

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 23 日現在

機関番号：32604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500430

研究課題名（和文） 超微粒子プラスミド複合体を用いた腫瘍免疫遺伝子治療システムの構築

研究課題名（英文） Novel Strategy of Tumor Gene Therapy by Very Small Plasmid Complex Particles

研究代表者

小山 義之 (KOYAMA YOSHIYUKI)

大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00162090

研究成果の概要（和文）：我々は、生体に投与後、腫瘍内で高い遺伝子発現を示すDNA複合体の調製法を確立している。サイトカインをコードしたプラスミドの複合体は、坦癌モデルマウスにおいて著しい治癒効果を示した。さらに効率よく免疫を惹起するため、結核菌タンパク ESAT-6 などの遺伝子についても検討した。これらは単独でも高い腫瘍増殖抑制効果を示し、さらにサイトカイン遺伝子を組み合わせると、抗腫瘍活性はさらに向上した。また、これらはイヌの原発性腫瘍に対しても高い治癒効果を示した。

研究成果の概要（英文）： Great efforts have been focused on developing the non-viral vector systems as safer alternatives to viruses. But the in vivo gene expression by those artificial vectors is strictly limited. The major obstacles should be adverse interactions of the complex with biocomponents, and the too large size of the complexes to be delivered to the target cells. We developed an anionic polymer-coating on the complex particles, which re-charged the particles to negative, and effectively diminished the non-specific interactions. It also enabled the preparation of concentrated very small DNA complex suspension under the precise conditions.

Small plasmid complexes were then prepared with the PEI and the plasmids encoding cytokines or virus specific proteins, and explored for anticancer therapeutic potential with tumor-bearing mice. They showed significant therapeutic effect in mice after intratumoral injection, and fairly high therapeutic effect was obtained.

In order to induce higher immune response to tumor cells, expression of the pathogenic antigen on the tumor cell surface should be effective. Simultaneous transfection with plasmids expressing cytokines and pathogenic antigen into tumor cells should, thus, be expected to lead to highly effective anti-tumor immune-enhancement.

We employed two pathogenic proteins, adenovirus death protein (ADP) and mycobacterium tuberculosis early secretory antigenic target-6 protein (ESAT-6), and mycobacterium tuberculosis major secretory protein antigen 85B (Ag85B) as an immune response-inducing antigen. The small complexes made of the plasmids harboring the pathogenic protein genes showed highly effective anti-tumor activity, and as expected, co-transfection of those pathogenic genes with cytokine-genes induced much higher anti-tumor therapeutic effect in tumor-bearing mice. Animal clinical study on primary tumor-bearing dogs was also carried out, and evident suppression of the tumor growth was observed.

交付決定額

（金額単位：1000 円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1700	510	2210
22年度	900	270	1170
23年度	900	270	1170

年度			
年度			
総計	3500	1050	4550

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：薬物伝達システム

1. 研究開始当初の背景

様々なタイプのDNA/ポリカチオン（またはカチオン性脂質）複合体が、安全な非ウイルス型の遺伝子導入用ベクターとして研究されている。しかし、これらは培養細胞を用いた実験ではすでに極めて高い遺伝子発現効率が達成されているが、生体内に投与したときの発現はほとんど無い。

その主な原因として、(1) 生体成分との副作用、(2) 複合体の大きすぎるサイズ、の二点が挙げられる。

我々は、核酸複合体をヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの特殊なポリアニオンで保護コーティングすることにより、生体成分との副作用を大きく低減できることを報告してきた。さらに、我々は活性を保持したまま凍結乾燥する製造技術を開発した。この技術を応用し、希薄な条件下で得た極微小な複合体粒子を、凍結乾燥・再水和の過程で濃縮し、極微小な核酸複合体の、安定な濃厚分散液を得ることに初めて成功した。

これらを、マウスなどの小動物の静脈内や腫瘍内に投与すると、腫瘍組織内で極めて高い遺伝子発現を引き出し、非ウイルス型ベクターを用いた全身投与による生体内遺伝子高発現を達成した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、ヒトへの臨床応用可能な、治癒効果の高い非ウイルス型の遺伝子治療システムを開発することにある。本研究で用いたシステムは、上述のように、通常のプラスミド/ポリカチオン複合体にさらにポリアニオンを加えた三元複合体であることを特徴とする。ポリアニオンコーティングは、凍結乾燥後、再水和すると活性の高い微粒子が再生する。本研究では、まず凍結乾燥による活性低下のメカニズムの解明し、凍結乾燥後も高い活性が再現性良く維持できる製剤の調製方法を検討する。

高い発現の得られた製剤について、これらをマウスの血管内、腹腔内、腫瘍局所内に投与し、生体内で高発現するシステムを確立する。また、細胞毒性、生体毒性を調べ、安全性の高い製剤の調製法を検討する。

様々なサイトカイン遺伝子をコードした

プラスミドDNAを合成し、その複合体の担癌マウスにおける治癒効果を検討する。さらに、抗腫瘍効果の高い遺伝子の設計を行い、高い安全性と優れた治癒効果を持つ製剤の調製法を確立する。

高い治癒効果が得られたものに関しては、中型動物での臨床研究を行う。そして、これらの結果を総合し、ヒトへの臨床応用の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

【凍結乾燥による活性低下のメカニズムの解明】

DNA複合体を凍結乾燥すると遺伝子導入活性が落ちる理由は、まだ完全には解明されていない。凍結乾燥後も高い活性を持つ複合体を得るため、初めに培養細胞を用いてその活性低下のメカニズムを解明し、複合体調製の最適条件を追求した。

【微小な複合体粒子を得るための条件の確立】

様々な条件下で調製したDNA複合体を凍結乾燥・再水和し、得られる複合体のサイズ、表面電位をナノサイザーを用いて測定し、微小で安定な複合体粒子を得るための条件を確立した。

【小動物を用いた治癒実験】

担癌動物モデルに様々なサイトカインをコードしたプラスミドの超微粒子複合体を投与して治癒効果の検討を行った。

【最適遺伝子の検討】

免疫システムを活性化するための新たな戦略として、微生物抗原遺伝子の投与を検討した。

【中型動物での治癒効果の評価】

安全性と治癒効果の高い製剤に関して、動物臨床試験を行い、原発性腫瘍に対する治療を試みた。

4. 研究成果

我々はこれまでに、DNAの複合体にコンドロイチン硫酸などのポリアニオンによる保護コーティングを施し、生体成分との非特異的な副作用を低減し、特殊な条件下で極微小なDNA複合体の安定な濃厚分散液を得ることに成功している。

複合体の調製条件、凍結乾燥条件、再水和条件を詳細に検討し、凍結乾燥後も、より高い遺伝子発現活性を持った超微粒子が再水和によって容易に得られる製剤の調製条件を確立した。

この技術を用いて免疫賦活化サイトカイン GM-CSF の遺伝子をコードしたプラスミドの極微小な複合体を調製し、それらの坦癌モデルマウスにおける治癒効果を調べ、これらのDNA微粒子複合体は明らかな抗腫瘍効果を示すことを確認した。

より高い治療効果を得るために、他の抗腫瘍サイトカインとして、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-12 (IL-12)などをコードしたプラスミドについても同様に複合体を調製し、その効果を坦癌モデルマウスを用いた治癒実験において比較検討した。その結果、IL-2を用いた製剤は、B16メラノーマを移植した坦癌モデルマウスにおいて、特に高い腫瘍増殖抑制効果を示した。

しかし、サイトカインの発現のみでは、抗腫瘍活性には限界があった。効率よく免疫システムを惹起するには、サイトカインだけではなく、デインジャー・シグナルの存在が必要なのではないか、と考えた。そこで、アデノウイルス、結核菌などの高い抗原性を持つ微生物タンパクのプラスミドを合成し、その複合体を同様に調製した。坦癌モデルマウスにおける治癒実験において、結核菌タンパク ESAT-6、あるいは Ag85B をコードしたプラスミドを用いた製剤は、単独でも B16メラノーマを移植した坦癌モデルマウスにおいて、高い腫瘍増殖抑制効果を示した (図1)。

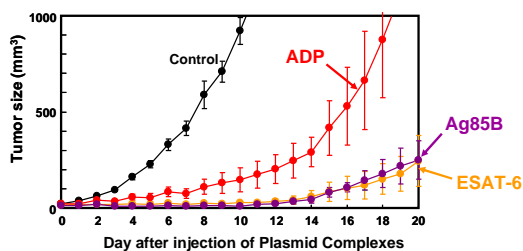


図1. 微生物抗原遺伝子の抗腫瘍効果

さらに、これらの微生物タンパクと、IL-2などのサイトカインを組み合わせることで、著しく高い抗腫瘍活性が達成された (図2)。

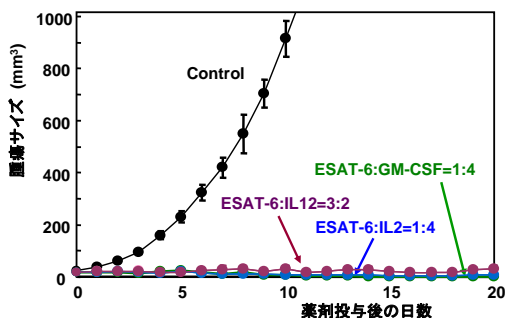


図2. ESAT-6 遺伝子とサイトカイン遺伝子の相乗効果

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5件)

(1) Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy, Yoshihara C., Hamada K., Kuroda M., Koyama Y., Oncology Letters, (査読有), ONCOLOGY LETTERS 3: 387-390, 2012.

(2) Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer, Hamada K., Yoshihara C., Ito T., Tani K., Tagawa M., Sakuragawa N., Itoh H., Koyama Y., J Gene Med. (査読有) 14: 120-127, 2012.

(3) Loosening of DNA/polycation complexes by synthetic polyampholyte to improve the transcription efficiency: effect of charge balance in the polyampholyte, Yoshihara C., Shew C-Y., Ito T., Koyama Y., Biophys J. (査読有) 98:1257-66, 2010.

(4) DNA/polyethyleneimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice, Ito T., Yoshihara C., Hamada K., Koyama Y., Biomaterials, (査読有) 31:2912-8, 2010.

(5) Analysis of the surface structure of DNA/polycation/hyaluronic acid ternary complex by Raman microscopy, Ito T., Koyama Y., Otsuka M., J Pharm Biomed Anal., (査読有) 51:268-72, 2010.

[学会発表] (計3件)

(1) Novel Antitumor Strategy by Transfection of Plasmids Encoding Pathogenic Antigen- and Cytokine-Genes, Y. Koyama, C. Yoshihara, T. Ito, and M. Eriguchi, American Society of Gene and Cell Therapy, 2012. 5, Philadelphia

(2) Oncolytic Plasmid System, a Novel Antitumor Strategy by Plasmid Encoding Adenovirus Protein, Y. Koyama, M. Tojyo, C. Yoshihara, K. Hamada, and T. Ito, American Society of Gene and Cell Therapy,

2011. 5. Seattle

(3) Small Plasmid/PEI/Anionic Polysaccharide Ternary Complex Particles: Toxicity and Animal Clinical Study, Y. Koyama, M. Tojyo, C. Yoshihara, K. Hamada, and T. Ito, American Society of Gene and Cell Therapy, 2010. 5. Washington DC

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

(1) 名称：新規な複合体、それを含有する医薬及び癌の治療方法

発明者：小山 義之、芳原 智恵子

権利者：アルファ・ナノ・メディカ (株)

種類：特許

番号：特願 2011-201136

出願年月日：2011 年 8 月 29 日

国内外の別：国内

(2) 名称：新規なベクター、それを含有する医薬及び癌の治療方法

発明者：濱田 雄行、小山 義之、芳原 智恵子、伊藤智子

権利者：アルファ・ナノ・メディカ (株)

種類：特許

番号：特願 2010-20766

出願年月日：2010 年 4 月 20 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 義之 (KOYAMA YOSHIYUKI)

大妻女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00162090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

芳原 智恵子 (YOSHIHARA CHIEKO)

大妻女子大学・家政学部・助手

研究者番号：40597093