

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790129
 研究課題名 (和文) Plasmid DNA の臓器表面投与方法における取り込み機構の解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of uptake mechanism of plasmid DNA after organ surface administration
 研究代表者
 麓 伸太郎 (FUMOTO SHINTARO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70380988

研究成果の概要：

遺伝子治療法は、癌などの難治性疾患に対する治療法として期待されているが、臨床応用に至った例に乏しい。我々は、plasmid DNA 単体を肝臓などの臓器表面に、臓器・部位選択的かつ安全に導入可能なことを報告しているが、遺伝子導入効率に改善の余地がある。そこで、本研究では遺伝子導入に必要な plasmid DNA の細胞取り込み機構を明らかにし、遺伝子導入の促進剤の探索に有益な知見を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：医療薬剤学、DDS、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

先天性遺伝子欠損症、癌等の様々な難治性疾患に対する治療法として遺伝子治療法が期待されている。遺伝子治療法の方法論として、体外に組織、細胞等を取り出し、in vitro で標的遺伝子を導入し、再び体内に戻す ex vivo 法と、遺伝子医薬品を直接体内に注入する in vivo 法があるが、患者の負担や操作の煩雑さなどを考えると、in vivo 法の確立が望まれる。また、遺伝子導入の方法は、ウイルス性ベクター、非ウイルス性ベクターの2つに大別され、ウイルス性ベクターでは効率的な

遺伝子導入が可能であるが、治験中に白血病の発生(Check E., Nature, 420, 116-118 (2002))や毒性による死者が出る(Marshall E., Science, 286, 2244-2245 (1999))など安全性に関して大きな問題がある。一方、非ウイルス性ベクターでは遺伝子導入効率の面ではウイルス性ベクターに及ばないが、ウイルス性ベクターより安全であり、ヒトへの臨床応用を考えた際には非ウイルス性ベクターの開発を進めるのが理想的である。ベクターの投与経路として、血管内への遺伝子デリバリー(Kawakami S., et al., Pharm. Res., 17, 306-313

(2000) etc.)においては、理論上広範な細胞への遺伝子導入が可能である反面、標的細胞以外への移行が副作用に繋がる可能性が高く、標的細胞に遺伝子を如何に効率的に送達するかが重要な課題となっている。また、標的組織への直接注射(Hickman M. A., et al., Hum. Gene Ther., 5, 1477-1483 (1994) etc.)では標的部局特異的遺伝子導入が可能であるが、組織への注入にともなう物理的な傷害が懸念され、頻回投与の妨げになる。従って、安全かつ標的部局特異的に遺伝子を導入し得る方法の開発が強く望まれる。

我々は、臓器レベルのみならず病巣部局特異的な薬物の送達を目的として、世界に先駆けて、標的臓器の表面へ薬液を直接滴下する方法を開発し、種々の薬物を腹腔内の各臓器、部局に適用し、基礎的情報を蓄積してきた(右図)。そこでこの臓器表面投与法を遺伝子に応用し、plasmid DNA をマウスの腹腔内の臓器表面へ滴下したところ、標的臓器・部局選択的な遺伝子発現が得られた(Kawakami S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 294, 46-50 (2002) etc.)。この方法は、臓器への物理的な傷害も起こらず、plasmid DNA 単体を用いることから安全ではあるが、遺伝子導入効率に改善の余地があり、更に研究を進める必要がある。

2. 研究の目的

最終的な目標は、臓器表面投与法のヒトへの臨床応用であるが、遺伝子導入効率や種差の問題など解決すべき課題は多い。これらの課題を合理的に解決するためには、遺伝子導入機構を解明することが必要不可欠である。遺伝子を投与してから実際に遺伝子発現に至るまでには、取り込み過程、核内移行といった様々な過程が存在し、それぞれが障壁となり得るので、各過程が遺伝子導入においてどのように寄与しているのかを解析する。

臓器表面投与法では臓器レベルでの移行は既に達成しているため、細胞レベルでの導入機構が検討の対象となるが、そのうち最初の過程である取り込み機構の解明を本研究の目的とする。

取り込み機構を解明するために、plasmid DNA が拡散によって細胞内に移行するのか、それともエンドサイトーシスによって移行するのかを明らかにする。細胞膜の透過による場合、担体の有無と同定、膜との相互作用等について解析する。エンドサイトーシスによる場合、エネルギー依存性の確認、クラスリン介在性エンドサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスといった経路の同定、レセプターの有無と同定などを行う。これらのうち複数の経路が取り込みに関わっており、それぞれ遺伝子発現に至る経路と至らない経路がある可

能性も考えられる。こういった定性的な解析のみならず、投与した plasmid DNA がどの程度取り込まれるかといった定量的な解析も併せて行う。

3. 研究の方法

臓器表面投与時における plasmid DNA の取り込み機構を解明するためには、各種阻害剤の使用、plasmid DNA 溶液や薬液の処理時間の制御、溶液の組成の選択などが不可欠である。臓器表面に滴下すると溶液が瞬時に拡散し、一方、静脈内投与では影響が全身に及んでしまうため、in vivo でこれらの条件を適用することは実質的に不可能である。そこで本研究では、ガラス製拡散セルを外科用アロンアルファで臓器表面に貼り付け、そこに各種薬液を投与することで各種実験条件を実現する。薬液の処理は、plasmid DNA 溶液に対し、前処理、同時処理、後処理が可能である。我々はこの実験系により、plasmid DNA 溶液の浸透圧によって遺伝子発現効率が変わり、低張であるほど遺伝子発現効率が高いという結果を既に報告している(Hirayama R., et al., Biol. Pharm. Bull., 28, 2166-2169 (2005))。

Plasmid DNA の取り込みは、plasmid DNA の量および遺伝子発現効率で評価する。遺伝子発現効率は感度の高いホタルルシフェラーゼを使う。また画像解析などでは必要に応じて green fluorescent protein (GFP) 発現 plasmid DNA または蛍光標識 plasmid DNA を用いる。これらの実験系により、単純な取り込みだけでなく、遺伝子発現に至る経路の同定が可能になる。

取り込み機構として、エンドサイトーシスとその他の機構(拡散等)が考えられる。Plasmid DNA の分子量(一般に数百万)を考えた場合、エンドサイトーシスの可能性が高いが、念のため両方を念頭に置き、その判別のための実験を行う。

- (1) ホタルルシフェラーゼの発現に関しては既に測定方法が確立している。Plasmid DNA の取り込み量の評価に関しては、環境負荷を考慮し放射性同位体を使用しない方法を用いる。具体的には、plasmid DNA の拡散セル内残存量を、二本鎖 DNA 特異的蛍光プローブ PicoGreen® (Molecular Probes)により定量する。取り込み量によっては残存量では評価し難い可能性もあり、その際は plasmid DNA を蛍光標識し、臓器中の取り込み量を評価する。また細胞表面への結合も考慮し、酸またはアルカリ処理、DNase による分解等により、細胞表面に結合した plasmid DNA の除去を適宜行う。
- (2) 現在のところ、遺伝子導入された細胞種が不明であるため、GFP 発現 plasmid DNA を導入して、組織切片を共焦点レーザー顕微鏡(ZEISS, LSM 510 META)で観察し、

同定する。

- (3) 蛍光標識 plasmid DNA を投与し、細胞内局在を画像解析することで、拡散またはトランスポーターを介して移入するのか、エンドサイトーシスで取り込まれるのかを判別する。
- (4) Plasmid DNA はポリアニオンであるため、過剰量のデキストラン硫酸、ポリイノシン酸といったスカベンジャーレセプターのリガンドによる阻害実験(Kawabata K., et al., *Pharm. Res.*, 12, 825-830 (1995))を行い、plasmid DNA を認識するレセプター（または担体等）の有無を検討する。
- (5) (4)の結果を踏まえ、細胞表面に存在するタンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼにより分解し、取り込み量、遺伝子発現効率に対する影響を解析する。
- (6) エンドサイトーシスには、クラスリン介在性エンドサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスなどがあり、それぞれ取り込み、遺伝子発現にどのように関わっているか調べる。それぞれ代表的な阻害剤に、クロルプロマジン(Wang L. H., et al., *J. Cell Biol.*, 123, 1107-1117 (1993))、フィリピン(Schnitzer J. E., et al., *J. Cell Biol.*, 127, 1217-1232 (1994))、アミロライド(Hewlett L. J., et al., *J. Cell Biol.*, 124, 689-703 (1994))などがある。また、蛍光標識 plasmid DNA と各種マーカー（トランスフェリン、コレラトキシン B、デキストラン）で二重染色後、共焦点レーザー顕微鏡により画像解析し、経路を同定する。
- (7) DNA の配列により取り込み量に差がある可能性もあるため、他の plasmid DNA または合成DNAを用い検討を行う。

4. 研究成果

Plasmid DNA の遺伝子導入機構の解析に先立ち、マウスにおいて標的臓器選択性の最適化を行い、胃漿膜表面に滴下する plasmid DNA 溶液の容量を可能な限り減じることにより、遺伝子発現の胃選択性を改善することに成功した。更に、アニマルスケールアップとして、ラットに対して遺伝子導入を行ったところ、ラットの胃漿膜表面の細胞に対して、マウスよりも選択的に遺伝子を導入することが可能であった。

また、将来的に臓器表面投与法を臨床応用する際には、安全性の観点から、標的臓器・部位選択性のみならず、生体への傷害性が低いことも重要であるため、plasmid DNA 溶液をマウス肝臓表面に滴下した際の血清中 GPT, GOT 活性を測定したところ、カテーテルを用いて投与することで、血清中 GPT, GOT の上昇は起こらないことを確認した。更に、実際の病態のモデルとして、肝炎モデルに対して遺伝子導入を行い、肝炎時においても、肝炎

を悪化させることなく、遺伝子導入が可能であり、plasmid DNA の臓器表面投与法の安全性が示唆された。

次に、肝臓表面の細胞及び胃漿膜表面の細胞に関して、マウスにおいて、plasmid DNA の取り込み機構の解析を行った。Plasmid DNA を取り込み、遺伝子発現に至る細胞は、肝臓の場合も胃の場合も、タイトジャンクションに囲まれた中皮細胞であることが示唆された。胃の場合に関して更に検討を行い、中皮細胞のマーカーであるメソセリンの発現を確認した。そこで、まず肝臓の中皮細胞における取り込み機構に関して、過剰量のデキストラン硫酸、標的遺伝子を含まない plasmid DNA によって遺伝子発現が阻害され、poly I 及び牛胸腺 DNA では遺伝子発現が阻害されず、plasmid DNA の取り込みは単純なポリアニオン認識機構ではない可能性が示された。また、クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤であるクロルプロマジン、カベオラ介在性エンドサイトーシスの阻害剤であるメチルβシクロデキストリンによって遺伝子導入効率は変わらず、これらの経路が関わっている可能性は低い。マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライドでも、遺伝子発現に阻害はかからなかった。また、plasmid DNA はマクロピノサイトーシスのマーカーであるデキストランとさほど共局在しておらず、PI3K 阻害剤であるウォルトマンニンまたは LY294002 によって遺伝子発現が阻害されたことから、plasmid DNA の取り込みにはファゴサイトーシスが関わっている可能性が示された。一方、胃においてはアミロライドによって遺伝子発現効率に阻害がわかり、デキストランとも共局在していたことから、マクロピノサイトーシスが遺伝子発現に必要な経路である可能性が示され、臓器によって取り込み機構が異なると考えられる。

さらに胃の中皮細胞について取り込み機構を詳細に解析した。pDNA の胃漿膜表面からの取り込みは、アクチンダイナミクス（アクチンの再構成、ミオシンによる収縮）の制御を受けていることが明らかとなった。アクチンダイナミクスを制御する Rho family GTPases (Rho, Cdc42, Rac)の上流で働く PI-3K, Src, Syk の3つのキナーゼの関与も示唆された。さらに、Rho family GTPases の中でも、Rho の関与は低い一方で、Rac が pDNA の細胞取り込みに重要な役割を果たしており、その下流の PAK, WAVE を制御することで、pDNA のマクロピノサイトーシスによる取り込みが起こることが示唆された。以上、pDNA は Rac 介在性マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、遺伝子発現に至ることが明らかとなった。このことは、今後、遺伝子導入効率を改善する上で、有益な基礎的情報となりうる。具体的には、マクロピノサイ

トーシスの促進剤を用いることで、遺伝子導入効率の改善が期待される。また、遺伝子発現に至らない細胞における問題点の抽出にも繋がるものと思われる。

また、Plasmid DNA の局所適用を目的として Plasmid DNA 含有軟膏を開発し、ラットの胃漿膜表面において評価したところ、遺伝子導入効率と遺伝子発現期間が改善した。軟膏を塗布する際の塗布操作の影響が考えられたので、plasmid DNA 溶液を滴下後、葉さじで摩擦したところ、遺伝子導入効率と遺伝子発現期間が改善したので、塗布操作の影響が大きいことが示された。この方法は、臓器表面に対して、物理的な力がかかるため、臨床応用向きではないが、遺伝子導入効率と遺伝子発現期間の改善のメカニズムを明らかにすることで、今後の遺伝子導入法の改善に役立つ情報が得られるものと期待される。

我々は、plasmid DNA 単体によって、in vivo において遺伝子導入が可能であることを、臓器表面の中皮細胞において観察した。一方、他の投与経路との違いを解析することも、興味深いものと思われた。これまでに、門脈内に plasmid DNA 単体を投与することで、肝臓において遺伝子発現に至ることが報告されているが、静脈内投与では肝臓における遺伝子導入効率は低い。そこで、その差異を解析することを目的に、plasmid DNA をマウスに投与する前に、あらかじめ血清とインキュベーションしたところ、仮説では血清中のヌクレアーゼによって分解が起り、遺伝子導入効率が低下するものと考えていたが、実際には遺伝子導入効率は低下しなかった。このことは、血清中に、plasmid DNA の細胞取り込み及び遺伝子導入に必要な因子が存在する可能性を示唆するものと思われる。

以上の研究において、遺伝子導入効率に著しい個体差が認められた。タンパク質によっては、治療域が狭いことも考えられるので、臨床において、遺伝子導入効率のモニタリングをする必要が出てくるものと思われるが、遺伝子発現産物が細胞外に分泌しない場合、モニタリングのためには生検をおこなう必要がある。そこで、組織中の遺伝子導入効率を簡便かつ非侵襲的に評価する方法の開発を目的に、治療遺伝子とモニター遺伝子を同時に投与する方法を考案した。モニター遺伝子として、分泌型の *Gaussia* ルシフェラーゼを選択し、plasmid DNA 単体の筋肉内投与、胃漿膜表面投与、ハイドロダイナミクス法による静脈内投与、さらにカチオン性リポソームとの複合体の静脈内投与を行ったところ、全ての方法において、組織中の遺伝子発現と血中のモニター遺伝子発現産物が有意に相関し、組織中の遺伝子発現効率が非侵襲的に評価可能であることが示された。

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 5 件)

1. J. Nakamura, S. Fumoto, K. Ariyoshi, Y. Kodama, J. Nishi, M. Nakashima, H. Sasaki and K. Nishida: Unilateral lung-selective gene transfer following the administration of naked plasmid DNA onto the pulmonary pleural surface in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 729-732 (2007) 査読有り.
2. J. Nakamura, S. Fumoto, R. Kawanami, Y. Kodama, J. Nishi, M. Nakashima, H. Sasaki and K. Nishida: Spleen-selective gene transfer following the administration of naked plasmid DNA onto the spleen surface in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 941-945 (2007) 査読有り.
3. J. Nishi, S. Fumoto, H. Ishii, Y. Kodama, M. Nakashima, H. Sasaki, J. Nakamura and K. Nishida: Improved stomach selectivity of gene expression following microinstillation of plasmid DNA onto the gastric serosal surface in mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69: 633-639 (2008) 査読有り.
4. S. Fumoto, J. Nishi, J. Nakamura and K. Nishida: Gene therapy for gastric diseases, *Curr. Gene Ther.* 8: 187-200 (2008) 査読有り.
5. J. Nishi, S. Fumoto, H. Ishii, Y. Kodama, M. Nakashima, H. Sasaki, J. Nakamura and K. Nishida: Highly stomach-selective gene transfer following gastric serosal surface instillation of naked plasmid DNA in rats, *J. Gastroenterol.* 43: 912-919 (2008) 査読有り.

[学会発表] (計 12 件)

1. 西順也、麓伸太郎、石井啓樹、兒玉幸修、中嶋幹郎、佐々木均、中村純三、西田孝洋：Plasmid DNA 胃漿膜表面微量滴下による遺伝子発現の胃選択性向上に関する検討、第 23 回日本 DDS 学会大会、平成 19 年 6 月、熊本
2. 麓伸太郎、古川広之、兒玉幸修、西順也、中嶋幹郎、佐々木均、中村純三、西田孝洋：正常時及び肝障害時における plasmid DNA 肝臓表面投与法の安全性に関する検討、第 23 回日本 DDS 学会大会、平成 19 年 6 月、熊本
3. 西順也、麓伸太郎、石井啓樹、兒玉幸修、中嶋幹郎、佐々木均、中村純三、西田孝洋：マウス胃漿膜表面からの plasmid DNA 取り込み機構の解析、第 24 回日本薬学会九州支部大会、平成 19 年 12 月
4. 石井啓樹、麓伸太郎、西順也、兒玉幸修、

中嶋幹郎、佐々木均、中村純三、西田孝洋：
Plasmid DNA のラット胃漿膜表面滴下投
与法による胃選択的な遺伝子導入、第 24
回日本薬学会九州支部大会、平成 19 年 12
月

5. 西順也、麓伸太郎、石井啓樹、中嶋幹郎、
佐々木均、中村純三、西田孝洋：マウス胃
漿膜表面細胞における plasmid DNA 取り
込み機構の in vivo 解析、第 24 回日本 DDS
学会大会、平成 20 年 6 月、東京
6. 石井啓樹、麓伸太郎、西順也、中嶋幹郎、
佐々木均、中村純三、西田孝洋：Plasmid
DNA のラット胃漿膜表面投与による胃へ
の高選択的遺伝子導入、第 24 回日本 DDS
学会大会、平成 20 年 6 月、東京
7. 麓伸太郎、中嶋幹郎、佐々木均、中村純三、
西田孝洋：血液成分による plasmid DNA
の in vivo デリバリー、第 24 回日本 DDS
学会大会、平成 20 年 6 月、東京
8. 古川智也、麓伸太郎、中嶋幹郎、佐々木均、
中村純三、西田孝洋：Plasmid DNA のマウ
ス肝臓表面投与時における取り込み機構
の解析、第 24 回日本 DDS 学会大会、平成
20 年 6 月、東京
9. 西順也、麓伸太郎、中村純三、西田孝洋：
Plasmid DNA による胃漿膜表面への遺伝
子導入を制御する細胞内シグナル伝達経
路、第 25 回日本薬学会九州支部大会、平
成 20 年 12 月、延岡
10. Xuan Wang, Shintaro Fumoto, Junzo
Nakamura, Koyo Nishida: A comparison
between cationic polymer polyethyleneimine
and naked pDNA in gene delivery following
selective liver surface instillation in mice, The
Second Asian Symposium on Pharmaceutical
Sciences in Nagasaki, March 2009, Nagasaki,
Japan
11. 吉川直樹、麓伸太郎、石井啓樹、西順也、
王旋、中村純三、西田孝洋：Plasmid DNA
のラット胃漿膜表面投与：摩擦による遺伝
子発現期間の延長、日本薬学会第 129 回年
会、平成 21 年 3 月、京都
12. 王旋、麓伸太郎、堀勇太、中村純三、西田
孝洋：組織中の外来遺伝子発現の測定を目
的とした治療外来遺伝子モニタリング、日
本薬学会第 129 回年会、平成 21 年 3 月、
京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

麓伸太郎 (FUMOTO SHINTARO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70380988

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし