

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究

所 属 国立感染症研究所 細胞化学部
研究者 北川隆之

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 西島正弘、野村義明 (HS財団流動研究員)
- (2) 第一製薬株式会社創剤研究所 安藤秀一、片岡 捷夫

要旨

脂質を成分とするリポソームは遺伝子導入用ベクターとして期待されているが、導入効率が低く実用化には至っていない。我々は細胞毒性が低く、血清の存在下に *in vitro* 遺伝子導入が可能な新規カチオン性リポソームを開発した。本研究では外来性遺伝子発現に及ぼす血清成分の作用、およびリポソーム/遺伝子複合体の体内動態に及ぼす血球の影響について検討した。

1. 研究目的

近年、新しい医学的治療法として、遺伝子治療に対する期待が高まっている。日本においても臨床治療が開始されているが、有効で安全性の高い遺伝子導入技術の開発や、倫理面における整備がさらに必要である。外来性遺伝子を動物細胞内に導入するベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルスベクターがよく利用されているが、安全面での問題も指摘されている。脂質を成分とするリポソームは、安全性や応用性の高さなどから、遺伝子導入ベクターとして期待されているが、一般に導入効率が低く、実用化には至っていない。本研究では、遺伝子導入ベクターとしてのカチオン性脂質を含むリポソームの有用性に着目し、毒性が低く、かつ導入効率の優れた新規リポソーム製剤の開発を目的としている。

多くの市販カチオン性リポソームは、一般に血清を含む培養液中では遺伝子発現効率が顕著に低下することが遺伝子導入上の欠点である。これは主に、培養液中でのカチオン性リポソームの構造的な不安定性に起因する。我々は、このような観点から、血清を含む培養液中におけるリポソーム構造の安定性を基準として、これまでに種々のカチオン性脂質を含むリポソーム処方多数スクリーニングし、血清存在下においても安定な形状を示し、かつ市販のリポソームとほぼ同等の遺伝子導入効果をもつ、数種類の新規カチオン性リポソーム処方を見出した。本研究では、これらの新規カチオン性リポソームについて、蛍光性外来遺伝子発現の定量的な解析を基にして、導入遺伝子の膜透過、細胞内安定性や、核内移行性を高めるなどの工夫を行い、安全、かつ発現効率の高いカチオン性リポソームの開発を行い、*in vivo* への適用をめざした。

2. 研究方法

(1) カチオン性リポソームTFL-08の調整

総脂質濃度が20mMとなるように各構成脂質 (DC-6-14/DOPE/Cholesterol=4/3/3) を秤量し、9%スクロース溶液にて多重膜リポソームを作成した後、エクストリュージョン法により孔径200nmのポリカーボネートフィルターを用いサイズを均一にした。調製リポソームの物性は、粒子径測定 (大塚電子DLS-700)、ゼータ電位測定 (大塚電子 ELS-800) により行った。

(2) カチオン性リポソームによる遺伝子導入と発現効率の測定

遺伝子導入細胞として、ヒト由来の腫瘍細胞 (HeLa, A549)、HeLa融合細胞 (CGL1, CGL4) などを使用した。細胞 (0.2-1×10⁵ cells / 35mm dish) を5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中で、37℃、5%CO₂で 20-48時間培養した後、新しい培地と交換したものを使用した。凍結乾燥カチオン性リポソーム (TFL-08; 第一製薬) はH₂Oで懸濁した後、無血清培地で希釈した (最終カチオン脂質濃度: 8, 12, 36nmol/35mm dish)。導入用遺伝子として、GFP発現プラスミド (pGREEN LANTERN-1 5.0Kbp) を無血清培地で希釈し (最終DNA量 1 μg/dish)、希釈したリポソームとプ

ラスミドDNAを混和して、室温で15分間放置後、培地（含血清または無血清）を加え、細胞に添加した。特に記載のないものについては、37℃、5%CO₂中で3-5時間の培養を行った後、細胞をPBSで洗い、新しい培地で24時間さらに培養した。GFP遺伝子細胞を蛍光顕微鏡下で観察した後、細胞懸濁液を調整し、1×10⁴ cellsについてFACSによるGFP発現効率の測定を行った。

(3) 導入遺伝子の蛍光標識と解析

エチジウムモノアジド (EMA) で光照射により蛍光標識を行ったGFP発現プラスミドを上記と同様にリポソーム複合体として細胞内に導入し、導入遺伝子の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡およびFACSを用いて経時的に解析した。

(4) リポソーム/遺伝子複合体の体内動態解析

脂質膜を3H-CHEで標識したTFL-08を用いてリポソーム/遺伝子複合体を調製し、マウス尾静脈より、リポソームまたは複合体のサンプル液を200-250 uL（総脂質量：500 nmol）投与した。投与3分後にマウスを屠殺し、腹大静脈よりヘパリン処理シリンジを用いて採血し、肝臓、脾臓、肺及び腎を回収した。各臓器は生理食塩水を用いてホモジナイズした後、放射活性（Aloka LSC900）を測定した。

(5) リポソームと血球成分との相互作用

マウス尾静脈より、TFL-08液200uL（2600nmol総脂質）またはスクロース溶液200uLを投与後、EDTA処理シリンジを用いて、腹大静脈より採血した。総合血液学検査装置（TECHNICON H-1 System）を用いて、血球数（赤血球、白血球、血小板）を計測した。結果は無処置群を100%として、平均±標準誤差で示した。ラットを用いた場合は、頸静脈より1回採血した後、TFL-08液200uL

（2600nmol総脂質）、eggPCリポソーム液 200uL（8000nmol総脂質）またはスクロース溶液200uLを頸静脈より投与し、経時的にEDTAまたはヘパリン処理シリンジを用いて、頸静脈より採血した。結果は投与前の血球数の平均値を100%として、平均±標準誤差で示した。マウス腹大静脈より採血した血液105uLにTFL-08（20mM）30uLまたはスクロース溶液を添加し、スクロース溶液を用いて500倍に希釈遠心後（1000rpm×5min）スライドグラスにサンプルを塗布し、Weight単染色後、顕微鏡観察を行った。

3. 研究成果

(1) 新規カチオン性リポソームの外来性遺伝子発現機構の解析：発現効率に及ぼす血清成分の影響

我々は培養液中での安定性、ならびに簡便かつ再現性の高い調整法の確立を目標としたカチオン性リポソームのスクリーニングを行い、DC-6-14 (Fig. 1) を含むカチオン性リポソームについて、蛍光性たんぱく質GFP遺伝子の細胞内発現を指標として、ヒトがん細胞株を用いた *in vitro* 遺伝子導入効率を定量的に解析した。その結果、DC-6-14-リポソームが血清存在下でも比較的高い遺伝子発現効率を有することを見出した。多くの市販カチオン性リポソームが血清を含む培養液中で遺伝子発現効率が顕著に低下するのに対し、DC-6-14-リポソームでは、血清無添加よりもむしろ高い遺伝子発現効率を得られた。従って、このリポソームには他の市販リポソームとは異なる特性が認められた。これらの結果は、カチオン性リポソームと血清成分との異なる相互作用に起因する可能性が推定された。この新規カチオン性リポソームの作用機構について、GFP遺伝子発現に及ぼす血清成分の影響を検討した結果、リポフェクトアミンにおけるウシ血清の顕著な阻害作用は、主要な血清成分のアルブミンでも認められたが、DC-6-14リポソーム（TFL-02, TFL-08）の遺伝子導入作用はアルブミンでは全く阻害されなかった。また、DC-6-14リポソームで認められた血清による遺伝子発現の促進効果もアルブミンでは認められず、他の血清成分の関与が示唆された（昨年度報告書）。

そこで、静電的な相互作用によりカチオン性リポソームと結合することが予想される負電荷の血清成分として、プロテオグリカン類の構成成分である酸性ムコ多糖類の影響を更に検討した。リポフェクトアミンの遺伝子発現作用は、負電荷をもつヘパリン、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸により濃度依存的に強く阻害された (Fig. 2)。しかし対照のデキストラン、コンドロイチンには阻害作用は全く認められず、プロテオグリカン類の阻害作用が静電的な相互作用に起因することが示唆された。デキストラン、コンドロイチンは、DC-6-14リポソーム（TFL-08）の遺伝子発現に対しても全く影響を及ぼさなかったが、ヘパラン硫酸には同様に強い阻害作用が認められた。しかし、リポフェクトアミンの場合と比較すると、TFL-08ではヘパリン、コンドロイチン硫酸に対しやや抵抗性を示

し、血清因子との静電氣的相互作用の相違が示唆された。

(2) 蛍光標識したDNAの細胞内導入と解析

酸性ムコ多糖類の遺伝子導入過程への影響について、エチジウムモノアジド (EMA) で蛍光標識した GFP発現プラスミドを上記と同様にリポソーム複合体として細胞に加え、細胞内に導入されたDNAの割合を検討した。いづれのカチオン性リポソームでも、阻害効果のないデキストランでは細胞内に導入されるDNAの割合は全く影響をうけなかったが、阻害効果の強いデキストラン硫酸は標識DNAの細胞内導入を強く阻害した (Fig. 3)。また、他の酸性ムコ多糖類についても発現効率と細胞内導入の阻害作用はよい相関を示し、酸性ムコ多糖類は主として外来遺伝子の細胞内導入過程を阻害することが示唆された。

(3) 新規カチオニックリポソームの体内動態と血球成分との相互作用

すでに述べたように、DC-6-14リポソームは培養細胞系において発現効率が高く、細胞毒性の低い遺伝子導入用カチオニックリポソームである。このリポソーム処方を用いた場合、*in vitro*における遺伝子発現は血清存在下においても非常に高く、*in vivo*への応用を期待させるものであった。そこで、TFL-08リポソームを用いて、静脈投与後の生体内挙動を検討した結果、投与直後から肺に集積し、その後経時的に肝臓への集積が起り、血漿中での滞留はみられなかった。投与直後の一時的な肺集積は、静電的相互作用によりTFL-08が血液細胞と凝集物を形成し、この凝集物が肺の毛細血管を塞栓することにより起こると考えられた。そこで今回は、TFL-08リポソームと血球成分との相互作用について検討を加えた。また、対象として中性リポソームの血液成分への影響も検討した。

我々が開発したTFL-08は、DC-6-14にDOPEとCholesterolを添加したりポソームであり、Cholesterolを含有することが特徴の一つである。TFL-08は単独では粒子径140nm、ゼータ電位+35mVを示すカチオニックリポソームである。TFL-08の溶媒であるスクロース溶液をマウスに投与した場合、白血球の増加が観察されたが、赤血球、血小板に変化はみられなかった。一方、TFL-08を投与した場合、赤血球の変化は認められなかったが、10分後に白血球、血小板の減少がみられた (Fig. 4)。ただし、投与2時間後にはそれらは回復した。血球数の経時変化をさらに検討するため、ラットを用いて同様の検討を行った。その結果、マウスの場合と同様に、TFL-08の投与直後、白血球と血小板の減少が生じ、その後それらの数は増加し、投与30分後には投与前のレベルに回復した (Fig. 5)。赤血球に関しては同様に変化は認められなかった。この血球数の減少、回復の変化はTFL-08の肺集積に相関しており、肺集積に血球細胞が関与している可能性が示唆された。そこで、血球細胞とTFL-08の相互作用について、TFL-08を添加した血球細胞の形態について顕微鏡観察を行った。未処理の血液をスライドグラスに塗布し、顕微鏡観察した場合は、血球はすべてばらけて存在していた。一方、TFL-08を添加した血液では、血小板を中心とした血球細胞の凝集体が観察された。今回、この凝集物が認められた試料の中にリポソームの存在は確認できなかった。ここでは、光学顕微鏡を用いていることから、粒子径140nmのTFL-08同士が凝集しない限りは、TFL-08そのものを観察する事はできない。また、TFL-08は膜表面がカチオニックに帯電していることから、静電反発によってTFL-08同士の凝集は起こりにくいと考えられる。なお、対象として実施した中性電荷のH-EggPCリポソームをラットに投与した場合は血球細胞の変化は認められなかった。

4. 考察

多くの市販遺伝子導入用リポソーム試薬は、*in vitro*での遺伝子導入の際、いったん血清添加培地を無血清培地に置き換える必要がある。これは血清存在下でリポソーム構造が不安定となるためであり、血清存在下でも安定なリポソーム処方を用いれば、高い遺伝子発現活性が得られることが期待される。我々は、このような観点よりスクリーニングした新規カチオン性リポソームについて、ヒト細胞株への*in vitro* 遺伝子導入効率を蛍光性GFP遺伝子の細胞内発現を指標とした定量的な解析を行い、血清存在下でも比較的高い遺伝子発現効率を得られることを明らかにした。血清の存在により遺伝子発現効率の低下するリポソームでは、その粒子状構造が血清添加により消失していたのに対し、DC-6-14リポソームの構造は血清存在下でも安定に存在していた。さらに、遺伝子発現効率の異なるHeLa融合細胞系を用いた解析より、遺伝子の発現効率においては導入したDNAの細胞内安定性が1つの重要な要因となり得ることもこれまでの研究で明らかにした。リポソーム/DNA複合体が細胞内に導入され、細胞内で輸送・代謝される分子機構はまだ不明であるが、これらの過程においてリポソーム/

DNA複合体と血清、細胞のタンパク性因子との相互作用の関与が推定された。我々は本研究で、血清に含まれる負電荷のプロテオグリカン類が静電的な相互作用を介して、カチオン性リポソームによる遺伝子発現活性に関与する可能性を明らかにした。蛍光標識した遺伝子の細胞内導入過程の解析から、負電荷プロテオグリカンによる遺伝子発現の強い阻害作用は、主として遺伝子の細胞内導入過程の阻害であることを明らかにした。血清による阻害効果の少ない新規カチオン性リポソームでは、酸性プロテオグリカンに対してもやや抵抗性となることも、血清中のプロテオグリカン類との静電的な相互作用を示唆している。これらの相互作用が、リポソーム/DNA複合体の物性や機能にどのような影響を与えるのか、またどのような血清因子が関与するかなど、今後の検討課題である。

新規カチオン性リポソームの遺伝子治療への応用を考えて、マウス静脈投与後の生体内挙動に関する検討も行った。TFL-08/遺伝子複合体のマウスにおける体内動態を検討した結果、正電荷複合体の場合、投与後肺に集積した後、肝臓に移行する。これは正電荷複合体が、投与後血球細胞との相互作用により凝集物等を形成し、肺に分布（塞栓）し、その後、肺から遊離して肝臓に取り込まれたのであろうと推定した。そこで、正電荷のTFL-08のマウス単独投与を行い、血液中の血球細胞数変化について検討した結果、投与直後に白血球と血小板の減少が認められた。TFL-08をin vitroで添加した血球細胞において、血小板を中心とした血球の凝集体が観察された。また in vivo試験において、TFL-08の投与直後、減少した白血球と血小板は、投与30分後には投与前のレベルに回復することも明らかになった。したがって、血球細胞数の経時的変化とTFL-08血球細胞の凝集物形成、およびTFL-08の肺分布の動態とがよく関連したことから、上述した仮説の妥当性が示唆された。本結果は、TFL-08単独の知見であるが、TFL-08/DNA複合体においても正電荷の場合には血球細胞との凝集物形成が起こることが考えられ、TFL-08単体の時と同様の体内動態（肺への一時的な集積）を示すと考えられる。このような血球細胞との凝集物形成や体内動態において、さきに述べた血清あるいは細胞表面のプロテオグリカン類との静電的な相互作用が重要な役割を果たすことが推定される。本研究で検討された導入遺伝子の細胞内安定性や局在性、体内挙動などの定量的な解析より、今後さらに安全かつ有効な遺伝子治療に適した遺伝子導入リポソームベクターが開発されるものと期待される。

5. 結論

ヒトの遺伝子治療への応用を目的に、血清添加培地中での安定性と遺伝子発現効率を指標に開発された新規カチオン性リポソーム（TFL-08）は、血清存在下でも比較的高い遺伝子発現効率を持つことが大きな特徴である。新規カチオン性リポソームのヒトがん細胞への外来性遺伝子の導入効率において、リポソーム/DNA複合体の細胞内安定性の重要性についてこれまでの研究で明らかにした。また今回、カチオン性リポソームと血清成分との相互作用に関する解析より、血清などに含まれる負電荷のプロテオグリカン類が静電的な相互作用を介して遺伝子の細胞内導入過程を阻害し、発現効率を調節する可能性を明らかにした。今後これらの相互作用が、どのようにリポソーム/DNA複合体の構造や機能に影響を与えるのか、さらに検討する必要がある。またリポソーム/DNA複合体と血球成分との相互作用がDNA複合体の体内挙動にも関与することが示唆され、標的細胞に特異的な遺伝子治療を検討する際の重要な問題点と思われる。

6. 研究発表

(1) Serikawa, T., Suzuki, N., Kikuchi, H., Tanaka, K. and Kitagawa, T. : New cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1467, 419-430 (2000)

(2) Ishiwata, H., Suzuki, N., Ando, S., Kikuchi, H. and Kitagawa, T. : Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J. Control. Release* 69, 139-148 (2000)

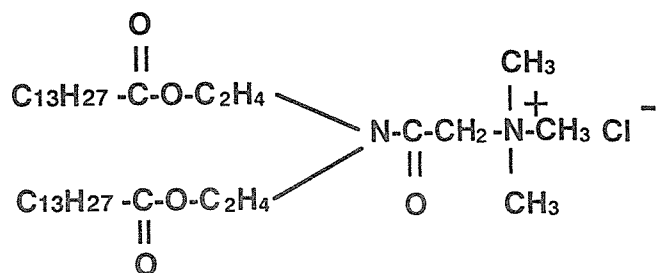
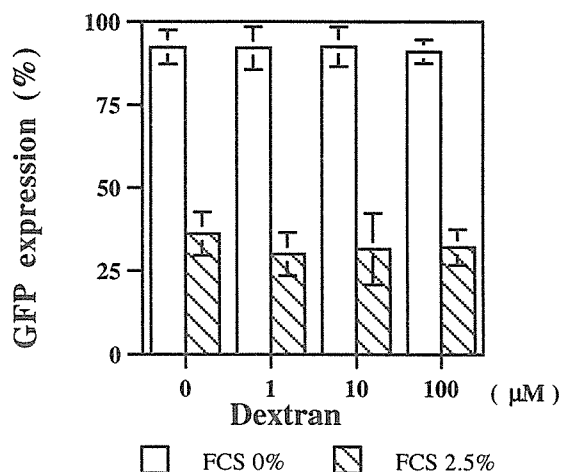
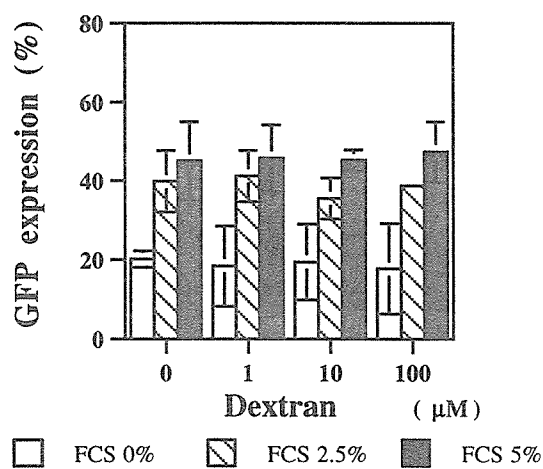


Fig. 1. Chemical structure of DC-6-14, *O,O'*-ditetradecanoyl-*N*-(α -trimethylammonioacetyl)diethanolamine chloride.

TFL-08

LipofectAMINE

(A) Dextran



(B) Dextran Sulfate

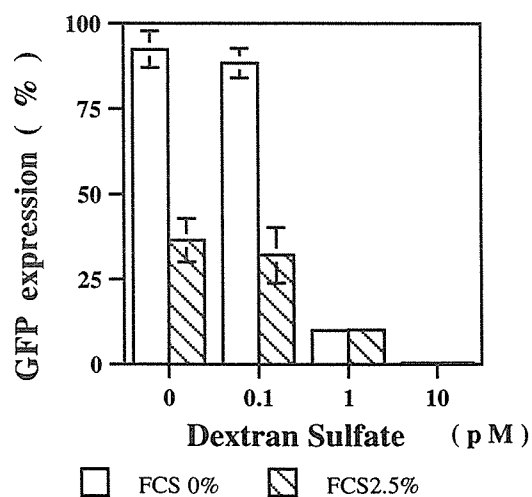
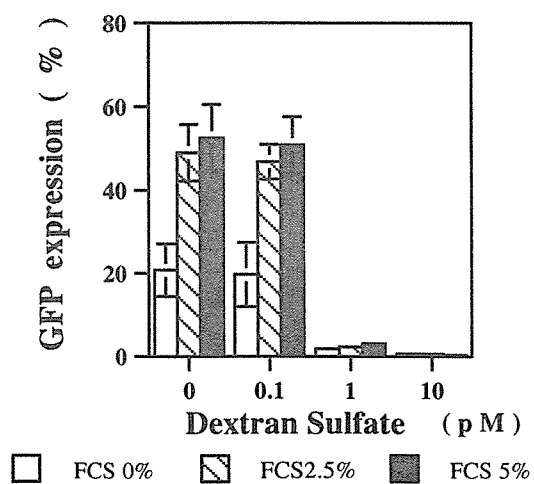
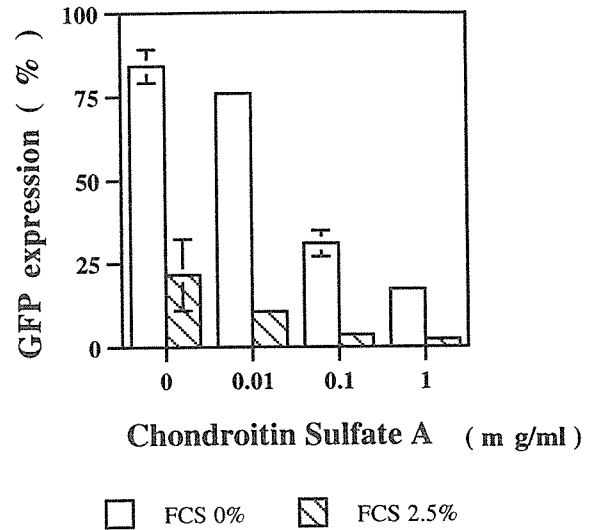
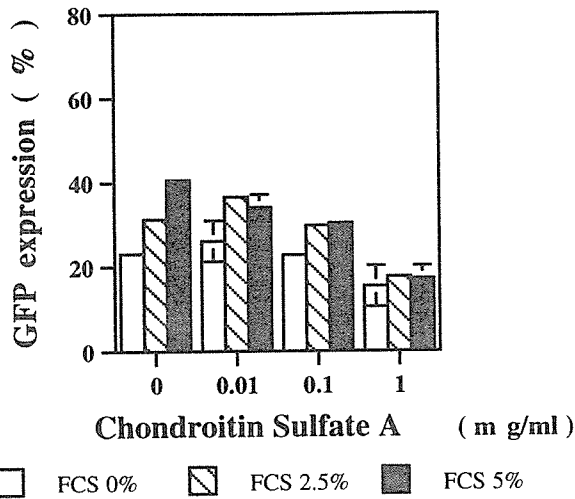


Fig. 2. -continued-

TFL-08

LipofectAMINE

(C) Chondroitin Sulfate A



(D) Heparin

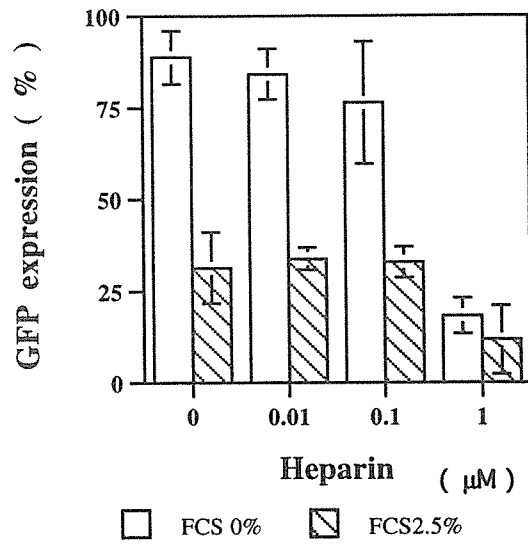
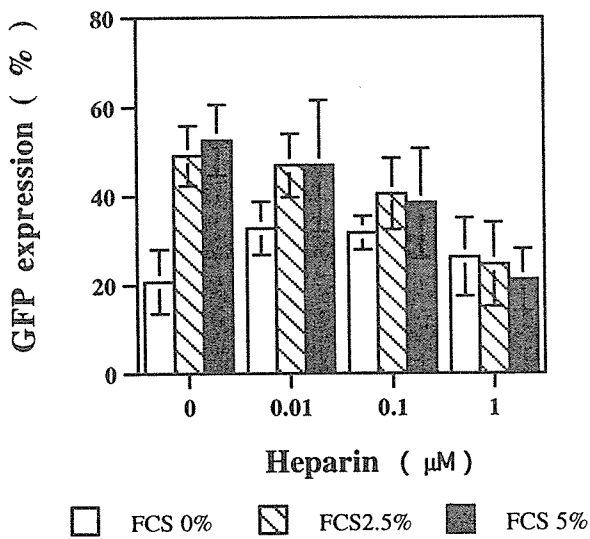


Fig. 2. Effects of glycosaminoglycans on liposome-mediated gene expression in the presence of (A) Dextran, (B) Dextran sulfate, (C) Chondroitin sulfate, and (D) Heparin in HeLa cell hybrids CGL1.

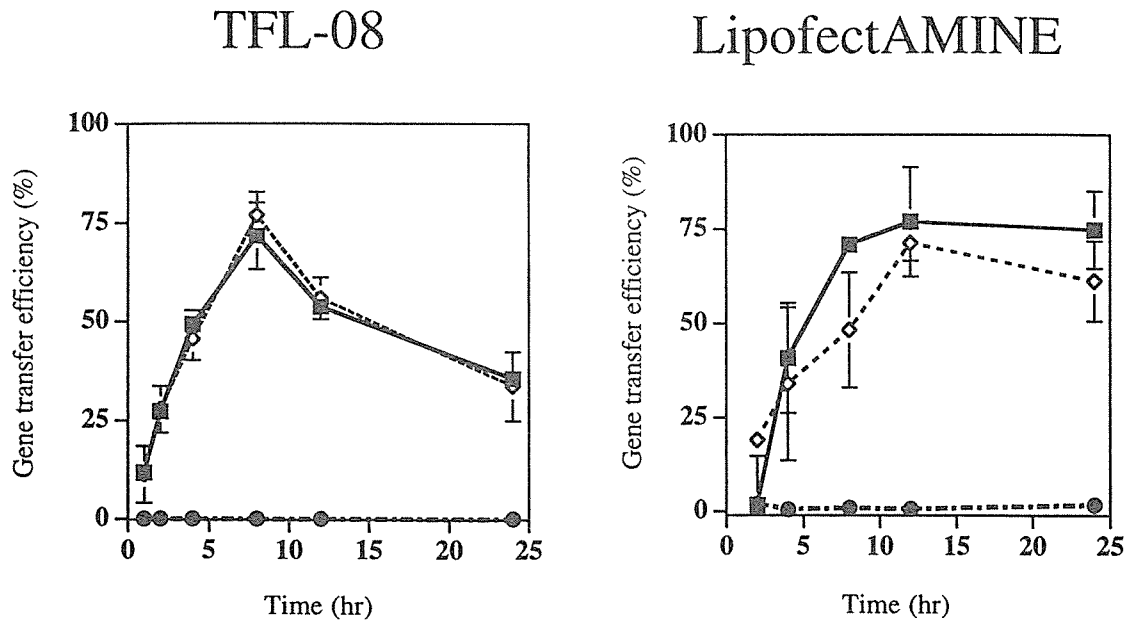


Fig. 3. Incorporation of EMA-labeled plasmid DNA into the cells by liposomes. EMA: ethidium monoazide.

---●---, control; ---◇---, 100 mM Dextran; ---■---, 10 pM Dextran sulfate.

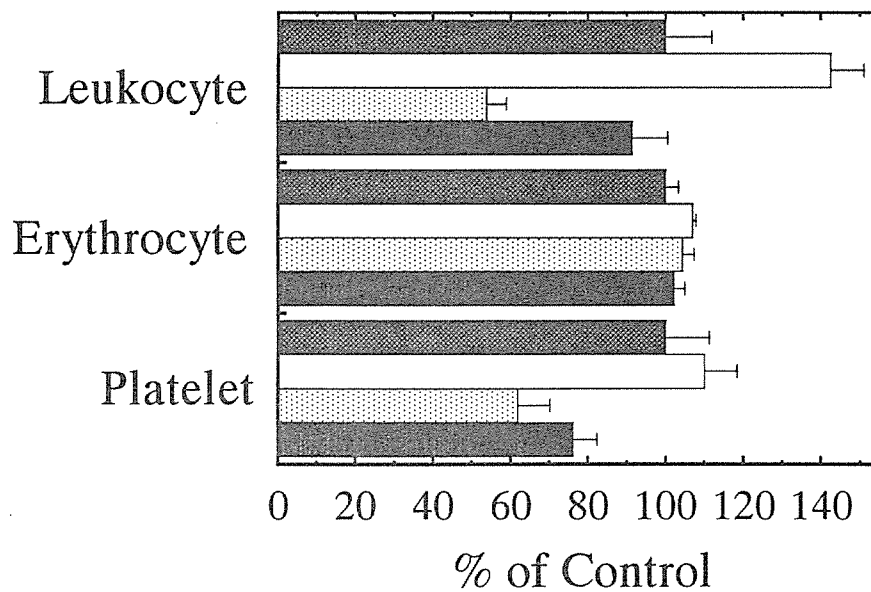


Fig. 4. Blood cell counts after intravenous injection of DC-6-14 liposomes.

Mice received 2.6 μmol of lipids via tail vein and were sacrificed at 10 min (dotted) or 2 hour (gray) post injection to collect their blood. Control (filled) cell counts obtained in non-treated normal mice were $4.97 \times 10^3/\mu\text{L}$, $9.10 \times 10^6/\mu\text{L}$ and $1.32 \times 10^3/\mu\text{L}$ for leukocytes, erythrocytes and platelets, respectively. Blood cell counts of the mice receiving sucrose solution (hollow), as solvent of liposome suspension, are also indicated.

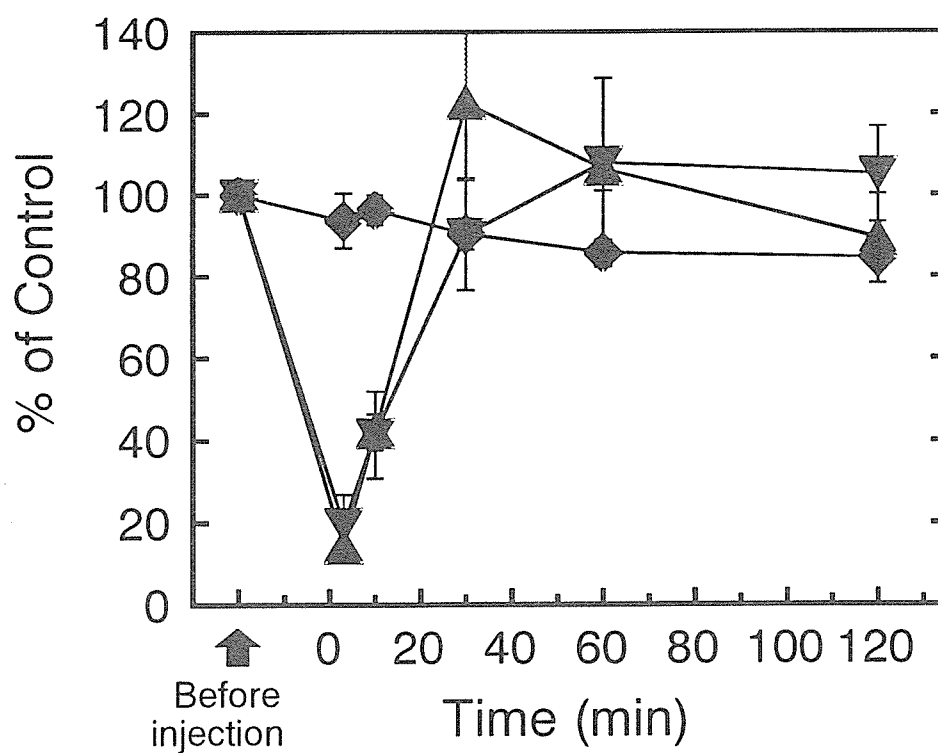


Fig. 5. Count of rat blood cells after i.v. injection of TFL-08 liposomes
 ▲ : Leukocyte, ◆ : Erythrocyte, ▼ : Platelet

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社