

学位論文

プラスミド DNA/キトサン/コンドロイチン硫酸
三元複合体による *in vitro* と *in vivo* での遺伝子導入

2013 年度

萩原 健司

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	萩原 健司
主 論 文 題 目： プラスミド DNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> での 遺伝子導入				
(内容の要旨) pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子であるコンドロイチン硫酸で被覆し、物理化学的な安定性と遺伝子発現活性の向上を目指した pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を開発した。三元複合体のキャラクタリゼーション、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での遺伝子導入を行ない、コンドロイチン硫酸を被覆剤として使用することの意義を検討した。				
第一章 遺伝子治療の歴史的背景および現状についてまとめ、本研究を行うことの意義と目的について述べた。				
第二章 pDNA/キトサン複合体と、様々な分子量および硫酸化度のコンドロイチン硫酸によって被覆された三元複合体のキャラクタリゼーションを行った。至適なコンドロイチン硫酸で被覆された三元複合体は、血中や生体組織中において高い安定性があることが期待された。複合体の細胞内取り込み機構および細胞内輸送経路を解析した結果、三元複合体はマクロピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、プロトンスポンジ効果でエンドソームから細胞質中に脱出し、複合体の状態を維持して核内に移行していることが明らかになった。				
第三章 pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を凍結乾燥製剤に応用し、さらに <i>in vivo</i> での遺伝子発現活性を評価した。三元複合体は、凍結乾燥後冷凍保存し使用直前に再水和する「凍結乾燥-再水和型」製剤としての利用が適していることが見出された。 <i>in vivo</i> で腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療を行ったところ、三元複合体は有意に高い抗腫瘍効果を発揮し、さらに凍結乾燥-再水和三元複合体も同等の効果を有することが認められた。				
第四章 pDNA/キトサン複合体と三元複合体の凝縮度の違いが転写効率・翻訳効率に与える影響について調べた。コンドロイチン硫酸で被覆することにより粒子の凝縮度が緩やかになることが示唆された。複合体の細胞内動態の定量的解析の結果、コンドロイチン硫酸による被覆は、細胞内部への取り込み量を有意に向上させる効果がある一方、核移行効率はわずかに低下させることが明らかになった。mRNA レベルでの遺伝子発現活性評価により、pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の転写効率は有意に向上することが分かった。				
第五章 本研究の結論をまとめた。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 81147542	SURNAME, First name HAGIWARA, Kenji
<p>Title Gene delivery by pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i></p>		
<p>Abstract</p> <p>Plasmid DNA (pDNA) /chitosan/chondroitin sulfate (CS) ternary complexes were developed to enhance physicochemical stability and transfection efficiency of pDNA/chitosan complexes. Physicochemical characters such as particle size, zeta potential, and morphology, and transfection abilities <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> were examined for ternary complexes.</p> <p>Chapter 1 Historic background and current situation of gene therapy were summarized, and research significance for this study was stated.</p> <p>Chapter 2 Plasmid DNA/chitosan complexes covered with six kinds of CSs having different sulfation degrees and molecular weights were physicochemically characterized. Ternary complexes covered with appropriate CS showed particle size of around 180 nm and zeta potential of -40 mV with unique globular structure. They also showed high stabilities in the conditions where blood proteins or erythrocytes exists. Ternary complexes were uptaken via macropinocytosis, escaped from endosomes by proton sponge effect, and entered into nucleus without dissociation of pDNA, chitosan, and CS.</p> <p>Chapter 3 The effects of coating pDNA/chitosan complexes with CS on stability in freeze-dry rehydration processes and cell transfection ability <i>in vivo</i> were investigated. Freeze-dried ternary complexes showed sufficient cell transfection ability <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>. In addition, ternary complexes significantly suppressed tumor growth and showed histopathologically high anti-tumor effect by intratumoral injection to tumor-bearing mice.</p> <p>Chapter 4 Transcription or translation efficiency and gene expression activity of pDNA complexes were analyzed in connection with difference of compaction strength of the complexes. As a results of fluorescence quenching assay and quantification analyses using realtime-PCR, it was suggested that CS coating loosened the compaction of pDNA and chitosan, causing a significant enhancement of transcription efficiency.</p> <p>Chapter 5 The major findings of the study was summarized.</p>		

目次

第1章 序論	1
1.1 遺伝子治療	1
1.2 遺伝子導入方法	5
1.2.1 ウイルスベクター	6
1.2.2 非ウイルスベクター	8
1.2.3 核酸の封入	10
1.3 ドラッグデリバリーシステム	12
1.3.1 DDS と遺伝子治療	13
1.3.2 粒子サイズと体内薬剤動態	14
1.3.3 遺伝子複合体の細胞内動態	15
1.3.4 DDS における糖鎖	16
1.4 キトサンによる遺伝子導入	18
1.4.1 キトサンについて	18
1.4.2 非ウイルスベクターとしてのキトサン	19
1.4.3 特徴	22
1.5 改良のためのアプローチ	27
1.6 本研究について	30
1.6.1 コンドロイチン硫酸について	30
1.6.2 目的	32
1.6.3 研究意義	32
1.7 本論文の構成	34
1.8 参考文献	35
第2章 pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体のキャラクタリ ゼーションと <i>in vitro</i> での遺伝子導入	46
2.1 緒言	46
2.2 実験方法	47
2.2.1 材料	47
2.2.2 複合体の作製	48
2.2.3 アガロースゲル電気泳動	50
2.2.4 粒子径およびゼータ電位測定	50
2.2.5 原子間力顕微鏡による複合体の形態観察	51

2.2.6	化学合成によるコンドロイチン硫酸の蛍光標識.....	51
2.2.7	DNase I 耐性評価.....	53
2.2.8	ウシ血清アルブミンによる凝集評価.....	54
2.2.9	赤血球凝集アッセイ.....	54
2.2.10	滴定実験.....	54
2.2.11	細胞培養.....	55
2.2.12	トランスフェクション.....	56
2.2.13	遺伝子発現活性の定量.....	56
2.2.14	フローサイトメトリーによる複合体の細胞内取り込み量評価.....	57
2.2.15	細胞毒性評価.....	58
2.2.16	阻害剤処理.....	58
2.2.17	コレラ毒素、トランスフェリン、デキストランの細胞内取り込み量.....	60
2.2.18	siRNA によるノックダウン.....	60
2.2.19	ウェスタンブロッティング.....	61
2.2.20	F-Actin の動態観察.....	63
2.2.21	共焦点レーザー顕微鏡による複合体の局在観察.....	64
2.2.22	細胞膜透過化処理.....	65
2.2.23	データの取り扱いおよび統計処理.....	66
2.3	実験結果および考察.....	67
2.3.1	キャラクタリゼーション.....	67
2.3.1.1	アガロースゲル電気泳動による複合体の形成確認.....	67
2.3.1.2	粒子径およびゼータ電位.....	69
2.3.1.3	原子間力顕微鏡による複合体の形態観察.....	73
2.3.1.4	DNase I 耐性評価.....	74
2.3.1.5	ウシ血清アルブミンによる凝集評価.....	76
2.3.1.6	赤血球と複合体の相互作用.....	77
2.3.1.7	滴定実験.....	79
2.3.1.8	小括.....	80
2.3.2	遺伝子発現活性の評価.....	82
2.3.2.1	トランスフェクション条件による違い.....	82
2.3.2.2	細胞毒性評価.....	90
2.3.2.3	小括.....	91
2.3.3	細胞内への取り込み過程および細胞内動態の解析.....	93

2.3.3.1	エンドサイトーシス過程	93
2.3.3.2	細胞内輸送経路.....	110
2.3.3.3	小括.....	125
2.3.4	総括	126
2.4	参考文献	127
第3章 凍結乾燥製剤への応用と <i>in vivo</i> での遺伝子導入.....		132
3.1	緒言	132
3.1.1	凍結乾燥製剤	132
3.1.2	ガンの遺伝子治療.....	133
3.1.3	本章について	134
3.2	実験方法	135
3.2.1	材料	135
3.2.2	複合体の作製.....	136
3.2.3	複合体の保存条件および再溶解	136
3.2.4	アガロースゲル電気泳動.....	136
3.2.5	粒子径およびゼータ電位測定.....	136
3.2.6	原子間力顕微鏡による複合体の形態観察.....	137
3.2.7	キトサナーゼ処理による複合体の解離	137
3.2.8	細胞培養	137
3.2.9	トランスフェクション.....	137
3.2.10	ルシフェラーゼ遺伝子発現活性の定量	137
3.2.11	複合体の細胞毒性または細胞増殖抑制効果の評価	138
3.2.12	ウェスタンブロッティング	138
3.2.13	<i>In vitro</i> 細胞増殖抑制アッセイ	138
3.2.14	自殺遺伝子治療実験	139
3.2.14.1	Huh-7 細胞皮下投与マウスモデルの作製	139
3.2.14.2	複合体溶液および GCV 溶液の調製	139
3.2.14.3	マウスへの pDNA 複合体と GCV の投与.....	139
3.2.14.4	腫瘍サイズの測定及び計算方法	140
3.2.14.5	病理組織学的検査.....	140
3.2.15	<i>In vivo</i> での β -ガラクトシダーゼアッセイ	141
3.2.15.1	Huh-7 細胞皮下投与マウスモデルの作製	141

3.2.15.2	pDNA 複合体の投与.....	141
3.2.15.3	組織切片の作成.....	141
3.2.15.4	β -ガラクトシダーゼ染色.....	142
3.2.16	動物実験倫理規定.....	142
3.2.17	データの取り扱いおよび統計処理.....	142
3.3	結果および考察	143
3.3.1	<i>In vitro</i> での保存条件の検討.....	143
3.3.1.1	保存した pDNA 複合体のキャラクタリゼーション	143
3.3.1.2	凍結乾燥-再水和後の pDNA 複合体溶液の DNA 濃度測定	148
3.3.1.3	アガロースゲル電気泳動による pDNA の状態の解析.....	150
3.3.2	自殺遺伝子治療による抗腫瘍活性の検討.....	157
3.3.2.1	<i>In vitro</i> での細胞増殖抑制効果の検討	157
3.3.2.2	腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療	161
3.3.3	総括	170
3.4	参考文献	171
第 4 章	pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の転写および翻訳効率	174
4.1	緒言	174
4.2	実験方法	175
4.2.1	材料	175
4.2.2	複合体の作製	175
4.2.3	YOYO-1 pDNA 複合体を用いた蛍光消光アッセイ	176
4.2.4	細胞培養	176
4.2.5	トランスフェクション	176
4.2.6	トランスフェクション後の細胞の回収	176
4.2.7	核の単離	177
4.2.8	Total DNA の抽出・精製	177
4.2.9	Total RNA の抽出・精製	178
4.2.10	リアルタイム PCR	179
4.2.11	転写および翻訳効率の算出	183
4.2.12	データの取り扱いおよび統計処理.....	183
4.3	結果および考察	184

4.3.1	YOYO-1 pDNA 複合体を用いた蛍光消光アッセイ	184
4.3.2	細胞内および核内の pLuc 量.....	186
4.3.3	<i>Luciferase</i> mRNA の発現解析.....	189
4.3.4	転写・翻訳効率	191
4.4	総括	193
4.5	参考文献	194
第 5 章	結論	196
発表論文.....		201
本論文に関する学会発表.....		202
その他関連する学会発表.....		205

第1章 序論

1.1 遺伝子治療

遺伝子治療は、疾患の原因となる異常を遺伝子レベルで修復・正常化することで、根源的な治療を目指した医学療法である。先天性な遺伝子欠損症のみならず、癌やウイルス感染症などの難治性疾患に対する画期的な治療法として実現が期待されている。1970年代後半の分子生物学の急速な進歩をきっかけとし、レトロウイルスベクターを中心としたウイルスベクターが開発され、現在の遺伝子治療臨床研究の幕が開けられた。以下のFig. 1-1に年別の臨床プロトコール承認件数の推移を示す。

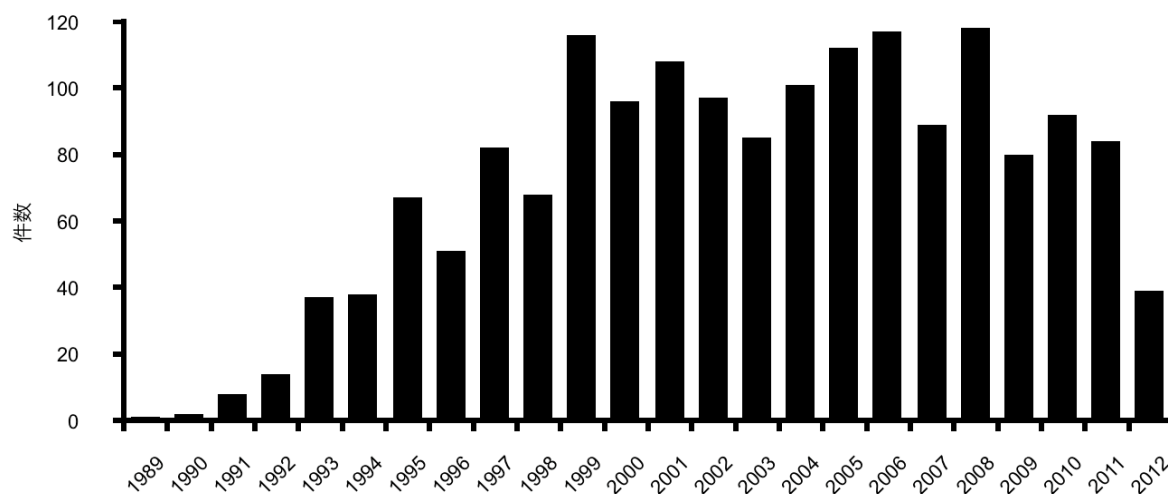


Fig. 1-1 遺伝子治療の現状：臨床プロトコール承認件数の推移[1]

1980年代からは、多くのヒト疾患関連遺伝子が同定され、それらの遺伝子クローニング技術も急速に研究が推進した。また、ウイルスベクターや非ウイルス

ベクターによる多種の遺伝子導入法が開発され、それを発端とし多くの基礎研究成果が報告されるようになった[2]。1990年には、アメリカ国立衛生研究所(NIH)において2名のアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症患者リンパ球へのADA遺伝子導入自家リンパ球の投与がBlaese博士らによって行われた[3]。現在までに400例以上の遺伝子治療が世界中で実施され、先天性遺伝子疾患だけでなく、悪性腫瘍や感染症といった疾患も対象として臨床研究が試みられている[4]。Fig. 1-2に国別でみた臨床プロトコル件数、Fig. 1-3に臨床試験の開発状況、Fig. 1-4に世界で臨床試験が行われた遺伝子治療対象疾患について示す。遺伝子治療の臨床プロトコル承認件数は、アメリカ合衆国において圧倒的に多く(65%)、次いでヨーロッパ(28%)、アジア(4%)の順である。開発状況に関しては、第一相臨床試験が最も多く(61%)、第二相・第三相と進むにつれ件数は一挙に減少している。開発後期に進む例も見受けられるようにはなってきたが、日米欧において2013年現在では医薬品として承認されたものは未だない。遺伝子治療の対象疾患としては、癌が6割以上を占め、次いで単一遺伝子疾患、循環器疾患、感染性疾患である。治療法が未だに確立されていない難治性疾患の治療に向けた研究が広く遂行されている。日本では、1995年に北海道大学医学部小児科のグループによりADA欠損症患者に対して初めて遺伝子治療臨床研究が開始され、これを機に基礎・臨床研究が本格化してきた。これまでに日本において実施された遺伝子治療の一覧をTable 1-1に示す。

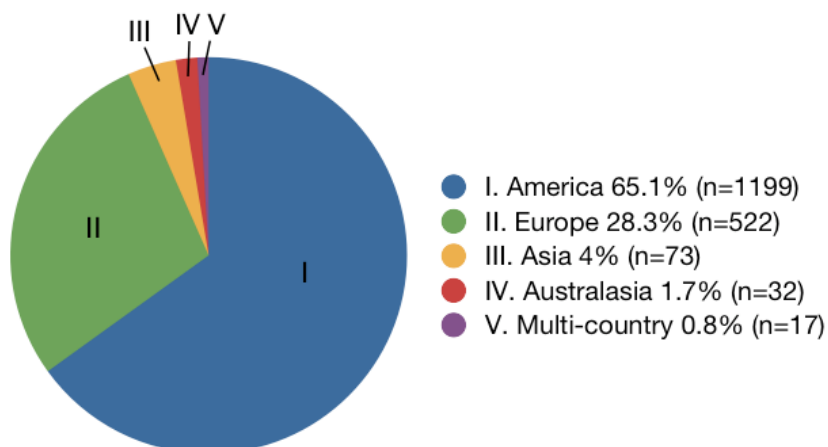


Fig. 1-2 国別でみた臨床プロトコール承認件数[1]

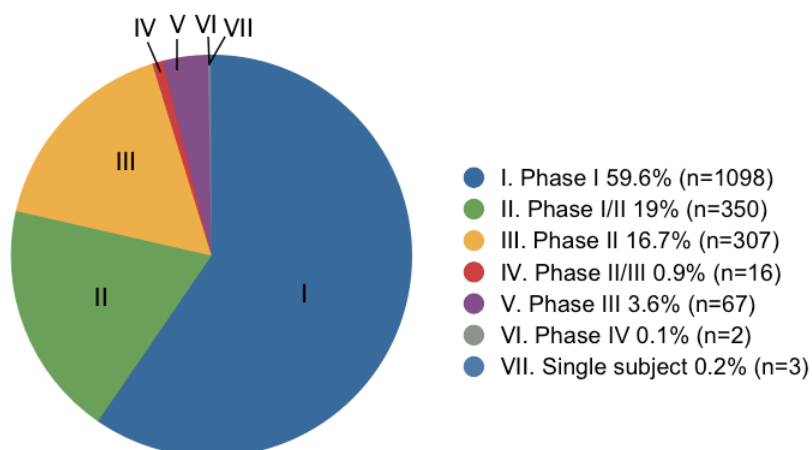


Fig. 1-3 遺伝子治療の臨床試験の開発状況[1]

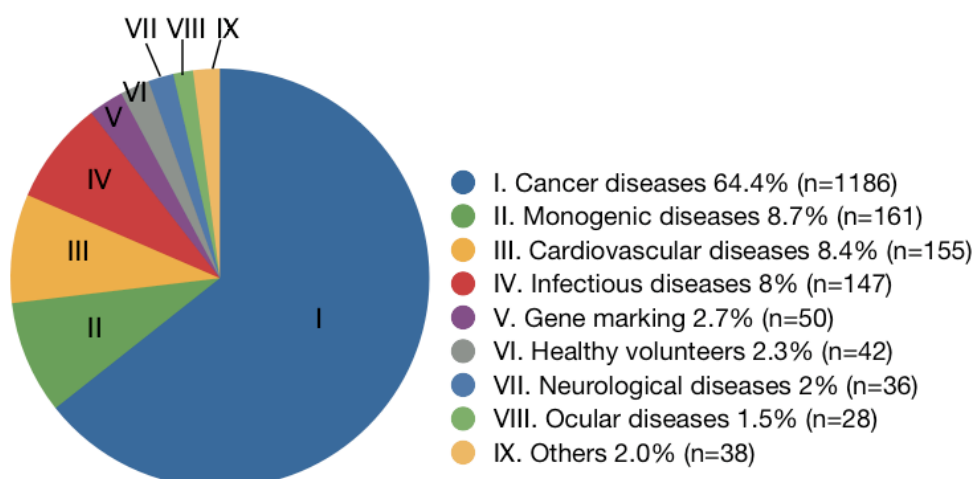


Fig. 1-4 遺伝子治療の対象疾患[1]

Table 1-1 日本で行われた遺伝子治療例

実施承認年	実施施設(病院・企業名)	対象疾患	導入遺伝子	ベクターの種類/導入方法	実施症例数(予定症例数)
1995	北海道大学医学部附属病院	ADA欠損症 [免疫不全症]	ADA	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者T細胞)	1[終了]
1997	ミドリ十字	HIV感染症	HIV env/rev	レトロウイルスベクター/in vivo(筋注)	0(4) [開始前に中止]
1998	東京大学医学部研究所附属病院	腎がん	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者腎がん細胞)	4(4)
	岡山大学医学部附属病院	非小細胞肺癌	正常型p53	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	9[終了]
	東京医科大学病院				3[終了]
	東北大学医学部附属病院				2[終了]
東京慈恵会医科大学附属病院	1[終了]				
2000	名古屋大学医学部附属病院	悪性グリオーマ	インターフェロンβ	正電荷リボソーム/in vivo(がん組織局所投与)	5(25)
	癌研究会附属病院/同癌化学療法センター	乳がん	多剤耐性遺伝子MDRI	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者造血幹細胞)	3(10)
	千葉大学医学部附属病院	進行食道がん	正常型p53	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	10(10) [終了]
	岡山大学医学部附属病院	前立腺がん	ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	9(9) [終了]
2001	大阪大学医学部附属病院	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー症	肝細胞増殖因子	プラスミドベクター/in vivo(大腿部筋肉内投与)	22(22) [終了]
2002	筑波大学附属病院	再発性白血病	HSV-tk/低親和性神経成長因子受容体膜貫通領域および細胞外領域	レトロウイルスベクター/ex vivo(ドナー末梢血単核球)	実施中(10)
	東京慈恵会医科大学附属病院	神経芽種	インターロイキン-2/リンフォタクチン	アデノウイルスベクター/in vivo(患者神経芽種細胞)	0(6) [開始前に中止]
	北海道大学医学部附属病院	ADA欠損症	ADA	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者造血幹細胞)	2(4)
	東北大学医学部附属病院	X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)	サイトカイン共通受容体γc鎖	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者造血幹細胞)	(5) [開始前に中止]
2003	神戸大学医学部附属病院	前立腺がん	HSV-tk	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	6(6) [終了]
	信州大学医学部附属病院	悪性黒色腫	インターフェロンβ	正電荷リボソーム/in vivo(がん組織局所等)	5(5) [終了]
	アンジェスMG	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー症	HGF	プラスミドベクター/in vivo(大腿部筋肉内投与)	41 [終了] 9 [終了]
2006	九州大学病院	閉塞性動脈硬化症/パージャヤー症	線維芽細胞増殖因子-2	センダイウイルスベクター/in vivo(大腿～下腿部筋肉内投与)	12[終了]
	自治医科大学	進行期パーキンソン病	ヒト芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素	アデノ随伴ウイルスベクター/in vivo(線条体内定位脳手術の注入)	6(6) [終了]
2007	北里大学	前立腺がん	HSV-tk	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	実施中3(最大25)
	タカラバイオ	再発性白血病	HSV-tk/deltaLNGFP	レトロウイルスベクター/ex vivo(ドナー末梢血単核球)	実施中1(9)
2008	岡山大学	前立腺がん	インターロイキン-12	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	6(標準21,最大36)
2009	東京大学医学部附属病院	進行性膠芽腫	β-ガラクトシダーゼ	遺伝子組み換え単純ヘルペスウイルスG47Δ/in vivo(定位的腫瘍内直接投与)	実施中(標準21,最大30)
	国立がんセンター中央病院	造血器悪性腫瘍	HSV-tk/deltaLNGFP	レトロウイルスベクター/ex vivo(ドナー末梢血単核球)	実施中(標準10,最小5)
	三重大学医学部附属病院	食道がん	MAGE-A4抗原特異的T細胞受容体α鎖及びβ鎖	レトロウイルスベクター/ex vivo(患者末梢血Tリンパ球)	実施中(標準9,最大18)
	京都府立医科大学附属病院	腎細胞がん	インターフェロンβ	正電荷リボソーム/in vivo(がん組織局所投与)	実施中(5)
2010	岡山大学病院	前立腺がん	がん抑制因子REIC/Dkk-3	アデノウイルスベクター/in vivo(がん組織局所投与)	実施中(標準24,最大36)

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部が公開情報に基づきまとめた資料より改変(2012年)

1.2 遺伝子導入方法

細胞内への遺伝子導入方法には、患者の細胞を取り出したうえで遺伝子を導入し、再度その細胞を患者体内に戻す「*ex vivo*法」と、体内に直接遺伝子を導入する「*in vivo*法」がある。*ex vivo*法は目的細胞のみに遺伝子を導入するのが容易であるため、初期の遺伝子治療では比較的多く用いられてきた手法である。しかしながら、このような煩雑な方法は対象患者数が多い場合には適していないため、遺伝子治療をより広く適用するためには安全な*in vivo*法の開発が不可欠であり、近年では*in vivo*法の研究が多く行われるようになってきている。

遺伝子治療技術を開発し発展させるためには、効率的に遺伝子を導入する技術を確立することが最も重要な課題となる。負帯電性の遺伝子（核酸）を細胞内に導入するためには、それを運ぶ「ベクター」の開発が必須であり、Vermaらは理想的なベクターの条件として以下に挙げる点を提唱した[5]。

- (1) 作製が容易である
- (2) 分裂細胞、非分裂細胞、どちらにも遺伝子導入が可能である
- (3) 宿主のゲノムに部位特異的に遺伝子を挿入できる
- (4) 目的の細胞種に特異的に遺伝子を導入できる
- (5) 免疫応答を引き起こさない
- (6) 遺伝子の発現量を調節できる

遺伝子を単独で生体に投与した場合、血中の核酸分解酵素等により迅速に分解されてしまうため、生体内において非常に不安定である。したがって、臨床応用の大部分は遺伝子導入システム、すなわちベクターを用いて行われている。ベクターには、大きく分けてウイルスベクターと非ウイルスベクターの2種類がある。

1.2.1 ウイルスベクター

ウイルスベクターとは、ウイルスが細胞に感染する本来の性質を利用して遺伝子導入を達成するベクターであり、遺伝子治療臨床研究で広く使用されている。Fig. 1-5に示す通り、遺伝子治療に用いられているベクターの約7割をウイルスベクターが占めている[4]。

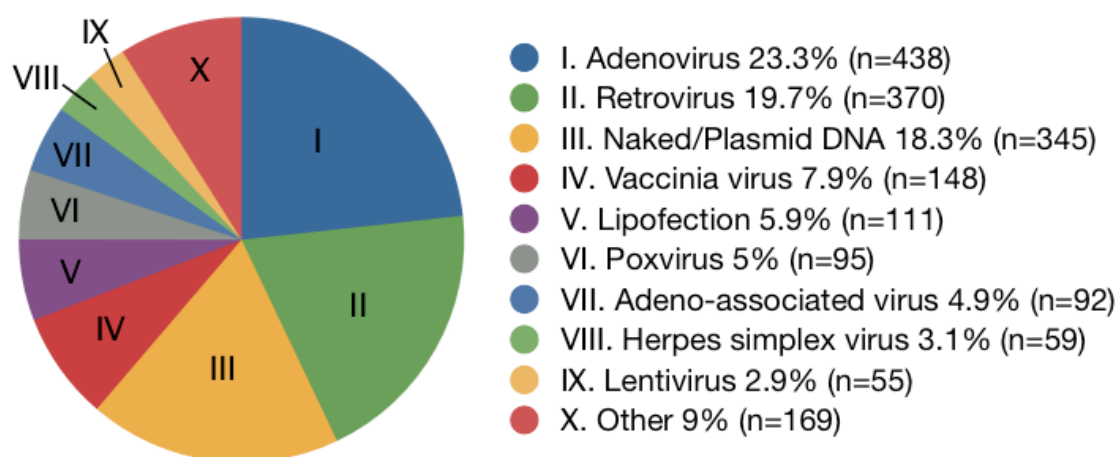


Fig. 1-5 2011 年における遺伝子治療の臨床試験のベクター別件数[4]

ウイルスベクターにはレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等、多くの種類があり、いずれも高い遺伝子導入効率を有することが実証され、第Ⅱ・Ⅲ相臨床試験まで到達している。Table 1-2にウイルスベクターの特徴をまとめた。

Table 1-2 ウイルスベクターの特徴[6]

ベクターの種類	長所	短所
レトロウイルス レンチウイルス	永続的な遺伝子発現が可能	他の遺伝子発現へ影響を及ぼす可能性がある
アデノウイルス	高い遺伝子発現 高いタイトターのベクター調製が可能 非分裂細胞でも適用可能	発現が一過性である 抗原性を有する
アデノ随伴 ウイルス	長期的な遺伝子発現 非分裂細胞でも適用可能	挿入できる遺伝子サイズが小さい

しかしながら、ウイルスベクターは安全面に致命的な問題を有していることも事実であり、数多くの死亡例が報告されている。1999年、米国ペンシルバニア大学で行われた先天性代謝疾患オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症に対する遺伝子治療の例では、アデノウイルスの全身投与により患者が急性肺肝不全により死亡した。さらにフランスでは重症複合免疫不全症に対し不活性化レトロウイルスを投与したところ、白血病様の症状を引き起こした事例なども報告されている[7]。これらは、ウイルス由来の免疫応答が原因と判明した。さらに、臨床試験で最も多く使われているアデノウイルスにおいては、投与後約1週間でCTL応答（細胞傷害性T細胞の応答）を引き起こし、ウイルスが激減することが報告されており、ウイルスの連続投与は困難とされている[8]。

このようにウイルスベクターを用いた遺伝子治療では、重篤な副作用が問題視されており、遺伝子治療が「臨床研究段階」から「治療」に発展できない大きな原因となっている。治療方法の確立においては、安全性が何よりも優先されるべきことであり、今後遺伝子治療を発展させていくためにはウイルスを用いない「安全」な遺伝子導入法の開発が不可欠である。

1.2.2 非ウイルスベクター

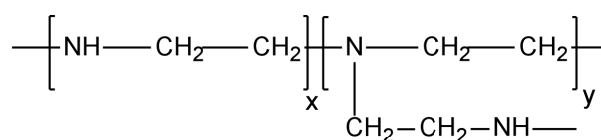
従来用いられてきたウイルスベクターは、上述したように臨床試験において数多くの死亡例が報告され、免疫原性や毒性といった深刻な問題がクローズアップされてきた。そこで、ウイルスの遺伝情報を用いない、化学物質を基本として遺伝子を導入する非ウイルスベクターが提案された。遺伝子治療の臨床応用、特に全身性投与の成否の鍵を握るのは安全性に優れ遺伝子導入効率の高い非ウイルスベクターの開発にあるといえる。代表的な非ウイルスベクターとして、カチオン性脂質、カチオン性高分子が挙げられる。

(1) カチオン性脂質

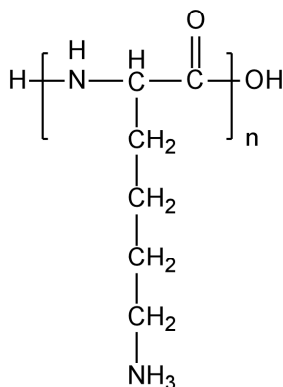
非ウイルスベクターとして最も幅広く用いられている。リン脂質の界面作用により作製したリポソーム内に核酸を封入するリポソーム型と、単に脂質との静電的相互作用により複合体を形成する非リポソーム型（リポプレックス）がある。臨床例も報告されているように非ウイルスベクターの中では高い発現効率を示す。

(2) カチオン性高分子

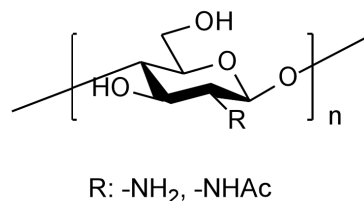
非ウイルスベクターとして利用されている代表的なカチオン性高分子化合物として、Fig. 1-6に示すように、ポリエチレンジイミン (PEI)、ポリ-L-リジン (PLL)、キトサンが挙げられる。静電的相互作用により形成されたカチオン性高分子化合物と核酸の複合体はポリプレックスと呼ばれる。様々なパラメータの改変やアクティブターゲティングのための化学修飾が容易であるため、遺伝子導入効率を向上させるための研究が広く行われている。



(a) ポリエチレンジイミン



(b) ポリ-L-リジン



(c) キトサン

Fig. 1-6 非ウイルスベクターとして使用される
代表的なカチオン性高分子化合物

一般に非ウイルスベクターによる遺伝子導入効率は、ウイルスベクターと比べて低い。しかしながら、非ウイルスベクターの利点である分子設計の容易さ

を最大限に活かせば、ウイルスベクターには不可能な機能を付与することも可能であり、細胞特異性、遺伝子発現の空間的・時間的制御能の付与、遺伝子導入効率の向上が期待される。以下のFig. 1-7に、全論文数から見たウイルスベクター、脂質ベクター、ポリマーベクターの研究動向を示す。2000年以降、代表的な非ウイルスベクターである脂質ベクターやポリマーベクターに関する研究報告は微増し続けている。

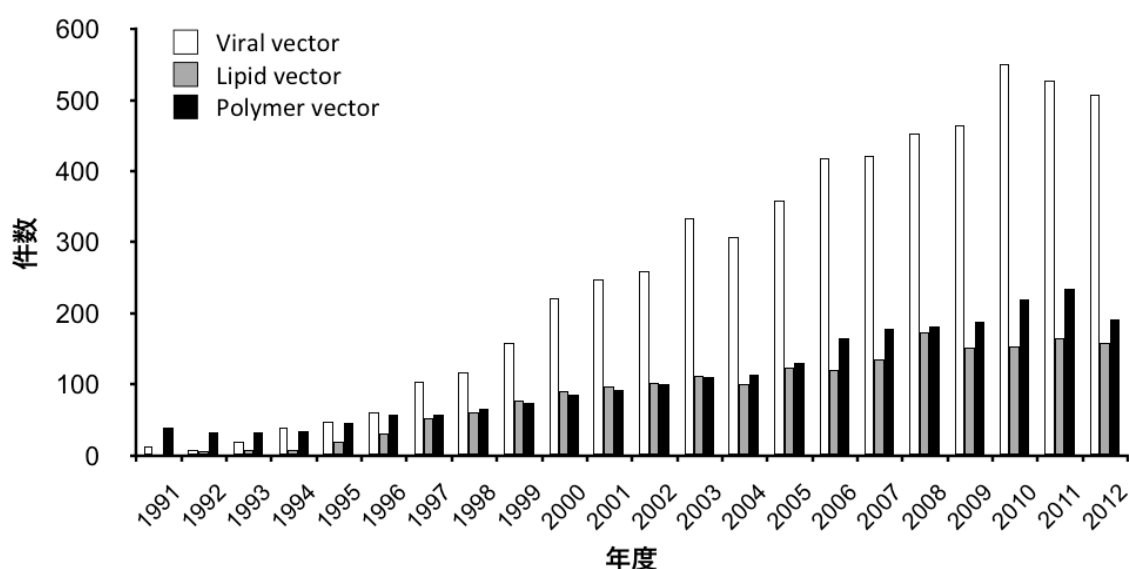


Fig. 1-7 全論文数から見たベクターの研究動向 (出典: SciFinder より集計)

1.2.3 核酸の封入

細胞内部に核酸を送達する技術に関して、天然で優れたシステムを有するのはウイルスである。ウイルスは自ら保持するRNAやDNAを凝縮して殻タンパク質内部に搭載し、目的の時間・空間でそれらを放出する。典型的なウイルス粒子においては、ウイルスRNAまたはDNAは正十二面体やカプシドと呼ばれるヘリックス状の核タンパク質複合体の内部に凝縮されている。エンベロープウイ

ルスでは、カプシドはウイルスの糖タンパク質を含む脂質二重膜に内包される。さらに、ウイルスは逆転写酵素、RNAポリメラーゼ、リン酸化・脱リン酸化酵素等のタンパク質も有し、これらが協同的に脱殻および複製の過程で重要な役割を果たす。ウイルスは細胞内に侵入した後、細胞内の空間的・時間的な環境変化を利用しながら核まで接近し、自身のRNAやDNAを核内に送り込む。このように、人工的な遺伝子キャリアー開発にあたっては、ウイルスの持つ理想的かつ効率的なシステムに学ぶべき点は多い。

人工的な化合物を用いてDNAを凝縮させることに関連した研究は、40年近く行われてきた[9,10]。真核細胞においては、DNAは生体内ポリアミンやヒストンなどのタンパク質と相互作用して高次に凝縮しクロマチンを形成している。DNAはヒストン8量体の周囲に巻きつき、ヌクレオソームコアを形成する。DNAに沿って並んだコアはクロマチンを形成し、このヒモはさらに密に凝集してスーパーコイルへ組織化される。クロマチン構造変化と遺伝子発現との関連に着目した研究も報告されており[11]、遺伝子の機能発現に高次構造が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。ウイルスがカプシド内にDNAまたはRNAを凝縮しているように、非ウイルスベクターであるカチオン高分子を用いた場合もDNAを凝縮させることが可能であり、スペルミン[12]、プロタミン[13]、ポリL-リジン[9]、多価のカチオン[14]等が利用されてきた。DNA鎖はこれらのカチオン性物質により電荷が中和されて凝縮し、さらに過剰にカチオンを加えることで正電荷を有した複合体が形成される。

DNAとして“環状・超らせん”という特徴的なトポロジーを有するプラスミドDNA (pDNA) は原始的なDNAの共通形態である。pDNAが凝縮される機構を明

らかにすることは、非ウイルスベクターによる遺伝子治療の本体として、先端医療にも直結している。長田らは、pDNA凝縮を誘起させる系として親水性セグメントとカチオン性セグメントからなるブロック共重合体（ポリエチレングリコール-ポリリジン）による高分子ミセル化を活用した[15]。これにより、pDNAの量子化折り畳み機構が見出された。pDNAはn回折り畳みによりpDNA全長の $x/2(n+1)$ で規定される長さの棒状構造に凝縮するというものである。折り畳まれたpDNAを遺伝子キャリアーとして機能させたとき、酵素分解耐性を持ちつつ、かつ転写が妨げられず、高い遺伝子発現活性を有する高性能遺伝子キャリアーとなった。このように、目的遺伝子を効率的に凝縮する機能は遺伝子キャリアーにとって必須の能力といえる。

1.3 ドラッグデリバリーシステム

ドラッグデリバリーシステム（DDS、薬物送達システム）とは、体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御し、目標とする患部（臓器や組織、細胞、病原体）に薬物を効果的かつ集中的に送達する技術である。DDSを確立することで薬剤の有効性の増強、副作用の低減、治療における利便性の向上が達成されることが期待できる[16]。近年では、バイオテクノロジーの発展によって、さまざまなペプチドやタンパク質、遺伝子をヒトの治療に応用する研究が盛んに行われており、いずれも精密な体内動態の制御を実用化の必須条件にしていることから、DDSの必要性が増してきている。以下のFig. 1-8に、DDS研究動向の年別集計データを示す。1990年代半ばからDDS研究が急激に盛んになり、その中で

も遺伝子デリバリー、タンパク質デリバリーへの適用例が一定の割合を占めることが分かる。

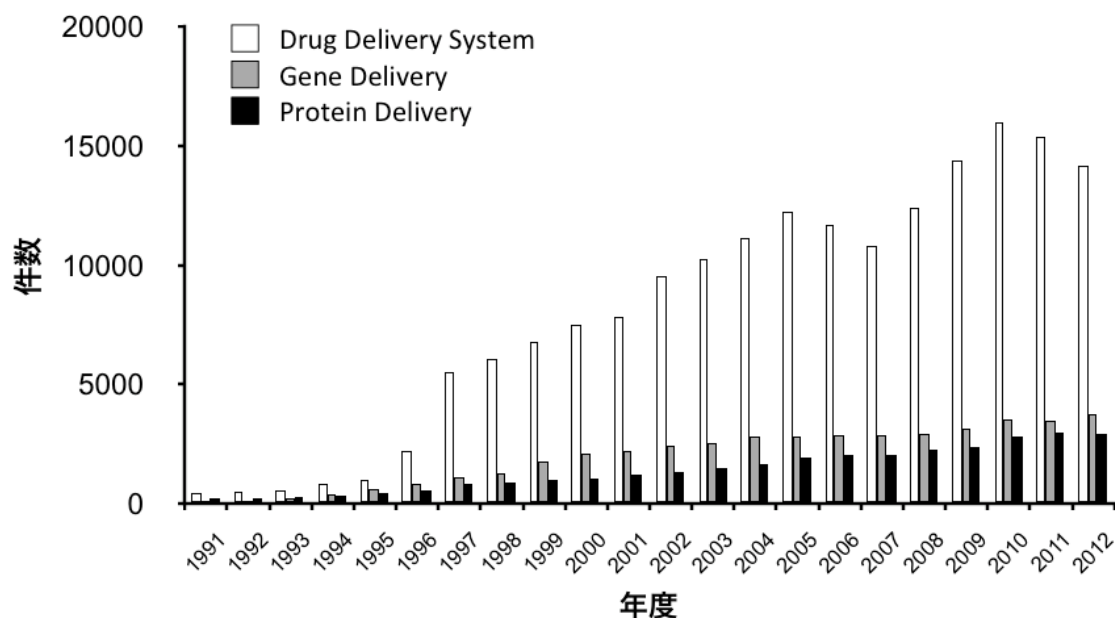


Fig. 1-8 論文数から見た DDS の研究動向 (出典: SciFinder より集計)

1.3.1 DDS と遺伝子治療

遺伝子治療は、癌などの難治性疾患に対抗可能な有力な手段として大きな期待が寄せられている。一方、治療に応用する上で最適な細胞内部位に到達させるためのデリバリー技術が確立されていない点がボトルネックとなっているのが現状である。特に、核酸は大きく負に電荷を帯びた高分子鎖であり、細胞表面の負に帯電した膜から反発を受けるために細胞内への取り込み過程が大きな障壁となる。さらに、Nakedな状態で投与した場合、血中に存在する核酸分解酵素によって速やかに分解されてしまうという問題点が深刻である。したがって、優れた治療効果を得るためには核酸を効率的に細胞質や核内に送達する技

術開発が不可欠であり、遺伝子治療に適用が可能なDDSの確立が望まれている。遺伝子デリバリーにおいては、組織レベルから細胞レベル、さらにはオルガネラレベルに到る、よりマイクロかつ緻密な薬物動態制御技術を開発する必要がある。

1.3.2 粒子サイズと体内薬剤動態

Fig. 1-9に示すように、ナノサイズの粒子を生体に投与した場合、粒子サイズによって体内動態は大きく異なり、10 μm 以上の微粒子は塞栓により肺に、10~4 μm の粒子は肺または肝臓に、4~0.2 μm の粒子はほとんどが肝臓に分布することが知られている[17]。

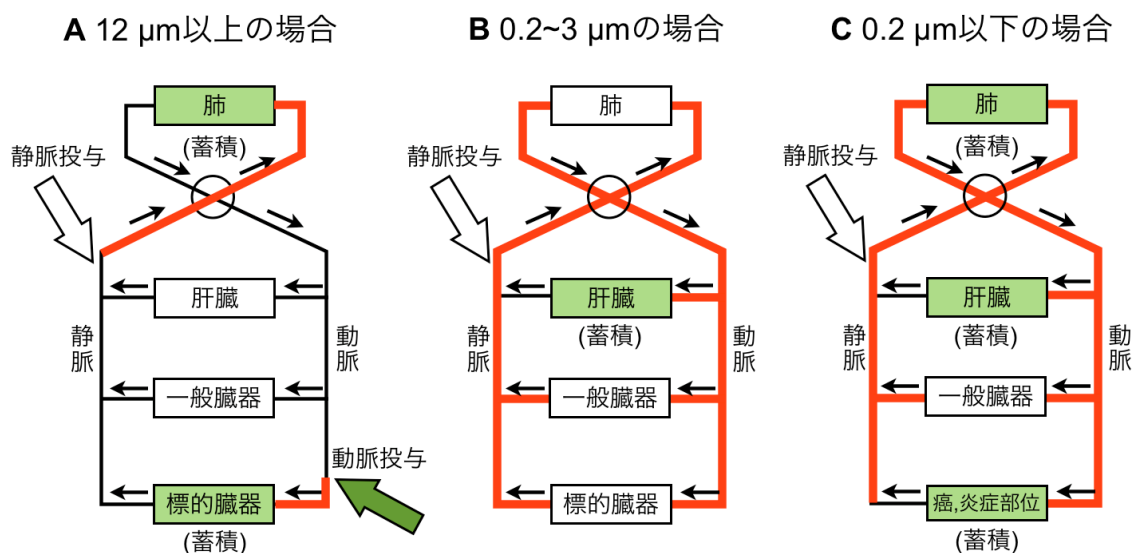


Fig. 1-9 血管内投与後の微粒子キャリアーの体内挙動と粒子サイズの関係 (文献[17]より改変)

複合体の粒子サイズは、使用する核酸およびポリカチオンの種類、またその組成比、溶媒のpHや塩強度といった様々な要素に左右されるため、作製条件に大きく依存する。つまり、使用用途に応じて粒子サイズをコントロールすることは、薬剤の送達部位を自在にコントロールすることに直結するのである。

1.3.3 遺伝子複合体の細胞内動態

上述の通り、遺伝子治療を達成するためには遺伝子複合体の体内動態だけでなく、細胞内動態を制御することも重要な技術となる。複合体が目的組織の細胞表面に送達された後、細胞内へのエンドサイトーシス過程においても粒子サイズが関与するためである。受容体介在型の被覆ピットによるエンドサイトーシスでは、直径200 nm以下の粒子はそれ以上の粒子と比較して特に効率良く細胞内に取り込まれる[18,19]。また、粒子サイズをコントロールすることで使用するエンドサイトーシス経路をコントロールすることも可能である。Laiらは、40 nmの粒子はクラスリンエンドサイトーシスで取り込まれるのに対し、25 nmの粒子はカベオラエンドサイトーシスで取り込まれることを報告している[20]。このように、粒子サイズは目的組織までの体内動態だけでなく、細胞内動態の制御にも直結する因子であり、複合体の特性を評価する上で重要なパラメータの一つとなる。

Fig. 1-10にプラスミドDNA (pDNA) による遺伝子治療効果達成に必要なステップを示す。

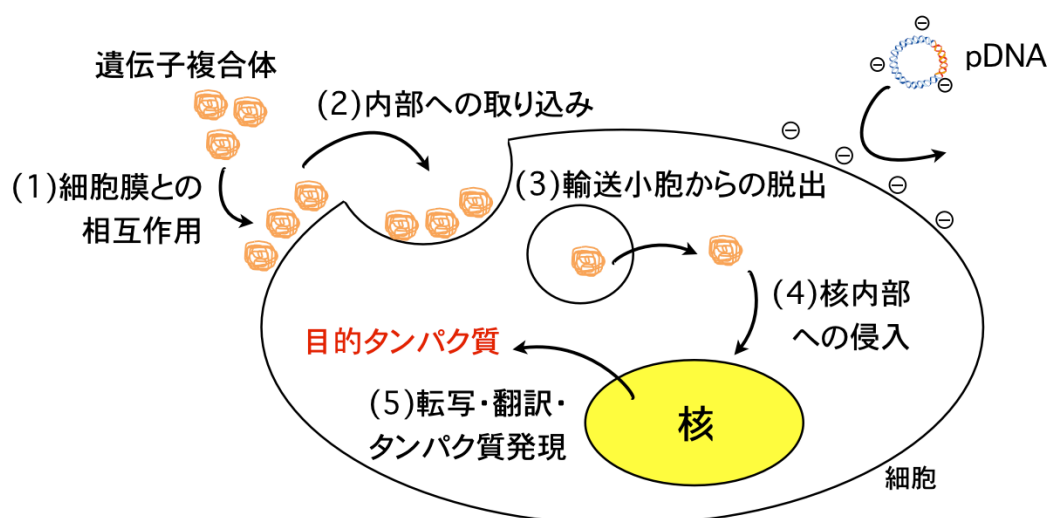


Fig. 1-10 遺伝子複合体による治療効果を得るために必要なステップ

このように、遺伝子複合体による治療効果を得るためには細胞外部および細胞内部で多段階のステップを通過しなければならない。ここでの問題点は、遺伝子複合体の動態を定量的に捉えることが困難なことであり、どのステップが遺伝子導入効率において律速段階になっているかという点が不明のまま、遺伝子複合体の開発が進んでいることである[21]。特定の細胞内部位に核酸を送達するためには、よりミクロな視点から作用機序を熟考し、細胞内動態を制御することが重要な課題となる。

1.3.4 DDS における糖鎖

糖鎖は、受精、神経細胞の発生・分化、細胞接着、ウイルス感染、癌の転移など様々な生命現象に関与していることが明らかにされ、DNA、タンパク質に続く第3の生命情報分子として、様々な研究分野において注目されている[22,23]。また、Table 1-3に示すように、糖鎖を認識するタンパク質についても、

様々な動物組織から単離され、構造や機能解析といった研究が行われている。多種多様な糖鎖の機能が明らかになるにつれ、医療分野においても糖鎖の活用が検討されてきた。癌化に伴って生体内糖鎖の構造・量が顕著に変化することはすでに知られており、これを利用した癌診断も一般的に行われている。

Table 1-3 細胞表面上の糖鎖認識を有するタンパク質[24]

タンパク質	発現する細胞	糖結合特異性
アシアロ糖タンパク質受容体	肝臓の実質細胞	ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン
マンノース受容体	マクロファージ	フコース/マンノース/N-アセチルグルコサミン
P-セレクチン	白血球	シアリル Le ^x
E-セレクチン	血管内皮細胞、血小板	シアリル Le ^x , シアリル Le ^a

糖鎖は多様な構造と性質、機能を有し、生体適合性にも優れていることから、薬剤の吸収動態の制御や放出制御といったDDS技術にも広く応用されている。一例として、多糖類でリポソームを被覆することにより、リポソームが物理化学的に安定化することが報告されている[25]。遺伝子デリバリーにおいても糖鎖は広く利用されている。非ウイルスベクターに糖鎖を修飾することでアシアロ糖タンパク質受容体やマンノース受容体を介して取り込まれ、遺伝子発現が向上することが報告されている[26,27]。受容体を介することで取り込み量が向上したと考えられているが、複合体の核膜通過や核内での転写効率といった、より詳細な遺伝子輸送メカニズムについては、明らかにされていない。

このように、糖鎖は標的指向性付与や安定化といった機能素材として多角的に利用できることが期待され、今後の非ウイルスベクターの開発において重要性を増すと考えられる。

1.4 キトサンによる遺伝子導入

1.4.1 キトサンについて

キトサンは、天然に豊富に存在するキチン (β -1,4-ポリ-N-アセチルグルコサミン) を脱アセチル化することによって得られる多糖である。キチンおよびキトサンの構造を Fig. 1-11 に示す。キチンは菌類、節足動物、軟体動物などの主要な構造多糖で、天然にセルロースに匹敵するほど存在する[28]。マウスにおけるLD50は16 g/kg以上とキトサンの細胞毒性は非常に低く[29]、また生体適合性に秀でた材料である[30]。他のカチオン性ベクターと比較し、細胞レベルでの安全性は極めて高い。MTTアッセイによる細胞生存率試験やトリパンブルー染色による細胞毒性試験で、キトサンが極めて低毒性であることが報告されている[31]。そのため、医薬品賦形剤、機能性食品、化粧品等として幅広く利用されている[32]。脱アセチル化の比率や分子量により多様な性質を示すだけでなく、様々な誘導体が合成され、新たな性質が付与されている。その応用の幅は非常に広く、近年、遺伝子導入キャリアーとして大きく注目されている[33]。

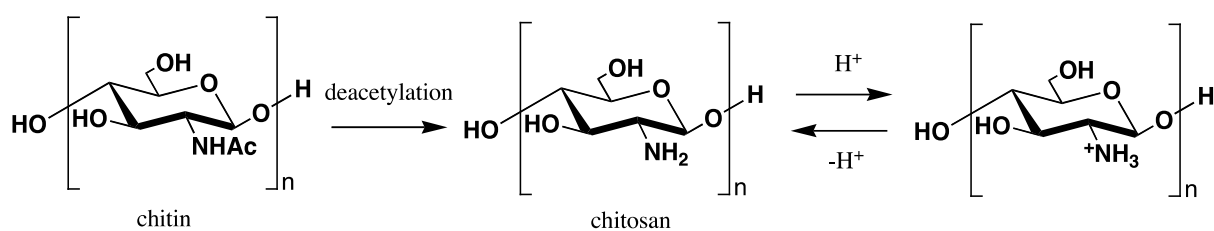


Fig. 1-11 キチン、キトサンの構造

1.4.2 非ウイルスベクターとしてのキトサン

キトサンは弱酸性水溶液中において第一級アミンが正電荷を有するため、PEIやPLLと同様に核酸と静電的な相互作用で複合体を自己形成する。Fig. 1-12に非ウイルスベクターとして利用されているカチオン性高分子の研究動向を示した。PLLは非ウイルスベクターの概念が誕生した直後から利用され始めてきたが、2002年以降は横ばいの傾向を示している。一方、キトサンについては、1995年にMumperらによってキトサンを用いた遺伝子デリバリーに関する研究成果が報告されたことを発端とし[34]、PEI、PLL、 dendroliマーと並んで研究が盛んに行われてきた。キトサンは非ウイルスベクターとして、PEIやPLLに代わる存在感を増してきている。

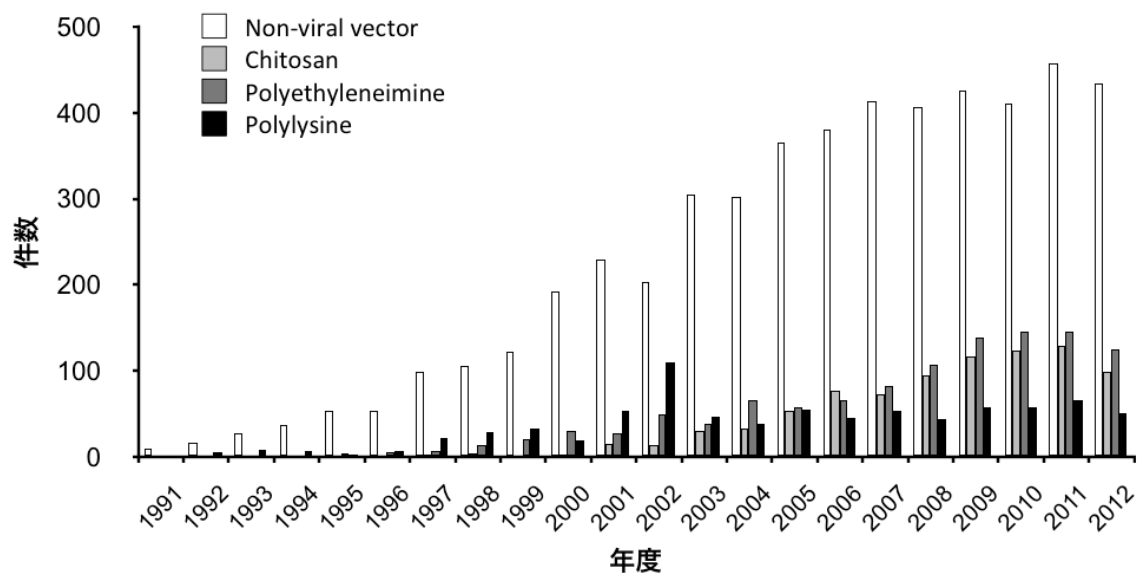


Fig. 1-12 全文献数から見たカチオン性高分子の研究動向
(出典: SciFinder より集計)

キトサンと遺伝子の結合は静電相互作用によるため、キトサンの分子量、DDA (脱アセチル化度)、N/P比 (キトサンのアミノ基と核酸のリン酸基の電荷比)、複合体形成時のpH環境に大きく依存する[35]。これらのパラメータが異なるキトサンを用いた遺伝子導入の*in vitro*での研究例をTable 1-4に、*in vivo*での研究例をTable 1-5に示す。

Table 1-4 キトサンを用いた *in vitro* での遺伝子導入 (文献[35]より改変)

キトサン	粒子径(nm)	至適N/P比	細胞種	結果	Ref.
70 kDa	50-100	3	HeLa, HepG2, NBNLCL2	トランスフェクションから24~96時間で遺伝子発現活性が増大	[36]
390 kDa	260-750	2	HeLa, HEK293, IB-3	4週間の凍結乾燥保存が可能	[37]
102 kDa	100-500	2	COS-1, NIH3T3, A549, C ₂ C ₁₂	塩または血清存在下で安定な複合体形成	[38]
162 kDa, DDA = 83%	120	3	293, HT1080, Caco-2	pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現は pDNA/PEI複合体と比較して遅延	[31]
15, 52 kDa	180	5	A549, B16, HeLa	pH 6.9、血清存在下が至適トランスフェクション条件	[39]
150, 400, 600 kDa	100	-	MG63, HEK293, MSC	MG63とMSC細胞よりもHEK293細胞の遺伝子発現活性が高い。	[40]
24-mer	100	10			
Ultra pure and high molecular weight chitosan	300	2.4 or 3	293	pDNA/キトサンオリゴマーの遺伝子発現の開始は、pDNA/高分子量キトサンよりも早い	[41]
150 kDa, DDA = 75%	40-80	5	293, CHO-K1	10日間に渡る長期的な遺伝子発現	[42]
390kDa (DDA = 60-90%)	150-200	3.3-9 (Depend on DDA)	HEK293, SW756, HeLa	<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での遺伝子導入効率にDDAが関与	[43]
10-213kDa (DDA = 88%)	160-300	6	A549	低分子量キトサンを用いた場合に粒子径が低下	[44]

Table 1-5 キトサンを用いた *in vivo* での遺伝子導入 (文献[35]より改変)

キトサン	粒子径(nm)	投与経路	遺伝子	結果	Ref.
390 kDa	150-300	経口	Dominant peanut allergen	アレルギー誘導性のアナフィラキシー反応の低下	[45]
102 kDa, DDA = 80%	100-600	経皮	Luciferase, b-gal	皮下での遺伝子発現を検知	[46]
110 kDa	300-330	鼻腔内	RSV antigen	CTLの誘導による抗ウイルス効果	[47]
-	-	鼻腔内	INF-g	気道炎症の緩和	[48]

1.4.3 特徴

(1) 分子量と脱アセチル化度

キトサンの分子量は、遺伝子/キトサン複合体の粒子径、安定性、細胞への取り込み量、遺伝子発現活性に影響を与える重要な因子である。低分子量のキトサンを用いて作製された遺伝子複合体は、高分子量のキトサンと比較し、平均粒子径が小さい粒子を形成することが報告されている[44]。一方で、オリゴマー化キトサンでは遺伝子と複合体を形成するに際して十分な結合能が得られない場合もある[49]。

Kiangらは、分子量が390 kDaのキトサンを用いた場合、遺伝子と完全に結合するためには、DDA = 90, 70, 62%でそれぞれN/P = 3.3, 5.0, 9.0必要であることを報告した[50]。これは、DDAの減少によってキトサンのカチオン性が低下したこと、また、アセチル基による立体障害が増加することで遺伝子結合能が

低下したことに起因し、完全な複合体形成には高いN/P比が必要であることを意味する[49]。このように、分子量のみならず、DDAもまた遺伝子とキトサンの複合体形成に重要なパラメータとなる。

当研究室においても、オリゴマーから分子量約500 kDaにわたる分子量と様々なDDAのキトサンを用いて、遺伝子キャリアーとしての性質が検討されてきた。キトサンを用いた遺伝子導入の特徴として、(i)血清存在下でも遺伝子導入効率が高い、(ii)他のキャリアーと比較して細胞毒性が低い、(iii)遺伝子発現の持続期間が長い、(iv)遺伝子導入効率は細胞種に依存するということがこれまでに明らかになっている。

(2) プロトンスポンジ効果

pDNA/キトサン複合体による遺伝子導入のメカニズム解析も徐々に進みつつある[51,52]。通常、非ウイルスベクターは分子量が非常に大きいため細胞膜を通過することが不可能であり、細胞内への移行にはエンドサイトーシス経路を介する。エンドサイトーシスによって取り込まれた後、エンドソーム内に封入された遺伝子複合体は、エンドソームおよびライソソーム内でpH低下に伴って酵素による分解を受ける。遺伝子発現に寄与するものは、エンドソーム内での分解を回避し、核内で転写、細胞質で翻訳を受けたごく一部である[53]。つまり、生体投与後の体内動態だけでなく、細胞内部での動態も非ウイルスベクターによる遺伝子デリバリーの大きな障壁となっている。一方、キトサン[54]やポリエチレンイミン[55,56]はこの点を克服するための特徴を有していることが提唱されている。キトサンのアミノ基はエンドソーム内環境のpH 5.0~6.5において緩

衝効果を持つため、エンドソームのpH低下の過程で過剰なプロトンの流入を引き起こす。これにより、エンドソーム内には対イオンや水も流入し、エンドソームは膨張して破裂する。これは、1985年にBoussifらが提唱したプロトンスポンジ効果と呼ばれるものである。キトサンが非ウイルスベクターとして注目されるようになったのは、この効果によってエンドソームから脱出する能力を有していることが大きい。

このような特徴からキトサンによる遺伝子デリバリーは*in vitro*では効率的に達成できるものの、*in vivo*での使用においてはさらなる改良が必要である。複合体粒子が正電荷を帯びているため、細胞と静電的に非特異的相互作用することにより、細胞特異的な遺伝子デリバリーは達成できない。さらに、血中タンパク質との相互作用によって凝集体を形成してしまうことも大きな問題点である。

(3) ゼータ電位

溶液中における複合体の表面電荷は、界面動電電位、すなわちゼータ電位として測定できる。複合体の細胞内取り込み過程では、正電荷を有する複合体は負電荷を有する細胞表面へ吸着し、細胞に取り込まれやすくなる[57]。一方、静電的相互作用による取り込みでは、細胞特異的な遺伝子デリバリーは達成されない。正帯電性のpDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子であるヒアルロン酸で被覆した三元複合体は負に帯電する。細胞膜表面との静電相互作用による非特異的な吸着を抑制し、同時に細胞膜表面受容体を介した特異的な遺伝子デリバリーが達成された[72]。ゼータ電位の絶対値が小さい複合体は溶液中で凝集

体を形成しやすいが、絶対値が大きい場合には静電的な反発力により、形成しにくくなることが知られている。このように、ゼータ電位は複合体の溶液分散度や凝集性、他の分子との相互作用、粒子表面の特徴を評価する上で有益な指標となるだけでなく、細胞との相互作用過程においても重要な役割を果たす。

(4) 粒子形態

Fig. 1-13に、高分子複合体における代表的な粒子形態の三例を示す。

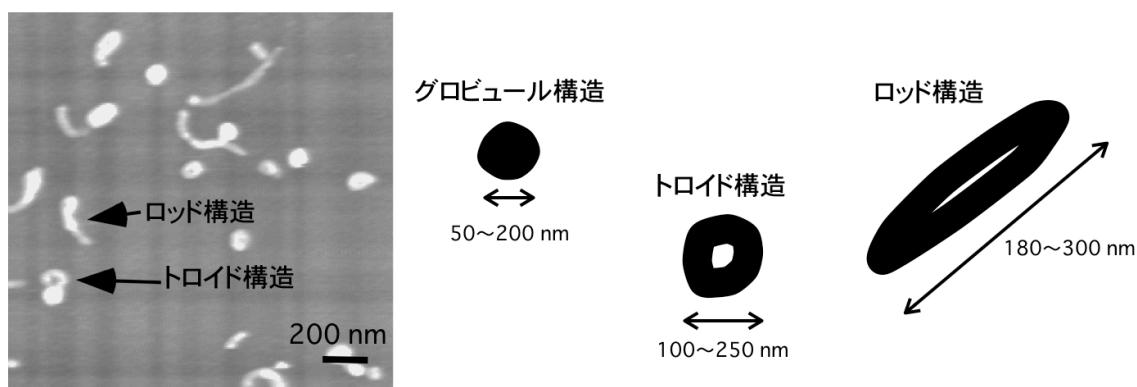


Fig. 1-13 pDNA 複合体の様々な粒子形態

粒子形態が複合体の安定性を左右する例もある。複合体のサイズが同程度であっても、グローブ構造（球状）の複合体は、トロイド（ドーナツ状）やロッド状（棒状）のものと比較し、核酸分解酵素に対するpDNAの保護能力が高くなることが報告されている[15,51]。その他にも、粒子形態は細胞との親和性・取り込み・遺伝子発現にも影響する重要な要素であることが指摘されている[58]。

キトサンを遺伝子キャリアーとして用いる場合、その分子量・脱アセチル化度の違いにより、形成される粒子形態は大きく異なるため、溶液中での安定性および分散性に優れた球状構造の粒子を形成させることが望ましい。

(5) 血清タンパク質との相互作用

遺伝子複合体を生体に投与にする場合、局所投与、筋肉注射、皮下注射、経口投与、静脈投与といった様々な方法があるが、いずれの場合においても目的部位に到達する前に様々な分子と遭遇する。細胞内に取り込まれた後も、細胞内に存在するタンパク質やオルガネラと相互作用することになる。細胞質内は高濃度にタンパク質が含まれ、細胞質内動態が遺伝子導入効率に影響する[59]。

多くの非ウイルスベクターによる遺伝子導入の場合、血清存在下ではその効率が著しく低下する。血清タンパク質と遺伝子複合体が相互作用することにより、イオン交換反応で複合体から核酸が解離したり、タンパク質と複合体の凝集体が形成したりすることが原因と考えられている。また、水溶性に乏しい遺伝子複合体の場合は、*in vivo*において血清タンパク質によりオプソニン化され、静脈投与から数分でマクロファージにより血中から排除されてしまう[60]。

pDNA単独およびpDNA/ポリ-L-リジン複合体をマウスの尾静脈から投与した場合、投与後5分で血中濃度が30%まで低下し、肝臓に集積することが報告されている[61]。静脈投与されたpDNA/キトサン複合体についても主に肝臓、腎臓、肺に集積することが報告されている[54,62]。このように血中タンパク質との相互作用は遺伝子複合体にとって不可避であり、これらの分子との予期せぬ相互作用を極力低減させる必要がある。

1.5 改良のためのアプローチ

遺伝子複合体を *in vivo* で投与した後、細網内皮系組織 (RES, Reticuloendothelial system) による貪食から免れ、細胞特異的に輸送されることが好ましい。非ウイルスベクターによる遺伝子デリバリーにおいては、血清タンパク質などの血液中に存在するタンパク質といった巨大分子との相互作用がベクターの性質に大きな影響を与える。この問題を解決するために、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾法が広く研究されてきた。PEG で複合体を被覆することでベクターの抗原性を低減し、循環系における安定性や滞留性を増大させ、生体内での半減期を伸ばすことが可能である[63]。本手法は、PEG 化インターフェロンを代表例としてタンパク質製剤にも広く適用されている。非ウイルスベクターである PEI を PEG 修飾した場合、複合体の凝集や血清タンパク質との相互作用が抑制され、*in vivo* において遺伝子発現が有意に上昇したことが報告されている[4]。当研究室において橋本や神谷らは、側鎖にカルボキシル基を持つ PEG 誘導体 (PEG-C) で pDNA/キトサン複合体を被覆した pDNA/キトサン/PEG-C 三元複合体を開発した。これは pDNA/キトサン複合体と比較し、自己凝集や血清モデルタンパク質として BSA による凝集が抑制されることを実証した[64]。また、PEG-C のカルボキシル基末端に糖を修飾した糖修飾 PEG-C を用いることで糖鎖認識を介した細胞特異性を付与することも可能である[64]。

ベクターに細胞特異性を付与する方法として、ベクターへの化学修飾が有用である。化学修飾にはトランスフェリンや抗体、また Table 1-3 に示した糖類を

活用し、いずれもこれらをリガンドとするレセプターを高発現している細胞への特異的な輸送を目指したものである[65-70]。

さらに、糖修飾によって細胞表面受容体特異的な遺伝子導入が検討されている。橋本はキトサンにマンノースおよびラクトースを修飾することによって、マンノース受容体を介したマクロファージへの遺伝子導入およびラクトース受容体を介した肝癌細胞への特異的な遺伝子導入を行い、その遺伝子発現機構の解析を行った[51,71]。キトサンを用いた遺伝子デリバリーに関し、従来の研究手法と改良された手法の概念図をFig. 1-14に示す。

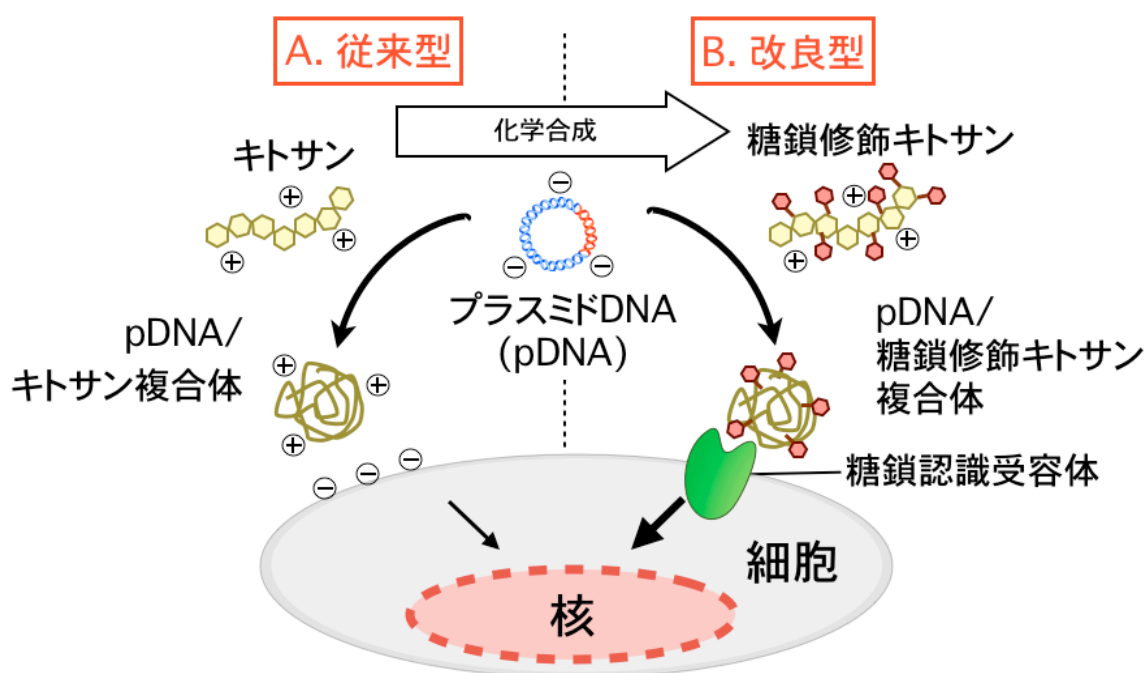


Fig. 1-14 pDNA/キトサン複合体による遺伝子デリバリーの概念図
細胞特異的な遺伝子デリバリーを達成するために、細胞表面受容体の糖鎖認識能を利用する方法が確立された。

これまで、非ウイルスベクターの改良のアプローチとして、高分子の糖鎖修飾による細胞特異性の付与、三元複合体化による安定性の向上という二点の戦略について述べた。これらのハイブリッド型として、静電的相互作用により糖修飾PEG-CでpDNA/キトサン複合体を被覆した、pDNA/キトサン/糖修飾PEG-C三元複合体が開発された。この三元複合体は、*in vitro*および*in vivo*において高い遺伝子導入効率と細胞特異性を有していることが実証された[64]。腫瘍形成マウスモデルでの自殺遺伝子治療実験の結果、自殺遺伝子をコードしたpDNA/キトサン/ラクトース修飾PEG-C三元複合体およびプロドラッグであるガンシクロビル (GCV) の併用で高い抗腫瘍効果が得られた[72]。他の例として、pDNA/キトサン複合体をヒアルロン酸で被覆した場合、CD44を介した受容体特異的な遺伝子デリバリーが達成され、さらに複合体の保存安定性が向上することが実証された[72]。ヒアルロン酸もキトサン同様に生体由来の糖鎖であり、溶液中で混合するのみでpDNA/キトサン/ヒアルロン酸三元複合体を作製できることは大きな利点である。糖鎖以外にもポリアミノ酸を活用した例もある。pDNA/キトサン複合体をポリγ-グルタミン酸で被覆した三元複合体は、細胞への取り込み量が増加し、さらに細胞特異的が付与されたことが報告されている[73,74]。溶液中で各素材を混合するのみで、表面に糖鎖を提示した安定な複合体を容易に作製できるという本方式は、遺伝子複合体の改良方法として非常に有益であり、これを利用した研究はpDNA/PEI複合体でも数多く報告されている[75]。このように、pDNA複合体を改良する方法として、様々なアプローチが検討されてきた。

1.6 本研究について

本研究では、pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子であるコンドロイチン硫酸で被覆し、物理化学的な安定性と遺伝子発現活性の向上を目指したpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を開発した。三元複合体形成の概念図を Fig. 1-15 に示した。

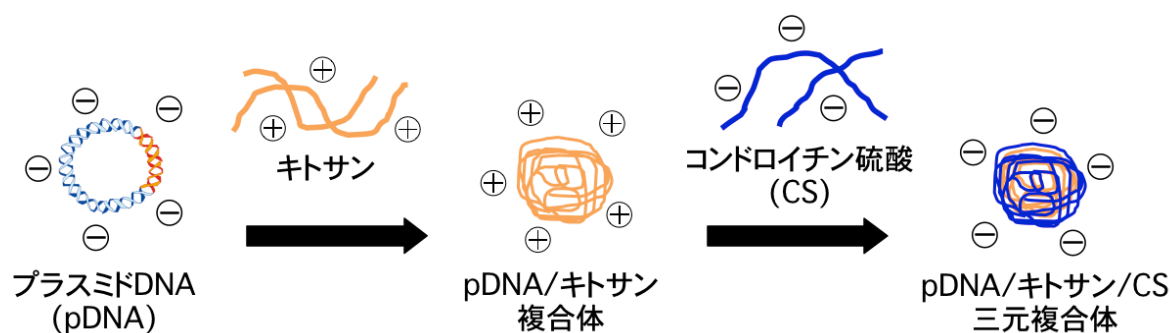


Fig. 1-15 pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体形成の概念図

1.6.1 コンドロイチン硫酸について

コンドロイチン硫酸は、ヘパラン硫酸と双璧をなす代表的な硫酸化グリコサミノグリカンであり、様々なコアタンパク質に共有結合したプロテオグリカンとして組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。

Fig. 1-16に示すように、D-グルクロン酸 (GlcA) とN-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) の二糖が数十回交互に反復する糖鎖に硫酸基が結合した直鎖状の基本骨格構造をとる。同図におけるRは、硫酸化されうる部位を示す。生合成過程において基質特異性の異なる複数の硫酸基転移酵素の作用により、主に

GlcA残基の2位やGalNAc残基の4位または6位で硫酸化修飾をうける[76]。したがって、由来となる生物種や部位によってグルクロン酸のエピ化の有無や硫酸基結合部位に大きな違いが生じ、著しい多様性が生じる。

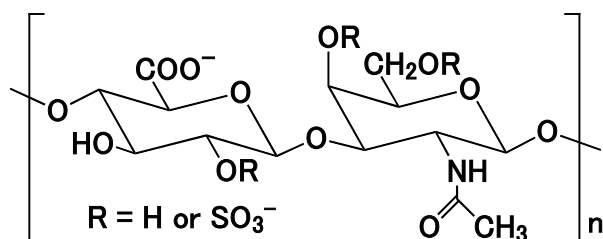


Fig. 1-16 コンドロイチン硫酸の構造

コンドロイチン硫酸は多様な構造を有することから、細胞接着・細胞内シグナル・細胞外マトリックスと細胞の認識および結合といった機能を制御する重要な要素となる[77]。特に、哺乳類の脳における神経細胞の複雑なネットワーク形成にコンドロイチン硫酸の構造多様性が密接に関与することが発見され、神経細胞との関連性に着目した研究が盛んに推進されている。神経系の発達や再生過程で神経の軸索誘導や再生を阻害する分子として振る舞う一方、神経突起の伸長を促進する分子としての一面をも併せもつという矛盾は、その構造多様性に起因することが指摘されている[78,79]。コンドロイチン硫酸認識受容体として、種々の腫瘍細胞表面に過剰発現しているCD44のバリエーションと親和性が高いことも知られ[80,81]、コンドロイチン硫酸を用いたドラッグデリバリーはこのような細胞表面受容体を介した特異性が付与されることが期待される。

1.6.2 目的

分子量および硫酸化度の異なる種々のコンドロイチン硫酸を用いて、被覆に適したコンドロイチン硫酸種を明確にし、pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の組成比および作製条件の最適化を行う。また、複合体の粒子径・表面電荷・粒子形態・血中での安定性といった物理化学的な性質を踏まえた上で、細胞 (*in vitro*) および生体組織 (*in vivo*) への高効率な遺伝子導入を目指す。さらに、コンドロイチン硫酸による被覆が複合体の細胞内動態に及ぼす影響、遺伝子複合体としての保存安定性を検討することで、遺伝子デリバリーシステムの開発にコンドロイチン硫酸を活用することの理学的かつ工学的意義を明らかにする。

1.6.3 研究意義

生命現象の理解とともに遺伝子治療の可能性は広がりつつあるが、遺伝子を細胞に安全で効率良く導入する技術が未だ確立されていないことから、一般的な治療法としては普及していない。安全面での問題が懸念されるウイルスベクターと比較し、非ウイルスベクターは遺伝子導入効率の低さを除いて、多くの利点を有する。非ウイルスベクターは、導入する遺伝子のサイズに特に制限がなく、化学的な修飾により様々な性質を付与することが可能である。分子設計次第では繰り返し投与可能な非ウイルスベクターも実現できるだろう。これまで様々な遺伝子キャリアーが提案されてきたが、その中でも特に天然由来のキトサンは生体親和性に優れ低毒性という重要かつ必須な性質を備えている。キトサンを基にした新たな非ウイルスベクターを開発することは、遺伝子治療の

実用化に向けて有益な知見の一つになると期待され、遺伝子デリバリーシステムの発展に大きく寄与することが期待される。

1.7 本論文の構成

第1章 本研究の背景と意義について述べた。

第2章 pDNA/キトサン複合体と、分子量および硫酸化度の異なるコンドロイチン硫酸によって被覆されたpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の物理化学的キャラクタリゼーションを行った。種々の細胞株に遺伝子導入を行い、遺伝子発現活性と細胞内取り込み量を評価した。至適と見出されたコンドロイチン硫酸によって形成された三元複合体の細胞内輸送経路を解析した。

第3章 三元複合体を凍結乾燥再水和型製剤に応用し、pDNAの安定性試験、粒子の形態学的変化、遺伝子発現活性の変動といった観点の評価した。さらに、腫瘍形成マウスモデルにおいて自殺遺伝子治療実験を行い、抗腫瘍効果について検討した。

第4章 pDNA/キトサン複合体と三元複合体の凝縮度という形態学的特徴の違いが、核内での転写効率に及ぼす影響に調べた。さらに、リアルタイムPCRを用いて三元複合体の細胞内動態の定量的解析を行ない、複合体の転写および翻訳効率を評価した。

第5章 本研究で得られた知見を総括した。

1.8 参考文献

- [1] Willey 社 J.Gene.Med. 公開統計資料 “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide” (2012) [<http://www.wiley.co.uk/genemed/clinical>]
- [2] 谷憲三郎, 浅野茂隆 編, 遺伝子治療の新展開, 羊土社 (2001)
- [3] R.M. Blease, K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, et al., T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years., *Science* 270, 475-480 (1995).
- [4] M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, R.M. Edelstein, Gene therapy clinical trials world wide 1989-2004-an overview., *J. Gene Med.* 6, 597-602 (2004).
- [5] I.M. Verma, N. Somia, Gene therapy-promises, problems and prospects., *Nature* 389, 239-242 (1997).
- [6] 鐘ヶ江裕美, 斎藤泉, 村松正寛 他, “アデノウイルスを用いた遺伝子発現” 新遺伝子工学ハンドブック, 羊土社 (1997).
- [7] J. Kaiser, Gene therapy. Panel urges limits on X-SCID trials., *Science* 307, 1544-1545 (2005).
- [8] The EGST 12th Annual Congress Education Session.
- [9] Y.M. Evdokimov, A.L. Platonov, A.S. Tikhonenko, Y.M. Varshavsky, A compact form of double-stranded DNA in solution., *FEBS Lett.* 23, 180-184 (1972).
- [10] U.K. Laemmli, Characterization of DNA condensates induced by poly (ethylene oxide) and polylysine., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 14

- 4288-4292 (1975).
- [11] G. Felsenfeld, J. Boyes, J. Chung, D. Clark, V. Studitsky, Chromatin structure and gene expression., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9384-9388 (1996).
- [12] Z. Lin, C. Wang, X. Feng, M. Liu, J. Li, C. Bai, The observation of the local ordering characteristics of spermidine-condensed DNA: atomic force microscopy and polarizing microscopy studies., Nucleic Acids Res. 26, 3228-3234 (1998).
- [13] M.J. Allen, E.M. Bradbury, R. Balhorn, AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica., Nucleic Acids Res. 25, 2221-2226 (1997).
- [14] N.V. Hud, K.H. Downing, R. Balhorn, A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3581-3583 (1995).
- [15] K. Osada, H. Oshima, D. Kobayashi, M. Doi, M. Enoki, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Quantized folding of plasmid DNA condensed with block cationer into characteristic rod structures promoting transgene efficacy., J. Am. Chem. Soc. 132, 12343-12348 (2010).
- [16] 岡田弘晃, [実践 DDS 講座]第 1 回「総論 : DDS への期待と現状」 利用が拡大する DDS 技術,医薬製品寿命延長にも貢献, 日経バイオビジネス 29, 132-135 (2003).
- [17] 福田充, ドラッグデリバリーシステム, 化学同人 (1995).

- [18] M.P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R.J. Levy, G.L. Amidon, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells in size dependent., *Pharm. Res.* 14, 1568-1573 (1997).
- [19] S. Prabha, W.Z. Zhou, J. Panyam, V. Labhasetwar, Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles., *Int. J. Pharmacol.* 244, 105-115 (2002).
- [20] S.K. Lai, K. Hida, C. Chen, J. Hanes, Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles., *J Control. Rel.* 125, 107–111 (2008).
- [21] H. Akita, S. Hama, H. Mizoguchi, H. Harashima, Development of Non-viral Vector Based on the Quantitative Comparison of Intracellular Trafficking with Viral Vector., *YAKUGAKU ZASSHI* 126, 1047-1057 (2006).
- [22] 池北雅彦, 入村達郎, 辻勉, 堀戸重臣, 吉野輝夫, 糖鎖学概論, 丸善 (1997).
- [23] 永井克孝 編, 糖鎖 I -糖鎖と生命-, 東京化学同人 (1994).
- [24] 高倉喜信, Overview -糖と DDS, *Drug Delivery System* 19, 28-31 (2004).
- [25] Y. Noguchi, T. Noguchi, T. Sato, Y. Yokoo, S. Itoh, M. Yoshida, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, E. Nakayama, Priming for in vitro and in vivo anti-human T lymphotropic virus type 1 cellular immunity by virus-related protein reconstituted into liposome., *J. Immunol.* 146, 3599-3603 (1999).

- [26] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo., *J. Biol. Chem* 263, 14621-14624 (1988).
- [27] S.S. Diebold, M. Kursam E. Wagner, M. Cotton, M. Zeneke, Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells., *J. Biol. Chem.* 274, 19087-19094 (1999).
- [28] 矢吹稔, -最後のバイオマス-キチン、キトサン, 技報堂出版 (1988).
- [29] K. Arai, T. Kunumaki, T. Fujita, Toxicity of chitosan., *Bull. Tokai Reg. Fish. Lab.* 43, 89-94 (1968).
- [30] V. Chobot, J. Kremenak, L. Opletal, Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 4. Chitin and chitosan., *Ceska Slov. Farm.* 44, 190-195 (1995).
- [31] M. Köping-Höggård, I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, et al., Chitosan as a nonviral gene delivery system., Structure-property relationships and characteristics compared with polyehylenimine in vitro and after lung administration in vivo., *Gene Ther.* 8, 1108-1121, (2001).
- [32] 矢吹稔, キチン、キトサンのはなし, 技報堂出版 (1992).
- [33] 生化学辞典 第 3 版, 東京化学同人 (1998).
- [34] R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Claspell, A.P. Rolland, Novel polymeric condensing carriers for gene delivery., *Proc. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 22, 178-179 (1995).
- [35] K. Hagiwara, R. Anastasia, M. Nakata, T. Sato, Physicochemical

- properties of pDNA/chitosan complexes as gene delivery systems., *Curr. Drug Discov. Technol.* 8, 329-339 (2011).
- [36] P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A.M. Steffan, J.S. Remy, Chitosan-Based Vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability., *Pharmaceutical Res.* 15, 1332-1339 (1998).
- [37] K.W. Leong, H.Q. Mao, V.L. Truong-Le, K. Roy, S.M. Walsh, J.T. August, DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles., *J. Control. Rel.* 53, 183-193 (1998).
- [38] F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A.P. Rolland, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery., *J. Control. Rel.* 56, 259-272 (1998).
- [39] T. Sato, T. Ishii, Y. Okahata, In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency., *Biomaterials* 22, 2075-2080 (2001).
- [40] K. Corsi, F. Chellat, L. Yahia, J.C. Fernandes. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles., *Biomaterials* 7, 1255-1264 (2003).
- [41] M. Köping-Höggård, Y.S. Mel'nikova, K.M. Vårum, B. Lindman, P. Artusson. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo., *J.*

- Gene Med., 130-141 (2003).
- [42] X.F. Li, D.K. Lee, A.S. Chan, H.O. Alpar, Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles., *Biochim. Biophys. Acta* 1630, 7-18 (2003).
- [43] T. Kiang, J. Wen, H.W. Lim, K.W. Leong, The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection., *Biomaterials* 25, 5293-5301 (2004).
- [44] M. Huang, C.W. Fong, E. Khorc, L.Y. Lim, Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymermolecular weight and degree of deacetylation., *J. Control. Rel.* 106, 391-406 (2005).
- [45] K. Roy, H.Q. Mao, S.K. Huang, K.W. Leong, Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy., *Nat. Med.* 5, 387-391 (1999).
- [46] Z. Cui, R.J. Mumper, Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization., *J. Control. Rel.* 75, 409-419 (2001).
- [47] M. Iqbal, W. Lin, I. Jabbal-Gill, S.S. Davis, M.W. Steward, L. Illum, Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice., *Vaccine* 21, 1478-1485 (2003).
- [48] M. Kumar, X. Kong, A.K. Behera, G.R. Hellermann, R.F. Lockey, S.S. Mohapatra, Chitosan IFN- γ -pDNA Nanoparticle (CIN) Therapy for Allergic Asthma., *Genet. Vaccines Ther.* 1, 3 (2003).

- [49] 岡本浩一, キトサンを用いた遺伝子デリバリー, *Drug Delivery System* 22-2, 131-137 (2007).
- [50] T. Kiang, J. Wen, H.W. Lim, K.W. Leong, The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection., *Biomaterials* 25, 5293-5301 (2004).
- [51] M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, T. Sato, Lactosylated chitosan for DNA delivery into hepatocytes: the effect of lactosylation on the physicochemical properties and intracellular trafficking of pDNA/chitosan complexes., *Bioconjug. Chem.* 17, 309-316 (2006).
- [52] A. Pathak, P. Kumar, K. Chuttani, S. Jain, A.K. Mishra, S.P. Vyas, K.C. Gupta, Gene expression, biodistribution, and pharmacoscintigraphic evaluation of chondroitin sulfate-PEI nanoconstructs mediated tumor gene therapy., *ACS nano* 3, 1493-1505 (2009).
- [53] S. Hama, H. Akita, R. Ito, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, H. Harashima, Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems., *Mol. Ther.* 13, 786-794 (2006).
- [54] H.Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August, K.W. Leong, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency., *J. Control. Release* 70, 399-421 (2001).

- [55] C.M. Varga, T.J. Wickham, D.A. Lauffenburger, Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design., *Biotechnol. Bioeng.* 70, 593-605 (2000).
- [56] K. Maruyama, F. Iwasaki, T. Takizawa, H. Yanagi, T. Niidome, E. Yamada, T. Ito, Y. Koyama, Novel receptor-mediated gene delivery system comprising plasmid/protamine/sugar-containing polyanion ternary complex., *Biomaterials* 25, 3267-3273 (2004).
- [57] S.K. Lai, K. Hida, C. Chen, J. Hanes, Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles., *J. Control. Rel.* 125, 107-111 (2008).
- [58] M. Huang, C.W. Fong, E. Khor, L.Y. Lim, Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation., *J. Control. Rel.* 106, 391-406 (2005).
- [59] G.L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A.S. Verkman, Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus., *J. Biol. Chem.*, 275, 1625-1629 (2000).
- [60] H.M. Patel, Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis., *Crit. Rev. Ther. Drug carrier Syst.* 9, 39-90 (1992).
- [61] P.R. Dush, M.L. Read, L.B. Barrett, M.A. Wolfert, L.W. Seymour, Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery., *Gene Ther.* 6, 643-650 (1999).

- [62] S. Richardson, H. Kolbe, R. Duncan, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA., *Int. J. Pharm.* 178, 231-243 (1999).
- [63] 金尾義治, 進歩する薬物医療 DDS 最前線, 廣川書店(2002)
- [64] M. Hashimoto, Y. Koyama, T. Sato, In vitro gene delivery by pDNA/chitosan complexes coated with anionic PEG derivatives that have a sugar side chain., *Chem. Lett.* 37, 266-267 (2008).
- [65] C.M. Roth, S. Sundaram, Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery: insights from intracellular pathways., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6, 397-426 (2004).
- [66] C.K. Chan, D.A. Jans, Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence., *Hum. Gene Ther.* 10, 1695-1702 (1999).
- [67] T. Merdan, J. Callahan, H. Petersen, K. Kunath, U. Bekowsky, P. Kopecknova, T. Kissel, J. Kopecek, Pegylated polyethylenimine-Fab' antibody fragment conjugates for targeted gene delivery to human ovarian carcinoma cells., *Bioconjug. Chem.* 14, 989-996 (2003).
- [68] S.S. Diebold, M. Kursal, E. Wagner, M. Cotten, M. Zenke, Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells., *J. Biol. Chem.* 274, 19087-19094 (1999).

- [69] S. Grosse, Y. Aron, I. Honore, G. Thevenot, C. Danel, A.G. Roche, M. Monsigny, I. Fajac, Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes., *J. Gene Med.* 6, 345-356 (2004).
- [70] K. Sagara, S.W. Kim, A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes., *J. Control. Release.* 79, 271-281 (2002).
- [71] M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, H. Yanagie, M. Eriguchi, T. Sato, Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages., *Biotechnology Lett.*, 28, 815-821 (2006).
- [72] 当研究室における未発表データ
- [73] S.F. Peng, M.J. Yang, C.J. Su, H.L. Chen, P.W. Lee, M-C. Wei, H.W. Sung, Effects of incorporation of poly(γ -glutamic acid) in chitosan/DNA complex nanoparticles on cellular uptake and transfection efficiency., *Biomaterials* 30, 1797-1808 (2009).
- [74] S.F. Peng, M.T. Tseng, Y.C. Ho, M.C. Wei, Z.X. Liao, H.W. Sung, Mechanisms of cellular uptake and intracellular trafficking with chitosan/DNA/poly(γ -glutamic acid) complexes as a gene delivery vector., *Biomaterials* 32, 239-248 (2011).
- [75] T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Kawakami, K. Nishida, J. Nakamura, M.

- Teshima, H. Nakagawa, Y. Kodama, H. To, H. Sasaki, The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule., *Biomaterials* 30, 4427-4434 (2009).
- [76] M. Kusche-Gullberg, L. Kjellén, Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 605–611 (2003).
- [77] K.R. Kirker, Y. Luo, J.H. Nielson, J. Shelby, G.D. Prestwich, Glycosamino-glycan Hydrogel Films as Bio- interactive Dressings for Wound Healing., *Biomaterials* 23, 3661-3671 (2002).
- [78] S. Miyata, Y. Komatsu, Y. Yoshimura, C. Taya, H. Kitagawa, Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation., *Nat. Neurosci.* 15, 414-422 (2012).
- [79] J.J. Hill, K. Jin, X.O. Mao, L. Xie, D.A. Greenberg, Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 9155-9160 (2012).
- [80] C.A. Henke, U. Roongta, D.J. Mickelson, J.R. Knutson, J.B. McCarthy, CD44-Related Chondroitin Sulfate Proteoglycan, A Cell Surface Receptor Implicated with Tumor Cell Invasion, Mediates Endothelial Cell Migration on Fibrinogen and Invasion into a Fibrin Matrix., *J. Clin. Invest.* 97, 2541-2452 (1996).
- [81] Glyco Forum [<http://www.glycoforum.gr.jp>]

第2章 pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体のキャラクターゼーションと *in vitro* での遺伝子導入

2.1 緒言

pDNA/キトサン複合体は、*in vitro*では血清存在下でも比較的高い遺伝子導入効率を達成することが可能である。しかしながら、凝集体の形成や細胞特異性の欠如といった問題点に起因し、*in vivo*においては遺伝子導入効率が低いことが懸念されている。これらの問題点を解決するために、pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子で被覆する方法が考案された。本手法によりpDNA/キトサン複合体の物理化学的、生物学的な安定性を向上することで、細胞内取り込み過程・細胞内動態・遺伝子発現に有益な効果をもたらすことが期待された。

本章では、pDNA/キトサン複合体の被覆剤として、様々な分子量および硫酸化度のコンドロイチン硫酸を用いてpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体をそれぞれ作製し、粒子のキャラクターゼーションおよび*in vitro*での遺伝子導入を行った。三元複合体の粒子径・ゼータ電位・粒子形態といった性質が種々の細胞株における遺伝子発現活性と細胞内取り込み量に与える影響について検討し、三元複合体の細胞内取り込み機構および細胞内動態を解析した。

2.2 実験方法

2.2.1 材料

ルシフェラーゼプラスミド溶液 (pGL3-Control Vector) はPromegaより購入した。ベクターマップをFig. 2-1に示す。以下、pGL-3-Control VectorをpLucと表記する。

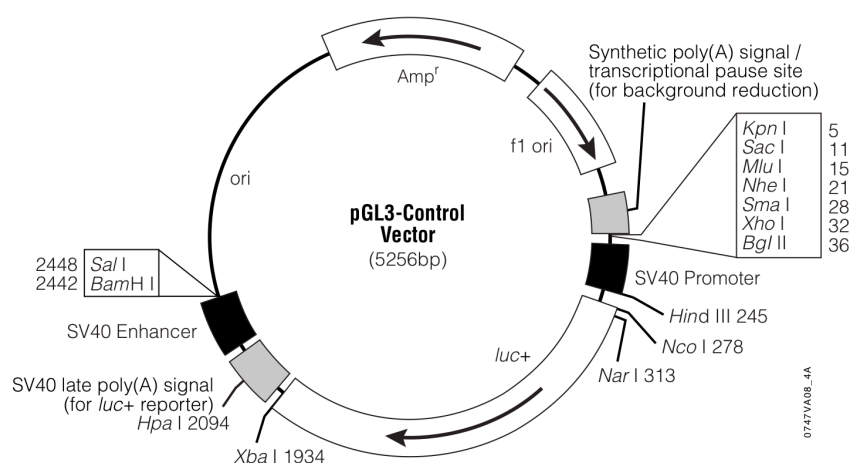


Fig. 2-1 pGL-3-Control Vector のベクターマップ (Promega 社カタログより引用)

ヒートショック法によりコンピテントセル (DH5 α , TOYOBO) にpLucを導入後、前培養液を作製した。アンピシリン (1 mg/mL) 含有LB培地で大量培養後、EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen) に付属のプロトコールに従ってpDNAを精製した。TEバッファーで1.0 mg/mLに調整し、これをpLuc溶液とした。

キトサン (52 kDa, 脱アセチル化度84%) は焼津水産化学 (株) より、コンドロイチン硫酸は、生化学工業 (株) より提供された。キトサンおよびコンドロイ

チンを予め1 N HClでpH 6.5に調整したPBS(-)にそれぞれ溶解させ、0.22 μm filter (Millex GV, MILLIPORE) で濾過滅菌後、ストック溶液とした。コンドロイチン硫酸は以下、CSと表記する。本研究で使用したコンドロイチン硫酸はTable 2-1にまとめた。

Table 2-1 本研究で用いたコンドロイチン硫酸

名前	命名	由来	限界粘度	分子量 (kDa)	硫酸化度
CD	CS-10	サメ	0.20-0.43	10	1.02
AN	CS-14A	サメ	0.36-0.42	14	1.21
BN	CS-14B	ウシ	0.40-0.55	14	0.96
ND	CS-15	サメ	0.51-0.65	15	1.06
New-AN	CS-22	サメ	0.50-0.61	22	1.20
N	CS-40	サメ	1.18-1.60	40	1.08

硫酸化度：二糖あたりの硫酸基数

2.2.2 複合体の作製

pDNA/キトサン複合体は以下の通り作製した。所定量のpDNA溶液およびキトサン溶液をそれぞれpH 6.5に調整した10 mM MOPS (Sigma) 溶液で希釈し、室温で15分間静置した。希釈したそれぞれの溶液を混合し、さらに室温で15分間静置することによりpDNA/キトサン複合体を作製した。複合体作製時のpDNA濃度は30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。混合比は、pDNAのリン酸基 (P) とキトサンのアミノ基 (N) の電荷比P:Nに基づいて決定した。

pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は以下の通り作製した。

pDNA溶液、コンドロイチン硫酸、キトサン溶液を10 mM MOPS溶液 (pH 6.5) で希釈し、室温で15分間静置した。希釈したpDNA溶液とコンドロイチン硫酸溶液を混合した後、室温で15分間静置した。その後、希釈したキトサン溶液を加えて混合し、さらに室温で15分間静置することでpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を作製した。複合体作製時のpDNA濃度は30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。混合比は、pDNAのリン酸基 (P) とキトサンのアミノ基 (N)、コンドロイチン硫酸のカルボキシル基と硫酸基の和 (-) の電荷比 P:N:(-) に基づいて決定した。なお、トランスフェクションに用いる複合体を作製する際には、以下の通り調製した溶媒を用いた。DMEM (GIBCO) 13.5 g/LをMilli-Qに溶解させた後、MOPS粉末 (Sigma) を10 mMになるよう加え、 NaHCO_3 粉末 (nacalai tesque) でpH 6.5に調整し、0.22 μm filter (Stericap, Millipore) で濾過滅菌した。

粒子径・ゼータ電位測定、原子間力顕微鏡観察、BSA凝集アッセイ、DNase耐性実験に用いる際には10 mM MOPS溶液 (pH 6.5) を、赤血球凝集アッセイに用いる際にはPBS(-) (pH 6.5) を使用し上記の方法に基づいてpDNA複合体を作製した。

フローサイトメトリーまたは共焦点レーザー顕微鏡観察に用いる場合は、YOYO-1またはYOYO-3で蛍光標識したpDNAおよびTexasRed修飾キトサン (52 kDa, DDA = 84%) を用いて複合体を作製した。pDNAの標識方法は以下の通りである。1 mM YOYO-1 (Molecular Probes) または1 mM YOYO-3 (Molecular Probes) は使用直前にPBS(-)で100倍希釈し、1.0 mg/mL pDNA溶液と等量混合した。この分量は300 bpあたり一個の蛍光分子が導入される割合

である。遮光下、室温で60分間静置し、pDNAをYOYO-1またはYOYO-3標識した。その後、上述した通りpDNA複合体を作製した。

2.2.3 アガロースゲル電気泳動

50×TAEバッファー (nacalai) をMilli-Qで50倍希釈し、1×TAEバッファーを調製した。TAEバッファーとアガロース (nacalai) を用いて1%アガロースゲルを作製し、pDNA量が200 ngになるようpDNA複合体溶液をアプライし、電気泳動装置 (Mupid II, コスモ・バイオ) で100 V、30分間程度泳動した。ローディングバッファーは10×Loading Buffer (タカラバイオ) を用いた。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸して染色し、泳動結果をMolecular Imager FX (BIO-RAD) で解析した。

2.2.4 粒子径およびゼータ電位測定

粒子径およびゼータ電位測定には、ZETA SIZER nano series ZEN3600 (シスメックス) を用いた。粒子径測定は動的光散乱法によって、以下の通り行った。pDNA濃度 30 µg/mLの複合体溶液を 10 mM MOPS (pH 6.5) 溶液で 6 µg/mLに希釈した。プラスチックキュベット (#83-1714, SANSYO) に希釈した複合体溶液を 500 µL以上加え、測定温度 25 °C、Automaticの条件で測定を行った。また、ゼータ電位測定はレーザードップラー電気泳動法により行った。キャピラリーセル (#DTS 1060, Malvern) に 1 mL シリンジを用いて希釈した複合体溶液を充填し、測定温度 25 °C、粘度 0.8882 cP、誘電率 79.0、電極間電圧 150 Vの実験条件で測定した。

2.2.5 原子間力顕微鏡による複合体の形態観察

pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はそれぞれP:N = 1:5およびP:N:(-) = 1:5:16の電荷比で作製した。pDNA濃度 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で作製後、10 mM MOPS溶液 (pH 6.5) で3倍希釈し、pDNA濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した。希釈した各複合体溶液100 μL をマイカ板に滴下し、室温で3分間放置し物理吸着させた。これをMilli-Q 100 μL で2回洗浄し、窒素ガスで表面を乾燥させ、デシケーターの中で一晩放置し、原子間力顕微鏡観察に用いた。原子間力顕微鏡はSPM-9600 (島津製作所) を、カンチレバーはSN-AF01-A (Olympus Optical Co. Ltd.) を用いてコンタクトモードで測定を行った。

2.2.6 化学合成によるコンドロイチン硫酸の蛍光標識

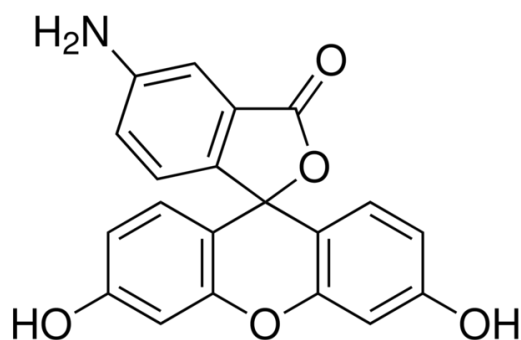


Fig. 2-2 5-Amino Fluorescein の構造式

5-Amino Fluorescein によるコンドロイチン硫酸の標識方法は、文献[1]のプロトコールに従い、以下の通り行なった。CS-22 100 mg を 20 mL の HCl/ピリジン = 3/1 (v/v) に溶解した。5-Amino Fluorescein (Sigma, Fig. 2-2) 114 mg を 4 mL の HCl/ピリジン = 1/1 (v/v) に溶解した。これらを混合し、ピリジンを用いて pH 4 付近に調整した。EDC [1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩, Wako] を 0.39 g (CS の二糖ユニットの 9.8 等量) を追加し、室温で 4 時間反応した。100 mL 1.25% 酢酸ナトリウム/冷エタノールを反応液の 3 等量追加し、減圧濾過した。

得られた固体を Milli-Q に溶解し、VIVA SPIN 20 mL CONCENTRATOR (VIVA SCIENCE) を用いて限外濾過した。4 °C, 4000 ×g, 20 分間遠心し、Milli-Q を添加する処理を 11 回繰り返す、36 時間程度凍結乾燥した。その後、薄層クロマトグラフィー [TLC; 展開溶媒: クロロホルム/メタノール = 1:1 (v/v)] で精製確認した。さらに、蛍光分光光度計 (F-2500, HITACHI) を用いて FITC 濃度と蛍光強度の検量線を作製し、FA-CS-22 において挿入された蛍光量を算出した。

5-Amino fluorescein 標識 CS-22 (以下、FA-CS-22) の精製確認を薄層クロマトグラフィー (TLC) により行なった。また、蛍光分光光度計測定により、蛍光分子の修飾率を算出した。結果を以下 Fig. 2-3 に示す。

TLC 板の展開像より、化学合成・限外ろ過後の FA-CS-22 はスポット上に留まり遊離の蛍光分子は検出限界以下であった。また、蛍光分子数と蛍光強度の関係からコンドロイチン硫酸鎖に修飾された蛍光分子数を算出したところ、1 mg FA-CS-22 あたり 0.99 μg の 5-Amino fluorescein が修飾されたことが分か

った。これは、二糖 805 ユニットあたり 5-Amino fluorescein が 1 分子挿入されたことに相当する。

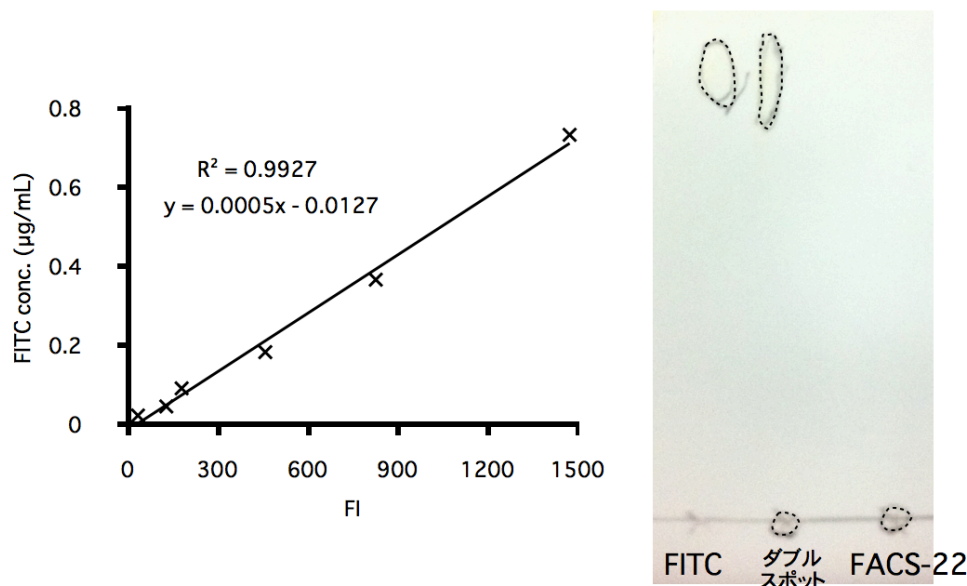


Fig. 2-3 蛍光分子数と蛍光強度の関係

2.2.7 DNase I 耐性評価

pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はそれぞれ P:N = 1:5 および P:N:(-) = 1:5:16 で作製した。pDNA 濃度 30 µg/mL 複合体溶液 50 µL に 10×H バッファー [500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 1 M NaCl] を 6 µL 添加し、DNase I 溶液 (0.07 U/µL, タカラバイオ) を 1 µL 添加した。37 °C で 30 分間反応させ、100 mM ヨード酢酸 (nacalai tesque) 水溶液を 1 µL, 100 mM EDTA (nacalai tesque) 水溶液を 3 µL 添加し、反応を停止させた。その後、4.0 mg/mL キトサナーゼ (生化学工業) を 2 µL 添加し、遮光下 42 °C で 4 時間キトサンの分解を行った。得られた溶液を pDNA 量が 200 ng/well になるようアプライし、1%アガロースゲル電

気泳動によって解析した。

2.2.8 ウシ血清アルブミンによる凝集評価

pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はそれぞれP:N = 1:5およびP:N:(-) = 1:5:16の電荷比で調製した。複合体溶液50 μ Lに対して、0.0675, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) /PBS(-)溶液 (pH 6.5)をそれぞれ50 μ L加え、4時間室温で静置した。その後、混合溶液の濁度を測定した。濁度の測定には、紫外・可視分光光度計 (Ultrospec 300, アマシャム・バイオサイエンス) を用い、350 nmにおける吸光度を測定した。

2.2.9 赤血球凝集アッセイ

10 mLの馬保存血液 (コージンバイオ株式会社, 12070110) を2000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5分間で遠心し、PBS(-)で洗浄した。この操作を三回繰り返した。10 μ L 2%赤血球溶液 (v/v) をV底96ウェルプレート (BMBio, BM6002) に播種し、PBS(-)または所定濃度の複合体溶液を10 μ L添加し、気泡が入らないようピペッティングした。パラフィルムでウェル全体を覆い、室温で30分間静置した。その後、デジタルカメラでウェル全体を撮影した。

2.2.10 滴定実験

pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はそれぞれP:N = 1:5およびP:N:(-) = 1:5:16の電荷比で調製した。複合体溶液

150 μ LをpHメーター AS-212 (アズワン) の感知部に滴下し、0.05 N HCl溶液を用いて滴定した。

2.2.11 細胞培養

本章では、アフリカミドリザル腎臓由来COS7細胞 (JCRB) およびマウスメラノーマB16細胞 ((財)ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク)、ヒト肝癌Huh-7細胞 (Riken Cell Bank)、ヒト肺腺癌A549細胞 (Riken Cell Bank)、イヌ腎臓尿細管上皮由来MDCK細胞 (筑波大学医学部永田恭介教授より提供)を用いた。これらの細胞は、硫酸ストレプトマイシン (nacalai tesque) 100 mg/L、ペニシリンGカリウム (明治製菓) 50,000 units/Lおよび56 °Cの湯浴に30分間浸して補体を非働化させたウシ胎児血清 (FBS, Code. 10437-028, Lot. 397541, 397541) を10%になるように加えたDMEM (Code. 08458-45, nacalai tesque) 培地を用いて、37 °C、5% CO₂-95% airに保たれたCO₂インキュベーター (SANYO) 内で培養した。

COS7, A549, およびMDCK細胞の継代方法は以下の通り行った。Φ10 cmのディッシュ (IWAKI) 上でコンフルエントになった細胞の培地を除去した後、PBS(-)溶液で洗浄した。0.05% Trypsin (DIFCO) / 0.02% EDTA-4Na (nacalai tesque) PBS(-)溶液を加え、CO₂インキュベーター内でCOS7およびA549細胞は4~5分間、MDCK細胞は15~20分間インキュベーションしてディッシュから細胞を剥離させた。Huh-7細胞の場合は、0.05% Trypsin / 0.02% EDTA-4Na PBS(-)溶液を加えた後、すぐに吸引除去し、CO₂インキュベーター内で5分間インキュベーションし、細胞を剥離させた。血清含有培地を加えて細胞細胞懸濁

液を遠心管に回収し、1,000 rpm、5分間、4 °Cで遠心し、上清を除去した。新たに培地を加えてピペティングし、所定の希釈倍率でディッシュに播種した。

2.2.12 トランスフェクション

トランスフェクション用の培地は、DMEM (pH 6.5) 溶液にFBSを10%加えた溶液を使用した。これを以下、DMEM 10% FBS (pH 6.5) 溶液とする。トランスフェクション時にサブコンフルエントになるよう、トランスフェクション前日に24ウェルプレート (IWAKI) に細胞を播種した。各ウェルの培地をDMEM 10% FBS (pH 6.5) 溶液に置換し、pDNA濃度30 µg/mLの複合体溶液を加えた。CO₂インキュベーター内で所定時間およびpDNA濃度でインキュベーションし、トランスフェクションを行った。

2.2.13 遺伝子発現活性の定量

(1) ルシフェラーゼアッセイ

トランスフェクション後、24時間細胞を培養し、ウェルをPBS(-)溶液で3回洗浄した。Cell Culture Lysis Reagent (Promega) 100 µLを各ウェルに加え、細胞を溶解させ、細胞溶解液をチューブに回収した。これを4 °C, 12000 rpmで5分間遠心し、各サンプルにおいて上清20 µLとルシフェリン溶液 (Luciferase Assay System, Promega) 100 µLを測定用96ウェルプレートにアプライし、ルミノメーター (Turner Designs, The reporter, Promega) で測定した。

(2) プロテインアッセイ

DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて、Lowry法によって各細胞溶解液のタンパク質濃度を測定した。手順は以下の通りである。BSA (Sigma) を Cell Culture Lysis Reagentに溶解させ、2.0 mg/mLの溶液を調製した。これを段階希釈した2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL溶液、また0 mg/mL溶液を作製した。Protein Assay Reagent AとReagent Sを50:1で混合し、軽く振り混ぜたものを調製し、これをReagent A' とした。96ウェルマルチプレート (IWAKI) にルシフェラーゼアッセイで用いた細胞溶解液またはBSA溶液を5 μ L入れ、さらにReagent A' 25 μ L、Reagent B 200 μ Lを加え、遮光して15分間室温で静置した。その後、690 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (Multiscan MS, Labosystems, Germany) で測定した。

(3) 遺伝子発現活性の算出

ルシフェラーゼアッセイによって得られたRelative light units (RLU) の値をプロテインアッセイによって得られた細胞溶解液のタンパク質量で補正した値、すなわちRLU/mg proteinを算出し、これをルシフェラーゼ遺伝子発現活性とした。

2.2.14 フローサイトメトリーによる複合体の細胞内取り込み量評価

複合体投与から4時間インキュベーション後、培地を除去し、PBS(-)で3回洗浄し、トリプシン処理によって細胞懸濁液を回収した。回収後、4 °C、2000 rpmで5分間遠心し、上清を除去して細胞ペレットを得た。このペレットに0.4% Trypan Blue PBS(-)溶液 50 μ Lを各ウェルに加えて軽く振盪し、2分間室温で静

置後、PBS(-)を1 mL加え4 °C、1000 rpmで5分間遠心した。トリパンブルー添加は、細胞表面に残存する蛍光を消光するための処理である[8]。さらに、PBS(-)を加えて遠心し、上清を除くという洗浄操作を三回行った後、500 µL PBS(-)に細胞を懸濁した。フローサイトメーター (EPICS ALTRA, BECKMAN COULTER) を用いて、488 nm アルゴンレーザーで励起し、525 nm バンドパスフィルターで蛍光を検出した。各サンプルにつき10,000個の細胞を測定し、解析はEXPO32 (BECKMAN COULTER) で行った。

2.2.15 細胞毒性評価

複合体の細胞毒性はWST-1アッセイによって評価した。方法は以下の通りである。1-Methoxy PMS (同仁化学研究所) 7 mgをMilli-Q 10 mLに溶解させた。また、WST-1 (同仁化学研究所) 33 mgをPBS(-) 9 mLに溶解させた。1-Methoxy PMS溶液とWST-1溶液を1:9で混合後、0.22 µm filterで濾過滅菌し、これをWST-1/PMS溶液とした。細胞を96ウェルプレートに3,000 cells/well播種し、24時間後にpDNA複合体溶液を添加、さらに4または24時間インキュベーションした。その後、PBS(-)で3回洗浄し、WST-1/PMS溶液を各ウェルに110 µLずつ添加し、4時間後にマイクロプレートリーダーを用いて450 nmでの吸光度を測定した。また、対照波長として690 nmにおける吸光度を測定した。

2.2.16 阻害剤処理

トランスフェクション直前に、所定濃度の阻害剤溶液を細胞に添加し、4 °Cまたは37 °Cで所定時間インキュベーションした。その後、阻害剤含有培地を除

去し、トランスフェクションを行った。使用した阻害剤の効果および処理条件を以下のTable 2-2に示す。

Table 2-2 阻害剤の効果および処理条件

阻害方法	効果	処理条件
4 °Cインキュベーション	低温条件によるエンドサイトーシス阻害[2,3]	トランスフェクション30分前からトランスフェクション終了まで4 °Cインキュベーション
Chlorpromazine (Mw = 355.34, 和光純薬工業)	クラスリンの集合-脱集合を阻害し、レセプターのリサイクルを妨げ、クラスリンエンドサイトーシスを阻害[4,5]	溶媒：滅菌水, トランスフェクション前から30分間 10 µg/mLで37 °Cインキュベーション
MBCD (Mw = 1303.3, 和光純薬工業)	コレステロールを除去することでカベオラエンドサイトーシスを阻害[6,7]	溶媒：滅菌水, トランスフェクション前から1時間 1 mMで 37 °Cインキュベート
Filipin (Mw = 654.13, Sigma-Aldrich)	コレステロールと結合し、カベオラエンドサイトーシスを阻害[7]	溶媒:DMSO, トランスフェクション前から1時間 5 µg/mLで37 °Cインキュベーション
Cytochalasin D (MW = 507.6, 和光純薬工業)	アクチンのマクロフィラメントの低分子化を促し、マクロピノサイトーシスを阻害[8]	溶媒：DMSO, トランスフェクション前から30分間 10 µg/mLで37 °Cインキュベーション
Wortmannin (Mw = 428.43, 和光純薬工業)	ホスファチジルイノシトール3リン酸の働きを抑制し、マクロピノサイトーシスを阻害[9]	溶媒：DMSO, トランスフェクション前から1時間 16.9 µMで37 °Cインキュベーション
EIPA (5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride, Mw = 299.46, MP Biomedicals)	Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体阻害により、細胞内pHを低下させ、Rac1, cdc42シグナルを遮断。マクロピノサイトーシス阻害剤[10]	溶媒：DMSO, トランスフェクション前から30分間 100 µMで37 °Cインキュベーション
NEM (N-ethylmaleimide, Mw = 124.13, 和光純薬 工業)	エンドサイトーシス経路の初期において、NSFタンパク質を含むエンドソーム融合機構を阻害[11]	溶媒：pH 5に調整したPBS(-), トランスフェクション 前から15分間40 µMで37 °Cインキュベーション
バフィロマイシン (Mw = 622.83, 和光純薬 工業)	エンドサイトーシス小胞内の酸性化を阻害[12]	溶媒：DMSO, トランスフェクション前から30分間 200 nMで37 °Cインキュベーション
モネンシン (Mw = 670.9, Sigma-Aldrich)	細胞内イオン濃度を変え、エンドソーム小胞からライゾソームへのリガンド移行を阻害 [13]	溶媒：100%エタノール, トランスフェクション前か ら 30分間10 µMで37 °Cインキュベーション
ノコダゾール (Mw = 301.3, ICN Biomedical)	微小管重合を阻害し、微小管による細胞内輸送を阻害 [14,15]	溶媒: DMSO, トランスフェクション前から30分間 20 µMで37 °Cインキュベーション

2.2.17 コレラ毒素、トランスフェリン、デキストランの細胞内取り込み量

FITC-Cholera Toxin β Subunit (Sigma), Alexa Fluor 488-Transferrin (Molecular Probes), または FITC-Dextran (Molecular Probes; Mw = 10 kDa) を DMEM 10% FBS で希釈した。COS7 細胞が接着したウェルに所定濃度添加し、37 °C, 4 時間培養した。その後、PBS(-)で洗浄し、トリプシン処理によって細胞ペレットを回収した。トリパンプルー処理による細胞表面の蛍光を消光し、上記の方法に従ってフローサイトメーターで細胞内への取り込み量を測定した。

2.2.18 siRNA によるノックダウン

トランスフェクション当日に70-80%コンフルエントになるようCOS7細胞を6ウェルプレートに播種した。siRNA溶液およびLipofectamineRNAiMAX (RNAiMAX; invitrogen) 溶液をOptiMEM (Gibco) で希釈し、室温で15分間静置した。10 μ M siRNA溶液10 μ Lに対し、LipofectamineRNAiMAXを5 μ L使用した。Caveolin-1, Clathrin heavy chainに対するsiRNAおよびNegative Control用のsiRNAの配列情報はTable 2-3に示す。希釈したsiRNA溶液と希釈したRNAiMAX溶液を混合し、室温で20分間静置してsiRNA/RNAiMAX複合体を作製した。作製時のsiRNA濃度は500 nMである。COS7細胞培養ディッシュ上の培地を除去後、OptiMEMでさらに10倍希釈したsiRNA/RNAiMAX溶液を添加し、siRNA濃度50 nMで5時間培養した。各ウェルをPBS(-)で洗浄後、DMEM 10% FBSに培地交換し、さらに48または72時間培養した。

2.2.19 ウェスタンブロッティング

M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo) を細胞培養ウェルに所定量添加し、室温で15分間静置後、セルスクレイパーで細胞層を剥離して回収した。DC protein assay kitを用いて、Lowry法によって各細胞溶解液のタンパク質濃度を測定した。所定量のタンパク質溶液と2 x Laemmli sample buffer (125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% β-メルカプトエタノール, 20% グリセロール, 0.1% ブロモフェノールブルー) を混合し100 °Cで2分間加熱した。その後、SDS-PAGEにより分離した。ポリアクリルアミドゲルの組成比はTable 2-4およびTable 2-5に示す。PVDFメンブレン (Biorad) をメタノールに20秒間浸した後、Milli-Qに浸し、親水化処理を行なった。転写槽でPVDFメンブレンにタンパク質を転写し、5% Skim milk (nacalai tesque) /TBS-T溶液で1時間、室温でブロッキングした。Primary antibody in 2.5% Skim milk/TBS-T溶液をPVDFメンブレンに添加し、4 °Cで終夜振盪した。TBS-T溶液で10分間洗浄する操作を3度行い、HRP-conjugated secondary antibody in 2.5% Skim milk/TBS-T溶液を添加後、室温で1時間振盪した。さらに、TBS-T溶液で10分間洗浄する操作を5度行った。ECL Prime Western Blotting Detection System (GEヘルスケア) 付属の2種溶液を等量混合し、PVDFメンブレンに添加後、暗室でHyperfilm ECL (GEヘルスケア) を感光させた。使用した抗体情報はTable 2-6に示す。

Table 2-3 siRNA の配列情報

Target	sequence		Length (bp)
Clathrin heavy chain [16]	sense	5'-cauuggcuucaguaccugTT-3'	21
	anti-sense	5'-caggguacugaagccaugTT-3'	21
Caveolin-1 [17]	sense	5'-gaugugauugcagccaaccagTT-3'	21
	anti-sense	5'-cugguucugcaaucaacT-3'	21
Negative Control	sense	5'-uacguacuauccgcggaTT-3'	21
	anti-sense	5'-auccgcggauguacguaTT-3'	21

Table 2-4 Separating Gel 組成

Separating Gel 15 mL	10%	12.5%	15%
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	5 mL	6.25 mL	7.5 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8/0.4% SDS	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL
dH ₂ O	6.25 mL	5 mL	3.75 mL
10% APS	90 μL		
TEMED	30 μL		

Table 2-5 Stacking Gel 組成

Stacking Gel 5 mL	4%
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	0.65 mL
0.5 M Tris-HCl, pH6.8/0.4% SDS	1.25 mL
dH ₂ O	3.05 mL
10% APS	30 μL
TEMED	10 μL

Table 2-6 抗体情報と希釈率

Protein	Primary antibody		Secondary antibody	
β -Actin (43 kDa)	sc-81178 (SANTA CRUZ, ACTBD11B7)	1/2000	HRP conjugated anti-Mouse IgG (KPL, 074-1806, 100-737)	1/5000
HSV-1 Thymidine Kinase (43 kDa)	sc-28038 (SANTA CRUZ, B0912)	1/500	HRP conjugated anti-Goat IgG (SANTA CRUZ, sc-2020, H0405)	1/2000
Clathrin heavy chain (180 kDa)	ab2731 (abcam, GR74663-1)	1/500	HRP conjugated anti-Mouse IgG (KPL, 074-1806)	1/5000
Caveolin-1 (22 kDa)	sc-894 (SANTA CRUZ, H2506)	1/500	HRP conjugated anti-Rabbit IgG (Sigma, A8275-1ML, 117H9250)	1/5000

2.2.20 F-Actin の動態観察

1% HCl エタノールにスライドガラスを3日間浸し、超音波処理後に70%エタノールを加えさらに洗浄した。アセトンですすぎ洗いし、再度アセトンに浸して超音波処理した。その後、120 °C, 20分間高圧蒸気滅菌した。6 ウェルプレートに表面処理済みのスライドガラスを置き、COS7細胞を200,000 cells/wellで播種した。播種から24時間後、DMEM FBS(-)で一度洗浄し、DMEM FBS(-)に培地交換した。さらに24時間培養し、COS7細胞を飢餓状態にした。終濃度50 ng/mL EGF (Epidermal growth factor; PROSPEC, cyt-217-a) 含有DMEM FBS(-)または各種サンプルを添加し5分間37 °Cで培養した。PBS(-)で各ウェルを洗浄後、4% formaldehyde/PBS(-)を添加し、10分間室温で静置した。溶液除去後、細胞をPBS(-)に室温で30秒間浸し、Permeabilization buffer [0.5% Triton X-100 in PBS(-)] を添加後に室温で5分間静置した。PBS(-)に室温で30秒間浸し

た後、100 nM Alexa Fluor-ファロイジン (Invitrogen, A-12380) /PBS(-)を添加し、室温遮光条件下で30分間静置した。PBS(-)で3回洗浄後、Mounting solution [DABCO(1,4-ジアザビスクロ(2,2,2)オクタン溶液)/ glycerol = 25% w/v, pH 8.5] を細胞の封入剤として使用した。蛍光画像は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, TH4-100) により取得した。

2.2.21 共焦点レーザー顕微鏡による複合体の局在観察

(1) エンドソームと複合体の局在観察

トランスフェクション前日に、35 mmガラスベースディッシュ (IWAKI) に10,000~20,000 cells/wellでCOS7細胞を播種した。YOYO-1またはYOYO-3標識pDNAを用いてpDNA複合体を作製後、5 µg/mL FM4-64 (Molecular Probes) 含有10 mM MOPS DMEM 10% FBS (pH 6.5) で希釈し、pDNA濃度3 µg/mLで細胞に投与した。所定時間インキュベーション後、複合体を含む培地を除き、PBS(-)で3回洗浄した。5 µg/mL Hoechst 33342 (Molecular Probes) /PBS(-)を添加し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000) で観察した。

(2) ライソゾームと複合体の局在観察

トランスフェクション前日に、35 mmガラスベースディッシュに10,000~20,000 cells/wellでCOS7またはHuh-7細胞を播種した。YOYO-1標識pDNAを用いてpDNA複合体を作製し、pDNA濃度3 µg/mLで細胞に投与した。所定時間インキュベーション後、複合体を含む培地を除き、PBS(-)で3回洗浄した。その後、DMEM/F12 (Invitrogen) で100倍希釈したLysoTracker (Molecular Probe)

溶液を添加し、75 nM 37 °Cで1時間培養した。さらにPBS(-)で3回洗浄し、DMEM/F12培地に交換し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS NT, Leica Microsystems) で観察した。

2.2.22 細胞膜透過化処理

Transport buffer [20 mM HEPES (CALBIOCHEM), 110 mM 酢酸カリウム (nacalai tesque), 5 mM 酢酸ナトリウム (Wako), 2 mM 酢酸マグネシウム (Wako), 2 mM DTT (nacalai tesque), 1 mM EGTA (nacalai tesque), 0.7 μL/mL protease inhibitor cacktail set III (CALBIOCHEM)] を調製し、1 N NaOHと1 N HClを用いてpH 6.5またはpH 7.3にそれぞれ調整した。ジギトニン (Wako) はMilli-Qに溶解し、10 mg/mLのストック溶液を作製した。-30 °Cで保存し、使用する際はpH 7.3 Transport bufferに希釈した。

10 cmディッシュでサブコンフルエントまで増殖したCOS7細胞をトリプシン処理によって回収した。pH 7.3 Transport bufferで細胞を洗浄し、4 °C, 1000 rpmで5分間遠心して上清を取り除いた。40 μg/mL ジギトニン溶液を1 mL/dish加えてよくピペッティングし、氷上で5分間インキュベーションした。これに5 mL/dishのpH 7.3 Transport bufferを加えて反応を停止し、4 °C, 1000 rpmで5分間遠心して上清を取り除いた。さらにpH 6.5 Transport bufferを加えて細胞を洗浄した後、10 cmディッシュ1枚分の細胞ペレットを8等分に分注し、同様に遠心して上清を取り除き、膜透過化細胞を作製した。

ジギトニン処理細胞をpH 6.5 Transport buffer 90 μLに再懸濁し、これに複合体溶液を10 μL投与し、37 °Cで10分間または30分間インキュベーションした。

35 mmガラスベースディッシュに同バッファーで10倍希釈した細胞懸濁液を添加し、細胞接着後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2.2.23 データの取り扱いおよび統計処理

複数回測定したデータに関しては、各データの平均値を採用し、エラーバーは標準偏差値として示した。統計処理は各図キャプションに記した方法に基づき行なった。

2.3 実験結果および考察

2.3.1 キャラクターゼーション

2.3.1.1 アガロースゲル電気泳動による複合体の形成確認

pDNA/キトサン複合体および6種類のpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体溶液中において、pDNAが複合体を形成しているかどうか、アガロースゲル電気泳動によって解析した。結果をFig. 2-4に示す。

アガロースゲル電気泳動像より、P:N = 1:5のpDNA/キトサン複合体およびP:N:(-) = 1:5:16のpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体溶液中において遊離のpDNAは検出されなかった(Fig. 2-4A)。したがって、CSの分子量または硫酸化度に依らず三元複合体溶液中でもpDNAは複合体化していることが明らかになった。

次に、CS-22三元複合体溶液中の遊離pDNAに関し、複合体組成比を変更した場合について解析した(Fig. 2-4B)。P:N:(-) = 1:5:4~1:5:16, 1:8:4~1:8:32の組成比において遊離のpDNAは未検出であったが、P:N:(-) = 1:5:32の時わずかにpDNAの遊離が確認された。アニオンの増加によりpDNAの凝縮に作用するキトサンのアミノ基量が相対的に減少し、一部のpDNAが複合体化されず遊離のバンドとして検出されたものと考えられる。これらのデータより、三元複合体溶液中にCSが過剰量含まれないことがpDNAの複合体化に重要な条件であることが示唆された。

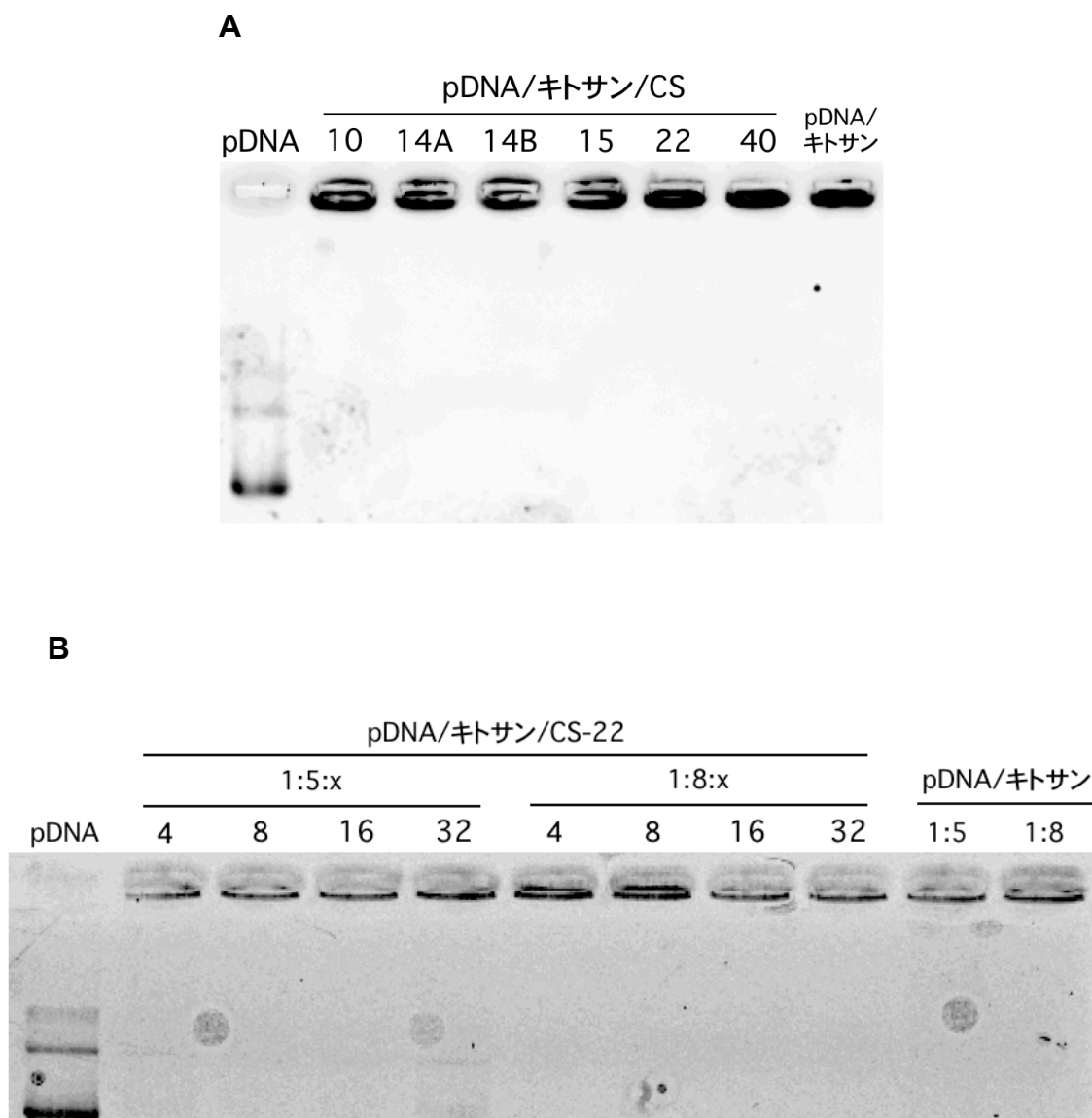


Fig. 2-4 1.0%アガロースゲル電気泳動による複合体の形成確認

(A) Variety of CSs (pDNA/chitosan/CS, P:N:(-) = 1:5:16; pDNA/chitosan, P:N = 1:5), (B) Composition ratio (pDNA/chitosan/CS-22, P:N:(-) = 1:5:4, 8, 16, 32; 1:8:4, 8, 16, 32; pDNA/chitosan, P:N = 1:5, 8), 1.0 % Agarose, TAE buffer, pDNA 200 ng/well.

2.3.1.2 粒子径およびゼータ電位

(1) コンドロイチン硫酸種依存性

pDNA/キトサン複合体と6種類のpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の粒子径およびゼータ電位をそれぞれ動的光散乱法またはレーザードップラー電気泳動法により測定した。結果を以下のTable 2-7に示す。

CS-10およびCS-14B三元複合体は、粒子径850-1000 nmを示した。この2種が1 μm近い粒子径を示したという本実験での測定結果は、後述のAFMによる形態観察で巨大粒子または凝集体を形成が確認された点と対応していると考えられる (Fig. 2-5)。CS-14A, CS-15三元複合体は250-300 nm程度の粒子径を示した一方で、CS-22, CS-40三元複合体はpDNA/キトサン複合体と同程度の200 nm以下の微粒子を形成していた。CS-14A, CS-15三元複合体の粒子径が多少大きい値を示した理由に関しては、粒子の凝縮度が関与していると考えられる。CS-14A, CS-15三元複合体はAFM観察像で輪郭のぼやけた粒子形態像が散見された点より、CS-22, CS-40三元複合体と比較して緩く凝縮された粒子を形成していると考えられ、動的光散乱法による粒子径測定では大きめの値が算出されたことが推察された。一方、AFM観察で粒子輪郭がシャープな像を示したCS-22, CS-40三元複合体は、コンドロイチン硫酸が粒子表面をタイトに被覆し、凝縮度の高い粒子を形成していると考えられた。

ゼータ電位に関して、pDNA/キトサン複合体は+20 mV程度を示したことから粒子表面をキトサンが覆った形態をとっていると考えられる。一方、6種類の三元複合体はゼータ電位-40 mV程度の負電荷を示したことから、コンドロイチン硫酸が粒子表面を覆った形態をとっていることが確認された。

Table 2-7 複合体の粒子径およびゼータ電位

Complex	CS	Limiting viscosity	Mw (kDa)	Sulfation degree*	Size (nm)	Zeta potential (mV)
pLuc/chitosan	-	-	-	-	187.0 ± 12.2	+18.2 ± 1.6
	CS-10	0.20-0.43	10	1.02	1039.3 ± 9.0	-38.8 ± 3.5
	CS-14A	0.36-0.42	14	1.21	296.3 ± 37.9	-39.8 ± 2.8
pLuc/chitosan	CS-14B	0.40-0.55	14	0.96	873.5 ± 18.7	-38.7 ± 2.4
/CS	CS-15	0.51-0.65	15	1.06	269.3 ± 3.1	-39.5 ± 2.3
	CS-22	0.50-0.61	22	1.20	186.3 ± 8.7	-38.7 ± 2.7
	CS-40	1.18-1.60	40	1.08	172.7 ± 2.1	-39.3 ± 1.4

pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), n = 3.

*The number of sulfate groups per disaccharide

(2) 組成比依存性

Table 2-8には、pDNA/キトサン/CS-22三元複合体の粒子径およびゼータ電位の組成比依存性を示す。P:N:(-) = 1:5:4から1:5:32と三元複合体中のコンドロイチン硫酸量が増加するにつれ、ゼータ電位-30 mV程度から-40 mV程度まで低下した。1:5:16においてゼータ電位が極小値を示したことから、この組成比においてコンドロイチン硫酸が粒子表面を完全に被覆した状態になったと判断した。

また、P:N:(-) = 1:5:16において巨大な粒子が形成されることが示唆されていたCS-10とCS-14B三元複合体について、組成比を変更した場合の粒子径とゼータ電位を測定した。結果を以下のTable 2-9に示す。CS-10とCS-14B三元複合体は、P:N:(-) = 1:5:4において370 nm程度の粒子が形成され、このときのゼータ電位は-5 mV程度であった。ゼータ電位がゼロに近い値を示した点より、P:N:(-) =

1:5:4では十分にコンドロイチン硫酸で被覆されていない可能性が示唆された。なお、この程度の中性的なゼータ電位をとる粒子の場合、時間経過につれ凝集体が形成されることが予測されたため、粒子径およびゼータ電位測定後のサンプルをpDNA濃度 6 $\mu\text{g/mL}$, 室温条件下で一晩静置した。その結果、P:N:(-) = 1:5:4では白色沈殿物が確認された。またP:N:(-) = 1:5:2ではどちらの複合体においても複合体溶液が白濁し、沈殿物が形成された。コンドロイチン硫酸量が増加すれにつれ、ゼータ電位は負に大きく帯電し、P:N:(-) = 1:5:16のとき-40 mV程度を示した。このとき、三元複合体は十分にコンドロイチン硫酸で被覆されたと考えられる。ただし、粒子径は870-1000 nm程度であり、P:N:(-) = 1:5:24および1:5:32ではさらに大きな粒子 (1650-2100 nm) が形成された。これらのデータより、CS-22やCS-40と比較してCS-10およびCS-14BはpLuc/キトサン複合体の被覆剤として適していないといえる。

Table 2-8 pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の粒子径およびゼータ電位の組成比依存性

Complex	x	Size (nm)	Zeta Potential (mV)
	0	187.0 ± 12.2	+18.2 ± 1.6
pLuc/chitosan	4	157.7 ± 1.9	-31.5 ± 0.4
/CS-22	8	158.3 ± 1.2	-33.1 ± 1.3
(1:5:x)	16	186.3 ± 8.7	-38.7 ± 2.7
	32	231.7 ± 0.5	-39.0 ± 0.6

pDNA/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:4, 8, 16, 32), n = 3.

Table 2-9 CS-10 と CS-14B 三元複合体の粒子径・ゼータ電位

Complex	P:N:(-)	Size (nm)	Z.P. (mV)
pDNA/chitosan /CS-10	1:5:4	370	-6.6
	1:5:8	424	-27.9
	1:5:16	1039.3 ± 9.0	-38.8 ± 3.5
	1:5:24	1680	-41.9
	1:5:32	2120	-40.8
pLuc/chitosan /CS-14B	1:5:4	365	-5.4
	1:5:8	451	-25.7
	1:5:16	873.5 ± 18.7	-38.7 ± 2.4
	1:5:24	1650	-41.8
	1:5:32	1950	-42.8

pDNA/chitosan/CS-10, CS-14B (P:N:(-) = 1:5:4,8,16,24,32)

(3) 5-Amino fluorescein修飾コンドロイチン硫酸三元複合体

複合体の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察する際に、Fluoresceinで蛍光標識したCS-22 (FA-CS-22) を用いる。FA-CS-22 三元複合体の粒子径およびゼータ電位を測定した。結果をTable 2-10に示す。

P:N:(-) = 1:5:16において180 nm程度を示すCS-22 三元複合体と比較し、FA-CS-22 三元複合体はP:N:(-) = 1:5:16において多少大きい粒子径 (280 nm) を示した。P:N:(-) = 1:5:8~1:5:24において、FA-CS-22 三元複合体のゼータ電位はCS-22 三元複合体と同程度の-40 mV付近を示したことから、FA-CS-22でpDNA/キトサン複合体を十分に被覆されていることが示唆された。

Table 2-10 pLuc/キトサン/FA-CS-22 三元複合体の粒子径・ゼータ電位

Complex	P:N:(-)	Diameter (nm)	Z. P. (mV)
pLuc/chitosan /FA-CS-22	1:5:8	259.7 ± 3.4	-37.0 ± 0.6
	1:5:16	281.7 ± 1.2	-40.1 ± 1.2
	1:5:24	415.0 ± 11	-40.4 ± 1.1

pDNA/chitosan/FA-CS-22 (P:N:(-) = 1:5:8,16,24, n = 3.

2.3.1.3 原子間力顕微鏡による複合体の形態観察

pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の形態を原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察した。観察像をFig. 2-5に示す。

pDNA/キトサン複合体はグロビュール、ロッド構造の不均一な粒子構造をとっていた。CS-10三元複合体は1 μm程度の巨大粒子、CS-14B三元複合体は凝集体、CS-15三元複合体はサイズが不均一な粒子が観察された。それに対し、

CS-14A, CS-22, CS-40三元複合体はサイズが均一なグロビュール構造の粒子を形成していることが確認された。CS-14AおよびCS-22の高い硫酸化度、またはCS-40の高分子量というコンドロイチン硫酸の性質が均一な球状粒子の形成に関与している可能性が示唆された。

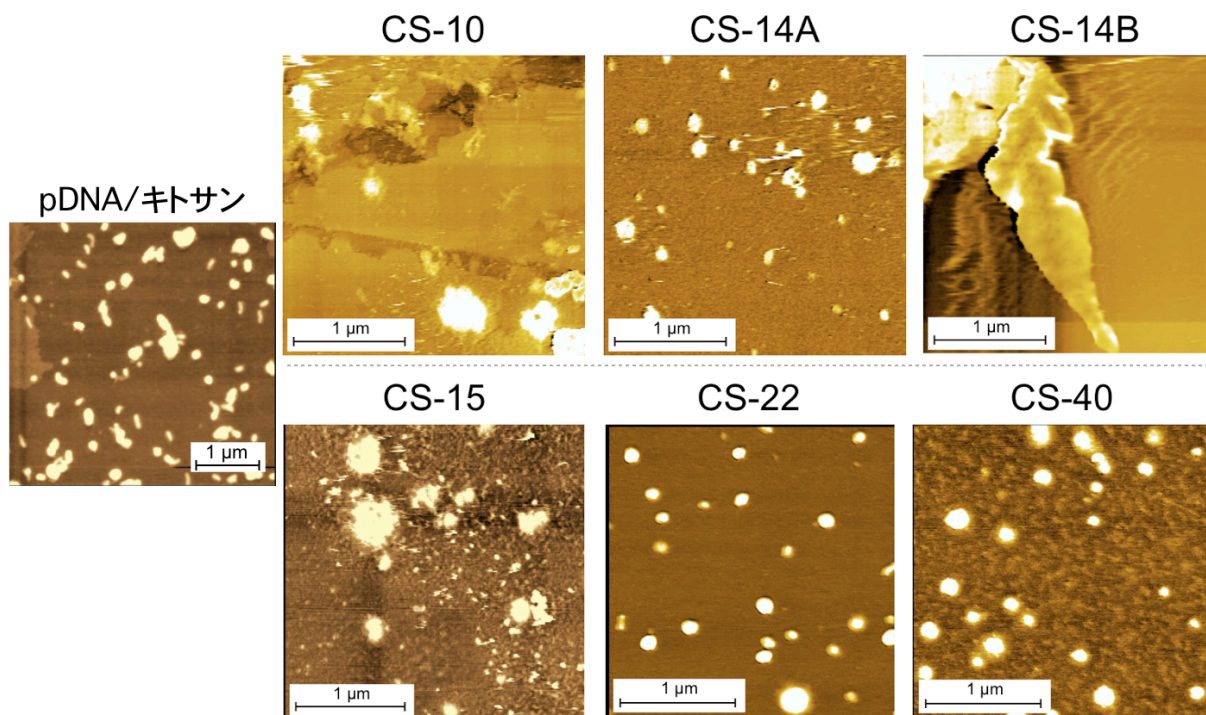


Fig. 2-5 AFM による粒子形態の観察像

pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/ chitosan /CS (P:N:(-) = 1:5:16),

Bar = 1 μm

2.3.1.4 DNase I 耐性評価

DNase I 処理によるpDNAへの影響を調べるため、pDNA溶液、pDNA/キトサンおよびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸複合体溶液をDNase I 処理し、アガロースゲル電気泳動によって解析した。結果をFig. 2-6に示す。

Naked pDNAはDNase処理後、完全に分解されフラグメント化したが、複合体溶液ではDNase処理後もpDNAは保護されていた。マウス血中におけるpDNAの半減期は10分程度であり[18]、DNase処理時間30分でNaked pDNAが完全に分解された本実験条件は、生体中よりも過酷な環境といえる。そのような状況下においても複合体のpDNAが保護されていた点は、*in vivo*の応用に向けて大きなアドバンテージとなることが期待される。

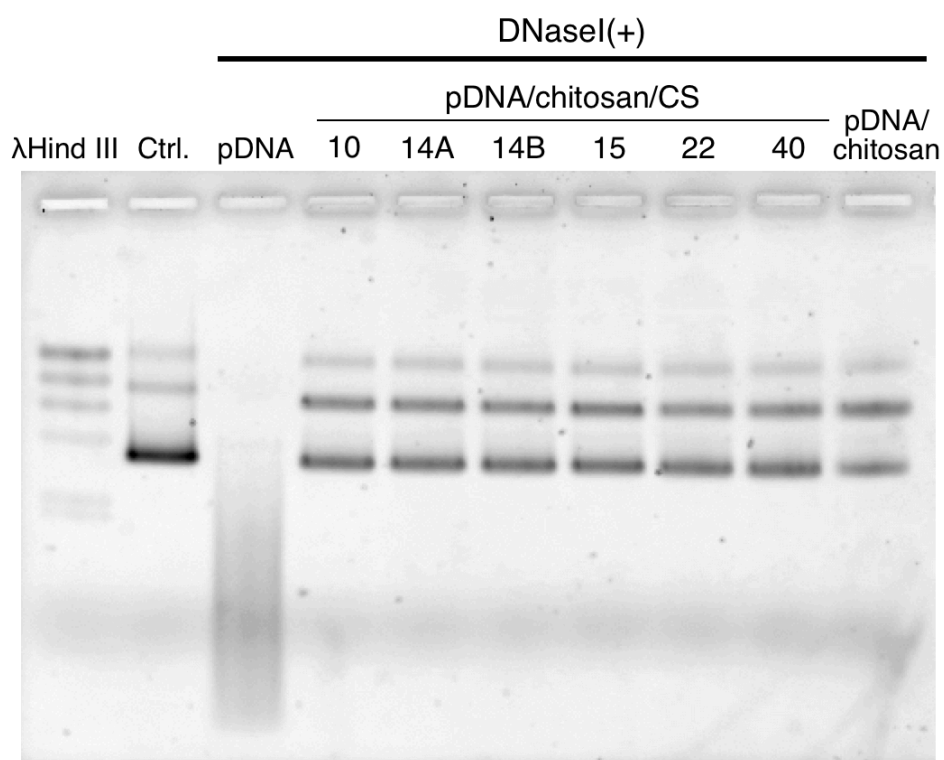


Fig. 2-6 DNase I 処理による pDNA への影響

Naked pDNA, pDNA/chitosan/CS-22 ternary complex (P:N:(-) = 1:5:16), and pDNA/chitosan complex (P:N = 1:5) were treated with 0.1 U of DNase I and subsequently treated with chitosanase. Samples were analyzed by a 1% agarose gel retardation assay.

2.3.1.5 ウシ血清アルブミンによる凝集評価

血中のモデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) と複合体の相互作用を凝集度から評価するため、これらの溶液を混合して4時間後における濁度から凝集度を評価した。結果をFig. 2-7に示す。

BSAは溶液中で負に帯電しているため、正電荷を帯びたpDNA/キトサン複合体と静電的相互作用により凝集体を形成することが知られている[19]。本実験においても、pDNA/キトサン複合体はBSA濃度依存的に濁度が上昇し、凝集体が形成された。CS-10およびCS-14B三元複合体は複合体形成時に巨大粒子または凝集体を形成していたため、BSA非存在下でも高い濁度を示したものの、その他4種 (CS-14A, CS-15, CS-22, CS-40) の三元複合体と同様に濁度の有意な上昇は認められなかった。三元複合体は粒子表面が負に帯電しているため、静電的反発力によってBSAの吸着が抑制されたと考えられる。核酸分解酵素耐性能力 (Fig. 2-6) に加え、三元複合体は血中タンパク質との非特異的な相互作用を回避した点より、pDNA/キトサン複合体と比べて物理化学的な安定性が高いことが示唆された。

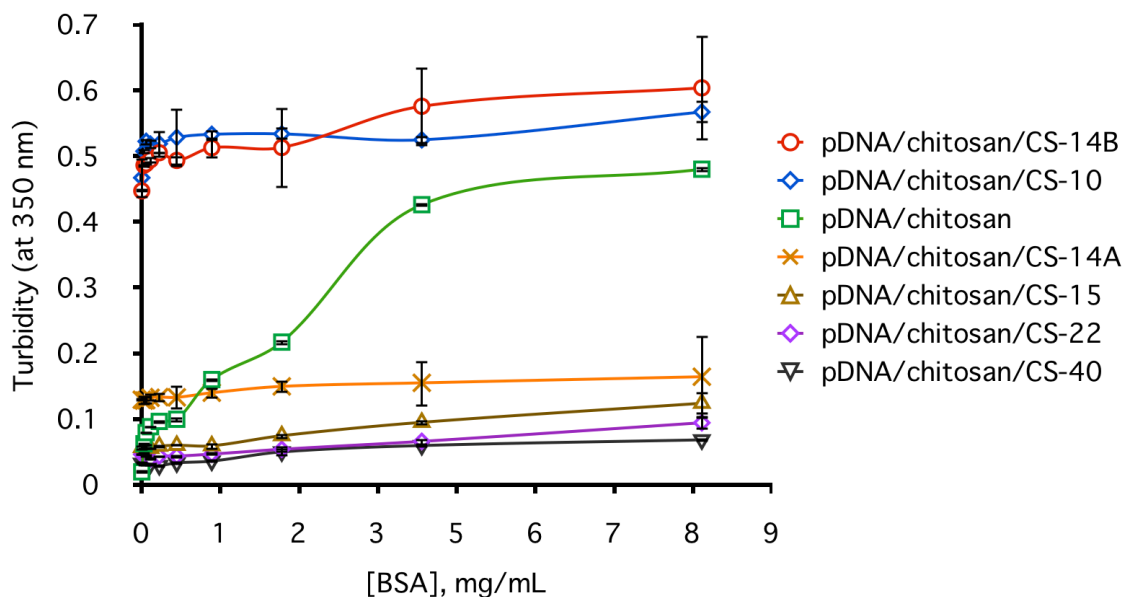


Fig. 2-7 BSA による複合体溶液濁度の変化

pDNA/chitosan/CS-22 ternary (P:N:(-) = 1:5:16) and pDNA/chitosan (P:N = 1:5) were incubated with BSA for 4 h. The pDNA concentration was 15 $\mu\text{g/mL}$. n = 3.

2.3.1.6 赤血球と複合体の相互作用

V底ボトムディッシュを用いた赤血球凝集アッセイでは、赤血球が凝集した場合にウェル底まで沈殿しなくなるため、ウェル中央付近がぼやけて観察される。凝集しない場合は赤血球がウェル底に沈殿し集積するため、点状に観察される。本実験ではpDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/CS三元複体の赤血球凝集度または溶血活性について検討した。結果を以下のFig. 2-8に示す。

pDNA/キトサン複合体の場合、pDNA濃度が7.5, 15 $\mu\text{g/mL}$ のとき赤血球凝集が認められた。一方、6種類のコンドロイチン硫酸三元複合体および凍結乾燥-再水和CS-22三元複合体では、試験した濃度領域内において赤血球凝集は認められなかった。正に帯電したpDNA/キトサン複合体は静電的な相互作用によって

赤血球を凝集したが、負帯電の三元複合体は静電反発によりそれを回避したと考えられる。また、赤血球凝集を誘発したpDNA/キトサン複合体を含む全ての試験サンプルにおいて、赤血球の細胞膜が破壊される溶血作用は認められなかった。

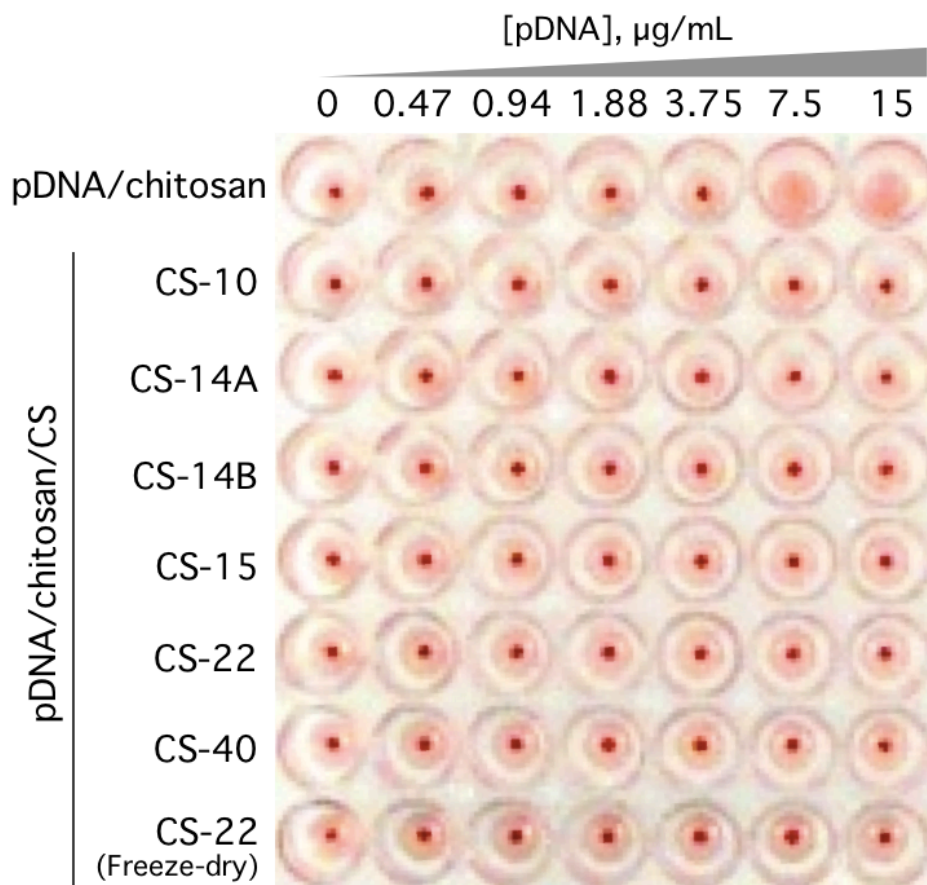


Fig. 2-8 キトサン複合体を用いた赤血球凝集アッセイ

pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), Freeze-dried rehydrated CS-22 ternary complex (P:N:(-) = 1:5:16; storage: -20 °C, 7 days), 2%(v/v) erythrocyte in PBS(-).

2.3.1.7 滴定実験

アミノ基に富むキトサンは、PEIと同様にバッファリング効果を有することが提唱されている[20]。本実験では、キトサンが複合体化した後、すなわちpDNA/キトサン複合体とpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の状態でのバッファリング効果を調べるために、複合体溶液をHCl溶液で滴定し、pHの変動を測定した。複合体溶液の滴定曲線をFig. 2-9に示す。

キトサン溶液の場合、pH 4.0～6.5において顕著なpH緩衝能が確認された。一方、pDNA/キトサン複合体とpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の場合、キトサン溶液と類似した滴定曲線を示した。IshiiらもpDNA/キトサン複合体溶液がキトサン溶液と同程度のバッファリング効果を示すことを実証していたが[21]、その効果は三元複合体化した場合においても有効であることが本実験により明らかになった。pDNA/キトサン複合体および三元複合体がバッファリング効果を有することは、エンドソームからプロトンスポンジ効果によって細胞質中に脱出する可能性を示唆するものであり、この点が細胞への遺伝子デリバリーにおいて有利に作用することが期待される。

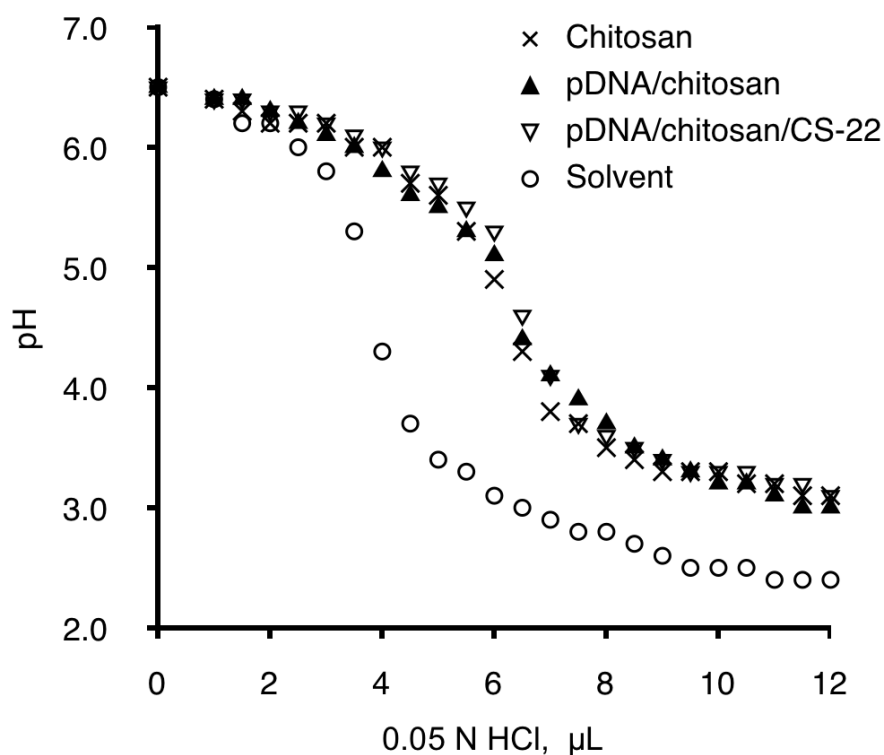


Fig. 2-9 複合体溶液のバッファリング効果

Chitosan, pDNA/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), and pDNA/chitosan (P:N = 1:5) were titrated with 0.05 N HCl.

2.3.1.8 小括

本項では、pDNA/キトサン複合体と種々のコンドロイチン硫酸によって被覆されたpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の物理化学的なキャラクタリゼーションを行った。

アガロースゲル電気泳動により、複合体溶液中における遊離のpDNAは検出限界以下であり、大部分が複合体化していた。AFM観察では、被覆に用いるコンドロイチン硫酸の分子量や硫酸化度により形成される粒子形態が大きく異なることが明らかになった。pDNA/キトサン複合体はグロビュール、ロッド構造の不均一な粒子形態を示したのに対し、硫酸化度の高いCS-14AおよびCS-22およ

び高分子量のCS-40で被覆したときは、球状の均一な粒子が形成された。ゼータ電位測定より、三元複合体はP:N:(-) = 1:5:16において-40 mV程度を示し、コンドロイチン硫酸がpDNA/キトサン複合体を十分に被覆した形態をとることが分かった。粒子径測定より、CS-22, CS-40三元複合体はpDNA/キトサン複合体と同程度の180 nmであった。AFM観察より凝集体の形成が散見されたCS-10およびCS-14B三元複合体は、粒子径が850-1000 nm程度の大きい値を示した。また、血中モデルタンパク質としてのBSAとpDNA複合体の相互作用を溶液濁度より評価したところ、複合体の種類によってその挙動は大きく異なっていた。pDNA/キトサン複合体は静電的にBSAと相互作用し凝集体を形成したのに対して、負帯電性の三元複合体は静電的な反発力によってBSAとの相互作用を回避し、非特異的な吸着および凝集が抑制されていた。同様に、三元複合体は赤血球との非特異的な相互作用を回避することが分かった。DNase耐性実験において、pDNA/キトサン複合体および全ての三元複合体は核酸分解酵素耐性を示した。これらの三元複合体の性質は、生体中での安定性に寄与するものと期待される。さらに、複合体溶液のバッファリング効果を滴定実験によって検討したところ、pDNA/キトサン複合体および三元複合体化したときにおいてもキトサン単体溶液と同程度のpH緩衝能を有していた。これは、プロトンスポンジ効果によってエンドソームから細胞質に脱出する可能性を示唆するものである。

以上の結果より、適切なコンドロイチン硫酸によって被覆された三元複合体では、(i)不均一な粒子形態が改善され、均一な球状粒子が形成されること、(ii) BSA および赤血球との相互作用が回避され、血中での安定性向上が期待されること、(iii) pDNA/キトサン複合体と同程度のバッファリング効果を示すことに

より、有望な遺伝子キャリアーとなる可能性が示唆された。次項においては、これらの複合体を用いて細胞への遺伝子導入を試みた。

2.3.2 遺伝子発現活性の評価

2.3.2.1 トランスフェクション条件による違い

(1) 細胞種依存性

pDNA/キトサン複合体および6種類のpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の遺伝子発現活性と細胞内取り込み量をアフリカミドリザル腎臓由来COS7, ヒト肝癌Huh-7細胞において検討した。ルシフェラーゼ遺伝子発現活性を結果をFig. 2-10に示す。また、マウスメラノーマB16, イヌ腎臓由来MDCK, およびヒト肺腺癌A549細胞での遺伝子発現活性をFig. 2-11に示す。

COS7, Huh-7細胞においては、粒子径850-1000 nmを示すCS-10およびCS-14B三元複合体の遺伝子発現活性はpDNA/キトサン複合体よりも低い値を示し、200-300 nm程度のサイズを有していた他の三元複合体 (CS-14A, CS-15, CS-22, CS-40) では2~3倍高い値を示した。また、両細胞種でCS-22三元複合体が最大の遺伝子発現活性を示した。複合体の細胞内取り込み量に関しては、遺伝子発現活性と対応していたことから、遺伝子発現活性と細胞内取り込み量は相関関係にあることが確認できた。すなわち、三元複合体による遺伝子発現活性の向上は、細胞内取り込み量の増加に起因するものであった。一方で、Huh-7細胞におけるCS-40三元複合体の細胞内取り込み量はCS-22三元複合体と同程度に高い値を示したのに対し、遺伝子発現活性はpDNA/キトサン複合体と同程度であるという矛盾点も挙げられた。この点に関しては、Huh-7細胞ではCS-22,

CS-40三元複合体で細胞内動態やその後の転写効率、翻訳効率に差異がある可能性が考えられる。

B16細胞においてはpDNA/キトサン複合体の方がpDNA/キトサン/CS三元複合体よりも遺伝子発現活性が高かった。一方、MDCKおよびA549細胞においては全体的に三元複合体で遺伝子発現活性は向上した。これらの結果より、コンドロイチン硫酸は特定の細胞種において膜表面上で認識をうけている可能性が示唆された。

特定の細胞種において三元複合体の遺伝子発現活性が向上した点について、200 nm以下の均一な球状粒子の形成による改善だけではなく、以下の要素も関与している可能性がある。(i)三元複合体はゼータ電位が負であり静電的相互作用による取り込みは得られなくなったが、CS認識受容体による特異的な取り込みが促進された、(ii)CS被覆によって遺伝子発現活性に有利な細胞内輸送経路に誘導された、という2点が要因として考えられた。これらの点に着目し、次章においては細胞内への複合体の取り込み機構および細胞内動態を解析した。

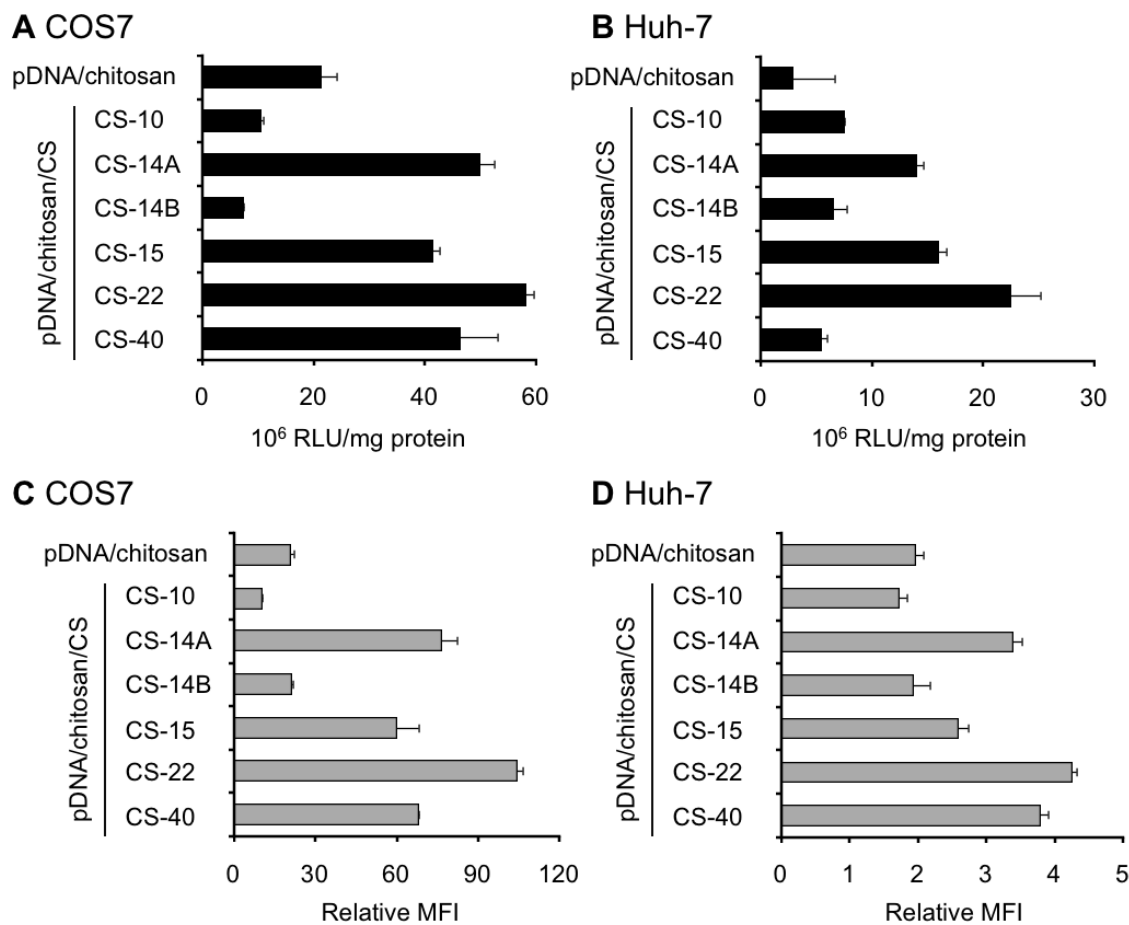


Fig. 2-10 三元複合体の(A,B)遺伝子発現活性と(C,D)取り込み量.
 (A,C) COS7 cells, (B,D)Huh-7 cells in DMEM containing 10% FBS. [pDNA]
 = 3 μ g/mL, Transfection time 4 h, Post transfection time 24 h,
 pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), n = 3.

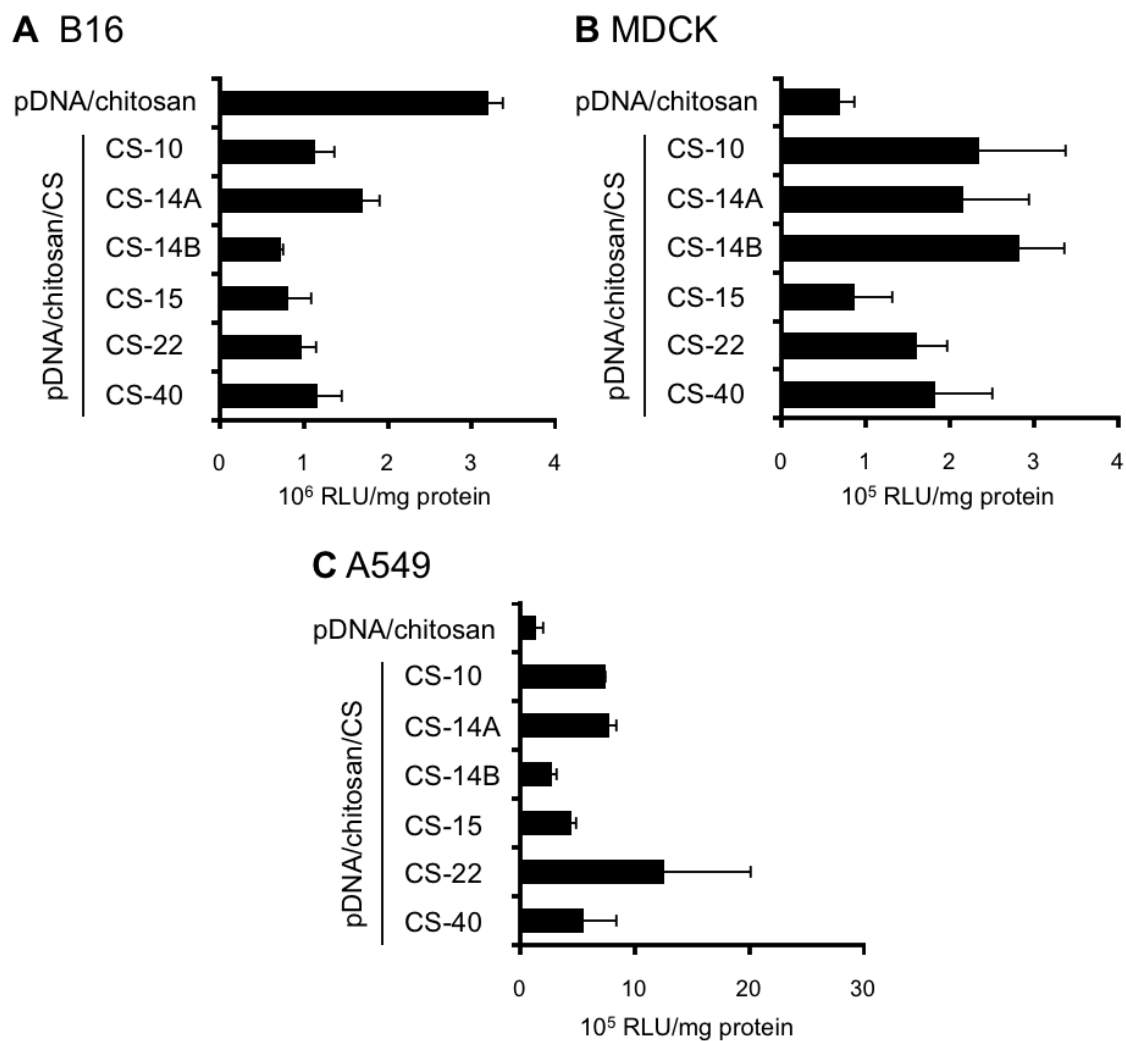


Fig. 2-11 種々の細胞における遺伝子発現活性

(A) B16 cells, (B) MDCK cells, (C) A549 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, Transfection time 4 h, Post transfection time 24 h, pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), n = 3.

(2) 組成比依存性

pDNA/キトサン/CS-22三元複合体の遺伝子発現活性の組成比依存性をFig. 2-12に示す。被覆に用いるCS-22の混合比をP:N:(-) = 1:5:4~32まで検討したところ、1:5:16で遺伝子発現活性は最大を示した。三元複合体は、1:5:16でゼータ電位が極小値-40mV程度をとった点を考慮すると、この組成比において複合体はCSによって完全に被覆され、最大の効果、すなわち遺伝子発現活性が最大になったと考えられる。以後、CS-22三元複合体は1:5:16を至適組成比とした。

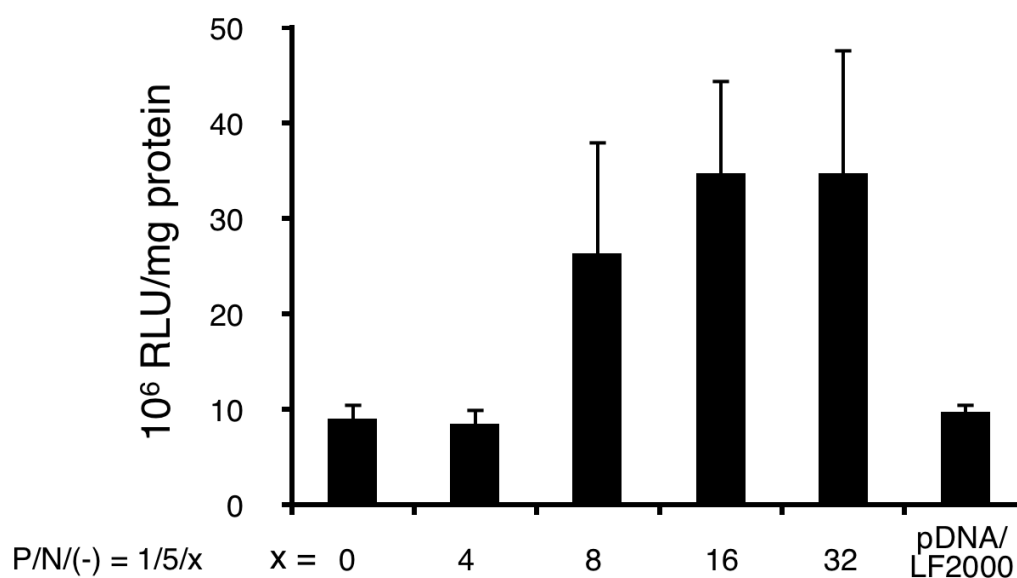


Fig. 2-12 遺伝子発現活性の組成比依存性

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μg/mL, Transfection time 4 h, Post transfection time 24 h, pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:4, 8, 16, 32), pDNA/LF2000 (Lipofectamine2000), n = 3.

(3) インキュベーション時間依存性

pDNA複合体の遺伝子発現活性と細胞との相互作用時間の関係性について調べた。結果をFig. 2-13に示す。三元複合体は細胞との相互作用時間が2時間で遺伝子発現活性は最大となり、それ以上の相互作用は遺伝子発現活性に影響しなかった。一方、pDNA/キトサン複合体は細胞との相互作用が4時間で遺伝子発現活性が最大となった。この違いは、細胞内に複合体が取り込まれるスピードの違いを反映したものと考えられ、三元複合体においては取り込みがpDNA/キトサン複合体よりも短時間で行われている可能性が示唆された。

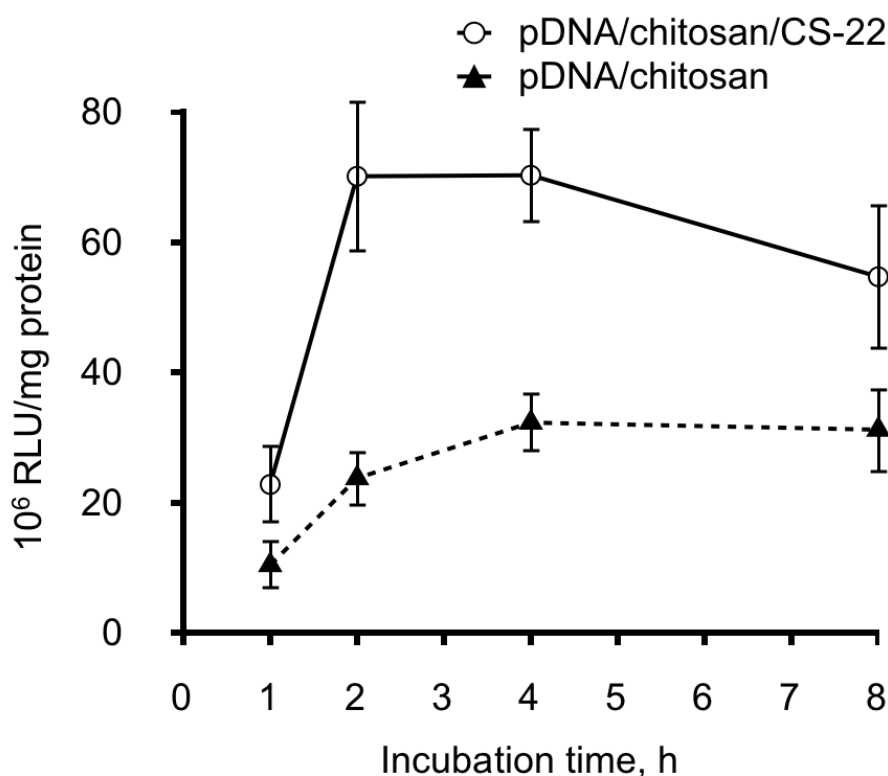


Fig. 2-13 遺伝子発現活性のインキュベーション依存性

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, Transfection time 1, 2, 4, 8 h, Post transfection time 27, 26, 24, 20 h, pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:4, 8, 16, 32), n = 3.

(4) pDNA濃度依存性

細胞との相互作用時のpDNA濃度と遺伝子発現活性の関係性について検討した。結果をFig. 2-14に示す。pDNA濃度が3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のとき、pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/CS-22三元複合体の遺伝子発現活性は十分に高い値を示し、この濃度において遺伝子発現活性を評価することは妥当であることが示された。

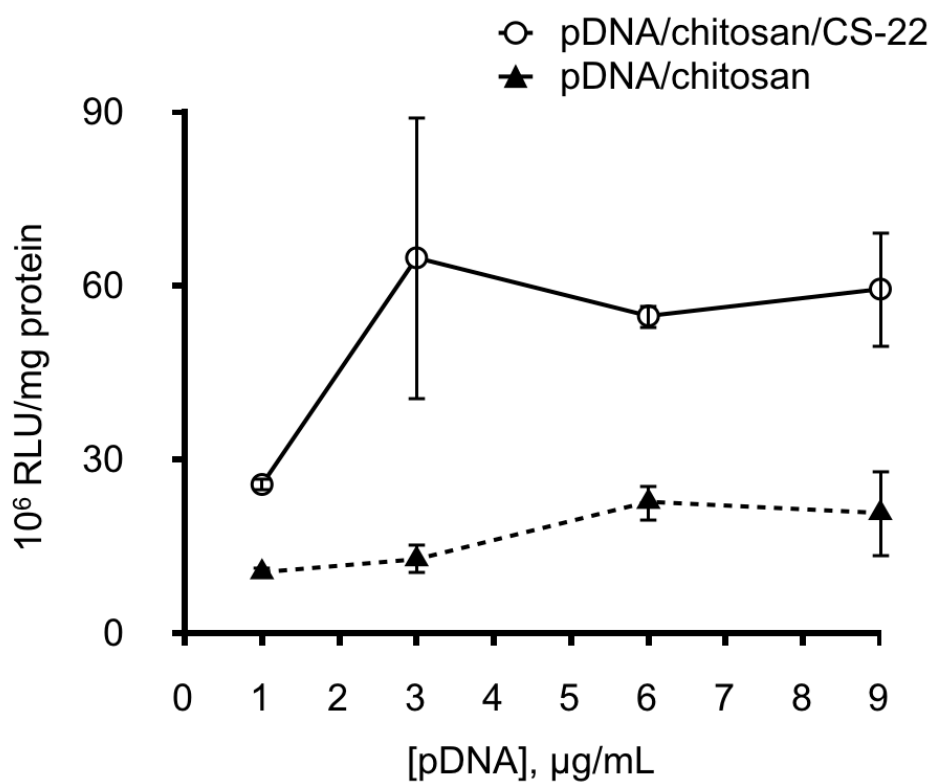


Fig. 2-14 遺伝子発現活性の pDNA 濃度依存性

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 1, 3, 6, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Transfection time 4 h, Post transfection time 24 h, pDNA/chitosan (P:N = 1:5), pDNA/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:4, 8, 16, 32), n = 3.

(5) ポストトランスフェクション時間依存性

pDNA複合体による遺伝子発現活性のポストトランスフェクション時間依存性を検討した。結果をFig. 2-15に示す。

両複合体において遺伝子発現活性が最大となる時間が異なり、CS-22三元複合体に関してはポストトランスフェクション時間が48時間、pDNA/キトサン複合体では72時間であった。この差については、細胞内部への複合体の取り込みから核到達・転写翻訳までの時間の違いが反映されているものと考えられる。

さらに、ポストトランスフェクション時間が168時間（7日）において、三元複合体と比較してpDNA/キトサン複合体による遺伝子発現活性が大きく低下していた。この点は、両複合体の迎る細胞内動態の違いを示唆するものであり、詳細に関して次項で検討した。

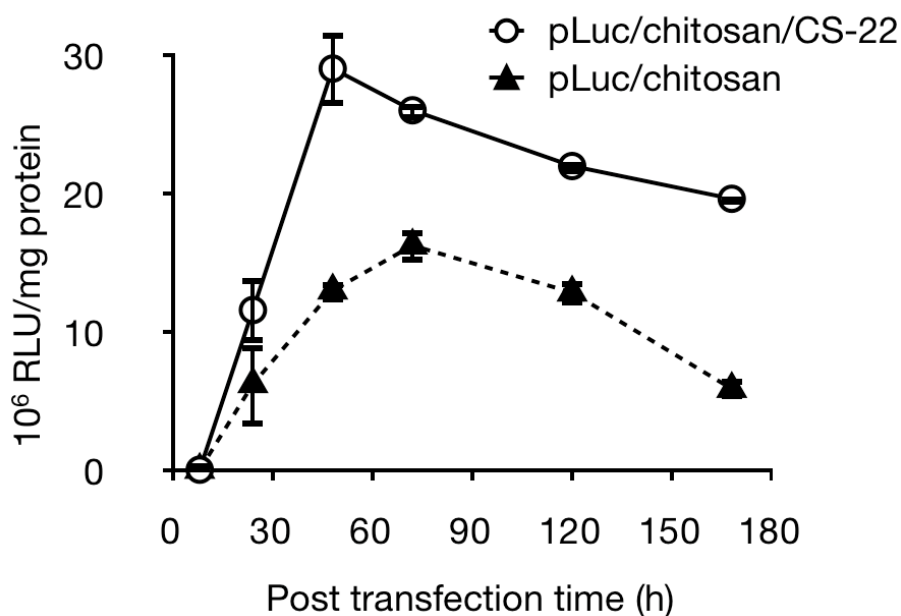


Fig. 2-15 遺伝子発現活性の Post transfection time 依存性.

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, transfection time = 4 h, post transfection time = 8, 24, 48, 72, 120, 168 h, n = 6.

2.3.2.2 細胞毒性評価

テトラゾリウム塩であるWST-1は、生細胞の代謝活性によってフォルマザン色素に還元される。フォルマザン色素量は培養細胞の代謝活性と直接比例するため、WST-1アッセイによって複合体の細胞毒性を評価することが可能である。pDNA複合体と細胞との所定時間インキュベーション後におけるWST-1アッセイの結果をFig. 2-16に示す。

pDNA濃度3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で4時間インキュベーション後、pDNA/PEI複合体、pDNA/キトサン複合体、pDNA/キトサン/CS三元複合体の細胞毒性は認められなかった(Fig. 2-16A 左図)。24時間インキュベーション後も細胞生存率は80%以上を示した(Fig. 2-16B 左図)。しかしながら、pDNA/PEI複合体はpDNA濃度依存的に細胞生存率の低下が認められ、4時間インキュベーション後には30%程度 (Fig. 2-16A 右図)、24時間インキュベーション後は80%程度(Fig. 2-16B 右図)の細胞毒性が生じた。一方、pDNA/キトサンとpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はpDNA濃度が24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で4時間または24時間インキュベーション後も80%以上の細胞生存率を示した。これらのデータより、pDNA/キトサン複合体およびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はpDNA/PEI複合体よりも低毒性であり、本研究での実験条件に準拠した遺伝子導入時には細胞毒性による悪影響は誘起されていないことが示唆された。

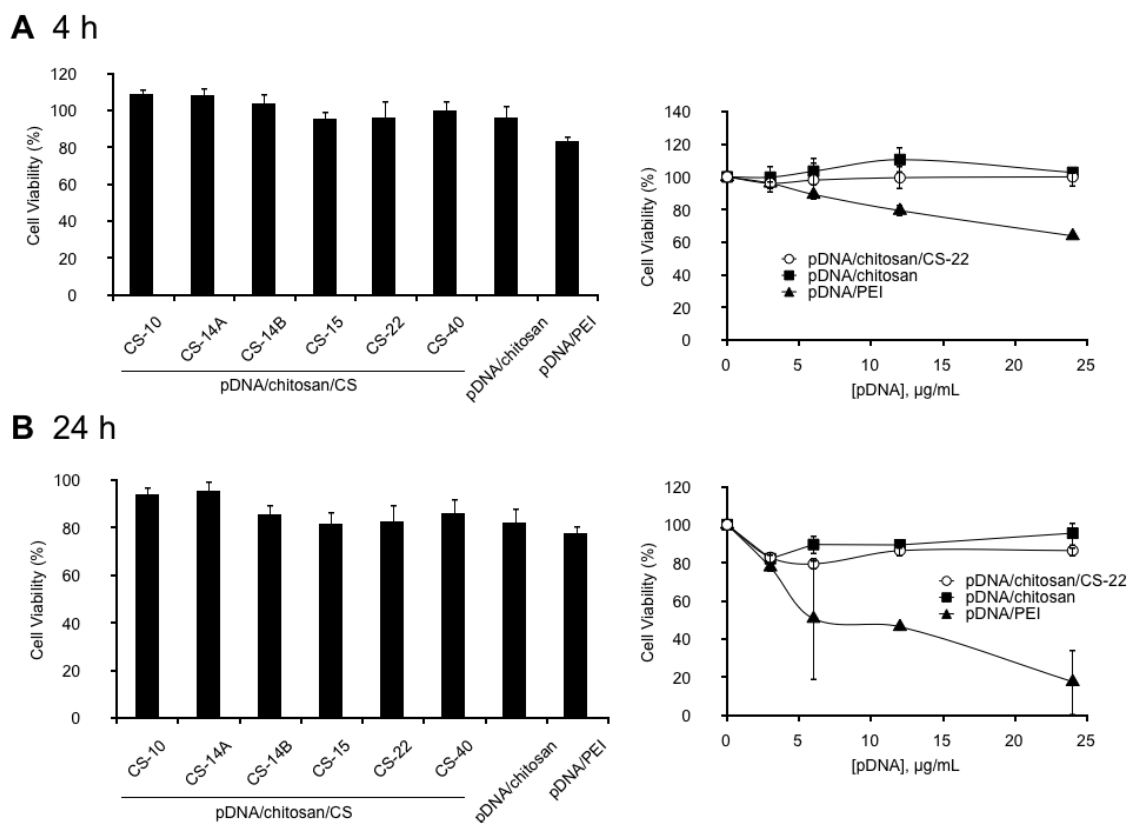


Fig. 2-16 WST-1 アッセイによる複合体の毒性評価

(A) 4 時間インキュベーション, (B) 24 時間インキュベーション

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3, 6, 9, 12, 24 $\mu\text{g/mL}$, Transfection time: 4, 24h, pDNA/PEI (P:N = 1:5), pDNA/キトサン (P:N = 1:5), pDNA/キトサン/CS (P:N:(-) = 1:5:16), n = 3

2.3.2.3 小括

本項では、pDNA/キトサン複合体とpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を用いて種々の細胞株に遺伝子導入を行い、遺伝子発現活性と細胞内取り込み量を評価した。また、遺伝子発現活性のトランスフェクション条件依存性や複合体の細胞毒性を検討した。

COS7, Huh-7細胞においては、巨大粒子を形成するCS-10およびCS-14B三元複合体で遺伝子発現活性はpDNA/キトサン複合体よりも低い値を示し、CS-22

三元複合体で最大の遺伝子発現活性を示した。CS-22三元複合体の至適組成比を複合体形成能、粒子径、ゼータ電位、遺伝子発現活性の観点から検討し、P:N:(-) = 1:5:16と決定した。COS7, Huh-7細胞において三元複合体の遺伝子発現活性が向上した理由は、複合体の細胞内取り込み量が増加したことに起因していた。他の細胞種 (B16, MDCK, A549細胞) での三元複合体の遺伝子発現活性の検討結果より、pDNA/キトサン複合体よりも低い値を示す細胞種も存在する事が分かった。細胞の種類でCS被覆による効果に違いが認められた点は、細胞表面でのコンドロイチン硫酸の認識性や細胞内動態といった遺伝子発現機構の違いによるものと考えられる。

遺伝子発現活性が最大を示すまでに必要な細胞とpDNA複合体のインキュベーション時間にはpDNA/キトサン複合体と三元複合体で差があり、三元複合体の方が迅速に細胞内に取り込まれていることが示唆された。トランスフェクション時のpDNA濃度と遺伝子発現活性の関係性を検討した結果、pDNA濃度が3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が妥当な条件であることが確認された。さらに、遺伝子発現活性のポストトランスフェクション時間依存性の検討により、三元複合体はpDNA/キトサン複合体と比較して早い時間から最大の遺伝子発現活性を示し、7日後においても高い値を維持していた。

WST-1アッセイで複合体の細胞毒性を評価したところ、pDNA/キトサンおよびpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸複合体は高濃度で24時間インキュベーション後もCOS7細胞において有意な細胞毒性は観察されなかった。

以上より、適切なコンドロイチン硫酸で被覆された三元複合体は、pDNA/キトサン複合体と比較して細胞内取り込み量および遺伝子発現活性が向上し、

有用な遺伝子キャリアーであることが示された。次項においては、pDNA/キトサン複合体と CS-22 三元複合体の細胞内動態について多角的に検討した。

2.3.3 細胞内への取り込み過程および細胞内動態の解析

2.3.3.1 エンドサイトーシス過程

(1) 阻害剤による影響

Transferrin、Cholera toxin β subunit、Dextran はそれぞれクラスリン介在型エンドサイトーシス、カベオラ介在型エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれる[22]。各エンドサイトーシス阻害剤での処理後に細胞内へのこれらの因子の取り込み量を評価することで、薬剤処理の効果、すなわち目的のエンドサイトーシス経路が抑制されているか検討した。結果を以下の Fig. 2-17~Fig. 2-19 に示す。

Chlorpromazine は、エンドソーム膜に存在するクラスリンの集合-脱重合を妨げ、クラスリン介在型エンドサイトーシスを阻害する[4,5]。COS7 細胞において Chlorpromazine 処理後に Transferrin の取り込み量はコントロールと比較して有意に減少したことから、クラスリン介在型エンドサイトーシスが抑制されていることが示された (Fig. 2-17)。

M β CD, Filipin は、共に細胞膜に存在するコレステロールに作用することで脂質ラフトを不安定化し、カベオラ介在型エンドサイトーシスを阻害する[6,7]。Filipin または M β CD 処理後に Cholera toxin β subunit の取り込み量が有意に減少したことから、カベオラ介在型エンドサイトーシスが抑制されていること

が確認された(Fig. 2-18)。

また、Cytochalasin D と Wortmannin は、アクチンフィラメントのダイナミクスを阻害することでマクロピノサイトーシスを抑制する[8,9]。

Wortmannin または Cytochalasin D 処理後に Dextran の取り込み量が有意に減少したことから、マクロピノサイトーシス経路が抑制されていることが示された (Fig. 2-19)。

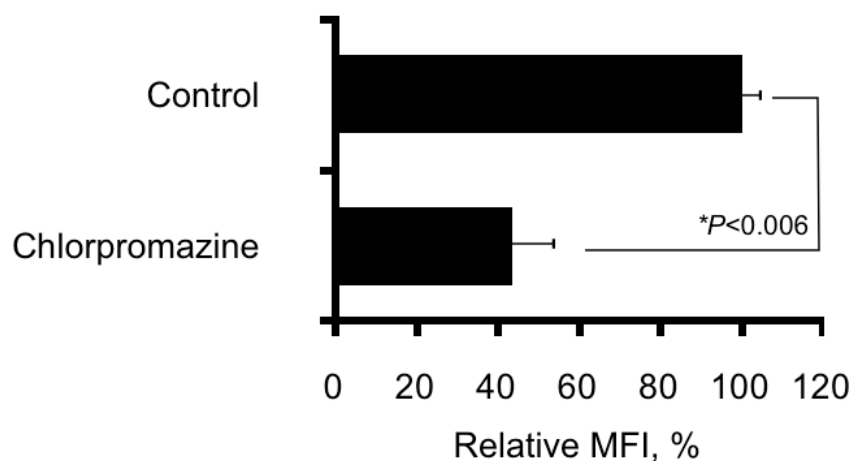


Fig. 2-17 COS7 細胞における Alexa Fluor 488-Transferrin の取り込み量
After pre-treatment of chlorpromazine, COS7 cells treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Alexa Fluor 488-Transferrin for 4 h. Control cells were defined as 100%.
Student's t test, * $P < 0.006$, $n = 3$.

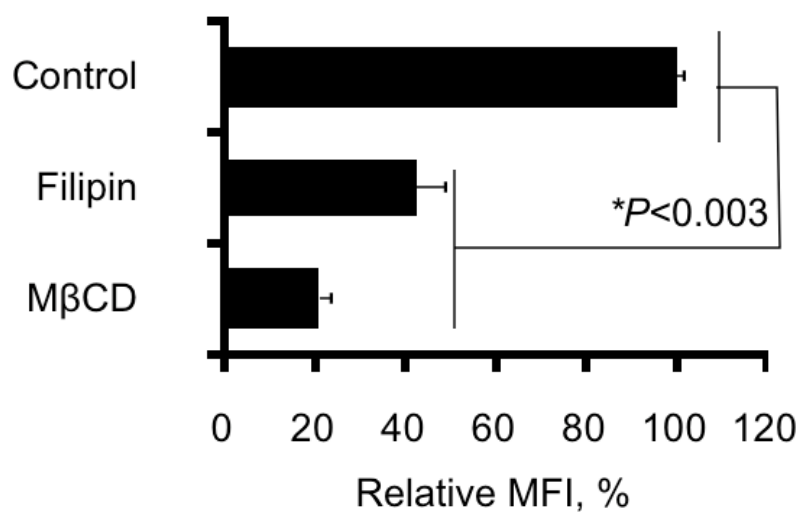


Fig. 2-18 COS7 細胞における FITC-Cholera Toxin β Subunit の取り込み量
After pre-treatment of Filipin or M β CD, COS7 cells treated with 15.6 nM FITC-Cholera Toxin β Subunit for 4 h. Control cells were defined as 100%. Student's t test, * $P < 0.003$, $n = 3$.

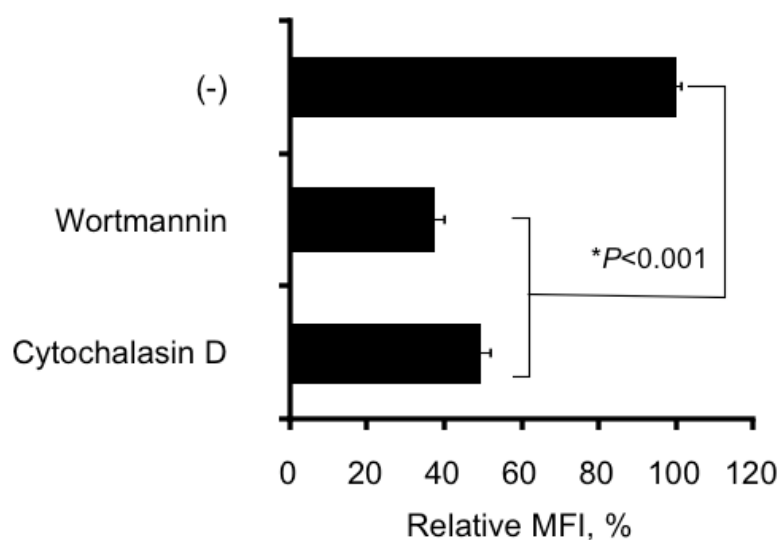


Fig. 2-19 COS7 細胞における FITC-Dextran の取り込み量
After pre-treatment of Wortmannin or Cytochalasin D, COS7 cells treated with 0.5 mg/mL FITC-Dextran for 4 h. Control cells were defined as 100%. Student's t test, * $P < 0.001$, $n = 3$.

細胞内への pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の取り込み機構を明らかにするために、各種エンドサイトーシス経路を遮断し、遺伝子発現活性または細胞内取り込み量を調べた。阻害剤処理後の COS7 細胞における三元複合体の遺伝子発現と取り込み量の結果を Fig. 2-20 に、阻害剤処理後の Huh-7 細胞における三元複合体の遺伝子発現活性の結果を Fig. 2-21 に示す。

COS7 細胞において、阻害剤未処理時と比較し Chlorpromazine 処理後に pDNA/キトサン複合体または pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体による遺伝子発現活性および細胞内取り込み量に有意な低下は認められなかった。したがって、両複合体のエンドサイトーシス過程にクラスリン介在型エンドサイトーシスは関与していないことが示唆された。なお、このとき三元複合体の遺伝子発現活性と細胞内取り込み量が 1.5~2 倍程度に亢進していた。類似した現象は Van らによって報告されており、あるエンドサイトーシス経路を遮断することによって別種のエンドサイトーシス経路が活性化されたと考えられる[23]。この場合は、クラスリン介在型エンドサイトーシス経路の遮断によりカベオラ介在型エンドサイトーシスまたはマクロピノサイトーシス経路が亢進されたものと推察される。MβCD または Filipin 処理時には、pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性および細胞内取り込み量は阻害剤未処理時と比較して 20%程度低下したのに対し、三元複合体の場合に有意な変動は認められなかった。よって、カベオラ介在型エンドサイトーシスは pDNA/キトサン複合体の COS7 細胞内取り込みに一部関与していた一方、三元複合体の取り込みに関与していないことが示唆された。Wortmannin または Cytochalasin D 処理時には、両複

合体の遺伝子発現活性および取り込み量が大きく減少した。したがって、pDNA/キトサン複合体および三元複合体の大部分はマクロピノサイトーシスによって COS7 細胞内に取り込まれていることが明らかになった。

Huh-7 細胞においては、Chlorpromazine, MβCD, および Filipin 処理時に両複合体の遺伝子発現活性と細胞内取り込み量に変化は認められなかった。よって、クラスリン介在型エンドサイトーシスとカベオラ介在型エンドサイトーシスの関与は低いと考えられる。なお、Huh-7 細胞はカベオラ介在型エンドサイトーシスが恒常的に起こらないことが報告されており [24]、今回の結果を支持するものである。Wortmannin または Cytochalasin D 処理時には、両複合体の遺伝子発現活性と取り込み量は大きく低下したことから、Huh-7 細胞においても pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体はマクロピノサイトーシスによって大部分が取り込まれていることが分かった。

これらの結果より、コンドロイチン硫酸認識受容体を有すると予想される特定の細胞種においては CS 被覆でマクロピノサイトーシスによる細胞内取り込みが亢進される可能性が示唆された。

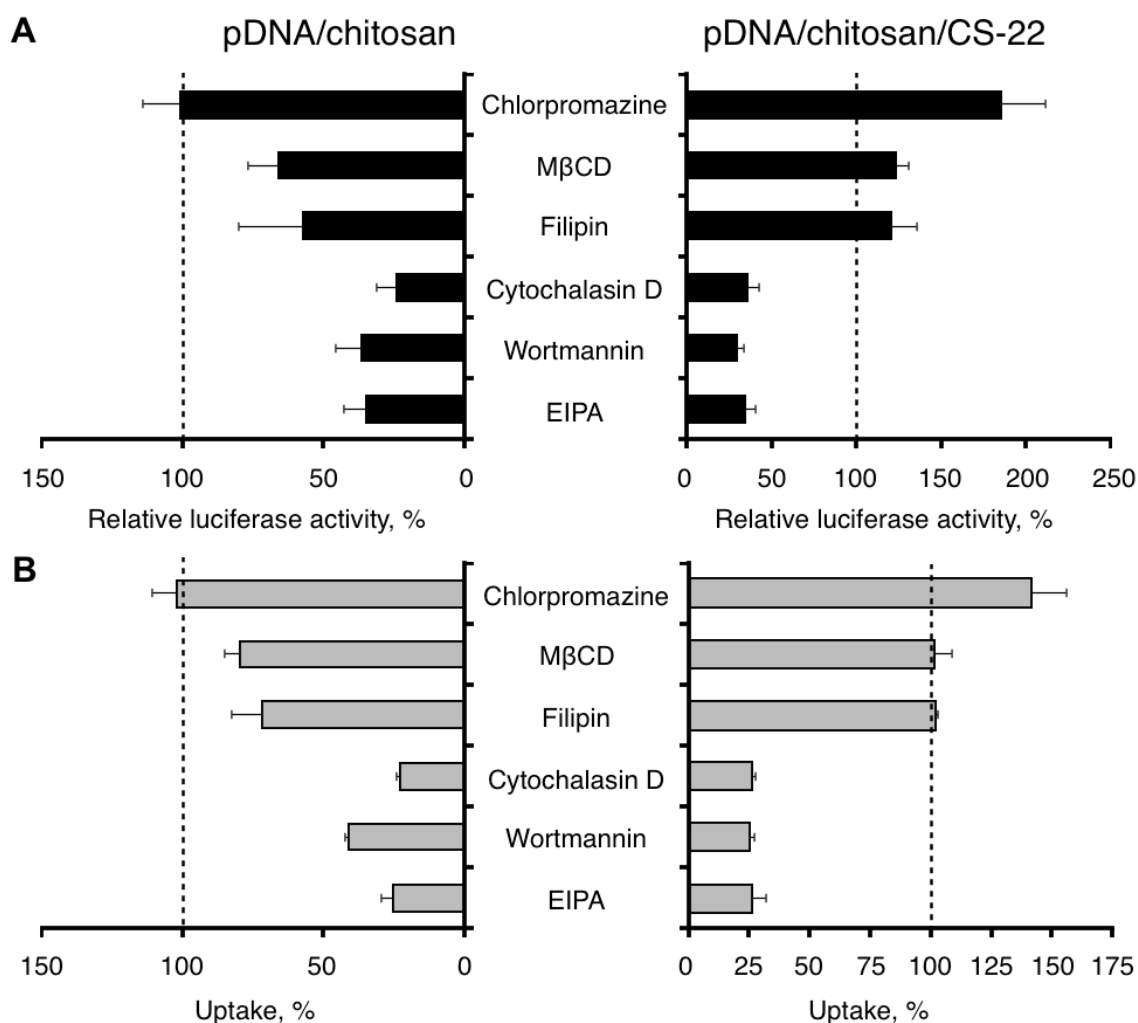


Fig. 2-20 COS7 細胞におけるエンドサイトーシス阻害剤処理後の三元複合体の (A) 遺伝子発現活性と (B) 取り込み量
 COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, (A) pLuc/chitosan (P:N = 1:5), pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 4 h, post transfection time = 24 h, (B) YOYO-1 pLuc/chitosan (P:N = 1:5), YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 4 h; Control cells were defined as 100%. n = 3.

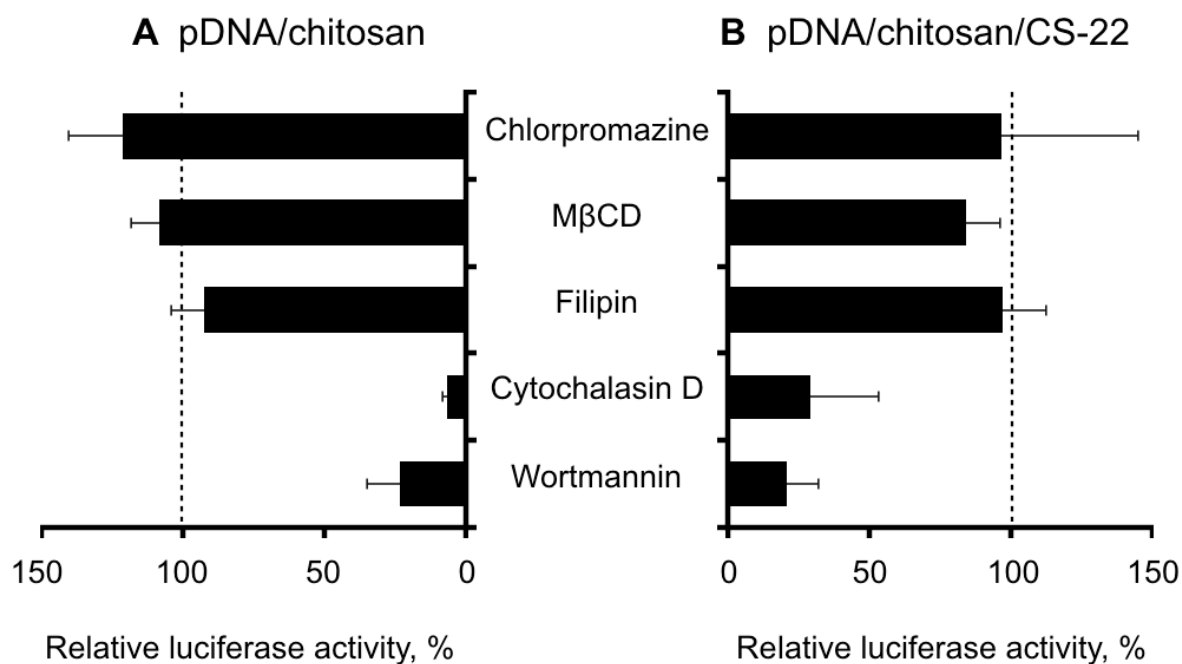


Fig. 2-21 Huh-7 細胞におけるエンドサイトーシス阻害剤処理後の
三元複合体の遺伝子発現活性

Huh-7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, (A) pLuc/chitosan (P:N = 1:5), (B) pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 4 h, post transfection time = 24 h, Control cells were defined as 100%. n = 3.

(2) Caveolin-1 および Clathrin heavy chain のノックダウン

化学阻害剤 (Chlorpromazine, M β CD, Fillipin) を用いた検討により、COS7 細胞においては pDNA/キトサン複合体の一部がカベオラ介在型エンドサイトーシスを介す一方で、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体はクラスリン介在型エンドサイトーシスおよびカベオラ介在型エンドサイトーシスの関与は低いことが示唆された。この点に関してさらなる確証を得るために、クラスリン介在型エンドサイトーシスに必須なタンパク質である Clathrin heavy chain (CHC)、またはカベオラ介在型エンドサイトーシスに必須なタンパク質である Caveolin-1 (Cav-1) を siRNA によってノックダウンし、両複合体のエンドサイトーシス機構解析に及ぼす影響を検討した。

siRNA によるトランスフェクションから 48, 72 時間後の CHC と Cav-1 のタンパク質レベルでの発現確認をウェスタンブロッティングにより行なった。結果をそれぞれ以下の Fig. 2-22 および Fig. 2-23 に示す。

siRNA によるトランスフェクションから 48 時間後、CHC および Cav-1 の発現量は内在性タンパク質の 40%程度に、72 時間後には 25-30%程度にまで低下した。したがって、これらのタンパク質のノックダウンによる pDNA 複合体の細胞内取り込みと遺伝子発現活性への影響を調べる際には、タンパク質レベルでの発現低下がより顕著なポストトランスフェクション 72 時間が至適条件と判断された。

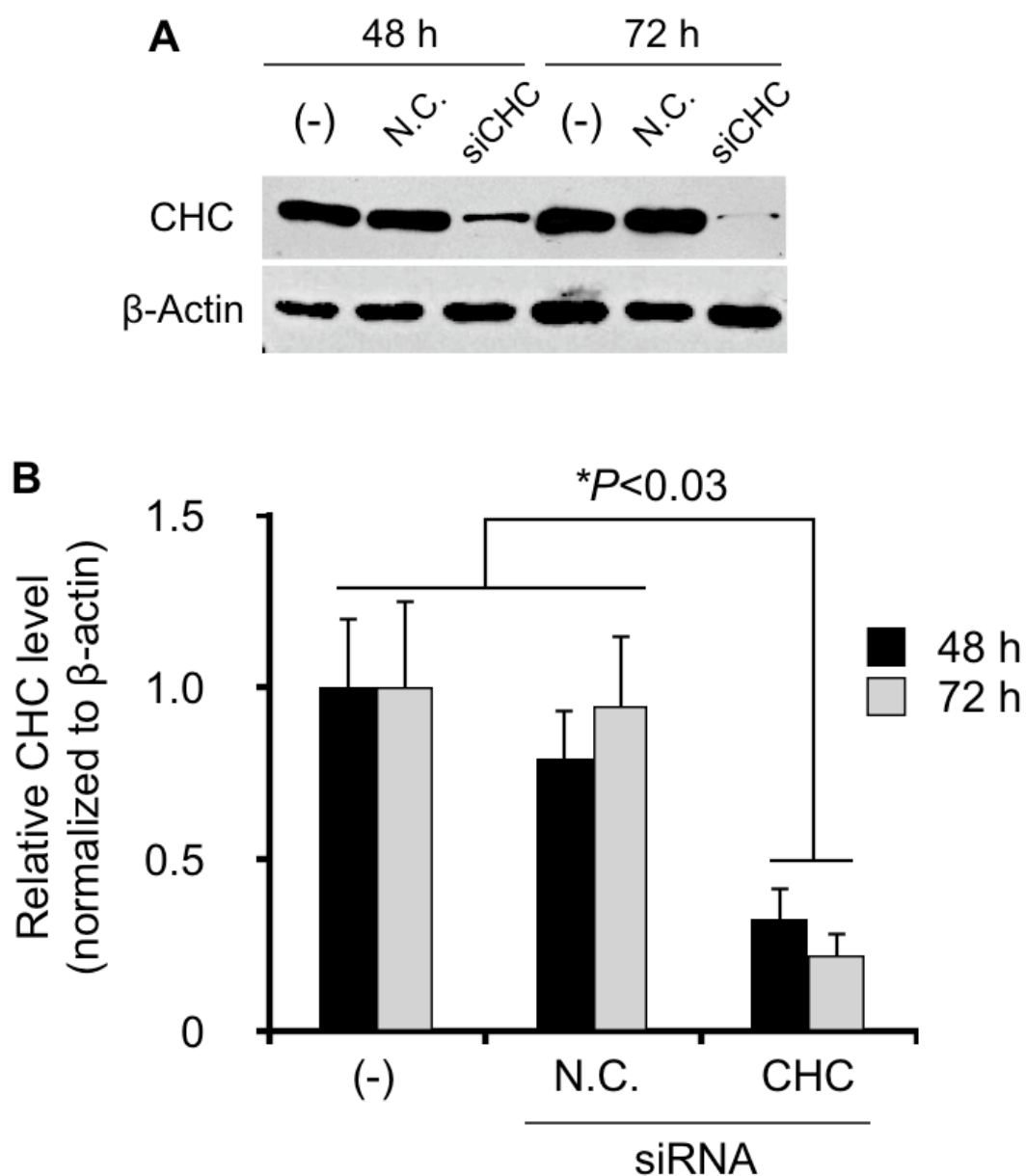


Fig. 2-22 ウェスタンブロッティングによる Clathrin heavy chain の発現確認
 (A) (-): RNAiMAX, N.C.: siRNA-Negative Control/RNAiMAX, siCHC: siRNA-CHC/RNAiMAX, (B) Quantitative analysis of relative CHC expression level after siRNA transfection., Student's t test, $*P < 0.03$, $n = 3$.

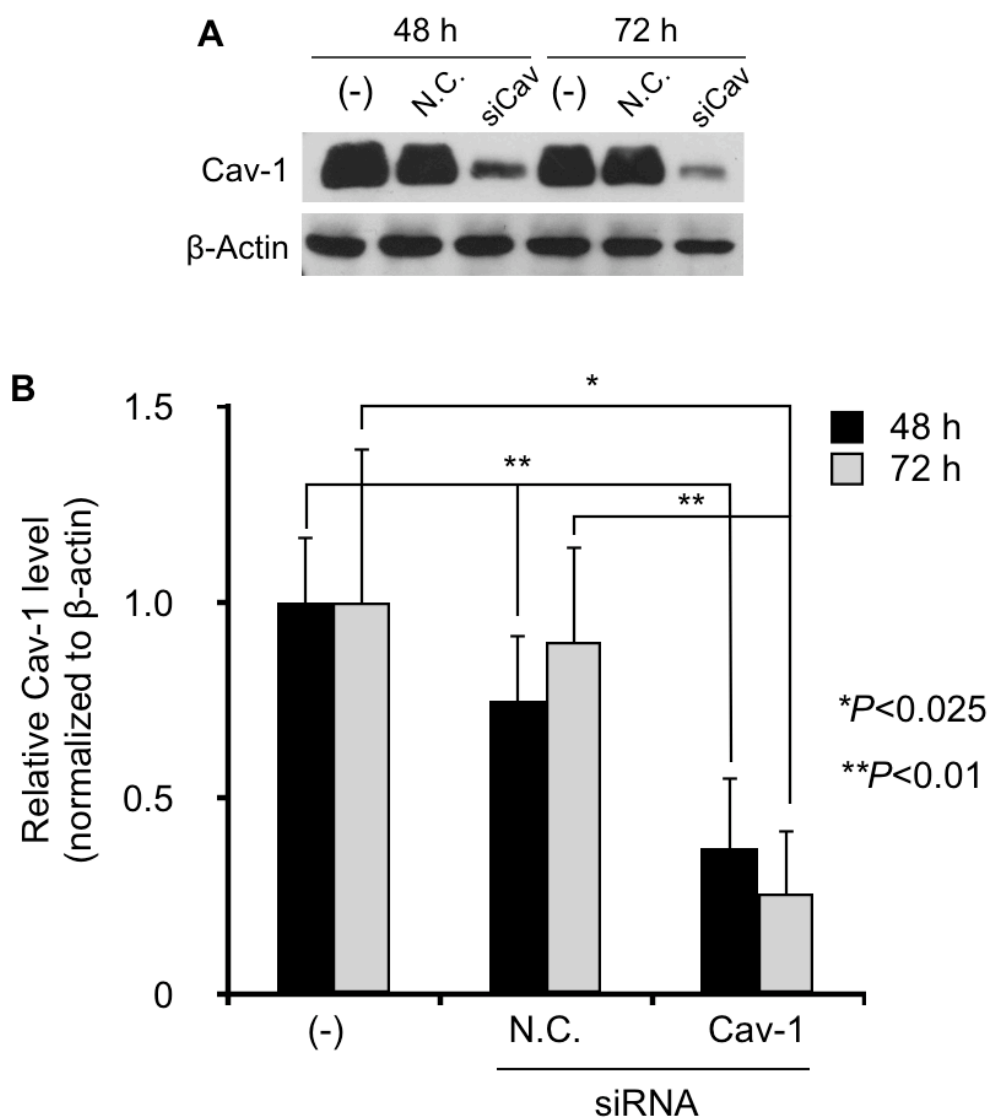


Fig. 2-23 ウェスタンブロッティングによる Cav-1 の発現確認
 (A) (-): RNAiMAX のみ, N.C.: siRNA-Negative Control/RNAiMAX, siCav: siRNA-Cav-1/RNAiMAX, (B) Quantitative analysis of relative Cav-1 expression level after siRNA transfection., Student's t test, * $P < 0.025$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

次に、CHC または Cav-1 の発現低下の表現型としてクラスリン介在型エンドサイトーシスまたはカベオラ介在型エンドサイトーシスが抑制されているか調べた。siRNA による CHC または Cav-1 ノックダウン後の Transferrin または Cholera toxin β Subunit の COS7 細胞内取り込み量をフローサイトメトリーにより測定した。結果をそれぞれ、以下の Fig. 2-24 および Fig. 2-25 に示す。

キャリアー単独およびネガティブコントロール siRNA 投与時の Alexa Fluor 488-Transferrin の COS7 細胞内取り込み量を 100%としたとき、siRNA による CHC ノックダウン後には取り込み量が有意に低下し 40%程度を示した。したがって、CHC ノックダウン後の表現型としてクラスリン介在型エンドサイトーシスが抑制されていることが確認できた。

同様に、Cav-1 ノックダウン後にはキャリアー単独およびネガティブコントロール siRNA 投与群と比較して FITC-Cholera Toxin β Subunit の COS7 細胞内取り込み量は有意に低下し、20%程度を示した。よって、Cav-1 ノックダウン後にカベオラ介在型エンドサイトーシスが抑制されていること示された。

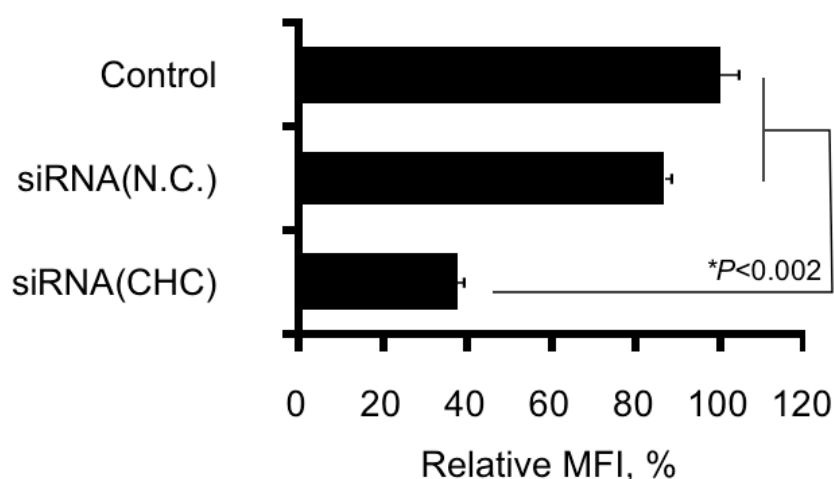


Fig. 2-24 Alexa Fluor 488-Transferrin の COS7 細胞内取り込み量
 COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, After siRNA transfection ([siRNA] = 50 nM, transfection time = 5 h, Post transfection time = 72 h), the cells were treated with 50 μ g/mL Alexa Fluor 488-Transferrin for 4 h. Control cells were defined as 100%. Student's t test, $*P < 0.002$, $n = 3$.

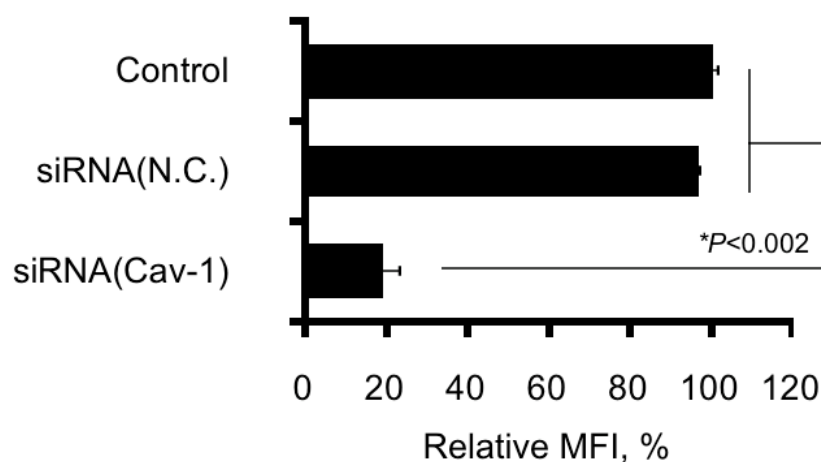


Fig. 2-25 FITC-Cholera Toxin β Subunit の COS7 細胞内取り込み量
 COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, After siRNA transfection ([siRNA] = 50 nM, transfection time = 5 h, Post transfection time = 72 h), the cells were treated with 15.6 nM FITC-Cholera Toxin β Subunit for 4 h. Control cells were defined as 100%. Student's t test, $*P < 0.002$, $n = 3$.

COS7 細胞の CHC または Cav-1 を siRNA でノックダウンし、pDNA/キトサン複合体または pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体を投与した。pDNA 複合体によるトランスフェクションから 24 時間後におけるルシフェラーゼ遺伝子発現活性を以下の Fig. 2-26(A,B)に、トランスフェクション後の細胞内取り込み量を Fig. 2-26(C,D)に示す。

ネガティブコントロール配列または CHC ノックダウン時には、pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性はキャリアー単独投与時と同程度であったのに対し、Cav-1 ノックダウン時には 60%程度に低下した。一方、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体ではネガティブコントロール配列、CHC および Cav-1 ノックダウン時に遺伝子発現活性の有意な低下は認められなかった。

同様に、フローサイトメトリーによる複合体の細胞内取り込み量の結果より、Cav-1 ノックダウン時に pDNA/キトサン複合体の取り込み量が減少した。

Cav-1 ノックダウン時に pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性および取り込み量が低下したという結果は、pDNA/キトサン複合体の一部がカベオラ介在型エンドサイトーシスによって COS7 細胞内に取り込まれる点を支持するものと考えられる。

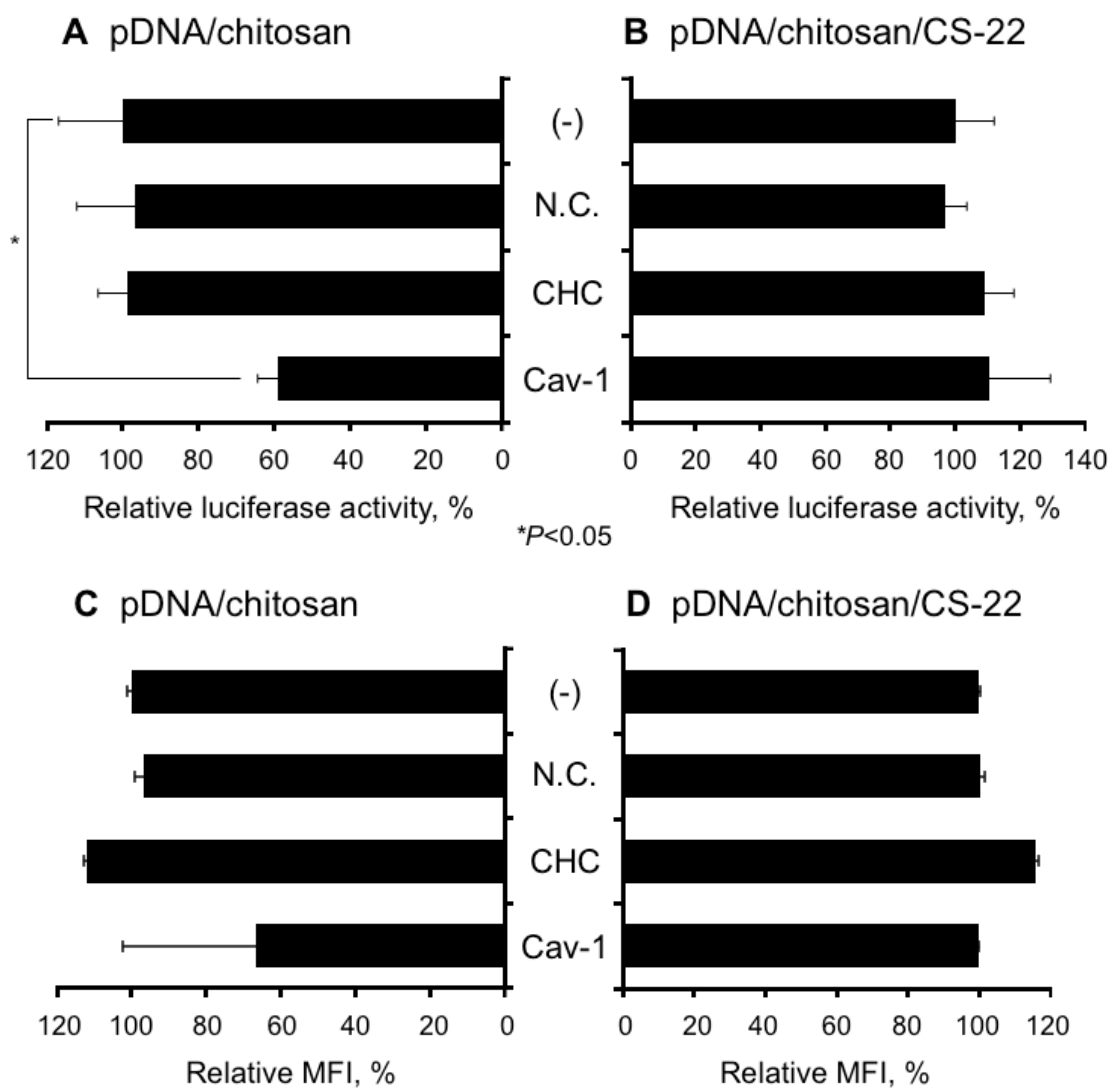


Fig. 2-26 COS7 細胞における Caveolin-1 または Clathrin heavy chain ノック
 ダウン後の pDNA 複合体の(A,B)遺伝子発現活性と(C,D)取り込み量
 COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, After siRNA transfection
 ([siRNA] = 50 nM, transfection time = 5 h, Post transfection time = 72 h),
 the cells were treated with the pDNA complexes. (A) pLuc/chitosan (P:N =
 1:5), (B) pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), [pDNA] = 3 μ g/mL,
 transfection time = 4 h, post transfection time = 24 h, (C) YOYO-1
 pLuc/chitosan (P:N = 1:5), (D) YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) =
 1:5:16), [pDNA] = 3 μ g/mL, transfection time = 4 h, Control cells were
 defined as 100%. Student's t test, *P < 0.05, n = 3.

(3) F-Actin の動態観察

Wortmannin, Cytochalasin D を用いた阻害実験より、pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体はマクロピノサイトーシスによって COS7 細胞および Huh-7 細胞内に取り込まれることが示唆された (Fig. 2-20)。本項では、三元複合体を COS7 細胞に投与後、ファロイジンを用いて F-Actin のダイナミクスを観察しマクロピノサイトーシスが活性化されているか検討した。

ファロイジンとアクチンの解離定数は 17 nM 程度であり特異的に結合するため[25]、蛍光標識したファロイジンを用いて固定化した細胞のアクチンを可視化できる。ファロイジンの構造式を Fig. 2-27 に示す。

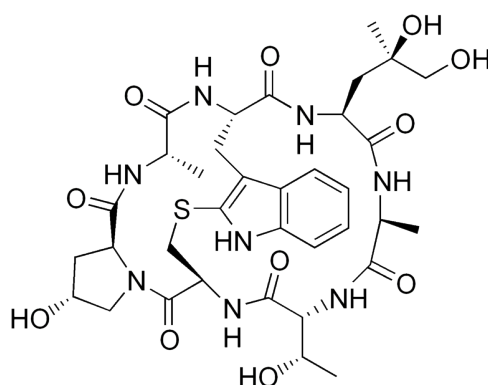


Fig. 2-27 ファロイジンの構造式

COS7 細胞に pDNA、キトサン、コンドロイチン硫酸、EGF、pDNA/キトサン複合体、または pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を投与し、Alexa Fluor 578-ファロイジンによって可視化された F-Actin を蛍光顕微鏡で観察した。蛍光像を Fig. 2-28 に示す。

DMEM、pH 6.5 DMEM、pDNA、キトサン、pDNA/キトサン添加時には、

全体的に蛍光強度が低く、細胞全体にアクチン分子が分散して存在する様子が観察された。これらのサンプルで処理した場合には、COS7 細胞膜付近で Actin の再構成は起こっていないと考えられる。

一方、EGF、CS-22、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体添加時には、特に細胞膜付近で蛍光強度の高い繊維状物質の集積が確認された。これは、外部因子刺激によって細胞膜付近で F-Actin の再構成が促されたものと考えられる。

EGF 処理した細胞の蛍光像においては、葉状仮足（ラメリポディア）様のアクチン骨格ダイナミクスが認められた。コンドロイチン硫酸またはコンドロイチン硫酸三元複合体で処理した細胞の蛍光像では、マクロピノサイトーシス誘起の際に見られる細胞膜のラッフリング、および糸状仮足（フィロポディア）が観察された。Nakase らは、CHO-K1 細胞においてマクロピノサイトーシスを誘起して細胞内に取り込まれるオクタアルギニン（R8）ペプチド添加後には、細胞膜付近のアクチンフィラメントが再構成されることを報告している[26]。

これは R8 ペプチドの添加により、細胞膜のラッフリングや葉状仮足といったアクチンフィラメントのダイナミクスが誘起されたものと考えられている。コンドロイチン硫酸（三元複合体）添加後に、類似したアクチンダイナミクスが観察されたことは、コンドロイチン硫酸で被覆された三元複合体がマクロピノサイトーシスを誘起し COS7 細胞内への取り込みを促進する可能性を示唆する。

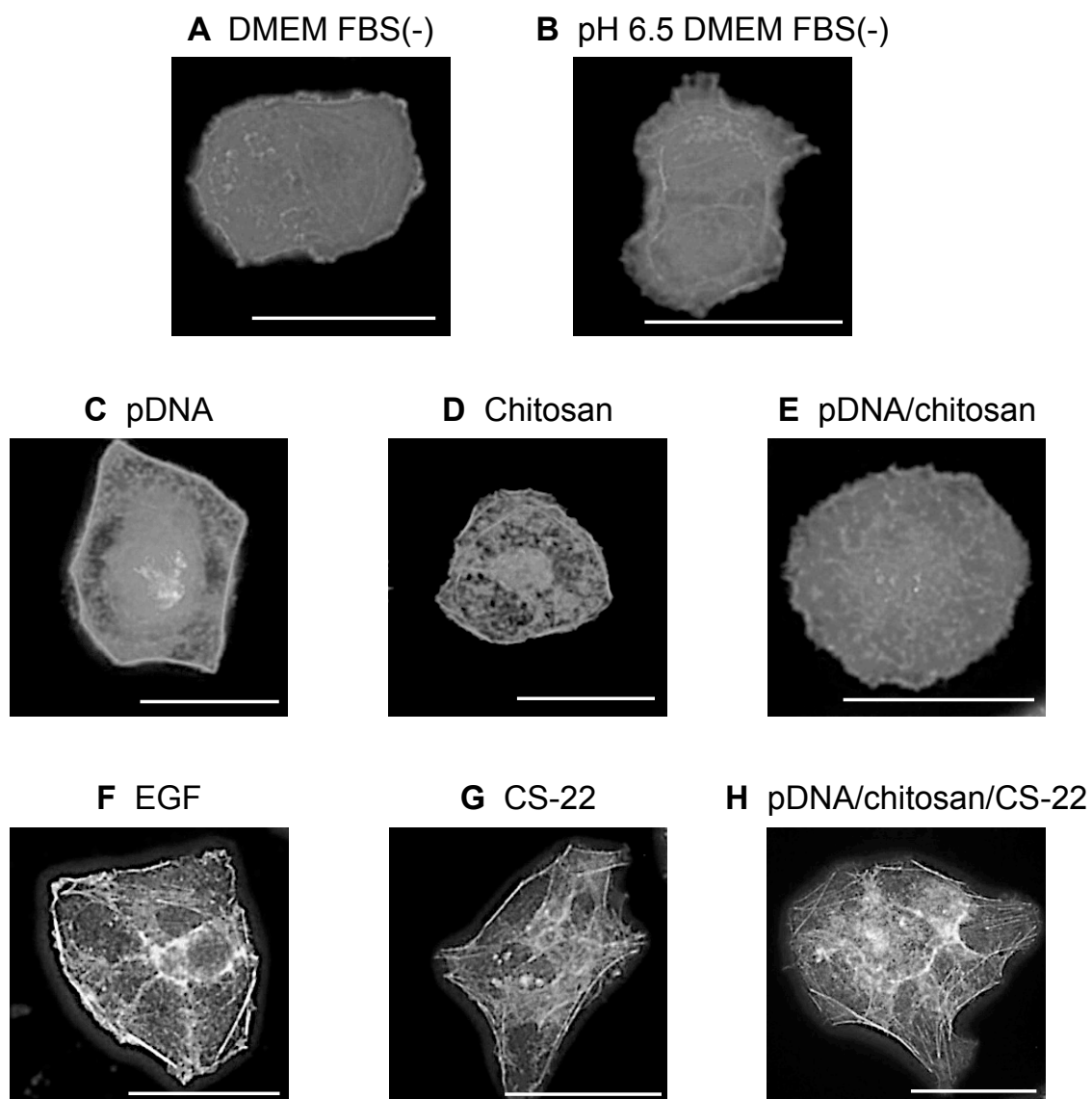


Fig. 2-28 F-Actin の蛍光観察像 (COS7 細胞)

(A) DMEM FBS(-), (B) pH 6.5 DMEM FBS(-), (C) pDNA, (D) Chitosan, (E) pDNA/chitosan (P:N = 1:5), (F) EGF 50 ng/mL, (G) CS-22, (H) pDNA/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), [pDNA] = 3 $\mu\text{g/mL}$, [chitosan] = 9.1 $\mu\text{g/mL}$, [CS-22] = 31.5 $\mu\text{g/mL}$, COS7 cells were treated with each sample for 5 min at 37 °C. Bar = 20 μm .

2.3.3.2 細胞内輸送経路

(1) 阻害剤による影響

細胞内に取り込まれた複合体が核に到達するまでの輸送経路を明確にするため、細胞内輸送経路阻害剤処理による遺伝子発現活性への影響を調べた。阻害剤処理後の COS7 細胞および Huh-7 細胞における遺伝子発現活性を Fig. 2-29 および Fig. 2-30 にそれぞれ示す。

N-Ethylmaleimide (NEM) は、NEM sensitive fusion protein (NSF) タンパク質によるエンドソーム融合機構の阻害剤である[11]。NEM 処理細胞においては、エンドサイトーシスによって形成された小胞が初期エンドソームと融合されなくなる。NEM 処理した COS7 細胞において、pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の遺伝子発現活性は有意に低下した。したがって、両複合体はエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、初期エンドソーム/後期エンドソーム経路へと輸送されることが示唆された。

1.4.3 で述べた通り、キトサンは弱酸性条件下において脱プロトン化しているキトサンのアミノ基がエンドソーム内に流入したプロトンを緩衝する「プロトンスポンジ効果」を示す。また、キトサンが pDNA やコンドロイチン硫酸と複合体を形成した後も同効果を有することが示された(Fig. 2-9)。エンドソーム内部でキトサンがプロトンスポンジ効果を発揮することで、エンドソームの破裂と複合体の細胞質中への脱出が促される。本項では、pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体がプロトンスポンジ効果によってエンドソームから脱出するか検討するため、バフィロマイシン A1 とモネンシン

を用いた阻害実験を行なった。バフィロマイシン A1 は、エンドソーム膜に存在するプロトンポンプ特異的な阻害剤であり、エンドソーム内部の酸性化を妨げる[12]。モネンシンは、膜間の陽イオン交換 (Na^+/H^+) を促進し、エンドソーム内の pH 上昇を引き起こす[13]。バフィロマイシン A1 またはモネンシン処理 COS7 細胞および Huh-7 細胞において、pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性は 70~90%程度の阻害効果が認められた。したがって、エンドソーム内へのプロトンの流入により、pDNA/キトサン複合体がエンドソームから細胞質中に脱出していることが示された。また、コンドロイチン硫酸で被覆された三元複合体の遺伝子発現活性も 50~70%程度阻害された。三元複合体のエンドソーム脱出にも、エンドソーム内へのプロトン流入が関与することが示唆された。Fig. 2-9 の複合体溶液の滴定実験において、三元複合体溶液はキトサン溶液および pDNA/キトサン複合体溶液と同程度のバッファリング能を示したというデータは、三元複合体もプロトンスポンジ効果によってエンドソームから脱出する可能性を支持するものである。

続いて、複合体の細胞内輸送経路に微小管輸送が関与しているか検討した。微小管は、核周辺の微小管形成中心から細胞内全体に広く張り巡らされ、その働きの1つとして細胞内外への物質輸送に携わることが知られている。ノコダゾールは、微小管重合を妨げ小胞の微小管輸送を阻害する[14,15]。ノコダゾール処理 COS7 細胞においては、pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性が 2 倍程度に亢進された一方、三元複合体で有意な変動は認められなかった。ノコダゾール処理後、pDNA/キトサン複合体は微小管輸送によるライソゾームへの移行が妨げられたことで遺伝子発現活性が向上したと考えられる。コンドロイ

チン硫酸三元複合体は細胞内に取り込まれた後、迅速にエンドソームから脱出し、核付近までの移動に微小管輸送が関与しないことが推察された。ノコダゾール処理した Huh-7 細胞においては、両複合体の遺伝子発現活性に変化は認められなかったため、微小管輸送は関与していないことが示唆された。pDNA/キトサン複合体の細胞内輸送経路は、Huh-7 細胞と COS7 細胞で異なる可能性がある。

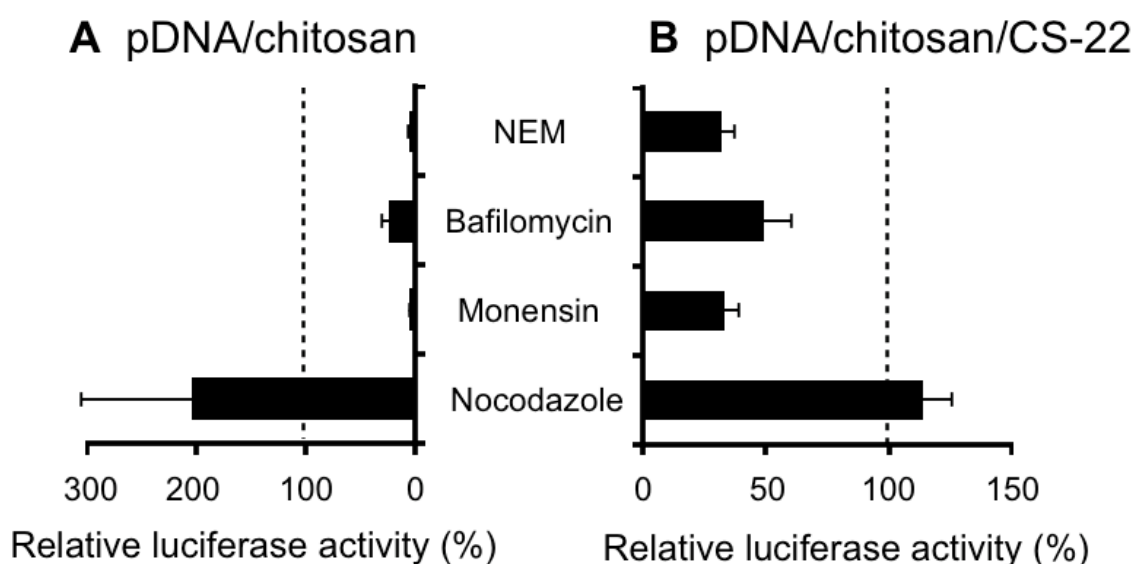


Fig. 2-29 COS7 細胞における細胞内輸送経路阻害剤処理後の三元複合体の遺伝子発現活性

COS7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, (A) pLuc/chitosan (P:N = 1:5), (B) pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 4 h, post transfection time = 24 h, Control cells were defined as 100%. n = 3.

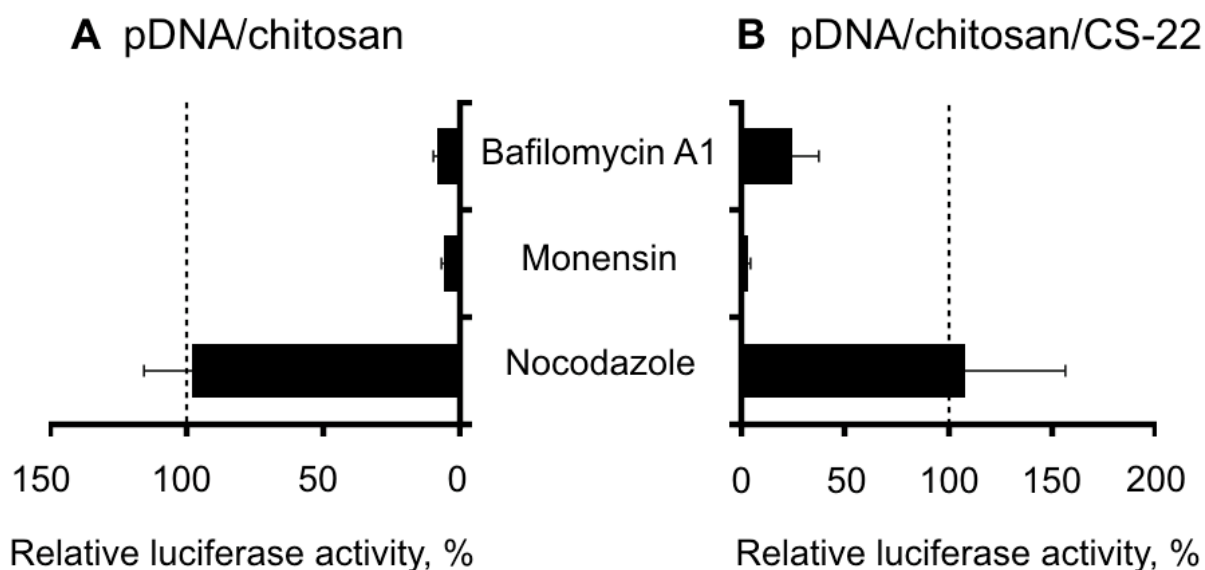


Fig. 2-30 Huh-7 細胞における細胞内輸送経路阻害剤処理後の三元複合体の遺伝子発現活性

Huh-7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, (A) pLuc/chitosan (P:N = 1:5), (B) pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 4 h, post transfection time = 24 h, Control cells were defined as 100%. n = 3.

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による複合体の共局在観察

pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/CS 三元複合体がエンドソームから脱出するタイミングを明らかにするために、FM4-64 標識エンドソームと YOYO-1 標識 pDNA 複合体の COS7 細胞内での局在を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。トランスフェクションから 4 時間後における蛍光像を Fig. 2-31 および Fig. 2-32 に示す。

トランスフェクションから 4 時間後、大部分の pDNA/キトサン複合体はエンドソームと共局在していた (Fig. 2-31)。一方、同時間において三元複合体はエンドソームから脱出し、細胞質に局在する様子が観察された (Fig. 2-32)。これ

らの結果より、pDNA/キトサン複合体と比較し、三元複合体の方が迅速にエンドソームから脱出する可能性が示唆された。

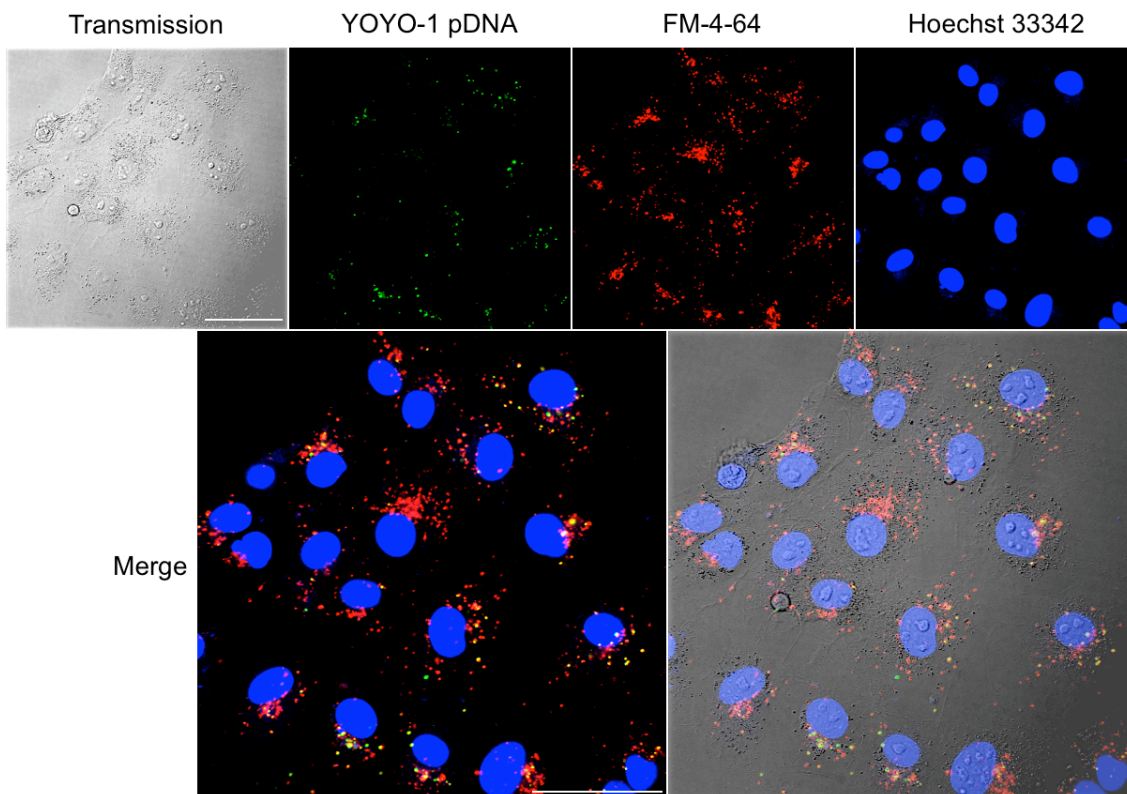


Fig. 2-31 トランスフェクションから4時間後における pDNA/キトサン複合体とエンドソームの局在 (COS7 細胞)

COS7 cells in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/DMEM F12, COS7 cells were treated with YOYO-1 pLuc/chitosan (P:N = 1:5) in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FM4-64 containing pH 6.5 DMEM 10% FBS. transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5 h, [pDNA] = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merge: Left panel = YOYO-1/FM4-64/Hoechst 33342, Right panel = Transmission/YOYO-1/FM4-64/Hoechst 33342, Bar = 20 μm .

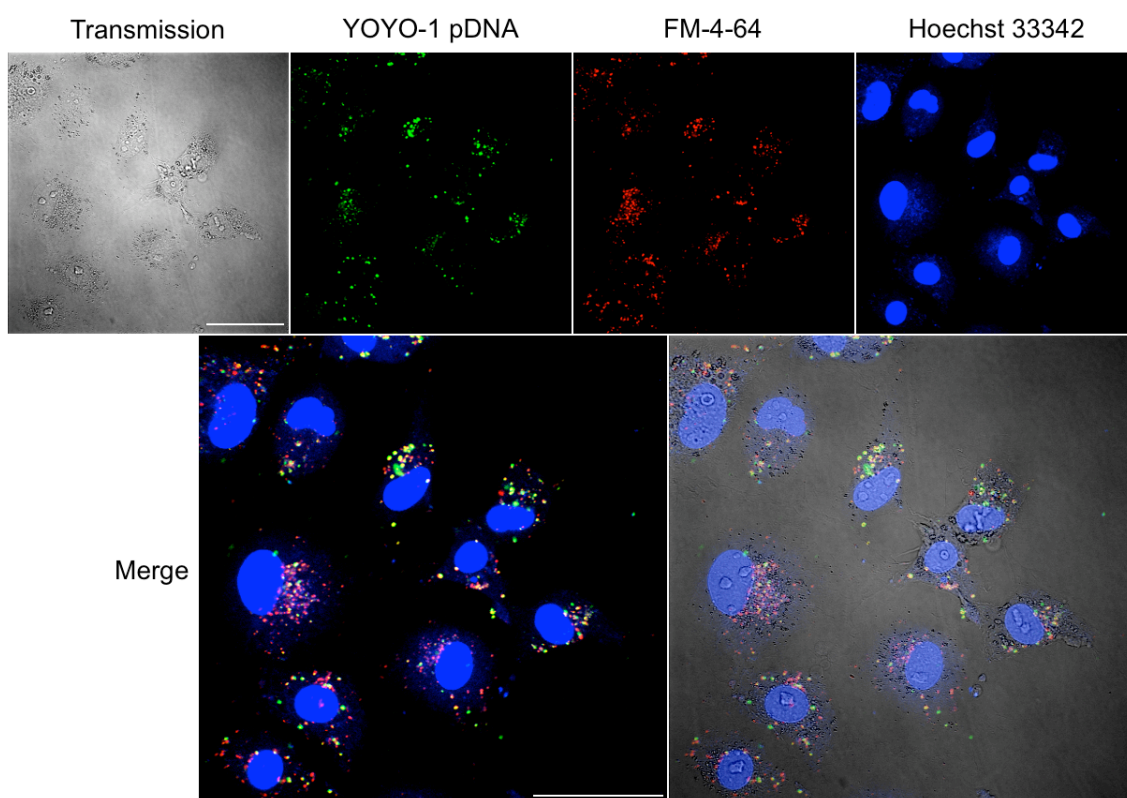


Fig. 2-32 トランスフェクションから 4 時間後における pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体とエンドソームの局在 (COS7 細胞)

COS7 cells in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/DMEM F12, COS7 cells were treated with YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16) in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FM4-64 containing pH 6.5 DMEM 10% FBS. transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5 h, [pDNA] = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merge: Left panel = YOYO-1/FM4-64/Hoechst 33342, Right panel = Transmission/YOYO-1/FM4-64/Hoechst 33342, Bar = 20 μm .

細胞内に取り込まれた複合体がライソゾームに輸送されて分解を受けることは、遺伝子デリバリーにおいて大きな障壁の一つとなる。これまでに pDNA/キトサン複合体は、トランスフェクションから 4 時間後においてもエンドソーム内に留まることが示唆された。次に、pDNA/キトサン複合体を含むエンドソームがライソゾームと融合しているか LysoTracker を用いて検討した。

LysoTracker プローブは細胞膜透過性で酸性オルガネラに濃縮されるため、内部が酸性であるライソゾームを可視化できる。COS7 細胞および Huh7 細胞においてトランスフェクション 4 時間後の YOYO-1 標識 pDNA 複合体とライソゾームの局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。蛍光像を以下の Fig. 2-33 に示す。

COS7 細胞のトランスフェクションから 4 時間後、pDNA/キトサン複合体の一部は LysoTracker 標識ライソゾームと共局在していたが、三元複合体の大部分は細胞質中で観察された。pDNA/キトサン複合体は、三元複合体と比較してエンドソームから脱出するのが遅く、トランスフェクション 4 時間後からライソゾームに移行されている可能性が示唆された。一方、三元複合体は細胞内に取り込まれた後、ライソゾームに移行する前に大部分がエンドソームから脱出していると考えられる。Huh-7 細胞においては、両複合体はトランスフェクション 4 時間後からライソゾームとの共局在は観察されなかった。

これらの結果は、微小管輸送阻害剤であるノコダゾール処理時の遺伝子発現活性の結果と対応していた。ノコダゾール処理 COS7 細胞では、ライソゾームへの移行/分解経路が遮断され、pDNA/キトサン複合体の遺伝子発現活性が向上したが、ノコダゾール処理 Huh-7 細胞で有意な変動は認められなかった。すなわち、pDNA/キトサン複合体は COS7 細胞ではライソゾームに輸送されるが Huh-7 細胞では輸送されないという知見を支持する。

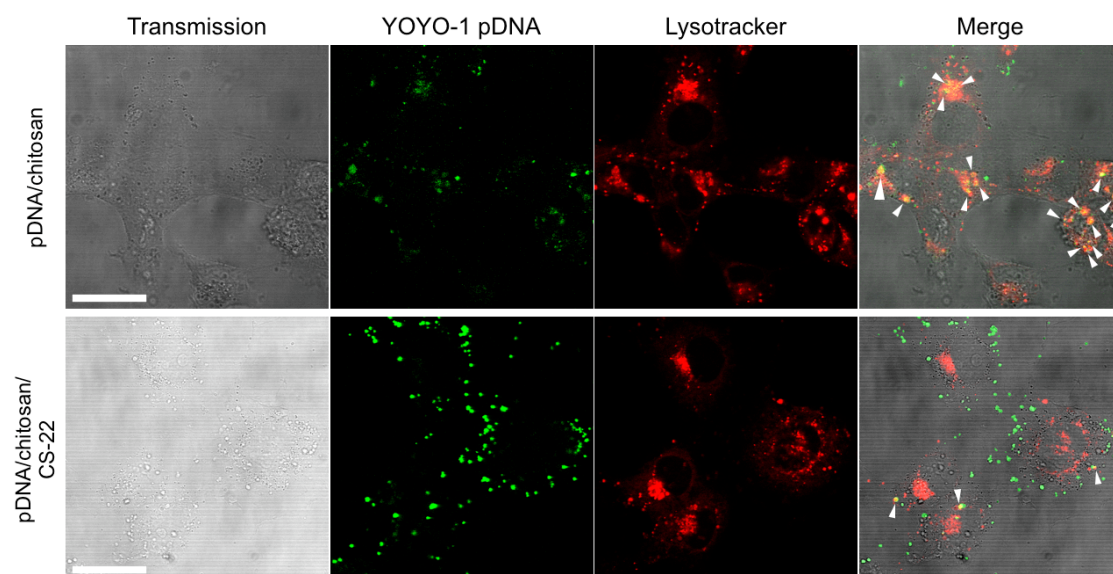
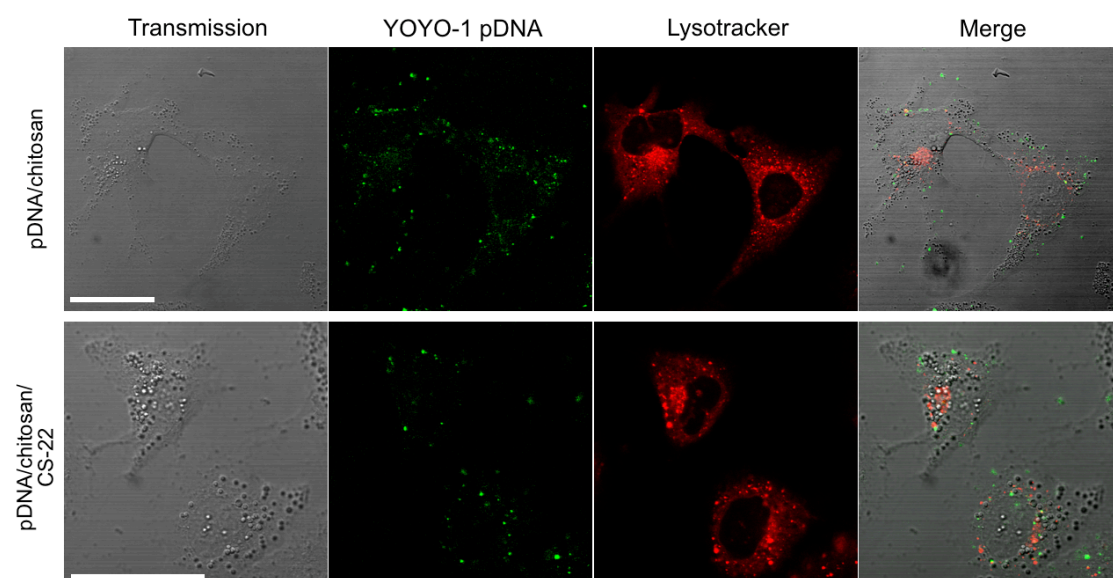
A COS7**B Huh-7**

Fig. 2-33 トランスフェクション 4 時間後の
pDNA 複合体とエンドソームの局在

(A) COS7 or (B) Huh-7 cells were treated with YOYO-1 pLuc/chitosan (P:N = 1:5) or YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16) in pH 6.5 DMEM 10% FBS. transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5 h, Lysosomes were stained with LysoTracker. [pDNA] = 3 μ g/mL, Merge: Transmission/YOYO-1/Lysotracker, Bar = 20 μ m.

pDNA 複合体が遺伝子発現に至るには、細胞外から細胞内部に取り込まれ、核に移行し mRNA への転写後、タンパク質に翻訳される必要がある。そこで、トランスフェクションから4時間または8時間後に核と pDNA 複合体の局在を調べた。Hoechst 33342 で染色した核と YOYO-1 標識 pDNA 三元複合体の COS7 細胞内での観察像を以下の Fig. 2-34 および Fig. 2-35 に示す。

トランスフェクション4時間または8時間後に、pDNA/キトサン複合体は COS7 細胞内に取り込まれ、一部は核内に局在する様子（白色）が観察された (Fig. 2-34)。この時、pDNA とキトサンは共局在していたことより、核内においても pDNA とキトサンは複合体を形成した状態で侵入していることが明らかになった。

pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体も同様に、トランスフェクション4時間または8時間後に細胞内に取り込まれ、一部が核内に存在する様子が観察された (Fig. 2-35)。pDNA/キトサン複合体と比較し三元複合体でトランスフェクションした場合は1細胞あたりに取り込まれる蛍光量が多い点は、フローサイトメトリーによる COS7 細胞内への取り込み量を測定した実験結果と対応している (Fig. 2-10)。細胞質および核内において、YOYO-1 標識 pDNA と TexasRed-キトサンが共局在していたことから、pDNA とキトサンは複合体化した状態を維持して存在することが分かった。

続いて、三元複合体は核内までコンドロイチン硫酸と複合体化した状態で侵入するか明らかにするために、YOYO-3 標識 pDNA/キトサン/FA-CS-22 (フルオレセインアミン標識 CS-22) 三元複合体の COS7 細胞内での局在を観察した。トランスフェクションから4時間後または8時間後の蛍光像を Fig. 2-36 に示

す。

トランスフェクション4時間または8時間後から核内に侵入した三元複合体の蛍光像が観察された。このとき、核内においてYOYO-3標識したpDNAとFA-CS-22(緑色)が共局在していたことから、pDNAとコンドロイチン硫酸は複合体を形成した状態で核内に侵入していたことが分かった。したがって、これまでの結果より、三元複合体でトランスフェクションした場合はpDNA・キトサン・コンドロイチン硫酸は解離せずに複合体を形成した状態で核内に移行していることが明らかになった。

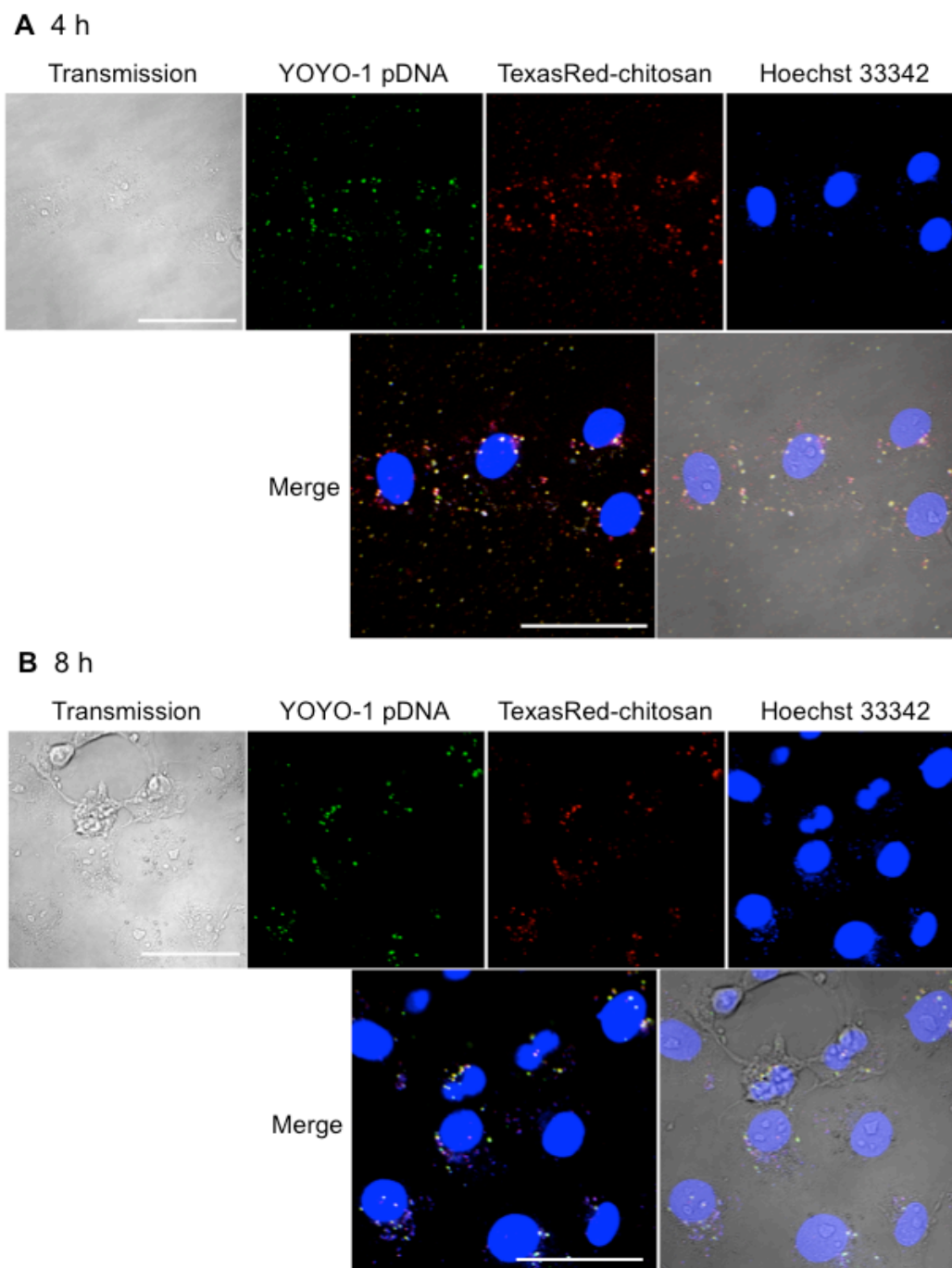


Fig. 2-34 トランスフェクションから (A) 4 時間後と (B) 8 時間後における pDNA/キトサン複合体の局在 (COS7 細胞)

COS7 cells in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/DMEM F12, COS7 cells were treated with YOYO-1 pLuc/TexasRed-chitosan (P:N = 1:5) in pH 6.5 DMEM 10% FBS. transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5 h, [pDNA] = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merge: Left panel = YOYO-1/TexasRed/Hoechst 33342, Right panel = Transmission/YOYO-1/TexasRed/Hoechst 33342, Bar = 20 μm .

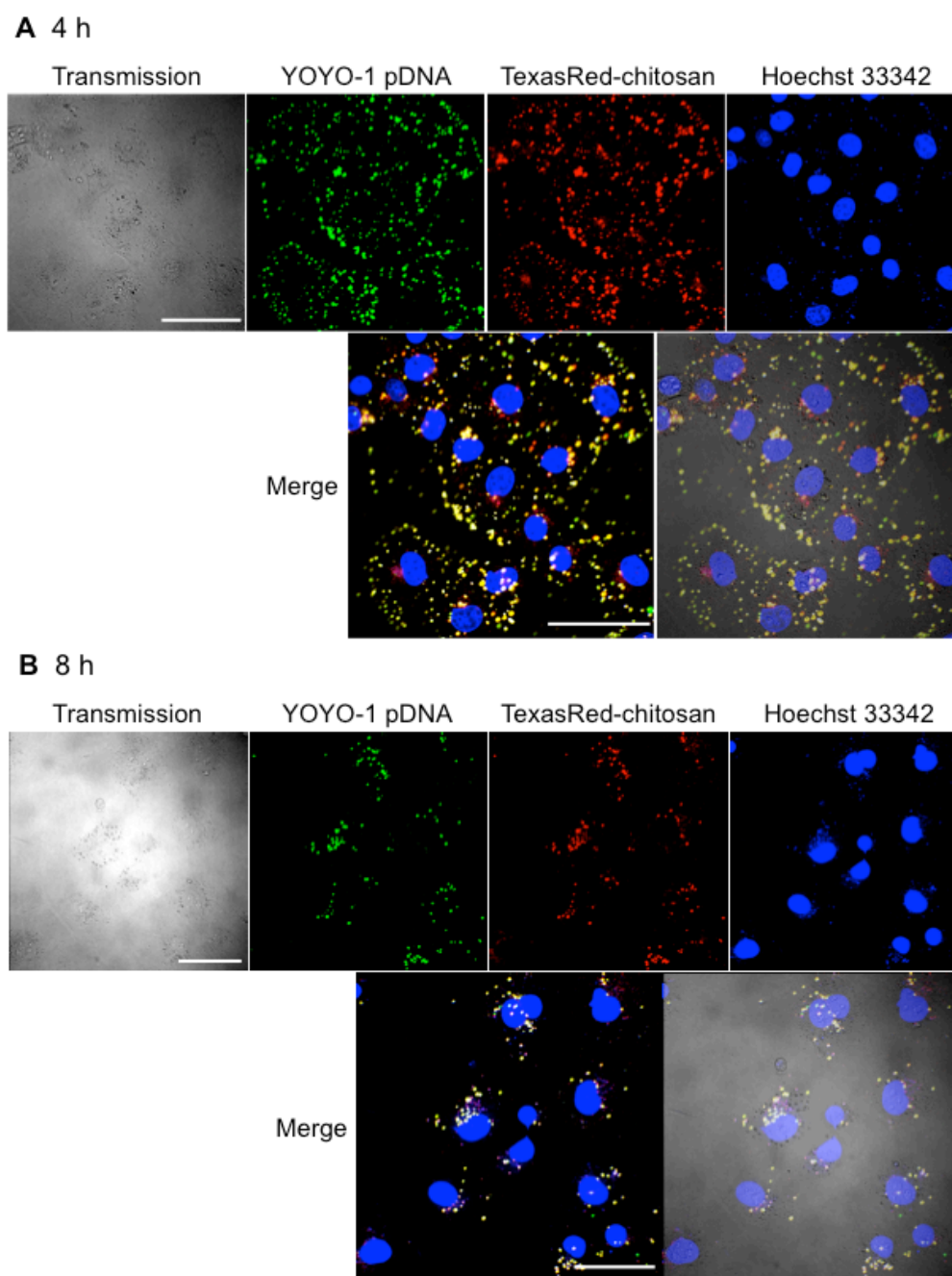


Fig. 2-35 トランスフェクションから (A) 4 時間後と (B) 8 時間後における pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の局在 (COS7 細胞)

COS7 cells in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/DMEM F12, COS7 cells were treated with YOYO-1 pLuc/TexasRed-chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16) in pH 6.5 DMEM 10% FBS. transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5 h, 4.5 h. [pDNA] = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merge: Left panel = YOYO-1/TexasRed/Hoechst 33342, Right panel = Transmission/YOYO-1/TexasRed/Hoechst 33342, Bar = 20 μm .

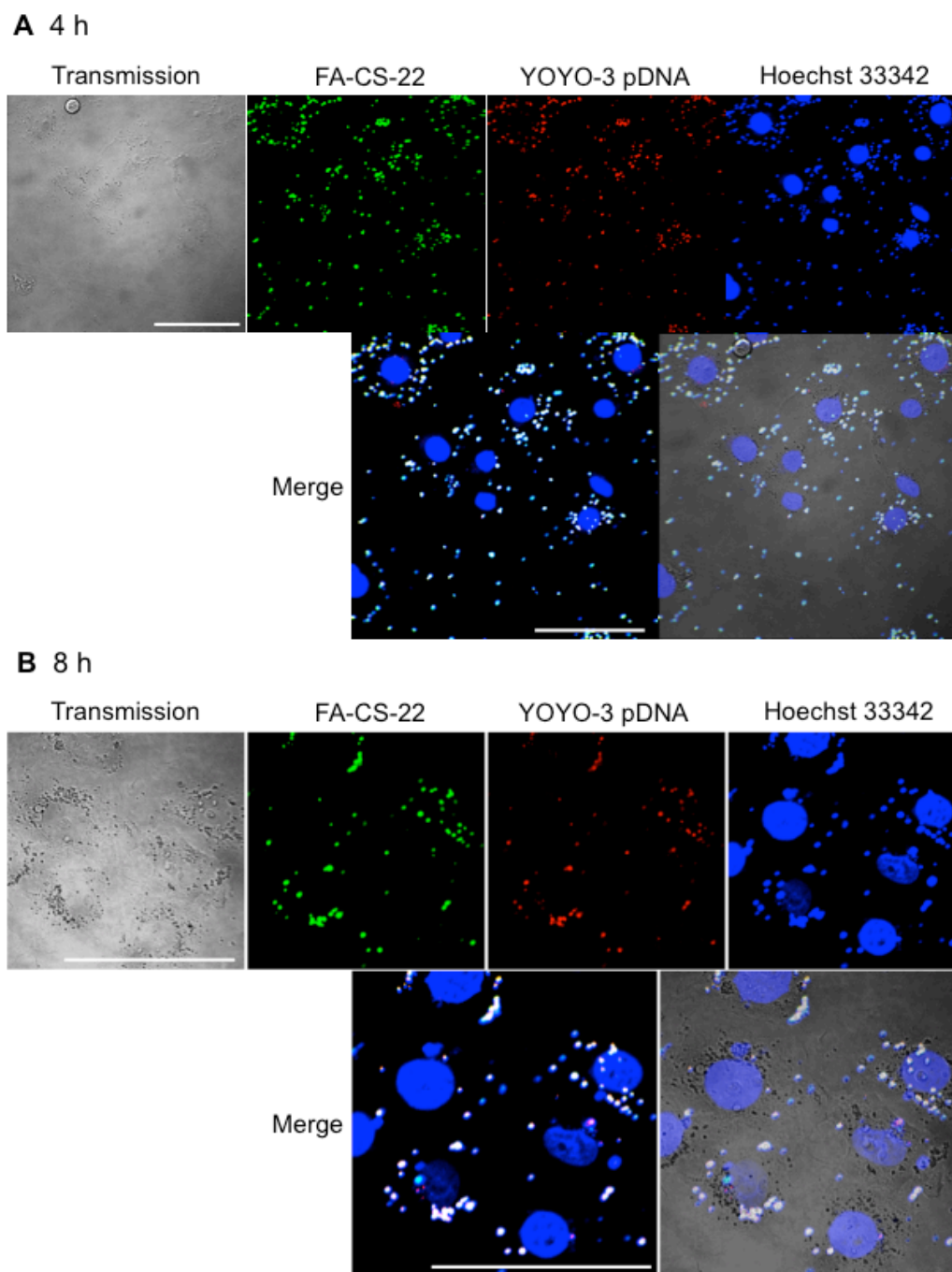


Fig. 2-36 トランスフェクションから (A) 4 時間後、(B) 8 時間後の YOYO-3 pLuc/chitosan/CS-22 三元複合体の局在 (COS7 細胞)

COS7 cells in 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342/DMEM F12, YOYO-3 pLuc/chitosan/FA-CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 3.5 h, post transfection time = 0.5, 4.5 h, [pDNA] = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Merge: Left panel = Fluorescein/YOYO-3/Hoechst 33342, Right panel = Transmission/Fluorescein/YOYO-3/Hoechst 33342, Bar = 20 μm .

