

(神田紘介) 論文内容の要旨

主 論 文

Ternary Complex of Plasmid DNA with Protamine and γ -Polyglutamic Acid for Biocompatible Gene Delivery System

生体適合型遺伝子デリバリーシステムとしてのプロタミンおよび
 γ -ポリグルタミン酸を用いた pDNA 三重複合体の作製
(神田紘介、兒玉幸修、黒崎友亮、今村政信、中川博雄、室高広、樋口則英、
中村忠博、北原隆志、本田正幸、佐々木均)

Biological and Pharmaceutical Bulletin: 36 巻、11 号、1794 頁～1799 頁、
2013 年 11 月 1 日発行

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：佐々木均 教授)

緒 言

遺伝子治療を有効かつ安全に行うためには、遺伝子ベクターの性能が重要である。遺伝子ベクターとしては、ウイルスベクターと非ウイルスベクターがあるが、非ウイルスベクターには、その構成成分を工夫することで、高い遺伝子導入効率、安定性、安全性を付与できる可能性がある。しかし、安全性や品質の問題で臨床への応用は極めて難しい。ポリプレックスと呼ばれる非ウイルスベクターは、カチオン性のポリマーやアニオン性のポリマーを組み合わせ、静電気的な相互作用を利用して形成させる複合体がある。

本研究では、医薬品である硫酸プロタミン（以下、プロタミン）に着目した。プロタミンは、アルギニンを主成分とする 32 アミノ酸からなる分子量が 4000-4250 のカチオン性のタンパク質である。また、プロタミンは医薬品であり、ヘパリンの解毒剤やインスリンを持効化する添加物として用いられる等、安全性の高いポリマーである。一方、プロタミンには、そのカチオン性に由来する微弱な毒性が報告されている。本研究では、さらに、納豆の粘液成分で安全性の高いアニオン性のポリマーである γ -ポリグルタミン酸 (γ -PGA) を添加することで、アニオン性の三重複合体を作製し、その有用性について検討を行った。

対象と方法

遺伝子(pDNA)にプロタミンを様々な電荷比 (pDNA のリン酸/プロタミンの窒素) で添加し、pDNA/プロタミン複合体を調製し、安定性及び遺伝子導入効率、毒性から最

適な調製条件の検討を行った。

電荷比が 1:6.4 で調製を行った pDNA/プロタミン複合体に、様々な電荷比 (pDNA のリン酸/プロタミンの窒素/ γ -PGA のカルボン酸) で γ -PGA を添加し、pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体を調製した。蛍光標識プロタミンおよび plasmid enhanced green fluorescent protein-C1 (pEGFP-C1) を利用することにより、複合体の取り込みと遺伝子発現の関係を蛍光顕微鏡下で観察した。エンドサイトーシス阻害剤 (CPZ、genistein、amiloride) を使用し、取り込み機構の解析を行った。なお、複合体の安定性の検討は、Zetasizer Nano ZS による粒子サイズおよびゼータ電位の測定および gel retardation assay により行った。遺伝子導入効率の検討は、luciferase assay により行った。毒性の検討は、WST-1 assay により行った。細胞は、マウスのメラノーマ由来の B16-F10 細胞を使用した。

結 果

電荷比 (pDNA のリン酸/プロタミンの窒素) が 1:6.4 で調製を行った pDNA/プロタミン複合体が、複合体の安定性及び遺伝子導入効率、毒性の観点から、最適であった。本条件下での pDNA/プロタミン複合体は、平均粒子径が 78.7 ± 2.7 nm、ゼータ電位が $+25.7 \pm 0.3$ mV であった。また、若干の細胞毒性を有していた。

電荷比 (pDNA のリン酸/プロタミンの窒素/ γ -PGA のカルボン酸) が 1:6.4:16 で調製を行った pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体が、複合体の安定性及び遺伝子導入効率、毒性の観点から、最適であった。本条件下での pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体は、平均粒子径が 80.8 ± 1.8 nm、ゼータ電位が -41.5 ± 0.6 mV であった。pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体は、pDNA/プロタミン複合体と比較して、遺伝子導入効率に変化は認められなかったが、細胞毒性は減少した。

蛍光標識プロタミンおよび pEGFP-C1 を使用したそれぞれの複合体を細胞に添加し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、複合体の取り込みおよび導入遺伝子発現が観察された。

エンドサイトーシス阻害剤を添加したところ、pDNA/プロタミン複合体は genistein と amiloride ($p < 0.05$)、pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体は、amiloride と CPZ で遺伝子導入効率の低下が認められた ($p < 0.01$)。

考 察

本研究では、医薬品として臨床使用され安全性の高いカチオン性のポリマーであるプロタミンを応用した複合体の開発を行った。pDNA/プロタミン複合体は、カチオン性の複合体であり、高い遺伝子導入効率を示すが、若干の細胞毒性を有していた。我々は、安全性が高いアニオン性のポリマーである γ -PGA を添加することで、遺伝子導入効率をほとんど下げることなく、毒性を軽減した三重複合体 (pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体) の開発に成功した。

複合体を B16-F10 細胞に添加した結果、細胞内への取り込みと、遺伝子の発現が観察された。阻害剤を用いた検討により、pDNA/プロタミン複合体は、カベオラ介在性エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシス、pDNA/プロタミン/ γ -PGA 複合体は、クラスリン介在性エンドサイトーシスおよびマクロピノサイトーシスを介した取り込みが行われていることが示された。

以上、高い遺伝子導入効率を持ち、細胞毒性が少ない、生体適合型の三重複合体の開発に成功した。臨床への応用が期待される。