

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：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790186

研究課題名(和文) 関節リウマチをモデルとした局所型新規遺伝子医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of novel gene medicine for rheumatoid arthritis

研究代表者

兒玉 幸修 (Kodama, Yukinobu)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50448510

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)：関節リウマチに対して遺伝子と薬物のダブルターゲティングを可能にするデリバリーシステムの開発を行った。pDNA、polyethylenimine (PEI)、MTXの混合比と調製プロセスを最適化することで、ナノサイズの安定な微粒子(MTX複合体)を構築することに成功した。関節リウマチ患者由来滑膜細胞を用いてMTX複合体の遺伝子導入効果を検討した結果、高い遺伝子発現を示した。また、siRNA、PEI、chondroitin sulfate (CS)を組み合わせたCS複合体も構築した。CS複合体は市販ベクターに匹敵する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 novel delivery system which enables delivery of both gene and drugs to rheumatoid arthritis. We successfully prepared the pDNA-PEI-MTX complexes (MTX complexes) by optimization of the mix ratio and preparation process. MTX complexes showed high gene expression in human fibroblast-like synoviocytes from RA patients (HFLS-RA). We also developed siRNA-PEI-CS (CS complexes). CS complexes showed high silencing effect comparable to commercial vector (lipofectamine).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：遺伝子デリバリー 関節リウマチ メトトレキサート コンドロイチン硫酸

1. 研究開始当初の背景

近年、分子生物学の飛躍的な進歩によって関節リウマチ(RA)の病態形成に重要な分子が明らかになり、それらを標的とした生物学的製剤が開発された。生物学的製剤の登場は、RA治療の効果を劇的に向上させたが、十分な治療効果を得られない症例もあり、新たな治療法として遺伝子治療が期待されている。なかでもRNA干渉を誘導するsiRNAやsiRNA発現pDNA(psiRNA)は、遺伝子発現レベルでの炎症や増殖の抑制が可能であること、活性が非常に高いこと、さらに標的分子に対する特異性も高いことから、医薬品として注目されている。

しかし、siRNAやpDNAは細胞内取り込みが低く、生体内で速やかに分解されるため、医薬品開発をする上で大きな障壁になっている。これまでに、電気パルスや超音波などの物理的刺激の利用や各種高分子と複合体を形成させたナノ粒子製剤の開発など、多岐に渡ってsiRNAの医薬品化を目指した技術研究が行われているが、実用的な方法は開発されておらず、いまだ臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、RAを疾患モデルとして、局所型の新規遺伝子医薬品の開発と技術構築を行う。すなわち、pDNAやsiRNAなどの核酸に数種の物質を添加し、静電的に自己組織化させたCore-Shell型複合体を作成し、医薬品としての有用性を評価するとともに、方法論を確立する。

3. 研究の方法

(1) ホタルルシフェラーゼをコードしたpDNA(pCMV-Luc)あるいはGFPをコードしたpDNAにpolyethylenimine(PEI)、メトトレキサート(MTX)を様々な比率で混合し、pDNA-PEI複合体(PEI複合体)、pDNA-PEI-MTX複合体(MTX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。

(2) マウスメラノーマ細胞株 B16F10 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、MTXや葉酸、各種エンドサイトーシス阻害剤を共存させて、トランスフェクションを行い、複合体の取り込み経路について調査した。

(3) 各複合体を赤血球と混合し、凝集性を評価した。ddY系雄性マウスに各複合体を尾静脈内投与し、6時間後の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現を測定した。

(4) 滑膜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。

(5) ルシフェラーゼに対するsiRNA(siLuc)、PEI、MTXあるいはchondroitin sulfate(CS)を様々な比率で混合し、siLuc-PEI複合体(siPEI複合体)、siLuc-PEI-MTX複合体(siMTX複合体)およびsiLuc-PEI-CS複合体(siCS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MTXの電荷比が1:60, 90, 120, 150, 180となるようにPEI複合体とMTXを混合し、pDNA-PEI-MTX複合体(MTX複合体)を調製した。その結果、MTXの電荷比が120以上で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、MTX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。

B16F10細胞を用いて、MTX複合体の遺伝子導入効率を評価した。その結果、MTX複合体はPEI複合体に匹敵する高い遺伝子発現を示した(図1)。

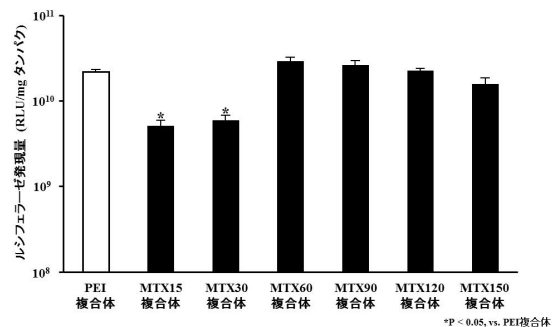


図1 PEI複合体とMTX複合体の遺伝子発現量

また、MTXあるいは葉酸と共存させて遺伝子導入効率を検討した結果、非共存時と比較して有意に遺伝子発現効果は低下した。さらに、各種エンドサイトーシス阻害剤(クロルプロマジン、ゲニステイン、アミロライド)と共存させた結果、ゲニステインと共存させた場合に遺伝子発現効果が有意に低下した。これらの結果より、MTX複合体は葉酸受容体と結合し、カベオラ介在性のエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることが示唆された。

また、PEI複合体では強い赤血球凝集が観察されたのに対し、MTX複合体では観察さ

れなかった。ddY 系雄性マウスに各複合体を静脈内投与し、6 時間後の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現量を測定した。その結果、MTX 複合体の肝臓、脾臓における遺伝子発現量は PEI 複合体と比較して有意に高かった (図 2)。

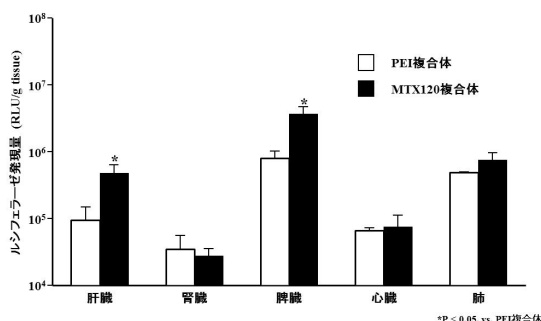


図2 PEI複合体とMTX複合体の各臓器における遺伝子発現

慢性関節リウマチ患者由来ヒト滑膜細胞 (HFLS-RA) を用いて、MTX 複合体の細胞内取り込みおよび遺伝子発現効果を検討した。pDNA、蛍光標識した PEI、および MTX で MTX 複合体を作製し、細胞内取り込みを蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、HFLS-RA においても細胞内取り込みが観察された。また、遺伝子導入効率を検討した結果、HFLS-RA 細胞においても 1×10^8 (RLU/mg protein) を超える高い遺伝子発現を示した。

モデルとしてホタルルシフェラーゼに対する siRNA と PEI、MTX を混合し、siRNA-PEI-MTX 複合体 (siMTX 複合体) の調製を試みた。様々な混合比と調製プロセスにより構築を試みたが、凝集がみられ、ナノサイズの複合体にすることが困難であった。そこで、関節リウマチに有用な被膜成分として、新たに chondroitin sulfate (CS) に着目し、siRNA-PEI-CS 複合体 (siCS 複合体) の構築を試みた。その結果、混合比と調製プロセスを最適化することで CS 複合体を作製することに成功した。製剤学的検討により最適化した CS 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、CS 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、CS 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、MTX 複合体によりメラノーマ細胞および関節リウマチ由来の滑膜細胞へ遺伝子導入が可能であることを明らかにした。また、siRNA 用の遺伝子ベクターとしては CS 被膜型遺伝子ベクターを構築することができた。これらの結果は、関節リウマチをモデルとした局所型新規遺伝子医薬品の開発に有益な基礎的情報であると考えられる。今後は、関節リウマチのモデル動物を作製し、MTX 被膜型遺

伝子ベクターおよび CS 被膜型遺伝子ベクターの有用性について検討を続けていく予定である。

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

Kodama Y, Harauchi S, Kawanabe S, Ichikawa N, Nakagawa H, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Safe and effective delivery of small interfering RNA with polymer- and liposomes-based complexes. *Biol Pharm Bull.* 36(6): 995-1001 (2013). 査読有

Kurosaki T, Kitahara T, Nakamura T, Nishida K, Fumoto S, Kodama Y, Nakagawa H, Higuchi N, Sasaki H: Development of effective cancer vaccine using targeting system of antigen protein to APCs. *Pharm Res.* 29(2): 483-9 (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9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, 日本薬剤学会第 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, 日本薬剤学会第 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

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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

兒玉 幸修 (Yukinobu Kodama)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：50448510

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし