

《若手研究者紹介》



超音波応答性マンノース修飾リポソームによる 細胞選択的核酸送達システムの開発

運 敬 太* Keita Un

国立医薬品食品衛生研究所

1. はじめに

編集部から本コラム執筆の依頼を受けた際、これまでの研究内容を振り返る良い機会であると考え、未熟ながらも筆を執らせて頂いた。

筆者は学部4年生になった際、当時木村聰城郎教授が主宰されていた岡山大学薬学部生物薬剤学教室に配属され、卒業研究のテーマとして「微粒子内封抗癌剤による抗腫瘍効果決定因子の解析に関する研究」に関わることとなった。ドラッグデリバリーシステム(DDS)については大学の講義で耳にしていたが、実質的にはこれが筆者とDDS研究との出会いであり、その後も関わり続けていく「リポソーム」との出会いでもある。諸先生方や先輩方からの厳しくも暖かいご指導の下、研究の楽しさ・難しさを知り、またこの研究が筆者の研究者としての第一歩でもあった。博士前期課程では、「P-糖タンパク質高発現癌細胞に対する*in-vivo*抗腫瘍効果に関する研究」に携わり、癌の薬物治療においては避けて通れない「抗癌剤耐性」というテーマを頂いた。自分で考え、調べ、試すという試行錯誤を繰り返しながら

少しずつ進めていく中で、「研究」の一端が垣間見えた気がした。今思うと、大学院に進学したばかりの一学生が行う研究の進捗の遅さに目をつぶり、気長に待って頂いた先生方の我慢強さに感謝したい。さて、筆者はその後博士後期課程から橋田 充教授の主宰される京都大学薬学研究科薬品動態制御学分野の一員となり、川上 茂講師の研究グループで、超音波刺激を利用した遺伝子・核酸医薬品の標的選択的送達法に関する研究に携わることとなった。本稿では筆者がその京都大学大学院在学中に携わった「超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射併用に基づく核酸導入法の開発と疾患治療への応用に関する研究」について、その一部を紹介させて頂く。

2. 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/ 核酸複合体の開発

遺伝子治療は癌や嚢胞性線維症などの遺伝子変異に端を発する疾患治療に有望な方法であるが、効果的な遺伝子治療効果の達成のためには疾患に応じた標的細胞への遺伝子送達が不可欠であり、標的細胞への選択的かつ高効率な遺伝子送達を可能にする方法の開発が求められる。癌免疫療法や抗炎症療法の標的細胞である抗原提示細胞や血管内皮細胞には、その細胞膜上にマンノースやガラクトース、フコース受容体などの糖鎖認識機構が発達しており、糖修飾キャリアの標的細胞として知られている。これら糖鎖受容体介在性エンドサイトーシスに基づき、標的細胞への核酸送達を可能にする糖鎖修飾リポソ-

*2006年岡山大学薬学部総合薬学科卒業、2008年同大学院医歯薬学総合研究科博士前期課程修了、2011年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士号(薬学)取得。2010年より日本学術振興会特別研究員を経て、2011年10月より国立医薬品食品衛生研究所薬品部研究員。2011年7月、日本薬剤学会第36回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 受賞。これまで一貫して薬物送達システム(DDS)製剤の開発・評価研究に携わっている。連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 E-mail: un@nihs.go.jp

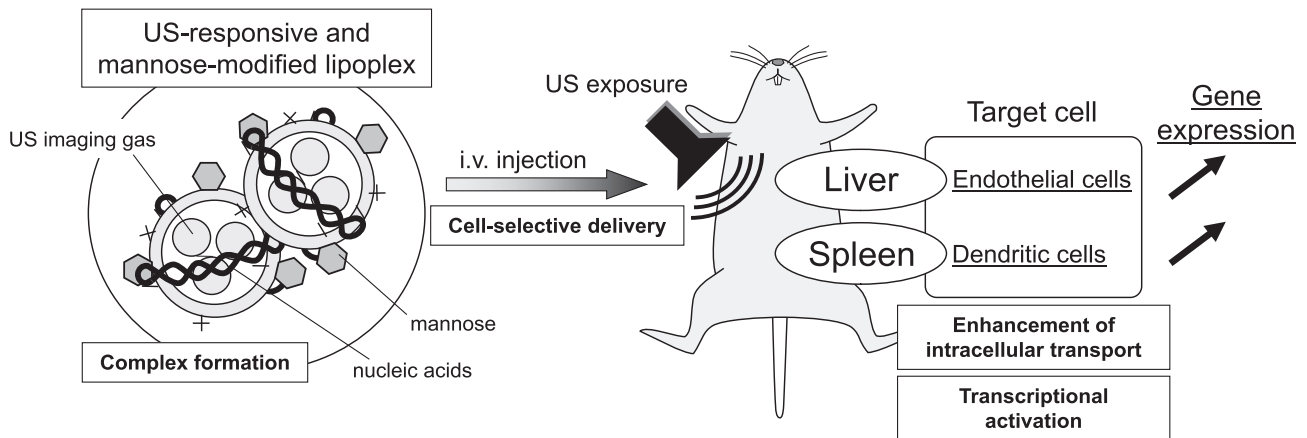


Fig. 1. *In-vivo* gene transfection method using ultrasound (US)-responsive and mannose-modified lipoplexes.

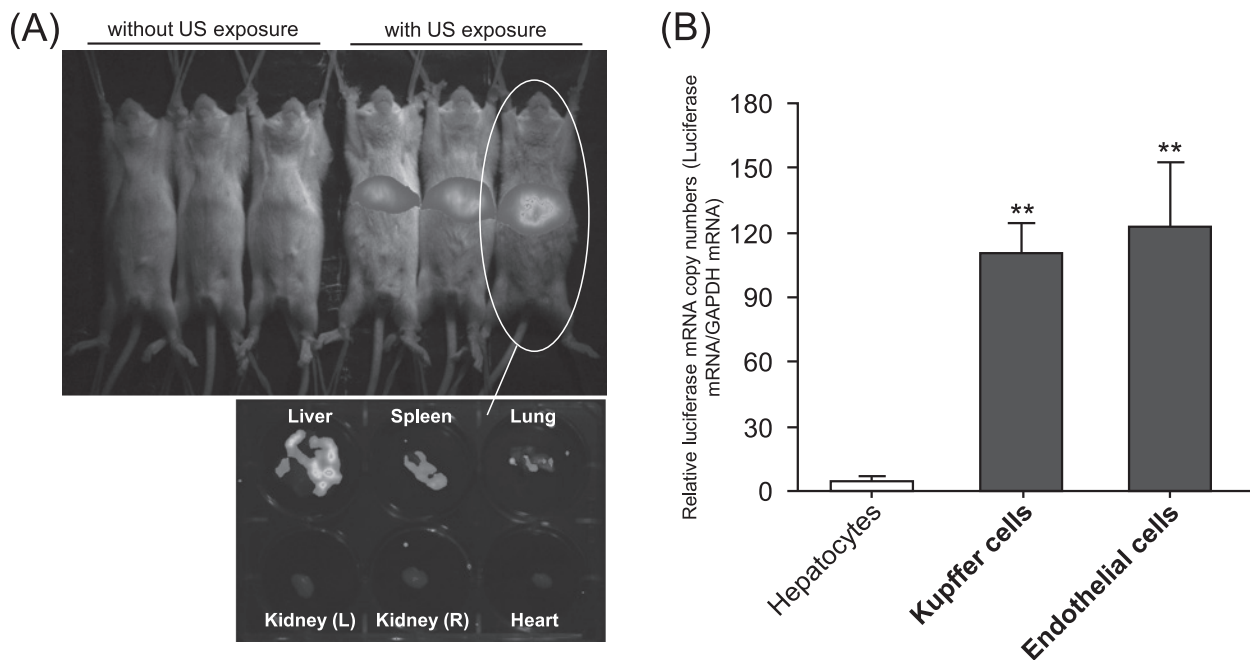


Fig. 2. *In-vivo* gene expressing characteristics by US-responsive and mannose-modified lipoplexes and US exposure. (A) *In-vivo* imaging photographs of luciferase expression in mice and isolated organs at 6 hr after transfection by US-responsive and mannose-modified lipoplexes with or without US exposure (firefly luciferase-encoding plasmid DNA: 50 μ g). (B) Hepatic cellular localization of luciferase expression at 6 hr after transfection by US-responsive and mannose-modified lipoplexes and US exposure. ** $p < 0.01$, compared with the corresponding group of hepatocytes. Each value represents the mean + S.D. ($n = 4$).

ム / 核酸複合体が開発されているが、臨床において優れた治療効果を得るためには、細胞選択的かつより効率的な核酸送達を達成し得る方法論の開発が望まれる。

近年、細胞内への遺伝子・薬物導入効率を増強させる方法として、電気刺激、物理的圧力、高水圧や超音波照射などの外部刺激の利用が積極的に試みられている。特に超音波造影剤であるマイクロバブル

製剤と超音波照射を併用するソノポレーション法では、最適強度の超音波照射によって誘導される製剤崩壊と共に発生するキャビテーションエネルギーにより細胞膜上に一過性の小孔が生じ、それを介して多量の核酸医薬品を細胞質内に直接導入可能であることが報告されている。さらにマイクロバブル製剤は血管造影剤として、また超音波照射機器は超音波検査や結石治療などの分野で既に利用されているた

め、臨床応用の可能性が高い遺伝子導入法としても注目されている。その一方、核酸医薬品とマイクロバブル製剤を別個投与する従来のソノポレーション法では、標的臓器・標的細胞選択的に高い遺伝子発現効率を得ることは難しい。

こうした背景の下、筆者らはソノポレーションを利用した効率的核酸導入と糖鎖認識機構に基づく細胞選択的核酸送達の融合を図り、単一製剤に超音波応答性と標的細胞指向性を付与した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体の開発研究を行った (Fig. 1)。まずマンノース受容体認識機構と超音波照射に伴う細胞穿孔誘導機構を単一製剤内に組み込むことを考え、超音波応答性と標的細胞指向性を併せ持つ超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を開発した¹⁾。本製剤と超音波照射を利用した遺伝子導入による *in-vivo* 遺伝子発現特性を評価した結果、マウス肝臓および脾臓において顕著に高い遺伝子発現が示され、その遺伝子発現はマンノース受容体発現細胞である肝非実質細胞や脾臓の樹状細胞において選択的に認められることを見出した (Fig. 2)¹⁾。一方、肺や腎臓、心臓においては超音波照射に伴う遺伝子発現増強は認められず、本方法に基づく遺伝子導入は、標的細胞選択的に高い遺伝子発現を達成し得る方法であると言える。

3. 遺伝子発現増強機構の解明

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した *in-vivo* 遺伝子導入法では、従来のリポフェクション法と異なる機構で遺伝子発現が誘導されていると推察され、このメカニズム解析は、遺伝子発現効率の改善や疾患治療への応用を考える上で不可欠である。そこで、*in-vivo* 遺伝子発現に関与する核酸化合物の体内動態挙動、細胞内導入機構、ならびに遺伝子導入に伴う転写活性化に着目し、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を用いた遺伝子導入機構とその支配因子について評価した。

まず超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射による遺伝子導入時の核酸医薬品の体内動態挙動について評価した。その結果、製剤のマンノース修飾、ならびに超音波照射により、肝臓および脾臓への核酸送達量が増大することが示された¹⁾。またソノポレーションを利用した本方法

では、超音波照射によるマイクロバブル製剤の崩壊に起因して細胞膜上に生じる一過性の小孔を介して多量の核酸医薬品が細胞質内に導入される²⁾。従って、超音波照射に伴う肝臓および脾臓への核酸移行量の増大は、核酸医薬品の細胞質内導入の促進に起因するものであると推察され、超音波照射時に多量の核酸医薬品を肝臓および脾臓内に送達し得る製剤を利用した場合に、核酸医薬品の効率的組織内移行が認められると考えられる。

一方で、各種物理刺激により転写過程が活性化され、それに伴い遺伝子発現が増強するという知見が報告されているため、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した遺伝子発現増強に及ぼす転写活性化の関与についても評価した。その結果、遺伝子発現制御プロモーターにおける特定の転写因子結合部位の有無が遺伝子発現の増強に影響することが示された³⁾。さらに超音波照射に伴い、上記特定の転写因子の活性化が誘導されることも示され、他の物理刺激に起因した転写活性化機構と同様、本方法においても超音波照射を付与した細胞において同様の生理的变化が誘導されていることが明らかとなった³⁾。

以上、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射に伴う *in-vivo* 遺伝子発現増強には、1) マンノース修飾による核酸医薬品の標的細胞への移行性増大、2) 超音波照射に起因した製剤崩壊に伴う細胞質内への核酸送達の増強、ならびに3) 超音波照射に伴う転写活性化、という三因子の複合的関与が示唆された。

4. 疾患治療への応用

4.1 癌に対する DNA ワクチンへの応用

癌抗原により付与される癌特異免疫を利用した癌免疫療法は、標的癌細胞特異的な抗腫瘍効果が得られると共に、治療に伴う毒性が低いという特徴を有することから、癌患者の転移・再発予防法として期待されている。特に癌特異抗原発現遺伝子を利用する DNA ワクチンは、液性免疫、ならびに細胞性免疫を付与できると共に、強い殺細胞活性を示す標的癌細胞特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTLs) を効率的に誘導可能である。しかしながら、DNA ワクチンにより優れた治療効果を得るためには、癌特異免疫誘導において重要な役割を果たす抗原提示細胞に

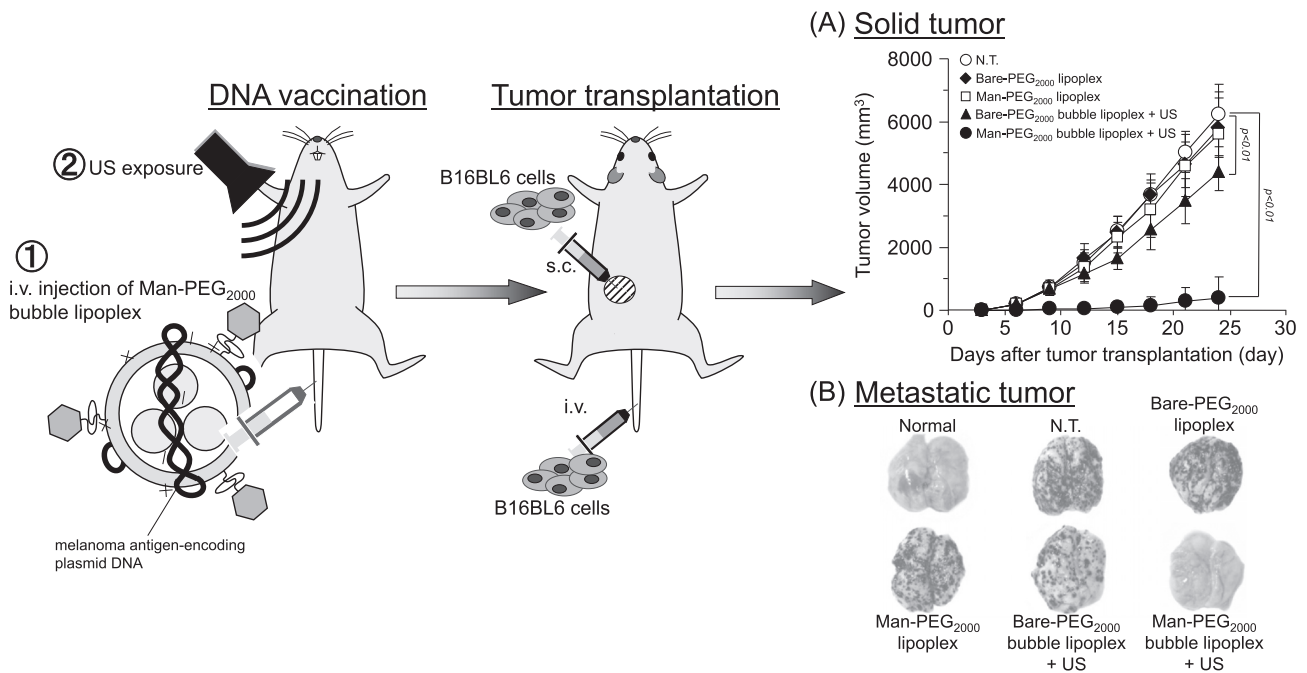


Fig. 3. Cancer vaccine effects against solid tumors (A) and pulmonary metastatic tumors (B) by DNA vaccination using US-responsive and mannose-modified lipoplexes and US exposure (melanoma-related antigen encoding plasmid DNA: 50 μ g). N.T., no treatment. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 10$).

対して選択的かつ高効率に癌抗原発現遺伝子を導入することが不可欠である。一方、組織内に分布する抗原提示細胞数は極めて少なく、*in-vivo*において抗原提示細胞選択的かつ高い遺伝子導入を達成することは難しい。

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を用いた遺伝子導入では、樹状細胞への選択的かつ高効率な遺伝子導入が可能となるため、DNAワクチンへの応用が期待される。そこで、癌特異抗原発現プラスミドを用いて作製した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体によるDNAワクチン効果を評価した。メラノーマ関連抗原を発現するプラスミドを用いて超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体作製して評価した。その結果、製剤の静脈内投与と超音波照射併用により免疫誘導を施したマウス脾臓において、主要組織適合遺伝子複合体クラスI分子上への抗原提示が認められ、それに伴い、メラノーマ特異的なCTL活性の誘導が認められた⁴⁾。さらにメラノーマ特異的に高い腫瘍増殖抑制効果、ならびに生存日数の延長効果が固形腫瘍や転移性肺腫瘍に対して認められた(Fig. 3)⁴⁾。メラノーマは高転移・再発特性を有するため、

患者の予後が極めて悪い。その一方、様々な特異抗原の同定が進んでいる癌種であるため、転移・再発予防法としてのDNAワクチンの有効性が期待されている。従って超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用したDNAワクチンが、メラノーマの転移・再発に対する予防・治療法への発展が期待される。

4.2 細胞間接着分子の発現抑制に基づく抗炎症治療への応用

薬剤性肝炎や虚血再灌流性肝傷害は、臨床における薬物治療や生体肝移植などの外科手術時における有害事象として認識され、様々な薬物投与に伴うNF- κ B活性化や活性酸素誘導、およびそれに起因した炎症性サイトカイン産生によって惹起される。これらの炎症反応発生初期には、血管細胞接着分子や細胞間接着分子(ICAM)が肝臓の血管内皮細胞上に発現誘導され、好中球などの血管内皮細胞との接着、回転、ならびに組織内浸潤に関与することが報告されている。特にICAM-1は、炎症反応の重症化に繋がる好中球などの組織内浸潤に強く関与する分子であり、アンチセンスDNAによるICAM-1発現抑制や抗ICAM-1抗体によるICAM-1と好中球との

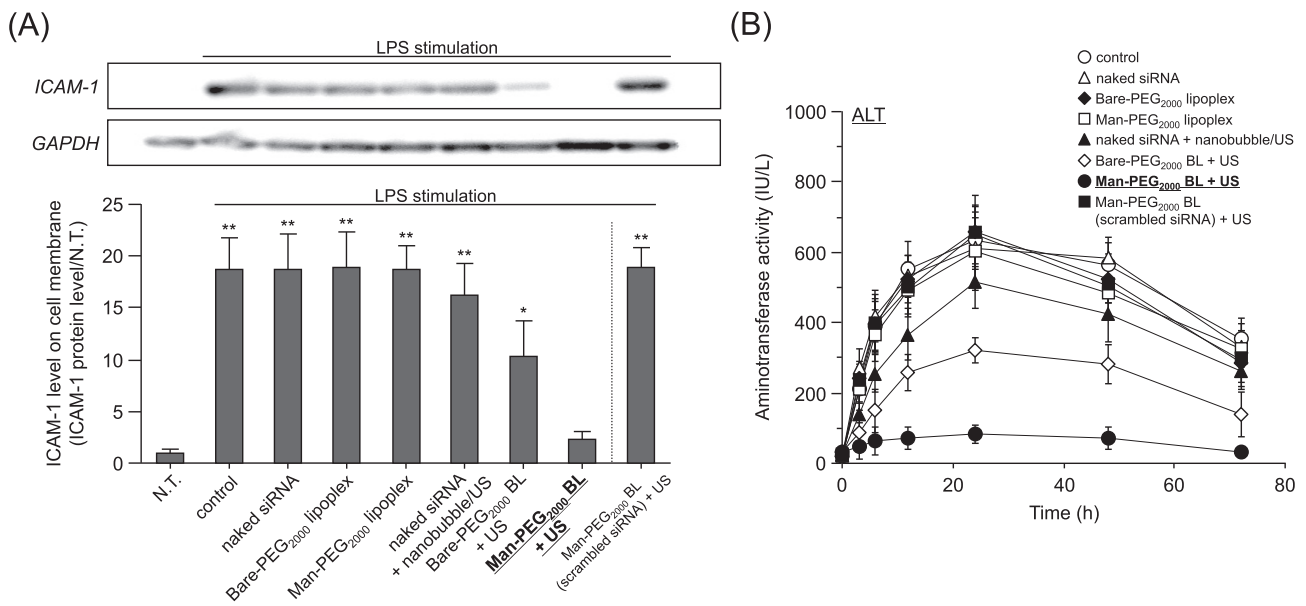


Fig. 4. Anti-inflammatory effects by US-responsive and mannose-modified lipoplexes complexed with ICAM-1 siRNA and US exposure. (A) The level of ICAM-1 expression obtained by siRNA delivery (10 μ g siRNA) using various types of methods in hepatic endothelial cells at 3 hr following LPS/D-galactosamine stimulation. (B) The level of ALT activities followed by siRNA delivery (10 μ g siRNA) using various types of methods following LPS/D-galactosamine stimulation. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with N.T. N.T., no treatment. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 5$).

相互作用の阻害による炎症反応の抑制に関する研究が近年進められている。

この肝血管内皮細胞には、マンノース受容体に基づく糖鎖認識機構が発達しており、マンノース修飾キャリアの標的細胞となり得る。そのため、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を用いた遺伝子導入法は、肝血管内皮細胞への選択的かつ高効率な遺伝子導入を可能にすると考えられる。そこで本方法を ICAM-1 に対する siRNA 送達に応用し、肝血管内皮細胞内に ICAM-1 siRNA を効率的に送達することによる抗炎症効果を評価した。超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達では、ICAM-1 発現を惹起するリポ多糖 (LPS) 誘導急性肝炎モデルマウスにおいて、細胞内 *icam-1* mRNA 発現量、ならびに細胞膜上の ICAM-1 発現量共に顕著に抑制されることが明らかとなった (Fig. 4)⁵⁾。さらに本方法を用いた ICAM-1 siRNA 送達による ICAM-1 発現抑制に伴い、好中球の組織内浸潤、ならびに炎症性サイトカイン産生が抑制され、その結果 LPS 誘導急性肝炎モデルマウスの炎症反応も顕著に抑制された (Fig. 4)⁵⁾。この方法では、前述と

同様、超音波照射に伴う超音波応答性リポソーム崩壊に起因して細胞膜上に一過性に生じる小孔を介して siRNA が細胞質内に直接導入される。ここで細胞質内は siRNA の機能発現部位であるため、本方法は siRNA 送達法として適していると言える。また、この抗炎症効果は四塩化炭素やジメチルニトロソアミン、虚血再灌流処理に基づく急性肝炎に対しても認められた⁵⁾。従って、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による抗炎症治療では、様々な急性肝炎および肝傷害に対して高い効果が期待される。

5. おわりに

筆者らは超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体の静脈内投与と体外からの超音波照射という極めて簡便な方法で、標的細胞選択的かつ飛躍的に高い遺伝子導入を達成可能であり、さらには疾患治療の応用することで優れた治療効果が得られることを示した。この方法論は、*in-vivo* 核酸送達の障壁である「標的細胞への選択的核酸送達」と「細胞質内への効率的核酸導入」を解決可能であるため、

これらの知見は新規遺伝子導入法開発に有用な情報を提供し得ると考えられる。また、マンノース分子を様々なリガンドに置換することで、多様な標的細胞に対して応用可能な汎用性の高いシステムであるため、癌や急性炎症のみならず慢性疾患や先天性疾患治療などの幅広い疾患への応用を今後期待したい。筆者は現在、国立医薬品食品衛生研究所薬品部において、奥田晴宏部長、加藤くみ子室長のご指導の下、DDS 製剤の品質評価に関する研究に携わっている。まだまだ微力ではあるが、これまでの経験を活かしながら、DDS 製剤開発の促進に貢献できればと願っている。

最後に本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科・橋田 充教授、山下富義准教授、川上 茂講師に深謝致します。併せて共同研究者としてご助言を賜りました帝京大学薬学部・丸山一雄教授、鈴木 亮講師に感謝致します。さらに、研究にご協力頂きました大学院生の方々に心より感謝の意を表します。また、この度コラム執筆の機会を与えて頂いた「薬剤学」編集委員の先生方に深く感謝致します。

引用文献

- 1) K. Un, S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy, *Biomaterials*, **31**, 7813–7826 (2010).
- 2) K. Un, S. Kawakami, M. Yoshida, Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes, *Biomaterials*, **32**, 4659–4669 (2011).
- 3) K. Un, S. Kawakami, Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure, *J. Control. Release*, **156**, 355–363 (2011).
- 4) K. Un, S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier, *Mol. Pharm.*, **8**, 543–554 (2011).
- 5) K. Un, S. Kawakami, M. Yoshida, Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Efficient suppression of murine ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation, *Hepatology*, (2012) in press.