

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592084

研究課題名(和文) ナノバブル超音波増強法を用いた肺静脈からの逆行性アプローチによる肺への遺伝子導入

研究課題名(英文) Retrograde injection of plasmid DNA containing nano bubble via pulmonary vein

研究代表者

土田 正則 (TSUCHIDA, MASANORI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60293221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺局所への遺伝子導入は呼吸器疾患の制御に有望な方法と期待される。本研究ではプラスミドDNAを肺静脈から逆行性に投与することで肺胞の細胞に遺伝子を導入できる事を示した。ルシフェラーゼ遺伝子をマーカーとして検討したところ、1.0mlの投与量、30秒の投与時間でルシフェラーゼ発現量が最大となることが判明した。また、lacZの発現からII型肺胞細胞に遺伝子が導入されることも確認した。hydrodynamics-based法によりプラスミドDNAを肺局所に導入する方法を確立したが、溶解液を攪拌してマイクロバブルを発生させることで遺伝子導入効率は向上しなかった。順行性投与では有意に導入効率が向上した。

研究成果の概要(英文)：Lung-targeted gene transfer is expected to revolutionize the treatment of respiratory diseases. In this study, we demonstrated that naked plasmid deoxyribonucleic acid (DNA) can be transferred into alveolar cells in normal rats, by retrograde injection into the pulmonary vein with the left pulmonary artery clamped. When a luciferase expression plasmid vector pCAGGS-luciferase in a reporter assay was examined, the maximal luciferase expression was obtained when the DNA solution was injected within 30 s in a volume of 1.0 mL. We detected lacZ expression exclusively in the type II pneumocyte attached to alveolar walls by immunoelectron microscopy. Protocol for naked plasmid DNA transfer into rat lung using this hydrodynamics-based transfection method was established. However, addition of micro bubble did not enhance the efficacy of gene transfer. On the other hand, micro bubble enhanced the efficacy of gene transfer via antegrade injection.

研究分野：胸部外科

キーワード：遺伝子導入 プラスミドベクター 肺静脈 逆行性投与 ナノバブル

### 1. 研究開始当初の背景

移植や癌、動脈硬化などの領域で遺伝子治療による病状のコントロールに向けた研究が行われているが、未だに臨床応用には至っていない。その大きな理由は(1) 遺伝子導入効率の低さと、(2) 効率の良い遺伝子導入を実現するためには、ウイルスに遺伝子を組み込む必要があることによる。ウイルスを用いた場合には感染や癌化が重大な問題となる。

ウイルスを用いない方法としてプラスミドベクターによる導入が考えられるが、安全性は高いものの、一般的には遺伝子導入効率は低く、目的とする遺伝子を効率よく生体に導入するのは難しい。

特に呼吸器領域では移植や悪性腫瘍、遺伝性の肺疾患への応用が期待されるが、人でのウイルスを用いた経気道投与による遺伝子導入で死亡例が報告されており、肺局所への遺伝子導入方法の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は肺局所に、プラスミド DNA (naked DNA) を用いて遺伝子導入効率の良い新たな方法を確立することである。

そのために

(1) 従来の気管支からの経気道投与や肺動脈からの順行性投与ではなく、肺静脈から逆行性に投与するアプローチにより肺局所への導入効率が改善するかどうかを確認し、逆行性アプローチを確立すること

(2) さらにプラスミドベクターの溶解液を超音波で攪拌しバブルを発生させること、さらにナノバブルを溶解液として用いることにより遺伝子導入効率が向上するか否かを検討すること

以上の2つの新しい方法を確立することで肺局所へ安全に、かつ、効率よく遺伝子を導入することを目指す

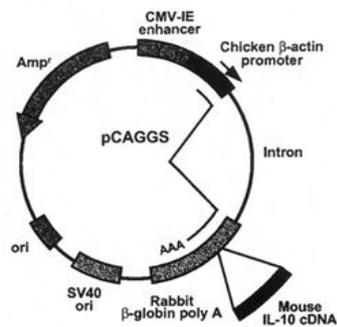
本研究の基本的な遺伝子導入の原理は、hydrodynamics-based transfection 法である。すなわち、肺静脈と肺動脈をクランプし、ラット肺の体積(1ml程度)と同程度の量の遺伝子溶解液を肺静脈から投与し、圧で肺の細胞内に遺伝子を導入するものである。それに加えて溶解液を超音波で攪拌し、細胞膜透過性を増加させることで遺伝子導入効率が向上するか否かを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子の大量調整: Qiagen 社製大量培養キットを用い遺伝子を大量調整した。

図1の構造を有する pCAGGS プラスミドベクターを使用した。

図1



### (2) 遺伝子の導入方法:

全身麻酔下でラットを開胸し、左肺静脈と左肺動脈を露出した。24 ゲージ留置針を左肺静脈に挿入し、肺静脈の留置針末梢側と肺動脈を遮断し、naked DNA (プラスミド DNA) 溶解液を左肺静脈から投与し、圧で肺の細胞内に遺伝子を導入した。

### (3) 遺伝子導入・発現の効率の評価:

マーカー遺伝子である pCAGGS-luciferase をレポーター遺伝子として使用し、肺組織中の luciferase 活性を測定し、遺伝子導入・発現の効率を評価した。

至適導入遺伝子溶液量の検討: pCAGGS-luciferase 量(800mg)を Ringer 液に溶解し、導入遺伝子溶液量を 0.5ml、1ml、1.5ml、2ml の4群を設定し、遺伝子導入1週間前と1週間後に肺を採取しルシフェラーゼ活性を測定した

至適導入速度の検討: 至適導入遺伝子溶液量の pCAGGS-luciferase 800mg を導入速度から、5秒、10秒、30秒、60秒の4群を設定し、至適導入速度を検討した。

遺伝子の至適投与量の検討: 導入する pCAGGS-luciferase 量を 100mg、400mg、800mg、1600mg、CAGGS800mg のみの5群を設定し、至適導入溶液量かつ至適導入速度で、導入遺伝子の用量依存性と発現の持続期間を検討した。

肺静脈から導入した遺伝子の発現部位の同定: pCAGGS-lacZ を至適導入溶液量かつ至適導入速度で導入し、左肺静脈から逆行性に導入した遺伝子の発現部位を同定した。

肺組織障害度の検討: pCAGGS-luciferase を至適導入溶液量かつ至適導入速度で導入することによる肺組織への影響(障害の有無)を組織学的に検討した。

生涯度は間質の浮腫、細胞浸潤、肺胞壁の破壊をスコア化し評価した。最後に、有効な遺伝子の導入・発現の効率が得られる条件のうち、最も肺組織への影響が小さい導入条件を決定した。

### (4) 遺伝子導入に際し超音波を用いてマイクロバブルを発生させると遺伝子導入効率が向上することが知られている。マイクロバ

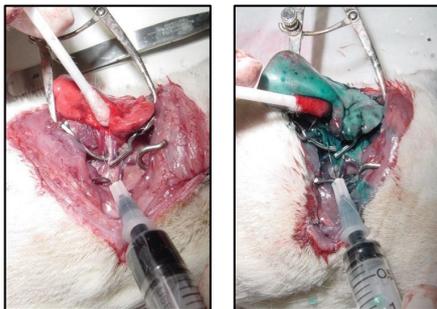
ブル発生に際して細胞膜に微小な孔が一時的に形成されることで遺伝子導入効率が向上するためと考えられている。プラスミドベクターの溶解液を超音波で攪拌しバブルを発生させることにより遺伝子導入効率が向上するか否かを検討した。  
また、ナノバブルを溶解液として使用する可能性についても検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子の導入方法の確立

図2のように開胸、人工呼吸管理下に肺静脈からの逆行性投与は高い成功率で実施できた。

図2 開胸下左肺静脈からの逆行性投与



##### (2) 至適導入遺伝子溶液量の評価

pCAGGS-luciferase 量を 800mg に固定し、溶液量を 0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml を 10秒で投与し、肺組織中のルシフェラーゼ量を比較した。左肺でのルシフェラーゼ発現は 1.0ml 投与が最大であり、投与量は 1.0ml が最適と考えられた。

表1 至適導入遺伝子溶液量の評価

	0.5ml	1ml	1.5ml	2ml
右肺	5328 ± 326	4232 ± 451	3860 ± 322	2496 ± 209
左肺	7890 ± 862	80560 ± 1309	45890 ± 692	38620 ± 1022
心臓	5050 ± 652	4987 ± 406	6520 ± 599	4056 ± 308

##### (3) 至適導入速度の評価

pCAGGS-luciferase 量 800mg を 1.0ml で溶解し、投与速度を 5秒、10秒、30秒、60秒と変化させて肺組織中のルシフェラーゼ量を比較した。導入速度は 30秒で最大となり、10秒、60秒では、導入効率が低下することが示された。

表2 至適導入速度の評価

	5秒	10秒	30秒	60秒
右肺	4322 ± 569	5699 ± 688	4987 ± 502	5022 ± 592
左肺	68251 ± 1058	75622 ± 2895	138965 ± 4822	10463 ± 3952
心臓	2088 ± 698	5587 ± 1152	4080 ± 198	3098 ± 1022

##### (4) 遺伝子溶解濃度の評価

1.0ml の溶解に pCAGGS-luciferase を 100mg、400mg、800mg、1600mg 溶解し 30秒で

投与し濃度別の導入量を比較した。800mg の濃度が適切であることが示された。

表3 遺伝子溶解濃度の評価

	100mg	400mg	800mg	1600mg
右肺	3989 ± 1121	6551 ± 925	6877 ± 908	8222 ± 655
左肺	125661 ± 8962	102554 ± 6989	156855 ± 9881	98556 ± 6987
心臓	4899 ± 688	6985 ± 1268	6822 ± 2365	5698 ± 1052

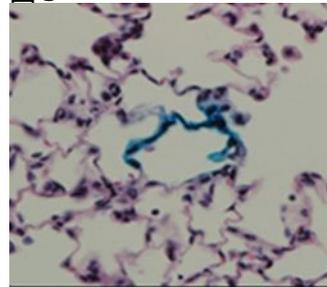
以上から pCAGGS-luciferase 800mg を 1.0ml で溶解し、30秒で投与する条件が最も導入効率が良いと判定した。

以下の実験ではこの条件を用いることとした。

##### (5) 遺伝子発現部位の同定

pCAGGS-lacZ は肺胞壁特に、II型肺胞上皮において発現を確認することができた(図3)。

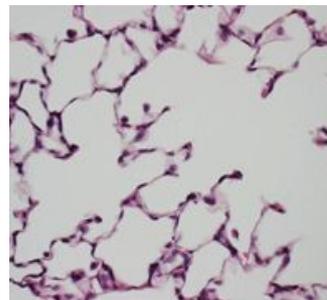
図3



##### (6) 肺組織の障害度の検討

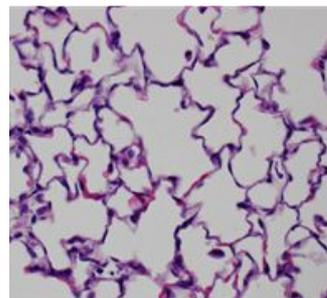
遺伝子導入後 3、5日後の肺組織を浮腫、細胞浸潤、肺胞壁破壊の項目で評価した。

図4 遺伝子を含まない溶液投与後3日目の肺組織



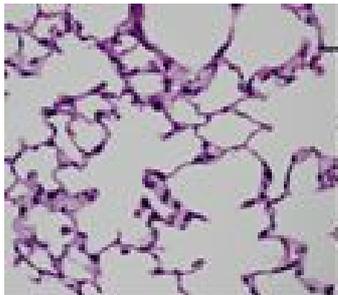
明らかな肺障害は認められない

図5 遺伝子導入後3日目の肺組織



間質の浮腫と軽度の細胞浸潤があり軽度の肺障害が認められる。肺胞壁破壊は認めない。

図6 . 遺伝子導入後5日目の肺組織



間質の浮腫と軽度の細胞浸潤は3日目よりも軽減している。肺胞壁破壊は認めない。

#### (7) マイクロバブル発生による導入効率改善の検討

表4 マイクロバブル発生による導入効率

	攪拌なし	攪拌あり	pCAGGS800mg
右肺	5433 ± 1324	4655 ± 1222	5643 ± 1469
左肺	156373 ± 6733	136677 ± 4822	4678 ± 2111
心臓	24337 ± 579	3546 ± 1245	5633 ± 1672

攪拌の有無(マイクロバブル発生)による導入効率の改善は認めなかった。

表5 順行性投与でのマイクロバブルの効果

	攪拌なし	攪拌あり
順行性	4787 ± 1053	99603 ± 8972
逆行性	145772 ± 5677	156372 ± 6782

逆行性投与ルートでは攪拌(マイクロバブル発生)による導入効率向上は認めなかったため、肺動脈からの順行性投与で攪拌による導入効率の向上を検討した。順行性投与では攪拌により導入効率が有意に向上した。

(8) ナノバブル溶解液投与の安全性  
ナノバブル溶液を投与すると順行性、逆行性の両方で肺胞壁の破壊、毛細血管周囲の浮腫がおこり肺組織が高度に障害された。溶解液にリンゲル液や生理食塩水で濃度を調整し、また、pHを重炭酸ナトリウムで変更して投与したが障害は軽減できなかった。

#### 結果の要約

肺への遺伝子導入は、主にアデノウイルスベクターを用いて、肺動脈あるいは気管を導入経路として行われてきた。しかし Naked DNAを肺静脈から逆行性に投与して肺局所に導入し、その発現を確認できたという報告はない。本研究ではルシフェラーゼ遺伝子をマーカーとして肺静脈からの逆行性投与は肺動脈からの順行性投与方法に比べて導入効率が向上すること、投与量、投与時間、遺伝子

濃度の条件を決定した。また、肺への障害が軽度であることを確認し、短期間の安全性に問題がないことが判明した。溶解液を攪拌してマイクロバブルを発生させることで逆行性投与では遺伝子導入効率は向上しなかったが、順行性投与では有意に導入効率が向上した。ナノバブルを溶解液として使用することは肺障害がおこるため断念した。今後、本研究を進めることにより、肺に対する侵襲が小さく高効率のプラスミド遺伝子の導入が可能になるものと考えられる。

#### 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1件)

Abe H, Kamimura K, Kobayashi Y, Ohtsuka M, Miura H, Ohashi R, Yokoo T, Kanefuji T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S.  
Effective Prevention of Liver Fibrosis by Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 in a Rat Liver Fibrosis Model.  
査読有 Mol Ther Nucleic Acids. 5;5: 2016 Jan e276.

##### [学会発表](計3件)

Kamimura K Abe H, Kobayashi Y, Ohtsuka M, Miura H, Yokoo T, Suda T, Tsuchida M, Liu D, Terai S  
The Effect of Fibrosis on Gene Delivery Efficiency of Hydrodynamics-based Gene Delivery  
第21回日本遺伝子治療学会学術集会  
2015年7月25日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)  
Abe H Kamimura K, Kobayashi Y, Ohtsuka M, Miura H, Ohashi R, Yokoo T, Kanefuji T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Zhang G, Liu D, Terai S.  
Effective Prevention of Liver Fibrosis by Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery of Matrix Metalloproteinase-13 in Rat Liver Fibrosis Model .  
18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy  
2015年5月14日 New Orleans (USA)  
Kobayashi Y, Kamimura K, Abe H, Ohtsuka M, Miura H, Yokoo T, Suda T, Tsuchida M, Aoyagi Y, Liu D, Terai S.  
Effect of Fibrotic Tissue on Liver-targeted Hydrodynamic Gene Delivery  
18th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy  
2015年5月14日 New Orleans (USA)

〔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

土田 正則 (TSUCHIDA MASANORI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60293221

##### (2) 研究分担者

小池 輝元 (KOIKE TERUMOTO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：90635723

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：