

機関番号：34306

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390016

研究課題名（和文） 糖尿病遺伝子治療を目指した非侵襲的な皮内遺伝子送達システムの開発

研究課題名（英文） Development of a noninvasive transdermal gene delivery system for gene therapy of diabetes

研究代表者

小暮健太郎（KOGURE KENTARO）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70262540

研究成果の概要（和文）：本研究では、人工遺伝子デリバリーシステム MEND を非侵襲的に皮内／筋肉内に送達し、インスリンを発現させることで糖尿病遺伝子治療法の開発を目指した。無針注射器により MEND を非侵襲的に皮内送達し、持続的な *in vivo* 遺伝子発現の誘導に成功した。プレプロインスリン遺伝子プラスミド DNA を構築し、MEND による培養細胞および組織中での当該 mRNA の有意な発現を確認した。さらに、糖尿病モデルマウスにおいて、MEND によるインスリン量の増大を確認した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop gene therapeutic technology for diabetes by production of insulin in skin and muscle via noninvasive transdermal delivery of artificial gene delivery system MEND. We succeeded the noninvasive transdermal delivery of MEND by jet-injection, and induction of sustained gene expression in the skin. We constructed preproinsulin plasmid DNA, and confirmed significant expression of the mRNA in the culture cells and skin. Moreover, increment of insulin production in diabetes-model mice treated with MEND.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
21 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
22 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：生物物理化学、薬物送達学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：遺伝子送達、糖尿病、インスリン、皮膚

1. 研究開始当初の背景

従来の I 型糖尿病（以下糖尿病）治療は、インスリン製剤（ペプチド）を注射等で皮内に投与することでインスリンを補充するものであった。遺伝子工学等により様々な特徴を

有するインスリン製剤が開発され効果を上げてはいるが、これら製剤は投与後短時間で血中から消失してしまうため、患者は毎日数回の注射を繰り返す行わなければならない、QOL の改善が切望されている。そのため、イ

インスリンが常に安定に供給され続けるシステムが望まれてきた。そのため、遺伝子導入による安定したインスリン供給システムは有効である。最近、レンチウイルスやアデノ随伴ウイルスを用いて糖尿病モデルラットの肝臓にインスリン遺伝子を導入し、インスリンを発現させ血糖値の抑制に成功した例が報告されているが、ウイルスによる遺伝子導入は免疫原性や毒性安全性の問題が指摘されており、より安全な人工遺伝子送達システムによるインスリン遺伝子導入が望まれる。現在ウイルスを用いずに *in vivo* で遺伝子を肝臓に導入可能な方法として、尾静脈から大量の遺伝子水溶液を急速注入する hydrodynamics 法が用いられているが、ヒトへの応用には問題が多い。さらに市販の人工キャリアーによる遺伝子導入効果は非常に低い。

2. 研究の目的

研究代表者はインスリン遺伝子を皮内に導入することで、インスリンを安定に供給できると考え、研究代表者が開発に成功している人工遺伝子送達システム MEND をベースに皮内遺伝子送達システムを開発し、インスリン遺伝子を皮内導入することで糖尿病遺伝子治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

皮膚内への人工遺伝子送達システムの開発と、インスリン遺伝子導入による糖尿病治療法の確立を目指し、(1) 皮内送達による遺伝子発現の検討とキャリアー動態解析、(2) キャリアーの最適化と皮内におけるインスリン産生の検討、(3) インスリンの効率的な皮内発現による糖尿病治療の検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、人工遺伝子デリバリーシステムである MEND を皮内に送達し、皮内および筋肉内にてインスリンを発現させることによる糖尿病の遺伝子治療法の開発を目指した。

(1) 皮内送達による遺伝子発現の検討とキャリアー動態解析: MEND の皮内移行方法の確立を目指し、イオントフォレシスおよび無針注射器を用いて MEND のモデルとしてのリポソームおよび MEND の皮膚投与を行った。無針注射器を用いることで、MEND を皮内に送達できることが明らかになった。同時に、イオントフォレシスによって、数百 nm もの大きさを有する複合体粒子を非侵襲的に効率よく皮内に送達することに成功した。無針注射およびイオントフォレシスによるナノ粒子の皮内投与の例は報告されておらず、我々の成果が初めてのものである。(2) キャリアーの最適化と皮内におけるインスリン産生の検討: 製剤化の一環として、糖を共存させることによる MEND の凍結乾燥と、低容量再水和による濃縮 MEND 懸濁液の調製法を確立

した。この凍結乾燥 MEND を用いて、*in vivo* における遺伝子発現能を評価したところ、naked DNA を単独で投与した場合に比べて MEND により持続的な *in vivo* 遺伝子発現を誘導することに成功した。さらに、プレプロインスリン遺伝子をコードしたオリジナルのプラスミド DNA の構築にも成功した。次いで、プリン遺伝子プラスミド DNA とプレプロインスリン遺伝子プラスミド DAN を共封入した MEND を調製し、培養細胞 (*in vitro*) にトランスフェクションした後、RT-PCR 法によってプロインスリン mRNA とプリン mRNA の発現を確認するとともに、Western blotting 法によって成熟化インスリンが産生されることを確認した。さらに、皮膚および筋肉に MEND を投与し、組織中の mRNA 量をリアルタイム PCR を用いて定量した結果、プレプロインスリン mRNA の有意な発現を確認した。また、糖尿病モデルマウスを作成し、MEND を投与した後の血漿中のインスリン量を ELISA 法によって定量した結果、MEND 投与によるインスリン量の増大を確認した。これまでに、キャリアーを用いた *in vivo* インスリン発現は報告されておらず、初めての知見である。(3) インスリンの効率的な皮内発現による糖尿病治療の検討: しかし、インスリン量としては不十分であったため、より効率的な皮内送達法および遺伝子発現活性の増大を目指し、物理的経皮送達法を組合せ、皮内における MEND の動態を評価した。その結果、皮内内奥まで MEND の送達に成功するとともに、有意に 5 倍以上の遺伝子発現活性の増大が認められた。また、血中グルコース濃度に応答したインスリン発現を実現するために、L 型ピルビン酸キナーゼプロモーターをレポーター遺伝子上流に組み込んだ新しいグルコース応答性プラスミド DNA を構築した。そのプラスミド DNA をトランスフェクションした培養細胞において、培地中のグルコース濃度を変化させた場合、グルコース濃度に依存して遺伝子発現活性が 10 倍弱上昇することを確認した。研究期間は終了したが、現在グルコース応答性プラスミド DNA を封入した MEND による血糖値抑制効果を検討している。

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 9 件)

① Kigasawa K, Kajimoto K, Nakamura T, Hama S, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *Int. J. Pharm.* 査読有 150 巻. 2011. 256-265

② Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M,

Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. Int. J. Pharm. 査読有 403 巻. 2011. 57-65

③Akita H, Kogure K, Moriguchi R, Nakamura Y, Higashi T, Nakamura T, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Futaki S, Harashima H. Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation. J. Control. Release 査読有 143 巻. 2010. 311-317

④Kigasawa K, Kajimoto K, Hama S, Saito A, Kanamura K, Kogure K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. Int. J. Pharm. 査読有 383 巻. 2010. 157-160

⑤ Akita H, Kudo A, Minoura A, Yamaguchi M, Khalil IA, Moriguchi R, Masuda T, Danev R, Nagayama K, Kogure K, Harashima H. Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. Biomaterials 査読有 30 巻. 2009. 2940-2949

⑥Kigasawa K, Kajimoto K, Watanabe M, Kanamura K, Saito A, Kogure K. In vivo transdermal delivery of diclofenac by ion-exchange iontophoresis with geraniol. Biol. Pharm. Bull. 査読有 32 巻, 2009, 684-687

⑦Homhuan A, Kogure K, Nakamura T, Shastri N, Harashima H. Enhanced antigen presentation and CTL activity by transduction of mature rather than immature dendritic cells with octaarginine-modified liposomes. J. Control. Release 査読有 136 巻. 2009. 79-85

⑧El-Sayed A, Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. Octaarginine-and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. J. Biol. Chem. 査読有 283 巻. 2008. 23450-23461

⑨Moriguchi R., Kogure K., Harashima H. Non-linear pharmacodynamics in the transfection efficiency of a non-viral gene delivery system. Int. J. Pharm. 査読有 363 巻. 2008. 192-198

[学会発表] (計 29 件)

①岩根奈緒美、濱進、伊東真寛、中瀬生彦、土谷博之、二木史朗、小暮健太郎. ステアリ

ル化オクタアルギニンの塗布によるメラノーマ治療. 日本薬学会第 131 年会 2011. 3. 静岡

②小暮健太郎. イオントフォレシスによる経皮ナノ DDS. オレオナノサイエンスシンポジウム 2010-ナノ DDS 2010. 11. 東京

③小暮健太郎. 薬工をつなぐ DDS 技術-微弱流によるナノ粒子の皮内デリバリー. 薬工融合型ナノメディシン創薬」シンポジウム 2010 2011. 11. 名古屋

④小暮健太郎. 痛みのないペプチド医薬品投与方法-電気のでペプチドを皮膚から身体の中に送り込む-. 第 5 回国際ペプチドシンポジウム日本ペプチド学会市民フォーラム 2010. 2010. 10. 京都

⑤濱 進、伊東真寛、小笹愛弓、総谷哲也、佐伯健、原島秀吉、小暮健太郎. ジェットインジェクション法を用いた核酸医薬の非侵襲的経皮送達法の開発. 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回夏季セミナー 2010. 9. 滋賀

⑥小暮健太郎. イオントフォレシスによる抗原タンパク質ナノ粒子の経皮投与. 第 19 回 DDSカンファランス. 2010. 9. 静岡

⑦伊東真寛、濱 進、佐伯 健、小笹愛弓、総谷哲也、原島秀吉、小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体による経費核酸送達. 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム 2010. 6. 札幌

⑧伊東真寛、小笹愛弓、総谷哲也、佐伯 健、濱 進、原島秀吉、小暮健太郎. ジェットインジェクション法による治療遺伝子の皮内送達. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会. 2010. 6 大阪

⑨木村有希、濱 進、気賀澤 郁、高橋唯仁、金村聖志、梶本和昭、小暮健太郎. イオントフォレシスによる皮膚細胞ギャップジャンクションへの影響. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会 2010. 6. 大阪

⑩木村有希、濱 進、気賀澤郁、高橋唯仁、金村聖志、梶本和昭、小暮健太郎. イオントフォレシスによる皮膚細胞タンパク質 Cx43 のリン酸化誘導. 日本薬剤学会第 25 年会 2010. 5. 徳島

⑪島谷悠里、濱 進、小暮健太郎. 狭小空間に侵入可能な siRNA 送達キャリアーの開発. 日本薬学第 130 年会 2010. 3. 岡山

⑫伊東真寛、濱 進、小暮健太郎. ジェットインジェクション法による皮内遺伝子送達の検討. 日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 岡山

⑬木村有希、濱進、気賀澤郁、高橋唯仁、金丸聖志、梶本和昭、小暮健太郎. イオントフォレシスによるナノ粒子の皮内送達メカニズムの解明. 日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 岡山

⑭佐伯 健、濱 進、中村孝司、原島秀吉、小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体の凍結乾燥法の確立と機能性評価. 日

本薬学会第130年会 2010.3.岡山

⑮ 小暮健太郎. イオントフォレシスによる核酸医薬の皮内送達. 第5回 DDS 熊本シンポジウム 2010.2.熊本

⑯ K. Kogure, K. Kigasawa, K. Kanamura, K. Kajimoto. Noninvasive and effective transdermal delivery of siRNA by iontophoresis. Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium

2009.11.福岡

⑰ 小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体による DDS. 日本化学会コロイドおよび界面化学部会「第6回新領域創造講座」

2009.11.東京

⑱ 総谷哲也, 濱進, 原島秀吉, 小暮健太郎. siRNA の経皮送達による新規皮膚がん治療法の開発. 第59回日本薬学会近畿支部大会 2009.10.大阪

⑲ 小笹愛弓, 濱進, 原島秀吉, 小暮健太郎. インスリン遺伝子封入多機能性エンベロープ型ナノ構造体による I 型糖尿病治療法の開発. 第59回日本薬学会近畿支部大会 2009.10.大阪

⑳ 伊東真寛, 濱進, 原島秀吉, 小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体を用いた非侵襲的な遺伝子皮内投与の検討. 第59回日本薬学会近畿支部大会 2009.10.大阪

㉑ 佐伯 健, 濱進, 中村孝司, 原島秀吉, 小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体の製剤化と in vivo 機能性評価. 第59回日本薬学会近畿支部大会 2009.10.大阪

㉒ 小暮健太郎. イオントフォレシスによるナノ粒子の経皮 DDS. 第25回日本 DDS 学会学術集会. 2009.7 東京

㉓ 佐伯健, 濱進, 中村孝司, 原島秀吉, 小暮健太郎. オクタアルギニン修飾多機能性エンベロープ型ナノ構造体の凍結乾燥法の確立. 第25回日本 DDS 学会学術集会 2009.7.東京

㉔ 伊東真寛, 濱進, 原島秀吉, 小暮健太郎. 非侵襲的投与方法による多機能性エンベロープ型ナノ構造体の皮内投与の検討. 遺伝子・デリバリー研究会 第9回シンポジウム 2009.7.大阪

㉕ 佐伯 健, 濱進, 中村孝司, 原島秀吉, 小暮健太郎. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体の製剤化のための凍結乾燥法の検討. 遺伝子・デリバリー研究会 第9回シンポジウム 2009.7.大阪

㉖ 小笹愛弓, 濱進, 原島秀吉, 小暮健太郎. インスリン遺伝子の皮内デリバリーによる I 型糖尿病の新規治療法の確立. 遺伝子・デリバリー研究会 第9回シンポジウム 2009.7.大阪

㉗ K. Kogure, K. Kigasawa, K. Kanamura, K.

Kajimoto. Efficient and noninvasive transdermal delivery of siRNA by iontophoresis. The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society 2009.7. Copenhagen Denmark

㉘ 小暮健太郎, 山本昌彦, 渡辺みずず, 斎藤顕宜, 金村聖志, 原島秀吉, 梶本和昭. リポソームとイオントフォレシスを組み合わせた経皮送達システム. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008.11.東京

*小暮健太郎, 気賀澤郁, 斎藤顕宜, 金村聖志, 原島秀吉, 梶本和昭. イオントフォレシスによる siRNA ナノ粒子の皮内送達. 第57回高分子討論会 2008.9.大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/bukka/bukka-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小暮 健太郎 (KOGURE KENTARO)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70262540

(2) 研究分担者

奥野 貴士 (OKUNO TAKASHI)
富山大学・薬学部・准教授
研究者番号：80411031

(3) 連携研究者

()

研究者番号：