

## 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 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2010～2011

課題番号：22659110

研究課題名（和文）遺伝子デリバリー技術の医療応用に重要な長期タンパク質発現系の開発・治療展開

研究課題名（英文）Development of long-term protein expression for medical application of gene delivery technology and its therapeutic application

研究代表者

川上 茂（Kawakami Shigeru）

京都大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：20322307

研究成果の概要（和文）：

In vivo 遺伝子導入技術は、遺伝子治療やヒト遺伝子の機能解析、病態モデル動物開発に繋がる。本研究では、染色体の特定部位への遺伝子挿入を利用した安全な長期遺伝子発現系の構築と押圧や吸引力を利用した新規臓器特異的導入法の開発に成功した。これらの長期発現ベクターや核酸導入法は、難治性疾患治療に対する核酸医薬を用いた新規治療戦略の開発に向けて有益な基礎的知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

In vivo gene transfection technology is an important method for the establishment of gene therapy, gene functional analysis, and diseased animal model. In this study, we have succeeded to develop a long-term gene transfection method that is induced by integration of specific sites in the genome and tissue pressure and/or suction-mediated gene transfection methods for naked plasmid DNA. This information would be efficient for the establishment of new therapeutic strategies for refractory diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	270,000	3,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、応用薬理学

キーワード：遺伝子治療、遺伝子導入、遺伝子デリバリー、肝臓、腎臓、長期発現

## 1. 研究開始当初の背景

In vivo 遺伝子導入技術は、遺伝子治療やヒト遺伝子の機能解析、病態モデル動物開発に繋がることから、世界的にも、標的細胞のみで治療用タンパク質を発現させるためのターゲティング法の開発競争が行われている。遺伝子導入のためのベクターは、ウイルス性・非ウイルスベクターが用いられているが、生産・使用の簡便性、安全性、P1 レベルで

の研究使用等の観点では、非ウイルスベクターの開発が重要である。研究の進展により遺伝子発現は実用レベルまで到達してきているが、その殆どは一過性、短期間のタンパク質発現系であり、発現させる生理活性タンパク質の薬理効果・機能の長期観察・解析には適さない。また、naked 核酸による遺伝子導入法は、非常にシンプルであり、速やかな研究成果の応用が期待できる。

以上の背景をもとに、種々の疾病の標的となる細胞・臓器への naked 核酸導入法の開拓ならびに、細胞におけるタンパク質の長期発現系の構築が、核酸・遺伝子医薬を用いた治療・創薬ツールとして発展させるための緊急な課題である。

## 2. 研究の目的

phiC31 インテグラーゼを用いた遺伝子導入法では、ドナーpDNA 上の attB サイトとゲノム上の pseudo attP サイトが遺伝子組み換えを行うため、部位特異的な遺伝子組み換えによる長期遺伝子発現を行うため (図1)、非特異的なゲノムへの遺伝子組み換えに比べ比較的安全であると考えられる。

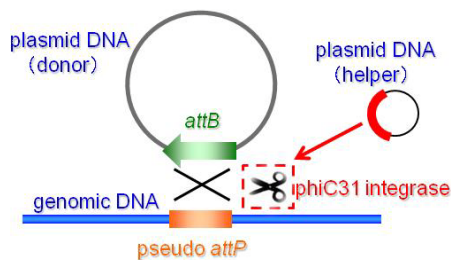


図1 phiC31 インテグラーゼによる遺伝子組み換え機構

そこで本システムを用いたマウスへの長期遺伝子発現系の開発を行った。phiC31 インテグラーゼ発現プラスミド DNA (pDNA)、モデル遺伝子である attB 配列を有するルシフェラーゼ (Luc) 発現ベクター (attB ドナー pDNA) を設計し、申請者らによる独創的な遺伝子デリバリーシステムを用いて安全なマウスでの長期タンパク質発現を実現する。本方法の医療応用への妥当性を確認する為、Luc の生体内での発現特性、染色体への組み込み、安全性の包括的な評価を行う。さらに、attB 配列を有する肝細胞増殖因子 (HGF) 発現ベクターを設計し、HGF の長期発現に基づく線維性疾患に対する遺伝子治療の分子薬理的な評価を行った。次に、本長期遺伝子発現技術の in vivo での応用を広げるため、一定の組織押圧により核酸導入を可能とする組織押圧核酸導入法の開発と導入機構の解明を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ベクター構築：最適な in vivo での投与条件の検討の為のベクター設計のため、血清を用いた簡便な長期遺伝子発現の評価法の確立を行った。すなわち、attB サイトを含み分泌型タンパクの Gaussia luciferase (GLuc) を発現する pDNA の構築 (pORF-GLuc/attB) による血清の経時的なサンプリング系の確立を目指す。この方法では、使用するマウスの数を減らし、かつ、高感度な評価が可能にな

る。また、線維性疾患治療のための hHGF を発現し attB サイトを含み hHGF を発現する pDNA の構築 (pORF-hHGF/attB) も行った。

(2) 遺伝子導入法：pDNA は、ハイドロダイナミクス法 (Gene Ther., 6 (7),1258-66, 1999) あるいは組織押圧核酸導入法 (Biochem Biophys Res Commun, 372 (3), 383-387, 2008, Hum Gene Ther., 20 (10), 1157-67, 2009) により、マウス肝臓あるいは腎臓へ導入した。さらに、組織押圧核酸導入法の原理を応用した腎臓などの腹腔内臓器への新規デバイスとして、腹腔内視鏡先端に搭載可能な組織吸引デバイスを新たに開発した。

(3) マウスを用いた長期遺伝子発現ならびに薬理効果の評価：

①Gluc の評価：マウスにハイドロダイナミクス法で phiC31 integrase 発現ベクターである pCMV-int と pORF-Gluc/attB を様々な比率で混合し、共投与を行った。その後、経時的にマウス血清のサンプリングを行い、血清中 GLuc 活性の測定を行った。

②組織押圧核酸導入法ならびに吸引法の評価：マウスを開腹し、pCMV-Luc をマウス尾静脈投与後速やかに、圧力制御デバイスを用いて腎臓を  $0.59 \text{ N/cm}^2$  の力で押圧した。その後各臓器をホモジナイズし、各臓器における Luc 活性の測定をおこなった。同様の方法で蛍光標識 pCMV-Luc の腎臓での分布、あるいは、腎臓での転写因子の活性化の評価も併せて行った。また、組織吸引デバイスを作成し、組織押圧核酸導入法と同様の手順で、各臓器における Luc 活性の評価を行った。

③線維性疾患への治療効果の評価：治療効果は、上記、Gluc の実験で最適化された投与条件を用いて、pCMV-int と pORF-hHGF/attB の投与を行った。その後、四塩化炭素の腹腔内への繰り返し投与により作製した肝線維症モデルマウスでの、数種類の線維化マーカーの mRNA 量の測定及び Azan 染色により評価した。

## 4. 研究成果

Gluc は分泌性タンパク質であるため、ハイドロダイナミクス法で肝臓に導入された場合、血清の Gluc 定量により遺伝子導入を同一個体により評価することができる。ハイドロダイナミクス法により各 pDNA をマウス肝臓へ導入し、血清中 Gluc 量を測定したところ、120 日間に渡る安定した遺伝子発現の持続が認められた。最も高い遺伝子発現を維持したのは、 $25 \mu\text{g}$  pORF-GLuc/attB と  $10 \mu\text{g}$  pCMV-int を共投与した場合であった。この投与条件において、Gluc 遺伝子がマウス染色体上の pseudo attP サイトに組み込まれていることを確認し、phiC31 integrase 発現 pDNA による長期遺伝子発現の最適な投与条件の構築に成功した。

次に、Gluc 長期遺伝子発現系で得られた最適条件をもとに、HGF 長期発現による肝線維症の治療の評価を試みた。次に、hHGF 発現プラスミド (pORF-hHGF/attB) を構築した。先に最適化された条件 5  $\mu$ g pORF-hHGF/attB と 10  $\mu$ g pCMV-int で投与したところ、肝臓における hHGF の発現持続化が認められ、また、この条件下 hHGF がマウス肝臓におけるゲノム DNA 上の pseudo attP 配列への組み込まれていることも確認した。これらの知見は、Gluc で得られたものと良く一致するものである。そこで、肝線維症に対する治療効果の薬理的評価を行った。その結果、肝線維症モデルマウスでは、対照と比較して HGF の維持発現量がやや低かったものの、HGF 長期発現による線維化抑制の傾向が、線維化マーカーの mRNA 量及び Azan 染色から確認された。以上、HGF の肝臓への長期遺伝子発現により、肝線維症に対する治療効果を示す可能性が示された。一方で、肝線維症の完治はみられなかったことから、効果的な治療を行うためには、遺伝子発現レベルを向上させるための DDS 技術開発が必要であることが強く示唆された。

次に、組織圧核酸導入法における naked 核酸導入メカニズムのマウス腎臓への取り込みや転写への影響に関する評価を行った。通常は、静脈内投与直後に組織圧を行うが、ここでは組織圧の時間を投与前-60、-30、-20、-10、0,+180 秒と変化させて遺伝子発現の解析を行った。-60、-30、-20 秒ではブランクレベルであり、-10 秒では僅かに遺伝子発現が認められた。一方で、投与直後である 0 秒と +180 秒では顕著に高い遺伝子発現が認められた。これは、腎臓への組織圧により pCMV-Luc の細胞内取り込みが約 10 秒以内というごく短時間の間亢進され、押圧された組織・細胞内へ取り込まれていることを示唆するものである。蛍光標識 pCMV-Luc を用いて腎臓組織切片で評価を行ったところ、押圧した腎臓において高い蛍光が観察され、押圧により pCMV-Luc の腎臓内への取り込みが亢進されていた。この知見は、先ほどの遺伝子発現から推察された膜透過性亢進を支持するものである。10 秒というごく短時間での膜透過亢進は、安全な核酸導入法としては優れた特性を有していると考えられる。今回は約 1 秒、1 回の組織圧による遺伝子導入であるが、i) 押圧スピードや回数、ii) naked 核酸の投与量や安定性、iii) 点滴投与選択等の最適化により、遺伝子導入効率の改善が期待できる。一方、ハイドロダイナミクス法による高い遺伝子発現メカニズムの一つに肝臓での転写因子 AP-1 や NF $\kappa$ B の活性化が寄与している事が報告された (Hum. Gene Ther., 19(10), 1009-1020, 2008)。そこで、押圧した腎臓での転写因子 AP-1 や NF $\kappa$ B を評価したと

ころ、組織圧においても転写因子 AP-1 や NF $\kappa$ B の活性化が認められ、このような転写因子活性化が、効率的な遺伝子発現に寄与している可能性が示された。これらの知見は、組織圧法による遺伝子導入メカニズムの一端を示すものであり、組織圧を利用した最適な遺伝子導入法開発に向けて有益な基礎的情報となると考えられる。

一方、組織圧法では、0.59 N/cm<sup>2</sup>の組織圧により形状が変形しやすい腎臓、肝臓、脾臓へ効果的に遺伝子導入される一方で、同じ押圧力で形状が変化しにくいマウス皮下に移植した固形がんや筋肉への押圧ではほとんど遺伝子発現が確認されなかった。この知見は、組織圧による組織変形が一過的な細胞膜での変化を引き起こし、その結果として naked pDNA が細胞内へ取り込まれていることを示唆している。そこで、腹腔内視鏡などを利用して組織吸引デバイスを腹腔内に挿入させ、組織吸引を行い、形状を軽く変形させることで吸引部位への遺伝子が導入されるのではないかと考えた。このような背景のもと、新しいシリコン製の組織吸引デバイスの開発を行った。本デバイスは腹腔内視鏡先端に搭載できるよう設計できるため、腹腔内臓器への naked 核酸による遺伝子導入を可能とすることができる。組織吸引を行った結果、組織吸引した腎臓、心臓、肝臓、脾臓への naked 核酸による吸入部位への高効率な遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

以上、これらの phiC31 インテグラーゼ発現ベクターや臓器特異的な核酸導入法は、長期的な標的臓器での遺伝子発現制御を通じた新規治療法の開発に向けて有益な基礎的知見となることが期待される。

## 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 Yoshiaki Umemoto, Shigeru Kawakami, Yuki Otani, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida: Evaluation of long-term gene expression in mouse liver using phiC31 integrase and hydrodynamic injection, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 査読有, in press
- ② Hidefumi Mukai, Shigeru Kawakami, Haruyuki Takahashi, Yuki Otani, Kyosuke Satake, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida: Key physiological phenomena governing transgene expression based on tissue pressure-mediated transfection in mice, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 33, 2010, 1627-1637  
DOI:doi.org/10.1248/bpb.33.1627

[学会発表] (計 5 件)

- ① 梅本佳昭、川上 茂、樋口ゆり子、山下富義、橋田 充:  $\phi$ C31 インテグラーゼを用いたマウス肝臓での HGF 発現の長期持続化と肝線維症治療効果の評価、日本薬学会 13 年会、北海道大学 (北海道)、2012 年 3 月 31 日
- ② Shigeru Kawakami, Yuki Otani, Hidefumi Mukai, Yoshiaki Umemoto, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida:  $\phi$ C31 integrase-mediated long-term gene expression in the cultured renal cell lines and murine kidney, AMERICAN SOCIETY of GENE & CELL THERAPY (ASGCT) 14th Annual Meeting, シアトル (アメリカ合衆国) 2011 年 5 月 19 日
- ③ 梅本佳昭、川上 茂、大谷祐基、山下富義、橋田 充: *Gussia luciferase* を用いた  $\phi$ C31 integrase による in vivo 長期遺伝子発現の簡便な評価法の開発、第 60 回日本薬学会近畿支部会、摂南大学 (大阪)、2010 年 10 月 30 日
- ④ 向井英史、川上 茂、橋田 充: 臓器特異的遺伝子発現制御を目的とする組織押圧核酸導入法の開発と評価、第 60 回日本薬学会近畿支部会、摂南大学 (大阪)、2010 年 10 月 30 日
- ⑤ 梅本佳昭、川上 茂、大谷祐基、山下富義、橋田 充:  $\phi$ C31 integrase による in vivo 長期遺伝子発現の簡便な評価を目的とした分泌型 luciferase 発現 pDNA の構築、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回夏期セミナー、琵琶湖ホテル (滋賀)、2010 年 9 月 1 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 導入対象物質の送達装置の作動方法および導入対象物質の送達方法

発明者: 清水一憲、小西聡、川上 茂、橋田 充

権利者: 京都大学、立命館大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-238885

出願年月日: 2010 年 10 月 25 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds\\_Home/index.htm](http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm)

アウトリーチ活動:

2010 年 12 月 18 日第 10 回・物質—細胞統合システム拠点 (iCeMS) カフェ: “体の中の宅急便”で一般市民を対象として、研究成果の解説をおこなった。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 茂 (SHIGERU KAWAKAMI)

京都大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号: 20322307

(2) 研究分担者

橋田 泰彦 (YASUHIKO HASHIDA)

京都大学・物質—細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号: 30512462

(3) 連携研究者

該当なし