

dimethyl sulfoxide 中にて反応し CH 修飾キトサンを合成し、透析により精製を行った。反応生成物は、NMR と ESI-MS により確認を行った。

Lysine-histidine(KH)デンドロンの合成：固相合成により合成した。NovaSynTGR resin に対し Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-beta-Ala-OH、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH、を用いて第一世代を合成後、第二世代以降は Fmoc-Lys(Fmoc)-OH、または Fmoc-His(Boc)-OH、を用いて合成した。反応の進行は Kaiser test により確認した。20%piperidine により Fmoc を外し、95%TFA/2.5%EDT により切り出した。産生物は HPLC により精製し、MALDI-TOF MS により分子量を確認した。

KH デンドロン修飾キトサンの合成：KH デンドロン修飾キトサンは液相合成により合成した。まずキトサンに 2-iminothiolane・HCl 処理を行い、-SH を付加した。次に各世代の KH デンドロンとキトサンを DMSO 中で反応させた後、VIVASPIN20 (MW5000) を用いて未反応の KH デンドロンを除去し、得られた化合物を凍結乾燥した。KH デンドロン修飾キトサンの構造は NMR を用いて、また、修飾率は ninhydrin test により確認した。

プラスミド (pCMV-Luc)：CMV プロモーター、firefly luciferase 遺伝子を搭載したプラスミド DNA を用いた。

細胞：細胞は、human embryonic kidney (HEK293) cells (理研細胞バンクより譲渡) を用いた。培養には、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L グルタミンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。

キトサンとプラスミド DNA 複合体の調製：キトサン溶液とプラスミド DNA 溶液をそれぞれの濃度で調製し、キトサン上のアミノ基およびプラスミド DNA 上のリン酸基の各種モル比 (A/P 比) で室温にて混合して調製した。複合体形成の確認は、アガロース電気泳動により行った。

遺伝子発現の評価： 1.5×10^5 cell/well の濃度で 24 well プレートに播種して 24 時間後、キトサンとプラスミド DNA の複合体を含有する Opti-MEM® に変更し 6 時間培養後、DMEM 中で 42 時間培した後に洗浄した細胞を回収した。細胞

は、lysis buffer に溶解させ遠心後、ルシフェリンを添加し、ルシフェラーゼ活性はルミノメーターを用いて測定した。

KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の細胞内分布の評価：細胞は 8 well チャンバーガラススライドに播種した。キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと tetramethylrhodamine(TMR)修飾 pDNA の複合体を含む培地中で培養後、エンドソームの標識を目的に Alexa Fluor 488 Transferrin conjugate 含有 Opti-MEM 中で培養した。細胞を PBS で洗浄後、4%paraformaldehyde で固定し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

リソソーム内 pH の測定：fluorescein isothiocyanate(FITC)-dextran(MW:70000)1mg/ml 含有培地中で細胞を培養後、キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと pDNA 複合体含有培地で培養し、PBS で細胞を洗浄後、4%paraformaldehyde により固定後、蛍光顕微鏡で、ex. 457 nm および 488 nm のそれぞれの励起光で em 510 – 520 nm の範囲で撮影し、得られた画像を Image J により解析した。

細胞毒性の評価：複合体を含む OptiMEM 中で 6 時間培養後、DMEM 培地に変更して更に 42 時間培養し、PBS で細胞を洗浄後、Cell Counting Kit-8 により cell viability を評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験はすべて京都大学の規定に基づき行った。

C. 研究結果

CH 修飾キトサン、KH デンドロン修飾キトサンの合成：2-Iminothiolane・HCl を重量比で 100 に対して Histidine-Cysteine-OMe を 400 の割合で混合したものが、最もバッファリング能が高かった。さらに、pH7.4 または pH5.5 における水への溶解度を評価したところ、pH7.4 においてキトサンは全く溶解しなかったのに対して、CH 修飾キトサンは溶解し、その溶解度は pH5.5 におけるキトサンの溶解度にほぼ匹敵する高さであった。

KH デンドロン修飾キトサンの構造を NMR によって確認した。KH デンドロンの水への溶解度は、100 mg/ml であった。キトサンの溶解度は 0.1 mg/ml であったが KH デンドロン修飾キトサンの

溶解度は 10 mg/ml に増大した。次に、キトサンおよび KH デンドロン修飾キトサンに対して滴定を行ったところ、滴定曲線のシフトが認められた。

キトサン/pDNA 複合体、CH 修飾キトサン/pDNA 複合体、または KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体を調製し、アガロース電気泳動で複合体が形成されていることを確認した。また、DNAaseI で処理後、アガロース電気泳動を行ったところ、キトサン/pDNA 複合体では酵素切断によるバンドが認められたが、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合、切断は認められなかった。

細胞内分布の評価

キトサン/TMR-pDNA 複合体の場合、pDNA の分布とエンドソームの分布の指標となる Alexa Fluor 488 transferrin conjugate の分布がほぼ同じであった。一方、CH 修飾キトサン/pDNA 複合体または、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合、Alexa Fluor 488 transferrin conjugate のシグナル以外の細胞質にも TMR-pDNA のシグナルが分布する様子が確認された。

エンドソーム/リソソーム内の pH の変化の評価

Ohkuma らの方法 (Proc Natl Acad Sci USA, 75, 3327-3331, 1978) によりエンドソーム/リソソーム内の pH を評価した。キトサン/pDNA 複合体の場合、何も取り込ませていない細胞のエンドソーム/リソソーム内 pH はほぼ同程度であったが、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合はそのいずれの場合よりも pH が高かった。

遺伝子発現の評価

CH 修飾キトサンまたはキトサンと pDNA の複合体をそれぞれ A/P 比 2~30 および 1~10 の範囲において調製し、HEK293 細胞に投与後の遺伝子発現量を測定したところ、それぞれ、A/P 比が 2 または 25 において遺伝子発現量が最大となった。それぞれの最大遺伝子発現量を比較すると、CH 修飾キトサン/pDNA 複合体の場合キトサン/pDNA 複合体の場合の約 3 倍であった。

KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA の複合体をそれぞれ A/P 比 2~33 および 0.5~8 の範囲において調製し、HEK293 細胞に投与後の遺伝子発現量を測定したところ、それぞれ A/P 比 21 または 2 において最も遺伝子発現が高

かった。それぞれの最も遺伝子発現の高い A/P 比における発現量を比較すると、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合の遺伝子発現はキトサン/pDNA 複合体の場合の遺伝子発現の約 3 倍であった。

毒性の評価

本研究においてキトサン、CH 修飾キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと pDNA の複合体いずれの場合においても、細胞毒性は認められなかった。

D. 考察

ヒスチジン修飾率の異なる CH 修飾キトサン間でのバッファリング能を評価したところ、ヒスチジン-システインジペプチドの混合率を高くして合成したヒスチジン修飾キトサンの方がより強いバッファリング能を有することが分かった。したがって、混合比を変えることにより高効率にヒスチジンを修飾できていることが示唆される。

未修飾キトサンは一般的に酸性条件下では溶解しやすいが、中性ではゲル化または沈殿を生じるため溶解しにくいことが知られている。一方、最もバッファリング能が高かった CH 修飾キトサンについて、酸性または中性における水への溶解度を評価したところ、CH 修飾キトサンは pH 5.5 においても、pH7.4 においても同様によく分散した。更に、pH7.4 では、未修飾キトサンは全く解けなかったのに対し、CH 修飾キトサンは 10 mg/ml まで溶解した。これは、ヒスチジン修飾によりキトサンの表面にアミノ基が導入されたために、中性領域においてもイオン化しやすくなり水へ溶解しやすくなったと考えられる。以上、細胞や組織が正常に機能する環境である pH7.4 において CH 修飾によりキトサンの溶解度を飛躍的に上昇させることができた。

培養細胞における遺伝子発現効率を比較すると、CH 修飾キトサンとキトサンそれぞれの最適 A/P 比における最大の遺伝子発現量を比較しても CH 修飾キトサンの方が有意に高い遺伝子発現が得られた。以上より、ヒスチジン修飾がキトサンの遺伝子導入効率改善に有効であることを明らかにした。しかしながら、ジペプチド修飾では、キトサンのアミノ基 1 個に対して 1 個のヒスチジンが導入されるため、より効率的な修飾法が必要

となる。そこで、より効率的なヒスチジン修飾を目的にリジンデンドロンの末端にヒスチジンを結合させた KH デンドロンを合成した。第 3 世代のリジンデンドロンの場合、キトサンの 1 個のアミノ基に対して、8 個のヒスチジンを付加する事が可能になった。

キトサンの場合と比較して KH デンドロン修飾キトサンの中和滴定曲線は右へのシフトし、KH デンドロン修飾によりキトサンに pH buffering 能が付与されたことが示唆された。次に、細胞内における pH buffering 能を確認する事を目的に、FITC-dextran の蛍光強度を指標にエンドソーム/リソソーム内の pH の比較を行った。キトサン/pDNA 複合体を取り込ませた細胞と何も取り込ませていない細胞の FI₄₈₈/FI₄₅₇ はほぼ同程度であったのに対し、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体を取り込ませた細胞では FI₄₈₈/FI₄₅₇ の増大が認められ、エンドソーム/リソソーム内の pH が上昇したことが示唆された。本結果は、KH デンドロン修飾によりキトサンの pH 滴定曲線が右にシフトしたと併せて考えると、KH デンドロンによりエンドソーム内に流入した H⁺ が捕捉され、H⁺ 流入による pH の低下を抑制したことで説明できると考えられる。さらに、蛍光分子 TMR 修飾した pDNA とキトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンの複合体を HEK293 細胞に取り込ませた後、TMR-pDNA の細胞内分布を観察すると、キトサンとの複合体の場合は、エンドソーム内に TMR-pDNA が滞留する様子が観察されたが、KH デンドロン修飾キトサンとの複合体の場合においては TMR-pDNA の細胞質への分布が認められた。これらの結果は、PEI などの pH buffering 能を有する分子を pDNA と一緒にエンドソーム内に取り込ませると、エンドソーム内に流入した H⁺ が PEI に捕捉され、さらなる H⁺ 流入を促進すると同時に、Cl⁻ のエンドソーム内への流入が加速され、結果的にエンドソーム内の Cl⁻ イオン濃度上昇に伴いエンドソームの一時的な崩壊が誘発され pDNA の細胞質への移行が促進されるという報告 (J Gene Med 7, 657-663, 2005) とよく一致する。

キトサンのようにカチオン性を有する分子と pDNA の複合体による遺伝子導入法において、混合比は、複合体の安定性、粒子径、表面電荷に関

係する因子であり、最終的に遺伝子発現を決定する因子である。まず、KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA の複合体をそれぞれ各 A/P 比で作成し、平均分子量およびゼータ電位を測定した。キトサン/pDNA 複合体では、A/P 比が 8 より大きい場合は粘性が高くなり複合体が微粒子にはならなかった。各複合体に対しアガロース電気泳動を行ったところ、KH デンドロン修飾キトサンおよびキトサンいずれの場合も今回調製した A/P 比の範囲内において、ウェル以外に pDNA のバンドが認められなかったことから、複合体が形成されていることが確認できた。次に、各複合体を DNaseI で処理後、アガロース電気泳動を行ったところ、キトサン/pDNA 複合体の場合は酵素により切断された pDNA のバンドが認められたが、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA の場合は切断された pDNA のバンドが認められなかった。従って、KH デンドロン修飾キトサンと複合体を調製した方がキトサンの場合と比較して pDNA に対する保護能力が高いことが示唆され、今後 in vivo で使用する場合には、体内に存在する DNA 切断酵素から保護できることが期待できる。最後に、KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンとの pDNA 複合体を用いて HEK293 細胞における遺伝子発現を評価したところ、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA の場合は A/P 比 21 において、またキトサン/pDNA の場合は A/P 比 2 において最も高い遺伝子発現が得られ、各複合体における A/P 比の最適値が明らかになった。また、各最適 A/P 比における遺伝子発現を比較したところ、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体における遺伝子発現量はキトサン/pDNA 複体の遺伝子発現量より有意に高かった。

E. 結論

まず、histidine-cyctaine ジペプチドを用いてキトサンにヒスチジンを修飾した CH キトサンにより、中性領域での水への溶解度の増大、エンドソームからの脱出促進により遺伝子発現を増大させることができ、遺伝子導入効率の改善において、キトサンへのヒスチジン修飾が有効であることを明らかにした。さらに、キトサンに対する効率的なヒスチジン修飾を目的に、生体親和性を有す

るリジンデンドロンを骨格とし、その表面に pH buffering 能を有するヒスチジンを修飾した KH デンドロンを新たに構築した。KH デンドロンをキトサンに修飾することにより、中性領域における水への溶解度の改善、pH buffering 能の付与によるエンドソームからの脱出促進を可能にし、最終的に遺伝子発現効率を増大させることが可能となった。さらに、KH デンドロン修飾キトサンと pDNA の複合体形成により DNA 切断酵素からの pDNA の保護効果も期待できることが明らかとなった。以上、本研究計画、3 年間の計画のうちの 2 年目の成果を予定通り終了する事ができた。今後、DNA ワクチン療法への応用展開が期待できる成果を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Hashida, Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress. *Bio Drugs* 24(3), 195-205, 2010
2. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape. *Bioconjug Chem.* 21(6):1087-95, 2010
3. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Development of Lysine-histidine Dendron Modified Chitosan for Improving Transfection Efficiency in HEK293 Cells. Submitted.

2. 学会発表

1. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Improvement of the endosomal escape of chitosan by histidine modification、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム、大阪、2009 年 7 月 9-11 日
2. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Observation of Histidine-modified Chitosan/pDNA Complexes Escaping from Endosomes、第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会、

岡山、2009 年 9 月 3-5 日

3. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Development of lysine-histidine dendron modified chitosan for improving transfection efficiency in HEK293 cells、日本薬剤学会第 25 年会、徳島、2010 年 5 月 12-14 日
4. 樋口ゆり子、張 凱琳、川上 茂、山下富義、橋田 充、キトサンによる遺伝子導入効率改善を目的としたヒスチジン修飾法の最適化、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム、北海道、2010 年 6 月 2-3 日【**准奨励賞を受賞**】
5. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Endosomal Escape Rate of Lysine-Histidine Dendrons Evaluated by Live Cell Imaging、第 26 回日本 DDS 学会、大阪、2010 年 6 月 17-18 日
6. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Improvement of Gene Transfection Efficiency by Histidine-modified Chitosan, FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, U.S.A., 2010 年 11 月 13-18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

新規多機能性キトサンによる遺伝子導入システムの 開発とDNAワクチンへの応用

所属 京都大学大学院薬学研究科
研究者 樋口 ゆり子

研究要旨 キトサンの DNA ワクチン療法への応用を目指し、pH buffering 能を有するアミノ酸であるヒスチジンを樹状構造の末端に有するヒスチジンデンドロンを合成し、キトサンに修飾したところ、細胞質への移行促進により遺伝子発現を増大させることができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、エイズ予防 DNA ワクチン療法の確立を目指した新規遺伝子導入キャリアの開発である。キトサンは、バイオマス資源キチンから合成可能であるため、安価でかつ生分解性を有する安全なキャリア素材である。さらに、DNA ワクチン治療への応用を考えた場合、キトサン自体の有する免疫賦活作用によるワクチン効果の増強も期待できる。しかしながら、既に遺伝子導入キャリアとして汎用されているカチオン性を有する脂質やポリマーなどと比較すると、遺伝子導入効率が低いことが問題となる。その主な原因は、中性領域の水溶液中において粘性が極めて高く溶解度が低いこと、および、プラスミド DNA (pDNA) との複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれた後、エンドソームやリソソーム内へ滞留することにより pDNA が分解されること、である。

昨年度、我々は本研究課題において、pH buffering 能を有するアミノ酸であるヒスチジンを含むジペプチドをキトサンに修飾することにより、水溶性の増大、キトサンへの pH buffering 能の付与、エンドソームからの脱出促進、を通して遺伝子導入効率の改善が可能であることを明らかにした (Bioconjug Chem 2010)。

そこで本年度は、キトサンへの高効率なヒスチジン修飾によりさらに遺伝子導入効率を改善することを目的とする。コアとなる分子を中心に、

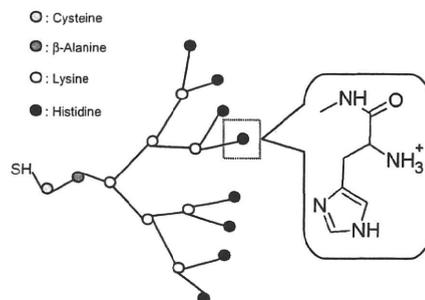
規則正しい分岐構造を有するデンドロンは、ほぼ単一分子量であり、一か所に多数の分子を修飾可能であるという特長を有する。特に、リジンなどの分岐構造を有するアミノ酸を用いて合成されたアミノ酸デンドロンは生体分解性を有する薬物やイメージング素子のキャリアとして利用されている。そこで、リジンデンドロンの末端にヒスチジンを修飾したリジン-ヒスチジンデンドロン (KH デンドロン) を合成し、キトサンにヒスチジンを修飾し、さらに、本法によりヒスチジン修飾したキトサンと pDNA の複合体を形成させることにより、pDNA のエンドソームから細胞質への移行の促進による遺伝子発現を増大させる。

B. 研究方法

KH デンドロンの合成: 固相合成により合成した。NovaSynTGR resin に対し Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-beta-Ala-OH、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH、を用いて第 1 世代を合成後、第 2、第 3 世代は Fmoc-Lys(Fmoc)-OH、または Fmoc-His(Boc)-OH、を用いて合成

(図 1)。反応の進行は Kaiser test により確

図 1



認した。20%piperidine により Fmoc を外し、95%TFA/2.5%EDT により切り出した。産生物は HPLC により精製し、MALDI-TOF MS により分子量を確認した。

KH デンドロン修飾キトサンの合成：KH デンドロン修飾キトサンは液相合成により合成した。まずキトサンに2-iminothiolane・HCl処理を行い、thionylated chitosan を合成した。次に KH デンドロンとキトサンを DMSO 中で反応させた後、VIVASPIN20 (MW5000) を用いて未反応の KH デンドロンを除去し、得られた化合物を凍結乾燥した。KH デンドロン修飾キトサンの構造は NMR を用いて確認し、また、修飾率は ninhydrin test により定量した。

pH 滴定：キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンを 1%の酢酸中に溶解し、0.1N NaOH により滴定を行い、溶液の pH を測定した。

pDNA (pCMV-Luc)：CMV プロモーター、firefly luciferase 遺伝子を搭載した pDNA を用いた。

細胞：細胞は、human embryonic kidney (HEK293) cells (理研細胞バンクより譲渡) を用いた。培養には、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L グルタミンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いた。

KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の調製：キトサンは、中性の水溶液には溶解しにくいので酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.5) に溶解した。また、KH デンドロン修飾キトサンは 5% glucose に溶解した。キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサン水溶液と 5% glucose に溶解した pCMV-Luc を等体積で室温において混合した。混合比は、KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサン中のアミノ基と pDNA 中のリン酸のモル比 (A/P) で示す。複合体の平均粒子径ならびにゼータ電位は、ZetaNanoSizer により測定した。複合体の安定性は DNaseI で 37 度 3 時間インキュベーション後、アガロース電気泳動により pDNA サイズの評価を行った。

KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の細胞内分布の評価：HEK293 細胞は 8 well チャンバーガラススライドに播種した。キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと tetramethylrhodamine(TMR)修飾 pDNA の複合

体を含む培地中で培養後、エンドソームの標識を目的に Alexa Fluor 488 Transferrin conjugate 含有 Opti-MEM 中で細胞を培養した。PBS で洗浄後、4%paraformaldehyde で固定し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

エンドソーム/リソソーム内 pH の測定：fluorescein isothiocyanate(FITC)-dextran(MW: 70000)1mg/ml 含有培地中で HEK293 細胞を培養後、キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと pDNA 複合体含有培地で培養した。PBS で洗浄後、4%paraformaldehyde により固定し、蛍光顕微鏡で、ex. 457 nm および 488 nm のそれぞれの励起光で em. 510 – 520 nm の範囲で撮影し、得られた画像を Image J により解析した。

遺伝子発現の評価：キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと pDNA の複合体を含有する Opti-MEM[®]中で 6 時間培養後、DMEM 培地に変更してさらに 42 時間培養した後に PBS で洗浄した細胞を回収した。細胞は、lysis buffer に溶解させ遠心した後、ルシフェリンを添加し、ルシフェラーゼ活性はルミノメーターを用いて測定した。

細胞毒性の評価：キトサンまたは KH デンドロン修飾キトサンと pDNA の複合体を含む OptiMEM 中で 6 時間培養した。その後、DMEM 培地に変更してさらに 42 時間培養し、PBS で細胞を洗浄後、Cell Counting Kit-8 により cell viability を評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験はすべて京都大学の規定に基づき行った。

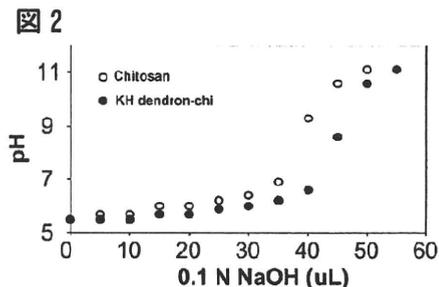
C. 研究結果

KH デンドロンおよび KH デンドロン修飾キトサンの合成および評価

KH デンドロン修飾キトサンの構造を NMR によって確認した。キトサンの溶解度は 0.1 mg/ml であったが KH デンドロン修飾キトサンの溶解度は 10 mg/ml に増大した。次に、キトサンおよび KH デンドロン

修飾キトサン

に対して滴定を行ったところ、滴定曲線のシフトが認め

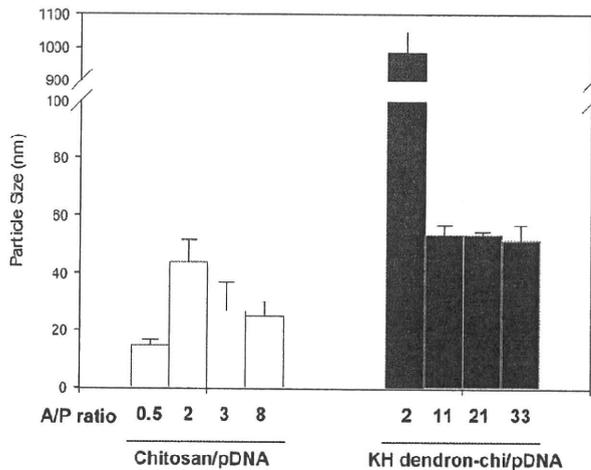


られた (図 2)。

KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA 複合体における pDNA の物理科学的性質および安定性の評価

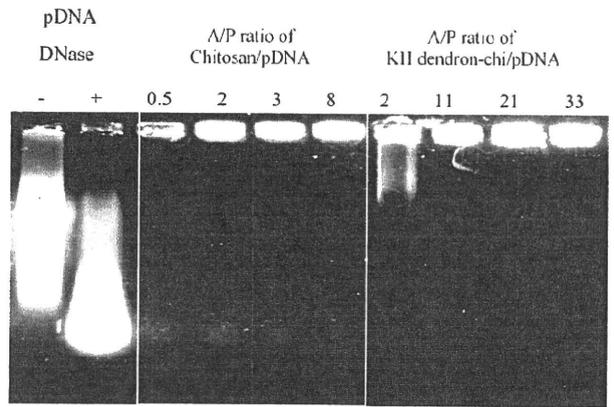
KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA の複合体を各 A/P 比で調整し、粒子径および表面電荷の指標となるゼータ電位を測定した。キトサン/pDNA 複合体は A/P 比 8 まで、また、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体は A/P 比 11~33 において、平均粒子径は 50 nm 以下であった (図 3)。また、キトサン並びに KH デンド

図 3



ロン修飾キトサンいずれの場合においても、A/P 比が増加するにつれてゼータ電位も増加した。キトサン/pDNA 複合体または KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体をそれぞれ 0.5~8 または 2~33 の各 A/P 比で調製し、アガロース電気泳動で確認したところ、pDNA は投与したウェルの位置から移動しなかった。次に、複合体形成による pDNA の酵素切断に対する安定性の評価を目的に、各複合体を DNAaseI でインキュベートした後にアガロース電気泳動を行ったところ、キトサン/pDNA 複合体の場合は、投与したウェルにおける pDNA の減少ならびに、pDNA のみを DNAaseI で処理した場合のバンドと同じ高さに薄いバンドが認められた。一方、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合は、pDNA のみを DNAaseI で処理した場合のバンドの位置にはバンドはほとんど認められず、A/P 比 2 の複合体においてウェルより下に流れるようなバンドがわずかに認められた (図 4)。

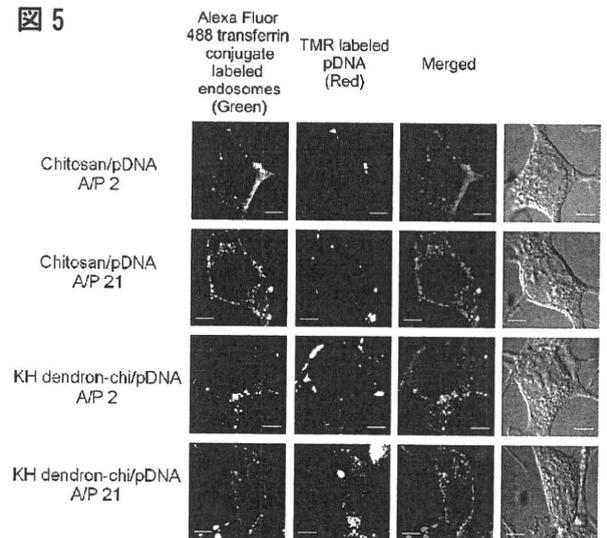
図 4



KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと TMR-pDNA の複合体の細胞内分布の評価

A/P 比が 2 または 21 で調製した KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと TMR 修飾 pDNA の複合体を HEK293 細胞に取り込ませ、細胞内分布を観察した。キトサン/TMR-pDNA 複合体の場合、pDNA の分布とエンドソームの分布の指標となる Alexa Fluor 488 transferrin conjugate の分布がほぼ同じであった。一方、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合は、Alexa Fluor 488 transferrin conjugate のシグナル以外の場所にも TMR-pDNA のシグナルが分布する様子が確認された (図 5)。これらの結果は、KH デンドロン修飾キトサン/TMR-pDNA 複合体の pDNA の一部がエンドソームから脱出して細胞質に移行したことを示唆する。

図 5

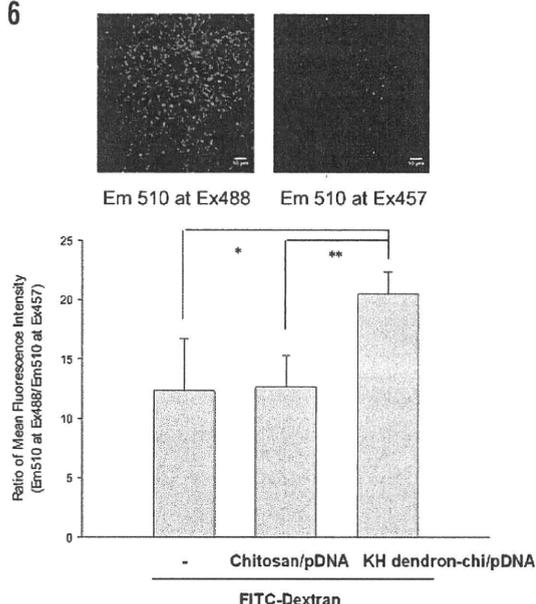


KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA との複合体が細胞内に取り込まれた時のリソソーム内の pH の変化の評価

FITC には吸収波長特性に 457 nm および 488

nm の 2 つのピークがあり、457 nm および 488 nm のそれぞれの励起光で em 510 – 520 nm の範囲で蛍光強度を測定した場合のそれぞれの蛍光強度を FI₄₅₇ および FI₄₈₈ とすると、 $R = FI_{488}/FI_{457}$ であらわされる R の値が pH と相関することが知られている。Ohkuma らは、比較的大きな分子量の dextran はエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれ、リソソームへ移行することを利用して FITC-dextran を細胞内へ取り込ませ、ex 457 nm および ex. 488 nm で FITC の蛍光強度を測定することによってエンドソーム/リソソーム内の pH の測定が可能であることを報告した (Proc Natl Acad Sci USA, 75, 3327-3331, 1978)。そこで、本方法を用いて、KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA との複合体を細胞内へ取り込ませた後の FITC-dextran の蛍光強度を比較したところ、キトサン/pDNA 複合体の場合は、何も取り込ませていない細胞の FITC-dextran の FI₄₈₈/FI₄₅₇ とほぼ同程度であったが、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合はそのいずれの場合よりも FI₄₈₈/FI₄₅₇ が高かった (図 6)。従って、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体が細胞内に取り込まれることによりリソソーム内の pH が上昇したことが示唆される。

図 6

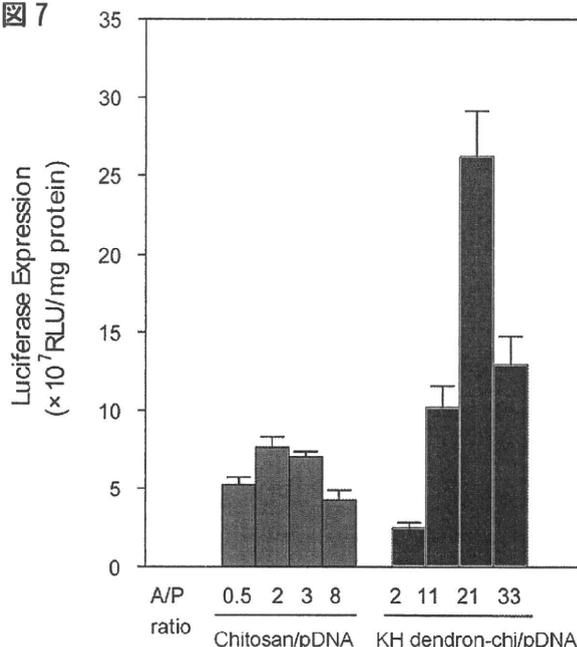


KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA との複合体による遺伝子発現の評価

KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA の複合体をそれぞれ A/P 比 2~33 および

0.5~8 の範囲において調製し、HEK293 細胞に投与後の遺伝子発現量を測定したところ、それぞれ最も遺伝子発現の高い最適の混合比があり、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合は A/P 比 21 において、また、キトサン/pDNA 複合体の場合は A/P 比 2 において最も遺伝子発現が高かった (図 7)。それぞれの最も遺伝子発現の高い A/P 比における発現量を比較すると、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体の場合の遺伝子発現はキトサン/pDNA 複合体の場合の遺伝子発現の約 3 倍であった。

図 7



KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンと pDNA との複合体の HEK293 細胞に対する細胞毒性の評価

遺伝子発現において KH デンドロン修飾キトサンまたはキトサンのそれぞれにおいて最も遺伝子発現が高かった A/P 比 2 または 21 において、細胞生存率の比較をおこなったところ、いずれの場合においても、何も投与しなかった細胞の生存率とほぼ同程度であり、これらの条件のもとでは細胞毒性はほとんどないことが示唆される。

D. 考察

昨年度、我々は、本研究課題において、ヒスチジンを末端に有するジペプチドを合成し、キトサンにヒスチジン修飾を行い、キトサンを遺伝子キャリアとして利用する時に問題となる、水溶性の低さ、細胞内への取り込みの低さを改善し、最終

的に遺伝子導入を増大させることができ、ヒスチジン修飾の有効性を明らかにした。しかしながら、ジペプチド修飾では、キトサンのアミノ基1個に対して1個のヒスチジンが導入されるため、より効率的な修飾法が必要となる。そこで本年度は、より効率的なヒスチジン修飾を目的にリジンデンドロンの末端にヒスチジンを結合させたKHデンドロンを合成した。リジンデンドロンは、規則的な枝分かれ構造で、ほぼ均一な分子量を有するため、第3世代のリジンデンドロンの場合、キトサンの1個のアミノ基に対して、8個のヒスチジンを付加する事が可能になる(図1)。さらに、アミノ酸だけから構成されるKHデンドロンはキトサンの特長である生体親和性を損なわずにヒスチジンの修飾が可能となる。

遺伝子デリバリーのキャリア開発において、pH buffering 能を有する分子がエンドソームからの脱出促進に有効であることは既に報告がある。そこでまず、KHデンドロンのpH buffering 能の評価を目的に、中和滴定を行ったところ、キトサンの場合と比較してKHデンドロン修飾キトサンの中和滴定曲線の右へのシフトが確認され(図2)、KHデンドロン修飾によりキトサンにpH buffering 能が付与されたことが示唆された。次に、細胞内におけるpH buffering 能を確認する事を目的に、FITC-dextranの蛍光強度を指標にエンドソーム/リソソーム内のpHの比較を行った。キトサン/pDNA複合体を取り込ませた細胞と何も取り込ませていない細胞の FI_{488}/FI_{457} はほぼ同程度であったのに対し、KHデンドロン修飾キトサン/pDNA複合体を取り込ませた細胞では FI_{488}/FI_{457} の増大が認められ(図6)、エンドソーム/リソソーム内のpHが上昇したことが示唆された。本結果は、KHデンドロン修飾によりキトサンのpH滴定曲線が右にシフトしたことから併せて考えると、KHデンドロンによりエンドソーム内に流入した H^+ が捕捉され、 H^+ 流入によるpHの低下を抑制したことで説明できると考えられる。さらに、蛍光分子TMR修飾したpDNAとキトサンまたはKHデンドロン修飾キトサンの複合体をHEK293細胞に取り込ませた後、TMR-pDNAの細胞内分布を観察すると、キトサンとの複合体の場合は、エンドソーム内にTMR-pDNAが滞留する様子が観察されたが、KHデンドロン修飾キト

サンとの複合体の場合においてはTMR-pDNAの細胞質への分布が認められた(図5)。これらの結果は、PEIなどのpH buffering 能を有する分子をpDNAと一緒にエンドソーム内に取り込ませると、エンドソーム内に流入した H^+ がPEIに捕捉され、さらなる H^+ 流入を促進すると同時に、Cl⁻のエンドソーム内への流入が加速され、結果的にエンドソーム内のCl⁻イオン濃度上昇に伴いエンドソームの一時的な崩壊が誘発されpDNAの細胞質への移行が促進されるという報告(J Gene Med 7, 657-663, 2005)とよく一致する。

キトサンのようにカチオン性を有する分子とpDNAの複合体による遺伝子導入法において混合比は、複合体の安定性、粒子径、表面電荷に関係する因子であり、最終的に遺伝子発現を決定する因子である。まず、KHデンドロン修飾キトサンまたはキトサンとpDNAの複合体をそれぞれ各A/P比で作成し、平均分子量およびゼータ電位を測定した(図3)。キトサン/pDNA複合体では、A/P比が8より大きい場合は粘性が高くなり複合体が微粒子にはならなかった。各複合体に対しアガロース電気泳動を行ったところ、KHデンドロン修飾キトサンおよびキトサンいずれの場合も今回調製したA/P比の範囲内において、ウェル以外にpDNAのバンドが認められなかったことから、複合体が形成されていることが確認できた。次に、各複合体をDNaseIで処理後、アガロース電気泳動を行ったところ、キトサン/pDNA複合体の場合は酵素により切断されたpDNAのバンドが認められたが、KHデンドロン修飾キトサン/pDNAの場合は切断されたpDNAのバンドが認められなかった(図4)。従って、KHデンドロン修飾キトサンと複合体を調製した方がキトサンの場合と比較してpDNAに対する保護能力が高いことが示唆され、今後in vivoで使用する場合には、体内に存在するDNA切断酵素から保護できることが期待できる。最後に、KHデンドロン修飾キトサンまたはキトサンとのpDNA複合体を用いてHEK293細胞における遺伝子発現を評価したところ、KHデンドロン修飾キトサン/pDNAの場合はA/P比21において、またキトサン/pDNAの場合はA/P比2において最も高い遺伝子発現が得られ、各複合体におけるA/P比の最適値が明らかになった。また、各最適A/P比にお

ける遺伝子発現を比較したところ、KH デンドロン修飾キトサン/pDNA 複合体における遺伝子発現量はキトサン/pDNA 複合体の遺伝子発現量より有意に高かった (図 7)。

E. 結論

本研究において、生体親和性を有するリジンデンドロンを骨格とし、その表面に pH buffering 能を有するヒスチジンを修飾した KH デンドロンを新たに構築した。KH デンドロンをキトサンに修飾することにより、中性領域における水への溶解度の改善、pH buffering 能の付与によるエンドソームからの脱出促進を可能にし、最終的に遺伝子発現効率を増大させることが可能となった。さらに、複合体形成により DNA 切断酵素からの保護効果も期待できることから今後 DNA ワクチンへの応用展開へ期待できる成果がえられた。本研究計画、3 年間の計画のうちの 2 年目の成果を予定通り終了する事ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Hashida, Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress. *Bio Drugs* 24(3), 195-205, 2010
2. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape. *Bioconjug Chem.* 21(6):1087-95, 2010
3. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Development of Lysine-histidine Dendron Modified Chitosan for Improving Transfection Efficiency in HEK293 Cells. Submitted.

2. 学会発表

1. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida Development of

lysine-histidine dendron modified chitosan for improving transfection efficiency in HEK293 cells、日本薬剤学会第 25 年会、徳島、2010 年 5 月 12-14 日

2. 樋口ゆり子、張 凱琳、川上 茂、山下 富義、橋田 充、キトサンによる遺伝子導入効率改善を目的としたヒスチジン修飾法の最適化、遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム、北海道、2010 年 6 月 2-3 日【**准奨励賞を受賞**】
3. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Endosomal Escape Rate of Lysine-Histidine Dendrons Evaluated by Live Cell Imaging、第 26 回日本 DDS 学会、大阪、2010 年 6 月 17-18 日
4. K.L. Chang, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Improvement of Gene Transfection Efficiency by Histidine-modified Chitosan, FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, U.S.A., 2010 年 11 月 13-18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

平成22年度
政策創薬総合研究事業
エイズ医薬品等開発研究
研究報告書
重点研究・若手研究者奨励研究

平成23年5月

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 タナカ印刷株式会社

