

Plasmid DNA によるマウス胃漿膜表面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 西 順也

[目的]

遺伝子治療は、難治性疾患に対する根治的治療法として期待を集めており、遺伝子治療に関する研究開発が活発に行われている。胃に関しても例外ではなく、胃潰瘍および胃癌の治療を目的とした遺伝子治療が研究されている¹⁾。しかしながら、遺伝子治療の実用化に向けては、未だ安全性に問題がある。特に疾患部位以外への遺伝子導入は、副作用の原因となりうるため、標的臓器への効率的かつ選択的な遺伝子導入法の開発は重要である。さらに、遺伝子導入機構の解明により、遺伝子導入の障壁となりうる過程を明らかにすることは、効率的な遺伝子導入を行うために有用な情報であると考えられる。

本研究は、安全かつ効率的な遺伝子導入法を確立するために、最も安全な遺伝子ベクターである plasmid DNA (pDNA) を用いた胃選択的な *in vivo* 遺伝子導入法を開発することを目的とした。さらに、pDNA によるマウス胃漿膜表面への遺伝子導入機構を解明することを目的とした。

[結果・考察]

I. pDNA の胃漿膜表面滴下による胃選択的遺伝子導入に関する検討

マウス胃漿膜表面に naked pDNA を滴下投与することにより、胃に遺伝子導入が可能であるかを検討した。pCMV-luciferase 遺伝子の投与量および投与容量を 30 $\mu\text{g}/30 \mu\text{L}$ とした検討において、胃に遺伝子導入は可能であったが、脾臓等、標的臓器以外においても高い遺伝子発現が確認された。投与量および投与容量を減量して 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$ とした検討においては (Fig. 1)、胃選択的な遺伝子導入が可能となり、胃における遺伝子発現レベルは、脾臓の 5.7 倍高い値を示した²⁾。蛍光標識 pDNA を用いた解析において、滴下投与 1 時間後までは、投与部位周辺でのみ pDNA が確認されたが、2 時間後においては、肝臓、脾臓および横隔膜に pDNA が拡散していることが示された。このことから、投与後の pDNA 溶液の周辺組織への拡散が、胃以外への臓器・組織への遺伝子導入の要因となっていることが示唆された。

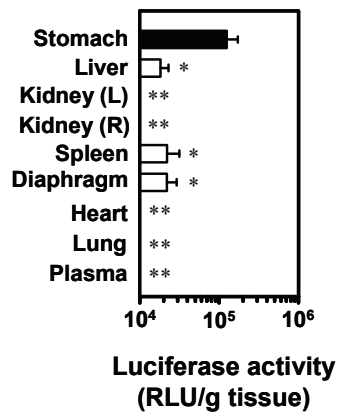


Fig. 1 Gene expression in the stomach, liver, kidneys (left and right), spleen, diaphragm, heart, lung and plasma 6 h after gastric serosal surface microinstillation of pDNA at a dose of 1 μ g (1 μ L) in mice. Each bar represents the mean + S.E. of at 19 experiments. Significantly different from the stomach (* p <0.05, ** p <0.01).

II. 胃漿膜表面における pDNA の取り込み機構に関する検討

分子量が数百万にもなる pDNA が、単に胃漿膜表面に投与するだけで細胞内へ取り込まれ、遺伝子発現に至ることは細胞生物学的にも興味深いことである。胃漿膜表面投与において pDNA を取り込む細胞を解析した結果、pDNA が内在化した細胞は、密着結合に囲まれた細胞であることが示された。密着結合の存在および細胞の大きさ等の特徴から、pDNA を取り込んでいる細胞は、中皮細胞であることが示唆された。また、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いた遺伝子導入阻害実験により、クラスリン介在性あるいは脂質ラフト・カベオラ介在性エンドサイトーシスの阻害剤では、遺伝子導入は阻害されず、マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライド処理で遺伝子導入が阻害されることが示された。さらに、蛍光標識 pDNA およびエンドサイトーシスマーカーの細胞内局在解析において、pDNA とデキストランが共局在している様子が確認された。これらの結果から、pDNA による胃漿膜表面への遺伝子導入にマクロピノサイトーシスが関与していることが推察された。

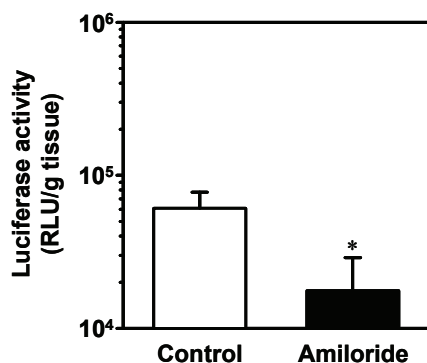


Fig. 2 Effect of macropinocytic inhibitor on gene expression in the stomach 6 h after gastric serosal surface administration of pDNA in mice. Ninety microliters of 5% glucose or amiloride (10 mM) were administered onto the gastric serosal surface using a diffusion cell in mice. pDNA solution (15 μ g/10 μ L) was added 30 min after pretreatment. Two hours after pDNA addition, the solution in a diffusion cell was removed. Luciferase activity in the stomach (site of a diffusion cell attachment) was determined 6 h after pDNA addition. Each bar represents the mean + S.E. of at least 18 experiments. Significantly different from the control (* p <0.05).

III. pDNA による胃漿膜表面への遺伝子導入を制御する細胞内シグナル伝達経路に関する検討

pDNA の細胞内在化経路として、マクロピノサイトーシスが示唆されたことから、pDNA の取り込みへのアクチンの関与が推察された。アクチン重合を阻害するラトランキュリン B 処理を行うと、遺伝子発現レベルが有意に低下したことから、胃漿膜表面における遺伝子導入とアクチンの関与が裏付けられた。また、LY294002 (Fig. 3) および NSC23766 処理によっても遺伝子発現レベルが低下し、PI3-キナーゼ、Rac を介したアクチン重合が、胃漿膜表面への遺伝子導入に深く関与していることが示唆された。さらに、pDNA を取り込んだ周辺において、WAVE2 と pDNA との共局在も確認され、アクチン重合を誘起する一連の細胞内シグナル伝達によって、pDNA による胃漿膜表面の遺伝子導入が制御されていることを動物レベルで示すことができた。遺伝子導入とアクチンダイナミクスの関与を示唆する種々の知見は、胃漿膜表面における pDNA のマクロピノサイトーシスによる取り込みを支持するものと思われる。

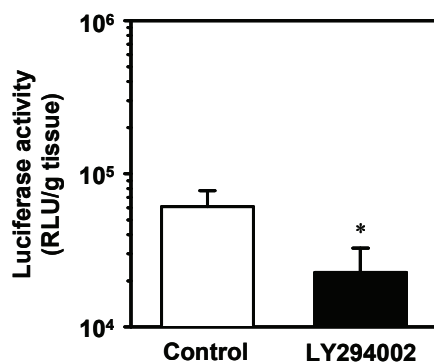


Fig. 3 Effect of PI3-kinase inhibitor on gene expression in the stomach 6 h after gastric serosal surface administration of pDNA in mice.

Ninety microliters of 5% glucose or LY294002 (50 μ M) were administered onto the gastric serosal surface using a diffusion cell in mice. pDNA solution (15 μ g/10 μ L) was added 30 min after pretreatment. Two hours after pDNA addition, the solution in a diffusion cell was removed. Luciferase activity in the stomach (site of a diffusion cell attachment) was determined 6 h after pDNA addition. Each bar represents the mean + S.E. of at least 17 experiments. Significantly different from the control (* p <0.05).

[結論]

pDNA を胃漿膜表面に滴下投与することにより、胃選択的な遺伝子導入が可能であり、投与量および投与容量を適切に減じることで、その選択性を向上させることが可能であることを見出した。また、pDNA による胃漿膜表面への遺伝子導入における pDNA の取り込み機構に関して、動物レベルにおいて基礎的知見を得た。本研究で得られた知見は、胃選択的かつ効率的な *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。

[文献]

- 1) Fumoto S. et al., *Curr. Gene Ther.* **8**:187-200 (2008)
- 2) Nishi J. et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**:633-639 (2008)