

《若手研究者紹介》



静電的相互作用を基盤とした生体適合型遺伝子ベクターの開発

黒 崎 友 亮* Tomoaki Kurosaki

長崎大学病院薬剤部

1. はじめに

遺伝子治療は先天性遺伝子欠損症や癌、感染症に対する次世代の治療技術として注目されている。効果的な遺伝子治療の実現には、安全でかつ高い遺伝子導入効果を有する遺伝子ベクターの開発が不可欠である。遺伝子ベクターは主にウイルスベクターと非ウイルスベクターの二種類に分類される。このうち、ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高く、これまでに多くの臨床試験に用いられたものの、発癌性や免疫原性などの致命的な副作用が明らかとなり、現在は構造が明確で免疫原性が少ない非ウイルスベクターへの期待が高い。

非ウイルスベクターの構成成分として、カチオン性高分子やカチオン性リポソームなどのカチオン性の化合物が数多く研究・開発されている。アニオン性の遺伝子に対し、カチオン性の化合物を過剰に添加することにより、表面がカチオン性に帯電したナノサイズの微粒子を形成することができる。これらのカチオン性微粒子はアニオン性に帯電した細胞膜と静電的に強く結合することによって、高い遺伝子発現効果を示すことから、遺伝子ベクターとして汎用されている。一方で、カチオン性の遺伝子ベクターはその表面電位に比例して、細胞障害性や生体成分との凝集などの副作用が増大することが知られている。

このようなカチオン性遺伝子ベクターの欠点を解

決するために、微粒子の表面を親水性高分子である polyethyleneglycol (PEG) を用いて修飾した遺伝子ベクターが開発されている。しかし、PEG 修飾した遺伝子ベクターは、毒性が大きく軽減されるが、その立体障害のために細胞との接触が減少し、遺伝子発現効率が極端に低下することが知られている。さらに、臓器選択性や遺伝子発現効率の向上を目的として、PEG 鎖を抗体やリガンドなどで有機化学的に修飾した新規遺伝子ベクターが開発されているが、複雑に有機合成された化合物は生体に投与した場合に、予期しない重篤な副作用の原因となることが懸念される。また、成分や調製方法が錯雑な遺伝子ベクターは医薬品としての応用が非常に困難である。

著者らはこれまでに、生体適合性のアニオン性化合物を用いてベクター表面を静電的に被膜することによって、安全性を大きく向上できることを見出した。さらに、ある種のアニオン性化合物を用いた被膜によって、遺伝子医薬品を安全かつ効果的に細胞内へ送達できることを発見した。本稿では、この技術を用いた新規遺伝子ベクターの特徴と今後の展望について紹介したい。

2. 生体適合型遺伝子ベクター (ternary complex) の開発

非ウイルス性遺伝子ベクターの中でも、カチオン性高分子である polyethylenimine (PEI) は静電的相互作用による DNA の微粒子化や proton sponge 効果によるエンドソームの破壊など、遺伝子導入に優れた性質を持ち、PEI を用いて pDNA を微粒子化した pDNA/PEI complex は、*in vitro* と *in vivo* の両条件下で高い遺伝子発現を示すことが知られている。PEI は特に肺における遺伝子発現に優れ、既に試薬としても市販されている (*in vivo* jet-PEI,

*2005年、長崎大学薬学部薬科学科を卒業。同年、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科へ進学。2010年、博士(薬学)の学位を取得。2010年4月より、長崎大学病院薬剤部にCOE研究員として配属し、現在に至る。好きな言葉：成功者は走り出してから考える。趣味：水泳、旅行。連絡先：〒852-8501 長崎市坂本1-7-1
E-mail: kurosaki@nagasaki-u.ac.jp

Polyplus-transfection 社). 一方で, pDNA/PEI complex は微粒子表面に強いカチオン性を帯びているために, 細胞障害性や血液成分との凝集などの重篤な副作用の原因となることが報告されている. また, pDNA/PEI complex は細胞膜上のアニオン性の proteoglycans と非特異的に結合するため, 臓器や細胞レベルでの遺伝子発現制御が困難である.

そこで本章では, pDNA/PEI complex の副作用や欠点を改善する目的で, 様々な生体適合性のアニオン性高分子を用いて, pDNA/PEI complex を静電的に被膜した生体適合型遺伝子ベクター (ternary complex) の開発を行った (Fig. 1). 生体適合性のアニオン性高分子として polyadenylic acid (polyA), polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC), α -polyaspartic acid (α -PAA), α -polyglutamic acid (α -PGA), γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を用いて, ternary complex を作製し, その有用性について評価した.

これまでに, カチオン性の遺伝子ベクターをアニオン性高分子を用いて被膜した報告があるものの, 300~1,000 nm 前後の極めて大きな粒子が形成され, 生体への適応が困難であった. 本研究では, 種々のアニオン性高分子と pDNA/PEI complex を静電的に自己組織化し, 粒子径が 100 nm 以下で, 表面がアニオン性に帯電した ternary complex の構築に成功した (Table 1). さらに, 作製した ternary complex は pDNA のリン酸基と PEI のアミノ基, アニオン性高分子の負の官能基の電荷比が 1 : 8 : 6 と

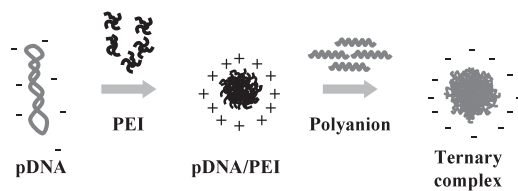


Fig. 1. Formation of ternary complexes with anionic charge.

Table 1. Particle size and ζ -potential of the complexes.

Complexes	Size (nm)	ζ -Potential (mV)
pDNA/PEI	65.4 \pm 15.8	+ 55.5 \pm 0.7
pDNA/PEI/polyA	52.0 \pm 14.4	- 18.9 \pm 0.4**
pDNA/PEI/polyIC	40.2 \pm 8.3	- 19.6 \pm 0.2**
pDNA/PEI/ α -PAA	84.5 \pm 3.2	- 39.7 \pm 0.1**
pDNA/PEI/ α -PGA	85.1 \pm 8.0	- 22.9 \pm 0.6**
pDNA/PEI/ γ -PGA	88.9 \pm 3.8	- 28.4 \pm 1.3**

Mean \pm S.E. ($n = 3$), **: $p < 0.01$ vs. pDNA/PEI.

るように調製しており, 総電荷が +1 であるにもかかわらず, 明らかなアニオン性を示したことから, 微粒子表面にアニオン性高分子による被膜層が形成されたことが推察される. また, heparin sulfate などの一部のアニオン性高分子は pDNA/PEI complex の電気的な結合を崩壊し, pDNA の安定性を損なうことが知られている. そこで, ternary complex の安定性をアガロースゲル電気泳動法を用いて評価したところ, 全ての ternary complex において pDNA の流出は認められず, 安定な微粒子の形成が確認できた.

3. Ternary complex の毒性と遺伝子発現効果の評価

非ウイルスベクターはウイルスベクターと比較して, 免疫原性や発癌性などの観点から安全性が高いとされるものの, 細胞障害性や赤血球との凝集, 血栓症などの副作用が知られている. そこで, ternary complex の赤血球凝集と細胞障害性について評価した. この結果, アニオン性高分子を用いて pDNA/

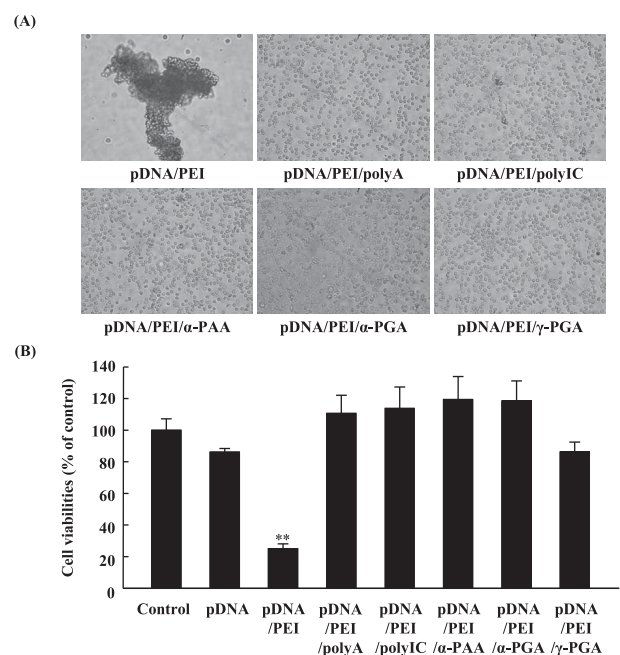


Fig. 2. Aggregations (A) and cytotoxicities (B) of the complexes.

(A) Each complex was added to erythrocytes and agglutinations were observed by phase microscopy (400 \times magnification). (B) B16-F10 cells were incubated with various complexes for 2 h and cell viability was measured at 24 h after treatment by WST-1 assay. Each datum represents the mean \pm S.E. ($n = 13$). **: $p < 0.01$ vs. control.

PEI complex を被膜することで, pDNA/PEI complex による赤血球の凝集や細胞障害性を著しく軽減することに成功した (Fig. 2). これらの副作用の軽減は, アニオン性高分子によって形成された微粒子表面のアニオン性の被膜層が, 赤血球や細胞膜との相互作用を消失させたことに起因すると推察される.

しかしながら, アニオン性の遺伝子ベクターはカチオン性の遺伝子ベクターとは異なり, 細胞膜と静電的に反発するため, 毒性は軽減するものの, 細胞との接触や細胞内への取り込み, 遺伝子発現が大幅に減少することも予測された. そこで, 次に各遺伝子ベクターの細胞内取り込みや遺伝子発現について検討を行った (Fig. 3). この結果, カチオン性の pDNA/PEI complex は高い細胞内取り込みと遺伝子発現を示したが, 多くのアニオン性の ternary complex では, 細胞内取り込み量と遺伝子発現量が大きく低下した. しかしながら, γ -PGA を用いて被膜した pDNA/PEI/ γ -PGA complex は, アニオン性であるにも関わらず, pDNA/PEI complex と比較して有意に高い細胞内取り込みを示し, 極めて高い遺伝子発現が観察された.

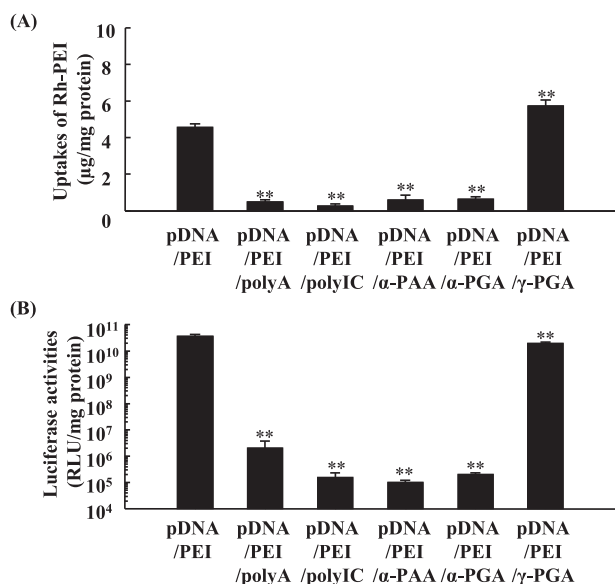


Fig. 3. Uptake efficiencies (A) and transgene efficiencies (B) of ternary complexes. B16-F10 cells were transfected with complexes containing pCMV-Luc and Rhodamine-PEI (Rh-PEI). Twenty-four hours after transfection, fluorescence of Rh-PEI (A) and luciferase activity (B) were evaluated. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 6$). **: $p < 0.01$ vs pDNA/PEI complex.

4. pDNA/PEI/ γ -PGA complex の遺伝子発現メカニズムの解明

この pDNA/PEI/ γ -PGA complex の高い細胞内取り込みには, 何らかの特殊な取り込み機構が関与している可能性がある. そこで, 低温条件下または γ -PGA, L-glutamic acid の共存下で pDNA/PEI/ γ -PGA complex を細胞に添加し, 細胞内取り込み量と遺伝子発現量を測定した (Fig. 4). pDNA/PEI/ γ -PGA complex の細胞内取り込み量と遺伝子発現量は低温条件下で大きく減少し, エネルギー依存性の取り込み機構の関与が示唆された. さらに, γ -PGA の添加で pDNA/PEI/ γ -PGA complex の細胞内取り込み量と遺伝子発現量は濃度依存的に減少した. しかし, L-glutamic acid は細胞内取り込み量や遺伝子発現量に影響しなかった. これらの結果から, pDNA/PEI/ γ -PGA complex が γ -PGA に特異的な受容体を介して, エネルギー依存的に細胞内に取り込まれていることが示された.

以上, γ -PGA を用いて pDNA/PEI complex を静電的に被膜することで, 細胞毒性と血液凝集を大きく低減しながら, 効率的に遺伝子を導入できる画期

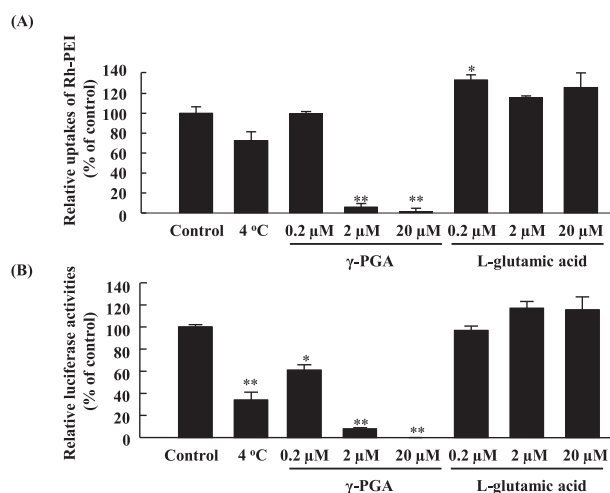


Fig. 4. Effect of the inhibitors on the uptake efficiency (A) and transfection efficiency (B) of pDNA/PEI/ γ -PGA complex. pDNA/PEI/ γ -PGA complex was transfected in medium which was at 4°C or contained various concentrations of γ -PGA and L-glutamic acid. Twenty-four hours after transfection, fluorescence of Rh-PEI (A) and luciferase activity (B) were evaluated. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 6$). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control.

的な新規遺伝子ベクターの開発に成功した¹⁾。

5. γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターの開発²⁾

さらに、著者らは様々なカチオン性の遺伝子ベクターと pDNA との複合体を γ -PGA を用いて被膜した γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターを新たに開発し、その有用性について検討を行った。カチオン性の遺伝子ベクターとして poly-L-lysine (PLL) や poly-L-arginine (PLA), N-[1-(2,3-dioleloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA)-cholesterol (Chol) liposome や DOTMA-L- α -diolelylphosphatidylethanolamine (DOPE) liposome を用いた。PLL や PLA は生体分解性のカチオン性高分子として知られており、生体適合性が極めて高い。また、DOTMA-DOPE liposome は lipofectin として市販されている遺伝子導入試薬であり、*in vitro* で高い遺伝子導入効果を示すことが知られている。さらに、DOTMA-Chol liposome は DOTMA-DOPE liposome と比較して *in vivo* における遺伝子発現効果が高いことが報告されている。

これらのカチオン性の遺伝子ベクターと pDNA と

の複合体に γ -PGA を添加した結果、複合体の凝集や崩壊を引き起こすことなく、表面がアニオン性に帯電したナノサイズの安定な微粒子を形成することが可能であった。そこで次に、 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターの *in vitro* における有用性を評価した (Fig. 5)。この結果、これらアニオン性の γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは B16-F10 細胞において、内包したカチオン性の遺伝子ベクターと同等またはそれ以上の遺伝子発現効果を示した。これらの γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは pDNA/PEI/ γ -PGA complex と同様に、 γ -PGA に特異的な取り込み機構を介して細胞内へ取り込まれているものと推察される。さらに、 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは、細胞障害性を大きく改善していることを見出した。また、 γ -PGA を用いた被膜によって、内包するカチオン性遺伝子ベクターの赤血球凝集や溶血が大きく軽減されることも確認している。

そこで、各遺伝子ベクターをマウスへ静脈内投与し、6 時間後の遺伝子発現量を測定した (Fig. 6)。この結果、pDNA/PLA complex と pDNA/PLL complex は肺で、pDNA/DOTMA-Chol complex と pDNA/

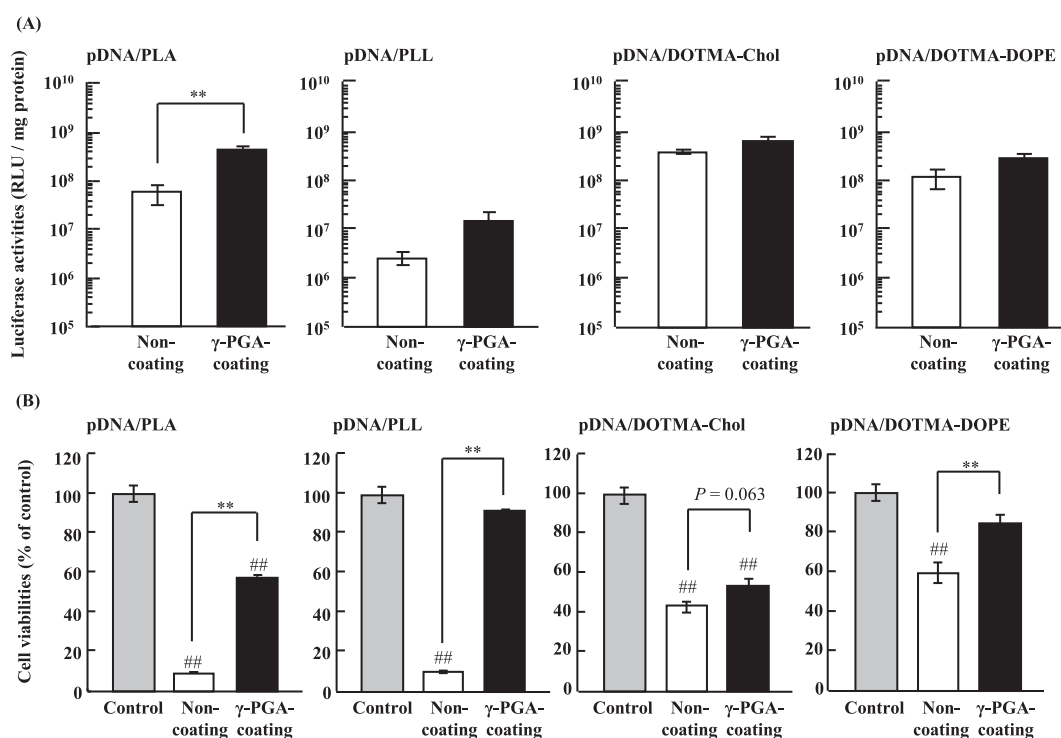


Fig. 5. Transfection efficiencies (A) and cytotoxicities (B) of various complexes. B16-F10 cells were transfected with the various complexes. 22 h after transfection, luciferase activities (A) and cell viabilities (B) were determined. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 3$ or 12), **: $p < 0.01$, #: $p < 0.01$ vs control.

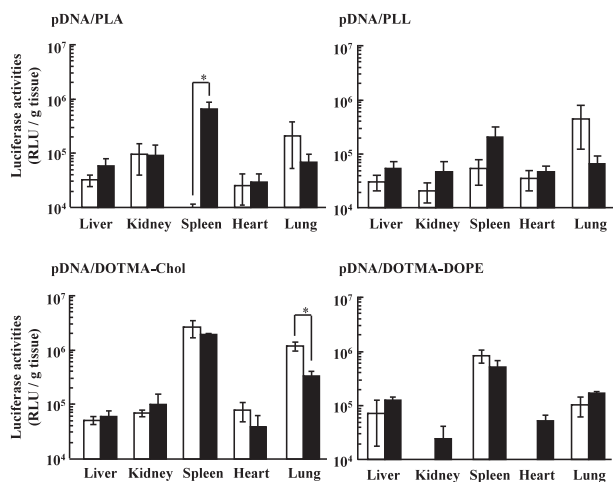


Fig. 6. Transgene efficiencies of the various complexes in mice.

The complexes were injected intravenously into mice. At 6 h after administration, mice were sacrificed and each organ was dissected to quantify luciferase activity. Each value represents the mean \pm S.E. ($n = 3-5$). *: $p < 0.05$. □ : non-coating and ■ : γ -PGA-coating.

DOTMA-DOPE complex は脾臓と肺で高い遺伝子発現効果が認められた。しかしながら、 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは肺における遺伝子発現量が低値を示した。カチオン性の遺伝子ベクターは静脈内投与後に、血液中で赤血球や血清アルブミンなどと凝集し、肺を塞栓することで高い遺伝子発現効果を示すことが知られている。 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは血液中で凝集せず、肺を塞栓しなかったために肺の遺伝子発現効果が減少したものと推察される。一方で、 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは脾臓で高い遺伝子発現効果を示した。脾臓は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が豊富な臓器であることから、 γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターは DNA ワクチンベクターとしての有用性が期待できる。

そこで、我々は γ -PGA 被膜型遺伝子ベクターを癌ワクチンや感染症ワクチンへ応用し、既にその高い有用性を確認している。現在、詳細なメカニズムや臨床への応用に関して検討を進めている。

6. おわりに

著者らは、様々なアニオン性化合物を用いて作製した遺伝子ベクターの有用性を追求し、製剤学的な安定性や遺伝子導入効果、安全性などの詳細な検討を行ってきた。この結果、 γ -PGA などの数種の特

なアニオン性化合物を用いることで、安全性が大きく向上し、遺伝子医薬品を特定の臓器へ選択的に送達する事ができる画期的な新規遺伝子ベクターの開発に成功している^{3,4)}。この技術は pDNA のみならず、siRNA にも応用が可能であることを確認しており、今後の臨床応用が期待される。

このように、著者らは大学病院薬剤部という臨床の立場から、遺伝子医薬品の安全性や効果、汎用性、多機能性、安定性などの重要性を痛感し、臨床への応用に耐えうる次世代型遺伝子ベクターの開発を行ってきた。この遺伝子ベクターは生体適合性の高い化合物を自己組織化することによって、安全性と効果を両立できる画期的なものである。これら化合物の組み合わせは無限に存在し、今後は臨床使用の容易なクリニカル DDS とも言うべき分野を育てたいと考えている。

最後に本稿で紹介した研究を行うに当たり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました長崎大学病院薬剤部佐々木均教授に謹んで厚く御礼申し上げます。さらに、実験の一部に御協力頂いた長崎大学大学院医歯薬学総合研究科治療薬剤学研究室員一同に感謝致します。

引用文献

- 1) T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Fumoto, K. Nishida, J. Nakamura, T. Niidome, Y. Kodama, H. Nakagawa, H. To, H. Sasaki, Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and γ -polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials*, **30**, 2846–2853 (2009).
- 2) T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Kawakami, Y. Higuchi, A. Yamaguchi, H. Nakagawa, Y. Kodama, T. Hamamoto, M. Hashida, H. Sasaki, Gamma-polyglutamic acid-coated vectors for effective and safe gene therapy, *J. Control. Release*, **142**, 404–410 (2010).
- 3) T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Kawakami, K. Nishida, J. Nakamura, M. Teshima, H. Nakagawa, Y. Kodama, H. To, H. Sasaki, The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule, *Biomaterials*, **30**, 4427–4434 (2009).
- 4) T. Kurosaki, R. Kishikawa, M. Matsumoto, Y. Kodama, T. Hamamoto, H. To, T. Niidome, K. Takayama, T. Kitahara, H. Sasaki, Pulmonary gene delivery of hybrid vector, lipopolyplex containing N-lauroylsarcosine, via the systemic route, *J. Control. Release*, **136**, 213–219 (2009).