

がん細胞への siRNA デリバリーとがん遺伝子治療への適用

高橋有己,* 西川元也, 高倉喜信

In vivo siRNA Delivery to Tumor Cells and Its Application to Cancer Gene Therapy

Yuki TAKAHASHI,* Makiya NISHIKAWA, and Yoshinobu TAKAKURA

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

(Received June 14, 2007)

RNA interference (RNAi) is a posttranscriptional gene-silencing event in which short double-stranded RNA (siRNA) degrades target mRNA. Because of its potent and highly specific gene-silencing effect, RNAi is expected to be used in the treatment of various diseases. Cancer is one of the major targets of RNAi-based therapy, because silencing oncogenes or other genes contributing to tumor progression can be target genes for RNAi. The delivery of RNAi effector to target cells is one of the key factors determining therapeutic efficacy, because gene silencing is limited to cells reached by RNAi effectors. Tumor cell lines stably expressing reporter genes were confirmed to be effective in sensitively and quantitatively evaluating RNAi effects in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Quantitative analyses of the gene-silencing effect revealed that short-hairpin RNA expressing plasmid DNA (pshRNA) has more durable effects than siRNA. Intratumoral injection of RNAi effectors was effective in suppressing target gene expression in tumor cells, and silencing of β -catenin or hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) significantly inhibited tumor growth. RNAi effectors were successfully delivered to tumor cells colonizing the liver through the vascular route. We found that tumor-bearing liver showed elevated HIF-1 α expression in the cells, and the silencing of the expression in normal liver cells is also effective in inhibiting metastatic tumor growth. These results indicate the possibility of RNAi-based cancer therapy.

Key words—RNA interference; short hairpin RNA; hydrodynamic delivery; electroporation; tumor growth

1. はじめに

RNA 干渉 (RNA interference) は二本鎖 RNA により配列特異的に mRNA が分解される現象である。¹⁾ 2001 年に Tuschl らにより, この現象が活性本体である 21-23 塩基対の二本鎖 RNA (siRNA) を用いることで哺乳動物にも適用可能であることが明らかとされ, それ以来, 合成された siRNA, あるいは細胞内でプロセッシングを受けることにより siRNA となるショートヘアピン型 RNA (shRNA) を用いることで RNA 干渉が誘導可能であることが *in vitro*・*in vivo* の実験系において証明されてきた。^{2,3)} RNA 干渉は, 標的遺伝子の発現を簡便かつ特異的に抑制可能であることから, 現在では特定遺伝子の機能を評価するための実験手技として幅広く

活用されている。また, がんやウイルス感染などに代表される病原タンパク質の発現亢進が原因となる疾患に対しては, その発現を特異的に抑制することによる分子標的治療法としての応用が期待されている。^{4,5)} その一方で, RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は siRNA が存在する細胞に限局されるため, RNA 干渉の治療手段としての適用には siRNA の標的細胞へのデリバリーが必要条件となる。⁶⁾ しかしながら十分に治療可能な siRNA のデリバリー方法はまだまだほとんど開発されておらず, より効率的なデリバリー方法の開発が必要である。そこで本稿ではわれわれの検討結果を中心に, siRNA をデリバリーすることで発がん遺伝子やがん細胞の増殖・転移等に関与した遺伝子の発現を抑制することによるがん治療の可能性について解説する。

2. *In vivo* におけるがん細胞への siRNA のデリバリー

RNA 干渉の誘導には, siRNA が標的細胞に活性を保持した状態で到達することが必要であるが,

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

*e-mail: Yuki@f01.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD1 で発表したものを中心に記述したものである。

siRNA は核酸であることから生体内における安定性が低い。したがって、化学的安定性の改善を目的とした化学修飾 siRNA の有効性も報告されている。⁷⁾ また、細胞での転写により shRNA を発現するベクターも有効であり、ウイルスベクター、非ウイルスベクターが利用可能である。^{8,9)} ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター投与による死亡事例やレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における白血病の発症など、安全性の面で解決しなければならない課題が多い。¹⁰⁻¹²⁾ これに対し、プラスミド DNA (pDNA) に代表される非ウイルスベクターは、安全性・生産性の面で優れており、また問題とされてきた導入効率についても近年大幅に改善されてきている。ウイルスを使わない方法で RNA 干渉を誘導し疾患治療を実現するためには、siRNA あるいは shRNA 発現 pDNA (pshRNA) を標的細胞内へデリバリーすることが必須である。しかしながら、siRNA や pshRNA などは、水溶性高分子であるため細胞膜透過性が著しく低く、静脈内投与のような一般的な投与方法ではほとんど細胞内には到達しない。細胞内で作用するこれら化合物による疾患治療の実現には、これらの化合物を効率よく標的細胞内にデリバリーする技術の開発が必要である。膜透過性が制限される水溶性高分子化合物の細胞内デリバリーに関しては、これまでにアンチセンスオリゴヌクレオチドやリポザイム、pDNA などを対象に検討されてきた。¹³⁾ 中でも非ウイルスベクターによる遺伝子導入に関する検討においては、pDNA 単独の投与方法の最適化に始まり、電気パルスや超音波の利用、各種高分子・微粒子ベクターとの複合体化による遺伝子発現の増大など、多岐に渡る技術が集積されている。siRNA や shRNA 発現ベクターの利用に際しても、これまでに開発されてきた核酸デリバリー技術が応用可能である。siRNA あるいは pshRNA を生体レベルで標的細胞、すなわちがん細胞へデリバリーすることで標的遺伝子の発現を抑制することが可能となれば、新規分子標的がん治療法になり得るものと考えられる (Fig. 1)。

2-1. がん細胞における遺伝子発現抑制効果の定量的解析 がん細胞での RNA 干渉誘導の検討には、がん細胞内の遺伝子発現量を定量的に評価可能な実験系の利用が非常に有用である。われわれはマウス黒色細胞腫 B16 細胞をモデルのがん細胞と

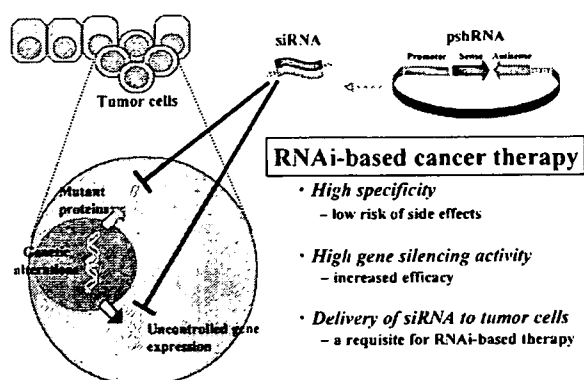


Fig. 1. Schematic Image of RNAi Pathway and Its Application to Cancer Therapy

Because of its highly potent and specific gene silencing effect, RNAi is expected to be applied to cancer therapy. To perform RNAi-based therapy, siRNA or pshRNA should be delivered to the target cells because the RNAi effect is limited in the cells that received RNAi effectors.

し、ホタル及びウミシイタケの2種類のルシフェラーゼを安定に発現する細胞株 B16/dual Luc を構築することによりがん細胞における遺伝子発現抑制効果について定量的に評価可能であることを報告した。¹⁴⁾

この系では、B16/dual Luc にホタルルシフェラーゼに対する siRNA をトランスフェクションし、一定時間後に測定した両ルシフェラーゼ活性の比を算出することで簡便かつ定量的に RNA 干渉効果を評価可能である。われわれの検討においては、種々の濃度の siRNA をトランスフェクションしたのちのルシフェラーゼ活性を経時的に評価し、遺伝子発現抑制効果が siRNA の濃度依存的であることが示されている (Fig. 2)。¹⁵⁾ RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は、ある時点での最大抑制率を指標に評価されることが多いが、「効果」の観点からは抑制強度だけでなく抑制時間も重要である。われわれは薬物速度論解析において用いられるモーメント解析を、ルシフェラーゼ活性の経時変化データに当てはめることで、遺伝子発現抑制効果の強度及び持続時間の指標として、 AUC_{IE} 及び MRT_{IE} を RNA 干渉効果の新たな指標として提唱した (Table 1)。¹⁵⁾ これにより初期濃度 (C_0) 1, 10, 100 nM の siRNA による遺伝子発現抑制効果について評価を行ったところ、その AUC_{IE} 及び MRT_{IE} と C_0 とは薬物用量-反応を表す式 C_0/AUC_{IE} or $C_0/MRT_{IE} = C_0/a + b/a$ (Eq. (1); a, b は定数) において線形関係であることを見出した (Fig. 3)。また、siRNA 及び pshR-

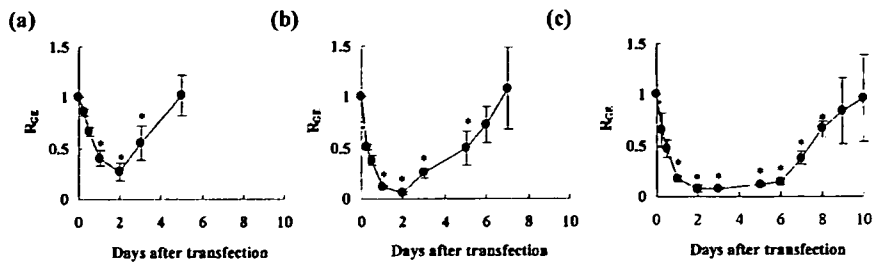


Fig. 2. Time-courses of Gene Expression (R_{GE}) following Transfection of siRNA

B16-BL6/dual Luc cells were transfected with siRNA targeting firefly luciferase at concentrations of 1 (A), 10 (B) and 100 nM (C). Luciferase activities were determined at the indicated times after transfection. The results are expressed as mean \pm S.D. ($n=3$). * $p<0.05$ for Student's t -test versus control group. Cited from Ref. 15).

Table 1. AUC_{IE} (day) and MRT_{IE} (day) versus siRNA Initial Concentrations (C_0 ; nM)

C_0	AUC_{IE}	MRT_{IE}
1	2.00	1.98
10	4.00	2.72
100	6.59	4.21

NAによる遺伝子発現抑制効果についての定量的比較を行う際にも B16/dual Luc 及びモーメント解析の方法論は有用であり、1分子当たりの遺伝子発現抑制効果は pshRNA の方が約 50 倍強力であることを示した。また、遺伝子発現抑制効果の持続について MRT_{IE} を用いて評価を行い、濃度により多少のばらつきは認められるものの pshRNA の方が 2-3 倍有利であることを明らかにしている。

B16/dual Luc は 2 種類のルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するため、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼの活性の比を取ることにより生体内のがん細胞数のばらつきを補正し、標的遺伝子の発現抑制効果について *in vivo* においてもがん細胞特異的に定量的に評価可能である。

2-2. 局所投与によるデリバリー 局所への遺伝子導入を目的としたベクターの投与に関しては既に種々の検討がなされている。腫瘍局所での RNA 干渉の誘導によるがん治療を試みる際には、これら既存の投与方法が利用可能と考えられる。しかしながら遺伝子発現強度が重要な遺伝子導入とは異なり、RNA 干渉の誘導によるがん治療の際には標的細胞群のどれぐらいの割合に siRNA を導入できたか、という標的 (がん) 細胞へのデリバリー効率が治療効果を左右する重要なパラメーターになるものと考えられる。

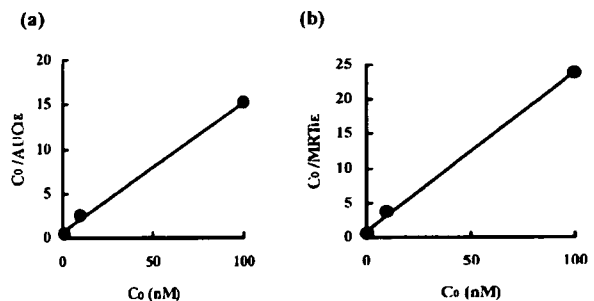


Fig. 3. Linear Plots of C_0/AUC_{IE} and C_0/MRT_{IE} versus C_0

(a) Linear plots of C_0/AUC_{IE} versus C_0 . Symbols represent C_0/AUC_{IE} calculated, with lines fitted using Eq. (1). a and b , are parameters described in Eq. (1), and were calculated to be 6.90 and 4.72, respectively. r , is the correlation coefficient of the linear plots, and was calculated to be 0.999. (b) Linear plots of C_0/MRT_{IE} versus C_0 . Symbols represent C_0/MRT_{IE} calculated, with lines fitted using Eq. (1). a and b , are parameters described in Eq. (1), and were calculated to be 4.35 and 3.47, respectively. r , is the correlation coefficient of linear plots, and was calculated to be 0.999. Cited from Ref. 15).

局所投与された pDNA のデリバリー効率を改善する手法として各種物理的刺激的適用が試みられてきた。代表的なものとしては、電気パルスを投与部位に加えるエレクトロポレーションが挙げられる。一般にエレクトロポレーションを行うことにより遺伝子発現が増大することが報告されているが、われわれはこのときの発現の増加は導入細胞数の増大も伴うものであることを観察している。¹⁶⁾

われわれはマウス皮下に B16/dual Luc を移植することにより作製した原発性腫瘍モデルにおいて、ホタルルシフェラーゼを標的とする siRNA 又は pshRNA 水溶液を腫瘍組織内に注入したのちエレクトロポレーションを行うことで投与 24 時間後のルシフェラーゼ活性は対照群の約 30% にまで抑制可能であることを報告している。¹⁴⁾ 培養条件下での遺伝子発現抑制が約 90% 程度であることを考慮すると、本投与方法を用いることで腫瘍組織中の少なくとも 70% 以上のがん細胞において RNA 干渉を

誘導可能であることが推察できる (Fig. 4).¹⁴⁾

2-3. 経血管投与によるデリバリー siRNA 又は pshRNA の経血管投与は血流を介してこれら化合物が分布することから、投与された化合物の分布が投与部位近傍に限局される局所投与と比較して、より多くの細胞へと siRNA・pshRNA を導入可能な投与方法である。これら化合物を血管より投与した検討としては、2002年7月の Kay らのグループの報告がある。¹⁷⁾ 彼らは大容量のプラスミド DNA 水溶液を急速に血管内投与することにより、種々の臓器、特に肝臓において高い遺伝子発現が得られる方法 (ハイドロダイナミクス法) を用いた検討を行い、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA をマウスに投与し、同時投与した siRNA による RNA 干渉効果をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子に相補的な配列を持つ siRNA を投与することにより、約 80% の遺伝子発現抑制を得ている。また、siRNA に加え、pshRNA を投与した場合も siRNA と同等の抑制効果が得られることも報告している。

がん治療を目的としたハイドロダイナミクス法による RNA 干渉の *in vivo* への適用には、標的細胞へのデリバリー効率も効果を左右する重要な因子となる。siRNA と pshRNA とでは、分子サイズに大きな違いが存在するため、デリバリー効率に影響を与える可能性が考えられる。われわれは、分子サイズがハイドロダイナミクス法による遺伝子導入効率に及ぼす影響を明らかにするために、PCR を利用することでサイズの異なる遺伝子導入ベクターを用いた検討を行った。¹⁸⁾ しかしながら、4.8 kbp の GFP 発現プラスミド DNA、あるいは発現に必要な部分のみ (1.7 kbp) を PCR で増幅した DNA 断片をハイドロダイナミクス法でマウスに遺伝子導入したときの肝臓では、ほぼ同数の細胞で遺伝子発現が認められた (Fig. 5).¹⁸⁾ したがって、少なくともハイドロダイナミクス法による肝臓へのデリバリーに関しては分子サイズの影響はあまり認められないものと考えられる。一方、分子量 4000 の PEG を用いた検討では、十分な肝臓での集積がみられなかったことから、デリバリーの観点からはサイズが小さいことがかならずしも有利とは限らないことも推察される。¹⁹⁾

既述の通りハイドロダイナミクス法によるデリバ

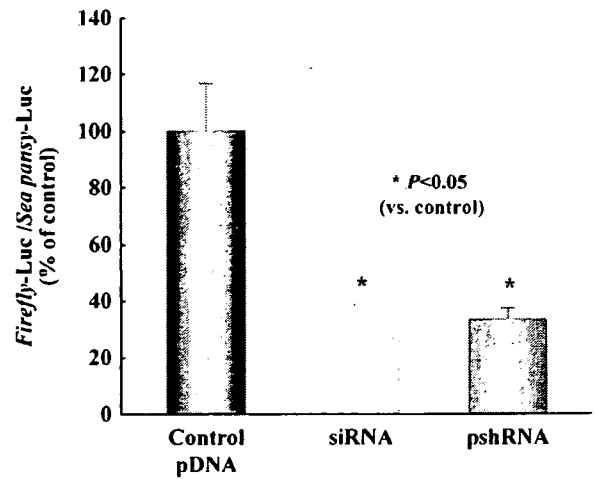


Fig. 4. RNAi in Subcutaneous B16-BL6/dual Luc following Intratumoral Injection of RNAi Inducer Followed by Electroporation

Mice received an intratumoral injection of control pDNA, siRNA targeting firefly luciferase (10 μ g) or pshRNA targeting firefly luciferase (30 μ g) followed by electroporation at a field strength 1000 V/cm 19 days after subcutaneous B16-BL6/dual Luc inoculation. Luciferase activities in the tumor tissue were determined 24 h after injection. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n=8$). * $p < 0.05$ for Dunnett's test versus control group. Cited from Ref. 14).

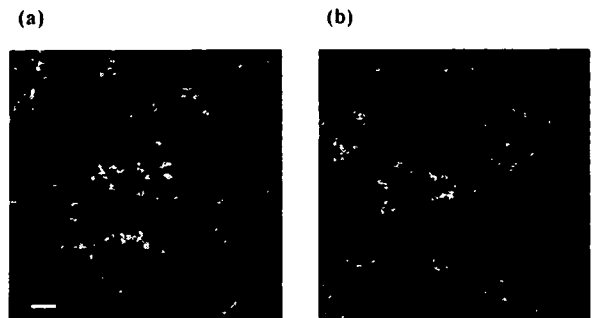


Fig. 5. Confocal Microscopic Images of the Liver Sections following Intravenous Injection of pEGFP-F or EGFPF-mini in Mice by the Hydrodynamics-based Procedure

Mice were euthanized at 6 h after injection and the liver sections were made. The images shown are typical of those observed in several visual fields of three mice per group. (a): EGFP-F-expressing pDNA (25 μ g or 8.4 pmol/mouse), (b): PCR-amplified EGFPF-expressing cassette (8.9 μ g or 8.4 pmol/mouse). Cited from Ref. 18).

リーは血流を介して行われることから、肝臓構成細胞のみならず血管に沿って分納する細胞がそのデリバリーの対象となると考えられる。われわれはハイドロダイナミクス法を利用することにより肝臓構成細胞のみならず、肝臓に転移したがん細胞にも血流を介して siRNA・pshRNA をデリバリー可能ではないかと考え、ルシフェラーゼ遺伝子で標識した B16-BL6 細胞を門脈内に移植することで作成した実験的肝転移モデルマウスを用いた検討を行っ

た.¹⁴⁾ その結果 siRNA 又は pshRNA のハイドロダイナミクス法による投与により肝臓中がん細胞での標的遺伝子発現を有意に対照群の 40–50%程度にまで抑制可能であることを見出ししている (Fig. 6).¹⁴⁾ ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入細胞数は肝臓の約 40%であることが報告されており、それより高い導入効率を得ることができたがこれは転移したがん細胞は血管に沿って分布することを反映した結果と推察される。しかしながら、その遺伝子発現抑制効果は、局所投与の場合と比較して低く、複数回投与による遺伝子発現抑制効率の改善はほとんど認められなかったため、より効率的な遺伝子発現抑制を実現するためにはほかのアプローチの併用等も検討する必要があると考えられる。

3. RNA 干渉を利用したがん遺伝子治療法の開発

前述の通り、生体内のがん細胞に対して siRNA 又は pshRNA をデリバリーすることができれば、がん細胞における遺伝子発現を抑制することが可能であり、その遺伝子発現抑制効果を利用したがん治療の試みについても報告されている。既に報告されているものとしては、がん細胞の増殖・生存・転移・血管新生・免疫回避といった性質に関係した遺伝子を標的とした RNA 干渉による検討が報告されている。

3-1. 局所投与によるがん細胞増殖抑制 局所に作製した腫瘍に対して siRNA 又は pshRNA の腫瘍内投与とエレクトロポレーションを併用することでがん細胞の遺伝子発現を効率よく抑制可能である

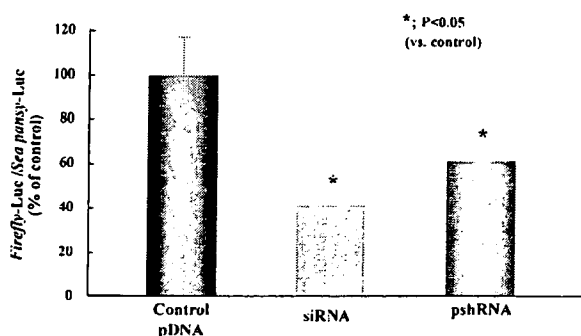


Fig. 6. RNAi in Metastatic Tumors in the Liver following Injection of siGL3 or pU6-siGL3 by the Hydrodynamics-based Procedure

Mice received an intravenous injection of control pDNA, siRNA targeting firefly luciferase or pshRNA targeting firefly luciferase (50 μ g) 13 days after tumor inoculation via the portal vein. The luciferases activities in the liver were measured 24 h after the injection. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n \geq 4$). * $p < 0.05$ for Dunnett's test versus control group. Cited from Ref. 14).

が、われわれはこの方法を用いてがん細胞の増殖等に関与した遺伝子である β -catenin, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の発現を抑制することでがん細胞の増殖が抑制可能であることを報告している。²⁰⁾ pshRNA の腫瘍内注射とエレクトロポレーションにより各内因性の標的遺伝子の mRNA 発現レベルを対照群の 25–35%程度に抑制可能であり、これらががんの増殖や転移に関与する遺伝子の発現を抑制することで有意ながん増殖の抑制が得られることを明らかとしている。このとき、一部マウスではがんのほぼ完全な退縮が認められた (Fig. 7)。こうした pshRNA のデリバリーによる腫瘍増殖の抑制効果は腫瘍サイズ依存的であり、腫瘍サイズの増大とともに抑制効果が減弱することも示されている。これは、腫瘍の増大に伴い pshRNA がデリバリーされるがん細胞数の割合が減少することによるものと考えられる。したがって、大きな腫瘍を標的とする場合にはデリバリー効率を改善することが重要と考えられる。

局所投与により RNA 干渉を誘導する方法としては、エレクトロポレーションの利用のほかにカチオン性物質/siRNA コンプレックスの腫瘍内投与が報告されている。Kim らは VEGF を標的とする siRNA を、マウス皮下に作製した腫瘍組織内に Cholesteryl oligo-D-arginine (Chol-R9)/siRNA コンプレックスの形で単回投与することにより、がん細胞の増殖を対照群と比較して有意に抑制可能であることを報告している。²¹⁾ また、sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) を標的とする siRNA とカチオン性リポソームのコンプレックスをマウス皮下に作製した腫瘍組織内に 3 日毎に注入することで腫瘍組織の増殖を有意に抑制可能であることが Chae らにより報告されている。²²⁾ しかしながら、われわれの検討も含めたいずれの報告においても完全な腫瘍の拒絶には至っておらず、更なる効率の改善又はほかの方法を併用することによる治療効果の増強が必要であると考えられる。

3-2. 経血管投与を利用したがん細胞増殖抑制 経血管投与は導入細胞数の増大という観点から有用な方法であると考えられ、がん細胞が散在する転移性腫瘍に対してはその適用が特に望ましいと考えられる。ハイドロダイナミクス法を用いることで肝転移性腫瘍に対して RNA 干渉を誘導可能であるの

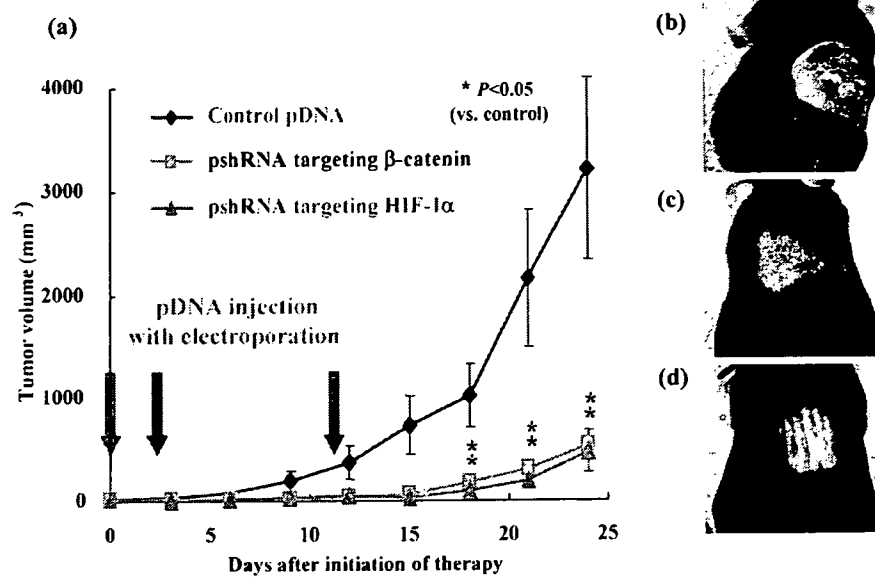


Fig. 7. Effects of Intratumoral Delivery of pshRNAs on the Growth of Primary Tumor Tissue

(a) Mice received an intratumoral injection of 30 μ g control pDNA or pshRNAs followed by electroporation. pDNAs were administered at day 0, 3 and 12 after the initiation of the therapeutic treatment. The results are expressed as the mean \pm S.E. ($n=4$). * $p < 0.05$ for Student's t -test versus control group. (b-d) Photographic image of tumor tissue of mice who received an intratumoral injection of control pDNA (b), pshRNA targeting β -catenin (c) or pshRNA targeting HIF1 α (d) at 18 days after initiation of therapeutic treatment. Cited from Ref. 20).

で、その遺伝子発現抑制効果を利用したがん治療の可能性について評価した。すなわち局所腫瘍モデルと同様に、マウス結腸がん細胞株 Colon26 細胞を門脈より移植することで作製した肝転移腫瘍モデルにおける β -catenin 又は HIF-1 α を標的とする pshRNA のがん細胞増殖抑制効果について調べた。培養 Colon26 細胞を用いた *in vitro* の系においては β -catenin を標的とする pshRNA の方が HIF-1 α を標的とする pshRNA より強力ながん細胞増殖抑制効果を示している。両 pshRNA の物性はほぼ同じであるため肝臓中のがん細胞へのデリバリー効率は同程度であると考えられることから、 β -catenin を標的とする pshRNA の方が肝転移性腫瘍モデルにおけるがん細胞増殖抑制効果は高いと考えられる。しかしながら β -catenin を標的とする pshRNA の投与ではがん細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかった一方で、HIF-1 α を標的とする pshRNA を投与したところがん細胞の増殖を効率よく抑制可能であった。このことから、肝臓中のがん細胞内の遺伝子発現抑制以外の要因が肝臓における RNA 干渉の誘導によるがん細胞増殖抑制効果に関与していると推察される。その一因として、ハイドロダイナミクス法を用いることで肝臓中のがん細胞にデリバリー可能ではあるが、投与された pshRNA は肝臓

中の正常細胞へもデリバリーされることから、がん細胞のみならず正常細胞における遺伝子発現の抑制ががん細胞の増殖抑制につながったのではないかという仮定が考えられる。詳細については現在検討中である。

全身投与によりがん細胞において RNA 干渉を誘導することによりがん細胞の増殖抑制を試みた検討としては、siRNA 単独投与又はカチオン性物質/siRNA コンプレックスの投与によるものが報告されている。Mook らは、large subunit of RNA polymerase II を標的とする naked siRNA を尾静脈より投与することで、マウス皮下に作製した腫瘍の増殖を有意に抑制可能であることを報告している。²³⁾ また、EphA2 を標的とする naked siRNA を用いた同様の検討結果も報告されている。²⁴⁾ Pal らは Raf を標的とする siRNA をカチオン性リポソーム/siRNA コンプレックスの形で静脈内投与することにより、マウス皮下に移植したがん細胞における Raf の遺伝子発現及び腫瘍組織の増殖を抑制可能であることを報告している。²⁵⁾

また、がん細胞以外の細胞も RNA 干渉の標的細胞とした検討が Santel らにより報告されている。²⁶⁾ 彼らは、腫瘍組織内の血管内皮細胞における CD31 の発現をカチオン性リポソーム/siRNA を用いて抑

制することにより、腫瘍組織における血管新生並びに腫瘍組織の増殖を抑制可能であることを示している。一般にがん細胞は遺伝子の変異が起こり易いため、RNA干渉による遺伝子発現抑制に対する耐性を獲得する可能性が考えられるが、それと比較して血管内皮細胞のような正常細胞は遺伝子発現の変異は起こり難いため、彼らの結果は正常細胞を標的とすることによる耐性を生じ難い新しい治療法の可能性を示すと考えられる。

4. おわりに

がん細胞特異的に発現している特定の分子を標的とした分子標的治療の実現が望まれており、特定の mRNA を特異的に分解する RNA 干渉は最も有望視される方法の 1 つである。しかしながら、その実現には siRNA あるいは shRNA 発現ベクターを標的細胞（主にがん細胞）に効率よくデリバリーする方法論の開発が不可欠である。一般にがん治療を目的とした場合にはがん細胞に対する RNA 干渉誘導効率が治療効果を左右する大きな要因となることが多いため、研究開発が進むにつれて、RNA 干渉によるがん治療の可能性だけでなく、その限界も明らかとなってきた。標的細胞群の一部において RNA 干渉を誘導することで治療効果が得られる場合、RNA 干渉を利用するシステムは非常に優れた治療法になる可能性がある。今後は治療遺伝子の投与や、DNA ワクチンによる抗原デリバリーなどと組み合わせることで、RNA 干渉により治療効果が増大できるものと期待する。

REFERENCES

- 1) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
- 2) Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P., *Cell*, **101**, 25-33 (2000).
- 3) Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A., *Genes Dev.*, **13**, 3191-3197 (1999).
- 4) Gong H., Liu C. M., Liu D. P., Liang C. C., *Med. Res. Rev.*, **25**, 361-381 (2005).
- 5) Rye P. D., Stigbrand T., *Tumour Biol.*, **25**, 329-336 (2004).
- 6) Zeng Y., Cullen B. R., *RNA*, **8**, 855-860 (2002).
- 7) Braasch D. A., Liu Y., Corey D. R., *Biochemistry*, **42**, 7967-7975 (2003).
- 8) Xia H., Mao Q., Paulson H. L., Davidson B. L., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1006-1010 (2002).
- 9) Miyagishi M., Taira K., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 497-500 (2002).
- 10) Marshall E., *Science*, **287**, 565-567 (2000).
- 11) Marshall E., *Science*, **286**, 2224-2245 (1999).
- 12) Marshall E., *Science*, **298**, 34-35 (2002).
- 13) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861-870 (2001).
- 14) Takahashi Y., Nishikawa M., Kobayashi N., Takakura Y., *J. Control. Release*, **105**, 332-343 (2005).
- 15) Takahashi Y., Yamaoka K., Nishikawa M., Takakura Y., *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 816-819 (2006).
- 16) Sakai M., Nishikawa M., Thanaketspaisarn O., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.*, **12**, 607-616 (2005).
- 17) McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T.-T. T., Conklin D. S., Hannon G. J., Kay M. A., *Nature*, **418**, 38-39 (2002).
- 18) Hirata K., Nishikawa M., Kobayashi N., Takahashi Y., Takakura Y., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2251-2261 (2007).
- 19) Kobayashi N., Kuramoto T., Yamaoka K., Hashida M., Takakura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 853-860 (2001).
- 20) Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y., *J. Control. Release*, **116**, 90-95 (2006).
- 21) Kim W. J., Christensen L. V., Jo S., Yockman J. W., Jeong J. H., Kim Y.-H., Kim S. W., *Mol. Ther.*, **14**, 343-350 (2006).
- 22) Chae S. S., Paik J. H., Furneaux H., Hla T., *J. Clin. Invest.*, **114**, 1082-1089 (2004).
- 23) Mook O.R., Baas F., Wissel M. B., Fluiter K., *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 833-843 (2007).
- 24) Duxbury M. S., Ito H., Zinner M. J., Ashley S. W., Whang E. E., *Oncogene*, **23**, 1448-1456 (2004).
- 25) Pal A., Ahmad A., Khan S., Sakabe I., Zhang C., Kasid U. N., Ahmad I., *Int. J. Oncol.*, **26**, 1087-1091 (2005).
- 26) Santel A., Aleku M., Keil O., Endruschat J., Esche V., Durieux B., Löffler K., Fechtner M., Röhl T., Fisch G., Dames S., Arnold W., Giese K., Klippel A., Kaufmann J., *Gene Ther.*, **13**, 1360-1370 (2006).

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 κ B (NF- κ B) in the lung. Insertion of additional NF- κ 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)- β or IFN- γ 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- κ 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。^{1,2)} *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。²⁾ 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。³⁾ 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、安全性に優れる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。⁴⁾ 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一つであるが、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"> • Optimization of administration route/method • Development of cell-specific carrier/vector • Use of cell/tissue-specific promoters
Level of expression	The transgene expression is not sufficient to produce any significant therapeutic effects.	<ul style="list-style-type: none"> • Increase in the delivery efficiency of genes into the cell/nucleus • Use of highly active promoter
Duration of expression	Frequent administration may reduce the quality of life in patients.	<ul style="list-style-type: none"> • Controlled/sustained release of plasmid DNA • Increase in the stability of genes in administration sites and in the cells • Prevention of promoter attenuation/inactivation • Stabilization of transgene products • Extension of the life span of the cells expressing the transgene
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"> • Optimization of administration route/method

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,⁹⁾ *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)- α やインターフェロン (IFN)- γ 、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。⁶⁾ 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。⁷⁻¹⁰⁾ 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。¹¹⁾ ¹¹¹In 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

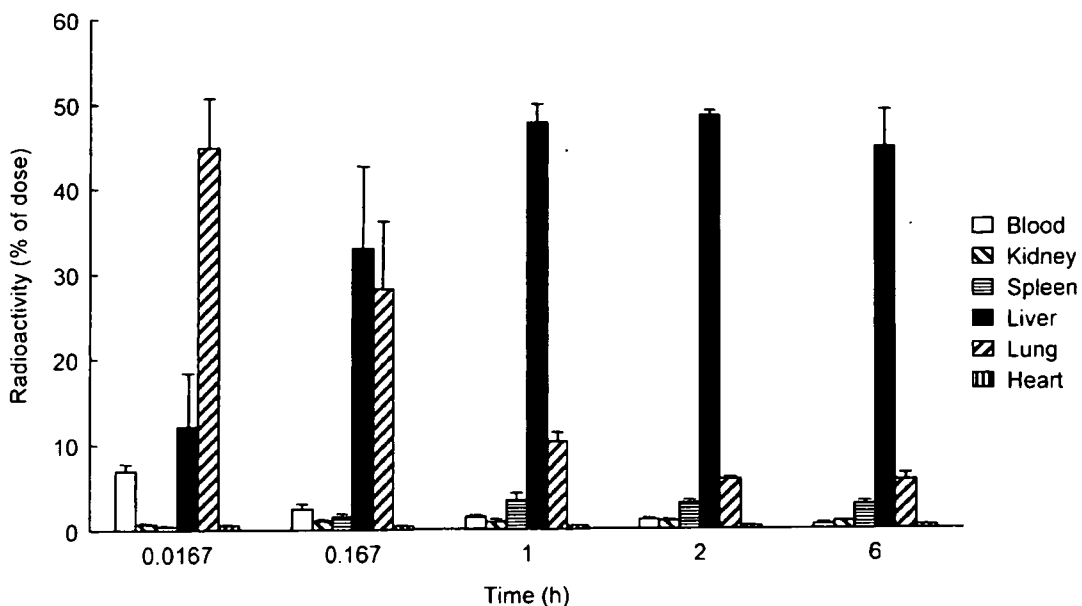


Fig. 1. Tissue Distribution of Radioactivity after Intravenous Injection of ¹¹¹In-labeled Lipoplex in Mice

Mice received a DOTMA/Chol liposome-¹¹¹In-plasmid DNA complex at a dose of 25 μ 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- α 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。⁹⁾ 実際、リポプレックス投与後血清中 TNF- α 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- κ 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- α は、転写因子 NF- κ B の強力な活性化因子として知られる。NF- κ B は活性化により核へ移行し、DNA 上の NF- κ 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- κ B 結合配列が存在し、NF- κ 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- α が産生され、遺伝子導入細胞内で NF- κ 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- κ 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- κ 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- κ B が活性化することが明らかとなった。NF- κ 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- κ B 活性化が認められた。このとき、NF- κ 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- κ 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- κ 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

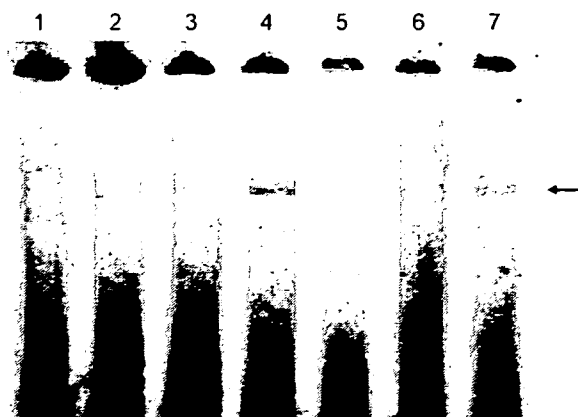


Fig. 2. Analysis of NF- κ B Activity in Mouse Lung after Intravenous Injection of Lipoplex

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 μ 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- κ 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- κ 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- κ 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- κ B 活性と遺伝子発現の間には正の相関があることが示唆された。

2-3. NF- κ 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- κ B 結合配列が4個存在する。われわれは、NF- κ 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- κ 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- κ B 結合配列を新たに挿入した新規プラスミド pCMV- κ B₅-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- κ B₅-Luc は NF- κ 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)。

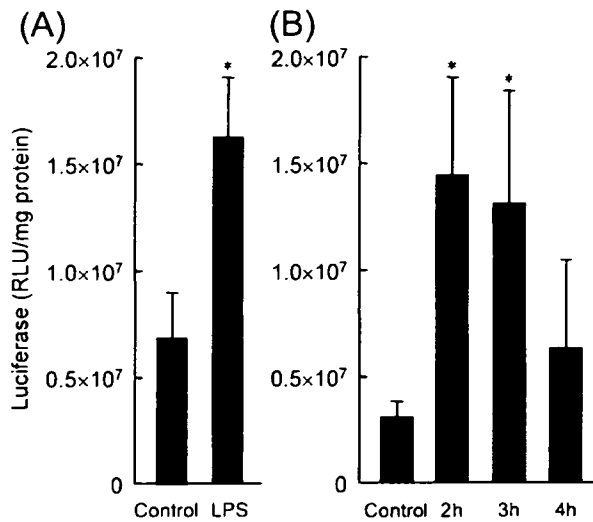


Fig. 3. Effect of LPS on Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of the Lipoplex

(A) At 30 min before injection of the lipoplex, mice received saline (control) or 200 μ g LPS. (B) Mice received 200 μ 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).

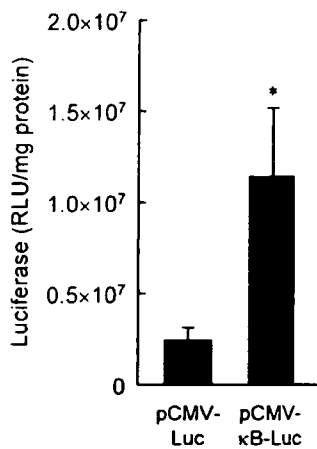


Fig. 4. Transgene Expression in Mouse Lung after Intravenous Injection of pCMV-Luc or pCMV- κ B₅-Luc

Each group of mice received a lipoplex composed of the indicated plasmid DNA at a dose of 25 μ 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- κ 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- κ 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- κ B が恒常的に活性化している癌細胞では、挿入した NF- κ 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。¹²⁾ 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¹³⁾ と Wolff ら¹⁴⁾ 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。¹⁵⁾ 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- β 又は IFN- γ を発現するプラスミド DNA (pCMV-Mu β 及び pCMV-Mu γ) 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。¹⁶⁾ 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、³⁾ 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

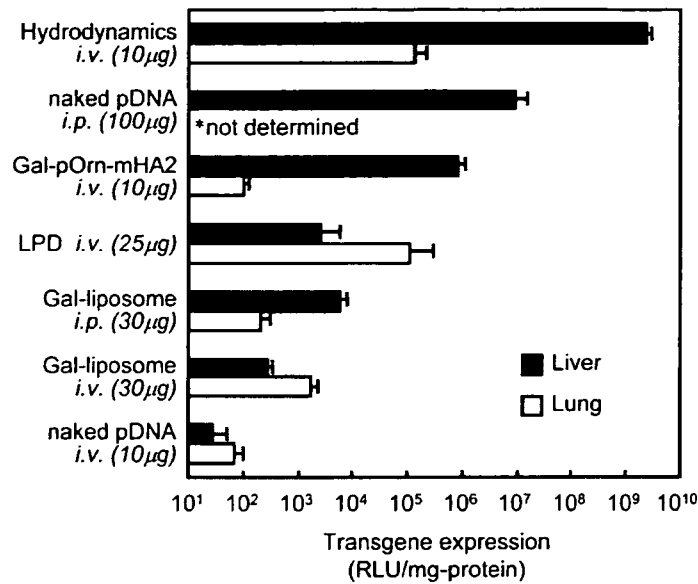


Fig. 5. Comparison of Transgene Expression Produced by Various Nonviral Gene Delivery Approaches

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 fusogenic 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).

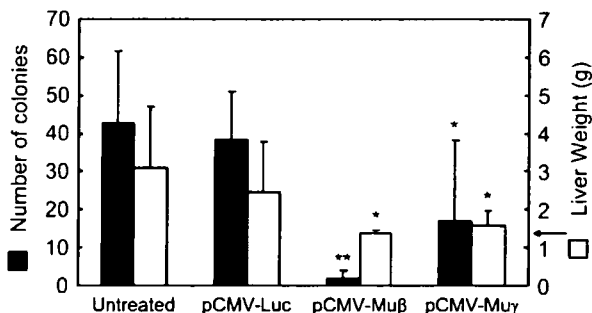


Fig. 6. Inhibition of Hepatic Metastasis of Tumor Cells by IFN-expressing Plasmid DNA

Mice were inoculated with 1×10^5 CT-26 into the portal vein, and received 10 µg pCMV-Muβ or pCMV-Muy 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 \pm 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- κ B₅-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。¹⁷⁾ 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-Mu β , pGZB-Muy) 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。^{7,9,10)} 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

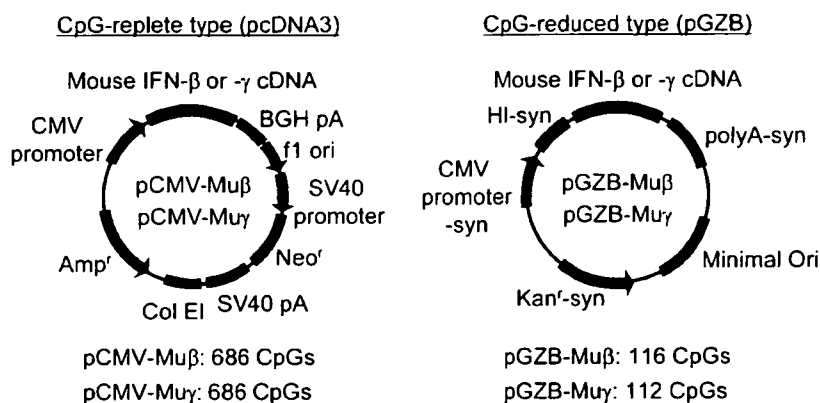


Fig. 7. Construction of IFN-expressing Plasmid DNA with Reduced Numbers of CpG Motifs

Mouse IFN- β or IFN- γ 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.

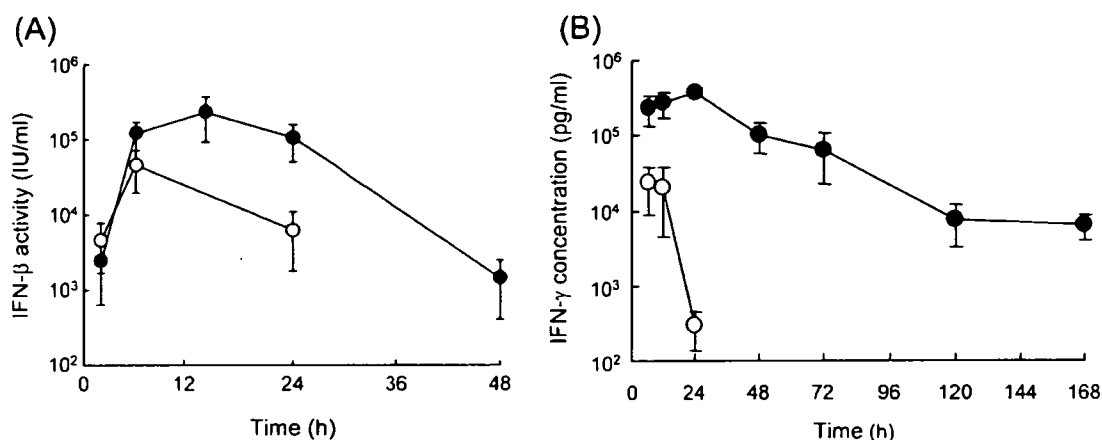


Fig. 8. Transgene Expression Profiles after Administration of IFN-expressing Plasmid DNA

(A) After intravenous injection of IFN- β -expressing plasmid DNA (10 μ g) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN- β activity was measured. (B) After intravenous injection of IFN- γ -expressing plasmid DNA (1 μ g) by the hydrodynamics-based procedure, the serum IFN- γ concentration was measured. The results are expressed as the mean \pm S.D. of three mice. ○: pCMV-Mu β , pCMV-Mu γ , ●: pGZB-Mu β , pGZB-Mu γ .

腔マクロファージから多量の TNF- α 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。¹⁰⁾

In vivo においても、naked pCMV-Luc の静脈内投与により血清中 TNF- α 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- α 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- α は検出限界 (17 pg/ml) 以下であり、TNF- α 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 β 又は pGZB-Mu γ 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- β 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- γ 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、

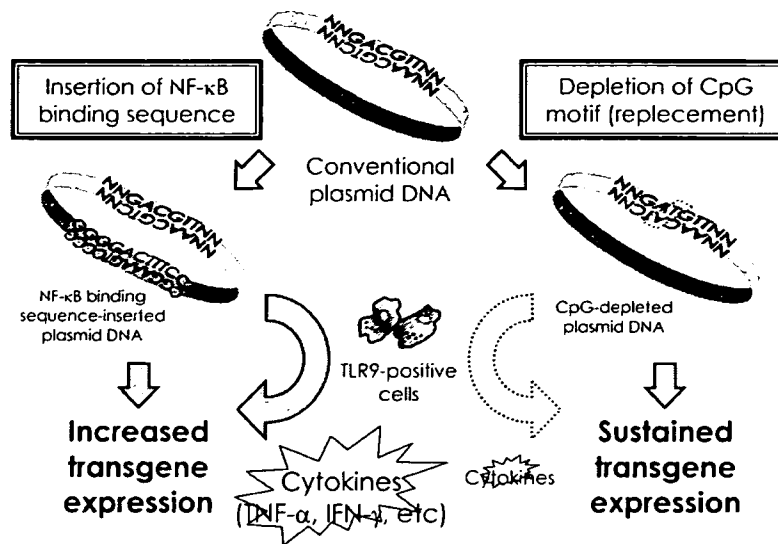


Fig. 9. Optimization of *In Vivo* Gene Transfer through Regulating Biological Response to Vectors

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ず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¹⁸⁾、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).