

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590060

研究課題名(和文) 次世代バイオ・ナノ遺伝子ベクターの構築と医療薬学への展開

研究課題名(英文) Nano vectors with biosurfactant MEL-A

研究代表者

中西 守 (NAKANISHI, MAMORU)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90090472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は三名の物理系薬学者がウイルスベクターを使用せずに、次世代ナノ遺伝子ベクターの開発と構築に取り組んだものである。研究はバイオサーファクタント(MEL)を包摂した正電荷リポソームの開発に成功し、遺伝子導入を、安全で導入効率のよい、医療の場でも使用可能にしたものである。研究は医療薬学の推進に大きく寄与すると考えられた。研究の推進過程で得られた諸知見は新時代の医療素材の開発とも密接につながっており物理系薬学の研究の推進に多大の影響を与えると判断された。

研究成果の概要(英文)：The liposomes made by biosurfactant(MEL-A) dramatically increased the efficiency in transfection of plasmid DNAs and foreign DNAs. The efficiency by nano vector is derived from the unique pathway similar to that by certain RNA virus vectors. From the safety and low toxicity the nano vector would appear to be a new operating technique with great potential in gene transfection and drug delivery in medical treatment.

研究分野：生物物理学

キーワード：nano vectors liposome biosurfactant gene transfection medical treatment membrane fusion

1. 研究開始当初の背景

「新薬学教育制度」の下で大学院博士課程(4年制)の研究・教育が24年度から全国一斉にスタートした。物理系薬学の立場から薬学教育・研究に携わって来た研究代表者と研究分担者は新時代の薬学研究が社会の要望に適切に対応したものにするため、各人の独創性高い先端技術を基盤にして次世代の医療薬学を創成・先導し、新時代の薬学研究に貢献しようとした。

具体的には、「次世代バイオ・ナノ遺伝子ベクターの構築と医療薬学への展開」について、領域の異なる3名の物理系薬学研究者(免疫物理・ナノ製剤・画像処理)の特長を基盤に研究を推進し、「RNA干渉」、「免疫神経連関」、「抗原提示」への革新的遺伝子導入技術を確立し医療薬学を先導しようと企画した。

ところで、遺伝子治療は21世紀の主要な医療技術の一つになると期待されていた。癌やエイズの治療にも有効な新世代の医療技術であるとの期待もされた。しかし、「遺伝子治療」は完成された医療技術と考えることには大きな誤りがあった。米国NIH研究所でなされた最初の遺伝子治療の研究(医療)から、既に20数年が過ぎようとしていたが、遺伝子治療の際には病原性ウイルスベクターを用いて疾患患者の治療を行うため、病原性ウイルスによる患者の死亡例などが数々報告されていた。これは、**Tragic setback**(悲劇の再来)という言葉でNature誌にも大きく報道されていた。**Tragic setback**を起こさないためには、全く新しい視点に立った遺伝子ベクターの開発が必要であった。

さて、この20数年間には生命科学の分野ではいくつもの大きな発見がなされた。特にRNAの機能についてである。中でも、Andrew FireとCraig MelloらのRNA干渉(RNAi)の発見である。RNA干渉の考えは遺伝子(プラスミド)や核酸医薬品に代わり、遺伝子治療の問題点に解決の糸口を与える新世代医療の基盤技術になりうる様相が出てきた。Mark Davis等のグループによりナノ粒子を活用しRNA干渉を利用したヒトでの臨床例が報告され、国内外でRNA干渉と医療との関心が高くなっていった。

さらに、2011年のノーベル医学・生理学賞は自然免疫と獲得免疫の研究者に授与された。その中でもロックフェラー大学のRalph Steinman教授の逝去とノーベル賞の授与の発表とが重なりマスコミは大きなニュースとして取り上げた。Steinman教授は樹状細胞によるがん治療を死亡直前まで受けておられた。この樹状細胞による抗原提示能の増強は、血液中の細胞を培養してがん細胞に対する免疫力を高め、がん治療を目指す「樹状細胞ワクチン療法」であり、保険の適用外であったが、抗がん剤のような副作用がほとんどなく、入院も不要な新しい治療法として注目されていた。

2. 研究の目的

本研究は次のように大別できる。

(1) バイオ・ナノ遺伝子ベクターを用いたRNA干渉の制御・促進機構の研究。

バイオ・サーファクタント(MEL)を素材としたナノ遺伝子導入ベクターを調製し、その特性を解明した。旧来の非ウイルスベクターとは明瞭に作用機構が異なり細胞膜との膜融合により迅速に遺伝子を標的細胞に導入するので、この特性は関連分野の研究に莫大効果を与えると判断され、各種のバイオサーファクタント(MEL)を素材としたナノ遺伝子ベクターを調製し、その特性の解明とよりすぐれた素材の開発を行った。

研究の初期目的は大いに達成されたと確信でき、本研究の遂行を通して国際的にも高い評価が得られる独創性の高い研究成果と、今後の関連分野の研究と教育に反映出来る貴重な成果が得られた。また、本研究の遂行により薬学・医学の基礎研究と臨床研究の推進に大きく貢献できる研究成果が得られ、研究の目的は大きく達成されたと判断できた。また、研究成果の社会への貢献度も甚大であり、国際的にも意義高い研究成果を確立する目的も大いに達成されたと考えられた。

(2)

In vitro 共存系を利用した樹状細胞と神経細胞のクロストークの研究

b 骨髄由来の樹状細胞の調製。骨髄前駆細胞から樹状細胞の分化。マウス脾臓細胞とBalb/c 骨髄由来の成熟細胞を卵白アルブミン添加培地で共存培養。成熟樹状細胞を調製。新生児マウス神経節初代培養細胞による共存培養系の確立。交感神経・上頸神経節初代培養細胞(SCG)及び感覚神経・後根神経節初代培養細胞(DRG)と樹状細胞の共存培養システムの確立。Time-lapse 光学顕微鏡による神経節初代培養細胞と樹状細胞の相互作用の解析。

(3)

抗原提示能に関与する液性因子の同定とその相互作用機構の解明

樹状細胞とナイーブT細胞との共存培養によるMHCクラスII分子を介したT細胞への抗原提示能の計測と解析。マウスを用いた固形癌に対する増殖抑制の個体レベルでの追究。

(4) 次世代ナノ遺伝子ベクターの構築とその特性の解明。

金ナノ粒子を基盤にした次世代ナノ遺伝子ベクターの構築。生体内適合性・生体内分解性の高分子ナノ粒子内に遺伝子を封入し、ナノ粒子表面物性を制御することに、細胞内への移行性を変化させ、遺伝子の標的有効性の向上の検討。また、標的での吸収性向上のためのナノ粒子設計法の確立。

(5)

次世代バイオ・ナノ遺伝子ベクター - の構築と医療薬学への展開

本申請研究は3名の物理系薬学者がその英知と最新の研究成果を駆使して、互いの先端研究の成果を基盤に、経験の大小と無関係に忌憚のない研究討議を基盤に新しい薬学研究の新領域を開発・提言しようとするものである。研究者らはこれまでの研究で得られた成果を統合・推進し、薬が研究の新時代に相応しい研究を先導する独自独走的な研究を打ち出したいと研究を推進した。3名の研究者は薬学研究の場において、これまで基礎薬学に近いところで研究を進めてきた。しかし、新時代の薬学研究や医療薬学の研究においては、薬学部内の他の分野の研究者との協力や支援を受ける体制を維持することは重要であると考えられ、研究成果の社会への還元等を含めて薬学部の多様な教員との共同研究の強く進めたいと考えた。

3. 研究の方法

バイオサーファクタントを(MEL)を包摂した正電荷リポソームを用いて、非ウイルスベクターによる特定遺伝子の発現と抑制をコントロールできる独創的な手法を開発し、その独自の技術を使って安全性の高い遺伝子導入ベクターによる基礎及び臨床医療の研究を可能にした。

4. 研究成果

本研究は3名の物理系薬学者がこれまでの研究成果と研究技術を統合・推進させ、病原性ウイルスは使用せず、独自・独創性の高い先端技術を駆使して、次世代バイオ・ナノ遺伝子ベクターの特徴を生かした新時代の医療薬学研究における革新的技術を構築しようとした。最終年度は研究の中核をなす次世代ナノ遺伝子ベクターの構築とその達成を目指して研究の大いなる完成と将来の科学技術の新展開になることを強く意図して研究の完成を進めた。バイオサーファクタント(MEL)を包摂した正電荷リポソームによる遺伝子導入法がsiRNAによる遺伝子発現を顕著に促し、非ウイルスベクターによる特定遺伝子の発現を制御できることを明らかにした。研究成果は特筆できるものであり、研究代表者や研究分担者が画期的な遺伝子導入技術になると予想した研究計画を強く支持するものになった。本申請研究は画期的な先端技術として種々の研究に活用されると判断された。また、ナノ遺伝子ベクターがマイクロRNAを包摂しsiRNAを効率よく標的細胞へ導入できるのは正電荷リポソームと標的細胞の膜融合効率を顕著に増大させていることに起因していることを解明した。本申請研究のベクターは生体(細胞・組織)に無用な損傷を与えることなく迅速に遺伝子導入を可能にするだけでなく、RNA干渉によ

り遺伝子の発現を適宜制御できることを明らかにした。これらの特性は関連分野の研究に多大の効果を与えると推察され、バイオ・ナノベクターの特性を増大させる新素材の追究により数十倍から数百倍にも達する導入効率の上昇も期待される。今後は、in vivoの研究のさらなる進展が期待される。

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15件)

Tadokoro, S., Shibata, T., Inoh, Y., Nakanishi, M., Utsunomiya-Tte, N. Cell Biol. Int., 40, 589 (2016). 査読有

Tadokoro, S., Inoh, Y., Nakanishi, M. Biochim. Biophys. Acta, 1840, 2290 (2015). 査読有

Hagiyama, M., Nakanishi, M., Ito, A., Br. J. Dermatol., 168, 771 (2013). 査読有

Inoh, Y., Furuno, T., Nakanishi, M., Eur. J. Pharm. 49, 1 (2013). 査読有

Furuno, T., Hagiyama, M., Hirashima, N., Nakanishi, M., J. Neuroimmunol. 250, 50 (2012). 査読有

[学会発表](計20件)

[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〕なし

ホームページ等

<http://www.phar.agu.ac.jp>

6．研究組織

(1) 研究代表者

中西 守 (NAKANISHI, Mamoru)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号： 90090472

(2) 研究分担者

山本浩充 (YAMAMOTO, Hiromitsu)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号： 30275094

伊納義和 (INHO, Yoshikazu)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号： 90434547