

機関番号：32680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700564

研究課題名(和文) 酸性多糖で被覆したDNA複合体微粒子を内包した生分解性持続型遺伝子治療剤の創製

研究課題名(英文) Preparation of novel durable gene expression system comprising biodegradable device containing DNA complex particles coated by acidic polysaccharides

研究代表者

伊藤 智子 (Ito, Tomoko)

武蔵野大学・薬学研究所・客員研究員

研究者番号：80372910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アルギン酸水溶液にヒアルロン酸で被覆したDNA複合体を混合することで自己硬化型核酸徐放剤の創製を試みた。

ヒアルロン酸で被覆したDNA複合体微粒子を、アルギン酸水溶液中に懸濁して生体内に投与すると、投与部位でゲルが形成された。得られたゲルは生体内で徐々に分解された。さらに低結晶性のリン酸カルシウム(ACP)を予め加えることで、ゲルの分解およびDNA複合体放出の速度が制御された。免疫活性化遺伝子を用いて調製したDNA複合体とACPを含んだアルギン酸水溶液を、担ガンマウスの傍腫瘍に投与したところ、非常に高い治療効果を示した。これらは、注射可能な長期発現型核酸徐放剤としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared the durable gene expression systems using injectable auto-forming alginate gel including DNA complexes coated by hyaluronic acid. When the alginate solution including the finely dispersed DNA complexes coated with hyaluronic acid was injected in a living body, a gel was formed in the injected site. The gel continuously degraded in a tumor tissue. The rate of gel-degradation and release of the DNA complexes could be controlled by addition of amorphous calcium phosphate (ACP). When the alginate solution containing the DNA complexes with cytokine-gene and ACP was injected close to the tumor tissue of the mice, the formulation showed high therapeutic effect. It is expected for applications as an injectable sustained-gene expression device.

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：遺伝子治療 放出制御 ナノバイオ材料

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の30%は癌である。免疫療法等の進歩にもかかわらず生存率の著明な改善には至っていない。一方、癌が遺伝子異常で発生することから、遺伝子治療が注目され、過去19年間臨床研究が行われてきた。治療用DNAを癌細胞に導入するため、ウイルスをベクター(運び屋)として用いた臨床試験が試みられた。しかしウイルスは抗体による不活化や、毒性が問題となり、効果的な治療は難しい。そこで、ウイルスに代わる安全なベクターとして、プラスミドDNAとポリカチオンとのイオン複合体が注目され、研究されてきた。しかし、これらは、培養細胞では高い発現を示すが、動物に投与後の生体内での発現は極めて低い。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、天然ポリアニオンであるヒアルロン酸をDNA/ポリカチオン複合体に加えると、その表面を被覆し、電荷をシールドして生体成分との副作用を低減することを見出した。さらに我々は、ヒアルロン酸で被覆したDNA複合体は様々な特長を有し、腫瘍選択的な遺伝子の高発現を導くことを確認した。

また、DNA複合体は、*in vivo*で用いる高濃度条件では急速に凝集する。複合体のサイズは、効率よいデリバリーに重要であるにもかかわらず、これまで解決法が無かった。我々は、ヒアルロン酸がDNA/ポリカチオン複合体に保護コロイド的に働いて分散を安定化し、凍結乾燥後も再水和すると細かな分散体が再生し、高い発現活性を維持することを見出した。そして凍結乾燥・再水和の過程を経て、世界中で強く所望されていた極微細(直径約70 nm)なDNA複合体の濃厚液を得ることに初めて成功した。免疫活性化サイトカインGM-CSF遺伝子をコードしたDNAを用いて、これらの技術により調製した超微粒子複合体は、担癌マウスの腫瘍内に一日おき5回の投与によって劇的な治癒効果を示し、直径5mmの腫瘍を完全消失させた。しかし、完治させるには複数回の投与が必要であり、単回投与では再びリグロースした。臨床的には複数回の投与は部位によってはしばしば困難である。そこで、臨床応用可能な治療効果の高い核酸製剤を開発するためには、単回投与で高い治癒効果の期待されるスロー・リリース・システムの創製が強く望まれた。

薬物を長期にわたって徐々に放出する「スロー・リリース・システム」は、生分解性の固体デバイスを中心に広く研究されてきた。ところがDNA複合体は、一般に分散安定性が極めて悪いため有効な徐放手段がなく、長期安定発現の可能な製剤の成功例や、放出挙動を自在に制御した報告例がなかった。

一方我々は、ヒアルロン酸などのアニオン性天然多糖で被覆したDNA複合体が、極めて分散安定性が良く、様々な徐放担体中でも安定に発現活性を保ったままで分散し続ける

ことを見出した。これらのDNA三元複合体を我々の開発した生分解性自己硬化型アパタイトセメントに内包し、担ガンモデルマウスに投与すると、生体内でデバイスが分解し、DNAが経時的に放出され、一回の投与で非常に高い治癒効果を示した。しかし、アパタイトセメントの減少率が低いマウスにおいては全く効果が見られなかった。埋め込んだ、DNA複合体の放出量が不十分であったと思われる。より再現性良く、スムーズな放出が得られる担体の開発の必要性が示唆された。

2. 研究の目的

徐放型製剤は遺伝子治療の分野でも要望は強い。DNAの発現効率を維持したまま、基材からの自在な放出制御を可能にするためには、DNA複合体の濃厚な超微粒子懸濁液を再現性良く調製し、生分解挙動を制御されたデバイスに安定に分散させることが必要である。上述したように、我々はDNA複合体を酸性多糖で被覆することで凍結乾燥保存ができるほどの非常に安定な粒子で、条件によって極微細(直径約70 nm)なDNA複合体の濃厚液の調製に成功している。

一方、一般的な徐放基材等の固体製剤を用いる場合、投与経路は、切開、移植、縫合といった手順を踏む必要がありQOLの低下を引き起こす。また、部位によっては投与が困難な場合も多い。そこで、注射可能な自己凝固型徐放デバイスが望まれる。本研究では、安全性の高い注射可能な生分解性自己会合型ゲルと非晶質リン酸カルシウム(ACP)を組み合わせることで、デバイスの分解速度を緻密に制御し、さらに分散性の良い酸性多糖被覆DNA複合体を内包させることで、自在な放出制御を図り、患者に負担を与えない、より治癒効果の高い注射型核酸徐放製剤を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA複合体超微粒子の調製

希薄条件下で調製したDNA/ポリエチレンジアミン(PEI)/ヒアルロン酸超微粒子を凍結乾燥・再水和してDNA複合体超微粒子濃厚液を調製した。

(2) DNA複合体超微粒子を内包した非晶質リン酸カルシウム含有自己会合型デバイスの調製

自己会合型デバイスとしてアルギン酸ゲルを用いた。粉末状のACPは、塩化カルシウムとリン酸水素ナトリウムの混合水溶液を氷浴中で水酸化ナトリウム水溶液に滴下することで得た。アルギン酸水溶液にDNA複合体とACPを様々な割合で混合した。

(3) アルギン酸ゲルの分解挙動

酢酸緩衝液(pH4.5)、トリス塩酸緩衝液(pH7.4)中でのアルギン酸ゲルの分解挙動を評価した。また、ACPを含有したアルギン酸ゲルについても同様に評価した。

(4) アルギン酸ゲルのpH応答性の評価

酢酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液中でのアルギン酸ゲル、または ACP を含有したアルギン酸ゲル内の pH を測定した。

(5) *In vitro* でのアルギン酸ゲルからの DNA 放出挙動の評価

YOYO で蛍光標識した DNA 複合体超微粒子を内包したアルギン酸ゲルからの DNA 複合体の放出挙動を酢酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液で評価した。

(6) 担ガンマウスでのアルギン酸ゲルの分解挙動の評価

マウスメラノーマ細胞 B16 をマウスの皮下に移植して担癌マウスを作製した。DNA 複合体と ACP を含有したアルギン酸水溶液にバリウムを添加し、腫瘍組織近傍に投与した。体内で形成したアルギン酸ゲルの分解挙動を X 線 CT で解析した。

(7) 担ガンマウスを用いた腫瘍の治癒効果
免疫活性化遺伝子を用いて調製した DNA 複合体含有アルギン酸水溶液を腫瘍内（または腫瘍近傍）に投与し、治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) pH によるアルギン酸ゲルの分解挙動

我々はアルギン酸水溶液を生体内に注射投与すると生体内のカルシウムイオンによって投与部位でゲル化することを報告している。そこで、*invitro* の実験で用いるアルギン酸ゲルは、生体内と同じカルシウム濃度を持つ疑似体液（SBF）を用いて、透析膜に添加したアルギン酸水溶液を SBF に浸漬させることで調製した。

アルギン酸ゲルは酸性条件下で分解・溶解することが知られている。そこで、アルギン酸ゲルにカルシウム供給材である ACP を混合し、ACP によるゲルの分解挙動への影響を pH7.4 のトリス塩酸緩衝液および pH4.5 の酢酸緩衝液を用いて評価した。SBF 中で得られたソフトなアルギン酸ゲルは、トリス塩酸緩衝液中では ACP の有無に関わらずほとんど分解しなかった。一方、酢酸緩衝液中では、ACP を含有していないゲルは分解速度が速く、1 晩で約 30% も分解・溶解した。ACP の含むゲルは、分解速度が遅く、ゆっくり溶解した（図 1）。

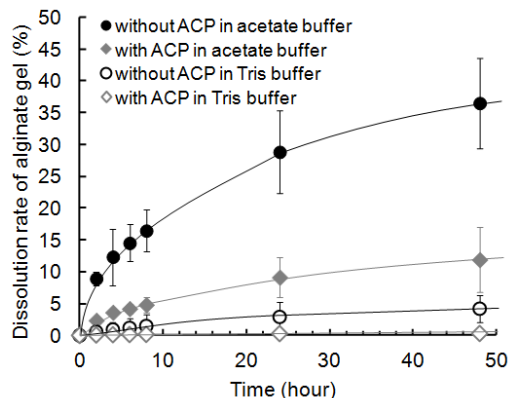


図 1 酢酸緩衝液中、またはトリス塩酸緩衝液中でのアルギン酸ゲルの分解挙動

次に、酢酸緩衝液に浸漬させたゲル内の pH を測定した。ACP を含んでいないアルギン酸ゲルは浸漬後 2 時間で緩衝液と同じ pH4.5 まで低下したが、ACP を含有したゲルは 4 時間後も pH が完全に下がりきることはなかった（図 2）。これらのことから、ACP はアルギン酸ゲルのカルシウムの供給材としてだけでなく、緩衝効果も併せ持ち、ゲルの分解速度を抑制させたものと考えられる。

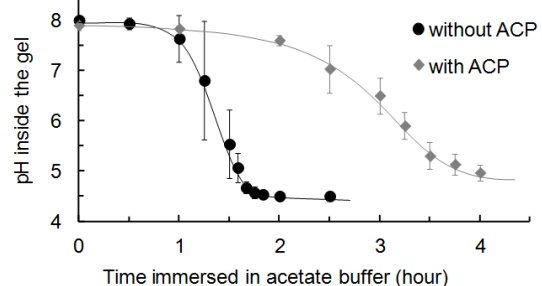


図 2 酢酸緩衝液中における ACP 含有アルギン酸ゲルの pH 変化

(2) アルギン酸ゲルからの DNA 複合体の放出挙動

凍結乾燥濃縮によって得られたヒアルロン酸被覆 DNA 複合体を ACP 含有アルギン酸ゲルに内包し、酢酸緩衝液中での DNA 複合体の放出挙動を調べた。ACP の含まれていないゲルでは初期バーストが見られ、2 時間で 20% 以上の DNA 複合体が放出された。その後 3 日間にかけてゆっくり放出し、約 40% まで放出された後ほとんど放出されなかった。アルギン酸と DNA 複合体が副反応を起こし、DNA 複合体を抱き込んだままアルギン酸ゲルが分解したと考えられる。一方、ACP を含有したゲルからは、DNA 複合体が長期間にわたってスムーズに放出され、その放出速度は ACP の含有量に依存した（図 3）。また、放出された DNA 複合体は凝集することなく分散を保っていることが蛍光顕微鏡で観察された。さらに、DNA の切断等の損傷がないことが電気泳動によって確認された。

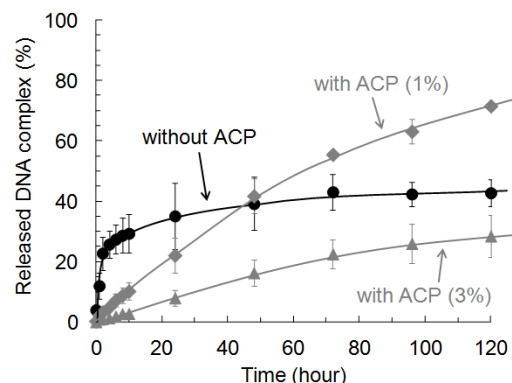


図 3 酢酸緩衝液中でのアルギン酸ゲルからの DNA 複合体の放出挙動

(3) 担ガンマウスでのアルギン酸ゲルの分解挙動

腫瘍組織中は pH が低いことが知られており、生体内で形成したアルギン酸ゲルは、腫瘍組

織内の弱酸性環境下で徐々に分解されることが期待される。そこで、バリウムで可視化した ACP 含有アルギン酸ゲルの皮下腫瘍モデルマウスでの分解挙動を X 線 CT により評価した。ACP の含有したゲルは投与から 6 週間経過しても 40%以上の残存が見られた。一方、ACP の含まないゲルは 90%以上が分解され、ゲルは腫瘍組織内（近傍）にほとんど残っていなかった（図 4）。これらのことから、アルギン酸ゲルに ACP を含有させることで腫瘍組織での分解速度も制御できることが認められた。

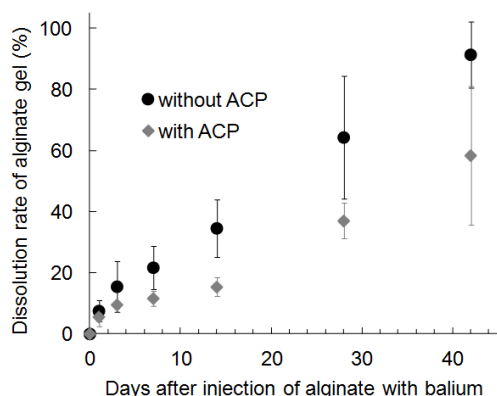


図 4 傍腫瘍での ACP 含有アルギン酸ゲルの分解挙動

(4) DNA 複合体を内包した ACP 含有アルギン酸ゲルの担ガンマウスへの治癒効果

免疫活性化遺伝子をコードしたプラスミド複合体と ACP を含んだアルギン酸水溶液を調製し、皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍内（腫瘍近傍）に投与した。ゲルに内包していない DNA 複合体は投与から 1 週間、抗腫瘍効果を示したが、その後腫瘍が再成長した。一方、ACP 含有アルギン酸ゲルに内包した DNA 複合体を投与した群では、5 匹中 2 匹はほとんど効果が見られなかった。DNA の放出よりも腫瘍の成長速度が速く、放出した DNA 量が足りなかったものと示唆される。一方、高い治癒効果を示した 3 匹では、3 週間くらいはゆっくり腫瘍が成長したが、その後徐々に腫瘍が縮小し、6 週間後には腫瘍がほとんど消失した。これらのマウスは、100 日間観察したが、再発は見られなかった（図 5）。これらは、腫瘍内で凝固したアルギン酸ゲルは徐々に分解し、DNA 複合体が徐放されることで治療効果が持続したためと考えられる。

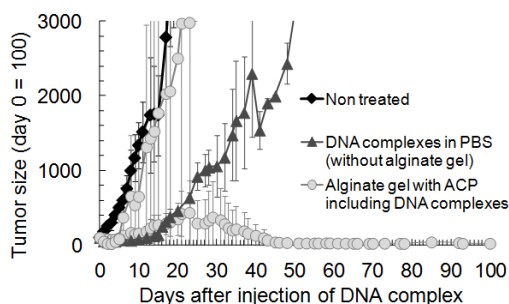


図 5 DNA 複合体を内包した ACP 含有アルギン酸ゲルの抗腫瘍効果

以上のように、DNA 複合体微粒子を内包した ACP 含有アルギン酸ゲルは、注射可能な長期発現型核酸徐放製剤としての応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

J. Chou, T. Ito, M. Otsuka, B. Ben-Nissan, B. Milthorpe, The Effectiveness of the Controlled Release of Simvastatin from β -TCP Macrosphere in the Treatment of OVX Mice, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読有, in press, DOI: 10.1002/term.1784

T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, Preparation of Calcium Phosphate Nanocapsule Including DNA/PEI/hyaluronic acid Ternary Complex for Durable Gene Delivery, Journal of Pharmaceutical Sciences, 査読有, 103, 2014, 179-184, DOI: 10.1002/jps.23768

T. Ito, RZ. LeGeros, M. Takemasa, Y. Tokudome, T. Uchino, A. Ito, M. Otsuka, Effect of calcium phosphate compound (MZP-CaP) with and without fluoride in preventing bone loss in ovariectomized rats, International Journal of Drug Delivery, 査読有, 5, 2013, 412-419, <http://www.arjournals.org/index.php/ijdd/article/view/1088>

T. Ito, M. Otsuka, Application of calcium phosphate as a controlled release device, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 36, 2013, 1676-1682, DOI: 10.1248/bpb.b13-00383

J. Chou, T. Ito, M. Otsuka, B. Ben-Nissan, B. Milthorpe, The Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic Macrospheres, Key Engineering Materials, 査読有, 529, 2013, 461-464, DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.461

J Chou, T Ito, D Bishop, M Otsuka, B Ben-Nissan, B. Milthorpe, Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic β -TCP Drug Delivery System, PLoS ONE 8, 査読有, e54676, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0054676

T Ito, M Takemasa, K Makino, M. Otsuka, Preparation of calcium phosphate nanocapsule including simvastatin/deoxycholic acid assembly,

and their therapeutic effect in osteoporosis model mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 査読有, 65, 2013, 494-502, DOI: 10.1111/jphp.12008
J. Chou, T. Ito, M. Otsuka, B. Ben-Nissan, B. Milthorpe, Simvastatin Loaded -TCP Drug Delivery System Induces Bone Formation and Prevents Rhabdomyolysis in OVX Mice, *Advanced Healthcare Materials*, 査読有, 2, 2013, 678-681, DOI: 10.1002/adhm.201200342
T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, DNA complex-releasing system by injectable self-setting apatite cement, *The Journal of Gene Medicine*, 査読有, 14, 2012, 251-261, DOI: 10.1002/jgm.2613
T. Ito, M. Saito, T. Uchino, M. Senna, M. Iafisco, M. Prat, L. Rimondini, M. Otsuka, Preparation of injectable auto-forming alginate gel containing simvastatin with amorphous calcium phosphate as a controlled release medium and their therapeutic effect in osteoporosis model rat, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 査読有, 23, 2012, 1291-1297, DOI: 10.1007/s10856-012-4597-3
M. Iafisco, B. Palazzo, T. Ito, M. Otsuka, M. Senna, J. M. D. Lopez, J. G. Morales, A. Tampieri, M. Prat, L. Rimondini, Preparation of core-shell poly(L-lactic) acid-nanocrystalline apatite hollow microspheres for bone repairing applications, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 査読有, 23, 2012, 2659-2669, DOI: 10.1007/s10856-012-4732-1
K. Hamada, C. Yoshihara, T. Ito, K. Tani, M. Tagawa, N. Sakuragawa, H. Itoh, Y. Koyama, Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary GMCSF plasmid complex for ovarian cancer, *The Journal of Gene Medicine*, 査読有, 14, 2012, 120-127, DOI: 10.1002/jgm.1647

[学会発表](計20件)

Tomoko Ito, Biodegradable Film Swellable to a Bioadhesive Hydrogel for Adhesion Barrier and Hemostatic Device, The 25th European Conference on Biomaterials, 2013年9月9日~10日, Hotel Meliá Castilla, Madrid, Spain
伊藤智子、生体組織接着性をもつ生分解水和ゲルの開発と薬物徐放デバイスへの応用、第29回日本DDS学会学術集会、2013年7月5日、京都テルサ

伊藤智子、DNA三元複合体のサイズと発現効率 - in vitro と in vivo の相違 -、遺伝子・デリバリー研究会 第13回シンポジウム、2013年5月11日、帝京大学板橋キャンパス

伊藤智子、生体接着性水和ゲル形成能を持つ生分解性フィルムの開発と癒着防止材・止血材への応用、日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム2012、2012年11月26日~27日、仙台国際センター

伊藤智子、DNA/PEI/ヒアルロン酸三元複合体の微細構造と転写・発現活性との相関、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012、2012年09月24日~2012年09月26日、仙台市民会館

芳原智恵子、結核菌抗原遺伝子をコードしたプラスミド複合体の調製と動物臨床の応用、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012、2012年09月24日~2012年09月26日、仙台市民会館

伊藤智子、シンバスタチン含有デオキシコール酸ミセルを内包したリン酸カルシウムカプセルの創製と骨粗鬆症治療への応用、第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月4日、札幌コンベンションセンター

伊藤智子、水素結合型高分子コンプレックスを用いた生体適合性薬物徐放担体の開発、第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月5日、札幌コンベンションセンター

芳原智恵子、プロタミン/ヒアルロン酸高分子イオン複合体を用いたサイトカイン徐放システムの創成、第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月4日、札幌コンベンションセンター

Tomoko Ito, Calcium phosphate nanocapsule as durable gene delivery system for plasmid DNA complex, 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012年07月15日~2012年07月18日、Centre des congrès de Québec, Canada

Yoshiyuki Koyama, Novel Antitumor Strategy by Transfection of Plasmids Encoding Pathogenic Antigen- and Cytokine-Genes, the American Society of Gene & Cell Therapy's 15th Annual Meeting, 2012年05月16日~2012年05月19日、Pennsylvania Convention Center, USA

Tomoko Ito, A controlled DNA complex release system comprising injectable auto-forming alginate gel including amorphous calcium phosphate, the American Society of Gene & Cell Therapy's 15th Annual Meeting, 2012年

05月16日～2012年05月19日、
Pennsylvania Convention Center, USA
小山義之、結核菌抗原タンパク遺伝子を用いた免疫治療 - 免疫賦活化機能とガン治療への応用 -、第87回日本結核病学会総会、2012年5月10日、広島国際会議場
伊藤智子、生分解性デバイスを用いたプラスミド複合体徐放システムの創製と抗腫瘍効果、第33回日本バイオマテリアル学会大会、2011年11月21日、京都府民総合交流プラザ 京都テルサ)
伊藤智子、持続型遺伝子発現を目的としたプラスミド複体内包リン酸カルシウムナノカプセルの調製と遺伝子治療への応用、第11回シンポジウム「アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2011」、2011年9月2日、大阪大学 コンベンションセンター
芳原智恵子、PREPARATION OF SMALL PLASMID COMPLEX FOR CANCER THERAPY AND APPLICATION TO MEDIUM ANIMAL CLINICAL STUDY、第17回日本遺伝子治療学会年次学術集会、2011年7月15日～17日、九州大学医学部百年講堂
伊藤智子、ヒアルロン酸被覆型DNA複合体を内包したアパタイトナノカプセルの調製と持続型遺伝子治療への応用、第27回日本DDS学会、2011年6月9日、東京大学本郷キャンパス
Tomoko Ito, Preparation of hydroxyapatite nanocapsule including DNA/PEI/hyaluronic acid ternary complex for durable gene delivery、14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell therapy、2011年5月19日、Seattle, Washington, USA
Chieko Yoshihara, Highly Effective Non-Viral Antitumor Gene Therapy System Comprising Biocompatible Small Plasmid Complex Particles、14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell therapy、2011年5月19日、Seattle, Washington, USA
Yoshiyuki Koyama, Oncolytic Plasmid System, a Novel Antitumor Strategy by Plasmid Encoding Adenovirus Protein、14th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell therapy、2011年5月19日、Seattle, Washington, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智子 (ITO Tomoko)
武蔵野大学・薬学研究所・客員研究員
研究者番号：80372910