

研究課題別評価

1. 研究課題名: ナノ複合体を用いた遺伝子治療による内科的再生医療

2. 氏名: 山本雅哉

3. 研究のねらい:

これまでの再生医療は、皮膚、軟骨、骨など、組織学的および機能的に単純な組織を対象として、外傷や外科手術によって失われた機能の回復を目的としている。本研究のねらいは、内科的なアプローチにより、慢性疾患に対して生体組織の再生を誘導する治療法、すなわち“内科的再生医療”を提案することである。これは、肝硬変、肺線維症、など難治性の慢性線維性疾患に対する根本的な治療策をもたない現在の外科的再生医療の問題を解決する、次世代の再生医療と位置付けることができるであろう。本研究では、こうした線維化を解消するためのキーとなる生体シグナル分子の遺伝子と水溶性高分子とのナノ複合体を用いたドラッグデリバリーシステムを開発し、標的部位に効率よく遺伝子を導入することによって、疾患治療を試みる。

4 研究成果:

4. 1. はじめに

遺伝子治療とは、遺伝子を人為的に補う、あるいは、遺伝子発現を人為的に制御することによって、細胞の機能をコントロールし、病気の治療を行う手段である。近年、分子生物学の進歩によって、新しい遺伝子の働きも解明され、遺伝子改変細胞を用いた細胞治療およびそれらの細胞の基礎生物医学研究への展開も期待されている。細胞への遺伝子導入法は、ウイルス法と非ウイルス法とに大別される。これまで、遺伝子発現効率の高いことから、主として、ウイルス法が用いられてきた。しかしながら、ウイルスの毒性や免疫原性などが問題であり、近年、遺伝子導入効率の高い非ウイルス性遺伝子キャリアの開発が望まれている。非ウイルス性遺伝子キャリアを用いた生体内遺伝子導入では、細胞とうまく遺伝子を相互作用させることに加えて、遺伝子の体内での安定性を高め、また遺伝子をいかに特定部位にターゲティングできるかが、遺伝子発現レベルを大きく左右する。例えば、カチオン性遺伝子キャリアは、タンパク質、脂質、血球細胞などの生体成分と相互作用しやすく、その体内動態の制御がきわめて難しい。本研究では、標的細胞に特異的に相互作用することのできる水溶性高分子として、プルランなどの多糖からなる非ウイルス性遺伝子キャリアを開発した。

4. 2. カチオン化プルランと遺伝子とからなるナノ複合体の作製

プルランは天然の多糖であり、肝臓に高い親和性をもつとともに、肝実質細胞に発現しているアシアロ糖タンパク質レセプターを介して肝細胞へ取り込まれることが知られている。そこで、このような特性をもつプルランを遺伝子キャリアとして利用すれば、遺伝子の肝臓へのターゲティングが可能になると考えられる。まず、非電荷親水性高分子であるプルランと遺伝子とをポリイオンコンプレックス形成させるために、反応試薬である *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) を用いてプルランの水酸基にスペルミンを導入した。得られたカチオン化プルラン誘導体のスペルミン導入率を元素分析法により定量したところ、表 1 に示すように、いずれの分子量のプルランでも反応条件によって、スペルミン導入率を変化させることができた。

表 1 異なるスペルミン導入率をもつカチオン化プルラン誘導体の作製

Pullulan Molecular weight	Molar ratio of pullulan hydroxyl groups to CDI ([CDI] / [OH])				
	0.5	1.0	1.5	3.0	5.0
5,900			12.9	18.8	
11,800			12.3	22.0	
22,800	2.7	5.6	11.0	23.0	32.5
47,300	1.1	6.0	12.3	20.4	32.9
112,000	2.2	7.4	10.7	26.3	33.1
212,000			9.7	30.7	

Spermine introduction was determined by the conventional elemental analysis.

次に、得られたカチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とを混合することによって、ポリイオンコンプレックスを形成させ、ナノ複合体を作製した。カチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA との混合比は、プラスミド DNA のリン酸基に対するプルラン誘導体のアミノ基のモル数の比(N/P

比)で定義した。表2は分子量の異なるカチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックスの見かけの分子サイズならびにゼータ電位を示す。分子量 5,900 および 11,800 のプルランでは、元のプラスミド DNA に比べて大きな分子サイズを認めたが、分子量が 22,800 から 212,000 のプルラン

では、分子サイズが 200~300 nm であった。プラスミド DNA はポリアニオンであるため、その分子鎖は、電気的反発力で広がっていると考えられる。カチオン化プルラン誘導体とのポリイオンコンプレックス形成により、電気的中和と分子鎖の

表2 異なる分子量ならびにスベルミン導入率をもつカチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックスの見かけの分子サイズとゼータ電位

Pullulan molecular weight	Molar ratio of pullulan hydroxyl groups to CDI ([CDI] / [OH])			
	1.0	1.5	3.0	5.0
5,900		1530 / +11.3 (12.9)		
11,800		1290 / +14.4 (12.3)		
22,800	2200 / +7.00 (5.60)	327 / +14.3 (11.0)	282 / +13.6 (23.0)	195 / +14.5 (32.5)
47,300	1280 / +9.04 (5.95)	246 / +15.0 (12.3)	205 / +16.0 (20.4)	282 / +16.8 (32.9)
112,000	1250 / +10.0 (7.35)	259 / +13.4 (10.7)	288 / +10.8 (26.3)	282 / +11.3 (33.1)
212,000		280 / +14.1 (9.74)		
Free plasmid DNA		410 / -14.7 (-)		

Apparent molecular size (nm) / zeta potential (mV) (spermine introduction)

らまりが起こり、この分子鎖の広がりが変化すると考えられる。分子量の低いプルランでは分子鎖が短く、十分にプラスミド DNA 分子を凝縮させることができないため、分子サイズが低下しなかったと考えられる。一方、分子量が大きくなると、ポリイオンコンプレックスによりプラスミド DNA 分子は効率よく凝縮され、分子サイズが低下したと考えられる。また、分子量 22,800、47,300 ならびに 112,000 のカチオン化プルラン誘導体について、異なるスベルミン導入率をもつプルラン誘導体を用いてポリイオンコンプレックスの分子サイズとゼータ電位とを測定した。その結果、スベルミン導入率の低いプルランでは、分子量が低いプルランを用いた場合と同様に、プラスミド DNA が凝縮されず、ポリイオンコンプレックスが凝集することによって、プラスミド DNA のみの場合と比較して、分子サイズが大きくなることがわかった。また、スベルミン導入率の低いプルラン誘導体では、カチオン性残基が少ないため、コンプレックスのゼータ電位の低いことがわかった。以下、カチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックスをナノ複合体と称する。

4. 3. カチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とのナノ複合体を用いた in vitro 遺伝子導入

得られたナノ複合体の物理化学的性質が細胞への遺伝子導入に与える影響について検討した。まず、プルランが結合することができるアシアロ糖タンパク質レセプターをもつ細胞である、ヒト肝がん細胞株 (HepG2 細胞) ならびにラット骨髄より単離した骨髄間質細胞 (MSC) を用いて、ナノ複合体を用いた in vitro の遺伝子導入について検討した。用いた遺伝子は、化学発光を利用して高感度で遺伝子発現レベルを評価することができる Luciferase タンパク質をコードするプラスミド DNA である。図1は、異なる分子量ならびにカチオン化度をもつカチオン化プルラン誘導体を用いた HepG2 細胞ならびに MSC における遺伝子発現レベルを示す。図から明らかなように、いずれの分子量のプルランを用いた場合も、プルランのカチオン化度に依存して遺伝子発現は変化した。また、最も高い遺伝子発現を示すカチオン化度は、用いたプルランの分子量により異なっていた。これまでに、遺伝子導入では、ポリイオンコンプレックスのサイズが 200 nm 程度で正に帯電している場合、高い遺伝子発現が得られることが知られている。表 2 に示すように、プルラン誘導体の分子量が 22,800 より高く、スベルミン導入率が 10% より高い場合、ポリイオンコンプレックスの分子サイズは、200~300 nm 程度、ゼータ電位は約 +15 mV であり、大きさやゼータ電位だけでは、図 1 で示した結果を説明することはできないことがわかった。おそらく、分子量やスベルミン導入率が高い場合、ポリイオンコンプレックスがより安定化され、細胞内で遺伝子がキャリアから解離しないため、遺伝子発現が低下したと考えられる。

一方、アシアロ糖タンパク質レセプターに結合するアシアロフェツインで処理した細胞に対して遺伝子導入を行ったところ、アシアロフェツインの濃度が高くなるにつれて、遺伝子発現の低下することがわかった。このことは、プルランを用いた肝細胞への遺伝子導入には、レセプターを介したナノ複合体と肝細胞との特異的な相互作用が関与していることを示している。また、細胞表

面に結合したナノ複合体は、クラスリンならびにカベオラの二つの経路を介して細胞内に取り込まれていることがわかった。さらに、異なる分子量をもつカチオン化プルランを用いて細胞への遺伝子導入と発現との関係を調べたところ、分子量 112,000 ならびに 212,000 のプルランを用いた場合、プラスミド DNA の取り込み率は約 20%と他の分子量のプルランを用いた場合よりも低いことがわかった。しかしながら、他の分子量のプルランでは、分子量ならびにスぺルミン導入率によらずプラスミド DNA の取り込み率は 65~80%であった。以上、ナノ複合体の物理化学的性質ならびに細胞への取り込み挙動の結果から、遺伝子発現の変化には、プラスミド DNA の取り込み以外に、細胞内での遺伝子の動態が影響を及ぼしていることがわかった。

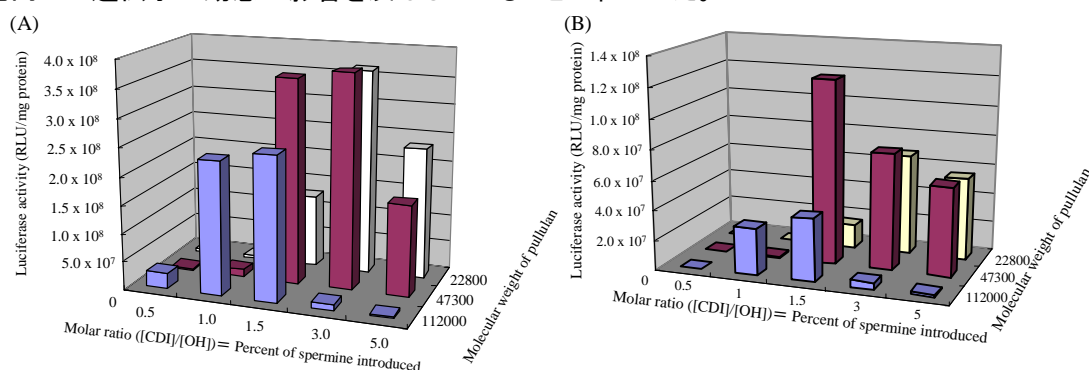


図1 カチオン化プルラン誘導体の分子量ならびにスぺルミン導入率がHepG2細胞(A)ならびにMSC(B)における *in vitro* 遺伝子導入に与える影響

4. 4. ナノ複合体を用いた肝臓への *in vivo* 遺伝子導入とその生物活性

肝臓は体内において代謝機能を担う重要な臓器であり、この代謝機能の異常、あるいは肝癌、肝硬変などが重篤な肝臓疾患として知られている。ナノ複合体を用いて肝臓への遺伝子ターゲティングが可能になれば、これらの疾患に対する遺伝子治療への応用も可能となる。上述したように、カチオン化プルラン誘導体を利用することによって、肝細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかになった。そこで、異なる分子量ならびにスぺルミン導入率をもつカチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とからなるポリイオンコンプレックスを用いて、マウスの肝臓への遺伝子導入を試みた。その結果、分子量、スぺルミン導入率、ならびに N/P 比を変化させることにより、ナノ複合体を用いた肝臓への遺伝子導入が変化することがわかった。また、最も高い遺伝子発現を示したナノ複合体の作製条件は、*in vitro* と *in vivo* とでは異なっていた。この遺伝子導入メカニズムについては、現在、検討中であるが、ナノ複合体の生体内での安定性と血中タンパク質との相互作用とのバランスが寄与していると考えられる。また、遺伝子治療の例として、最も高い遺伝子発現が得られたカチオン化プルラン誘導体を用いて、肝臓特異的にがんの転移抑制効果をもつタンパク質を発現させ、がん細胞の肝臓への転移抑制効果について検討した。その結果、ナノ複合体を静脈内投与 1 日後、リンパ腫細胞をマウスの静脈内移植したところ、生理食塩水ならびにプラスミド DNA 単独投与群と比べて、ナノ複合体投与群において、肝臓への転移が抑制され、担がんマウスの生存期間が延長した。このことは、ナノ複合体を用いて肝臓へ遺伝子導入することにより、肝臓における生物活性が増強され、がんの肝臓への転移が抑制されたことを示している。

4. 5. ナノ複合体を用いた肺への *in vivo* 遺伝子導入

経気管投与により肺へ遺伝子を導入する場合、口から肺組織の深部まで遺伝子を到達させる必要がある。このためには、解剖学的な知見から、遺伝子と遺伝子キャリアとのポリイオンコンプレックスのサイズは、数百ナノメートルオーダーのレベルが必要となる。加えて、生体成分との相互作用の少ない負に帯電していることが望ましいと考えられる。すなわち、肺への遺伝子導入を目的とするナノ複合体には、ナノメートルオーダーのサイズをもち、かつ生体成分との相互作用により凝集することがないシステムの創製が必要不可欠である。そこで、異なる分子量ならびにスぺルミン導入率をもつカチオン化プルラン誘導体とプラスミド DNA とからなるナノ複合体を用いて、マ

ウスの肺への遺伝子導入を試みた。その結果、分子量、スペルミン導入率、N/P 比、ならびにナノ複合体の作製方法を変化させることにより、ナノ複合体を用いた肺への遺伝子導入が変化することがわかった。具体的な結果は示さないが、ナノ複合体の作製方法を工夫することによって得られた負に帯電したポリイオンコンプレックスは、生体成分との相互作用が少なく、肺への効率よい遺伝子導入を可能にしたと考えられる。

5 自己評価:

研究開始時の目標は、(1)細胞特異的な遺伝子導入のための水溶性高分子からなるナノ複合体を作製すること、(2)ナノ複合体を用いた肝臓ならびに肺に対する *in vivo* 遺伝子導入法を確立すること、(3)慢性線維性疾患モデル動物に対して、ナノ複合体を用いて肝臓ならびに肺への *in vivo* 遺伝子導入を行い内科的再生医療を検討すること、の 3 点であった。上述の通り、研究期間を通じて、(1)に関しては、遺伝子発現メカニズムの研究は途中であるが、ほぼ達成できたと考えられる。しかしながら、(2)については、肝臓ならびに肺への *in vivo* 遺伝子導入が可能であるという知見は得られたものの、ナノ複合体の生体内での安定性の評価、遺伝子発現のメカニズム、ならびに組織学的なナノ複合体の分布と遺伝子発現細胞との関係など、課題が残った。(3)については、肝がんを例に、ナノ複合体を用いて肝臓へ機能遺伝子を導入することにより、疾患モデル動物に対する治療効果が得られることを明らかにできたが、(2)と同様に遺伝子発現メカニズムに関する研究に加えて、本研究の最終目標であった慢性線維症に対する治療効果を検討するという最大の課題を残す結果となった。一方、当初目標としていなかった、骨髄間葉系幹細胞など、再生医療に利用可能な細胞への遺伝子導入が可能であることがわかった。この知見を利用して、さきがけ研究とは関連しない研究ではあるが、研究室の他グループによって、機能遺伝子を導入した間葉系幹細胞を用いた細胞治療や培養基上へ遺伝子固定化技術などとして、現在、検討が進められている。本研究の最終目標である線維症治療の効果について、現在、検討しているところであり、今後、さらに研究を継続するつもりである。

6 研究総括の見解:

外科的な再生医療の困難な肝硬変、肺線維症などの慢性線維性疾患に対する新しい対応として、生体シグナル分子の遺伝子と水溶性高分子とのナノ複合体を用いたドラッグデリバリーシステムを開発することを研究の目的としている。

主要な研究成果として次の 2 点を挙げることが出来る。第 1 に肝臓に高い親和性を持つ多糖分子プルランに生体内ポリアミンの一つであるスペルミンを導入し、これとプラスミド DNA を混合して得られるポリイオンコンプレックスをヒト肝がん細胞株に適用し、遺伝子発現率を最大にする最適のスペルミン導入率が存在することを明らかにしたこと; 第 2 に、開発した物質をマウスの肝臓に適用し、遺伝子発現率を最大化する条件を求めたこと、である。実際リンパ腫細胞を静脈内から移植したマウスにおいて肝臓に転移する確率はナノ複合体の投与によって有意な生存期間の延長が認められた。

研究成果は 3 件の国際会議発表、招待講演 1 件、解説論文 1 篇のほか、2 篇の英文学術誌への原著論文掲載が決定している。これらを勘案し全体として予想の程度の成果が出ていると判断する。

7 主な論文等:

論文(原著論文)発表:

- Yamamoto, M. and Tabata, Y.: Tissue engineering by modulated gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* to be published.
- Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression. *J. Biomed. Nanotechnol.* to be published.

特許出願:2件

発 明 者: 山本雅哉、田畑泰彦

発明の名称: 核酸の肝臓へのターゲティング

出 願 人: JST、山本雅哉、田畑泰彦

出願番号(出願日): 特願 2003-414504(平成 15 年 12 月 12 日)

公開番号(公開日): 特開 2005-170877(平成 17 年 6 月 30 日)

発 明 者: 山本雅哉、田畑泰彦

発明の名称: 核酸の肝臓へのターゲティング

出 願 人: 国立大学法人京都大学

出願番号(出願日): 特願 2004-207329(平成 16 年 7 月 14 日)

公開番号(公開日): 特開 2006-028061(平成 18 年 2 月 2 日)

学会発表:14 件

国際学会:3 件

- Yamamoto, M., Jo, J., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression. 7th World Biomaterials Congress (2004.5.17-21 Sydney)
- Yamamoto, M., Jo, J., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y.: Polysaccharide-based non-viral gene delivery system for adult stem cells. 32nd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. (2005.6.18-22. Miami)
- Jo, J., Yamamoto, M., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y.: Effect of physicochemical properties of cationized pullulan complexed with plasmid DNA on the level of gene expression for mesenchymal stem cells. The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. (2005.11.18-23. Hawaii)

国内学会:10 件

招待講演(国内):1 件

- 山本雅哉、田畑泰彦: ドラッグデリバリーシステムを利用した慢性線維性疾患に対する内科的再生医療の試み、「第 21 回日本 DDS 学会」(2005.7.22-23. 長崎)

著作物:2 件

- 山本雅哉、田畑泰彦: 線維性慢性疾患に対する組織再生誘導治療. 日本 DDS 学会誌 20(2), 110-117 (2005).
- 山本雅哉: ナノ複合体を用いた遺伝子治療による内科的再生医療. Japan Nanonet Bulletin 第 90 号(2005).