

機関番号：32680

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700494

研究課題名（和文）DNA 複合体微粒子内包アパタイトによる持続型遺伝子治療剤の創製

研究課題名（英文）Development of durable gene expression systems comprising apatite-cements or -particles including DNA complex

研究代表者 伊藤 智子（ITO TOMOKO）

武蔵野大学・薬学研究所・特別研究員

研究者番号：80372910

研究成果の概要（和文）：DNA 複合体微粒子を内包したアパタイトセメントおよびアパタイトナノカプセルは、破骨細胞によって継続的に分解され、DNA 複合体をほぼ一定の速度で放出した。これらを皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍近傍に投与したところ完治を含め非常に高い治療効果を示した。これらは、注射可能な長期発現型核酸徐放剤としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The apatite-cements and -nanocapsule including DNA complex particles were degraded by osteoclast, and the DNA complex was continuously released. When they were injected peri-tumorally into tumor-bearing mice, significant tumor-growth suppression effect was observed, and in some cases, complete disappearance of tumor was achieved. They would be expected as a novel sustained-gene expression device.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノバイオ材料、遺伝子治療、放出制御

1. 研究開始当初の背景

難病の治療法として注目を集める遺伝子治療だが、一般に外来遺伝子の発現は極めて短期間(2～3日)で自然消滅してしまうため、

有効な治療に結びつきにくい。そのため効果が持続する徐放タイプの遺伝子導入剤が強く望まれている。しかし、細胞への導入可能な DNA 複合体は、一般に分散安定性が極め

て悪く、有効な徐放手段が未だ見つからない。徐放を困難にする理由として、核酸複合体の分散の不安定さが挙げられる。DNA/カチオン性高分子（または脂質）複合体は、形成時から比較的大きな集合体となり、さらに次第に凝集して沈殿してしまう。我々は、天然ポリアニオンであるヒアルロン酸を DNA/ポリカチオン複合体に加えると、ヒアルロン酸が、DNA 複合体を壊すことなく表面を被覆し、非常に分散性の良い三元複合体を形成することを見出した。ヒアルロン酸で被覆した DNA 複合体は、プラス電荷がシールドされているため生体適合性が高く、血球やタンパクとの副作用をせず、悪性化した細胞に特異的に取り込まれ、遺伝子の被転写効率が非常に高く、高発現を導くことが確認された。さらに、ヒアルロン酸は保護コロイド的に働いて分散を安定化し、凍結乾燥後も再水和すると細かい安定な分散体を再生し、フレッシュな複合体同等以上の高い発現活性を保持することを見出した。そして世界中で強く所望されていた極微細（直径約 70 nm）な DNA 複合体の濃厚液を凍結乾燥・再水和の過程で得ることに初めて成功した。免疫活性化遺伝子をコードしたプラスミドを用いて、この方法で調製した超微粒子複合体を、B16 細胞を皮下に移植したマウスに複数回投与したところ、腫瘍組織内に投与したものでは腫瘍細胞の完全な消失が、また静脈内投与群では腫瘍の有意な縮小が見られた。さらに、予め静脈内から B16 細胞を投与して作成した肺転移モデルマウスにこれらの微粒子複合体を静脈内投与したところ、ほとんどの転移巣が消失した。このように、ヒアルロン酸でコートした超微粒子複合体は非常に高い治癒効果を示したが、投与量や回数を減らすと十分な治療効果は得られなかった。また、増大した腫瘍の治癒は非常に困難であり、投与回数を増や

しても、直径約 1 cm 以上の腫瘍では、投与期間中は腫瘍の成長を抑えたが、投与をやめると再び腫瘍が成長した。一方、臨床的には複数回の投与は部位によってはしばしば困難であり、単回の投与で効果がある製剤が強く望まれる。

そこで、臨床応用可能な治療効果の高い核酸製剤を開発するためには、単回投与で高い治癒効果の期待される持続型発現システムの創製が強く望まれた。

2. 研究の目的

上述したように徐放型製剤は遺伝子治療の分野でも要望は強い。遺伝子導入用のベクター粒子を放出制御するためには、これらが基材中や高分子の網目中で安定に分散を維持する必要がある。しかし、一般に DNA/ポリカチオン複合体は極めて分散が不安定で速やかに凝集するためデバイス中に分散させることは困難である。我々の考案したヒアルロン酸でコートした DNA 三元複合体システムは凍結乾燥保存ができるほどの非常に安定な粒子で、調製条件によって極微細（直径約 70 nm）な DNA 複合体の濃厚液を調製することができる。一方、一般的な生分解性の固体デバイスの投与経路は、切開、移植、縫合といった手順を踏む必要があり、部位によっては困難な場合も多い。そこで、注射可能な凝固型徐放デバイスが望まれる。我々の研究室では生体適合性のよい自己硬化型アパタイトセメントを開発し、組成、添加剤、調製条件を変えることで結晶化度をコントロールし、生体内での溶解速度が任意に制御できることを見出し報告してきた。本研究では、これらの徐放デバイス技術と、我々の開発した DNA 複合体分散化手法を融合し、ヒアルロン酸被覆 DNA 複合体を生分解性に優れた自己硬化型アパタイトセメント中に包含させ

る、または、アパタイト薄膜で表面をコートし、マイクロカプセル化することにより、持続性のある注射可能な核酸製剤を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 複合体超微粒子を包含させた自己硬化型生分解性アパタイトセメントの調製
希薄条件下で調製した DNA/ポリエチレンジアミン (PEI) /ヒアルロン酸超微粒子を凍結乾燥・再水和して DNA 複合体微粒子濃厚液を調製した。リン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD)、リン酸四カルシウム (TTCP) 及び様々なポリマー (PEG、デキストランまたはアテロコラーゲン) を混合粉碎し、リン酸水溶液を加えてスラリー状にしたものに、上記の DNA 複合体を加え、DNA 複合体超微粒子内包アパタイトセメントを調製した。

(2) DNA 複合体超微粒子を内包したアパタイトマイクロカプセルの調製
上記と同様の方法で DNA 複合体微粒子の濃厚懸濁液を調製し、そこにアパタイト過飽和疑似体液 (SBF) を添加して複合体表面にハイドロキシアパタイトを析出させた。DNA 複合体粒子のアパタイトカプセルへの内包効率は、濃食塩水で内包されていない複合体を分離させ、電気泳動で単離することで評価した。

(3) DNA 複合体超微粒子内包アパタイトセメント及びマイクロカプセルの構造・物性評価
得られたアパタイトセメント及びマイクロカプセルの表面構造を走査型電子顕微鏡・エネルギー分散型 X 線分析装置 (SEM-EDX) で、結晶性を X 線回折法 (XRD) により評価した。マイクロカプセルのサイズを動的光散乱法で評価した。蛍光標識した DNA を用いて DNA 複合体粒子を調製しアパタイトセメント内での DNA 複合体の分散性を蛍光顕微鏡により観察した。DNA 複体内包アパタイトマ

イクロカプセル水中での分散性も同様に蛍光顕微鏡で評価した。

(4) *In vitro* でのアパタイトからの DNA 放出挙動の評価

アパタイトセメントからの DNA 複合体の放出
YOYO で蛍光標識した DNA 複合体超微粒子を内包したアパタイトセメントスラリーを培養シャーレ上で硬化させ、そこにアパタイトを溶解させる機能を持つ破骨細胞様の MLC-6 細胞を加えて培養し、培地中の蛍光強度を測定することで DNA の放出挙動を調べた。

アパタイトマイクロカプセルからの DNA 複合体の放出
DNA 複体内包アパタイトカプセルを pH 4.5 の酢酸緩衝液に加え、アパタイトを溶解し、そこに濃食塩水で処理したのち電気泳動で評価した。

(5) *In vitro* での遺伝子発現効率評価
マウス B16 メラノーマ細胞での遺伝子発現効率を GFP 遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いて評価した。

(6) マウス生体内でのアパタイトセメント分解挙動の評価

DNA 複合体含有アパタイトセメントスラリーをマウスの大腿骨近傍に投与し、アパタイトセメントの溶解挙動を X 線 CT で解析した。

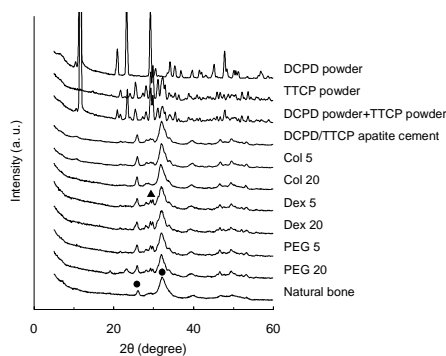
(7) 担ガンマウスを用いた腫瘍の治癒効果
マウスメラノーマ細胞 B16 をマウスの皮下に移植して担癌マウスを作製した。免疫活性化遺伝子を用いて調製した DNA 複合体含有アパタイトセメントスラリーを腫瘍近傍に、または DNA 複体内包アパタイトカプセルを腫瘍内に投与しそれぞれの治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) DNA 複合体超微粒子内包アパタイトセメ

ント

リン酸を加えた DCPD/TTCP セメントスラリーに DNA 複合体微粒子を加えると、ヒアルロン酸で被覆していない DNA 複合体粒子はセメント内で凝集した。一方、ヒアルロン酸で被覆した DNA 複合体粒子はセメントの硬化後も小さな粒子状で分散していることが蛍光顕微鏡で観察された。また、硬化後のセメントは低結晶性アパタイトに転移し、コラーゲンを混合したアパタイトセメントは自然骨と良く似た XRD パターンを示した (図 1)。

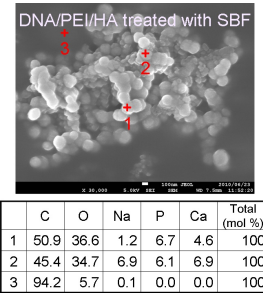


(図 1) ポリマー含有アパタイトセメントの XRD スペクトル

(2) DNA 複合体超微粒子内包アパタイトカプセル

アパタイトで被覆する前の DNA 複合体は濃食塩水によって完全に解離し、電気泳動において DNA 単体と同じ移動度を示した。一方、アパタイトで被覆した DNA 複合体は全く解離せず、DNA/ポリカチオンの泳動は観察されなかった。これらのアパタイトカプセルを SEM-EDX 解析を行ったところ、リンとカルシウムが検出され(図 2)、さらに XRD によりハイドロキシアパタイトのピークが示された。これらのことから、DNA 複合体はヒアルロン酸でコーティングした後 SBF 中でインキュベートすることで、効率よくアパタイトカプセル中に内包されることが確認できた。また、得られた DNA 複体内包マイクロカプセルは 200 nm くらいの粒子として水中で分散してい

ることが示された。



(図 2) DNA 複体内包アパタイトカプセルの SEM-EDX 解析

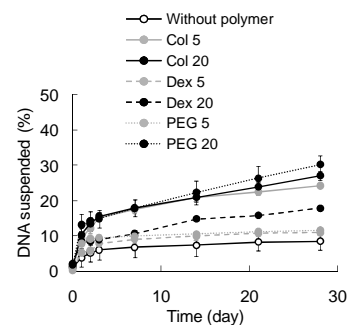
(3) アパタイトからの DNA 放出

アパタイトセメントからの DNA 放出

破骨細胞様 MLC-6 細胞存在下では DNA 複合体は比較的速やかに放出された。また、コラーゲンまたは PEG 20%を含んでいるアパタイトセメントは MLC-6 細胞に貪食され持続的な DNA 複合体の放出を示した(図 3)。これらのアパタイトから放出した DNA 複合体粒子のサイズ及び電位はアパタイトに入れる前と同じであった。一方、デキストランまたは PEG 5%を含んでいるアパタイトセメントは初期バーストが高く、細胞毒性が観察された。

アパタイトマイクロカプセルからの DNA 放出

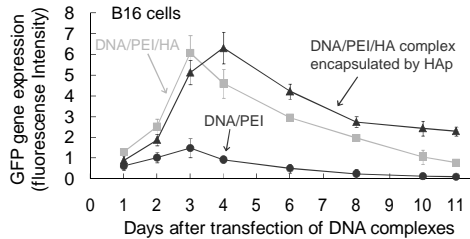
上述したようにアパタイトは破骨細胞に貪食されて酸性条件下で溶解する。そこで、これらの DNA 複体内包アパタイトカプセルを pH 4.5 の酢酸緩衝液に加え、アパタイトを溶解した。そこに濃食塩水で処理したのち電気泳動したところ DNA 単体と同じ位置にバンドが観察され、アパタイトマイクロカプセルからの DNA 放出が確認された。



(図 3) アパタイトセメントからの DNA 放出

(4) *In vitro*での遺伝子発現効率

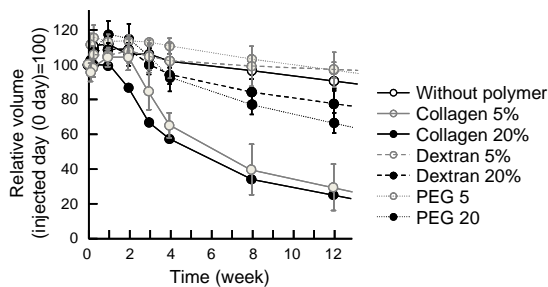
アパタイトカプセルに内包された DNA 複合体は、カプセル化されていない DNA 複合体よりも発現が遅延し、さらに発現期間が持続した(図 4)。



(図 4) DNA 複体内包アパタイトカプセルによる *In vitro* 遺伝子発現効率

(5) 生体内でのアパタイトセメントの分解

DNA 複合体超微粒子濃厚液とアパタイトセメントスラリーの混合液を生体内に注射すると、速やかに固化し、DNA 複合体を内包したアパタイトセメントが形成された。これらのアパタイトセメントは経時的に分解し、その分解速度はポリマーの種類・量に依存した。骨と類似の結晶性パターンを持つコラーゲンを混合したアパタイトセメントは *in vivo* において最も速く分解した(図 5)。

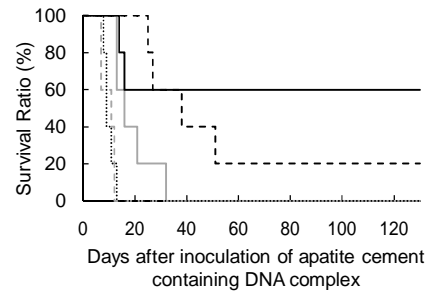


(図 5) マウスに移植した DNA 複合体含有アパタイト/ポリマーセメントの分解挙動

(6) 抗腫瘍治療効果

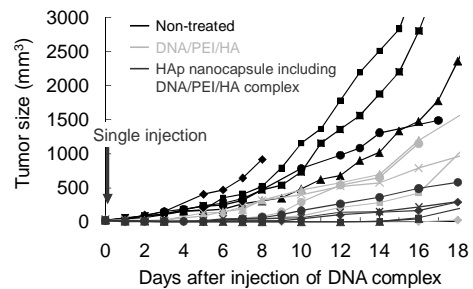
免疫活性化遺伝子を含むプラスミド複合体を内包したコラーゲン含有アパタイトセメントスラリーを、皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍近傍に投与したところ、40%のマウスにおいては埋め込んだアパタイトセメントの減

少率が低く、DNA 複合体の放出量が不十分であったため、治療効果は見られなかった。一方、60%の個体においては、生体内で固化したセメントは1ヶ月以上にわたって徐々に溶解し、DNA 複合体粒子を放出し続け、腫瘍の完全治癒を示した。



(図 6) DNA 複体内包アパタイトセメントによる抗腫瘍治療効果

また、免疫活性化遺伝子をコードした DNA 複体内包アパタイトカプセルを腫瘍内に単回投与すると、カプセル化していない DNA 複合体よりも有意な腫瘍増殖抑制効果を示した(図 7)。



(図 7) DNA 複体内包アパタイトカプセルによる腫瘍増殖抑制効果

以上のように DNA 複合体微粒子を内包したアパタイトセメント及びアパタイトカプセルは、遺伝子の長期発現によって単回投与においても高い抗腫瘍効果を達成した。これらは、核酸徐放製剤としての応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, Analysis of the surface structure of DNA/polycation/hyaluronic acid ternary complex by Raman microscopy, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 査読有, 51, 268-272 (2010)

T. Ito, C. Yoshihara, K. Hamada, Y. Koyama, DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice, Biomaterials, 査読有, 31, 2912-2918 (2010)

C. Yoshihara, C. Y. Shew, T. Ito, Y. Koyama, Loosening of DNA/Polycation Complexes by Synthetic Polyampholyte to Improve the Transcription Efficiency: Effect of Charge Balance in the Polyampholyte, Biophysical Journal, 査読有, 98, 1-10 (2010)

〔学会発表〕(計29件)

Tomoko Ito, Injectable self-setting apatite cement for DNA/PEI/hyaluronic acid ternary complex-releasing system and therapeutic effect in tumor model mice International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011.3, Tsukuba, Japan

Tomoko Ito, DNA complex-releasing system by apatite cement for gene therapy Universita' del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" Invited lecture, 2011.1, Novara, Italy

伊藤智子、生分解性アパタイトセメントからの DNA/高分子複合化ナノ粒子放出制御と遺伝子治療への応用、第 27 回製剤と粒子設計シンポジウム、2010 年 10 月、ホテル日航金沢、石川

伊藤 智子、DNA/金ナノ粒子複合体内包ア

パタイトカプセルの調製、第 10 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、2010 年 6 月、北海道大学、北海道

Tomoko Ito, Development of DNA Complex-releasing Systems Using Biodegradable Apatite Cement and Therapeutic Effect in Tumor Model Mice, American Society of Gene and Cell Therapy 13th Annual Meeting, 2010.5, Washington DC, USA

伊藤智子、生分解性アパタイトセメントを用いた DNA 複合体の徐放システム、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2009、2009 年 11 月、京都テルサ、京都

伊藤智子、ヒドロキシアパタイトセメントを用いたプラスミド複合体の徐放システム、第 9 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、2009 年 7 月、大阪大学、大阪

伊藤智子、DNA 複合体微粒子内包アパタイトによる持続型遺伝子治療製剤の創製、第 25 回日本 DDS 学会、2009 年 6 月、東京ドームホテル、東京

Tomoko Ito, DNA complex-releasing system by apatite cement, American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, 2009.5, Ventura, USA

Tomoko Ito, High Level Therapeutic Effects of Fine Plasmid/PEI/Hyaluronic Acid Ternary Complex Particles in Tumor Model Mouse American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, 2009.5, Ventura, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 智子 (ITO TOMOKO)

武蔵野大学・薬学研究所・特別研究員

研究者番号 : 80372910