

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300177

研究課題名（和文）筋組織へのナノミセル遺伝子導入を用いた重度外傷への新規アプローチ

研究課題名（英文）A novel approach to treat severe trauma using gene introduction by nanomicelle into skeletal muscle

研究代表者

位高 啓史（ITAKA KEIJI）

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：60292926

研究成果の概要（和文）：生体適合性に優れたナノミセル型遺伝子キャリアを用いたマウス骨格筋へのハイドロダイナミクス投与により、1ヶ月以上の持続的な遺伝子発現を得た。ナノミセルへのコンドロイチン硫酸添加により、さらに組織傷害の少ない投与が可能であった。末梢神経損傷モデルに対して、筋肥大効果のあるIGF-1遺伝子を、コンドロイチン硫酸添加ナノミセルを用いて投与し、運動・感覚機能の早期改善が得られた。本システムは外傷後の廃用性変化を防止し、早期の機能改善を目指す治療戦略として有用である。

研究成果の概要（英文）：Polyplex nanomicelle is an effective and biocompatible gene carrier. By hydrodynamic injection of nanomicelle into skeletal muscle of mice, a prolonged transgene expression was obtained for more than a month. The addition of chondroitin sulfate to the nanomicelle further reduced the tissue damage in the muscle. In model mice of peripheral nerve injury, the introduction of IGF-1 gene into the muscle using the nanomicelle accelerated the recovery of motor function and sensation of the paralyzed limb, through the processes of the muscular hypertrophy induced by IGF-1. This strategy is promising for avoiding disuse atrophy and the eventual early recovery of motor and sensory functions after severe trauma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：ナノバイオサイエンス

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、遺伝子、バイオテクノロジー、ナノ材料、外傷、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

神経損傷、難治性骨折などの重度外傷は、長期間を要することが多い治療経過で、筋萎縮、関節拘縮といった廃用性変化から非可逆

的な組織の器質化が生ずると、最終的な機能回復の著しい障害となる。これを防止するために運動療法が一般的に行われるが、外傷の残存する部位では限界があり、筋および周囲組織に対する薬理的なアプローチを併用

する必要性が考えられる。筋変性は昨今の分子生物学的検討により分子・遺伝子レベルでの病態機序解明が進み、IGF-1の投与やプロテアーゼ阻害による筋萎縮防止の可能性が示唆されている。重度外傷への適応では、長期に渡る薬効の安定性、持続性が求められ、遺伝子導入が有力な戦略のひとつとなる。

筋組織は従来より naked DNA を用いた遺伝子導入のターゲットとして注目され、Duchenne 型筋ジストロフィー症を初めとする筋組織そのものの治療目的のほか、DNA ワクチンのような、投与後の筋からの生理活性物質の徐放を利用するシステムとして研究されてきた。投与経路として、従来 DNA を直接筋注射し、エレクトロポレーションなどの物理刺激を併用する手法が中心であったが、発現の安定性、再現性に問題があり、十分な発現を得るには組織傷害が大きくなる欠点があった。

一方、筋注射を上回る遺伝子発現を得る手法として、四肢近位で駆血後 DNA を経静脈投与し、一時的な組織内圧の上昇により効率よい膜透過、細胞内輸送を実現するハイドロダイナミクス法による手法が報告され、軽微かつ一過性の組織傷害のみで効率よい遺伝子導入が確認されている。

本研究は、応募者らがこれまで独自に研究開発を進めてきた非ウイルス性ナノミセル型キャリアが、このハイドロダイナミクス法による筋ターゲット遺伝子導入に最適な手法であると着想したものである。廃用性障害に陥りつつある筋への遺伝子投与方法として、キャリア設計・投与方法の最適化を進め、重度外傷後の筋および周囲組織に対する新しい治療法への展開を試みる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物モデルを用いて、ハイドロダイナミクス法による筋ターゲット遺伝子導入手法の条件最適化、治療効果評価を行い、外傷治療への展開を図ることである。これまで廃用性変化の進行を見守るしかないことが多かった筋組織への積極的なアプローチにより、最終的な運動機能の改善を目標とする治療戦略の基礎的検討を行う。本研究では正常動物への実験により、ナノミセル型キャリアの設計・投与方法最適化を進め、次いで外傷モデル動物を用いた実験により、治療用遺伝子の投与による筋・運動器への治療効果を検討する。さらに筋への遺伝子導入では、周囲組織や血液中への発現タンパクの長期徐放も期待されるため、筋からの導入遺伝子の徐放およびその治療効果についても検討する。これらの組合せによる、新しい視点からの機能再建法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究で用いるナノミセル型キャリアは、独自開発したポリエチレングリコール (PEG) とカチオン鎖を連結したブロック共重合体を用い、これとプラスミド DNA (pDNA) を混合させて形成されるナノミセル構造体である。内核で凝縮された DNA の周囲を PEG による外殻が取り囲む構造を取り、生体内安定性、生体適合性に優れることが特長である。カチオン鎖として、PLL (ポリリシン) を用いたもの、またはポリアスパラギン酸主鎖にジエチレントリアミン構造を側鎖として連結したポリカチオン (PAspDET) を用いた。

骨格筋へのハイドロダイナミクス投与は、マウス下肢を大腿の近位で駆血し、大伏在静脈からキャリア溶液を緩徐に静注することによって行った (図 1)。駆血帯は静注後 5 分で解除する。組織内の静水圧を一過性に増加させ、細胞膜の透過性を亢進させて、キャリアの細胞内取り込みを促進させるメカニズムである。

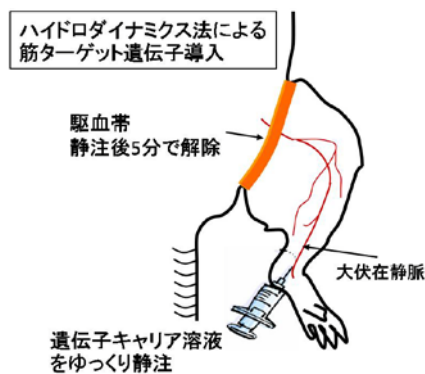


図 1: ハイドロダイナミクス法

投与した筋での遺伝子発現は、ルシフェラーゼ遺伝子投与後の組織での発現定量、in vivo imaging system (IVIS)での観察、GFP 遺伝子を用いた組織学的観察によって行った。さらに筋の組織傷害を組織学的評価、CPK 定量によって評価した。

疾患モデルへの展開として、末梢神経損傷モデルに対する IGF-1 遺伝子の投与を行った。IGF-1 遺伝子発現プラスミド DNA を作成し、ナノミセルに内包してハイドロダイナミクス投与を行った。神経損傷モデルとしては、坐骨神経冷却損傷モデルを用いた、神経機能解析としては、歩行機能の sciatic functional index (SFI) による解析、下肢足底の知覚テスト (Paw pressure test) と行った。

また筋への遺伝子導入後の発現タンパクの血中への徐放による治療効果を見るために、マウスへの膀胱がん (BxPC3) 皮下移植モデルを用い、血管新生を抑制する働きを持つ sFlt-1 遺伝子の投与による腫瘍増殖抑制

を評価した。

4. 研究成果

(1) ナノミセルによる筋ハイドロダイナミクス投与による遺伝子導入

PEG-PLL を用いたナノミセルにおリシフェラーゼ遺伝子を筋へ導入すると、図2のように、naked DNA 投与と比べ有意に高い遺伝子発現が1ヶ月以上持続した。このとき組織中に取り込まれたpDNAを定量すると、naked DNA では投与後5日で当初投与量の0.1%以下までDNAは分解されて消失する一方、ナノミセルではその約1000倍の量のpDNAが組織中に残存していた。

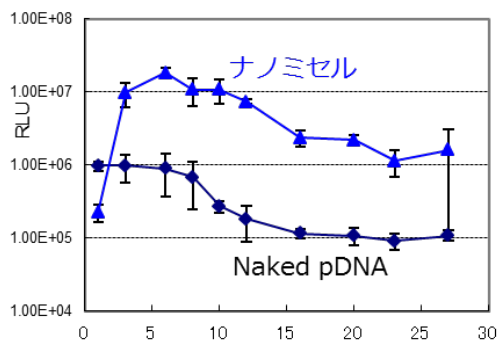


図2：ハイドロダイナミクス法投与後の筋での遺伝子発現（ルシフェラーゼ）

GFP 遺伝子投与後に、マウスの生きたまま筋組織を細胞単位で観察することが可能な *in vivo* 共焦点イメージングシステム（アメリカハーバード大学附属マサチューセッツ総合病院 Yun 教授との共同研究）で観察すると、naked DNA では少数の筋線維に強い GFP 発現が見られる一方、ナノミセルでは多くの筋線維に広く発現の見られることが明らかとなった（図3）。一方明らかな筋の組織傷害は見られなかった。

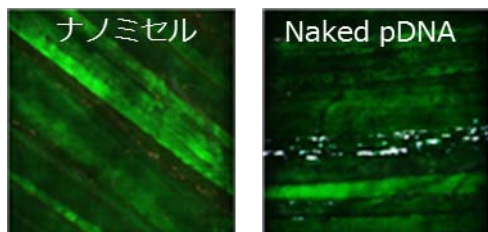


図3：GFP 遺伝子投与後の筋組織ライブイメージング

本イメージングシステムを用いて、蛍光標識した pDNA の細胞組織内分布を見ると、ナノミセルでは投与後数日に渡って、ナノミセルが徐々に核へ移行し、持続的な発現に繋が

っていることが分かった。

また筋ハイドロダイナミクス投与後の組織傷害の指標として血中の CPK 濃度を見ると、naked DNA、ナノミセルとも、投与翌日には CPK 濃度が一時上昇したが、その後数日でコントロールレベルまで回復した。

(2) コンドロイチン硫酸添加ナノミセルによる組織傷害性の軽減

コンドロイチン硫酸 (CS) は天然の細胞外マトリクスで、負電荷を持つ。ナノミセル溶液に過剰の電荷量の CS を添加すると、ポリカチオン/pDNA/CS の三元コンプレックスが形成される。遺伝子導入に用いると、コンプレックスの安定化効果により、発現の持続化が観察された。さらにこの CS の重要な働きとして、効果的に生体内での組織傷害性や炎症惹起を制御することが明らかとなった。培養細胞に対する実験で、傷害された細胞膜のみを透過する蛍光色素 (YO-PRO1) を用いて、遺伝子導入後の膜傷害性を評価すると、ナノミセル溶液中に残存するフリーポリマーと CS が結合して、フリーポリマーによる膜傷害を効果的に抑制していることが分かった（図4）。

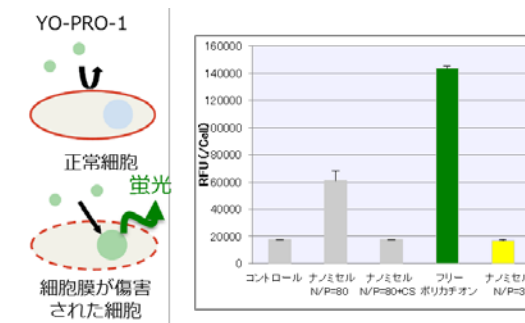


図4：細胞膜傷害性の評価

この CS 添加ナノミセルを筋ハイドロダイナミクス投与へ応用すると、投与4時間後の血中 CPK を有意に減少させることが確認された。CPK 漏出の原因となる膜傷害は一過性かつ可逆性であることは (1) にても確認されていたが、さらにこの CS 添加システムでその傷害性を最小限にすることができた。

(3) 坐骨神経損傷モデルに対する IGF-1 遺伝子の投与

PEG-PAspDET を用いたナノミセルに CS を添加したシステムを用いて、マウス坐骨神経損傷モデルに対する IGF-1 遺伝子投与を行った。IGF-1 の筋への作用はまず筋肥大（萎縮防止）効果が挙げられ、筋萎縮の分子メカニズムはまだ全容は解明されていないが、IGF-1 シグナルの減少によるユビキチン-プロテアソ

ム系の活性化によるタンパク分解の関与が考えられている。IGF-1 投与による筋萎縮防止が複数のモデル動物にて報告されている。IGF-1 投与後 7 日の摘出筋の重量計測を行うと、無治療群では健側と比べ麻痺側で約 28% の重量減少（萎縮）が見られた一方、ナノミセルで IGF-1 投与した群では、約 12% の減少に止まった（図 5）。

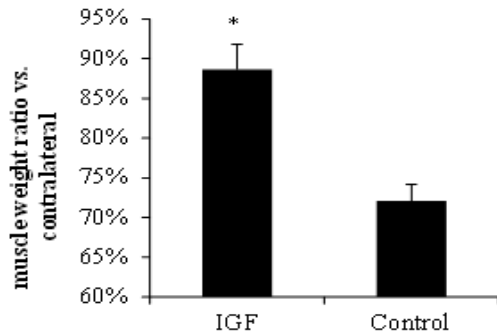


図 5：神経損傷後 7 日での患肢/健肢重量比

これに伴う運動機能の早期改善を評価する目的で、歩行機能解析を行った。記録された足跡より SFI 算出すると、神経損傷後無治療群では、約 3 週で SFI はほぼ正常に回復するのに対し、ナノミセルによる IGF-1 投与群では、約 2 週の時点での顕著な回復が見られた（図 6）。

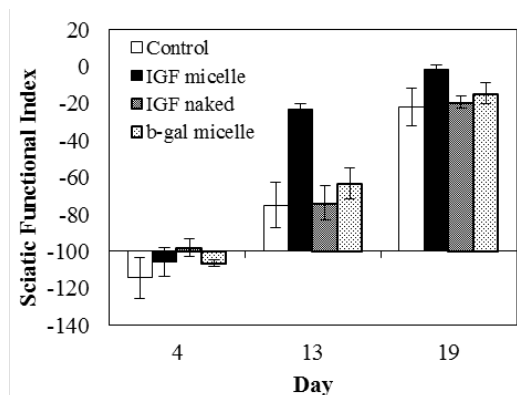


図 6：神経損傷後の歩行機能解析

一方、足底の機械刺激による知覚障害の評価（Paw pressure test）では、無治療群およびコントロール遺伝子投与群では、やはり約 3 週で知覚改善が得られたが、ナノミセルによる IGF-1 投与群では、驚くべきことに投与後 4 日で改善傾向が見られ、2 週で完全に正常に回復した（図 7）。IGF-1 による直接の神経軸索伸長への作用は文献的にも明らかではなく、この効果が神経知覚線維への IGF-1（タンパク）の直接の効果か、筋肥大による二次的な効果であるかは現時点では不明で、今後の検討課題である。

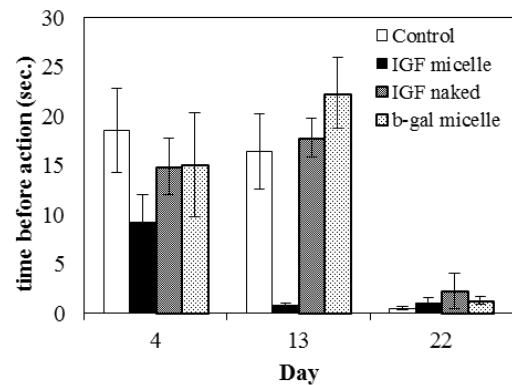


図 7：神経損傷後の知覚機能評価

(4) がん増殖抑制

がんに対する抗血管新生療法として、sFlt-1 遺伝子の投与を行った。これは VEGF 受容体 1 型の可溶部分タンパクで、これが血管新生部位に多量に存在することにより、がん細胞から産生される VEGF がトラップされ、血管新生阻害効果を得るものである。既に sFlt-1 遺伝子を内包したナノミセルの全身投与により、がんの増殖抑制効果の得られることが確認されている。

同遺伝子発現 pDNA を PEG-PLL を用いたナノミセルに内包し、筋ハイドロダイナミクス投与すると、血清中での sFlt-1 タンパクが持続的に検出されると共に、無治療群およびコントロール遺伝子投与群と比べ、有意ながん増殖抑制効果が得られた。腫瘍組織を血管内皮特異的なマーカーである PECAM-1 免疫染色を行うと、陽性部位の割合が有意に減少し、このがん増殖抑制が確かに新生血管阻害によるものであることが示唆された。Naked DNA による投与との比較では、投与後 2 週程度までは同様の増殖抑制効果が観察されたが、それ以後は徐々に腫瘍増殖が加速したのに対し、ナノミセルではさらに増殖抑制効果が持続した。

以上のように、ナノミセル型遺伝子キャリアを用いたハイドロダイナミクス法による骨格筋への遺伝子導入の有用性・安全性が確認された。特に CS 添加ナノミセルによって、筋への組織傷害を最小限にすることができ、ナノミセルの生理的環境下での安定性を相まって、安全かつ持続的な遺伝子発現が可能となった。既に神経損傷モデルに対して、良好な神経機能改善の促進効果が確認されているが、現在さらに下肢虚血モデルに対する治療用遺伝子投与による血管再生促進の評価を始めている。これらの知見を総合して、本手法の治療戦略としての可能性を吟味し、大動物を用いた検証、さらに臨床への展開を検討していく予定である。

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 6 件)

- ① 位高啓史. 生体適合性遺伝子ナノキャリアの開発研究と疾患治療への応用. バイオマテリアル—生体材料. 査読無, Vol. 30, 2012, 39-46.
- ② Itaka K, Kataoka K. Progress and prospects of polyplex nanomicelles for plasmid DNA delivery. Curr Gene Ther. 査読有, Vol. 11, 2011, 457-465. BSP/CGT/E-Pub/00096 [pii]
- ③ Uchida S, Itaka K, Chen Q, Osada K, Miyata K, Ishii T, Harada-Shiba M, Kataoka K. Combination of Chondroitin Sulfate and Polyplex Micelles from Poly(ethylene glycol)-poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} Block Copolymer for Prolonged In Vivo Gene Transfection with Reduced Toxicity. J Control Release. 査読有, Vol. 2, 2011, 296-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.026>
- ④ Oba M, Vachutinsky Y, Miyata K, Kano MR, Ikeda S, Nishiyama N, Itaka K, Miyazono K, Koyama H, Kataoka K. Antiangiogenic Gene Therapy of Solid Tumor by Systemic Injection of Polyplex Micelles Loading Plasmid DNA Encoding Soluble Flt-1. Mol Pharm, 査読有, Vol. 7, 2010, 501-509. 10.1021/mp9002317
- ⑤ Itaka K, Ishii T, Hasegawa Y, Kataoka K. Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. Biomaterials, 査読有, Vol. 31, 2010, 3707-3714. S0142-9612(09)01316-7 [pii]
- ⑥ Itaka K, Osada K, Morii K, Kim P, Yun SH, Kataoka K. Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. J Control Release, 査読有, Vol. 143, 2010, 112-119. S0168-3659(09)00859-1 [pii]

[学会発表] (計 15 件)

