

遺伝子治療のための新規人工遺伝子デリバリーシステム：多機能性 エンベロープ型ナノ構造体の開発

小暮健太郎

Development of a Novel Artificial Gene Delivery System Multifunctional Envelope-type Nano Device for Gene Therapy

Kentaro KOGURE

Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received May 31, 2007)

For efficient gene delivery to the nucleus, nonviral vectors need to overcome several barriers such as the plasma membrane, endosomal membrane, and nuclear membrane. To overcome these obstacles, it is necessary to equip the delivery system with various functional devices. However, it is difficult to package all such functional devices into a single system to exert each of their functions at the appropriate time and at the correct location. Thus our group proposed a new packaging concept, “programmed packaging.” A multifunctional envelope-type nano device (MEND) was developed for use as an efficient nonviral system for the delivery of plasmid DNA (pDNA), oligodeoxynucleotide (ODN), and siRNA using octaarginine (R8) as an internalizing ligand based on the programmed packaging. The R8-modified MEND (R8-MEND) encapsulating pDNA showed significantly high transfection activity comparable to that of adenovirus, and the uptake pathway of R8-MEND was macropinocytosis, which can avoid lysosomal degradation. R8-MEND successfully delivered gene to hair follicles after *in vivo* topical application to mouse skin. Moreover, R8-MEND encapsulating anti-luciferase ODN using protamine showed a 90% antisense effect, and R8-MEND encapsulating siRNA condensed with stearylated R8 significantly silenced luciferase activity. Our group thus succeeded in the development of R8-MEND based on programmed packaging, and MEND is a promising new delivery system for pDNA and functional nucleic acids.

Key words—gene delivery; nonviral vector; gene therapy

1. はじめに

遺伝子治療を目的とした人工遺伝子デリバリーシステムの研究は近年盛んに行われているが、ウイルスを凌駕するような画期的なシステムが開発されるまでには至っていない。われわれは、従来のデリバリーシステム開発のアプローチには限界があると考え、ウイルスに近づけるものを作り出すために、新しいコンセプトを提唱し、それに基づく新規な人工遺伝子デリバリーシステムの開発を行ってきた。いまだプロトタイプで開発途上ではあるが、高い機能

性を有するものを構築できたため、本稿で紹介させて頂く。

2. 新しいパッケージングコンセプト Programmed Package

人工遺伝子デリバリーシステムにより、目的の臓器・組織まで送達し、標的となる細胞の核内にまで遺伝子を移行させるには、細網内皮系によるトラップを回避しつつ、血管壁を乗り越えて組織に到達したのち、標的細胞に結合することで取り込まれ、エンドソームなどの細胞内小胞から脱出して、最終的に核膜を突破する必要がある (Fig. 1).¹⁾ このように、多くの障壁を突破し、効率よく遺伝子を送達するためには、体内動態及び細胞内動態を積極的に制御する必要があり、多くの機能性素子が開発されてきた。²⁾ 例えば、細網内皮系を回避し血中滞留性を向上させる目的の親水性高分子ポリエチレングリコール (PEG) や、特定の細胞表面に発現してい

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)

現住所：京都薬科大学 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5)

*e-mail: kogure@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成 18 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

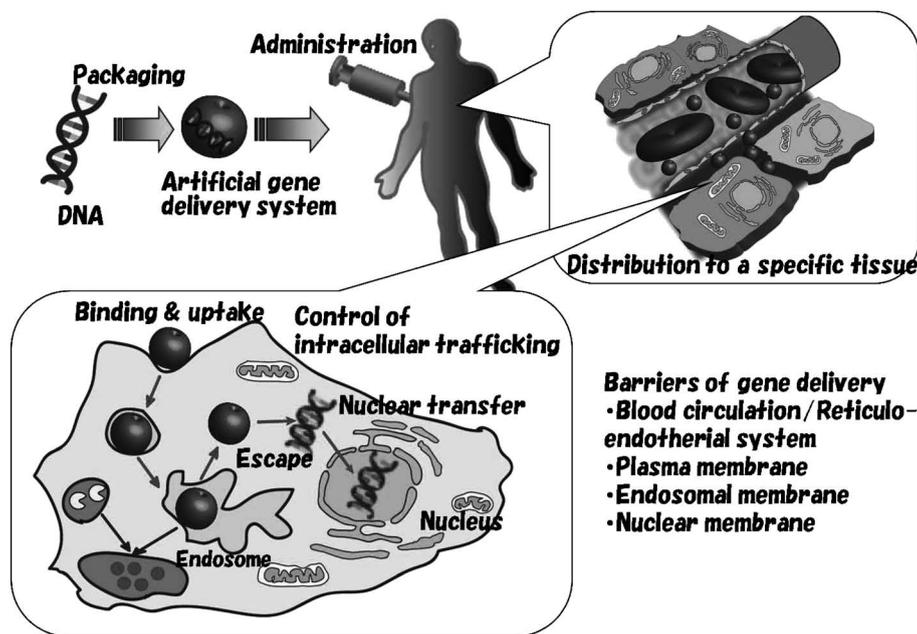


Fig. 1. Various Barriers of Efficient Gene Delivery by Artificial Delivery System

るレセプターを認識し特異的な送達を可能にする標的化リガンド、また細胞に取り込まれたのちのエンドソーム脱出を促進する pH 感受性膜融合性ペプチドなどである。多彩な機能性素子が、適切なタイミングと場所においてそれぞれの機能を発揮することによって、体内動態と細胞内動態の制御が可能になる。

従来の人工遺伝子デリバリーシステムは、大別して 2 種類からなる。1 つは、カチオン性高分子とプラスミド DNA との複合体である polyplex であり、例えばポリ-L-リジン (PLL) やポリエチレンジアミン (PEI) とプラスミド DNA からなる複合体が知られている。もう 1 つは、カチオン性脂質とプラスミド DNA との複合体である lipoplex である。人工遺伝子デリバリーシステムには、体内動態や細胞内動態を制御し遺伝子送達効率を向上させるために、前述の機能性素子を組込んだものも開発されている。例えば、PEI に標的化のためのリガンドとしてトランスフェリン (Tf) や血中滞留性向上のために PEG を修飾したものや、³⁾ カチオン性脂質にインフルエンザウイルス由来の膜融合ペプチドを組込んだものが報告されている。⁴⁾ しかしながら、従来の人工遺伝子デリバリーシステムは、ほとんどが「単純な混合」によって調製され、機能性素子とその機能を発揮できるような「トポロジー」を保持で

きているか否かは定かではない。

すなわち、人工遺伝子デリバリーシステムに搭載した多くの機能性素子を適切なタイミングと場所において機能させる目的で、それらが機能を発揮可能な最適なトポロジーを制御した形で、ナノサイズのデリバリーシステム上に搭載することが重要になる。しかしながら、従来のデリバリーシステムは、デリバリーシステム調製時に機能性素子のトポロジーを制御し適切な時間と場所で機能させることは不可能であった。われわれは、デリバリーの戦略を明確にすることによって各素子が機能を発揮すべき時間と場所が明らかとなり、それを実現する目的で機能性素子の配置とトポロジーが設計され、その設計に基づいた構築 (パッケージング) がなされるべきであると考え、人工遺伝子デリバリーシステムの新しいパッケージングコンセプトとして Programmed Packaging を提唱している。⁵⁾ Programmed Packag-



小暮健太郎

京都薬科大学薬品物理化学分野教授。博士 (薬学) 1994 年徳島大学大学院薬学研究科修了後、富山医科薬科大学 (現富山大学) 薬学部助手、徳島大学薬学部助手、CREST 博士研究員、北海道大学薬学部特任講師を経て、2007 年 4 月より現職。研究領域は生体膜と遺伝子デリバリー。好きなものは、STAR TREK、ホークス、酒。

ing とは、1) デリバリーシステムの体内/細胞内動態における様々な障壁を突破する戦略を立案し (Programming), 2) 戦略の達成に必要な新規機能性素子を創製するとともにデリバリーシステムを設計し (Molecular design), 3) 新規構築技術を駆使して設計を具現化する (Packaging), という 3 要素から構成される。一見当たり前のようなことであるが、構築技術 (Assembly) が伴っておらず、実際に順序立てて開発されたデリバリーシステムは皆無である。

3. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体 MEND

われわれは、Programmed Packaging を実現するためには、デリバリーシステムの基本構造が重要であると考えた。多種類の機能性素子のトポロジー制御が容易であり、送達されるべき積荷とキャリアが独立されている構造が有利であると考えた。このような観点からわれわれは、エンベロープ型ウイルスに着目した。例えば、知名度の高いエンベロープ型ウイルスであるインフルエンザウイルスは、積荷であるウイルスゲノムとデリバリー (感染) に必要な機能 (細胞への取り込みと細胞質への脱出) が独立している。この構造を基本に、Fig. 2 に示すような、ナノ粒子化された機能性核酸コア (プラスミド DNA, アンチセンスオリゴ DNA, 及び siRNA など) が、脂質エンベロープ膜 (リポソーム膜) によって包まれた構造体を設計した。エンベロープ膜は、種々の機能性素子 (例えば血中滞留性向上を目的とした PEG, 標的化を可能にする特異的リガン

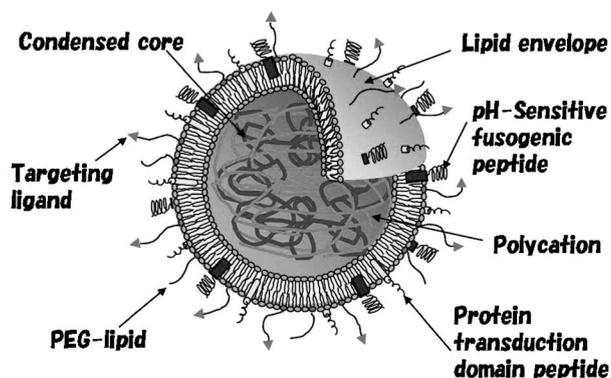


Fig. 2. Schematic Representation of Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND)

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.

ド分子, 細胞への取り込み促進を期待した細胞膜透過性ペプチド, エンドソームからの脱出促進を目的とした膜融合性素子など) によって修飾されており, それらは送達戦略に添った形で配置されている。われわれは, 設計した構造体を「多機能性エンベロープ型ナノ構造体: Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND)」と命名した。⁶⁾

4. オクタアルギニン R8 修飾 MEND

効率よく DNA を核に送達する戦略として, 通常のエンドサイトーシスとは異なる経路を選択可能な機能性素子として, 細胞膜透過性ペプチド (CPP) であるオクタアルギニン R8 に着目した。R8 は, HIV の Tat ペプチドがアルギニンを多く含むことから発想して京都大学の二木らによって開発されたもので, 詳細な検討の結果, アルギニン残基数は 8 が最適であることが見出された。⁷⁾ 当時, CPP は通常のエンドサイトーシスとは異なる経路 (非エンドサイトーシス経路) によって細胞に取り込まれると考えられていた。そこで, われわれがカチオン性である R8 に機能性素子として期待したものは, カチオン性による細胞への高い結合性と核への高い親和性と CPP であることによる非エンドサイトーシス経路での取り込みである。R8 はプラスミド DNA と複合体を形成し, 高い遺伝子発現を誘導できることが明らかになっていたので,⁸⁾ これがわれわれの期待した非エンドサイトーシス経路によるものかどうかを検討した結果, 意外にも R8/DNA 複合体の取り込み経路は, クラスリン介在性のエンドサイトーシスであった。⁹⁾ しかしながら, R8 ペプチド単独では非エンドサイトーシス経路で取り込まれることから, R8 ペプチドの存在状態が取り込み経路を決定するのではないかと考え, MEND への修飾を想定して R8 を表面に修飾したりポソームを用いて, 細胞への取り込み経路について検討を行った。その結果, R8 修飾リポソームの取り込みは, 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ヨ糖では阻害されず, 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のみ阻害された。¹⁰⁾ この結果から, R8/DNA 複合体とは異なり, R8 修飾リポソームは通常のエンドサイトーシス経路ではないマクロピノサイトーシスによって取り込まれることが明らかになった。興味深いことに, リポソームに修飾する R8 の密度を 5% から 0.8% に

下げると、R8 修飾リポソームの取り込み経路が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に変わることが明らかになり、¹⁰⁾ 機能性素子は単にキャリアーに付与するだけではなく、そのトポロジー(存在形態や密度など)をコントロールすることが重要であり、Programmed Packaging に欠くことのできない要素であることが明らかになった。

R8 修飾 MEND (R8-MEND) は、2つのステップからなる Lipid film hydration 法によって調製される。⁶⁾ 1st ステップでは、プラスミド DNA などの核酸をポリカチオンとの静電的相互作用によって荷電を有するナノ粒子化 (100 nm 以下) し、2nd ステップにおいて脂質膜の水和と脂質膜/ナノ粒子の静電的相互作用のために脂質乾燥薄膜に荷電ナノ粒子懸濁液を添加し、超音波処理によってナノ粒子を脂質膜でコートし MEND 形成させる。最後に MEND 懸濁液にステアリル化 R8 (STR-R8) を添加することで膜表面に R8 ペプチドを提示させた R8-MEND が得られる。

R8-MEND を、最強のウイルスベクターであるアデノウイルスと 2 種類の細胞系において、比較した結果、R8-MEND は全く細胞毒性を示すことなく同等の遺伝子発現活性を示すことが明らかになった。⁵⁾ *In vitro* において高い遺伝子発現活性を有する R8-MEND の *in vivo* への応用として、皮膚毛包への局所投与による遺伝子導入を試みた。LacZ プラスミド DNA 及び GFP プラスミド DNA を封入した R8-MEND を、毛を刈ったマウスの背中に塗布し、2 週間後に毛幹を観察した結果、 β -gal 陽性及び GFP の蛍光が観察されたことから、R8-MEND は毛包細胞に遺伝子導入可能であることが明らかとなった。遺伝子導入効率を Lipofectamine (LFN) と比較したところ、LFN はほぼゼロであったのに対して、R8-MEND の効率は約 25% を示し、高い遺伝子導入能を有することが明らかとなった。レポーター遺伝子ではなく毛成長に関連する遺伝子 Born morphogenetic protein receptor type-1 a (BMPRI1A)¹¹⁾ を封入した R8-MEND をマウスの皮膚に塗布した結果、明らかな毛周期の遅延が認められた (Fig. 3)。恐らく、R8-MEND によって導入された BMPRI1A が毛包内で発現し、それによって毛周期が遅延されたと考えられ、R8-MEND によ

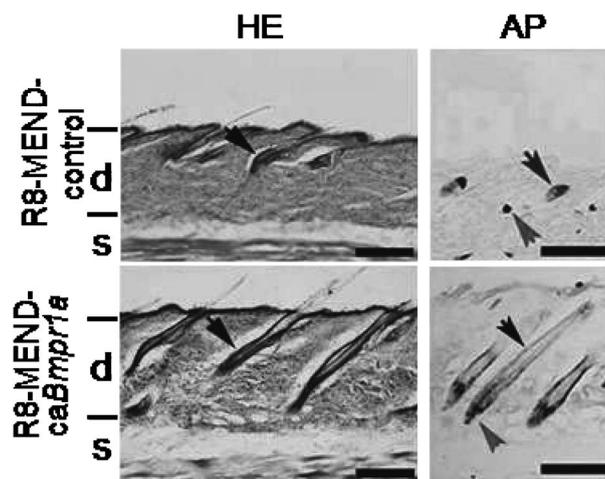


Fig. 3. *In vivo* Applications of R8-MEND

Hair follicle formation in mice skin treated with R8-MEND containing GFP (R8-MEND-control) or GFP and a constitutively active form of *Bmpr1a* (R8-MEND-*caBmpr1a*). Tissue sections were stained with Hematoxylin-eosin (HE). Black arrows indicate hair follicles in the dermis. Cells were stained for Alkaline Phosphatase (AP) activity to determine hair cycle phase (see text). Black arrow: sebaceous gland, gray arrow: dermal papilla, black arrow: outer root sheath, d: dermis, s: subcutis space. Scale bars: 200 μ m.

て生体に導入された機能性遺伝子が、その機能を発揮できることを示している。したがって、R8-MEND は局所投与による遺伝子治療のツールとしての可能性が期待される。

5. 機能性核酸キャリアーとしての R8-MEND

高い機能性を発揮できる R8-MEND は、遺伝子の発現だけではなく、特異的遺伝子の抑制ツールであるアンチセンスオリゴ DNA (ODN) 及び siRNA のキャリアーとしても期待される。しかし、ODN は 1 本鎖で短い (20 b 前後) であり、siRNA も 20 bp 程度の短い 2 本鎖 RNA であるため、プラスミド DNA と同様に効率よく MEND にパッケージ可能であるかどうか不明であった。そこで、3 種のポリカチオン (ポリ L リジン (PLL)、ステアリル化 R8 (STR-R8) 及びプロタミン) を用い、まずは ODN のナノ粒子化を検討した。その結果、3 種のポリカチオンすべてによって 100 nm 以下のナノ粒子を調製することに成功した。ODN ナノ粒子を MEND にパッケージするために lipid film hydration 法を行ったところ、3 種のナノ粒子をすべて R8-MEND に封入することに成功した。¹²⁾ 封入効率は、80% 以上であり非常に高いものであった。

一方 siRNA では、100 nm 以下 (約 60 nm) のナノ粒子化が可能であったのは STR-R8 のみであり、

PLL 及びプロタミンでは 200 nm 以上の大きな粒子しか得られなかった。siRNA ナノ粒子をコアとして MEND への封入を試み、ショ糖密度勾配分画により評価した結果、STR-R8/siRNA 複合体の場合においてのみ従来の MEND と同様の比重を有したものが得られたが、PLL 及びプロタミンの場合には空のリポソームと同様の分画に siRNA が確認されたことから、STR-R8 によって調製したナノ粒子のみが MEND に封入可能であることが明らかとなった。¹³⁾ ポリカチオンに依存したナノ粒子化の成否を左右する構造的因子として、STR-R8 の疎水基 (ステアリル基) 及び他のポリカチオンよりも短いカチオン鎖が考えられ、siRNA ナノ粒子化の過程において有利に働いている可能性がある。また、プラスミド DNA や ODN のナノ粒子化と大きく異なる理由としては、DNA が A 型、B 型、Z 型などいくつかの立体構造を取り得るのに対して、RNA 2 本鎖は A 型に偏っている (構造の自由度が低い) ことが可能性として考えられ、siRNA のナノ粒子化は DNA とは異なり、いくつかの条件を満たす必要があることが示唆された。

3 種のポリカチオンによって調製した R8-MEND による特異的遺伝子抑制効果を比較した結果、ODN-R8-MEND の場合、PLL/ODN 複合体及び STR-R8/ODN 複合体を用いて調製した R8-MEND は、ほとんどアンチセンス効果を示さなかった。一方、プロタミン/ODN 複合体を含む R8-MEND は、非常に高いアンチセンス効果を示した。市販のトランスフェクション試薬である LFN2000 と比較した結果、LFN2000 によるアンチセンス効果は、時間とともに減弱していくのに対して、ODN-R8-MEND に (プロタミン) によるアンチセンス効果は 48 時間まで持続するものであった。¹²⁾

一方、siRNA-R8-MEND (STR-R8) の特異的抑制効果をルシフェラーゼ安定発現細胞株を用いて検討した結果、投与量と時間に依存して高い抑制効果を示した (Fig. 4)。¹³⁾ LFN 2000 と抑制効果を比較した結果、本来のルシフェラーゼの活性を 100 としたとき、抗ルシフェラーゼ siRNA 封入 R8-MEND は強力な抑制効果を示したが、LFN 2000/抗ルシフェラーゼ siRNA 複合体による有意な抑制効果は認められなかった。対照となる抗 GFPsiRNA の場合において LFN2000 処理細胞では、本来のルシフェ

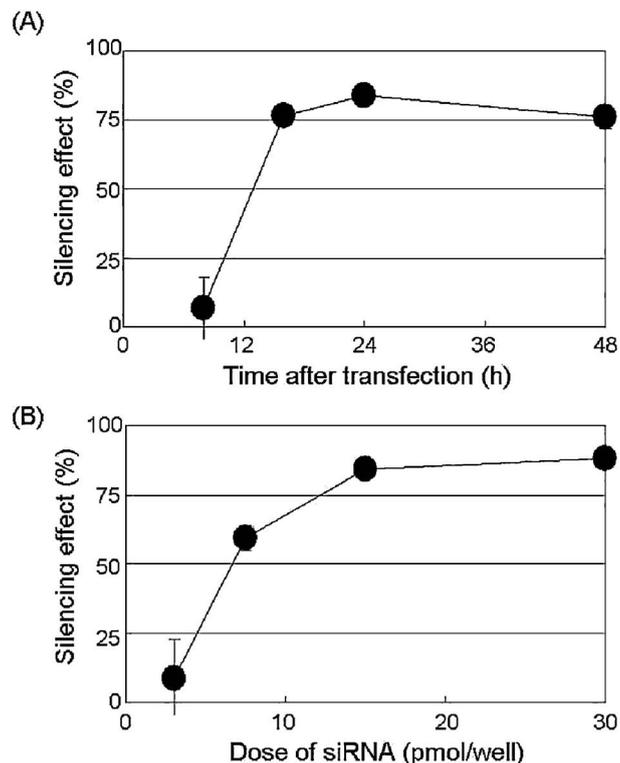


Fig. 4. Silencing Effect of R8-MEND Encapsulating Anti-luciferase siRNA on the Luciferase Activity of HeLa Cells Stably Expressing Luciferase

A) Time-dependent silencing effect of R8-MEND. R8-MEND (30 pmol/well siRNA) was transfected to HeLa cells (4×10^4 cells), and the luciferase activities were measured at 8 h, 16 h, 24 h and 48 h after transfection. B) Dose-dependent silencing effect of the R8-MEND. Various amounts of R8-MEND were transfected to HeLa cells (4×10^4 cells) and the luciferase activity was measured 24 h after transfection. Relative gene silencing was calculated by normalizing to cells treated with non-specific (anti-GFP) siRNA. The values are the mean \pm S.D. ($n=3$).

ラーゼ活性が 5 倍以上に増大していることが明らかとなった。そのため、LFN2000/抗 GFPsiRNA 複合体処理群と比較すると、LFN2000/抗ルシフェラーゼ siRNA 複合体処理群は有意にルシフェラーゼ遺伝子を抑制していると言える。恐らく、LFN2000 はなんらかの作用によって非特異的に遺伝子の発現を増強しているのではないかと推察された。一方、抗 GFPsiRNA 封入 R8-MEND 処理細胞においての活性の有意な増大は認められなかった。細胞毒性を比較した結果、LFN2000 は有意な毒性を示したのに対して、R8-MEND は全く毒性を示さなかった。したがって R8-MEND は、非特異的な遺伝子発現増強や毒性などの副作用を示すことなく強力に遺伝子抑制効果を発揮できることから、特異的遺伝子抑制のための有用なツールとして期待される。

6. 核内動態制御の重要性

以前から、人工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。非線形性の原因を解明することは、人工遺伝子デリバリーシステムの遺伝子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 R8-MEND 及び一般的な lipoplex である LFX 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 (Fig. 5)。興味深いことに、R8-MEND は前述のように取り込みメカニズムや細胞内動態が通常のキャリアー (LFN) と異なるにも係わらず、同様に非線形性が認められた。解析の結果、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した結果得られる PD は非線形であることが明らかになり、人工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と示唆された。¹⁴⁾ 従来、人工遺伝子デリバリーシステムの機能改善のためには、IPK を促進することが重要であると考えられてきたが、核移行後の PD の考慮も重要である。

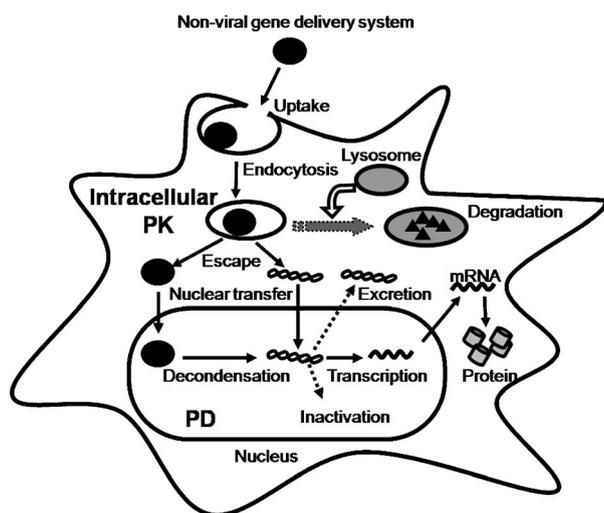


Fig. 5. Schematic Image of Intracellular PK and PD of pDNA with a Non-viral Gene Delivery System

Packaged (or complexed) pDNA is internalized via endocytosis, leading to lysosomal degradation. Once escaping from endosome/lysosome either in condensed form or free form, the pDNA must then pass through the nuclear membrane. The condensed pDNA in the nucleus must then be decondensed to free pDNA before transcription. The transcribed messenger RNA is effluxed to cytosol for translation.

7. おわりに

以上紹介したように、われわれは非常に高い機能性を有している R8-MEND の開発に成功した。しかしながら、R8-MEND はプロトタイプであり、Fig. 2 で示した理想的な MEND とするためには、改良を行わなければならない。最後の項で述べたように、MEND も含めた人工遺伝子デリバリーシステム開発は、細胞内動態のみならず核移行後の核内動態の制御・改善も考慮する必要がある。また、実用化のためには、製剤化 (均一で安定した MEND の開発) を行わなければならない。今後、実用化をも視野に入れて MEND の機能性向上と新たな構築方法の開発に取り組んでいきたい。

謝辞 本稿で紹介した研究は、すべて北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室で行われたものであり、最良の研究の場とチャンスを与えていただいた原島秀吉教授に感謝申し上げます。また、研究にご協力いただいた紙谷浩之准教授、秋田英万助教、山田勇磨助手、及び大学院生、学部学生の皆様に感謝申し上げます。

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) Ogris M., Walker G., Blessing T., Kircheis R., Wolschek M., Wagner E., *J. Control. Release*, **91**, 173–181 (2003).
- 4) Schoen P., Chonn A., Cullis P. R., Wilschut J., Scherrer P., *Gene Ther.*, **6**, 823–832 (1999).
- 5) 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).
- 6) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **98**, 317–323 (2004).
- 7) Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836–5840 (2001).
- 8) Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M.,

- Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y., *Biochemistry*, **41**, 3073–3080 (2002).
- 9) Khalil I. A., Futaki S., Niwa M., Baba Y., Kaji N., Kamiya H., Harashima H., *Gene Ther.*, **11**, 636–644 (2004).
- 10) Khalil A. I., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- 11) Yuhki M., Yamada M., Kawano M., Iwasato T., Itohara S., Yoshida H., Ogawa M., Mishina Y., *Development*, **131**, 1825–1833 (2004).
- 12) Nakamura Y., Kogure K., Yamada Y., Futaki S., Harashima H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 431–437 (2006).
- 13) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **119**, 360–367 (2007).
- 14) Moriguchi R., Kogure K., Iwasa A., Akita H., Harashima H., *J. Control. Release*, **110**, 605–609 (2006).