

平成 21年 5月 27日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18209006
 研究課題名（和文） 体内および細胞内リアルタイム動態解析に基づく遺伝子キャリアデザインの最適化

研究課題名（英文） Development of gene carriers based on in vivo and intracellular distribution real-time analysis

研究代表者

橋田 充 (MITSURU HASHIDA)
 京都大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：20135594

研究成果の概要：

本研究の目的は、in vivo において十分な効果を発現する遺伝子導入ベクター開発に必要な、生体内および細胞内での遺伝子キャリアの動態をリアルタイムで評価できる実験法を確立し、その評価解析結果に基づいてキャリアを合理的に設計することである。非ウイルス性遺伝子導入キャリアとプラスミド DNA の複合体の in vivo ならびに細胞内の動態を解析し、遺伝子発現と動態との関係を明らかにし、細胞内動態とキャリアの安全性の観点からその関係を明らかにした。また、これらの情報を基に遺伝子導入キャリアの設計および開発並びにマウスの肺がんモデルを用いた治療への応用を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
年度			
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患に対する治療法として遺伝子治療が注目を集めており、これを実現するためには効果的に遺伝子を導入できるベクターの開発研究が精力的に実施されている。これらには、ウイルスを用いるアプローチに加え、カチオン性リポソームやカチオン性高分子などの非ウイルスベクターが挙げられる。しかしながら、これら多くの研究は、遺伝子発現効率というエンドポイントだけに注視したスクリーニング研究すぎず、その非体系

的な研究から得られる情報だけで実用的なキャリアを創製することは極めて難しく、実際に研究は遅々として進んでいない。生体内に投与された外来遺伝子から目的のタンパク質が発現されるに至るまでには、投与部位から標的細胞へ到達するまでの障壁、標的細胞外から遺伝子の転写部位である核に至るまでの障壁が数多く存在している。したがって、in vivo において十分な効果を発現する遺伝子導入ベクターを開発するためには、生体内および細胞内での遺伝子キャリアの動

態をリアルタイムで評価できる実験法を確立し、その評価解析結果に基づいてキャリアを合理的に設計することが必要不可欠である。

申請者は、長年に渡る研究の中で、ファーマコキネティクスを基盤として DDS 製剤を合理的に設計するコンセプトを確立し、高分子プロドラッグ、修飾タンパク質、微粒性子キャリアなど新規なターゲティング型薬物キャリアを数多く生み出してきた。さらに近年は、*in vivo* 遺伝子導入に関する研究にも着手し、プラスミド DNA およびその複合体の物性と体内動態との相関を解析するとともに、糖修飾キャリアによる肝実質細胞や樹状細胞への遺伝子導入についても成功を収めている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子キャリアの合理的設計を目的とした基盤的研究として、遺伝子キャリアの動態(特に細胞内動態)解析法の開発、安全性評価法の開発、および体内・細胞内動態解析に基づく新しいキャリアの設計・開発に取り組んだ。具体的には、(1)細胞内でのリアルタイム動態解析法の開発を目的に、検出力の高いプラスミド DNA 蛍光標識法を開発し、細胞内器官の染色を併せて行うことによる、顕微鏡下での細胞内動態の評価、(2)安全性の高いキャリア開発を目的とした非ウイルス性遺伝子キャリアによるサイトカイン産生およびその上流の転写因子の同定および活性化の評価、(3)受容体介在性輸送を利用した細胞取り込み効率の増大、(4)*in vivo* でのリアルタイム転写活性評価を可能にする新規プラスミド DNA の構築(5)遺伝子発現効率の増大およびサイトカイン産生抑制を目的としたエンドソーム内分解回避機構を具備した新しいキャリアの創製、を行った。以下、得られた成果について報告する。

3. 研究の方法

プラスミドの蛍光標識：プラスミド DNA は Label IT Kit を用いて Fluorescein または TMR により標識を行った。また量子ドットによる標識を行った。

