

研究種目：若手研究 (A)
研究期間：2007～2010
課題番号：19689005
研究課題名 (和文) 樹状細胞指向性ナノ粒子・物理刺激併用による高効率遺伝子導入システム構築と癌治療
研究課題名 (英文) Development of efficient gene transfection system by the combination use of dendritic cells-selective nanoparticle and physical stimulation for cancer therapy
研究代表者 川上 茂 (Kawakami Shigeru)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号：20322307

研究代表者の専門分野：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・福祉、免疫学、癌、遺伝子、ドラッグデリバリー、遺伝子治療

1. 研究計画の概要

難治性疾患に対する遺伝子治療は、期待の大きさに反して、効果的な遺伝子導入ベクターの開発が進まないため、十分な成果を挙げていない。これまで申請者らは、遺伝子治療用の非ウイルスベクターを開発し、特に糖鎖認識機構を利用した *in vivo* 細胞特異的遺伝子ターゲティングシステムの開発において成果を挙げてきた。申請者らが開発したマンノース修飾コレステロール誘導体、**Man-C4-Chol** を用いたマンノース修飾リポソームでは、免疫担当細胞への認識・取り込みが大きく改善され、既に、投与部位から標的細胞までの移行は克服できていると考えている。一方、申請者らの定量的評価系による検討により、現在の遺伝子ターゲティングシステムでは、細胞内遺伝子動態が遺伝子発現効率における最大の障壁となっている。申請者らが精力的に開発を進めてきた遺伝子ターゲティングシステムは、既に投与部位から標的細胞までの移行過程までの精密制御に成功しており、細胞膜透過が期待できる物理的刺激と併用することで、飛躍的に高い *in vivo* 遺伝子発現を得ることができ、その結果、細胞性免疫誘導に基づいた革新的ながん免疫療法が可能になると考えられる。

本研究では、樹状細胞選択的に認識して効率的に遺伝子を導入できる遺伝子ターゲティングシステムを利用した新規がん免疫療法の確立を目標として樹状細胞指向型キャリアと物理刺激の組み合わせにより画期的な遺伝子導入効率を目指す。さらに本システムを利用した *in vivo* 法によって投与された新規 DNA ワクチン製剤の癌免疫療法への応用の可能性に関して、治療効果ならびに副

作用発現の両面から検討を進め総合的な観点から最適化を進める。

2. 研究の進捗状況

本研究では、糖修飾リポソームと物理刺激の併用による高効率遺伝子導入法の開発と癌治療への展開を目標とする。まず、マンノース修飾リポソーム製剤投与による投与経路とターゲティング効果の関連性を明らかにすることに成功した。次に、物理刺激として臨床で使用できる超音波の利用に着目し、マンノース修飾リポプレックスと超音波応答製剤であるバブルリポソームとの併用で静脈内投与し、体外からの超音波照射によるバブルの崩壊に伴うキャビテーションエネルギーによる細胞穿孔を利用した高効率遺伝子導入法の開発を行った。遺伝子マンノース修飾リポプレックスとマンノース修飾リポプレックスおよびバブルリポソームのマウス静脈内併用投与後に体外からの超音波照射を行うことで、*in vivo* においてマクロファージや樹状細胞への細胞選択的な遺伝子導入の大幅な改善に成功した。

次に、簡便かつ安定な細胞選択的遺伝子導入を目的に、PEG 末端にマンノース残基を結合した新規マンノース修飾ポリエチレングリコール(PEG)脂質(**Man-PEG-DSPE**)を合成し、それを用いてマンノース修飾バブルリポプレックス(**Man-PEG-BL**)を新規調製した。マウスへ静脈内投与後、**Man-PEG-BL** と超音波照射により、**Man-PEG-BL** 単独投与時と比較し、肝臓及び脾臓において約 300 倍高い遺伝子発現が認められたが、肺、腎臓、心臓での遺伝子発現に変化は認められなかった。また、マンノースレセプターを発現する肝非実質細胞及び脾樹状細胞において細

胞選択的な遺伝子導入効率の改善が認められた。さらに、OVA をコードする遺伝子を用いたところ、OVA 特異的な細胞障害性 T 細胞誘導効果が認められた。以上、超音波応答性糖修飾バブルリポプレックスの開発とそれを利用した DNA ワクチン治療への展開に成功した。

3. 現在までの達成度

“②おおむね順調に進展している。”

進捗状況に示したとおり、大部分の研究計画は達成することができた。超音波応答性糖修飾リポソームの開発に成功したのは、投与計画以上の大きな成果である。この成功は DNA ワクチン治療への展開を可能とした。DNA ワクチン効果に関して、良好な結果を得るため免疫感作の最適化（投与量、間隔、回数）に際し、時間をかけ検討した為、目標とした細胞障害性 T 細胞誘導効果を得ることができたが、計画より若干の遅れがあり、おおむね順調に進展していると判断した。

4. 今後の研究の推進方策

これまで得られた知見を基に製剤を最適化し、樹状細胞への遺伝子導入効率を更に改善すると共にメラノーマ関連抗原発現プラスミドを用いたメラノーマに対する DNA ワクチン効果を評価する予定である。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕（計 8 件）

①Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M: Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannoseylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure, *Hum Gene Ther*, 21(1):65-74 (2010) 査読有

②Zhou S, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M: Intranasal administration of CpG DNA lipoplex prevents pulmonary metastasis in mice, *Cancer Lett.*;287(1):75-81 (2010) 査読有

③Kuramoto Y, Kawakami S, Zhou S, Fukuda K, Yamashita F, Hashida M: Mannosylated cationic liposomes/CpG DNA complex for the treatment of hepatic metastasis after intravenous administration in mice, *J Pharm Sci*, 98(3):1193-1197 (2009) 査読有

④Wijagkanalan W, Kawakami S, Takenaga M, Igarashi R, Yamashita F, Hashida M: Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannoseylated liposomes in rats, *J Control Release*, 125(2):121-130, (2008) 査読有

⑤Kuramoto Y, Kawakami S, Zhou S, Fukuda K, Yamashita F, Hashida M: Use of mannoseylated cationic liposomes/ immunostimulatory CpG DNA complex for effective inhibition of peritoneal dissemination in mice, *J Gene Med*, 10(4):392-399 (2008) 査読有

⑥Kuramoto Y, Kawakami S, Zhou S, Fukuda K, Yamashita F, Hashida M: Efficient peritoneal dissemination treatment obtained by an immunostimulatory phosphorothioate-type CpG DNA/cationic liposome complex in mice, *J Control Release*, 126(3):274-280 (2008) 査読有

⑦Kawakami S, Higuchi Y, and Hashida M: Non-viral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide, *J Pharm Sci*, 97 (2):726-745 (2008) 査読有

⑧Lu Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M: Development of an antigen presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannoseylated liposomes, *Biomaterials*, 28(21):3255-3262 (2007). 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

① Kawakami S, Mukai H, Hashida M: Development and evaluation of organ-press mediated in vivo gene transfection methods of plasmid DNA and siRNA. The 10 the US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, Hawaii, December 16-20, 2009

② Kawakami S, Hashida M: Cancer immunotherapy using glycosylated liposomes, 日本癌学会総会、横浜、2009 年 10 月 2 日

③ Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M: Glycosylated liposomes for drug and nucleic acids delivery, 11th Liposome Research Days, Yokohama, Japan, July 21, 2008

④Kawakami S, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M, Glycosylated liposomes for the targeted delivery of siRNA and CpG DNA, 第 14 回日本遺伝子治療学会年会、札幌、2008 年 6 月 12 日

⑤ Kawakami S, Hashida M: Evaluation and development of nano-carriers using imaging technology, 1st Asian Biomaterial Conference, Tsukuba, Japan, December 8, 2007.

⑥Wijagkanalan W, Kawakami S, Teshima M, Sasaki H, Hashida M: Targeting of inhaled dexamethasone palmitate using mannoseylated liposomes in an endotoxin-induced lung inflammation model, 日本薬剤学会第 23 年会、札幌、2008 年 5 月 20 日

⑦ Kuramoto Y, Kawakami S, Hashida M: Cationic liposomes formulations for the effective treatment of peritoneal dissemination by CpG DNA, 日本癌学会、横浜、2007 年 10 月 4 日
〔図書〕（計 1 件）

①川上 茂、樋口ゆり子、橋田 充：バイオ医薬の開発技術とシーズ、第 5 編 非感染症ワクチン（がんワクチン他）、第 3 章がん DNA ワクチンの為のリポソーム製剤の開発、pp 342-349CMC 出版社（2008）

〔その他〕

ホームページ: <http://>

dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm