

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860107

研究課題名(和文)医療用医薬品を素材とする多機能性ナノデバイスを用いた革新的遺伝子医薬品の開発

研究課題名(英文)Development of novel gene medicines based on the multifunctional nano-device using the regulatory-approved medical products

研究代表者

兒玉 幸修 (KODAMA, Yukinobu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：50448510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：医療用医薬品を用いた遺伝子ベクター開発を行った。医薬品はプロタミン硫酸塩静注(PRT)、コンドロイチン硫酸注射液(CS)、強力ネオミノファーゲンC、ヒアルロン酸点眼液を用いた。pDNAと医薬品の組み合わせを検討した結果、混合比と調製手順を最適化することでpDNA-PRT複合体(PRT複合体)、pDNA-PRT-CS複合体(CS複合体)を構築できた。両複合体はともに高い遺伝子発現を示した。PRT複合体は細胞毒性を示したが、CS複合体では毒性が見られなかった。PRT複合体は血清存在下で遺伝子発現が低下したが、CS複合体は影響を受けなかった。CS複合体は静脈内投与後、脾臓で高い遺伝子発現を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel gene vector using regulatory-approved medical products. We used novo-protamine sulfate (PRT), chondroitin sulfate sodium (CS), stronger neo-minophagen C (GL), and sodium hyaluronate (HA) ophthalmic solution as medical products. We successfully prepared the pDNA-PRT complexes (PRT complexes) and pDNA-PRT-CS complexes (CS complexes) by optimization of the mix ratio and preparation process. PRT complexes and CS complexes showed high gene expression. Although PRT complexes showed slight cytotoxicity, CS complexes showed no cytotoxicity. Also, the gene expression of PRT complexes was greatly reduced in the presence of FBS. The presence of FBS, however, did not greatly affect gene expression of the CS complex. CS complexes showed high gene expression in the spleen after intravenous administration.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：遺伝子デリバリー 医薬品 硫酸プロタミン コンドロイチン硫酸

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の発展により、遺伝子やタンパク質などが新たなバイオ医薬品として注目されている。特に遺伝子治療はバイオインフォマティクスの発展と相成り、がんなどの難治性疾患や様々な先天性疾患に有力な手段として期待されている。しかし、遺伝子医薬品は安定性や膜透過性が低いため、細胞内へ安全に効率よく導入できるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が必須で、全世界的な競争が展開されている。しかし、従来の DDS 開発は新規シーズの開発を優先し、ヒトでの臨床使用に必要な動態試験・安全性試験・薬理試験を念頭に置いていない。また、無菌調製のプロセスや大量生産・長期保存への配慮が不十分である。すなわち、基礎研究から非臨床試験・臨床試験へ移行する段階に必要な GLP/GMP 基準の素材での製造や、無菌大量製造法が考慮されておらず、基礎から臨床への橋渡しを阻んでいる。

申請者は、生体適合性の高い成分を静電的に自己組織化させ、臓器特異的に薬物取り込みや遺伝子発現できる画期的なナノデバイスを開発した。このナノデバイスは表面が負電荷で細胞毒性や血液凝集を示さず、構成する高分子や脂質の性質により定量的に肺、脾臓、肝臓へ医薬品を送達することができる。また、ナノデバイスはサプリメントや医薬品に使用されている既知の成分により構築しているため、生体適合性および安全性が極めて高く、迅速な臨床応用が期待できる。しかし、実際に臨床試験へ移行するためには、さらに GLP/GMP 基準での製造が必要不可欠である。GLP/GMP 基準の DDS 構築のために、遺伝子医薬品独自の新しい製造原理に基づいた GLP/GMP 基準の製造施設を備え、優れたシーズを臨床試験へ進めるようにサポートする拠点の形成が望まれている。しかし我々は発想を転換し、GLP/GMP 基準で製造されている市販の医療用医薬品を用いてナノデバイスを構築することを発案した。

2. 研究の目的

本研究では、既に臨床で使用されている医療用医薬品を構成成分としたナノデバイスの開発と実証研究を行う。

3. 研究の方法

(1) モデル遺伝子として、ルシフェラーゼをコードした pDNA (pCMV-Luc) を用いた。pDNA とカチオン性医療用医薬品である硫酸プロタミン静注用を組み合わせる pDNA 内包カチオン性ナノデバイスを調製した。さらに、カチオン性ナノデバイスにアニオン性医療用医薬品であるコンドロイチン硫酸注射液 (CS)、グリチルリチン静注液 (GL)、あるいはヒアルロン酸点眼液 (HA) を組み合わせ、pDNA 内包アニオン性ナノデバイスの構築を試みた。調製したナノデバイスの粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。また、血清の影響についてもゼータサイザーや電気泳動などで製剤学的に調べた。

面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。また、血清の影響についてもゼータサイザーや電気泳動などで製剤学的に調べた。

(2) マウスメラノーマ細胞 B16-F10 を用いて、ナノデバイスの遺伝子発現を調べた。また、細胞毒性を WST-1 assay によって測定する。さらに、遺伝子発現に及ぼす各種阻害剤の影響を調べ、ナノデバイスの取り込み機構について精査した。

(3) pDNA として pCMV-Luc よりも 150 倍発現が高い Nano-Luc を用いた。Nano-Luc、プロタミン静注用、コンドロイチン硫酸注射液を用いてナノデバイスを作製し、マウスへ投与した。投与後 24 時間に各臓器を摘出し、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) siRNA としてホタルルシフェラーゼの発現を抑制する siRNA (siLuc) を用いた。siLuc、プロタミン静注用、コンドロイチン硫酸注射液を用いてナノデバイスを作製した。作製したナノデバイスの粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安定性を電気泳動などで調べた。

4. 研究成果

pDNA と硫酸プロタミン静注用 (PRT) の電荷比が 1:1, 2, 4, 6, 8, 10 となるように混合し、pDNA-PRT 複合体 (PRT 複合体) を調製した。その結果、電荷比 2 以上で 100 nm 以下のカチオン性複合体を構築できた。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結果、電荷比 1 では pDNA の流出が認められたが、電荷比 2 以上では流出は見られず、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、PRT 複合体の遺伝子導入効率を評価した。その結果、電荷比が大きくなるにつれて遺伝子発現は高くなり、電荷比 8 以上で頭打ちとなった (図 1)。

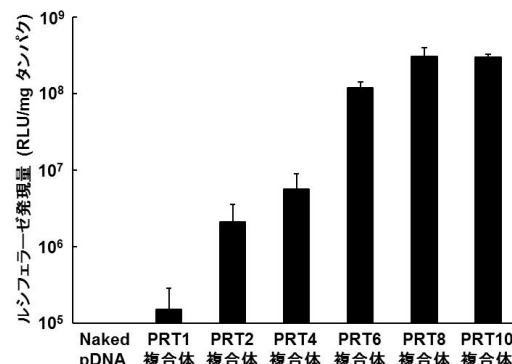


図1 PRT複合体の遺伝子発現量

次に、PRT 複合体にアニオン性医薬品 (CS、GL、あるいは HA) を被膜した三重複合体の調

製を試みた。その結果、GL では凝集して複合体を構築できなかったが、CS および HA では 100 nm 程度のアニオン性複合体を構築できた。また、アガロースゲル電気泳動によって安定性を評価したところ、pDNA の流出は見られず、安定に pDNA を内包していることが確認できた。そこで、B16F10 細胞を用いて、CS 複合体および HA 複合体の遺伝子導入効率を評価した。その結果、HA 複合体ではほとんど遺伝子発現は見られなかった。しかし、CS 複合体では PRT 複合体にはやや劣るものの、 1×10^7 RLU/mg protein を超える高い遺伝子発現を示した (図 2)。

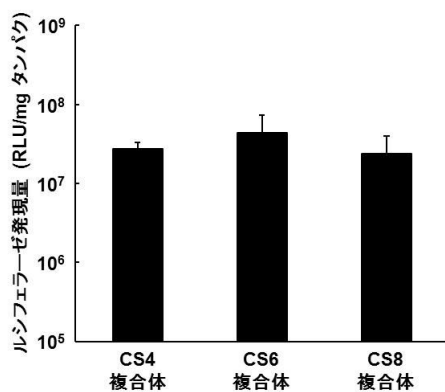


図2 CS複合体の遺伝子発現量

カチオン性複合体は細胞毒性を示すことが報告されている。そこで、カチオン性の PRT8 複合体とアニオン性の CS6 複合体の細胞毒性を比較した。0.25 μ g の pDNA を内包した複合体においては、PRT8 複合体、CS6 複合体ともに細胞毒性を示さなかった。しかし、0.5 μ g の pDNA を内包した複合体においては、PRT8 複合体でわずかに毒性が見られた。一方、CS6 複合体では 0.5 μ g においても細胞毒性を示さなかった (図 3)。したがって、PRT 複合体を CS で被膜することで細胞毒性を軽減できることが示された。

