

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18590143

研究課題名（和文） 遺伝子治療に対する疾病・薬物治療の影響に関する研究

研究課題名（英文） Influence of disease stage and pharmacotherapy on gene delivery.

研究代表者

佐々木 均（Sasaki Hitoshi）

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・教授

研究者番号：00170689

研究成果の概要：

我々は代表的な遺伝子導入ベクターを用いて、疾患の病態が及ぼす遺伝子導入効率への影響を検討した。その結果、数種の疾患モデルマウスにおける遺伝子発現形態は正常マウスとは大きく異なり、疾患の病態や病期が遺伝子発現量に大きく影響することを明らかにした。また、この遺伝子発現量の変化は、疾患の種類や遺伝子導入ベクターの構成成分によって大きく異なることを見だし、疾患毎に最適な遺伝子導入ベクターの選択が必要であることを実証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：6806（薬学・医療系薬学）

キーワード：遺伝子、デリバリー、疾病、肝臓、カチオン性高分子、肝炎、肝切除、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子医薬品が薬のひとつとして反復投与される時代の到来が期待されている。遺伝子の細胞への標的化や効率的な遺伝子導入発現を目的に、様々なベクターの開発が進められている。

一方、臨床において遺伝子治療を受ける場合、患者は何らかの疾患や合併症を持ち、さらに複数の薬物による治療も行われている。しかし、疾患や薬物治療が、遺伝子デリバリーに及ぼす影響を系統的に研究した報告は

ない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子デリバリーに及ぼす疾患の影響を系統的に検討し、将来の遺伝子治療における治療指針を作成することを目的とした。さらに、疾患の影響するメカニズムを解析することで、遺伝子デリバリーの増強や改善を行うことが可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) モデル pDNA として、CMV プロモーターを有し、ホタルルシフェラーゼ (Luc) をコードした pCMV-Luc を用いた。

(2) 代表的な遺伝子ベクターとしてカチオン性高分子である分岐鎖および直鎖ポリエチレンジアミン (B-PEI and L-PEI) を、またカチオン性リポソームとして DOTMA-DOPE, DOTMA-Chol リポソームを用いた。

(3) 疾患モデルとして肝疾患に注目し、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性の薬剤性肝炎モデル、リポポリサッカライド (LPS)・ガラクトサミン (D-GalN) 誘発性のウイルス性肝炎モデル、部分肝切除モデルを作成した。

(4) これら疾患モデル動物にその病態に応じて遺伝子ベクターを投与し、遺伝子デリバリーに及ぼす疾患の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝炎惹起物質として CCl₄ をマウスに投与し、薬剤性肝炎モデルを作成した。生化学的・解剖学的観察を行った結果、投与後 18 時間にダメージが最も高く、48 時間で直接的なダメージが減少し、168 時間には肝機能が正常に再生することを確認した。そこで、pDNA/B-PEI, pDNA/L-PEI 複合体を病期毎に投与し、遺伝子発現量を比較検討した。その結果、両複合体において肝炎惹起 18 時間目に肝臓における遺伝子発現が対照群より有意に減少し、再生期と考える 48 時間目まで有意に増加することが示された。168 時間目には、肝炎惹起群と対照群で差は認められなかった。この結果より遺伝子治療の効果に疾患が大きく寄与し、その病態に応じた投与設計が必要なことが示された。

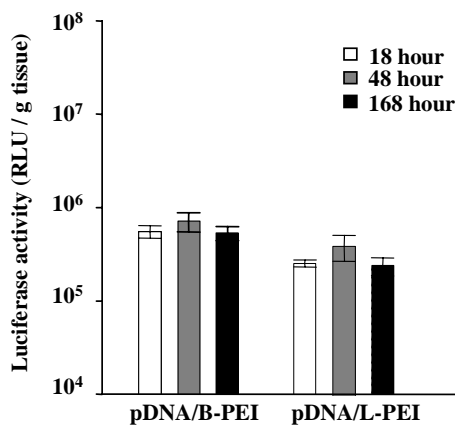


Fig. 1. Luciferase expression in the liver of control mice after the administration of pDNA/B-PEI and pDNA/L-PEI polyplexes at 18, 48, 168 after saline injection.

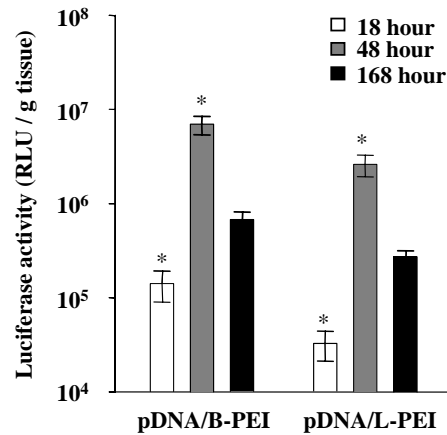


Fig. 2. Luciferase expression in the liver of CCl₄-treated mice after the administration of pDNA/B-PEI and pDNA/L-PEI polyplexes at 18, 48, 168 after CCl₄ injection. *; $P < 0.05$ vs. control mice.

(2) 化学物質の直接の影響を除くため、肝臓の 3 分の 1 切除による pDNA/B-PEI 複合体の遺伝子発現への影響を検討した。肝臓切除群は肝臓切除後 72 時間以内で急速に肝臓が再生し、168 時間目には肝機能が正常に回復した。そこで、pDNA/B-PEI 複合体を病期毎に投与し、遺伝子発現量の推移を検討した。その結果、肝臓切除群は肝臓再生が盛んな切除後 48 時間において、肝臓の遺伝子発現が対照群に比較して有意に増加した。他の臓器では有意な変化は認められなかった。この結果は肝臓における遺伝子発現量の上昇が細胞増殖に起因することを示唆するものである。

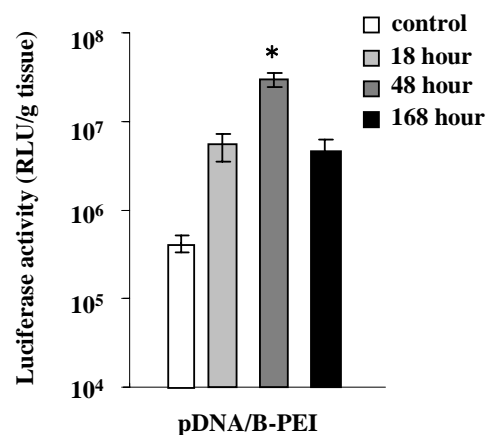


Fig. 3. Luciferase expression in the liver of partial hepatectomy treated mice after the administration of pDNA/B-PEI polyplex at 18, 48, 168 after hepatectomy. *; $P < 0.05$ vs. control mice.

(3) 肝炎惹起物質として LPS・D-GalN をマウスに投与し、ウイルス性肝炎モデルを作成した。生化学的・解剖学的観察を行った結果、投与後 12 時間にダメージが最も高く、24 時

間で直接的なダメージが減少し、さらに 48 時間にはダメージが大きく減少することを確認した。そこで、pDNA/B-PEI 複合体を病期毎に投与し、遺伝子発現量を検討した。その結果、肝炎惹起 6, 12, 24, 48 時間目に肝臓における遺伝子発現が対照群より有意に上昇した。この結果と(1)の結果から、疾患の特性によって病態が及ぼす遺伝子ベクターへの影響が大きく異なることが示された。

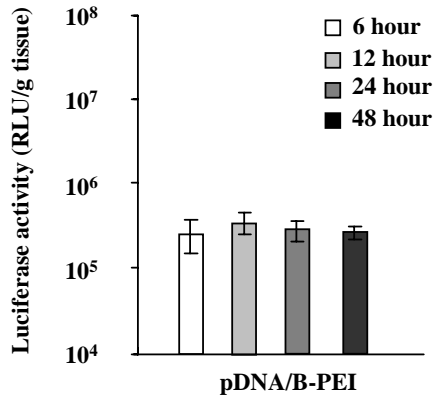


Fig. 4 Luciferase activities in the liver of control mice 6 h following the administration of pDNA/B-PEI polyplex at 6, 12, 24, and 48 h after saline injection.

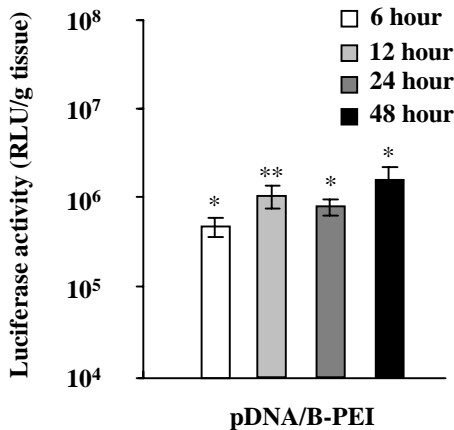


Fig. 5 Luciferase activities in the liver of D-GalN/LPS treated mice 6 h following the administration of pDNA/B-PEI polyplex at 6, 12, 24, and 48 h after D-GalN/LPS injection. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.01$ vs. control mice.

(4) 肝炎惹起物質としてCCl₄をマウスに投与し、薬剤性肝炎モデルを作成した。このモデルマウスにpDNA/DOTMA-DOPE, pDNA/DOTMA-Chol複合体を病期毎に投与した。その結果、肝炎惹起 18 時間目にpDNA/DOTMA-DOPE複合体の肝臓における遺伝子発現が対照群より有意に減少したが、pDNA/DOTMA-Chol複合体においては減少しなかった。一方で再生期と考える 48 時間目でpDNA/DOTMA-DOPE複合体の遺伝子発現量は変化しなかったが、pDNA/DOTMA-Chol複合体の遺伝子発現量は有

意に増加することが示された。168 時間目には、肝炎惹起群と対照群で差は認められなかった。この結果と(1)の結果から、遺伝子ベクターの種類や構成成分によって疾患が及ぼす遺伝子発現への影響に大きな差異があることが示された。

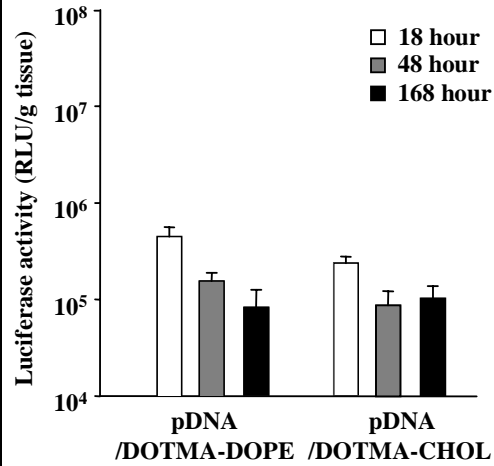


Fig. 6. Luciferase expression in the liver of control mice after the administration of pDNA/DOTMA-DOPE lipoplexes and pDNA/DOTMA-CHOL lipoplexes at 18, 48, 168 after saline injection.

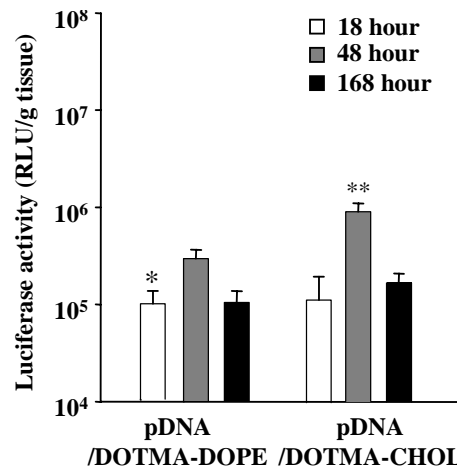


Fig. 7. Luciferase expression in the liver of CCl₄-treated mice after the administration of pDNA/DOTMA-DOPE lipoplexes and pDNA/DOTMA-CHOL lipoplexes at 18, 48, 168 after CCl₄ injection. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ vs. control mice.

以上の研究成果より、臨床における遺伝子治療には疾患とその病態を見極め、適切な遺伝子導入製剤を、適切なタイミングで使用する必要があることが示された。

	Gene expression in injured stage	Gene expression in recovered stage
Hepatitis induced by GalN/LPS (pDNA/B-PEI)	↑	↑
Hepatitis induced by CCl4 (pDNA/B-PEI and pDNA/L-PEI)	↓	↑
Hepatitis induced by CCl4 (pDNA/DOTMA-DOPE)	↓	↑
Hepatitis induced by CCl4 (pDNA/DOTMA-CHOL)	↓	↑
Partial hepatectomy (pDNA/B-PEI)	↑	Increasing according to recovering of liver

また、我々はステロイドや制癌剤などの薬物が及ぼす遺伝子発現量への影響についても予備的検討を行っており、基礎的な知見を得ている。

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 4 件)

(1) Sasaki H, Yoshida S, Kitahara T, Yoshioka T, Nakagawa H, Nakamura T, Ichikawa N, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M. Influence of disease stage on polyethylenimine-mediated plasmid DNA delivery in murine hepatitis. *Int J Pharm.* 318: 139-45 (2006). 査読有り

(2) Tada Y, Kitahara T, Yoshioka T, Nakamura T, Ichikawa N, Nakashima M, Nishida K, Nakamura J, Sasaki H.
論文名: Partial hepatectomy enhances polyethylenimine-mediated plasmid DNA delivery. *Biol Pharm Bull.* 29: 1712-6 (2006). 査読有り

(3) Miyanaga K, Yoshioka T, Nakagawa H, Kitahara T, To H, Ichikawa N, Nakashima M, Nishida K, Nakamura J, Sasaki H. Influence of murine hepatitis induced by D-(+)-galactosamine hydrochloride and lipopolysaccharide on gene expression of polyethylenimine/plasmid DNA polyplex. *Biol Pharm Bull.* 31:1585-9 (2008). 査読有り

(4) Yoshioka T, Yoshida S, Kurosaki T, Teshima M, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M, To H, Kitahara T, Sasaki H. Cationic liposomes-mediated plasmid DNA delivery in murine hepatitis induced by carbon tetrachloride. *J Liposome Res.* 23:1-7 (2009). 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

(1) Sasaki H, Yoshida S, Kitahara T, To H, Ichikawa N: Delivery timing of plasmid DNA with non-viral carrier in murine hepatitis. 21st FAPA congress. Yokohama, Japan, 2006.

(2) 山内浩子, 冨田勇巳, 一川暢宏, 藤秀人, 佐々木均, 中嶋幹郎, 西田孝洋, 中村純三: 肝再生の遺伝子デリバリーに対する影響—肝切除マウスにおける polyethylenimine/pDNA 複合体の遺伝子発現. 日本薬学会第 126 年会. 仙台, 2006.

(3) 佐々木均, 山内浩子, 冨田勇巳, 一川暢宏, 藤秀人, 中嶋幹郎, 西田孝洋, 中村純三: Polyethylenimine を用いた遺伝子デリバリーへの病態の影響—四塩化炭素誘発肝障害マウスにおける検討. 日本薬学会第 126 年会. 仙台, 2006.

(4) Sasaki H: Partial hepatectomy enhances polyethylenimine-mediated plasmid DNA delivery. The 66th World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (FIP 2006). Salvador Bahia, Brazil, 2006.

(5) Teshima, M., Yoshida, S., Fumoto, S., Nishida, K., Nakamura, J., Nakashima, M., Hamamoto, T., To, H., Kitahara, T., Sasaki, H., Effect of disease stage on gene expression by polyplex and lipoplex in murine hepatitis induced by carbon tetrachloride, 23rd JSSX Annual Meeting. Kumamoto, Japan, 2008.

(6) Sasaki, H., Kurosaki, T., To, H., Kitahara, T., Influence of murine hepatitis induced by D-(+)-galactosamine hydrochloride and lipopolysaccharide on gene expression of polyethylenimine/pDNA polyplex, 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Atlanta, USA, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 均 (Sasaki Hitoshi)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・教授
研究者番号: 00170689

(2) 研究分担者

藤 秀人 (To Hideto)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
研究者番号: 90345809