NFκB 応答型プラスミド DNA の作成：CMV プロモーターの上流に NFκB 結合領域を 5 ~ 20 回繰り返し挿入したプラスミドを作成した。

IL-12 発現プラスミドの作成：CMV プロモーターの下流にマウス IL12 の配列を挿入したプラスミドを作成した。

カチオン性リポソームまたはカチオン性ポリマーとプラスミド DNA 複合体の調製：カチオン性リポソームは構成脂質をクロロホルム中で混合しエバポレーション後、5%デキ

ストロース中に超音波照射し分散させて作成した。(DOTMA:Cholesterol=1:1, DOTAP:Cholesterol=1:1)作成したリポソーム溶液とプラスミド DNA を室温で混合し複合体を調製した。PEI を 5%デキストロース中に分散させ、プラスミド DNA を室温で混合し複合体を調製した。

赤血球相互作用回避した肝指向型キャリア/プラスミド DNA 複合体の調製：プラスミド DNA と PEI を N/P 比 20 で 5%デキストロース中に複合体を形成させ、室温で 30 分静置させた後、Gal 修飾 BSA5%デキストロース溶液を添加し複合体を調製した。

免疫応答制御型キャリア/プラスミド DNA 複合体の調製：NFκB デコイと肝 Kupffer 細胞指向性キャリア Fuc リポソーム 5%デキストロースで複合体を調整した。カチオン性リポソーム構成脂質に all trans retinoic acid (ATRA)を混合し、5%デキストロース中でリポソームを作成した。

細胞毒性の評価：MTT アッセイ法により生存細胞数を測定した。

サイトカイン濃度の測定：プラスミド DNA/キャリア複合体を細胞へ取り込ませた後の培養液または、複合体を投与後の血清または組織のホモジネート中の TNFα、IL6、INFγ などのサイトカインを ELISA 法により測定した。

肝臓における炎症の評価：プラスミド DNA/キャリア複合体をマウスへ投与後、肝炎の指標として血清中の AST・ALT 活性を測定した。また、肝臓を取り出しパラフィン切片を作成し H/E 染色により形態学的変化を観察した。肺がんモデルマウスの作成：CDF1 マウスに colon26 又は colon26/Luc 細胞を静脈内より投与することにより作成した。

4. 研究成果

(1)プラスミド DNA/キャリア複合体の静脈内投与後の安全性の評価とリアルタイムでモニターする方法の開発

カチオン性リポソームまたはカチオン性ポリマーとプラスミド DNA 複合体の静脈内投与後の NFκB 活性、サイトカイン産生および肝炎症の評価：遺伝子導入キャリアの開発においては投与後の生体に与える影響を基に安全性を考慮したキャリアデザインが必要とされる。そこで *in vivo* で高い遺伝子導入効率が可能で、既に広く利用されている代表的な非ウイルス性の遺伝子導入キャリアであるカチオン性リポソーム並びにカチオン性ポリマー (PEI) に焦点をあて、より安全性の高い遺伝子導入キャリアデザインを目的に、遺伝子導入効率と安全性の関係の評価を行った。一般的に高い遺伝子発現を得るには、投与量および正電荷を増大させる混合比を選択することが重要である。そこで各種投与量および混合比で調製したプラスミ

ド DNA/キャリアの複合体をマウスへ投与し、投与による代表的な影響として組織または血清中の炎症性サイトカイン産生誘発や肝臓での炎症誘発などが挙げられる。そこで代表的な遺伝子導入キャリアであるカチオン性リポソームおよびカチオン性ポリマーとプラスミド DNA 複合体を投与後の血清中のサイトカインおよび肝炎の指標である血清中の ALT および AST の活性を測定した。カチオン性リポソームの場合は、投与量および正電荷が増加する混合比において遺伝子発現の増加、サイトカインおよび AST・ALT の増加が認められたが、カチオン性ポリマーの場合は、遺伝子発現の増加が認められるものの、サイトカインおよび AST・ALT の増加は認められなかった。さらにサイトカイン産生に関係する転写調節因子 NF κ B の活性化についても同様の結果が得られ、これらのサイトカイン産生に NF κ B 活性化の経路が関与することが示唆された。

