

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659813

研究課題名(和文)加齢黄斑変性症を標的とした新規遺伝子治療技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel gene therapy targeting age-related macular degeneration

研究代表者

佐々木 均(Sasaki, Hitoshi)

長崎大学・大学病院・教授

研究者番号：00170689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性症に対する安全で高効率の新規遺伝子ベクターを開発した。pDNA、ポリエチレンイミン(PEI)、 γ -ポリグルタミン酸(PGA)あるいはコンドロイチン硫酸(CS)を最適混合比で調製し、ナノ粒子(pDNA-PEI複合体、pDNA-PEI-PGA複合体、pDNA-PEI-CS複合体)を構築した。PGA複合体およびCS複合体はPEI複合体で認められた細胞毒性や硝子体凝集を示さず、高い遺伝子発現効果を示した。siRNA、PEI、 γ -PGAを組み合わせたsiPGA複合体も構築した。siPGA複合体は市販ベクターで認められた細胞毒性を示さず、高い遺伝子抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the safe and efficient novel ocular gene delivery system to the age-related macular degeneration. We successfully prepared the stable nanoparticles (pDNA-PEI complex: PEI complex, pDNA-PEI-gamma-PGA complex: PGA complex, pDNA-PEI-CS complex: CS complex) by optimization of the mix ratio. The PGA complex and CS complex showed high gene expression comparable to PEI complex. While PEI complex showed severe agglutination of vitreous body and cytotoxicity, PGA complex and CS complex showed no agglutination of vitreous body and no cytotoxicity. We also developed siRNA-PEI-gamma-PGA (siPGA complexes). The siPGA complexes showed high silencing effect comparable to commercial vector (lipofectamine) without cytotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：加齢黄斑変性症 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症は米国をはじめとする欧米先進国において、成人の失明原因の第一位であり、国民の注目度も高い眼疾患である。日本国内においても本症の発生頻度は増加傾向にあり、日本での患者数はおよそ 43 万人、そのうち予後不良の滲出型は患者数がおよそ 33 万 4000 人と推定されている。近年、加齢黄斑変性症の発症に血管新生因子である VEGF が深く関与していることが明らかとなり、転移性大腸癌の治療薬として開発された抗 VEGF 抗体である Avastin の眼球内局注療法が著効することが報告された。この報告を契機に加齢黄斑変性症の治療は大幅に進展し、現在では抗 VEGF 抗体 Fab 断片である Lucentis や VEGF 中和アプタマーである Macugen が開発され、高い有用性が確認されている。

このように、加齢黄斑変性症の治療法は現在めざましく進展しており、この他にも様々な治療技術が研究されている。このうち、遺伝子治療は次世代の治療技術として注目を集め、さらに近年の siRNA の発見により遺伝子欠損症だけでなく、様々な疾患への応用が期待されている。加齢黄斑変性症においても例外なく、VEGF を標的とした siRNA によって、高い治療効果が期待できる。しかし、眼球内への遺伝子導入技術は未だ確立しておらず、安全かつ効果的に眼球内に遺伝子を導入できる遺伝子ベクターの開発が急務である。

2. 研究の目的

加齢黄斑変性症などの高齢者に増加する特有の眼科疾患に対し、現在新しい治療法や生物製剤が数多く開発されている。遺伝子製剤も高い治療効果が期待される医薬品のひとつであるが、既存の遺伝子ベクターは遺伝子導入効率が低く、さらに硝子体の白濁や網膜障害を引き起こすなど問題点も多い。

これまでに、我々は遺伝子と生体適合性の数種の化合物を静電的に自己組織化させる新しい技術（薬物送達複合体、特願 2008-224118、特願 2010-43186）を用いることで、安全かつ効果的に網膜へ遺伝子を導入できる新たな遺伝子ベクターを開発した。そこで、本研究ではこの画期的な新規遺伝子ベクターを用いて、加齢黄斑変性症の新たな治療技術の構築を行う。

3. 研究の方法

(1) モデル pDNA として、ヒトサイトメガロウイルス(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。pDNA と polyethylenimine (PEI) を結合させ、カチオン性の複合体 (PEI 複合体) を作製した。さらに chondroitin sulfate (CS)、 γ -polyglutamic acid (γ -PGA) などのアニオン性化合物を用いてカチオン性の複合体を静電的に被膜し、アニオ

ン性の新規遺伝子ベクターを構築した。各複合体の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定した。また、アガロースゲル電気泳動により複合体の安定性を評価した。

(2) ヒト網膜由来細胞 ARPE-19 細胞を用いてトランスフェクションを行い、各複合体の遺伝子発現効率を評価した。また、WST-1 assay により細胞障害性も検討した。

(3) 日本白色家兎から眼球を摘出し、硝子体を抽出した。各複合体を硝子体と混合し、凝集を測定した。

(4) pCMV-Luc を含んだ各複合体を硝子体内投与し、24 時間後に眼球を摘出後、網膜中の遺伝子発現量を測定した。

(5) ルシフェラーゼに対する siRNA (siLuc)、PEI、 γ -PGA を様々な比率で混合し、siLuc-PEI 複合体 (siPEI 複合体) および siLuc-PEI- γ -PGA 複合体 (si γ -PGA 複合体) を調製した。各複合体の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定した。また、アガロースゲル電気泳動により複合体の安定性を評価した。

(6) ルシフェラーゼ恒常発現 B16F10 細胞 (B16F10-Luc) を用いてトランスフェクションを行い、各複合体の遺伝子発現抑制効果を評価した。

4. 研究成果

pDNA と PEI の電荷比が 1:8 の pDNA-PEI 複合体 (PEI 複合体) を調製し、さらに pDNA と γ -PGA あるいは CS の電荷比が 1:6 となるように PEI 複合体と γ -PGA あるいは CS を混合し、pDNA-PEI- γ -PGA 複合体 (γ -PGA 複合体) および pDNA-PEI-CS (CS 複合体) を調製した。各複合体の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定した結果、 γ -PGA 複合体および CS 複合体ともに、ナノサイズの安定なアニオン性微粒子を構築することができた。また、アガロースゲル電気泳動を用いて安定性を評価した結果、 γ -PGA 複合体における pDNA の流出は認められず、安定に pDNA を内包していることが示された。

ARPE-19 細胞を用いて、各複合体の遺伝子導入効率を評価した。その結果、 γ -PGA 複合体および CS 複合体は PEI 複合体に匹敵する高い遺伝子発現を示した。また、 γ -PGA 複合体および CS 複合体は PEI 複合体で認められた細胞傷害性を示さなかった。

また、PEI 複合体では強い硝子体凝集が観察されたのに対し、 γ -PGA 複合体および CS 複合体では観察されなかった (図 1)。各複合体を日本白色家兎に硝子体内投与し、24 時間後の網膜中の遺伝子発現量について定量解析した。PEI 複合体、 γ -PGA 複合体および CS

複合体のいずれも高い遺伝子発現効果を示した(図2)。

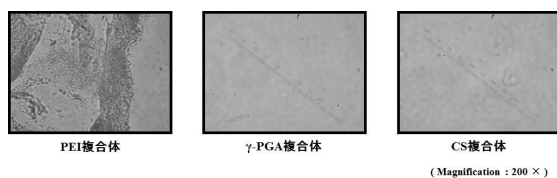


図1 各複合体による硝子体凝集

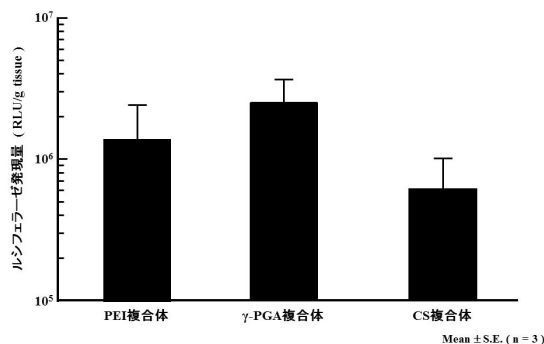


図2 各複合体を硝子体内投与後の遺伝子発現量

モデルとしてホタルルシフェラーゼに対する siRNA と PEI、 γ -PGA を最適な混合比およびプロセスで調製することで、siRNA-PEI- γ -PGA 複合体 (si γ -PGA 複合体) の作製に成功した。製剤学的検討により最適化した si γ -PGA 複合体をルシフェラーゼ恒常発現メラノーマ細胞 B16-F10-Luc 細胞に添加し、遺伝子抑制効果および細胞障害性について検討した。その結果、si γ -PGA 複合体は市販の遺伝子導入試薬である lipofectamine に匹敵する高い遺伝子抑制効果を示した。また、si γ -PGA 複合体は lipofectamine で認められた細胞毒性を示さなかった。

以上のように、我々は本研究によって、 γ -PGA 複合体および CS 複合体が高い遺伝子導入効率と安全性を兼ね備えた眼科疾患用遺伝子ベクターになり得る可能性を示した。また、我々の技術は pDNA だけでなく siRNA にも適応可能であることを明らかにした。今後は、モデル動物を用いた遺伝子抑制効率および薬理効果の評価を引き続き行っていく予定である。

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)

Kurosaki T, Kodama Y, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Miyakoda M, Yui K, Sasaki H: Secure splenic delivery of plasmid DNA and its application to DNA vaccine. *Biol Pharm Bull.* 36(11): 1800-6 (2013). 査読有

Kanda K, Kodama Y, Kurosaki T, Imamura M, Nakagawa H, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Honda M, Sasaki H: Ternary complex

of plasmid DNA with protamine and γ -polyglutamic acid for biocompatible gene delivery system. *Biol Pharm Bull.* 36(11): 1794-9 (2013). 査読有

Kurosaki T, Uematsu M, Shimoda K, Suzuma K, Nakai M, Nakamura T, Kitahara T, Kitaoka T, Sasaki H: Ocular gene delivery systems using ternary complexes of plasmid DNA, polyethylenimine, and anionic polymers. *Biol Pharm Bull.* 36(1):96-101 (2013). 査読有

Kurosaki T, Higuchi N, Kawakami S, Higuchi Y, Nakamura T, Kitahara T, Hashida M, Sasaki H: Self-assemble gene delivery system for molecular targeting using nucleic acid aptamer. *Gene.* 491(2): 205-9 (2012). 査読有

Kurosaki T, Yamashita Y, Aki K, Harasawa H, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Secure and effective gene vector of polyamidoamine dendrimer pharmaceutically modified with anionic polymer. *J Pharm Sci.* 100(11): 4855-63 (2011). 査読有

Kurosaki T, Morishita T, Kodama Y, Sato K, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Hamamoto T, Sasaki H, Kitahara T: Nanoparticles electrostatically coated with folic acid for effective gene therapy. *Mol Pharm.* 8(3): 913-9 (2011). 査読有

[学会発表](計10件)

西垣 和香、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: 樹状細胞標的型ナノデバイスを用いたマラリア DNA ナノワクチンの開発、第30回日本薬学会九州支部大会、佐世保、2013年12月8日

塩川 裕美、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: Dendrigrift poly-L-lysine を用いた生体内分解型遺伝子ベクターの開発、日本薬学会第28年会、名古屋、2013年5月25日

矢次 結衣子、兒玉 幸修、大久保 智佳子、北原 隆志、佐々木 均: ポリヌクレオチド被膜型複合体による脾臓指向性新規遺伝子ベクターの開発、日本薬学会第28年会、名古屋、2013年5月25日

兒玉 幸修、北原 隆志、江頭 かの子、中嶋 幹郎、樋口 則英、中村 忠博、佐々木 均: Fetuin 被膜型複合体による新規遺伝子ベクターの構築、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28日

塩川 裕美、兒玉 幸修、原内 智慧、北原 隆志、佐々木 均: 静電的自己組織化を基盤としたアニオン性 siRNA ベクターの開発、第29回日本薬学会九州支部大会、熊本、2012年12月8日

佐々木 均、兒玉 幸修、黒崎 友亮、樋口 則英、北原 隆志、中村 忠博: 安全かつ効果的な眼疾患用新規遺伝子ベクターの開発、第32回日本眼薬理学会、滋賀、2012年9月15日

大久保 智佳子、仲宗根 ちひろ、黒崎 友亮、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: ホスファチジルセリンアナログを用いた脾臓

指向性遺伝子導入ベクターの開発、日本薬剤学会第27年会、神戸、2012年5月24日

原内 智慧、川鍋 早紀、黒崎 友亮、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：肝細胞選択的なグリチルリチン含有遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第27年会、神戸、2012年5月24日

兒玉 幸修、黒崎 友亮、江頭 かの子、中嶋 幹郎、中川 博雄、樋口 則英、中村 忠博、北原 隆志、佐々木 均：制癌剤と遺伝子同時送達を目的としたメトトレキサート被膜型遺伝子ベクターの開発、日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月31日

Yukinobu Kodama, Tomoaki Kurosaki, Kanoko Egashira, Tadahiro Nakamura, Takashi Kitahara, Hitoshi Sasaki: Polyplex of pDNA with poly-L-lysine, poly-L-histidine, and γ -polyglutamic acid for biocompatible gene delivery system, 日本薬物動態学会第26回年会、広島、2011年11月17日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：薬物送達複合体
発明者：佐々木 均、黒崎 友亮、北原 隆志、藤 秀人
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第5382682号
取得年月日：平成25年10月11日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 均 (Hitoshi Sasaki)
長崎大学・病院・教授
研究者番号：00170689

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし