

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790041

研究課題名（和文） バイオサーファクタントを用いた新規非ウイルスベクターの開発

研究課題名（英文） A study of novel non-viral vectors containing biosurfactant MEL-A

研究代表者

伊納 義和（Inoh Yoshikazu）

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90434547

研究成果の概要：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。研究代表者はこれまで、従来の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培養細胞だけでなく、動物においても、従来の非ウイルスベクターと比較して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た。

また、研究代表者は、本ベクターが従来の正電荷リポソームとは異なり、主にリポソームと細胞膜との融合により迅速かつ大量に細胞内に遺伝子が導入され、高い遺伝子導入効率を達成することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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

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。1985年にアメリカのNIHで公的遺伝子治療審査機関が設立され、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よりも高い遺伝子導入効率を達成するコレステロール誘導体を開発してきた。特に側鎖末端に親水性の高いヒドロキシエチルアミノ末端基をもった正電荷コレステロール誘導体I(図1)を素材とした正電荷リポソームはDC-Cholより著しく高い遺伝子導入効率を有していることを明らかにした。

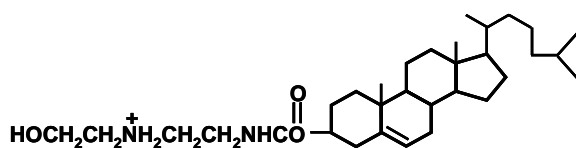


図1 誘導体Iの構造

一方、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。その結果、導入効率が低いとされている従来の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。

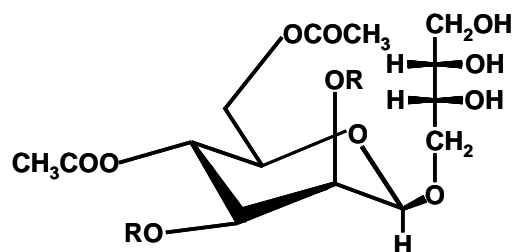


図2 Mannosylerythritol lipid A (MEL - A) の構造

2. 研究の目的

申請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。

バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームは、*in vivo* においても従来の非ウイルスベクターより高い遺伝子導入効率を達成することが予備的実験より明らかにしており、非ウイルスベクターによる遺伝子治療の発展に大きく寄与出来ることが示唆された。本申請研究では、まず申請者が開発した独創的なバイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームの詳細な細胞内遺伝子導入機構の追究を試みる。さらにこれらの知見を基にした *in vivo* への発展を試み、バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームの遺伝子治療用ベクターとしての有用性を明らかにすることを目的とする。具体的には、以下の実験を実施する。

(1) バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームの細胞内遺伝子導入機構の解明

(2) バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームの *in vivo* への展開

3. 研究の方法

(1) 研究代表者は従来の正電荷コレステロールを素材とした正電荷リポソーム・遺伝子複合体は細胞膜と静電相互作用により吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム膜とリポソーム膜との融合により遺伝子が細胞質に放出され、核移行する過程を経て遺伝子発現することを明らかにしている。そこで本申請研究では、バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームの遺伝子導入機構解明として以下の研究を実施した。

・細胞膜とリポソーム膜、及びエンドソーム膜とリポソーム膜との相互作用は細胞内への取り込み量と導入遺伝子の核移行において重要な役割を果たしている。そこで形質膜をモデルとした負電荷リポソームと正電荷リポソームの相互作用を指標として、FRET法(Fluorescence resonance energy transfer 法)を用いてバイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームと形質膜との相互作用を追究した。

・バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソーム及び導入遺伝子の細胞内動態について共焦点レーザー顕微鏡を用い、正電荷リポソーム・遺伝子複合体の細胞内動態、導入遺伝子がどのような経路で移行しているかについて時間的・空間的観察を実施した。

(2) バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームを対象に *in vivo* における遺伝子効率を追求し、遺伝子治療を目指した遺伝子導入ベクターとしての有用性について検討することを試みた。具体的には、腫瘍に対する遺伝子治療を推進する遺伝子導入ベクターの開発を目指し、マウスを用い、局所投与での検討を行った。

4. 研究成果

(1) バイオサーファクタント含有正電荷リポソームの膜融合能

FRET法により、細胞膜と正電荷リポソームの膜融合能の測定を行った。FRET法は、ドナー分子(NBD)とアクセプター分子(Rhodamine)が近距離(10nm以下)に存在すると、ドナー分子を励起したとき、励起されたドナー分子の蛍光エネルギーが、アクセプター分子の励起エネルギーに移行してアクセプター分子の蛍光が観察されるようになる(FRET)。しかし、ドナー分子とアクセプ

ター分子間の距離が離れると FRET の解消が起こる。この性質を利用し、細胞膜のモデルとして使用した負電荷リポソームをドナー分子(NBD)と、アクセプター分子(rhodamine)で蛍光標識し、正電荷リポソームと負電荷リポソームが膜融合することにより引き起こされる FRET の解消による NBD の蛍光強度の増大を測定し、正電荷リポソームとの膜融合能の指標とした。

その結果、バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームは細胞膜モデルとして用いた負電荷リポソームとの膜融合能が上昇することが明らかとなった(図3)。

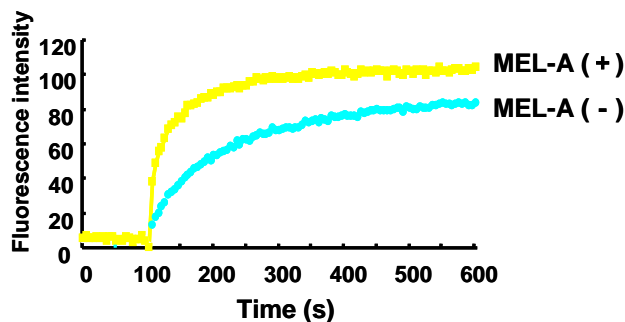


図3 FRET法を用いた負電荷リポソームとの膜融合能

(2) バイオサーファクタント含有正電荷リポソームによる細胞内遺伝子導入機構の解明

NBDでMEL-Aを、ローダミンで正電荷リポソームを、Cy5でDNAオリゴヌクレオチドをそれぞれ標識し、細胞内における詳細な経時変化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含有正電荷リポソームを用いてDNAオリゴヌクレオチドを導入した場合には、10分後には、MEL-Aが細胞膜に均一に分布し、その後、リポソームが細胞膜と接着した部位から徐々に細胞膜上に分布していく様子が観察された。そして、

細胞膜と正電荷リポソームが融合し、数分後にはDNAオリゴヌクレオチドがすばやく核内に集積していた。しかしながら、バイオサーファクタントを含有していない正電荷リポソームを用いた場合にはこのような細胞膜との融合は観察されなかった(図4)。以上の結果より正電荷リポソームにバイオサーファクタントを含有させた正電荷リポソームを用いると、バイオサーファクタントを含有していない正電荷リポソームを用いたときとは異なり、細胞膜との融合により細胞の核内に迅速にかつ、大量に取り込まれる経路が存在していることがわかった。

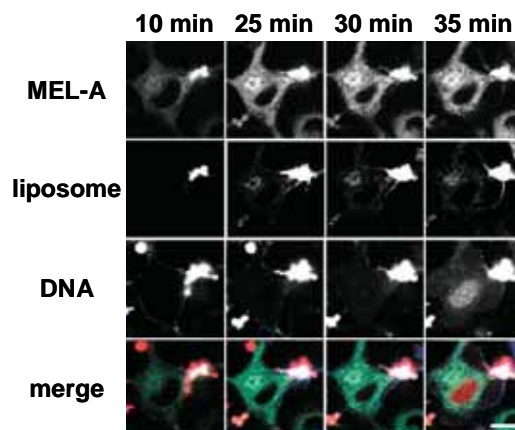


図4 バイオサーファクタント(MEL-A)、正電荷リポソーム、導入遺伝子の細胞内動態

(3) バイオサーファクタント含有正電荷リポソームによるin vivoへの展開

6週齢C57BL/6J雄性マウスにマウスメラノーマ細胞を腹腔内投与し、腹腔内に腫瘍を形成させた。その後、バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソーム-遺伝子複合体を腹腔内に投与し、24時間後における腹腔内に形成させた腫瘍に対する遺伝子導入効率をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

