

4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranoside (X-gal, Sigma) staining solution (1 mg/ml X-gal, 5 mM ferricyanide and 5 mM ferrocyanide at pH 7.3–7.6 in the wash buffer) for 16–24 h at 37°C. For comparison, the same amount of pDNA in 20  $\mu$ l 5% dextrose solution was injected directly into the lobe and the X-gal staining was performed in a similar manner.

#### Quantification of $\beta$ -galactosidase-expressing hepatocytes

At 48 h after administration of pCMV.SPORT- $\beta$ gal, hepatocytes were isolated as above from the left lateral lobe of the liver, the lobe receiving the electric pulses after intravenous injection of naked pDNA (i.v. injection+EP group) or an injection of naked pDNA (direct injection group). The hepatocytes isolated and supplemented with William medium E containing 10% fetal bovine serum were seeded into culture plates. After 12-h incubation, the hepatocytes were washed, fixed with 0.25% glutaraldehyde for 20 min at 4°C, then stained with X-gal solution (1 mg/ml in phosphate-buffered saline, pH 7.4) for 16–24 h at 37°C. More than 100 individual cells per sample were observed under a microscope, and the number of blue cells, that is,  $\beta$ -galactosidase-expressing cells, was counted. Results are expressed as the percentage of  $\beta$ -galactosidase-expressing hepatocytes in the left lateral lobe of the liver.

#### Transfection to HepG2 cells

HepG2 cells, a human hepatoma cell line, were seeded to  $2 \times 10^6$  cells in Dulbecco's minimum essential medium/10% fetal bovine serum in six-well plates for 24 h prior to transfection. Naked pDNA or pDNA/Gal-PLL was added to the cells and electric pulses (95 V, 5 ms/pulse, 12 pulses, 10 Hz) were delivered to the cells through an electrode for cultured cells. The luciferase activity was assayed at 24 h after transfection.

#### Statistical analysis

Data were statistically analyzed by Student's *t*-test.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and by grants for Health and Labour Sciences Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### References

- Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 861–870.
- Nishikawa M et al. Hepatocyte-targeted *in vivo* gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Therapy* 2000; 7: 548–555.
- Morimoto K et al. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethylenimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther* 2003; 7: 254–261.
- Kawakami S et al. Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannoseylated cationic liposomes. *Gene Therapy* 2000; 7: 292–299.

- Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1088: 131–134.
- Huber PE, Pfisterer P. *In vitro* and *in vivo* transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Therapy* 2000; 7: 1516–1525.
- Liu F, Song YK, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; 6: 1258–1266.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735–1737.
- Somari S et al. Theory and *in vivo* application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2000; 2: 178–187.
- Behrader M et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I–II trial. *Cancer* 1993; 72: 3694–3700.
- Mir LM et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; 77: 2336–2342.
- Heller R et al. *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* 1996; 389: 225–228.
- Suzuki T et al. Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Lett* 1998; 425: 436–440.
- Rols MP et al. *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 168–171.
- Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 867–870.
- Hickman MA et al. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1477–1483.
- Liu F, Huang L. Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 2002; 9: 1116–1119.
- Kawabata K, Takakura Y, Hashida M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 1995; 12: 825–830.
- Kobayashi N et al. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 853–860.
- Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, Hashida M. Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes *in vivo*: Optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly(L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 408–415.
- Takakura Y et al. Characterization of plasmid DNA binding and uptake by peritoneal macrophages from class A scavenger receptor knockout mice. *Pharmacol Res* 1999; 16: 503–508.
- Blomhoff R et al. Uptake and degradation of bovine testes  $\beta$ -galactosidase by parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Int J Biochem* 1985; 17: 1321–1328.
- O'hara AJ et al. The spread of transgene expression at the site of gene construct injection. *Muscle Nerve* 2001; 24: 488–495.
- Nishikawa M, Hashida M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 275–283.
- Wagner E et al. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7934–7938.
- Boussif O et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297–7301.
- Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA. Naked DNA delivered intraportally express efficiently in hepatocytes. *Gene Therapy* 1996; 3: 593–598.

- 28 Zhang G et al. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1763-1772.
- 29 Yoshida Y et al. Introduction of DNA into rat liver with a hand-held gene gun: distribution of expressed enzyme, [<sup>32</sup>P]DNA, and Ca<sup>2+</sup> flux. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 695-700.
- 30 Budker V et al. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Therapy* 1998; 5: 272-276.
- 31 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.
- 32 Canatella PJ, Prausnitz MR. Prediction and optimization of gene transfection and drug delivery by electroporation. *Gene Therapy* 2001; 8: 1464-1469.

## RNAi ベクターの生体への応用

西川元也, 小林直樹, 高倉喜信

京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野

RNAiによる遺伝子発現抑制は、癌やAIDS、ウイルス性肝炎などの難治性疾患に対する画期的治療法になりうるものとして注目を集めている。このRNAiを実際の疾患治療に応用するには、標的細胞内に分子を効率よく送達する技術の開発が必須である。水溶性高分子であるRNAiベクターの*in vivo*デリバリーに関しては、これまでに遺伝子を対象として検討されてきたデリバリー技術の応用が可能である。本稿では、siRNAおよびsiRNA発現ベクターを生体に投与方法について紹介する。

**Key words** hydrodynamics-based procedure, plasmid DNA, DNA-cationic compound complex, delivery, cellular uptake

RNA interference (RNAi, RNA干渉)は、二本鎖RNAにより配列特異的にmRNAが分解される現象である。2001年5月にTuschlら<sup>1)</sup>により、この現象が活性本体である21~23塩基対の二本鎖RNA (small interfering RNA ; siRNA)を用いることで哺乳動物にも適用可能であることが明らかとされ、それ以降、化学合成されたsiRNA,あるいは細胞内での転写により、siRNAを発現するベクターを用いることによってRNAiが実現可能であることがさまざまな実験系において証明されてきた。

siRNAやsiRNA発現ベクターは水溶性高分子であることから、細胞膜透過性が著しく低い。したがって、細胞内で作用するこれら化合物が有効に機能するためには、効率的に細胞内にデリバリーされることが必要条件となる。膜透過に不利な特性を有する水溶性高分子化合物を対象とする細胞内デリバリー

法に関しては、これまでにアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、プラスミドDNAなどを対象に、遺伝子導入ならびに遺伝子発現抑制に関する検討において開発が進められてきた。代表的なものとして、正電荷化合物(脂質やリポソーム,高分子, dendrimerなどを含む),各種ウイルス,さらにエレクトロポレーション(電気穿孔法)や遺伝子銃などの利用があげられる<sup>2)</sup>。

siRNAおよびsiRNA発現ベクターを利用した疾患治療戦略においても、これらDNAを対象化合物として培われたデリバリー技術が応用可能と考えられる。すでに、培養細胞を用いた研究においては、正電荷リポソーム(cationic liposome)などの導入試薬を用いてsiRNAを細胞内に導入することによる遺伝子ノックダウンが、ある特定の遺伝子産物の機能解析手段として定着しつつある。このようにして得

### *in vivo* application of RNAi vector

Makiya Nishikawa Naoki Kobayashi Yoshinobu Takakura

にしかわ・まきや 1992年京都大学大学院薬学研究科修士課程薬学専攻修了,95年同博士後期課程退学,同年京都大学薬学部助手,99~2001年米国Pittsburgh大学博士研究員(Leaf Huang研究室)を経て,02年京都大学大学院薬学研究科助教授。現在の専門:ドラッグデリバリーシステム開発,遺伝子治療。

られる遺伝子発現抑制を生体に適用することが、*in vivo*での遺伝子機能解析に限らず、ウイルス感染や病原性タンパク質が原因の難治性疾患に対する画期的治療法になりうるものと期待されている。しかしながら、培養細胞への水溶性高分子化合物の導入に関しては利用可能なデリバリー技術が開発されているものの、生体レベルで標的臓器・細胞に特異的に、さらには活性発現の場である細胞質へデリバリーする機能を有するベクターならびに投与技術は現在も開発途中である。生体でのRNAiの実現には、細胞内でのイベントに加え、そこに到達するまでの過程を考慮する必要がある(図1)。

本稿では、非ウイルス型ベクターを用いたRNAiの生体への応用に関して、siRNA発現ベクターを中心に概説する。

## ● *in vivo* デリバリー: ターゲットとテクノロジー

遺伝子導入用ベクターはウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。通常、導入効率の観点からはウイルスベクターが圧倒的に有利ではあるが、アデノウイルスベクター投与による死亡事例やレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における白血病の発症など、安全性の面で解決しなければならない課題が多い。これに比較して非ウイルスベクターは安全性や生産性に優れており、プラスミドDNAを利用した遺伝子導入に関して数多くの導入用ベクター(キャリア)が開発されるとともに、投与方法に関してもさまざまな工夫がなされてきた。

医薬品の大部分を占める低分子有機化合物と比較すると、巨大分子であるプラスミドDNAの生体内分布は大幅に制限を受ける。通常の血管内投与の場合には、連続内皮で構成される血管を通過して組織の実質細胞に到達することは不可能である。この場合、デリバリー可能な細胞は血管内皮細胞と血管内に存在する血球系細胞に限られる。プラスミドDNA-ベクター複合体の粒子サイズが直径200 nm程度以下の場合に限り、肝臓や脾臓、骨髄の不連続内皮で構成される血管を透過可能であり、これら組

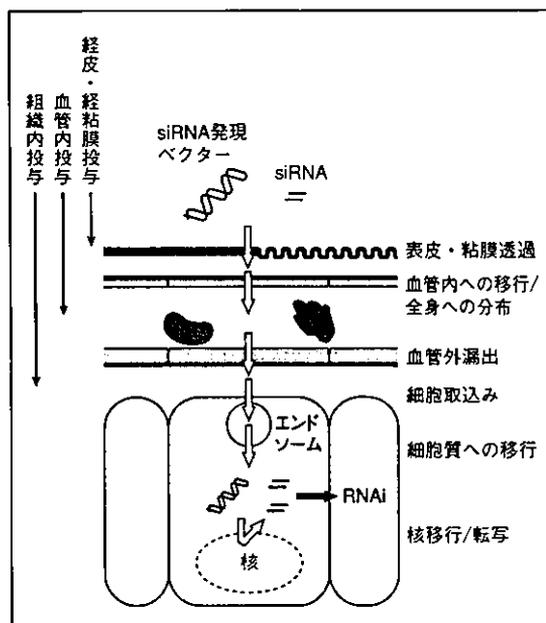


図1 siRNAおよびsiRNA発現ベクター生体投与後のRNAi実現までの概略図

生体に投与されたsiRNAおよびsiRNA発現ベクターが効果を発揮するためには、その機能発現の場である標的細胞内に移行する必要がある。そこに至るまでには図に示す多くの解剖学的な障壁が存在するとともに、酵素による分解も障害となる。siRNAと比較した場合、siRNA発現ベクターは核内へ移行し転写される必要がある。図中左側には、siRNAおよびsiRNA発現ベクターに利用可能な種々の投与方法と、体内動態のスタート地点を示す。

織中の実質細胞での遺伝子発現が可能と考えられる。正電荷リボソームあるいは正電荷高分子との複合体化は、負に帯電した細胞膜表面への相互作用を増強することで遺伝子発現を増強する有用な手法の一つであるが、複合体のサイズが大きくなる場合が多く、また投与後に血清タンパク質や血球との相互作用によりその体内分布がさらに制限を受ける危険性が高い<sup>3)</sup>。また、正電荷リボソーム複合体を投与した場合には炎症性サイトカインが産生され、遺伝子発現に対しても影響を及ぼすことが指摘されている<sup>4)</sup>。

プラスミドDNA単独を血管内に投与した場合には、血管壁透過に加えて血中の酵素による分解の影響や肝Kupffer細胞によるクリアランスが著しいことから、有意な遺伝子発現を得ることはできなかつ

た。しかしながら、大容量のプラスミドDNA水溶液を急速に血管内注入する方法、いわゆるハイドロダイナミクス法がLiuら<sup>5)</sup>により開発され、プラスミドDNA単独でも遺伝子発現が得られることが示された。この方法により得られる遺伝子発現は、肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓など測定された内臓すべてで検出されており、これら臓器への遺伝子導入に非常に有効な方法であることが明らかとなった。特に肝臓での発現レベルは、これまでに開発された非ウイルス型遺伝子導入法のなかで群を抜いて高い。また、その大部分が肝実質細胞での発現であることから、肝細胞を標的とした遺伝子治療への応用が期待されるだけでなく、遺伝子導入による生体反応をスクリーニングする系としてもしばしば用いられる。

筆者らは、最適条件下（体重20gのマウスで約2mlを5秒間で尾静脈内注射）でのモデル高分子ならびに微粒子を用いた検討から、ハイドロダイナミクス法による細胞内へのデリバリーは高分子、微粒子に共通の非特異的な過程であること、デリバリーにおける排除限界は直径50～200nm付近であることを明らかにした<sup>6)</sup>。その臨床への応用に際しては負荷ならびに組織傷害性の軽減が前提と考えられるが、カテーテルなどを利用した局所への適用についての検討が進められており、今後の展開が期待される。本アプローチによる遺伝子導入によって、約40%の肝細胞への遺伝子導入が実現されている<sup>5)</sup>。また、プラスミドDNA単独の血管内投与による遺伝子導入技術として組織内滞留性を増大するアプローチが検討されており、横隔膜へのジストロフィン遺伝子導入が実現されている<sup>7)</sup>。

一方、組織内に直接注射することによって遺伝子発現を得るアプローチに関しても精力的に検討されている。1990年にWolffら<sup>8)</sup>により報告されたプラスミドDNA単独の筋肉注射による骨格筋での遺伝子発現の報告を皮切りに、これまでに多くの臓器、組織での遺伝子導入が認められている。これには、心筋、横隔膜などの筋組織をはじめ、肝臓、腎臓などの内臓から皮膚や脳までが含まれる<sup>2)</sup>。こうした

投与方法では、多くの場合正電荷ベクター複合体よりもプラスミドDNA単独が有効であること、電気パルスあるいは超音波によって局所注射後の遺伝子発現効率が大幅に改善されることが示されている。また、正電荷高分子とは異なり、プラスミドDNAと凝集体を形成しないポリビニルピロリドンなどのポリマーの利用によっても発現の増強が得られている。組織内注射は局所への投与であり、プラスミドDNAの分布がそのサイズにより大きく制限を受けることから、こうした投与方法による遺伝子発現は投与部位に選択的である。したがって、標的的特異的な遺伝子導入が可能になる反面、プラスミドDNAの分布に依存した遺伝子導入・発現細胞の局在が問題であり、単なる筋肉注射の場合にはせいぜい直径2mm程度の範囲内の細胞への導入が実現できるに過ぎない。そのため、標的細胞内のmRNAをターゲットにするRNAiの場合には、どれだけ多くの細胞でRNAiを起こすことが遺伝子ノックダウンによる治療効果発現に必要なかが、組織への局所注射による投与の有効性を決定する要因と考えられる。

## ●合成 siRNA の生体への応用

合成 siRNA は、RNA で構成される活性本体であり、プラスミドDNA に比べて比較的分子量であることから、デリバリー上の障壁はより少ないと推察される。最近では天然のRNAではなく、さまざまな機能性を付加した修飾体を用いたRNAiの可能性も示されている<sup>9)</sup>。

哺乳動物個体レベルでRNAiが可能であることは、2002年7月にKayらのグループによりはじめて報告された<sup>10)</sup>。彼らは、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAをハイドロダイナミクス法によりマウスに投与し、肝臓でのルシフェラーゼ活性を指標に同時投与した siRNA による RNAi 効果を判定した。ルシフェラーゼ遺伝子と無関係な 21塩基対の siRNA を投与した場合にはルシフェラーゼ活性に変化が認められないのに対し、ルシフェラーゼ遺伝子に相補性を有する配列をもつ

siRNA を投与することにより平均81%の遺伝子発現抑制を得ている。

また、ほぼ同時にLewisら<sup>11)</sup>も、ハイドロダイナミクス法による合成siRNAの効果をルシフェラーゼ活性を指標に検討した結果を発表している。彼らは、10 $\mu$ gのターゲットプラスミドDNAと5 $\mu$ gの合成siRNAとを同時投与し、1日後のルシフェラーゼ活性を指標とした評価から、肝臓をはじめ腎臓、脾臓、肺、膵臓において80~90%のRNAi効果が得られることを示した。この検討では、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼをそれぞれコードするプラスミドDNAを同時に投与し、両者の比を取ることで実験間のバラツキを補正している(ダブルルシフェラーゼアッセイ法)。彼らは、外来性タンパク質に対してだけでなく、内因性タンパク質に対する効果も報告した。すなわち、蛍光タンパク質の一種EGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウスを用い、EGFPに対するsiRNA (50 $\mu$ g) をハイドロダイナミクス法で投与することにより、肝臓中の蛍光タンパク質の量を減少可能であることを示した。つまり、siRNAをデリバリーすることで恒常的なタンパク質発現も抑制可能であることが明らかとなった。

これらレポーター遺伝子を用いた基礎検討に引き続き、疾患治療への応用に関する検討が進められつつある。Songら<sup>12)</sup>は、肝臓でのFas発現の増強をRNAiによって抑制することで、Fas-Fasリガンドを介したアポトーシスにより急速に肝機能が破壊される肝炎治療の可能性を検討している。彼らは、Fasに対するsiRNAをハイドロダイナミクス法でマウスに投与するとmRNAおよびタンパク質のレベルで確かにFas発現が低下すること、その効果は少なくとも10日間は持続することを示した。コンカナバリンA (Con A) の投与により肝細胞死を誘発する2日前にsiRNAを投与すれば、肝障害の抑制が可能であることも示している。また、siRNAの投与は、低濃度のCon Aにより惹起される肝線維化、さらにはFas抗体投与による劇症肝炎に対しても有効であ

ることを報告した。最近、Zenderら<sup>13)</sup>は、同様の急性肝障害を対象とした検討を行い、カスパーゼ8 (caspase 8) をsiRNAでノックダウンすることの有効性を報告している。

