

## ナノ複合体を用いた遺伝子治療による内科的再生医療

山本雅哉

京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野

### 1. 研究のねらい

これまでの再生医療は、皮膚、軟骨、骨など、組織学および機能的に単純な組織を対象とし、外傷や外科手術によって失われた機能の回復を目的としてきた。本研究のねらいは、内科的なアプローチにより、慢性疾患に対して生体組織の再生を誘導する治療法、すなわち“内科的再生医療”を提案することである。これは、肝硬変、肺線維症、など難治性の慢性線維性疾患に対する根本的な治療策をもたない現在の外科的再生医療の問題を解決する、次世代の再生医療と位置付けることができるであろう。本研究では、こうした線維化を解消するためのキーとなる生体シグナル分子の遺伝子と水溶性高分子とのナノ複合体を用いたドラッグデリバリーシステムを開発し、標的部位に効率よく遺伝子を導入することによって、疾患治療を行うことを目的とした。本報告では、肝臓に対して高い親和性をもつ多糖であるプルランを利用した *in vitro* ならびに *in vivo* における遺伝子導入とその疾患治療への応用について概説する。

### 2. 研究成果と考察

#### 2-1. スペルミン導入プルランとプラスミド DNA とのナノ複合体を用いた *in vitro* 遺伝子導入

プルランは天然の多糖であり、肝臓に高い親和性をもつとともに、肝実質細胞に発現しているアシアロ糖タンパク質レセプター (ASGPR) を介して肝細胞へ取り込まれることが知られている。まず、非電荷親水性高分子であるプルランと遺伝子とのポリオンコンプレックスを形成させるために、生体内ポリアミンの一つであるスペルミンをプルランへ導入した。得られた異なる分子量ならびにスペルミン導入率をもつスペルミン導入プルランと Luciferase タンパク質を発現するプラスミド DNA とを混合することにより、両者のポリオンコンプレックス (ナノ複合体) を形成させた。Luciferase タンパク質の発現は、化学発光を利用して、高感度に定量することが可能である。得られたナノ複合体を用いて、ASGPR をもつ細胞である、ヒト肝がん細胞株 (HepG2 細胞) に対する *in vitro* 遺伝子導入について検討した。図1は、異なる分子量ならびにスペルミン導入率をもつスペルミン導入プルランを用いた HepG2 細胞における遺伝子発現レベルを示す。図から明らかのように、いずれの分子量のプルランを用いた場合も、プルランのスペルミン導入率に依存して遺伝子発現は変化した。また、最も高い遺伝子発現を示すスペルミン導入率は、用いたプルランの分子量により異なっていた。これまでに、遺伝子導入では、ポリオンコンプレックスのサイズが約 200 nm 以下で正に帯電している場合、高い遺伝子発現が得られることが知られている。

しかしながら、スペルミン導入プルランの分子量が 22,800 より高く、スペルミン導入率が 10% より高い場合、ナノ複合体の分子サイズは、200~300 nm 程度、ゼータ電位は約 +15 mV であった。以上より、図1で示した *in vitro* 遺伝子発現では、ナノ複合体のサイズやゼータ電位のみならず、ナノ複合体の細胞内動態などの他の因子も影響を及ぼしていることを示唆している。一方、アシアロ糖タンパク質レセプターに結合するアシアロフェツインで処理した細胞に対して遺伝子導入を行ったところ、遺伝子発現の低下

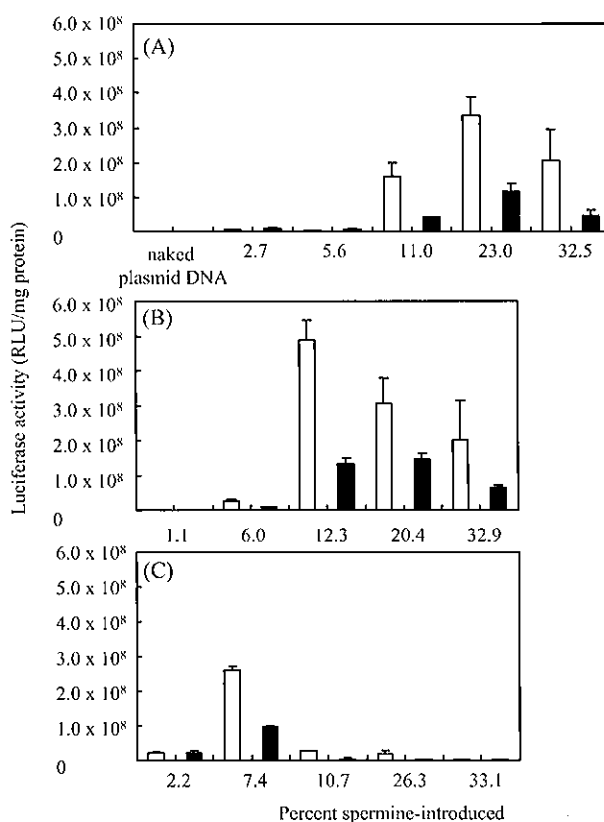


図1 ナノ複合体を用いたHepG2細胞への*in vitro*遺伝子導入  
プルランの分子量(A)22,800、(B)47,300、(C)112,000  
□:アシアロフェツイン未処理、■:アシアロフェツイン処理

することがわかった。このことは、ナノ複合体を用いた肝細胞への遺伝子導入には、レセプターを介したプルランと肝細胞との特異的な相互作用が関与していることを示している。

## 2-2. ナノ複合体を用いた肝臓への *in vivo* 遺伝子導入とその生物活性

肝臓は体内において代謝機能を担う重要な臓器であり、この代謝機能の異常、あるいは肝癌、肝硬変などが重篤な肝臓疾患として知られている。ナノ複合体を用いた肝臓への遺伝子ターゲティングが可能になれば、これらの疾患に対する遺伝子治療への応用も可能となる。そこで、異なる分子量ならびにスペルミン導入率をもつスペルミン導入プルランとプラスミド DNA とからなるナノ複合体を用いて、マウスの肝臓への遺伝子導入を試みた。その結果、ナノ複合体の作製に用いるスペルミン導入プルランの分子量、スペルミン導入率などを変化させることにより、肝臓における遺伝子発現レベルの変化することがわかった。また、最も高い遺伝子発現を示したナノ複合体の作製条件は、*in vitro* と *in vivo* とでは異なっていた。このメカニズムについては検討中であるが、ナノ複合体の生体内での安定性や血中タンパク質との相互作用などが寄与していると考えられる。また、遺伝子治療の例として、最も高い遺伝子発現が得られたナノ複合体を用いて、肝臓特異的にがんの転移抑制効果をもつタンパク質を発現させ、がん細胞の肝臓への転移抑制効果について検討した。その結果、ナノ複合体を静脈内へ投与 1 日後、リンパ腫細胞をマウスの静脈内から移植した場合、生理食塩水ならびにプラスミド DNA 単独投与群と比べて、ナノ複合体投与群において、肝臓への転移が抑制され、担がんマウスの生存期間が延長されることがわかった。このことは、ナノ複合体を用いて肝臓へ遺伝子導入することにより、発現したタンパク質の肝臓における生物活性が増強され、肝臓へのがんの転移が抑制されたことを示している。

以上を要するに、*in vivo* において、肝臓への遺伝子導入が可能なナノ複合体を開発することに成功した。また、肝臓へ機能遺伝子を導入することにより、肝臓疾患治療の可能性を示した。今後、この遺伝子導入法を利用して、線維症のみならず、肝臓疾患や肝臓がん治療などへの応用を目指して研究を展開する。

## 3. 主な発表

### 論文発表

- 1) Yamamoto, M. and Tabata, Y.: Tissue engineering by modulated gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* to be published.

### 国際会議発表

- 1) Yamamoto, M., Jo, J., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression. 7th World Biomaterials Congress (2004.5.17-21 Sydney)
- 2) Yamamoto, M., Jo, J., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y.: Polysaccharide-based non-viral gene delivery system for adult stem cells. 32<sup>nd</sup> Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. (2005.6.18-22. Miami)
- 3) Jo, J., Yamamoto, M., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y.: Effect of physicochemical properties of cationized pullulan complexed with plasmid DNA on the level of gene expression for mesenchymal stem cells. The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. (2005.11.18-23. Hawaii)

### 著作物

- 1) 山本雅哉、田畑泰彦：線維性慢性疾患に対する組織再生誘導治療。日本 DDS 学会誌 20(2), 110-117 (2005).

## 4. その他

### 特許

- 1) 山本雅哉、田畑泰彦：核酸の肝臓へのターゲティング。特開 2004-220148  
他に出願中 1 件