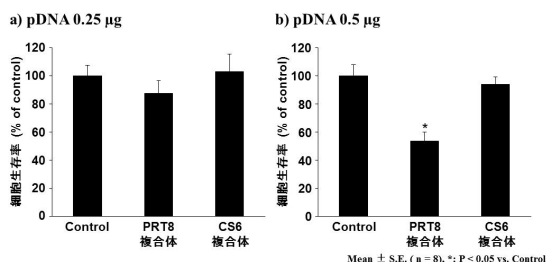


図3 PRT複合体とCS複合体の細胞毒性

次に、PRT 複合体と CS 複合体の取り込みメカニズムを明らかにするために、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) と共存させた時の遺伝子導入効率を評価した。PRT 複合体は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、PRT 複合体は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。一方、CS 複合体はクロルプロマジンおよびゲニステインと共存させた場合

に遺伝子発現効果が低下する傾向にあった。これらの結果より、CS 複合体はクラスリン介在性および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、遺伝子導入効率に対する血清の影響を検討したところ、PRT 複合体は血清存在下で有意に遺伝子発現が低下した。一方、CS 複合体はほとんど血清の影響を受けなかった。したがって、CS 複合体は *in vivo* においても有用である可能性が示された。

そこで次に *in vivo* での遺伝子発現について検討した。PRT 複合体をマウスに静脈内投与した結果、肝臓、脾臓、肺で高い遺伝子発現を示した。一方、CS 複合体を静脈内投与後は、脾臓において選択的に高い遺伝子発現を示した (図 4)。また、PRT 複合体、CS 複合体を赤血球と混和させた結果、PRT 複合体は凝集を引き起こしたが、CS 複合体は凝集しなかった。

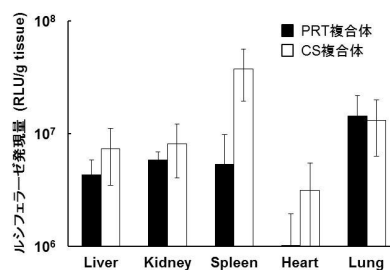


図4 *in vivo*におけるPRT複合体とCS複合体の遺伝子発現

ルシフェラーゼを抑制する siRNA に硫酸プロタミン静注用を様々な比率で添加し、siRNA 内包 PRT 複合体 (siPRT 複合体) を構築した。さらに、siPRT 複合体に CS を加えて、siRNA-PRT-CS 複合体 (siCS 複合体) を調製した。これらの複合体は 100 nm 程度の安定なアニオン性微粒子を形成した。これらの複合体を、ルシフェラーゼを恒常発現させたメラノーマ細胞株 B16-F10/Luc 細胞に添加し、遺伝子抑制効果を評価したが、十分な抑制効果が得られなかった。

以上のように、我々は本研究によって、医療用医薬品を用いて遺伝子導入可能なナノデバイスを開発することに成功した。特に PRT と CS を用いた CS 複合体は安全性が高く、*in vivo* においても遺伝子導入可能であり、非常に有用な遺伝子ベクターとなる可能性が示された。これらの結果は、核酸医薬を臨床応用するためのベクター開発に有益な基礎的情報であると考えられる。今後は、siRNA でも効果を発揮できるように製剤の改良を行っていく予定である。

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 8 件)

Kodama Y. Development of a Multi-functional Nano-device for Safe and

Effective Gene Delivery to Target Organs. *Yakugaku Zasshi*. 136(11): 1533-19 (2016). DOI: 10.1248/yakushi.16-00198 査読有

Hashizume J, Higuchi N, Sato K, Kodama Y, Matsunaga N, Sakamoto T, Yamaguchi K, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Evaluation of Antiemetic Therapy for Hepatic Transcatheter Arterial Infusion Chemotherapy with Cisplatin. *Biol Pharm Bull*. 39(4): 611-4 (2016). DOI: 10.1248/bpb.b15-00603. 査読有

Kurosaki T, Nakasone C, Kodama Y, Egashira K, Harasawa H, Muro T, Nakagawa H, Kitahara T, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Splenic gene delivery system using self-assembling nano-complex with phosphatidylserine analog. *Biol Pharm Bull*. 38(1): 23-9 (2015). DOI: 10.1248/bpb.b14-00478. 査読有

Kodama Y, Yatsugi Y, Kitahara T, Kurosaki T, Egashira K, Nakashima M, Muro T, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Quaternary complexes modified from pDNA and poly-L-lysine complexes to enhance pH-buffering effect and suppress cytotoxicity. *J Pharm Sci*. 104(4): 1470-7 (2015). DOI: 10.1002/jps.24364. 査読有

Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K: Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int*. 64(4): 24-31 (2015). DOI: 10.1016/j.parint.2015.01.005. 査読有

Kodama Y, Ohkubo C, Kurosaki T, Egashira K, Sato K, Fumoto S, Nishida K, Higuchi N, Kitahara T, Nakamura T, Sasaki H: Secure and effective gene delivery system of plasmid DNA coated by polynucleotide. *J Drug Target*. 23(1): 43-51 (2015). DOI: 10.3109/1061186X.2014.950665. 査読有

Kodama Y, Shiokawa Y, Nakamura T, Kurosaki T, Aki K, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H: Novel siRNA delivery system using a ternary polymer complex with strong silencing effect and no cytotoxicity. *Biol Pharm Bull*. 37(8): 1274-81 (2014). DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00058>. 査読有

Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H: Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery.

Eur J Pharm Biopharm. 87(3): 472-9 (2014). doi: 10.1016/j.ejpb.2014.04.013. 査読有

〔学会発表〕(計13件)

三枝 由香莉、兒玉 幸修、岩永 真理恵、北原 隆志、佐々木 均：グリコサミノグリカンで被膜した生体分解型遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第31年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016年5月19日~21日

小林 瑞希、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：関節リウマチ治療を目的としたメトトレキサートを構成成分とする遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第31年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016年5月19日~21日

根岸 智奈美、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：ポリアミノ酸で構築した生体分解型マリアナノワクチンの開発、日本薬剤学会第31年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016年5月19日~21日

兒玉 幸修：標的臓器への安全かつ高効率な核酸医薬送達を実現する多機能性ナノデバイスの開発、第32回日本薬学会九州支部大会、九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市)、2015年11月28日~29日

徳永 彩子、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：生体分解型DNAナノワクチンによる悪性黒色腫の増殖抑制、第31回日本DDS学会学術集会、京王プラザホテル(東京都・新宿区)、2015年7月2日~3日

上田 由貴、兒玉 幸修、三枝 由香莉、北原 隆志、佐々木 均：pH緩衝能の増大と毒性軽減を目的とした四重複合体の開発と有用性評価、日本薬剤学会第30年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015年5月21日~23日

徳永 彩子、兒玉 幸修、樋口 則英、北原 隆志、佐々木 均：Dendrigraft poly-L-lysineを基材とした遺伝子ベクターの有用性評価、日本薬剤学会第30年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015年5月21日~23日

野田 稜、兒玉 幸修、黒崎 友亮、中村 忠博、北原 隆志、佐々木 均：アニオン性 dendriplex を用いた遺伝子デリバリーシステムの開発、日本薬剤学会第30年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015年5月21日~23日

永原 忠幸、兒玉 幸修、北原 隆志、中嶋 幹郎、佐々木 均：アニオン性三重複合体の眼疾患用遺伝子ベクターとしての有用性評価、日本薬剤学会第30年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015年5月21日~23日

花村 啓紀、兒玉 幸修、北原 隆志、中嶋 幹郎、佐々木 均：抗原提示細胞標的化ナノ粒子を用いた新規がんワクチンの開発、日本薬剤学会第30年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015年5月21日~23日

藏本 悠、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木均：Dendrigraft poly-L-lysine を構成成分とした生分解型 siRNA ベクターの構築、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)、2014 年 5 月 20 日～22 日

西垣 和香、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木均：医療用医薬品を用いた GMP 基準の新規遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)、2014 年 5 月 20 日～22 日

Yukinobu Kodama, Yumi Yamashita, Takashi Kitahara, Hitoshi Sasaki: Secure and effective gene vector of polyamidoamine dendrimer pharmaceutically modified with anionic polymer, 5th Pharmaceutical Sciences World Congress,メルボルン(オーストラリア)、2014 年 4 月 13 日～16 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兒玉 幸修 (KODAMA, Yukinobu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・

助教

研究者番号：50448510

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし