

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590961

研究課題名(和文) ハイドロダイナミック力を用いた肝ミトコンドリアへの遺伝子導入システムの開発

研究課題名(英文) Development of hydrodynamic gene delivery system for the delivery to the mitochondria

研究代表者

須田 剛士 (Suda, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10361916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア(Mit)特異的な遺伝子治療の実現に向け、Mit特異的なプロモーターと終止配列、ならびにMit特異的なコドン使用に特化した遺伝子からなるプラスミドと、その送達システムの開発を行った。単純なハイドロダイナミック導入法(HD)では明らかなMitでの遺伝子発現が確認できなかったため、Mit移行シグナルとそれに結合するタンパクの併用を試みた。移行シグナルと結合タンパクをクローニングした後、HDの物理的なインパクトによる結合の解離を防止するため、溶液の粘弾性を利用し注入溶液量と速度をともに半減させたHDシステムを新規に開発した。現在、これらを用いてMit特異的な遺伝子導入を検証中。

研究成果の概要(英文)：Toward the development of a feasible mitochondrial gene therapy in clinic, the plasmids consist of a mitochondria-specific promoter and terminal signal with genes, which are modified for a mitochondria-specific codon usage, were developed, and we confirmed no expression from the plasmids in the nucleus using a confocal microscopy. Because hydrodynamic gene delivery could not efficiently deliver the plasmids to mitochondria, proteins binding to the mitochondrial localization signal were employed for enhancing the delivery. In order to prevent the dissociation between the localization signal and proteins, we newly developed hydrodynamic gene delivery injecting a half volume with a half speed of the authentic hydrodynamic delivery. Now we are evaluating the effectiveness of the modified hydrodynamic system in the delivery of the plasmids to the mitochondria in mice.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ミトコンドリア 遺伝子治療 ハイドロダイナミック導入法 レオロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア (Mit) ではエネルギー産生過程で多量の過酸化物が産生される一方で抗酸化活性が脆弱であり、DNA 修復機構も不十分であるため遺伝子変異が核の 10~20 倍高い頻度で発生する。さらにイントロン・ヒストンが存在しないため変異が機能障害を伴い易く、一度変異が生じると更なる酸化ストレスが惹起され、悪循環を招来する。

NASH においては、肝臓へ過剰に流入した遊離脂肪酸が Mit で代謝される際に多量の過酸化物を発生し、8-OHdG などを経した変異やテロメアの短縮とテロメラーゼ活性の変化など細胞の老化や癌化に関与する異常が蓄積すると共に、肥満モデル動物では Mit の複製に関与する核由来因子の発現低下も指摘されており、Mit の機能障害がその病態形成に強く関与していることが示されている。しかし、Mit を介した効果的な薬物療法は存在せず、Mit ゲノムを操作することが可能な遺伝子治療の開発が必要である。

(2) 既存の遺伝子導入法は基本的に核での発現を目的としており、細胞質から更に Mit の外膜と内膜を越えて Mit へ遺伝子を導入することは困難であると考えられてきた。最近 Keeney らは、細胞膜との癒合を引き起こす N-terminal protein transduction domain (PTD) と、Mitochondrial localization signal (MLS) ならびに Mit ゲノム結合蛋白 (TFAM) から成る融合蛋白とプラスミドとの複合体を用いて、Mit での蛋白発現を報告した。また Lyrawati らは pmtGFP を DQAsome で Mit に導入し、GFP 遺伝子発現を報告している。しかしこれらはすべて *in vitro* での報告であり、*in vivo* での導入には更なる技術革新が必要である。

(3) ハイドロダイナミック導入法 (HD) は、大量の生理食塩水を急速静注することで細胞膜の透過性を亢進させる高効率非ウイルスベクターである^①。申請者らは HD の臨床応用を目指して HD の遺伝子導入効率を規定する因子の同定^②、高い遺伝子導入効率を確保するための条件の解析^③、循環動態上の安全性を担保するための要件の解析^④を順次施行する過程で、細胞質内に持ち込まれた溶液により形成される細胞内小胞が Mit にも存在することを発見した。HD により、核酸のみならず蛋白を含む様々な物質を細胞内へと送達することが可能であることから、HD 単独、あるいはすでに *in vitro* で Mit への導入が報告されているシステムとの併用による Mit への効率的な遺伝子導入が達成される可能性が示唆される。

