

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18863

研究課題名(和文) 製剤の分散状態に着目した細胞間差の少ない遺伝子送達法の開発

研究課題名(英文) Development of transfection methods with low cell-to-cell variability based on the dispersity

研究代表者

麓 伸太郎 (FUMOTO, Shintaro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：70380988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非ウイルスベクターでは遺伝子導入効率だけでなく著しい細胞間差も解決すべき大きな課題である。本研究では、製剤の分散状態を制御することで細胞間差の少ない非ウイルスベクターを開発することを目的とした。リポプレックスのPEG修飾に脱離可能なものを用いた上で、新たなPEG修飾タイミングとして複合体形成時にPEG修飾が施されるSyn-insertion法を考案した。この方法によれば、PEG修飾により製剤の分散状態を制御しつつ、肝臓における遺伝子発現の低下を抑えることが可能であった。さらにこの方法に用いる物質を探索し、分散状態を制御しつつ遺伝子発現を高める物質を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：It is a big challenge to resolve the problem of cell-to-cell variability as well as transfection efficiency in non-viral gene transfer. The aim of this study was to develop the non-viral vector with low cell-to-cell variability by regulation of dispersity of the vector. We formulated syn-insertion of detachable PEGylated lipids to the lipoplex during formation. It was possible to maintain hepatic gene expression with regulation of dispersity of the lipoplex. Furthermore, we sought the suitable materials for this methods. As a result, we succeeded in enhancing gene expression of lipoplex with dispersity regulation.

研究分野：薬剤学

キーワード：遺伝子・核酸工学材料 遺伝子導入機構 エンドサイトーシス 細胞間差 リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

線維症、癌、先天性遺伝子欠損症など様々な難治性疾患の治療戦略として遺伝子治療は理にかなっており、効率的かつ安全な遺伝子ベクターの開発は急務である。非ウイルスベクターは改変が容易な上、変異原性もなく、安全性の高い遺伝子導入システムの開発が期待される反面、特に *in vivo* 遺伝子導入効率が課題である。さらに、動物レベルのみならず培養細胞レベルにおいても著しい細胞間差が存在し、遺伝子治療の妨げとなるため、効率を改善することのみならず細胞間差を解消することも重要な課題である。

遺伝子治療の臨床研究では、遺伝子導入効率の観点からウイルス性ベクターを使用することが多いが、毒性による死者が出るなど安全性に懸念がある上、抗原性により頻回投与が困難である。また、ウイルス自体の持つ細胞指向性を改変するのは容易ではない。一方、安全性の観点および改変の容易さから、国内外で非ウイルス性ベクターの研究が行われているが、遺伝子導入効率の面でウイルス性ベクターに劣ることが多い。ハイドロダイナミクス法(大容量のプラスミド DNA 溶液を瞬時に静脈内投与)は簡便で、かつ遺伝子導入効率が非常に高い。しかしながら、遺伝子発現陽性細胞の割合は 50%程度であり、ハイドロダイナミクス法においても大きな細胞間差が認められる。一方、非ウイルス性ベクターの遺伝子導入機構の解析も進んでいるが、細胞間差を生じる機構に関しては情報に乏しく、さらなる研究が望まれている。

我々はこれまで、*in vivo* 遺伝子導入法の開発と並行して遺伝子導入機構の解析を進めてきた。プラスミド DNA による臓器表面の中皮細胞への遺伝子導入では、細胞取り込み経路は Rac 経路介在性マクロピノサイトーシスであることを明らかにした (Mol. Pharmaceutics 2009)。カチオン性リポソーム・プラスミド DNA 複合体(リポプレックス)を用いた *in vivo* 遺伝子導入法の開発も行っており、電荷制御仮説に基づきガラクトース修飾リポプレックスの塩濃度を精密制御し肝実質細胞選択的に遺伝子導入効率を改善することに成功した (Mol. Ther. 2004)。さらに、リポプレックスと血清成分、特にフィブロネクチンの相互作用が体内動態および遺伝子発現の組織分布プロファイルを決定づける重要な因子であることを明らかにした (J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005; J. Gene Med. 2011; Biol. Pharm.

Bull. 2013)。肝実質細胞選択的に遺伝子を送達するためには、肝類洞内皮壁の障壁を超えるため粒子径の小さな複合体を開発する必要があるが、一方で粒子径の大きな複合体の方が遺伝子導入効率は高く (Biol. Pharm. Bull. 2006)、粒子径について一種のジレンマが存在する。そこで、リポプレックスの PEG 修飾に体内で脱離可能な PEG 脂質を用いることで体内において粒子径が増大するようデザインし、さらに複合体形成時に PEG 修飾が施される Syn インサクション法を考案することで、製剤の粒子径を縮小しつつ、遺伝子発現の肝臓選択性を高めることに成功した (日本薬剤学会 2015)。

一方、我々はさらに、非ウイルスベクターの細胞間差を生じる機構を解析し、これまでに次の 4 つのことを明らかにした。1. 同種細胞においても活発なエンドサイトーシス経路が異なり、個々の細胞が役割分担を行っていること。2. 細胞集積量と遺伝子発現量は相関しないこと。3. 遺伝子発現に至るのは酸化ストレスの少ない細胞であること。4. イオン存在下、リポプレックスの分散状態が悪く、細胞間差を生じる一因になっていること。そこで本研究では、これまでに得られた知見を基に、製剤の分散状態の制御に基づき細胞間差の少ない非ウイルスベクターを開発するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

遺伝子治療において、遺伝子導入効率および安全性が成否のカギを握っている。非ウイルスベクターに関しては遺伝子導入効率だけではなく著しい細胞間差も解決すべき大きな課題である。これまでに標的細胞における遺伝子発現の細胞間差を解消すべく、機構解析を行ってきた。解析結果より、細胞集積にも細胞間差が存在するが細胞集積量と遺伝子発現は相関しないこと、遺伝子発現の細胞間差に酸化ストレスが関与すること、並びにイオンや生体成分の存在により非ウイルスベクターの分散状態が悪化し、細胞間差を生じる大きな要因となっていることを明らかにした。本研究では、製剤の物理化学的性質に着目し、製剤の分散状態を制御し、細胞間差の少ない非ウイルスベクターを開発する。併せて細胞間差を生じる機構について、細胞側、製剤側両面から解析する。

細胞間差の少ない非ウイルスベクターの開発

・様々な因子を精密に設定することでリポプレックスの物理化学的性質を制御し、イオンや生体成分存在下でも分散状態の良いリポプレックスを開発する。

・ベクターからプラスミド DNA の放出を促進する環状 CR8C ペプチドを含むリポプレックス、エンドソームからの脱出を促進する炭酸カルシウムをコアに持つリポプレックスを開発する。

細胞間差を生じる機構の解析

・細胞側の要因として、酸化ストレスなどに着目し、非ウイルスベクターによる遺伝子発現の細胞間差を生じる機構を明らかにする。

・製剤側の要因として、イオンや生体成分存在下でリポプレックスの分散状態が悪化する機構、粒子径の異なるリポプレックスの分散状態の解析を通して細胞間差を生じる機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

試薬：

遺伝子導入に用いた非ウイルス性ベクターは、DOTAP/Chol リポソーム、ポリエチレンイミン (PEI) である。さらに、脂質、炭酸カルシウム、プラスミドからなる eLCC も用いた。

プラスミド DNA としては、ホタルルシフェラーゼをコードした pCMV-luciferase、分泌型合成ルシフェラーゼをコードした pCpGfree-Lucia、緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 をコードした pZsGreen1-N1、赤色蛍光タンパク質をコードした ptdTomato-C1 を用いた。プラスミド DNA の蛍光標識では、Label IT nucleic acid labeling キットを用いた。

抗酸化剤として、エダラボン、all-trans レチノイン酸 (ATRA)、トコフェロール、アスコルビン酸、N-アセチルシステイン (NAC)、phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) を用いた。

細胞：

ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 を用いた。

実験動物：

ddY 系雄性マウスを実験に供した。実験計画は、長崎大学動物実験委員会の承認を受けた。

観察：

定性的な観察では、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

定量的な観察では、イメージベースサイトメーターまたはフローサイトメーターを用いた。ルシフェラーゼの定量にはルミノメーターを用いた。

### 4. 研究成果

細胞間差の少ない非ウイルスベクターを開発するためにこれまで機構解析を行い、解析結果より、トランスフェクション中の粒子径増大を抑え、発生する酸化ストレスを制御する必要性が示されている。粒子径増大を防ぐためには、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾が有効であるが、PEG 修飾により細胞取り込みやエンドソーム脱出までも阻害されてしまう、いわゆる PEG のジレンマが存在する。そこで本研究では、リポプレックスの PEG 修飾に脱離可能な PEG 脂質を用いたうえで、新たな PEG 修飾タイミングとして、複合体形成時に PEG 修飾が施される Syn-insertion 法を考案した。Syn-insertion 法によれば、リポプレックスの粒子径を小さくでき、さらに肺を回避しつつ肝臓における遺伝子発現の低下を抑えることが可能であった (論文 1)。

この Syn-insertion 法を進展させ、脂質・炭酸カルシウム・プラスミド粒子 (eLCC) を作製することに成功した。エチジウムブロマイドインターカレーションアッセイにより、プラスミドが効率的に粒子内へ内封されていること、HepG2 細胞における遺伝子発現効率が高まることが確認できた。この eLCC はプラスミドだけでなく、低分子薬物も搭載することが可能で、実際に複数の低分子薬物として、ドキシソルピシンおよびクルクミンを搭載することができた (論文 2)。ドキシソルピシン・クルクミンを搭載した LPCCD では、pH 低下に伴い薬物放出が促進されること、HepG2 細胞において細胞障害活性を示すこと、マウスに投与後、ドキシソルピシンおよびクルクミンの体内動態がほぼ一致することを見出した。

酸化ストレスの制御に関しては、種々の活性酸素消去剤について検討し、なかでもエダラボンにより HepG2 細胞における遺伝子発現効率が高まること示された (学会発表 4)。そこでエダラボン封入リポソームを作製したところ、より低濃度で高い遺伝子発現増強効果が得られた。これは、リポフェクション時において発生する活性酸素を選択的に除去することができた結果だ

と考えている。

2017年度は、Syn-insertion法に利用可能な物質探索を行い、培地中での凝集を防ぎつつ、HepG2細胞において遺伝子発現を3倍程度高める物質を発見した。遺伝子発現についてはHLB値の高い方が良好である傾向があったが、凝集抑制についてはそのような傾向はみられなかった。

さらに、このSyn-insertion法を発展させ、上述のようにeLCCを作製することに成功している。本年度は、eLCCの動物への応用を目指し、作製に用いたアルコールの除去方法について検討した。除去方法として透析も考えられるが、時間がかかる上、結局濃縮する必要がある。そこで遠心限外濾過法を選択した。当初、濾過膜が詰まってしまう、限外濾過ができなかったが、少し遠心してはピペティングで攪拌し、数回に分けて遠心限外濾過を行うことで、問題を回避できた。さらに、プラスミド以外の物質への応用を進め、タンパク質と脂溶性薬物を同時に搭載することができた(学会発表8)。ウシ血清アルブミン(BSA)と脂溶性カルボシアニン色素DiDの組み合わせにより、pH感受性放出、細胞質への送達、一致したマウス体内動態などを示した上で、パクリタキセルおよびスーパーオキシドディスムターゼを同時に搭載したRGD修飾LSPCにより、腫瘍モデルマウスの生存期間を延長されることに成功した。

酸化ストレスの制御に関しては、エダラボンがリポフェクションにおいて有効であることを見出している。市販のリポフェクタミン3000でも有効であった一方、ポリエチレンイミンのポリプレックスでは無効であった。マウスにおいても有効性が確認でき、さらに肝炎を抑えられることも明らかになった。また、HepG2細胞において、エダラボンによりリポフェクション時の遺伝子発現細胞数が2倍増え、細胞間差が一部解消されたことが示された。

## 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. Peng J, Fumoto S, Miyamoto H, Chen Y, Kuroda N, Nishida K, One-step formation of lipid-polyacrylic acid-calcium carbonate nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and curcumin, Journal of Drug Targeting, 25 (8): 704-714 (2017).査読有

2. Fumoto S, Taniguchi N, Ikai Y, Yoshikawa N, Miyamoto H, Sasaki H, Hashida M, Kawakami S, Nishida K: The Insertion Timing of PEGylated Lipids to Galactosylated Lipoplexes is Important for Liver-Selective Transfection in Mice Gene and Cell Therapy, 1(1) 1-11 (2016). 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. Jian Qing Peng, Shintaro Fumoto, Hiroataka Miyamoto, Tadaharu Suga, Shigeru Kawakami, Koyo Nishida: Lipid-based calcium carbonate nanoparticles for co-delivery of drugs and proteins、遺伝子・デリバリー研究会第17回夏期セミナー、熱海(2017)、口頭発表
2. 川口真帆、小川昂輝、淵上由貴、麓伸太郎、萩森政頼、川上茂: 超音波応答性遺伝子/ナノバブル複合体による肝臓での遺伝子発現特性評価、第33回日本DDS学会学術集会、2017年7月6-7日、京都、ポスター
3. 小川昂輝、淵上由貴、麓伸太郎、萩森政頼、川上茂: 超音波応答性遺伝子/ナノバブル複合体を用いた脳への遺伝子導入法の開発、日本薬剤学会第32年会、2017年5月11-13日、埼玉、口頭
4. Jian Qing Peng, Shintaro Fumoto, Yi Chen, Hiroataka Miyamoto, Koyo Nishida: Characterization of lipidic polyacrylic acid-stabilized calcium carbonate ternary nanoparticle encapsulating drug combination via one-step preparation, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, Kyoto(2017) ポスター発表
5. Shu Wang, Shintaro Fumoto, Hiroataka Miyamoto, Koyo Nishida: The development of edaravone-loaded liposomes to enhance transfection efficiency of lipoplex in HepG2 cells, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, Kyoto(2017) ポスター発表
6. Wang Shu, Shintaro Fumoto, Hiroataka Miyamoto, Koyo Nishida: The development of non-viral transfection method based on regulation of oxidative stress、第33回日本薬学会九州支部大会、鹿児島(2016) 口頭発表
7. 麓伸太郎、Shu Wang、広瀬 沙織、平野 史、宮元 敬天、西田 孝洋: 非ウイルスベクターの細胞間差に関する解析: 製剤側要因と細胞側要因、日本薬剤学会第31年会、岐阜(2016) ポスター発表

8. ポン ジェンチン、麓 伸太郎、宮元 敬天、西田 孝洋: One-step preparation of liposomal polyacrylic acid-stabilized calcium carbonate ternary nanoparticle for combination chemotherapy, 日本薬剤学会第 31 年会, 岐阜 (2016) 口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学薬学部薬剤学分野ホームページ

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/dds/index-j.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

麓 伸太郎 (FUMOTO, Shintaro)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・  
准教授  
研究者番号 : 7 0 3 8 0 9 8 8

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

彭 劍青 (PENG, Jian Qing)  
王 舒 (WANG, Shu)  
黄智 剛 (KOU, Tomotaka)  
後瀬 伸大 (NOCHISE, Nobuhiro)  
広瀬 沙織 (HIROSE, Saori)  
田中 克也 (TANAKA, Katsuya)  
白石 亜希 (SHIRAIISHI, Aki)  
中村 浩二 (NAKAMURA, Koji)