

detected after TA administration to mice (Fig. 3, A and B). Intravenous injection of any catalase derivative (5000 U/mouse) inhibited the increase in the plasma AST and ALT levels, with significant ( $P < 0.05$ ) inhibition by Man- or Suc-catalase.

Figure 4 shows the survival of mice receiving an intraperitoneal injection of TA. Man- or Suc-catalase significantly increased the survival period compared with the saline-, catalase-, PEG-catalase-, or Gal-catalase-treated group ( $P < 0.01$  for the saline-treated group,  $P < 0.05$  for the catalase-, PEG-catalase-, or Gal-catalase-treated group).

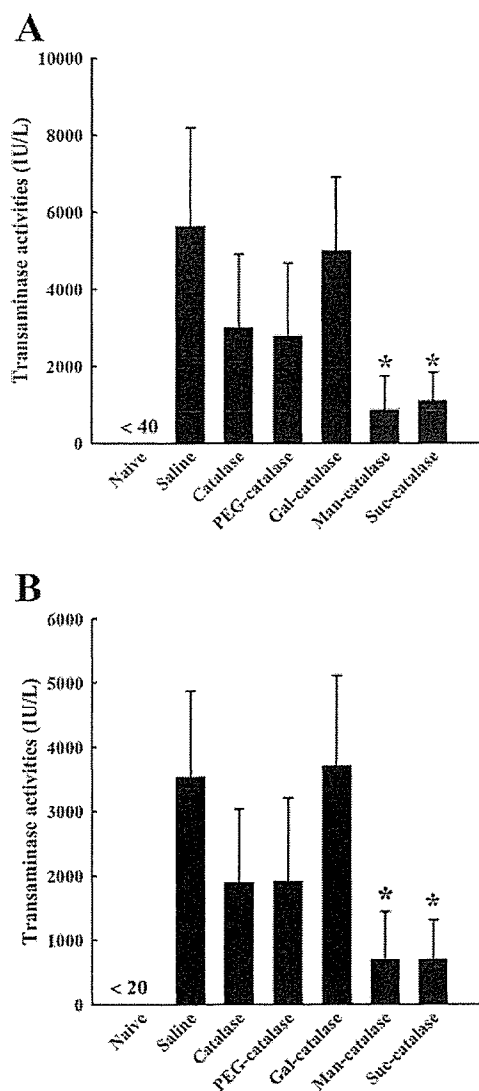
**NF- $\kappa$ B Activation Induced by Lipopolysaccharide Plus D-Galactosamine and Its Prevention by Catalase Derivatives.** The above results demonstrated that the proposed luminescence-based analytical method is effective in evaluating TA-induced fulminant liver injury and its prevention by the catalase derivatives, Man-catalase and Suc-cata-

lase. To examine the versatility and reliability of this analytical method when applied to other disease models, the effect of catalase derivatives on LPS/GalN-induced fulminant liver injury was also investigated. As shown by the quantitative luciferase assay in Fig. 1B, a large amount of firefly luciferase-derived luminescence was detected in the saline-treated mice after injection of LPS/GalN (Fig. 5A). Treatment with catalase, PEG-, or Gal-catalase reduced the luminescence in live mice to a degree, whereas Man- or Suc-catalase markedly inhibited the expression of the firefly *luciferase* gene. A quantitative analysis supported these results (Fig. 5B); Man- or Suc-catalase significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the F/R ratio in the liver of LPS/GalN-treated mice. Plasma ALT and AST levels that were markedly increased by the LPS/GalN treatment were significantly ( $P < 0.05$ ) inhibited by Man- or Suc-catalase (Fig. 6, A and B). The survival of LPS/GalN-treated mice was also significantly ( $P < 0.01$  for the saline-, catalase-, PEG-catalase-, or Gal-catalase-treated group) increased by Man- or Suc-catalase (Fig. 7).

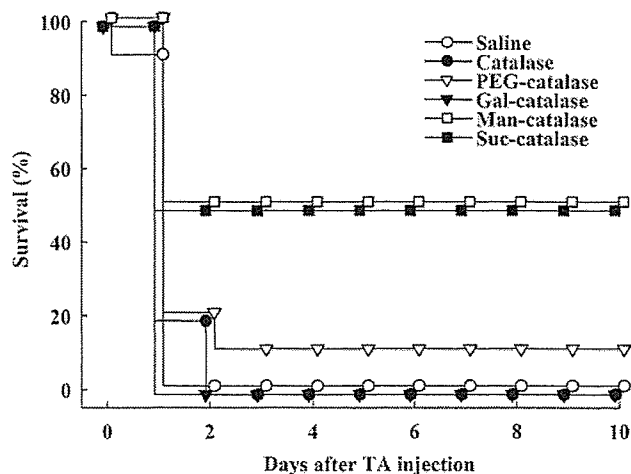
**EMSA of Liver Nuclear Extract.** To confirm the results obtained using pDNA, we performed an EMSA analysis of nuclear NF- $\kappa$ B in mouse liver (Fig. 8). The NF- $\kappa$ B activity was markedly increased by TA or LPS/GalN. This activation was effectively inhibited by Man-catalase. These results strongly support that hypothesis that the data obtained by the newly developed method using pDNA reflect changes in NF- $\kappa$ B activity in the liver during inflammation.

## Discussion

NF- $\kappa$ B is a ubiquitous transcription factor that is involved in many inflammatory processes, and the importance of NF- $\kappa$ B activation has been widely discussed in relation to liver injury. One of the most popular approaches to analyzing NF- $\kappa$ B activation is EMSA. A standard EMSA typically relies upon  $^{32}$ P-end-labeling of nucleic acids to detect the DNA component of the protein-DNA complexes on polyacrylamide gels. Although isotopic labeling provides high-detection sensitivity, the use of radioisotopes is subject to regulatory procedures, disposal limitations, and the short half-life of the

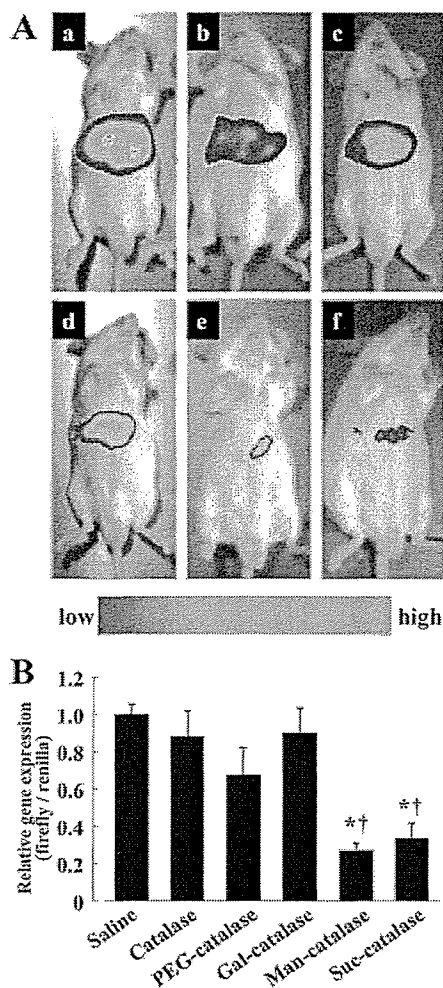


**Fig. 3.** Effect of catalase derivatives on plasma transaminase levels. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was injected into the tail vein of mice just before the intraperitoneal TA injection. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of four mice. \*, a statistically significant difference compared with the saline-treated group ( $P < 0.05$ ). A, aspartate aminotransferase (AST). B, alanine aminotransferase (ALT).



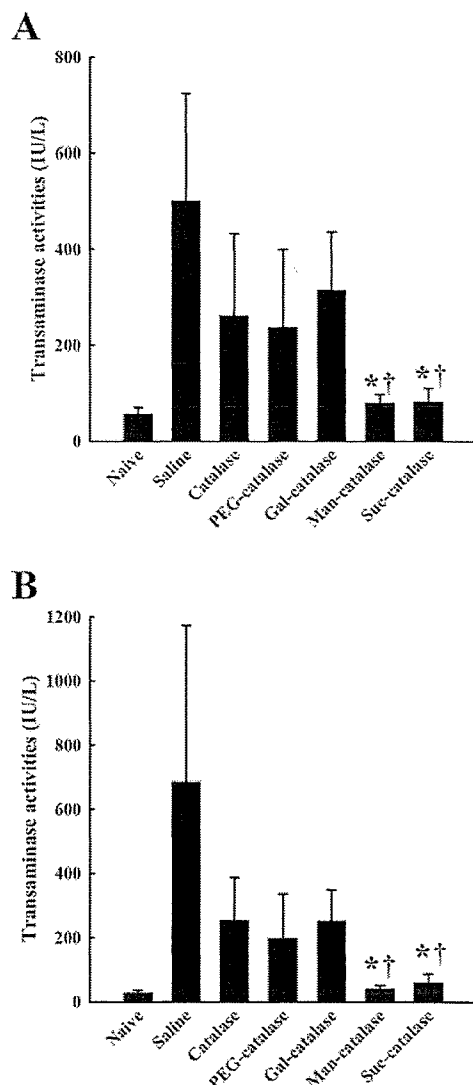
**Fig. 4.** Survival rate of mice receiving an intraperitoneal injection of TA. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was injected into the tail vein. The survival of the Suc- or Man-catalase treated group was significantly greater than that of the saline- ( $P < 0.01$ ) or catalase-treated ( $P < 0.05$ ) group ( $n = 10$ ).

label, and requiring a long incubation with an autoradiographic film. In marked contrast, the luminescence-based technology developed in the present study provides a simple, sensitive, and quantitative method for detecting the real-time transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in live animals. This luminescence-based method consists basically of *in vivo* gene transfer to mouse liver using two plasmid vectors: one is pNF- $\kappa$ B-Luc, which encodes firefly *luciferase* gene driven by a basic promoter element plus NF- $\kappa$ B binding elements, and the other is pRL-SV40, which encodes *R. reniformis luciferase* gene under the control of an NF- $\kappa$ B-insensitive SV40 promoter. pNF- $\kappa$ B-Luc is designed especially for monitoring activation of the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway, which contains five tandem copies of the NF- $\kappa$ B enhancer element. We confirmed the response of firefly *luciferase* expression in



**Fig. 5.** Effect of catalase derivatives on the activation of NF- $\kappa$ B. LPS/GalN was intraperitoneally injected 24 h after pDNA injection. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was intravenously injected just before the LPS/GalN injection. A, visualization of firefly *luciferase* gene expression in live mice 24 h after LPS/GalN injection. a, saline; b, catalase; c, PEG-catalase; d, Gal-catalase; e, Man-catalase; f, Suc-catalase. The luminescent signals were color-coded based on the color scale below the images. B, mice were killed 24 h after LPS/GalN injection, and the luciferase activities in the liver were assayed. Relative gene expression was indicated as an  $x$ -fold increase compared with the saline-treatment group. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of four mice. \*, a significant difference compared with the saline-treated group ( $P < 0.01$ ); †, a statistically significant difference compared with the catalase-treated group ( $P < 0.01$ ).

mouse melanoma B16-BL6 cells permanently transfected with pNF- $\kappa$ B-Luc when activated by standard stimuli, such as hydrogen peroxide (Supplemental Figure) or TNF- $\alpha$  (Y. Kobayashi, M. Nishikawa, K. Hyoudou, F. Yamashita, and M. Hashida, unpublished data). We also confirmed that the results obtained using pDNA correspond to those obtained by the EMSA of NF- $\kappa$ B in mouse liver. Therefore, this method is specific for the real transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. Moreover, this approach can be applied to analyzing the changes in other transcription factors that are associated with liver inflammation, such as activator protein-1, by simply replacing pNF- $\kappa$ B-Luc with such transcription factor specific vectors. NF- $\kappa$ B consists of homodimers or heterodimers through the combination of the subunits p65 (Rel-A), p50 (NF- $\kappa$ B<sub>1</sub>, p105), p52 (NF- $\kappa$ B<sub>2</sub>, p100), c-Rel, or Rel-B. It has already been reported that TA (Fernandez-Martinez et al., 2004) and LPS (Romics et al., 2004) induces nuclear localization of



**Fig. 6.** Effect of catalase derivatives on plasma transaminase levels. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was injected into the tail vein of mice just before the intraperitoneal LPS/GalN injection. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of five mice. \*, a significant difference compared with the saline-treated group ( $P < 0.05$ ); †, a statistically significant difference compared with the catalase-treated group ( $P < 0.05$ ). A, AST. B, ALT.

p65/p50 and p50/p50 complexes. Therefore, although the two bands detected in the EMSA were not identified, they would represent p65/p50 and p50/p50 dimers.

In the present study, the reporter genes were introduced into mouse liver by intravenous injection of pDNA using the hydrodynamics-based procedure, an established gene transfer method to the liver (Liu et al., 1999). This method gives very high transgene expression with naked pDNA, although a transient increase in liver enzymes within 1 day of the hydrodynamics-based gene transfer has been reported (Kobayashi et al., 2004). As shown in Fig. 1A, the F/R ratio was almost constant 1 day after pDNA injection, suggesting that the hydrodynamics-based procedure itself induces very little toxicity at 1 day after injection or later. The mechanism for the hydrodynamics-based gene transfer would involve the direct cytosolic delivery of pDNA through the cell membrane as a result of transiently increased permeability (Kobayashi et al., 2001, 2004). Moreover, hepatic uptake and gene expression mechanisms after intravenous administration of pDNA by conventional and hydrodynamics-based procedures have been reported previously (Kobayashi et al., 2001). In the present study, we tried to minimize the dose of pDNA. For the quantitative luciferase assay, 0.1  $\mu$ g of pDNA was sufficient for the analysis. On the other hand, at least 5  $\mu$ g of pDNA was needed for the imaging. The sensitivity of the assay systems explains the difference in the doses. Within this dose range, the level of transgene expression after the hydrodynamics-based procedure is reported to be proportional to the dose (Kobayashi et al., 2004). White BALB/c mice were used for the *in vivo* imaging studies, because luciferin chemiluminescence can hardly be detected through the black color of C57BL/6 mice.

It has been reported that the administration of TA activates NF- $\kappa$ B followed by the generation of ROS in the liver (Lu et al., 1999), and it was also reported that LPS treatment increases the generation of ROS in Kupffer cells (Uchikura et al., 2004) and the NF- $\kappa$ B binding activity in hepatocytes (Freedman et al., 1992). Reactive oxygen species contribute to the pathogenesis of a variety of liver diseases, such as

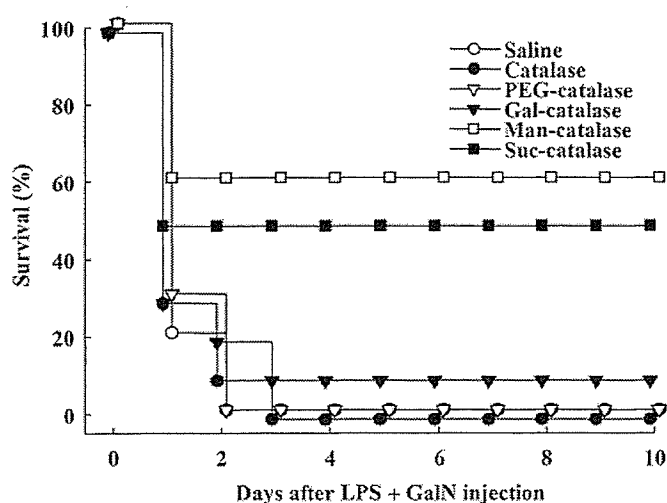


Fig. 7. Survival rate of mice receiving an intraperitoneal injection of LPS/GalN. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was injected into the tail vein. The survival of the Suc- or Man-catalase treated group was significantly ( $P < 0.01$ ) greater than that of any other group ( $n = 10$ ).

acetaminophen overdose, hemochromatosis, alcoholic liver injury, toxin exposure, and viral hepatitis (Slater, 1984). Proinflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-18, are believed to play roles in the cellular injury associated with fulminant hepatitis. It has been reported that hydrogen peroxide is able to directly activate NF- $\kappa$ B, and a variety of antioxidants and antioxidant enzymes, such as catalase, down-regulate TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation (Schreck et al., 1991; Anderson et al., 1994). TA is a thiono-sulfur-containing compound that is commonly used for inducing fulminant hepatic failure (Bruck et al., 2002) and liver cirrhosis (Kamath et al., 1999) in animal models. During the biotransformation of TA, both flavin-containing monooxygenase (Chieli and Malvaldi, 1984) and cytochrome P450 (Lee et al., 2003) reduce dioxygen to superoxide anion, which is then catalyzed to produce hydrogen peroxide. Therefore, biotransformation of TA precedes oxidative damage-associated liver injury. This injury has been implicated in the phenomena of glutathione depletion (Sanz et al., 2002), an increase in malondialdehyde (So et al., 2002), and the disappearance of tetraploid hepatocytes (Diez-Fernandez et al., 1993) in liver cells after TA administration. Nevertheless, the detailed biochemical mechanisms underlying this hepatotoxic process of TA remain largely unknown. Kupffer cells are reported to play an important role in TA-induced liver injury, because the depletion of

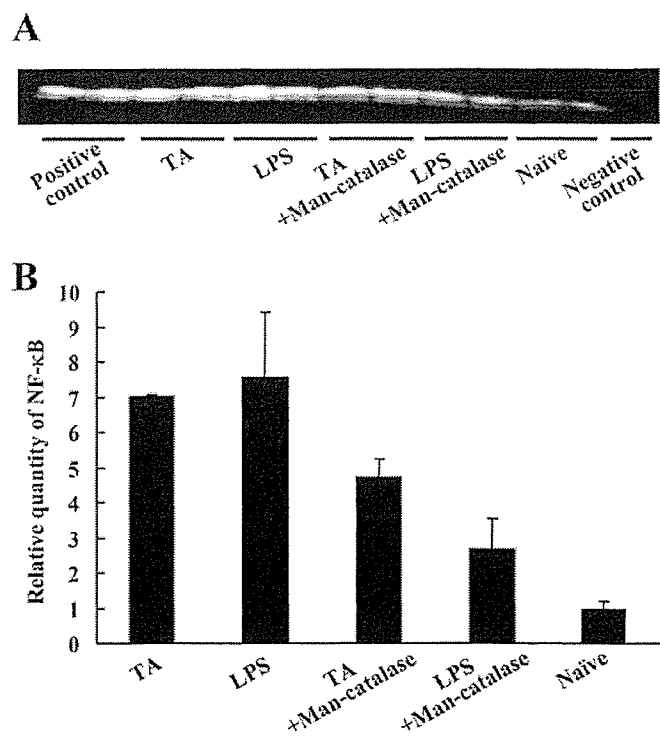


Fig. 8. EMSA analysis of NF- $\kappa$ B activity in nuclear extracts of mouse liver. Saline (vehicle) or any catalase derivative (5000 U/mouse) was injected into the tail vein of mice just before the intraperitoneal TA or LPS/GalN injection. A, activation of NF- $\kappa$ B binding to DNA as demonstrated by EMSA. Only the band for bound NF- $\kappa$ B is shown. The bands express the NF- $\kappa$ B activity in the liver of individual mice. Nuclear extracts from HeLa cells containing NF- $\kappa$ B protein were mixed with the labeled and unlabeled probe to obtain the positive and negative controls, respectively. B, quantitative densitometry evaluations of EMSA. Data are represented as an  $x$ -fold increase relative to the naive group. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of two mice.

Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates TA-induced hepatotoxicity (Andres et al., 2003). In the present study, TA-induced NF- $\kappa$ B activation and liver injury was effectively inhibited by Man- or Suc-catalase, both of which are derivatives targeting Kupffer cells and liver endothelial cells through the recognition by mannose receptors or scavenger receptors, respectively. These results suggest that hydrogen peroxide is initially produced during metabolism of TA, and then, the peroxide generated distributes to all types of liver cells and activates NF- $\kappa$ B in receiving cells, followed by the production of inflammatory cytokines. In the LPS/GalN-induced fulminant hepatitis model, Man- or Suc-catalase also effectively inhibited NF- $\kappa$ B activation and liver injury. Because LPS is mainly recognized by the toll-like receptor 4 expressed on Kupffer cells (Su et al., 2000) and subsequently produce ROS (Uchikura et al., 2004) and inflammatory cytokines (Su et al., 2000), the delivery of catalase to the nonparenchymal cells is efficient. The cause of TA- or LPS/GalN-induced death is reported to be ROS-mediated liver dysfunction (Okuyama et al., 2003). In these models, mice will die within a couple of days, as observed in the present study, because of a rapid production of toxic ROS after treatment. If mice can tolerate the deadly assaults of ROS, they would survive for a relatively long period of time because little ROS are generated in the later periods.

Using various chemically modified catalase derivatives, we have shown the importance of the tissue distribution of such derivatives on their pharmacological activities (Yabe et al., 1999a,b, 2001; Nishikawa et al., 2004, 2005; Nishikawa and Hashida, 2006). In the present study, we demonstrated that Man-catalase and Suc-catalase were effective in inhibiting liver inflammation, whereas unmodified catalase or Gal-catalase, derivatives targeting liver parenchymal cells (hepatocytes), was not so effective. These results clearly demonstrate that the delivery of catalase to liver nonparenchymal cells, such as Kupffer and sinusoidal endothelial cells, is important for inhibition of the TA- or LPS/GalN-induced liver inflammation. These catalase derivatives, retaining high enzymatic activities (> 96%) after modification, were also effective in preventing ischemia/reperfusion hepatic injury in mice (Yabe et al., 1999b, 2001).

In conclusion, a quantitative method to analyze NF- $\kappa$ B activation in the liver has been successfully developed. Moreover, the method clearly demonstrates that catalase derivatives targeting liver nonparenchymal cells can effectively inhibit TA- or LPS/GalN-induced fulminant hepatic injury. This luminescence-based method requires no genetic recombination technique, is highly sensitive to the activation of NF- $\kappa$ B in the liver, and allows continuous monitoring of the activation in live animals. Because liver inflammation is a common pathological event, this novel, simple, and sensitive method can be used not only for analyzing the incidence of events in the organ under various inflammatory conditions but also for screening drug candidates for the prevention of the diseases involved in NF- $\kappa$ B activation, such as inflammation, oncogenesis, and tumor metastasis.

## References

- Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, and Herzenberg LA (1994) Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11527-11531.
- Andres D, Sanchez-Reus I, Bautista M, and Cascales M (2003) Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochem Pharmacol* 66:917-926.
- Bruck R, Aeed H, Schey R, Matas Z, Reifen R, Zaiger G, Hochman A, and Avni Y (2002) Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J Hepatol* 36:370-377.
- Chieli E and Malvaldi G (1984) Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 31:41-52.
- Diez-Fernandez C, Bosca L, Fernandez-Simon L, Alvarez A, and Cascales M (1993) Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 18:912-918.
- Fernandez-Martinez A, Callejas NA, Casado M, Bosca L, and Martin-Sanz P (2004) Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *J Hepatol* 40:963-970.
- Freedman AR, Sharma RJ, Nabel GJ, Emerson SG, and Griffin GE (1992) Cellular distribution of nuclear factor kappa B binding activity in rat liver. *Biochem J* 287:645-649.
- Hwang TH, Yoon BC, Jeong JS, Seo SY, and Lee HJ (2003) A single administration of adenoviral-mediated HGF cDNA permits survival of mice from acute hepatic failure. *Life Sci* 72:851-861.
- Hyoudou K, Nishikawa M, Umeyama Y, Kobayashi Y, Yamashita F, and Hashida M (2004) Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells. *Clin Cancer Res* 10:7685-7691.
- Kamath PS, Tyce GM, Miller VM, Edwards BS, and Rorie DK (1999) Endothelin-1 modulates intrahepatic resistance in a rat model of noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology* 30:401-407.
- Kobayashi N, Kuramoto T, Chen S, Watanabe Y, and Takakura Y (2002) Therapeutic effect of intravenous interferon gene delivery with naked plasmid DNA in murine metastasis models. *Mol Ther* 6:737-744.
- Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, and Takakura Y (2001) Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 297:853-860.
- Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, and Takakura Y (2004) Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 6:584-592.
- Lee JW, Shin KD, Lee M, Kim EJ, Han SS, Han MY, Ha H, Jeong TC, and Koh WS (2003) Role of metabolism by flavin-containing monooxygenase in thioacetamide-induced immunosuppression. *Toxicol Lett* 136:163-172.
- Liu F, Song Y, and Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6:1258-1266.
- Loguercio C and Federico A (2003) Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 34:1-10.
- Lu SC, Huang ZZ, Yang H, and Tsukamoto H (1999) Effect of thioacetamide on the hepatic expression of gamma-glutamylcysteine synthetase subunits in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 159:161-168.
- Nishikawa M and Hashida M (2006) Inhibition of tumour metastasis by targeted delivery of antioxidant enzymes. *Expert Opin Drug Deliv* 3:355-369.
- Nishikawa M, Hyoudou K, Kobayashi Y, Umeyama Y, Takakura Y, and Hashida M (2005) Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. *J Control Release* 109:101-107.
- Nishikawa M, Miyazaki C, Yamashita F, Takakura Y, and Hashida M (1995) Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties. *Am J Physiol* 268:G849-G856.
- Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, Umeyama Y, Takahashi Y, Kobayashi Y, Kumai H, Ishida E, Staud F, Yabe Y, et al. (2004) Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clin Exp Metastasis* 21:213-221.
- Ma SF, Nishikawa M, Katsumi H, Yamashita F, and Hashida M (2006) Liver targeting of catalase by cationization for prevention of acute liver failure in mice. *J Control Release* 110:273-282.
- Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Araya S, Kawada N, Yamaoka Y, and Yodoi J (2003) Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology* 37:1015-1025.
- Opanasopit P, Shirashi K, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y, and Hashida M (2001) In vivo recognition of mannose-6-phosphate residues by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein. *Am J Physiol* 280:G879-G889.
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, and Bours V (1997) Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem* 378:1237-1245.
- Romics L Jr, Kodys K, Dolganiuc A, Graham L, Velayudham A, Mandrekar P, and Szabo G (2004) Diverse regulation of NF-kappaB and peroxisome proliferator-activated receptors in murine nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 40:376-385.
- Sanz N, Diez-Fernandez C, Andres D, and Cascales M (2002) Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* 1587:12-20.
- Schreck R, Rieber P, and Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 10:2247-2258.
- Shen Z, Peedikayil J, Olson GK, Siebert PD, and Fang Y (2002) Multiple transcription factor profiling by enzyme-linked immunosay. *Biotechniques* 32:1168, 1170-1172, 1174 passim.
- Slater TF (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15.
- So EC, Wong KL, Huang TC, Tasi SC, and Liu CF (2002) Tetramethylpyrazine protects mice against thioacetamide-induced acute hepatotoxicity. *J Biomed Sci* 9:410-414.
- Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steinstraesser L, Alarcon WH, Remick DG, and Wang SC (2000) Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* 31:932-936.

- Uchikura K, Wada T, Hoshino S, Nagakawa Y, Aiko T, Bulkley GB, Klein AS, and Sun Z (2004) Lipopolysaccharides induced increases in Fas ligand expression by Kupffer cells via mechanisms dependent on reactive oxygen species. *Am J Physiol* 287:G620–G626.
- van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H, and Bast A (2001) Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 86 (Suppl 1):S121–S127.
- Viatour P, Merville MP, Bours V, and Chariot A (2005) Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30:43–52.
- Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, Takakura Y, and Hashida M (1999a) Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1176–1184.
- Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, and Hashida M (2001) Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 298:894–899.
- Yabe Y, Koyama Y, Nishikawa M, Takakura Y, and Hashida M (1999b) Hepatocyte-specific distribution of catalase and its inhibitory effect on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Free Radic Res* 30:265–274.
- Yamasaki Y, Sumimoto K, Nishikawa M, Yamashita F, Yamaoka K, Hashida M, and Takakura Y (2002) Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 301:467–477.
- Zhang G, Budker V, and Wolff JA (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10:1735–1737.

---

**Address correspondence to:** Dr. Makiya Nishikawa, Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. E-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

---

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

西川元也

Optimization of *In Vivo* Gene Transfer through Regulating Biological Response to Vectors

Makiya NISHIKAWA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,  
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 3, 2006)

The spatiotemporal distribution of transgenes determines the therapeutic efficacy of *in vivo* gene transfer. The important parameters of gene transfer are the level, duration, and cell specificity of expression, and the number of transfected cells. Interaction of vectors with blood cells, antigen-presenting cells, serum proteins, and other biological components affects the tissue distribution of vectors and the profile of transgene expression. Although plasmid DNA is less immunogenic than viral vectors, it can induce inflammatory cytokine release, due mainly to the presence of unmethylated CpG dinucleotides (CpG motifs). It was clearly demonstrated that intravenous injection of a plasmid DNA/cationic liposome complex resulted not only in the induction of inflammatory cytokines, but also in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the lung. Insertion of additional NF- $\kappa$ B-binding sequences into conventional plasmid DNA resulted in a high transgene expression in the lung, suggesting that the biological response to vectors can be used to increase transgene expression. In a marked contrast to this strategy, long-term transgene expression was achieved by reducing the number of the CpG motifs in plasmid DNA. A plasmid encoding murine interferon (IFN)- $\beta$  or IFN- $\gamma$  with reduced numbers of CpG motifs was highly effective in inhibiting metastatic tumor growth in mice. These results clearly demonstrate the importance of the regulation of biological responses to plasmid vectors to optimize plasmid-based *in vivo* gene transfer.

**Key words**—gene therapy; immune response; CpG motif; inflammatory cytokines; hydrodynamics-based procedure; NF- $\kappa$ B

## 1. はじめに

根治的な疾患治療法として多大な期待を集めた遺伝子治療は、臨床での有効性が報告されたものもあるが、全体的には当初の期待を十分に満たしているとは言い難い。特に、アデノウイルスベクターによる死亡事例やレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療での白血病の発症など、安全性に関する重大な問題が明らかとされてきた。こうした問題はベクターを改良する、あるいは新しいタイプのベクターを開発することで大幅に改善可能であり、本特集においても新規ベクターの有用性が示されている。その一方で、これら安全性に関する問題とは別に有効

性に関しても解決すべき問題点が残されている。有効な遺伝子治療の実現には、治療用遺伝子並びに発現タンパク質の時空間動態（遺伝子発現プロファイル）を対象疾患毎に厳密に制御することが必要であるが、これまでの膨大な研究にも係わらずその最適化は依然として遺伝子治療研究の最重要課題である。<sup>1,2)</sup> *In vivo* での遺伝子発現プロファイルには、ベクターの体内動態やベクターに対する生体反応が影響を及ぼすことから、その最適化には *in vivo* での評価が必須である。このことも遺伝子治療法の開発を遅らせる一因と考えられる。

*In vivo* 遺伝子導入による疾患治療においては、ベクターに組み込まれた遺伝子が標的細胞内で転写・翻訳されて産生されるタンパク質の経時的濃度変化（時間的特性）及び体内での局在性（空間的特性）がその治療効果を決定する。<sup>2)</sup> したがって、ベクターあるいは産生タンパク質の時空間動態制御に

京都大学大学院薬学研究科（〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29）

e-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS7で発表したものを中心に記述したものである。

よる遺伝子治療の最適化が可能と考えられ、新規ベクター・デリバリーシステム並びに新しい投与方法が開発されてきた。遺伝子治療を試みる上で重要となる遺伝子発現特性としては、遺伝子発現の標的細胞選択性、発現レベル、発現期間、発現細胞数が挙げられる (Table 1)。いずれも重要なパラメータであるが、対象疾患・治療遺伝子によってはかならずしも最適化の必要がない場合も考えられる。代替法として PEG 化製剤が利用可能な場合 (例えばアデノシンデアミナーゼなどの分泌型タンパク質など) には、遺伝子導入・発現細胞の特異性や数の重要性は低く、発現レベル及び発現期間が重要なパラメータと考えられる。<sup>3)</sup> 一般的に、これらのパラメータに関してはウイルスベクターが優れており、高く持続的な遺伝子発現が必要とされない場合 (虚血性疾患に対する血管新生因子の導入など) を除き、非ウイルスベクターの利用は制限されている。したがって、安全性に優れた非ウイルスベクターの利用を進めるためには、遺伝子発現レベルの増大、並びに遺伝子発現期間の延長が重要である。

*In vivo* 遺伝子発現は、培養細胞での評価が可能なベクター固有の遺伝子導入・発現活性だけでなく、生体によるベクター認識、あるいは標的細胞以外の生体成分との相互作用によっても大きく影響される。<sup>4)</sup> プラスミド DNA はウイルスベクターと比較して免疫原性や病原性が低いものの、細菌由来 DNA に特徴的な構造である非メチル化 CpG 配列

(CpG モチーフ) が原因となり、炎症性サイトカインの産生を誘導するなど強い生理活性を持つことも報告されている。そこで本稿では、このプラスミド DNA による炎症性サイトカイン産生を遺伝子発現増大に利用するアプローチと、CpG モチーフ数を削減したプラスミド DNA によるインターフェロン遺伝子発現の持続化に関するわれわれの検討結果を紹介する。

## 2. DNA 投与により産生されるサイトカインを利用した遺伝子発現の増強

### 2-1. DNA 複合体による炎症性サイトカイン産生

カチオン性リポソームとプラスミド DNA を複合体化することで効率的に培養細胞に遺伝子を導入・発現させることが可能であることが報告されて以来、様々な非ウイルスベクター・デリバリーシステムが開発されてきた。複合体化によるアプローチでは、カチオン性化合物を用いてプラスミド DNA 複合体に正の表面電荷を賦与することで負に帯電する細胞表面との相互作用を増大させ、DNA を細胞内にデリバリーすることが遺伝子発現につながるものとされる。カチオン性リポソームとプラスミド DNA との複合体 (リポプレックス) は、臨床応用が検討されるなど魅力的な非ウイルスベクターの 1 つであるが、解決すべき問題点として遺伝子発現レベルの低さが挙げられる。後述するようにハイドロダイナミクス法による遺伝子導入ではかならずしも遺伝子発現効率が低い訳ではないことから、リポプ

Table 1. Gene Transfer Characteristics that Affect the Efficacy of Gene Therapy

	Problems	Possible solutions
Target cell-specific transgene expression	Expression in non-target cells, such as immune cells and germ cells, may cause adverse reactions, or inhibit transgene expression in target cells.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimization of administration route/method</li> <li>• Development of cell-specific carrier/vector</li> <li>• Use of cell/tissue-specific promoters</li> </ul>
Level of expression	The transgene expression is not sufficient to produce any significant therapeutic effects.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase in the delivery efficiency of genes into the cell/nucleus</li> <li>• Use of highly active promoter</li> </ul>
Duration of expression	Frequent administration may reduce the quality of life in patients.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlled/sustained release of plasmid DNA</li> <li>• Increase in the stability of genes in administration sites and in the cells</li> <li>• Prevention of promoter attenuation/inactivation</li> <li>• Stabilization of transgene products</li> <li>• Extension of the life span of the cells expressing the transgene</li> </ul>
Number of transfected cells	Gene transfer of intracellular proteins may not be effective, unless they are expressed in a vast majority of target cells.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimization of administration route/method</li> </ul>

レックスの遺伝子導入効率が低い原因は、ベクター(プラスミド DNA)ではなくむしろそのデリバリー効率にあるものと考えられる。培養細胞への遺伝子導入においては dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) を中性のヘルパー脂質として用いたりリポプレックスにより高い遺伝子発現を得ることが可能である。しかしながら、静脈内投与時には DOPE 含有リポプレックスが赤血球と融合することで結果的に遺伝子発現が低くなることが報告されており,<sup>9)</sup> *in vivo* 遺伝子導入には利用できない。

リポプレックスのもう1つの問題として、腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$  やインターフェロン (IFN)- $\gamma$ , インターロイキン-12 などの炎症性サイトカインの産生が挙げられる。これはプラスミド DNA 中の CpG モチーフが、樹状細胞などに発現する Toll-like receptor (TLR)-9 に非自己として認識されることによるものと考えられている。<sup>6)</sup> クロドロネート含有リポソームを静脈内投与することで脾臓マクロファージや肝 Kupffer 細胞を機能的に除去したマウスでは、血清中の炎症性サイトカイン濃度が大幅に低下することが示されており、リポプレックスによるサイトカインの産生にはこれら貪食細胞の関与が指摘されている。CpG モチーフを含むプラスミド DNA 単独 (naked DNA) を投与することでも

サイトカインが産生されるが、リポプレックス化により産生量は増大する。培養マクロファージ、樹状細胞を用いた検討からは、TLR-9 依存的な免疫応答だけでなく、TLR-9 非依存的な現象の関与も示されている。<sup>7-10)</sup> 特にリポプレックスの場合には、CpG モチーフが存在しない場合にも免疫細胞が活性化することが明らかとなっており、現在その機構について詳細な検討を行っている。

われわれは、リポプレックスによる遺伝子発現の増強を目的に、静脈内投与後の遺伝子発現並びにリポプレックスに対する生体反応について評価した。検討には、CMV プロモータにドライブされたルシフェラーゼ cDNA をコードし、CpG モチーフを 846 個含有するプラスミド DNA (pCMV-Luc) を選択した。また、*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-*n,n,n*-trimethylammonium chloride (DOTMA) とコレステロール (Chol) からなるリポソームをカチオン性リポソームとして採用し、pCMV-Luc と混合することでリポプレックスを調製した。<sup>11)</sup> <sup>111</sup>In 標識プラスミド DNA からなるリポプレックスをマウス尾静脈内に投与したところ、リポプレックスは投与後速やかに肺に集積し、その後徐々に肝臓へ移行することが示された (Fig. 1)。最終的には、投与量の約 8% のプラスミド DNA が肺へ、約 50% が

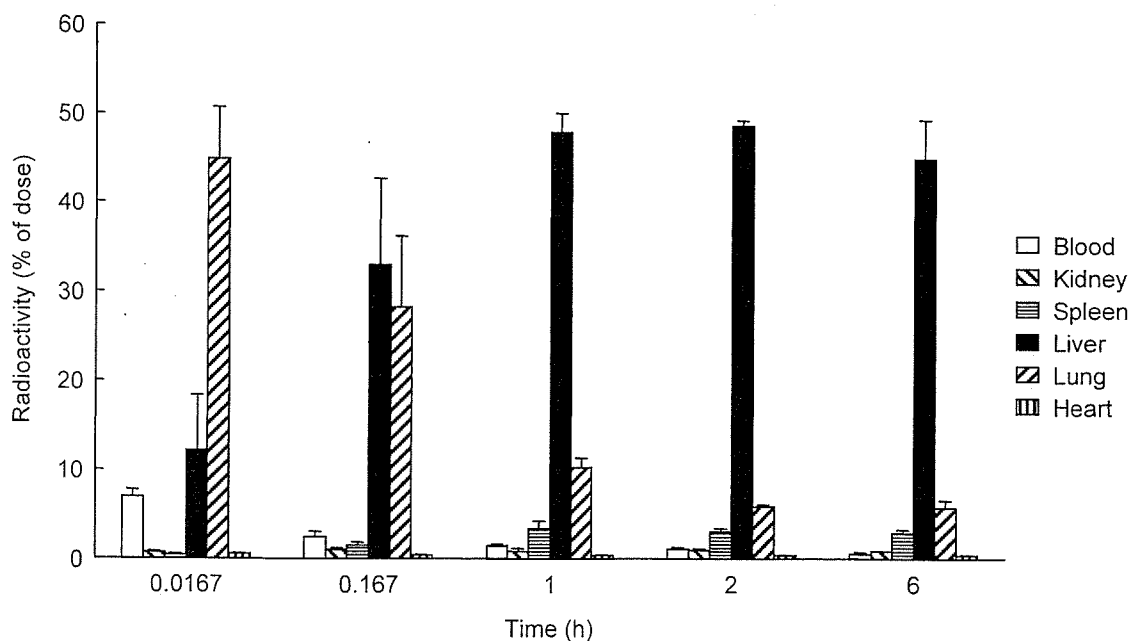


Fig. 1. Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection of <sup>111</sup>In-labeled Lipoplex in Mice

Mice received a DOTMA/Chol liposome-<sup>111</sup>In-plasmid DNA complex at a dose of 25  $\mu$ g DNA/mouse. The blood concentration and tissue accumulation of radioactivity were determined at the indicated times. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice.



肝臓へ集積した。これまでの報告にあるように、リポプレックスを静脈内投与すると血液成分との相互作用の結果肺に一時的に集積し、肺毛細血管内皮細胞で遺伝子が発現する。われわれの検討においても、肺で一過性の遺伝子発現が得られた。一方、肝臓への集積には主に肝非実質細胞が関与し、TNF- $\alpha$ などのサイトカイン産生には Kupffer 細胞が重要であることが報告されている。<sup>9)</sup> 実際、リポプレックス投与後血清中 TNF- $\alpha$  濃度は速やかに上昇して2時間後にピークとなり、その後減少し投与24時間後にはほとんど検出されなかった。

**2-2. 肺での NF- $\kappa$ B 活性と遺伝子発現効率との相関** リポプレックス投与により産生される TNF- $\alpha$  は、転写因子 NF- $\kappa$ B の強力な活性化因子として知られる。NF- $\kappa$ B は活性化により核へ移行し、DNA 上の NF- $\kappa$ B 結合配列に結合することでサイトカインを始め多くの遺伝子の転写を促進する。また、サイトメガロウイルス (CMV) などのウイルスのゲノムにも NF- $\kappa$ B 結合配列が存在し、NF- $\kappa$ B の活性化によりウイルス増殖が促進することも知られている。非ウイルスベクターによる遺伝子導入においては、多くの細胞で高い転写活性がある CMV プロモータが汎用される。したがって、リポプレックスの投与により TNF- $\alpha$  が産生され、遺伝子導入細胞内で NF- $\kappa$ B が活性化されると、CMV プロモータにドライブされた導入遺伝子の発現の亢進が想定される。そこでわれわれは、リポプレックスを静脈内投与したときの遺伝子発現臓器である肺で、リポプレックスの投与により NF- $\kappa$ B が活性化するかについて検討した。Figure 2 に示すように、核内で NF- $\kappa$ B が検出されたことから、リポプレックスの投与により肺で NF- $\kappa$ B が活性化することが明らかとなった。NF- $\kappa$ B を活性化することが知られるリポ多糖 (LPS) を前投与したマウス肺では、さらに顕著な NF- $\kappa$ B 活性化が認められた。このとき、NF- $\kappa$ B 結合配列を含む放射標識オリゴヌクレオチド (ODN) と核タンパク質との結合は、過剰量の非標識 ODN の添加により消失したが、pCMV-Luc によっても完全に消失した。このことから、NF- $\kappa$ B が pCMV-Luc に結合することが明らかとなった。これは、pCMV-Luc の CMV プロモータに存在する4個の NF- $\kappa$ B 結合配列を介した結合であると推察され、この結合により遺伝子発現が影響を受ける

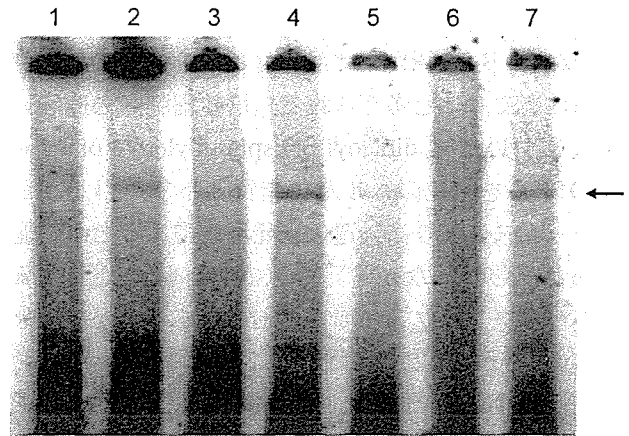


Fig. 2. Analysis of NF- $\kappa$ B Activity in Mouse Lung after Intravenous Injection of Lipoplex

Lung was harvested from mice and nuclear protein extracts were analyzed by EMSA. Lane 1: untreated mouse, Lanes 2, 3: pairs of mice each received the lipoplex intravenously, Lane 4: mice received 200  $\mu$ g LPS 30 min before injection of the lipoplex, Lane 5: the sample from 4 was electrophoresed with a 100-fold excess of unlabeled ODN with an NF- $\kappa$ B binding sequence, Lane 6: the sample from 4 was electrophoresed with a 10-fold excess of pCMV-Luc, Lane 7: the sample from 4 was electrophoresed with a 100-fold excess of unlabeled ODN with a random sequence. Arrow indicates the NF- $\kappa$ B band. Cited from *J. Gene Med.*, 8(1), 53-62 (2005).

ことが考えられた。

そこで、肺での NF- $\kappa$ B 活性と遺伝子発現との相関を明らかにするために、LPS 投与による遺伝子発現への影響について検討した。遺伝子導入前あるいは後に LPS を投与することで、肺での遺伝子発現が有意に増大した (Fig. 3)。以上の結果から、肺での NF- $\kappa$ B 活性と遺伝子発現との間には正の相関があることが示唆された。

**2-3. NF- $\kappa$ B 活性に感受性の高いプラスミド DNA の開発** 遺伝子治療を目的として用いられるプラスミド DNA には発現効率の高さから CMV プロモータが汎用されるが、前述の通りこのプロモータには NF- $\kappa$ B 結合配列が4個存在する。われわれは、NF- $\kappa$ B 結合配列をプラスミド DNA に追加することで、リポプレックス投与により活性化する NF- $\kappa$ B をより効率的に遺伝子発現増大に利用できないかと考えた。そこで、CMV プロモータの上流に5個の NF- $\kappa$ B 結合配列を新たに挿入した新規プラスミド pCMV- $\kappa$ B<sub>5</sub>-Luc を構築した。核タンパク質と放射標識 ODN とを用いた結合実験の結果、pCMV-Luc と比較して pCMV- $\kappa$ B<sub>5</sub>-Luc は NF- $\kappa$ B との結合性が増大することが確認された。そこでリポプレックスとしてマウス静脈内に投与したところ、約5倍高い遺伝子発現が得られた (Fig. 4)。

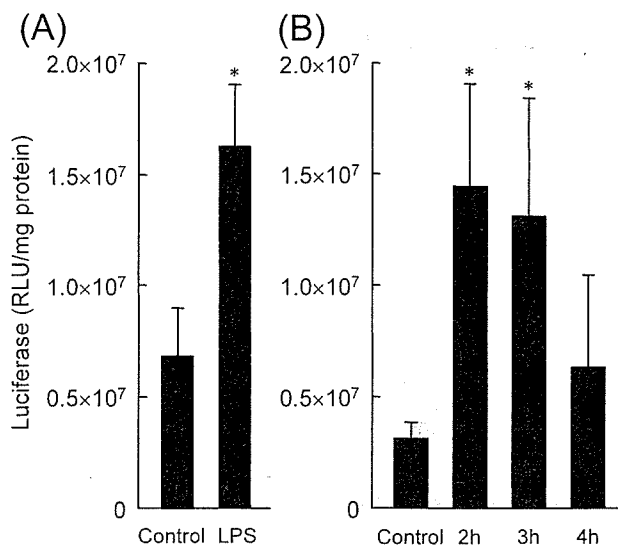


Fig. 3. Effect of LPS on Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of the Lipoplex

(A) At 30 min before injection of the lipoplex, mice received saline (control) or 200  $\mu$ g LPS. (B) Mice received 200  $\mu$ g LPS at the indicated times post-intravenous injection of the lipoplex. At 6 h after injection, mice were killed and the lungs were harvested for luciferase assay. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice. \* $p$  < 0.05 (vs. the control group). Cited from *J. Gene Med.*, 8(1), 53–62 (2005).

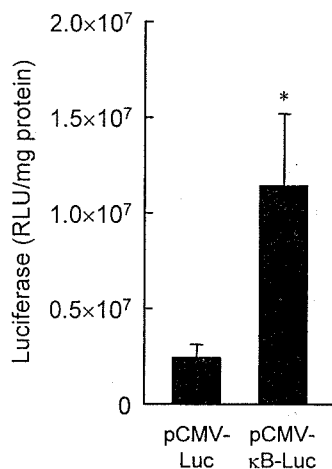


Fig. 4. Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of pCMV-Luc or pCMV- $\kappa$ B<sub>5</sub>-Luc

Each group of mice received a lipoplex composed of the indicated plasmid DNA at a dose of 25  $\mu$ g DNA/mouse. At 6 h after injection, mice were killed and the lungs were harvested for luciferase assay. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice. \* $p$  < 0.05 (vs. pCMV-Luc group). Cited from *J. Gene Med.*, 8(1), 53–62 (2005).

このアプローチは、リポプレックス投与後の肺での遺伝子発現に限らず、NF- $\kappa$ B 活性が高い環境下において幅広く有効と考えられる。癌細胞ではしばしば NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が報告されていることから、癌細胞での遺伝子発現の増大に利用できるものと期待される。われわれはマウス結腸癌細胞

colon26 を用いた予備的な検討から、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化している癌細胞では、挿入した NF- $\kappa$ B 結合配列数に依存して遺伝子発現が増大することを明らかにしている。

### 3. CpG モチーフ数の削減による遺伝子発現の持続化

ベクター投与により大量の炎症性サイトカインが産生されることは、遺伝子治療にはかならずしも好ましいことではない。<sup>12)</sup> 特に炎症性サイトカインが薬理効果に有利に作用しない場合には、極力その産生を抑制することが望ましいと考えられる。CpG モチーフ数に依存して炎症性サイトカインが産生されること、またその産生はリポプレックス化により飛躍的に増大することから、ベクター投与による炎症性サイトカインの産生を抑制するには、naked DNA を用いること、CpG モチーフ数を減らすことが重要と考えられる。

1999 年に Liu ら<sup>13)</sup> と Wolff ら<sup>14)</sup> によりハイドロダイナミクス法が開発され、これにより他の非ウイルスベクターによる遺伝子導入方法と比較して圧倒的に高い遺伝子発現が得られるようになった。本法では、生理食塩水に溶解した naked DNA を急速にマウス尾静脈内に注射することで肝臓で非常に高い遺伝子発現が得られる。Figure 5 には、各種非ウイルス型遺伝子導入法による遺伝子発現レベルを示すが、ハイドロダイナミクス法により、数オーダー以上高い遺伝子発現（ホタルルシフェラーゼ活性）が得られる。このように本手法により圧倒的に高い遺伝子発現が得られることから、多くの研究で遺伝子導入法として利用されてきた。<sup>15)</sup> われわれも、IFN 癌遺伝子治療に関する検討を行い、マウス IFN- $\beta$  又は IFN- $\gamma$  を発現するプラスミド DNA (pCMV-Mu $\beta$  及び pCMV-Mu $\gamma$ ) をハイドロダイナミクス法により担癌マウスに投与することで高い抗腫瘍効果を得ている。<sup>16)</sup> しかしながら、その発現が一過性であったことから、遺伝子発現が高い肝臓への癌転移は効率よく抑制できた (Fig. 6) もの、肺への転移にはあまり有効ではなかった。

IFN 癌遺伝子治療効果は、遺伝子発現を持続化することで大幅に改善可能と考えられる。遺伝子発現の持続化に関しては種々のアプローチが考えられるが、<sup>3)</sup> 遺伝子発現レベルを損なうことなく持続化することは容易ではない。前述のように、CpG モ

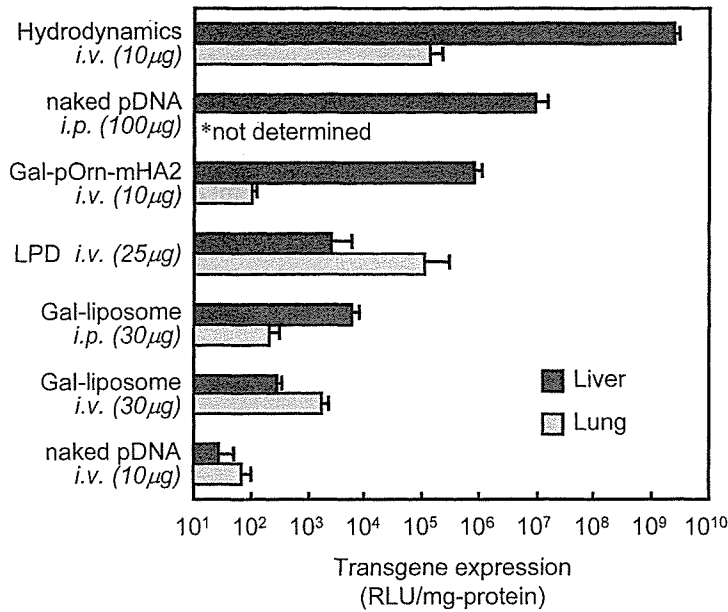


Fig. 5. Comparison of Transgene Expression Produced by Various Nonviral Gene Delivery Approaches

Plasmid DNA encoding firefly luciferase cDNA was administered as the naked or complex form to mice, and the luciferase activity in the organs indicated was measured. Gal-pOrn-mHA2, galactosylated poly(l-ornithine) modified with a fusigenic HA2 peptide; LPD, plasmid DNA complexed with protamine and DOTAP liposome; Gal-liposome, cationic galactosylated liposomes composed of DOTMA, cholesterol and galactosylated cholesterol derivative. Cited from *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (5), 713-731 (2005).

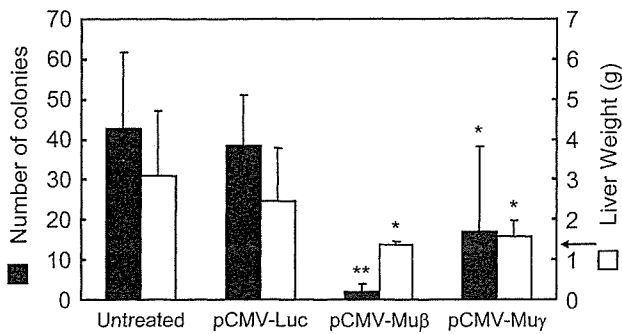


Fig. 6. Inhibition of Hepatic Metastasis of Tumor Cells by IFN-expressing Plasmid DNA

Mice were inoculated with  $1 \times 10^5$  CT-26 into the portal vein, and received 10 µg pCMV-Muβ or pCMV-Muγ by the hydrodynamics-based procedure on days 1, 3, 5, 7, and 9. On day 17, mice were sacrificed, and the number of metastatic colonies on liver surface was counted and the liver weight was measured. The results are expressed as the means ± S.D. of at least five mice. Arrow indicates the average liver weight of age-matched normal mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (vs. the untreated group). Cited from *Mol. Ther.*, 57 (5), 713-731 (2002).

チーフにより誘導される炎症性サイトカインは、pCMV-κB<sub>5</sub>-Luc を用いた検討で示されたように遺伝子発現を増大させる一方で、長期の遺伝子発現に対しては抑制的に作用する場合も報告されている。また、外来遺伝子に対する防御機構としてメチル化酵素が作用し、プラスミド DNA 中の CpG モチーフのメチル化により遺伝子発現が抑制されることも示されている。したがって、遺伝子発現の持続化に

はプラスミド DNA 中の CpG モチーフ数を削減することが有効と考えられる。<sup>17)</sup> そこでわれわれは、CpG モチーフ数を大幅に減少したプラスミド DNA を構築し、IFN 癌遺伝子治療効果の増強を試みた。CpG モチーフ数削減プラスミド DNA として Genzyme 社が開発した pGZB ベクターを採用し、ホタルルシフェラーゼ又は IFN-β、IFN-γ 発現プラスミド DNA (pGZB-Luc, pGZB-Muβ, pGZB-Muγ) を構築した (Fig. 7)。

3-1. 炎症性サイトカイン産生に対する CpG モチーフ数の影響 マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いた検討では、CpG モチーフをほとんど含まない牛胸腺 DNA の添加では有意な TNF-α 産生は認められなかったが、CpG モチーフを多数含む pCMV-Luc により TNF-α が産生された。また、この反応はリポプレックス化により顕著に増大した。一方、培養マウス腹腔マクロファージを用いた検討では、pCMV-Luc を naked DNA として添加しても有意な TNF-α が産生されないことを明らかにしている。<sup>7,9,10)</sup> 最近、TLR-9 発現データの解析から、腹腔マクロファージでは TLR-9 の発現レベルが低く、これが CpG モチーフに反応しない一因であることを示唆する結果を得ている。その一方で、pCMV-Luc からなるリポプレックスでは腹

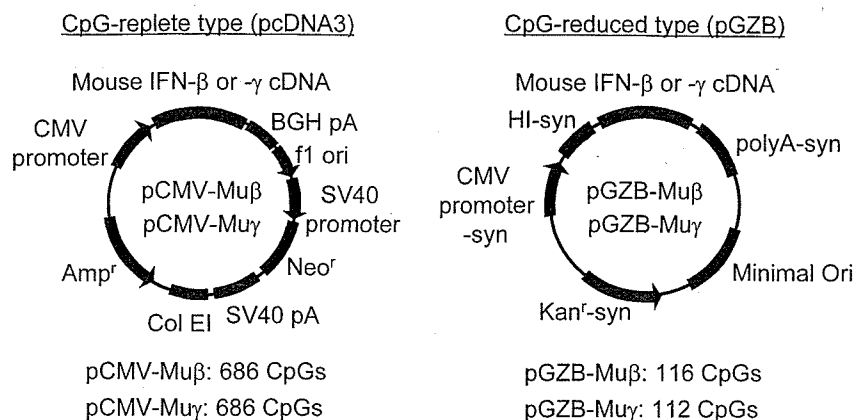


Fig. 7. Construction of IFN-expressing Plasmid DNA with Reduced Numbers of CpG Motifs

Mouse IFN- $\beta$  or IFN- $\gamma$  cDNA fragment was inserted into CpG-replete pcDNA3 or CpG-reduced pGZB. The numbers of CpG motifs in each plasmid DNA are indicated. HI: hybrid intron, -syn: synthetic.

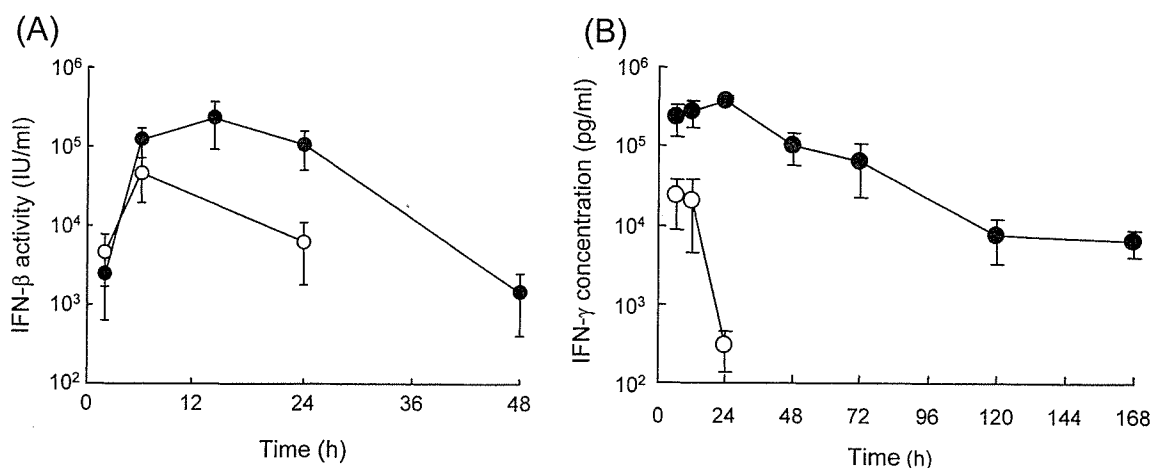


Fig. 8. Transgene Expression Profiles after Administration of IFN-expressing Plasmid DNA

(A) After intravenous injection of IFN- $\beta$ -expressing plasmid DNA (10  $\mu$ g) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN- $\beta$  activity was measured.

(B) After intravenous injection of IFN- $\gamma$ -expressing plasmid DNA (1  $\mu$ g) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN- $\gamma$  concentration was measured. The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice. O: pCMV-Mu $\beta$ , pCMV-Mu $\gamma$ , ●: pGZB-Mu $\beta$ , pGZB-Mu $\gamma$ .

腔マクロファージから多量の TNF- $\alpha$  が産生され、またこの反応が TLR-9 ノックアウトマウス由来のマクロファージでも認められるなど、TLR-9 に依存しない反応経路の関与も明らかとなっている。<sup>10)</sup>

*In vivo* においても、naked pCMV-Luc の静脈内投与により血清中 TNF- $\alpha$  レベルが増大したが、牛胸腺 DNA の場合には有意な上昇は認められなかった。そこで、CpG モチーフ数を削減した pGZB-Luc を naked あるいはリポプレックスとして投与したところ、血清中 TNF- $\alpha$  濃度はいずれの投与形態の場合にも pCMV-Luc の場合の 20—45% 程度であった。これは、各プラスミド中の CpG モチーフの割合 (pCMV-Luc, 6%; pGZB-Luc, 3%) と対応する値であった。中でもハイドロダイナミクス法で

naked pGZB-Luc を投与した場合には TNF- $\alpha$  は検出限界 (17 pg/ml) 以下であり、TNF- $\alpha$  による遺伝子発現への影響は非常に小さいことが推察された。

**3-2. CpG モチーフ数削減による遺伝子発現の持続化と抗腫瘍効果の増強** pGZB-Mu $\beta$  又は pGZB-Mu $\gamma$  をハイドロダイナミクス法でマウスに投与したところ、いずれの場合にも対照群と比較して持続的な血清中 IFN 活性 (濃度) が検出された (Fig. 8)。IFN- $\beta$  活性の最大値は約 5 倍であり、約 8 倍大きい血漿中濃度—時間曲線下面積 (AUC) 並びに約 2 倍長い平均滞留時間 (MRT) を示した。血清中 IFN- $\gamma$  濃度にはさらに顕著な違いが認められ、AUC 及び MRT はそれぞれ約 20 倍、約 3 倍であった。遺伝子発現プロファイルの違いを反映して、

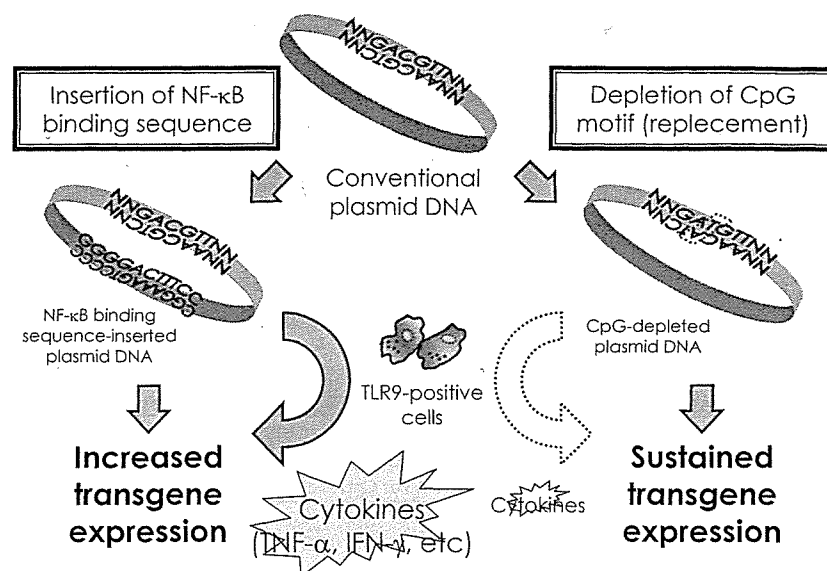


Fig. 9. Optimization of *In Vivo* Gene Transfer through Regulating Biological Response to Vectors

Immune cells recognize CpG motifs in plasmid DNA and secrete inflammatory cytokines, which greatly affect transgene expression. (A) NF-κB in target cells (lung endothelial cells) is activated by inflammatory cytokines, so a higher transgene expression can be obtained by adding NF-κB binding sequences to plasmid DNA. (B) Reducing the number of CpG motifs in plasmid DNA results in less production of inflammatory cytokines and prolonged transgene expression.

pGZB ベクター投与群ではより高い抗腫瘍効果が認められた。マウス結腸癌細胞 CT-26 を尾静脈内に移植することで作成した肺転移モデルマウスでの検討から、肺表面の転移結節数の有意な減少並びに生存日数の著明な延長が認められた。

#### 4. おわりに

本稿では、プラスミド DNA を用いる遺伝子導入の際に重要な生体反応として CpG モチーフに対する免疫反応を取り上げ、この応答を積極的に利用することによる遺伝子発現増大と、回避することによる遺伝子発現持続化についてわれわれの試みを紹介した (Fig. 9)。*In vivo* 遺伝子導入による遺伝子治療の実現には多くの問題が残されるが、対象疾患、対象遺伝子/タンパク質によってはだいぶんと遺伝子治療実現の可能性が高くなりつつある。英国ではハイドロダイナミクス法の原理を利用したヒト臨床研究がスタートし<sup>18)</sup>、重大な副作用がないこと、遺伝子発現が検出可能であったことが報告された。Naked DNA は最も安全な遺伝子ベクターと考えられることから、今後の遺伝子投与技術の進展とベクターデザインの最適化により有効な遺伝子治療法になり得るものと期待する。

#### REFERENCES

- 1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861-870 (2001).
- 2) Nishikawa M., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 275-283 (2002).
- 3) Nishikawa M., Takakura Y., *Gene Med. MOOK*, **5**, 118-123 (2006).
- 4) Opanasopit P., Nishikawa M., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**, 191-233 (2002).
- 5) Sakurai F., Nishioka T., Saito H., Baba T., Okuda A., Matsumoto O., Taga T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., *Gene Ther.*, **8**, 677-686 (2001).
- 6) Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A., Klinman D. M., *Nature*, **374**, 546-549 (1995).
- 7) Yasuda K., Ogawa Y., Kishimoto M., Takagi T., Hashida M., Takakura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 344-348 (2002).
- 8) Yoshinaga T., Yasuda K., Ogawa Y., Takakura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**, 389-394 (2002).
- 9) Yasuda K., Kawano H., Yamane I., Ogawa Y., Yoshinaga T., Nishikawa M., Takakura Y., *Immunology*, **111**, 282-290 (2004).
- 10) Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M., Takakura Y., *J. Leukoc. Biol.*, **77**, 71-79

- (2005).
- 11) Kuramoto T., Nishikawa M., Thanaketaipaisarn O., Okabe T., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **8**, 53–62 (2006).
  - 12) Tan Y., Li S., Pitt B. R., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2153–2161 (1999).
  - 13) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
  - 14) Zhang G., Budker V., Wolff J. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1735–1737 (1999).
  - 15) Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 713–731 (2005).
  - 16) Kobayashi N., Kuramoto T., Chen S., Watanabe Y., Takakura Y., *Mol. Ther.*, **6**, 737–744 (2002).
  - 17) Yew N. S., Cheng S. H., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **1**, 115–125 (2004).
  - 18) ASGT News, Summer 2006 ([http://www.asgt.org/am06/asgt\\_news/complete.php](http://www.asgt.org/am06/asgt_news/complete.php)).

## 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

西川元也,\* 竹本誠二, 高倉喜信

### Development of Heat Shock Proteins with Controlled Distribution Properties and Their Application to Vaccine Delivery

Makiya NISHIKAWA,\* Seiji TAKEMOTO, and Yoshinobu TAKAKURA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho,  
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 18, 2006)

Antigen delivery to antigen-presenting cells (APCs) is a key issue in developing effective cancer vaccines. Controlling the tissue distribution of antigens, which are administered in a peptide/protein or DNA form, can increase antigen-specific immune responses, including the induction of cytotoxic T lymphocytes. Heat-shock protein 70 (Hsp70), a member of a highly conserved family of molecular chaperones, forms complexes with a variety of tumor-related antigens *via* its polypeptide binding domain. Because Hsp70 is taken up by APCs through the recognition by Hsp receptors, such as CD91 and LOX-1, its application to antigen delivery systems has been examined both in experimental and clinical settings. A tissue distribution study revealed that Hsp70 is mainly taken up by the liver, especially by hepatocytes, after intravenous injection in mice. A significant amount of Hsp70 was also delivered to regional lymph nodes when it was injected subcutaneously, supporting the hypothesis that Hsp70 is a natural targeting system to APCs. Model antigens were complexed with or conjugated to Hsp70, by which greater antigen-specific immune responses were achieved. Cytoplasmic delivery of Hsp70-antigen further increased the efficacy of the Hsp70-based vaccines. These findings indicate that effective cancer therapy can be achieved by developing Hsp70-based anticancer vaccines when their tissue and intracellular distribution is properly controlled.

**Key words**—heat-shock protein; DNA vaccine; pharmacokinetics; antigen delivery; intracellular trafficking

#### 1. はじめに

抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症に対する有効かつ安全な治療法として期待されている。抗原を投与することで特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が誘導され、この CTL が標的となる癌細胞などを傷害することで治療効果が得られるものと考えられる。一般に CTL の誘導には、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC) が抗原タンパク質又は抗原ペプチドを取り込んだあと、これを細胞内で分解し、生成されたペプチド断片を MHC class I 分子上に提示する

必要がある。こうした免疫療法は、からだに本来備わっている免疫機能を利用し、これを活性化することで標的細胞を攻撃することから、抗癌剤や放射線などを利用した治療法と比較して副作用の危険が低いことが利点とされる。その一方で、治療に必要なレベルの CTL を誘導することが困難であることが問題とされ、十分な治療効果が得られていないのが現状である。その主な原因として、1) 抗原タンパク質・抗原ペプチドの APC への移行量が少ない、2) APC に移行後の抗原タンパク質・抗原ペプチドの利用率が低い、3) APC の CTL 誘導能が低い、ことが挙げられる。このうち 1) 及び 2) に関しては、投与された抗原の体内動態の制御、さらには APC に取り込まれたあとの細胞内動態を制御することで効果増強が可能である。

筆者らはこれまでに、卵白アルブミン (ovalbumin: OVA) をモデル抗原タンパク質として用いた

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

\*e-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

検討において、効率的な CTL の誘導を目的に APC への OVA デリバリーシステムの開発を行ってきた。APC に発現するスカベンジャーレセプターが負電荷高分子を特異的に認識することから、このレセプターを介して APC にデリバリー可能なサクシニル化 OVA を開発し、<sup>1,2)</sup> これにより CTL 誘導の増大、さらには OVA 発現癌細胞を移植した担癌マウスの生存日数の延長に成功した。また、OVA をカチオン化することで APC への取り込みを大幅に増大することにも成功し、このカチオン化 OVA によっても効率的な CTL が誘導可能であることを示した。<sup>3)</sup> スカベンジャーレセプターを介したデリバリーやカチオン化による効率的な CTL 誘導は、APC による取り込みが増大した抗原 (OVA) がエンドソーム/ライソソーム経路から細胞質に誤送され、MHC class I 分子にクロスプレゼンテーションされた結果と推察される。

さらなる免疫効果の増強には、抗原の体内動態の制御に加えて、APC 内での動態 (細胞内トラフィック) 制御並びに APC の活性化が有効と考えられる。近年、腫瘍免疫の分野において、熱ショックタンパク質が強力な免疫賦活化物質として注目を集めている。熱ショックタンパク質は熱などの刺激により発現が亢進するタンパク質群であり、分子シャペ

ロンとして細胞内タンパク質の高次構造の形成や輸送、分解等を介助することが知られている。<sup>4)</sup> 代表的な熱ショックタンパク質である heat shock protein 70 (Hsp70) は、C 末に存在する抗原ペプチドと結合可能なドメイン (polypeptide binding domain) を有する。<sup>5)</sup> また、マクロファージや樹状細胞などの APC に発現する CD91 や LOX-1 などのいわゆる Hsp レセプターにより認識され APC に効率よく取り込まれること、<sup>6,7)</sup> さらに CD40, Toll-like receptor (TLR)-2, TLR-4 などを介して APC を活性化するアジュバント活性があることも報告されている。<sup>8)</sup> したがって、抗腫瘍免疫を目的とした抗原デリバリーにおいて、Hsp70 は理想的な抗原キャリアであると考えられ、これを利用することで効果的な抗腫瘍免疫が誘導されることが期待される (Fig. 1)。そこで本稿では、熱ショックタンパク質の体内・細胞内動態に焦点を当て、Hsp 利用によるワクチン開発について概説する。

## 2. Hsp70 の体内動態

### 2-1. 静脈内投与

細胞外の熱ショックタンパク質は、細胞に危険を伝えるシグナル (danger signal) としての重要な機能を持つ。しかしながら、細胞外へ移行した熱ショックタンパク質の体内動態については明らかとはされていなかった。そこで筆

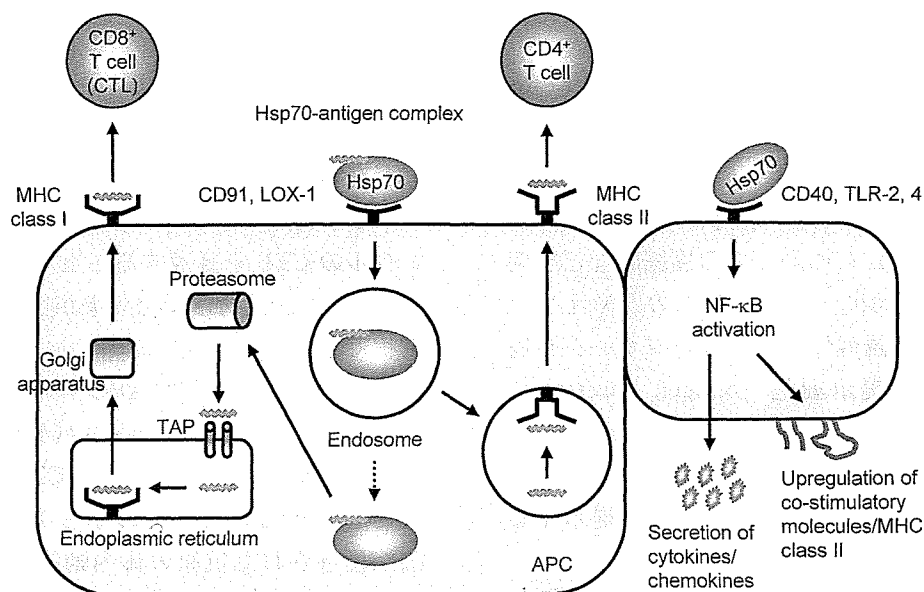


Fig. 1. Roles of Hsp70 in Immune Response

Hsp70 is recognized by signaling receptors, such as CD40 and Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4, on APCs, activates nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), then up-regulates the expression of costimulatory molecules and MHC class II and induces the secretion of cytokines/chemokines. In addition, Hsp70 is recognized by Hsp receptors, such as LOX-1 and CD91, and internalized. When antigen peptides are bound or conjugated to Hsp70, the internalized peptides can be processed and presented on MHC molecules.



者らは、熱ショックタンパク質を利用した抗原デリバリーシステムの合理的開発を目的に、代表的な熱ショックタンパク質である Hsp70 の体内挙動についてマウスを用いて検討した。<sup>9)</sup>

<sup>111</sup>In で放射標識を施したマウス Hsp70 をマウス尾静脈内に投与したところ、Hsp70 は速やかに血中から消失し主として肝臓に集積した (Fig. 2)。投与量を 50 倍 (100  $\mu$ g/マウス) に増加した場合にも体内動態に顕著な違いは認められなかったことから、少なくともこの投与量の範囲においては体内動

態が線形であることが明らかとなった。その一方で、過剰量の非標識 Hsp70 を前投与することで標識体の血漿中からの消失並びに肝取り込みは有意に阻害され、特異的な取り込み機構の関与が示唆された。Hsp70 を認識するレセプターには、マクロファージや樹状細胞などの APC に発現する LOX-1 が挙げられる。<sup>10)</sup> このレセプターは、ポリアニオンを認識するスカベンジャーレセプターの 1 種であり、リガンドとしてスクシニル化牛血清アルブミン (BSA) 並びにマレイル化 BSA, poly [I] などを認

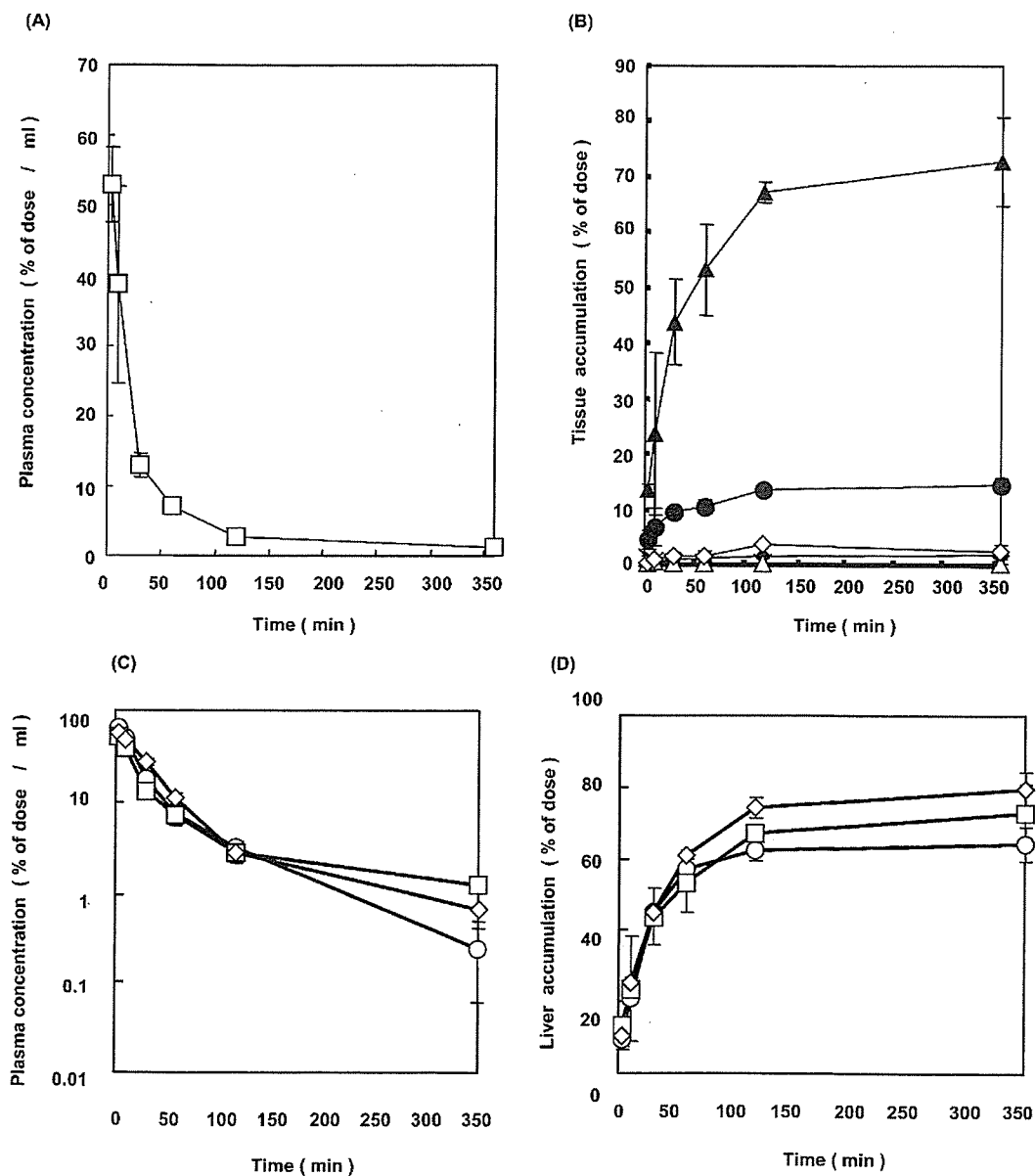


Fig. 2. Tissue Distribution of <sup>111</sup>In-radioactivity after Intravenous Injection of <sup>111</sup>In-Hsp70 in Mice

(A, B) After injection of <sup>111</sup>In-Hsp70 at a dose of 10  $\mu$ g/mouse, the radioactivity in plasma (A) and organs (B) was measured and expressed as % of dose/ml (A) or % of dose (B). Keys: (▲): liver, (●): kidney, (◇): urine, (◆): spleen, (△): heart, (×): lung. (C, D) After injection of <sup>111</sup>In-Hsp70 at a dose of 2, 10 or 100  $\mu$ g/mouse, the radioactivity in plasma (C) and liver (D) was measured and expressed as % of dose/ml (C) or % of dose (D). Keys: (○): 2  $\mu$ g/mouse, (□): 10  $\mu$ g/mouse, (◇): 100  $\mu$ g/mouse. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three mice. Cited from *Pharm. Res.*, 22 (3), 419-426 (2005).

識することが知られている。そこで、これらポリアニオンを前投与したところ、Hsp70の肝臓への取り込みは有意に阻害された (Fig. 3)。したがって、Hsp70の肝臓取り込みには LOX-1 などのスカベンジャーレセプターの関与が考えられる。

一方、LOX-1とは別のHspレセプターであるCD91は、マクロファージや線維芽細胞、肝細胞などに発現する。<sup>11)</sup> CD91のリガンドである $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M)を前投与した場合にも、Hsp70の肝臓取り込みは顕著に阻害された (Fig. 3)。こうした結果は、Hsp70が静脈内投与後 LOX-1 や CD91 などのHspレセプターに認識され、主に肝臓に取り込まれることを示唆するものである。コラゲナーゼを含む緩衝液を灌流することで肝臓構成細胞を肝細胞と、Kupffer細胞や類洞内皮細胞を含む非実質細胞とに分離したところ、Hsp70は肝細胞に多く取り込まれることが明らかとなった。マウスから単離培養した肝細胞を用いた検討においても、 $\alpha_2$ -Mあるいは抗CD91抗体の共存により、Hsp70の細胞取り込みが抑制された。したがって、循環血液中に移行したHsp70は、主に肝実質細胞に発現

するCD91に認識され、その多くが肝臓、特に肝細胞に取り込まれることが示唆された。

**2.2. 皮下投与** 抗腫瘍効果を目的としたワクチンの投与部位として皮膚や筋肉などが検討されている。一般に、筋肉や皮膚、皮下組織に投与された高分子は、投与部位に貯留され、血管やリンパ管へ吸収される。リンパ節にはAPCが豊富に存在し、抗原提示などの免疫応答に重要なイベントが行われる。マウスの足蹠に皮下投与後、Hsp70は投与部位から徐々に消失し、投与後2—24時間の時点で投与量の約20%が肝臓に集積した。このとき、所属リンパ節へも非常に高い移行(約3%)が認められ、効率的な免疫応答には、本投与経路が有効である可能性が示された。

### 3. 熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発

これまでに熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発の試みが報告されている。前述の通り、熱ショックタンパク質は標的細胞であるAPCにより効率よく認識されることから、それ自身にターゲティングのための認識素子が搭載されていることになる。したがって、熱ショックタンパク質を利用したワクチン開発においては、どのような抗原をどのような方法で熱ショックタンパク質に吸着・結合させるか、さらには細胞に取り込まれたのちの細胞内動態をいかに制御するかが問題となる。これまでに熱ショックタンパク質のペプチド結合能を利用して抗原を吸着させる試みと、抗原を共有結合した融合タンパク質を利用する試みが検討されている。融合タンパク質の場合には遺伝子として投与可能であることから、DNAワクチンに関しても検討されている。

**3.1. 熱ショックタンパク質—抗原複合・結合体による免疫誘導** 熱ショックタンパク質と抗原との複合体の形成についてはいくつかの報告がある。癌組織から抽出・回収されたHsp70には内因性ペプチドが結合しており、APCに取り込まれることでこのペプチドが腫瘍関連抗原としてクロスプレゼンテーションされる。こうした複合体を利用することで、ペプチド単独と比較してAPCの免疫応答が劇的に増強されることが報告されている。<sup>12)</sup> しかしながら、ペプチドとHsp70との結合親和性はペプチド配列に依存することから、<sup>13)</sup> Hsp70複合体としてデリバリー可能な抗原の種類は限られる。Moroi

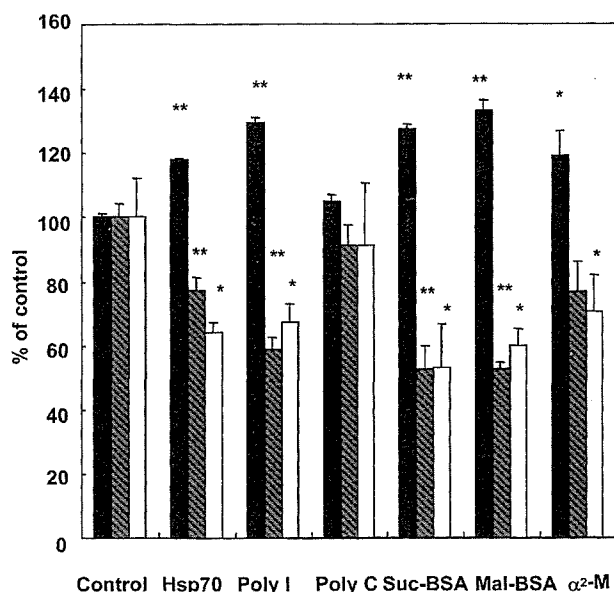


Fig. 3. Effects of Pre-administration of Various Compounds on the Plasma Clearance, Hepatic and Splenic Uptake of <sup>111</sup>In-Hsp70

Each compound (200  $\mu$ g/mouse) was injected into the tail vein of mice 10 min prior to the injection of <sup>111</sup>In-Hsp70 at a dose of 2  $\mu$ g/mouse. At 10 min after injection of <sup>111</sup>In-Hsp70, the radioactivity in plasma, liver and spleen was measured. Keys: (closed bar) plasma, (hatched bar) liver, (open bar) spleen. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three mice. Statistically significant differences were assessed using Student's *t* test compared with controls. Cited from *Pharm. Res.*, 22 (3), 419-426 (2005).

らは、Hsp70 のペプチド結合ドメインに高い結合親和性を有するペプチドをあらかじめ抗原に結合することで、複合体形成における親和性の問題を解決している。<sup>14)</sup> すなわち、小胞体に存在する Hsp70 のホモログである Bip に対して高い親和性を示すペプチド (HWDFAWPW) を OVA の MHC class I 抗原 (SIINFEKL) に結合することで、抗原ペプチドと Hsp70 との複合体の安定化に成功している。マウスに免疫後の特異的 CTL 反応を指標とした検討において、Bip 結合ペプチドが有用であり、これにより腫瘍の退縮や拒絶が可能であることを報告している。

熱ショックタンパク質と抗原とを直接結合した融合タンパク質の利用も検討されている。Udono らは、熱ショックタンパク質の 1 つである heat shock cognate protein 70 に、OVA の MHC class I 抗原を共有結合した融合タンパク質を開発し、マウスへの投与により抗原特異的な CTL 誘導に成功している。<sup>15)</sup>

**3-2. 細胞内動態制御による効果増強** 通常、高分子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。Hsp70 並びにその抗原結合 (複合) 体は、APC 細胞の Hsp レセプターに認識されて細胞内に内在化されると考えられる。熱ショックタンパク質を利用した抗原デリバリーでは、APC 内で抗原が MHC class I 分子上に提示される必要があるが、一般にエンドサイトーシスを受けた高分子は、エンドソームからライソゾームへ輸送され、そこで酵素により分解される。これまでの検討において筆者らは、化学修飾によりモデル抗原 OVA の APC 取り込みを増大させることでクロスプレゼンテーションが促進され、効率的な免疫応答が得られることを報告している。<sup>2,3)</sup> したがって、Hsp70 を抗原キャリアとする試みにおいても抗原分子の細胞内動態を制御する、すなわちエンドソームなどから細胞質へ積極的に輸送することで免疫誘導活性の増強が期待される (Fig. 1)。

高分子の細胞外から細胞質への輸送は、遺伝子導入を目的とした検討において多数報告されてきた。エンドソームでは、膜上のプロトン ATPase がベシクル内にプロトンを汲み入れることでエンドソーム内の pH を下げる。このとき、生理的 pH 以下でプロトン化する窒素原子を持つ化合物がエンドソーム

内に存在すると、エンドソームに入ってきたプロトンが消費され、pH の低下が抑制される。エンドソーム内へ塩化物イオンの流入を伴ってプロトンが流入することでエンドソームの浸透圧が増大し、最終的にエンドソームが崩壊し、内包物が細胞質に放出されると考えられている。この効果は「プロトンスポンジ効果」と呼ばれ、弱塩基性高分子であるポリエチレンイミンでその効果が報告<sup>16)</sup>されて以来、多くの化合物が同様の効果を持つことが示され、主に遺伝子発現の増大を目的にその利用が検討されている。

筆者らは、プロトンスポンジ効果を有する化合物としてポリヒスチジン (His) を選択し、Hsp70 を利用した抗原デリバリーにおける有用性について検討した。これまでのところ、Hsp70-抗原複合体にさらに His を結合することで、抗原複合体を APC の細胞質へ積極的にデリバリー可能であることを明らかにした。マウス皮内投与により高い CTL 誘導並びに強力な抗腫瘍効果が得られ、Hsp70 を利用した抗原デリバリーにおける細胞内動態の重要性が示されている。

#### 4. 熱ショックタンパク質を利用した DNA ワクチンの開発

抗原分子の遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を筋肉や皮膚に注射することで、抗原特異的な免疫誘導が得られる。この方法は DNA ワクチンと総称され、体液性免疫のみならず細胞性免疫をも誘導できることから癌治療への応用が期待されている。プラスミド DNA の投与部位としては筋肉や皮膚が用いられることが多く、ほとんどの場合プラスミド DNA 単独 (naked DNA) が用いられる。DNA ワクチンの効果は、産生される抗原の時間的、量的特性と、抗原と APC との相互作用頻度によって決定されると考えられることから、ワクチンを投与する部位近傍の APC 数や遺伝子発現プロファイルが DNA ワクチンの効果を決定するものと考えられる。遺伝子発現の観点からは、持続的な遺伝子発現が得られる骨格筋が皮膚や脾臓等と比較して有望であるが、<sup>17)</sup> APC が豊富に存在する皮膚内への投与も有効と考えられる。DNA の投与形態はほとんどの場合プラスミド DNA 単独 (naked DNA) であり、遺伝子発現効率を増大するためにエレクトロポレーションや超音波等が併用される。

筆者らはこれまでに、プラスミド DNA を効率よく APC にデリバリーすることを目的にカチオン性高分子であるメチル化 BSA (mBSA) との複合体を調製し、筋肉内あるいは皮内投与することでモデル抗原特異的な CTL の誘導並びに抗体産生の増大に成功した.<sup>18,19)</sup> このアプローチでは、プラスミド DNA を mBSA と複合体化することで樹状細胞への遺伝子導入が増大することが可能であった (Fig. 4 (A)). その一方で、マウス筋肉内に投与したときの遺伝子発現は複合体化により大幅に減少した (Fig. 4 (B)). その理由として、筋肉や皮膚に投与した複合体が APC と遭遇する機会が非常に少なく、投与した複合体の大部分が筋肉細胞やケラチノサイトに取り込まれること、これら細胞での遺伝子発現は複合体よりも naked DNA で効率的であることが挙げられる。DNA ワクチンの利点として、し

ばしば APC に直接遺伝子導入することで、内因性抗原に対する Th1 型の免疫誘導が可能であることが挙げられるが、遺伝子導入時の DNA 動態や遺伝子発現の結果から考えると、投与したプラスミド DNA により抗原が APC 内で発現し、これが免疫誘導につながる可能性は低いことが推察される。

以上のことから、Hsp70 を利用した DNA ワクチンの試みにおいても、遺伝子発現の大部分は APC 以外の細胞で起きる可能性が高い。したがって、APC 以外の細胞で発現した Hsp70-抗原結合体を APC にデリバリーし、効率的にクロスプレゼンテーションを誘導することで Hsp70 を利用した DNA ワクチンの効果増強が期待される (Fig. 5). われわれはこうした考えの基、His-Hsp70-抗原ペプチドの融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を構築し、マウス皮内投与後の CTL 誘導並

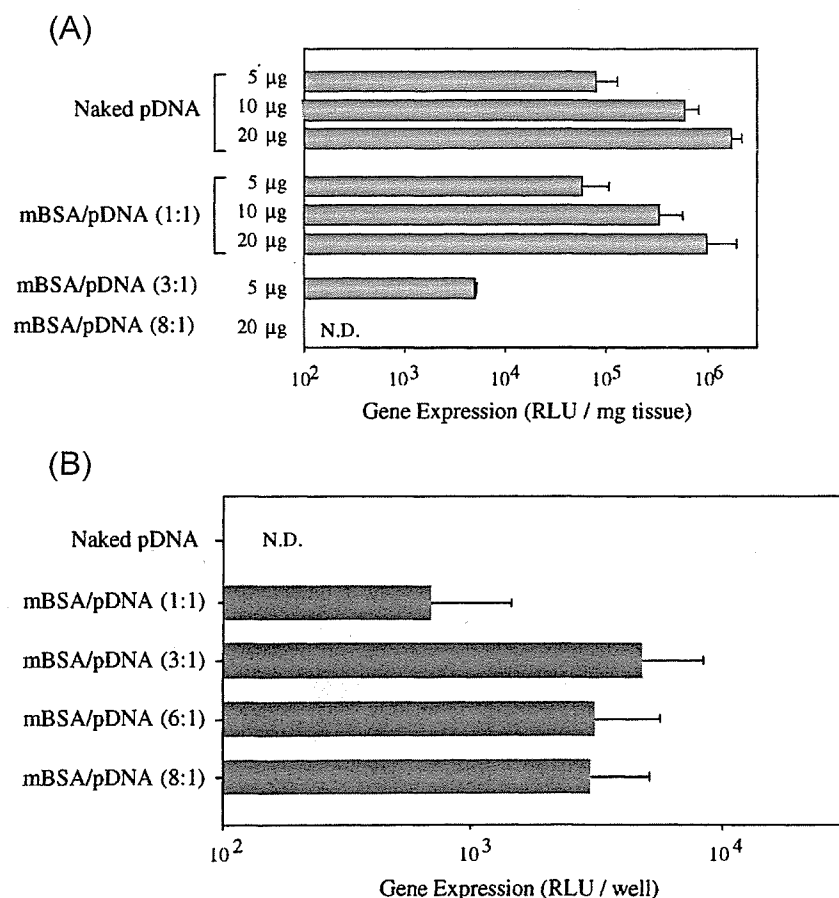


Fig. 4. Transgene Expression by Naked and Complexed Plasmid DNA in Skeletal Muscle (A) and Mouse Dendritic Cell Line, DC2.4 (B)

(A) Plasmid DNA encoding firefly luciferase was injected into the quadriceps of mice as the naked or complexed form with methylated bovine serum albumin (mBSA) at indicated doses and weight ratios. At 3 days after injection, the luciferase activity was measured. (B) Naked or complexed plasmid DNA was added to DC2.4, and the luciferase activity in the cells was measured 18 h after transfection. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three mice or three determinations. Cited from *Int. J. Pharmaceut.*, 293 (1-2), 291-301 (2005).