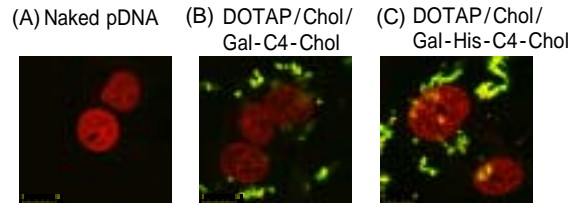
in vivo における NF κ B 活性のリアルタイムモニター法の開発：そこで、*in vivo* での遺伝子導入による安全性のリアルタイムモニターを目的に、NF κ B の活性化にตอบสนองしてルシフェラーゼ発現が増大するプラスミドを作成した。転写調節因子 NF κ B は活性化されると核へ移行し、核内の活性化された NF κ B 量が増大する。そこで、CMV プロモーターを有しルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA のプロモーターの上流に NF κ B 結合領域を 5 ~ 20 個増大させたプラスミド DNA を作成した。マウスの尾静脈よりハイドロダイナミクス法で投与し、マウスを LPS などで NF κ B 活性化状態にし、ルシフェラーゼの発現量を *in vivo* イメージング装置により観察したところ、NF κ B の活性化にตอบสนองしたルシフェラーゼ発現の増大が認められた。従って、本プラスミド DNA を用いることにより *in vivo* での NF κ B 活性化をリアルタイムでモニターすることが可能になった。

(2) プラスミド DNA/キャリア複合体の細胞内動態と遺伝子発現および安全性に関する検討

細胞内動態制御に基づき遺伝子発現増大を可能にするキャリアの開発：遺伝子発現の一つの障壁としてエンドソーム内での酵素切断があげられる。そこで、ヒスチジンがエンドソーム内でプロトンスポンジ効果によりエンドソーム膜を破壊することを利用し、遺伝子のエンドソームからの脱出促進を目的に、従来の肝細胞ターゲット型リポソーム（ガラクトース修飾リポソーム：Gal リポソーム）にヒスチジンを導入した Gal-His リポソームを作成した。ガラクトースを認識するアジアロ糖タンパク質レセプ

ターを高発現する HepG2 細胞を用いて検討をおこなったところエンドソームからの脱出が確認された（図 1）。また Gal リポソームと比較し Gal-His リポソームにより遺伝子の取り込み量並びに発現量の有意な増加が認められた。

（図 1）

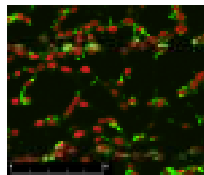
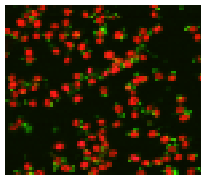


細胞内動態と NF κ B 活性化、サイトカイン産生に関する検討：我々は既に、カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体の静脈内投与後の血清中並びに肝臓でのサイトカイン濃度の上昇にはマクロファージが関与していることを明らかにしている。そこで、カチオン性リポソームとカチオン性ポリマーとの *in vivo* でのサイトカイン産生特性の原因の一つとして、マクロファージからのサイトカイン産生経路の一つである TLR 認識による NF κ B 活性化経路に着目した。TLR はエンドソーム内に発現しており、プラスミド DNA の CpG 配列を任視することが知られている。一方、代表的なカチオン性ポリマーである PEI はエンドソームのように pH が低い環境では水素イオンを捕捉するバッファリング能によりエンドソームを破壊することが知られており、プラスミド DNA のエンドソームからの脱出を促進する可能性が考えられる。そこでカチオン性リポソームまたはカチオン性ポリマーとプラスミド DNA の複合体の細胞内動態観察を目的に、プラスミドの蛍光標識を行った。次に、蛍光標識プラスミド DNA を用いてカチオン性リポソームまたは PEI との複合体を用いて細胞内動態を観察したところ、カチオン性リポソームとの複合体は顆粒状の分布が認められたが、PEI との複合体は細胞質全体に分布する様子が観察され（図 2）。PEI のバッファリング能によりプラスミド DNA のエンドソームからの脱出が促進されていることが示唆された。更に、PEI/プラスミド DNA 複合体を各種混合比で調製し、培養マクロファージからのサイトカイン産生並びに細胞内の NF κ B 量を測定したところ、正電荷が増加してもサイトカイン並びに NF κ B の増加は認められなかった。また、プラスミドの量が同じで混合比も同じカチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体と比較し、有意にサイトカインおよび NF κ B 量は有意に低かった。従って、細胞内動態、特にエンドソームからの脱出促進を考慮することにより、NF κ B 活性化並びにサイトカイン産生を抑制したキャリア開

