

非ウイルス性ベクターによる臓器・部位・細胞選択的遺伝子導入法に関する研究

麓 伸太郎

Organ-, Region- and Cell-Selective Gene Transfer Using Non-Viral Vectors

Shintaro FUMOTO

Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi,
Nagasaki 852-8521, Japan

(Received May 21, 2009)

Safety in gene therapy is an important issue since both viral and non-viral vectors have toxic side effects. Not only vectors themselves, but also distributions of produced proteins affect safety in gene therapy; thus, development of target-selective gene transfer methods is rational. We have developed organ-, region- and cell-selective gene transfer methods using non-viral vectors. To deliver foreign gene to liver parenchymal cells (hepatocytes), galactosylation of cationic liposome/plasmid DNA complex is useful strategy. Based on analyses for intrahepatic disposition characteristics and interaction with blood components, we formulated novel galactosylated lipoplex with regulated salt concentration to reduce particle size of lipoplex and to stabilize lipoplex simultaneously; as a consequence, we succeeded in improvement of hepatocyte-selective gene transfer after intraportal injection of the lipoplex in mice. On the other hand, administration routes are important for target-selective gene transfer. We discovered that simple instillation of naked plasmid DNA onto organ surface (the liver, kidney, spleen, stomach and lung) in mice and rats could result in effective and region-selective transgene expression. Neither physical force nor carriers are necessary for gene transfer onto organ surface mesothelial cells. To rationally improve transfection efficiency, mechanism of gene transfer should be elucidated. We clarified that Rac-mediated macropinocytosis was required for naked plasmid DNA transfer in gastric mesothelial cells.

Key words—gene delivery; gene therapy; targeting; intraperitoneal organ; mechanism of transfection

1. はじめに

遺伝子治療法は、先天的な遺伝子欠損症のみならず、がんなどの難治性疾患に対する治療法として期待されている。遺伝子導入の方法論としては、体外に取り出した組織や細胞に対し *in vitro* にて遺伝子を導入し、再び体内に戻す *ex vivo* 法と、遺伝子医薬品を直接体内に注入する *in vivo* 法の二つに大別されるが、*ex vivo* 法では操作の煩雑さなどから将来的な普及に難点があるため、その点ではより簡便な *in vivo* 法の確立が望まれる。*In vivo* 遺伝子導入においては、ウイルス性及び非ウイルス性のベクター（運搬体）が用いられており、一般にウイルス性ベクターでは高い遺伝子導入効率を示すが、臨床

試験における死者や白血病の発生があり、安全性に問題がある。一方、非ウイルス性ベクターでは培養細胞においては高い遺伝子導入効率を示すものの、実験動物における遺伝子導入効率は低いことが多い。また、カチオン性リポソームをキャリアとして用いた場合、プラスミド DNA に含まれる CpG モチーフに起因する炎症反応の惹起が問題となる。さらに、ウイルス性ベクターにせよ、非ウイルス性ベクターにせよ、産生されたタンパク質の持つ高い生物活性により、標的以外の部位における遺伝子発現は副作用につながる可能性が高い。したがって、ベクター自身の安全性と産生されたタンパク質の安全性の観点から、ベクターを標的部位選択的に送達することが望ましい。

標的部位選択的に遺伝子を導入するためには、ベクターを生体内に投与後、全身レベルにおける標的臓器・部位への移行から細胞の核に至るまでの全体の過程、つまりベクターの体内・細胞内動態を理解

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

e-mail: sfumoto@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

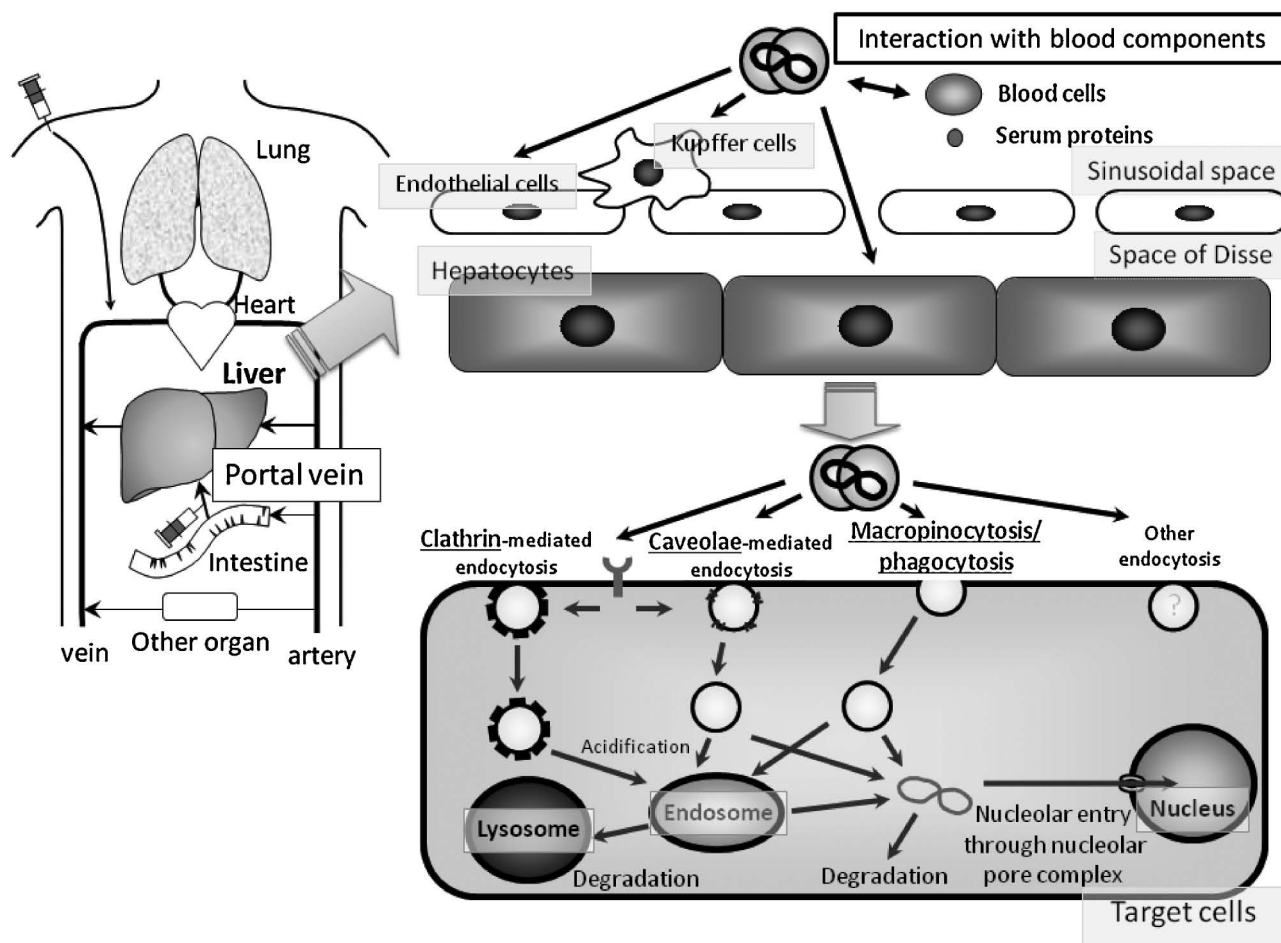


Fig. 1. Schematic Representation of *in Vivo* Gene Delivery Targeted to the Liver

する必要がある (Fig. 1). 細胞の持つ特殊な認識機構を利用するのみならず、投与経路に関しても工夫することで、より標的部位選択的な遺伝子導入を達成し易くなる。ベクターの選択に関しては、非ウイルス性ベクターはウイルス性ベクターよりも安全性が高く、取り扱いが容易であり、機能付加も行い易いという利点を持つ。本稿では、非ウイルス性ベクターによる臓器・部位・細胞選択的遺伝子導入法に関するわれわれの研究成果について論述する。

2. 肝実質細胞選択的な遺伝子導入

肝臓には実質細胞や、クッパー細胞、類洞内皮細胞などの非実質細胞が存在する。目的とする遺伝子を実質細胞に選択的に導入するための方法として、これらの細胞の持つ厳密な糖鎖認識機構を利用する戦略が挙げられる。そこで、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標的とした、ガラクトース修飾コレステロール誘導体 Gal-C4-Chol を含有するカチオン性リポソームとプラスミ

ド DNA の複合体 (ガラクトース修飾リポプレックス) をマウス門脈内に投与したところ、実質細胞選択的な遺伝子発現に至った。¹⁾ しかしながら、投与量の大部分が肝臓に移行しているのにも係わらず、その遺伝子導入効率は培養細胞における遺伝子導入効率に及ばないものであった。したがって、ガラクトース修飾リポプレックスを投与後、肝臓に到達してから実質細胞に至るまでの過程、すなわち血液成分との相互作用、肝局所における動態、類洞内皮壁透過性などに障壁があるものと考えられた。



藪 伸太郎

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬剤学研究室助教。2004年3月京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士(薬学)取得後、2004年4月長崎大学薬学部助手に赴任。2007年4月より現職。研究領域はドラッグデリバリーシステム。趣味は音楽鑑賞(ジャズ、クラシックなど)。

2-1. ガラクトース修飾リポプレックスの肝局所動態の解析

ガラクトース修飾リポプレックスの問題点を抽出するため、ラット肝灌流実験系を用いて、ガラクトース修飾リポプレックスの肝局所動態を速度論的に解析した。²⁾ リポプレックスが血球成分と相互作用した場合、肝局所動態はより複雑となることが予想されたため、血球を含まない灌流液を用いて解析を行った。瞬時投与されたりポプレックスの静脈側流出曲線をモーメント解析した結果、ガラクトース修飾リポプレックスは、未修飾リポプレックスの場合に比べて肝抽出率が高くなることが示された。さらに、2-コンパートメント拡散モデルに基づいて速度論的に評価したところ、ガラクトース修飾複合体は、高い組織結合性及び内在化速度定数を示すことが明らかとなった。肝臓実質細胞と非実質細胞との移行比 (PC/NPC 比) に関しても、ガラクトース修飾複合体のほうが未修飾複合体に比べ約 1.8 倍高い値を示し、実質細胞選択性が增大していることが示されたが、その PC/NPC 比の絶対値は各細胞の血漿接触表面積比よりも小さく、類洞内皮の透過性が制限されていることが示唆された。一方、カチオン性高分子のポリエチレンジアミンに関しても、粒子径などの物性や遺伝子導入効率に及ぼす分子量の影響及びガラクトース修飾の効果を解析している。³⁾ ポリエチレンジアミンとプラスミド DNA の複合体の肝局所動態を解析したところ、より小さな複合体を形成するポリエチレンジアミンでは、カチオン性リポソームの場合に比べ高い実質細胞移行性を示したことから、⁴⁾ 複合体の粒子径が組織移行の重要な因子の 1 つであることが推察された。実際に、リポソームの粒子径を大きくすると、非実質細胞における遺伝子導入効率は改善されるが、実質細胞における遺伝子導入効率は改善されないことを示している。⁵⁾ したがって、リポプレックスの粒子径を小さくすることで、肝実質細胞への移行性を改善できる可能性があるものと考えられた。

2-2. ガラクトース修飾リポプレックスと血清成分の相互作用

表面に高い正電荷を持つガラクトース修飾リポプレックスは、生体内に投与後、標的細胞に到達するまでに、血清タンパク、赤血球などの生体成分と相互作用すると考えられる。そこで、リポプレックスと血液成分との相互作用に関して詳細な解析を行った。⁶⁾ Carboxyfluorescein 標識プ

ラスミド DNA と rhodamine 標識リポソームとの複合体を全血とインキュベーションしたところ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の解消が観察されたのに対し、先に血清と混合したのち、赤血球とインキュベーションした際には顕著な FRET の解消は認められなかった。また、リポプレックスを全血とインキュベーションした場合には、血清とプレインキュベーションした際に比べ、顕著なプラスミド DNA の分解が観察された。これらの結果より、リポプレックスと血清タンパクとの相互作用は極めて強固である一方、複合体が赤血球と相互作用する際には複合体からプラスミド DNA が放出されることが明らかとなった。また、リポプレックスをマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、血清とのプレインキュベーションにより遺伝子発現が顕著に増大したことから、マウス体内において赤血球との相互作用によるリポプレックスからのプラスミド DNA の放出並びに分解が抑制されたものと推察された。以上より、リポプレックスの粒子径のみならず、血中における安定性にも改善の余地があるものと思われる。

2-3. リポプレックス形成時における電荷制御による遺伝子導入効率の改善

粒子径の縮小並びに安定化を同時に実現するにあたって、リポプレックスの形成過程を理解することが重要である。リポプレックス形成時における分散溶媒のイオン濃度は、カチオン性リポソーム及びプラスミド DNA の表面電荷、さらにはリポプレックスの凝集に影響を与えると考えられる。そこで、溶媒中イオン濃度を精密に設定することによってリポプレックスの物性を制御できるという仮説を立て (電荷制御仮説, Fig. 2)、物性の評価並びに体内動態、遺伝子発現に対する改善効果について検討した。⁷⁾ グルコースと塩化ナトリウムからなる等張溶液中における各種ガラクトース修飾リポプレックスの粒子径を測定した結果、低濃度 (5 mM) の塩化ナトリウム存在下、リポプレックスの粒子径は最小となり、平均粒子径は 120 nm となった。また、5 mM 塩化ナトリウム存在下調製したりポプレックス (電荷制御リポプレックス) の場合には、グルコースのみからなる溶媒で調製した場合に比べ、生理食塩水で希釈した際の凝集速度が遅くなることが示された。FRET による解析で、電荷制御リポプレックスにおいては脂質がプ

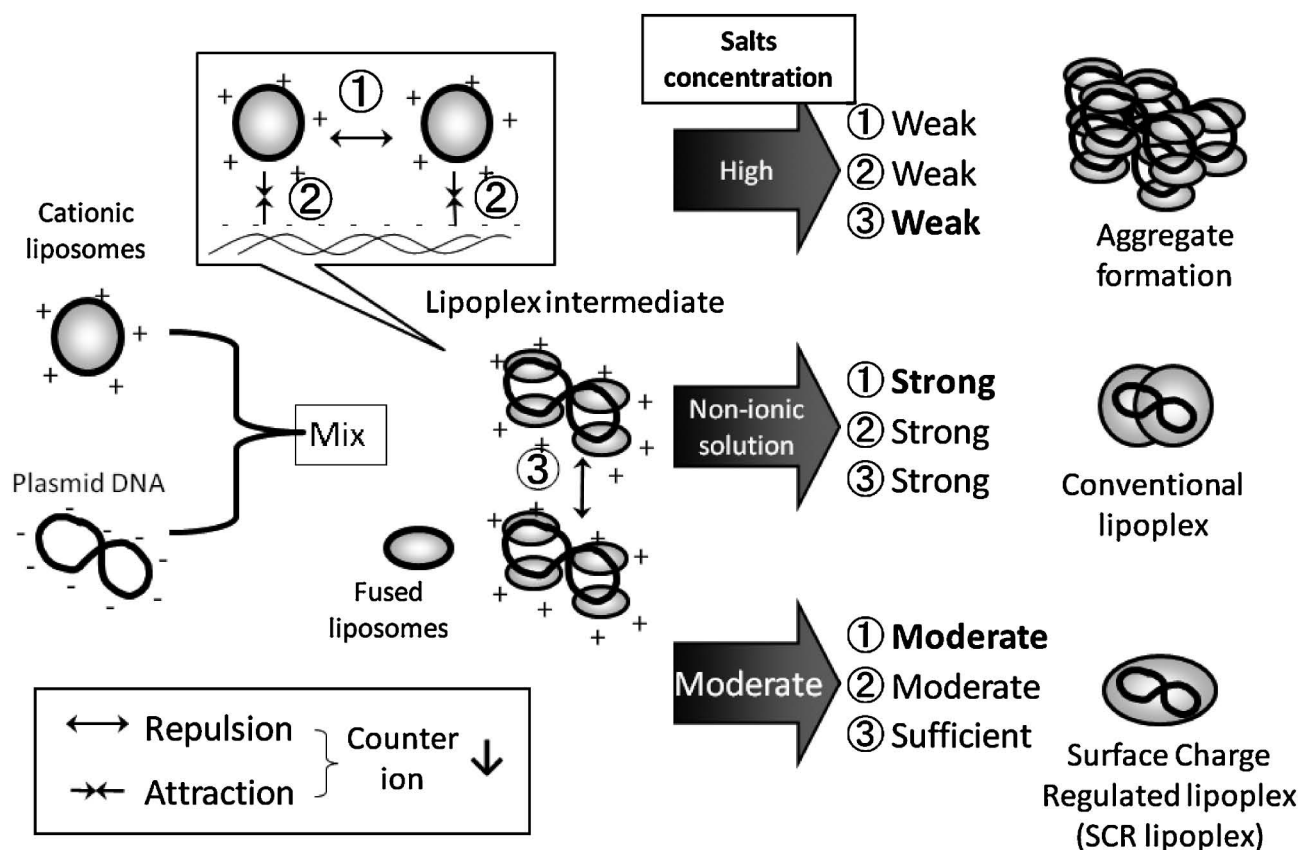


Fig. 2. Scheme of Surface Charge Regulation Hypothesis for Formation of Stable Lipoplex

Numbers for each process represent 1, repulsion among cationic liposomes, 2, attraction between cationic liposomes and plasmid DNA, and 3, repulsion among lipoplex intermediates, respectively. Fusion of cationic liposomes during lipoplex formation is important for lipoplex stability. Presence of moderate concentration of salts in lipoplex solution enhances fusion of cationic liposomes in the lipoplex and keeps sufficient repulsion among lipoplex intermediates; as a consequence, lipids in the lipoplex efficiently covers plasmid DNA.

ラスミド DNA の周りを効果的に覆うことが明らかとなり、さらに、血中での安定性が改善していることも示された。肝灌流実験系において両複合体の肝局所動態を評価したところ、電荷制御リポプレックスでは組織結合性が顕著に高くなり、肝実質細胞への移行性が増大する傾向にあった。そこで複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、電荷制御複合体では遺伝子発現が 20 倍程度増大し、標的の肝実質細胞で特に高い値を示した。この概念は肺を標的とした未修飾リポプレックスについても有効で、電荷制御リポプレックスは静脈内投与後の肺における遺伝子導入効率を顕著に改善した。⁸⁾

3. 投与経路の工夫による臓器・部位選択的な遺伝子導入

従来の血管系への投与方法では、原理上、広範な細胞に対する遺伝子導入が可能である一方で、臓器全体に分布してしまうことで、病巣部位など、臓器内

の特定部位選択的に遺伝子を導入することは難しい。これに対し、われわれはこれまでに、臓器内の特定部位選択的な薬物送達を目的として、肝臓や腎臓、胃、小腸などの腹腔内臓器表面へ薬物を直接する投与方法を開発した [Fig. 3(A)].⁹⁻¹²⁾そこで、この臓器表面投与方法を遺伝子デリバリーに応用し、以下に論述する。

3-1. プラスミド DNA 単体の腹腔内及び胸腔内臓器表面への滴下投与

一般に、培養細胞ではプラスミド DNA 単体の遺伝子導入効率は低く、カチオン性リポソームなどのキャリアを用いる必要がある。しかしながら、カチオン性リポソーム自体にアポトーシスの誘導作用など毒性があることが知られており、より安全なキャリアの合成研究が広く行われている。一方、動物レベルでは、肝臓などに対する局所注入法¹³⁾やエレクトロポレーション法¹⁴⁾さらには高容量のプラスミド DNA 溶液を瞬時に静脈内に投与するハイドロダイナミクス法¹⁵⁾などによ

り、プラスミド DNA 単体においても効率的な遺伝子導入が可能である。これらの方法に共通する点は、組織・細胞に対し物理的な力がかかることである。

これに対しわれわれは、臓器表面投与法を遺伝子デリバリーに応用するに当たり、対照実験としてプラスミド DNA をマウスの腹腔内の臓器表面に単に滴下し、効率的な遺伝子導入に至ることを明らかにした (Fig. 4)。これまでに、肝臓,¹⁶⁾ 腎臓,¹⁷⁾ 脾臓,¹⁸⁾ 胃漿膜¹⁹⁾ 及び肺²⁰⁾ の各臓器表面に対して遺伝子導入が可能であることを示している。その遺伝子

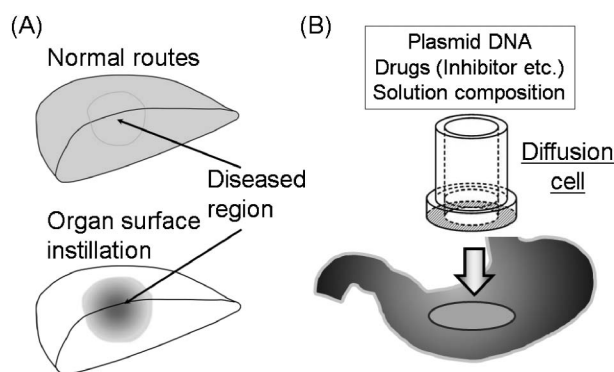


Fig. 3. Schematic Representation of Proposed Drug Distribution via Normal Routes and Organ Surface Instillation (A), and of *in Situ* Experiment (B)

発現は投与した臓器選択的であり、さらに肝臓の投与葉や片側の腎臓、肺など、投与した部位選択的でもあった。腹腔内視鏡などの進歩により、臓器表面に投与するためには必ずしも開腹する必要はなく、実際に、カテーテルを用いれば安全性に問題がないことも示した。²¹⁾ また、円筒状の拡散セルを臓器表面に貼付し [Fig. 3 (B)], そこにプラスミド DNA を投与することで周辺組織への拡散を防いだところ、投与部位特異的な遺伝子発現が得られたことから、滴下投与時の周辺組織における遺伝子発現はプラスミド DNA の拡散に起因するものと考えられた。¹⁶⁻¹⁹⁾ そこで、投与容量、投与速度を厳密に制御することで周辺組織への拡散を抑制することを試み、マウスの胃漿膜表面に滴下するプラスミド DNA の投与容量を可能な限り減じれば胃選択性が改善すること、²²⁾ マウスより臓器の大きいラットでは、さらに高い選択性を示すこと、²³⁾ 並びにマウス肝臓表面に微量を持続的に滴下することで、投与部位以外において遺伝子発現が検出されなくなること²⁴⁾ を見出した。

遺伝子発現に至る細胞は主に中皮細胞であり、²³⁾ プラスミド DNA の分子量を考えるとその下層までは送達されにくいことが考えられるが、胃の粘膜側で発生したがんが漿膜側に浸潤した際などには、本

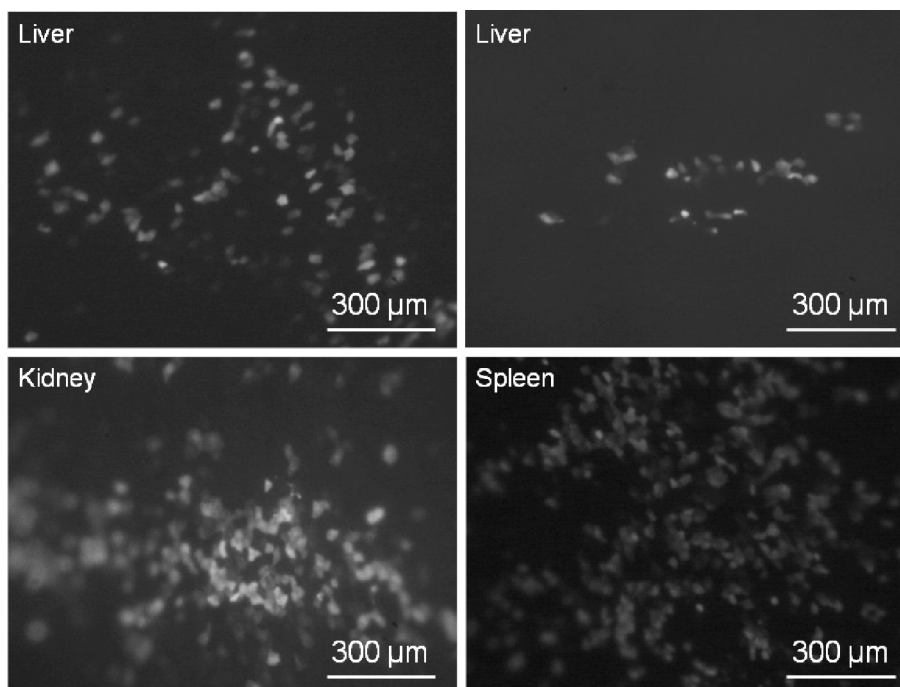


Fig. 4. Gene Expression (ZsGreen1) on Intraperitoneal Organs after Organ Surface Instillation of Plasmid DNA

投与方法が有効であるものと考えられる。²⁵⁾ また、分泌性のタンパク質であれば中皮細胞の下層の細胞にも働くものと思われ、実際に分泌性のタンパク質を胃漿膜表面に遺伝子導入した際にも、血中へ分泌されうることを示している。²⁶⁾

3-2. 遺伝子導入メカニズムの解析 プラスミド DNA 単体を臓器表面に単に滴下するだけで効率的な遺伝子導入に至ることを示したが、個体や部位によってばらつきが大きい (Fig. 4)。つまり効率的な遺伝子導入に至る細胞と至らない細胞があり、後者の存在は遺伝子導入効率に改善の余地があることを示しているものと思われる。また、キャリアや物理的な力によらず遺伝子発現に至ることは、生物学的に大変興味深い。そこで、遺伝子導入を改善するための情報並びに細胞機能に関する情報を得るために、プラスミド DNA 単体による遺伝子導入機構を解析した。臓器表面投与方法では標的細胞への移行は達成しており、ここでは細胞取り込み機構に着目して解析を行った。実験には各種阻害剤の使用が不可欠であったため、投与条件を厳密に制御可能な、拡散セルを用いた *in situ* 実験 [Fig. 3 (B)] を行った。この実験系により、溶媒の組成の影響を解析し、低張であるほど遺伝子導入効率が高いことを示している。²⁷⁾ これまでに、プラスミド DNA の細胞取り込みは単純なポリアニオン認識機構によるものではないこと、並びに細胞取り込み経路はクラスリン介在性エンドサイトーシスやカベオラ/脂質ラフト介在性エンドサイトーシスではなく、マクロピノサイトーシス又はファゴサイトーシスであることを明らかにした。²⁸⁾ さらに、プラスミド DNA による遺伝子導入は、アクチンダイナミクスによって制御されたイベントであること、このアクチンダイナミクスに必要な細胞内シグナル伝達経路は、Rac を介したものであることを見い出した。²⁹⁾

4. おわりに

ガラクトース修飾リポプレックスに関し、問題点を抽出し、問題点を解決しうる製剤設計により、肝実質細胞選択的に遺伝子導入効率を改善した。また、投与経路の工夫として、プラスミド DNA を臓器表面に投与する方法により、臓器・部位選択的に遺伝子を導入することに成功した。さらに、臓器表面投与方法におけるプラスミド DNA の細胞取り込み機構として、Rac 経路によって制御されたマクロピ

ノサイトーシスが重要な役割を果たしていることを見い出した。現在、プラスミド DNA 単体による遺伝子導入におけるメカニズムを、さらに解析中である。今後、メカニズムをベースとして遺伝子導入効率を改善し、各種病態モデルに対する治療効果を検証していきたい。臓器表面投与方法では、生体肝移植後のドナー及びレシピエントに対する *in vivo* 再生療法、重篤な胃潰瘍及び漿膜側に浸潤した胃がんなどを考えており、脾臓への遺伝子導入では DNA ワクチンによる感染症に対する治療やがん免疫療法も可能かもしれない。

謝辞 本稿で紹介した研究は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬剤学研究室及び京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野において行われたものであり、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました長崎大学中村純三教授並びに京都大学橋田充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、種々の有益なご助言とご指導を頂いた長崎大学西田孝洋准教授、京都大学山下富義准教授並びに京都大学川上茂助教に謹んで深く感謝の意を表します。また、研究にご協力頂きました大学院生、学部学生の皆様に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kawakami S., Fumoto S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **17**, 306–313 (2000).
- 2) Fumoto S., Nakadori F., Kawakami S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **20**, 1452–1459 (2003).
- 3) Morimoto K., Nishikawa M., Kawakami S., Nakano T., Hattori Y., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *Mol. Ther.*, **7**, 254–261 (2003).
- 4) Fumoto S., Kawakami S., Ishizuka M., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **18**, 230–237 (2003).
- 5) Higuchi Y., Kawakami S., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1521–1523 (2006).
- 6) Fumoto S., Kawakami S., Shigeta K., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 484–493 (2005).
- 7) Fumoto S., Kawakami S., Ito Y., Shigeta K.,

- Yamashita F., Hashida M., *Mol. Ther.*, **10**, 719–729 (2004).
- 8) Kawakami S., Ito Y., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **7**, 1526–1533 (2005).
- 9) Nishida K., Fujiwara R., Kodama Y., Fumoto S., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Pharm. Res.*, **22**, 1331–1337 (2005).
- 10) Nishida K., Kamenosono M., Kuma A., Fumoto S., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Drug Target*, **13**, 215–223 (2005).
- 11) Nakamura J., Kobayashi K., Fumoto S., Nishi J., Mukai T., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1049–1053 (2005).
- 12) Nishida K., Kuma A., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 1073–1077 (2005).
- 13) Hickman M. A., Malone R. W., Lehmann-Bruinsma K., Sih T. R., Knoell D., Szoka F. C., Walzem R., Carlson D. M., Powell J. S., *Hum. Gene Ther.*, **5**, 1477–1483 (1994).
- 14) Somiari S., Glasspool-Malone J., Drabick J. J., Gilbert R. A., Heller R., Jaroszeski M. J., Malone R. W., *Mol. Ther.*, **2**, 178–187 (2000).
- 15) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 16) Hirayama R., Nishida K., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1697–1699 (2004).
- 17) Hirayama R., Nishida K., Fumoto S., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 181–184 (2005).
- 18) Nakamura J., Fumoto S., Kawanami R., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 941–945 (2007).
- 19) Nakamura J., Fumoto S., Shoji K., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2082–2086 (2006).
- 20) Nakamura J., Fumoto S., Ariyoshi K., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 729–732 (2007).
- 21) Fumoto S., Furukawa H., Kodama Y., Nishi J., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *Drug Delivery System*, the 23rd Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, Kumamoto, June 2007, Vol. 22 No. 3, p. 313.
- 22) Nishi J., Fumoto S., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**, 633–639 (2008).
- 23) Nishi J., Fumoto S., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *J. Gastroenterol.*, **43**, 912–919 (2008).
- 24) Fumoto S., Tsuchimochi M., Nishi J., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1298–1302 (2009).
- 25) Fumoto S., Nishi J., Nakamura J., Nishida K., *Curr. Gene Ther.*, **8**, 187–200 (2008).
- 26) Wang X., Fumoto S., Hori Y., Nakamura J., Nishida K., Abstract of papers, the 129th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Kyoto, March 2009, No. 4, p. 175.
- 27) Hirayama R., Fumoto S., Nishida K., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2166–2169 (2005).
- 28) Nishi J., Fumoto S., Ishii H., Kodama Y., Nakashima M., Sasaki H., Nakamura J., Nishida K., Abstract of papers, the 24th Annual Meeting of the PSJ Kyushu Branch, Fukuoka, December 2007, p. 10.
- 29) Nishi J., Fumoto S., Nakamura J., Nishida K., Abstract of papers, the 25th Annual Meeting of the PSJ Kyushu Branch, Nobeoka, December 2008, p. 34.