

多機能性エンベロープ型人工遺伝子デリバリーシステムの創製

原島秀吉,* 小暮健太郎, 山田勇磨, 秋田英万, 紙谷浩之

Development of Multifunctional Envelope Type Artificial
Viral like Gene Delivery SystemHideyoshi HARASHIMA,* Kentaro KOGURE, Yuma YAMADA,
Hidetaka AKITA, and Hiroyuki KAMIYAFaculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Nishi 6, Kita 12,
Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

(Received June 25, 2007)

This review introduces a new concept “Programmed Packaging” to develop a non-viral gene delivery system. Based on this concept, multifunctional envelope type nano devices (MEND) were developed for *in vitro*, *in situ* and *in vivo* conditions. A quantitative study to identify a rate limiting step in intracellular trafficking was also shown between viral and non-viral vectors, which indicated an important role of controlled intranuclear disposition for development a safe and efficient non-viral gene delivery system. This review will provide a future direction of non-viral gene delivery system.

Key words—gene delivery; Programmed Packaging; controlled intracellular trafficking; mitochondria; intranuclear disposition

序 論

20 世紀, 人類は月への飛行を実現した. 21 世紀はマイクロ (あるいはナノ) の世界への挑戦の世紀となることが予想される. 遺伝子治療や再生医療のような先端医療を実現するためには, 生体内のマイクロやナノの空間を制御する技術の確立が不可欠である. われわれは, 遺伝子 (あるいは機能性核酸など) を細胞内の標的部位へ送達し, その機能発現を制御可能なシステムの開発を目標に研究を行ってきた. 本総説では, そのようなシステムを創製するために, われわれがどのようなコンセプトに基づいて研究を進めているのか, 現時点でどこまでが可能で, どこが関門となっているかを, 分かり易く概説した.

1. 新しい Packaging コンセプト

人工遺伝子デリバリーシステムが, 外来遺伝子を標的とする組織さらには細胞の核まで送達する過程には, 数多くのバリアが存在する. 例えば, 標的臓

器・組織に効率よく送達するためには, 細網内皮系などの排除機構を回避しなければならず, さらにその後には, 標的細胞を特異的に認識し効率よく取り込まれる必要がある. 細胞に取り込まれたのちも, エンドソームなどの膜小胞から細胞質へと脱出せねばならず, 最終的には 2 枚ある核膜を突破して遺伝子発現を誘導する必要がある. このように, 人工遺伝子デリバリーシステムによって標的細胞において目的の遺伝子を発現させるためには, 体内動態と細胞内動態の両者における多くのバリアを突破する必要がある (Fig. 1).¹⁾

そのため, これまでに多くの研究者によって, これらのバリアを突破するための様々な機能性素子が開発されている.²⁾ 例えば, 血中滞留性を向上させるためのポリエチレングリコール (PEG), 特異的に細胞を認識するための抗体分子や, 細胞表面に豊富に発現する特異的レセプターのリガンド (EGF やトランスフェリンなど), 細胞への高い親和性によって細胞取り込みを促進する細胞膜透過性ペプチド (Tat やポリアルギニンペプチド), エンドソーム脱出を促進するための pH 応答性膜融合ペプチド (GALA), 核移行を促進するための核局在化シグ

北海道大学大学院薬学研究院 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

*e-mail: harasima@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は, 平成 19 年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである.

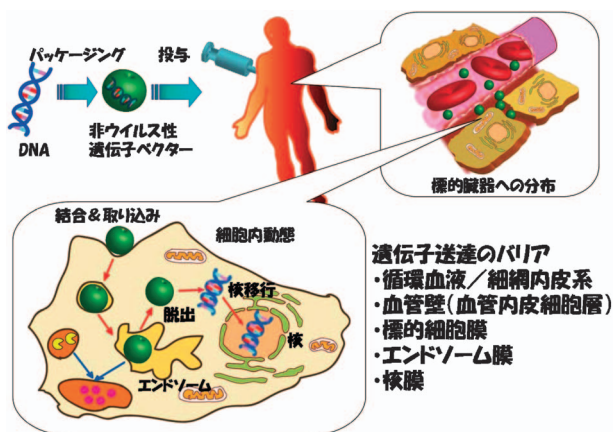


Fig. 1. Various Barriers of Efficient Gene Delivery by Artificial Delivery System

ナル (NLS) などが知られている。²⁾ これまでは、これら様々な機能性素子の1つあるいは複数を組み込んだDNA複合体が人工遺伝子デリバリーシステムとして用いられてきたが、従来の技術では目的に合わせて適切な場所や時間において機能を発揮すべき機能性素子が、1つの複合体中に混在した形では調製することができなかった。³⁾ しかし、核内まで遺伝子を送達するためには、1つのナノサイズの粒子に、すべてのバリア突破に必要な機能性素子を、効率よく機能できるような形でパッケージしなければならない。そこで、われわれは理想的な人工遺伝子デリバリーシステムを構築するための新しいパッケージングコンセプトとして「Programmed Packaging」を提唱した。⁴⁾ Programmed Packagingは、1) 体内動態・細胞内動態メカニズムに立脚した各バリア突破のための戦略立案 (Programming), 2) 戦略実現に必要な新規機能性素子の分子設計と各機能性素子を合理的に配置したキャリアの設計 (Molecular Design), 3) これらをナノ空間にアセンブルするナノテクノロジー (Packaging), からなる。

このような設計コンセプトを実現するために最適な構造として、インフルエンザウイルスなどのエンベロープ型ウイルスの構造特性に着目した。エンベロープ型ウイルスは、見事にゲノムDNAをコンパクト化したキャプシド構造 (コア) とそれを取り囲むエンベロープ構造からなり、さらにエンベロープ上にはヘマグルチニンなどの細胞結合やエンドソーム脱出のための機能性素子が配置されている。われ

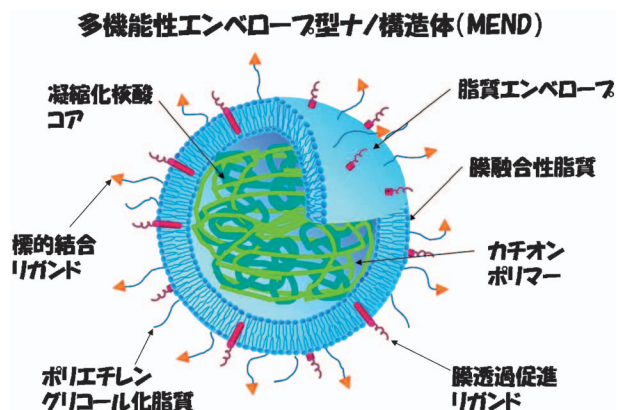


Fig. 2. Schematic Representation of Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND)

The MEND consists of condensed nucleotides core, coated with a lipid envelope equipped with functional devices, such as polyethylene glycol (PEG) for long blood circulation, pH-sensitive fusogenic peptide for endosomal escape and protein transduction domain peptide for cellular entry.

われは、このエンベロープ型ウイルスの構造を参考に、Fig. 2に示すような新しいタイプの人工遺伝子デリバリーシステムとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND: multifunctional envelope-type nano device)を設計した (Fig. 2).^{1,4-10)} MENDは、エンベロープウイルスのように核酸 (DNA及びRNA) とポリカチオンからなるナノ粒子のコアが、脂質エンベロープ膜に内封された構造を有しており、コアとエンベロープには、NLS, PEGあるいは特異的リガンドなど多種類の機能性素子をトポロジーを考慮して配置することが可能である。また、DNAなどの核酸をナノ粒子化する利点は、分解酵素などからの保護、高い封入効率、サイズの縮小など多数あり、これらのことからエンベロープ型の構造は、極めて合理的であると考えられる。

このように設計 (Molecular Design) した MENDを構築するために、われわれは新たな構築技術 (Packaging)を開発した。これまでに Cullis らのグループによって、リポソーム中にフリーのプラスミド DNA を封入する方法として界面活性剤除去法が報告されていた。¹¹⁾ 界面活性剤除去法は、カチオン脂質/プラスミド DNA/界面活性剤からなる混合ミセル溶液から透析により界面活性剤を除去し、リポソームにプラスミド DNA を封入する方法である。しかしこの方法は、核酸ナノ粒子コアを封入する方法としては適していなかったため、界面活性剤を豊富に含む小さいリポソーム「SUV*」が界面活

性剤除去により融合することを利用して、負電荷 SUV* と正電荷コアの混合物から界面活性剤除去により膜融合を誘起し、コアを脂質コートする方法を考案した (Fig. 3). この方法で得られたものについて、粒子径・ゼータ電位測定及びシヨ糖密度勾配分画解析を行ったところ、コアが脂質でコートされていることが確認され、MEND の構築に成功したことが明らかとなった.⁶⁾ われわれはこの SUV* の膜融合を利用した MEND の構築方法を「SUV* fusion」と命名した.

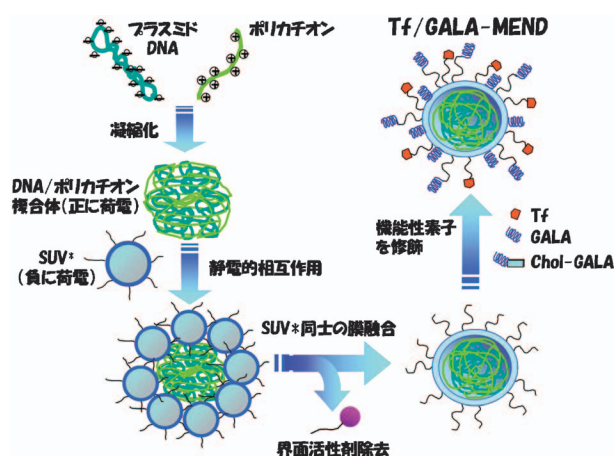


Fig. 3. Construction of MEND by a SUV* fusion Method

The SUV* fusion method consists of three steps, i.e., 1) DNA condensation with a polycation, 2) electrostatic interaction of the charged SUV* with a DNA/polycation complex (DPC), and 3) lipid coating of the DPC due to fusion of the SUV* by detergent removal. After lipid coating, the MEND can be equipped with various functional devices, such as Tf and GALA peptides.

しかし、SUV* fusion 法は、DNA の封入率があまり高くない (30%) ため、より簡便でしかも封入効率の高い方法が必要である。そこでわれわれは、核酸ナノ粒子 (コア) と脂質膜との静電的相互作用を利用した脂質膜水和法を考案した.⁵⁾ 正電荷を有するコア (図中は DNA/ポリカチオン複合体) を、負電荷脂質を含む乾燥脂質薄膜に添加して水和させるとともに、静電的に脂質膜表面にコアを結合させたのち、弱い超音波照射によりコアを脂質でコートする訳である (Fig. 4). 得られた MEND は、ヘテロではあるが 70–90% もの高い封入率を得ることに成功した。このように、われわれは従来の方法では不可能であった核酸ナノ粒子 (コア) を脂質エンベロープにパッケージする新しい技術の確立に成功した。

2. R8-MEND と Tf/GALA-MEND

Programming において、細胞内導入経路の選択は、遺伝子デリバリーシステムの細胞内運命を左右するため重要であり、大きく分けて 2 つある (Fig. 5). われわれは、これら 2 つの経路を介する送達戦略 (Programming) を実現するために、2 種類の MEND を設計した。

2-1. レセプター介在性エンドサイトーシス経路

この経路は、MEND 表面に提示したリガンドを、細胞表面に存在するレセプターに結合させることで

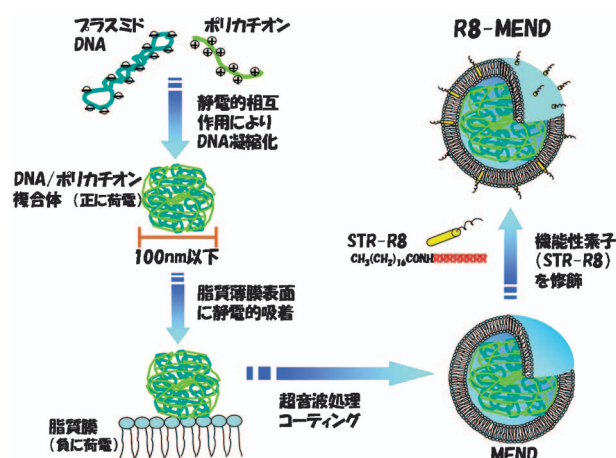


Fig. 4. Construction of MEND by a Lipid Film Hydration Method

In this method, a condensed DNA core particle electrostatically adsorb to surface of lipid film, then the core particle is coated with lipid membrane by gentle sonication. After lipid coating, the MEND can be modified with functional devices, such as STR-R8.

エンドサイトーシスを誘起して細胞に取り込ませたのち、なんらかの工夫によってエンドソームから核酸ナノ粒子コアを細胞質に放出させ、最終的に核まで送り込むことで遺伝子発現を誘導するものである。この経路は、抗体やリガンドなどを用いることで、特異的なレセプターを標的とすることが可能であるため選択性が高く、多くの DDS で利用されている。われわれは、がん細胞表面に豊富に存在するトランスフェリン (Tf) レセプターに着目し、そのリガンドである Tf と、血中滞留性のための PEG を MEND に修飾することを考えた。さらに、PEG の立体障害を鑑み Tf は PEG 先端に結合させた Tf/PEG-MEND を設計した。

われわれは、エンドサイトーシスによる遺伝子送達には、エンドソーム脱出効率が鍵であると考え、エ

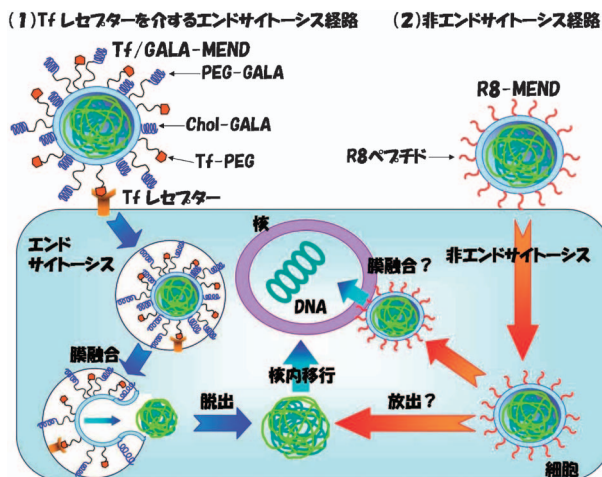


Fig. 5. Strategies of Gene Delivery by the MEND via Different Cellular Up-take Mechanisms

(1) Receptor-mediated endocytosis: the MEND, which is equipped with functional devices, such as targeting ligand and fusion peptide, binds to specific receptor on cell surface, and internalizes via receptor-mediated endocytosis. Then, condensed core can escape from endosome by some mechanism, such as membrane fusion, and the core transfers into nucleus. (2) Non-classical endocytosis: the MEND modified with cell penetrating peptide internalizes via non-classical endocytic mechanism, which can avoid lysosomal degradation, and the core particle can transfer into nucleus after removal of envelope.

ンドソーム内の環境変化 (pH 低下) に応答して膜融合性を発揮できる pH 応答性膜融合ペプチド GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA) を、エンドソーム脱出用の機能性素子として採用した。¹²⁾ GALA は、グルタミン酸・アラニン・ロイシン・アラニンの繰り返し配列からなり、生理的条件 (中性 pH) ではランダムコイル構造を有しているが、エンドソーム内環境 (酸性 pH) では疎水性の α -ヘリックス構造を取ることで膜への親和性が増大する。この性質を利用することで、エンドソーム膜と MEND の脂質膜との膜融合が誘起され、内封されている核酸ナノ粒子が細胞質に放出されることを期待した。われわれは、Programmed Packaging において機能性素子のトポロジーコントロールが機能性素子の機能発現に重要であると考えているため、GALA の機能発現に及ぼすトポロジーの影響について水溶性蛍光色素を封入したりポソームを用いて検討を行った。その結果、GALA ペプチドをそのままの状態ではリポソームとともに細胞に取り込まされた場合や、GALA をリポソーム内部に封入した場合には、エンドソーム膜とリポソーム膜の融合による色素の細胞内放出は観察されなかった。しかし、GALA をコレステロール化 (Chol-GALA) するこ

とで、リポソーム脂質膜に導入し GALA を膜表面に提示した場合のみ、内封色素の効率よい細胞内放出が観察された。これらの結果から、GALA がその機能を発揮するには、リポソーム膜と共存するだけでは不十分であり、そのトポロジーコントロール (脂質膜上に提示) が必須であることが明らかとなった。¹³⁾

この結果に基づいて、Tf/PEG-MEND のエンベロープ膜に Chol-GALA を導入し、核酸ナノ粒子コアの細胞質中への放出効率及び遺伝子発現活性を評価した。Chol-GALA のエンベロープへの導入によって、コアの細胞質への放出が確認された。しかし、半分の細胞ではエンドソーム内に核酸ナノ粒子が留まっている状態が観察されたことから、Chol-GALA の導入だけでは不十分であることが示唆された。また、このときの遺伝子発現活性は、GALA 未導入の MEND のおよそ 10 倍の活性を示したが、さほど高いものではなかった。恐らく、Tf/PEG-MEND の場合、PEG の立体障害のため Chol-GALA とエンドソーム膜との相互作用が十分ではなく、高い脱出効率は得られなかったであろうと推察された。この PEG の立体障害を回避して GALA を作用させるために、Tf/PEG-MEND の PEG の先端に GALA を付与 (PEG-GALA) した MEND (Tf/PEG-GALA-MEND) による核酸ナノ粒子コアの細胞質放出と遺伝子発現活性を検討したところ、Chol-GALA とさほど変わらない活性しか得られなかった。この原因として、PEG 先端に付与した GALA はエンドソーム膜と相互作用可能であるが、MEND のエンベロープ膜と GALA との間に距離があるため十分な膜融合が誘起されなかったことが推察された。そこで、Chol-GALA と PEG-GALA の欠点を補い合うために、両 GALA 誘導体を Tf/PEG-MEND に組み込んだところ、DNA コアのコアの完全なエンドソーム脱出が確認され、さらに遺伝子発現活性は、Tf/PEG-MEND の約 100 倍まで向上した。この結果は、MEND へのトポロジーコントロールを考慮した搭載により、両 GALA 誘導体が協調的に機能を発揮することによって得られたものと考えられる。

2-2. 非エンドサイトーシス経路 この経路は、2-1. 項で述べたレセプター介在性エンドサイトーシス経路と異なり、通常のエンドサイトーシスとは異

なる経路で MEND が細胞に取り込まれ、ライソゾーム系を回避して細胞質中に核酸ナノ粒子コアを放出させ、最終的に核内に送達することで遺伝子発現を誘導するものである。この経路は、2-1. 項の経路と比較して選択性は低いが、ライソゾーム分解系を回避できる点が優れている。われわれは、この戦略を実現するために、細胞膜透過性ペプチドに着目した。細胞膜透過性ペプチドとして HIV 由来の Tat ペプチドが有名であるが、近年では京都大学の二木らによって見出されたポリアルギニンペプチド (特にオクタアルギニンペプチド R8) が注目されている。二木らの研究によって、R8 ペプチドはアクチンの重合を経てマクロピノサイトーシスを誘起し、マクロピノソームとして細胞に取り込まれることが明らかにされている。¹⁴⁾ マクロピノソームは、ライソゾームとの融合が起こらないため、取り込まれた物質はライソゾームによる分解を回避できることが期待される。そこでわれわれは、R8 ペプチドに、カチオン性であることによる高い細胞親和性、非エンドサイトーシス経路によるライソゾーム分解系の回避、核膜への高い親和性を期待し、エンベロープ脂質膜への親和性を考慮したステアリル化 R8 (STR-R8) を MEND の機能性素子として採用した。STR-R8 はカチオン性を有するため、ポリアニオンである DNA と複合体形成することが可能であり、実際に STR-R8/DNA 複合体は高い遺伝子発現活性を有することが知られている。¹⁵⁾ そこで、STR-R8/DNA 複合体の細胞への取り込みメカニズムを解析したところ、意外にもクラスリン介在性エンドサイトーシス経路を介することが明らかになった。¹⁶⁾ このことから、R8 ペプチドによってマクロピノサイトーシスを誘起するためには、ペプチドの高い自由度が重要ではないかと考え、脂質膜表面に R8 を提示した R8 修飾リポソームを調製し、その細胞取り込みメカニズムを解析した。その結果、クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤であるショ糖溶液では取り込みは阻害されないが、マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライドによって著しく抑制され、R8 修飾リポソームの主たる細胞内取り込み経路はマクロピノサイトーシスであることが明らかになった。¹⁷⁾ 実際に、脂質膜水相法によって調製した MEND 表面に STR-R8 を修飾した R8 修飾 MEND (R8-MEND) の遺伝子発現活性

に対するショ糖溶液とアミロライドの影響を検討したところ、R8-MEND の遺伝子発現活性はアミロライドによってのみ著しく抑制された。このことから、R8 ペプチドを表面に提示した MEND は、マクロピノサイトーシスで取り込まれ遺伝子発現を誘導していることが示唆された。さらに R8-MEND の遺伝子発現活性を、代表的なウイルスベクターであるアデノウイルスと比較したところ、ほぼ同等の発現活性を示すことが明らかとなった (Fig. 6).⁴⁾ この R8-MEND の高い遺伝子発現活性は、マクロピノサイトーシスで取り込まれ、ライソゾーム分解系を回避して細胞質へコアを放出し、効率よく核まで遺伝子を送達した結果であることが示唆される。

さらに興味深いことに、膜表面に修飾する R8 密度を低下させると、細胞への取り込み経路はマクロピノサイトーシスからクラスリン介在性エンドサイトーシスへと切り替わることが見出された。¹⁷⁾ 低密度 R8 を修飾した MEND の遺伝子発現活性は、前述の R8-MEND と比較して著しく低いものであった。これは、エンドサイトーシスによって取り込まれライソゾーム分解系によって分解を受けるため、最終的に核まで送達される DNA 量が低くなるためであろうと推察される。このことは、前述のように細胞への取り込み経路の選択が、遺伝子デリバリー

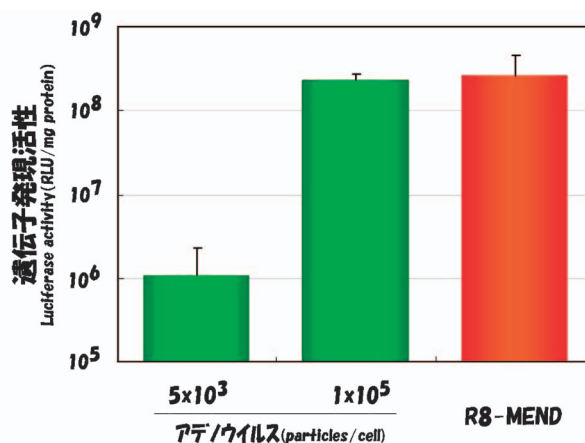


Fig. 6. Comparison of Transfection Activity of R8-MEND with Adenovirus

The transfection efficiencies of R8-MEND and Adenovirus were compared using HeLa cell lines that express receptors for adenovirus serotype 5 (i.e., CAR and the integrin receptor). Increasing the dose of Adenovirus up to 1×10^5 particles/cell resulted in higher transfection efficiency; however, toxicity increased and transfection efficiency decreased at doses higher than 1×10^5 particles/cell. Transfection efficiency with R8-MEND equaled the highest transfection efficiency with Adenovirus, however, R8-MEND produced no detectable cytotoxicity (data not shown).

システムにとって非常に重要であることを意味している。

このように、R8-MEND は、高い遺伝子送達能を有することが示されたが、プラスミド DNA だけでなく細胞質で作用する他の機能性核酸のデリバリーシステムとしても高い能力を有している。われわれは、短い 1 本鎖 DNA であるアンチセンスオリゴ DNA (ODN) を、プロタミンをポリカチオンとして用い脂質膜水和法によって R8-MEND に高効率 (90%以上) で封入する技術を確認している。^{8,9)} 培養細胞を用いてそのアンチセンス効果を検討したところ、市販の試薬である Lipofectamine2000 のアンチセンス効果が 24 時間程度で減少するのに対して、R8-MEND は 48 時間でも高いアンチセンス効果を維持していた。⁹⁾ 興味深いことに、ODN をナノ粒子化するためのポリカチオンをポリ-L-リジン (PLL) や STR-R8 にした場合には、R8-MEND によるアンチセンス効果は認められなかった。このとき、Lipofectamine2000 では有意な毒性が認められたが、R8-MEND は有意な毒性を示さなかった。このことから、ポリカチオンに依存した機能性核酸のナノ粒子化状態が、細胞質中での放出などに影響を及ぼす重要な因子であることが示唆された。さらに最近われわれは、ODN よりも強力な特異的遺伝子の抑制ツールとして注目されている siRNA の R8-MEND への封入技術を確認しており、その遺伝子抑制活性も検討している。¹⁰⁾ その結果、siRNA はポリカチオンとして STR-R8 を用いたときのみ R8-MEND に封入可能であることが明らかになり、これまでのプラスミド DNA や ODN とは異なることを見出している。恐らく、2 本鎖 RNA は DNA よりも柔軟性が低いいため、限られたポリカチオンでしかナノ粒子化できないためであろうと推察している。ルシフェラーゼ安定発現細胞株を用いて、そのルシフェラーゼ活性に対する抑制効果を Lipofectamine2000 と比較したところ、驚いたことにコントロール siRNA/Lipofectamine2000 複合体で処理した細胞のルシフェラーゼ活性が、元の活性の 5 倍以上に増大しており、Lipofectamine2000 処理による非特異的な遺伝子発現の活性化効果が認められた。しかし R8-MEND 処理細胞では、そのような非特異的な活性化は認められず、濃度依存的、時間依存的に特異的に高い遺伝子抑制効果が観察された。これらのこと

から、R8-MEND は遺伝子 (プラスミド DNA) のみならず ODN や siRNA など機能性核酸のデリバリーシステムとしても優れていることが明らかとなった。

3. MEND の *in vivo* への展開

3-1. 毛包細胞への遺伝子送達 R8-MEND は、これまでの検討から細胞レベル (*in vitro*) だけではなく、*in vivo* においても高い遺伝子送達能を発揮することが明らかになっている。LacZ 遺伝子及び GFP 遺伝子をコードするプラスミド DNA を封入した R8-MEND を、毛を刈って皮膚を露出させた ICR マウス (4 週令, オス) の背中に塗布し、2 週間後に観察したところ、毛幹に β -gal 及び GFP の発現が認められた。⁴⁾ このときの、遺伝子導入率を LacZ プラスミドを用いて評価したところ、市販の遺伝子導入試薬である LFN では全く導入されなかったのに対して、R8-MEND は約 25% の遺伝子導入効率を示したことから、R8-MEND は *in vitro* のみならず *in vivo* においても高い遺伝子送達能を有することが明らかになった。従来から毛包への遺伝子導入はいくつか報告されているが、それらは脱毛処理やレチノイン酸処理などによって毛周期を最も細胞分裂の盛んな時期にリセットしていたのに対して、R8-MEND による遺伝子導入時には、それらの処理を行っていなかったことから、ヒトへの応用を考えたときに R8-MEND は有用なデリバリーツールとなり得ることが示唆される。さらに、毛周期の制御に重要な役割を果たしている BMP receptor type IA (BMPRI1A) 遺伝子をコードするプラスミド DNA を R8-MEND に封入して、マウスの背中に塗布したところ、コントロールと比較して明らかに毛周期の進行を遅延した。⁴⁾ このことから、R8-MEND によって送達された遺伝子は、その機能を発揮し得ることが確かめられたとともに、R8-MEND による毛髪の成長制御の可能性が示された。

3-2. 血管投与による腫瘍への遺伝子到達 静脈内投与可能な遺伝子治療用ベクターの開発は、非侵襲的な治療を実現するテクノロジーとして究極的なゴールといえる。非ウイルスベクターの *in vivo* への応用を可能とするためには血中安定性や標的部位へのターゲティングなど多くの課題を克服する必要がある。*In vivo* における腫瘍へのデリバリーにおいては、本ベクターの血中安定性を付与するた

めにポリエチレングリコール (PEG) などの水溶性ポリマーの修飾が必要である。実際、抗がん剤を PEG 修飾リポソームに封入することにより、血中滞留性を劇的に向上させることができる。さらに、リポソームサイズを 100–200 nm のサイズに制御することによって、血管構造の粗い腫瘍組織へ選択的にデリバリーすることが可能となっている。われわれは MEND に対して PEG で修飾し、腫瘍へのデリバリーを試みた。その結果、劇的な血中滞留性の上昇が認められることが明らかとなっている。一方、PEG の MEND への修飾は、*in vitro* における遺伝子発現を阻害することも明らかとなった。これは、PEG によってベクター表面に水和層が形成され、ベクターの細胞への取り込み過程や、エンドソーム脱出過程を阻害することが原因と考えられる。このように、PEG は *in vivo* における腫瘍へのデリバリーには必要であるが、腫瘍到達後の遺伝子発現にはかえって邪魔となってしまうという、“PEG のジレンマ”ともいふべき問題は、静脈内投与型遺伝子治療用ベクターの開発において多くの研究者が直面している難問である。われわれは腫瘍特異的に発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に着目し、“PEG のジレンマ”を解決する戦略を打ち立てた。¹⁸⁾ MMP は細胞外マトリックスを分解する機能を有しており、基質認識部位のペプチド配列が明らかとなっている。MMP により認識・切断されるペプチド配列を挿入した PEG 脂質誘導体を合成することにより腫瘍特異的な PEG の切断により MEND の細胞膜との相互作用が上昇し遺伝子発現活性が増加すると考え、腫瘍選択的分解性 PEG 脂質誘導体の合成を行った。

合成した腫瘍選択的分解性 PEG 脂質誘導体を MEND に修飾し、遺伝子発現活性の上昇がみられるか評価を行った。MMP の高発現細胞においては、従来の PEG 修飾に比べ、分解性 PEG を用いた際に劇的な遺伝子発現の上昇が認められた。一方、MMP 低発現細胞においては、両者の間で遺伝子発現レベルは大きく変わらなかった。このことから、腫瘍選択的分解性 PEG 搭載 MEND は、ターゲット細胞の MMP 発現量依存的に活性化を受けることが明らかとなった。さらに、本腫瘍選択的分解性 PEG 搭載 MEND を血管内投与し、腫瘍への遺伝子発現レベルを解析した結果、従来の PEG 修飾

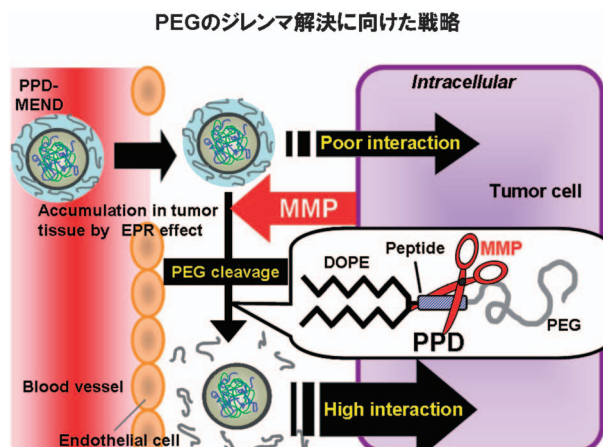


Fig. 7. A Schematic Diagram Illustrating the Strategy Used to Overcome the Dilemma in Use of PEG

1) By modifying the gene carrier with biocleavable PEG, the systemic circulation is prolonged, and the accumulation in tumor is increased by the EPR effect. 2) After extravasation from capillaries in the tumor tissue, the biocleavable PEG is cleaved by an extracellular MMP secreted from tumor cells. 3) PEG dissociates from the gene carrier, and the naked carrier can then associate efficiently with the tumor cell surface.

MEND と比較し、優位に高い遺伝子発現レベルを示すことが明らかとなった。このことから、われわれの戦略は、“PEG のジレンマ”を解決する上で有用な手段となることが明らかとなった (Fig. 7)。¹⁸⁾ さらに、遺伝子発現レベルの向上を目指し、体内動態と腫瘍内動態の最適化を行った。上記の腫瘍選択的分解性 PEG 搭載 MEND は、PEG 未修飾のものと比較して血中滞留性は得られるが、従来の PEG と比較すると滞留性は落ちるというジレンマが生じた。そこで、血中滞留性と、腫瘍内動態のバランスを取るべく、従来型 PEG と腫瘍選択的分解性 PEG を混ぜて修飾し、*in vivo* における遺伝子発現を解析した。その結果、当量混合して修飾した際に、腫瘍選択的分解性 PEG 単独修飾と比較してさらに高い遺伝子発現を得ることに成功した。¹⁸⁾

今後、腫瘍選択的分解性 PEG 搭載 MEND に対して細胞内動態制御素子を組み込むことにより、効率的な *in vivo* 腫瘍発現ベクターが構築可能であると考えている。

4. ミトコンドリアへの薬物送達システム

近年、ミトコンドリアと様々な疾患との関連が明らかになってきており、本オルガネラを標的とした薬物治療が注目されている。ミトコンドリアは非常に多様な機能を有するオルガネラであり、その機能の欠損が疾患を発症させる。例えば、エネルギー産

生の中核となる電子伝達系の機能低下による糖尿病、アポトーシスの制御異常によるがん、心筋梗塞、ミトコンドリア DNA の変異によるミトコンドリア遺伝病などが挙げられる (Fig. 8).^{19,20)} 現在までに、ミトコンドリアを標的とした薬物送達システムがいくつか報告されてきたが、疾患治療を実現するレベルには達していない。^{21,22)}

ミトコンドリアを標的とした薬物送達を成功させるためには、1) 薬物の種類や分子サイズによらないキャリアへの薬物封入、2) 疾患細胞への標的化と効率的な細胞内導入、3) そして細胞内動態制御に基づいたミトコンドリアへの選択的な送達が必要である (Fig. 9).²²⁾ 本セクションでは、これまでわれわれが取り組んできたミトコンドリアを標的とし

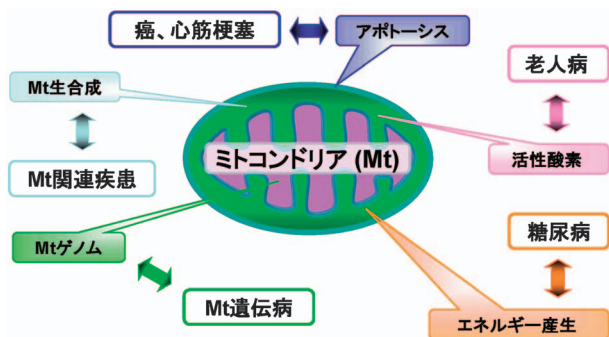


Fig. 8. Relationship between Mitochondria and Diseases

た薬物送達研究を紹介するとともに、ミトコンドリア内の各コンパートメント (外膜、内膜、膜間腔、マトリックス) に目的薬物を送達させる、「ミトコンドリア内動態制御 (Regulation of intramitochondrial trafficking)」を提唱し、ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) による疾患治療の可能性について概説する。

4-1. がん細胞ミトコンドリアを標的としたアポトーシスの誘導 ミトコンドリア関連疾患を治療するためには、疾患毎に標的臓器を狙い、薬物を選択的に送達する必要がある。細胞は、高分子薬物はもちろん、低分子薬物でさえ対応するトランスポーターがないものは細胞内に取り込まない。そのため、疾患細胞への選択的送達とともに、効率的な細胞内導入が重要な課題として挙げられる。これらの課題を突破するために、脂質二重膜小胞リポソームに着目した研究を行ってきた。リポソームは、脂質膜表面に標的リガンドを修飾することで標的臓器への移行を可能とし、さらに血中滞留性素子 polyethylene glycol (PEG) を修飾することで *in vivo* の安定性を付加させることが可能である。²³⁻²⁴⁾ また、粒子径をコントロールすることで enhanced permeability and retention (EPR) 効果 (微粒子を 100–200 nm に制御することで血中からがん組織に漏出し易い性質) によってがん組織にリポソームが

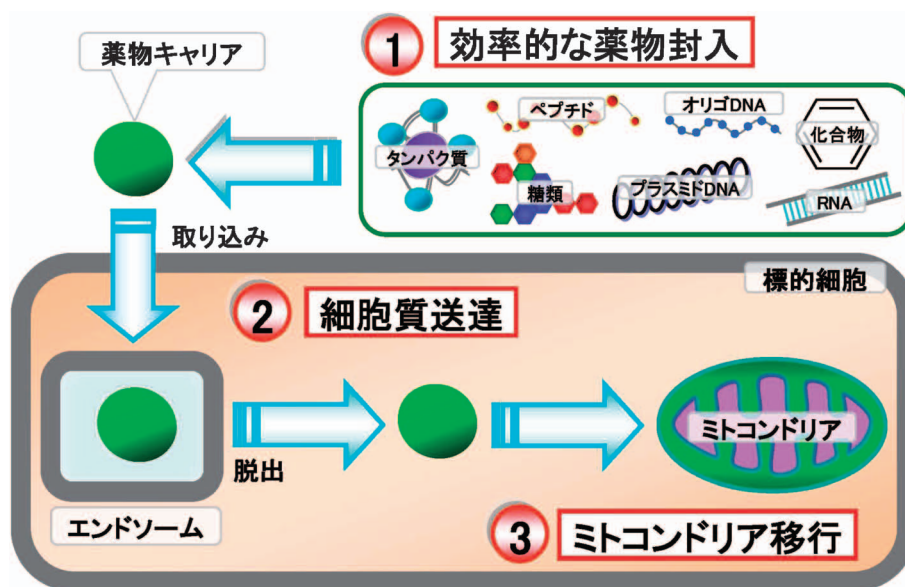


Fig. 9. Problem to be Overcome for the Development of a Mitochondrial Drug Delivery System

To establish a potent mitochondrial drug delivery system, the drug must be encapsulated in a drug carrier depending on the physical characteristics (1). Thereafter, intracellular trafficking of the carrier including endosomal escape (2) and subsequent mitochondrial targeting (3) must be regulated.

集積することも報告されている。^{25,26)} われわれは、ミトコンドリアへの薬物送達研究の第一弾としてがん細胞ミトコンドリアを標的とした研究に着手した。

われわれは、がん標的リガンドであるトランスフェリン (Tf)、エンドソーム脱出素子 GALA を用いることでがん細胞質中への薬物送達を可能とするリポソームの開発に成功している (Tf & GALA システム)。¹³⁾ Tf はがん細胞に過剰発現することが報告されており、薬物封入リポソームに表面修飾することで、リポソームを受容体介在性エンドサイトーシスによって細胞内に取り込ませることが可能である。²⁷⁾ しかし、細胞に取り込まれたリポソームはエンドソームから脱出しなければ、ライソソームで分解されてしまう。われわれは、pH 感受性膜融合性ペプチド GALA をリポソーム表面に修飾することで、エンドソーム内が酸性環境化になったときに膜融合を誘起し、薬物を細胞質中に送達する戦略を考案した (Fig. 10)。本リポソームを用いることで、内封物質の蛍光色素が細胞質全体に拡散することを確認している。¹³⁾

われわれは、本システムにアポトーシス誘導物質マストパラン²⁸⁾を封入し、がん細胞ミトコンドリアを標的としたがん細胞殺傷アプローチを試みた。マストパランは、14 アミノ酸残基からなる両親媒性

のペプチド (INLKALAALAKKIL-NH₂) であり、黒スズメバチの毒の成分である。マストパランは様々な薬理作用を持つが、新しい薬理作用として Permeability transition (PT) が注目されている。PT は、ミトコンドリア内膜の透過性が亢進する現象として定義されており、分子量 1500 Da 以下の物質の非選択的透過を引き起こす。その結果、ミトコンドリアの膨潤や膜構造の劇的な変化をもたらす。ミトコンドリア内のチトクロム c (Cyt c) が細胞質中に放出される。そのため、マストパランがミトコンドリアに送達されるとアポトーシスが誘起される (Fig. 10)。Tf & GALA 搭載リポソームにマストパランを封入し白血病細胞株 K-562 細胞に添加し、細胞質に放出された Cyt c を Western blot により検出した結果、Cyt c の細胞質放出が確認され、アポトーシスが誘起されることが示唆された。²⁹⁾ 今後は、本システムを *in vivo* へ適応し新たなアプローチからのがん治療へと発展させたい。

4-2. ミトコンドリア内動態制御 (Regulation of Intramitochondrial Trafficking) の提唱 体内動態、さらには細胞内動態を制御する DDS 研究は医薬品開発の重要な位置を占めている。そのため、細胞内でミトコンドリアを標的化する重要性は多くの研究者から認識されている。しかしながら、ミトコ

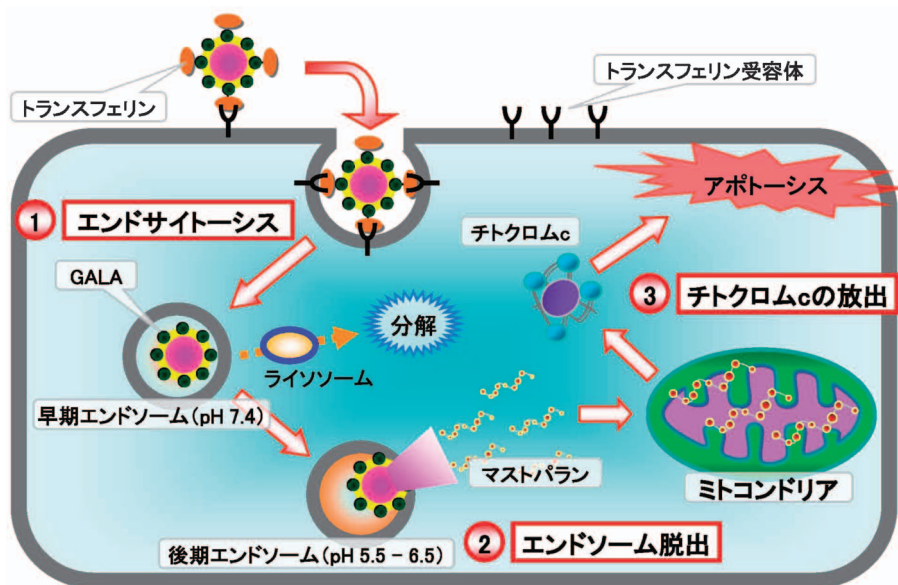


Fig. 10. Intracellular Trafficking of Mastoparan in Tf Modified Liposomes Equipped with Chol-GALA

Tf modified liposomes equipped with GALA can be internalized by tumor cells via receptor-mediated endocytosis (1). In the endosomes, GALA can enhance the fusion between liposomes and endosomes at a lower pH and mastoparan is released to the cytosol (2). Mastoparan that escapes from the endosomes can attack the mitochondria, permeability transition is induced, and cytochrome c is released from the mitochondria (3).

ンドリア内での送達選別, すなわちミトコンドリア内動態制御を考慮した送達戦略は, ほとんど報告されていない. 今後は, 疾患に合わせて, 治療薬物をミトコンドリア内の適所に送達し, 治療効果を最大限に発揮させる DDS を構築することが重要になると考えられる (Fig. 11).²²⁾

ミトコンドリアは, 外膜, 内膜からなる 2 層の膜構造を有しており, 電子伝達系の存在する膜間腔とミトコンドリア DNA の存在するマトリックスから構成されている. ミトコンドリアの各コンパートメントには, 生命活動に必須の装置がそれぞれ配置されており, 疾患毎にミトコンドリア内での薬物の送達選別が必要となる (Fig. 11). 例えば, アポトーシス制御の異常を治療したいのならば, アポトーシス関連分子が多く存在するミトコンドリア外膜に薬物を送達する必要がある. この戦略によって, アポトーシス誘導によるがん細胞の殺傷, 抑制による心筋梗塞などの治療が可能となる. エネルギー産生源である電子伝達系の治療には, 関連分子が多く存在するミトコンドリア内膜, 膜間腔への薬物送達が必要となる. この戦略によって, エネルギー産生が低下することで誘発される種々の疾患を治療すること

が可能となる. また, 遺伝子治療を行う場合には, ミトコンドリアの 2 枚膜を突破しミトコンドリア DNA の存在するマトリックス領域まで薬物を送達する必要がある. 本戦略では, 正常なミトコンドリア DNA を送達する補充療法, またミトコンドリア DNA の変異を修復するアプローチが可能となる.

様々な機能を有するミトコンドリアを標的とした薬物治療には, 様々な分子が候補薬物として挙げられ, その薬物毎にミトコンドリア内での送達選別が必要となる. そのため, ミトコンドリアを標的とした DDS の真のゴールは, 治療薬物をミトコンドリア内の適所に送達可能なシステムを開発することである.

5. 細胞内動態の定量的評価

ウイルスは様々な環境下において生物とともに進化と淘汰を繰り返し, 個々の環境に応じて多様性を獲得してきた. この長年の進化の過程で, ウイルスは細胞膜や核膜などの細胞内バリアを突破し, 宿主細胞の核内にそのゲノム DNA を効率的に導入するための極めて巧みな機構を獲得しており, 効率のよい遺伝子ベクターを開発する上でよい目標である. これまでウイルスの構造あるいは機能に着目し, 多

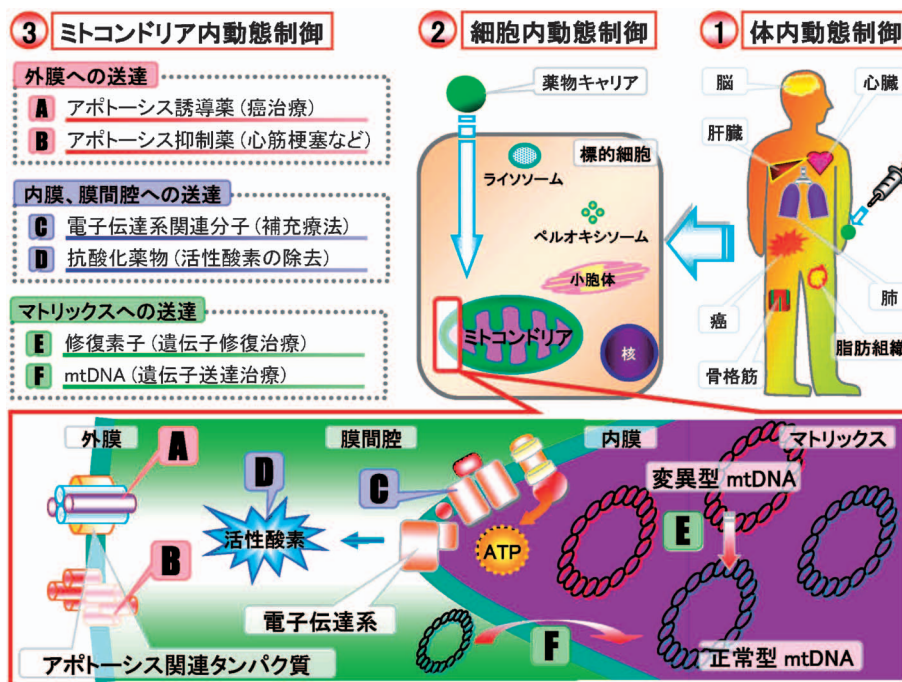


Fig. 11. Novel Concept for Mitochondrial Diseases' Therapy, "Regulation of Intramitochondrial Trafficking"

For drug therapy, regulation of both the bio distribution and intracellular trafficking are important factors. In addition, we propose "Regulation of intramitochondrial trafficking" to effectively achieve a mitochondrial disease therapy. Sorting of a drug to the appropriate region in a mitochondrion can increase therapeutic effect and decrease undesired side-effects of that drug.

くのデバイス開発がなされてきた。1つ目のバリアとして、細胞膜が挙げられる。センダイウイルスや HIV などは、宿主細胞のレセプターに結合後、細胞膜と直接融合することで細胞質内にゲノム DNA を直接導入することが明らかとされている。HVJ 由来の融合タンパク質を修飾したリソソームに DNA やタンパク質を封入することで、効率的なデリバリーが可能であることが知られている。^{30,31)} また、先に述べた GALA は、インフルエンザの pH 依存的な膜融合メカニズムに習った戦略といえる。¹³⁾ 核移行に関しては、遺伝子の凝縮化剤であるポリカチオンに対してアデノウイルス由来の外殻タンパク質であるヘキソンを修飾する試み³²⁾や、アデノウイルスのコアタンパク質の1つである mu を遺伝子の condenser として用いる試み^{33,34)}がなされている。

5-1. 細胞内動態の素過程を定量的に評価する方法の確立 効率的な遺伝子発現を実現するために数多くの細胞内動態制御素子が開発されてきたが、これらのバリアを克服する素子をベクターに修飾した際の相対的な遺伝子発現の上昇が成功の目安であり、細胞内動態のどの過程が律速段階となっているかについて、定量的な評価が十分行われなまま開発が進んできた。ウイルスとの細胞内動態を定量的に比較することにより、まず、現在の非ウイルスベクターと目標となるウイルスベクターの細胞内動態比較と発現効率を評価し、「どこが」「どれだけ」「なぜ」劣っているかを明らかとした上で、その律速段階となる部分を改善することで、より効率的なベクター開発が可能となると考えられる。

このようなアプローチを行うために、遺伝子の細胞内局在を定量化する方法論が不可欠である。これまで、核単離と PCR を組み合わせた方法により、核移行量の測定を行う技術が確立されてきた。³⁵⁾ しかしながら、エンドソームにおける局在量を定量化する上では、その単離プロトコールが煩雑な点や、収率の評価などが困難なことから、オルガネラの単離による方法は定量的評価には不向きと考えられる。

われわれは共焦点レーザー顕微鏡画像を用いて、遺伝のクラスター面積を基に核とエンドソーム/リソソーム分画に存在する遺伝子量を同時に定量化する方法 (Confocal image-assisted 3-dimensionally integrated quantification; CIDIQ) 法を考案した。³⁶⁾

遺伝子は細胞に導入後数時間の間はクラスターとして検出されることが明らかとなっている。本方法はこの現象を利用し、エンドソーム/リソソーム、及び核などのオルガネラを Lysosensor DND189 や Hoechst33342 により染め分けをし、ロードミナベリした遺伝子の局在を明らかにした上で、遺伝子のクラスター面積を遺伝子量の指標として 3 次元的に定量化する方法である (Fig. 12)。