(図2)

プラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体

プラスミドDNA/カチオン性ポリマー (PEI) 複合体



(緑: プラスミド、赤: 核)

発が可能であると考えられる。

(3) In vivo での安全性を考慮したプラスミド DNA/キャリア複合体の開発および治療への応用

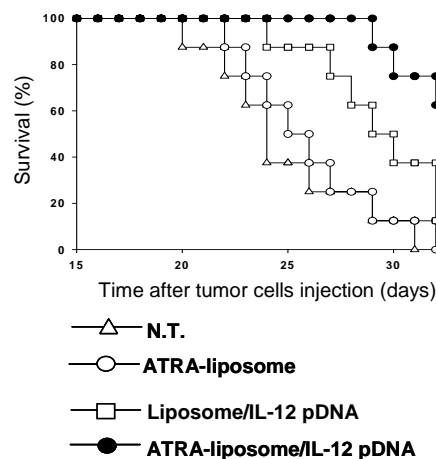
NFκB 活性化抑制型プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の開発: 本プロジェクトで得られた成果より in vivo でのサイトカイン産生ならびに肝炎誘発には Kupffer 細胞やマクロファージ中の NFκB 活性化が関与することが明らかになった。そこで、NFκB 活性化抑制を目的に、NFκB 活性抑制可能なオリゴヌクレオチドである NFκB デコイを Kupffer 細胞指向性キャリア (Fuc リポソーム) により Kupffer 細胞選択的に送達させた。NFκB デコイは Kupffer 細胞選択的に送達され、プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体投与による NFκB 活性化抑制、サイトカイン産生抑制効果ならびに肝炎の指標である血清中の AST・ALT の増加抑制効果が得られた。次に、NFκB 活性抑制を有する化合物 ATRA を封入したカチオン性リポソームを作成し、プラスミド DNA との複合体を調製しマウスへ投与したところ、同様に NFκB 活性化抑制、サイトカイン産生抑制効果ならびに肝炎の指標である血清中の AST・ALT の増加抑制効果が得られた。以上、NFκB 活性化抑制に基づくプラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体による免疫応答抑制が可能になった。

赤血球との相互作用を抑制したプラスミド DNA/カチオン性ポリマー複合体の開発: カチオン性ポリマー、PEI は、in vivo での高い遺伝子導入効率、炎症性サイトカイン産生を誘発しないなど遺伝子導入キャリアとして有効な性質を有する一方、投与後の血中での赤血球との凝集が問題となる。その原因の一つに複合体の表面にある正電荷との相互作用が指摘されている。そこで、複合体の表面電荷の中和を目的に、PEI/プラスミド DNA 複合体と赤血球の凝集抑制を目的に、PEI/プラスミド DNA/Gal-BSA の三次元複合体を調製した。三次元複合体により赤血球との凝集は抑制された。更に BSA にリガンドとして Gal 修飾を施している為標的指向性を同時に付与することも可能である。Gal 修飾は肝実質細胞への指向性を付与できることが知られており、今回作成した三次元複合体を投与後肝臓での遺伝子発現を測定したところ、肝実質細胞での高い遺伝子発現が確認された。従って、PEI/プラスミド

DNA/Gal-BSA の三次元複合体により、赤血球との凝集抑制並びに肝実質細胞指向性の付与が可能になった。

がん遺伝子治療への応用: 調製した ATRA 封入リポソームと作成した IL12 発現プラスミドの複合体を作成し、肺癌モデルマウスへ静脈内投与し、一定日数後、肺を摘出したところ、肺に転移した癌細胞数は、ATRA 封入リポソームのみまたは ATRA 不含リポソーム/プラスミド DNA 複合体を投与した場合と比較し、ATRA 封入リポソーム/プラスミド DNA 複合体を投与した場合は有意に少なかった。また、ATRA 封入リポソーム/プラスミド DNA 複合体投与により、生存期間の延長も認められた(図3) さらに、ATRA 封入リポソームのみまたは ATRA 不含リポソーム/プラスミド DNA 複合体を投与した場合と比較し、ATRA 封入リポソーム/プラスミド DNA 複合体を投与した場合は、肝切片の観察により形態学的な変化がほとんど認められず、肝炎誘発が抑制されたことが示唆された。

(図3)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

1. Yasunori Saito, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Immunostimulatory Characteristics Induced by Linear Polyethyleneimine/plasmid DNA Complexes in Cultured Macrophages. Human Gene Therapy, 20(2), 137-145 (2009) 査読有
2. Hidefumi Mukai, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida: Renal press-mediated transfection method for plasmid DNA and siRNA to the kidney. Biochemical and Biophysical Research Communicat

- ions, 372(3), 383-387 (2008) 査読有
3. Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Mitsuru Hashida: Pharmacokinetic considerations regarding non-viral cancer gene therapy. *Cancer Science*, 95(5), 856-862 (2008) 査読有
 4. Oranuch Thanaketsarn, Makiya Nishikawa, Takayuki Okabe, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Insertion of nuclear factor- κ B binding sequence into plasmid DNA for increased transgene expression in colon carcinoma cells. *Journal of Biotechnology*, 133(1), 36-41 (2008) 査読有
 5. Takayuki Nemoto, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Efficient protection by cationized catalase against H₂O₂ injury in primary cultured alveolar epithelial cells. *Journal of Controlled Release*, 121(1-2), 74-80 (2007) 査読有
 6. Miyuki Hohokabe, Yuriko Higuchi, Hidetoshi Mukai, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida: Hepatocyte-selective gene transfer by galactosylated protein/linear polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(3), 277-284 (2007) 査読有
 7. Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: The potential role of fucosylated cationic liposome/NF κ B decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease. *Biomaterials*, 28(3), 532-539 (2007) 査読有
 8. Ayumi Sato, Motoki Takagi, Akira Shimamoto, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida: Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials*, 28(7), 1434-1442 (2007) 査読有
 9. Yukari Kuramoto, Makiya Nishikawa, Kenji Hyoudou, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex. *Journal of Controlled Release*, 115(2), 226-233 (2006) 査読有
 10. Takeshi Terada, Mieko Iwai, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *Journal of Controlled Release*, 111(3), 333-342 (2006) 査読有

11. Shigeru Kawakami, Yoshitaka Ito, Pensri Charoensit, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1382-1390 (2006) 査読有
12. Takeshi Terada, Makiya Nishikawa, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Analysis of the molecular interaction of glycosylated proteins with rabbit liver asialoglycoprotein receptors using surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 966-972 (2006) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Wassana Wijagkanalan, Shigeru Kawakami, Mariko Kuroda, Hitoshi Sasaki, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida: Inhalation of Dexamethasone Palmitate Encapsulated Mannosylated Liposomes Efficiently Ameliorates LPS-Induced Lung Inflammation in Rats. 第 11 回国際リポソーム研究会議 2008 年 7 月 19 日 横浜
2. Pensri Charoensit, 川上 茂, 山下 富義, 橋田 充: Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by siRNA/polyethylenimine complexes. 第 24 回日本DDS学会 2008 年 6 月 29 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 充 (MITSURU HASHIDA)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 20135594

(2) 研究分担者

山下 富義 (FUMIYOSHI YAMASHITA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 30243041
川上 茂 (SHIGERU KAWAKAMI)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号: 20322307
樋口 ゆり子 (YURIKO HIGUCHI)
京都大学・薬学研究科・研究員
研究者番号: 40402797