

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究(G)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590046  
 研究課題名(和文) 生体膜貫通ペプチドとグライコフェクションによる遺伝子導入ミセルベクターの開発  
 研究課題名(英文) Development of oligoarginine-conjugated lipid vector for gene delivery  
 研究代表者  
 米谷 芳枝 (MAITANI YOSHIE)  
 星薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：10231581

## 研究成果の概要：

本研究では、遺伝子導入効率を上昇させるために、核移行能がある新規ラクトース脂質を合成し、これまでのオリゴアルギニン PEG 脂質に混合したナノ粒子を調製し、グライコフェクションによる遺伝子導入ベクターの開発を目的とする。自己凝集するオリゴアルギニン PEG 脂質と、ラクトース PEG 脂質をそれぞれデザインし、合成した。遺伝子とラクトース修飾オリゴアルギニンミセルベクターとの複合体の構造を物理化学的手法で調べ、培養細胞における遺伝子導入効率との関係も調べた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：6802

キーワード：(1)遺伝子ベクター (2)オリゴアルギニン (3)生体膜貫通ペプチド (4)リポソーム (5)非エンドサイトーシス (6)ミセル (7)ラクトース修飾 (8)遺伝子導入

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、難病の新規治療法として注目されている。この治療法の鍵は遺伝子導入である。

遺伝子はポリアニオンで核酸分解酵素によって分解されやすいために、遺伝子導入ベクターという遺伝子の運び屋が重要となるからである。これまでに様々な遺伝子導入ベ

クターが研究されている。これらは大別するとウイルスと非ウイルスベクターである。具体的には、遺伝子の核への送達には、ウイルスベクターでは遺伝子をウイルスに封入し、担体ごと一緒に標的細胞内へ取り込ませる。また、非ウイルスベクターでは正電荷を有する高分子担体やリポソームとの複合体にして

核への送達が行われている。現在、遺伝子治療には遺伝子導入効率が高いウイルスベクターが用いられている。しかし、遺伝子治療中のアデノウイルスの免疫反応でのショック死や、レトロウイルスによる白血病の誘発などウイルスベクターによる副作用が問題となっている。しかも、日本では、遺伝子導入ベクターとして米国製のウイルスベクターが用いられている。安全な国産非ウイルスベクターの開発が急務である。

非ウイルスベクターの問題点は、一般に遺伝子の発現効率が低いことである。申請者は、これまでにナノ技術を用いてリポソームなどの遺伝子ベクターを開発し、癌遺伝子治療への応用を検討してきた。その結果、従来の高分子担体やリポソームベクターなどでも、細胞内への取り込みは十分あるが、細胞内でエンドソームから遺伝子の脱出が不十分であることもわかってきた。そこで、ウイルスベクターのように非エンドサイトーシスの取り込み機構を示す非ウイルスベクターの開発が望まれる。

HIV-1 Tat タンパク質やショウジョウバエ Antp タンパク質由来の十数残基の塩基性ペプチドや、それらをモデルとしたアルギニンやリジンに富んだペプチドには、それらを結合した蛋白質や核酸等に高い細胞膜透過性を与えることが知られている。これまでに、このような生体膜貫通ペプチドの一つであるオリゴアルギニンを脂質分子に結合した化合物を合成し、それでリポソームを修飾することにより、非エンドサイトーシスで細胞膜を透過するリポソームベクターを調製し、遺伝子導入効率を評価してきた。その結果、オリゴアルギニンの鎖長が10で、脂質分子に対してポリエチレングリコール(PEG)リンカーがあるときに、遺伝子導入効率が高くなることを明らかにした。また、オリゴアルギニンPEG脂質は自己凝集してミセルを作ることにも明らかにした。しかしながら、その遺伝子発現効率は既存の遺伝子導入試薬とほぼ同等であった。この結果は、エンドソームからの遺伝子の脱出だけでなく、核膜を突破し、遺伝子が核内へ入らなければ、効率的な遺伝子発現は望めないことを示唆した。

一方、正電荷を有する高分子ベクターでは、糖を高分子の先端に結合すると核には核レクチンがあるので、核への遺伝子移行が増加し、遺伝子導入効率が上昇することが報告され、グライコフェクションといわれている。リポソームベクターにおいても、糖修飾したときの遺伝子導入効率が最近研究されるようになってきた。

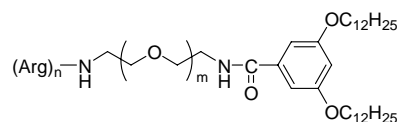
## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入効率を上昇させるために、遺伝子をコンパクトにし、細胞膜に作

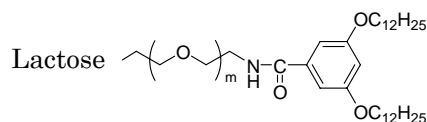
用する最適なオリゴアルギニン鎖長と PEG リンカー鎖長を有し、自己凝集する新規オリゴアルギニン PEG 脂質と新規糖脂質をそれぞれデザインし、合成する。つぎに、この新規オリゴアルギニン PEG 脂質からなるミセルに新規糖脂質を添加した、糖修飾オリゴアルギニンミセルベクターを開発する。さらに、遺伝子とオリゴアルギニン PEG 脂質ミセルベクターとの複合体の構造を物理化学的手法で調べ、培養細胞における遺伝子導入効率との関係も調べる。これらによって、ミセルベクターの遺伝子導入機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 生体膜貫通ペプチド PEG 脂質の合成  
オリゴアルギニンの鎖長 ( $n=4, 10$ ) で、オリゴアルギニンと脂質分子を結ぶリンカー構造 (ポリエチレングリコール(PEG)脂質の鎖長,  $m=43$ , 分子量 2,000) の各種誘導体を合成した。基本的骨格は PEG をリンカーとする人工脂質誘導体である。その構造を下に示す。取り込み機構解析のために、同時に脂質末端に蛍光標識したものも合成した。



(2) ラクトース PEG 脂質の合成  
ラクトース結合した PEG ( $m=43$ , 分子量 2,000) 脂質を合成した。



(3) オリゴアルギニンミセルベクターの糖修飾最適量の決定

オリゴアルギニンミセルベクターへの糖脂質の最適添加量を決定するために、糖修飾ミセルの表面状態や安定性、粒子径を測定した。また、これらのミセルベクターの安定性を、血清存在下でインキュベーション後の粒子径測定によって評価した。

(4) オリゴアルギニンミセル、またはリポソーム/DNA 複合体形成と遺伝子発現評価  
最適糖修飾オリゴアルギニンミセル、またはリポソームベクターを用いて、ヒトの子宮頸癌細胞である HeLa 細胞における遺伝子の取り込みと遺伝子発現を評価した。ミセルでは 5  $\mu\text{M}$  脂質濃度、リポソームは

EPC:コレステロール:Arg10-脂質= 7:3:0.5 (モル比)で調製し、サイズは超音波照射をして約200nmに調整した。表面電位は約54mVであった。

DNAとしては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA pCMV-lucを用いた。ミセル、またはリポソーム/DNA複合体を3時間無血清培地で、その後血清存在下で21時間インキュベーションした。遺伝子導入効率は、発現したルシフェラーゼをルミノメーターで測定した。

正電荷ミセルベクターと負電荷DNAとの複合体の最適な荷電比(混合比)を表面電荷と粒子径測定、培養細胞でのルシフェラーゼ遺伝子の発現から決定した。また、DNAの複合体の取り込みはフローサイトメーターと、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。さらに、複合体の構造は、位相差電子顕微鏡、暗視野顕微鏡や1分子蛍光分析法で調べた。

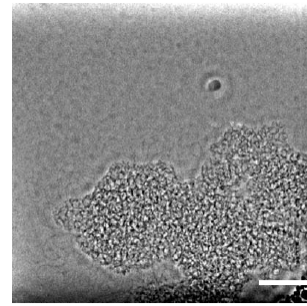
(5) 糖修飾オリゴアルギニンミセルまたはリポソーム/DNA複合体の細胞内取り込み機構解明

グライコフェクションによる細胞内取り込み機構は、各種阻害剤処理と温度変化における取り込み量の変化をフローサイトメトリーによって調べた。また、インキュベーション3時間後に取り込まれた蛍光ラベル化したDNAとリポソームを共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

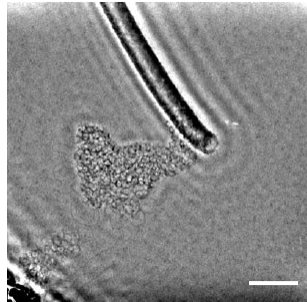
#### 4. 研究成果

オリゴアルギニンミセルベクターでは、デカアルギニンが最も高い遺伝子発現を示したので、以下の実験では、デカアルギニンを用いることにした。オリゴアルギニンPEG脂質は自己凝集性があり、ミセルを形成する。蛍光物質のピレンを用いた測定から、臨界ミセル濃度(CMC)は $20.9\mu\text{M}$ であることが明らかになった。また、このミセル濃度以下の $5\mu\text{M}$ において、CMC濃度以上のときより、高い遺伝子発現を示した。

位相差電子顕微鏡によってこの複合体を観察すると、籠状構造をとっており(図1A)、さらに脂質濃度が高くCMC以上の濃度になるとファイバー状の構造が観察された(図1B)。これらの結果は、デカアルギニン脂質はミセルである必要はなく、DNAとデカアルギニン脂質の特殊な籠状構造が遺伝子の取り込み、発現に有効であると考えられた。



(A)



(B)

図1 デカアルギニンミセルとDNA複合体の位相差電子顕微鏡写真

また、ミセルベクターの対照として、デカアルギニン修飾リポソームを用いた。まず、デカアルギニンリポソームベクターへの糖脂質の最適添加量を決定するために、糖修飾リポソームの表面状態や安定性を表面電位と粒子径測定によって調べた。その結果、リポソームとして粒子径を変化させず、5mol%まで糖脂質を添加できることが明らかとなった。また、糖脂質添加リポソームベクターの安定性を、血清存在下でインキュベーション後の粒子径測定によって評価した結果、粒子径の変化はほとんどなく安定であった。

糖修飾デカアルギニンミセルでは、 $5\mu\text{M}$ デカアルギニン脂質に対して $5\mu\text{M}$ 、または $10\mu\text{M}$ 糖脂質を用いて、また、DNAと混合する順序をそれぞれ変えて複合体を調製した。その結果、糖脂質とデカアルギニン脂質を混合してからDNAと混合すると、遺伝子発現が最も低下し、その他の場合においても有意な遺伝子導入効率の改善はみられなかった(図2)。

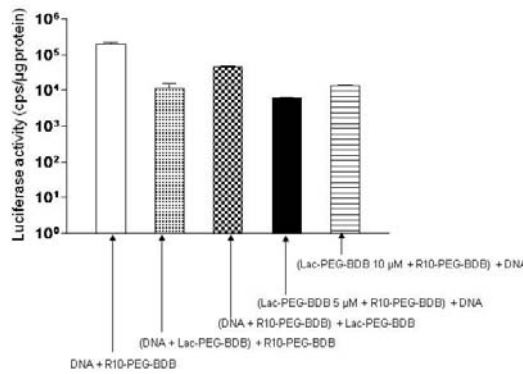


図2 各ラクトース修飾デカアルギニンミセルの遺伝子発現

これはデカアルギニンミセルでは糖脂質のような他の成分が添加されると籠構造等の変化が起こりやすく、遺伝子導入効率が低下するためと推察した。

一方、デカアルギニンリポソームベクター(Arg10-PEG-L)である未修飾リポソーム(Plain)と糖修飾したリポソーム(Lac-PEG-BDB)によるプラスミドDNAの荷電比(+/-)1で複合体を形成し、遺伝子導入効率の評価を行った結果、導入効率は未修飾リポソームとほぼ同等であった(図3)。さらに、細胞内に取り込まれた後エンドソーム膜と融合して遺伝子導入効率を上昇させることが知られている融合脂質であるDOPEをリポソームに添加しても、改善は見られなかった。

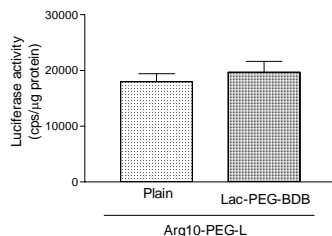


図3 ラクトース修飾デカアルギニンリポソームベクターの遺伝子発現

これらのミセルとリポソームベクターとDNA複合体の細胞内での取り込み機構については、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、デカアルギニンミセルやリポソームベクターとのDNA複合体は、細胞内に取り込まれた後に、テトラアルギニンベクターとの複合体に比較して速やかにDNAを放出することが明らかになった(発表論文1)。また、フローサイトメーターによる細胞内取り込みでは、マクロピノサイトシス透過経路阻害剤であるNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors amiloride

によって強く阻害され、クラスリンやカベオラ透過経路による取り込み阻害剤の影響はほとんど受けないことにより、デカアルギニンミセルとリポソームベクターともにマクロピノサイトシスによって取り込まれると推察された(発表論文1)。

核移行能がある新規ラクトース脂質と、マクロピノサイトシスによる取り込みを示すデカアルギニンPEG脂質からなるミセルベクターは、グライコフェクションによって導入効率の大きな改善はみられなかった。今後、さらに糖PEG脂質のリンカーであるPEG鎖長を長くし、核にある受容体認識を高めることによって導入効率の高い遺伝子導入ベクターの開発が可能となると考える。

#### 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 6件)

1. M. Furuhata, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG, Int J Pharm. 37(1-2):40-46 (2009).
2. T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, Int J Pharm. 368, 186-192 (2009).
3. W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, Biol. Pharm. Bull. 32(2):311-315 (2009).
4. W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, Chem. Pharm. Bull. 57(2), 138-143 (2009).
5. T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, High gene delivery in tumor by intratumoral injection of tetraarginine-PEG lipid-coated protamine/DNA, J. Control. Release, 129(2)124-127

(2008)

6. M. Furuhashi, Y. Hattori and Y. Maitani, Novel oligoarginine-linked PEG-lipid micelles for gene delivery, Proc. Hoshi Univ., 50: 21-32 (2008).

[学会発表] (計 7件)

1. 古幡昌彦、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 オリゴアルギニンPEG修飾リボソームによる細胞内取り込み経路および遺伝子発現 日本薬学会 第128年会 (横浜) 2008年3月26-28日
2. 小林昇平、古幡昌彦、R. Danev、永山國昭、戸潤一孔、服部喜之、米谷芳枝、原口徳子、オリゴアルギニン脂質/DNA複合体の細胞内動態 遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム 2008年5月9日(大阪)
3. 丁武孝、服部喜之、米谷芳枝 MEL-A modified MHAPC-liposomes for gene delivery in vitro and in the lung. 第10回応用薬理シンポジウム 2008年6月7-8日(東京)
4. 丁武孝、泉澤友宏、服部喜之、米谷芳枝 MEL-A and Tween 80 modified cationic liposomes for gene transfection in vitro and in the lung. 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE (横浜), 2008年7月19-22日
5. Y. Maitani, Liposomal Drug Delivery : An Update, 22nd Federation of Asian Pharmaceutical Association Congress 2008年11月7-10日(シンガポール)
6. 古幡昌彦、川上宏子、戸潤一孔、服部喜之、米谷芳枝、オリゴアルギニンミセル/DNA複合体の構造と遺伝子導入効率、日本薬剤学会第22年会 2007年5月21-23日(埼玉)
7. 古幡昌彦 オリゴアルギニン脂質ベクターによる遺伝子の細胞内移行促進、日本薬剤学会第22年会 2007年5月21-23日(埼玉)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

米谷 芳枝 (MAITANI YOSHIE)  
星薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：10231581

## (2)研究分担者

川上 宏子 (KAWAKAMI HIROKO)  
野口研究所・研究部・研究員  
研究者番号：40320254