

炭酸カルシウム粒子を用いた腹腔内組織への 遺伝子導入に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 嶺 豊春

〔目的〕

先天性遺伝子欠損症、癌などの難治性疾患に対する治療法として、遺伝子治療が期待されている。腹膜線維症や癌の腹膜播種など腹腔内組織の難治性疾患に対しても遺伝子治療が有望であり、腹腔内組織への効率的かつ安全な遺伝子導入法の研究開発が重要となる。ウイルスベクターは、遺伝子導入効率の面で有用であるものの、安全性の問題がある。安全性の高いベクターとしてプラスミド DNA (pDNA) が挙げられるが、pDNA の腹腔内投与における遺伝子導入効率は低く、将来的な臨床応用を考える上で、より効率的かつ安全な遺伝子導入法の開発が望まれる。

本研究においては、組織選択性を高める目的で、組織表面に塗布する pDNA 含有軟膏剤の開発を行い、さらに塗布操作による摩擦の影響を解析した。得られた情報を基に研磨剤である炭酸カルシウムを用いた *in vivo* 遺伝子導入法を考案した。製剤学的特性の向上を目的に新規炭酸カルシウム粒子の開発も行い、得られた炭酸カルシウム粒子の製剤学的特性および有効性を評価した。さらに腹腔内組織全体への *in vivo* 遺伝子導入に応用し、開発した炭酸カルシウム粒子の有効性及び安全性を評価した。

〔方法〕

In vivo 遺伝子導入：レポーター遺伝子として細胞内局在型ルシフェラーゼ、分泌型ルシフェラーゼ、あるいは緑色蛍光タンパク質をコードした pDNA を用いた。ddY 系雄性マウスまたは Wistar 系雄性ラットに対し、麻酔下、開腹してマイクロピペットにより pDNA を胃漿膜表面に滴下投与した。投与前後に薬匙により摩擦を加え、摩擦の影響を解析した。pDNA 含有軟膏剤は薬匙を用いて塗布した。pDNA 含有炭酸カルシウム懸濁剤の投与においては、開腹せず腹壁越しに胃漿膜表面または腹腔内へ針付きシリンジを用いて投与した。一定時間経過後、遺伝子導入効率を測定した。また、腹腔内液中および血漿中の TNF- α 濃度、LDH 活性を測定することで安全性を評価した。
新規炭酸カルシウム粒子の合成：卵黄レシチンを溶解したジエチルエーテルに対し、ボルテックスしながら炭酸ナトリウム水溶液と塩化カルシウム水溶液を順次混合することで、新規炭酸カルシウム粒子を得た。

〔結果〕

I. 摩擦による胃漿膜表面への遺伝子導入

胃漿膜表面での pDNA の滞留性及び組織選択性の向上を目的にカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) を軟膏基剤とした pDNA 含有軟膏剤を作製し、ラットの胃漿膜表面に薬匙を用いて塗布したところ、組織選択性のみならず遺伝子発現が顕著に増大した。遺伝子発現の増大メカニズムを解析したところ¹⁾、pDNA 溶液を胃漿膜表面へ滴下後に薬匙で摩擦を加えることで、CMC-Na を含まない条件でも高い遺伝子発現を示した。また、pDNA 溶液を滴下する前に摩擦を加えたときには遺伝子発現が増大しなかったことから、摩擦を加える時点で細胞近傍に pDNA が存在する必要があるものと推察された。

II. プラスミド DNA 含有炭酸カルシウム懸濁剤の開発

製剤を投与する際に腹壁を切開し、腹腔内組織を露出させ摩擦を加える方法は、臨床応用を考慮した場合に侵襲性が問題となる可能性がある。そこで、摩擦の効果を簡便に再現可能な製剤として研磨剤を併用することを考案した。研磨剤として炭酸カルシウムを選択し、pDNA 含有炭酸カルシウム懸濁剤の遺伝子導入効率を評価したところ、マウスの胃において pDNA 単独と比較して約 130 倍高い遺伝子導入効率を示した。しかしながら、市販の炭酸カルシウムは沈降が速く、沈殿が固化し再懸濁不良となった。そこで、より取り扱いやすい製剤を得るため、炭酸カルシウム粒子の形状制御を試みた。種々の合成条件を検討したところ、新規に花卉状粒子 (炭酸カルシウムマイクロフラワー、MF) を得た (Fig. 1)²⁾。MF は、沈降が市販の炭酸カルシウムより遅く、沈殿しても再懸濁が容易であり、*in vivo* 遺伝子導入を行う際の操作性が向上した。pDNA 含有炭酸カルシウム懸濁剤の胃に対する遺伝子導入効率を評価したところ、MF は低濃度でも市販品と比較して高い遺伝子導入効率の促進効果を示すことが明らかとなった (Fig. 2)。一方、粒子径の縮小を目的として超音波を MF に照射したところ、MF の形状が破壊され、遺伝子発現が有意に低下した。

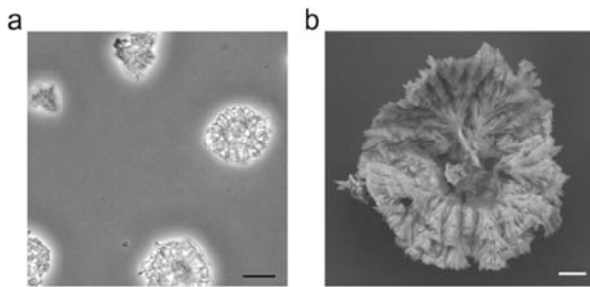


Fig. 1 Morphology of MF.

(a) Phase contrast image of MF. Scale bar: 20 μm . (b) Scanning electron microscopy for MF. Scale bar: 10 μm .

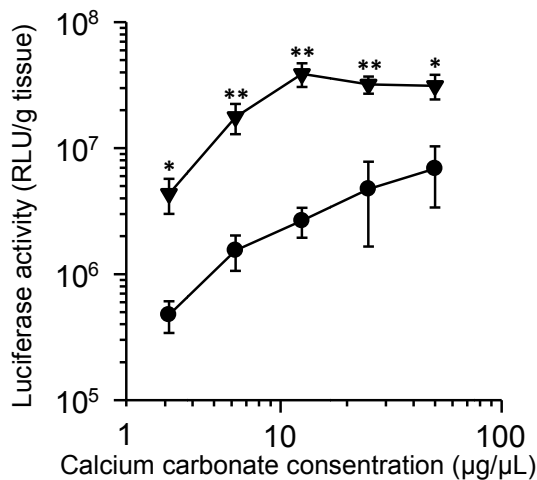


Fig. 2 Effectiveness of MF for *in vivo* transfection to the stomach in mice.

Effect of concentration of commercially available calcium carbonate (circles) and MF (inverted triangles) on transfection to the stomach. Each value represents the mean \pm S.E. of at least 5 experiments. Significantly different from commercially available calcium carbonate (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

III. 炭酸カルシウムマイクロフラワーを用いた腹腔内組織全体への遺伝子導入

新規に開発した MF を用いることで、開腹手術を行わなくても pDNA の胃漿膜表面投与時における遺伝子導入効率を改善できることが明らかとなった。ここで MF を腹腔内投与に応用することで、腹腔内組織全体に高い遺伝子発現が得られる可能性があると考えた。pDNA 含有 MF 懸濁剤のマウスへの腹腔内投与により、肝臓、胃、腸など腹腔内組織全体に対し、高効率で遺伝子導入することに成功した (Fig. 3)。臨床における遺伝子治療においては高い遺伝子導入効率だけでなく、頻回投与が可能となるような安全性が必要である。そこで MF の安全性について、分泌方向性、炎症反応、

組織障害性の点からそれぞれ解析を行った。遺伝子発現の深度を解析したところ、腹膜中皮細胞に限られており、腹腔内選択的な遺伝子導入が可能であることが示唆された。さらに、分泌型ルシフェラーゼをコードした pDNA を含有する MF 懸濁剤を用いて遺伝子導入を行ったところ、遺伝子発現産物の腹腔側への選択的な分泌特性が示された。MF 投与群では腹腔内液および血漿中の TNF- α 濃度が上昇したものの、pDNA・カチオン性リポソーム複合体を投与した場合と比較し一過性で軽度であった。腹腔内液および血漿中の LDH 活性は MF 投与時においても非投与時と比較して有意に上昇しなかった。

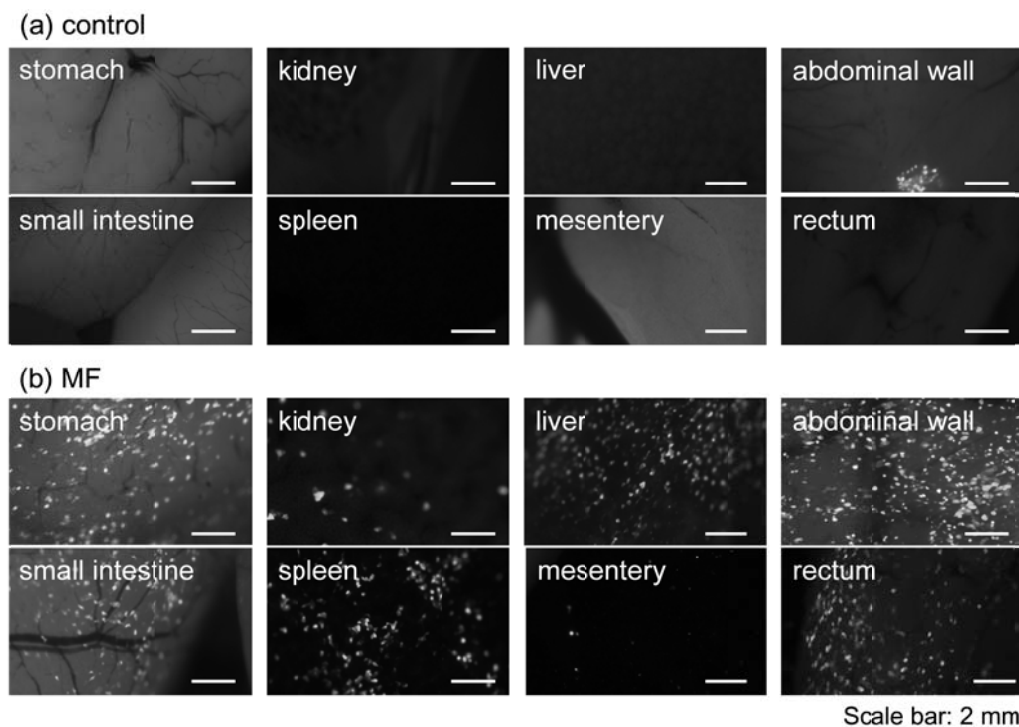


Fig. 3 Detection of transgene-positive cells in each tissue after intraperitoneal administration in mice.

Gene expression in intraperitoneal tissues 24 h after intraperitoneal administration of pZsGreen1-N1.

[考察]

pDNA 含有軟膏剤を開発中に、組織への摩擦に遺伝子発現促進効果があることを見出した。得られた情報を基に炭酸カルシウム粒子の併用を考案し、高い遺伝子発現を得ることができた。さらに製剤学的に取り扱いやすい粒子の新規合成に取り組み、MF を開発した。得られた結果から炭酸カルシウムの形状が製剤学的特性および遺伝子導入効率を左右する因子であることが推察された。MF により腹腔内組織全体への効率的な遺伝子導入が可能であることも明らかとなった。MF を用いた遺伝子導入は腹腔内選択的であり、組織障害性も低く、炎症反応も軽度であったことから、安全性の面でも優れていることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、腹腔内組織への効率的かつ安全性の高い *in vivo* 遺伝子導入法の開発に有益な情報であると思われる。

[基礎となった学術論文]

- 1) **Mine T**, Ishii H, Nakajima S, Yoshikawa N, Miyamoto H, Nakashima M, Nakamura J, Fumoto S, Nishida K, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1514-1517 (2011).
- 2) Fumoto S, Nakajima S, **Mine T**, Yoshikawa N, Kitahara T, Sasaki H, Miyamoto H, Nishida K, *Mol. Pharm.*, **9**, 1962-1970 (2012).