本方法を 3 種の非ウイルスベクターに応用したところ、完全にエンドソーム/リソソーム系にトラップされているベクターや、時間と依存的にエンドソームから脱出し、核まで到達するものなど、ベクターによって特徴的な体内動態特性を持つことを明らかとなった。特に市販の LipofectAMINE PLUS においては、非常に効率的にエンドソームから脱出し、さらに 1 時間以内に核移行を示すという結果が得られた。このような早い核移行性は、アデノウイルスと匹敵するものである。

5-2. ウイルス vs. 非ウイルス：律速段階はどこに？ CIDIQ により得られる細胞内オルガネラへの局在分率と RealTime PCR を用いて算出される細胞への取り込み量の積より、核オルガネラに存在する遺伝子量が算出される。本方法を用い、われわれは、非ウイルスベクターとウイルスベクターの代表として、LipofectAMINE PLUS (LFN) とアデノウイルスベクターを選び、両者の細胞内動態比

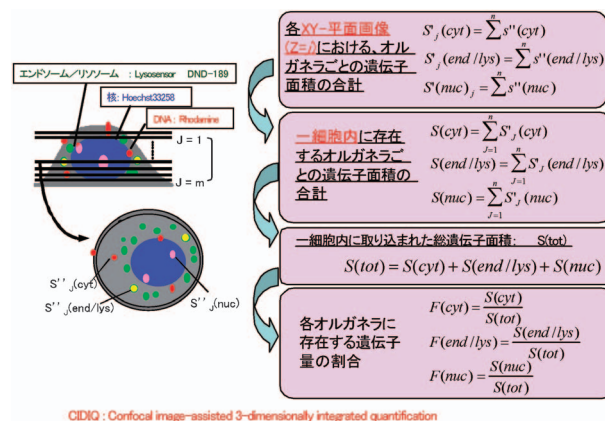


Fig. 12. Methodology to Quantify the Intracellular Trafficking of Gene Vectors Based on the Confocal Images

After the transfection of rhodamine-labeled genes, acidic compartment (e.g. endosome/lysosome) and nucleus was stained by Lysosensor and Hoechst 33342, respectively. Z-series of confocal images were captured by confocal laser scanning microscopy. The pixel areas of cluster was used as an index of the amount of pDNA.

較を行った。³⁷⁾最適化された LipofectAMINE PLUS 及びアデノウイルスのプロトコールに従いトランスフェクションしたところ、両ベクターともトランスフェクション後、3 時間で遺伝子発現が認められ、以後の両ベクターの発現活性はほぼ同じであることが明らかとなった。このことから、LipofectAMINE PLUS は、アデノウイルスと同等のスピードで核まで遺伝子を送達することや Ad に匹敵する発現活性を有することが示唆された。一方、リアルタイム PCR により DOSE をルシフェラーゼ遺伝子のコピー数として表記して比較した結果、同程度の活性を示すのに必要なコピー数は、LipofectAMINE PLUS においてアデノウイルスと比較して数千から 1 万倍多いことが示された。In vivo への応用などを考えると、投与量を最小にするためには、単位コピー当たりの発現活性を上昇させる必要があり、細胞内のどの過程にこの要因があるのかを明らかにすることは有用である。

初めに、LipofectAMINE PLUS とアデノウイルスの細胞への取り込み過程を比較した。アデノウイルス又は LipofectAMINE PLUS をトランスフェクション後、37°C で 1 時間インキュベートし、細胞を回収した。DNA を抽出し、real time PCR により定量し、細胞数は β -actin の量を基に決定した。37°C インキュベート時の取り込み効率、LipofectAMINE PLUS で Dose の 45%、アデノウイルスで Dose の 10% と、LipofectAMINE PLUS の方が効率的であり、コピー数で約 1 万倍多くの DNA が取り込まれることが明らかとなった。

続いて、細胞内動態について解析した。先に示したように、CIDIQ 法により各オルガネラに存在する遺伝子の割合を測定することが可能であるが、リアルタイム PCR によって求まる細胞へ取り込まれた遺伝子コピー数の絶対値にこれらの細胞内局在割合を掛けることにより、オルガネラ内遺伝子量を算出することが可能である。アデノウイルスについても、CIDIQ を利用してアデノウイルスの各オルガネラへの局在を解析した。アデノウイルスにおいては、ゲノム DNA そのものをラベルすることは不可能である。本定量においては、アデノウイルスの外殻タンパク質であるヘキソンを Texas Red によりラベルした。その結果、LipofectAMINE PLUS と同様、エンドソーム・ライソソームに局在するとき

は黄色、細胞質に局在するときは赤色に観察された。一方、核内にも赤のシグナルの共局在は認められたが、アデノウイルスは核移行の際、核膜孔上で崩壊し、アデノウイルスのゲノム DNA が外殻タンパク質と解離することから、これら核内のシグナルは核中のアデノウイルスのゲノム DNA 量を反映していないと考えられる。そこで、アデノウイルスゲノム DNA の核内移行量の算出については核単離を行い、リアルタイム PCR によって定量を行った。常法に従い核単離を行い、遺伝子量を定量した結果、1 細胞当たり取り込まれたアデノウイルスの約 36.6% に相当する 7.3 コピーが核に存在していることが明らかとなった。トランスフェクション後 1 時間でアデノウイルスは LipofectAMINE PLUS よりも効率的に核に分布していることが明らかとなったが、その効率は数倍程度であり、細胞内動態の違いからは、大きな遺伝子発現効率の差は説明することは不可能である。そこで、核移行量についてさらに比較を行った。核内に存在する遺伝子量は、LipofectAMINE PLUS で数千倍高く、同程度の遺伝子発現を示すのに、LipofectAMINE PLUS の方が桁違いに多くのコピー数が必要であることが示された。言い換えれば、1 コピー当たりの核移行後の遺伝子発現効率は、アデノウイルスの方が LipofectAMINE PLUS よりも格段に高いことを示す結果であり、その差は約 8000 倍異なることが明らかとなった。したがって、LipofectAMINE PLUS とアデノウイルスによる発現効率の差の支配要因は、主に、核移行後の発現効率にあることが明らかとなった。³⁷⁾

この情報をベクター開発にフィードバックするためには、「なぜ」このような違いが生じるのかを明らかにする必要がある。核移行後発現効率の差を生み出す要因としては、転写過程と翻訳過程が挙げられる。上記のように、核移行量を定量化することにより、ウイルスと人工ベクターの発現効率差に及ぼす細胞内動態 (intracellular pharmacokinetics; iPK) と、核移行後発現効率 (Pharmaco-dynamics; PD) の寄与を分離評価することができた。同じように、セントラルドグマの中間体である mRNA の発現量を測定することによって、核移行後発現効率差における、転写効率と翻訳効率の寄与を分離評価することが可能となる。mRNA の発現量を核移行量で除した値は、転写効率を示すパラメーターであり、ま

た、発現量を mRNA によって除した値は、翻訳効率を示すパラメーターである。実際に mRNA をリアルタイム RT-PCR によって求め、上記の値を求めた結果、トランスフェクション後、初期の時間においては、転写効率で1桁、翻訳効率で2桁、アデノウイルスの方が高いという結果が得られた。³⁸⁾

われわれは、まず、大きく分けて2つの仮説を立て、転写効率の違いを生み出すメカニズムの解明を試みた。1つ目は、アデノウイルスに由来した要因であり、核内にゲノム DNA と一緒に導入されるウイルス由来コアタンパク質、あるいは、ウイルスゲノム DNA にコードされているタンパク質や配列などが転写を促進しているという仮説である。もう1つは、遺伝子の核内様式が異なる可能性である。まず1つ目の可能性として、アデノウイルスコアタンパク質の関与について解析を行った。あらかじめ GFP をコードするアデノウイルスを感染させ、核内にアデノウイルス由来タンパク質をプレロードしたのち、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA を LFN によりトランスフェクションした。もし、ウイルス由来のコアタンパク質が、CMV プロモーターに関連する転写因子を活性化するのであれば、LFN によるトランスフェクション活性はアデノウイルスのプレ感染によって上昇するはずである。しかしながら遺伝子発現はプレ感染なしのものに比べて上昇は認められなかったことから、コアタンパク質の転写活性化では、転写活性の違いは説明できないことが明らかとなった。さらに、アデノウイルス由来 DNA 配列やゲノム DNA 構造による転写活性化のメカニズムがあるか否かについて検討を行うために、GFP を発現するアデノウイルスのゲノム DNA とプラスミド DNA を核内マイクロインジェクションし、24 時間後の遺伝子発現効率を測定した。しかしながら、両者に大きな差は認められないことから、DNA の配列や構造の違いからでは、核内転写効率の差は説明できないことが明らかとなった。そこで、次に、視点を変えて、遺伝子の核内存在様式の違いという観点から検証を行った。

In situ ハイブリダイゼーションによって、ベクターから解離した遺伝子のイメージングを行った。その結果、LFN の方が多くの遺伝子が核内に送達しているのに係わらず、核内に検出される遺伝子は明らかにアデノウイルスの方が多いため、アデ

ノウイルスの方が LFN より効率的に decondense されるということが示唆された。さらに、核内存在部位について詳細に検討したところ、アデノウイルスの方では、ユークロマチン領域に局在しているのに対し、プラスミド DNA では、ランダムに局在していたことから、核内における存在部位の制御も重要であることが示唆された。³⁸⁾ また、翻訳効率においては、mRNA とベクター間との交互作用が LFN の方で強いことが示されており、細胞質における翻訳を阻害する大きな要因であると考えられる。今後、ベクターと mRNA との相互作用を回避する戦略を取ることが重要と考えられる³⁸⁾ (Fig. 13)。

一方、非ウイルスベクターのもう1つの問題点として、遺伝子発現の heterogeneity が挙げられる。アデノウイルスにおいては、ほぼ 100% の細胞で発現が認められるのに対し、非ウイルスベクターにおいては 10% 程度しか発現は認められない。この原因を明らかとするために、遺伝子の核移行と遺伝子発現を同時にイメージングする方法を確立した。その結果、核移行が得られた細胞は全体の 23% 程度しか認められず、核移行過程が律速となることが示された。さらに、核移行が認められた細胞すべてで遺伝子発現が認められる訳ではなく、発現を示した細胞は核移行が認められた細胞のうち、30% 程度であった。このことから、核に到達したのちの転写過程も heterogeneity の要因であることが明らかとなった。³⁹⁾

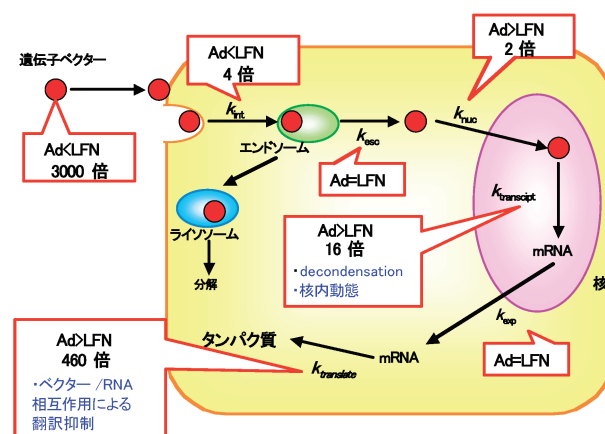


Fig. 13. Comparison Intracellular Distribution between Adenovirus and LipofectAMINE PLUS

Intracellular distribution of adenovirus and LipofectAMINE PLUS at 1 hour after the transfection. As a result, it was clarified that post-nuclear delivery process is a rate-limiting process in the current non-viral vectors.

これまでに、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムの投与量と遺伝子発現との間には、正の非線形的な関係が存在することが知られてはいたが、系統立てた解析は行われていなかった。この非線形性の原因を解明することは、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムの遺伝子発送達能力を向上させる上で有用であると考え、われわれの MEND 及び一般的な lipoplex を用いて細胞内動態 (Intracellular pharmacokinetics; iPK) 及び核内動態 (Pharmacodynamics; PD) を解析した。その結果、細胞への取り込みから核移行に至る過程 iPK は、投与量に依存した線形の変化を示したのに対して、核内移行量で遺伝子発現量を除することによって得られる PD は非線形であることが明らかになり、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムにおける遺伝子発現の非線形性の原因は、遺伝子の核移行後にあることが示唆された。⁴⁰⁾

以上これらの結果は、効率的な非ウイルスベクターを開発する際に、単に核まで遺伝子を送達するだけではなく、その後の核内動態までも厳密に制御する必要があるということを示すものである。もちろん、本研究は細胞内動態の重要性を否定するものではない。細胞内動態と核内動態過程は直列でつながっており、両者をともに制御することが極めて重要となる。

6. 核内動態制御

外来遺伝子を発現させる遺伝子治療においては、核への DNA 送達最終目標ではなく、人工遺伝子デリバリーシステムにより送達させた外来 DNA から効率よく発現させることが必要である。外来 DNA から産生されるタンパク質や機能性 RNA (siRNA, リボザイム等) は治療効果を発揮する薬物であり、外来 DNA はその前駆体 (プロドラッグ) に相当すると考えられる。⁴¹⁾ したがって、外来 DNA の発現を含めた制御 (核内動態制御)²⁾ は、核の中の DDS であると言える。

核内動態制御を達成するためには、外来 DNA の核内動態 Fig. 14 を知る必要がある。そこで、マウス尾静脈から naked (裸の) プラスミド DNA を hydrodynamics 法 (高容量の DNA 溶液を高速で静脈注射する方法) により投与し、核内の外来 DNA 量と発現量の経時変化を調べた。従来から、非ウイルスベクターにより導入された (hydrodynamics

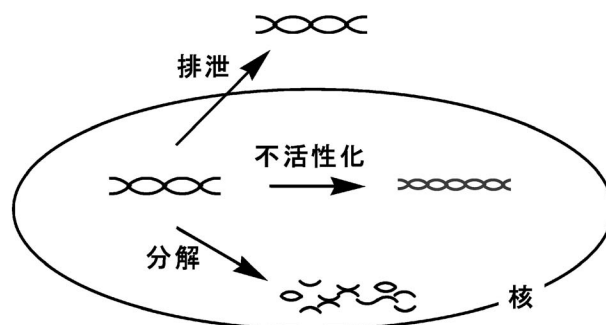


Fig. 14. Intranuclear Disposition of Exogenous DNA

法により投与される場合も含む) 外来遺伝子の発現は一過性であることが知られていたが、われわれの実験においても投与されたプラスミド DNA からの発現は一過性であった。核内の外来 DNA 量の減少は発現の減少と比較して 1 桁以上穏やかに進行していた。発現量 (タンパク質量) を同じ時点での核内の外来 DNA 量で除した値は外来 DNA 1 コピー当たりの発現効率を示しているが、その経時変化を追跡したところ、驚いたことに外来 DNA 1 コピー当たりの発現効率がわずか数日で数百分の一に減少していること (サイレンシング) が明らかとなった。⁴²⁾ また、hydrodynamics 法の場合ほど顕著ではないが、培養細胞に electroporation 法により導入した naked プラスミド DNA の場合にもサイレンシングが生じていた。⁴³⁾ われわれはこの原因として、染色体上の遺伝子のサイレンシングに関与している DNA のメチル化を想定していたが、実際にメチル化を測定した結果、外来 DNA のメチル化は原因ではないことが明らかとなった。^{42,44)} 次に、DNA のメチル化とともに染色体上の遺伝子のサイレンシングに関与しているヒストン (染色体 DNA に結合しているタンパク質) の修飾が原因であると想定した。しかし、実際にヒストン修飾を調べたところ、大きな経時変化は観察されなかったことから、別の要因が主要な原因であることが明らかとなった。⁴⁴⁾ このサイレンシングには炎症反応の関与が小さいことが明らかとなっている。⁴⁵⁾ 最近、われわれは、あらかじめマウス肝臓に導入した外来遺伝子の発現が、hydrodynamics 法により数日後に生理食塩水を投与することにより著しく増強されることを見出した。⁴⁴⁾ この興味深い現象は、外来遺伝子のサイレンシングの機構を明らかにする上で重要なものに

なるものと期待している。

次に、非ウイルス性ベクターにより送達させた外来 DNA の核内動態について調べた。カチオン性脂質を用いて導入した外来遺伝子の発現は細胞周期に大きく依存することが知られている。この理由として、核膜が消失する細胞分裂期に外来 DNA が「核移行」することが提唱されていた。⁴⁶⁾ われわれは、市販の LipofectAMINE 試薬を用いて外来 DNA を培養細胞に導入し、外来 DNA の核移行とタンパク質の発現の両者を個々の細胞レベルで dual に共焦点顕微鏡により検出した。³⁹⁾ 核への外来 DNA の移行率は S 期初期で少ないものの、他の場合にはほぼ一定であった。一方、S 期後期や分裂期に外来 DNA を導入した場合、発現率が上昇した。発現率と核移行率の比を取ると、S 期後期や分裂期に大きな値を示した。したがって、外来遺伝子発現の細胞周期依存性は、核移行の細胞周期依存性ではなく、外来遺伝子からの転写の細胞周期依存性に発するものであることが明らかとなった。³⁹⁾ この原因として考えられるのが DNA 結合タンパク質との相互作用の細胞周期依存性である。例えば、染色体 DNA と結合するヒストンタンパク質の mRNA 量は細胞周期に依存しており、S 期に 15 倍まで増加することが報告されている。このことは、ヒストンタンパク質（又は他の DNA 結合タンパク質）が増加し、外来 DNA に結合しているポリカチオンと置換することにより転写が開始される可能性を示唆する。

以上のように、外来 DNA の核内動態は様々な要因により影響されている。未知の要因が多数存在している可能性があるが、遺伝子治療の実用化にはいち早く核内動態制御を達成する必要がある。そこでわれわれは、核内における転写効率を上昇させることを試みた。まず、ヒストンに着目し、ヒストンに親和性のある配列 (left-handedly curved sequence) がプロモーターの上流に付加されたプラスミド DNA をマウスに導入した。このヒストン親和性配列が適切な位置に存在する場合に発現効率は上昇したが、これは TATA box (真核生物のプロモーター中にあり転写因子により認識される配列) が露出することにより、転写因子との相互作用が促進された結果であると考えている。⁴⁷⁾ また、さらに強力なヒストン高親和性配列を付加した場合、対照プラスミドを用いた場合の 10 倍以上の発現上昇を観察して

いる (福永ら、未発表データ)。また、これとは対照的に、ヒストンとの親和性が低い配列を TATA box の近傍に導入した場合にも発現が上昇することを見出している (後藤ら、未発表データ)。一方、核内 DNA 量の減少への対策として、複製型プラスミド DNA の利用を試みた。複製型 DNA を用いた場合、外来遺伝子の発現効率が上昇した (須田・伊藤ら、未発表データ)。このように、核内動態制御の実現に向け様々な観点からのアプローチを行っている。

標的遺伝子の配列を正常型に変換する遺伝子修復法は、外来遺伝子発現法とともに遺伝子治療の有力な方法となり得る (Fig. 15)。この方法は、同時に遺伝子ノックアウト法としても有望である。われわれは、遺伝子修復用 DNA と相同組換えに関与するタンパク質との相互作用を制御することにより、遺伝子修復用 DNA の核内動態制御を試みた。

従来、遺伝子修復法の 1 つである SFHR (Small Fragment Homologous Replacement) 法においては、遺伝子修復用 DNA として 2 本鎖 PCR 産物が用いられていた。導入した 2 本鎖 PCR 産物は、相同組換えにより標的 DNA と置換されることが考えられる。この際、2 本鎖 DNA が標的 DNA と結合するためには、2 本鎖が解離する必要がある (このプロセスは相同組換えに関与するタンパク質が行うと推定される)。したがって、2 本鎖ではなく、相補鎖が存在しない 1 本鎖の状態では細胞に導入すれば、相同組換えに関与するタンパク質が DNA 断片

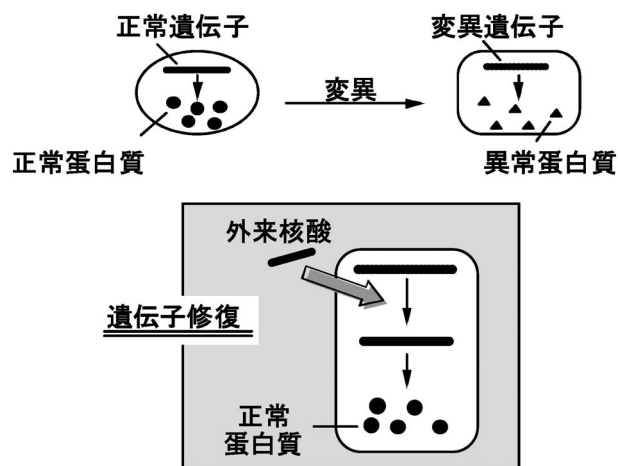


Fig. 15. Correction of Mutated Gene with Exogenous Nucleic Acid

を利用する効率 (availability) が向上すると考えられる。この作業仮説に基づき、相補鎖が存在しない 1 本鎖 DNA 断片を調製し遺伝子修復実験を行った。1 本鎖 DNA 断片を、塩基置換変異を有する標的プラスミド DNA と 400 : 1 のモル比で培養細胞に導入したところ、約 2% の効率で目的配列への変換 (遺伝子修復) が観察された。この値は、2 本鎖 PCR 産物を用いた場合の約 12 倍の値であった。⁴⁸⁾ 1 本鎖 DNA 断片による遺伝子修復効率は周辺の配列に依存しており、配列によっては 10% という値が観察されている (内山ら、未発表データ)。1 本鎖 DNA 断片は効率が落ちるものの、塩基欠失変異や塩基挿入変異も修復可能である。⁴⁹⁾

放射線同位元素で標識した 1 本鎖 DNA 断片を用いた場合、標的 DNA に放射活性が「移る」ことが明らかとなっている。⁵⁰⁾ このことは 1 本鎖 DNA 断片による遺伝子修復に相同組換えが関与していることを示唆する。相同組換えに関与する Rad51 タンパク質は、試験管内鎖交換反応において、1 本鎖 DNA よりも部分的に 2 本鎖を形成している 1 本鎖 DNA をよく認識することが知られている。1 本鎖 DNA を用いる遺伝子修復のプロセスに Rad51 が主要な役割を担っているかについては今後の検討を待たねばならないが、十分に可能性があると考えられる。そこで、部分的に 2 本鎖となっている 1 本鎖を用いて遺伝子修復を行ったところ、さらに修復効率が上昇した (土谷ら、未発表データ)。この効率は従来法 (2 本鎖 PCR 産物を用いた場合) の約 20 倍の値である。以上のことにより、DNA 断片の核内動態制御を行うことにより、遺伝子修復効率の上昇が達成可能なことを明らかとした。

外来遺伝子発現の場合においても、遺伝子修復の場合においても、核内タンパク質との相互作用の制御が核内動態制御²⁾の実現に重要であると思われる。

今後の展望

われわれは、ウイルスに匹敵する効率と安全性を兼ね備えた人工遺伝子デリバリーシステムを創製することを目標として研究を進めてきた。これまでに、いくつかの関門を突破することに成功したが、同時に、新しい関門に直面することになった。これらの過程はあたかもジェットコースターのように、研究者冥利に尽きる、と言っても過言ではない。解決すべき大きな関門が残されているので、研究室一

丸となってこれらの問題に挑戦して行きたい。

謝辞 最後に、本研究に献身的に協力してくれた北海道大学大学院薬学研究院、薬剤分子設計学研究室の学生諸君と、惜しめないご指導、ご助言を頂いた共同研究者の二木史朗教授 (京都大学)、馬場嘉信教授 (名古屋大学)、菊池 寛博士 (エーザイ)、由井伸彦教授 (北陸先端科学技術大学院大学)、長崎幸夫教授 (筑波大学)、佐々木茂貴教授 (九州大学)、片岡一則教授 (東京大学) に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45 (2006).
- 2) Kamiya H., Akita H., Harashima H., *Drug Discov. Today*, **8**, 990–996 (2003).
- 3) Kursá M., Walker G. F., Roessler V., Ogris M., Roedl W., Kircheis R., Wagner E., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 222–231 (2003).
- 4) Khalil I. A., Kogure K., Futaki K., Hama S., Akita H., Ueno M., Kishida H., Kudoh M., Mishina Y., Kataoka K., Yamada M., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 682–689 (2007).
- 5) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **98**, 317–323 (2004).
- 6) Sasaki K., Kogure K., Chaki S., Kihira Y., Ueno M., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **296**, 142–150 (2005).
- 7) Moriguchi R., Kogure K., Akita H., Futaki S., Miyagishi M., Taira K., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **301**, 277–285 (2005).
- 8) Yamada Y., Kogure K., Nakamura Y., Inoue K., Akita H., Nagatsugi F., Sasaki S., Suhara T., Harashima H., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1939–1942 (2005).
- 9) Nakamura Y., Kogure K., Yamada Y., Futaki S., Harashima H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 431–437 (2006).
- 10) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **19**, 360–367 (2007).
- 11) Scherrer P., Cullis P. R., *Gene Ther.*, **6**, 271–281 (1999).
- 12) Nir S., Nicol F., Szoka Jr. F. C., *Mol.*

- Membr. Biol.*, **16**, 95–101 (1999).
- 13) Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H., *Biochemistry*, **18**, 5618–5628 (2004).
 - 14) Nakase I., Niwa M., Takeuchi T., Sonomura K., Kawabata N., Koike Y., Takehashi M., Tanaka S., Ueda K., Simpson J. C., Jones A. T., Sugiura Y., Futaki S., *Mol. Ther.*, **10**, 1011–1022 (2004).
 - 15) Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 1005–1011 (2001).
 - 16) Khalil I. A., Futaki S., Niwa M., Baba Y., Kaji N., Kamiya H., Harashima H., *Gene Ther.*, **11**, 636–644 (2004).
 - 17) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
 - 18) Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Oishi M., Nagasaki Y., Kihira Y., Ueno M., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 68–77 (2007).
 - 19) Chan D. C., *Cell*, **125**, 1241–1252 (2006).
 - 20) Schapira A. H., *Lancet*, **368**, 70–82 (2006).
 - 21) Weissig V., Cheng S. M., D'Souza G. G., *Mitochondrion*, **3**, 229–244 (2004).
 - 22) Yamada Y., Akita H., Kogure K., Kamiya H., Harashima H., *Mitochondrion*, **7**, 63–71 (2007).
 - 23) Allen T. M., Hansen C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 133–141 (1991).
 - 24) Torchilin V. P., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 145–160 (2005).
 - 25) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
 - 26) Oupicky D., Ogris M., Howard K. A., Dash P. R., Ulbrich K., Seymour L. W., *Mol. Ther.*, **5**, 463–472 (2002).
 - 27) Ciechanover A., Schwartz A. L., Dautry-Varvat A., Lodish H. F., *J. Biol. Chem.*, **258**, 9681–9689 (1983).
 - 28) Zimmerberg J., Parsegian V. A., *Nature*, **323**, 36–39 (1986).
 - 29) Yamada Y., Shinohara Y., Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Kamiya H., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **303**, 1–7 (2005).
 - 30) Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K., Kaneda Y., *J. Gene Med.*, **7**, 1044–1052 (2005).
 - 31) Kaneda Y., Nakajima T., Nishikawa T., Yamamoto S., Ikegami H., Suzuki N., Nakamura H., Morishita R., Kotani H., *Mol. Ther.*, **6**, 219–226 (2002).
 - 32) Carlisle R. C., Bettinger T., Ogris M., Hale S., Mautner V., Seymour L. W., *Mol. Ther.*, **4**, 473–483 (2001).
 - 33) Akita H., Tanimoto M., Masuda T., Kogure K., Hama S., Ninomiya K., Futaki S., Harashima H., *J. Gene Med.*, **8**, 198–206 (2006).
 - 34) Keller M., Harbottle R. P., Perouzel E., Colin M., Shah I., Rahim A., Vaysse L., Bergau A., Moritz S., Brahimi-Horn C., Coutelle C., Miller A. D., *Chem. Bio. Chem.*, **4**, 286–298 (2003).
 - 35) Tachibana R., Harashima H., Ide N., Ukitsu S., Ohta Y., Suzuki N., Kikuchi H., Shinohara Y., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **19**, 377–381 (2002).
 - 36) Akita H., Ito R., Khalil I. A., Futaki S., Harashima H., *Mol. Ther.*, **9**, 443–451 (2004).
 - 37) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Harashima H., *Mol. Ther.*, **13**, 786–794 (2006).
 - 38) Hama S., Akita H., Iida S., Mizuguchi H., Harashima H., *Nuc. Acids Res.*, **35**, 1533–1543 (2007).
 - 39) Akita H., Ito R., Kamiya H., Kogure K., Harashima H., *J. Gene Med.*, **9**, 197–207 (2007).
 - 40) Moriguchi R., Kogure K., Iwasa A., Akita H., Harashima H., *J. Control. Release.*, **110**, 605–609 (2006).
 - 41) Kogure K., Akita H., Kamiya H., Harashima H., “Modern Biopharmaceuticals,” ed. by Knäblein J., Wiley-VCH, Weinheim, 2005, pp. 1521–1536.
 - 42) Ochiai H., Harashima H., Kamiya H., *FEBS Lett.*, **580**, 918–922 (2006).
 - 43) Ochiai H., Harashima H., Kamiya H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1294–1296 (2006).
 - 44) Ochiai H., Fujimuro M., Yokosawa H., Harashima H., Kamiya H., *Gene Ther.* (in press).
 - 45) Ochiai H., Harashima H., Kamiya H., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1958–1962 (2005).
 - 46) Tseng W. C., Haselton F. R., Giorgio T. D.,

- Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 53–64 (1999).
- 47) Kamiya H., Fukunaga S., Ohyama T., Harashima H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **461**, 7–12 (2007).
- 48) Tsuchiya H., Harashima H., Kamiya H., *J. Gene Med.*, **7**, 486–493 (2005).
- 49) Tsuchiya H., Sawamura T., Harashima H., Kamiya H., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1958–1962 (2005).
- 50) Tsuchiya H., Harashima H., Kamiya H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 1194–1200 (2005).