

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

核酸をコアとするナノ微粒子による薬物・免疫治療システムの
開発に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 西川 元也

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

| | |
|--------------------------------------|---------|
| I. 総括研究報告書 | |
| 核酸をコアとするナノ微粒子による薬物・免疫治療システムの開発に関する研究 | |
| 西川元也 | ----- 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 7 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 8 |

研究要旨 前年度までの検討において、非メチル化 CpG 配列（CpG モチーフ）を含む DNA をカチオン性リポソームとの複合体とすることで高い抗腫瘍効果が得られる反面、カチオン性化合物による非特異的な毒性も認められた。そこで本年度は、複合体化以外の方法で CpG DNA の抗腫瘍免疫活性を増大することとし、それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類のオリゴヌクレオチド（ODN）を用いることで Y 型 2 本鎖 ODN（Y-ODN）を構築した。マクロファージ様細胞株 RAW264.7 に添加したところ、一本鎖（ss-）および二本鎖（ds-）ODN と比較して Y-ODN の場合には活性の強い CpG モチーフを含まない場合でも有意に高い腫瘍壊死因子（TNF）- α およびインターロイキン（IL）-6 が産生された。この活性増大には Y 型化による細胞取り込み量増大の関与が示唆された。そこで Y-ODN に免疫活性化能の高い CpG モチーフを組み込んだところ、非常に高いレベルのサイトカイン産生および高い癌細胞増殖抑制効果を示した。一方、腫瘍内に浸潤する免疫担当細胞を標的とした DNA-抗癌剤デリバリーについて、プラスミド DNA-ドキシソルビシン（DXR）結合体の有用性を評価した。癌細胞と RAW264.7 細胞との共培養系での評価において DNA-DXR 結合体が最も効率よく癌細胞増殖を抑制した。DNA あるいは DXR 単独投与群と比較して DNA-DXR 結合体は、担癌マウスモデルにおいて高い癌細胞増殖抑制効果ならびに生存日数の延長効果を示した。

A. 研究目的

癌組織では血管透過性が亢進し、通常血管壁を透過しないサイズの高分子・微粒子が集積することから、サブミクロン、特に直径 100 nm 以下のナノ粒子を利用した癌組織への薬物ターゲティングが期待されている。これまでにも、リポソームやナノスフェアなどをキャリアとした膨大な研究が行われ、その一部についてはすでに臨床使用可能な製剤が開発されている。しかしながら、依然として癌に対する薬物治療が十分に達成されているとは言い難い。一方、癌抗原を投与することで生体に備わる免疫機構を活性化する癌免疫治療も注目を集めている。DNA ワクチンの場合には、DNA 中の非メチル化 CpG 配列、いわゆる CpG モチーフ、による免疫

担当細胞の活性化が、抗原による抗腫瘍免疫効果を増大することが示されている。そこで本研究では、プラスミド DNA（pDNA）またはナノサイズのデンドリマー様 DNA 構造体を用いることで抗癌剤を癌組織へターゲティング可能なナノ粒子を構築し、癌への薬物ターゲティングが可能な新規ナノ粒子型ドラッグデリバリーシステムを開発する。近年、腫瘍組織に集積するマクロファージなどの免疫担当細胞は、腫瘍組織環境下において本来の異物排除機能が低下し、各種メディエータを放出することで癌細胞の浸潤・転移、増殖を亢進することが指摘されている。DNA 中の CpG モチーフは自然免疫機能を活性化することから、本研究で開発する核酸をコアとするキャリアを用いることで腫瘍組

織中の免疫担当細胞の活性化が期待できる。また、DNA はドキソルビシンなど DNA インターカレータをはじめとする各種抗癌剤との結合能を有することから、核酸をコアとするナノ粒子を用いることで、抗癌剤を効率よく癌組織へターゲティングすることも可能である。免疫機能を活性化しつつ抗癌剤による殺細胞効果が期待される本ナノ粒子デリバリーシステムは、メカニズムの異なる2つの治療戦略を融合した新規システムであり、リポソームなど生物学的に不活性なキャリアとは異なり、相乗的かつ高い抗腫瘍効果が期待できる。

B. 研究方法

(1) Y-ODN の構築および CpG モチーフを含む新規 Y 型 DNA の開発：それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類の 30 塩基の ODN を当モルずつ混合し、95 °C で加熱後徐々に冷却することで Y-ODN を調製した。このとき Y-ODN の 1 箇所を強力な CpG モチーフ GACGTT に置換した Y-CpG ODN、3 箇所を置換した Y-3CpG ODN を新たに設計した。別途、対照として Y 型を構成する ODN のうちの 1 種を ssODN、これに相補的な配列を加えた dsODN、Y 型の構成成分すべてを 2 本鎖とした 3 種類の dsODN (dsODN×3) も併せて調製した。各 ODN の見かけのサイズは動的光散乱法により測定した。

(2) 免疫活性化能の評価：マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を播種 (5×10^5 cells/ml) し、24 時間後に各 ODN を種々の濃度 (2、6、18 $\mu\text{g/ml}$) で添加した。活性化の指標として、上清中 TNF- α および IL-6、IL-12 濃度を ELISA 法により測定した。

(3) 安定性の評価：Y-ODN および dsODN に DNase I (0.75 U/10 μg DNA) または 50 % 未変性 fetal bovine serum (FBS) を添加し、37 °C でインキュベートした。EDTA の添加により

反応を停止後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により各 ODN の分解を評価した。

(4) ODN の細胞取り込み：FITC 標識した各 ODN を種々の濃度で RAW264.7 細胞に添加した。1 時間後に flow cytometry により測定した細胞の蛍光強度を指標に ODN の細胞取り込みを評価した。

(5) 癌細胞増殖抑制効果：RAW264.7 細胞に各 ODN (10 $\mu\text{g/ml}$) を添加 8 時間後の上清を conditioned medium (CM) として回収した。ホタルルシフェラーゼを安定に発現するマウスメラノーマ B16-BL6 細胞 (B16-BL6/Luc) をモデル癌細胞として用い、これに各 CM を添加した。48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することで癌細胞増殖を評価し、各 ODN 処理による癌細胞増殖抑制効果を判定した。

(6) pDNA-DXR 結合体の調製：pcDNA3.1 あるいは pCMV-Luc を DXR と種々の重量比で混合し、室温で 1 時間静置することで結合体を調製した。DXR の結合は DXR の蛍光を測定することで評価した。

(7) pDNA-DXR 結合体による癌細胞増殖抑制：トランズウェル上段に RAW264.7 細胞 (2×10^5 cells/ml) を、下段にホタルルシフェラーゼ (Luc) を安定に発現するマウス結腸癌細胞 colon26/Luc または B16-BL6/Luc 細胞 (4×10^4 cells/ml) を播種した。培養 24 時間後に DXR または pDNA、pDNA-DXR を RAW 細胞側に添加し、一定時間培養後ルシフェラーゼ活性を指標に癌細胞数を測定した。

(8) 担癌マウスでの DNA に対する免疫応答：colon26/Luc を BALB/c 雄性マウスの背部皮下 (3×10^5 cells/mouse) または腹腔内、門脈内 (いずれも 1×10^5 cells/mouse) に移植することで、固形腫瘍、腹膜播種、肝転移モデルマウスを作成した。一定期間経過後、担癌マウスに pcDNA3.1 を 250 μg DNA/mouse の投与量で静脈内投与し、2 時間後の血清お

よび肝臓、脾臓中 TNF- α 濃度を ELISA 法により測定した。

(9) 肝転移抑制効果: colon26/Luc を門脈内に移植 8 日後に pDNA (pcDNA3.1)-DXR、DXR、pDNA を単回静脈内投与した。移植 13 日後に転移臓器である肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を指標に肝転移を評価した。

(10) 抗腫瘍効果: マウス腹水癌 sarcoma-180 (S-180) を 5 週齢 ICR 雌性マウスに 1×10^6 cells/mouse で腹腔内移植することで腹水癌モデルマウスを作成した。移植 6 日および 13 日後に pDNA-DXR を腹腔内投与し、経日的な体重変動と生存日数を評価した。

C. 研究結果

(1) Y-ODN の物性評価: 電気泳動の結果、Y-ODN は約 350 bp 付近に均一のバンドとして泳動された。1 ユニットあたりの塩基数は 90 base であることから、Y-ODN は dsODN と比較して嵩高い構造を持つことが示唆された。動的光散乱法により測定した見かけのサイズは約 7nm であり、Y-CpG ODN、Y-3CpG ODN の場合もほぼ同等の値が得られた。

(2) Y-ODN によるサイトカイン産生: 配列中に強力な CpG モチーフを含まない ODN を RAW264.7 細胞に添加した場合、ODN 濃度の増大に伴い若干量の TNF- α 産生が認められた。これは強力ではないものの配列中に含まれる CpG 配列によるものと推察された。一方、同じ配列の ODN で調製した Y-ODN を添加することで、有意に高い TNF- α の産生が認められた。IL-6 に関しても同様の結果が得られた。

(3) ODN の安定性および細胞取り込み: 以上より、ODN を Y 型とすることでサイトカイン産生能が増大することが示された。そこで、この Y-ODN による高いサイトカイン産生が ODN の安定性の増大によるかについて DNase I または 50%未変性 FBS を用いて検討

した。その結果、いずれの場合においても Y-ODN は dsODN と同様に分解された。一方、FITC 標識 ODN を用いて検討した RAW264.7 細胞への取り込みは、dsODN と比較して Y-ODN で有意に高いことが示された。

(4) CpG モチーフを含む Y-ODN によるサイトカイン産生: ODN に強力な CpG モチーフを挿入することで、RAW264.7 細胞への添加により産生される TNF- α はいずれの群においても顕著に増大した。CpG モチーフ数あたりの TNF- α 産生量で比較すると、Y-CpG ODN は ssCpG ODN をはじめ他の群と比較して有意に高い TNF- α 産生を示した。中でも、配列や CpG モチーフ数などが Y-CpG ODN とすべて同等である dsCpG ODN $\times 3$ との比較では、約 6 倍高い TNF- α および IL-6 の産生が得られた。構造中に強力な CpG モチーフを 3 個挿入した Y-3CpG ODN では、強力な CpG モチーフが 1 個のみの Y-CpG ODN よりも有意に高い TNF- α および IL-6、IL-12 産生が得られた。

(5) 癌細胞増殖抑制効果: 各 ODN を添加した RAW264.7 細胞の CM を B16-BL6/Luc 細胞に添加したところ、サイトカイン産生を反映して Y-3CpG ODN の場合に最も高い癌細胞増殖抑制効果が得られた。

(6) pDNA-DXR による癌細胞増殖抑制: 一定量の pDNA に種々の量の DXR を結合した pDNA-DXR を RAW264.7 細胞に添加したところ、DXR 量の増加に比例して細胞数が減少するとともに、pDNA により誘導される TNF- α 濃度が減少した。そこで以降の検討では、有意な TNF- α 産生が認められる混合比率 (重量比で 10:1) で調製した pDNA-DXR を用いた。トランズウェル上段の RAW264.7 細胞に pDNA を添加することで TNF- α が産生され、これにより下段の colon26/Luc、B16-BL6/Luc 細胞の増殖が抑制された。DXR 単独を添加した場合にも細胞増殖が抑制さ

れたが、pDNA-DXR により最も高い癌細胞増殖抑制効果が得られた。

(7) 担癌マウスにおける pDNA に対する反応性の評価： colon26/Luc 細胞をマウス背部皮下あるいは腹腔内に移植した担癌マウスに pDNA を静脈内投与したところ、正常マウスとほぼ同等の TNF- α 産生が認められた。一方、肝転移モデルマウスにおいては、pDNA の投与により血中および肝臓で正常マウスよりも顕著に高い TNF- α 産生が得られた。

(8) pDNA-DXR による肝転移抑制： pDNA (250 μ g/mouse) の単独投与により、肝臓中癌細胞数は若干減少する傾向が認められたが、依然として 10^7 個程度の癌細胞が検出された。一方、DXR の投与によっても用量依存的な増殖抑制効果が認められた。一定量 (250 μ g/mouse) の pDNA に DXR を結合させた場合には未処置群の 1/10 以下にまで癌細胞数が減少した。

(9) S-180 腹水癌モデルマウスでの延命効果： pDNA-DXR の腹腔内投与群では、腹水癌増殖に伴う体重増加が抑制されるとともに、若干の延命効果が認められた。

D. 考察

CpG DNA により産生されるサイトカインは、Th1 型に分類される抗腫瘍サイトカインが中心であることからその癌治療への応用が期待されている。しかしながら、Toll-like receptor-9 (TLR9) を介する CpG DNA 認識、さらにはサイトカイン産生に関しては、おもにホスホチオエート型オリゴヌクレオチドを用いた検討が行われており、その結果が必ずしも pDNA などのホスホジエステル型 DNA には当てはまらないことも指摘されている。さらには、カチオン性化合物との複合体化により CpG DNA によるサイトカイン産生能は、一般的には増大する傾向にあるが、最近の報告では必ずしも一義的に規定され

ないことも証明されつつある。

本研究では、核酸をコアとすることで、免疫担当細胞からの抗腫瘍サイトカイン産生を誘導し、これによる抗腫瘍剤との相乗効果を目的としたシステム開発を行うが、この DNA による免疫活性化能を最大限に引き出すことを目的に種々の検討を行ってきた。昨年度の検討において、カチオン性リポソーム複合体によるサイトカイン産生は細胞依存的であること、リポソームの組成によっても顕著に異なることを明らかにした。また、CpG ODN とカチオン性リポソーム複合体を投与することで有意な抗腫瘍効果が得られ、一部のマウスにおいては癌を拒絶可能なレベルの抗腫瘍免疫が誘導可能であることも明らかにした。しかしながら、カチオン性リポソームに起因すると考えられる毒性が懸念され、安全な治療システムを構築するためにはカチオン性化合物を利用せずに CpG ODN の有効性を増大することが重要と考えられた。

そこで本年度は、デンドリマー様 DNA の基本骨格である Y 型 ODN を利用したナノ構造体の開発に取り組んだ。その結果、ODN を Y 型とすることで、ssODN や dsODN と比較して有意に高いサイトカイン産生を示すことが見出された。CpG モチーフを含む DNA によるサイトカイン産生には、そのレセプターである TLR9 が関与することが明らかにされている。TLR9 はエンドソームなどの細胞内コンパートメントに存在することから、リガンド-レセプター結合には構造を保持した CpG DNA が細胞内に取り込まれることが必須である。Y 型化による活性増大の機構解明を目的に、ODN の安定性ならびに細胞取り込みを評価した。その結果、Y 型化により RAW264.7 細胞への取り込みが増大する傾向が認められた。dsODN では 60 base で 1 ユニットであるのに対して Y-ODN の場

合には 90 base で 1 ユニットとなる。ODN の細胞取り込みにはサイズ依存性があることが報告されていることから、Y-ODN の取り込みが高いことの理由としてサイズが大きいことが関与する可能性が挙げられる。しかしながら、動的光散乱法により測定した見かけのサイズは Y-ODN、dsODN いずれの場合にも約 7nm であり、詳細については今後検討する予定である。一方、Y 型化により ODN は安定化せず、むしろ若干不安定になる傾向が認められた。末端数が多いことが一つの理由として考えられる。CpG モチーフを挿入した Y-ODN により非常に高いレベルのサイトカイン産生が得られたことから、こうしたユニークな構造を有する DNA 構造体により有効な免疫治療が実現できる可能性が示された。予備検討において、第一世代の dendritic cell 様 DNA の構築に成功しており、今後このボトムアップ型 DNA ナノ粒子の設計・開発を進めていく予定である。

一方、DNA を用いた DXR デリバリーに関しても、pDNA を用いた検討によりその有用性を明らかにした。肝転移モデルマウスを用いた検討において、DXR あるいは pDNA 単独投与群と比較して、pDNA-DXR 結合体投与群では肝臓での癌細胞増殖が有意に抑制された。pDNA 投与により担癌マウスでも高いサイトカイン産生が得られることを確認しており、この結果は pDNA に含まれる CpG モチーフによる抗腫瘍サイトカインの産生と、DXR による殺細胞効果によるものと考えられる。通常、DXR は単独投与の場合には全身に分布し心毒性を示すことが報告されている。DNA にインターカレートさせることで、DXR の組織分布が変化し、特に DNA を取り込む肝臓への移行が増大したことが推察される。今後、DXR の体内動態について検討するとともに、その制御にも取り組む予定である。

E. 結論

CpG モチーフを含む DNA を用いることで TNF- α や IL-12 などの Th-1 型サイトカインを誘導可能であり、ODN の Y 型化により免疫活性化能の増大が得られた。また、DXR を DNA に結合することで、高い抗腫瘍効果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kuramoto Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex. *J. Control. Release*, **115**: 226- 233 (2006).
- (2) Fukuhara Y, Naoi T, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. Plasmid DNA uptake and subsequent cellular activation characteristics in human monocyte-derived cells in primary culture. *J. Pharm. Sci.*, in press.
- (3) Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. *Immunology*, **120**: 295- 302 (2007).

2. 学会発表

- (1) 梅山夕香里、西川元也、山下富義、橋田充、免疫賦活型 CpG オリゴヌクレオチド複合体を用いた腹膜播種性癌転移抑制、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15~16 日
- (2) 西川元也、核酸をコアとするナノサイズ DDS の開発、第 22 回日本 DDS 学会学術集会、2006 年 7 月 7~8 日
- (3) 安田幸代、吉田寛幸、西川元也、高倉喜信、プラスミド DNA による各種初代培養マ

クロファージの活性化、第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会、2006年10月13～14日

(4) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Takakura Y, Cytokine secretion profiles in primary cultured cells and in mice stimulated with plasmid DNA, GPEN2006, 2006年10月25～27日

(5) 的野光洋、西川元也、高倉喜信、Y型形成によるオリゴヌクレオチドの免疫活性化能の増強、第16回アンチセンスシンポジウム、2006年11月27～28日

(6) 西川元也、核酸をコアとするナノ粒子による薬物・免疫治療システムの開発、第12回創剤フォーラム若手シンポジウム、2006年12月2日

(7) 安田幸代、吉田寛幸、西川元也、高倉喜信、リポプレックスの脂質組成依存的・CpGモチーフ非依存的な免疫細胞活性化現象の解析、日本薬学会第127年会、2007年3月28～30日

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版 年 | ペー ジ |
|---------------|----------------------------|---------------|------------------|-------------|-----|---------|-------------|
| 西川元也, 高倉喜信 | 持続的遺伝子発 現のためのアプ ローチ. | 原島秀吉, 田畑泰彦 | 遺伝子医学 MOOK 5号 | メディカ ルドウ | 大阪市 | 2006 | 118- 123 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|------------------------|-------------------|---------------|------|
| Kuramoto Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M. | Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex. | J. Control. Release | 115 (2) | 226- 233 | 2006 |
| Fukuhara Y, Naoi T, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. | Plasmid DNA uptake and subsequent cellular activation characteristics in human monocyte-derived cells in primary culture. | J. Pharm. Sci. | | | 2007 |
| Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. | DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. | Immunology | 120 (3) | 295- 302 | 2007 |
| Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. | Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting beta-catenin or hypoxia-inducible factor 1 α . | J. Control. Release | 116 (1) | 90-95 | 2006 |
| Kawase A, Isaji K, Yamaoka A, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. | Enhanced antigen-specific antibody production following polyplex-based DNA vaccination via the intradermal route in mice. | Vaccine | 24 (27- 28) | 5535- 5545 | 2006 |
| Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Kuramoto Y, Yamashita F, Hashida M. | Analysis of in vivo nuclear factor- κ B activation during liver inflammation in mice: prevention by catalase delivery. | Mol. Pharmacol. | 71 (2) | 446- 453 | 2007 |
| 西川元也 | ベクターに対する生体反応の制御に基づく in vivo 遺伝子発現の最適化. | 薬学雑誌 | 126 (11) | 1029- 1037 | 2006 |
| 西川元也, 竹本誠 二, 高倉喜信 | 体内・細胞内動態制御機能を搭載した熱ショックタンパク質の開発とワクチンデリバリーへの応用. | 薬学雑誌 | 127 (2) | 293- 300 | 2007 |

3. 持続的遺伝子発現のためのアプローチ

西川元也・高倉喜信

持続的な遺伝子発現は実現困難ではあるが、遺伝子治療には重要な課題である。プラスミドDNAのヌクレアーゼに対する安定性が低いこと、プロモーター活性が速やかに減弱することが発現期間を短くする原因と考えられる。本稿では、その改善の試みとして検討されているカチオン性キャリアとの複合体化、ハイドロダイナミクス法によるヌクレアーゼ活性の低い細胞質への急速デリバリー、製剤学的工夫によるコントロールリリース、プロモーターの選択、さらには遺伝子発現を低下させる原因となる炎症性サイトカイン産生の抑制を目的としたプラスミドDNAのCpG配列の削減を取り上げ、概説する。

はじめに

遺伝子を組み込んだウイルスやプラスミドDNAを投与することで外来性遺伝子の発現が得られることが報告されて以来、*in vivo* 遺伝子導入による疾患治療が期待されてきた。しかしながら、現状では当初期待された効果からは程遠く、治療上有効な遺伝子治療の実現には解決すべき問題が山積しているのが現状である。

一般に、ウイルスを用いない遺伝子導入法では、ほとんどの場合、目的タンパク質のcDNAを組み込んだプラスミドDNAが用いられるが、こうした非ウイルス型遺伝子導入法はウイルスベクターを用いる方法と比較すると安全で、生産性にも優れることが利点とされる。その一方で、遺伝子導入・発現の効率が低いことや発現が持続しないことが大きな問題点として指摘されている。遺伝子治療においては、①遺伝子発現の標的細胞選択性、②発現レベル、③発現期間、④発現細胞数などが遺伝子導入による治療効果を左右すると考えられ

るが、これらの項目の重要度は対象疾患に依存する(表①)。例えば、ジストロフィン欠損が原因の遺伝性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの場合には、四肢の筋肉細胞や心筋、横隔膜など全身の筋肉細胞への遺伝子導入が必須であり、できるだけ多くの筋肉細胞での持続的な遺伝子発現が重要であるが、発現レベルは正常の約20%程度で十分であることが示されている。一方、血友病を対象とした遺伝子治療では、循環血中の血液凝固因子が薬理効果を発揮するため、遺伝子発現細胞は本来の産生細胞である肝細胞である必然性は低い。しかしながら、こうした欠損遺伝子の補充を目的とする場合には、治療効果や患者のQOLの観点から、持続的な遺伝子発現、すなわち投与回数の減少が要求される。臨床試験で最も多くの症例がある癌遺伝子治療を目的としたサイトカイン遺伝子や自殺遺伝子導入の場合には、発現がどの程度持続すればよいかは明らかではないが、持続的発現が有効である場合が多いものと考えられる。

key words

プラスミドDNA, ヌクレアーゼ, ハイドロダイナミクス法, カチオン性キャリア, CMV プロモーター, 炎症性サイトカイン, CpG モチーフ

表① 導入遺伝子と治療効果を得るために必要となる遺伝子導入・発現特性

| 導入遺伝子 | 必要となる遺伝子導入・発現特性 | 代表的疾患 |
|-------------------------|--|-------------------------------------|
| 遺伝的欠損タンパク質： 細胞内タンパク質 | ① 標的細胞への遺伝子導入が必須 ③ 持続的な遺伝子発現が望まれる ④ 遺伝子導入（発現）細胞数も治療効果に影響を及ぼす | デュシェンヌ型筋ジストロフィー，オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 |
| 遺伝的欠損タンパク質： 血漿タンパク質 | ② 遺伝子発現レベルは低くても有効な場合がある ③ 持続的な遺伝子発現が望まれる | 血友病，アデノシンデアミナーゼ欠損症 |
| 各種サイトカイン | ② 遺伝子発現レベルは低くても有効な場合がある ③ 持続的な遺伝子発現が望ましい | 癌，ウイルス感染 |
| (血管内皮)細胞増殖因子 | ① 組織レベルでの標的部位近傍への発現が必要 | 閉塞性動脈硬化症，心筋梗塞・狭心症 |

必要となる特性としては、①遺伝子導入・発現の標的細胞選択性、②発現レベル、③発現期間、④発現細胞数に関して、必要と考えられるもののみを記した。

遺伝子発現の持続は、用いるベクターや投与方法、標的細胞に大きく依存する。プラスミドDNAを用いた際の遺伝子発現期間は、ウイルスベクターと比較して短い傾向にある。従って、安全性に優れた非ウイルス型遺伝子導入法を有効な疾患治療法とするためには、その発現期間の大幅な延長が必要である。そこで本稿では、プラスミドDNAの安定化（分解の抑制）、持続的遺伝子導入、プロモーターの選択、炎症性サイトカイン産生の抑制など、プラスミドDNAによる遺伝子発現を持続化する試みについて概説する。

I. プラスミドDNAの安定化

持続的な遺伝子発現の実現には、目的タンパク質のcDNAをコードしたプラスミドDNAが遺伝子発現に必要な構造を保持した形で存在することが必須である。しかしながら、プラスミドDNAは他のDNA同様ヌクレアーゼにより分解されることから、生体に投与しても遺伝子発現に必要とされる細胞内・核内に到達するまでに分解を余儀なくされる。従って、その安定性を改善することは遺伝子治療を実現するうえで最重要課題である。

1. プラスミドDNAの安定性

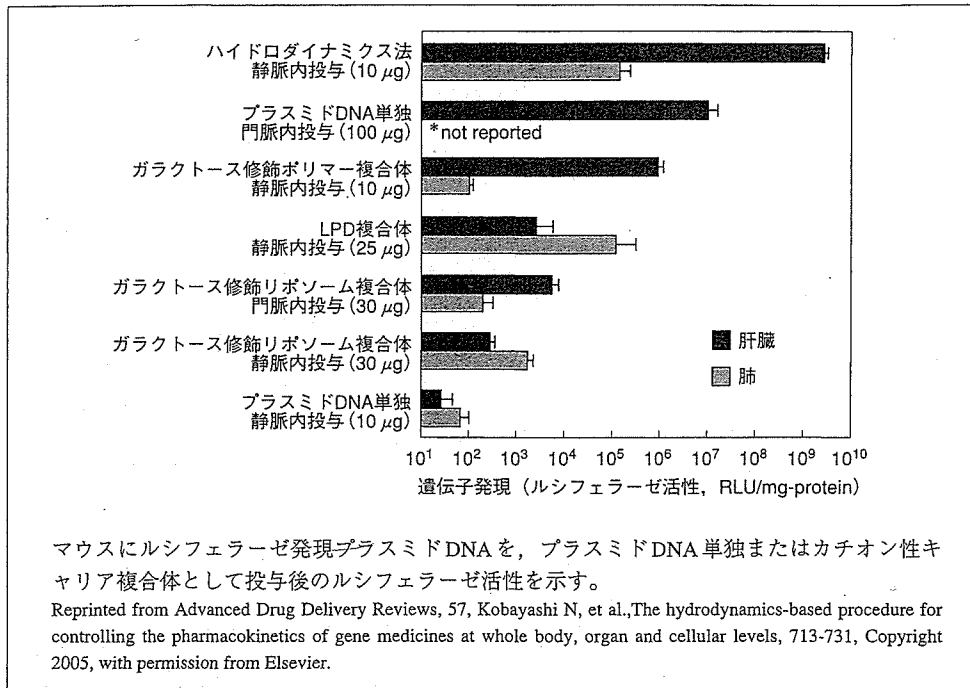
プラスミドDNAは、ヌクレアーゼに対する安定性が低いことと、細胞内への移行性が著しく低いため、遺伝子発現を目的とした検討においてはベ

クター（キャリア）を利用することによる改善が試みられている。実際、プラスミドDNAは血清中で速やかに分解されること、また *in vivo* 条件化ではさらに分解速度が大きいことが示されている²⁾。通常、検討においては supercoil 型のプラスミドDNAが投与されるが、投与後速やかに open circular 型から linear 型に変換され、さらに小さく分解される。open circular 型や linear 型のプラスミドDNAは、遺伝子発現効率が supercoil 型と比較して、それぞれ90%、10%であること、各型式のプラスミドDNAはそれぞれ固有の血中消失パターンを示すことも報告されている。

血清中のヌクレアーゼに加えて、マクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞が細胞を取り込むことによるクリアランスも指摘されている。われわれは、マウスから単離した細胞を用いた検討から、プラスミドDNAはマクロファージや樹状細胞に効率よく取り込まれたのちに細胞内で分解され、その分解産物が細胞外へ放出されることを報告した²⁴⁾。生体内においても、静脈内投与されたプラスミドDNAは、血中で分解を受けると同時に肝臓のクッパー細胞と類洞内皮細胞に速やかに取り込まれることが示されている²⁵⁾。

生体内では主にプラスミドDNAはヌクレアーゼにより分解されることから、DNAが分布する局所でのヌクレアーゼ活性がプラスミドDNAの分解に

図1 各種遺伝子投与方法による遺伝子発現レベルの比較 (文献9より)



は大きく寄与する。静脈内投与の場合と比較して、プラスミドDNA単独の注射で比較的良好な遺伝子発現が得られる筋肉組織では、注射4時間後においてもプラスミドDNAが安定に組織中に存在することが示唆されており⁹⁾、ヌクレアーゼ活性が低いことも筋肉での良好な遺伝子発現と関連する可能性が示されている。

2. コンプレックス化による安定性の改善

カチオン性リポソームやポリカチオンとの複合体化は、プラスミドDNAの細胞取り込みを大幅に増大すると同時に、ヌクレアーゼによる分解を抑制する。これはDNAを複合体の中に取り込むことで、ヌクレアーゼによる認識を物理的に回避することによって考えられる。しかしながら、*in vivo*に適用した際には、しばしば血中投与時には肺への塞栓、あるいは組織内投与の場合には組織内拡散の制限などの問題に加え、細胞内へ到達した後も効率的なプラスミドDNAの放出が問題となることが多い。後者の問題については、ポリエチレニンなどのいわゆるプロトンスポンジ効果をもつ化合物の利用により、ある程度克服可能である

ことが示されている。Kataokaらのグループは、新規ブロックコポリマーを合成し、細胞内での複合体からのプラスミドDNAの放出を促進することで、培養細胞において高い遺伝子発現を得ている⁷⁾。

3. 急速投与による分解回避と高効率遺伝子発現

細胞外環境と比較すると細胞質のヌクレアーゼ活性は低いため、速やかに細胞質へプラスミドDNAを送り込むことでもプラスミドDNAの分解は回避可能である。このことは、Liuらにより開発されたハイドロダイナミクス法による遺伝子導入において最も顕著に証明された⁸⁾。ここでは、大用量(体重20gのマウスに対して1.6 ml)のプラスミドDNA生理食塩水を5秒以内に尾静脈内投与するが、これによりプラスミドDNAが血中ヌクレアーゼにより分解されるよりも早く細胞内へ移行するものと考えられる。肝臓での発現が最も高く、それ以外の内臓でも遺伝子発現が検出可能である。本投与方法は、これまでに開発された非ウイルス型遺伝子導入法の中で最も遺伝子発現効率が高い⁹⁾(図1)。そのメカニズムの1つとして細胞膜透過性の亢進¹⁰⁾が示されており、また細胞膜上の小孔

の形成も確認されている¹¹⁾。同様の機構は、一定の電気パルスを与えることで荷電分子の移動を促進するエレクトロポレーションによる遺伝子導入にも当てはまる。実際に、プラスミドDNAを血管内に投与後、エレクトロポレーションを適用することで肝臓や腎臓、脾臓などでの比較的高い遺伝子発現が得られている¹²⁾¹³⁾。

本アプローチでは、血管壁や細胞膜などのデリバリー障壁の物理的圧力による克服が、高い遺伝子発現の実現には最も重要と考えられる。これに加えて、用いられるのが「裸」のプラスミドDNAであることから、プラスミドDNAにとって細胞質内は比較的安定に存在しうる環境であることが推察される。カチオン性キャリアとの複合体をハイドロダイナミクス法で投与した場合には、逆に遺伝子発現効率が大幅に減弱する。

侵襲性が高いことやマウスとヒトとの解剖学的特徴の違いなどから、この遺伝子導入法をそのままヒトに適用することには大きな問題がある。しかしながら、同様の機構に基づく改良型遺伝子導入法が開発されつつあり、肝臓をはじめ腎臓や骨格筋などへの効率的な遺伝子導入が実現されている¹⁴⁾¹⁶⁾。

II. コントロールドリリースによる持続的遺伝子導入

継続的な遺伝子導入が可能となれば、最終的な遺伝子発現も持続的になることが期待される。Ochiyaらは、コラーゲンから抗原性の強いテロペプチドを除いたアテロコラーゲンを利用したプラスミドDNAの徐放化技術を開発し、プラスミドDNAを持続的に放出することが可能であること、さらには投与部位近傍組織での遺伝子発現が長期間持続することを示した¹⁷⁾。Kushibikiらは、生分解性のカチオン化ゼラチンからなるマイクロスフェアを調製し、これにプラスミドDNAを内封することで28日間にわたりDNAが放出されることを示している¹⁸⁾。また、このシステムを用いて肝細胞増殖因子のアンタゴニストを持続的に発現させることに成功し、担癌マウスでの延命効果を得ている。

III. プロモーターの遺伝子発現特性

細胞内に導入されたプラスミドDNAは、そのほとんどがepisomalに存在すると考えられ、染色体にはほとんど組み込まれない。従って、小腸上皮細胞のように細胞ターンオーバーが早い細胞や、細胞分裂が盛んな細胞では遺伝子導入細胞は速やかに減少する。一方、寿命の長い筋肉細胞や肝細胞では少なくとも数ヶ月にわたり細胞は存在するが、プラスミドDNAによる遺伝子発現期間は細胞の寿命と比べると短い。

プラスミドDNAによる遺伝子導入の検討においては、多くの場合、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターが用いられる。CMVプロモーターは多くの細胞で活性であり、他のウイルス由来プロモーターや哺乳類の組織特異的プロモーターと比較して高い遺伝子発現を与えることが多い。従って、遺伝子発現効率の低さが問題となる非ウイルスベクターによる遺伝子導入においては、このプロモーターが繁用されている。しかしながら、CMVプロモーターの場合には初期に高い発現は得られるものの、その活性は非常に速やかに低下する人が多い。肺や肝臓での遺伝子発現は、遺伝子導入後数日中には大きく低下することが示されている。一方、アルブミンプロモーターなどの組織特異的プロモーターは、CMVプロモーターと比較すると長期間の発現が得られるが¹⁹⁾、解決すべき問題点として発現レベルの低さが挙げられる。筋肉での遺伝子発現は、他臓器・細胞よりも持続する傾向にあり、CMVプロモーターを用いた場合でも1年以上遺伝子産物が検出されている。筋特異的プロモーターである筋クレアチンキナーゼプロモーターとの比較では、この組織特異的プロモーターを用いることで、より持続的な発現が得られることが示されている。その理由として、CMVプロモーターの場合には免疫担当細胞でも遺伝子発現が起これ、これが原因となり遺伝子発現細胞が排除されることが考えられる²⁰⁾。

IV. 炎症性サイトカインの産生と持続的遺伝子発現に及ぼす影響

一般に、プラスミドDNAを用いた遺伝子導入法は、ウイルスベクターと比較して安全であるとされている。しかしながら、プラスミドDNAの投与により炎症性サイトカインが産生されること、またこのサイトカインが遺伝子発現に影響を及ぼすことが報告されている。

1. 非メチル化CpG配列と炎症性サイトカインの産生

大腸菌を用いて調製されるプラスミドDNAには、細菌由来DNAの特徴が色濃く残る。その代表的かつ最も重要な特徴が非メチル化CpG配列(CpGモチーフ)である。通常のプラスミドDNAには、治療用タンパク質のcDNAの他にプロモーターやエンハンサー、複製起点、薬剤耐性遺伝子などが並ぶが、治療用タンパク質cDNAを除くほぼ全域にわたってCpGモチーフが存在する。ヒトやマウスの免疫担当細胞には、この異物の侵入を感知するシステムとしてToll-likeレセプター9(TLR-9)が存在し、CpGモチーフを認識することで免疫細胞から炎症性サイトカインが放出されることが明らかにされている。

免疫担当細胞からの炎症性サイトカインの産生は、カチオン性リポソームと複合体(リポプレックス)化することで大幅に増大する。マウス樹状細胞株DC2.4を用いた検討から、プラスミドDNA単独の場合と比較してリポプレックスでは1/10のDNAで同等の腫瘍壊死因子(TNF- α)を誘導した⁴⁾。マウス腹腔マクロファージでは、プラスミドDNA単独ではTNF- α は誘導されなかったが、リポプレックス化することで高いTNF- α 産生が認められた³⁾。静脈内投与されたリポプレックスは投与直後一時的に肺に集積し、結果的にここで高い遺伝子発現が得られるが、肝臓のクッパー細胞がTNF- α などの炎症性サイトカインを産生することが示されている²¹⁾。

上述のように、CMVプロモーターからの遺伝子発現は速やかに減弱するが、この現象には炎症性サイトカインによるプロモーターの不活化やCpG

配列のメチル化が関与する可能性がある。従って、プラスミドDNA中のCpGモチーフは、持続的な遺伝子発現を実現するうえで大きな障壁になるものと考えられる。

2. CpG配列数の低減化による遺伝子発現の持続化

以上より、CpGモチーフ数を減少させることで遺伝子発現の持続化が期待される。その実現には種々の方法が提唱されているが、ここではプラスミドDNA中の遺伝子発現に必要な部分のみをPCRで増幅する試みと、プラスミドDNA中CpG配列の削減の試みを紹介する。

(1) PCR増幅断片による遺伝子導入

通常のプラスミドDNA中には、複製起点oriのようなヒトでの遺伝子発現には不要な配列が存在する。そこでプラスミドDNAをテンプレートとして、必要な部分(プロモーターからpoly Aまで)のみをPCRで増幅することでCpGモチーフ数を減少させることが可能である。Hofmanらは、リポプレックスあるいはDNA単独をハイドロダイナミクス法によりマウスに投与することで、プラスミドDNA同様、遺伝子発現が得られることを報告している²²⁾。予備的な検討ではあるが、われわれもプラスミドDNAと比較して、PCR増幅断片による遺伝子発現はピークの値は低いものの、持続する傾向にあることを明らかにしている。

(2) プラスミドDNA中のCpG配列の削減

CMVプロモーターやoriなど、細菌やウイルス由来のDNA配列中にはCpGモチーフが多い。モチーフ中の非メチル化シトシンは酵素的にメチル化することが可能であるが、これにより遺伝子発現活性は大幅に減弱する。Genzyme社のYewらは、CpG中のシトシンをチミン(T)に変換することで、プラスミドDNAから約80%の非メチル化CpG配列の削減に成功している。このベクター(pGZBベクター)をマウスに投与することで、免疫反応が低減可能であること、さらには持続的な遺伝子発現が得られることを証明した²³⁾²⁴⁾。

おわりに

ヒトに遺伝子を導入することで種々の疾患を治

療するためには、遺伝子産物（タンパク質）の生体内運命を厳密に制御することが重要である。かつて生体内半減期が短いことで臨床開発が断念されたタンパク質医薬品候補物質のいくつかは、最近ではポリエチレングリコールとの結合体とすることで血中滞留型製剤として上市されている。タンパク質の直接投与と比較して、遺伝子導入によ

るアプローチでは、持続的なタンパク質の発現による効果の持続が期待されたが、実際には遺伝子の長期発現は非常に挑戦的なテーマである。対象疾患に必要とされる期間にわたって遺伝子発現を持続させることが可能となれば、*in vivo* 遺伝子治療の実現性が飛躍的に高まるものと期待する。

参考文献

- 1) Nishikawa M, Hashida M : Biol Pharm Bull 25, 275-283, 2002.
- 2) Kawabata K, Takakura Y, et al : Pharm Res 12, 825-830, 1995.
- 3) Yasuda K, Kawano H, et al : Immunology 111, 282-290, 2004.
- 4) Yoshinaga T, Yasuda K, et al : Biochem Biophys Res Commun 299, 389-394, 2002.
- 5) Hisazumi J, Kobayashi N, et al : Pharm Res 21, 1223-1228, 2004.
- 6) Satkauskas S, Bureau MF, et al : Mol Ther 4, 317-323, 2001.
- 7) Fukushima S, Miyata K, et al : J Am Chem Soc 127, 2810-2811, 2005.
- 8) Liu F, Song Y, et al : Gene Ther 6, 1258-1266, 1999.
- 9) Kobayashi N, Nishikawa M, et al : Adv Drug Deliv Rev 57, 713-731, 2005.
- 10) Kobayashi N, Nishikawa M, et al : J Gene Med 6, 584-592, 2004.
- 11) Zhang G, Gao X, et al : Gene Ther 11, 675-682, 2004.
- 12) Sakai M, Nishikawa M, et al : Gene Ther 12, 607-616, 2005.
- 13) Thanaketaisarn O, Nishikawa M, et al : Pharm Res 22, 883-891, 2005.
- 14) Budker V, Zhang G, et al : Gene Ther 3, 593-598, 1996.
- 15) Eastman SJ, Baskin KM, et al : Hum Gene Ther 13, 2065-2077, 2002.
- 16) Liang KW, Nishikawa M, et al : Gene Ther 11, 901-908, 2004.
- 17) Ochiya T, Takahama Y, et al : Nat Med 5, 707-710, 1999.
- 18) Kushibiki T, Matsumoto K, et al : Gene Ther 11, 1205-1214, 2004.
- 19) Herweijer H, Zhang G, et al : J Gene Med 3, 280-291, 2001.
- 20) Yuasa K, Sakamoto M, et al : Gene Ther 9, 1576-1588, 2002.
- 21) Sakurai F, Terada T, et al : Gene Ther 9, 1120-1126, 2002.
- 22) Hofman CR, Dileo JP, et al : Gene Ther 8, 71-74, 2001.
- 23) Yew NS, Zhao H, et al : Mol Ther 1, 255-262, 2000.
- 24) Yew NS, Zhao H, et al : Mol Ther 5, 731-738, 2002.

参考図書

- *Non-viral Vectors for Gene Therapy 2nd ed, Huang L, Hung M-C, et al eds, Elsevier, 2005.
- *Human Gene Therapy 12(8), 861-870, Nishikawa M, Huang L, 2001.

西川元也

- 1990年 京都大学薬学部卒業
- 1992年 京都大学大学院薬学研究科修士課程修了
- 1995年 京都大学薬学部助手
- 1996年 薬学博士（京都大学）
- 1999年 米国ピッツバーグ大学博士研究員（～2001年）
- 2002年 京都大学大学院薬学研究科助教授



Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex[☆]

Yukari Kuramoto^a, Makiya Nishikawa^{b,*}, Kenji Hyoudou^a,
Fumiyoshi Yamashita^a, Mitsuru Hashida^a

^a Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

^b Departments of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Received 24 April 2006; accepted 1 August 2006

Available online 12 August 2006

Abstract

Although unmethylated CpG dinucleotide-containing oligodeoxynucleotides (CpG ODN) are able to inhibit tumor metastasis through the induction of antitumor immunity, their stability and delivery to antigen presenting cells needs to be improved. In this study, we formulated a CpG ODN complex with cationic liposomes (CpG ODN-lipoplex) and its antitumor activity was evaluated in peritoneal dissemination models of tumor cells stably labeled with firefly *luciferase* gene. A single intraperitoneal administration of CpG ODN-lipoplex greatly reduced the number of tumor cells to 0.01% or lower compared with that detected in untreated mice, which may be associated with increased production of TNF- α and IL-12. CpG ODN-lipoplex increased the survival time of the tumor-bearing mice, and most long-term survivors rejected rechallenged tumor cells. These results indicate that a single dosing of CpG ODN-lipoplex is effective in inhibiting peritoneal dissemination and inducing long-lasting antitumor immunity.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: CpG ODN; Cationic liposomes; Peritoneal cavity; TNF-alpha; IL-12

1. Introduction

The vertebrate immune system has evolved to recognize certain patterned nucleotide sequence motifs present in the bacterial genome and to elicit immunological reactions to counteract bacterial infections [1]. Previous studies have demonstrated that CpG dinucleotides are present at the expected frequency (1/16 dinucleotides) in bacterial DNA, but they are only about one-quarter as prevalent in vertebrates, and are mostly methylated [2,3].

Recognition of CpG dinucleotides by the innate immune system requires engagement of Toll-like receptor (TLR)-9 on antigen presenting cells [4]. In general, CpG DNA stimulates B cells, dendritic cells (DCs), and monocytes/macrophages to produce cytokines that polarize the T-cell response towards Th-1.

However, the level of immune stimulatory effects of DNA depends to a great degree on the precise bases flanking the CpG dinucleotide. Together with the one or two bases on its 5' and 3' sides, the CpG dinucleotide comprises a CpG motif. Immunostimulatory activities of bacterial DNA can be mimicked by synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG ODN) [5–8]. By examining many possible base combinations, the optimal CpG motif for activating murine immune cells was found to be GACGTT [3,9,10].

The efficacy of CpG ODN in preventing or treating tumor progression or metastasis has been examined in several experimental models [15]. For cancer immunotherapy, the phosphodiester (PO) backbone of CpG ODN is generally substituted by phosphorothioate (PS) to increase the stability against nuclease degradation [11]. PS-type ODN, however, induces potent systemic toxic effects, such as transient anticoagulant activity, activation of complement cascade, and inhibition of basic fibroblast growth factor binding to surface receptors [12–14]. Therefore, we use cationic liposome to prevent enzymatic degradation

[☆] Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

* Correspondence author. Tel.: +81 75 753 4616; fax: +81 75 753 4614.

E-mail address: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp (M. Nishikawa).

of PO-type CpG ODN as substitute for PS modification. Cationic liposomes have been extensively employed as a vehicle for plasmid DNA in gene therapy trials, because they protect plasmid DNA from degradation, enhance its cellular uptake, and greatly improve its transgene expression activity [15]. They are also thought to be useful for the delivery of PO-type ODN, so they are capable of stabilizing PO-type ODN without severe toxic effects. A previous study demonstrated that intravenous injection of lipopolyplex consisting of cationic liposomes, protamine sulfate and PO-CpG ODN inhibited tumor growth in mouse lung [16]. However, there has been no report about the antitumor effect of PO-type CpG ODN complexed with cationic liposomes on peritoneal dissemination. Because immune cells will be involved in the antitumor effects of the ODN complex, its antitumor effects would be dependent on the route of its administration and the metastatic sites of the tumor cells.

In this study, we designed a 26-mer PO-type CpG ODN based on several reports examining the requirements of CpG ODN for immune activation. Then, the CpG ODN/cationic liposome complex, or lipoplex, was formulated and its antitumor activity was examined in experimental peritoneal dissemination models in mice. Using the clones of murine melanoma B16-BL6 cells and colon26 cells stably transfected with firefly *luciferase* gene, the process of tumor metastasis was examined in mice by measuring the luciferase activity in the peritoneal organs after intraperitoneal injection of the luciferase-expressing tumor cells (Hyoudou et al, unpublished data). Our data show that a single administration of CpG ODN-lipoplex induces antitumor Th-1 type cytokines in the abdominal cavity, resulting in the suppression of tumor cell growth, and rejection of peritoneal dissemination.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male C57/BL6 (6-week-old) mice and male CDF1 (6-week-old) mice were purchased from the Shizuoka Agricultural Cooperative Association for Laboratory Animals (Shizuoka, Japan). Animals were maintained under conventional housing conditions. All animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

2.2. Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), RPMI1640 medium, phosphate buffered saline (PBS), and Hanks' balanced salt solution (HBSS) were obtained from Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from GIBCO-Invitrogen (Tokyo, Japan). All other chemicals were of the highest grade available. *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*n,n,n*-trimethylammonium chloride (DOTMA) was purchased from Tokyo Kasei (Tokyo, Japan) and cholesterol was from Nacalai Tesuque (Kyoto, Japan). Oligonucleotides with phosphodiester backbones were purchased from Operon (Tokyo, Japan). The sequences of ODNs

were 5'-TCGACGTTTTGACGTTTTGACGTTTT-3' (CpG ODN), 5'-CCCAGGGATCTCCACCTCCTGACACT-3' (random ODN) and 5'-TGCAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTT-3' (GpC ODN). The levels of TNF- α , and IL-12 (p70) in the peritoneal lavage fluids and culture supernatant were determined by the OptEIA™ set (BD Pharmingen, San Diego, CA).

2.3. Cell lines

Murine melanoma B16-BL6 tumor cells [18], obtained from the Cancer Institute of Japan (Tokyo, Japan), were grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.15% NaHCO₃, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine at 37 °C in humidified air containing 5% CO₂. Murine adenocarcinoma colon26 tumor cells [19] and murine macrophage-like RAW264.7 cells were also grown in 5% CO₂ in humidified air at 37 °C with RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. B16-BL6 cells that stably express the firefly *luciferase* gene (B16-BL6/Luc) were established as previously reported [17]. Colon26 cells expressing the same gene (colon26/Luc) were also established by the same protocol as that for B16-BL6/Luc cells.

2.4. Preparation of lipoplex

Mixtures of DOTMA and cholesterol (1:1 in molar ratio) were dissolved in chloroform, vacuum-desiccated, and hydrated by vortexing in 3 ml sterilized 5% dextrose to give a final concentration of 6 mg/ml total lipids. After hydration, the dispersion was sonicated for 3 min in a bath sonicator at 37 °C. The lipid solution was frozen in liquid nitrogen for 2 min and thawed in a water bath for 6 min at 37 °C. The dispersion was passed through a MILLEX®-GV 0.45 μ m filter unit (Millipore, Bedford, MA, USA). Liposomes with a diameter of 214.7 \pm 6.7 nm were obtained using dynamic light scattering (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments, UK). Cationic liposomes and CpG ODN in 5% dextrose were mixed at a charge ratio of 1:2.3 (-/+), i.e., 7.5 μ g total lipid per 1 μ g ODN, and left at 37 °C for 30 min to form a cationic liposome/CpG ODN complex (CpG ODN-lipoplex) [20]. Random ODN and GpC ODN were also mixed with cationic liposomes to obtain random ODN-lipoplex and GpC ODN-lipoplex, respectively.

2.5. Induction of peritoneal dissemination in mice

B16-BL6/Luc cells and colon26/Luc cells were trypsinized and suspended in HBSS. B16-BL6/Luc cells (5.0×10^4 cells in 100 μ l HBSS) or colon26/Luc cells (1.0×10^5 cells in 100 μ l HBSS) were inoculated intraperitoneally into male C57BL/6 mice or male CDF1 mice, respectively.

2.6. Antitumor effect of CpG ODN administration

Soon after tumor inoculation (within 1 min), saline, 5% dextrose, CpG ODN (10 μ g), CpG ODN-lipoplex (ODN: liposome = 1 μ g:7.5 μ g or 10 μ g:75 μ g), random ODN-lipoplex

(ODN:liposome=10 μg :75 μg), GpC ODN-lipoplex (ODN:liposome=10 μg :75 μg), or cationic liposomes (75 μg) were administered into the peritoneal cavity of mice (200 μl 5% dextrose solution/mouse). Seven days after tumor inoculation, the mice were euthanized by cervical dislocation and the intraperitoneal organs (greater omentum, peritoneum, spleen, kidney, and liver) were excised and washed with ice-cold saline. For investigation of the administration route-dependent activity of CpG ODN-lipoplex, CpG ODN-lipoplex was administered intraperitoneally, intravenously, or intradermally (100 μl 5% dextrose solution/mouse). Then the organs were homogenized in a lysis buffer (0.05% Triton X-100, 2 mmol/l EDTA, 0.1 mol/l Tris pH 7.8), and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Ten milliliter of the supernatant was mixed with 100 μl of a luciferase assay buffer (Picagene, Toyo Ink, Tokyo Japan), and the light produced was measured with a luminometer (Lumat LB 9507, EG and G Berthold, Bad Wildbad, Germany). The luciferase activity of the peritoneal organs was converted to the number of B16-BL6/Luc cells using a regression line as previously reported [16]. The luciferase activity derived from colon26/Luc cells was also converted to a cell number using an established regression line. The regression line gave a constant of 3 to 5 RLU/sec/cell for the quantification of the number of B16-BL6/Luc cells and colon26/Luc cells. Measuring the luciferase activity of greater omentum homogenates mixed with B16-BL6/Luc cells or colon26/Luc cells showed that ≥ 300 cells were enough for the detection of these cells (data not shown).

2.7. Effect of CpG ODN on survival of tumor-bearing mice

For investigation of the survival rate of tumor-bearing mice, CDF1 mice were injected intraperitoneally with colon26/Luc cells. Soon after tumor inoculation (within 1 min), mice were treated with saline, liposome only, CpG ODN, CpG ODN-lipoplex, and random ODN-lipoplex intraperitoneally (the number of mice was at least 8 in each group). On day 80, survivors were inoculated again with colon26/Luc cells intraperitoneally. Those surviving then received an injection of colon26/Luc cells into the tail vein 144 days after the first challenge.

2.8. Detection of cytokines produced by RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were plated on 24-well culture plates at a density of 1×10^6 cells/ml and cultured for 24 h. Cells were washed three times with 0.5 ml PBS before use. Naked CpG ODN (2.5 μg) CpG ODN-lipoplex and GpC ODN-lipoplex (ODN:liposome=2.5 μg :18.75 μg) were diluted in 0.5 ml Opti-MEM (Invitrogen). The cells were incubated with Opti-MEM containing lipoplex for 2 h, then, washed three times with PBS and incubated with Opti-MEM for 8 h. The supernatants were collected for ELISA to determine TNF- α .

2.9. Detection of cytokines in peritoneal lavage

C57BL/6 mice intraperitoneally inoculated with B16-BL6/Luc cells received an intraperitoneal injection of CpG ODN-

lipoplex, GpC ODN-lipoplex (ODN:liposome=10 μg :75 μg). One, six, twelve, and eighteen hours later, peritoneal lavage was performed by the injection of 3 ml cold sterile PBS intraperitoneally. The levels of TNF- α and IL-12 (p70) in the peritoneal lavage were determined by ELISA.

2.10. Statistical analysis

Differences were statistically analyzed by Student's *t*-test and Kaplan–Meier analysis with a log-rank test to determine survival.

3. Results

3.1. Inhibition of the proliferation of B16-BL6/Luc cells and colon26/Luc cells in peritoneal organs by CpG ODN-lipoplex

We first examined the number of B16-BL6/Luc cells in the peritoneal organs after inoculation of 5×10^4 cells. About 2×10^6 cells were found in the greater omentum of the saline-treated mice 7 days after tumor inoculation. The number of the cells in the greater omentum accounted for more than 90% of the total number of tumor cells detected in the peritoneal organs (Fig. 1). Because the proliferation of tumor cells in the greater omentum is life-threatening in peritoneal dissemination patients [21], the number of the cells in the greater omentum was used as an indicator of the antitumor activity of each treatment in the following studies.

CpG ODN-lipoplex significantly reduced the number of tumor cells in the greater omentum at a dose of 1 μg ODN (data not shown). When the dose was increased to 10 μg ODN/mouse, the number of tumor cells was further reduced to about 0.1% of that detected in the saline-treated controls (Fig. 2). Unlike the CpG ODN-lipoplex, the random ODN-lipoplex or GpC ODN-lipoplex slightly reduced the number of cells, suggesting an induction of CG sequence-dependent antitumor response. Naked CpG ODN or cationic liposomes hardly reduced the

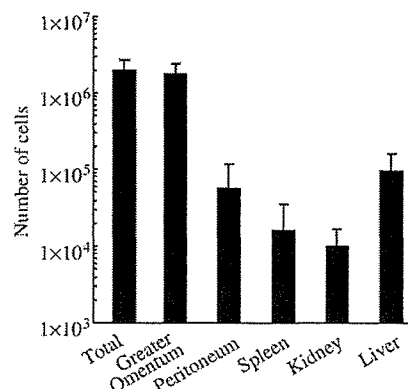


Fig. 1. Number of B16-BL6/Luc cells in peritoneal organs 7 days after inoculation into the peritoneal cavity of mice. C57BL/6 mice were inoculated intraperitoneally with 5×10^4 B16-BL6/Luc cells. Seven days after inoculation, mice were sacrificed and luciferase activity in the greater omentum was measured. Results are expressed as mean \pm SD of five mice. The experiment shown is representative of two experiments with similar results.

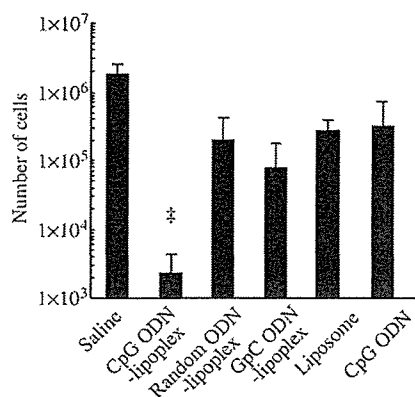


Fig. 2. Effect of CpG ODN-lipoplex on the number of B16-BL6/Luc cells in the greater omentum of mice. C57BL/6 mice were inoculated intraperitoneally with B16-BL6/Luc cells. Soon after tumor inoculation, saline, naked CpG ODN, CpG ODN-lipoplex, random ODN-lipoplex, GpC ODN-lipoplex, and cationic liposomes were administrated into the peritoneal cavity. Seven days after injection, mice were sacrificed and the luciferase activity of the greater omentum was measured. Results are expressed as mean+SD of at least four mice. The experiment shown is representative of two experiments with similar results. ‡ $p < 0.01$; The number of cells was significantly different from saline i.p. group.

number of tumor cells. The treatment with 5% dextrose, the vehicle of CpG ODN-lipoplex, showed no significant effects on the number of tumor cells in the greater omentum (data not shown). These results indicate that complexation with cationic liposomes is essential for CpG ODN to inhibit the proliferation of tumor cells in the peritoneal cavity.

Similar experiments were performed using colon26/Luc tumor cells. No luciferase activity was detected in the greater omentum (<300 tumor cells) of mice receiving CpG ODN-lipoplex (10 μ g ODN), suggesting that the adhesion and proliferation of the tumor cells was almost completely inhibited by the treatment (data not shown).

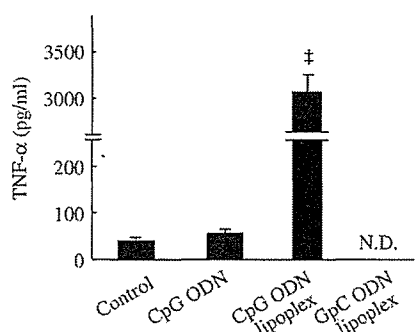


Fig. 3. Secretion of TNF- α from RAW264.7 cells produced by CpG ODN-lipoplex. Naked CpG ODN, CpG ODN-lipoplex or GpC ODN-lipoplex were added to RAW264.7 cells, and incubated for 2 h. Then, the medium was removed and the cells were washed with PBS, and cultured in new medium for 8 h. The presence of cytokines in culture medium was detected by ELISA. Results are presented as mean+SD. The experiment shown is representative of two experiments with similar results. ‡ $p < 0.01$; The concentration of TNF- α was significantly different from the control group (t -test). N.D.; not detected (<16 pg/ml).

3.2. In vitro cytokine production from macrophage-like cell lines

To examine whether macrophages are responsible for the production of the TNF- α by CpG ODN-lipoplex, RAW264.7, mouse macrophage-like cells, were treated with CpG ODN-lipoplex and the concentration of TNF- α and IL-12 (p40) in the supernatants were examined. RAW264.7 cells treated with CpG ODN-lipoplex produced a significant amount of TNF- α (3024 ± 300 pg/ml), while naked CpG ODN produced less TNF- α (56 ± 4 pg/ml) (Fig. 3). However, cells treated with GpC ODN-lipoplex produced a level of cytokines that was below the limit of detection (<16 pg/ml).

3.3. In vivo cytokine production by administration of CpG ODN-lipoplex

The levels of TNF- α and IL-12 (p70) in the peritoneal cavity were below the limits of detection (TNF- α < 16 pg/ml, IL-12 (p70) < 62 pg/ml) at 1 h after intraperitoneal injection of CpG

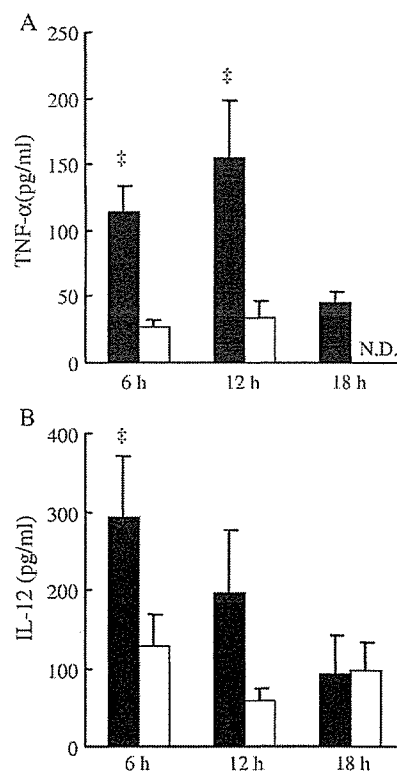


Fig. 4. TNF- α and IL-12 (p70) in peritoneal lavage fluid of mice given an intraperitoneal injection of CpG ODN-lipoplex. B16-BL6/Luc tumor cells were inoculated into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice. Soon after tumor inoculation, CpG ODN-lipoplex (closed bars), and GpC ODN-lipoplex (open bars) were administered to the peritoneal cavity. Six, twelve, and eighteen hours later, ascitic fluid was collected and the levels of TNF- α (A) and IL-12 (p70) (B) were measured by ELISA. Results are presented as mean+SD of at least four mice. The experiment shown is representative of two experiments with similar results. ‡ $p < 0.01$; The concentration of cytokine was significantly different from GpC ODN-lipoplex i.p. group. N.D.; not detected (TNF- α < 16 pg/ml, IL-12 (p70) < 62 pg/ml).

ODN-lipoplex (data not shown). The levels of TNF- α or IL-12 (p70) reached a peak at 12 or 6 h after intraperitoneal injection of CpG ODN-lipoplex, respectively. (TNF- α 155 ± 43 pg/ml, IL-12 (p70) 292 ± 79 pg/ml). On the other hand, GpC ODN-lipoplex induced less TNF- α and IL-12 (p70) secretion in the peritoneal cavity. (Fig. 4)

3.4. Administration route-dependent antitumor activity of CpG ODN-lipoplex

To examine whether the antitumor effect of CpG ODN-lipoplex is induced by local or systemic immune activation, we evaluated the effect of the administration route of the CpG ODN-lipoplex on its antitumor activity. To this end, mice bearing peritoneal B16-BL6/Luc tumor cells were injected with CpG ODN-lipoplex via different administration routes.

Injection of CpG ODN-lipoplex into the tail vein or into the dorsal skin hardly reduced the number of tumor cells in the greater omentum (Fig. 5A). Fig. 5B shows TNF- α and IL-12 (p70) production in the peritoneal cavity after administration of CpG ODN-lipoplex via one of the different routes. In the peritoneal lavage of mice given intravenous or intradermal injections, the level of TNF- α was hardly changed (21 ± 12 pg/ml, 36 ± 4 pg/ml, respectively). As for IL-12 (p70), in mice given

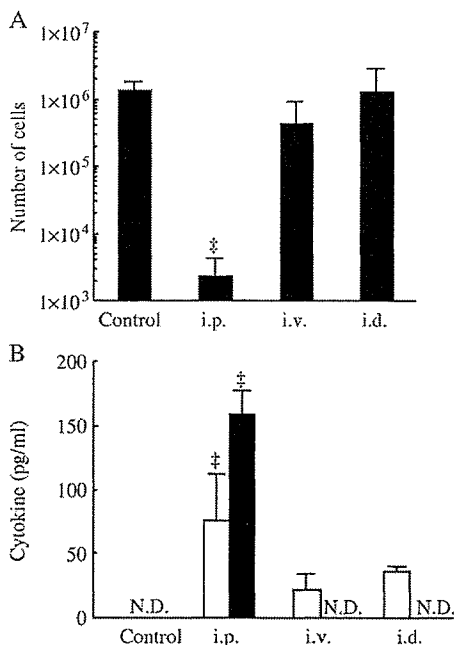


Fig. 5. Effect of the administration route of CpG ODN-lipoplex. (A) The number of B16-BL6/Luc cells in the greater omentum of mice, and (B) TNF- α and IL-12 (p70) in peritoneal lavage. B16-BL6/Luc tumor cells were given to C57BL/6 mice by intraperitoneal injection. CpG ODN-lipoplex was administered intraperitoneally, intravenously, or intradermally following tumor inoculation. (A) After 7 days, mice were sacrificed and the luciferase activity of the greater omentum was measured. $\ddagger p < 0.01$; The number of cells was significantly different from control group (*t*-test). (B) Six hours later, peritoneal lavage was collected and the levels of TNF- α (open bar) and IL-12 (p70) (closed bar) were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD of at least 4 mice. These experiments shown are representative of two experiments with similar results. N.D.; not detected (TNF- α < 16 pg/ml, IL-12 (p70) < 62 pg/ml).

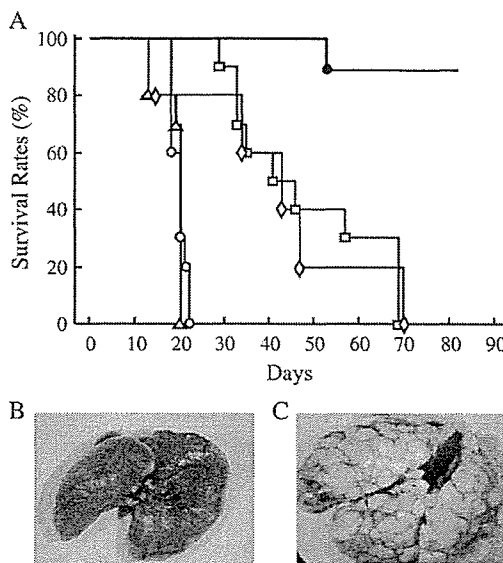


Fig. 6. (A) Survival rate of colon26/Luc tumor-bearing mice. On day 0, CDF1 mice were intraperitoneally inoculated with colon26/Luc cells. Tumor-bearing mice were treated with saline (O), cationic liposomes (\square), naked CpG ODN (Δ), random ODN-lipoplex (\diamond), or CpG ODN-lipoplex (\bullet). (B, C) Representative lung colonies after intravenous injection of colon26/Luc cells. The survival of the CpG ODN-lipoplex was significantly longer than the groups given saline, cationic liposomes, naked CpG ODN, or random ODN-lipoplex ($p < 0.0001$). (B) Long-time survivors; i.e., CDF1 mice that failed to establish peritoneal dissemination after primary and secondary challenge with colon26/Luc cells (these mice received CpG ODN-lipoplex soon after tumor inoculation) were rechallenged intravenously with colon26/Luc cells. At day 200 after the first challenge, all surviving mice were sacrificed. (C) Control mice were injected intravenously with colon26/Luc cells. After 20 days, mice were sacrificed. The experiment shown is representative of two experiments with similar results.

intravenous or intradermal injections, the level of production was below the limits of detection, which was in marked contrast to the results obtained with the intraperitoneal CpG ODN-lipoplex as mentioned above. These results suggest that the local immune response in the peritoneal cavity is essential for inhibition of the peritoneal dissemination of tumor cells by the CpG ODN-lipoplex.

3.5. Prolongation of survival time of colon26/Luc-bearing mice by CpG ODN-lipoplex

Fig. 6A shows the survival rate of CDF1 mice after inoculation with colon26/Luc cells in the peritoneal cavity, followed by the intraperitoneal injection of saline, cationic liposomes, naked CpG ODN, CpG ODN-lipoplex, or random ODN-lipoplex. The saline or CpG ODN-treated groups all died by day 20. Cationic liposomes or random ODN-lipoplex slightly increased the survival time. However, about 90% of the CpG ODN-lipoplex-treated mice survived more than 80 days.

To examine whether the surviving mice acquired immunity to colon26/Luc cells, they were again given intraperitoneal injections of the tumor cells without any additional CpG ODN-lipoplex. Table 1 summarizes the survival time in mice rechallenged with these tumor cells. Although 2 out of 8 mice