

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350553

研究課題名(和文)非ウイルス性ベクターを用いた遺伝子導入時における細胞間差を生じる機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of cell-to-cell variability in non-viral transfection

研究代表者

麓 伸太郎 (FUMOTO, Shintaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：70380988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入時において細胞間差を生じる機構を明らかにすることである。HepG2細胞における解析により、閾値以上においてリポプレックスの細胞集積量と遺伝子発現に相関がないことを明らかにした。さらに、非ウイルス性ベクターによる遺伝子発現の細胞間差を生じる製剤側の要因として製剤の分散状態、細胞側の要因として酸化ストレスが重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to elucidate the mechanism of cell-to-cell variability in non-viral transfection in HepG2 cells. In case of lipoplexes, there was no correlation between cellular association and transgene expression over the threshold of cellular association. Moreover, dispersion condition of the lipoplexes and oxidative stress were important pharmaceutical and cellular factors, respectively.

研究分野：薬学

キーワード：遺伝子・核酸工学材料 遺伝子導入機構 エンドサイトーシス 細胞間 リポソーム 高分子

## 1. 研究開始当初の背景

先天性遺伝子欠損症や癌などの難治性疾患の治療法として遺伝子治療が期待されている。遺伝子治療に用いられる *in vivo* 遺伝子導入法において満たすべき要件として、遺伝子導入効率、遺伝子発現期間、標的組織・細胞選択性、安全性が挙げられる。特に非ウイルス性ベクターでは *in vivo* における遺伝子導入効率が不十分であり、より効率の高い非ウイルス性ベクターを開発するためには、機構解析を行い、問題点を明らかにすることが望まれる。そこで、申請者らはこれまでに、非ウイルス性ベクターの開発を行うとともに、遺伝子導入機構の解析を行って、下記に示す知見を得てきた。

- a) ガラクトース修飾リポプレックス調製時、少量の電解質を加えることで電荷を制御し、リポプレックスの安定性を改善することで、*in vivo* において肝実質細胞選択的に遺伝子導入効率を改善した (Fumoto et al., *Mol. Ther.*, 10, 719-729 (2004))。
- b) リポプレックスの門脈内投与時において、血清成分との相互作用により肝臓における遺伝子発現が増大し、血清成分の中でもフィブロネクチンとの相互作用が重要であることを明らかにした (Fumoto et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315, 484-493 (2005), Yoshikawa et al., *J. Gene Med.*, 13, 632-643 (2011))。
- c) 腹腔内および胸腔内臓器表面に対し、pDNA を単に滴下するだけで、キャリアや物理的な力によらず、効率的な遺伝子発現に至ることを明らかにした (Fumoto et al., *Curr. Gene Ther.*, 8, 187-200 (2008) etc.)。
- d) 胃漿膜表面の中皮細胞における pDNA の細胞取り込みおよび遺伝子発現には、Rac 介在性マクロピノサイトーシスが重要であることを明らかにした (Fumoto et al., *Mol. Pharm.*, 6, 1170-1179 (2009))。
- e) 新規遺伝子導入材料として炭酸カルシウムマイクロフラワー (MF) を開発し、腹腔内臓器全体において遺伝子発現を高めることに成功した (Fumoto et al., *Mol. Pharm.*, 9, 1962-1970 (2012))。

しかしながら、申請者らが開発した方法においても、一般に用いられる非ウイルス性ベクターと同様に、遺伝子導入効率に著しい細胞間差が存在しており、遺伝子導入効率に改善の余地がある。そこで、遺伝子導入効率改善に繋がる情報を得るため、非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入において細胞間差を生じる機構を明らかにするという着想に至った。

国内外の研究動向：遺伝子治療の臨床研究では、遺伝子導入効率の観点からウイルス性ベクターを使用することが多いが、毒性による死者が出るなど安全性に懸念がある上、抗原性により頻回投与が困難である。また、ウイルス自体の持つ細胞指向性を改変するのは

容易ではない。一方、安全性の観点および改変の容易さから、国内外で非ウイルス性ベクターの研究が行われているが、遺伝子導入効率の面でウイルス性ベクターに劣ることが多い。ハイドロダイナミクス法 (大容量の pDNA 溶液を瞬時に静脈内投与) は簡便で、かつ遺伝子導入効率が非常に高い。しかしながら、遺伝子発現に至る細胞の割合は最も遺伝子発現の高い細胞である肝細胞で 50% 程度であり、ハイドロダイナミクス法においても細胞間差が認められる。非ウイルス性ベクターの遺伝子導入機構の解析も進んでいるが、細胞間差を生じる機構に関しては情報が乏しく、さらなる研究が望まれている。

## 2. 研究の目的

我々は非ウイルス性ベクターを用いた *in vivo* 遺伝子導入法の開発並びに遺伝子導入機構の解析を行ってきた。これまでの解析により、*in vivo* 遺伝子導入において、遺伝子導入効率に著しい細胞間差が存在することを明らかにしている。そこで本研究においては、非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入において細胞間差を生じる機構を解明する。下記の点に関して焦点を当て解析を行うことで、研究期間内に、非ウイルス性ベクターによる遺伝子導入における細胞間差を生じる機構を解明することとした。

非ウイルス性ベクターはエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれると考えられる。また、エンドサイトーシス経路はベクターにより異なると報告されている。そこで、まずエンドサイトーシス経路の細胞間差を解析した。さらに異なる非ウイルス性ベクターを同時適用した際の遺伝子発現の細胞間差を解析した。次にエンドサイトーシスと細胞周期の関連性を、エンドサイトーシス経路毎に同時解析した。また、蛍光顕微鏡を用いたライブイメージングにより、遺伝子発現に至った細胞は元々どのような細胞だったのかを解析した。最後に、酸化ストレスと遺伝子発現の細胞間差の関連性を解析した。

## 3. 研究の方法

試薬：

遺伝子導入に用いた非ウイルス性ベクターは、DOTAP/Chol リポソーム、ポリエチレンイミン (PEI)、DOTAP/Chol リポソームと環状 CR8C ペプチドを組み合わせたものである。

エンドサイトーシスマーカーとして、蛍光標識トランスフェリン、蛍光標識コレラトキシン B、蛍光標識デキストランを用いた。

プラスミド DNA としては、緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 をコードした pZsGreen1-N1、赤色蛍光タンパク質をコードした ptdTomato-C1 を用いた。プラスミド DNA の蛍光標識では、Label IT nucleic acid labeling キットを用いた。

細胞周期の検出では、7-AAD を用いた。

細胞：

ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いた。

細胞周期の同期：

ノコダゾール処理により M 期への同調を行った。S 期への同調は、チミジン/ヒドロキシウレア処理により行った。

観察：

定性的な観察では、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

定量的な観察では、イメージベースサイトメーターまたはセルソーターを用いた。

#### 4. 研究成果

2013 度は特に細胞取り込み過程に着目し解析を行った。非ウイルス性ベクターとして、カチオン性リポソーム、PEI などが挙げられるが、細胞取り込み経路がベクターによって異なるとの報告がある。また、予備的検討により、マウス腹腔内臓器表面の中皮細胞において、カベオラ介在性エンドサイトーシスが活発な細胞とマクロピノサイトーシスが活発な細胞があり、個々の細胞によって活発なエンドサイトーシス経路が異なる可能性が示されている。従って、細胞によって活発なエンドサイトーシスが異なることがエンドサイトーシスの細胞間差の本質である可能性が考えられた。そこで、蛍光標識した各種マーカー物質を用いて、その可能性の検証を試みた。主にクラスリン介在性エンドサイトーシスで取り込まれるトランスフェリン、カベオラ介在性エンドサイトーシスで取り込まれるコレラトキシン B、マクロピノサイトーシスで取り込まれるデキストランを HepG2 細胞に同時に適用し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、特定のマーカー物質をよく取り込む細胞が確認された。また、イメージベースサイトメーターで定量的に解析したところ、特定のエンドサイトーシス経路が活発な細胞の割合は 5~10% で、複数のエンドサイトーシス経路が活発な細胞と同程度の割合であった。従って、細胞ごとに活発なエンドサイトーシス経路が異なることが明らかとなり、このことがエンドサイトーシスの細胞間差につながっていると推察された。また、異なる非ウイルス性ベクターを同時に適用した際の遺伝子発現陽性細胞を検出したところ、リポプレックスと PEI ポリプレックス双方の遺伝子を発現する細胞の割合は、どちらか一方の遺伝子を発現する割合と同程度であった。非ウイルス性ベクターの種類によりエンドサイトーシス経路が異なることが知られており、個々の細胞によって活発なエンドサイトーシス経路が異なることで、遺伝子発現の細胞間差に繋がる可能性が示された。

2014 年度は、2013 年度と同じ評価系により細胞周期に関して解析を行った。解析にあ

たり、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用い、薬剤による同調実験を行った。ノコダゾールで M 期に同調させたところ、エンドサイトーシス活性に大きな変化はみられなかったが、ヒドロキシウレアで S 期に同調させたところ、トランスフェリンの細胞取り込みが増大する傾向がみられた。一方、非ウイルス性ベクターが遺伝子発現に至るためには、核に送達される必要があり、細胞周期に関する解析を行うにあたり、細胞取り込みと遺伝子発現に乖離がある可能性が考えられた。そこで、カチオン性リポソームに核移行を促進するペプチドを添加することで遺伝子導入効率の増大を試みたところ、HepG2 細胞において遺伝子発現に至る細胞の割合を平均 3 倍程度増加することができた。

2015 年度は、イメージベースサイトメーターより感度の高いセルソーターを導入し、マルチカラー解析を行った。トランスフェリン、コレラトキシン B の細胞集積と細胞周期の関連性を同時に解析したところ、個々の細胞によって活発なエンドサイトーシス経路が異なるというこれまでの解析結果を支持しつつ、新たに、細胞周期が G1 期から M 期へと進むにつれてそれまでエンドサイトーシスが活発でなかった細胞がトランスフェリンを良く取り込むようになることを明らかにできた。本研究で得られた知見は、非ウイルス性ベクターの細胞取り込みにおける細胞間差を理解する一助になるものとする。

さらに、非ウイルス性ベクターであるリポプレックスを用いて、細胞集積と遺伝子発現の細胞間差に関する解析を行った。結果、おおよそ 20% 近くの細胞はそもそもリポプレックスが移行しておらず、遺伝子発現に至るためには細胞集積量に閾値が存在する一方、閾値以上では細胞集積量と遺伝子発現に相関がないことを明らかにした。また、蛍光顕微鏡を用いてライブ観察を行ったところ、初期においてリポプレックスが細胞の大きさに匹敵する非常に大きな凝集体を形成し、それが時間と共に小さくなっていく様子が観察できた。一方、市販の非ウイルス性ベクターである Lipofectamine 3000 ではそのような凝集体が見られなかった。この凝集体の形成は、主にイオンの存在によるものと考えられ、実際に PBS とリポプレックスを混合することで、同様の凝集体が形成されることが明らかとなった。いずれにせよ、細胞の大きさに匹敵するような凝集体がそのまま細胞に取り込まれるとは考えにくく、製剤の分散状態が遺伝子発現の細胞間差の一因であると考えられる。

一方、*in vitro* 遺伝子導入効率は細胞周期に依存性であることが古くから知られている。また、酸化ストレスは細胞周期を含め、細胞の状態に大きな影響を与えることが知られている。そこで、遺伝子発現の細胞間差における酸化ストレスの影響を解析した。細胞集積量と酸化ストレスレベルに関しては、大き

な関連性は見られなかったが、遺伝子発現に至った細胞は、元々酸化ストレスレベルが低かった細胞であることが明らかとなった。

以上、本研究では、非ウイルス性ベクターによる遺伝子発現における細胞間差に焦点を当て、次の成果を得た。

1. 同種細胞でも細胞毎に活発なエンドサイトーシス経路が異なること。
2. エンドサイトーシス経路毎に細胞周期依存性が異なること。
3. 細胞集積量と遺伝子発現は相関せず、エンドサイトーシスにおける細胞間差が遺伝子発現の細胞間差に寄与する率はおおよそ20%であること。
4. リポプレックスの分散状態は遺伝子発現の細胞間差の一因であること。
5. 遺伝子発現に至る細胞は、酸化ストレスレベルが相対的に低いこと。

今後は本成果を基に、細胞間差の少ない遺伝子導入法を開発していく予定である。

#### 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 7 件)

1. Yoshikawa N., Fumoto S., Nakashima M., Shimokawa K., Miyamoto H., Nishida K. The role of fibronectin in pulmonary gene transfer following intravenous administration of lipoplex in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36 1807-1813 (2013). 査読有
2. Hirata H., Miyamoto H., Shimokawa K., Nakashima M., Nakayama M., Fumoto S., Nishida K. Novel diagnostic method of peritoneal injury using dual macromolecular markers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37 262-267 (2014). 査読有
3. Shintaro Fumoto and Shigeru Kawakami, Combination of nanoparticles with physical stimuli toward cancer therapy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 212-216 (2014). 査読有
4. Mine T, Miyamoto H, Yoshikawa N, Fumoto S., Sasaki H, Nakamura J, Nishida K, Effect of absorption enhancers on the absorption of FD-4 as a poorly absorbable marker macromolecule from the liver surface in rats. *J Drug Del Sci Tech*, 24, 386-389 (2014). 査読有
5. Kurosaki T, Kawanabe S, Kodama Y, Fumoto S., Nishida K, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H, Hepatic gene delivery system electrostatically assembled with glycyrrhizin. *Mol Pharm.*, 11, 1369-1377 (2014). 査読有
6. Kodama Y, Ohkubo C, Kurosaki T, Egashira K, Sato K, Fumoto S., Nishida K, Higuchi N,

Kitahara T, Nakamura T, Sasaki H, Secure and effective gene delivery system of plasmid DNA coated by polynucleotide. *J Drug Target*, 23, 43-51 (2015). 査読有

7. Fumoto S., Nishimura K, Nishida K, Kawakami S: Three-Dimensional Imaging of the Intracellular Fate of Plasmid DNA and Transgene Expression: ZsGreen1 and Tissue Clearing Method CUBIC are an Optimal Combination for Multicolor Deep Imaging in Murine Tissues, *PLOS ONE*, 11, e0148233 (2016) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 谷口尚紀, 吉川直樹, 宮元敬天, 佐々木均, 川上茂, 橋田充, 麓伸太郎, 西田孝洋, 肝実質細胞選択的 *in vivo* 遺伝子導入を指向したリポプレックスの物性制御, 第29回日本DDS学会学術集会, 京都テルサ (京都府京都市, 2013.7.5)
2. 河野光, 麓伸太郎, 嶺豊春, 宮元敬天, 西田孝洋, 炭酸カルシウムを用いた腹腔内臓器への *in vivo* 遺伝子導入におけるメカニズムの解析, 第29回日本DDS学会学術集会, 京都テルサ (京都府京都市, 2013.7.5)
3. 吉川直樹, 坂元景子, 宮元敬天, 麓伸太郎, 西田孝洋, 肝炎マウスへの *in vivo* 遺伝子導入におけるリポプレックスとアルブミンの相互作用: 遺伝子発現に寄与するメカニズムの解析, 第29回日本DDS学会学術集会, 京都テルサ (京都府京都市, 2013.7.5)
4. 谷口尚紀, 吉川直樹, 宮元敬天, 佐々木均, 川上茂, 橋田充, 麓伸太郎, 西田孝洋, PEG修飾リポプレックス調製時におけるPEG脂質挿入タイミングの重要性, バイオマテリアル学会九州講演会2013, 熊本大学黒髪北キャンパス (熊本県熊本市, 2013.9.20).
5. Shintaro Fumoto, Haruna Hirata, Hirota Miyamoto, Shigeru Kawakami, Koyo Nishida, A rapid screening method utilizing dual macromolecular markers for development of therapeutic methods of peritoneal injury, PSWC2014, Melbourne (Australia, 2014.4.13~2014.4.16).
6. 麓伸太郎, 宇根隆通, 宮元敬天, 西田孝洋, 複数のエンドサイトーシス活性の同時評価, 日本薬剤学会第29年会, 大宮ソニックシティビル (埼玉県大宮市, 2014.5.20~2014.5.22).
7. 宇根隆通, 麓伸太郎, 宮元敬天, 西田孝洋, HepG2細胞における活発なエンドサイトーシス経路と細胞周期の関連, 第30回日本DDS学会学術集会, 慶應義塾大学薬学部 (東京都港区, 2014.7.30~2014.7.31).
8. 麓伸太郎, 西村光洋, 西田孝洋, 川上茂: 遺伝子発現の空間分布評価における組

なし

- 織透明化技術の応用, 遺伝子・デリバリー研究会 第 15 回シンポジウム, 京都薬科大学 (京都府京都市, 2015.5.1)
9. 後瀬伸大、猪飼友里、川上茂、橋田充、宮元敬天、麓伸太郎、西田 孝洋: PEG 修飾リポプレックスによる肝臓選択的遺伝子導入における調製条件, 日本薬剤学会第 30 年会, ブリックホール (長崎県長崎市, 2015.5.21~2015.5.23)
  10. 麓伸太郎、西村光洋、木下瑛莉子、大山奈津子、原口綾奈、西田孝洋、川上茂: 組織透明化による薬物キャリア・遺伝子ベクターの組織中空間分布の評価, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 京王プラザホテル (東京都新宿区, 2015.7.2~2015.7.3)
  11. Fumi Hirano, Shintaro Fumoto, Takamichi Une, Hirotaka Miyamoto, and Koyo Nishida: Analysis of cell-to-cell variability in non-viral vector-mediated transfection, 日本薬物動態学会第 30 年会, タワーホール船堀 (東京都江戸川区, 2015.11.12~2015.11.14)
  12. 麓伸太郎、宇根隆通、平野 史、宮元敬天、西田孝洋: 非ウイルスベクターの細胞取り込みおよび遺伝子発現における細胞間差, 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 熊本大学薬学部 (熊本県熊本市, 2015.11.19~2015.11.20)
  13. 麓伸太郎: 組織透明化を基盤とした遺伝子医薬の体内挙動の可視化, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市, 2016.3.27~2016.3.29) シンポジウム発表

〔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〕

ホームページ等

長崎大学薬学部薬剤学分野ホームページ

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/dds/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

麓伸太郎 (FUMOTO Shintaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系) ・  
准教授

研究者番号: 70380988

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者