ハイドロダイナミクス法以外の投与方法・投与経路を用いた検討として、DOTAP (dioleoyltrimethylammonium propane) リボソームとsiRNAとの複合体を腹腔内へ投与した報告例がある<sup>14)</sup>。ここでは、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) に対する合成二本鎖siRNA-リボソーム複合体をマウスの腹腔内にあらかじめ投与し、致死量のエンドトキシン投与に対する保護効果を検討している。TNF- $\alpha$ に対するsiRNAを前投与することによりマウスの生存率は有意に高く維持され、このとき腹腔洗浄液中のTNF- $\alpha$ 量および腹腔内細胞でのTNF- $\alpha$ のmRNAレベルの有意な減少が確認されている。この結果は、腹腔内投与されたsiRNA複合体の少なくとも一部が、腹腔内でエンドトキシンに反応してTNF- $\alpha$ を産生する細胞(腹腔マクロファージなど)に取り込まれ、細胞内でTNF- $\alpha$ のmRNAを特異的に分解していることを示すものと考えられる。筆者らは培養腹腔マクロファージを用いた検討から、DNA-リボソーム複合体はそれ自身が強力な免疫活性化物質であり、DNA-リボソーム複合体添加により大量のTNF- $\alpha$ が産生されることを明らかにしている<sup>15)</sup>。siRNA-リボソーム複合体に対するマクロファージなど免疫細胞の反応性に関しては明らかでないが、安全かつ有効なRNAi療法の確立にはその解明が重要と思われる。一方Vermaらは、癌細胞の増殖を促進する $\beta$ -カテニン発現量をsiRNAで減少させることによって、マウス腹腔内での大腸癌細胞の増殖抑制に成功している<sup>16)</sup>。siRNAはOligofectamineとの複合体として腹腔内投与されているが、効果が得られていることから、siRNA複合体は癌細胞に取り込まれ、細胞内でRNAi現象が起こっているものと推察される。

また*in vivo*でのRNAi効果は、神経細胞を標的とした検討においても報告されている。Makimuraら<sup>17)</sup>は、体重調節に重要な役割を果たす神経ペプチドのAGRP (agouti-related peptide) に対する合成

siRNA を脳室内に投与することにより AGRP 発現を抑制し、食物摂取量を変化させることなくマウスを減量させることに成功した。siRNA は、脳内局所にそれぞれ単独あるいはリポフェクチン (lipofectin) との複合体として注射されている。標的となる細胞が限局されること、さらには脳へのデリバリーは脳血管障壁により大きく制限を受けることから、ここで用いられた投与方法は有用ではあるが、より非侵襲的なデリバリー法の確立が幅広い適用には必要となる。一方、Reich ら<sup>18)</sup> は血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する合成 siRNA を網膜下に注射することにより、レーザー照射による脈絡膜血管新生の抑制に成功している。

### ● siRNA 発現ベクターによる RNAi

siRNA 発現ベクターは、標的細胞の核内に移行後転写された RNA 分子が設計通りに二本鎖を形成してはじめて RNAi 活性を示す。DNA 骨格であることによる安定性の高さに加え、プロモーターをはじめとする配列の選択や転写後の siRNA 構造の最適化などにより長期間の抑制効果が得られる可能性があり、プロモーターによる活性の違いについても報告されている。

現在までのところ、*in vivo* で siRNA 発現ベクターを用いた検討は少ない。Kay らのグループは、1 報目のルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を用いた検討において、siRNA に加え siRNA 発現ベクターによる RNAi 効果についても評価している<sup>10)</sup>。合成 siRNA の代わりに siRNA 発現ベクターを投与した場合にもほぼ同様の抑制効果が得られていることから、投与されたプラスミド DNA は少なくともその一部が肝細胞中に移行し、核内で転写された RNA が Dicer-RISC (RNA-induced silencing complex) を介してターゲット (この場合は外来性ルシフェラーゼ) の mRNA を分解していることが考えられる。これ以外の siRNA 発現ベクターを用いた報告には、前述の Makimura らによる AGRP をターゲットとする試み<sup>17)</sup> や、B 型肝炎ウイルスの感染・増殖に対する抑制効果などがある<sup>19)</sup>。

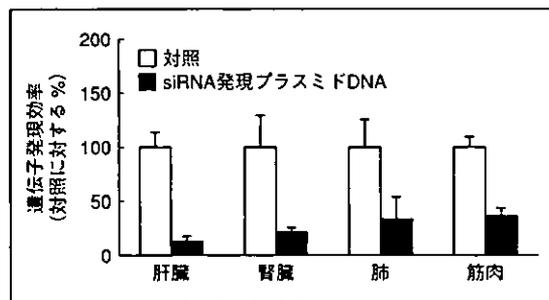


図2 siRNA 発現ベクターとターゲット遺伝子同時投与時の各組織、臓器における RNAi 効果

20 g のマウスに siRNA 発現プラスミド DNA (10  $\mu$ g)、pGL3-control (ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA, 3  $\mu$ g)、pRL-SV40 (ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド DNA, 3  $\mu$ g) を含む生理食塩水 1.6 ml を 5 秒以内に尾静脈内投与した (ハイドロダイナミクス法による投与)。投与 24 時間後にマウスを屠殺し、各組織中のホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化したホタルルシフェラーゼ活性を指標に、ホタルルシフェラーゼに対する siRNA 発現プラスミド DNA の効果を評価した。筋肉については別のマウスを用い、siRNA 発現プラスミド DNA (20  $\mu$ g)、pGL3-control (1  $\mu$ g)、pRL-SV40 (1  $\mu$ g) を含む生理食塩水 0.05 ml を大腿筋に注射した。投与 3 日後にマウスを屠殺後大腿筋を回収し、同様のアッセイを行った。結果は、それぞれの対照 (siRNA 非発現プラスミド DNA 投与) 群に対する siRNA 発現プラスミド DNA 投与群の遺伝子発現効率を示す ( $n=4$ )。 (Kobayashi N, et al : *J Pharmacol Exp Ther*, in press<sup>20)</sup> より改変)

筆者らは、疾患治療を目的とした siRNA 発現ベクターによる *in vivo* 遺伝子ノックダウン法の確立を目的に、siRNA 発現ベクターとターゲット mRNA との量的・時間的關係を焦点にマウスで検討を行っている<sup>20)</sup>。宮岸、多比良により開発された U6 プロモーターにドライブされたヘアピン型 siRNA 発現ベクター<sup>21)</sup> を用い、ハイドロダイナミクス法とダブルルシフェラーゼアッセイ法による評価を行った。siRNA 発現ベクターおよびモデルターゲットであるホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA の同時投与により、肝臓、腎臓、肺において有意な遺伝子発現抑制効果が認められた。別途、筋肉注射による骨格筋での遺伝子発現においても抑制効果が得られた (図 2)。ノックダウン効果の持続性について経時的にアッセイしたところ、投与 6 時間後には抑制効果はあまり認められなかったものの、1 日後から顕

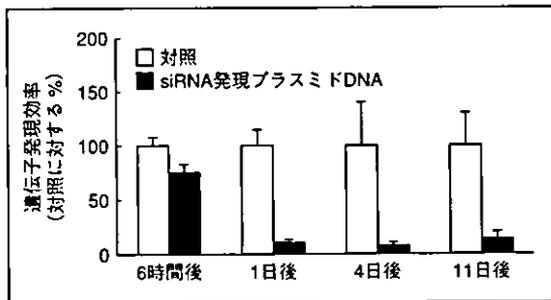


図3 siRNA発現ベクターとターゲット遺伝子同時投与後のRNAi効果の経時変化

siRNA発現プラスミドDNA (10  $\mu$ g), pGL3-control (ホタルルシフェラーゼ発現プラスミドDNA, 3  $\mu$ g), pRL-SV40 (ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドDNA, 3  $\mu$ g) をハイドロダイナミクス法によりマウスに尾静脈内投与した。経時的にマウスを屠殺し、図2の場合と同様に定量・規格化したときの遺伝子発現効率を示す (n=4)。

(Kobayashi N, et al : *J Pharmacol Exp Ther*, in press<sup>20</sup>) より改変)

著な抑制効果が認められ、その効率は投与後10日目までほぼ一定であった(図3)。しかしながら、対照条件下のルシフェラーゼ活性は経時的に減少していること、またハイドロダイナミクス法により導入した場合の転写・発現はそのほとんどが一過性であることを考慮すると、この結果がsiRNA発現ベクターによる遺伝子発現抑制効果が10日間持続することを反映しているとは限らない。

そこで、siRNA発現ベクターによる効果がどの程度の期間有効であるかを検討するために、siRNA発現ベクターをあらかじめ投与後、種々の間隔でターゲットプラスミドDNAを投与した。その結果、1日後に投与したターゲットに対してはsiRNA発現ベクターによる遺伝子発現抑制効果が認められたが、4日後に投与した場合には効果が得られず、siRNA発現ベクターによる効果は、少なくともこの条件下では数日程度であることが示された。しかしながら、同時投与の場合と異なりsiRNA発現ベクターとターゲットプラスミドDNAを別々に投与する場合には、DNA導入細胞が異なった分布になることが予想されることから、その影響を考慮する必要がある。図4には、ハイドロダイナミクス法によりEGFP-F(緑色)とDsRed(赤色)をコードするプラスミド

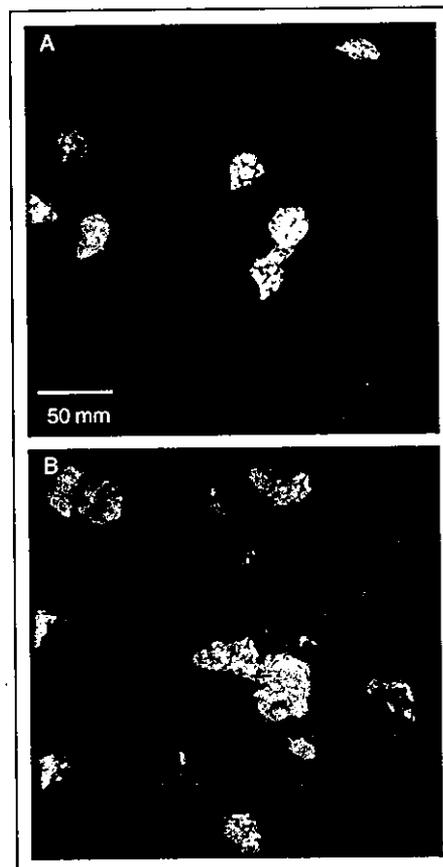


図4 ハイドロダイナミクス法による肝臓への遺伝子導入時の遺伝子発現細胞の局在

20gのマウスにEGFP-F発現プラスミドDNA (25  $\mu$ g) およびDsRed発現プラスミドDNA (25  $\mu$ g) を同時(A)あるいは4時間間隔をあけて(B)ハイドロダイナミクス法により投与した。投与後24時間の時点で肝臓を回収し、凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した像を示す。緑色がEGFP-Fの局在を、赤色がDsRedの局在を示し、両者が共存する細胞は黄色く観察される。

(Kobayashi N, et al : *J Pharmacol Exp Ther*, in press<sup>20</sup>) より)

DNAを同時あるいは別々に投与したときの共焦点レーザー顕微鏡像を示す。

ターゲットプラスミドDNAに対するsiRNA発現ベクターの相対的な投与量を増加させることにより、投与後6時間においても遺伝子発現抑制効果が得られた(図5)。しかしながら、このときの遺伝子発現抑制効果は投与1日後と比較すると弱く、siRNA発現ベクターによるRNAi効果発現にはある程度時間を要することが示唆された。

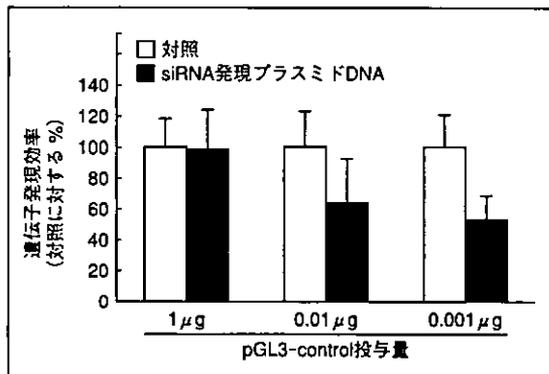


図5 投与後初期のRNAi効果におけるターゲット遺伝子投与量の影響

pGL3-control/pRL-SV40 (1 μg/1 μg, 0.01 μg/0.01 μgまたは0.001 μg/0.01 μg)をsiRNA発現プラスミドDNA (10 μg)と同時にヒドロダイナミクス法によりマウスに尾静脈内投与した。図2の場合と同様に定量・規格化し、投与6時間後の遺伝子発現効率を示す (n=4)。

(Kobayashi N, et al : *J Pharmacol Exp Ther*, in press<sup>20</sup>)より改変)

病原性タンパク質の発現を抑制することにより疾患を治療しようとする試みはこれまでも種々検討されており、mRNAを特異的に拮抗・分解するアンチセンスやリボザイムなどに関して基礎的な検討が進められてきた。これら既存の方法と比較してRNAiは、特異性に加え効率の高さから、病原性タ

ンパク質の発現抑制に対するより有効な方法として非常に注目を集めている。しかしながら、遺伝子治療に関する基礎検討でも明らかとされたように、核酸分子を効率よく細胞内に送達する方法論が絶対的に不足しているのが現状であり、臨床応用に向けてはより一層のデリバリー技術の改善が要求される。

## 文献

- 1) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001)
- 2) Nishikawa M & Huang L. Nonviral vectors in the new millennium : Delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**, 861-70 (2001)
- 3) Sakurai F, Nishioka T, Saito H, et al. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice : The role of the neutral helper lipid. *Gene Ther* **8**, 677-86 (2001)
- 4) Sakurai F, Terada T, Yasuda K, et al. The role of tissue macrophages in the induction of proinflammatory cytokine production following intravenous injection of lipoplexes. *Gene Ther* **9**, 1120-6 (2002)
- 5) Liu F, Song Y & Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**, 1258-66 (1999)
- 6) Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, et al. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 853-60 (2001)
- 7) Liu F, Nishikawa M, Clemens PR & Huang L. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd<sup>mdx/mdx</sup> mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* **4**, 45-51 (2001)
- 8) Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**, 1465-8 (1990)
- 9) Braasch DA, Jensen S, Liu Y, et al. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* **42**, 7967-75 (2003)
- 10) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, et al. RNA interference in adult mice. *Nature* **418**, 38-9 (2002)

- 11) Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA & Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* **32**, 107-8 (2002)
- 12) Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* **9**, 347-51 (2003)
- 13) Zender L, Hutker S, Liedtke C, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7797-802 (2003)
- 14) Sorensen DR, Leirdal M & Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* **327**, 761-6 (2003)
- 15) Yasuda K, Ogawa Y, Kishimoto M, et al. Plasmid DNA activates murine macrophages to induce inflammatory cytokines in a CpG motif-independent manner by complex formation with cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 344-8 (2002)
- 16) Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C & Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against  $\beta$ -catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**, 1291-300 (2003)
- 17) Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R & Mobbs CV. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci* **3**, 18 (2002)
- 18) Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* **9**, 210-6 (2003)
- 19) McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* **21**, 639-44 (2003)
- 20) Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, et al. Vector-based *in vivo* RNA interference : Dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharm Exp Ther*, in press (2004)
- 21) Miyagishi M & Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* **20**, 497-500 (2002)

# RNAiによるマウス個体での遺伝子ノックダウン

特集 RNAiとDDS

西川元也・小林直樹・高倉喜信\*

## RNAi-based gene silencing in mice

RNA interference (RNAi) is expected to be a novel therapeutic method for various diseases including cancer, AIDS and viral hepatitis. RNAi-based therapy could be realized by the development of efficient delivery system for small interfering RNA (siRNA), the effector molecule in RNAi. Because various methods are available to deliver siRNA into the cytoplasm of cultured cells, such as viruses, transfection reagents, and electroporation, RNAi-based knock down is becoming a standard to identify the function of the gene of interest. However, the application of siRNA or siRNA-expressing vector to *in vivo* gene silencing for the treatment of diseases has encountered with barriers on the delivery.

To overcome these problems, the development of delivery system is highly required. Delivery methods that have been developed for *in vivo* delivery of antisense oligonucleotides and genes can be applied to siRNA or siRNA-expressing vectors. Recently, we have shown that siRNA and siRNA-expressing plasmid DNA efficiently delivered to the liver can significantly suppress target genes. In this review, we summarize the possibility of *in vivo* RNAi by delivering siRNA or siRNA-expressing vectors in mice.

RNAiによる遺伝子発現抑制は、がんやエイズ、ウイルス性肝炎などの難治性疾患に対する画期的治療法になりうるものとして注目を集めている。RNAiによる疾患治療の実現には、生体における効率的なRNAi誘導が重要であり、siRNAに対するデリバリーシステムの開発が必須となる。siRNAおよびsiRNA発現ベクターの*in vivo*デリバリーに関しては、遺伝子を対象に検討されてきたデリバリー技術の応用が可能である。本稿では、siRNAおよびsiRNA発現ベクターを生体に投与する方法ならびにマウス個体でのRNAiの可能性について概説する。

Makiya Nishikawa・Naoki Kobayashi・Yoshinobu Takakura\*

key words : hydrodynamics-based procedure, plasmid DNA, DNA/cationic compound complex, delivery, cellular uptake

短い二本鎖RNA (small interfering RNA : siRNA)により配列特異的にmRNAが分解される現象であるRNA干渉(RNAi)は、遺伝子発現抑制を目的に従来検討されてきたリボザイムやアンチセンスなどの類似の方法と比較して配列特異性が高く、また非常に強力な遺伝子発現抑制効果を示す。これまでに、化学合成されたsiRNAあるいは細胞内での転写により、siRNAまたはヘアピン型RNA (short hairpin RNA : shRNA)を発現するベクターを用いることで、遺伝子発現抑制が実現可能であることが示されている。したがって、特定の遺伝子産物の機能解析手段としての利用にかぎらず、ウ

イルス感染やがん、その他病因蛋白質の発現亢進が引き金となる難治性疾患に対する画期的治療法になりうるものとして期待されている。

このRNAiによる遺伝子ノックダウンを疾患治療に利用するためには、機能分子であるsiRNAを効率よく標的細胞内にデリバリーすることが必須である。しかしながら、siRNAやsiRNA発現プラスミドDNAなどは、水溶性高分子であることから細胞膜透過性が著しく低い。したがって、細胞内で作用するこれら化合物による遺伝子ノックダウンを*in vivo*で達成するためには、効率的に細胞内にデリバリーする技術の開発が不可欠である。膜透過に不利な性質を有する水溶性高分子化合物を対象とした細胞質へのデリバリーに関しては、これまでにアン

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University  
京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野

表 1 遺伝子導入用デリバリーシステム・技術

	投与方法	適用可能な細胞・臓器	遺伝子発現効率	調製・投与の容易さ	その他
プラスミドDNA単独	組織内注射	骨格筋をはじめ全身の組織・臓器	低い	容易	遺伝子発現細胞が投与部位周辺に限られる。
	エレクトロポレーション	骨格筋をはじめ全身の組織・臓器	中程度	容易	若干の組織傷害性
	遺伝子銃	主に皮膚	低い	容易	遺伝子発現細胞が表層に限られる。
	ハイドロダイナミクス法	肝臓をはじめとする内臓、または骨格筋	高い	容易	毒性・組織傷害性に関する検討の余地あり
DNA複合体	正電荷リポソーム/脂質	肺血管内皮細胞(静注)、肺上皮細胞(気管内投与)、腹腔内など	低い	容易(調製時に凝集塊が形成する場合あり)	細胞毒性、複合体化による免疫細胞活性化
	正電荷高分子	肺血管内皮細胞(静注)、肝細胞など(ターゲティング型)	低い	多機能型ベクターの場合は設計・合成が煩雑	細胞毒性

チセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、プラスミドDNAなどを対象にさまざまな検討が行われてきた。代表的なものには、ウイルスを用いる方法や、カチオン性脂質やリポソーム、カチオン性高分子、 dendrimer などの合成高分子、あるいはエレクトロポレーションの利用などがあげられる(表1)<sup>1)</sup>。

こうした遺伝子導入を目的に開発された方法を利用することで、個体レベルでのRNAiが実現可能と考えられるが、*in vivo* RNAiの実現には細胞内への導入に加え、標的細胞に到達するまでの過程も重要である(図1)。また、比較的好成績が報告されているエリスロポエチンや肝細胞増殖因子などの分泌性蛋白質を対象とする遺伝子導入の場合とは異なり、siRNAおよびsiRNA発現ベクター投与による遺伝子発現抑制は導入細胞でのみ得られることから、RNAiによる疾患治療を試みる際には、多くの細胞へのデリバリー法の開発が重要と考えられる<sup>2)</sup>。また、遺伝子ノックダウンによる疾患治療においては、標的分子の選択もRNAiによる疾患治療の有効性を決定する重要な因子と考えられる。

#### 合成siRNAとsiRNA発現プラスミドDNAとの比較

合成siRNAは、RNAで構成される活性本体であり、一方、siRNA発現プラスミドDNAは、標的細胞

の核内に移行後転写されたRNA分子が、設計どおりに二本鎖を形成してはじめてRNAi活性を示す。siRNA発現ベクターはDNAであり、一方、siRNAはRNAであるが、体内動態や細胞取り込み過程におけるDNAとRNAの違いは明らかではない。siRNAは構造修飾が可能であり、さまざまな機能性を付加した修飾体も開発されている<sup>3)</sup>。一方、siRNA発現プラスミドDNAの場合には、DNAであることから安定性が高く、プロモーターをはじめとする配列の選択や転写後のsiRNA構造の最適化などにより、長期間の抑制効果が得られる可能性がある。

生体に投与後の組織分布や細胞取り込みなどには、分子サイズ依存的な拡散、血管壁透過、細胞膜透過過程が存在する。分子量に換算して数百万にもなるプラスミドDNAと比較すると、siRNAは数万程度であることからデリバリー上の障害はより少ないと推察される。しかしながら、細胞膜透過に関しては、siRNAでも単純拡散により細胞内移行可能なサイズよりはるかに大きく、実際の体内・細胞内動態において、siRNAとその発現プラスミドDNA間のサイズの違いが、RNAi効果に影響を及ぼすかについての詳細は不明である。

一方、細胞質内に移行後の動態に関しては、DNAが核内へ移行し転写されなければ活性が得られないのに対し、siRNAの場合にはその必要がない。

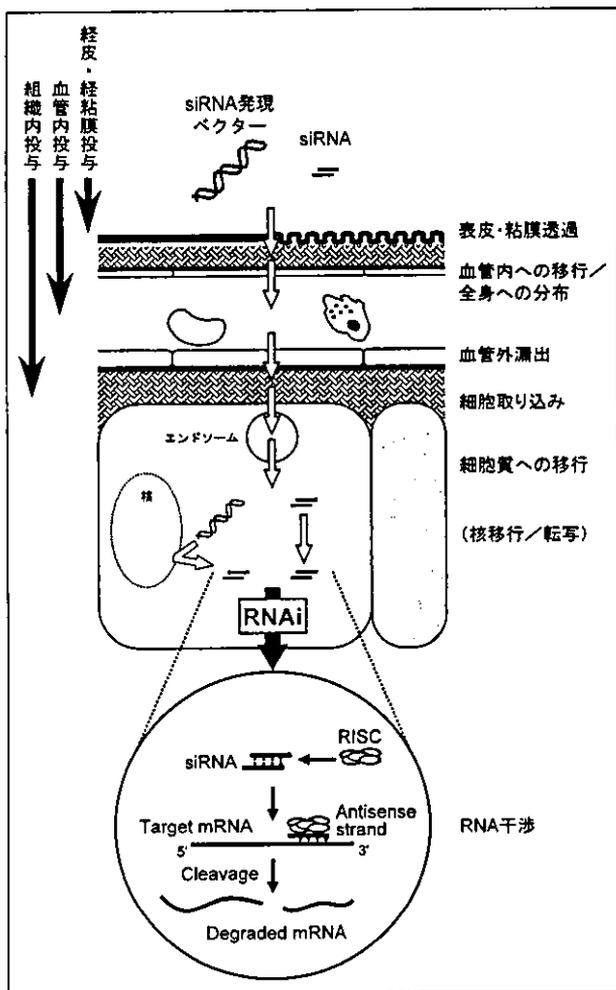


図1 siRNA および siRNA 発現ベクター投与後の RNAi が起きるまでの概略図

siRNA および siRNA 発現ベクターが効果を発揮するためには、標的細胞内に移行しなければならない。細胞質内に到達するまでには、図に示す多くの解剖学的な障壁が存在するとともに酵素による分解も障害となる。siRNA と比較した場合、siRNA 発現ベクターは核内へ移行し転写される必要がある。図中左側には、siRNA および siRNA 発現ベクターに利用可能な種々の投与方法と、体内動態のスタート地点を示す。

### In vivo RNAi のための siRNA デリバリー

siRNA および siRNA 発現プラスミド DNA はともに核酸分子である。したがって、*in vivo* での siRNA・siRNA 発現プラスミド DNA のデリバリーに関しては、代表的な非ウイルスベクターとして汎用されるプラスミド DNA を対象に開発が進められている遺伝子導入法の利用が検討されている。プラスミド DNA による遺伝子導入に関しては、これまでに数多くの導入用ベクター(キャリア)が開発

されるとともに、投与方法に関してもさまざまな工夫が施されてきた。

通常、プラスミド DNA は巨大分子であることからその生体内分布は大幅に制限を受ける。ハイドロダイナミクス法(後述)を用いない通常の血管内投与の場合には、巨大なサイズが原因となり、プラスミド DNA は連続内皮で構成される血管を通過して組織の実質細胞に到達することは不可能である。この場合、デリバリー可能な、すなわち遺伝子導入可能な細胞は血管内皮細胞と血液中の血球系細胞に限られる。

培養細胞への遺伝子導入試薬として有用なカチオン性リポソームあるいはカチオン性高分子は、プラスミド DNA との間で正電荷複合体を形成することで負に帯電した細胞膜表面への相互作用を増し、遺伝子発現の増大が可能である。しかしながら、複合体のサイズが大きくなる場合が多く、また、投与後に血清蛋白質や血球との相互作用により、その体内分布がさらに制限を受ける危険性が高い<sup>9)</sup>。したがって、複合体化により細胞へのアクセスはより制限を受ける場合がある。

プラスミド DNA/ベクター複合体の粒子サイズが直径 200 nm 程度以下の場合には、肝臓や脾臓、骨髄の不連続内皮で構成される血管を透過可能であり、これら組織中実質細胞での遺伝子発現が可能と考えられるが、それ以上のサイズになると血管内皮細胞以外との接触の機会は大きく減少する。また、カチオン性リポソームとの複合体を投与した場合には、炎症性サイトカインが産生され、遺伝子発現に対しても影響を及ぼすことが指摘されている<sup>9)</sup>。

プラスミド DNA をキャリアを用いずに血管内投与した場合には、血管壁透過に加えて血中のヌクレアーゼによる分解や肝臓の Kupffer 細胞によるクリアランスが著しい<sup>9)</sup>。しかしながら、1999 年に Liu ら<sup>10)</sup>により、大容量のプラスミド DNA 水溶液を急速に血管内注入する方法、いわゆるハイドロダイナミクス法が開発され、プラスミド DNA 単独でも遺伝子発現が得られることが示された。この方法により得られる遺伝子発現は、肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓など測定された内臓すべてで検出されており、その発現レベルは、カチオン性リポソーム複合体と比

較して1万倍以上高く、非常に有効な *in vivo* 遺伝子導入法であることが示された。また、肝臓での遺伝子発現の大部分は肝実質細胞での発現であることから、肝細胞を標的とした遺伝子治療法への応用が期待されている。

筆者らは、最適条件下でのプラスミド DNA ならびにモデル高分子、微粒子を用いた検討から、ハイドロダイナミクス法による細胞内への物質デリバリーは高分子・微粒子に共通の非特異的な過程であること、デリバリーにおけるサイズ限界は50~200 nm 付近にあることを明らかにした<sup>8-10)</sup>。その一方で、この投与方法の場合には、細胞膜傷害によると考えられる肝細胞内酵素の漏出も顕著であり、その臨床応用には組織傷害性の軽減に関する検討が必要と考えられる。

これまでの検討から、本アプローチにより約40%の肝細胞への遺伝子導入が達成されており<sup>7)</sup>、筋肉組織への遺伝子導入においても高い遺伝子導入効率を得られている<sup>11)</sup>。また、血管内投与したプラスミド DNA と組織へのエレクトロポレーションの併用、あるいはプラスミド DNA 単独の血管内投与による遺伝子導入技術として組織内滞留性を増大するアプローチが検討されており、横隔膜へのジストロフィン遺伝子導入が実現されている<sup>12)</sup>。

血管内投与と比較してより簡便な遺伝子投与方法として、プラスミド DNA 水溶液の組織への直接注射があげられる。プラスミド DNA 単独の筋肉注射による骨格筋での遺伝子発現の報告を皮切りに、心筋、横隔膜などの筋組織をはじめ、肝臓、腎臓などの内臓から皮膚や脳までの臓器・組織での遺伝子発現が報告されている<sup>1)</sup>。この投与方法では、多くの場合カチオン性ベクター複合体よりもプラスミド DNA 単独が有効であり、また、エレクトロポレーションあるいは超音波照射により局所注射後の遺伝子発現効率が大幅に改善可能である。

しかしながら、組織内注射は局所投与であることから、プラスミド DNA の分布・拡散は大きく制限される。したがって、こうした投与方法による遺伝子発現は投与部位近傍に限られ、筋ジストロフィーに対する遺伝子導入の場合のように、遺伝子導入・発現細胞の偏在が問題とされることがある。単純な筋

肉注射の場合には、せいぜい直径数 mm 程度の範囲内の細胞への遺伝子導入が実現可能であることが示されている。

標的細胞内の mRNA が標的となる RNAi では、RNAi 誘導可能な細胞数が重要と考えられることから、遺伝子ノックダウンによる治療効果発現における導入細胞数の重要性が非常に高い。これまでに *in vivo* で RNAi 効果が報告されている結果では、血管系を介して多くの細胞への導入が可能なハイドロダイナミクス法を用いている場合が多く、局所投与による効率的な RNAi の誘導には、エレクトロポレーションの適用などの工夫が必須と考えられる。

### ***In vivo* RNAi による遺伝子ノックダウンの定量的解析**

以上のように、*in vivo* RNAi の実現には、siRNA または siRNA 発現ベクターをいかに効率よく標的細胞にデリバリーするかが重要と考えられる。このデリバリー効率を簡便かつ定量的に評価する方法として、高感度検出が可能なレポーター遺伝子を siRNA (または siRNA 発現ベクター) と同時に投与し、そのときのレポーター遺伝子発現を指標に用いる方法があげられる。

哺乳動物個体レベルで RNAi が可能であることを最初に報告した Kay らのグループ<sup>13)</sup>もこの方法を用いている。彼らは、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA を、ハイドロダイナミクス法によりマウスに投与後の肝臓でのルシフェラーゼ活性を指標に、同時投与した siRNA あるいは siRNA 発現ベクターによる RNAi 効果を判定している。ルシフェラーゼ遺伝子と無関係な 21 塩基対の siRNA を投与した場合には、ルシフェラーゼ活性に変化が認められないのに対し、ルシフェラーゼ遺伝子に対する配列を持つ siRNA を投与することで平均 81% の遺伝子発現抑制を得ている。

また、同様の検討において、合成 siRNA の代わりに siRNA 発現プラスミド DNA を投与した場合にも約 93% と高い抑制効果が得られている。この方法では、遺伝子導入効率自身の変動する危険性が高く、厳密な RNAi による遺伝子抑制効率の評価は困難

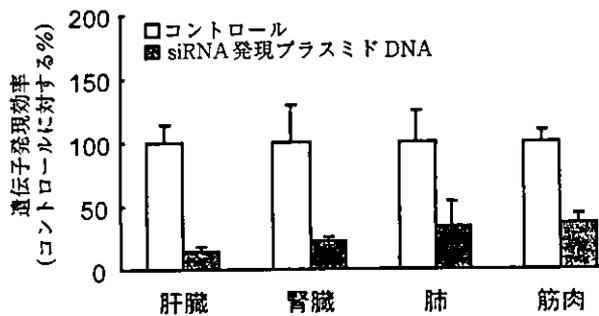


図2 ターゲット遺伝子同時投与時の各組織・臓器における RNAi 効果

(Kobayashi N et al., 2004<sup>14)</sup>より改変)

20gのマウスに siRNA 発現プラスミド DNA (10  $\mu$ g), pGL3-control (ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA, 3  $\mu$ g), pRL-SV40 (ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド DNA, 3  $\mu$ g) を含む生理食塩水 1.6 mL を 5 秒以内に尾静脈内投与した (ハイドロダイナミクス法による投与)。ルシフェラーゼ活性を指標に siRNA 発現プラスミド DNA の効果を評価した。筋肉については別のマウスでの筋肉注射後の結果を示す。結果は、おのおののコントロール (siRNA 非発現プラスミド DNA 投与) 群に対する siRNA 発現プラスミド DNA 投与群の遺伝子発現効率を示す。

である。この問題点を克服する方法として、ダブルルシフェラーゼアッセイを応用した方法があり、これにより実験間のばらつきが補正可能となる。

筆者らは、モデル標的としてホタルルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA と、遺伝子導入効率の補正のためのウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を投与することで作製したモデル系において、siRNA 発現プラスミド DNA による遺伝子ノックダウン効果の定量的解析を行い、siRNA 発現ベクターとターゲット mRNA との量的・時間的關係を焦点にマウス個体での検討を行った<sup>14)</sup>。検討には、宮岸・多比良により開発された U6 プロモーターにドライブされたヘアピン型 siRNA 発現プラスミド DNA<sup>15)</sup> をマウスに、ハイドロダイナミクス法あるいは局所注射により投与し、ダブルルシフェラーゼアッセイ法による評価を行った。siRNA 発現プラスミド DNA およびモデルターゲットであるホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA の同時投与により、肝臓および腎臓、肺、筋肉において有意な遺伝子発現抑制効果が認められた (図 2)。

ノックダウン効果の持続性について経時的に評価したところ、投与 6 時間後にはあまり認められなかったものの、1 日後から顕著な抑制効果が認めら

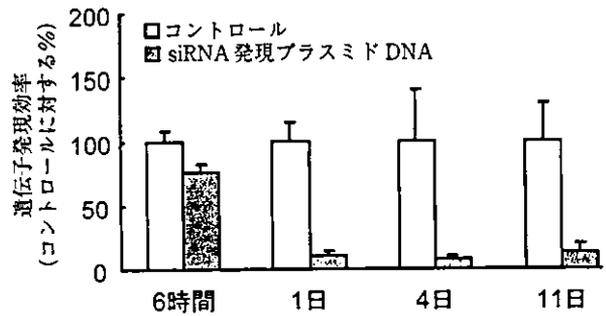


図3 ターゲット遺伝子同時投与時の種々のタイミングにおける RNAi 効果

(Kobayashi N et al., 2004<sup>14)</sup>より改変)

siRNA 発現プラスミド DNA (10  $\mu$ g), pGL3-control (3  $\mu$ g), pRL-SV40 (3  $\mu$ g) をハイドロダイナミクス法によりマウスに尾静脈内投与した。経時的にマウスを屠殺し、図 2 の場合と同様に定量・規格化したときの遺伝子発現効率を示す。

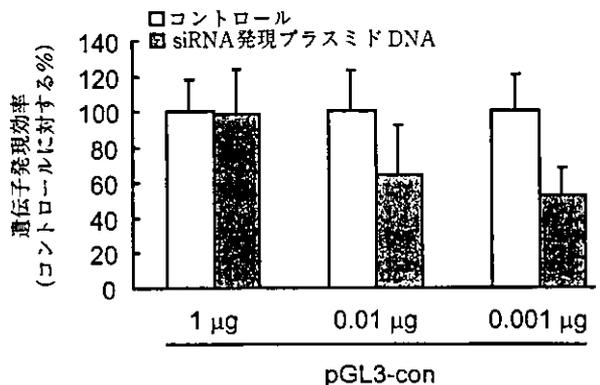


図4 投与後初期の RNAi 効果におけるターゲット遺伝子投与量の影響

(Kobayashi N et al., 2004<sup>14)</sup>より改変)

pGL3-control/pRL-SV40 (1  $\mu$ g/1  $\mu$ g, 0.01  $\mu$ g/0.01  $\mu$ g または 0.001  $\mu$ g/0.01  $\mu$ g) を siRNA 発現プラスミド DNA (10  $\mu$ g) と同時にハイドロダイナミクス法によりマウスに尾静脈内投与した。図 2 の場合と同様に定量・規格化し、投与 6 時間後の遺伝子発現効率を示す。

れ、その効率は投与後 10 日目までほぼ一定であった (図 3)。しかしながら、コントロール条件下のルシフェラーゼ活性は経時的に減少していること、また、ハイドロダイナミクス法により導入した場合の転写・発現はそのほとんどが一過性であることを考慮すると、この結果が siRNA 発現ベクターによる遺伝子発現抑制効果が 10 日間持続することを反映するとは限らない。

そこで、siRNA 発現ベクターによる効果がどの程度の期間有効であるかを検討するために、siRNA 発現プラスミド DNA をあらかじめ投与後種々の間隔でターゲットプラスミド DNA を投与した。その結

果, 1日後に投与したターゲットに対しては, siRNA 発現プラスミド DNA による遺伝子発現抑制効果が認められたが, 4日後に投与した場合には効果が得られず, siRNA 発現プラスミド DNA による効果は, 少なくともこの条件下では数日程度であることが示された. しかしながら, 同時投与の場合と異なり, siRNA 発現プラスミド DNA とターゲットプラスミド DNA を別々に投与した場合には, DNA 導入細胞が異なった分布になることが予想される<sup>14)</sup>ことから, その影響を考慮する必要がある.

また, ターゲットプラスミド DNA に対する siRNA 発現プラスミド DNA の相対的な投与量を増大させることで, 投与後6時間においても遺伝子発現抑制効果が得られた(図4). しかしながら, このときの遺伝子発現抑制効果は投与1日後と比較すると弱く, siRNA 発現プラスミド DNA による RNAi 効果発現にはある程度時間を要することが示唆された.

レポーター遺伝子導入と組み合わせた RNAi 評価法は, 簡便かつ定量的であることから, *in vivo* RNAi の実現を目的とした siRNA デリバリー開発には有効な手段と考えられる. その一方で問題点もあげられ, 前述の検討結果からも明らかなように, レポーター遺伝子の発現が短期間である場合には, 長期間の RNAi 効果が評価できない. また, 遺伝子導入可能な細胞(群)は用いる投与法に依存するため, 同時投与の場合には, レポーター遺伝子と siRNA 分子とが同一の細胞に導入される確率が高くなる. したがって, 得られる RNAi 効果は, 本来細胞で発現している蛋白質を標的とする場合よりも高い可能性がある.

レポーター遺伝子導入を利用した RNAi に関わるこれらの問題点を克服する方法として, 最近筆者らは, ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを同時に発現するがん細胞株を作製し, この細胞を用いた *in vivo* RNAi の検討を進めている. 皮下腫瘍に対して siRNA 発現プラスミド DNA あるいは siRNA を腫瘍内注射し, エレクトロポレーションを併用することにより, *in vivo* での固形腫瘍においても効果的な RNAi が誘導できることが示されている.

## *In vivo* RNAi による疾患治療

RNA レベルでの配列特異的な発現抑制が可能であることから, RNAi はがんやウイルス感染に対して合理的な治療戦略と考えられる. Song ら<sup>16)</sup>は, 肝臓での Fas 発現の増大を RNAi により抑制することで, Fas-Fas リガンドを介したアポトーシスにより急速に肝機能が破壊される肝炎の治療の可能性を検討している. 彼らは, Fas に対する siRNA をハイドロダイナミクス法でマウスに投与することにより, Fas の発現が低下すること, また, その効果は少なくとも10日間は持続することを示している. Concanavalin A (Con A) の投与により, 肝細胞死を誘発する2日前に予め siRNA を投与することで, 肝障害を抑制可能であることも示している. さらには, siRNA の投与は, 低濃度の Con A により惹起される肝線維化, さらには Fas 抗体投与による劇症肝炎に対しても有効であることを報告した. Zender ら<sup>17)</sup>は, caspase 8 を siRNA でノックダウンすることにより, 同様に急性肝障害が抑制可能であることを示している.

カチオン性リポソームを用いた siRNA による遺伝子発現抑制に関しても報告されている<sup>18)</sup>. ここでは, 腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  に対する合成二本鎖 siRNA/リポソーム複合体をマウスの腹腔内にあらかじめ投与し, 致死量のエンドトキシン投与に対する保護効果を検討している. TNF- $\alpha$  に対する siRNA を前投与することにより, マウスの生存率は有意に高く維持され, このときの腹腔洗浄液中の TNF- $\alpha$  量および腹腔内細胞での TNF- $\alpha$  の mRNA レベルの有意な減少が確認されている. この結果は, 腹腔内投与された siRNA 複合体の少なくとも一部が, 腹腔内でエンドトキシンに反応して TNF- $\alpha$  を産生する細胞(腹腔マクロファージなど)に取り込まれ, 細胞内で TNF- $\alpha$  の mRNA を特異的に分解していることを示すものと考えられる. また, がん細胞の増殖を促進する  $\beta$ -カテニンの発現を siRNA で減少させることで, マウス腹腔内での大腸がん細胞の増殖が抑制されることも示されている<sup>19)</sup>. この検討では, siRNA は oligofectamine との複合体として腹腔内投与されているが, 結果から推察すると siRNA 複合体ががん細胞に取り込まれ, 細胞

内で RNAi 現象が起きているものと考えられる。

*In vivo* RNAi は、神経細胞を標的とした検討でもその効果が証明されている。Makimura ら<sup>20)</sup>は、体重調節に重要な役割を果たす神経ペプチドの AGRP (agouti-related peptide) に対する合成 siRNA を脳室内に投与することにより AGRP 発現を抑制し、食物摂取量を変化させることなくマウスを減量させることに成功している。siRNA は、脳内局所にそれぞれ単独あるいは lipofectin との複合体として注射されている。Reich ら<sup>21)</sup>は、血管内皮増殖因子に対する合成 siRNA を網膜下に注射することにより、レーザー照射による脈絡膜血管新生の抑制に成功している。このほかにも、B 型肝炎ウイルスの感染・増殖に対する抑制効果も報告されている<sup>22)</sup>。

病原性蛋白質の発現を抑制することにより疾患を治療しようとする試みに関して、mRNA を特異的に拮抗・分解するアンチセンスやリボザイムなどの利用が検討されてきた。siRNA による mRNA の分解は、特異性・効率ともに高いことから、病原性蛋白質の発現抑制に対するより有効な治療方法として期待されている。しかしながら、siRNA あるいは siRNA 発現プラスミド DNA などの核酸分子を効率よく細胞内に送達する方法論が、いまだ十分整っているとはいえず、臨床応用に向けてはさらなる DDS の開発が必要と考える。

#### 文 献

- 1) Nishikawa M, Huang L : Nonviral vectors in the new millennium : delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12 : 861-870, 2001.
- 2) Nishikawa M, Hashida M : Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol Pharm Bull* 25 : 275-283, 2002.
- 3) Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA, Corey DR : RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42 : 7967-7975, 2003.
- 4) Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A et al. : Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice : the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther* 8 : 677-686, 2001.
- 5) Sakurai F, Terada T, Yasuda K, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : The role of tissue macrophages in the induction of proinflammatory cytokine production following intravenous injection of lipoplexes. *Gene Ther* 9 : 1120-1126, 2002.
- 6) Kawabata K, Takakura Y, Hashida M : The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice : involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 12 : 825-830, 1995.
- 7) Liu F, Song Y, Liu D : Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6 : 1258-1266, 1999.
- 8) Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y : Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 297 : 853-860, 2001.
- 9) 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* 6 : 455-463, 2004.
- 10) 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* 6 : 584-592, 2004.
- 11) 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* 11 : 901-908, 2004.
- 12) Liu F, Nishikawa M, Clemens PR, Huang L : Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd<sup>max/max</sup> mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther* 4 : 45-51, 2001.
- 13) McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA : RNA interference in adult mice. *Nature* 418 : 38-39, 2002.
- 14) Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M et al. : Vector-based *in vivo* RNA interference : dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 308 : 688-693, 2004.
- 15) Miyagishi M, Taira K : U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3'overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20 : 497-500, 2002.
- 16) Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N et al. : RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9 : 347-351, 2003.
- 17) Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S et al. : Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 7797-7802, 2003.
- 18) Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M : Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327 : 761-766, 2003.
- 19) Verma UN, Surabhi RM, Schmalstieg A, Becerra C, Gaynor RB : Small Interfering RNAs directed against  $\beta$ -catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9 : 1291-1300, 2003.
- 20) Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV : Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci* 3 : 18, 2002.
- 21) Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X et al. : Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9 : 210-216, 2003.
- 22) McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH et al. : Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21 : 639-644, 2003.

## 非ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療

西川元也

京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野

筋肉は、プラスミドDNAの注射により容易に遺伝子発現が得られることから、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療が早くから期待されてきた。しかしながら、ジストロフィンをはじめ筋ジストロフィーの原因タンパク質は細胞内に局在することから、一部の細胞への遺伝子導入では治療効果を得ることができない。対象筋肉中のできるだけ多くの細胞で遺伝子を発現させることが重要であり、そのためには効率的な遺伝子デリバリー法の開発が必要となる。本稿では、非ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の試みに関して、遺伝子デリバリー法の改善を中心に紹介する。

**Key words** gene transfer, hydrodynamics-based procedure, plasmid DNA, gene delivery, cellular uptake

### はじめに

筋ジストロフィーに代表される遺伝子疾患に対して、欠損遺伝子を補充する、または遺伝子変異を修復することによる治療—遺伝子治療—が、これら疾患に対する根本的治療法として期待されている。正常遺伝子を補充するには、標的細胞に効率良く遺伝子をデリバリーするベクターならびに投与技術の開発が不可欠である。そこで、過去10年以上にわたり遺伝子デリバリーシステムの開発が進められており、筋ジストロフィーを対象とした遺伝子治療においては、主にアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、プラスミドDNAなどの利用が検討されてきた (表1)<sup>1)</sup>。それぞれに利点・欠点があげられるが、臨床試験でのアデノウ

イルスベクターによる被験者の死亡、さらにはレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療プロトコールでの白血病発症などが報告され、安全性の面でプラスミドDNAなどの非ウイルスベクターの利用が好ましいと考える。

筋ジストロフィーは、骨格筋の壊死・再生と結合組織の増生を主病変として、進行性の筋力低下と筋萎縮をきたす遺伝性筋疾患の総称であり、現在までに30種以上が同定されている。最も高頻度に発生し、かつ最も重症のDuchenne型筋ジストロフィー (DMD) は、X連鎖性劣性遺伝形式をとり、人種によらず男児約3,500人につき1人の割合で発生する。筋力は年齢を経るに従い低下し、多くの場合呼吸不全あるいは心不全により死亡する。この重篤なDMDに対する有効な治療法はいまだ確立されてお

### Nonviral gene therapy for muscular dystrophy

Makiya Nishikawa

にしかわ・まきや 1992年京都大学大学院薬学研究科修士課程薬学専攻修了、95年同博士後期課程退学、同年京都大学薬学部助手、99年～2001年米国Pittsburgh大学博士研究員 (Leaf Huang研究室) を経て、02年京都大学大学院薬学研究科助教授。現在の専門：ドラッグデリバリーシステム開発、遺伝子治療。

表1 筋ジストロフィーに対する遺伝子治療に用いられるベクターの特徴

アデノウイルスベクター	遺伝子導入効率が高い 全長ジストロフィンcDNAの組み込みが可能 大量作製が容易	ウイルスに対する強い免疫反応 遺伝子発現期間が短い
AAVベクター	筋肉での高い遺伝子導入効率 免疫原性が低い	組み込み可能な遺伝子に制限あり (< 5 kbp) 調製が煩雑
単純ヘルペスウイルスベクター	遺伝子導入効率が高い 全長ジストロフィンcDNAの組み込みが可能	ウイルス毒性、免疫反応 遺伝子発現期間が短い
プラスミドDNA	非感染性 安全性が高く、調製が簡便 利用可能な遺伝子サイズに制限がない	通常、遺伝子発現効率が低い

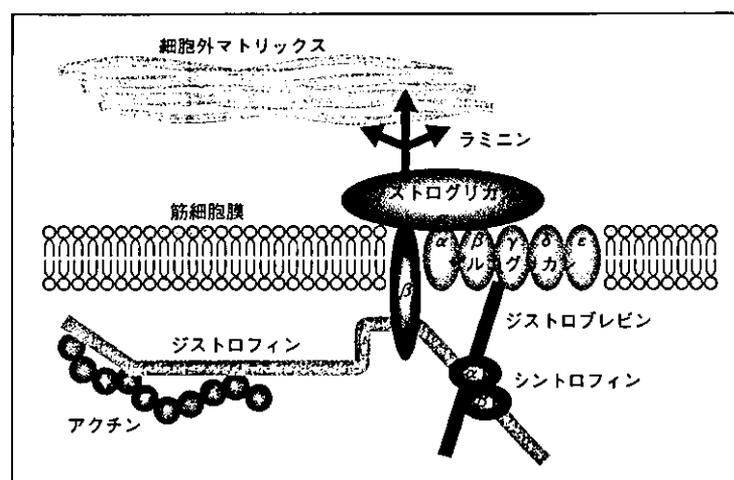


図1 ジストロフィンおよびジストロフィン結合糖タンパク質群の模式図

ジストロフィンはN末端側でアクチンと、C末端側でジストロフィン結合糖タンパク質群と結合する。ジストロフィン結合糖タンパク質群はラミニンを介し、細胞外マトリックスと結合する。

らず、筋肉増強剤の投与または呼吸補助などが行われているのみである。1980年代後半にKunkelら<sup>2)</sup>によりDMDの原因遺伝子が解明され、その遺伝子産物がジストロフィンと命名された。ジストロフィンは260万塩基対にわたる遺伝子にコードされる分子量427,000のタンパク質であり、形質膜直下に局在してN末端でアクチンと結合し、一方C末端でジストロフィン結合タンパク質群と複合体を形成することで細胞外マトリックスとも結合し(図1)、細胞構造の保守ならびにカルシウム濃度の調節などの機能を担う。

ジストロフィンはロッドドメインだけでも約120 nmに及ぶ巨大な細胞内タンパク質であることから、ジストロフィンをタンパク質の形で投与することは困難である。その一方で、原因遺伝子が解明された

ことから、遺伝子治療、すなわち正常なジストロフィン遺伝子の導入による治療が早くから提唱されてきた。筋肉への遺伝子導入が容易であることもあり、すでに欧米では筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の第I相臨床試験が開始されている。しかしながら、ジストロフィン遺伝子導入によるQOL改善には依然として解決すべき問題が残されている。なかでも遺伝子デリバリーの問題が重要であり、膨大な数のジストロフィン欠損筋肉細胞に、ジストロフィン遺伝子を運ぶデリバリーシステムの開発が不可欠である。本稿では、非ウイルスベクターによる筋ジストロフィー遺伝子治療に関して、筋肉細胞を対象とした最近の遺伝子デリバリー戦略を紹介する。

表2 筋肉への遺伝子導入が検討される疾患と要求される遺伝子発現特性

全身	血友病/血液凝固因子	血中タンパク質濃度プロファイル (総遺伝子発現量, 期間)
投与(筋肉)局所 細胞内	閉塞性動脈硬化症/血管内皮増殖因子, 肝細胞増殖因子 Duchenne型筋ジストロフィー/ジストロフィン	投与部位近傍でのタンパク質濃度 ジストロフィン陽性細胞数 遺伝子発現期間

## ●非ウイルスベクターによる筋肉への遺伝子導入

1990年に、プラスミドDNA溶液を筋肉注射することで遺伝子発現が得られることが示されてから<sup>3)</sup>, 筋肉は外来遺伝子の発現が容易な組織として認知されてきた。筋芽細胞が融合して生じる筋線維は分裂後の細胞であることから, *in vivo* 遺伝子導入においては非増殖細胞にも導入可能なプラスミドDNA, アデノウイルスベクター, AAVベクターなどが用いられており(表1), いずれの場合にも注入部位近傍での遺伝子発現が報告されている。また, 筋肉細胞は寿命が長いので, アデノウイルスベクターなど特に免疫原性の高いベクターを使わない限り, 遺伝子発現期間は長い。*in vitro* ではほとんど遺伝子発現が得られないプラスミドDNA単独を筋肉注射した場合に発現が得られるメカニズムの詳細は不明である。注入圧によりプラスミドDNAが細胞内に非特異的にデリバリーされる, DNAを認識するレセプターにより特異的に取り込まれる, など諸説が提唱されている。当初, プラスミドDNAの局所注入による遺伝子発現は, 筋肉組織特有の現象であるとされたが, その後, 肝臓, 腎臓, 皮膚, 脳, 癌など, 検討されたすべての部位で発現が確認されていることから, 普遍的な現象と思われる<sup>4)</sup>。

筋肉は発達した結合組織・細胞外マトリックスを有することから, 注射された物質の組織中移動・拡散は制限される。筋肉組織中での化合物の拡散速度は, 分子量の増加に伴い減少することが報告されている<sup>5)</sup>。したがって, 巨大分子であるプラスミドDNAの筋肉中での分布は極度に限られ, 結果とし

て遺伝子発現細胞が投与部位周辺に局在するものと考えられる。ジストロフィンを欠損する筋肉組織では, 筋肉細胞の壊死-再生により結合組織が増大し, その結果遺伝子発現細胞の分布がさらに制限されるなどの報告がある<sup>6)</sup>。

## ●筋ジストロフィー遺伝子治療に要求される遺伝子発現特性

筋肉は, 全身の約40%の体積を占めること, 体外からのアクセスが容易であり注射による薬物投与部位として長年の歴史があること, プラスミドDNAの筋肉注射により遺伝子発現が得られることなどから, 筋疾患を対象とした治療に限らず遺伝子導入によるタンパク質生産工場としての利用も検討されている。その一例として, 血液凝固第Ⅸ因子遺伝子を用いた血友病Bに対する臨床試験においては, 本来の発現臓器である肝臓ではなく筋肉への遺伝子導入が検討されている<sup>7)</sup>。また, 閉塞性動脈硬化症など虚血性疾患に対して, 肝細胞増殖因子をコードするプラスミドDNAを病変部位に筋肉注射することで血流動態が改善されている。これら全身あるいは局所作用を期待した分泌タンパク質の遺伝子導入では, 産生されたタンパク質の体内動態が治療効果を決定すると考えられる(表2)。

これに対し, 細胞内タンパク質であるジストロフィンでは, 分泌タンパク質とは異なった遺伝子導入・発現特性が要求される。ジストロフィンは恒常的に必要であることから, 発現期間は長いことが望ましい。また, トランスジェニックマウスでの検討から, 筋肉組織の機能回復には, ジストロフィンタンパク質の総発現量よりも発現細胞数の重要性が示