- ① 位高啓史, 内田智士, Qixian Chen, 長田健介, 石井武彦, 柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子, 片岡一則. 機能性と炎症制御を両立させたナノキャリアによる肺への遺伝子導入. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 2011. 11. 22, 京都府民総合交流プラザ京都テルサ (京都府京都市)
- ② Itaka K. Biocompatible polyplex nanomicelle for safe and effective gene introduction minimizing inflammatory responses. European Society of Gene and Cell Therapy, British Society for Gene Therapy, Collaborative Congress 2011, 2011. 10. 28, Brighton Center (Brighton, UK)
- ③ 位高啓史, 内田智士, Qixian Chen, 長田健介, 石井武彦, 柴田映子, 柴田雅明, 斯波真理子, 片岡一則. マクロファージ活性化を回避する安全な肺への遺伝子導入. 第 21 回アンチセンスシンポジウム, 第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム. 2011. 9. 2, 大阪大学 (大阪府吹田市)
- ④ Itaka K. Biocompatible Polyplex Nanomicelle for Safe and Effective Gene Transfer. 17th Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy. 2010. 10. 8, LMU Campus Großhadern (Munich, Germany)
- ⑤ Itaka K. Safe and effective gene delivery using biocompatible polyplex nanomicelle. 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology (招待講演) 2010. 10. 6, Ludwig-Maximilians-Universitaet (Munich, Germany)
- ⑥ Itaka K. Biocompatible Polyplex Nanomicelle for Safe and Effective Gene Transfer. Trilateral Symposium on NanoBio Integration (招待講演) 2010. 10. 2, Freie Universität Berlin (Berlin, Germany)
- ⑦ 位高啓史. 生体適合性遺伝子キャリアとしてのナノミセル. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会 (招待講演) 2010. 6. 17, 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)
- ⑧ Itaka K. Biodegradable Polyamino Acid-Based Polycations for Safe and Effective Gene Transfer Minimizing

Cumulative Toxicity. 13th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy. 2010.5.20, Marriot Wardman Park (Washington DC, USA)

- ⑨ Itaka K. Gene delivery with structure-specific biodegradable polymer - safe and sustained transgene expression by avoiding cumulative toxicity. 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2009.12.18, Maui Resort & Spa, Lahaina (Hawaii, USA)
- ⑩ 位高啓史. 細胞をターゲットするドラッグ・遺伝子デリバリーシステムの研究展開. 第5回 IN Cell User's Day (招待講演) 2009.10.9, 蚕糸科学研究所 (東京都)
- ⑪ 位高啓史, 石井武彦, 片岡一則. 生分解性カチオン性ポリマーによる遺伝子デリバリー. 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム. 2009.7.11, 大阪大学コンベンションセンター (大阪府吹田市)
- ⑫ 位高啓史, 石井武彦, 片岡一則. 生分解性ナノミセルによる遺伝子デリバリーと機能評価. 第25回日本DDS学会. 2009.7.4, 東京ドームホテル (東京都)
- ⑬ Itaka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for tumor targeting. International conference on materials for advanced technologies 2009 (ICMAT) and International union of material research societies-International conference in Asia (IUMRA-ICA 2009) (招待講演) 2009.6.29, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Centre (Singapore)
- ⑭ Itaka K. Engineered Supra-Macromolecular Assemblies as Nanodevices for Gene and Nucleic Acid Delivery. 2nd Asian Biomaterials Congress (ABMC) (招待講演) 2009.6.27, National University of Singapore (Singapore)
- ⑮ Itaka K. Biocompatible nanocarrier for gene and siRNA delivery. First World Congress of International Academy of Nanomedicine (IANM) (招待講演) 2009.6.13, Sanya (Hainan, China)

[図書] (計1件)

- ① 位高啓史. バイオマテリアルとしての細胞：骨芽細胞. バイオマテリアルの基礎 (日本医学館). 2010, 233-236

[その他]

ホームページ等
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

位高 啓史 (ITAKA KEIJI)
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：60292926

(2) 研究分担者

長田 健介 (OSADA KENSUKE)
東京大学・大学院工学系研究科・特任准教授
研究者番号：10396947

緒方 徹 (OGATA TORU)
国立障害者リハビリテーションセンター
研究所・運動機能系障害研究部・部長
研究者番号：00392192

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)
東京大学・医学附属病院・准教授
研究者番号：40282660

片岡 一則 (KATAOKA KAZUNORI)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：00130245

(3) 連携研究者

なし