

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790047

研究課題名(和文) 高効率・高安全性遺伝子導入ベクターの開発を目指したバイオサーファクタントの探索

研究課題名(英文) Exploration of biosurfactant to develop high efficiency and safety vector for gene transfection

研究代表者 伊納 義和 (INOH YOSHIKAZU)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：90434547

研究成果の概要(和文)：

遺伝子治療には遺伝子の運び屋(ベクター)が不可欠である。研究代表者は、非ウイルスベクターのひとつである正電荷リポソームにバイオサーファクタントを含有することにより遺伝子導入効率が著しく遺伝子導入効率が上昇することを明らかにしてきた。本課題研究では、さらなる遺伝子導入効率の向上を目的とし、脂肪酸組成、特に不飽和脂肪酸の割合(不飽和度)の異なるMEL-Aを含有した正電荷リポソームを作製し、遺伝子導入効率に及ぼす影響を検討した。その結果、MEL-Aの不飽和度は遺伝子導入効率に著しい影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

An unsaturated hydrocarbon chain in phospholipid was reported to affect a phase transition and a fusogenic activity after mixing membranes, and consequently to achieve a high DNA transfection efficiency. We previously showed that a biosurfactant mannosylerythritol lipid-A (MEL-A) enhances the gene transfection efficiency of cationic liposomes. Here, we have studied the effects of unsaturated fatty acid ratio of MEL-A on the gene transfer efficiency by cationic liposomes using MEL-A with different unsaturated fatty acid ratios. As a result, we demonstrated that the MEL-A unsaturated fatty acid ratio strongly affects transfection efficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：遺伝子治療、遺伝子導入、非ウイルスベクター、正電荷リポソーム、バイオサー

ファクタントクタント

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、先天性免疫不全症、各種の悪性腫瘍癌やエイズ等の難病にも有効であると世界中から大きな期待が寄せられている。1990年にアメリカで遺伝子治療が本格的に開始されて以来、世界では多くの患者に遺伝子治療が試みられてきた。しかし、現在のところ臨床では期待されたほどの治療成果を上げるまでには至っていない。その要因の一つとして、既存の遺伝子導入技術では、ヒトの体内で治療に必要なレベルの遺伝子発現が得られていないことが挙げられる。そのため、治療用遺伝子を目的の臓器、組織、及び細胞に効率良く運搬する基礎技術の開発が重要な課題となっている。これまで、多くの研究者によって生細胞に外来遺伝子を導入するための様々なキャリアが開発されており、それらは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。レトロウイルス、アデノウイルスに代表されるウイルスベクターを用いる方法は一般に導入効率が高く臨床応用が進んでいるが、細胞毒性、免疫原反応、野生型ウイルスへの組換えといった問題点が存在する。一方、リポソーム法に代表される非ウイルスベクターを用いる方法は、ウイルスベクターより安全性は高いものの導入効率の低さが問題となっている。このため、導入効率の高い非ウイルスベクターの開発が期待されている。

このような背景から、我々は非ウイルスベクター、特に作製・修飾が比較的容易である正電荷リポソームに着目してきた。なかでも遺伝子導入効率が比較的高いコレステロール誘導体を素材とした正電荷リポソームについて二十種類以上のコレステロール誘導体を合成し、市販のコレステロール誘導体で

あるDC-Cholよりも著しく高い遺伝子導入効率を有するコレステロール誘導体I（図1）の開発に成功した。

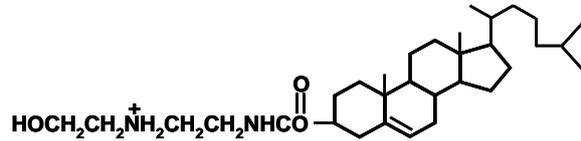


図1 誘導体Iの構造

近年、遺伝子工学、顕微光学等の進歩により正電荷リポソームによる細胞内遺伝子導入機構が解明されつつある。これにより、「いかにして細胞膜の内部に遺伝子を運ぶか」「いかにして細胞質から核に遺伝子を運ぶか」という観点から正電荷リポソームによる遺伝子導入効率を増強するための様々な工夫がなされてきた。そのなかで、非ウイルスベクターに合成界面活性剤を含有することにより、毒性に問題はあっても、遺伝子導入効率が増強されるという知見が報告された。そこで我々は新たに微生物由来の界面活性物質であるバイオサーファクタントに着目した。バイオサーファクタントは構造的には分子内に親水基と疎水基を併せ持つ、両親媒性物質であり、親水基としては、糖、ペプチド、有機酸等が、また疎水基としては脂肪酸、ステロール、テルペノイド等が知られ、構造上の特徴から糖脂質系、脂肪酸系、リポペプチド系、リン脂質系などに分類され、構造は多岐にわたっている。今回我々は親水基にマンノース、エリスリトールを有する糖脂質系バイオサーファクタントのひとつであるMEL-A (Mannosylerythritol lipid-A; 図2)を従来の正電荷リポソームに含有し、遺伝子導入用ベクターとしての有用性について検討した。

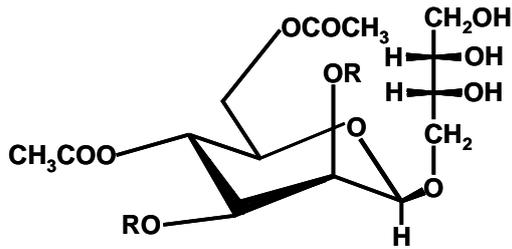


図 2 Mannosylerythritol lipid-A (MEL - A) の構造

その結果、MEL-A を含有した正電荷リポソームを用いることにより高い遺伝子導入効率を実現する非ウイルスベクターの開発に成功した。さらにこの新しいMEL-A 含有正電荷リポソームはこれまでの正電荷リポソームとは異なり、細胞膜とリポソーム膜が直接融合することにより導入遺伝子を迅速・大量に標的細胞の核内に移行させることにより高い遺伝子導入効率達成できることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで正電荷コレステロール誘導体を素材とした正電荷リポソームによる遺伝子導入の研究を行い、数多くの成果を得ている。そしてこれらの知見を基にして、従来の導入効率が低いとされている非ウイルスベクターに対して、バイオサーファクタントを用いることにより、高い遺伝子導入効率を実現することに成功した。

一方、近年、正電荷リポソームを構成する脂質の脂肪酸組成が、遺伝子導入効率に著しく影響を及ぼすことが明らかとなりつつある。正電荷リポソームを構成する脂肪酸組成、すなわち脂肪酸の長さや不飽和脂肪酸の割合 (=不飽和度) が、正電荷リポソームの物理化学的特性 (粒子径、表面電位、脂質膜流動性等)、導入遺伝子との相互作用、及び標的細胞との相互作用等に影響を及ぼすためである。そこで研究代表者は、酵母菌体に添

加する植物油の組成を変えることで、糖脂質の脂肪酸の長さや不飽和度の異なる多様な MEL-A を容易かつ大量に産生できることを利用し、MEL-A の脂肪酸組成を変化させることにより、正電荷リポソームの脂肪酸組成が遺伝子導入効率に及ぼす影響を検討することを目的とする。具体的には、脂肪酸組成を変化させた MEL-A 含有正電荷リポソームを作製し、これらの数種のバイオサーファクタント含有正電荷リポソームの物理学的特性を追究し、遺伝子導入効率との相関関係について明らかにする。

3. 研究の方法

研究代表者は、MEL-A が有する脂肪酸における不飽和度が遺伝子導入効率に及ぼす影響を検討するため、3 種類の不飽和度 (9.1%、21.5%、46.3%) を有する MEL-A を用いて、MEL-A 含有正電荷リポソームを作製し、以下の方法を用いて研究を遂行した。

- ・ MEL-A が有する脂肪酸の不飽和度が遺伝子導入効率に及ぼす影響について検討するため、培養細胞への遺伝子導入効率を測定した。
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡を用い、MEL-A が有する脂肪酸の不飽和度が正電荷リポソーム・遺伝子複合体の細胞内動態に及ぼす影響について時間的・空間的に観察した。
- ・ 正電荷リポソームと導入遺伝子の相互作用を検討する。具体的には不飽和度が異なる 3 種の MEL-A 含有正電荷リポソームに形質膜モデルとしての負電荷リポソームを添加したときの遊離遺伝子量を測定し、細胞膜に付着後、細胞内及び核内へ移行した遊離遺伝子量として算出した。

4. 研究成果

不飽和度の異なる脂肪酸 (不飽和度: 9.1%、21.5%、46.3%) を有する 3 種の MEL-A を含

有した正電荷リポソーム（それぞれ MEL-A(9.1%)、MEL-A(21.5%)、MEL-A(46.3%) と表記）を用い、MEL-A の不飽和度が及ぼす影響について以下の点について検討した。

(1) 遺伝子導入効率に及ぼす影響

不飽和度が遺伝子導入効率に及ぼす影響についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、不飽和度が 21.5%の MEL-A を用いたときにのみ高い遺伝子導入効率を得られた（図 3）。

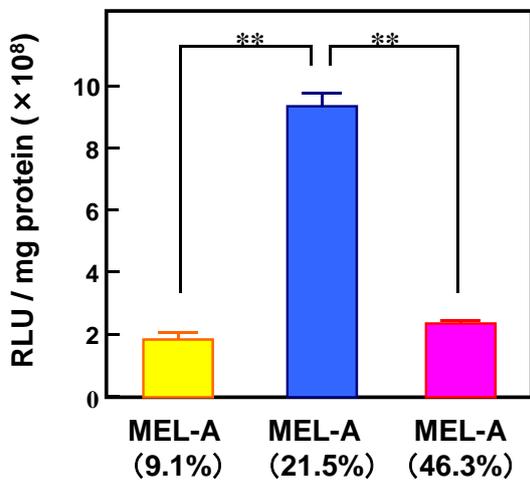


図 3 MEL-A の脂肪酸の不飽和度が遺伝子導入効率に及ぼす影響 (**p<0.01)

(2) 正電荷リポソームとDNAの細胞内動態に及ぼす影響

そこで不飽和度が遺伝子導入効率に及ぼす要因について検討するため、3 種の MEL-A 含有正電荷リポソーム及び導入遺伝子をそれぞれ蛍光標識し、細胞内動態について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、MEL-A(9.1%)を用いた場合は、正電荷リポソーム・DNA 複合体は細胞膜に接着しておらず、遺伝子も細胞内に導入されていなかった。一

方、MEL-A(21.5%)、MEL-A(46.3%)を用いた場合は細胞膜と正電荷リポソームが融合している様子が観察された。しかし、MEL-A(21.5%)を用いた時は、大量の遺伝子が核内に集積していたが、MEL-A(46.3%)を用いた場合は細胞内・及び核内に移行している遺伝子は観察されなかった（図 4）。この結果は MEL-A の不飽和度は、MEL-A 含有正電荷リポソーム・DNA 複合体がと細胞膜に付着・融合したのちの細胞内への遺伝子の遊離に影響を及ぼしている可能性が示唆するものである。

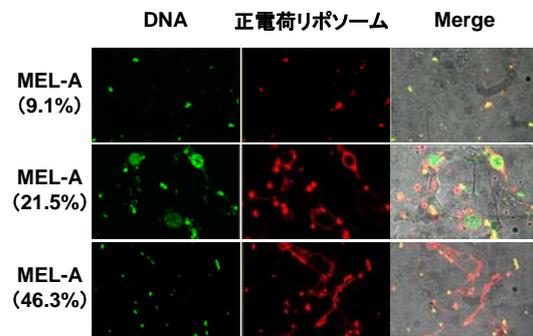


図 4 MEL-A の不飽和度が細胞内遺伝子導入動態に及ぼす影響

(3) 正電荷リポソームからのDNAの遊離に及ぼす影響

そこで、MEL-A 含有正電荷リポソームに形質膜のモデルとして負電荷リポソームを添加した後の正電荷リポソームからの遊離遺伝子量を測定した。

その結果、MEL-A(46.3%)を用いた時より、MEL-A(21.5%)を用いた時の遊離遺伝子量が有意に高いことが明らかとなった（データ示さず）。

以上の結果より MEL-A が有する脂肪酸の不飽和度は、正電荷リポソーム・DNA 複合体への付着、及び付着後の細胞内への遺伝子の遊

離に影響を及ぼし、その結果として遺伝子導入効率に著しい影響を与えることが明らかとなった。

遺伝子治療において重要な研究課題は安全で遺伝子導入効率の高いベクターの開発である。今日の遺伝子治療においては大半の事例でウイルスベクターが用いられているが、安全性に対する懸念から非ウイルスベクターの開発が強く期待されている。しかしながら、十分な遺伝子導入能を有する非ウイルスベクターはいまだ開発されていない。我々はこれまで正電荷コレステロール誘導体を素材とした正電荷リポソームの開発を行い、多くの成果を得てきた。そしてこれまで全く試みのなかったバイオサーファクタントに着目し、従来の正電荷リポソームに糖脂質系バイオサーファクタントのひとつである MEL-A を含有すると遺伝子導入効率が飛躍的に向上することを見出した。この独創的な糖脂質系バイオサーファクタント MEL-A 含有正電荷リポソームは従来の正電荷リポソームとは異なり、細胞膜との融合により迅速かつ大量に導入遺伝子が細胞内及び核内に導入されるという特色を有した非ウイルスベクターである。本課題研究では、さらなる遺伝子導入効率の向上を目的とし、脂肪酸組成の異なる MEL-A を含有した正電荷リポソームを作製し、遺伝子導入効率に及ぼす影響、及びこれらのリポソームの詳細な物理化学的特性等について生物物理学的・生物化学的手法を用いて明らかにし、これらの知見を基に現在の MEL-A よりも高い遺伝子導入能を有するバイオサーファクタント含有正電荷リポソームを探索し、*in vivo* への展開を試みるものである。本課題研究の遂行は、遺伝子治療分野において安全で遺伝子導入効率の高い非ウイルスベクターの開発に対して意義の

大きい研究であると言える。

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 2 件)

① Inoh, Y., Furuno, T., Hirashima, N., Kitamoto, D., Nakanishi, M., The ratio of unsaturated fatty acids in biosurfactants affects the efficiency of gene transfection. 398, Int. J. Pharm., 225-30, 2010, 査読有

② Nakanishi, M., Inoh, Y., Kitamoto, D., Furuno, T. Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery. 19, J. Drug Delivery Sci. Technol., 165-169, 2009, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 伊納 義和、新規正電荷リポソームによる迅速な siRNA 細胞内導入法の開発、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日 (静岡)

2. Yoshikazu Inoh, The ratio of unsaturated fatty acids in biosurfactant MEL-A affects DNA release from the liposomes, 第 49 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日 (仙台)

3. 伊納 義和、バイオサーファクタント含有正電荷リポソームの脂肪酸組成が遺伝子導入に及ぼす影響、第 26 回日本 DDS 学会、2010 年 6 月 17 日 (大阪)

4. 伊納 義和、バイオサーファクタント MEL-A が有する脂肪酸が遺伝子導入に及ぼす影響、日本薬学会第130年会、2010年 3月28日 (岡山)

5. Yoshikazu Inoh, Rate of unsaturated fatty acids in biosurfactant MEL-A affects gene transfection efficiencies mediated by cationic liposomes, 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2009年 12月1日 (大阪)

6. 伊納義和、分子イメージング法による新規正電荷リポソームによる細胞内遺伝子導入機構の解析、第18回日本バイオイメージング学会学術集会、2009年9月4日 (岡山)

7. Yoshikazu Inoh, Composition of unsaturated fatty acids in biosurfactants affects efficiency of gene transfection mediated by cationic liposomes, 第 48 回日本生物物理学会年会、2009年 11月 1日(徳島)

8. 伊納 義和、分子イメージング法による新規正電荷リポソームによる細胞内遺伝子導入機構の解析、第18回日本バイオイメージング学会 学術集会、2009年9月4日 (岡山)

9. 伊納 義和、バイオサーファクタント含有正電荷リポソームによる遺伝子導入の新技術、第 55 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2009年 7月 11日 (名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊納 義和 (Inoh Yoshikazu)

研究者番号 : 90434547

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし