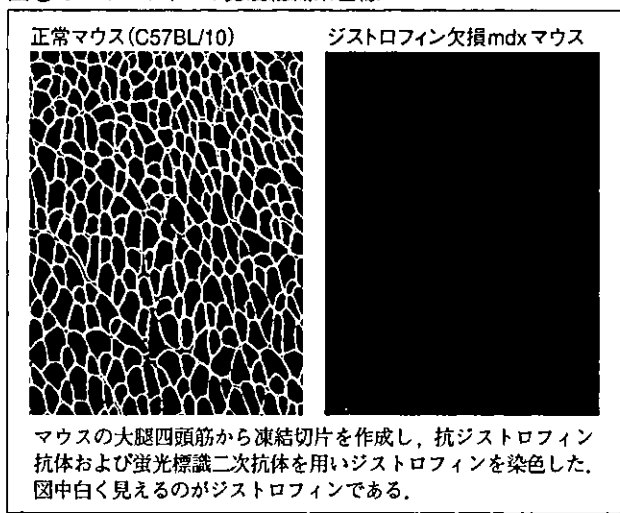
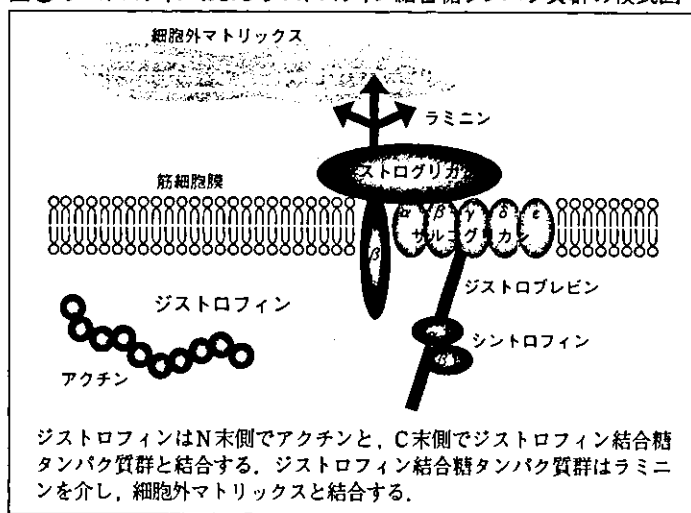


図① ジストロフィンの免疫組織染色像



図② 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



す。ジストロフィンはN末でアクチンと結合し、一方C末でジストロフィン結合糖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②)、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。

筋肉細胞は外来遺伝子の発現が比較的容易な細胞であり、プラスミドDNA(pDNA)単独(naked pDNA)に代表される非ウイルスベクターあるいは各種ウイルスベクターの投与により遺伝子発現が得られる。また、筋肉細胞は寿命が長いこと、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は長期間持続する傾向にある。このような特徴を有する筋肉細胞での遺伝子発現が対象となることから、DMD遺伝子治療の可能性は高いと考えられる。しかしながら、ベクター投与により得られる遺伝子発現特性と、治療に必要とされる発現特性とは大きく乖離している。表①に、遺伝子導入により産

生されるタンパク質の局在と、要求される遺伝子導入・発現条件を整理した²⁾。産生されるタンパク質が血漿中、すなわち細胞外スペースで機能を発揮する場合には、遺伝子導入の対象細胞は厳密でない。血液凝固第Ⅸ因子遺伝子を用いた血友病Bに対する遺伝子治療の臨床試験においても、本来の発現臓器である肝臓ではなく筋肉での遺伝子発現で治療効果が認められている³⁾。また、発現期間・効率性が重要ではあるものの、遺伝子導入細胞数はそれほど重要ではない。これに対

し、ジストロフィンのように産生されるタンパク質が細胞内に局在する場合には当然ながら遺伝子導入の標的は特定の細胞に限られる。さらに、筋ジストロフィーのように細胞レベルでの機能回復が必要とされる場合にはできるだけ多くの細胞への遺伝子導入が要求される。

筋肉組織は体重の40%もの量を占め、DMDにおいては全身の筋肉細胞でジストロフィンが欠損していることから遺伝子導入の対象となる細胞数は膨大であり、全身に広がる多数の筋肉細胞への遺伝子導入は非常に困難であると考えられ

表① 遺伝子産物の局在性と必要とされる遺伝子発現特性

	必要とされる遺伝子発現	
	血漿中(細胞外)	細胞内
遺伝子導入の対象細胞	厳密でない (筋肉細胞等での代用可)	標的細胞に限定される
遺伝子発現細胞数	重要度は低い (発現量が重要)	多いことが望ましい (細胞単位での機能回復)
遺伝子発現効率・発現期間 (遺伝子発現量)	疾患に依存 (高い効率、長い期間が望ましい場合が多い)	

る。しかし、四肢筋肉ならびに呼吸機能に重要な横隔膜の機能維持・回復が可能となるだけでも、DMD 患児の QOL 改善、さらには寿命の延長に繋がるものと考えられる。従って、DMD 遺伝子治療においては、これら筋肉組織のできるだけ多くの細胞への遺伝子導入を可能にする導入技術・ベクターの開発が必須である。遺伝子導入には対象細胞への遺伝子デリバリーが不可欠である。ここでは、ジストロフィン遺伝子を用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療について、特に筋肉細胞への遺伝子デリバリーに焦点を当てて概説する。

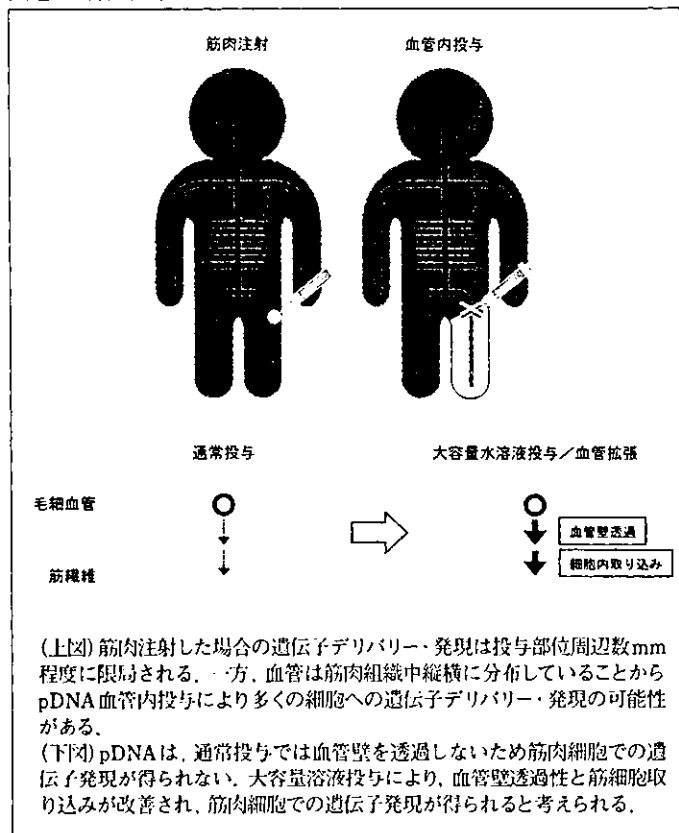
1990 年に Wolff ら¹⁾ が筋肉組織への naked pDNA の局所注射による遺伝子発現を報告して以来、各種ベクターの筋肉注射による遺伝子導入が試みられている。これまでに、様々なベクターの利用が検討されており、多くの場合投与部位近傍での遺伝子発現が報告されている。1999 年 9 月には、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた肢体型筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の臨床試験がスタートした。残念ながら、この臨床試験は現在中断中であり、こうした治療法の有効性は現時点では明らかでない。しかしながら、投与方法として筋肉注射が用いられていることから、十分な治療効果は期待できないものと推察される。これは、局所注射された遺伝子の分布ならびに発現は投与部位から数 mm 程度であることが報告されており²⁾、ごく一部の筋肉細

胞への遺伝子補充では治療上の意味がないからである。Phelps ら³⁾ は mdx マウスにジストロフィン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成し、筋肉組織の機能にはジストロフィンの発現レベルよりも発現の均一性、つまり発現細胞数が重要であることを報告している。

横隔膜を標的とした遺伝子導入も検討されているが⁴⁾、横隔膜は非常に薄く、また骨格筋と比べて解剖学的に投与が困難である。この場合にも、直接遺伝子を注射により投与する方法が試みられているが、組織への傷害性ならびに限局された遺伝子発現など骨格筋への遺伝子導入と同様の問題点があると考えられる。

できるだけ多くの細胞に遺伝子を送りこむためには、組織への局所投与ではなく、血流を介したデリバリーが有効と考えられる (図 3)。当初、血液中には多

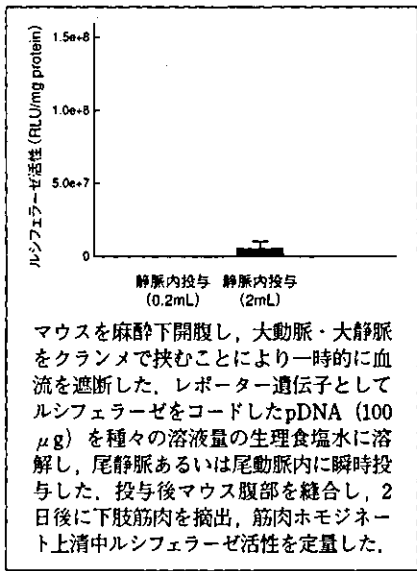
図 3 血管内投与による遺伝子デリバリー



量の DNA 分解酵素が存在するため、pDNA を循環血中に投与する場合には分解を抑制する何らかのベクターが必須であるとされ、正電荷リポソーム・高分子が開発された。しかしながら、pDNA/正電荷ベクター複合体はそのサイズが 100nm 以上である場合が多く、血管内投与後の遺伝子発現は血管内皮細胞にほぼ限定される⁵⁾。

一方、門脈内投与による肝細胞への遺伝子導入に関する検討から、条件によってはベクターは必要でなく naked pDNA のみで遺伝子発現が得られることが示された⁶⁾。発現に至る詳細なメカニズムに

図4 naked pDNA血管内投与後の下肢筋肉での遺伝子発現



については説明を待たなければならないが、大容量の高張マンニトール溶液投与により局所での浸透圧ならびに静水圧が上昇し、pDNAが血管壁を透過して肝細胞内へ移行するものと推察されている。こうした圧力による遺伝子導入は、その後マウス個体への大容量溶液の尾静脈内投与に適用され、肝臓をはじめとする種々臓器への遺伝子導入が可能であることが示された¹⁰⁾。肝臓への遺伝子導入においては臓器全体で約40%もの細胞への遺伝子導入が報告されている。

同様のアプローチを筋肉組織に適用することにより、多くの筋肉細胞への遺伝子導入が可能と考えられる(図5)。筋肉の毛細血管は、肝臓や腎臓などの場合と異なり連続内皮で構成されている。従って、通常の場合では分子量5000程度以上の物質は透過できない。pDNAは分子量400万あるいはそれ以上の巨大分子

であることから、筋肉細胞への遺伝子導入においてはまず血管壁の透過が障壁と考えられる。大容量溶液の投与による下肢筋肉への遺伝子デリバリー・導入を目的としてnaked pDNAを投与する場合、局所での静水圧を上昇させるためには一時的に血管系を閉鎖することが必要である。われわれは、マウスを開腹し、大動脈および大静脈を一時的にクランメで遮断することにより血流を一時的に停止し、尾部血管内にnaked pDNAを投与することによる遺伝子導入を試みた。

静脈内に通常量(200 μl)の溶液でnaked pDNA(モデル遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子をコードしたpDNA)を投与した場合には筋肉での遺伝子発現は殆ど認められなかったのに対し、大容量(2ml)の溶液量を投与した場合には有意な遺伝子発現が認められた(図4)。特に動脈内に投与した場合には、静脈内投与と比べて約25倍高い(1~10×10⁶ RLU/mg protein)遺伝子発現が認められた。投与時の条件を種々検討した結果、溶液量とpDNAが多いこと、また注入速度が速いことが高い遺伝子発現に結びつくことが示された。一方、血流を遮断する時間に関しては15秒で十分であり、それ以上長く(5~10分)してもさらなる発現の上昇は認められなかった。従って、瞬間的に血管内圧が上昇することがpDNAの血管壁透過ならびに筋細胞取り込みを促進しているものと考えられる。しかしながら、血管拡張作用のあるヒスタミンを前処理した場合にはさらに10倍程度遺伝子発現が上昇したことから、依然として血管壁透過がpDNAの筋肉細

胞へのデリバリーにおいて障壁であることも示唆された。mdxマウスにジストロフィンcDNAを組み込んだpDNAを投与した結果、下肢筋肉中多くの細胞でのジストロフィン発現が得られた。

進行性横隔膜筋肉壊死はDMD患児の呼吸不全の原因となる。従って、横隔膜はDMD遺伝子治療の重要な標的組織である。しかしながら、注射による直接投与は解剖学的・構造的に困難であること、また注射では限局した遺伝子発現しか得られないことから、効率的な遺伝子デリバリー技術の開発が必要と考えられる。下肢筋肉に対して用いたアプローチをそのまま横隔膜に適用することには手技的な問題点があり、また肝臓などへの高い遺伝子導入の危険性が考えられる。そこで、血管内にpDNAを投与した後に横隔膜組織でのpDNAの滞留時間を延長することにより遺伝子発現の改善を試みた¹¹⁾。

マウスに対し、ルシフェラーゼをコードするnaked pDNAを尾静脈内投与直後に横隔膜直下の大静脈をクランメで遮断し、一定時間の後に血流を再開した。横隔膜ならびに種々臓器中遺伝子発現を測定したところ、横隔膜での発現が最も高く(5×10⁶ RLU/mg protein)、肝臓など主要臓器の発現レベルは100分の1程度かそれ以下であった。横隔膜での遺伝子発現は6ヶ月後においてもピーク時(投与3日目)の約10分の1程度認められ、長時間持続することが示された。

*mdx*マウスに対しジストロフィンcDNAをコードしたpDNAを投与したところ、横隔膜の約40%の筋肉細胞においてジストロフィンが検出された。筋肉細胞が壊死-再生を繰り返すと中心核を有する細胞が増加するため、それを検出することで筋肉細胞の機能が評価可能である。実際、正常マウスでは中心核を有する横隔膜細胞は1.2%であったのに対し、*mdx*マウスではその値は約22%であった。ジストロフィン遺伝子導入された*mdx*マウスでは4%に減少した。さらに、細胞膜機能を色素evans blueの浸潤により評価したところ、ジストロフィン遺伝子導入*mdx*マウスの横隔膜細胞では色素浸潤細胞数が大きく減少し、ジストロフィンの導入により筋細胞膜が安定化されていることが示された。

ジストロフィンは、現在知られている中で最も長い2,300 kb以上の遺伝子にコードされており、cDNAも14 kbpと非常に大きい。naked pDNAや正電荷ベクター複合体などの非ウイルスベクターは、用いる遺伝子のサイズに制限はなく、比較的短い遺伝子しか封入できないアデノ随伴ウイルスベクターなどに対して有利であるとされる。しかしながら、遺伝

子導入においては核酸の長さに比例して核内への輸送効率が低下することが報告されており¹²⁾、遺伝子が大きいことが効率的な遺伝子導入の障害になることが考えられる。一方、ジストロフィン中には複数回の繰り返し構造が存在し、Becker型筋ジストロフィー患者でみられるように一部構造の欠失したジストロフィンが部分的に機能を有することが知られる。そこで、ミニジストロフィンやマイクロジストロフィンなどが設計され^{13) 14) 15)}、その機能についての検討が進められている。こうした短いジストロフィンは完全長のジストロフィンと比較した場合若干の機能低下が報告されているが、今後、遺伝子導入効率とその機能のバランスを考慮した議論をすべきであると考ええる。

遺伝子治療の可能性が示されてから、単一遺伝子の欠損に起因する遺伝子疾患はその欠損タンパク質をコードする遺伝子の導入により根本的な疾患治療が可能であると考えられてきた。遺伝子欠損の代表的な疾患であるDMDについても早くから遺伝子治療に関する検討が行われてきたが、遺伝子デリバリー上の障壁¹⁶⁾によりなかなか思うようには標的細胞に送達できないのが現状である。筋肉への

ジストロフィン遺伝子の導入がDMDに対する有効な治療法となるためには、デリバリー技術に関してさらなる改善が必要であるとともに、プロモータの選択やジストロフィン遺伝子の改良などpDNA構造の最適化なども検討する必要があると考える。

参考文献

- 1) Hoffman, E. P., Brown, R. H. Jr. et al.: Cell 51, 919-928, 1987.
- 2) Nishikawa, M. & Hashida, M.: Biol. Pharm. Bull. 25, 275-283, 2002.
- 3) Kay, M. A., Manno, C. S. et al.: Nat. Genet. 24, 257-261, 2000.
- 4) Wolff, J. A., Malone, R. W. et al.: Science 247, 1465-1468, 1990.
- 5) O'Hara, A. J., Howell, J. M. et al.: Muscle Nerve 24, 488-495, 2001.
- 6) Phelps, S. F., Hauser, M. A. et al.: Hum. Mol. Genet. 4, 1251-1258, 1995.
- 7) Davis, H. L. & Jasmin, B. J.: FEBS Lett. 333, 146-150, 1993.
- 8) Liu, Y., Mounkes, L. C. et al.: Nat. Biotechnol. 15, 167-173, 1997.
- 9) Budker, V., Zhang, G. et al.: Gene Ther. 3, 593-598, 1996.
- 10) Liu, F., Song, Y. et al.: Gene Ther. 6, 1258-1266, 1999.
- 11) Liu, F., Nishikawa, M. et al.: Mol. Ther. 4, 45-51, 2001.
- 12) Ludtke, J. J., Zhang, G. et al.: J. Cell Sci. 112, 2033-2041, 1999.
- 13) Ragot, T., Vincent, N. et al.: Nature 361, 647-650, 1993.
- 14) Yuasa, K., Miyagoe, Y. et al.: FEBS Lett. 425, 329-336, 1998.
- 15) Harper, S. Q., Hauser, M. A. et al.: Nat. Med. 8, 253-261, 2002.
- 16) Nishikawa, M. & Huang, L.: Hum. Gene Ther. 12, 861-870, 2001.

2. 遺伝子を用いた再生医療

3) 筋ジストロフィー治療

西川元也・橋田 充

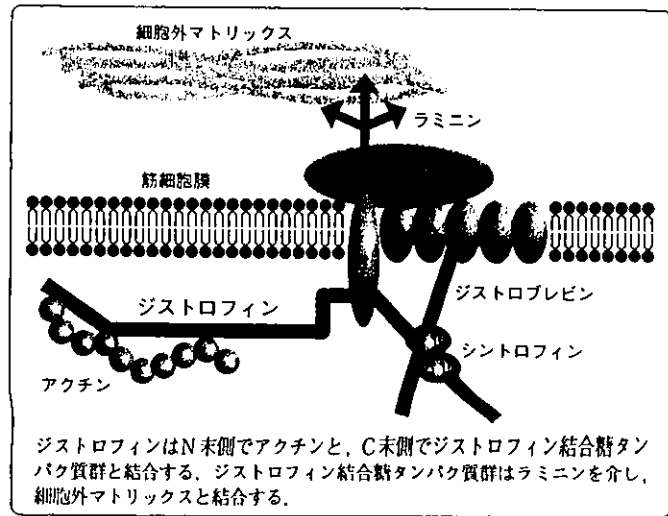
Duchenne型筋ジストロフィーは、筋細胞膜を裏打ちする細胞内タンパク質・ジストロフィンの欠損により生じる遺伝子疾患である。単一遺伝子欠損により生じるため早くから遺伝子治療が期待されてきたが、その実現には程遠い。筋ジストロフィーを対象とする遺伝子治療においては、遺伝子が導入される筋肉細胞の数が有効性を規定する重要な要因である。遺伝子導入効率が高いベクターの開発に加え、できるだけ多くの筋肉細胞に遺伝子を導入可能な方法論が開発されてはじめて筋ジストロフィー遺伝子治療実現に繋がるものと考えられる。

はじめに

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る。最も高頻度に発生するDuchenne型筋ジストロフィー (duchenne muscular dystrophy: 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らのグループによりDMDの原因遺伝子

が解明され、遺伝子産物がジストロフィンと命名された。ジストロフィンは分子量427kDaのタンパク質であり、形質膜直下に局在してN末でアクチンと結合し、一方、C末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

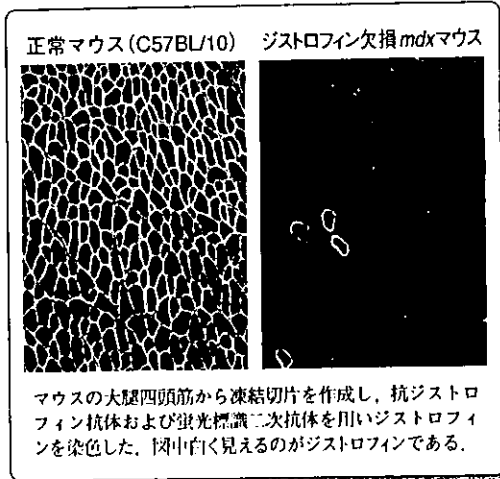
図① ジストロフィンおよびジストロフィン結合糖タンパク質群の模式図



Key Words

遺伝子治療, 筋ジストロフィー, 非ウイルスベクター, ジストロフィン, 血管壁透過, プラスミドDNA, 骨格筋, 横隔膜, 組織分布.

図② ジストロフィンの免疫組織染色像



ならびにカルシウム濃度の調節などの機能を担う。DMD以外の筋ジストロフィーについても原因遺伝子の解明が続いており、肢体型筋ジストロフィーのようにジストロフィン結合タンパク質の構成成分の欠損に起因する筋ジストロフィーなどが明らかにされてきている。

遺伝子産物であるジストロフィンが、ロッドドメインだけでも約120nmに及ぶ巨大な細胞内タンパク質であることからタンパク質補充による治療は困難であり、また原因遺伝子が解明されたこともあって、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DMDの夢の治療法として期待されてきた。しかしながら、その実現には多くの克服すべき障壁が存在する。図②に、正常マウス (C57BL/10) とジストロフィン欠損マウス (mdx) の筋肉組織のジストロフィン

染色像を示す。ここに示されるように、全ての正常筋繊維にはジストロフィンが検出されるが、欠損した場合にはほとんどの細胞で陰性である。これら全身に広がるジストロフィン欠損筋肉細胞が遺伝子導入の対象であることから、筋ジストロフィーの遺伝子治療に際してはベクターの開発だけでなく、投与法の工夫も必須となる。また対象とする筋肉組織についても四肢の骨格筋を対象とした基礎的検討が多いが、DMD患児のQOL改善、さらには寿命の延長という治療目的を実現するためには、これに加えて心筋ならびに横隔膜への遺伝子導入法の開発が要求される。ここでは、遺伝子補充あるいは変異遺伝子を標的とした試みを紹介するが、DMDに対してはこのほかに筋芽細胞²⁾、あるいはより増殖活性の高い筋肉由来幹性細胞³⁾などを投与する治療法も検討されている。

I. 遺伝子導入対象組織としての筋肉

1990年にWolffら⁴⁾が筋肉組織へのプラスミドDNA (pDNA) 単独 (naked pDNA) の局所注射による遺伝子発現を報告して以来、筋肉は外来遺伝子の発現が比較的容易な組織であると認知されてきた。表①に、現在までに開発された各種ベクターの特徴を整理する。筋芽細胞が融合して生じる筋繊維は分裂後の細胞であることから、*in vivo* 遺伝子導入に関しては非増殖細胞にも導入可能な naked pDNAに代表される非ウイルスベクター、あるいはアデノウイルス (Ad) ベクター、アデノ

表① 代表的な遺伝子導入ベクターの特徴

	レトロウイルスベクター	アデノウイルスベクター	AAVベクター	レンチウイルスベクター	naked pDNA	pDNA/正電荷非ウイルスベクター複合体
組み込み可能な遺伝子サイズ	7~7.5kb	最大35kb	4.7~4.9kb	7~7.5kb	無制限	無制限
非分裂細胞への取り込み	なし	あり	あり	あり	あり	あり
染色体への挿入・変異の可能性	あり	なし	ほとんどなし	あり	なし	なし
大量作成の方法	簡便	簡便	複雑	複雑	簡便	簡便

随伴ウイルス (AAV) ベクターなどが用いられる。また、筋肉細胞は寿命が長いこと、Ad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、遺伝子発現は長期間持続する傾向にある。in vitro では遺伝子発現を示さないnaked pDNAの筋肉注射により比較的効率的な遺伝子発現に至るメカニズムについては、1) 注入圧によりpDNAが細胞内に送り込まれる、2) DNAを認識するレセプターを介して取り込まれる、など諸説が報告されている。naked pDNAの局所注入による遺伝子発現は、筋肉組織に限らず、肝臓、腎臓、皮膚、脳、痛などにおいても認められることから、筋肉特異的なメカニズムではなく、より普遍的な現象と考えられる⁶⁾。

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により投与された化合物の組織中移動は制限を受ける。Naraら⁶⁾は、少なくとも分子量18の水分子と5000のイヌリン間においては、筋肉注射後の組織中拡散速度は化合物の分子サイズの増大に伴い減少することを報告している。従って、分子量数百万のpDNAあるいは粒子径数十〜数百ナノメートルのウイルスベクターを筋肉組織に注射した場合には、ベクターの組織内拡散・分布は大きく制限されることが考えられ、これにより遺伝子発現細胞の分布が制限される⁷⁾。

II. DMD治療に必要な遺伝子発現プロフィール

表②に、治療上必要とされる遺伝子産物 (タンパク質) の局在性と、それぞれの場合に必要なと考えられる遺伝子導入・発現条件を整理した⁸⁾。

表② 治療上必要とされる遺伝子発現特性

	必要とされる遺伝子産物の局在	
	血漿中 (細胞外)	細胞内
遺伝子導入の対象細胞	厳密でない (他組織利用可能)	標的細胞に限定される
遺伝子発現細胞数	重要度は低い (発現量が重要)	多いことが望ましい (細胞単位での機能回復)
遺伝子発現効率・発現期間 (遺伝子発現量)	疾患に依存 (高い効率、長い期間が望ましい場合が多い)	

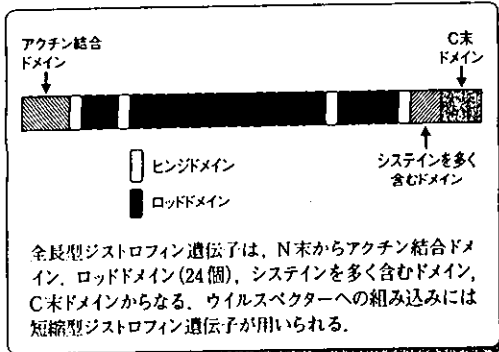
筋ジストロフィーに対する遺伝子治療では、ジストロフィンをはじめ対象となるタンパク質は恒常的に必要であることから、遺伝子発現の期間・持続は長いことが望ましい。また、Phelpsら⁸⁾は、mdxマウスにジストロフィン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて検討した結果、発現の均一性、つまり発現細胞数が重要であることを報告している。一方、発現レベル (ジストロフィンタンパク質量) に関しては、正常値の20%程度でも筋肉組織はほぼ完全な機能を有することを示している。従って、ジストロフィン遺伝子導入によるDMD治療に際しては、できるだけ多くの筋細胞への遺伝子デリバリー・発現が必要と考えられる。

III. ウイルスベクターによるジストロフィン遺伝子導入

これまでに筋ジストロフィーを対象とした遺伝子治療の検討においては、主にAdベクターおよびAAVベクターが用いられている。ウイルスベクターの場合、組み込み可能な遺伝子サイズに制限があり、しばしば全長のジストロフィン遺伝子 (約14kb) を組み込むことは不可能である。従って、ウイルスベクターによるジストロフィン遺伝子導入の検討においては、多くの場合ベクター開発に先立ちジストロフィン遺伝子の短縮化が要求される。

図③に、DMD遺伝子治療に用いられるジストロフィン遺伝子構造の模式図を示す。この遺伝子から産生されるジストロフィンは、N末からアクチン結合ドメイン、24個のロッドドメイン、システインを多く含むドメイン、C末ドメインからなる。ジストロフィン遺伝子に変異があるものの、不完全で短いジストロフィンタンパク質が作られるBecker型MD (BMD) では臨床症状はDMDと比較して軽い。臨床的重症度は、変異により欠失した部位がジストロフィン機能に

図③ ジストロフィン遺伝子の模式図



とってどれくらい重要であるかに依存するが、中央のロッドドメインを欠失する場合は比較的軽症である。こうした観察をもとに、ウイルスベクターに組み込み可能なサイズであり、かつ十分な機能を持つタンパク質を発現する短縮型ジストロフィン遺伝子が検討されてきた^{9)~11)}。Chamberlainら¹²⁾は、種々構造の異なるジストロフィンタンパク質を発現するcDNAを用いた検討を通じ、AAVベクター、レンチウイルスベクターに適した一部欠損型ジストロフィンの解析を行っている。

Adベクターは、非分裂細胞にも感染可能であり、また組み込み可能な遺伝子サイズも非常に大きいことから(表①)、ジストロフィンを対象とする遺伝子導入において有望なベクターである。第三世代のAdベクター(別名gutted Ad)は全てのウイルス由来の遺伝子を持たないため、全長型ジストロフィン遺伝子を挿入可能である¹³⁾。しかしながら、Adベクターは、染色体にほとんど組み込まれないこと、免疫反応を惹起しやすいなど、DMD治療に適さない特徴も挙げられる。

HIVウイルスをもとにしたレンチウイルスベクターは、組み込み可能なサイズが約9kbであるためジストロフィンの短縮化が必須であるが、ゲノムに組み込まれるため長期間の発現が期待される。さらに組み込みサイズが小さい(約5kb) AAVベクターでは、いかに短く、かつ機能を保持したジストロフィン遺伝子を構築するかが鍵となる。非

分裂細胞へも導入可能であり、細胞毒性や免疫反応などが低いなどの利点を有する。

IV. 非ウイルスベクターによるジストロフィン遺伝子導入

前述の通り、筋肉は外来遺伝子の発現が容易な組織であり、ジストロフィンcDNAをコードするnaked pDNAをmdxマウスの骨格筋に注入することでジストロフィンタンパク質の発現が得られている¹⁴⁾。血管内投与を前提とした*in vivo*遺伝子導入においては、pDNAの安定性向上、細胞との相互作用の増大、細胞特異的ターゲティングなどを目的に、pDNAと正電荷リポソーム・高分子との複合体が用いられる場合が多い。しかしながら、局所注射の場合には、複合体化により遺伝子発現が阻害される場合が多く、また遺伝子発現細胞の分布もより制限を受ける傾向にある。骨格筋に注射されたnaked pDNAによる遺伝子発現は、*in vivo*エレクトロポレーションにより最大で1,000倍程度まで大幅に増大する¹⁵⁾。pDNA水溶液を注入する方法は、調製が容易であり、投与も簡便で、免疫反応も低いなどの利点を有する反面、エレクトロポレーションなどを利用して遺伝子発現を改善させた場合においても、投与されたpDNAが投与部位近傍にしか分布せず、従って遺伝子導入される細胞も限局されることからDMD治療には適さないと考えられる。

V. デリバリー法の改善

DMD遺伝子治療における最重要項目である。できるだけ多くの細胞でジストロフィン遺伝子を発現させるためには、遺伝子をできるだけ多くの細胞にデリバリーすることが必要となる。そのためには、組織への局所注射ではなく、血流を介したデリバリーが有効と考えられる(図④)。当初、血液中には多量のDNA分解酵素が存在するため、

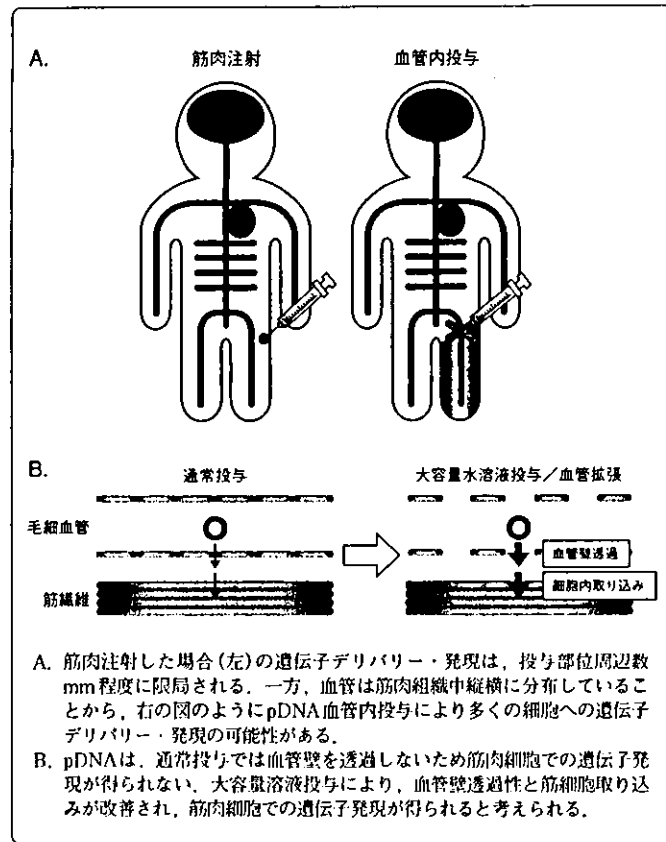
pDNAを循環血中に投与する場合には分解を抑制する何らかのベクターが必須であるとされ、正電荷リポソーム・高分子が開発された。しかしながら、pDNA/正電荷ベクター複合体はそのサイズが100nm以上である場合が多く、血管内投与後の遺伝子発現は血管内皮細胞にほぼ限定される。

一方、門脈内投与による肝細胞への遺伝子導入に関する検討から、条件によってはベクターは必要でなくnaked pDNAのみで遺伝子発現が得られることが示された¹⁶⁾。こうした圧力による遺伝子導入は、その後マウス個体への大容量溶液の尾静脈内投与に適用され、肝臓をはじめとする種々臓器への遺伝子導入が可能であることが示された^{17) 18)}。

同様のアプローチを筋肉組織に適用することにより、多くの筋肉細胞への遺伝子導入が可能と考え

られる(図4)。筋肉の毛細血管は、肝臓や腎臓などの場合と異なり連続内皮で構成されている。従って、通常の条件下では分子量5,000程度以上の物質は血管壁を透過しない。pDNAは分子量400万あるいはそれ以上の巨大分子であることから、筋肉細胞への遺伝子導入においてはまず血管壁の透過が障壁と考えられる。大容量溶液の投与による下肢筋肉への遺伝子デリバリー・導入を目的としてnaked pDNAを投与する場合、局所での静水压を上昇させるためには、一時的に血管系を閉鎖することが必要である。そこで、マウスを開腹し、大動脈および大静脈を一時的にクランプで遮断することにより血流を一時的に停止し、尾部血管内にnaked pDNAを投与することによる遺伝子導入を試みた。

図4 血管内投与による遺伝子デリバリー



A. 筋肉注射した場合(左)の遺伝子デリバリー・発現は、投与部位周辺数mm程度に限局される。一方、血管は筋肉組織中縦横に分布していることから、右の図のようにpDNA血管内投与により多くの細胞への遺伝子デリバリー・発現の可能性がある。
B. pDNAは、通常投与では血管壁を透過しないため筋肉細胞での遺伝子発現が得られない。大容量溶液投与により、血管壁透過性と筋細胞取り込みが改善され、筋肉細胞での遺伝子発現が得られると考えられる。

静脈内に通常量(200 μ l)の溶液でnaked pDNA(モデル遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子をコードしたpDNA)を投与した場合には筋肉での遺伝子発現はほとんど認められなかったのに対し、大容量(2ml)の溶液量を投与した場合には有意な遺伝子発現が認められた(図5)。特に動脈内に投与した場合には、静脈内投与と比較して約25倍高い遺伝子発現が認められた。mdxマウスにジストロフィンcDNAを組み込んだpDNAを投与した結果、下肢筋肉中多くの細胞でのジストロフィン発現が得られた。

横隔膜を対象とした遺伝子導入に際して下肢筋肉に用いたアプローチをそのまま適用するには手技的な問題点があり、また肝臓などへの高い遺伝子導入の危険性が考えられる。そこで、血管内に



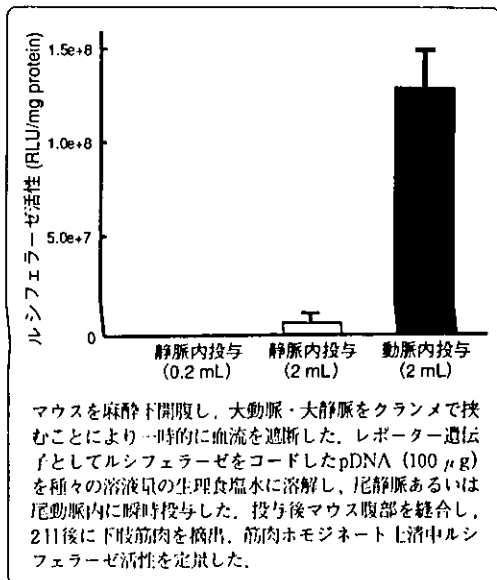
II章

再生医療とODS

pDNAを投与した後に横隔膜組織でのpDNAの滞留時間を延長することにより遺伝子発現の改善を試みた¹⁹⁾。マウスに対し、naked pDNAを尾静脈内投与直後に横隔膜直下の大静脈をクランメで遮断し、一定時間の後に血流を再開した。横隔膜ならびに種々臓器中遺伝子発現を測定したところ、横隔膜での発現が最も高く、肝臓など主要臓器の発現レベルは100分の1程度か、それ以下であった。mdxマウスに対しジストロフィンcDNAをコードしたpDNAを投与したところ、横隔膜の約40%の筋肉細胞においてジストロフィンが検出された。さらに、細胞膜機能を色素evans blueの浸潤により評価したところ、ジストロフィン遺伝子導入mdxマウスの横隔膜細胞では色素浸潤細胞数が大きく減少し、ジストロフィンの導入により筋細胞膜が安定化されていることが示された。

ここで取り上げた血管内にnaked pDNAを投与する方法は、多くの細胞への遺伝子デリバリーの可能性を秘めており、今後DMD遺伝子治療を有効な治療法とするためにはこうした技術の応用が不可欠であると考えられる。

図6 naked pDNA血管内投与後の下肢筋肉での遺伝子発現



VI. 読み枠の制御・点変異修復などに関するアプローチ

mRNAの段階で変異を含むexonをスキップさせることで短縮化ジストロフィンタンパク質の発現が可能と考えられる。アンチセンスDNAを用いたスプライシングの制御により、異常なexonをスキップしてジストロフィンタンパク質 (一部欠失) を発現させる試みが検討されている²⁰⁾。

一方、ジストロフィン遺伝子欠損の原因の5~15%は、遺伝子点変異などによりstop codonが出現するナンセンス変異によるものである。1999年にアミノ配糖体の一種であるgentamicinの投与によりstop codonを読み飛ばす (read through) ことが報告され²¹⁾、この結果をもとに米国でDMD患児に対する臨床試験が行われた。若干の筋細胞傷害軽減効果は認められたものの、現時点ではgentamicinによるジストロフィンタンパク質の発現は認められていない。

また、RNAとDNAのキメラオリゴヌクレオチド (キメラプラスト) は、ゲノムの単一ヌクレオチドを変更可能な技術であり、点変異が原因のDMDへの応用が期待される。Randoら²²⁾ は、mdxマウスにキメラプラストを筋肉注射することでジストロフィンタンパク質の発現を得ている。本手法の利点は一度修復されれば理論的には恒久的にジストロフィンを発現可能であることにある。Yoonらのグループ²³⁾ は、1本鎖DNAでも同様の効果があることを報告している。

おわりに

遺伝子治療の可能性が示されてから、単一遺伝子の欠損に起因する遺伝子疾患はその欠損タンパク質をコードする遺伝子の導入により根本的な疾患治療が可能であると考えられてきた。遺伝子欠損の代表的な疾患であるDMDについても早くか

ら遺伝子治療に関する検討が行われてきたが、遺伝子デリバリー上の障壁²⁴⁾によりなかなか思うようには標的細胞に送達できないのが現状である。ジストロフィン²⁵⁾は、現在知られている中で最も長い2,300kb以上の遺伝子にコードされており、cDNAも14kbと非常に大きい。遺伝子の細胞質から核内への輸送効率は核酸の長さに比例して低下することが報告されており²⁵⁾、遺伝子が大きいことが効率的な遺伝子導入の障害になることが考えられる。筋肉へのジストロフィン遺伝子の導入がDMDに対する有効な治療法となるためには、デリバリー技術に関してさらなる改善が必要であるとともに、プロモーターの選択やジストロフィン遺伝子の改良、pDNA構造の最適化なども検討する必要があると考える。

▶▶ 参考文献

- 1) Hoffman EP, Brown RH Jr, et al: Cell 51, 919-928, 1987.
- 2) Gussoni E, Pavlath GK, et al: Nature 356, 435-438, 1992.
- 3) Gussoni E, Soneoka Y, et al: Nature 401, 390-394, 1999.
- 4) Wolff JA, Malone RW, et al: Science 247, 1465-1468, 1990.
- 5) Nishikawa M & Hashida M: Biol Pharm Bull 25, 275-283, 2002.
- 6) Nara E, Masegi M, et al: Pharm Res 9, 161-168, 1992.
- 7) O'Hara AJ, Howell JM, et al: Muscle Nerve 24, 488-495, 2001.
- 8) Phelps SF, Hauser MA, et al: Hum Mol Genet 4, 1251-1258, 1995.
- 9) Yuasa K, Miyagoe Y, et al: FEBS Lett 425, 329-336, 1998.
- 10) Wang B, Li J, et al: Proc Natl Acad Sci USA 97, 13714-13719, 2000.
- 11) Harper SQ, Hauser MA, et al: Nat Med 8, 253-261, 2002.
- 12) Scott JM, Li S, et al: Neuromuscul Disord 12, S23-S29, 2002.
- 13) Kochanek S: Hum Gene Ther 10, 2451-2459, 1999.
- 14) Acsadi G, Dickson G, et al: Nature 352, 815-818, 1991.
- 15) Aihara H, Miyazaki J: Nat Biotechnol 16, 867-870, 1998.
- 16) Budker V, Zhang G, et al: Gene Ther 3, 593-598, 1996.
- 17) Liu F, Song Y, et al: Gene Ther 6, 1258-1266, 1999.
- 18) Kobayashi N, Kuramoto T, et al: J Pharmacol Exp Ther 297, 853-860, 2001.
- 19) Liu F, Nishikawa M, et al: Mol Ther 4, 45-51, 2001.
- 20) Barton-Davis ER, Cordier L, et al: J Clin Invest 104, 375-381, 1999.
- 21) Pramono ZA, Takeshima Y, et al: Biochem Biophys Res Commun 226, 445-449, 1996.
- 22) Rando TA, Disanik MH, et al: Proc Natl Acad Sci USA 97, 5363-5368, 2000.
- 23) Igoucheva O, Alexeev V, et al: Gene Ther 8, 391-399, 2001.
- 24) Nishikawa M & Huang L: Hum Gene Ther 12, 861-870, 2001.
- 25) Ludtke JJ, Zhang G, et al: J Cell Sci 112, 2033-2041, 1999.

西川元也 (にしかわまきや)

(京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野助教授)

- 1990年 京都大学薬学部卒業
- 1995年 京都大学大学院薬学研究科博士後期課程退学
京都大学薬学部助手
- 1997年 京都大学大学院薬学研究科助手
(大学院重点化に伴う配置転換)
- 1999年 米国Pittsburgh大学博士研究員
- 2002年 京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分
野助教授

siRNA・siRNA発現ベクター デリバリーシステム

西川元也¹・小林直樹・高倉喜信²

京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 助教授¹ 教授²

RNAiによる遺伝子発現抑制は、癌やエイズ、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。その実現には、標的細胞内に効率よく送達する技術の開発が必須であり、遺伝子やアンチセンスDNAを対象に検討されてきたデリバリー技術の適用が試みられている。これまでに、siRNAあるいはsiRNA発現ベクターを対象としてハイドロダイナミクス法や正電荷化合物との複合体化が試みられており、*in vivo*においてもRNAiが人為的に可能であることが示されている。



ハイドロダイナミクス法, プラスミドDNA,
核酸/正電荷化合物複合体, デリバリー, 肝臓,
細胞取り込み.

RNAiによる遺伝子発現抑制は、従来検討されてきた方法と比較して配列特異性ならびに発現抑制効果が非常に高いことから、基礎研究のツールとしてだけでなく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。実際、B型肝炎ウイルス感染やHIV感染に対する治療を目的とした基礎研究が世界中でスタートしている。しかしながら、RNAiによる治療には、21～23塩基対の二本鎖RNAであるsiRNA、あるいは細

胞内で転写によりsiRNAが得られるsiRNA発現ベクターを標的細胞に効率よく送達することが必須である。従って、siRNAあるいはsiRNA発現ベクターに対するデリバリーシステムの開発がRNAiによる治療法確立の鍵を握る。

通常、医薬品の多くは経口製剤として開発され、消化管から吸収された分子が作用発現部位に移行することで薬効を発揮する。しかしながら、輸送担体によって運ばれる場合を除き分子量500を超える化合物は消化管からの吸収性が悪い。RNAやDNAは、ヌクレオチドあたり分子量300程度であることから、比較的小

Makiya Nishikawa¹
Naoki Kobayashi
Yoshinobu Takakura²

Department of Biopharmaceutics and Drug
Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Kyoto University, Associate Professor¹,
Professor²

E-mail : makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp
: Delivery system for siRNA and siRNA-
expressing vector

さいsiRNAの場合でも分子量10000以上の高分子であり、経口吸収性は期待できない。siRNA発現ベクターの場合には分子量数百万にもなる巨大DNAである。また、注射により循環血液中に投与した場合においても作用発現の標的となる細胞質・核への移行は細胞膜により大幅に制限されるため、通常の投与方法では生体内でRNAi効果を得るのは非常に困難と考えられる。

一方、過去数十年にわたる *in vivo* 遺伝子治療あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチド (ODN) による遺伝子発現抑制に関する精力的な検討を通じ、膜透過に不利な特性を有するこれら高分子化合物を細胞内へデリバリーする方法が開発されてきた。このDNAデリバリーに関して培われた技術のなかには、siRNAあるいはsiRNA発現ベクターを利用した疾患治療戦略にも応用可能なものが含まれると考えられる。本稿では、siRNAあるいはsiRNA発現ベクターを生体に投与方法について整理したうえで、*in vivo* デリバリーによるRNAi効果についてわれわれのデータを含め概説する。

非ウイルスベクターとして汎用されるプラスミドDNAを利用した遺伝子導入において、数多くのベクター・投与方法が開発されてきた(表①)¹⁾。プラスミドDNA単独の投与方法に関する工夫として、組織内注射、注射とエレクトロポレーション・超音波照射などとの併用、遺伝子銃、ハイドロダイナミクス法と呼ば

表① 遺伝子導入用非ウイルス型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皮に限られる
	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

れる大容量溶液急速投与などが検討されており、それ以外は大きく分けて正電荷リポソーム/脂質あるいは正電荷高分子を用いる複合体化が挙げられる。なかでも、大容量のプラスミドDNA溶液(20gのマウスの場合、約2ml程度)を急速(5秒程度)に血管内に注入するハイドロダイナミクス法は、遺伝子発現効率が抜群に高く、肝臓を筆頭に種々の内臓での遺伝子発現が達成できる^{2) 3)}。また、プラスミドDNAを血管内に投与するため、より多くの細胞へのアクセスが実現され、組織内注射による方法とは対照的に多くの細胞へのデリバリーも可能である⁴⁾。肝臓への遺伝子導入においては臓器全体で約40%もの細胞への遺伝子導入が報告されている²⁾。有効なRNAi効果を得るためには、ターゲットとするタンパク質を合成するすべての細胞への導入が理想であり、そのデリバリー可能な細胞数がRNAi効果を決定する。従って、組織への局所注射は、非常に簡便な投与方法はあるものの、組織内拡散・分布が大きく制限されるためsiRNA・siRNA発現

ベクターの投与方法としては適さないと考えられる。

一方、アンチセンスODNを対象とした検討においても、主に培養細胞などへの導入に際しては正電荷リポソームや正電荷高分子、 dendriマーなど市販あるいは新規合成された導入用試薬が用いられている。しかし生体への投与に際しては、デリバリーシステムの利用ではなく、生体内での安定性改善を目的とした構造修飾がより一般的である。天然型のODNはホスホジエステル結合でありDNA分解酵素により容易に分解されるため、その結合をホスホロチオエート型に変更する方法が汎用される。アンチセンスODNの臨床試験を進める Isis Pharmaceuticals社ではさらにリボースの2'位のO原子にメトキシエチル基を導入することによって標的分子への結合性を高めている。siRNAに対しても、こうした構造修飾が検討されつつある⁵⁾。しかしながら、効率よく細胞内にデリバリーするためには遺伝子の場合同様の議論が必要となる。

表②に生体への投与時に重要と考えられる合成siRNAとsiRNA発現ベクターの特徴を示す。siRNAは活性本体であり、一方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。siRNAは構造修飾が可能であるが、それ自体が活性本体であること、一本鎖の場合には生物学的に不安定なRNA分子であること、さらに哺乳動物細胞においてはsiRNAの増幅機構が存在しないと考えられることなどから、siRNAによる抑制効果はせいぜい1週間程度と報告されている。一方、siRNA発現ベクターの場合には、ベクターがDNA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る。

細胞内移行の第一段階である生体膜透過は分子サイズに依存した過程であるが、siRNAとsiRNA発現ベクター間の違いは非常に大きく、分子量にして数百倍の開きがある。しかしながら、実際のデリバリーに際して分子のサイズがその効率に影響を及ぼすかについての詳細は

不明である。また、基本的には化学合成による調製が必要なsiRNAは高価であるのに対し、大腸菌で増やすことができるベクターは比較的安価であり大量調製が容易である。

*in vivo*でのsiRNAおよびsiRNA発現ベクターに関する最初の報告は、2002年7月にKayら⁶¹のグループによりなされた。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あるいはsiRNA発現ベクターによるRNAi効果を判定した。無関係な配列のsiRNA(21塩基対)を投与した場合にはルシフェラーゼ活性の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%の遺伝子発現抑制が得られている。また、同様の検討で合成siRNAの代わりにsiRNA発現ベクターを投与した場合には約93%の抑制効果が得られている。ここで、レポーター遺伝子をコードするプラスミドDNAの投与量は2 μ gであり、siRNAの場合は40 μ gが、一方siRNA発現ベクターの場合には10 μ gが

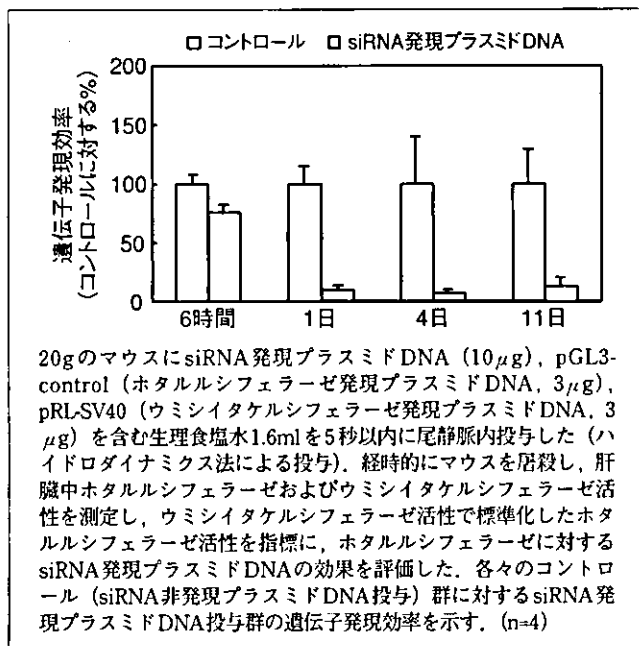
同時投与されている。分子量を考慮すると投与された分子数は圧倒的にsiRNAのほうが多く、少なくともこの検討においてはsiRNA発現ベクターの効果がより優れていると考察できる。また、ほぼ同時にMirusのグループ⁷¹もハイドロダイナミクス法による合成siRNAの効果をルシフェラーゼ活性を指標に検討し、10 μ gのターゲットプラスミドに対し、5 μ gの合成siRNA投与で1日後に肝臓をはじめ腎臓、脾臓、肺、膵臓において80~90%の発現抑制が得られることを示した。この検討では、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼをそれぞれコードしたプラスミドDNAを同時に投与し、両者の比を取ること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)。さらには、蛍光タンパク質の一種EGFP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 μ 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、すなわち恒常的なタンパク質の発現を抑制可能であることも示している。

われわれは、siRNA発現ベクターとターゲットmRNAとの量的・時間的關係を明らかにすることを目的にハイドロダイナミクス法を利用した基礎検討を進めている⁸¹。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⁸²を用い、ダブルルシフェラーゼアッセイ法により*in vivo*での検討を行った。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

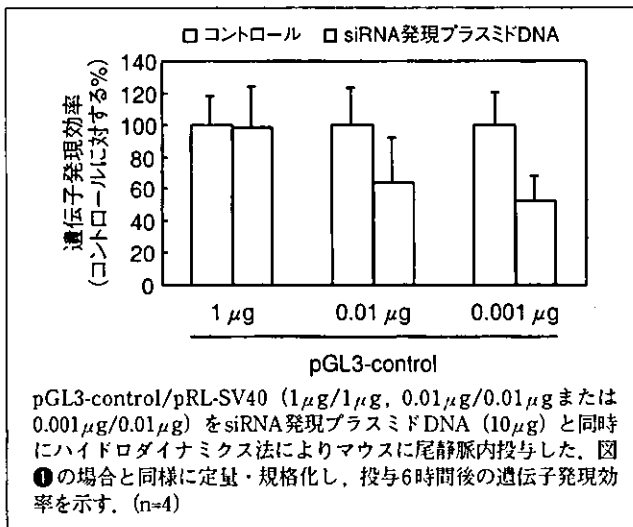
表② siRNAとsiRNAベクターの特性比較

	核酸の種類	大きさ	費用	効果の持続	効果改善法
siRNA	RNA	21~23bp	高価	短い	構造修飾
siRNAベクター	DNA	3000bp程度	比較的安価	長くなる可能性あり	ベクターの設計

図① 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



図② 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



DNAの同時投与により、肝臓・腎臓・肺において遺伝子発現抑制効果が認められた。また、投与後経時的にその効果を評価したところ、投与1日後から顕著な抑制効果が認められ、その抑制効率は投与後10日までほぼ一定であった(図①)。これは、ルシフェラーゼmRNAおよびsiRNAの転写が一過性であることによるものと推察された。また、ターゲットプラスミドDNAに対するsiRNA発現ベクターの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②)。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。さらに、siRNA発現ベクターをあらかじめ投与し、その後ターゲットプラスミドDNAを投与するまでの間隔を変化させたところ、

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なかった。これは、siRNA発現ベクターによる効果の持続時間を示唆するものと推察される。それと同時に、別々に投与することによるDNA導入細胞のパラツキも考慮する必要があることが考えられた。また、血管内への投与でなく筋肉注射についても検討したところ、ターゲットDNAとsiRNA発現ベクターの同時投与により肝臓などほぼ同じ効率で遺伝子発現が抑制可能であった。

哺乳類の細胞でRNAiが起きることが報告されて以来、少しずつではあるもののその疾患治療への応用を念頭においた検討が進められている。Songら¹⁰⁾は、

劇症肝炎時に肝細胞のアポトーシスを引き起こすことで個体を死に至らしめるFasの発現を、合成siRNAを投与することで抑制し、Fas介在性の死を抑制することにマウスにおいて成功している。彼らはあらかじめsiRNAをハイドロダイナミクス法によりマウスに投与し、劇症肝炎を惹起するためにエンドトキシンを投与している。FasをターゲットとするsiRNAを投与しなかったマウスはエンドトキシン投与によりFasが活性化し全例が死亡したのに対し、Fasに対するsiRNA投与群ではすべてのマウスが生存した。同様にマウスを用いた検討においては、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¹¹⁾。

ハイドロダイナミクス法以外の投与経路として、DOTAPリボソームとsiRNAとの複合体を腹腔内へ投与することも試みられている¹²⁾。ここでは、腫瘍壊死因子(TNF)- α 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- α 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- α 量および腹腔内細胞での TNF- α の mRNA レベルの有意な減少が確認されている。このことは、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- α を産生する細胞（腹腔マクロファージなど）に取り込まれ、細胞内でその機能、すなわち TNF- α の mRNA を特異的に破壊する活性を発揮していることを示すものである。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、われわれは *in vitro* の系で腹腔マクロファージが DNA/リボソーム複合体添加により大量の TNF- α を産生することを明らかにしている¹³⁾。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。Verma ら¹⁴⁾ は癌細胞の増殖を促進する β -カテニン発現量を siRNA で減少させることによる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。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 現象が起きているものと考えられる。

in vivo での RNAi 効果は、神経細胞や網膜を標的とした検討においても報告されている。Makimura ら¹⁵⁾ 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 あるいはその発現ベクター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 および siRNA 発現ベクターは、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。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、ここで用いられる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¹⁶⁾ 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。

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、アンチセンスやリボザイムなど対象とする mRNA を特異的に拮抗・分解する技術に関して基礎的な検討が進められてきた。アンチセンスに関しては、米国で臨床試験が進んでいる。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る。多くの研究室で *in vivo* における RNAi 現象が報告されているものの、これを臨床応用するためにはまだまだデリバリー技術の改善が要求される。かつて低分子化合物を対象として提案された DDS¹⁷⁾ を必要とする最新の医薬品候補物質が siRNA および siRNA 発現ベクターであると考えられる。

参考文献

- 1) Nishikawa M, Huang L: Hum Gene Ther 12, 861-870, 2001.
- 2) Liu F, Song Y, et al: Gene Ther 6, 1258-1266, 1999.
- 3) Kobayashi N, Kuramoto T, et al: J Pharmacol Exp Ther 297, 853-860, 2001.
- 4) Nishikawa M, Hashida M: Biol Pharm Bull 25, 275-283, 2002.
- 5) Braasch DA, Jensen S, et al: Biochemistry 42, 7967-7975, 2003.
- 6) McCaffrey AP, Meuse L, et al: Nature 418, 38-39, 2002.
- 7) Lewis DL, Hagstrom JE, et al: Nat Gen 32, 107-108, 2002.
- 8) Kobayashi N, et al: submitted.
- 9) Miyagishi M, Taira K: Perspectives in Gene Expression, The Eaton Publishers (Westboro), p361-376, 2002.
- 10) Song E, Lee S-K, et al: Nat Med 9, 347-351, 2003.
- 11) McCaffrey AP, Nakai H, et al: Nat Biotechnol 21, 639-644, 2003.
- 12) Sorensen DR, Leirdal M, et al: J Mol Biol 327, 761-766, 2003.
- 13) Yasuda K, Ogawa Y, et al: Biochem Biophys Res Commun 293, 344-348, 2002.
- 14) Verma UN, Surabhi RM, et al: Clin Cancer Res 9, 1291-1300, 2003.
- 15) Makimura H, Mizuno TM, et al: BMC Neurosci 3, 18, 2002.
- 16) Reich SJ, Fosnot J, et al: Mol Vis 9, 210-216, 2003.
- 17) Sezaki H, Hashida M: CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1, 1-38, 1984.

活性酸素消去酵素の細胞選択的デリバリーと治療効果

西川 元也^{*1} / 兵頭 健治^{*2} / 橋田 充^{*3}

1. はじめに

ヒトをはじめとする好気性生物は、酸素だけでなく、さまざまな化学反応により生ずる毒性の強い活性酸素をも巧みに利用して生命活動を営んでいる。そのために、必要とする場所でのみ活性酸素を産生し、必要としない場所では効率良くこれを消去する抗酸化システムを備えている。しかしながら、何らかの刺激により抗酸化システムの能力を上回る量の活性酸素が生じた場合には酸化-抗酸化バランスが崩れ、結果としてさまざまな障害が惹起される。最近の研究により、発癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性疾患、炎症、アレルギーなど、非常に多岐にわたる疾患に活性酸素が関与することが明らかにされた。活性酸素は、細胞、さらには固体の老化現象の原因物質としても注目されており¹⁾、その効果的な消去はわれわれの寿命にも関連していることが解明されつつある。

活性酸素が関与する疾患の治療に際しては、有害で不必要な活性酸素の生成を抑制すること、または生成した活性酸素を速やかに消去することが有効と考えられる。これまで、 α -トコフェロールなどの低分子抗酸化剤、あるいはスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)などの活性酸素消去酵素が、活性酸素に起因する

各種障害に対する有効な薬剤になるものとして期待されてきた。しかしながら、これら活性酸素消去剤を利用した疾患治療に際しては、活性酸素発生部位に効率よくデリバリーすることが必須であり、そのためには体内動態を制御可能なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が必要となる。ここでは、SODおよびCATの細胞選択的デリバリーによる治療効果改善について、肝虚血・再灌流障害抑制ならびに癌転移抑制に関する検討結果を紹介する。

2. 化学修飾によるSODおよびCATの体内動態制御

薬物の体内動態は、薬物の物理化学的・生物学的性質によって規定される生体との相互作用の総和として決定される。生理活性タンパク質および核酸化合物などの高分子物質は、アスピリンなどの低分子化合物と比較して分子サイズがはるかに大きいことから毛細血管壁および細胞膜の透過が制限され、結果的に分子構造に特徴的な生体内分布挙動を示す。われわれは、多様な物理化学的特徴を有する高分子物質の体内動態に関して薬動学的手法による定量的解析を通じ、高分子物質の物性と体内動態特性との相関を明らかにしてきた²⁻⁴⁾。

活性酸素消去酵素であるSODあるいはCATを活性酸素障害に対する治療に利用する場合、SODは腎排泄、CATは肝取り込みによりいずれも速やかに血漿中から消失するため、標的部位へ効率良くデリバリー可能なDDSを開発することが必要である。われわれは、これら酵素に対して

^{*1} Makiya Nishikawa 京都大学大学院薬学研究科 助教授 博士(薬学)

^{*2} Kenji Hyoudou 同上 修士課程

^{*3} Mitsuru Hashida 同上 教授 薬学博士
Cell-specific Delivery and Therapeutic Effect of Antioxidant Enzymes

直接各種化学修飾を施すことにより細胞選択的ターゲットを行い、活性酸素障害抑制に関する検討を行ってきた⁵⁻⁸⁾。図1に、各種化学修飾SODの体内動態を特徴付ける肝取り込みと尿排泄クリアランスを示す⁹⁾。SODは分子量が32,000と腎排泄過程の排除限界よりも小さいために速やかに糸球体でろ過された後、分解されるとともに尿細管で再吸収される。肝臓との相互作用は非常に小さいため、図のように腎排泄クリアランスに非常に偏った動態特性を示す。このSODに対して、不活性水溶性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)あるいは弱負電荷導入デキストラン(CMD)を結合することにより有効サイズを増大させることで腎排泄を抑制し、血中滞留性を大幅に改善可能である。一方、肝臓を構成する各種細胞への特異的なターゲットも可能であり、アシアロ糖タンパク質レセプターに認識されるガラクトース修飾(Gal-)を施すことにより肝細胞へのターゲットが可能であった。また、肝Kupffer細胞および肝血管内皮細胞への選択的デリバリーは、マンノース修飾(Man-)あるいはサクシニル化(Suc-)により、それぞれマンノースレセプター、スカベンジャーレセプターを介する取り込みにより実現された。図2には、CAT誘導体での肝臓構成細胞間での分布を示すが、それぞれの修飾に対応した移行動態を示すことが示されている⁹⁾。

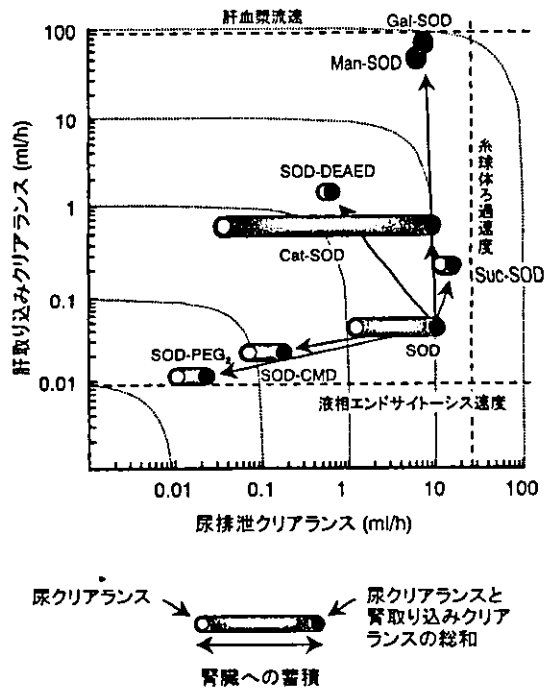


図1 SOD誘導体のマウス静脈内投与後の肝取り込みクリアランスと腎排泄クリアランス。Gal-SOD, ガラクトース修飾SOD; Man-SOD, マンノース修飾SOD; SOD-DEAED, ジエチルアミノエチル化デキストラン結合SOD; Cat-SOD, カチオン化SOD; Suc-SOD, スクシニル化SOD; SOD-CMD, カルボキシメチル化デキストラン結合SOD; SOD-PEG, ポリエチレングリコール修飾SOD

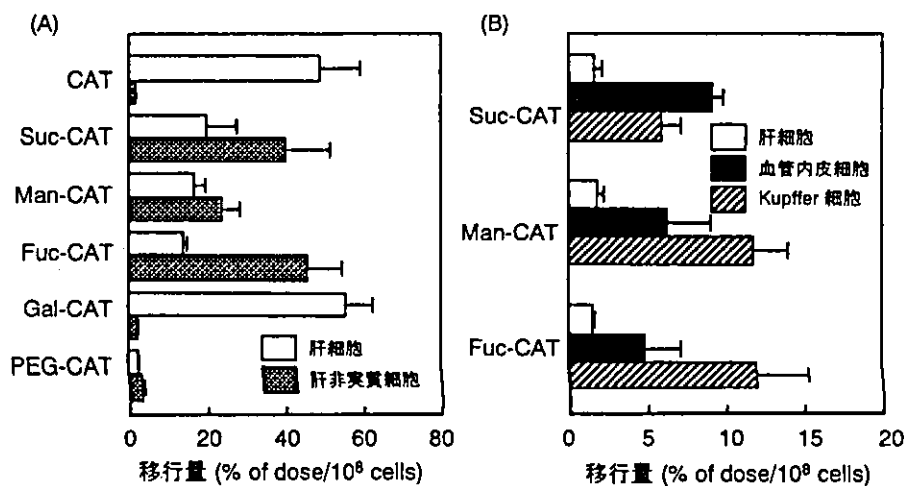


図2 CAT誘導体の(A)マウスおよび(B)ラット静脈内投与後の肝臓構成細胞間分布
Suc-CAT, スクシニル化CAT; Man-CAT, マンノース修飾CAT; Fuc-CAT, フコース修飾CAT; Gal-CAT, ガラクトース修飾CAT; PEG-CAT, ポリエチレングリコール修飾CAT

3. 肝虚血・再灌流障害に対する抑制効果

上記のように、SODおよびCATを対象に各種化学修飾を施すことにより、肝細胞ターゲティング型(Gal-SOD, Gal-CAT)ならびに、肝非実質細胞ターゲティング型(Man-SOD, Man-CAT, Suc-CAT)、血中滞留型(SOD-PEG2, PEG-CAT)誘導体が得られた。そこで、活性酸素が発症に関与する障害として、臓器移植時など臓器への血流が一時的に遮断後再開されることで生じる虚血・再灌流障害を取り上げ、SODおよびCATの細胞選択的デリバリーによる障害抑制について検討した。肝臓の虚血・再灌流時には、さまざまな細胞が活性酸素を産生することが報告されているが、中でもKupffer細胞が主要な発生源と考えられる。Kupffer細胞由来の活性酸素が肝障害を惹起するとともに好中球の浸潤を誘発し、肝臓局所で活性化された好中球からさらに多量の活性酸素が生成することにより重度の障害を引き起こすと考えられる(図3)。そこで、CAT誘導体投与によるマウス肝臓虚血・再灌流障害に対する抑制効果について、血漿中に漏出する肝細胞内酵素GOTおよびGPT活性を指標に検討した¹⁾。実験は、肝動脈と門脈をクランプすることで血流を30分間遮断し、再灌流後1時間の時点で採血した。各種CAT誘導体を再灌流5分前に10,000U/kgの投与量で静脈内投与したときの血漿中GPT活性

を図4に示す。対照群と比較して生理食塩水投与(無治療)群では有意に高い血漿中GPT活性が検出され、この系において著明な肝障害が惹起されることが確認された。これに対しCAT誘導体投与群では無治療群と比較して障害レベルの低下が認められ、中でも肝非実質細胞にターゲティングされるSuc-CATおよびMan-CAT投与群で顕著な障害抑制効果が得られた。

活性酸素代謝カスケードにおいてCATとSODは共同的に作用すると考えられていることから、

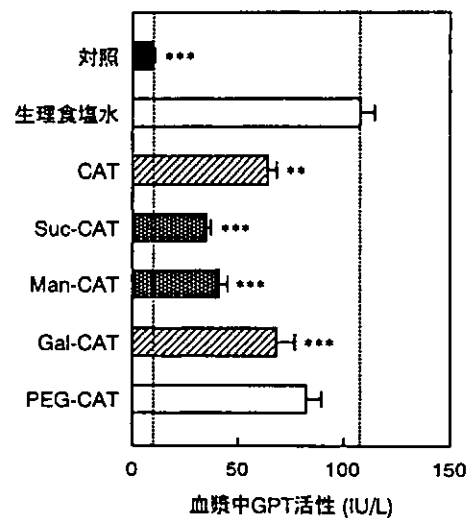


図4 血漿中GPT活性に及ぼすCAT誘導体投与の影響
生理食塩水投与(無治療)群との有意差, **, P<0.01;
***, P<0.001

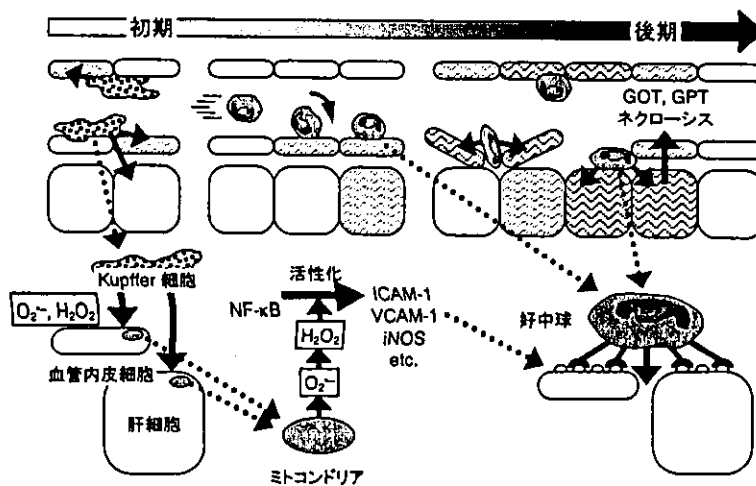


図3 肝臓虚血・再灌流障害の模式図

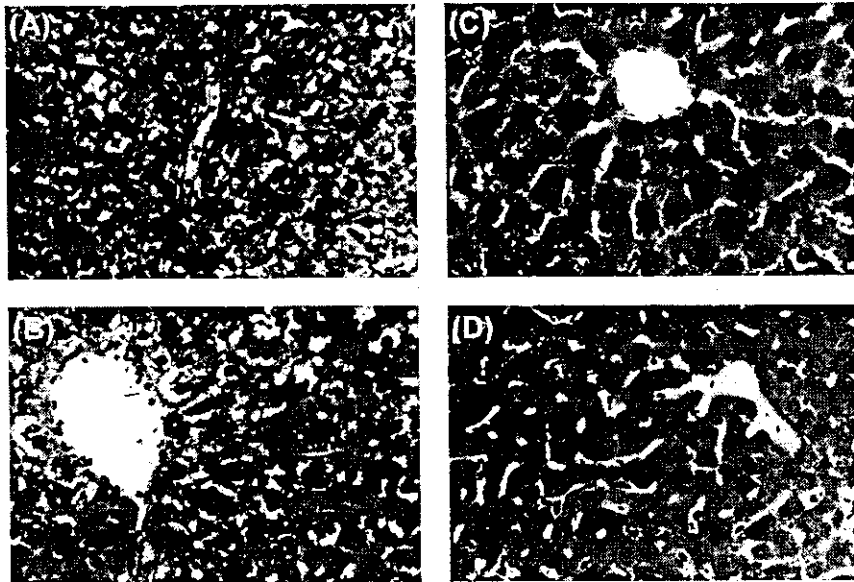


図6 マウス肝臓虚血・再灌流後の肝臓組織像
(A)生理食塩水, (B)CAT, (C)Suc-CAT, (D)Suc-CAT および Man-SOD 併用

両者の併用によりさらなる抑制効果が期待される。そこで、肝臓へのターゲティングが可能な Gal-SOD あるいは Man-SOD と各種 CAT 誘導体との併用効果について検討したところ、Suc-CAT と Man-SOD の組み合わせが非常に障害抑制に効果的であることが血漿中 GPT, GOT 活性および肝組織切片の形態観察(図5)から明らかとなった⁸⁾。さらには、こうした初期の障害を抑制することで好中球の浸潤による後期障害に対しても有効であることが示されている⁹⁾。肝臓の虚血・再灌流障害時には、初期に Kupffer 細胞などが活性化されることで好中球が集積し、接着した血管内皮細胞を障害した後に肝類洞内へ浸潤し、肝実質細胞に接着後障害を惹起するとされている¹⁰⁾。従って、肝臓虚血・再灌流障害時の主要な活性酸素産生源である Kupffer 細胞への直接的なデリバリーによる活性酸素の消去と、肝実質細胞への攻撃に対するバリアーとして機能する血管内皮細胞の構造の維持が、肝非実質細胞へのターゲティングが有効であることの理由として考えられる。

4. 癌転移に対する抑制効果

活性酸素と癌との関わりは複雑であり、多岐にわたる局面で両者の関連が指摘されている。放射

線照射または抗癌剤による抗腫瘍効果の発現には多くの場合活性酸素が関与しており、一方、発癌の原因となる遺伝子変異過程にも活性酸素は深く関与する。また、多くの要因が複雑に絡み合った結果として生じる癌転移のメカニズムが徐々に解明されるにつれて癌細胞の転移・浸潤過程に活性酸素種が複雑に関与すること、さらには低レベルの活性酸素が癌細胞の転移・浸潤能を亢進させること¹¹⁾が明らかとされてきた。

われわれは、この癌患者の生命を脅かす最大の要因である癌転移に焦点を当て、活性酸素消去酵素のデリバリーによる転移抑制について検討を進めている。再灌流障害の場合と同様、癌転移の抑制においても必要とされる部位、すなわち活性酸素が発生する部位へのデリバリーが必要と考えられる。そこで、肝転移および肺転移モデルマウスを用い、CAT 誘導体のデリバリーによる癌転移抑制を試みた。マウス結腸癌細胞 colon 26 は門脈内に投与すると肝臓に、尾静脈内に投与すると肺にそれぞれ特異的に転移結節を形成する。このようにして作成した肝転移モデルマウスに対し、癌細胞投与3日後に CAT 誘導体を 35,000U/kg の投与量で投与した¹²⁾。癌細胞投与14日後にマウスを開腹し摘出した肝臓を図6に示す。生理食