

静電的相互作用を基盤とした生体適合型遺伝子ベクターの開発とその応用に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 黒崎 友亮

[目的]

遺伝子治療は先天性遺伝子欠損症や癌、感染症に対する次世代の治療技術として注目されている。効果的な遺伝子治療の実現には、安全でかつ高い遺伝子導入効果を有する遺伝子ベクターの開発が不可欠である。近年、ウイルスベクターに代わる新たなベクターとして非ウイルスベクターが注目され、カチオン性高分子やカチオン性リポソームを用いたカチオン性の遺伝子ベクターが数多く開発されている。これらのカチオン性の遺伝子ベクターは、アニオン性に帯電した細胞膜と静電的に強く結合することによって、高い遺伝子発現効果を示す。一方で、カチオン性の遺伝子ベクターは細胞障害性や血液成分との凝集、臓器障害などの重篤な副作用の原因となることが知られている。

本研究では、種々のアニオン性高分子を用いて、pDNA と polyethylenimine (PEI) からなるカチオン性の pDNA/PEI complex を静電的に被膜した生体適合型遺伝子ベクター (ternary complex) を開発し、その有用性について検討した。

[結果・考察]

[I] 被膜型遺伝子ベクターの構築と生体適合性の評価

カチオン性の pDNA/PEI complex を生体適合性のアニオン性高分子である polyadenylic acid (polyA)、polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC)、 α -polyaspartic acid (α -PAA)、 α -polyglutamic acid (α -PGA)、 γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を用いて静電的に被膜することによって、粒子径が 100 nm 以下で、表面がアニオン性に帯電した ternary complex を構築した。pDNA/PEI complex は、強い赤血球凝集や細胞障害性を示したが、開発した ternary complex は、これらの毒性を示さず、高い安全性が認められた。

[II] 生体適合型遺伝子ベクターの遺伝子発現効率と遺伝子発現メカニズムについての検討

各 ternary complex の細胞内取り込みと遺伝子発現効率を測定した結果、 γ -PGA を用いて被膜した pDNA/PEI/ γ -PGA complex はアニオン性であるにも関わらず、高い細胞内取り込みと遺伝子発現を示した (Fig. 1)。

この pDNA/PEI/ γ -PGA complex の遺伝子導入メカニズムを評価したところ、pDNA/PEI/ γ -PGA complex は γ -PGA に特異的な受容体を介して細胞と接着し、カベオラ介在性エンドサイトーシスによって、細胞内へ取り込まれる事を見出した。さらに、pDNA/PEI/ γ -PGA complex はコアに存在する PEI のプロトンスポンジ効果によってエンドソームを破壊し、細胞質内へ効率的に移行して高い遺伝子発現を示すことを明らかにした。

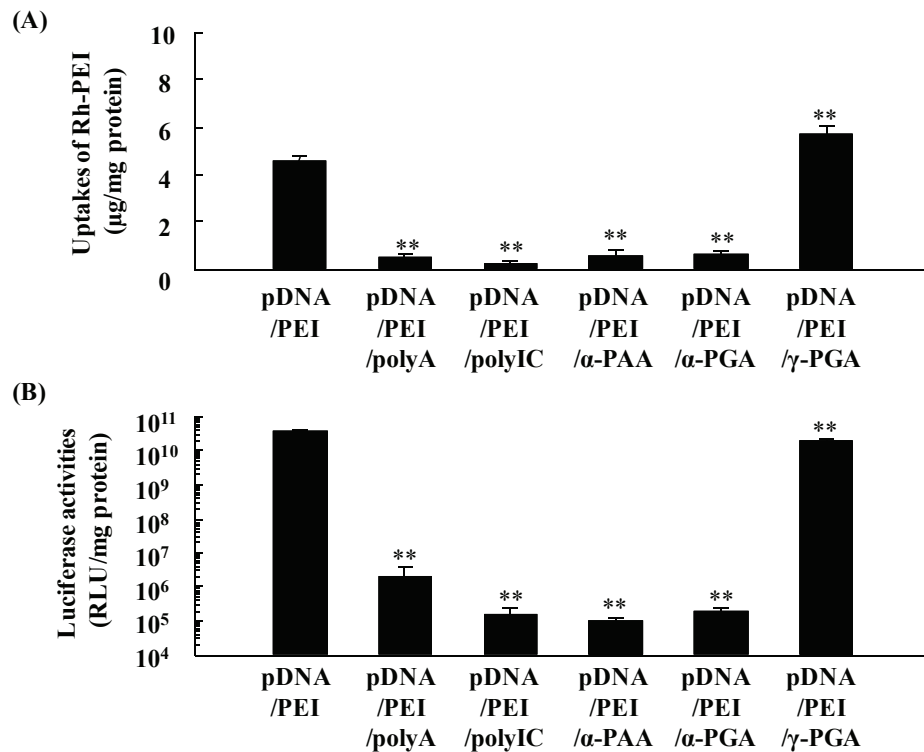


Fig. 1. Uptake efficiency (A) and transgene efficiency (B) of ternary complexes. Each data represents the mean \pm S.E. (n=6). **: $P < 0.01$ vs pDNA/PEI complex.

[III] pDNA/PEI/γ-PGA complex の *in vivo* における有用性の検討

pDNA/PEI complex をマウスへ尾静脈内投与した結果、非常に高い致死性と肝障害が観察された。一方で、pDNA/PEI/γ-PGA complex ではこのような毒性は認められず、生体内でも高い安全性を示した。また pDNA/PEI/γ-PGA complex は、静脈内投与後に脾臓で非常に高い遺伝子発現を示した (Fig. 2)。脾臓の組織化学的評価を行った結果、pDNA/PEI/γ-PGA complex は脾臓の中でも、特に抗原提示細胞に富んだ辺縁体に多量に蓄積し、遺伝子を発現していることを見出した。

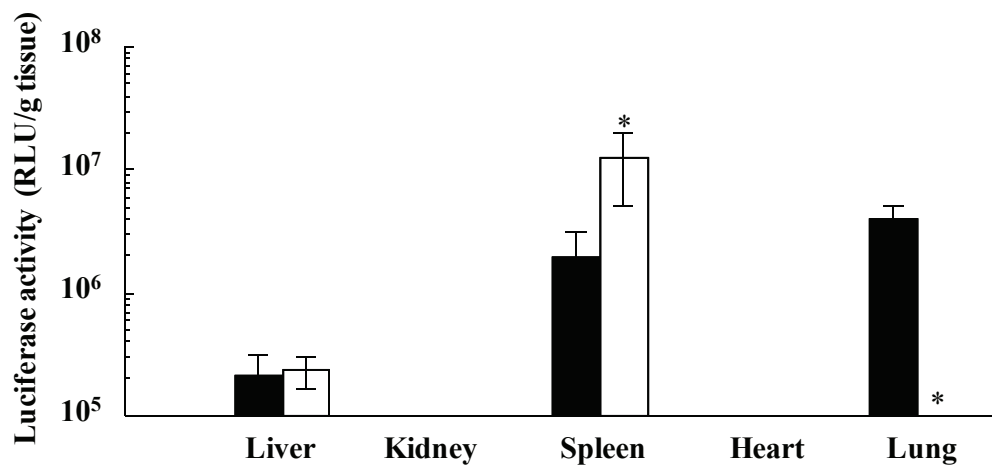


Fig. 2. *In vivo* transfection efficiencies of the complexes 6 hours after administration. Each data represents the mean \pm S.E. (n=3). ■: pDNA/PEI complex, □: pDNA/PEI/γ-PGA complex. *: $P < 0.05$ vs pDNA/PEI complex.

[IV] メラノーマを標的とした pDNA/PEI/ γ -PGA complex の DNA ワクチンベクターへの応用に関する検討

メラノーマに対する DNA ワクチン (pUb-M) を用いて作成した pUb-M/PEI/ γ -PGA complex をマウスに複数回投与し、メラノーマに対する免疫誘導効果を評価した。この結果、pUb-M/PEI/ γ -PGA complex の投与によって、マウスの皮内へ移植した腫瘍の増殖が有意に抑制された (Fig. 3)。さらに、pUb-M/PEI/ γ -PGA complex は、メラノーマ細胞の肺転移を著明に抑制し、肺転移モデルの生存期間を有意に延長することを見出した。

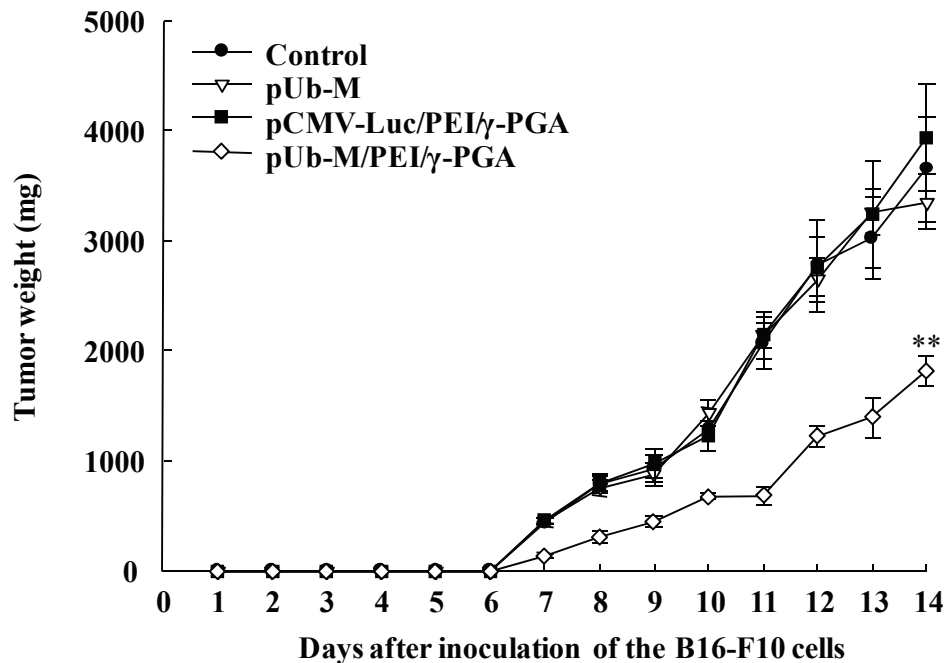


Fig. 3. Anti-tumor effect of pUb-M/PEI/ γ -PGA complex. Each data represents the mean \pm S.E. (n=6-8). **: $P < 0.01$ vs control.

[結論]

カチオン性の遺伝子ベクターである pDNA/PEI complex を、アニオン性高分子である γ -PGA を用いて静電的に被膜することにより、安全かつ効果的な生体適合型遺伝子ベクターの開発に成功した。また、この新規遺伝子ベクターは、脾臓で効率的に遺伝子を発現できることを見出した。そこで、メラノーマの DNA ワクチンにこの新規遺伝子ベクターを応用した結果、動物レベルでメラノーマに特異的な免疫を誘導し、メラノーマの増殖および転移を顕著に抑制することを証明した。本研究で得られた知見は、効果的な DNA ワクチン療法の開発に有益な情報であると考えられる。

[基礎となった学術論文]

1. Kurosaki T., Kitahara T., Fumoto S., Nishida K., Nakamura J., Niidome T., Kodama Y., Nakagawa H., To H., Sasaki H., Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and γ -polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials*, **30**, 2846-53 (2009).