その結果、バイオサーファクタントを含有

した正電荷リポソームを用いると、バイオサーファクタントを含有していない正電荷リポソームを用いた場合に比べて、腫瘍への遺伝子導入効率が著しく上昇した。また、市販のコレステロール誘導体である DC-Chol からなる正電荷リポソームと比較しても 100 倍以上高い遺伝子導入効率を有していることが明らかとなった。

1985年以降、これまで数多くの遺伝子治療が実施されてきた。遺伝子治療は導入遺伝子を目的の組織、臓器、及び細胞に効率よく運搬するための「ベクター」が必要不可欠である。このため多くの研究者により様々なベクターが開発されている。今日ではウイルスの有する感染能力を利用したウイルスベクターを用いた遺伝子治療が大部分を占める。しかしながら、安全性の観点から、ウイルスベクターと比較して遺伝子導入効率が低いものの安全性の高い非ウイルスベクターが注目を浴びている。このような背景から、遺伝子導入効率の高い非ウイルスベクターの開発が大いに期待されている。

我々は、これまで全く試みのなかった微生物由来の機能性脂質であるバイオサーファクタントを従来の正電荷リポソームに含有させ、遺伝子導入効率の高い非ウイルスベクターの開発を試みてきた。その結果、バイオサーファクタントのひとつである MEL-A を含有した正電荷リポソームを用いることにより、培養細胞において遺伝子導入効率が著しく上昇することが明らかとなった。また、この新しい MEL-A 含有正電荷リポソームを用いると従来のエンドサイトーシスによる取り込みに加え、細胞膜との融合により導入遺伝子が大量かつ迅速に核内に取り込まれ、高い遺伝子導入効率を達成することを明らかにした。また、MEL-A を含有した正電荷リポソ-

ムは *in vivo* においても高い遺伝子導入効率を有しており、臨床応用においても非常に有用であると考えられる。

この新規正電荷リポソームを用いた遺伝子導入法は、安全性も高く、今後さらなる検討を重ねれば臨床応用に期待がもてると思われる。

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. M. Nakanishi, Y. Inoh, D. Kitamoto, T. Furuno, Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2009, 査読有 in press

2. Y. Inoh, T. Furuno, N. Hirashima, M. Nakanishi, Nonviral vectors with a biosurfactant MEL-A promote gene transfection into solid tumors in mouse abdominal cavity. 32, *Biol. Pharm. Bull.*, 126-128, 2009, 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. 伊納義和, バイオサーファクタントを含有した正電荷リポソームを用いた腹腔内腫瘍への遺伝子導入, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 27 日(京都)

2. 星野有香, マスト細胞の活性化に及ぼす HRB(hydrolyzed rice bran)の影響
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 10 日(神

戸)

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による遺伝子導入の新経路, 日本生物物理学会第 46 回年会, 2008 年 12 月 7 日 (福岡)

4. 伊納義和, バイオサーファクタントを用いた非ウイルスベクターの開発, 第 17 回 DDS カンファレンス, 2008 年 9 月 20 日 (静岡)

5. 岡 和生, プロポリスの抗アレルギー作用, 第二回 岐阜薬科大学高次機能性食品 (蜂産品) 研究講演会, 2008 年 8 月 9 日 (岐阜)

6. Yoshikazu Inoh, Biosurfactant (MEL-A) shows a unique pathway for gene transfection, LRD2008 11th Liposome Research Days Conference, July 21, 2008 (Yokohama)

7. 伊納義和, バイオサーファクタントによる遺伝子導入の新経路, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 28 日 (横浜)

8. 中村里香, プロポリスの抗アレルギー作用, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 27 日 (横浜)

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新規の遺伝子導入

機構, 第 45 回日本生物物理学会年会, 2007 年 12 月 23 日 (横浜)

10. 伊納義和, バイオサーファクタントを用いた新規非ウイルスベクターの研究, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007 年 12 月 14 日 (横浜)

11. Yoshikazu Inoh, NBD-conjugated biosurfactant (MEL-A) shows a new pathway for gene transfection, The American Society for Cell Biology the 47th Annual Meeting, December 12, 2007 (Washington DC, USA)

12. 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細胞内遺伝子導入とその動態の研究, 日本バイオイメージング学会第 16 回学術集会, 2007 年 11 月 2 日 (東京)

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) 研究協力者

なし