2. 研究の目的

(1) 核と Mit におけるコドン使用の相違に基づく Mit 特異的な発現プラスミドの作製

(2) *in vivo* で肝臓の Mit へ遺伝子導入を行う非ウイルスベクターの開発

3. 研究の方法

(1) pMitGFP のクローニング : D-loop+改変 GFP 遺伝子+終止配列 (TER)

(2) pmtGFP と pMitGFP を局所的 HD でラット肝臓へ導入し、リアルタイム PCR によるプラスミドの定量、ならびにリアルタイム RT-PCR と共焦点レーザー顕微鏡による GFP メッセージの局在確認と定量

(3) Mitochondria localization signal (MLS) と Mitochondrial transcriptional factor A (TFAM) の融合タンパクを発現するプラスミドのクローニング

(4) 融合タンパクとリポーター遺伝子搭載 Mit 特異的な発現ベクターとの複合体形成を損なわずに細胞内へと送達させるための、より物理的ストレスの少ない HD の開発

4. 研究成果

(1) クローニング

それぞれ GFP と DsRed をリポーター遺伝子として有するプラスミドである pAcGFP1-C1 と pDsRedE2 に、プロモーターとして D-loop を、終止配列として TER 配列あるいは Mit の複製起点 (Ori) をクローニングし、D-loop-GFP-TER、D-loop-GFP-Ori、ならびに D-loop-DsRed-Ori とした。さらに、核と Mit でのコドン使用の差異による Mit での発現特異性を担保するために、GFP の G174A、G719A、ならびに DsRed の G429A、G678A 変異を導入した。変異の導入された D-loop-GFP-TER を pMitGFP とした。

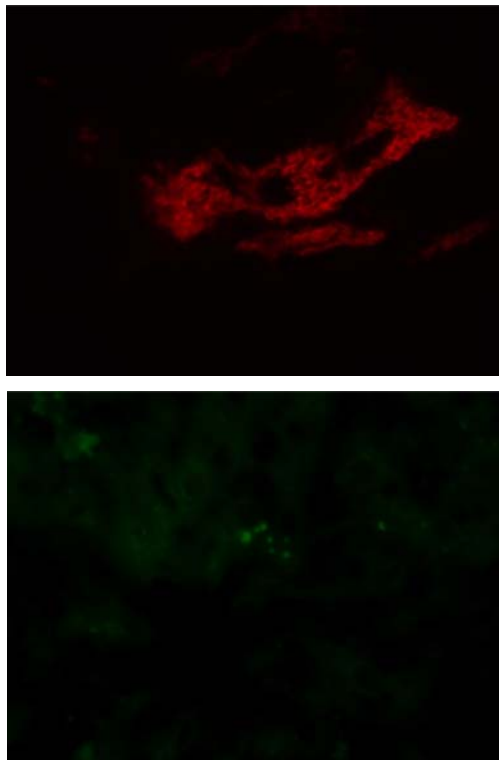
(2) 各プラスミドを生理食塩水に溶解し、体重の 10%容量を 8 週齢マウスの尾状脈より 10 秒間で静注することで、肝細胞への遺伝子導入を行った。遺伝子導入法自体の陽性コントロールとして CMV プロモーター制御下に核由来の GFP を発現する pCMV-GFP を用い、蛍光顕微鏡による評価とリアルタイム RT-PCR によるメッセージの定量を行った。

結果として、GFP シグナルは自家蛍光と交絡するため微弱な陽性シグナルの検出に最適な方法ではないこと、ならびに pCMV-GFP 導入マウスでは GFP のメッセージが確認される一方で、他のプラスミドが導入された肝臓に核由来リポーター遺伝子発現の認められないことが確認された (図 1)。

(3) MLS として染色体 17 番にコードされている superoxide dismutase 2 (SOD2) を採用し、pE-SUMO3 ベクターに SOD2 と、その下流に TFAM をクローニングした。TFAM は反復配列を含み PCR での増幅が困難なため、SOD2 と TFAM 全体の配列を人工的に合

成し、クローニングした。

図 1



上段：20 g の Bulb/c マウスに pDsRedE2 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を体重の 10%の生理食塩水とともに 5 秒間で尾静注射し、24 時間後に共焦点蛍光顕微鏡で観察 (x400)。Mit に集積した DsRed が確認できる。

下段：20 g の Bulb/c マウスに pMitGFP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を体重の 10%の生理食塩水とともに 5 秒間で尾静注射し、24 時間後に共焦点蛍光顕微鏡で観察 (x400)。非特異的な自家蛍光以外の蛍光を観察できない。

(4) 物理的ストレスの少ない HD 開発のため、コンピューター断層撮影により外科的な影響のない状態で HD がマウスの循環動態と臓器伸展に与える効果を定量的に評価した。

図 2

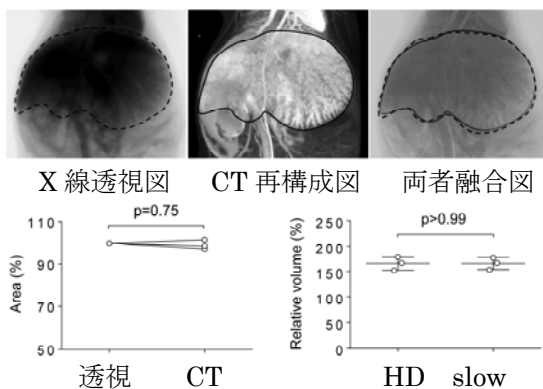
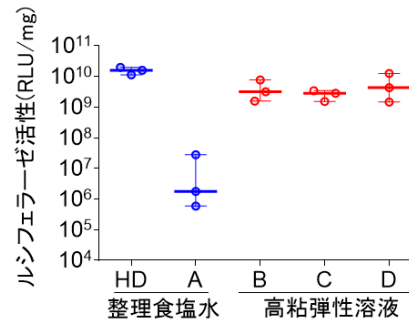


図 2 に示すように、X 線透視下にリアルタイム画像を評価し、注入終了直後にコンピューター断層撮影 (CT) を実施して 3 次元ポリユ

ームデータを取得した。9%体重容量の造影剤を 5 秒間で注入する HD と、同量を 60 秒間で注入する slow で比較した結果、肝臓のボリュームは注入容量に依存し、注入速度には非依存性であることが明らかとなった。

低用量での HD における導入効率を担保するため、レオロジー的な改良を加えた結果、図 3 に示すように必要溶液量、ならびに必要注入スピードをともに半減させながら導入効率を維持することに成功した。

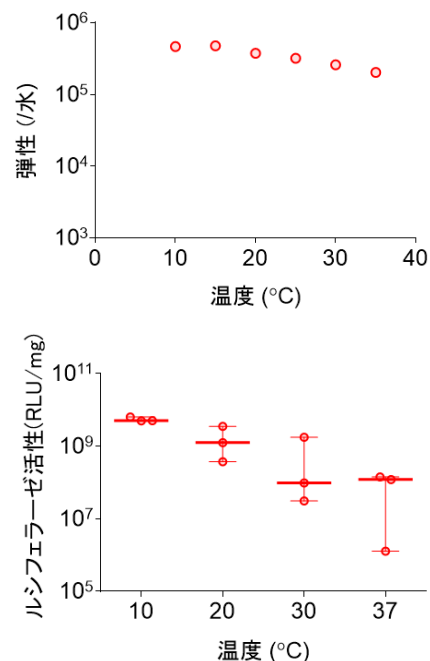
図 3



すなわち、生理食塩水を用いて注入容量と注入速度を HD の半分とした場合 (A)、導入効率はリンフェラーゼ活性で 10^{10} RLU/mg レベルから 10^6 RLU/mg のレベルまで低下したが、高粘弾性溶液 (B-D) を用いることで、導入効率は 10^9 RLU/mg レベルまで回復した。

導入効率改善効果は、溶液の粘弾性を増加させるのに用いた添加物の種類 (B-D) に非依存性で、かつ同一溶液の温度を低下させると、粘性ならびに弾性の上昇に伴い、導入効率も改善した (図 4)。

図 4



(5) 高弾性溶液を用い、通常の HD の半容量、半速度で実施する物理的なインパクトが緩和された HD を小動物、ならびに大動物に *in vivo* で実施するための注入システムを開発した (図 5)。注入溶液が直接接触するシリンジ、延長チューブや、注入局所の脈管内圧を測定するシステムなどは全て既に臨床で使用されている汎用品を採用し、GMP に準拠する構成とした。本システムは、注入局所の脈管内圧をフィードバックすることにより注入を電氣的に制御するもので、注入容量、ならびに注入速度のみならず、大動物における局所的な HD でも、一定の脈管内圧曲線が形成され、再現性の高い物理的なインパクトを担保する。

図 5



<引用文献>

- ① Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258-1266.
- ② Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther* 2007;14:129-137.
- ③ Suda T, Suda K, Liu D. Computer-assisted Hydrodynamic Gene Delivery. *Mol Ther* 2008;16:1098-1104.
- ④ Kamimura K, Suda T, Xu W, Zhang G, Liu D. Image-guided, Lobe-specific Hydrodynamic Gene Delivery to Swine Liver. *Mol Ther* 2009;17:491-9.

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 Kanefuji T, Yokoo T, Suda T, Abe H, Kamimura K, and Liu D. Hemodynamics of a Hydrodynamic Injection. *Mol Ther Meth & Clin Dev* 2014;doi:10.1038/mtm.2014.29. 査読有
- ② Yokoo T, Kamimura K, Suda T,

Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Ther* 2013;20:816-823. 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① Suda T. Imaging-guided Hydrodynamic Gene Delivery -Toward clinical trial- Invited Speech in 18th Annual Meeting, American Society of Gene & Cell Therapy May 15, 2015: New Orleans, USA.
- ② Kanefuji T, Yokoo T, Suda T, Sawada K, Arai Y, Abe H, Kamimura K, Liu D, Terai S. Impact of injection volume on hydrodynamic delivery to the liver in mice. 18th Annual Meeting, American Society of Gene & Cell Therapy May 14, 2015: New Orleans, USA.
- ③ Yokoo T, Kanefuji T, Suda T, Ushida A, Hasegawa T, Kamimura K, Liu D, Terai S. Rheological modification of hydrodynamic gene delivery. 18th Annual Meeting, American Society of Gene & Cell Therapy May 14, 2015: New Orleans, USA.
- ④ Kanefuji T, Yokoo T, Suda T, Sawada K, Arai Y, Abe H, Kamimura K, Liu D, and Aoyagi Y. Hemodynamics of hydrodynamic injection in mouse. 17th Annual Meeting, American Society of Gene & Cell Therapy May 23, 2014: Washington DC, USA.
- ⑤ Yokoo T, Suda T, Osaki A, Waguri N, Ishikawa T, Kamimura H, Kanefuji T, Kamimura K, Tsuchiya A, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Terai S. A second validation of a formula estimating platelet counts after partial splenic arterial embolization. Global Embolization Symposium and Technologies Asia 2014 Dec 19, 2014: Tokyo Convention Hall, Tokyo, Japan.
- ⑥ Suda T, Yokoo T, Kamimura K, Kanefuji T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Hydrodynamics-based, liver-targeted nonviral gene therapy approach for monogenic diseases. 48th Annual Meeting of The European Association for The Study of The Liver. Apr 27, 2013: Amsterdam, The Netherlands.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Suda T, Liu D. Hydrodynamic delivery. Adv in Genet.Non-Viral Vectors for Gene Therapy. Physical Methods and Medical Translation, L Huang, D Liu & E Wagner Eds. Elsevier Inc. 2015;89:89-111.

[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 :

出願年月日 :

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

須田 剛士 (Suda, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号 : 10361916

(2) 研究分担者

尾田 雅文 (Oda, Masafumi)

新潟大学・産学地域連携推進機構・教授

研究者番号 : 80372473

(3) 連携研究者

該当なし