

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 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010～2012
課題番号：22659006
研究課題名（和文） スイッチ機能を有する人工遺伝子デリバリーシステムの創製
研究課題名（英文） Novel gene delivery system with switch function
研究代表者 原島 秀吉（HARASHIMA HIDEYOSHI）
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：00183567

研究成果の概要（和文）：遺伝子デリバリーシステムが標的細胞と *interactive* に情報交換を行い、細胞の協力を得ながら遺伝子発現効率を飛躍的に促進できるシステムを開発することを目的とした。本研究ではこれをスイッチ機能と呼び、KALA 修飾リポソームをモデルとして、スイッチ機能を担う遺伝子群の探索と同定を行った。さらに、スイッチ機能を搭載した人工遺伝子デリバリーシステムを開発し、*in vivo* で機能するシステムへと展開した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop a novel gene delivery system with a switch function which can interact with target cells to enhance trans gene activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：人工遺伝子デリバリーシステム、スイッチ機能、KALA

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬を実現するためには、安全かつ有効な遺伝子デリバリー技術は不可欠である。これまでの人工遺伝子デリバリーシステムの開発においては、細胞内動態の素過程の効率促進が大きな課題であった。我々は独自の

コンセプトに基づいて、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multifunctional Envelope-type Nano Device: MEND) を開発し、分裂細胞ではアデノウイルスと同等の遺伝子発現を誘起することに成功した。

ウイルスの分子生物学をリードする A.

Helenius らは、「ウイルスが細胞内に進入するとき種々のシグナル伝達経路に影響を与え、自分自身を侵入しやすくするのみならず、遺伝子発現を有利にしていると報告した。このような状況下、「ウイルスベクターの核内送達以降の優れた発現効率」とが結びつき、「アデノウイルスには導入した遺伝子の発現を促進する（スイッチをオンにする）機能がある」あるいは、「現行の人工ベクターでは細胞内の遺伝子発現に関わるシグナルを抑制する（スイッチをオフにする）因子がある」という仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

本申請研究は、(1) 遺伝子導入による遺伝子発現変動の網羅的解析、(2) 遺伝子発現を促進・抑制する制御因子の同定と機能解析、(3) スイッチ機能搭載型 MEND の開発、(4) *in vivo* における治療効果の検証、からなる。

本研究のアウトプットとして、DNA ワクチン技術への応用を考えた。DNA ワクチンは、癌、感染症などの様々な疾患に対して適応可能な優れた細胞治療法である。DNA ワクチンによる細胞性免疫を誘起する上では、樹状細胞において高い遺伝子発現を発揮することができる遺伝子デリバリーシステム、及び、抗原提示した樹状細胞を活性化するためのアジュバントの開発が重要な課題となる。樹状細胞は、通常は自己への攻撃を回避するため、機能的に抑制状態にあると考えることができる。本研究で目指すスイッチ機能による機能活性化というコンセプトは、通常は機能が抑制されている細胞を標的にした方が解析しやすいと考えられる。

3. 研究の方法

本粒子表面に対して、ペプチドを修飾する

ために、各種ペプチドの脂質誘導体を合成した。細胞内動態比較の評価をおこなうため、細胞内への取り込み量や核移行量をリアルタイム PCR 法によって解析した。また、マイクロアレイ解析を用いることで、各種粒子を樹状細胞とインキュベーションした際の mRNA 発現変動を解析した。遺伝子発現レベルは、マーカーとしてルシフェラーゼを用いた遺伝子を用いた際の化学発光量により測定した。産生されるサイトカインレベルに関しては、ELISA 法を用いて解析した。

4. 研究成果

DNA ワクチンを開発する上で、樹状細胞への遺伝子導入法の確立は重要な課題である。我々は、遺伝子送達を可能とするための基盤技術として、遺伝子とポリカチオンからなる凝集体コアを脂質エンベロープによって封入した多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) を構築してきた。その中でも、pH 依存的に膜融合性を示す KALA ペプチドを修飾した MEND (KALA-MEND) は、従来から開発してきたオクタアルギニン (R8) 修飾 MEND (R8-MEND) と比較して極めて高い遺伝子発現を示した。細胞内動態比較の観点から、細胞内への取り込み量や核移行量について、リアルタイム PCR 法を用いて解析を行ったが、両者の間に大きな違いは認められなかった。このことから、KALA には、樹状細胞の細胞膜表面上の何らかの分子に相互作用し、スイッチを押すことで、細胞内シグナルパスウェイを活性化し、最終的に転写過程を活性化するのではないかと考えた。

マイクロアレイを用いて KALA-MEND 及び R8-MEND トランスフェクション時の mRNA 発現変動を解析した結果、KALA-MEND トランスフェクション群において遺伝子発現レベルの大きな変動を示すことが明らかとなった。ま

た、転写に関連する遺伝子群に着目した結果、KALA-MEND においては、STAT 1 や $\text{NF-}\kappa\text{B}$ などの遺伝子が促進しており、また、使用しているプラスミド DNA のプロモーター配列にこれらの結合配列が含まれるため、KALA は細胞に何らかの刺激を加え、転写活性化を誘起することが示唆された。

JAK/STAT 系の阻害剤存在下における遺伝子発現活性を解析した結果、その活性は、濃度依存的に劇的に阻害されることから、本シグナル経路の活性化が、遺伝子発現の上昇と密接に関わる現象であることが示唆された。また、これらの免疫応答に関わる転写因子の活性化に伴い、各種サイトカインの産生も優位に高く上昇することが示されたことから、本ペプチド修飾 MEND は、細胞内シグナルの活性化を介して遺伝子導入効率を促進するのみでなく、同時に樹状細胞を活性化することも明らかとした。KALA-MEND のうち、どの要素が活性化に関わるのかを明らかにするため、遺伝子を除いた KALA-リポソームあるいは、KALA ペプチド単独の活性化能を評価した結果、遺伝子、KALA ペプチド、脂質エンベロープすべてがそのアジュバント活性に重要な因子であることが明らかとなった。

KALA 修飾 MEND (KALA-MEND) のトランスフェクションは、樹状細胞に対して劇的なシグナル活性化を引き起こし、さらには $\text{NF-}\kappa\text{B}$ や STAT などの活性化を介した樹状細胞の活性化を行うことが明らかとなってきた。また、本細胞の活性化過程において、KALA 修飾 MEND の構成成分のうち、内封した遺伝子、KALA ペプチド、脂質エンベロープすべてが重要な因子であることが明らかとなった。本年度は、そのメカニズムについて詳細に解析を試みた。各種 toll 様受容体の欠損マウスから単離した樹状細胞においても、同様な活性化が引き起こされることも明らかとなった。また、

本細胞の活性化には、遺伝子を封入する脂質膜の融合性も重要であることも示された。これらのことから、遺伝子の細胞質への輸送が免疫活性化の引き金となることが示唆された。活性化により産生されるサイトカインのプロファイルを解明した結果、 $\text{IL1}\beta$ や I 型インターフェロンなどの産生が高く、これは、既存のアジュバント (LPS や CpG 配列含有オリゴヌクレオチド) により活性化された場合と比較しても大きく異なるものであった。さらに、これら KALA-MEND 特有のサイトカイン類の産生プロファイルより、インフラマソームや STING 経路などの活性化がその機構として考えられた。本仮説を検証するために、各種経路に対する阻害剤を用いた際のサイトカイン産生量を測定した結果、共に劇的な抑制が認められた。これらの結果より、KALA-MEND による免疫活性化には、外来遺伝子の細胞質輸送が極めて重要であり、さらにその経路には、長鎖 DNA に対する細胞質センサーが関与することが明らかとなった。

本 MEND により抗原発現プラスミドを導入した骨髄由来樹状細胞をマウスの皮下に免疫することにより、免疫活性化剤の有無によらず高い癌の予防効果が得られることが明らかとなった。本結果からも、本ペプチド修飾粒子は、高い抗原遺伝子導入活性とアジュバント効果を合わせ持つ多機能性粒子であり、DNA ワクチンへの展開が期待出来るシステムであると考えられる。

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 2 件)

1. Hatakeyama H, Ito E, Yamamoto M, Akita H, Hayashi Y, Kajimoto K, Kaji N, Baba Y, Harashima H. A DNA Microarray-based

Analysis of the Host Response to a Nonviral Gene Carrier: A Strategy for Improving the Immune Response. Mol Ther. 査読有、19(8):1487-98 (2011)

2. Shaheen SM, Akita H, Nakamura T, Takayama S, Futaki S, Yamashita A, Katoono R, Yui N, Harashima H. KALA-modified multi-layered nano- particles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine. Biomaterials. 査読有、32(26): 6342-50 (2011)

[学会発表] (計3件)

1. Hideyoshi Harashima, Breakthrough Technologies in Gene Delivery for Nanomedicines, FIP Centennial, 2012, October 8th, 2012, Amsterdam, the Netherlands, Amsterdam RAI
2. Hideyoshi Harashima, Multifunctional Envelope-type Nano Device for Non-viral Gene Delivery: Concept and Application for Nanomedicine, Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Sciences, September 23th, 2011, Innsbruck, Austria, University of Innsbruck
3. Hideyoshi Harashima, Nanotechnology for In Vivo Gene Delivery: Concept and Application of MEND, 2010 FIP PSWC/AAPS Annual Meeting and Exposition, Short Course: Nanotechnology from A to Z: Achievement in Drug Delivery and Tissue Engineering, November 14th, 2010, New Orleans, U. S. A. Ernest N. Morial Convention Center

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 核内移行性を有する脂質膜構造体
発明者: 原島秀吉, 秋田英万、シヤリフモハメドシヤヒーン、中村孝司、石井聡一郎、二木史朗、権利者: 北海道大学、番号: PCT/JP2011/059738、出願年月日: 2011年4月20日、国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 00183567

(2) 研究分担者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)
北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授
研究者番号: 10416216
林 泰弘 (HAYASHI YASUHIRO)
北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号: 30548178

(3) 連携研究者

秋田 英万 (AKITA HIDETAKA)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 80344472