

7. Jaeschke H. Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:1083-1088.
8. Rijcken E, Kriegelstein CF, Anthoni C, Laukoetter MG, Mennigen R, Spiegel HU, et al. ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:529-535.
9. Kono H, Uesugi T, Froh M, Rusyn I, Bradford BU, Thurman RG. ICAM-1 is involved in the mechanism of alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1289-G1295.
10. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200.
11. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498.
12. Sato A, Takagi M, Shimamoto A, Kawakami S, Hashida M. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials* 2007;28:1434-1442.
13. Kawakami S, Hashida M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007;22:142-151.
14. Mok H, Lee SH, Park JW, Park TG. Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing. *Nat Mater* 2010;9:272-278.
15. Kim SS, Ye C, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, Wu H, et al. Targeted delivery of siRNA to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Mol Ther* 2010;18:993-1001.
16. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010;464:1067-1070.
17. Takemoto H, Ishii A, Miyata K, Nakanishi M, Oba M, Ishii T, et al. Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system. *Biomaterials* 2010;31:8097-8105.
18. Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress. *BioDrugs* 2010;24:195-205.
19. Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1153-1166.
20. Li YS, Davidson E, Reid CN, McHale AP. Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer Lett* 2009;273:62-69.
21. Lentacker I, Wang N, Vandenbroucke RE, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Ultrasound exposure of lipoplex loaded microbubbles facilitates direct cytoplasmic entry of the lipoplexes. *Mol Pharm* 2009;6:457-467.
22. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, et al. Delivery of an angiogenic gene into ischemic muscle by novel bubble liposomes followed by ultrasound exposure. *Pharm Res* 2011;28:712-719.
23. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials* 2010;31:7813-7826.
24. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier. *Mol Pharm* 2011;8:543-554.
25. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, et al. Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release* 2011;156:355-363.
26. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, et al. The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes. *Biomaterials* 2011;32:4659-4669.
27. Negishi Y, Endo Y, Fukuyama T, Suzuki R, Takizawa T, Omata D, et al. Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Control Release* 2008;132:124-130.
28. Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 2004;173:531-541.
29. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:1-20.
30. Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H, et al. Role of RIG-I, MDA-5, and PKR on the expression of inflammatory chemokines induced by synthetic dsRNA in airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143:80-83.
31. Marques JT, Devosse T, Wang D, Zamanian-Daryoush M, Serbinowski P, Hartmann R, et al. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:559-565.
32. Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol* 2008;26:431-442.
33. Elvevold K, Simon-Santamaria J, Hasvold H, McCourt P, Smedsrød B, Sørensen KK. Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *HEPATOLOGY* 2008;48:2007-2015.
34. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:287-297.
35. Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, Wilson R, Kommineni C, Rao M, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;177:112-120.
36. Oyaizu T, Shikata N, Senzaki H, Matsuzawa A, Tsubura A. Studies on the mechanism of dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice. *Exp Toxicol Pathol* 1997;49:375-380.
37. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351.
38. Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, et al. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7721-7726.
39. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006;441:111-114.
40. Yacyszyn BR, Schievella A, Sewell KL, Tami JA. Gene polymorphisms and serological markers of patients with active Crohn's disease in a clinical trial of antisense to ICAM-1. *Clin Exp Immunol* 2005;141:141-147.
41. Miner PB Jr, Geary RS, Matson J, Chuang E, Xia S, Baker BF, et al. Bioavailability and therapeutic activity of alicaforsen (ISIS 2302) administered as a rectal retention enema to subjects with active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1427-1434.
42. The FO, Jonge WJ, Bennis RJ, van den Wijngaard RM, Boeckstaens GE. The ICAM-1 antisense oligonucleotide ISIS-3082 prevents the development of postoperative ileus in mice. *Br J Pharmacol* 2005;146:252-258.
43. Yacyszyn BR, Chey WY, Goff J, Salzberg B, Baerg R, Buchman AL, et al. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* 2002;51:30-36.
44. van Deventer SJ, Tami JA, Wedel MK. A randomised, controlled, double blind, escalating dose study of alicaforsen enema in active ulcerative colitis. *Gut* 2004;53:1646-1651.
45. Ambardekar VV, Han HY, Varney ML, Vinogradov SV, Singh RK, Vetro JA. The modification of siRNA with 3' cholesterol to increase nuclease protection and suppression of native mRNA by select siRNA polyplexes. *Biomaterials* 2011;32:1404-1411.
46. Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005;33:439-447.

P245

Galactosylated liposomes with proton sponge capacity: a novel hepatocyte-specific gene transfer system

Saffiya Habib, Mario Ariatti, Moganavelli Singh

Non-viral Gene Delivery Laboratory, Discipline of Biochemistry, Westville Campus, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa

Hepatocyte-directed liposomal gene delivery has received much attention due to the lack of suitable treatment for several liver-associated disorders. While targeting of liposomes to the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), nearly-exclusive to hepatocytes, is a well-documented means of achieving cell-specificity, endo/lysosomal degradation of the internalised DNA is one of several factors which hinder successful gene transfer. This study has attempted to address this concern by modifying hepatotropic liposomes with an endosomal escape-inducing proton sponge moiety.

Novel galactosylated (SH02) and imidazolylated (SH04) cholesterol derivatives were successfully synthesised with the aim of conferring the respective functions of ASGP-R-specificity and proton sponge capability upon cationic liposome formulations. These formed unilamellar vesicles with the cytofectin, 3β [N-(N',N'-dimethylaminopropane)-carbamoyl] cholesterol (Chol-T) and co-lipid, dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), when incorporated at 10 mol%. Liposomes effectively bound pCMV-luc plasmid DNA, provided protection against serum nucleases; and were well tolerated by both hepatocytes and kidney cells in culture. Competitive inhibition assays showed that liposomes containing SH02 were internalised predominantly via the ASGP-R. Acid titration experiments highlighted the endosomal pH-buffering capacity of SH04. SH04 improved the transfection activity of the Chol-T/DOPE system, but not that of its targeted counterpart, in kidney cells only. Both SH02 and SH04 individually exhibited transfection-enhancing properties and the transgene expression levels using both novel lipids were promising. With further optimisation of the proton sponge and targeting abilities, the liposomes may achieve desired transgene expression levels for use *in vivo*.

P246

Evaluation of skin angiogenesis stimulated by ointment preparations containing angiogenic genesKarolina Hajdukiewicz^{1,2}, Anna Stachurska^{1,2}, Agnieszka Zajkowska¹, Maciej Malecki^{1,2}¹Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland, ²Centre of Oncology, Warsaw, Poland

From a point of view of classic pharmacotherapy genes should be treated as active substances that condition the biological activity of a medicinal product that is used. In the case of angiogenic genes, a gene therapy product exerts angiogenic properties - and after having been introduced into appropriate cells it stimulates processes leading to the formation of new blood vessels. In this work we performed a series of experiments aimed to select a group of vehicles, ointment ingredients that could be useful in the systems that could introduce genes into the skin of laboratory animals. Experiments were conducted on plasmids encoding VEGF, FGF, SDF proteins. Appropriate ointment for-

mulas were prepared for experiments, and they were applied on the skin of laboratory mice; after pre-determined time mice were sacrificed, transfected skin specimens were collected and the presence of a pDNA sequence in samples was analysed with qPCR. The analysis of angiogenesis stimulation was also performed. The sequences of applied pDNAs were found in the mouse skin. Selected vehicles make it possible to introduce pDNA into skin cells; however, the *in vivo* transfection capacity is not high. Based on estimations 10-30% of pDNA molecules applied in ointment pass into the animal skin cells. Experiments also indicate that plasmid pVEGF, pSHH, pSDF stimulate angiogenesis in animal skin and proangiogenic properties depend on a plasmid dose which is used. This work was supported by a grant from Polish Ministry of Science and Higher Education (N N 405 456039).

P247

Muscle spontaneous regeneration in dwarf mice treated with a bicistronic vector followed by electrotransferE Higuti¹, NAJ Oliveira¹, CR Cecchi¹, ER Lima¹, P Martins², M Vainzof², CA Thomas³, AR Muotri³, P Bartolini¹, CN Peroni¹¹Biotechnology Department, IPEN-CNEN, São Paulo, Brazil,²Human Genome Research Center, IB-USP, São Paulo, Brazil, ³Dept. Cellular & Molecular Medicine, University of California, San Diego, USA

Gene therapy combines the correction of defective or missing gene with low risk to the patient. Our group has developed an *in vivo* gene therapy model for the treatment of growth hormone (GH) deficiency based on injection of naked DNA followed by electrotransfer. This strategy provided the presence of human growth hormone (hGH) for at least 60 days in the circulation of immunodeficient/dwarf (lit/scid) mice, that presented a weight gain of up to 33%. The aim of the present work is to verify the safety of our method, evaluating the presence of inflammatory infiltrate and the pattern of muscle regeneration at the electrotransfer site. A bicistronic vector containing the murine GH (mGH) and the GFP genes under the control of the CMV promoter was utilized. Lit/lit mice were treated with 50 µg of DNA or saline (control group), injected into the quadriceps muscle, followed by electrotransfer using eight 50-V pulses of 20 ms at a 0.5s interval. Histological analysis was performed on day 0, 1, 3, 6 and 12. Muscle damage was verified on the initial days after treatment, but appeared regenerated on the 12th day. GFP maximum expression was observed on the third day. Since increased circulating mGH levels were not observed, GH mediator, i.e. mouse insulin-like growth factor-I (mIGF-I), will be determined to evaluate electrotransfer efficiency. The results indicate that muscle spontaneously regenerates after this treatment.

Supported by FAPESP and CNPq.

P248

Novel ultrasound-responsive gene carrier with ternary structure.Tomoaki Kurosaki^{1,2}, Shigeru Kawakami¹, Ryo Suzuki³, Kazuo Maruyama³, Hitoshi Sasaki⁴, Mitsuru Hashida^{1,5}¹Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29

Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, ²The Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Chiyoda-ku, Tokyo 102-8471, Japan, ³Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan, ⁴Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan, ⁵Institute of Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8302, Japan

Backgrounds: Recently, ternary complex constructed with pDNA, cationic compounds, and anionic compounds were reported to show high gene expressions and low toxicities *in vivo*. In this experiment, we newly constructed novel ultrasound-responsive gene carrier with ternary structure for effective and secure transfection.

Methods: pDNA was mixed with some cationic polymers and cationic complexes were formed. The cationic complexes and the anionic liposomes were mixed for formations of ternary complexes. Then, perfluoropropane gas was entrapped into the ternary complex and ultrasound-responsive gene carriers were constructed.

Results: The stabilities of the gene delivery vectors were determined by gel electrophoresis and the stable complex formations were clarified. Furthermore, physicochemical properties of the gene delivery vectors were determined. Before entrapment of perfluoropropane gas, the gene carrier showed approximately 150 to 250 nm particle size and -20 to -40 mV ζ -potential. Entrapment of perfluoropropane gas increased particle size and approximately 550 to 600 nm particles were formed. Intravenous administration of the ultrasound-responsive gene carrier with ultrasound exposure from abdominal area significantly improved gene expressions in the mouse liver, kidney, and spleen.

Conclusion: This biocompatible ultrasound-responsive gene carrier with ternary structure would be novel formulation for effective and secure gene delivery.

P249

Combining MAR elements and transposon systems for improved gene expression and integration

D Ley¹, S Puttini¹, Y Bigot², N Mermod¹

¹University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, ²INRA Centre de Tours, Nouzilly, France

Safety, integration and long-term expression of a transgene constitute a major challenge in gene therapy applications. In this study, we combined the efficiency of transgene integration of the transposon system and the anti-silencing properties of a genetic element called matrix attachment region (MAR). We observed that the addition of the MAR 1-68 in the *PiggyBac* transposon does not interfere with transposition, by maintaining high frequency of transgene integration in CHO cells. Moreover, it seems that this association leads to higher transgene expression from few transposon integration events. This property would be particularly interesting to be tested in muscle progenitor mesoangioblast cells. These cells are important candidates for future stem cell therapy for myopathic patients and known to be difficult to transfect. Encouragingly, our first experiments show that *PiggyBac* and *Sleeping Beauty 100X* systems are greatly efficient in

these hard-to-transfect cells. Since *in vivo* electroporation is a possible strategy for the local treatment of muscle disorders, we are currently testing the combination of transposon and MAR using this method in mice muscle to see if transposon systems may promote sustained gene expression over time and/or increase transgene integration. Assessing efficiency and the advantages of this new association may lead to the discovery of a novel system possessing interesting properties for gene or cell-based therapy application.

P250

Novel carotenoid lipid vectors for ocular gene therapy

Susana Machado¹, Sofia Calado^{1,2}, Ana Vanessa Oliveira^{1,2}, Susana Jorge¹, Christer L. Øpstad³, Hans-Richard Sliwka³, Vassilia Partali³, Michael Pungente⁴, Gabriela Silva^{1,5}

¹Gene therapy lab, Institute for Biotechnology and Bioengineering (IBB/CBME), University of Algarve, Faro, 8005-139, Portugal, ²PhD program in Biomedical Sciences, University of Algarve, Faro, 8005-139, Portugal, ³Department of Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, 7491 Trondheim, Norway, ⁴Premedical Unit, Weill Cornell Medical College in Qatar, Doha, P.O. Box 24144, Qatar, ⁵Department of Biomedical Sciences and Medicine, University of Algarve, Faro, 8005-139, Portugal

The eye has several advantages for gene therapy: small size, low immune and inflammatory responses and minimal diffusion of drug to the systemic circulation. Cationic lipids, one of the most studied non-viral vectors, possess either rigid or non-rigid hydrophobic chains, leaving a gap in chain rigidity to be investigated. Our objective is to evaluate the efficiency of DNA delivery to human Retinal Pigmented epithelium (RPE) cells by novel cationic lipid vectors. These novel vectors, designated as C30-20 and C20-20, both possess a highly unsaturated, conjugated, rigid polyene chain, one of C30:9 and the other C20:5, respectively, plus a non-rigid saturated alkyl C20:0 chain.

Lipoplexes, formulated by solvent evaporation of ethanolic mixtures of the new polyene compound with a co-lipid, such as DOPE or cholesterol, and incubated with DNA, were characterized by gel retardation assays, and biocompatibility and transfection assays using RPE cells.

The different lipid formulations encapsulated DNA, were biocompatible with RPE cells, with better results for those with DOPE. The C20-20/DOPE formulation had transfection efficiencies above a commercial transfection agent (GeneJuice). These results show this new polyene vectors to be promising for ocular gene therapy.

Support: IBB/LA; PESt-OE/EQB/LA0023/2011; PIRG-GA-2009-249314; FCT Portugal (SFRH/BD/76873/2011, SFRH/BD/70318/2010); Qatar National Research Fund under the National Priorities Research Program (NPRP08-705-3-144, PI M. Pungente)

P251

Mitochondrial Gene Targeting in Mammalian Systems using Novel 'Mitochondriotropic' Liposomes

N Narainpersad, M Singh, M Ariatti

University of Kwazulu-Natal, Durban, South Africa

2. 糖修飾超音波応答性リポソームによるがん免疫治療・抗炎症治療戦略

運 敬太, 川上 茂, 橋田 充

個々の疾患に応じた細胞に核酸医薬品を選択的かつ高効率に導入する技術開発は、遺伝子治療のみならず *in vivo* 遺伝子機能解析や疾患モデル動物作製に不可欠である。特定の細胞表面には各種糖鎖認識機構が発達しており、細胞選択的かつ高効率核酸送達の標的として期待される。また近年、細胞内への核酸導入効率を増強させる方法として、超音波などの外部刺激の利用が積極的に試みられている。本稿では、単一製剤に超音波応答性と細胞指向性を付与した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体に関するわれわれの研究を中心に概説する。

はじめに

遺伝子治療はがんや嚢胞性線維症などの遺伝子変異に起因した疾患治療に有望な方法である。一方、効果的な遺伝子治療効果の達成のためには疾患に応じた標的細胞への遺伝子送達が不可欠であり、標的細胞への選択的かつ高効率な遺伝子送達を可能にする方法の開発が求められる。がん免疫療法や抗炎症療法の標的細胞

となり得る抗原提示細胞^{※1}や血管内皮細胞の細胞表面には、マンノースやガラクトース、フコース受容体などの糖鎖認識機構が発達しており、糖修飾キャリアの標的細胞として知られている。現在、糖鎖受容体介在性エンドサイトーシスに基づき、標的細胞への核酸送達を可能にする糖修飾リポソーム/核酸複合体が開発されているが、臨床において優れた治療効果を得るためには、細胞選択的かつより効率的な核酸送達を達

[キーワード&略語]

遺伝子導入, 糖修飾, ソノポレーション, DNA ワクチン, 抗炎症治療

CTLs: cytotoxic T-lymphocytes (細胞傷害性 T細胞)

ERK: extracellular signal-regulated kinase (細胞外シグナル制御キナーゼ)

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1 (細胞間接着分子-1)

IFN- γ : interferon-gamma (インターフェロン- γ)

JNK: Jun-N-terminal kinase (Jun-N末端キナーゼ)

LPS: lipopolysaccharide (リポ多糖)

PEG: polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)

TLR-9: Toll-like receptor-9 (Toll様受容体-9)

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha (腫瘍壊死因子- α)

VCAM: vascular cell adhesion molecule (血管細胞接着分子)

Cancer immunotherapy and anti-inflammatory therapy by sugar-modified and ultrasound-responsive liposomes

Keita Un¹⁾/Shigeru Kawakami²⁾/Mitsuru Hashida²⁾³⁾: National Institute of Health Sciences¹⁾/Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University²⁾/Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University³⁾(国立医薬品食品衛生研究所¹⁾/京都大学大学院薬学研究所²⁾/京都大学物質-細胞統合システム拠点³⁾)

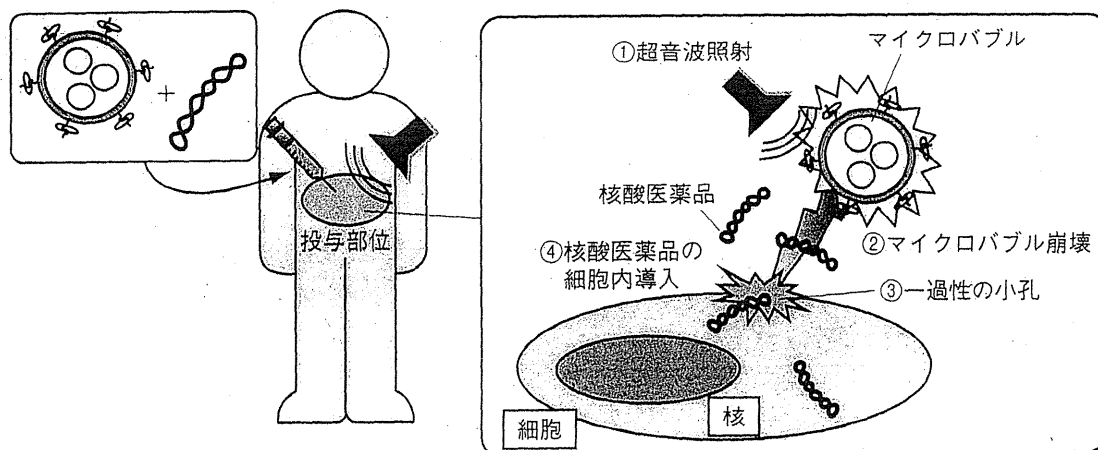


図1 ソノポレーションによる遺伝子導入法

ソノポレーションによる遺伝子導入では、超音波造影剤であるマイクロバブル製剤と超音波照射を併用する。最適強度の超音波照射によってマイクロバブル製剤が崩壊し、同時に発生するキャビテーションエネルギーによって細胞膜上に一過性の小孔が生じ、それを介して多量の核酸医薬品が細胞質内に導入される

成し得る方法論の開発が課題としてあげられる。

細胞内への遺伝子/薬物導入効率を増強するために、電気刺激¹⁾、物理的圧力²⁾、高水圧³⁾や超音波照射⁴⁾などの外部刺激の利用が積極的に試みられている。中でも、超音波造影剤であるマイクロバブル製剤と超音波照射を併用するソノポレーション^{*2}法では、最適強度の超音波照射によって誘導される製剤の崩壊とともに発生するキャビテーションエネルギーにより細胞膜上に一過性の小孔が生じ、それを介して多量の核酸医薬品を細胞質内に直接導入可能であることが報告されている(図1)⁵⁾。さらにマイクロバブル製剤はLevovist[®]やSonazoid[®]に代表される血管造影剤として、また超音波照射機器は超音波検査や結石治療などの分

野ですでに利用されているため、臨床応用の可能性が高い遺伝子導入法としても注目されている。一方で、核酸医薬品とマイクロバブル製剤を別個投与する従来のソノポレーション法では、標的臓器または標的細胞選択的に高い遺伝子発現効率を得ることは難しい。

近年、われわれはソノポレーションを利用した効率的核酸導入と糖鎖認識機構に基づく細胞選択的核酸送達の融合を図り、単一製剤に超音波応答性と標的細胞指向性を付与した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体の開発研究を進めてきた(図2)。さらにかんに対するDNAワクチン^{*3}や抗炎症治療への応用研究を試みてきた。本稿では、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射併用に基づく核酸導入法および疾患治療への応用に関する最近の知見を概説する。

※1 抗原提示細胞

体内に侵入してきた細菌やウイルス感染細胞などの断片を抗原として自己の細胞表面上に提示し、T細胞を活性化させる細胞。抗原提示細胞は細胞表面上に主要組織適合抗原分子(MHC分子)をもち、これに抗原が提示される。T細胞はMHC分子上に提示された抗原を認識して活性化し、免疫応答を起こす。

※2 ソノポレーション

高周波超音波(1~3 MHz)が、生細胞へ与える効果について指す言葉。マイクロバブルの存在下で超音波を適用すると、細胞膜に一時的な孔を開けることができ、そこから薬品分子、タンパク質または外来遺伝子などが細胞内に導入される。

■ 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体の開発

まず、マンノース受容体認識機構と超音波照射に伴う細胞穿孔誘導機構を単一製剤内に組込むことを考え、

※3 DNAワクチン

抗原情報をコードしたDNAを接種するワクチン療法。抗原提示細胞内で導入したDNAからがん抗原タンパク質が産生され、特に細胞性免疫が活性化される免疫誘導方法。

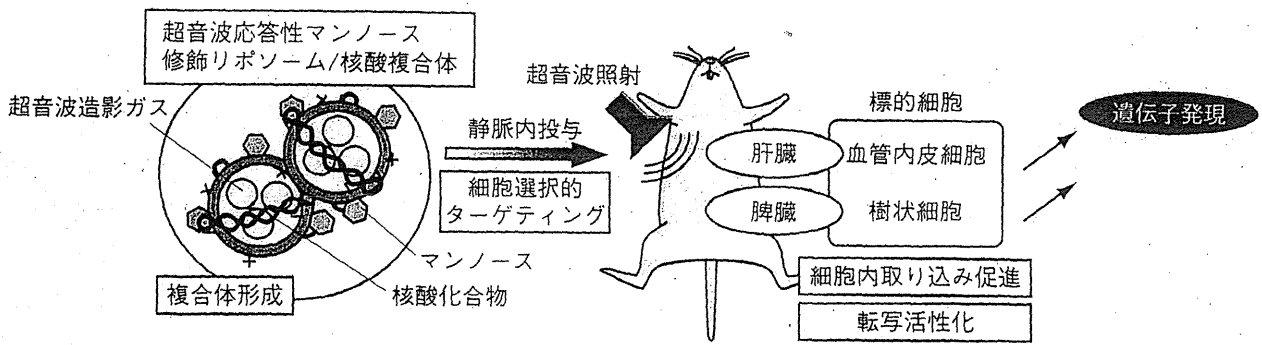


図2 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体による *in vivo* 遺伝子導入法

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を静脈内投与すると、マンノース受容体を豊富に発現する肝臓の血管内皮細胞や脾臓の樹状細胞に到達する。その後、対外からマウス腹部に超音波照射することで、バブル製剤の崩壊に伴い肝血管内皮細胞や脾臓樹状細胞の細胞膜上に一過性に生じる小孔を介して多量の核酸医薬品が細胞質内に導入される。また、超音波照射に起因した転写活性化も誘導され、これらが複合的に関与して標的細胞選択的な遺伝子発現の増強が *in vivo* において認められる。

超音波応答性と標的細胞指向性を併せもつ超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を構築した(図2)。脂質組成最適化を通じて、超音波造影ガスをリポソーム内に安定に封入するためには、ポリエチレングリコール(PEG)修飾および飽和脂肪酸が必須であり、また超音波造影ガスによる内圧に対して安定にリポソームの球形構造を維持するためには、低膜流動性脂質で製剤が構成される必要があることを見出した。次に、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した遺伝子導入により *in vivo* 遺伝子発現特性を評価した結果、マウス肝臓および脾臓において顕著に高い遺伝子発現が示され、その遺伝子発現はマンノース受容体発現細胞である肝非実質細胞や脾臓の樹状細胞において選択的に認められることを見出した(図3)。一方、肺や腎臓、心臓においては超音波照射に伴う遺伝子発現増強は得られなかった(図3)。われわれはこの原因として、肺においてはガス交換のための組織構造学的な特徴により超音波刺激が組織全体に伝播しないことに起因し、腎臓および心臓においては製剤の組織移行性が低いことに起因するものであると考えている⁶⁾。

リポソームやエマルジョンなどを利用した従来の遺伝子導入法では、エンドサイトーシス後に遺伝子配列中のCpGモチーフがエンドソーム内のTLR-9に認識され⁷⁾、TNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカイン産生に起因した組織傷害が誘導される⁸⁾。そこでわれ

われは、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した遺伝子導入後の血清中アミノトランスフェラーゼ活性(ALT/AST)を指標とした毒性評価を行った。その結果、本遺伝子導入操作に基づく肝毒性は従来法と比較して低いことを見出した。したがって、本方法に基づく遺伝子導入は、標的細胞選択的かつ高い遺伝子発現を低毒性条件下で可能にし得る方法であると言える⁶⁾。

② 遺伝子発現増強機構の解明

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した *in vivo* 遺伝子導入法では、従来のリポフェクション法と異なる機構で遺伝子発現が誘導されていると推察された。したがって、この機構解明は、遺伝子発現効率の改善や疾患治療への応用を考えるうえで不可欠である。そこで、*in vivo* 遺伝子発現に關与する核酸医薬品の体内動態挙動、細胞内導入機構、ならびに遺伝子導入に伴う転写活性化に焦点を当て、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を用いた遺伝子導入機構とその支配因子について評価した。

まず、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射による遺伝子導入時の核酸医薬品の体内動態挙動について評価した結果、製剤のマンノース修飾、ならびに超音波照射により、肝臓および脾臓への核酸送達量が増大することが示された。また

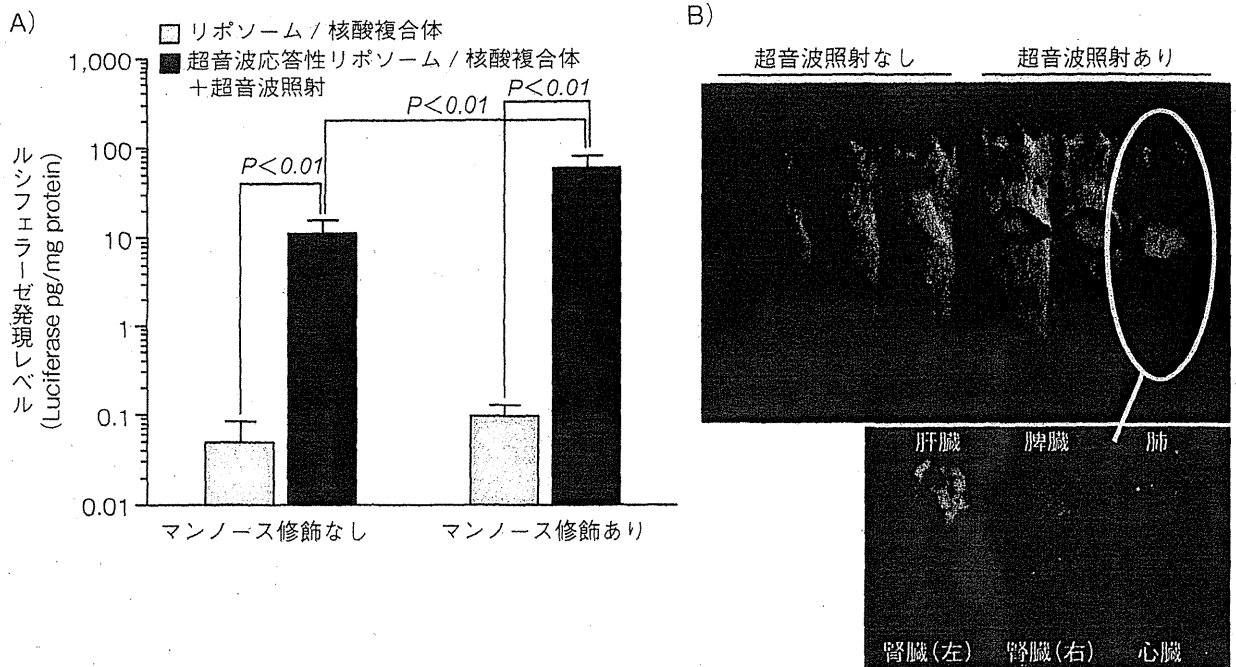


図3 マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射による *in vivo* 遺伝子発現特性

- A) マウス肝臓における遺伝子発現量を、ホタルルシフェラーゼをレポーター遺伝子として評価した。マンノース修飾を施した超音波応答性リポソーム/核酸複合体静脈内投与後、超音波照射を施した群において顕著に高い遺伝子発現量が得られた
- B) 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体投与後、超音波照射の有無によるホタルルシフェラーゼ活性の *in vivo* イメージング写真。超音波照射により肝臓および脾臓においてのみ高い遺伝子発現が認められ、その一方、他の臓器（肺、腎臓、心臓）では遺伝子発現の増強が認められない（文献6より転載）

ソノポレーションを利用した方法では、超音波照射によるマイクロバブル製剤の崩壊に起因して細胞膜上に生じる一過性の小孔を介して多量の核酸医薬品が細胞質内に導入される⁹⁾。したがって、超音波照射に伴う肝臓および脾臓への核酸移行量の増大は、核酸医薬品の細胞質内導入の促進に起因するものであると推察され、超音波照射時に多量の核酸医薬品を肝臓および脾臓内に送達し得る製剤を利用した遺伝子導入において、より高い核酸医薬品の組織内移行量の増大が認められると考えられる。したがって、超音波応答性リポソームと超音波照射による *in vivo* 遺伝子導入においては、製剤投与後、超音波照射時における標的臓器内への核酸移行性が遺伝子発現の多寡につながる事が示唆された⁹⁾。

一方、近年物理刺激に伴う p38, ERK および JNK 活性化に起因して転写活性化が誘導され、さらに遺伝子発現の増強が得られることが報告されている^{2) 3) 10) 11)}。そこで超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸

複合体と超音波照射を利用した遺伝子発現増強に及ぼす転写活性化の関与についても評価した結果、遺伝子発現制御プロモーターにおける特定の転写因子結合部位の有無が遺伝子発現の増強に影響することが示された¹²⁾。さらに超音波照射に伴い、上記特定の転写因子の活性化が誘導されることも示され¹²⁾、他の物理刺激に起因した転写活性化機構と同様、本方法においても超音波照射を付与した細胞において同様の生理的変化が誘導されていることを示唆している。

このようにわれわれは、標的細胞選択的に遺伝子発現効率を増強させるために、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した遺伝子導入法を開発し、肝臓および脾臓のマンノース受容体発現細胞選択的かつ高効率な遺伝子発現を達成可能であることを見出した。また、この遺伝子発現増強には、①マンノース修飾による核酸医薬品の標的細胞への移行性増大、②超音波照射に起因した製剤崩壊に伴う細胞質内への核酸送達の増強、ならびに③超音

波照射に伴う転写活性化，という三因子が複合的に関与していることが示唆された。この方法は，製剤の静脈内投与と超音波照射という簡便な操作で構成され，かつ基盤技術であるマイクロバブル製剤，ならびに超音波照射機器は診断・治療などの分野ですでに臨床応用されている。したがって，がんや先天性疾患などに対する遺伝子治療への臨床応用が期待される。

③ 疾患治療への応用

1) がんに対するDNAワクチンへの応用

がん抗原により付与されるがん特異免疫を利用したがん免疫療法は，標的がん細胞特異的な抗腫瘍効果が得られるとともに，治療に伴う毒性が低いという特徴を有することから，がん患者の転移・再発予防法として期待されている¹³⁾。特にがん特異抗原発現遺伝子を利用するDNAワクチンは，液性免疫，ならびに細胞性免疫を付与できるとともに，強い殺細胞活性を示す標的がん細胞特異的な細胞傷害性T細胞(CTLs)を効率的に誘導可能である¹⁴⁾。しかしながら，DNAワクチンにより優れた治療効果を得るためには，がん特異免疫誘導において重要な役割を果たす抗原提示細胞に対して選択的かつ高効率にがん抗原発現遺伝子を導入することが不可欠であるが¹⁵⁾，組織内に分布する抗原提示細胞数はきわめて少なく，*in vivo*において抗原提示細胞選択的な遺伝子導入を達成することは難しい。

超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を用いた遺伝子導入では，樹状細胞への選択的かつ高効率な遺伝子導入が可能となるため，DNAワクチンへの応用が期待される。そこで，がん特異抗原発現プラスミドを用いて作製した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体によるDNAワクチン効果を評価した。メラノーマ関連抗原を発現するプラスミドを用いて超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体作製して評価した結果，製剤の静脈内投与と超音波照射併用により免疫誘導を施したマウス脾臓において，MHCクラスI分子上への抗原提示が認められ，それに伴い，メラノーマ特異的なCTL活性の誘導が認められた¹⁶⁾。さらにメラノーマ特異的に高い腫瘍増殖抑制効果，ならびに生存日数の延長効果が固形腫瘍，ならびに転移性肺腫瘍に対して認められた(図4)¹⁶⁾。メラノーマは高転移性・再発特性を有するため，患者

の予後がきわめて悪い一方，さまざまな特異抗原の同定が進んでいるがん種であるため，転移・再発予防法としてのDNAワクチンの有効性が期待されている。したがって超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用したDNAワクチンが，メラノーマの転移・再発に対する予防・治療法へ発展することが期待される。

2) 細胞間接着分子の発現抑制に基づく抗炎症治療への応用

薬剤性肝炎や虚血再灌流性肝傷害は，臨床における薬物治療や生体肝移植などの外科手術時における有害事象として認識され，さまざまな薬物投与に伴うNF- κ B活性化や活性酸素誘導，およびそれに起因した炎症性サイトカイン産生によって惹起される¹⁷⁾。これらの炎症反応発生初期には，血管細胞接着分子*4 (vascular cell adhesion molecule: VCAM) や細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule: ICAM) が肝臓の血管内皮細胞上に発現誘導され，好中球などの血管内皮細胞との接着，回転，ならびに組織内浸潤に関与することが報告されている(図5)¹⁸⁾。特にICAM-1は，炎症反応の重症化につながる好中球などの組織内浸潤に強く関与する分子であり¹⁸⁾，アンチセンスDNAによるICAM-1発現抑制や抗ICAM-1抗体によるICAM-1と好中球との相互作用の阻害による炎症反応の抑制に関する研究が近年進められている。

この肝血管内皮細胞には，マンノース受容体に基づく糖鎖認識機構が発達しており，マンノース修飾キャリアの標的細胞となり得る。超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を用いた遺伝子導入法は肝血管内皮細胞への選択的かつ高効率な遺伝子導入を可能にするため，ICAM-1に対するsiRNA送達に応用し，肝血管内皮細胞内にICAM-1 siRNAを効率的に送達することによる抗炎症効果を評価した。超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用したICAM-1 siRNA送達では，ICAM-1発現を惹起するLPS誘導急性肝炎モデルマウスにおいて，

※ 4 細胞接着分子

血管細胞接着分子(VCAM)や細胞間接着分子(ICAM)などが含まれ，好中球などの細胞接着，回転，ならびに組織内浸潤に関与する。特に炎症反応発生初期に発現誘導され，炎症の重症化に関与する。

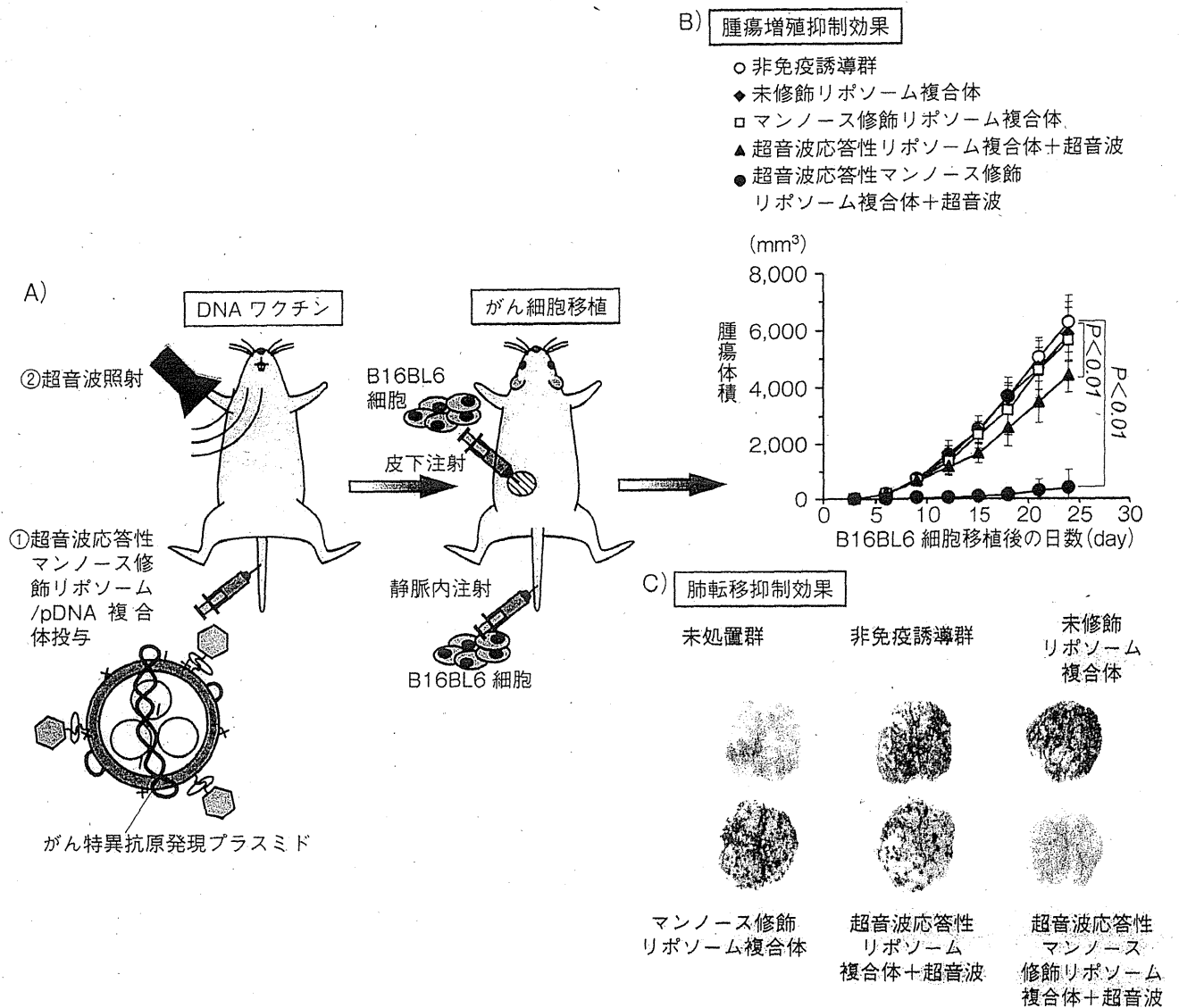


図4 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を利用したDNAワクチン

がん特異抗原発現プラスミドを用いて超音波応答性マンノース修飾リポソーム複合体を作製し、製剤投与と超音波照射による免疫誘導後、メラノーマ由来がん細胞 (B16BL6 細胞) を皮下投与し、腫瘍増殖抑制効果を評価した (A)。本方法により固形腫瘍の増殖は顕著に遅延し、10 例中 7 例で腫瘍の着着が完全に抑制された (B)。また免疫誘導後、がん細胞を静脈内投与し肺転移抑制効果を評価した結果、本方法によりがん細胞の肺転移も著しく抑制された (C: 文献 16 より転載)

細胞内 *icam-1* mRNA 発現量、ならびに細胞膜上の ICAM-1 発現量ともに顕著に抑制されることが明らかとなった¹⁹⁾。さらに本方法を用いた ICAM-1 siRNA 送達による ICAM-1 発現抑制に伴い、好中球の組織内浸潤、ならびに炎症性サイトカイン産生が抑制され、その結果 LPS 誘導急性肝炎モデルマウスの炎症反応も顕著に抑制された¹⁹⁾。この方法では、前述と同様、超音波照射に伴う超音波応答性リポソーム崩壊に起因して細胞膜上に一過性に生じる小孔を介して siRNA が細胞

質内に直接導入される。この細胞質内は siRNA の機能発現部位であるため、本方法は siRNA 送達法として適していると言える。また、この抗炎症効果は四塩化炭素やジメチルニトロソアミン、虚血再灌流処理に基づく急性肝炎に対しても認められた¹⁹⁾。したがって、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体と超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による抗炎症治療では、さまざまな急性肝炎および肝傷害に対して高い効果が期待される¹⁹⁾。

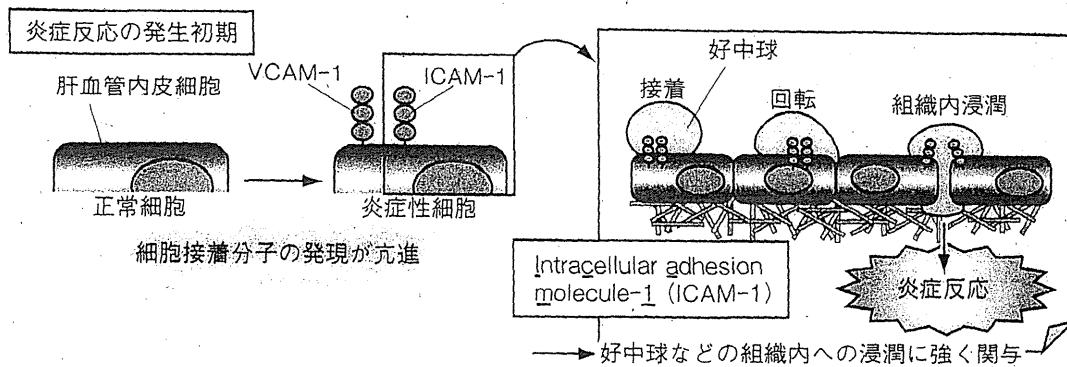


図5 炎症反応惹起における細胞間接着因子の役割

炎症反応発生初期には、肝血管内皮細胞上にさまざまな細胞接着分子 (VCAM-1, ICAM-1 など) が発現誘導され、好中球などの血管内皮細胞との接着、回転、ならびに組織内浸潤に関与している。特に ICAM-1 は、炎症反応の重症化につながる好中球などの組織内浸潤に強く関与する分子であるため、ICAM-1 の発現抑制は炎症反応の抑止につながると考えられる

急性肝炎はさまざまな薬物治療とともに偶発的に発生し、また虚血再灌流処置に伴う炎症反応は生体肝移植時における問題点として知られている。本方法を利用した ICAM-1 siRNA 送達に基づく抗炎症療法は、siRNA に起因した有害作用が低く、かつさまざまな炎症反応に対して広く適応できる可能性を秘めているので、炎症反応が懸念される疾患治療前に本方法により ICAM-1 siRNA を送達することで、予期せぬ炎症反応の発生を抑止できると考えられる。

おわりに

このように、われわれが開発した超音波応答性マンノース修飾リポソーム/核酸複合体を利用した核酸送達システムでは、製剤の静脈内投与と体外からの超音波照射というきわめて簡便な方法で、標的細胞選択的かつ飛躍的に高い遺伝子導入を達成可能であり、さらには疾患治療の応用することで優れた治療効果が得られることを示した。この方法は、製剤に修飾しているマンノース分子をさまざまなリガンドに置換することで、多様な標的細胞に対して応用可能な汎用性の高いシステムであり、今後はがんや急性炎症のみならず慢性疾患や先天性疾患治療への発展が期待される。

文献

1) Satkauskas, S. et al. : Mol. Ther., 5 : 133-140, 2002

2) Mukai, H. et al. : Biol. Pharm. Bull., 33 : 1627-1632, 2010
 3) Nishikawa, M. et al. : Hum. Gene Ther., 19 : 1009-1020, 2008
 4) Suzuki, R. et al. : J. Control. Release, 125 : 137-144, 2008
 5) Negishi, Y. et al. : J. Control. Release, 132 : 124-130, 2008
 6) Un, K. et al. : Biomaterials, 31 : 7813-7826, 2010
 7) Hemmi, H. et al. : Nature, 408 : 740-745, 2000
 8) Tousignant, J. D. et al. : Hum. Gene Ther., 11 : 2493-2513, 2000
 9) Un, K. et al. : Biomaterials, 32 : 4659-4669, 2011
 10) Pazmany, T. et al. : Exp. Cell Res., 221 : 103-110, 1995
 11) Chiu, Y. C. et al. : J. Cell Physiol., 215 : 356-365, 2008
 12) Un, K. et al. : J. Control. Release, 156 : 355-363, 2011
 13) Terando, A. M. et al. : Vaccine, 25 : 4-16, 2007
 14) Rice, J. et al. : Nat. Rev. Cancer, 8 : 108-120, 2008
 15) Melief, C. J. : Immunity, 29 : 372-383, 2008
 16) Un, K. et al. : Mol. Pharm., 8 : 543-554, 2011
 17) Norris, W. et al. : Curr. Opin. Gastroenterol., 24 : 287-297, 2008
 18) Rijcken, E. et al. : Gut, 51 : 529-535, 2002
 19) Un, K. et al. : Hepatology : in press, 2012

<筆頭著者プロフィール>

運 敬太：国立医薬品食品衛生研究所・薬品部研究官。1983年岡山県生まれ。2006年、岡山大学薬学部総合薬学科卒業。同大学院医歯薬学総合研究科博士前期課程、京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。'11年、博士（薬学）の学位を取得。'10年より日本学術振興会特別研究員を経て、'11年より現職。これまで一貫して薬物送達システム (DDS) 製剤の開発・評価研究に携わっている。

外部刺激を利用した *in vivo* 核酸デリバリー法の開発と評価

川上 茂* Shigeru Kawakami

京都大学大学院薬学研究科

1. はじめに

近年, 生命科学の進歩を背景に, 難治性のがんや炎症などの難治性疾患に対する治療薬として遺伝子・核酸の適用が期待されている。しかしながら, 一般的に, 遺伝子・核酸は注射液に分散させた状態, すなわち naked の形で血管内投与しても, 標的指向性の欠如や安定性の問題から, 特定の標的臓器・細胞において薬理効果を発現させることができない。したがって, 遺伝子・核酸の体内および細胞内動態を制御し, 疾病治療の標的となる細胞へ特異的に送達させるためのターゲティングシステムの確立が強く望まれている。

このような背景のもと, 著者らは, リポソームの表面に標的細胞を認識するための認識素子 (リガンド) として糖を選択し, 様々な糖修飾コレステロール誘導体で修飾した糖修飾リポソームの開発を行ってきた。この糖修飾リポソームを用いて, リガンド密度, 脂質組成, 粒子径などの物理化学的性質と体内動態の関連性を明らかにした。次に, 先に開発した糖修飾リポソームと遺伝子・核酸の複合体である糖修飾リポプレックスを調製し, 糖修飾リポプレックスの物理化学的性質, 体内動態, 遺伝子発現の関連性を明らかにすることで, 糖鎖認識に基づく遺伝

子・核酸医薬品の細胞選択的ターゲティングを達成した。得られた知見をもとに, 疾患動物モデルを対象として標的指向化による治療効果の改善を示すことができた。

このように標的指向ナノ DDS 製剤の単独での利用でも, 様々な遺伝子・核酸医薬による遺伝子発現制御化を通じて多彩な薬理作用を生み出すことができる。しかし, この標的指向ナノ DDS に対して, 複数の要素技術を組み合わせ融合することで, 細胞選択的かつ高効率な遺伝子・核酸の送達を達成することが可能となり, 薬物の体内動態の精密制御を通じて治療の最適化が達成できる。例えば, 薬物送達の標的細胞が複数の臓器に存在するものの, 薬物治療は特定の臓器細胞のみを対象としたい場合は, 標的部位に対して外部からの刺激・エネルギーを与える超音波やレーザー照射などの医用エネルギーと, 標的指向ナノ DDS 技術の両者を組み合わせることで, 外部刺激部位の標的細胞にのみ治療効果を集中させることが可能となる。

最近著者らは, 外部刺激として医療応用が既に進んでいる超音波を選択し, 先に開発した標的指向ナノ DDS, 即ち, 糖修飾リポプレックスとの融合化に関する研究を行っている。また, 外部刺激の新たなトリガーとして組織押圧を利用した naked 遺伝子・核酸導入法の開発にも取り組んでいる。そこで本稿では, これらの外部刺激を利用した *in vivo* 核酸デリバリー法の開発と評価に関して執筆の機会を得たので, 「薬剤学—生命とくすり—」R&D として, その研究の動機や strategy を交えて論述させて頂く。

*1995年3月長崎大学薬学部卒, 1999年10月京都大学大学院薬学研究科博士後期課程中退。長崎大学助手, 京都大学助手・助教を経て, 2009年より京都大学講師。博士(薬学)(京都大学)。2012年度日本薬剤学会奨励賞受賞。趣味: 山や海でのアウトドア, 読書, 子供との散歩。連絡先: 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29

E-mail: kawakami@pharm.kyoto-u.ac.jp

2. 超音波応答性糖修飾バブルリポソーム製剤の開発と評価

標的細胞に対する有効な遺伝子・核酸導入を行うためには、機能発現に対して体内・細胞内動態における障壁を解明後、その障壁を克服するための機能をキャリアへ付加させる必要がある。これまで著者らは、糖修飾リポプレックスの体内・細胞内動態解析を行い、本システムにおいては標的細胞にエンドサイトーシスを介して取り込まれ、速やかにリポソームに移行がみられることを報告した。このことは、糖修飾リポプレックスに搭載した遺伝子のエンドソーム膜から細胞質への移行性の悪さが機能発現において一つの大きな障壁となっていることを示唆している。よって、糖鎖認識機構により標的細胞表面に分布した後、細胞室内に対して遺伝子・核酸医薬を送達させるための技術基盤の確立が高効率な薬理作用発現に重要な鍵となる。そこで、標的指向能と標的細胞に分布してから細胞内部への移行能の両者の機能を併せ持つ新たな高機能性の遺伝子・核酸 DDS 開発を目指した。

一般に遺伝子・核酸を細胞質内に導入する方法として、マイクロバブル製剤に超音波照射した際に生じるキャビテーションエネルギーによる一過性の細胞膜穿孔を利用したソノポレーション法がある。平成 19~21 年度に京都大学大学院橋田充教授がプロジェクトリーダーを務めておられた NEDO のプロジェクトでは、帝京大学丸山一雄教授が従来、数 μm の粒子径を有していたマイクロバブル製剤を脂質組成の最適化によりその粒子径を 500 nm まで縮小させたバブルリポソーム製剤を開発し、本バブルリポソーム製剤を用い、超音波照射と naked プラスミド DNA を併用することで細胞穿孔に基づく高効率な遺伝子導入の実現に成功しておられた。しかしながら、バブルリポソーム製剤が標的指向性を有しておらず、遺伝子・核酸医薬とバブル製剤との体内動態が異なる挙動を示すことが、血管内投与後、標的細胞に対する高効率な遺伝子・核酸導入の障壁となっているのではないかと考えた。そこで著者らは、これまで開発した物理化学的性質を基盤とした糖修飾リポプレックスによる細胞選択的遺伝子・核酸ターゲティング法を基盤とし、糖修飾リポプレックスに超音波造影ガスを封入し、外部からの超音波照射と

組み合わせ、超音波照射部位の標的細胞において選択的かつ高効率な細胞内への送達を可能とする、新しい細胞特異的遺伝子・核酸ターゲティングシステムの実現に取り組んだ。本プロジェクトのプロトタイプ製剤構築は、帝京大学丸山教授と共同研究としてアドバイスを頂きながら進めた。

マンノースレセプターは、肝臓における Kupffer 細胞や類洞血管内皮細胞が、脾臓には樹状細胞に高発現している。これらの細胞は、炎症やがん免疫に対する治療において重要な標的細胞と考えられているが、組織内での細胞数の割合が低く、また、一般的にマクロファージ系の細胞では遺伝子発現が低いことが知られており、有効な治療法の開発に向けては、これらの細胞への選択的かつ高効率な細胞内送達システムの構築が必要である。

まず、マンノース修飾リポソームに超音波造影ガスを封入したマンノース修飾バブルカチオン性リポソーム/核酸医薬品との複合体（マンノース修飾バブルリポプレックス）の調製を行った¹⁾。脂質組成の最適化検討の結果、超音波造影ガスをリポソーム内に安定に封入するための脂質組成としては、高い相転移温度を示す飽和脂肪酸（1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropane (DSTAP) および 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)) と PEG_{2,000}-DSPE で製剤を調製する必要があることが明らかになった。図 1 に、マンノース修飾リポソームの脂質組成とマンノース修飾バブルリポソーム製剤とした際の遺伝子・核酸デリバリー法の概念図を示す。そこで本知見をもとに、1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2,000] (NH₂-PEG_{2,000}-DSPE) のアミノ基にマンノースを認識素子として導入した Mannose-PEG_{2,000}-DSPE を合成し、マンノース修飾バブルリポプレックスの調製を行った。その物理化学的特性は、粒子径および表面電荷を測定することにより評価し、未修飾バブルリポプレックスおよびマンノース修飾バブルリポプレックスの粒子径ならびに表面電荷は、それぞれ $568 \pm 13 \text{ nm}$, $+45.3 \pm 3.1 \text{ mV}$ および $569 \pm 12 \text{ nm}$, $+44.8 \pm 2.1 \text{ mV}$ であった。平均粒子径に関して、先の丸山教授らの DSPC と PEG_{2,000}-DSPE で構成される中性のバブルリポソームの報告とほぼ一致した。次に本製剤による遺伝子導入特性について解析を行った。ま

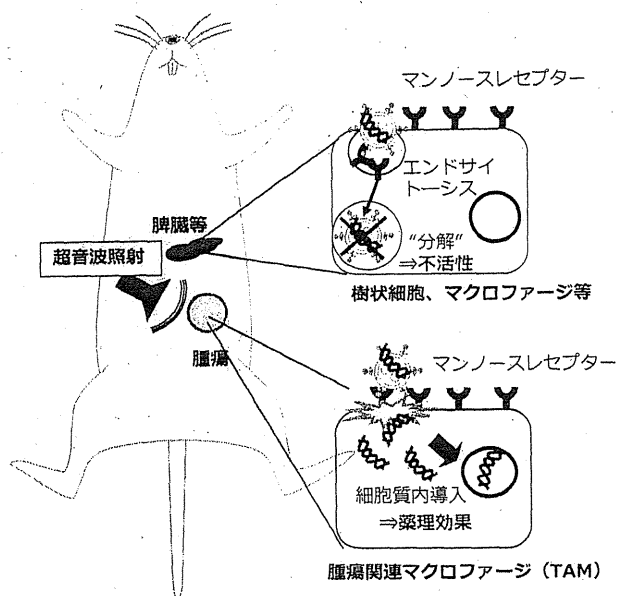


図2 マンノース修飾バブルリポプレックスと超音波照射による腫瘍関連マクロファージへの遺伝子・核酸デリバリー法の開発

マクロファージでは超音波照射により、細胞内に取り込まれるため、薬理効果を発揮することができると考えられる。このように、標的指向DDSの製剤設計の視点で見ると、認識素子ならびに封入する医薬品に対する選択の幅を広げることが可能とすることができる。

そこで本システムの治療への展開を行った。がんは、日本人の死亡原因の主因であり、画期的な薬物治療法の開発が強く望まれている疾病である。がんの薬物治療における障壁は、様々な臓器におけるがん発生、転移、薬剤耐性であり、これを克服するためには、単一の薬剤・方法による根治は難しく、様々な方法論の論理的な組み合わせによる薬物治療戦略が必要である。そこで、本システムの応用として、抗原提示細胞への標的指向化に基づく新しいDNAワクチンの開発を行った。この治療法で重要な因子としては、抗原提示細胞への高効率な遺伝子導入であり、抗原提示細胞に対してがん関連抗原を遺伝子発現させることで、内在性抗原として提示され、導入がん抗原特異的な細胞障害性T細胞(CTL)による細胞性免疫を誘導することができる。そこで著者らは、メラノーマ関連抗原ペプチドとしてgp100-TRP2をコードしたプラスミドDNAを用い、本プラスミドDNAを用いてマンノース修飾バブルリポプレックスを調製し、抗原提示細胞に対する標的指

向化に基づくメラノーマに対するDNAワクチンの開発を行った²⁾。超音波応答性マンノース修飾バブルリポプレックスをマウス尾静脈内より投与し、超音波照射により遺伝子導入を行ったところ、メラノーマ細胞に対する特異的なCTL活性が認められた。また、この免疫したマウスにメラノーマ細胞を静脈内から投与し、肺転移数で評価したところ、有意なメラノーマ細胞への肺転移数の抑制効果とそれに対応した形でマウスの生存日数の延長効果が認められた。また、対照のcolon細胞では、効果は認められず、導入抗原特異的な作用であることが示された。以上、抗原提示細胞に対する標的指向化に基づく、新しいDNAワクチンの開発に成功した。

一方、small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA) などのオリゴ核酸は、遺伝子発現を調節する機能を有しており、病気の標的となる細胞への送達により、多くの疾患治療への応用が期待できることから、創薬シーズとして期待されている。しかしながら、オリゴ核酸の実用化においても標的細胞質内への送達が必要不可欠な技術であり、多種多様な細胞に対する高効率な送達技術の確立が強く望まれている。これまでプラスミドDNAを中心に開発を行ってきたが、著者らが開発を行ったマンノース修飾バブルリポプレックス製剤は、核酸とリポソームの静電的相互作用を利用して複合体を形成させているため、種々のオリゴ核酸に対して適用することができると考えられる。そこでオリゴ核酸送達の可能性を評価するため、細胞内送達により標的遺伝子の効果的なノックダウンが可能となるsiRNAを取り上げた。ここでは、好中球の組織内への浸潤に強く関与する接着因子ICAM-1のsiRNAを、マンノースレセプターが高発現する肝臓類洞血管内皮細胞へ送達させICAM-1のノックダウンによる、急性肝炎の抑制効果を目指した³⁾。マンノース修飾バブルリポソームは、ICAM-1 siRNAと複合体を形成することが示され、また、マウス尾静脈内投与後、腹腔上から超音波照射を行うことで、肝臓非実質細胞への蛍光標識siRNAの高い取り込みが確認された。そこで、様々な急性肝炎モデルマウスに対して本システムを適用し、肝臓の血管内皮細胞に対する高効率な送達を実現し、肝炎の惹起の抑制効果を見出すことに成功した。

本システムは、標的細胞を認識する認識素子、超

音波照射条件, 医薬品の選択や粒子径の縮小化により, さらに多様な細胞への医薬品の送達を実現することができると考えられる。そこで現在, 新たなリガンド修飾脂質合成, アニオン性を有する製剤開発, 薬物として超音波増感剤の適用, バブル製剤の粒子径の縮小化に関する研究を様々な共同研究により進めており, 今後, これらの方法論の組み合わせにより本システムの進化を目指していきたい。

4. 組織押圧遺伝子・核酸導入法の開発と評価

著者らが開発を進めてきた標的指向ナノ DDS 製剤は, 実用化の視点でみると, 薬事規制や規格等, レギュレーションの面ではそれなりに障壁があると考えられる。今後の実用化に向けては, これらの有望な革新的ナノ DDS に対するレギュレーションも重要な研究課題として考える必要がある。一方, 核酸・遺伝子医薬における基礎研究成果の速やかな臨床展開を考えると, 医療機器を利用した naked 核酸・遺伝子医薬の導入というアプローチはシンプルであるため, 大きな利点を有すると考えられる。このような観点から, 著者らは, naked 遺伝子・核酸導入法の開発にも取り組んできた。

Naked 遺伝子・核酸による *in vivo* 遺伝子導入では, これまで 1990 年に Wolff らがマウス骨格筋に対して naked プラスミド DNA を筋肉内注射することで, 注射部位局所で高発現を示すことを報告していた。通常, 培養細胞に対して naked プラスミド DNA を添加した場合においても, ポリアニオンとしての性質あるいは安定性が問題となり, ほとんど遺伝子発現がみられない。これらの問題を改善させるため遺伝子導入試薬としてカチオン性リポソームやカチオン性ポリマーが用いられ, 培養細胞では高い遺伝子発現を得ることができる。一方, 1999 年に Liu らにより naked プラスミド DNA の大容量注射液のマウス尾静脈内への急速投与により, 肝臓実質細胞に対して極めて高いレベルの遺伝子発現が得られることが報告された。これらの報告の再現を通じ, 著者は, 大学院生時代に naked プラスミド DNA による遺伝子導入機構にも興味を持った。その後, 興味深いことに, 2002 年に Liu らは, 通常容量の注射液量でマウスに naked プラスミド DNA の尾静脈内注入後, 肝臓上の腹膜側から指を用いて複数回 mechanical massage を行うことで, 肝臓実質細胞

で高発現を示すことを報告した。このような背景のもと, 著者らは, naked 核酸導入には臓器への直接的な圧力が遺伝子導入のトリガーになるのではないかと考えるに至った。そこで, 多くの標的臓器において汎用的に利用でき, 実用化に向けた極めて単純な組織押圧による naked 遺伝子・核酸導入法の開発に着手した。

腎臓は, 生体の恒常性維持に重要な臓器であり, また, アルポート症候群, 腎線維症などの難治性疾患があり, 慢性化すると腎不全に至るため, 透析治療や臓器移植が必要となり, 患者の quality of life に影響を与える。遺伝子・核酸医薬は, このような難治性腎疾患に対する根本治療法としての可能性を有しているが, 通常 naked 遺伝子・核酸の静脈内投与では, ほとんど遺伝子発現を示さないことが知られている。そこで対象臓器として腎臓を取り上げ, 押圧した腎臓での遺伝子・核酸による遺伝子発現制御を目指した。まず, naked プラスミド DNA をマウス尾静脈内投与し, 投与直後に腎臓に対して軽く単回, 組織押圧を加えたところ, 押圧した腎臓での高い遺伝子発現が認められた。一方, 遺伝子発現の臓器特異性に関して, 押圧していない腎臓, 肝臓, 肺, 心臓, 脾臓においては, ほとんど遺伝子発現が認められ, 押圧した腎臓への特異的な遺伝子導入であることが明らかとなった。また, siRNA への適用の可能性を検討するため, ホタルルシフェラーゼ (Luc) をコードしたプラスミド DNA と Luc に対する siRNA を共投与したところ, 遺伝子発現の抑制効果が認められた。この遺伝子発現の抑制効果は, scramble siRNA では認められず, siRNA の配列特異的な作用であることが示され, siRNA に対しても有効な方法である可能性が示された。一方, 遺伝子発現を得るのに必要な腎臓への組織押圧では, 血中クレアチニン値および血中尿素窒素値の上昇が認められず, 腎機能に影響は与えていないことが示唆された。また, この組織押圧力に関する定量的な評価を行うために, 圧力制御デバイスを作成して臓器への押圧力と遺伝子発現効率の関連に関する検討を行い, 0.59 N/cm² 以上の組織押圧で遺伝子発現は最大値に達することを明らかにした⁴⁾。

さらに, 組織押圧による遺伝子・核酸導入機構を解明するため, 体内・組織内動態, 押圧間隔, 転写因子活性化の影響を評価した。その結果, 体内動態

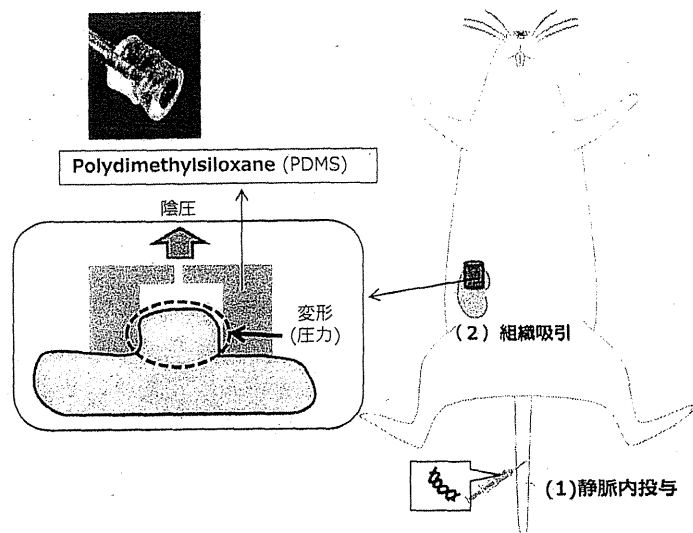


図3 腹腔内視鏡先端に搭載可能な組織吸引デバイスを用いた naked 遺伝子・核酸デリバリー法の開発

に関して $[^{32}\text{P}]$ 標識プラスミド DNA は、組織押圧により僅かな分布の増加がみられたが、有意な差ではなかった。一方で、蛍光標識プラスミド DNA を用いた組織観察では、組織押圧による顕著な分布の増加が認められ、プラスミド DNA の細胞取り込みが亢進していることが示唆された。また、組織押圧間隔の影響に関して、静脈内投与 60, 30, 20, 10 秒前に組織押圧を行ったところ、遺伝子発現はほとんど示さず、10 秒前で僅かに遺伝子発現を示した。一方、投与直後、投与後 180 秒後に組織押圧を行ったところ、高い遺伝子発現を示した。これらの結果は、組織押圧による膜透過亢進は一過性であり、安全であると共に、その期間は 10 秒程度の短い時間であることが示唆された。2008 年に西川らは、ハイドロダイナミクス法による高い遺伝子発現の機構の一つに転写因子 NF κ B や AP-1 の活性化が関与していることを報告していた。組織押圧遺伝子・核酸導入法においても同様の機構が関与していると考え、これら転写因子活性化の影響を明らかにするため、様々な転写因子結合部位をエンハンサー領域として有するプラスミド DNA を用いた遺伝子導入実験を行った。その結果、NF κ B や AP-1 エンハンサー領域を有するプラスミド DNA において有意に高い遺伝子発現を示し、ハイドロダイナミクス法と同様に組織押圧法においても、これらの転写因子の活性化が遺伝子発現に関与していることが示唆された。以上、組織押圧による極めて単純な遺伝子・核酸導入

法の開発に成功し、また、その遺伝子導入機構の一端を明らかにすることができた。

次の段階として、本システムは、例えば、腎臓移植が必要な腎臓に対する遺伝子・核酸導入による再生治療に応用できるのではないかと考え、立命館大学理工学部マイクロ機械システム工学科の小西教授と共同で、本法の医療展開を実現する新規医療用機器の開発を進めた。まずは、マウスでの遺伝子導入に Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) 技術を応用し、マウス体内埋め込み式腎臓核酸導入 MEMS デバイスの研究開発に成功した。一方、組織押圧を介した方法では、ヒトへ適用する場合、押圧した際、ある程度臓器が動き、加圧力の制御化が難しくなると判断し、これらの医療機器情報をもとにこのように組織の吸引により吸引局所に組織局所に圧力をかけることができる医療機器の開発を小西教授のグループと共に進めた (図 3)。シリコン製デバイスによる軽い組織吸引といった極めて簡単な操作で、腎臓、心臓、肝臓、脾臓に対して naked 遺伝子の導入による遺伝子発現を確認することができた⁵⁾。さらに、組織吸引力や吸引時間、吸引間隔による発現パターンの制御化および規格化を目的に、本法のコンピューター制御システムの開発を行った。得られた知見を基に、現在、本研究は腎臓、心臓、肝臓に対する治療法開発に向けて研究を進めている。

5. DDS 製剤臨床応用フォーカスグループ

ここまで紹介したような外部刺激と遺伝子・核酸医薬の組み合わせといった次世代先進医療技術においては、とりわけ、実用化に向けた研究展開の視点も重要である。我が国では、ナノ DDS 製剤の基礎研究は非常に盛んであるが、医薬品として上市されている品目が欧米に比べ少なく、トランスレーショナル研究の推進には、産官学連携、医薬工連携が必要不可欠であると実感している。著者は、日本薬剤学会 DDS 製剤臨床応用フォーカスグループ（グループリーダー：原島秀吉先生）の執行部メンバーとして活動させて頂いている。このフォーカスグループは、2011 年度に設立され、基礎研究成果を臨床応用へ進めるための橋渡し研究の促進を目的とし、我が国における優れた DDS 製剤研究が臨床応用へ結実するための課題を明らかにするとともに、我が国および海外における医薬品規制環境に関わる調査、情報交換を行っている。本フォーカスグループの執行部メンバーは、産官学の会員から構成されており、最終目標を実用化とする産官学の研究者が、一同に介し、共に意見を交わすことができる体制は貴重である。これまで 2011 年、2012 年と秋に箱根で合宿形式の討論会や本学会のラウンドテーブルでの議論を行っており、DDS 製剤の実用化に向けた課題の議論を行っている。

2013 年度日本薬剤学会第 28 年会（年会長：稲木敏男先生）では、本フォーカスグループでの議論をもとに、著者は国立医薬品食品衛生研究所薬品部加藤くみ子先生と、ラウンドテーブルセッションでオーガナイザーとして、“DDS 技術の可能性とその価値具現化への課題”について議論を行わせて頂く予定である。このような活動での議論を通じて、DDS 製剤の実用化推進に向けた活動を進めたい。

6. ま と め

近年、がん、自己免疫疾患、アルツハイマーなど充足されていない医療ニーズ（アンメットメディカルニーズ）に対応した新薬・治療法の開発が急務になっており、この問題を解決するため、モノクローナル抗体、核酸・遺伝子、幹細胞、ナノ DDS 製剤など新しいコンセプトに基づいた医薬品候補群や高性能製剤の開発が進められている。既に、米国にお

いて、多数のナノ DDS 製剤が認可されており、現在、臨床試験を行われている製剤も多いため (Documents of Advisory Committee for Pharmaceutical Science and Clinical Pharmacology, 2012)、今後の医療において大きな役割を占めると考えられる。また我が国では、医療イノベーション五か年計画において、革新的医薬品・医療機器の創出を日本の成長の牽引とし、優れた医薬品・医療機器を国民に迅速に提供していく方針が掲げられている。

本稿では著者らが最近進めてきた、医療機器などで誘発する外部刺激を利用した *in vivo* 遺伝子・核酸デリバリー法の開発と評価について論述させて頂いた。ここまで著者らによる遺伝子・核酸医薬デリバリー研究を紹介させて頂いたが、上述させて頂いたように標的指向ナノ DDS による送達と医療機器による外部刺激の利用は、単一の技術では不可能であったものに対しても新たな機能を創発させ、多様性を通じて新たな薬物治療戦略を与えることが可能となるため、今後ますます重要になると思われる。

本稿は、2012 年 5 月に神戸市神戸国際会議場で開催された日本薬剤学会第 27 年会（年会長：山下伸二先生）での奨励賞受賞講演（座長：菊池寛先生）を中心としてまとめたものです。執筆の機会を与えて頂いた日本薬剤学会会長原島秀吉先生、薬剤学編集委員長伊藤清美先生始め、日本薬剤学会の関連の先生方に厚く御礼申し上げます。また、日本薬剤学会では、年会、Global Education Seminar、製剤セミナー、DDS 製剤臨床応用 FG での活動を始め多くのことを勉強させて頂きました。奨励賞の受賞を励みとして、これまで得た知見をもとに、実用化を目指した基礎研究を推進し、薬学・薬剤学の発展に貢献していきたいと思えます。

これらの研究成果の多くは、共同研究により実施させて頂きました。糖修飾ナノバブルリポソーム製剤設計では、帝京大学薬学部教授丸山一雄先生、同准教授鈴木亮先生、同助教小田雄介先生に大変お世話になりました。新規糖修飾脂質誘導体合成法の開発では、岐阜大学生産科学部・京都大学物質・細胞統合システム拠点教授木曾真先生、同准教授安藤弘宗先生、同博士研究員植木章晴先生と共同研究を進めています。組織吸引デバイス開発では、立命館大学理工学部マイクロ機械システム工学科教授小西聡先

生, 同特定研究員・京都大学大学院薬学研究科特定助教清水一憲先生にご協力頂きました。

最後に, 本研究を遂行するにあたり, ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科・京都大学物質-細胞統合システム拠点教授橋田充先生に深く感謝します。また, 研究のご指導並びに多くのアドバイスを頂きました長崎大学医歯薬学総合研究科名誉教授中村純三先生, 同教授・附属病院薬剤部長佐々木均先生, 同教授西田孝洋先生, 京都大学大学院薬学研究科准教授山下富義先生, 同特定助教樋口ゆり子先生に感謝申し上げます。さらに, 実際研究に携わって頂いた, 京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野向井英史博士(現: 理化学研究所研究員), 運敬太博士(現: 国立医薬品食品衛生研究所薬品部研究員), 黒崎友亮博士, Unga Johan Mikael博士を始めとした, 多くの研究員・修了生・卒業生に感謝の意を表します。

また本研究の一部は, 文部科学省科学研究費補助金若手研究(A), 挑戦的萌芽研究, 厚生労働省科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業の助成により行われました。この場を借りて, 感謝申し上げます。

引用文献

- 1) K. Un, S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy, *Biomaterials*, **31**, 7813-7826 (2010).
- 2) K. Un, S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier, *Mol. Pharm.*, **8**, 543-554 (2011).
- 3) K. Un, S. Kawakami, M. Yoshida, Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida, Efficient suppression of ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation, *Hepatology*, **56**, 259-269 (2012).
- 4) H. Mukai, S. Kawakami, Y. Kamiya, F. Ma, H. Takahashi, K. Satake, K. Terao, H. Kotera, F. Yamashita, M. Hashida, Pressure-mediated transfection of murine spleen and liver, *Hum. Gene Ther.*, **20**, 1157-1167 (2009).
- 5) K. Shimizu, S. Kawakami, K. Hayashi, H. Kinoshita, K. Kuwahara, K. Nakao, M. Hashida, S. Konishi, *In vivo* site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device, *PLoS One*, **7**, e41319 (2012).

