

機関番号：14301

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

研究成果の概要（和文）：

超音波応答性と免疫担当細胞指向性を兼ね備えたマンノース修飾バブルリポプレックスの開発を行った。マンノース修飾バブルリポプレックスを投与し、体外からの超音波照射を行ったところ、マンノースレセプターが高発現する肝臓非実質細胞や脾臓樹状細胞に対して、一過性の細胞穿孔による高効率遺伝子導入が可能であった。また、本リポプレックスを利用した DNA ワクチンでは、導入癌抗原特異的な細胞性免疫誘導効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed mannosylated bubble lipoplex for ultrasound-responsive and cell-selective gene transfer. After administration of mannosylated bubble lipoplex, plasmid DNA was efficiently transfected to the mannose receptors-expressing cells, including dendritic cells and liver non-parenchymal cells followed by ultrasound exposure. Enhanced DNA vaccine potency was also observed by this transfection method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	18,200,000	5,460,000	23,660,000

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・福祉、免疫学、癌、遺伝子、ドラッグデリバリー、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

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、申請者ら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主要な

障壁である可能性が示されていた。

2. 研究の目的

このように申請者らが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体外からの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有効ながん免疫治療が可能になると考えられる。

本研究では、樹状細胞に対して細胞選択的に認識して効率的に遺伝子導入できるターゲティングシステムを利用した新規がん免疫治療を目標として、まず、樹状細胞指向型 DDS キャリア製剤 (糖修飾バブルリポソーム/プラスミド DNA 複合体; 糖修飾バブルリポプレックス) を開発し、超音波照射の組み合わせにより、遺伝子導入効率の改善を目指す。さらに本システムを利用し、*in-vivo* で投与された新規 DNA ワクチン製剤の癌免疫療法への展開の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

糖修飾リポソームの調製は、我々の過去の報告に従って糖修飾コレステロール誘導体、Man-C4-Chol を合成し (*Gene Therapy*, 7, 292-299, 2000)、リポソームに組み込み、*evaporation* 法により調製した。糖修飾バブルリポソームの調製: 末端にアミノ基を有する PEG-DSPE_{2,000} (SUNBRIGHT DSPE-020PA, 日本油脂) に対して、上述の方法に準じてマンノースを導入した糖修飾脂質誘導体、Man-PEG-DSPE を用いてマンノース残基を付加した PEG 修飾リポソームを *evaporation* 法により調製し、超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスを *sonication* 法により封入した。各種リポプレックス製剤の粒子径や電位などの物理化学的性質は、Zetasizer Nano (Malvern 社製) を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼをコードした pCMV-Luc、オブアルブミン (OVA) をコードした pCMV-OVA、gp-100 並びに TRP2 をコードした pUb-M との複合体は、静電的な相互作用により調製した。マウスへマンノース修飾バブルリポソームを静脈内投与し、5 分後に超音波照射 (SONOPORE KTAK-4000, ネッパジーン社製) を行い、各臓器での遺伝子導入ならびに肝非実質細胞及び脾樹状細胞内での細胞選択的遺伝子導入特性をホタルルシフェラーゼの発現を指標に評価した。脾臓 CD11C⁺細胞は、磁気分離ビーズカラムを用いて単離を行い、細胞中の遺伝子発現を定量的 PCR 法により評価した。

In vitro では、4 週齢 ICR 系雄性マウスか

ら腹腔マクロファージを単離し、細胞内取り込み特性、遺伝子発現特性、転写活性化、細胞毒性の評価を行った。*In vivo* では、ICR 系雌性マウス (18-22 g) を用いた。臓器に対する超音波照射は、直径 20 mm のプローブを用いて体外からマウス腹部に対して超音波強度 (frequency, 1.04 MHz; duty 50%; burst rate, 10Hz; intensity 1.0 W/cm²) で照射した。各臓器や標的細胞における遺伝子発現特性、体内動態特性、炎症性サイトカイン分泌特性、肝障害、転写活性化の評価を行った。

また、DNA ワクチンの評価に関しては、6 週齢 C57BL/6 系雌性マウスを用い pCMV-OVA や pUb-M を隔週で 3 回静脈内投与により遺伝子導入 (免疫) 後、細胞障害性 T 細胞 (CTL) 活性の評価を行い、あるいは、OVA 発現リンパ腫細胞株 E.G7-OVA 細胞、OVA 非発現リンパ腫細胞株 EL4 細胞やメラノーマ細胞株である B16BL6 細胞をマウスへ移植による生存率や腫瘍増殖抑制効果、あるいは抗転移効果について評価を行った。血清中の炎症性サイトカインは、ELISA 法により測定を行った。CTL 活性は、⁵¹Cr ラベルされた各上記細胞と免疫したマウスから単離した脾臓細胞を共培養し、⁵¹Cr 放出で評価した。

4. 研究成果

マンノース修飾リポソームがプラスミド DNA だけでなく、オリゴ核酸である 20 塩基の一本鎖 DNA である CpG DNA や 20 塩基の 2 本鎖 DNA である NFκB デコイとも複合体を形成し、静脈内、腹腔内、気道内投与においてもマンノースレセプターを介した細胞選択的核酸デリバリーが可能であることが示された。そこで、マンノース修飾リポソームを用いて標的細胞に到達させた後の細胞質内への高効率送達を目指した。物理的刺激としては、超音波造影ガス封入製剤と超音波照射により発生するキャビテーションエネルギーに基づく一過性の細胞穿孔を利用するソノポレーション法に関する検討を行った。まず、プラスミド DNA を旧来のマンノース修飾リポプレックスとして投与することによる生体内安定性の改善を試みた結果、本製剤とバブルリポソーム/超音波照射の併用により標的細胞選択的かつ高い遺伝子発現が得られた。さらに、プラスミド DNA-バブル製剤間の体内動態挙動の違いを克服するために、超音波応答性と標的細胞指向性を併せ持つマンノース修飾バブルリポソームの開発を行った。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 PEG 脂質 (Man-PEG-DSPE) を合成し、それを用いてプラスミド DNA と静電的相互作用により複合体を形成させたマンノース修飾バブルリポプレックスを調製した。調製したマンノース修飾バブルリポソーム/pCMV-Luc 複

合体の平均粒子径は約 500 nm、 ζ 電位は 44.8 mV であった。マウスへ静脈内投与後、マンノース修飾バブルリポプレックスと超音波照射により、マンノース修飾バブルリポプレックス単独投与時と比較し、肝臓及び脾臓において有意に高い遺伝子発現が認められた。一方、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、肝臓あるいは脾臓の細胞を分離したところ、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高い遺伝子発現が認められ、細胞選択的な遺伝子導入であることが示された。

マンノース修飾バブルリポプレックスを用いた遺伝子導入機構の解明に関する検討を行った。放射標識 pDNA を用いた体内動態解析を行った結果、マウスへ静脈内投与後、マンノース修飾バブルリポプレックスは、未修飾バブルリポプレックスに比べ、肝臓や脾臓に高い集積を示し、両製剤ともに超音波照射により肝臓や脾臓への取り込みが僅かながら増大されることが明らかとなった。また、蛍光標識 pDNA を用い、共焦点レーザー顕微鏡によるマウス腹腔マクロファージ初代培養細胞への細胞取り込み・内在化過程の観察を詳細に行った結果、マンノース修飾バブルリポプレックスは未修飾バブルリポプレックスより有意に高い細胞取り込みを示し、両製剤ともに超音波照射により pDNA が細胞質内へ高効率に移行されることを確認した。また、初代培養マクロファージにおけるマンノース修飾バブルリポプレックスや未修飾バブルリポプレックスと超音波照射による遺伝子発現は、エンドサイトーシス阻害剤ならびに TLR9 シグナル阻害剤の影響を受けず、この条件下、炎症性サイトカイン TNF α 産生は僅かであった。以上、超音波照射を利用したマンノース修飾バブルリポプレックスや未修飾バブルリポプレックスによる遺伝子導入法では、pDNA をエンドサイトーシス経路ではなく、細胞穿孔により直接細胞質内へ導入していることを示唆された。さらに、超音波照射に伴い、転写因子 AP-1 や NF κ B の活性化が引き起こされ、これらの要因が超音波応答性マンノース修飾バブルリポプレックスによる高い遺伝子発現に一部寄与していることが示された。

DNA ワクチン治療への展開に関して、モデル抗原タンパク質として汎用される OVA をコードする pCMV-OVA を用いたところ、マンノース修飾バブルリポプレックス投与群の脾臓から細胞を単離して、CTL 活性を評価したとこと、未修飾バブルリポプレックス投与群に比べて、E.G7-OVA 細胞での有意な ^{51}Cr 放出による細胞障害効果が認められた。一方、この効果は、EL4 細胞ではほとんど認められず、OVA 特異的な細胞障害性 T 細胞

(CTL) 誘導効果であることが示唆された。また、マンノース修飾バブルリポプレックス投与群では、未修飾バブルリポプレックス投与群に比べて、E.G7-OVA 細胞移植マウス群における、有意な E.G7-OVA 細胞増殖抑制効果ならびにマウス生存率延長効果が認められた。一方、この効果は、EL4 細胞移植マウス群ではほとんど認められなかった。以上、超音波照射とマンノース修飾バブルリポプレックスによる *in-vivo* 遺伝子導入が DNA ワクチンによる癌免疫治療法として有効に機能する可能性が示された。

表皮性メラニン形成細胞の悪性化により生じる、メラノーマと呼ばれる悪性黒色腫は年々罹患率が増加している。初期のメラノーマは外科手術等により治癒可能であるが、その後転移・再発が頻発するという特性をメラノーマは有し、かつ、転移・再発性メラノーマ患者の予後は極めて悪い。そこで、メラノーマ関連抗原である gp100 並びに TRP-2 を発現する pUb-M を、本方法によりマウス抗原提示細胞に導入して免疫し、B16BL6 細胞由来の固形腫瘍並びに転移性肺腫瘍に対する DNA ワクチン効果の評価を行った。その結果、超音波応答性マンノース修飾リポプレックスと超音波照射を用いた遺伝子導入法により免疫誘導を行ったマウス群では、B16BL6 細胞特異的な CTL 誘導活性を示し、B16BL6 細胞をマウスへ移植した固形腫瘍並びに転移性肺腫瘍マウスにおいても B16BL6 細胞特異的な腫瘍経の増大抑制効果、転移腫瘍数の減少効果が認められた。これらの知見は、超音波照射とマンノース修飾バブルリポプレックス製剤による *in-vivo* 遺伝子導入法が DNA ワクチンによるメラノーマに対する治療に有効である可能性を示すものである。

以上、マンノースレセプター認識機構、並びに超音波照射に伴う細胞穿孔を利用し、樹状細胞など免疫担当細胞に対し選択的かつ高効率な遺伝子導入を可能とする、マンノース修飾バブルリポプレックスと超音波照射の併用に基づく細胞選択的かつ高効率な遺伝子導入法の開発に成功した。また、遺伝子導入機構や転写因子活性化の関与を明らかにすることができた。さらに、超音波応答性マンノース修飾バブルリポプレックスによる遺伝子導入法が DNA ワクチンによる癌免疫治療法として有効に機能する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

① Un K, Kawakami S[†], Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M[†]: The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes,

(†corresponding authors)
Biomaterials, 32(20): 4659-4669 (2011) 査読有

② Un K, Kawakami S[†], Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M[†]: Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier,
(†corresponding authors)
Mol Pharm, 8(2): 543-554 (2011) 査読有

③ Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M: Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy, *Biomaterials*, 31(30): 7813-7826 (2010) 査読有

④ Un K, Kawakami S[†], Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M: Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannose-modified lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure, (†corresponding author)
Hum Gene Ther, 21(1): 65-74 (2010) 査読有

⑤ Zhou 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

⑥ Kuramoto 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

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

⑧ Kuramoto Y, Kawakami S[†], Zhou S, Fukuda K, Yamashita F, Hashida M: Use of mannose-modified cationic liposomes/immunostimulatory CpG DNA complex for effective inhibition of peritoneal dissemination in mice, (†corresponding author)
J Gene Med, 10 (4): 392-399 (2008) 査読有

⑨ Kuramoto 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

⑩ Wijagkanalan W, Kawakami S, Takenaga M, Igarashi R, Yamashita F, Hashida M: Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannose-modified liposomes in rats,
J Control Release, 125 (2): 121-130 (2008) 査読有

⑪ Lu Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M: Development of an antigen presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannose-modified liposomes,
Biomaterials, 28(21): 3255-3262 (2007) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 運 敬太、川上 茂、鈴木 亮、丸山一雄、樋口ゆり子、山下富義、橋田 充：超音波応答性リポソームを用いた in-vivo 遺伝子導入法における転写因子活性化と炎症性サイトカイン産生の評価、*遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム*、札幌、2010年6月2日

② Kawakami S, Un K, Suzuki R, Maruyama K, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M: Gene transfer characteristics of an ultrasound-responsive and mannose-modified bubble lipoplex, *International Conference on Biomaterials Sciences 2011*, Tsukuba, March 17, 2011

③ 運敬太、川上 茂、鈴木亮、丸山一雄、山下富義、橋田充：マンノース修飾バブルリポプレックスと超音波照射による標的細胞選択的かつ高効率遺伝子導入法の開発、*日本薬学会第130年会*、岡山、2010年3月29日

④ Kawakami S, Mukai H, Hashida M: Development and evaluation of organ-press mediated in vivo gene transfection methods of plasmid DNA and siRNA. *The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems*, Maui, Hawaii, December 17, 2009

⑤ Kawakami S, Hashida M: Cancer immunotherapy using glycosylated liposomes, *第68回日本癌学会総会*、横浜、2009年10月2日

⑥ Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M: Glycosylated liposomes for drug and nucleic acids delivery, *11th Liposome Research Days*, Yokohama, July 21, 2008

⑦ Kawakami 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

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

⑨ Wijagkanalan W, Kawakami S, Teshima M, Sasaki H, Hashida M: Targeting of inhaled dexamethasone palmitate using mannose-modified 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

⑩ Kuramoto Y, Kawakami S, Hashida M: Cationic liposomes formulations for the effective treatment of peritoneal dissemination by CpG

DNA, 第66回日本癌学会総会、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 ワクチンの為のリボソーム製剤の開発、pp 342-349、CMC 出版社 (2008)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 茂 (Kawakami Shigeru)

研究者番号：20322307

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし