

ベクターに対する生体反応の制御に基づく *In Vivo* 遺伝子発現の最適化

西川 元也

Optimization of *In Vivo* Gene Transfer through Regulating Biological Response to Vectors

Makiya NISHIKAWA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 3, 2006)

The spatiotemporal distribution of transgenes determines the therapeutic efficacy of *in vivo* gene transfer. The important parameters of gene transfer are the level, duration, and cell specificity of expression, and the number of transfected cells. Interaction of vectors with blood cells, antigen-presenting cells, serum proteins, and other biological components affects the tissue distribution of vectors and the profile of transgene expression. Although plasmid DNA is less immunogenic than viral vectors, it can induce inflammatory cytokine release, due mainly to the presence of unmethylated CpG dinucleotides (CpG motifs). It was clearly demonstrated that intravenous injection of a plasmid DNA/cationic liposome complex resulted not only in the induction of inflammatory cytokines, but also in the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) in the lung. Insertion of additional NF- κ B-binding sequences into conventional plasmid DNA resulted in a high transgene expression in the lung, suggesting that the biological response to vectors can be used to increase transgene expression. In a marked contrast to this strategy, long-term transgene expression was achieved by reducing the number of the CpG motifs in plasmid DNA. A plasmid encoding murine interferon (IFN)- β or IFN- γ with reduced numbers of CpG motifs was highly effective in inhibiting metastatic tumor growth in mice. These results clearly demonstrate the importance of the regulation of biological responses to plasmid vectors to optimize plasmid-based *in vivo* gene transfer.

Key words—gene therapy; immune response; CpG motif; inflammatory cytokines; hydrodynamics-based procedure; NF- κ B

1. はじめに

根治的な疾患治療法として多大な期待を集めた遺伝子治療は、臨床での有効性が報告されたものもあるが、全体的には当初の期待を十分に満たしているとは言い難い。特に、アデノウイルスベクターによる死亡事例やレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療での白血病の発症など、安全性に関する重大な問題が明らかとされてきた。こうした問題はベクターを改良する、あるいは新しいタイプのベクターを開発することで大幅に改善可能であり、本特集においても新規ベクターの有用性が示されている。その一方で、これら安全性に関する問題とは別に有効

性に関しても解決すべき問題点が残されている。有効な遺伝子治療の実現には、治療用遺伝子並びに発現タンパク質の時空間動態（遺伝子発現プロファイル）を対象疾患毎に厳密に制御することが必要であるが、これまでの膨大な研究にも係わらずその最適化は依然として遺伝子治療研究の最重要課題である。^{1,2)} *In vivo* での遺伝子発現プロファイルには、ベクターの体内動態やベクターに対する生体反応が影響を及ぼすことから、その最適化には *in vivo* での評価が必須である。このことも遺伝子治療法の開発を遅らせる一因と考えられる。

In vivo 遺伝子導入による疾患治療においては、ベクターに組み込まれた遺伝子が標的細胞内で転写・翻訳されて産生されるタンパク質の経時的濃度変化（時間的特性）及び体内での局在性（空間的特性）がその治療効果を決定する。²⁾ したがって、ベクターあるいは産生タンパク質の時空間動態制御に

京都大学大学院薬学研究科（〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29）

e-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS7で発表したものを中心に記述したものである。

よる遺伝子治療の最適化が可能と考えられ、新規ベクター・デリバリーシステム並びに新しい投与方法が開発されてきた。遺伝子治療を試みる上で重要となる遺伝子発現特性としては、遺伝子発現の標的細胞選択性、発現レベル、発現期間、発現細胞数が挙げられる (Table 1)。いずれも重要なパラメータであるが、対象疾患・治療遺伝子によってはかならずしも最適化の必要がない場合も考えられる。代替法として PEG 化製剤が利用可能な場合 (例えばアデノシンデアミナーゼなどの分泌型タンパク質など) には、遺伝子導入・発現細胞の特異性や数の重要性は低く、発現レベル及び発現期間が重要なパラメータと考えられる。³⁾ 一般的に、これらのパラメータに関してはウイルスベクターが優れており、高く持続的な遺伝子発現が必要とされない場合 (虚血性疾患に対する血管新生因子の導入など) を除き、非ウイルスベクターの利用は制限されている。したがって、安全性に優れる非ウイルスベクターの利用を進めるためには、遺伝子発現レベルの増大、並びに遺伝子発現期間の延長が重要である。

In vivo 遺伝子発現は、培養細胞での評価が可能なベクター固有の遺伝子導入・発現活性だけでなく、生体によるベクター認識、あるいは標的細胞以外の生体成分との相互作用によっても大きく影響される。⁴⁾ プラスミド DNA はウイルスベクターと比較して免疫原性や病原性が低いものの、細菌由来 DNA に特徴的な構造である非メチル化 CpG 配列

(CpG モチーフ) が原因となり、炎症性サイトカインの産生を誘導するなど強い生理活性を持つことも報告されている。そこで本稿では、このプラスミド DNA による炎症性サイトカイン産生を遺伝子発現増大に利用するアプローチと、CpG モチーフ数を削減したプラスミド DNA によるインターフェロン遺伝子発現の持続化に関するわれわれの検討結果を紹介する。

2. DNA 投与により産生されるサイトカインを利用した遺伝子発現の増強

2-1. DNA 複合体による炎症性サイトカイン産生

カチオン性リポソームとプラスミド DNA を複合体化することで効率的に培養細胞に遺伝子を導入・発現させることが可能であることが報告されて以来、様々な非ウイルスベクター・デリバリーシステムが開発されてきた。複合体化によるアプローチでは、カチオン性化合物を用いてプラスミド DNA 複合体に正の表面電荷を賦与することで負に帯電する細胞表面との相互作用を増大させ、DNA を細胞内にデリバリーすることが遺伝子発現につながるものとされる。カチオン性リポソームとプラスミド DNA との複合体 (リポプレックス) は、臨床応用が検討されるなど魅力的な非ウイルスベクターの 1 つであるが、解決すべき問題点として遺伝子発現レベルの低さが挙げられる。後述するようにハイドロダイナミクス法による遺伝子導入ではかならずしも遺伝子発現効率が低い訳ではないことから、リポプ

Table 1. Gene Transfer Characteristics that Affect the Efficacy of Gene Therapy

Problems		Possible solutions
Target cell-specific transgene expression	Expression in non-target cells, such as immune cells and germ cells, may cause adverse reactions, or inhibit transgene expression in target cells.	<ul style="list-style-type: none"> • Optimization of administration route/method • Development of cell-specific carrier/vector • Use of cell/tissue-specific promoters
Level of expression	The transgene expression is not sufficient to produce any significant therapeutic effects.	<ul style="list-style-type: none"> • Increase in the delivery efficiency of genes into the cell/nucleus • Use of highly active promoter
Duration of expression	Frequent administration may reduce the quality of life in patients.	<ul style="list-style-type: none"> • Controlled/sustained release of plasmid DNA • Increase in the stability of genes in administration sites and in the cells • Prevention of promoter attenuation/inactivation • Stabilization of transgene products • Extension of the life span of the cells expressing the transgene
Number of transfected cells	Gene transfer of intracellular proteins may not be effective, unless they are expressed in a vast majority of target cells.	<ul style="list-style-type: none"> • Optimization of administration route/method

レックスの遺伝子導入効率が低い原因は、ベクター（プラスミド DNA）ではなくむしろそのデリバリー効率にあるものと考えられる。培養細胞への遺伝子導入においては dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) を中性のヘルパー脂質として用いたりリポプレックスにより高い遺伝子発現を得ることが可能である。しかしながら、静脈内投与時には DOPE 含有リポプレックスが赤血球と融合することで結果的に遺伝子発現が低くなることが報告されており,⁵⁾ *in vivo* 遺伝子導入には利用できない。

リポプレックスのもう 1 つの問題として、腫瘍壊死因子 (TNF)- α やインターフェロン (IFN)- γ 、インターロイキン -12 などの炎症性サイトカインの産生が挙げられる。これはプラスミド DNA 中の CpG モチーフが、樹状細胞などに発現する Toll-like receptor (TLR)-9 に非自己として認識されることによるものと考えられている。⁶⁾ クロドロネート含有リポソームを静脈内投与することで脾臓マクロファージや肝 Kupffer 細胞を機能的に除去したマウスでは、血清中の炎症性サイトカイン濃度が大幅に低下することが示されており、リポプレックスによるサイトカインの産生にはこれら貪食細胞の関与が指摘されている。CpG モチーフを含むプラスミド DNA 単独 (naked DNA) を投与することでも

サイトカインが産生されるが、リポプレックス化により産生量は増大する。培養マクロファージ、樹状細胞を用いた検討からは、TLR-9 依存的な免疫応答だけでなく、TLR-9 非依存的な現象の関与も示されている。⁷⁻¹⁰⁾ 特にリポプレックスの場合には、CpG モチーフが存在しない場合にも免疫細胞が活性化することが明らかとなっており、現在その機構について詳細な検討を行っている。

われわれは、リポプレックスによる遺伝子発現の増強を目的に、静脈内投与後の遺伝子発現並びにリポプレックスに対する生体反応について評価した。検討には、CMV プロモータにドライブされたルシフェラーゼ cDNA をコードし、CpG モチーフを 846 個含有するプラスミド DNA (pCMV-Luc) を選択した。また、*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-*n,n,n*-trimethylammonium chloride (DOTMA) とコレステロール (Chol) からなるリポソームをカチオン性リポソームとして採用し、pCMV-Luc と混合することでリポプレックスを調製した。¹¹⁾ ¹¹¹In 標識プラスミド DNA からなるリポプレックスをマウス尾静脈内に投与したところ、リポプレックスは投与後速やかに肺に集積し、その後徐々に肝臓へ移行することが示された (Fig. 1)。最終的には、投与量の約 8% のプラスミド DNA が肺へ、約 50% が

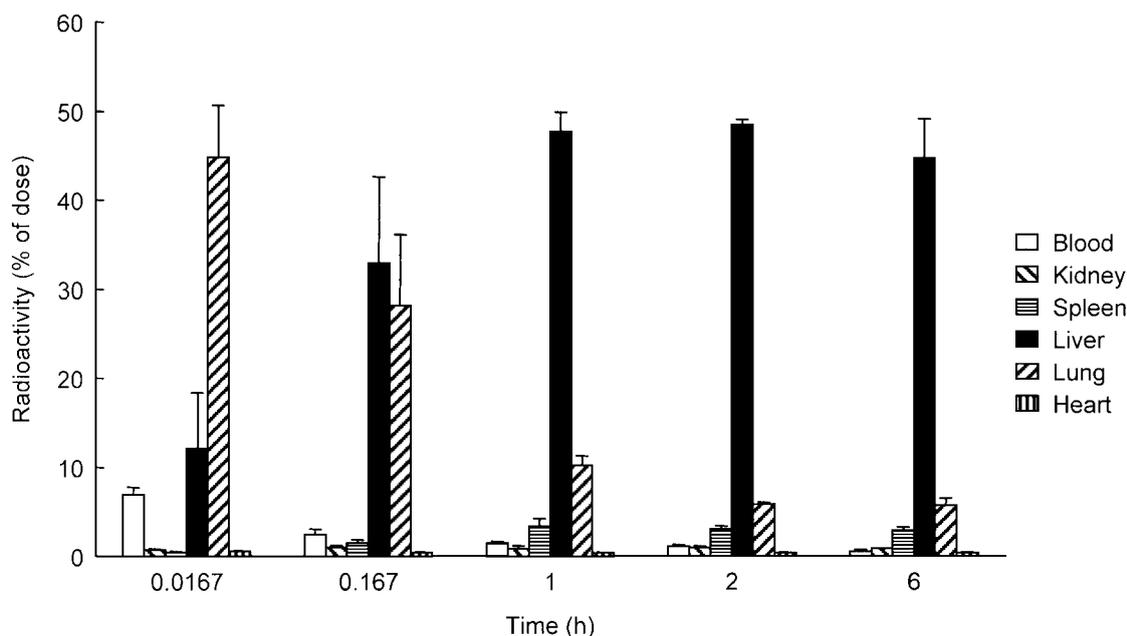


Fig. 1. Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection of ¹¹¹In-labeled Lipoplex in Mice

Mice received a DOTMA/Chol liposome-¹¹¹In-plasmid DNA complex at a dose of 25 μ g DNA/mouse. The blood concentration and tissue accumulation of radioactivity were determined at the indicated times. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice.

肝臓へ集積した。これまでの報告にあるように、リポプレックスを静脈内投与すると血液成分との相互作用の結果肺に一時的に集積し、肺毛細血管内皮細胞で遺伝子が発現する。われわれの検討においても、肺で一過性の遺伝子発現が得られた。一方、肝臓への集積には主に肝非実質細胞が関与し、TNF- α などのサイトカイン産生にはKupffer細胞が重要であることが報告されている。⁵⁾ 実際、リポプレックス投与後血清中TNF- α 濃度は速やかに上昇して2時間後にピークとなり、その後減少し投与24時間後にはほとんど検出されなかった。

2-2. 肺でのNF- κ B活性と遺伝子発現効率との相関 リポプレックス投与により産生されるTNF- α は、転写因子NF- κ Bの強力な活性化因子として知られる。NF- κ Bは活性化により核へ移行し、DNA上のNF- κ B結合配列に結合することでサイトカインを始め多くの遺伝子の転写を促進する。また、サイトメガロウイルス(CMV)などのウイルスのゲノムにもNF- κ B結合配列が存在し、NF- κ Bの活性化によりウイルス増殖が促進することも知られている。非ウイルスベクターによる遺伝子導入においては、多くの細胞で高い転写活性があるCMVプロモータが汎用される。したがって、リポプレックスの投与によりTNF- α が産生され、遺伝子導入細胞内でNF- κ Bが活性化されると、CMVプロモータにドライブされた導入遺伝子の発現の亢進が想定される。そこでわれわれは、リポプレックスを静脈内投与したときの遺伝子発現臓器である肺で、リポプレックスの投与によりNF- κ Bが活性化するかについて検討した。Figure 2に示すように、核内でNF- κ Bが検出されたことから、リポプレックスの投与により肺でNF- κ Bが活性化することが明らかとなった。NF- κ Bを活性化することが知られるリポ多糖(LPS)を前投与したマウス肺では、さらに顕著なNF- κ B活性化が認められた。このとき、NF- κ B結合配列を含む放射標識オリゴヌクレオチド(ODN)と核タンパク質との結合は、過剰量の非標識ODNの添加により消失したが、pCMV-Lucによっても完全に消失した。このことから、NF- κ BがpCMV-Lucに結合することが明らかとなった。これは、pCMV-LucのCMVプロモータに存在する4個のNF- κ B結合配列を介した結合であると推察され、この結合により遺伝子発現が影響を受ける

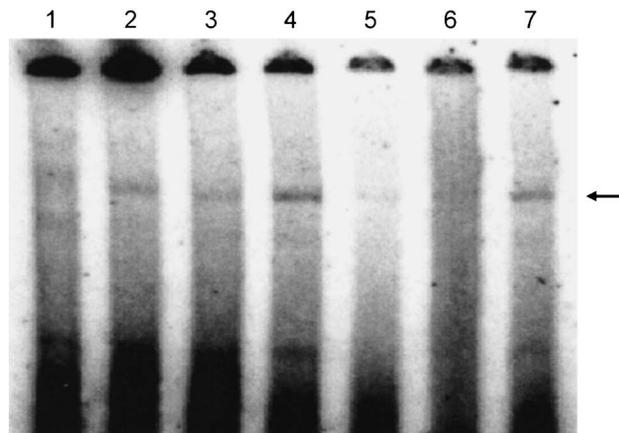


Fig. 2. Analysis of NF- κ B Activity in Mouse Lung after Intravenous Injection of Lipoplex

Lung was harvested from mice and nuclear protein extracts were analyzed by EMSA. Lane 1: untreated mouse, Lanes 2, 3; pairs of mice each received the lipoplex intravenously, Lane 4: mice received 200 μ g LPS 30 min before injection of the lipoplex, Lane 5: the sample from 4 was electrophoresed with a 100-fold excess of unlabeled ODN with an NF- κ B binding sequence, Lane 6: the sample from 4 was electrophoresed with a 10-fold excess of pCMV-Luc, Lane 7: the sample from 4 was electrophoresed with a 100-fold excess of unlabeled ODN with a random sequence. Arrow indicates the NF- κ B band. Cited from *J. Gene Med.*, 8 (1), 53-62 (2005).

ことが考えられた。

そこで、肺でのNF- κ B活性と遺伝子発現との相関を明らかにするために、LPS投与による遺伝子発現への影響について検討した。遺伝子導入前あるいは後にLPSを投与することで、肺での遺伝子発現が有意に増大した(Fig. 3)。以上の結果から、肺でのNF- κ B活性と遺伝子発現の間には正の相関があることが示唆された。

2-3. NF- κ B活性に感受性の高いプラスミドDNAの開発 遺伝子治療を目的として用いられるプラスミドDNAには発現効率の高さからCMVプロモータが汎用されるが、前述の通りこのプロモータにはNF- κ B結合配列が4個存在する。われわれは、NF- κ B結合配列をプラスミドDNAに追加することで、リポプレックス投与により活性化するNF- κ Bをより効率的に遺伝子発現増大に利用できないかと考えた。そこで、CMVプロモータの上流に5個のNF- κ B結合配列を新たに挿入した新規プラスミドpCMV- κ B₅-Lucを構築した。核タンパク質と放射標識ODNとを用いた結合実験の結果、pCMV-Lucと比較してpCMV- κ B₅-LucはNF- κ Bとの結合性が增大することが確認された。そこでリポプレックスとしてマウス静脈内に投与したところ、約5倍高い遺伝子発現が得られた(Fig. 4)。

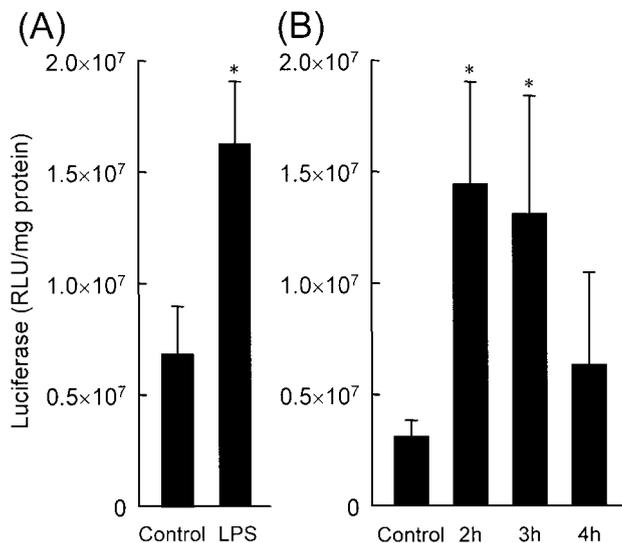


Fig. 3. Effect of LPS on Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of the Lipoplex

(A) At 30 min before injection of the lipoplex, mice received saline (control) or 200 μ g LPS. (B) Mice received 200 μ g LPS at the indicated times post-intravenous injection of the lipoplex. At 6 h after injection, mice were killed and the lungs were harvested for luciferase assay. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. * p < 0.05 (vs. the control group). Cited from *J. Gene Med.*, 8(1), 53-62 (2005).

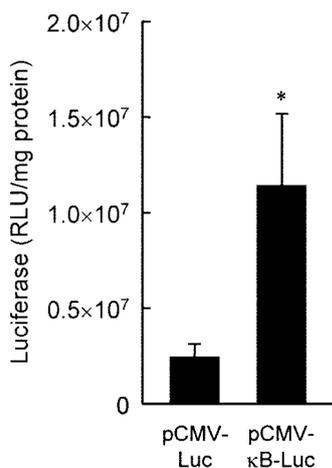


Fig. 4. Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of pCMV-Luc or pCMV- κ B₅-Luc

Each group of mice received a lipoplex composed of the indicated plasmid DNA at a dose of 25 μ g DNA/mouse. At 6 h after injection, mice were killed and the lungs were harvested for luciferase assay. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. * p < 0.05 (vs. pCMV-Luc group). Cited from *J. Gene Med.*, 8(1), 53-62 (2005).

このアプローチは、リポプレックス投与後の肺での遺伝子発現に限らず、NF- κ B 活性が高い環境下において幅広く有効と考えられる。癌細胞ではしばしば NF- κ B の恒常的な活性化が報告されていることから、癌細胞での遺伝子発現の増大に利用できるものと期待される。われわれはマウス結腸癌細胞

colon26 を用いた予備的な検討から、NF- κ B が恒常的に活性化している癌細胞では、挿入した NF- κ B 結合配列数に依存して遺伝子発現が増大することを明らかにしている。

3. CpG モチーフ数の削減による遺伝子発現の持続化

ベクター投与により大量の炎症性サイトカインが産生されることは、遺伝子治療にはかならずしも好ましいことではない。¹²⁾ 特に炎症性サイトカインが薬理効果に有利に作用しない場合には、極力その産生を抑制することが望ましいと考えられる。CpG モチーフ数に依存して炎症性サイトカインが産生されること、またその産生はリポプレックス化により飛躍的に増大することから、ベクター投与による炎症性サイトカインの産生を抑制するには、naked DNA を用いること、CpG モチーフ数を減らすことが重要と考えられる。

1999 年に Liu ら¹³⁾ と Wolff ら¹⁴⁾ によりハイドロダイナミクス法が開発され、これにより他の非ウイルスベクターによる遺伝子導入方法と比較して圧倒的に高い遺伝子発現が得られるようになった。本法では、生理食塩水に溶解した naked DNA を急速にマウス尾静脈内に注射することで肝臓で非常に高い遺伝子発現が得られる。Figure 5 には、各種非ウイルス型遺伝子導入法による遺伝子発現レベルを示すが、ハイドロダイナミクス法により、数オーダー以上高い遺伝子発現（ホタルルシフェラーゼ活性）が得られる。このように本手法により圧倒的に高い遺伝子発現が得られることから、多くの研究で遺伝子導入法として利用されてきた。¹⁵⁾ われわれも、IFN 癌遺伝子治療に関する検討を行い、マウス IFN- β 又は IFN- γ を発現するプラスミド DNA (pCMV-Mu β 及び pCMV-Mu γ) をハイドロダイナミクス法により担癌マウスに投与することで高い抗腫瘍効果を得ている。¹⁶⁾ しかしながら、その発現が一過性であったことから、遺伝子発現が高い肝臓への癌転移は効率よく抑制できた (Fig. 6) もの、肺への転移にはあまり有効ではなかった。

IFN 癌遺伝子治療効果は、遺伝子発現を持続化することで大幅に改善可能と考えられる。遺伝子発現の持続化に関しては種々のアプローチが考えられるが、³⁾ 遺伝子発現レベルを損なうことなく持続化することは容易ではない。前述のように、CpG モ

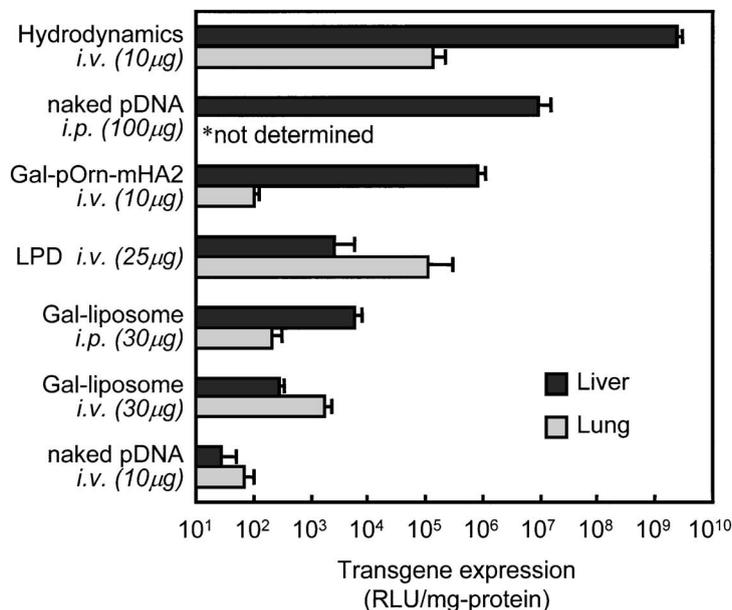


Fig. 5. Comparison of Transgene Expression Produced by Various Nonviral Gene Delivery Approaches

Plasmid DNA encoding firefly luciferase cDNA was administered as the naked or complex form to mice, and the luciferase activity in the organs indicated was measured. Gal-pOrn-mHA2, galactosylated poly (L-ornithine) modified with a fusigenic HA2 peptide; LPD, plasmid DNA complexed with protamine and DOTAP liposome; Gal-liposome, cationic galactosylated liposomes composed of DOTMA, cholesterol and galactosylated cholesterol derivative. Cited from *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(5), 713–731 (2005).

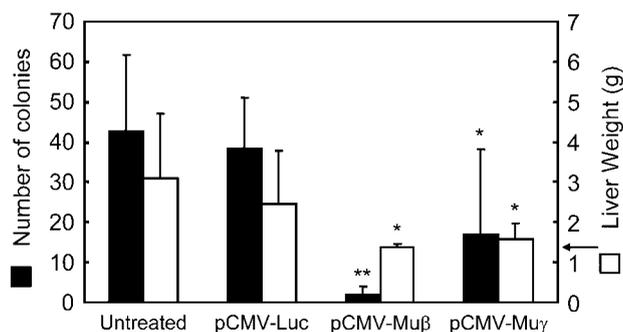


Fig. 6. Inhibition of Hepatic Metastasis of Tumor Cells by IFN-expressing Plasmid DNA

Mice were inoculated with 1×10^5 CT-26 into the portal vein, and received 10 μ g pCMV-Mu β or pCMV-Mu γ by the hydrodynamics-based procedure on days 1, 3, 5, 7, and 9. On day 17, mice were sacrificed, and the number of metastatic colonies on liver surface was counted and the liver weight was measured. The results are expressed as the means \pm S.D. of at least five mice. Arrow indicates the average liver weight of age-matched normal mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. the untreated group). Cited from *Mol. Ther.*, 57(5), 713–731 (2002).

チーフにより誘導される炎症性サイトカインは、pCMV- κ B₅-Luc を用いた検討で示されたように遺伝子発現を増大させる一方で、長期の遺伝子発現に対しては抑制的に作用する場合も報告されている。また、外来遺伝子に対する防御機構としてメチル化酵素が作用し、プラスミド DNA 中の CpG モチーフのメチル化により遺伝子発現が抑制されることも示されている。したがって、遺伝子発現の持続化に

はプラスミド DNA 中の CpG モチーフ数を削減することが有効と考えられる。¹⁷⁾ そこでわれわれは、CpG モチーフ数を大幅に減少したプラスミド DNA を構築し、IFN 癌遺伝子治療効果の増強を試みた。CpG モチーフ数削減プラスミド DNA として Genzyme 社が開発した pGZB ベクターを採用し、ホタルルシフェラーゼ又は IFN- β , IFN- γ 発現プラスミド DNA (pGZB-Luc, pGZB-Mu β , pGZB-Mu γ) を構築した (Fig. 7)。

3-1. 炎症性サイトカイン産生に対する CpG モチーフ数の影響 マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いた検討では、CpG モチーフをほとんど含まない牛胸腺 DNA の添加では有意な TNF- α 産生は認められなかったが、CpG モチーフを多数含む pCMV-Luc により TNF- α が産生された。また、この反応はリポプレックス化により顕著に増大した。一方、培養マウス腹腔マクロファージを用いた検討では、pCMV-Luc を naked DNA として添加しても有意な TNF- α が産生されないことを明らかにしている。^{7,9,10)} 最近、TLR-9 発現データの解析から、腹腔マクロファージでは TLR-9 の発現レベルが低く、これが CpG モチーフに反応しない一因であることを示唆する結果を得ている。その一方で、pCMV-Luc からなるリポプレックスでは腹

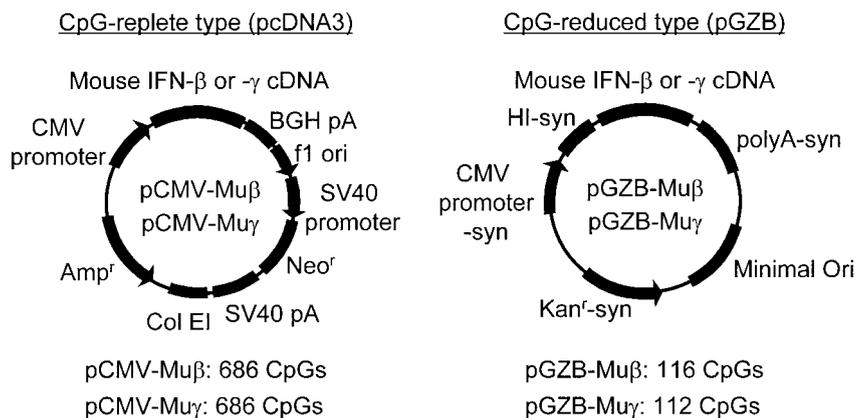


Fig. 7. Construction of IFN-expressing Plasmid DNA with Reduced Numbers of CpG Motifs

Mouse IFN-β or IFN-γ cDNA fragment was inserted into CpG-replete pcDNA3 or CpG-reduced pGZB. The numbers of CpG motifs in each plasmid DNA are indicated. HI: hybrid intron, -syn: synthetic.

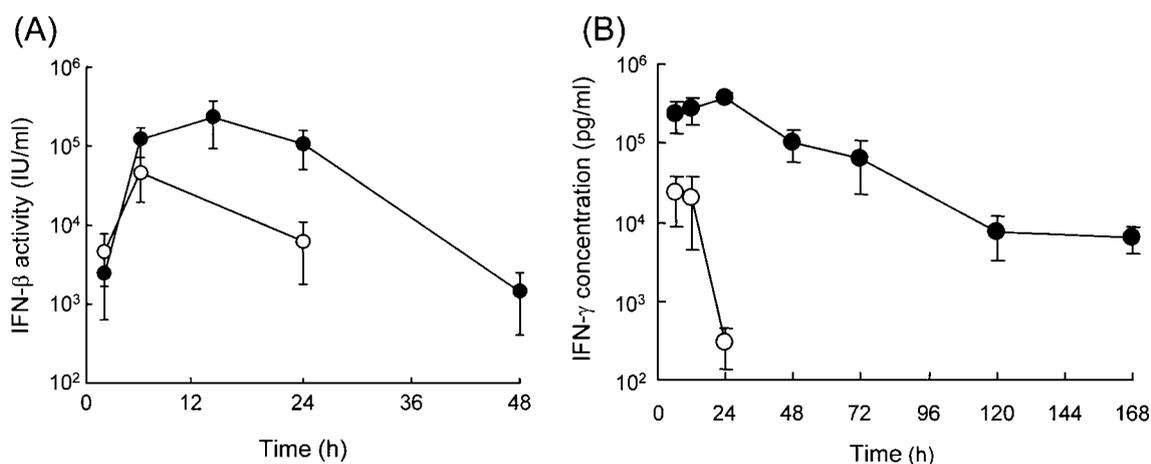


Fig. 8. Transgene Expression Profiles after Administration of IFN-expressing Plasmid DNA

(A) After intravenous injection of IFN-β-expressing plasmid DNA (10 μg) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN-β activity was measured. (B) After intravenous injection of IFN-γ-expressing plasmid DNA (1 μg) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN-γ concentration was measured. The results are expressed as the mean ± S.D. of three mice. ○: pCMV-Muβ, pCMV-Muγ, ●: pGZB-Muβ, pGZB-Muγ.

腔マクロファージから多量の TNF-α が産生され、またこの反応が TLR-9 ノックアウトマウス由来のマクロファージでも認められるなど、TLR-9 に依存しない反応経路の関与も明らかとなっている。¹⁰⁾

In vivo においても、naked pCMV-Luc の静脈内投与により血清中 TNF-α レベルが増大したが、牛胸腺 DNA の場合には有意な上昇は認められなかった。そこで、CpG モチーフ数を削減した pGZB-Luc を naked あるいはリポプレックスとして投与したところ、血清中 TNF-α 濃度はいずれの投与形態の場合にも pCMV-Luc の場合の 20–45% 程度であった。これは、各プラスミド中の CpG モチーフの割合 (pCMV-Luc, 6%; pGZB-Luc, 3%) と対応する値であった。中でもハイドロダイナミクス法で

naked pGZB-Luc を投与した場合には TNF-α は検出限界 (17 pg/ml) 以下であり、TNF-α による遺伝子発現への影響は非常に小さいことが推察された。

3-2. CpG モチーフ数削減による遺伝子発現の持続化と抗腫瘍効果の増強 pGZB-Muβ 又は pGZB-Muγ をハイドロダイナミクス法でマウスに投与したところ、いずれの場合にも対照群と比較して持続的な血清中 IFN 活性 (濃度) が検出された (Fig. 8)。IFN-β 活性の最大値は約 5 倍であり、約 8 倍大きい血漿中濃度—時間曲線下面積 (AUC) 並びに約 2 倍長い平均滞留時間 (MRT) を示した。血清中 IFN-γ 濃度にはさらに顕著な違いが認められ、AUC 及び MRT はそれぞれ約 20 倍、約 3 倍であった。遺伝子発現プロファイルの違いを反映して、

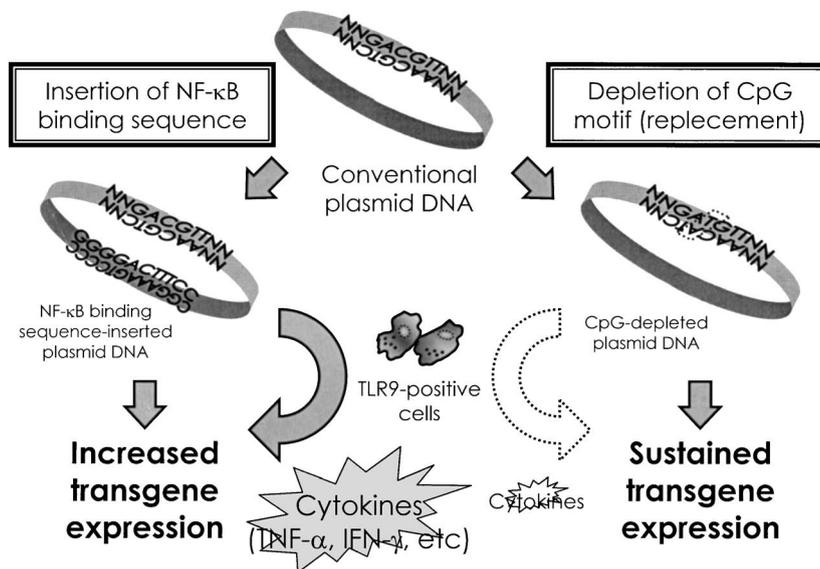


Fig. 9. Optimization of *In Vivo* Gene Transfer through Regulating Biological Response to Vectors

Immune cells recognize CpG motifs in plasmid DNA and secrete inflammatory cytokines, which greatly affect transgene expression. (A) NF- κ B in target cells (lung endothelial cells) is activated by inflammatory cytokines, so a higher transgene expression can be obtained by adding NF- κ B binding sequences to plasmid DNA. (B) Reducing the number of CpG motifs in plasmid DNA results in less production of inflammatory cytokines and prolonged transgene expression.

pGZB ベクター投与群ではより高い抗腫瘍効果が認められた。マウス結腸癌細胞 CT-26 を尾静脈内に移植することで作成した肺転移モデルマウスでの検討から、肺表面の転移結節数の有意な減少並びに生存日数の著明な延長が認められた。

4. おわりに

本稿では、プラスミド DNA を用いる遺伝子導入の際に重要な生体反応として CpG モチーフに対する免疫反応を取り上げ、この応答を積極的に利用することによる遺伝子発現増大と、回避することによる遺伝子発現持続化についてわれわれの試みを紹介した (Fig. 9)。*In vivo* 遺伝子導入による遺伝子治療の実現には多くの問題が残されるが、対象疾患、対象遺伝子/タンパク質によってはずいぶんと遺伝子治療実現の可能性が高くなりつつある。英国ではハイドロダイナミクス法の原理を利用したヒト臨床研究がスタートし¹⁸⁾、重大な副作用がないこと、遺伝子発現が検出可能であったことが報告された。Naked DNA は最も安全な遺伝子ベクターと考えられることから、今後の遺伝子投与技術の進展とベクターデザインの最適化により有効な遺伝子治療法になり得るものと期待する。

REFERENCES

- 1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861–870 (2001).
- 2) Nishikawa M., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 275–283 (2002).
- 3) Nishikawa M., Takakura Y., *Gene Med. MOOK*, **5**, 118–123 (2006).
- 4) Opanasopit P., Nishikawa M., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**, 191–233 (2002).
- 5) Sakurai F., Nishioka T., Saito H., Baba T., Okuda A., Matsumoto O., Taga T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., *Gene Ther.*, **8**, 677–686 (2001).
- 6) Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A., Klinman D. M., *Nature*, **374**, 546–549 (1995).
- 7) Yasuda K., Ogawa Y., Kishimoto M., Takagi T., Hashida M., Takakura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 344–348 (2002).
- 8) Yoshinaga T., Yasuda K., Ogawa Y., Takakura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**, 389–394 (2002).
- 9) Yasuda K., Kawano H., Yamane I., Ogawa Y., Yoshinaga T., Nishikawa M., Takakura Y., *Immunology*, **111**, 282–290 (2004).
- 10) Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y., *J. Leukoc. Biol.*, **77**, 71–79

- (2005).
- 11) Kuramoto T., Nishikawa M., Thanaketaipaisarn O., Okabe T., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **8**, 53–62 (2006).
 - 12) Tan Y., Li S., Pitt B. R., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2153–2161 (1999).
 - 13) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
 - 14) Zhang G., Budker V., Wolff J. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1735–1737 (1999).
 - 15) Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 713–731 (2005).
 - 16) Kobayashi N., Kuramoto T., Chen S., Watanabe Y., Takakura Y., *Mol. Ther.*, **6**, 737–744 (2002).
 - 17) Yew N. S., Cheng S. H., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **1**, 115–125 (2004).
 - 18) ASGT News, Summer 2006 (http://www.asgt.org/am06/asgt_news/complete.php).