

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670082

研究課題名(和文) 組織押圧・吸引圧を利用した遺伝子導入システムの開発

研究課題名(英文) Development of gene delivery system using the tissue press/suction method

研究代表者

川上 茂 (KAWAKAMI, Shigeru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：20322307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、組織吸引圧法による肝臓および腎臓での長期遺伝子発現系の構築や病態時における遺伝子発現の評価をおこなった。長期遺伝子発現系の構築のため、pCpGfree-Luciaをベクターとして選択したところ、肝臓・腎臓吸引圧法ではそれぞれ2週間に渡る発現が得られた。また、治療戦略構築のため、遺伝子発現部位を評価した。その結果、腎臓吸引圧法では腎臓の間質領域で、肝臓吸引圧法では主に吸引部位限局的に臓器上部での発現が観察された。さらに、病態時における影響に関して、四塩化炭素誘発性急性肝炎モデルマウスおよび肝繊維症モデルマウスにおける肝臓での遺伝子発現特性を明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：We previously developed tissue press/suction method as a selective gene delivery method. In this study, we developed sustained gene delivery system using the tissue suction method and evaluated the efficiency of transgene expression in pathological model mice to develop novel gene delivery strategy with tissue suction method or apply to analysis of gene function. For sustained transgene expression, pCpGfree-Lucia was used and expressed for 2 weeks both in the kidney and the liver. We also studied the distribution of transgene expression using tissue clearing method to construct treatment strategy. As a result, transgene the kidney suction method delivered was observed in interstitial area around blood vessel. In the liver suction method, transgene was observed in suctioned site and mainly in a superior part of the liver. In addition, characteristics of transgene expression both in carbon tetrachloride induced acute hepatitis model mice and hepatic fibrosis model mice were clarified.

研究分野：医療系薬学

キーワード：遺伝子 医療・福祉 バイオテクノロジー バイオ関連機器 遺伝子治療 組織押圧法 組織吸引圧法

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。2012年11月欧州においてアデノ随伴ウイルスをベクターとした遺伝子治療薬「Glybeta®」が承認され、本遺伝子治療薬の承認は、我が国における遺伝子治療薬開発の流れを加速させるものと予想される。一方、有効な in-vivo における標的臓器特異的な遺伝子導入技術は、創薬基礎研究に大きく貢献する基盤技術である。したがって、遺伝子デリバリーを目的に、微粒子、高分子、多機能性キャリアの開発が世界中で行われている。しかしながら、高い遺伝子発現のためには、種々の体内・細胞動態プロセスを克服する必要性から多くの機能性材料が要求され、複雑なキャリア構造体とならざるを得ない。したがって、生物医学領域や遺伝子治療の応用において、臓器特異的な遺伝子発現を実現するシンプルな in-vivo 遺伝子導入システムの開発が強く望まれている。

このような背景のもと申請者らは、組織押圧と naked プラスミドを利用した臓器特異的な遺伝子導入システムの開発に成功した[1, 2]。また、不明な点が多い本システムの遺伝子導入機構解明に取り組み、押圧刺激した組織での一過性の遺伝子透過性亢進及び転写因子活性化がその高い遺伝子発現に寄与することを明らかにした。さらに、マウス体内埋め込み式 MEMS デバイスを開発し、体外からの駆動可能な組織押圧により遺伝子発現を得ることに成功した[3]。一方、本システムのヒトへの展開のため、腹腔内視鏡先端に搭載可能な組織吸引デバイスを開発し、組織吸引圧を利用した遺伝子導入法の開発に成功した ([4]; PCT 出願: PCT/JP2011/062102、米国出願: 13/881, 304、欧州出願: 11835898.5)。このように、組織押圧・吸引圧による臓器特異的な遺伝子導入システムは、シンプルかつ汎用的な方法であり、生物医学や遺伝子治療における応用・基礎研究での発展が期待される。

