

の目的の細胞へと的確に送り届ける DDS 技術が要求される。本年度は、まずこの siRNA とアテロコラーゲンのナノ複合体の動物モデルへの投与と体内動態についての詳細を引き続き検討した。用いた動物モデルは全身性に骨転移をするヒト前立腺がんのマウスモデルであり、アテロコラーゲン・ナノ粒子による siRNA の全身性のデリバリーを、転移腫瘍、正常の臓器へのデリバリー量をもとに検討を加えた。

C. 研究結果

(1) ヒト精巣腫瘍モデルへの局所投与

すでに前年度の研究で明らかになった、アテロコラーゲンと siRNA を最適な濃度比率によって混合し、200ナノメートル以下のナノ粒子を形成させた。これを、ヌードマウスの精巣にヒト精巣腫瘍細胞を投与して得られた精巣腫瘍モデルの腫瘍部に局所投与した。用いた siRNA は精巣腫瘍細胞過剰発現しているヒト FGF-4 遺伝子の発現を90%抑制することが確かめられている配列である。その結果、投与された siRNA とアテロコラーゲンのナノ粒子は腫瘍内に数日間とどまり、腫瘍の FGF-4 遺伝子の発現をタンパク質レベルでも抑制した。さらに、バイオイメージング法によって腫瘍の継日的観察を行ったところ、腫瘍の増殖が顕著に抑制された。

(2) 接触性皮膚炎モデルマウスへの全身性投与

アテロコラーゲンと核酸との複合体であるナノ粒子の静脈内投与による全身性デリバリーが可能であるかどうかを検討するために、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドとのナノ粒子を、接触性皮膚炎を耳に惹起させたマウスの尾静脈から投与した。アンチセンスは、ICM-I に対する合成オリゴヌクレオチドで、すでにこのアンチセンスが炎症を抑制するように働くことは確認されている。その結果、マウスの耳の部位での炎症は顕著に抑制され、目立った毒性も認められなかった。

(3) 骨転移モデルマウスへの投与

ヒト前立腺がん細胞を免疫不全マウスの左心室から投与すると、20日前後で、

全身の骨に転移したマウスモデルを造ることができる。まず骨転移巣への siRNA のデリバリーを検討するために、ヒト前立腺がん細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼを安定に発現する細胞株を取得した。この細胞の増殖は、そのルシフェラーゼをイメージングすることで、生きたマウスでの腫瘍の増殖をリアルタイムに解析することができる。このマウスに対して、ルシフェラーゼを抑制する GL3siRNA をアテロコラーゲンとのナノ粒子として投与し、バイオイメージング解析を行った結果、顎や大腿骨といった骨点移送の隅々まで siRNA がデリバリーされ、そのルシフェラーゼの発現を90%も抑制することが判明した。

(4) アテロコラーゲン複合体のナノ粒子としての性状

ナノ粒子による siRNA の抑制効果と腫瘍や正常の臓器へのデリバリーは、ルシフェラーゼによる *in vivo* イメージングをフォトン数で定量することにより、さらに RNase protection 法によって評価した。まず siRNA のナノ粒子は正常の組織にも到達したが、がん組織にはその1.7から2.2倍の量がデリバリーされていることが判明推した。

さらに正常組織からは siRNA のほとんどが5-7日で消失するのに対し、腫瘍組織ではその60%が残存していた。また転移巣の腫瘍における遺伝子発現抑制効果は90%以上に達し、さらに転移腫瘍そのものの増殖も4週間以上に渡って抑制した。

siRNA (21-23 塩基) 1分子に対して3から5分子のアテロコラーゲンが結合していること、またその粒子の直径のサイズは75-100ナノメートルであることが判明した。さらにこのナノサイズの複合体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることも証明することが出来た。

D. 考察

1) 達成度について

我が国独自の材料と技術によってもたらされたアテロコラーゲン・ナノ粒子によるデリバリーテクノロジーが siRNA の全身性投与に対しても有効であることを証明した。さらに組織への siRNA のデリ

バリー量を正確に算定した結果、本方法は正常組織に比較して、腫瘍への siRNA の集積を促進することが、明らかとなった。またこのナノ粒子の細胞内への取り込みの様式等に関する性状を明らかにすることが出来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

SiRNA をベースにした核酸医薬による治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞へと的確に送り届ける DDS 技術が要求される。この点で siRNA を生体由来の分解酵素から保護し、他の遺伝子導入方法や蛋白質を導入する方法と比べて、生体内で長期間にわたって核酸医薬を安定に保持するアテロコラーゲンの諸性質は大きなアドバンテージとなる。このアテロコラーゲンのデリバリーの特長を生かして、この技術を用いた動物疾患モデルでの siRNA の治療薬としての可能性を実証検討することが今年度の研究成果によって成し遂げられた。

3) 今後の展望について

本研究成果により、アテロコラーゲン・ナノ粒子による siRNA の全身性骨転移モデルへのデリバリーが可能になった事実は、がん等の固形腫瘍ばかりではなく、全身の恒常性の維持に働く基礎代謝などの生理現象や疼痛、倦怠、疲労、さらには精神活動に対する現象の制御として siRNA は有用であることを示唆している。我々のアテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS は、動物の全身性の臓器、組織にまで siRNA をデリバリーしうることから、今後、siRNA の核酸医薬品としての利用価値が確立すれば、様々な疾患を標的にした医療への応用が期待できる。

E. 結論

本研究事業の成果は、アテロコラーゲンと siRNA 複合体のナノ粒子の全身性デリバリーの基礎となる基盤型情報を提供するものであり、今後の siRNA の臨床応用に向けてのナノ粒子デリバリー技術の開発に道が開けた。

F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (欧文)

- 1) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. Expert Opin. Drug Discov. 2: 159-167, 2007.
- 2) Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. Ann N Y Acad Sci. 1082: 9-17, 2006.
- 3) Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. Int J Oncol, 28: 383-391, 2006.
- 4) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of stem cells for liver regeneration. Hepatology, in press.
- 5) Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. Diabetologia. 49: 2948-2958, 2006.
- 6) Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. Int J Oncol. 29: 541-548, 2006.
- 7) Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation.

- FASEB J. 20: 1484-1485, 2006.
- 8) Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T and Ochiya T. "Stem cells into liver"-basic research and potential clinical applications. *Adv Exp Med Biol. Vol.585: 3-17, 2006.*
 - 9) Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res. 66: 7532-7539, 2006.*
 - 10) Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.20: 1321-1330, 2006.*
 - 11) Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci. 97: 689-696, 2006.*
 - 12) Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology, 131: 14-29, 2006.*
 - 13) Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I, Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res. 113: 138-143, 2006.*
 - 14) Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis. 27: 2497-2510, 2006.*
 - 15) Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA. 102: 12177-12182, 2005.*
 - 16) Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhus stomach cancer. *Cancer Sci. 96: 323-332, 2005.*
 - 17) Saito S, Honma K, Kita-Matsuo H, Ochiya T, Kato K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol Genomics. 22: 8-13, 2005.*
 - 18) Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant, 14:629-635.*
 - 19) Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Recapitulation of *in vivo* gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells, *Hepatology, 42: 558-567, 2005.*
 - 20) Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology. 41: 836-846, 2005.*
 - 21) Honma K, Miyata T, and Ochiya T. Atelocollagen-based cell transfection array allows high-throughput screening of gene functions and drug discovery. *Current Drug Discovery Technologies, 1: 287-294, 2004.*
 - 22) Sasaki H, Hirai K, Yamamoto Y, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M, Ochiya T. HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene, 23: 3681-3688, 2004.*
 - 23) Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto T, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res, 32: e109, 2004.*
 - 24) Hirai K, Sasaki H, Yamamoto H, Sakamoto H, Kubota Y, Kakizoe T, Terada M, Ochiya T. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp Cell Res, 294: 77-85, 2004.*

- 25) Kai E, and Ochiya T. A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan. *Pharm Res*, 21:838-843, 2004.
- 26) Hanai K, Kurokawa T, Minakuchi Y, Maeda M, Nagahara S, Miyata T, Ochiya T, and Sano A. Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum Gene Ther*, 15: 263-272, 2004.
- 27) Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Ueda M, Uchino M, and Yamamura K. Targeted conversion of the transthyretin gene in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 11: 838-846, 2004.

(和文)

- 1) 落谷孝広：アテロコラーゲン DDS による転移性がんの RNAi 治療、*Biotherapy*, 20: 527-533, 2006 (癌と化学療法社)
- 2) 寺谷工、山本雄介、落谷孝広：研究用ヒト細胞ソースとしての間葉系幹細胞の可能性、*Organ Biology*, 13: 419-431, 2006 (日本臓器保存生物医学会)
- 3) 落谷孝広：がん治療と RNAi 創薬、*ファルマシア*, 42: 1223-1227, 2006 (日本薬学会)
- 4) 落谷孝広：アテロコラーゲン DDS による転移性がんの RNAi Therapy, 61:1110-1116, 2006 (最新医学社)
- 5) 落谷孝広：siRNA デリバリーシステムのがん治療への応用、*Pharm Tech JAPAN* 21: 104-107, 2005 (時報社)
- 6) 竹下文隆、落谷孝広：アテロコラーゲンによる遺伝子治療用ベクターの生体内制御、*Molecular Medicine*, 42: 292-297, 2005 (中山書店)
- 7) 竹下文隆、落谷孝広：アテロコラーゲンによるがん治療を目的とした siRNA の in vivo デリバリーシステム、*RNA 工学の最前線*, 88-96, 2005. 中村義一 (編), (シーエムシー出版)
- 8) 竹下文隆、水口佳子、落谷孝広：アテロコラーゲンを用いた合成 small interfering RNA の IN VIVO 導入技術、*実験医学*, 22: 981-984, 2004.
- 9) 竹下文隆、落谷孝広：がん研究における IN VIVO イメージング、*医学の歩み*, 210:

192-195, 2004.

- 10) 竹下文隆、落谷孝広：アテロコラーゲンを用いた生体への siRNA デリバリー法の開発、改訂 RNAi 実験プロトコール、多比良和誠、羊土社、東京、224-225, 2004.

2. 学会発表

- 1) イメージング技術によるがん細胞の可視化と RNAi 治療評価系への応用、落谷孝広、第 1 回医療バイオワークショップ (2006. 4. 24 東京工業大学)
- 2) ヒト幹細胞から分化した肝細胞、落谷孝広、第 13 回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム (2006. 5. 19 東京)
- 3) Functional screening of the genes correlated with drug resistance in breast cancer using Atelocollagen-mediated siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Kazuki Nemoto, Jun Onodera, Yu Aso, Hiroshi Itoh, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第 20 回国際生化学・分子生物学会議 (2006. 6. 22 京都)
- 4) ステム細胞の肝細胞分化制御、落谷孝広、(シンポジウム) 第 13 回肝細胞研究会 (2006. 7. 1 旭川)
- 5) アテロコラーゲン DDS による siRNA のがん治療モデル、落谷孝広、(シンポジウム) 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 6) 転移性ヒト乳がん細胞に対する RNAi による治療効果の検討、竹下文隆、アグネスバナス、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 7) アテロコラーゲン siRNA 導入技術による薬剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、西尾和人、加藤菊也、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 8) アテロコラーゲン DDS で siRNA のがん治療は可能なのか、落谷孝広 (セミナー) バイオテクノロジー ジャパン セミナー (2006. 11. 13 東京)
- 9) がん転移モデルの in vivo イメージング、落谷孝広 (シンポジウム) 第 23 回日本疾患モデル学会総会 (2006. 11. 30 群馬)
- 10) アテロコラーゲン DDS による RNAi 創薬、落谷孝広 (セミナー) 第 27 回ヒューマンサイエンス総合セミナー (2007. 1. 23 東京)
- 11) siRNA によるがん治療モデル：RNA 干

渉による抗がん剤増感の試み、落谷孝広（シンポジウム）第9回癌治療増感研究シンポジウム（2007.2.11 奈良）

12) Atelocollagen-mediated delivery system for nucleic medicines. Nagahara S., Takeshita F., Honma K., Hanai K., Sano A. and Ochiya T., 第5回レトロメタボリズムカンファレンス（2005.5.8-11 神奈川）

13) アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる抗がん剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊也、落谷孝広（ポスター）、第64回日本癌学会学術総会（2005.9.14 札幌）

14) HST-1/FGF-4高発現による脳の発達異常、上田しのぶ、高濱靖、朝元誠人、竹下文隆、坂本裕美、寺田雅昭、落谷孝広（ポスター）、第64回日本癌学会学術総会（2005.9.15 札幌）

15) HPV18型のE6, E7遺伝子を標的としたsmall interference RNAの腫瘍増殖抑制効果に関する検討、藤井多久磨、林茂徳、落谷孝広、武井佳史、塚崎克己、久布白兼行、青木大輔、野澤志朗（ワークショップ）第64回日本癌学会学術総会（2005.9.16 札幌）

16) 白血病関連遺伝子MOZの造血における役割、勝本拓夫、相川祐規子、落谷孝広、北林一生（ポスター）第64回日本癌学会学術総会（2005.9.16 札幌）

17) siRNA/アテロコラーゲンデリバリーシステムの腫瘍組織特異性の検討、竹下文隆、永原俊治、本間紀美、落谷孝広（ワークショップ）第64回日本癌学会学術総会（2005.9.16 札幌）

18) サイクリンD1過剰発現による腫瘍形成促進に関与する遺伝子の検索、生田目奈知、竹下文隆、加藤尚志、落谷孝広（ポスター）第28回日本分子生物学会年会（2005.12.7 福岡）

19) アテロコラーゲンsiRNA導入技術による薬剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、根本一樹、小野寺純、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊也、落谷孝広（ポスター）第28回日本分子生物学会年会（2005.12.8 福岡）

20) siRNA/アテロコラーゲン複合体の全身投与における臓器・腫瘍組織特異性の検討、竹下文隆、生田目奈知、水口

佳子、本間紀美、加藤尚志、落谷孝広（ポスター）第28回日本分子生物学会年会（2005.12.9 福岡）

21) アテロコラーゲンナノ粒子によるsiRNAの全身性投与、落谷孝広（シンポジウム）日本薬理学会第126年会（2006.3.28 仙台）

22) 竹下文隆、落谷孝広、他。SiRNAによるアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞の増殖抑制、第63回日本癌学会総会、福岡、Sep, 2004.

（海外発表）

1) FASEB Liver Conference on Liver Growth, Development & Disease, (July 22-27 2006, Colorado, USA) Ochiya T. Title: Generation of hepatocytes from ES cells. 招待講演

2) The 5th Sino-Japan Joint Conference, (October 5-8 2006, Shanghai, China) Ochiya T. Title: Therapeutic potential of atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer. 招待講演

3) Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, (Oct 19-21, 2006, NY, USA) Ochiya T., Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Title: Atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer.

4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006 Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome profiling of hepatic differentiation from mesenchymal stem cell.

5) Gordon Research Conference-Molecular cell biology July 2-7, 2006, USA, Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome Analysis to Define the Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell.

6) 9th International Conference Drug and Gene-based Therapeutics, Agia Pelagia, island of Crete, Greece, September 2-8, 2006. Takeshita F., Ochiya T.: Efficient Small Interfering RNA delivery to metastatic tumors.

7) The 2nd International Conference on Tissue Engineering, Greece, May 22-27 2005, Ochiya T., Yamamoto Y., Teratani T. Title: Long-term maintenance of ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. 招待講演

- 8) American Society of Gene Therapy, Minneapolis, June 1-5 2005, Nagahara S, Takeshita F, Honma K, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Title: Efficient inhibition of bone metastasis via systemic delivery of siRNA using atelocollagen-mediated delivery system.
- 9) 64st Annual Meeting of Society for Developmental Biology, San Francisco, June 27- August 1 2005, Yamamoto Y., Teratani T., Quinn G., Kato T., Ochiya T., Title: Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from mouse embryonic stem cells. March 12-18 2006.
- 10) Animal model study for cancer, Keystone symposium, (Colorado, USA) Feb, 2004. Takeshita F, Ochiya T. Atelocollagen-mediated effective delivery system for synthetic siRNA suppresses orthotopic xenograft model of testicular tumor.
- 11) WCDA Conference、招待講演 (Germany) Sep, 2004. Ochiya T、Efficient inhibition of inflammatory disease and cancer by atelocollagen-mediated siRNA delivery.

H. 知的所有権の出願・取得状況
特許出願は特になし

循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発

分担研究者 斯波 真理子 国立循環器病センター研究所 室長

本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro* および *in vivo* において、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターを開発すること、さらに、循環器疾患モデル動物を用いて治療実験を行い、遺伝子治療の臨床応用の基礎とすることである。我々は、ポリカチオンとポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体を用いて、DNA と会合させると、DNA を内包して PEG が外殻を覆う *core-shell* 構造を形成し、DNA を外部環境より守ることを見出していた。本研究において、我々は、ブロック共重合体を改良し、*in vivo* において著明な遺伝子発現が可能で、安全性が高い遺伝子導入ベクターの開発に成功した。まず、カチオニックポリマーの部分に SS 架橋を導入して、*in vitro* での遺伝子導入および *in vivo* での DNA の安定性を上昇した。さらに、カチオニックポリマー部分に、緩衝能を有するポリマー PAsp(DET)を選択し、気管内投与による肺での著明な遺伝子発現増強に成功した。また、遺伝子導入後の肺組織の病理学的所見および炎症性サイトカインの遺伝子発現が、従来のポリマーに比べて非常に低く、安全性の面でも優れていることがわかった。また、PEG-PAsp(DET)を用いて、肺高血圧症モデルラットにアドレノメデュリンの遺伝子を気管内投与し、右室圧の低下という治療効果を認めた。本研究の成果により、臨床応用への道が開けたと言える。

研究協力者
国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部
大平 望都
安倍 映里
神野 桂子
前田 律子
薬理部
高木 敦子
副所長
寒川 賢治
国立循環器病センター
病院長
友池 仁暢
東京大学大学院
工学系研究科
片岡 一則
西山 伸宏
宮田 完二郎

宮崎大学
医学部第一病理学講座
浅田 祐士郎
畠山 金太

A. 研究目的

外来遺伝子を *in vivo* で発現させるためには、いくつかのステップが存在する。図 1 に外来遺伝子の発現までの道のりとしてまとめる。投与した遺伝子が *intact* な形で標的細胞へ到達するステップ(図 1 の①)、標的細胞の表面に接着するステップ(図 1 の②)、細胞内に取り込まれるステップ(図 1 の③)、エンドソームから細胞質への遊離のステップ(図 1 の④)、細胞質から核への移行のステップ(図 1 の⑤)、核膜の通過のステップ(図 1 の⑥)、遺伝子の転写のステップ(図 1 の⑦)、遺伝子の翻訳のステップ(図 1 の⑧)などである。ウイルスは、これらのステップをすべてクリアする機能を有している。外来遺伝子を導入して、発現にまで至るた

めには、これらの機能をすべて搭載しているベクターの構築が必要である。我々は、東京大学の片岡らとの共同研究で、*in vivo* 遺伝子導入のためのベクターの開発を行っており、ポリ L リジンとポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体を用いて、DNA との複合体を形成させると、DNA を内包し、PEG を外殻とした **core-shell** 構造をとる(図2)。このポリプレックスミセルは、血中投与により、6時間以上という長時間、DNA を安定に存在させることができ、*in vitro* および *in vivo* で遺伝子発現が可能であることを既に報告している。さらに PIC ミセルの遺伝子発現効率を上昇させるため、SS 結合で PIC ミセルの内核を架橋したベクターを用い、ミセルの内核を SS 結合で架橋することにより、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子導入の改善に成功した。また、ポリマーとして緩衝能を持つ PAsp(DET)に変更し、*in vitro* および *in vivo* において著明な遺伝子発現に成功した。本研究では、さらに、病理学および炎症性サイトカインの測定により、毒性についても検討した。

図1 外来遺伝子の発現までの道のり

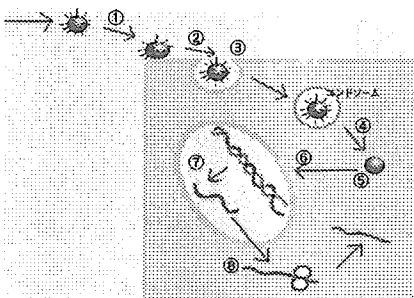
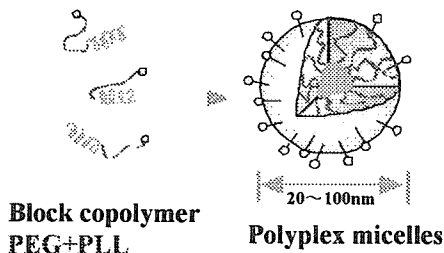


図2 ポリプレックスミセルの構造



B. 研究方法

1. 遺伝子導入ベクターとして、まず、架橋ミセルを作製した。架橋ミセルは、ポリ L

リジン(48)とポリエチレングリコール(12,000)のブロック共重合体を作製し、種々の%の架橋を導入した。ポリマーに架橋を導入することにより、細胞外の環境では、ポリウレックスミセルが DNA を安定に保つことができ、細胞内の還元環境下では、DNA から容易に離脱して、DNA の発現を阻害しない、理想的なシステムであると考えられる(図3)。また、PEG- PAsp(DET)は、ポリエチレングリコール(12,000)と PAsp(DET) (polyaminoethylene aminopropyl aspartamide(68)の共重合体を用いた。PEG-PAsp(DET)の構造を図4に示す。

図3 架橋ミセルの細胞内および細胞外でとりうる構造

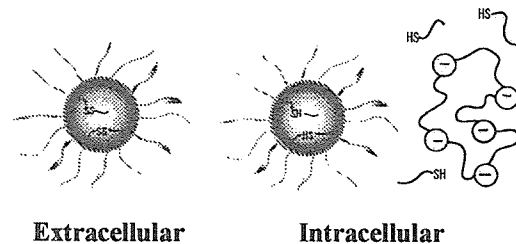
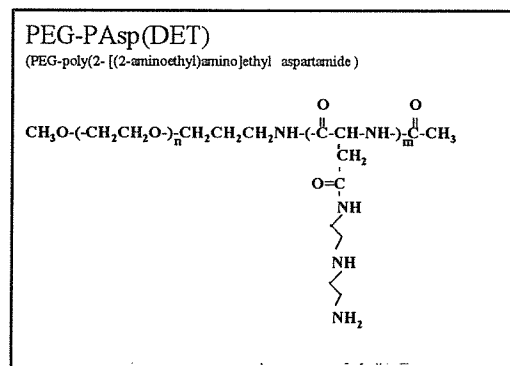


図4 PEG- PAsp(DET)の構造



2. *in vitro* 遺伝子導入実験

in vitro 遺伝子導入は、血管内皮細胞、Cos-1 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞を用いた。それぞれの細胞を 24 穴プレートに培養、10%FCS 存在下にそれぞれの SS 結合を持った架橋ミセルを加え、24 時間培養した。さらに 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定し、蛋白質定量後、活性を RLU/mg prot で表した。

3. in vivo 遺伝子導入実験

in vivo 遺伝子導入は、気管切開の後、マウス気管内投与器具を用いて気管内投与を行い、一定時間後に肺組織をホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性測定を行い、蛋白質定量後、活性をRLU/mg protで表した。

4. 肺高血圧モデルラットの作製

180 g の Wister ラットに、モノクロタリン 12 mg/100 g 体重を皮下注射して、4 週間放置し、肺高血圧モデルを作製した。

5. 血行動態測定

モノクロタリン投与 4 週間後のラットの頸静脈よりカテーテルを挿入して、PowerLab につなぎ、血圧を測定した。圧波形より、カテーテルの先端が右室に挿入されたことを確認後、右室圧を測定した。気管内遺伝子導入 3 日後、再度、右室圧測定を行った。

6. 気管内遺伝子導入

ラットの気管切開の後、ラット気管内投与器具を用いて PEG-PAsp(DET)ポリプレックスの気管内投与を行った。コントロールのポリマーとして、Exgen を用いた。肺組織は凍結し、Real Time-RT PCR による mRNA 測定を行った。

C. 研究結果

(1) 架橋ミセルの in vitro 遺伝子導入

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入実験を行った。Cos-1 細胞 (図 5) への遺伝子導入は、SS 結合が 13% のもので最大であった。

図5架橋ミセルによる Cos-1 細胞への遺伝子導入

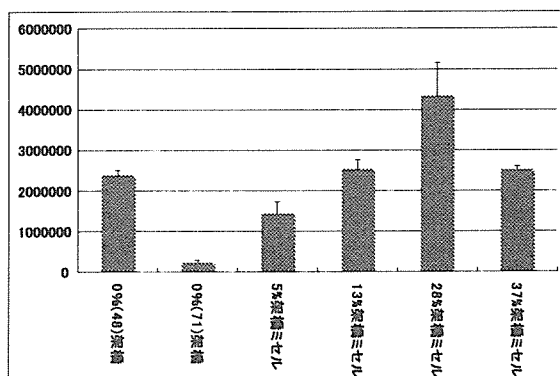


図6架橋ミセルによる血管内皮細胞への遺伝子導入

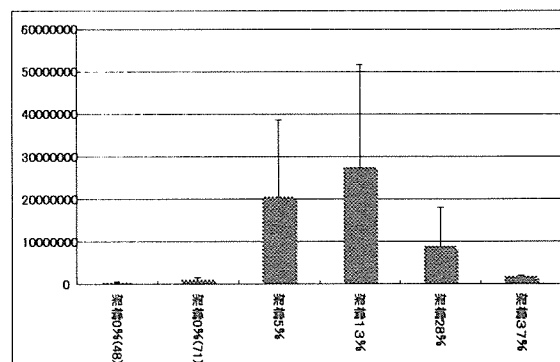
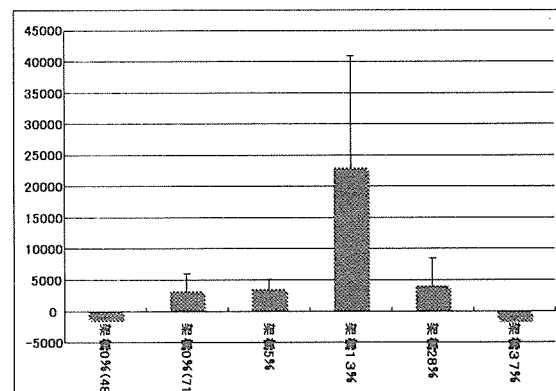


図7 架橋ミセルによる THP-1 細胞への遺伝子導入

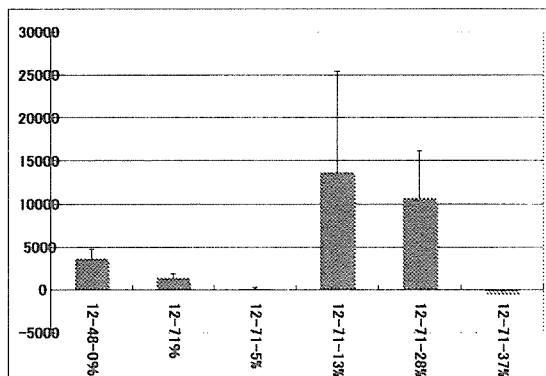


一方、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 では、28% の SS 結合導入により、遺伝子発現が最大となった。また、いずれも 37% の架橋導入により、遺伝子発現は低下していた。以上より、SS 結合を内核に導入することにより、in vitro での遺伝子発現を増加させることが可能であった。細胞それぞれに、最大の遺伝子発現をみとめる至適の架橋導入%が存在していた。

(2) 架橋ミセルによる in vivo 遺伝子導入実験

それぞれの%の架橋を導入した架橋ミセルを用いて、マウスの気管内投与を行い、1 日後に肺での遺伝子発現を測定したところ、13% および 28% の架橋導入により、有為な遺伝子発現を認めた (図 8)。5%、37% の架橋導入、および架橋のないものでは、ほとんど遺伝子の発現を認めなかった。

図8 架橋ミセルによる in vivo 遺伝子導入

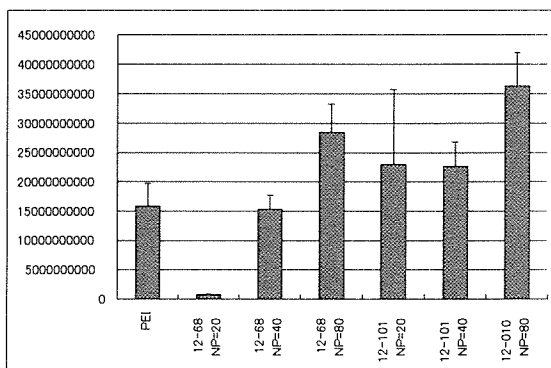


(3) PEG-PAsp(DET)ポリプレックスの in vitro 遺伝子導入

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入実験を行った。DETの重合度は68と101、N/Pは20、40、80のもので検討を行った。

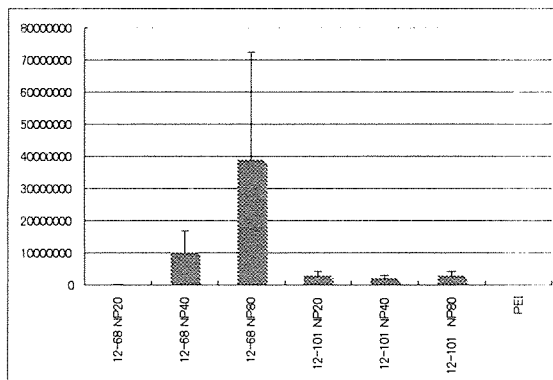
Cos-1細胞への遺伝子導入は、いずれの条件でも、PEIと同等あるいはそれ以上の発現効率を得た(図9)。重合度は101のもので68よりも遺伝子発現効率は高く、また、N/P比は80のもので最大であった。

図9. PEG-PAsp(DET)による Cos-1 細胞への遺伝子導入



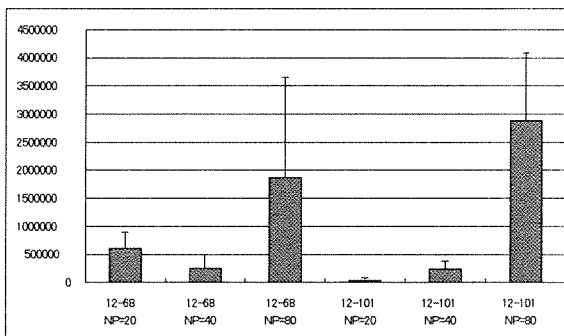
血管内皮細胞では、PEIおよび重合度101のもので毒性効果がでて多くの細胞が死んでしまい、図10のような結果となった。重合度68の中でもN/P比80のもので、良好な遺伝子導入効率を認めた。

図10. PEG-PAsp(DET)による血管内皮細胞への遺伝子導入



単球由来白血病細胞株 THP-1 では、68、101いずれの重合度でも、N/P比80のもので高率な遺伝子発現を認めた(図11)。以上より、in vitro では、N/P比が高値、重合度が101である方が、遺伝子発現効率が高値であること、重合度が101の場合、毒性がでる細胞もあることがわかった。

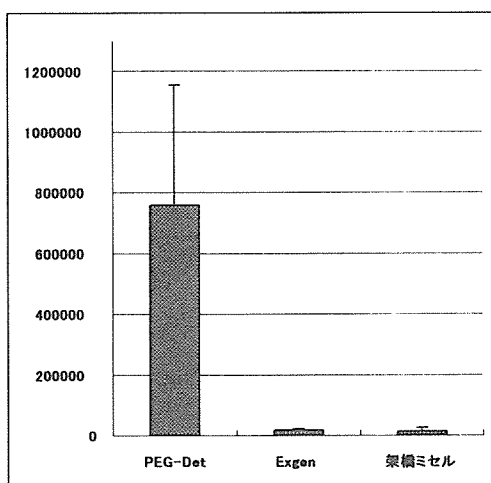
図11. PEG-PAsp(DET)による THP-1 細胞への遺伝子導入



(4) PEG-PAsp(DET)による in vivo 遺伝子導入実験

PEG-DETを用いてマウス気管内投与による in vivo 遺伝子導入実験を行い、Exgen (Linear PEI)および架橋ミセルによる遺伝子導入と比較した。PEG-DETを用いることにより、Exgen および架橋ミセルによる遺伝子導入に比し、約50倍の遺伝子発現を認めた(図12)。

図 12 PEG-PAsp(DET)による in vivo 遺伝子導入実験

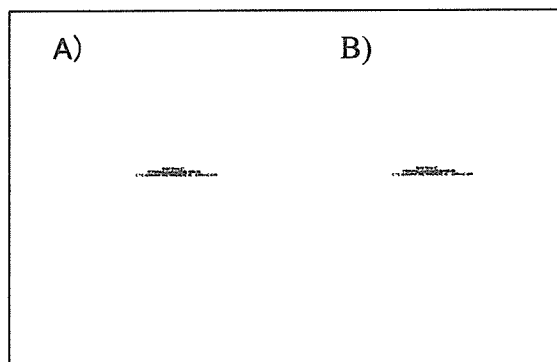


(5) PEG-PAsp(DET)による in vivo 遺伝子導入による毒性効果の検討

遺伝子導入による毒性を調べるため、PEG-PAsp(DET)および PEI を用いた遺伝子導入の後に、肺組織の顕微鏡写真を撮影した (図 13)。PEI を用いた遺伝子導入後は、炎症性細胞浸潤、及び浸出液を認め、肺組織のダメージが大きいのに比較し、PEG-PAsp(DET)による遺伝子導入後は炎症の所見などの異常を認めなかった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)は、毒性が低く、遺伝子導入効果が高い、非常に有用な遺伝子導入ベクターであることが示唆された。

図 13 気管内投与後の肺組織の顕微鏡写真

A) PEG-PAsp(DET)によるポリプレックスミセル B) Exgen(PEI)によるポリプレックス



モノクロータリン投与 4 週間後のラットに

対して、PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン発現遺伝子の導入を行ったところ、右室圧は有意に低下を認めた (図 14)。コントロールとして、アドレノメデュリン発現遺伝子と生理食塩液、アドレノメデュリン発現遺伝子と Exgen、PEG-PAsp(DET) とルシフェラーゼ遺伝子を投与したが、いずれも右室圧に有意な差を認めなかった。また、肺組織におけるアドレノメデュリン mRNA の量は、4 倍に増加を認めた (図 15)。

図 14. PEG-PAsp(DET)とアドレノメデュリンのポリプレックスミセル投与後の右室圧の変化

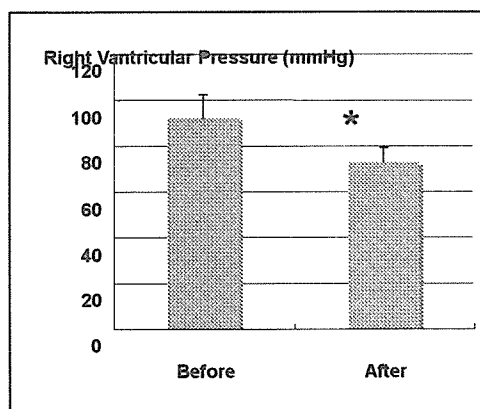
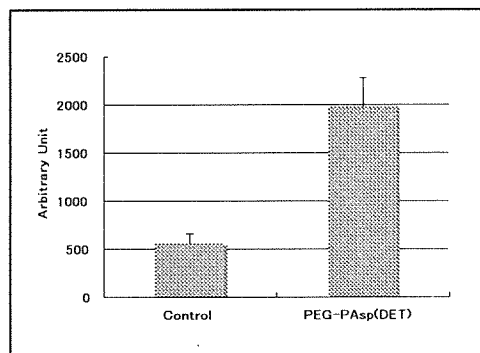


図 15 PEG-PAsp(DET)によるアドレノメデュリン遺伝子気管内投与後の肺でのアドレノメデュリン mRNA 量



D. 考察

1) 達成度について

遺伝子導入ベクターの開発において、合成ベクターは安全性が高いが遺伝子導入効率に問題があった。今回の架橋ミセルの研究で、以前のものよりさらに血中安定性が高く、発現効率のよいベクターが開発され

たと言える。また、PEG-PAsp(DET)という新しいベクターは、現在、市販されている、*in vivo* 遺伝子導入試薬(Exgen)および架橋ミセルに比し、50倍もの高度な発現効率を持つことがわかり、病理組織学的に毒性が非常に少ないこと、遺伝子導入により、肺高血圧症モデルラットの病態を改善できたことなどから、非常に有用であり、臨床応用へ大きく前進したと考えられる。本研究の研究期間において、当初の目標がクリアできたと評価できる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

近年、遺伝子導入ベクターとして、カチオン性ポリマーやリポソームに関心が寄せられるようになってきた。しかしながら、これらの合成ベクターとDNAとのポリプレックスは、溶解性、安定性、粒子径、表面電位のコントロールなど解決すべき問題点が多く、ウイルスベクターと同様の機能を持つには至っていない。また、*in vivo*での遺伝子導入効率が、疾患モデルの治療に有効である域まで達していない。我々は、ポリマーベクターの安全性を保ちながら、*in vivo*での遺伝子導入を可能とするベクターの開発を行っている。我々がベクターとして用いているのは、ポリカチオンとポリエチレングリコールのブロック共重合体であり、これはこれまでのホモポリマーと違い、ポリカチオンを内核、ポリエチレングリコールを外殻としたナノ粒子を形成し、溶解性、安定性にすぐれている。今年の課題は、このポリイオンコンプレックスミセルの*in vitro*および*in vivo*における遺伝子発現効率の改善である。ポリプレックスミセルの内核にSS結合を導入することにより、*in vitro*および*in vivo*において遺伝子発現効率を上昇させることができた。これらは、内核にSS結合を導入したことにより、細胞外ではDNAと固く結合し、安定性を増し、細胞内では、還元条件下におかれるため、DNAが遊離することも、遺伝子発現上昇に寄与すると考えられる。

さらに、本研究の成果として、PEG-PAsp(DET)という、*in vivo*での遺伝子発現効率が、従来のもの50倍という、著明な改善をみとめることができ、疾患モデル動物の病態改善をもたらすことができた。本研究成果により、臨床応用にむけて、

大きなブレークスルーがなされたと考えられる。

E. 結論

本研究において、我々は、*in vivo*において、発現効率の非常に高く、安全性に富む遺伝子導入ベクターの開発に成功した。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 欧文

1) J. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahata, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, Y. Tabata, Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Engineering (in press)* 2006

2) I. Ichi, K. Nakahara, Y. Miyashita, A. Hidaka, S. Kutsukake, K. Inoue, T. Maruyama, Y. Miwa, M. Harada-Shiba, M. Tsushima, S. Kojo and Kisei Cohort Study Group, Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids*. 2006; 41(9): 859-863

3) A. Yamamoto, M. Harada-Shiba, M. Endo, N. Kusakabe, T. Tanioka, H. Kato, and T. Shoji, The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis*. 2006; 186(1): 126-131

4) Nakayama Y, Masuda T, Nagaishi M, Hayashi M, Ohira M, Harada-Shiba M. High performance gene delivery polymeric vector: Nano-structured cationic star polymers (Star Vectors). *Current Drug Delivery*. 2005; 2; 53-57

5) Umeda M, Harada-Shiba M, Uchida K, Nakayama Y. Photo-Control of the polyplexen formation between DNA and photo-cation generatable water-soluble polymers. *Current Drug Delivery*. 2005; 2: 207-214

6) Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, Asada Y,

Yokoyama S: Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circ. Res.* 2004; 95: 945-952

7) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic

angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation.* 2004; 109: 526-531

8) Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S. Homozygous familial hypercholesterolemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. *Br J Dermatol.* 2003; 149: 1302-1303

9) Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003; 108: 889-895

10) Makino H, Harada-Shiba M. Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Therap Apher Dial.* 2003; 7: 397-401

11) Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 2541-2547

12) Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K. Polyion complex micelles as vectors in gene therapy-pharmacokinetics and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* 2002; 9(6): 407-414

2) 和文 無し

(総説)

1) 欧文 無し

2) 和文

1. 斯波真理子、杉沢貴子、常染色体劣性高コレステロール血症 循環器病研究の進歩 2006;46(XXV II):49-55

2. 斯波真理子 高脂血症 スズケンメディカル 2006;9(2):246-260

3. 斯波真理子 高脂血症と遺伝の関係は？高脂血症と遺伝の関係について教えてください。肥満と糖尿病 2006;5(3):420+421

4. 斯波真理子 生活習慣病 高脂血症 *Modern Physician* 2006;26(5):819-823

5. 斯波真理子 ナノテクノロジー (ナノDDS) を用いた動脈硬化性病変の治療・予防 分子心血管病 2006;7(1):57-62

6. 槇野久士、斯波真理子 LDL アフェレーシス効果と限界— *The Lipid* 2006;17(1): 49-54

7. 斯波真理子 ARH ノックアウトマウス *The Lipid* 2005;16 (4):316-322

8. 斯波真理子、高木敦子、横山信治、山本章 *Autosomal Recessive Hypercholesterolemia* 家系の遺伝子解析 *The Lipid* 2004;15(4):394-398

9. 斯波真理子 高分子ナノ微粒子型遺伝子治療用ベクターの開発— ナノテクノロジーの医療への応用— *日本血栓止血学会誌* 2003;14(6):507-510

10. 槇野久士、斯波真理子 LDL-アフェレーシス 最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 13 2003;239-246

11. 斯波真理子、片岡一則 ポリイオンコンプレックスミセル型遺伝子治療用ベクターの開発 ナノテクノロジーの医療への応用、*Bio ベンチャー* 2002;2 (5): 81-83

12. 日生下亜紀、斯波真理子 LDL 強制除去療法と HDL-LDL-アフェレーシスにおける経験— *The Lipid* 2002;13 (2):169-174 高見沢格、斯波真理子 スタチンの構造、活性、代謝 治療学 2002;36(5):467-470

2, 著書

Harada-Shiba M, Taira K, Kataoka K, Niidome T. (Eds.) Gene Transfer and Target Diseases. Non-viral Gene Therapy. Springer. 2005; 246-260

3, 学会発表

1) 国際学会

1) Harada-Shiba M, Makino, Sugisawa T, Nagumo A, Nakahata H, Yoshimasa Y, Tomoike H; Factors that determine the prognosis of FH under LDL-apheresis therapy.

6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA, Symposium 2007.03.2-4, Yokohama · Japan

2) Sugisawa T, Makino H, Nagumo A, Nakahata H, Yoshimasa Y, Harada-Shiba M; Skin perfusion pressure can be recovered by LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia. 6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA, General presentation.

2007.03. 2-4, Yokohama · Japan

3) Nagumo A, Makino H, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Nakahata H, Harada-Shiba M; Analysis of Changes of Lipoprotein Profile during and after LDL-apheresis. 6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA, General presentation.

2007.03. 2-4, Yokohama · Japan

4) Harada-Shiba M, Ohira M, Nishiyama N, Miyata K, Itaka K, Yamasaki Y, Kataoka K; Effect of Adrenomedullin Gene Transfer Using PEG-DET in Model Animals for Pulmonary Arterial Hypertension. UT Symposium on Nano-Bio Integration. General presentation

2006.12. 4-7, Tokyo · Japan

5) Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, Asada Y, Yokoyama S; Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse has delayed catabolism of LDL in vivo but normal internalization of LDL in vitro. XIV International symposium on Atherosclerosis, XIV

International symposium on Atherosclerosis. Workshop. 2006.06. 18-22, Rome · Italy

6) Nagumo A, Makino H, Okada S, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Ikeda T, Yamamoto A, Harada-Shiba M; Pregnancy of homozygous

familial hypercholesterolemic patients with coronary artery disease treated with LDL-apheresis, XIV International symposium on Atherosclerosis, XIV

International symposium on Atherosclerosis. Poster. 2006.06. 18-22, Rome · Italy

7) Harada-Shiba M, Minamino N, Kuwahara H, Ito T, Maeda R, Ohira M, Abe E, Jinno K, Tomoike H; Proteome analysis of hypertriglyceridemic rabbits. XIV International symposium on Atherosclerosis. Poster. 2006.06. 18-22, Rome · Italy

8) Harada-Shiba M, Makino H, Takamisawa I, Hiuge A, Yoshimasa Y, Yamamoto A; Long term effect of LDL-apheresis on Homozygous FH. The 4th World Congress of International Symposium for Apheresis, ワークショップ, Nashville · USA

9) Harada-Shiba M, Takagi A, Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Asada Y, Yokoyama S; Analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse. 第13回国際動脈硬化学会、一般演題、KYOTO · JAPAN

10) Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M; Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH)

protein expression. 第13回国際動脈硬化学会、一般演題、KYOTO · JAPAN

11) Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A; Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. 第13回国際動脈硬化学会、一般演題、KYOTO · JAPAN

2) 国内学会

1) 斯波真理子; Discovery and clinical characterization of autosomal recessive hypercholesterolemia,

日瑞循環器代謝学シンポジウム、シンポジウム 2007. 3、東京

2) 斯波真理子、大平望都、西山伸宏、宮田完二郎、山崎裕一、片岡一則; Effect of Adrenomedullin Gene Transfer Using PEG-PAsp(DET) in a Model Animal of Pulmonary Arterial Hypertension,

第71回日本循環器学会学術集会、一般演題 2007. 3、兵庫県 · 神戸

- 3) 斯波真理子; Autosomal Recessive Hypercholesterolemia の臨床症状、診断と遺伝子改変動物による解析、第 17 回生物試料分析科学大会、シンポジウム、2007.01 長野県・松本
- 4) 南雲彩子、榎野久士、杉沢貴子、中濱肇、吉政康直、斯波真理子; LDL アフェレシスにより除去されるリポ蛋白分画とその推移の検討、アフェレシス学会関西地方会、一般演題、2006.12、奈良
- 5) 斯波真理子、榎野久士、中濱肇、南雲彩子、横山信治、都島基夫、吉政康直、山本章、友池仁暢; 家族性高コレステロール血症(FH)ホモ接合体およびヘテロ接合体に対する LDL アフェレシス施行の長期予後について、第 26 回日本アフェレシス学会学術大会、シンポジウム、2006.7、滋賀
- 6) 斯波真理子; 家族性高コレステロール血症 (FH) の予後を決定する因子としての耐糖能、第 7 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference、シンポジウム、2006.7、北海道・小樽
- 7) 斯波真理子; Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) 遺伝子の機能解析、第 38 回日本動脈硬化学会総会、シンポジウム、2006.7、東京
- 8) 安部映里、高木敦子、大平望都、前田律子、神野桂子、横山信治、浅田祐士郎、寒川賢治、友池仁暢、斯波真理子; ニューロメジン U(NMU)の脂質代謝における役割—遺伝子改変動物での検討—、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京
- 9) 大平望都、高見沢格、安部映里、前田律子、神野桂子、西山伸宏、宮田完二郎、寒川賢治、片岡一則、斯波真理子; 遺伝子導入ベクター PEG-DET を用いた肺高血圧モデル動物の治療効果、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京
- 10) 前田律子、斯波真理子、伊藤恒賢、大和田一雄、大平望都、安部映里、神野桂子、桑原大幹、南野直人、友池仁暢; 高中性脂肪血症ウサギの内臓脂肪および血清のプロテオーム解析、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京
- 11) 南雲彩子、榎野久士、吉政康直、都島基夫、千葉喜英、池田智明、横山信治、山本章、友池仁暢、斯波真理子; LDL-アフェレシスを行いながら妊娠出産を行った FH ホモ接合体 2 例について、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京
- 12) Mariko Harada-Shiba, Moto Ohira, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Keiji Itaka, Yuichi Yamasaki, Kazunori Kataoka; Effect of Adrenomedullin gene transfer using PEG-DET in model animals for pulmonary hypertension、The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery、一般演題、2006.7、北海道・札幌
- 13) 大平望都、安部映里、高見沢格、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、寒川賢治、片岡一則、斯波真理子; 遺伝子導入ベクター PEG-DET を用いた肺高血圧モデル動物の治療効果、遺伝子デリバリー研究会第 6 回シンポジウム、一般演題、2006.5.19、福岡
- 14) 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、岡田定規、吉政康直、斯波真理子; LDL-アフェレシスを行いながら、妊娠、出産を行った FH ホモ接合体 2 例について、日本アフェレシス学会関西地方会、2005.12、大阪
- 15) 斯波真理子、横山信治、都島基夫、山崎卓、山本章、高木敦子、吉政康直、友池仁暢; 家族性高コレステロール血症 (FH) と Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) の臨床像、第 37 回日本動脈硬化学会シンポジウム、2005.7、東京
- 16) 安部映里、高木敦子、大平望都、神野桂子、前田律子、斯波真理子; in vitro における LDL 受容体の細胞内取り込み機構の ARH 依存性について、-in vivo との差異-、第 37 回日本動脈硬化学会、一般演題、2005.7、東京
- 17) 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則; PEG-DET による in vitro および in vivo の遺伝子導入の試み、第 37 回日本動脈硬化学会、一般演題、2005.7、東京
- 18) 斯波真理子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、片岡一則; Enhanced in vivo gene expression using PEG-DET、The 6th International Conference on Intelligent Materials and Systems、2005.7、東京
- 19) 斯波真理子; 循環器病に対する遺伝子治療への試み、遺伝子デリバリー研究会第 5 回シンポジウム、2005.5、東京
- 20) 大平望都、斯波真理子、安部映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則; PEG-DET による in vitro および in vivo の遺

伝子導入の試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム、一般演題、2005.5、東京

21) 斯波真理子、横山信治、吉政康直、山本章；Target LDL-cholesterol levels in familial hypercholesterolemia for prevention of cardiovascular events、第69回日本循環器学会、一般演題、2005.3、横浜

22) 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、神野桂子、前田律子、丸塚浩助、浅田祐太郎、野牛宏明、石橋俊、横山信治；Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)ノックアウトマウスの解析、日本動脈硬化学会第36回総会、一般演題、2004.6、福岡

23) 前田律子、斯波真理子、伊藤恒賢、大和田一雄、安部映里、大平望都、神野桂子、桑原大幹、南野直人、友池仁暢；高中性脂肪血症モデルウサギのプロテオーム解析、日本動脈硬化学会第36回総会、一般演題、2004.6、福岡

24) 大平望都、神野桂子、安部映里、前田律子、宮田完二郎、片岡一則、斯波真理子；架橋ミセルの遺伝子導入ベクターとしての評価、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、一般演題、2004.5、京都

25) 中山泰秀、舛田健、笥千聡、林美智子、斯波真理子、大平望都；合成高分子ベクターのナノ分子骨格の最適設計：スター型高分子の分子設計と持続的遺伝子発現、遺伝子・デリバリー研究会第4回シンポジウム、一般演題、2004.5、京都

26) 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、斯波真理子、吉政康直；Obesity and Insulin Resistance Possibly Promotes Ischemic Heart Disease of the Patients with Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL)、日本循環器学会、一般演題、横浜

27) 南雲彩子、榎野久士、伊藤康樹、平野勉、吉政康直、斯波真理子；LDL-アフェレシスによるsmall dense LDLの除去率について関西アフェレシス学会、一般演題、広島

28) 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、宮本恵宏、池田康行、浅田祐太郎、横山信治；Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)ノックアウトマウスの解析、日本動脈硬化学会第36回総会、一般演題、2003.7、京都

29) 安部映里、大平望都、宮本恵宏、浅田祐太郎、斯波真理子；Autosomal Recessive

Hypercholesterolemia (ARH)蛋白質合成制御機構の検討、日本動脈硬化学会第36回総会、一般演題、2003.7、京都

30) 高見澤格、大平望都、安部映里、浅田祐太郎、斯波真理子；高脂血症に対する気管内投与による遺伝子治療の試み、日本動脈硬化学会第35回総会、一般演題、2003.7、京都

4. 知的財産権の出願・取得状況

1) 特許

出願番号：特願2005-243938

発明者：斯波真理子

発明の名称：高コレステロール血症の疾患モデルマウス

出願人：国立循環器病センター総長

出願日：平成17年10月28日

特許第3709438号

出願番号：特願2002-130779

発明者：斯波真理子

発明の名称：染色体性劣性高コレステロール血症遺伝子における新規変異

出願人：国立循環器病センター総長

出願日：平成14年5月2日

2) その他 なし

高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授
協力研究者 山崎 裕一 東京大学大学院工学系研究科 講師

本研究の目的は、ブロック共重合体から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能評価と細胞に対する作用メカニズムの解析を通して、ベクター設計の最適化を行うことである。本研究では、ブロック共重合体のカチオン構造の最適化に加えて、環境応答性や標的認識機能を賦与することにより、様々な機能を具備した高分子ミセルを構築した。さらに、蛍光エネルギー移動(FRET)法、スフェロイド培養実験、ハウスキーピング遺伝子の発現変動評価などの人工ベクターの新しい機能解析法を確立し、それらを駆使することによって、高分子ミセルが遺伝子ベクターとして有効に機能することを明らかとした。

A. 研究目的

遺伝子治療における最も重要な課題の一つはベクターの開発であり、安全性と製剤性に優れ、比較的安価な非ウイルス型遺伝子ベクターに対する期待が高まっている。これに関連して、分担研究者である片岡らは、ポリエチレングリコール(PEG)-ポリカチオンブロック共重合体が DNA と静電的に相互作用することで形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発を行ってきた。高分子ミセルは、ウイルス (~50ナノメートル) と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究において、は図1に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時 (timing) に、必要な部位 (location) で、必要な診断や治療 (action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出することを目的としている。

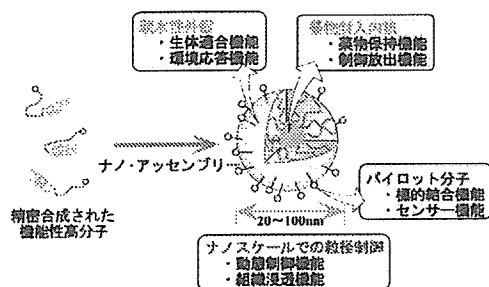


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

B. 研究方法

1) 種々カチオン性連鎖を有する新規ブロック共重合体の合成

本研究では、当研究室において合成法を確立している PEG-poly(β -benzyl L-aspartate)(PEG-PBLA)の PBLA 側鎖のベンジルエステルのエステル-アミド交換反応を利用して、種々のカチオン構造を定量的かつ効率的に PBLA 側鎖に導入した。これによって、PEG-ポリカチオンライブラリーを構築し、形成された高分子ミセルの化学構造-機能(遺伝子発現効率、細胞毒性)相関について検討した。高分子ミセルは、N/P比(DNA のリン酸残基に対するカチオン性アミノ基のモル数)を変化させて、10mM トリス緩衝液(pH7.4)中でブロック共重合体とプラスミド DNA を混合することにより調製した。

2) 環境応答性と標的指向性を賦与した高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

*in vivo*において有効に機能する遺伝子ベクターを構築するためには、(i)標的細胞に到達するまではプラスミド DNA(pDNA)を安定に保持する一方で、標的細胞内では効率的に pDNA を放出する環境応答性や(ii)標的細胞に結合し、ベクターの細胞内取り込みを促進する標的認識機能を合成ベクターに創り込むことは極めて有効であると考えられる。そこで本研究では、

PEG-poly(L-lysine)(PEG-PLL)ブロック共重合体の PLL 側鎖にチオール基を導入し、pDNA を内包した内核がジスルフィド(SS)架橋で安定化された高分子ミセルを開発した。

SS 架橋は、非還元的環境下である細胞外では極めて安定であるが、還元的環境下である細胞質内では選択的に開裂する環境応答性を有している。また、高分子ミセルに標的認識能を賦与するために、がん細胞や血管新生部位で特異的に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合する環状 RGD(c(RGDfK))ペプチドを PEG 末端に導入した。調製された高分子ミセルの機能は、物性評価(pDNA のリリースなど)、培養細胞への遺伝子導入、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察によって評価した。

3) 二重蛍光標識 pDNA を用いた蛍光顕微鏡による細胞内動態評価法の確立

Label-IT Nucleic Acid Labeling Kit を用いて、fluorescein と Cy3 の二重蛍光標識を施した pDNA は、ベクター内の凝縮状態では蛍光エネルギー移動(FRET)が惹起され、ベクターから pDNA が放出されると FRET が解消される。本研究では、この原理を利用した細胞内におけるポリプレックスからの pDNA リリースを評価した。

4) 固形がんモデルとしてがん細胞スフェロイドを用いた遺伝子ベクター評価法の確立

本研究では、固形がんモデルとしてがん細胞スフェロイドを用いた遺伝子ベクターの機能解析を行った。本手法によって、実際の固形がんのミクロ環境を再現した状態で、遺伝子ベクターの機能(遺伝子発現、毒性)を評価することが可能であり、さらに遺伝子発現の時間依存性やベクターの組織浸透性も評価することができる。

5) ハウスキーピング遺伝子の発現変動を利用した遺伝子ベクターの安全性評価法の確立

合成ベクターによる遺伝子デリバリーにおいては、合成ベクターを構成するポリカチオンが細胞に与える影響について十分に考慮しなければならない。そこで本研究では、ポリプレックスを用いた遺伝子導入に

伴う細胞のハウスキーピング遺伝子の発現量変動をそれぞれの遺伝子に対する primer を用いた定量 PCR により評価した。これによって、ポリプレックスを用いた遺伝子導入が遺伝子導入細胞のホメオスタシスに与える影響を評価することができるものと思われる。

C. 研究結果

1) 種々カチオン性連鎖を有する新規ブロック共重合体の合成

上述の PEG-PBLA のエステル-アミド交換反応によって異なるポリカチオン構造を有するブロック共重合体を合成し、高分子ミセルの遺伝子発現および細胞毒性をそれぞれルシフェラーゼアッセイおよび MTT アッセイにより評価した。その結果、PEG-PBLA 側鎖にジエチレントリアミン(DET)の導入により調製される PEG-PAsp(DET)が極めて効率的かつ低毒性な遺伝子導入を可能にすることが明らかとなった。PEG-PAsp(DET)は、側鎖にエチレンジアミン構造を有しており、細胞外 pH(7.4)からエンドソーム内 pH(5.5)に変化することによって、モノプロトン化状態(*gauche* 構造)からジプロトン化状態(*anti* 構造)にコンホメーション転移する。これに伴って、PEG-PAsp(DET)は強力な buffer 能を発揮するとともに、*anti* 構造のエチレンジアミン構造がエンドソーム膜に障害を与えるものと考えられ、その結果として効率的な遺伝子発現が惹起されることが示唆された。

2) 環境応答性と標的指向性を賦与した高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

内核に SS 架橋を導入した高分子ミセルは、非還元的環境では pDNA を安定に保持する一方で、還元的環境では効率的に内包 pDNA を放出することを電気泳動により明らかとした。また、SS 架橋導入高分子ミセルは、賦形剤を使用せずに凍結乾燥をすることが可能であり、製剤化においても大きな利点を有することが明らかとなった。また、SS 架橋導入高分子ミセルは、尾静脈投与において、肝実質細胞に均一に遺伝子導入できることが蛍光蛋白質(YFP)の遺伝子

発現評価により確認された。

さらに本研究では、SS 架橋導入高分子ミセルの末端に環状 RGD ペプチドを導入したところ、HeLa 細胞に対してリガンド-受容体結合を介した効率的な遺伝子発現が確認された。興味深いことに、環状 RGD ペプチドが有効に機能するためには、SS 架橋が必要であり、SS 架橋導入率が 11%の場合において、環状 RGD 導入ミセルはリガンド分子を導入してないミセルの 32 倍の遺伝子発現効率を示した。また、環状 RGD 導入ミセルの効率的な遺伝子発現は、細胞内取り込み量の増加ではなく、細胞内 Trafficking の変化によるものであることが pDNA の取り込み量の測定と細胞内局在の CLSM 観察により明らかとなった。

3) 二重蛍光標識 pDNA を用いた蛍光顕微鏡による細胞内動態評価法の確立

細胞内におけるポリプレックスからの pDNA のリリースを CLSM による FRET 観察により評価したところ、効率的な遺伝子発現を示す linear PEI によるポリプレックスでは細胞内における効率的な DNA リリースが確認され、linear PEI(LPEI)よりも低い遺伝子発現効率を示す Branch PEI(BPEI)や PLL からなるポリプレックスでは細胞内における DNA のリリースが遅いことが明らかとなった。このように、ポリプレックスによる効率的な遺伝子発現のためには、エンドソームから細胞質への効率的な移行に加えて、細胞質および核内で速やかに内包 DNA が放出される特性が必要とされるものと思われる。そこで本研究では、項目 1)で開発した異なるカチオン構造を有するポリカチオンから形成されるポリプレックスについて、細胞内 FRET を評価したところ、最も効率的な遺伝子発現を示した PAsp(DET)が細胞内で効率的な DNA リリースを達成することが明らかとなった。このように、PAsp(DET)は、上述の優れた細胞質内移行性に加えて、細胞内での効率的な DNA 放出によって高い遺伝子発現を示すものと思われる。

4) 固形がんモデルとしてがん細胞スフェロイドを用いた遺伝子ベクター評価法の確立

がん細胞スフェロイドを用いることによって、従来の単層培養では困難であった長期における遺伝子発現評価と感度に優れた毒性評価が可能となり、その結果、(i)PAsp(DET)が低毒性と高い遺伝子発現活性を兼ね備えたポリカチオンであること、(ii)PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルは、PAsp(DET)から形成されるポリプレックスより、遅延された遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また、400-500 μm の大きながん細胞スフェロイドを用いて、ポリプレックスおよび高分子ミセルの遺伝子発現評価を行ったところ、高分子ミセルはスフェロイド中心の Hypoxia への遺伝子導入を可能にすることが明らかとなった。このような高分子ミセルによる Hypoxia 領域への遺伝子導入は、その優れたがん組織浸透性に起因することが、200 μm のスフェロイドに対する蛍光標識 pDNA の浸透性の評価により確認された。このように、がん細胞スフェロイドを用いることによって、in vivo 環境を模倣した条件で人工ベクターの機能を評価することが可能であり、この評価を通じて、PEG-PAsp(DET)の in vivo 応用に向けた優れた特性が示唆された。

5) ハウスキーピング遺伝子の発現変動を利用した遺伝子ベクターの安全性評価法の確立

ポリプレックスを用いた遺伝子導入過程の導入細胞のホメオスタシスに対する影響をハウスキーピング遺伝子の発現変動により評価したところ、LPEI を用いた遺伝子導入ではハウスキーピング遺伝子の発現量が顕著に減少することが確認された。この結果は、LPEI による遺伝子導入が細胞に致命的なダメージを与えないまでも、細胞のホメオスタシスに大きな影響を及ぼしていることを示唆しているものと考えられる。一方、PAsp(DET)を用いた遺伝子導入では、ハウスキーピング遺伝子の発現量はほとんど変化しないことが明らかとなった。このように、PAsp(DET)は、細胞の正常機能を阻害しないことが示唆され、これは遺伝子導入による細胞機能の人為的制御において重要な特性であると考えられる。

D. 考察

1) 達成度について

本研究では、PEG-PBLA ブロック共重合体のエステル-アミド交換反応による PEG-ポリカチオンライブラリーの構築を行い、さらにブロック共重合体への環境応答性および標的認識機能の賦与を行うことによって、遺伝子ベクターとして機能する高分子ミセルの設計理論を確立した。その一方で、細胞内 FRET 観察、スフェロイド培養実験、ハイスケーピング遺伝子の発現変動量測定などの合成ベクターの新規機能解析法を開発した。このようなベクター構築法とその機能評価法の開発を通じて、高分子ミセル型ベクターの最適化を行い、さらに他の合成ベクターとの比較による優れた特性(低毒性、組織浸透性など)が明らかとした。これらの研究成果は、新しい高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築し、その機能発現メカニズムを明らかにするという当初の目標をほぼ達成するものであると言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子治療の実用化は、ベクターの開発に依存していると言っても過言ではない。本研究で開発した高分子ミセル型遺伝子ベクターは、従来の合成ベクターと比較して低毒性かつ効率的な遺伝子導入を可能とし、遺伝子治療の実用化を実現するベクターとして期待される。さらに本研究では、高分子ミセルに環境応答性や標的認識機能を賦与し、それらが有効に機能することを確認した。高分子ミセルの最大の特徴は、構成要素であるブロック共重合体の創り込みによって様々な機能を賦与できる点であり、本研究成果はベクターの高機能化のための分子設計として重要な知見を与えるものと考えられる。また、本研究で開発したベクターの機能評価法は、合成ベクターの新しい評価法として、学術的のみならず実用的な観点から大きな意義を有するものと考えられる。細胞内 FRET の観察は、細胞内におけるベクターの挙動をより詳細に追跡することを可能とし、成果として報告した論文は国内外の多くの研究者らによって引用されている。がん細胞スフェロイドを用い

た合成ベクターの機能評価法は、ベクターの *in vivo* 応用において考慮すべきであるベクターの生体適合性、遺伝子発現の時間依存性、組織浸透性を評価することが可能であり、*in vivo* 応用を目指した合成ベクターの評価法として大きな注目を集めるであろう。ハウスキーピング遺伝子の発現変動量測定による合成ベクターの毒性評価は、遺伝子導入による細胞の分化誘導などの目的において極めて重要であると考えられる。すなわち、細胞機能の人為的制御においては、遺伝子発現効率のみに着目するのではなく、遺伝子導入が細胞に与える影響についても十分に考慮する必要があると考えられ、合成ベクターの新しい評価法として国内外に大きなインパクトを与えることが予想される。

3) 今後の展望について

今後は、高分子ミセル型遺伝子ベクターの *in vivo* 応用をさらに進める予定である。これまでに、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルは、硬化性病変を伴った血管壁への遺伝子導入や遺伝子導入による骨再生などの局所遺伝子導入において、従来型合成ベクターより優れた遺伝子導入効果が確認されており、今後は実用化に向けた研究を展開する。一方、環境応答性と標的認識機能を賦与した高分子ミセルは、全身投与型の遺伝子ベクターとして、担ガンマウスを用いた *in vivo* 実験を展開していく予定である。また、本研究において、確立した合成ベクターの機能評価法は、ベクターのスクリーニング法として発展させ、実用化に結びつけたいと考えている。

E. 結論

本研究では、遺伝子ベクターの構築とその機能評価法の開発を通じて、*in vivo* 遺伝子治療のための高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築し、本システムがリポプレックスなどの従来型ベクターよりも優れた機能を有することを明らかとした。また、本研究で開発した合成ベクターの機能評価法は、創薬やバイオマテリアルの設計にも利用できるものと考えられる。これらのシステムの実用化に向けた今後の展開が期待される。