

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 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 西川 元也

平成 16 (2004) 年 4 月

# 目 次

I	総括研究報告書	
	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 -----	5
III	研究成果の刊行物・別刷 -----	8

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）

総括研究報告書

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

主任研究者 西川元也 京都大学大学院薬学研究科助教授

研究要旨 プラスミド DNA (pDNA) のナノ粒子化による遺伝子・抗癌剤テリハリーの改善を目的に、pDNA に直接化学修飾を施すことで pDNA への新しい機能の付加を試みた。前年度の検討において、アント基を含有する 4-[p-azidosalicylamido]butylamine (ASBA) を長波長紫外線を照射することで作成した pDNA 誘導体は、ASBA 導入数が多い場合にも約 50% と高い遺伝子発現活性を示した。そこで本年度は、化学修飾を利用した pDNA のナノ粒子化の実現に向けて pDNA のポリエチレングリコール (PEG) 修飾を試みた。pDNA と ASBA の混合溶液に紫外線を照射することで pDNA に ASBA を結合し、pDNA への遊離アミノ基の導入に成功した。このアミノ基に対して、ポリエチレングリコール (PEG) 誘導体を結合し、PEG 修飾 pDNA (PEG-pDNA) を得た。これにより、効率の良い非ウイルスベクターの一種である polyethyleneimine (PEI) と混合したときに得られる複合体の粒子径を縮小することに成功した。以上、新規に開発した PEG-pDNA を用いることで pDNA のナノ粒子化が実現された。今後、開発したナノ粒子化 pDNA を用いた遺伝子テリハリー、抗癌剤テリハリーについて検討を進める予定である。

#### A 研究目的

プラスミド DNA (pDNA) は、*in vivo* 遺伝子治療を目的とした検討において汎用されるか、そのサイズならびに強い負電荷のために標的細胞内への取り込みが制限を受け、十分な遺伝子発現が得られない。一方、カチオン性ベクターを用いた遺伝子導入は、培養細胞に対しては効果的であるものの、通常得られる複合体のサイズが 200 nm 以上であることから、*in vivo* での遺伝子導入には適さない場合が多い。これは複数分子の pDNA が一粒子を形成することか一因と考えられ、少分子の pDNA から構成される複合体を形成することか pDNA のナノ粒子化には必須と考える。前年度の検討において、遺伝子発現活性を十分保持した形での pDNA への直接化学修飾法の開発に成功した。そこで本年度は、pDNA に直接ポリエチレングリコールを結合し、カチオン性ベクターとの複合体調製時

の凝集形成を抑制することで pDNA のナノ粒子化を試みた。

#### B 研究方法

(1) pDNA への易反応性アミノ基の導入  
モデル pDNA としてルシフェラーゼをコートした pDNA を用いた。暗室条件下、4-[p-azidosalicylamido]butylamine (ASBA) を pDNA と混合し、長波長 (365 nm) の紫外線を照射することで ASBA を pDNA に結合した。pDNA への ASBA の結合は、ASBA 由来のアミノ基の存在を蛍光色素 FITC との反応により評価した。(2) pDNA の PEG 修飾  
得られた ASBA-pDNA に対し、アミノ基反応型 PEG 誘導体である 2,4-bis(O-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine (平均分子量 10,000) を反応させることで PEG 修飾 pDNA (PEG-pDNA) を得た。アガロースゲル電気泳動により、pDNA の構造に対する PEG 修飾の影響

響を評価した。(3) PEI 複合体の調製と粒子サイズの測定 カチオン性非ウイルスヘクターとして、平均分子量約 10,000 の分岐型 polyethyleneimine (PEI) を選択した。pDNA または PEG-pDNA と PEI を重量比 1:10 で混合することにより、pDNA/PEI ならびに PEG-pDNA/PEI を調製した。各複合体の粒子サイズは動的光散乱光度法により測定した。

### C 研究結果

(1) pDNA への易反応性アミノ基の導入  
前年度の検討において、ASBA のアミノ基にシエチレントリアミン四酢酸 (DTPA) 無水物を結合させた化合物を、紫外線照射することによって pDNA への DTPA の導入に成功している。得られた DTPA-pDNA に対して、遊離 DTPA 共存下競合的放射標識を行うことで、pDNA 一分子あたりの DTPA 結合数を算出した結果、pDNA 100  $\mu$ g に対して 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 が得られた。それぞれの修飾率の DTPA 結合 pDNA を用いて、HepG2 および COS7 細胞、あるいはマウス骨格筋への遺伝子導入を行ったところ、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 40~55%であり、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。そこで、同様の合成条件下、紫外線照射により ASBA を pDNA に結合することで ASBA-pDNA を得た。pDNA および ASBA-pDNA に FITC を反応させたところ、ASBA-pDNA でのみ強い蛍光が観察され、pDNA への ASBA の結合が確認された。(2) pDNA の PEG 修飾 ASBA-pDNA に対し、アミノ基反応型活性化 PEG を反応させ、PEG-pDNA を得た。PEG-pDNA をアガロースゲルで電気泳動し

たところ、泳動パターンに顕著な変化は認められず、pDNA の構造は PEG 修飾のあともほぼ維持されていることが示唆された。(3) PEI 複合体の調製と粒子サイズの測定 カチオン性非ウイルスヘクターとして、平均分子量約 10,000 の分岐型 PEI を選択し、pDNA または PEG-pDNA と PEI を重量比 1:10 (DNA:PEI) で混合することにより、pDNA/PEI および PEG-pDNA/PEI を得た。各複合体の粒子サイズについて動的光散乱光度法により測定したところ、pDNA/PEI 複合体の平均粒子サイズが 80nm 以上であったのに対し、PEG-pDNA/PEI 複合体では約 50nm とサイズの縮小化に成功した。

### D 考察

目的の遺伝子をコートした pDNA か、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トする領域か、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、官能基を共有結合で pDNA の塩基部分に結合することによる大幅な遺伝子発現効率の減弱が危惧される。対照として用いたノラレンによる pDNA の化学修飾では、DNA 2 本鎖を架橋するノラレンの導入により著しい遺伝子発現活性の減弱が認められた。これに対し、本研究で採用した ASBA を用いるアプローチでは、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。本方法では、2 本鎖の架橋は生しないことから、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ささないものと推察された。

PEG ならびにその関連化合物は、水保持能力が高く、細胞や生体分子との相互作用を大幅に抑制することから、生理活性タンパク質やリポソームなどの体内動態制御を目的として汎用される化合物である。pDNA とカチオン性ヘクターとの複合体の形成は、静電的

相互作用に基づくことから、本研究では pDNA の PEG 修飾によるカチオン性ヘクター複合体形成時のサイズ増大の抑制を試みた。その結果、PEG-pDNA を用いることで、調製した PEI 複合体の粒子サイズを減少させることに成功した。これは、pDNA に導入された PEG 分子が、PEI と pDNA の静電的相互作用を適度に阻害することで、PEI を介する pDNA の凝集が抑制された結果と考える。

pDNA には CpG モチーフと呼ばれるハクテリア由来の DNA に特徴的な配列が多く存在し、樹状細胞など Toll-like receptor-9 を発現する細胞が、この CpG モチーフを認識することで炎症性サイトカインが産生されることが報告されている。別途行った検討において、マウスに投与することで確かに tumor necrosis factor- $\alpha$  が産生されることを明らかにしている。こうした pDNA 構造に対する生体反応は、遺伝子治療においては回避すべきと考えられるか、癌を標的とする治療においては免疫系を活性化する反応として好ましいと考えられる。実際、CpG モチーフを含有するオリゴヌクレオチドを用いた癌転移に関する検討において、カチオン性ヘクターと複合体化することで高い転移抑制効果を得ている。今後、ナノ粒子化 pDNA による遺伝子テリハリーの改善に関して in vivo での検討を行うとともに、pDNA への抗腫瘍サイトカイン cDNA の組み込み、ならびにアトリアマイシンなどの抗癌剤の結合を適宜行うことにより、ナノ粒子化 pDNA による癌治療を図る。

## 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 への官能基の効率的な導入を可能にした。また、PEG 修飾を施すことにより、PEI と混合

したときに得られる複合体の粒子径を縮小することに成功した。本研究の結果開発されたナノ粒子、PEG-pDNA/PEI を用いることで遺伝子テリハリーの改善、さらには抗癌剤 DDS が実現可能になるものと考えられる。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

- (1) Nishikawa M, Nakano T, Okabe T, Hamaguchi N, Yamasaki Y, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study *Bioconjugate Chem*, **14** 955-961 (2003)
- (2) Kobayashi N, Hirata K, Chen S, Kawase A, Nishikawa M, Takakura Y Hepatic delivery of particulates in the submicron range by a hydrodynamics-based procedure implications for particulate gene delivery systems *J Gene Med*, in press
- (3) Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q, Huang L Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA *Gene Ther*, in press
- (4) 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 学会発表

- (1) 小林直樹、陳石、西川元也、高倉喜信、ハイトロタイナミクス法による肝実質細胞テリハリーにおける粒子サイズの影響、日本薬学会第 123 年会、2003 年 3 月 27~29 日
- (2) 小林直樹、川瀬篤史、西川元也、高倉喜信、ハイトロタイナミクス(Hydrodynamics)

法による肝細胞への効率的遺伝子テリハリメカニズム、第19回日本DDS学会、2003年6月19～20日

(3) 梅山夕香里、兵頭健治、西川元也、山下富義、橋田 充、免疫活性型 CpG オリゴヌクレオチドを用いた腹膜播種性癌転移抑制、第13回アンチセンスシンポジウム、2003年12月1～2日

(4) 加古慶子、吉永貴治、安田 圭、西川元也、高倉喜信、外来性 DNA の構造および投与形態依存的な炎症性サイトカインの誘導、第13回アンチセンスシンポジウム、2003年12月1～2日

#### H 知的所有権の出願・登録状況

##### 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, Nakano T, Okabe T, Hamaguchi N, Yamasaki Y, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M	Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study	Bioconjugate Chem	14 (5)	955-961	2003
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
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	STP Pharma Sci	13 (1)	57-62	2003
Fumoto S, Nakadori F, Kawakami S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M	Analysis of hepatic disposition of galactosylated cationic liposome/plasmid DNA complexes in the rat perfused liver	Pharm Res	20 (9)	1452-1459	2003
Fumoto S, Kawakami S, Ishizuka M, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M	Analysis of hepatic disposition of native and galactosylated polyethylenimine complexed with plasmid DNA in perfused rat liver	Drug Metab Pharmacokin	18 (4)	230-237	2003
Managit C, Kawakami S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M	Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes	Int J Pharm	266	77-84	2003
Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y	Vector-based in vivo RNA interference dose- and time-dependent suppression of transgene expression	J Pharmacol Exp Ther	308 (2)	688-693	2004
Yasuda K, Kawano H, Yamane I, Ogawa Y, Yoshinaga T, Nishikawa M, Takakura Y	Restricted cytokine production from mouse peritoneal macrophages in culture in spite of extensive uptake of plasmid DNA	Immunology	111	282-290	2004
Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q, Huang L	Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA	Gene Ther	in press		2004

Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y	Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery	J Gene Med	in press		2004
Kobayashi N, Hirata K, Chen S, Kawase A, Nishikawa M, Takakura Y	Hepatic delivery of particulates in the submicron range by a hydrodynamics-based procedure implications for particulate gene delivery systems	J Gene Med	in press		2004
Ikenaga T, Yamasaki Y, Shakushiro K, Nishikawa M, Takakura Y	Induction of cytotoxic T lymphocytes following immunization with cationized soluble antigen	Vaccine	in press		2004
Ishida E, Managit C, Kawakami S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M	Biodistribution characteristics of galactosylated emulsions and incorporated probucol for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs in mice	Pharm Res	in press		2004
Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, Umeyama Y, Takahashi Y, Kobayashi Y, Kumai H, Ishida E, Staud F, Yabe Y, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M	Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice	Clin Exp Metastasis	in press		2004
Hisazumi J, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y	Significant role of liver sinusoidal endothelial cells in hepatic uptake and degradation of naked plasmid DNA following intravenous injection	Pharm Res	in press		2004
Shakushiro K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y	Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells	Immunology	in press		2004
西川元也、橋田 充	筋シストロフィー治療	遺伝子医学別冊		209-215	2003
西川元也、小林直樹、 高倉喜信	siRNA・siRNA 発現ヘクターテリハリーステム	遺伝子医学	7(3)	361-365	2003
西川元也、兵頭健治、 橋田 充	活性酸素消去酵素の細胞選択的テリハリーと治療効果	化学工業	54(12)	940-945	2003



西川元也、小林直樹、 高倉喜信	RNA <sub>i</sub> ヘクターの生体への応用	Mol Med	41 (1)	22-29	2004
西川元也	非ウイルスヘクターを用いた筋 ンストロフィーに対する遺伝子 治療	Mol Med	41 (3)	316- 323	2004

20030632

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