## 2. 研究の目的

生物医学領域や遺伝子治療の応用において、臓器特異的な遺伝子発現を実現するシンプルな in-vivo 遺伝子導入システムの開発が強く望まれている。これまでの研究実績をもとに、本研究は組織押圧・吸引法の研究を深化させ、組織押圧・吸引圧を利用した新規遺伝子治療法や in-vivo 遺伝子機能解析へと展開する為の基盤研究をおこなう。本研究では、特に、組織押圧・吸引圧による遺伝子発現制御理論、組織吸引圧デバイス製造技術、遺伝子治療への応用などの視点より展開する。本研究推進により、遺伝子・核酸治療薬の開発に新たに機械工学的手法が導入され、腎臓、肝臓等での遺伝子導入の時空間制御化を可能とすると共に、合理的かつ迅速に基礎研究から応用研究へと橋渡しする道も容易に拓かれることから、学術的な独創性や汎用性に

加えて、社会的意義も極めて大きいものと考えられる。

## 3. 研究の方法

申請者らはこれまでに組織押圧・吸引圧を利用した naked 遺伝子導入法の開発に成功した。本研究は組織押圧・吸引法の研究を深化させ、組織押圧・吸引圧を利用した新規遺伝子治療法や in-vivo 遺伝子機能解析へと展開する為の基盤研究を行うことを目的とし、以下の4点について研究に取り組んだ。(1) 組織押圧・吸引圧法における遺伝子導入メカニズムを明らかにする。(2) 組織吸引圧法による遺伝子発現レベルの最適化を行う。(3) 組織押圧・吸引圧法における遺伝子発現の長期持続化を達成する。(4) 肝臓や腎臓を対象とした遺伝子治療法の開発を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 組織押圧・吸引圧法における遺伝子導入メカニズム

吸引圧を施した腎臓および肝臓では、遺伝子発現に関与する転写因子の活性化がみられた。また、腎臓吸引圧法において、pDNA の投与タイミングを変化させ、細胞膜透過性の亢進時間を検討した。その結果、吸引圧法による細胞膜透過性亢進の持続時間は約 0 ~ 10 秒間であり、そのごく短い期間に pDNA が細胞内へ移行し、転写因子の結合が関与して遺伝子発現を増加させている可能性が示された。

また、組織吸引圧法による遺伝子の臓器内空間分布を明らかにするため、組織透明化を用いて腎臓および肝臓における遺伝子発現部位の評価をおこなった。その結果、腎臓吸引圧法では、腎臓の血管内皮細胞ではなく、血管周囲の間質領域に対して遺伝子導入されている可能性が示された。さらに、免疫染色をおこなった結果、主に尿細管周囲繊維芽細胞、部分的に血管周皮細胞に遺伝子導入されることが明らかとなった。また、肝臓吸引圧法では、吸引部位に限局した発現がみとめられ、主に臓器上部で発現している様子が観察された。さらに、X-gal 染色を用いて評価した結果、肝臓吸引圧法における遺伝子発現部位は肝臓実質細胞であることが示唆された。

### (2) 組織吸引圧法による遺伝子発現レベルの最適化

肝臓への吸引圧法に関して、遺伝子導入における吸引圧を最適化した結果、-5 kPa 以上の吸引圧により、吸引部位の外側左葉では対照群(未処置群)と比較して  $5.0 \times 10^3$  程度高い発現がみられた。また、吸引による ALT 値の上昇は観察されなかった。さらに、遺伝子発現レベルの向上を目指し、組織吸引できる面積を5倍に増やした吸引デバイスの開発をおこなった。

(3)・(4) 組織押圧・吸引圧法における遺伝子発現の長期持続化、肝臓や腎臓を対象とした遺伝子治療法の開発

単一のプラスミドによる発現持続化を目指すため、pCpGfree-Lucia をベクターとして選択し、組織吸引圧法による発現期間を評価した。その結果、腎臓ならびに肝臓において、それぞれ2週間に渡る発現を得ることができた。また、病態時における影響に関して、四塩化炭素誘発性急性肝炎モデルマウスおよび肝繊維症モデルマウスでの遺伝子発現特性を明らかにできた。以上の結果より、hepatic growth factor (HGF) の長期発現を目的に pCpGfree-Luc を用いた pCpGfree-hHGF の構築をおこなった。

以上、本研究では、組織吸引圧法による組織内遺伝子発現の空間分布を解明することに成功した。また、病態時における影響に関して、四塩化炭素誘発性急性肝炎モデルマウスおよび肝繊維症モデルマウスにおける肝臓での遺伝子発現特性を明らかにできた。

#### <引用文献>

- [1] H. Mukai, S. Kawakami, M. Hashida, Renal press-mediated transfection method for plasmid DNA and siRNA to the kidney, *Biochem Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 372, No. 3, 2008, pp. 383-387
- [2] H. Mukai, S. Kawakami, Y. Kamiya, F. Ma, H. Takahashi, K. Satake, K. Terao, H. Kotera, F. Yamashita, M. Hashida, Pressure-mediated transfection of murine spleen and liver, *Human Gene Therapy*, Vol. 20, No. 10, 2009, pp. 1157-1167
- [3] K. Shimizu, S. Kawakami, K. Hayashi, Y. Mori, M. Hashida, S. Konishi, Implantable pneumatically actuated microsystem for renal pressure-mediated transfection in mice, *Journal of Controlled Release*, Vol. 159, No. 1, 2012, pp. 85-91
- [4] K. Shimizu, S. Kawakami, K. Hayashi, H. Kinoshita, K. Kuwahara, K. Nakao, M. Hashida, S. Konishi, In vivo site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device, *PLoS One*, Vol. 7, No. 7, 2012, e41319

#### 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4件)

N. Oyama, Y. Fuchigami, S. Fumoto, M. Sato, M. Hagimori, K. Shimizu, S. Kawakami, Characterization of transgene expression and pDNA distribution of the suctioned kidney in mice, *Drug Delivery*, 査読有, in press, 2017  
DOI: 10.1080/10717544.2017.1333171

Y. Taniguchi, S. Kawakami, Y. Fuchigami, N. Oyama, F. Yamashita, S. Konishi, K. Shimizu, M. Hashida, Optimization of renal transfection using a renal suction-mediated transfection method in mice, *Journal of Drug Targeting*, 査読有, Vol. 24, 2016, pp. 450-456  
DOI:10.3109/1061186X.2015.1087526

Y. Otani, S. Kawakami, H. Mukai, Y. Fuchigami, F. Yamashita, M. Hashida, Long-term in vivo gene expression in mouse kidney using phiC31 integrase and electroporation, *Journal of Drug Targeting*, 査読有, Vol. 23, 2015, pp. 427-435  
DOI:10.3109/1061186X.2014.1002788

川上 茂, 淵上由貴, 医薬工連携型 DDS の開発, *医薬ジャーナル*, 査読無, Vol. 50, 2014, pp. 103-107

#### [学会発表](計15件)

川上 茂, 西村光洋, 小川昂輝, 大山奈津子, 萩森政頼, 麓伸太郎, 淵上由貴, 組織透明化による組織内空間分布評価を利用した外部刺激応答性遺伝子導入システムの評価, 第33回日本薬学会九州支部大会, 2016年12月3日~2016年12月4日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

原口綾奈, 淵上由貴, 萩森政頼, 麓伸太郎, 川上 茂, 肝臓への組織吸引圧法における薬物送達特性の評価, 第33回日本薬学会九州支部大会, 2016年12月3日~2016年12月4日, 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

S. Kawakami, N. Oyama, Y. Fuchigami, M. Sato, W. Wei, M. Hagimori, S. Fumoto, Renal suction-mediated transfection method can deliver pDNA to tubulointerstitial cells in mice, 日本薬物動態学会第31回年会, 2016年10月13日~2016年10月15日, キッセイ文化ホール, 松本市総合体育館(長野県・松本市)

大山奈津子, 淵上由貴, 萩森政頼, 麓伸太郎, 川上 茂, 腎臓吸引圧法では尿細管間質の繊維芽細胞および血管周皮細胞に遺伝子導入される, 遺伝子・デリバリー研究会第16回夏期セミナー, 2016年9月12日~2016年9月13日, やすらぎ伊王島(長崎県・長崎市)

N. Oyama, S. Fumoto, Y. Fuchigami, M. Hagimori, S. Kawakami, Spatial distribution of transgene expression in the kidney in renal suction-mediated transfection method in mice, The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals, 2016年6月24日~2016年6月25日, 京都教育文化センター(京都府・京都市)

大山奈津子, 麓伸太郎, 清水一憲, 淵上由貴, 川上 茂, 腎臓吸引圧遺伝子・核酸導入法における腎内遺伝子発現の空間分布評価, 日本薬剤学会第31年会, 2016年5月19日~2016年5月21日, 長良川国際会議場, 岐阜都ホテル(岐阜県・岐阜市)

川上 茂、外部刺激制御に基づく遺伝子・核酸デリバリーシステムの開発、日本薬学会第136年会、2016年3月26日～2016年3月29日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

川上 茂、原口綾奈、大山奈津子、淵上由貴、麓伸太郎、清水一憲、組織吸引圧を利用した遺伝子デリバリー：長期発現持続化と組織内発現の評価、第15回遺伝子・デリバリー研究会夏期セミナー、2015年9月7日～2015年9月8日、定山溪ビューホテル（北海道・札幌市）

大山奈津子、麓伸太郎、佐藤 萌、清水一憲、淵上由貴、川上 茂、腎臓吸引圧導入法による遺伝子導入部位の評価、日本薬剤学会第30年会、2015年5月21日～2015年5月23日、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）

佐藤 萌、大山奈津子、清水一憲、淵上由貴、川上 茂、腎臓への吸引圧核酸導入法を利用した外来遺伝子発現における支配因子の検討、遺伝子・デリバリー研究会第15回シンポジウム、2015年5月1日～2015年5月1日、京都薬科大学（京都府・京都市）

大山奈津子、佐藤 萌、麓伸太郎、清水一憲、淵上由貴、川上 茂、組織押圧・吸引圧を利用した腎臓への遺伝子導入における遺伝子発現部位ならびに簡易式組織吸引デバイスの評価、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日～2014年12月7日、第一薬科大学（福岡県・福岡市）

原口綾奈、淵上由貴、麓伸太郎、清水一憲、張 光元、橋田 充、川上 茂、肝臓への遺伝子導入のための組織吸引デバイスの開発と急性肝炎モデルマウスでの評価、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日～2014年12月7日、第一薬科大学（福岡県・福岡市）

川上 茂、原口綾奈、西村光洋、橋田 充、淵上由貴、超音波照射や組織押圧・吸引圧を利用した遺伝子デリバリー、分子デリバリー研究会：物理と薬学のコラボレーション2014年度研究会、2014年12月5日～2014年12月5日、慶應義塾大学矢上キャンパス（神奈川県・横浜市）

川上 茂、外部刺激を利用した標的指向性DDSの開発、第63回高分子討論会、2014年9月24日～2014年9月26日、長崎大学スカイホール（長崎県・長崎市）

川上 茂、原口綾奈、大山奈津子、張 光元、橋田 充、清水一憲、淵上由貴、組織吸引圧を利用した部位特異的遺伝子・核酸導入システムの開発、遺伝子・デリバリー研究会第14回夏期セミナー、2014年8月20日～2014年8月21日、阿蘇いこいの村（熊本県・阿蘇市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川上 茂（KAWAKAMI, Shigeru）  
長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授  
研究者番号：20322307

##### (2) 研究分担者

清水 一憲（SHIMIZU, Kazunori）  
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：70402500

##### (3) 連携研究者

和田 光弘（WADA, Mitsuhiro）  
九州保健福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：40295093

##### (4) 研究協力者

萩森 政頼（HAGIMORI, Masayori）  
麓伸太郎（FUMOTO, Shintaro）  
淵上 由貴（FUCHIGAMI, Yuki）  
大山 奈津子（OYAMA, Natsuko）