

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

化学修飾によるプラスミド DNA のナノ粒子化と DDS に関する研究

平成 14 年度 総合研究報告書

主任研究者 西川 元也

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
化学修飾によるプラスミド DNA のナノ粒子化と DDS に関する研究	1
西川元也	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	4
III. 研究成果の刊行物・別刷	6

研究要旨 pDNA のナノ粒子化を目的に pDNA への直接的な化学修飾を試みた。pDNA の化学修飾には易反応性官能基の導入が必須であると考え、本年度はまず、官能基の導入効率およびその遺伝子発現効率に及ぼす影響などについて検討した。ジエチレントリアミン四酢酸（DTPA）無水物を予め結合させた 4-[p-azidosalicylamido]butylamine（ASBA）と pDNA とを混合し、紫外線照射することで DTPA 分子の導入に成功した。反応条件を調整することにより導入数の制御が可能であり、DTPA を介した ^{111}In 標識により高比活性の放射標識体を得た。アガロース電気泳動により評価したところ、化学修飾による pDNA の構造変化は少ないことが示された。また遺伝子発現効率は導入 DTPA 数と相関し、いずれの場合にも未修飾 pDNA の 40~98% と高い活性を保持していた。従って、新規開発に成功した ^{111}In 標識体は、構造変化が少なく高い放射活性を有することから pDNA の体内動態を追跡するのに適した標識体であると考えられた。ポリエチレンイミンと ^{111}In -pDNA との複合体をマウス尾静脈内投与したときの主要な遺伝子発現臓器である肺での遺伝子発現と放射活性量との間には良好な相関が認められ、体内動態評価を基盤とした遺伝子デリバリーシステムの開発にも有用な化合物であることが示された。以上、導入した官能基に対し種々のリガンドあるいは正電荷化合物を結合することにより、pDNA のナノ粒子化が実現されるものとする。

A. 研究目的

pDNA に直接化学修飾を施すことにより pDNA の自己凝集を促し、得られたナノ粒子化 pDNA を用いた遺伝子デリバリーを目指す。また、化学修飾により官能基を導入した pDNA は、ナノ粒子化だけでなく pDNA の放射標識体を合成するのにも適していると考えられることから、化学修飾 pDNA のプロトタイプとして ASBA を介して DTPA を結合し、生体内で安定に pDNA の体内動態を追跡可能にする pDNA 放射標識法を開発する。

B. 研究方法

(1)pDNA へのスペーサーの導入：モデル pDNA としてルシフェラーゼをコードした pDNA を用いた。予め ASBA のアミノ基に

DTPA 無水物を縮合したものを紫外線照射により pDNA の塩基中アミノ基と共有結合した。(2) ^{111}In 標識を利用したスペーサー導入効率の定量化：光反応時の pDNA と ASBA のモル比を種々変化させて合成を行い、常法に従い ^{111}In を施した。遊離 DTPA 共存下での標識効率から pDNA 一分子あたりの DTPA 結合数を求めた。(3)遺伝子発現特性の評価：pDNA の遺伝子発現活性に対するスペーサー導入の影響について、HepG2 および COS7 細胞へのトランスフェクションを行った。遺伝子導入試薬 LipofectAMINE2000 と各種修飾 pDNA とを混合することでリポプレックスを調製し、細胞に添加後のルシフェラーゼ活性を測定した。また、マウス腓腹筋に各種 pDNA 誘導体単独を 1 μg /マウスの投与量で注射し、投与部位に電気パルス（200

V/cm、20 ms、6 パルス) を加え、2 日後に組織を回収し、遺伝子発現量を定量した。(4)¹¹¹In-pDNA による pDNA 体内動態評価：¹¹¹In-pDNA を 10 μg/マウスの投与量で静脈内投与し、経時的に血漿および尿、主要臓器を回収した。各サンプル中放射活性をγ-カウンターで測定し、投与量に対する割合で示した。対照として、ニックトランスレーション法により ³²P 標識した pDNA についても同様の体内分布実験を行った。(5)ポリエチレンジアミン(PEI)/pDNA 複合体投与時の肺移行動態と遺伝子発現の相関：分岐型 PEI(平均分子量約 10,000)を用い、pDNA 誘導体と複合体を形成した。調製時の PEI 中の N 原子の数と、pDNA 中の P 原子の数の比(N/P 比)を、3、10、15 と変化させることにより、物性の異なる複合体を得た。各複合体を 30 μg pDNA/マウスの投与量で尾静脈内投与し、6 時間後に肺を摘出、遺伝子発現を定量した。別途、¹¹¹In-pDNA を用いて同様に調製した複合体を投与し、30 分後の肺中放射活性を測定した。

C. 研究結果

(1)化学修飾 pDNA の合成：光反応時の pDNA と ASBA のモル比を種々変化させて合成を行い、常法に従い ¹¹¹In 標識を施した。別途、遊離 DTPA 共存下競合的放射標識を行い、そのときの標識効率から pDNA 一分子あたりの DTPA 結合数を算出した。その結果、pDNA100 μg に対して反応に用いる ASBA 量を 250、500、1000 と変化させることによりそれぞれ 2.3、4.1、および 15.8 個の DTPA が結合した pDNA を得た。得られた DTPA 結合 pDNA をアガロースゲルで電気泳動したところ、泳動パターンに若干の変化は見られたものの、pDNA 構造は化学修飾のあともほぼ保たれていることが示された。(2)遺伝子発現活性の評価：未修飾および DTPA 結合

pDNA を用い、HepG2 および COS7 細胞へのトランスフェクションを行ったところ、DTPA 結合数が 2~4 個の修飾 pDNA は、未修飾 pDNA の場合と比較して 90%以上の遺伝子発現効率を示した。最も修飾数の多い誘導体においても 55%であった。マウス筋肉注射後の遺伝子発現においてもほぼ同様の結果が得られた。(3)静脈内投与後の pDNA 体内動態評価：¹¹¹In-pDNA を静脈内投与したところ、血漿中 ¹¹¹In 放射活性は速やかに消失し、速やかに肝臓に約 60%が集積し、長時間肝臓中に検出された。一方、ニックトランスレーション法により ³²P 標識を施した場合には、これまでに示された結果同様、肝臓からの比較的速やかな放射活性の消失が認められた。(4)組織移行と遺伝子発現の相関：PEI/pDNA 複合体を投与したときの肺での遺伝子発現は、複合体中の PEI 量の増加に伴い上昇した。別途、¹¹¹In-pDNA/PEI 複合体を投与したときの肺組織中放射活性も PEI 量の増加とともに上昇し、両者の間には良好な相関が認められた。

D. 考察

目的の遺伝子をコードした pDNA が、標的細胞内で遺伝子を発現するにはプロモータやタンパク質をコードする領域が、細胞内のポリメラーゼ等に効率よく認識されなければならない。従って、官能基を共有結合を介して pDNA の塩基部分に結合することで大幅な遺伝子発現効率の低下が危惧される。しかしながら、本研究の結果から、化学修飾による遺伝子発現活性への影響は極めて低いことが示された。この結果は、これまでの報告にある psoralen を用いて 2 本鎖をクロスリンクさせる方法等と比較して遺伝子発現効率の点で非常に優れており、今後様々なリガンドを導入するのに適した誘導体であると考えられた。本方法では、2 本鎖の架橋

は生じないことから、アンチセンス鎖に導入された場合には特に遺伝子発現効率の低下を起こさないものと推察された。アガロースゲル電気泳動で検出した構造上の特徴についても大きな変化は認められなかった。導入した DTPA を介して ^{111}In 標識を施すことで、高比活性の放射標識体が得られ、最も DTPA 結合数が多い誘導體では 2,000,000 cpm/ μg pDNA となった。マウス一匹当たりの pDNA の投与量が通常 1~100 μg 、動態を追跡するのに必要な放射活性が最低で 100,000 cpm とすると、最も修飾率が低く (2.3 個の DTPA/pDNA)、同時に最も遺伝子発現効率の高い誘導體でも十分な比活性 (200,000 cpm/ μg pDNA) の放射標識体の開発に成功したことになる。 ^{111}In キレート部分の構造は、既に汎用されているタンパク質医薬品の体内動態追跡に用いる ^{111}In 標識法と類似であることから、細胞に取り込まれた後比較的長時間細胞内に保持されることも示された。この特性により、PEI 複合体を用いた肺への遺伝子導入効率が、肺組織中放射活性量と非常に良く相関する結果に繋がったものと考えられる。以上、 ^{111}In 標識 pDNA は pDNA の体内動態、特に組織分布過程の定量的評価をする上で非常に有効な化合物であることが示された。

E. 結論

pDNA の構造および遺伝子発現活性を大きく損なうことなく、化学修飾により pDNA への効率的な官能基の導入に成功した。得られた修飾 pDNA は、 ^{111}In 標識を施すことにより、in vivo 分布実験に用いることが可能であり、これまでに報告されている種々の放射標識 pDNA と比較して優れた特性を有することが示された。本研究で用いた官能基の導入

法を用い、種々のリガンドあるいは正電荷化合物を結合することにより、pDNA のナノ粒子化のみならず、pDNA の機能改善が達成されるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol. Ther.* 7: 254-261(2003).

(2) Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J. Drug Target.* 10: 99-104 (2002).

(3) Nishikawa M, Hashida M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 275-283 (2002).

2. 学会発表

(1) 中野貴透、岡部貴幸、西川元也、山下富義、橋田 充、インジウム-111-DTPA 錯体を利用したプラスミド DNA の新規放射標識体の開発と体内動態評価への応用、第 2 回遺伝子・デリバリー研究会、2002 年 5 月 17 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishikawa M, Hashida M.	Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy.	Biol. Pharm. Bull.	25(3)	275-283	2002
Nishikawa M, Tamada A, Kumai H, Yamashita F, Hashida M.	Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice.	Int. J. Cancer	99(3)	474-479	2002
Nishikawa M, Hasegawa S, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M.	Electrical charge on protein regulates its absorption from the rat small intestine.	Am. J. Physiol.	282(4)	G711-G719	2002
Murao A, Nishikawa M, Managit C, Wong J, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M.	Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes in vivo: effect of lipid composition.	Pharm. Res.	19(12)	1808-1814	2002
Yabe Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Mihara K, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M.	Pharmacokinetics and preventive effects of targeted catalase derivatives on hydrogen peroxide-induced injury in perfused rat liver.	Pharm. Res.	19(12)	1815-1821	2002
Yamasaki Y, Sumimoto K, Nishikawa M, Yamashita F, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y.	Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	301(2)	467-477	2002
Opanasopit P, Sakai M, Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M.	Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers.	J. Control. Release	80(1-3)	283-294	2002
Opanasopit P, Hyoudou K, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M.	Serum mannan binding protein inhibits mannosylated liposome-mediated transfection to macrophages.	Biochim Biophys Acta	1570(3)	203-209	2002
Opanasopit P, Nishikawa M, Hashida M	Factors affecting drug and gene delivery: effects of interaction with blood components.	Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.	19(3)	191-233	2002
Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M.	Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral	J. Drug Target.	10(2)	99-104	2002

	vectors for gene delivery.				
西川元也、Huang L、 橋田 充	ジストロフィン遺伝子導入 による Duchenne 型筋ジス トロフィー治療	遺伝子医学	6(3)	390-394	2002
Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, Yamashita F, Hashida M.	Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver.	Mol. Ther.	7(2)	254-261	2003
Nishikawa M, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M.	Basic pharmacokinetics of oligonucleotides and genes	Pharmaceut. Perspect. Nucl. Acid- Based Ther. Mahato RI, Kim SW (eds)		409-433	2002
Opanasopit P, Nishikawa M, Managit C, Yamashita F, Hashida M.	Control of hepatic disposition of mannosylated liposomes by PEGylation: effect of the molecular weight of PEG and the density of PEG and mannose.	S.T.P. Pharma Sci.	13(1)	57-62	2003
西川元也、橋田 充	筋ジストロフィー治療	遺伝子医学 (別冊)	in press		

20020774

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.4- P.5の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。