

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08238

研究課題名(和文)細胞内動態のリモート制御を特徴とする核酸送達戦略の疾患治療への応用

研究課題名(英文) Application of the strategy for nucleic acid delivery aimed at remote control of intracellular dynamics to the therapy

研究代表者

鶴川 真実 (Ukawa, Masami)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50735511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：核酸はさまざまな疾患に応用可能な医薬であるが、細胞に取り込まれにくいこと、何らかの担体によって細胞内に導入することが必要である。本研究室にて開発した高分子は、細胞表面で核酸などの取り込みを促進することを期待して設計されており、この担体として使用できると考えた。さらに、核酸が細胞に入った後の動態については他の薬物を併用することによって制御可能であると仮説を立て、研究を行った。その結果、がん細胞では薬物との併用による遺伝子発現の亢進がみられ、細胞への取り込みおよび核内への遺伝子の移行が併用薬の使用により変化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に徐放性・根本的治療を目的とする核酸医薬やDDS製剤と、即効性・対症療法を得意とする低分子薬物との組み合わせは、実際の疾患の治療においても併用薬として相性が良いことが考えられる。本研究において得られた核酸と併用薬の相互作用の情報は、オリゴアルギニン固定化高分子を用いた導入法のみならず、他のキャリアを用いた核酸医薬においても重要な薬物相互作用情報となりうると考えている。

研究成果の概要(英文)：Nucleic acids are applicable for the therapy of various disease, but carriers are required to cellular delivery of nucleic acids. We considered that the polymer, which is designed based on the notion of the enhancement of cellular uptake of drugs on the surface on the cells, could be suitable for the carrier. Furthermore, we hypothesized that the dynamics of nucleic acid after the uptake could be controlled by other drugs. As a result, the enhancement of transgene expression by addition of other drugs was observed in the tumor cell lines. It was also implied that cellular uptake and translocation of genes into nucleus were effected by other drugs.

研究分野：製剤学

キーワード：核酸デリバリー 膜透過ペプチド プラスミドDNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Drug Delivery System (DDS)は、薬を作用部位に選択的に送達することにより、副作用の軽減やより効率的な薬効の発現を実現することを目的としている。多くの場合、DDS 製剤では、運び手であるキャリアに薬物を結合させることにより、標的部位への薬物送達を行う。薬物の送達効率を上げる方法として、キャリアそのものに特定の組織へ集積させるための機能性分子を修飾する方法がまず挙げられるが、その他に、組織の構造自体を薬物の集積に有利に改変する方法がある。例えば、抗がん剤によってがん細胞をある程度死滅させることによってナノ粒子の分布を改善する方法(Tumor priming)(Li D et al. J Pharmacol Exp Ther. 2007)や、血管構造の正常化によって血流を通して運ばれるナノ粒子の分布を改善する方法(Nakamura H et al. Eur J Pharm Biopharm. 2014)が報告されている。一方、申請者は過去に、低分子薬物の処置によって細胞核の形質変化が起こり、リポソームとプラスミド DNA (pDNA)の複合体の核への集積が亢進することを示している。本結果は、環境を変えることによって作用部位への集積性を上げる戦略が細胞内においても有効であるということを示唆している。しかしながら先に述べた結果では、リポソームが核へ集積することは確認されたが、これは同時に、作用部位である核へ到達してもリポソームから薬物が離れていない可能性が高いことを示唆している。

### 2. 研究の目的

核酸を細胞内分解経路から護りつつ細胞内の作用部位へ送達するためには核酸のキャリアへの搭載が必要であるが、作用部位へ到達した後も核酸がキャリアに搭載されたままでは薬効が発現しない。このような核酸キャリアのジレンマは、本リポソームに限らず、核酸 DDS において普遍的なものである。核酸の良好な細胞内取り込み・細胞内動態制御を達成するためには、核酸をナノ粒子などのキャリアに搭載して運ぶことが有効である。しかし、薬効の発揮のためには核酸をキャリアから分離する必要があり、その分離を細胞内で制御することは困難である。そこで本研究では、本研究室で開発した新規の膜透過促進剤のオリゴアルギニン固定化高分子を利用し、オリゴアルギニン固定化高分子により細胞膜上でエンドサイトーシスを引き起こすことにより核酸を細胞内へ導入し、併用薬によって細胞内環境を変化させ、細胞内における核酸の作用部位への集積に有利にするという戦略を立案した。

### 3. 研究の方法

1) がん細胞における併用薬による遺伝子導入効率のフローサイトメトリーを用いた検討

a) pDNA の発現に対するドキシソルピシン(DXR)の影響の評価  
48-well プレートに HeLa 細胞懸濁液を播種し、37 °C で 24 時間インキュベートした。細胞懸濁液を取り除き、PBS で洗浄した後、PBS を用いて各 DXR 混合溶液を調製し、細胞に添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。  
混合溶液を取り除き、PBS で洗浄した後、DMEM 培地を用いて EGFP 発現プラスミド DNA (pEGFP-C1) (5 µg/mL) およびオリゴアルギニン固定化高分子(10 µg/mL)の混合溶液を調製し、細胞に添加し、37 °C で 4 時間インキュベートした。DMEM 培地に置換し、37 °C で 20 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、DMEM 培地およびトリプシン EDTA を添加して回収した細胞の平均蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。

b) pDNA の細胞内取り込みに対する DXR の影響のフローサイトメトリーを用いた評価  
48-well プレートに HeLa 細胞懸濁液を播種し、37 °C で 24 時間インキュベートした。細胞懸濁液を取り除き、PBS で洗浄した後、PBS を用いて DXR 混合溶液を調製し、細胞に添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。  
混合溶液を取り除き、PBS で洗浄した後、EIPA 非添加サンプルでは DMEM 培地を用いて Cy5 ラベルプラスミド DNA (pDNA) (2.5 µg/mL) およびオリゴアルギニン固定化高分子 (5 µg/mL) の混合溶液を調製し、EIPA 添加サンプルでは、混合溶液の曝露開始 30 分前に培地に EIPA (0.01 mM) を添加し、同濃度の EIPA を添加した pDNA およびオリゴアルギニン固定化高分子の混合溶液を調製し、細胞に添加し、37 °C で 4 時間インキュベートした。  
PBS で洗浄した後、DMEM 培地を添加、トリパンブルー(TB)処理して回収した細胞の平均蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。

c) NanoLuc 発現を指標とした他の併用薬の評価  
96-well プレートに Colon26 細胞懸濁液を播種し、PBS を用いてパクリタキセルまたはデキサメタゾンの溶液を調製し、それぞれ細胞に添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。  
混合溶液を取り除き、PBS で洗浄した後、DMEM 培地を用いて NanoLuc 発現 pDNA (0.75 µg/mL) およびオリゴアルギニン固定化高分子(7.5 µg/mL)の混合溶液を調製し、細胞に添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。  
混合溶液を取り除き、PBS で洗浄した後、フェノールレッド非含有の DMEM を各 well に加え、Nano-Glo® Luciferase Assay system (Promega)の所定の試薬を添加し、ルミノメーターで発光量の測定を行った。

### 2) 粘膜上皮細胞モデルにおける併用薬および炎症の影響

24-well plate に Caco-2 細胞を播種し、24 時間、37 °C でインキュベートした。上清を取り除き、炎症惹起サンプルには IL-1 (3.125 ng/mL), INF- (6.25 ng/mL), TNF- (6.25 ng/mL),

LPS (1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の混合液を添加し、24時間、37 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。混合液を取り除き、セレコキシブ (10  $\mu\text{M}$ )、5-アミノサリチル酸 (10  $\mu\text{M}$ )、デキサメタゾン (10  $\mu\text{M}$ )を添加し、24時間、37 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。混合液を取り除き、PBSでwash後、FITC-OVA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )とオリゴアルギニン固定化高分子(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の混合液を添加し、24時間、37 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。PBSでwash後、フローサイトメトリー及び共焦点レーザー顕微鏡で核と同じ高さにある蛍光標識分子の局在の評価を行った。

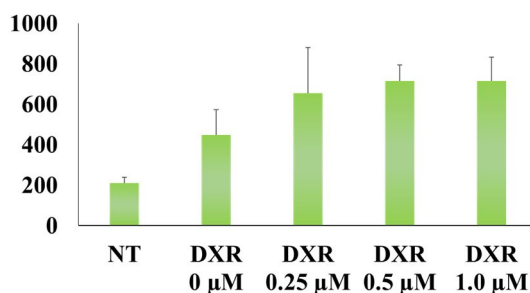
### 3) in vivo 局所投与における併用薬の効果の検討

Colon26細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mouse)をBalb/cマウスの腹側部皮下に移植することにより腫瘍を形成させ、腫瘍部にデキサメタゾンまたはパクリタキセルを投与し、それと同日もしくは翌日にオリゴアルギニン固定化高分子とNanoLuc発現pDNAの混合液を投与し、一定時間後に腫瘍を摘出し、Passive Lysis buffer (Promega)中に溶解させた後に遠心操作を行い、上清にNano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay system (Promega)の所定の試薬を添加し、ルミノメーターで発光量の測定を行った。

## 4. 研究成果

### 1-a) がん細胞におけるDXRによる遺伝子導入効率の向上

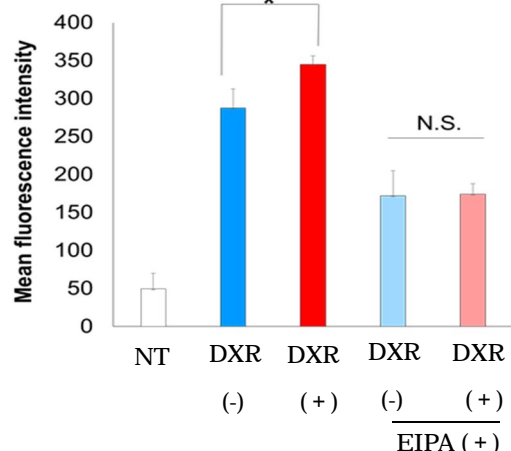
まず、リボソームを用いた遺伝子キャリアで遺伝子発現効率の向上が確認されていた併用薬であるDXRを用いて検討を行った。その結果、右図に示したように、DXRを0.5  $\mu\text{M}$ 程度加えることにより、オリゴアルギニン固定化高分子を用いた遺伝子導入においてもDXRを用いて遺伝子発現量が向上することが明らかとなった。



### 1-b) pDNAの細胞内取り込みに対するDXRの影響の評価

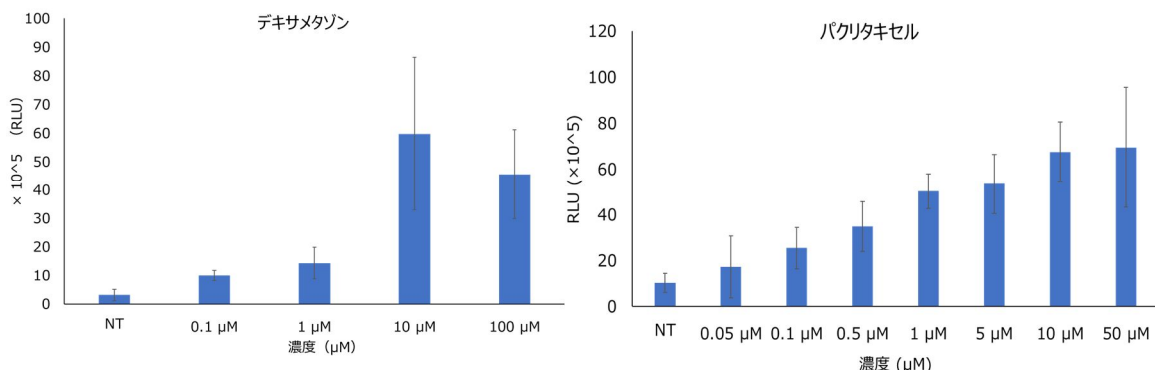
次に、DXRによるpDNA発現変化に関与している条件を確認するため、オリゴアルギニン固定化高分子による細胞内取り込みの主要なメカニズムと目されるマクロピノサイトーシス阻害剤 (EIPA)存在下において、DXR処置時の細胞内取り込み量について評価を行った。その結果、EIPA非処置時にはDXR添加サンプルの方が取り込み量が有意に高く、EIPA添加時にはこの有意差は消失した。

1-aおよび1-bの結果より、がん細胞においてin vitroにおいてDXRによる遺伝子発現上昇効果が得られ、これにはマクロピノサイトーシスが関与していることが示唆された。



### 1-c) NanoLucを用いた他の併用薬の影響の評価

DXR以外の併用薬の影響を確認するため、パクリタキセルとデキサメタゾンを処置した細胞においても遺伝子導入を行った。なお、本実験では細胞は正常マウスに移植可能ながん細胞であるcolon26細胞を用いた。その結果、パクリタキセルとデキサメタゾンも処置濃度依存的に遺伝子発現を増加させられることが明らかとなり、併用薬として使用できることが示唆された。

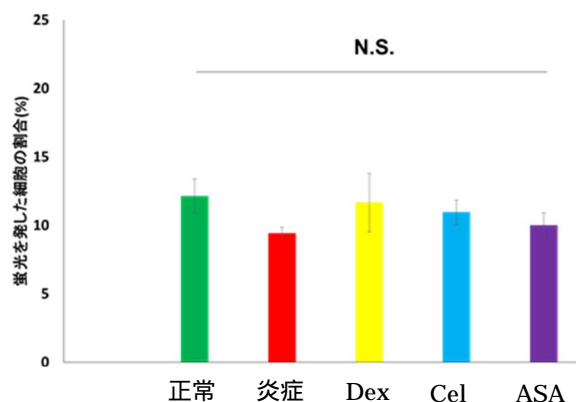


### 2) 粘膜上皮細胞モデルにおける取り込みへの影響

次に、粘膜上皮細胞モデルである Caco-2 細胞を用い、抗炎症薬を併用薬として遺伝子発現活性の変化の評価を試みた。しかし、オリゴアルギニン固定化高分子を用いてプラスミド DNA の導入を行ったところ、Caco-2 細胞ではほとんど遺伝子発現がみられず、併用薬によっても検出可能な遺伝子発現は確認されなかった。

そこで、細胞内取り込みの影響のみを確認するため、タンパク質 (FITC ラベル ovalbumin, FITC-OVA) を用い、炎症の有無と併用薬 (デキサメタゾン (Dex)、セレコキシブ (Cel)、5-アミノサリチル酸 (ASA)) による細胞内取り込みの変化の評価を行った。なお、併用薬は炎症惹起細胞に対して使用した。右図に示す通り、炎症および併用薬の影響はほとんど観察されなかった。

以上の結果より、併用薬による細胞内取り込みの向上は、粘膜上皮細胞モデルの Caco-2 細胞では再現が難しいことが明らかとなった。そこで、動物実験は腸管粘膜モデルについては行わず、がんモデルを用いて行うこととした。



### 3) in vivo 局所投与における併用薬の効果の検討

Colon26 細胞を用いて腫瘍を形成させたマウスに対して併用薬剤および pDNA、高分子を投与することにより、併用薬の遺伝子発現への影響の評価を試みた。その結果、腫瘍においては pDNA と高分子のみを投与した群において遺伝子発現がほとんど起こらず、併用薬による遺伝子発現活性上昇も観察されなかった。併用薬はオリゴアルギニン固定化高分子の本来の機能である細胞内取り込み能もしくは取り込まれた後の過程を促進するものと考えられるため、細胞内取り込み自体が十分でない系においては、別のアプローチの併用が必要であることが示唆された。

以上の結果より、本研究のコンセプトである細胞内動態のリモート制御は、in vitro のがん細胞においては一定の成功を収めたと考えられる。本研究で用いたオリゴアルギニン固定化高分子は、pDNA のみならず、抗体やペプチド、さらにはインフルエンザ不活化ウイルスなどの巨大な構造物も導入可能であることが示されている。そこで、助成期間終了後には、in vivo や導入能の低い細胞に対する製剤的アプローチについては検討を続け、lipoplex 化した pDNA などをオリゴアルギニン固定化高分子を用いて取り込ませることによる遺伝子導入効率の改善を試み、この成否が明らかとなった時点でこれまでの成果も併せて論文投稿を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南口遥加, 鶴川真実, 西野真名仁, 飛田悦男, 佐久間信至
2. 発表標題 オリゴアルギニン固定化高分子によるプラスミドDNAの細胞内取り込みに対するドキシソルピシン曝露の影響の検討
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐久間 信至  (Sakuma Shinji)  (80388644)	摂南大学・薬学部・教授    (34428)	