ジギトニンとは温和な非イオン性界面活性剤であり、細胞をジギトニン処理することで細胞膜を透過な状態にすることができる[27]。ジギトニン処理した細胞膜透過性の COS7 細胞に蛍光標識した pDNA 複合体を投与し、核と複合体の直接的な相互作用を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。pDNA 複合体との相互作用時間が 10 分または 30 分の蛍光像を以下の Fig. 2-37 に示す。

Naked pDNA は核膜を通過せず、核内での集積がほとんど確認されなかった。一方、pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は相互作用時間が 10 分から核内、特に核小体への集積が観察された。複合体化することで pDNA が高次に折れ曲がり、コンパクトな状態になったことで核膜を通過したものと考えられる。類似した現象として、Suvanasuthi らは、細胞内でアクチンが脱重合しているとき Nuclear localization signal (NLS) がない pDNA 複合体は、核小体に蓄積することを報告している[28]。彼らはこの点に関し、核小体で外来 pDNA の転写が活発的に行われていると考察している。pDNA/キトサン複合体と三元複合体も同様に、核内侵入後に核小体に集積し、転写を受ける可能性が考えられた。正帯電性の pDNA/キトサン複合体と負帯電性の三元複合体が負帯電の核膜を通過し核小体に集積するという類似した挙動を示したことは、少なくとも静電的な相互作用によるものではないと推察された。

以上より、pDNA/キトサン複合体と三元複合体は、複合体化していることで核膜を通過しやすくなることが示唆された。

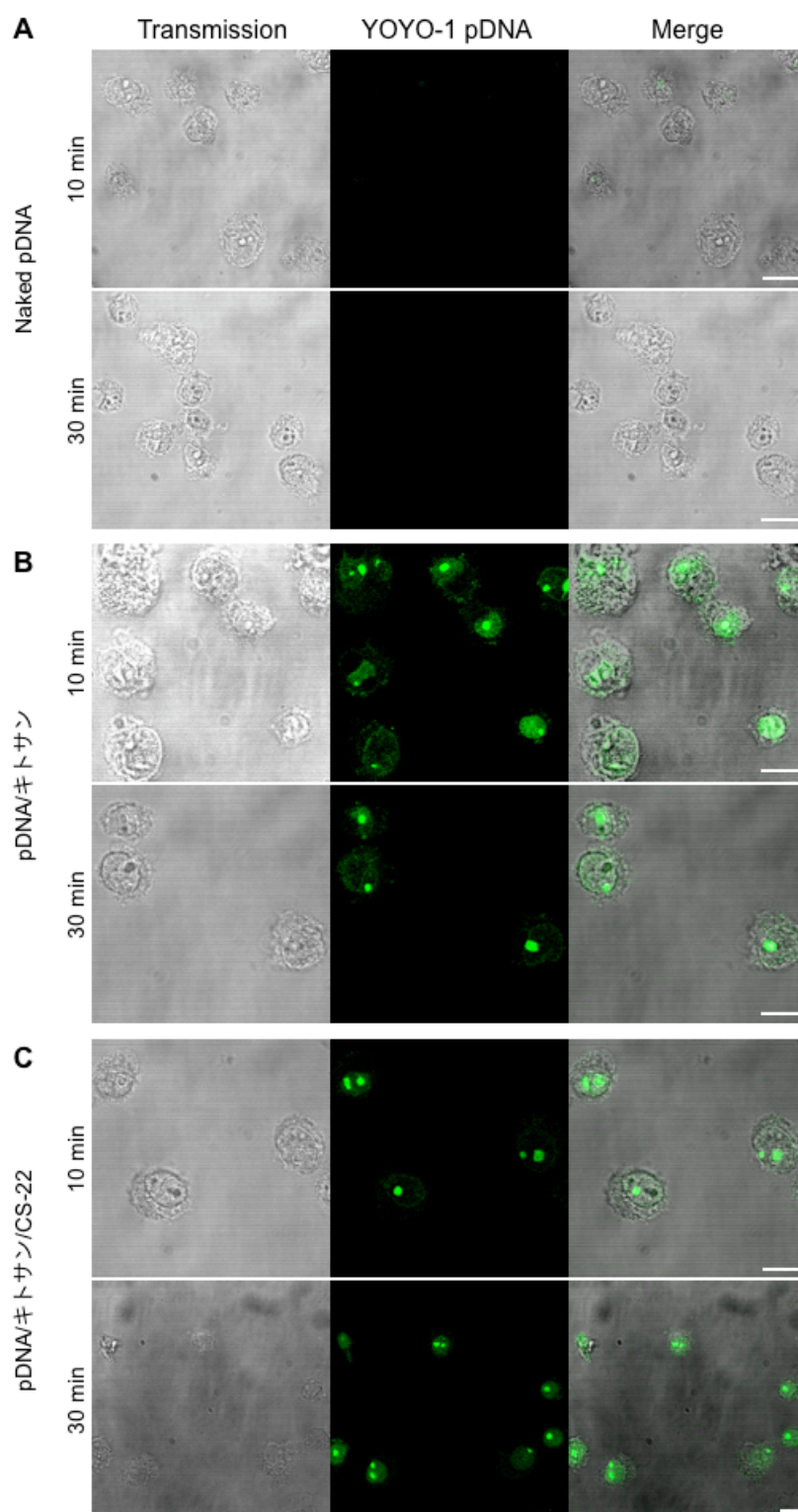


Fig. 2-37 ジギトニン処理 COS7 細胞における pDNA 複合体の局在
 (A) Naked YOYO-1 pDNA, (B) YOYO-1 pLuc/chitosan (P:N = 1:5), (C)
 YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), transfection time = 10, 30
 min. [pDNA] = 3 μ g/mL, Bar = 20 μ m.

2.3.3.3 小括

pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の細胞内への取り込み過程および細胞内輸送経路の解析を行った。

エンドサイトーシス阻害実験より、COS7 細胞において両複合体の大部分はマクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれていたが、pDNA/キトサン複合体の一部はカベオラ介在型エンドサイトーシスを介していた。Huh-7 細胞では、両複合体はマクロピノサイトーシスで取り込まれていた。細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれた後、両複合体はエンドソーム内でバッファリング能が発揮され、プロトンスポンジ効果によってエンドソームから細胞質中に脱出していることが示唆された。しかしながら、COS7 細胞においては pDNA/キトサン複合体の一部はライソゾームに移行する様子が観察された。一方、三元複合体はライソゾーム移行前に迅速に細胞質中に脱出していた。その後、pDNA/キトサン複合体と三元複合体は、核内に複合体の状態を維持して侵入していることが分かった。また、Naked pDNA は核膜を通過しなかったのに対し、pDNA/キトサン複合体と三元複合体においては細胞との相互作用が 10 分後から核内部への集積が見られた。複合体化していることが、核膜を通過するにあたり、有利に作用したことが考えられた。

2.3.4 総括

本章では、pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体のキャラクタリゼーションおよび *in vitro* での遺伝子導入を行なった。

CS-22によって形成された三元複合体は、組成電荷比P:N:(-) = 1:5:16において粒子径180 nm、ゼータ電位-40 mV、球状の均一な粒子を形成した。三元複合体はBSAおよび赤血球との非特異的な相互作用を回避し、さらに核酸分解酵素耐性も示された。これらのデータより、三元複合体は血中や生体組織中において高い安定性があると推察された。pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の遺伝子発現活性および細胞内取り込み量は向上した。三元複合体はマクロピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、プロトンスポンジ効果でエンドソームから細胞質中に脱出し、複合体の状態を維持して核内に侵入していた。

以上の検討より、pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は高い安定性と遺伝子発現活性を有する有望な非ウイルスベクターになる可能性が示された。

2.4 参考文献

- [1] A. Ogamo, K. Matsuzaki, H. Uchiyama, K. Nagasawa, Preparation and properties of fluorescent glycosaminoglycuronans labeled with 5-aminofluorescein., *Carbohydr. Res.* 105, 69-85 (1982).
- [2] O.P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan, R.M. Kannan, The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers., *Biomaterials* 29, 3469-3476 (2008).
- [3] I.A. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery., *Pharmacol. Rev.* 58, 32-45 (2006).
- [4] P.A. Orlandi, P.H. Fishman, Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains., *J. Cell Biol.* 141, 905-915 (1998).
- [5] A. Sofer, A.H. Futerman, Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP., *J. Biol. Chem.* 270, 12117-12122 (1995).
- [6] I.S. Zuhorn, R. Kalicharan, D. Hoekstra, Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis., *J Biol Chem.* 277, 18021-18028 (2002).
- [7] C. Lamaze, S.L. Schmid, The emergence of clathrin-independent

- pinocytic pathways., *Curr Opin Cell Biol.* 573-580 (1995).
- [8] J.P. Paccaud, K. Siddle, J.L. Carpentier, Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway., *J. Biol. Chem.* 267, 13101-13106 (1992).
- [9] N. Araki, M.T. Johnson, J.A. Swanson, A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages., *J. Cell Biol.* 135, 1249-1260 (1996).
- [10] M. Koivusalo, C. Welch, H. Hayashi, C.C. Scott, M. Kim, T. Alexander, N. Touret, K.M. Hahn, S. Grinstein, Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling., *J. Cell Biol.* 188, 547-563 (2010).
- [11] J.E. Rothman, Mechanisms of intracellular protein transport., *Nature* 372, 55-63 (1994).
- [12] N. Bayer, D. Schober, E. Prchla, R.F. Murphy, D. Blass, R. Ruchs, Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection., *J. Virol.* 72, 9645-9655 (1998).
- [13] S.K. Basu, J.L. Goldstein, R.G. Anderson, M.S. Brown, Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts., *Cell* 24, 493-502 (1981).
- [14] D. Li, P. Li, G. Li, J. Wang, E. Wang, The effect of nocodazole on the transfection efficiency of lipid-bilayer coated gold nanoparticles.,

- Biomaterials, 30, 1382-1388 (2009).
- [15] H. Akita, K. Enoto, T. Masuda, H. Mizuguchi, T. Tani, H. Harashima, Particle tracking of intracellular trafficking of octaarginine-modified liposomes: a comparative study with adenovirus., *Mol. Ther.* 18, 955-964 (2010).
- [16] H.S. Moskowitz, C.T. Yokoyama, T.A. Ryan, Highly cooperative control of endocytosis by clathrin., *Mol. Biol. Cell* 16, 1769-1776 (2005).
- [17] A. Manninen, P. Verkade, S. Le Lay, J. Torkko, M. Kasper, et al., Caveolin- 1 is not essential for biosynthetic apical membrane transport., *Mol. Cell Biol.* 25, 10087-10096 (2005).
- [18] K. Kawabata, Y. Takakura, M. Hashida, The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake., *Pharm. Res.* 12, 825-830 (1995).
- [19] P.R. Dush, M.L. Read, L.B. Barrett, M.A. Wolfert, L.W. Seymour, Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery., *Gene Ther.* 6, 643-650 (1999).
- [20] H.Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August, K.W. Leong, Chitosan–DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, *J. Control. Release* 70, 399-421 (2001).
- [21] T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, Mechanism of cell transfection with

- plasmid/chitosan complexes., *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 51-64 (1999).
- [22] A. Nanbo, M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, et al. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner., *PLoS Pathog.* 6, (2010).
- [23] M.A.E.M. van der Aa, U.S. Huth, S.Y. Häfele, R. Schubert, R.S. Oosting, et al., Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells., *Pharm. Res.* 24, 1590-1598 (2007).
- [24] E.M. Damm, L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Mezzacasa, T. Kurzchalia T, et al., Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae., *J. Cell Biol.* 168, 477-488 (2005).
- [25] E.M. De La Cruz, T.D. Pollard, Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments., *Biochemistry* 33, 14387-14392 (1994).
- [26] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, et al., Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis., *Biochemistry* 46, 492-501 (2007).
- [27] J.E. Hagstrom, J.J. Ludtke, M.C. Bassik, M.G. Sebestyén, a S. Adam, a J. Wolff., Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells., *J.*

Cell Sci. 110, 2323-2331 (1997).

- [28] S. Suvanasuthi, K. Tamai, Y. Kaneda, Rapid transport of plasmid DNA into the nucleolus via actin depolymerization using the HVJ envelope vector., J. Gene Med. 1, 55-62 (2007).

第3章 凍結乾燥製剤への応用と *in vivo* での遺伝子導入

3.1 緒言

3.1.1 凍結乾燥製剤

凍結乾燥とは氷から水蒸気への昇華による乾燥手法である。乾燥による極端な成分変化が起りにくい点が特徴的であり、凍結成分内部の水分が直接的に昇華するため隙間が多く多孔質なスポンジ状の乾燥物が得られる。また、多孔質ゆえに乾燥物の隙間に水が侵入しやすく、再溶解性に優れている。

2000年以降、特に医薬品やバイオ関連製品といった生物活性のある不安定な製品の保存方法としては、凍結乾燥保存が標準的な手段になっている。通常、タンパク質製剤や核酸複合体は、低濃度の水溶液として得られる。これらは水溶液中では不安定であるため、水分を除去して固形乾燥品にする必要がある。そこで、一般的には保存対象の活性を保護するために賦形剤を加えて乾燥させる必要がある。遺伝子複合体を凍結乾燥する際には、スクロース等の糖類を賦形剤として添加することで遺伝子発現活性が維持されることが報告されている[1]。Itoらは、pDNA/PEI複合体をヒアルロン酸で被覆した三元複合体は、凍結乾燥・再水和後においても粒子が凝集せず、粒子径と遺伝子発現活性が維持されることを見出した。このように、凍結乾燥は非ウイルスベクターの保存方法としても有効な手法となることが期待される[2,3]。

3.1.2 ガンの遺伝子治療

ガンの遺伝子治療技術は開発途上の段階にあるが、遺伝子治療の臨床プロトコルの約7割がガンを対象としたものであることから、その開発は人類の継願であるといえる。しかしながら、従来の遺伝子導入技術ではガン組織の成長を抑制するほど効果的でない場合が多く、遺伝子治療の有効性について未だガンにおいては明らかにされていない。ガンの遺伝子治療に用いられる代表的な手法としては免疫遺伝子治療法と自殺遺伝子治療法が挙げられる。

(1) 免疫遺伝子治療法

ガンは生体にとって異物であるため腫瘍免疫を誘発してガンを排除する試みは古くから存在し、遺伝子治療が可能になって以来、免疫遺伝子治療法として盛んに研究が行われている。これには2種類の方法があり、(1)宿主全体の免疫力を増強する目的でサイトカインが主として用いられるもの[4]と、(2)腫瘍に対する特異的な免疫を増強させる目的で腫瘍関連抗原から分離したガン遺伝子ワクチンを用いるものが開発されてきた[5]。生体の免疫機構を利用することの利点としては、低レベルの遺伝子導入効率で高い治療効果が見込まれることである。

(2) 自殺遺伝子療法

自殺遺伝子療法一般的な手法は、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK) 遺伝子をガン細胞に導入、発現させ抗ウイルス薬のガンシクロビル(GCV) をプロドラッグとして投与する方法である[6]。HSV-TK 遺伝子を導入さ

れたガン細胞は HSV-TK と自身のチミジンキナーゼによって GCV をリン酸化し、三リン酸型の GCV を形成する。この三リン酸型の GCV は DNA ポリメラーゼを阻害するために DNA 複製を起こす細胞はアポトーシスに陥り死滅する。さらに三リン酸型の GCV はギャップジャンクションを通過して隣接細胞へも取り込まれ遺伝子導入がない隣接細胞でも DNA 合成が阻害され死滅する。これをバイスタンダー効果と呼ぶ。本手法では全てのガン細胞に遺伝子が導入されなくともガン細胞を死滅できること、特に増殖段階にある活発な細胞が選択的に死滅すること、ガン細胞の死滅によってがん抗原が提示され腫瘍免疫が活性化されること、腫瘍血管の新生もバイスタンダー効果によって抑制されること、といった多くの作用を一つの遺伝子導入で達成することができる。

3.1.3 本章について

これまでに、pDNA/キトサン複合体をコンドロイチン硫酸で被覆することで物理化学的に非常に安定かつ高い遺伝子発現活性を有する遺伝子キャリアーの開発に成功し、複合体の物理化学的な性質と細胞との相互作用、細胞内動態との関連性について論じた。本章では、三元複合体を凍結乾燥製剤に応用した。特に、凍結乾燥-再水和した pDNA 複合体のキャラクタリゼーションと遺伝子発現活性に着目した。また、腫瘍形成マウスモデルにおいて pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による自殺遺伝子治療を行い、抗腫瘍効果を評価した。

3.2 実験方法

3.2.1 材料

単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼをコードした pGEG.TK (pTK; Fig. 3-1) は京都府立医科大学 松田修先生より譲渡され、株式会社 AMBiS のプラスミド受託生産サービスにより増幅した。pLuc、キトサン (Mw = 52 kDa, DDA = 84%)、コンドロイチン硫酸 (CS-22, Mw = 22 kDa) は第二章と同様のものを使用した。β-ガラクトシダーゼをコードした pSV-β-Galactosidase vector (pGal; Promega) のベクターマップは以下の Fig. 3-2 に示す。

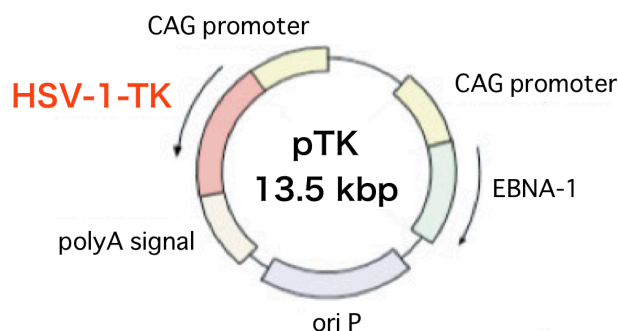


Fig. 3-1 pGEG.TK (pTK) のベクターマップ

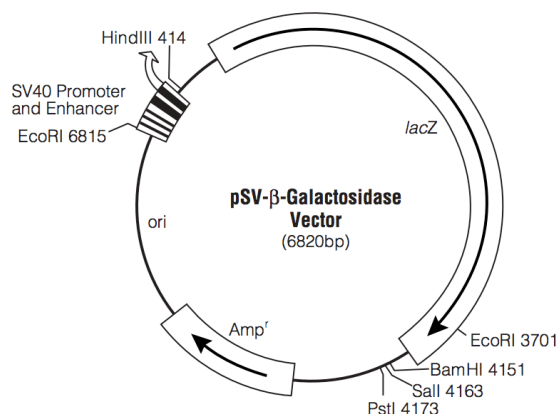


Fig. 3-2 pSV-β-Galactosidase vector (pGal) のベクターマップ
(Promega 社カタログより引用)

3.2.2 複合体の作製

用時調製用 (Fresh) pDNA 複合体は 2.2.2 と同様の方法で作製した。ただし、*in vivo* で使用する pDNA 複合体の作製には PBS(-) (pH 6.5) を使用し pDNA の終濃度が 100 µg/mL になるよう調製した。

凍結乾燥保存用の pDNA 複合体は以下の通り作製した。2.2.2 に従い、Milli-Q を溶媒として作製した pDNA/キトサン複合体または pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体溶液を液体窒素で急速凍結し、一晚以上真空乾燥させた。

3.2.3 複合体の保存条件および再溶解

pDNA 複合体は溶液状態で 4 °C または室温、凍結保存 (-20 °C)、または凍結乾燥状態で -20 °C、4 °C、室温で所定時間静置し保存した。凍結保存した複合体は使用直前に解凍した。凍結乾燥複合体は、使用直前に 2.2.2 で指定された溶媒で再溶解した。ただし、*in vivo* で使用する際には PBS(-) (pH 6.5) で再溶解した。再溶解時に白い沈殿物が目視できた場合は 27G シリンジでピペッティングを繰り返し粉砕した。その後、15～20 分間室温で攪拌した。

3.2.4 アガロースゲル電気泳動

2.2.3 と同様の方法で行なった。

3.2.5 粒子径およびゼータ電位測定

2.2.4 と同様の方法で行なった。

3.2.6 原子間力顕微鏡による複合体の形態観察

2.2.5と同様の方法で行なった。

3.2.7 キトサナーゼ処理による複合体の解離

用時調製、凍結保存、凍結乾燥-再水和、または溶液保存した20 μ L pDNA複合体溶液 ([pDNA] = 30 μ g/mL) に4.0 mg/mL キトサナーゼ (生化学工業) を2 μ L加え、遮光下42 $^{\circ}$ Cで4時間処理した。その後、1%アガロースゲル電気泳動に供した。

3.2.8 細胞培養

Huh-7細胞の培養および継代は、2.2.11の通り行なった。

3.2.9 トランスフェクション

Huh-7細胞のトランスフェクションは2.2.12の通り行なった。

3.2.10 ルシフェラーゼ遺伝子発現活性の定量

2.2.13に従い、ルシフェラーゼアッセイによって得られたRelative light units (RLU) の値をプロテインアッセイによって得られた細胞溶解液のタンパク質量で補正した値、すなわちRLU/mg proteinを算出し、これをルシフェラーゼ遺伝子発現活性とした。

3.2.11 複合体の細胞毒性または細胞増殖抑制効果の評価

複合体の細胞毒性または*in vitro*での細胞増殖抑制効果はWST-1アッセイによって評価した。方法は2.2.15の通り行なった。

3.2.12 ウェスタンブロッティング

pTK複合体による*in vitro*でのチミジンキナーゼの発現確認は、ウェスタンブロッティングで2.2.19に従い行なった。

3.2.13 *In vitro*細胞増殖抑制アッセイ

トランスフェクション当日に70-80%コンフルエントになるようHuh-7細胞を6ウェルプレート (IWAKI) に播種した。2.2.2 および3.2.3に従って pTK/キトサン複合体 (P:N = 1:8)、pTK/キトサン/CS-22 三元複合体 (P:N:(-) = 1:8:16)、凍結乾燥再溶解 pTK/キトサン/CS-22 三元複合体 (P:N:(-) = 1:8:16) を作製し、Huh-7細胞にpDNA濃度 3 µg/mLで投与し、DMEM 10% FBS (pH 6.5) 培地中で4時間培養した。各ウェルを洗浄後、さらに24時間培養した。

トランスフェクション後のHuh-7細胞を96ウェルプレートに5,000 cells/wellで再播種し、24時間培養後、ガンシクロビル (GCV; Wako) 濃度 0, 1, 10, 50, 100 µg/mL DMEM 10% FBS を添加し、さらに72時間培養した。

その後、3.2.11に従い、WST-1アッセイによってpDNA複合体の細胞増殖抑制効果の評価した。

3.2.14 自殺遺伝子治療実験

3.2.14.1 Huh-7 細胞皮下投与マウスモデルの作製

日本エスエルシー(株)より5週齢の雄性 BALB/c Slc-nu/nu マウスを入荷した。1週間の予備飼育の後、一般状態に異常がないことを確認し、6週齢で試験に供した。防衛医科大学校研究センター医療工学部門にて凍結保存されていた Huh-7 細胞を増幅培養し、25G のシリンジ (TERUMO) を用いておよそ $8 \times 10^6/100 \mu\text{L DMEM/head}$ を皮下投与した。投与部位はマウス後背部皮下の正中付近とした。

3.2.14.2 複合体溶液および GCV 溶液の調製

pTK/キトサン複合体および pTK/キトサン/CS-22 三元複合体はそれぞれ P:N = 1:8, P:N:(-) = 1:8:16 の混合比で pDNA 濃度が $100 \mu\text{g/mL}$ になるよう作製した。詳細方法は 2.2.2, および 3.2.3 の通りである。

3.2.14.3 マウスへの pDNA 複合体と GCV の投与

自殺遺伝子治療実験のプロトコールは、以下の Fig. 3-3 に示す。

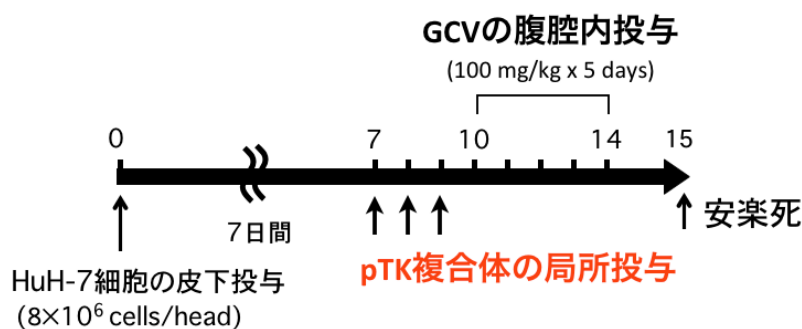


Fig. 3-3 自殺遺伝子治療実験のプロトコール

(1) pDNA 複合体の投与

Huh-7 細胞をマウスに皮下投与して 1 週間経過後から 3 日間連続して pDNA 複合体溶液を腫瘍あるいはその周囲に皮下投与した。投与液量は 100 μ L/head とし、投与には 27G のインシュリン用シリンジを用いた。

(2) GCV の投与

pDNA 複合体の連続投与翌日から、5 日間連続して GCV を腹腔内投与した。GCV の濃度は 4 mg/mL とし、投与液量は 100 mg/kg とした。毎日の体重測定結果から投与液量を算出した。投与には 27G のインシュリン用シリンジを用いた。

3.2.14.4 腫瘍サイズの測定及び計算方法

GCV 投与日から GCV 投与後 8 日目 (Huh-7 細胞皮下投与後 18 日目) まで連続して 1 日 1 回測定した。測定箇所は腫瘍部位の length \times width \times height (mm) とし、測定にはノギスを使用した。腫瘍の数値化は、文献[7]に従い length \times width \times height \times $\pi/6$ として計算し、GCV 投与初日を 100% として Growth rate (%) を算出した。

3.2.14.5 病理組織学的検査

病理解剖例については、ジエチルエーテル (Kanto Chemical) の過量麻酔により安楽死させた後、剖検した。Huh-7 細胞皮下投与後 15 日目に各群より 1 例を安楽死処分し、病理解剖した。また、Huh-7 細胞皮下投与後 17 日目に残り

の生存例を安楽死処分した。

病理解剖例の腫瘍部位を採取し、10 vol% 中性リン酸緩衝ホルマリン液 (Wako) で固定した。固定後、1例につきヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を1枚作製した。病理組織学的検査及び病理組織写真撮影には倒立顕微鏡 (Biozero BZ-8000, KEYENCE) を使用した。

3.2.15 *In vivo* での β -ガラクトシダーゼアッセイ

3.2.15.1 Huh-7 細胞皮下投与マウスモデルの作製

Huh-7 細胞 1×10^7 cells/100 μ L ずつ、マウス背中の皮下2箇所に移植した。なお、マウス1匹あたり2箇所腫瘍を形成させた。

3.2.15.2 pDNA 複合体の投与

腫瘍細胞の移植から約2週間後、pDNA 複合体の投与を行った。マウスをエーテル麻酔した後、pDNA 複合体 [pDNA] = 10 μ g/100 μ L を腫瘍内に局所投与した。注射針は27 G (テルモ株式会社) を使用し、pDNA 複合体の投与を1回/日で3日間連続で行った。投与開始から4日目に腫瘍を回収した。

3.2.15.3 組織切片の作成

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、皮下より腫瘍を摘出した。検体を半分は切断後直ちに、固定化液 (4% パラホルムアルデヒド、0.2% グルタルアルデヒド/PBS(-)(氷冷)) に入れ、4 $^{\circ}$ C で4時間固定化した。固定した検体は冷PBS(-)で洗浄後、10% ショ糖/PBS(-)に浸し、4 $^{\circ}$ C で2時間振とうした。次いで、

15%、20%-ショ糖/PBS(-)に浸し、各々2時間ずつ振とうした。クリオスタット (CM1900, Leica Microsystems) を用いて 20 μm の切片を作成し、シランコートされたスライドガラス (Matunami Glass) に付着させた。

3.2.15.4 β -ガラクトシダーゼ染色

染色用バッファーは、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム (Wako, 終濃度 5 mM)、ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム (Wako, 終濃度 5 mM)、および塩化マグネシウム (Wako, 終濃度 2 mM) を PBS(-)に溶解して作成した。使用直前に X-Gal ストック溶液 (Life Technologies, 20 mg/mL in DMSO) を、染色用バッファーで 20 倍希釈し、染色液として用いた。固定化液を切片上に乗せ、室温で 5 分間再度固定化した。PBS(-)で 2 回切片を洗浄した後、ろ紙で余分な水分を除いた。湿潤箱にスライドガラスを並べ、染色液を切片が完全に浸るように乗せた。37 $^{\circ}\text{C}$ で終夜染色を行い、PBS(-)で 2 回切片を洗浄後、ケルネクトロート溶液 (Merck) を用いて対比染色した。グリセロールを封入剤として行い、位相差顕微鏡で切片の観察を行なった。

3.2.16 動物実験倫理規定

全ての動物実験は、防衛医科大学校動物実験規則に基づいて実施した。

3.2.17 データの取り扱いおよび統計処理

複数回測定したデータに関しては、各データの平均値を採用し、エラーバーは標準偏差値として示した。統計処理は各図キャプションに記した方法に基づき行なった。

3.3 結果および考察

3.3.1 *In vitro* での保存条件の検討

3.3.1.1 保存した pDNA 複合体のキャラクタリゼーション

pDNA 複合体の保存条件の検討として、下記の各条件で7日間保存した複合体の粒子の物理化学的性質を調べた。保存条件としては、(i) 複合体溶液を凍結乾燥後、-20 °C、4 °C、または室温で保存し、使用直前に再溶解する「凍結乾燥-再水和型」、(ii) 複合体溶液を-20 °C で保存する「凍結保存型」、および (iii) 複合体溶液を4 °C または室温で保存する「溶液保存型」を検討した。各条件で7日間保存後の pLuc (Luciferase coding pDNA) 複合体の粒子径およびゼータ電位の測定結果を Table 3-1 に、pTK (Thymidine kinase coding pDNA) 複合体の測定結果を Table 3-2 に示す。

用時調製 pLuc/キトサン複合体は、粒子径 180 nm、ゼータ電位 +18 mV 程度を示した。凍結乾燥した pLuc/キトサン複合体は溶解時に白色の巨大沈殿物を形成し、複合体を溶液中に再分散させることが困難であった。同様の現象として、凍結乾燥した正帯電性 pDNA 複合体を再溶解後、凝集体を形成することが報告されている[8,9]。この問題を解決するために、スクロースやトレハロースといった糖類を複合体形成用溶媒の添加剤として用いることで、再溶解が可能になることが知られている[9,10]。しかしながら、糖添加によって塩濃度が高まり浸透圧が増大することは、*in vivo* での使用に適さない[8]。

一方で、-20 °C、4 °C、室温で保存した凍結乾燥-pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体は、溶解時に十分攪拌することで溶液中に再分散させることが可能であっ

た。コンドロイチン硫酸の非常に高い親水性[11]および三元複合体の強い負帯電性が、複合体の再水和を容易にしているものと推察された。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、室温で保存した凍結乾燥-再水和 pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体の粒子径はそれぞれ 260 nm, 300 nm, 340 nm 程度であり、ゼータ電位は全て -40 mV 程度を示した。凍結乾燥-再水和三元複合体のゼータ電位が用時調製 pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体と同程度の値を示したことより、保存後にもコンドロイチン硫酸が十分に複合体を被覆した形態をとることが示唆された。用時調製三元複合体の粒子径 190 nm 程度と比較し、凍結乾燥-再水和三元複合体の粒子径が 70~150 nm 程度増大した点に関しては、後に原子間力顕微鏡で粒子の形態観察を行い、原因について考察した (Fig. 3-4)。

凍結保存した pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体は約 270 nm、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存した三元複合体は約 250 nm、室温保存した三元複合体は約 590 nm の粒子径を示した。室温保存した三元複合体で粒子径が大きく増大したことは以下のように考察した。pDNA 複合体の粒子形成には、スーパーコイル型構造を呈した pDNA が高次に折り畳まれることが駆動力になる[12]。後に示した pDNA の安定性試験 (Fig. 3-5) より、室温保存した三元複合体は DNA の分解したフラクションが認められていた。したがって、pDNA の分解に伴う高次構造の崩壊が室温保存三元複合体の粒子径維持に影響を及ぼしたものと推察された。

凍結乾燥した pTK/キトサン複合体を $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存した後も白色沈殿物が形成され、再分散はできなかった。pLuc 複合体の場合と同様に、凍結乾燥-再水和 pTK/キトサン/CS-22 三元複合体は溶液中に再分散させることが可能であり、粒子径約 230 nm、ゼータ電位 -43 mV を示した。pLuc (5256 塩基対) と pTK (13500 塩

基対) でそれぞれ形成された pDNA 複合体は、類似した粒子径およびゼータ電位を有していたことより、塩基数の異なる pDNA を用いても物理化学的な性質が比較的保存された複合体を形成する可能性が示唆された。

Table 3-1 各条件で保存後の pLuc/キトサン/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16) および pLuc/キトサン (P:N = 1:5) の粒子径およびゼータ電位 (n = 3)

Data	Complex	Freshly prepared	Storage condition and storage temperature					
			Freeze-dried and rehydrated			Freeze-thawed	Solution	
			-20 °C	4 °C	R.T.	-20 °C	4 °C	R.T.
Size (nm)	pLuc/chitosan	187 ± 12	—	—	—	—	—	—
	pLuc/chitosan /CS-22	186 ± 8.7	264 ± 11	296 ± 58	337 ± 43	268 ± 50	249 ± 37	591 ± 60
Z.P. (mV)	pLuc/chitosan	+18.2 ± 1.5	—	—	—	—	—	—
	pLuc/chitosan /CS-22	-38.7 ± 2.7	-44.7 ± 0.4	-42.8 ± 0.3	-41.4 ± 0.9	-41.3 ± 0.0	-41.2 ± 0.2	-41.5 ± 1.2

Table 3-2 凍結乾燥再水和-pTK/キトサン/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16) および pTK/キトサン (P:N = 1:8) の粒子径とゼータ電位 (n = 3)

Complex	Freshly prepared		Freeze-dried and rehydrated	
	Size (nm)	Z.P. (mV)	Size (nm)	Z.P. (mV)
pTK/chitosan	187 ± 9.1	+23.0 ± 1.1	—	—
pTK/chitosan/CS-22	190 ± 2.6	-41.7 ± 0.5	232 ± 48	-43.9 ± 0.8

凍結乾燥-再水和三元複合体 (-20 °C で 7 日間保存) の粒子形態を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した。AFM 観察像を Fig. 3-4 に示す。

用時調製した pTK/キトサン複合体は、ロッドおよびトロイド状形態を呈した粒子形態をとっていた。さらに複数の複合体粒子が集合し、凝集した像も散見された。用時調製した pTK/キトサン/CS-22 三元複合体は球状の均一な粒子形態を呈していた。これらの観察結果は、pLuc 複合体の AFM 観察像と類似していた。pTK または pLuc で構成された凍結乾燥-再水和三元複合体は、用時調製した三元複合体と比べ、粒子輪郭が不明瞭な AFM 像を示した。凍結乾燥や再水和操作により粒子構造が多少崩れ、粒子外郭における分子密度が低下したことで柔軟な粒子が形成された可能性がある。とはいえ、粒子形態は球状を呈し、pDNA が凝縮されているコア部分にまでは影響が及んでいないと考えられる。用時調製時に平均粒子径約 180 nm を示した三元複合体を、凍結乾燥-再水和後に粒子径約 230 nm に増大することが示唆されていたが、この現象は一部粒子の凝集と粒子外郭における高分子鎖のパッキングが緩くなったことに起因すると推察された。

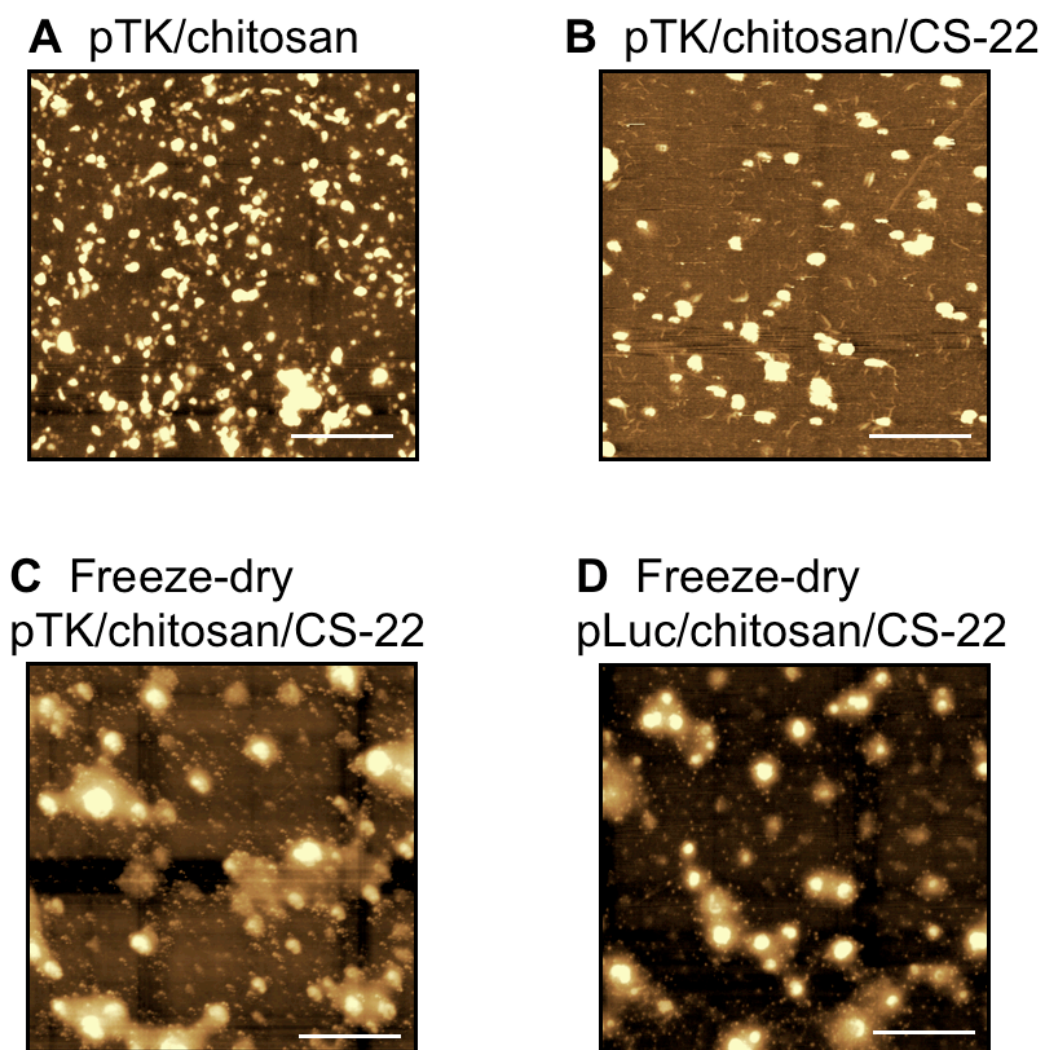


Fig. 3-4 AFM による pDNA 複合体の観察像

(A) pTK/chitosan (P:N = 1:8), (B) pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16), (C) Freeze-dry rehydrated pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16) stored at -20 °C for 7 days, (D) Freeze-dry rehydrated pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16) stored at -20 °C for 7 days, Bar = 1 μ m.

3.3.1.2 凍結乾燥-再水和後の pDNA 複合体溶液の DNA 濃度測定

pDNA/キトサン複合体は、凍結乾燥-再水和、凍結保存、および溶液保存後に白色沈殿物を形成した。このとき、溶液中に分散している複合体量と沈殿した複合体量の割合を調べた。各条件で保存した pDNA 複合体溶液を遠心し、上清の DNA 濃度を測定した。用時調製した pDNA 複合体溶液の DNA 濃度を 100% とし、保存後 pLuc 複合体溶液の相対 DNA 濃度を Table 3-3 に、pTK 複合体溶液の値を Table 3-4 に示す。

凍結乾燥後-20 °C, 4 °C, 室温で保存した再水和 pLuc/キトサン複合体溶液に残存する分散した pDNA 量は、用時調製したその 45%未満であることが明らかになった。凍結保存または溶液保存した pLuc/キトサン複合体も同様に、7%~46%のみが溶液中に分散し、残りは沈殿していた。それに対し、凍結乾燥-再水和三元複合体、凍結保存または溶液保存したコンドロイチン硫酸三元複合体においては、95%以上が溶液中に複合体として分散していた。凍結乾燥-再水和 pTK/キトサン複合体では 10%のみが溶液中に分散していたが、凍結乾燥-再水和三元複合体では 90%以上の pDNA が溶液上清に分散していた。これらの結果より、コンドロイチン硫酸で pDNA/キトサン複合体を被覆したことにより、保存後の pDNA 複合体の分散性が維持されていることが示唆された。

Table 3-3 各条件で 7 日間保存後の pLuc 複合体溶液の DNA 濃度 (n = 3)

Relative DNA conc. (%)	Storage condition and storage temperature						
	Freshly prepared	Freeze-dry rehydrated			Freeze- thawed	Solution	
		-20 °C	4 °C	R.T.		-20 °C	4 °C
pLuc/chitosan	100	17 ± 23	15 ± 11	42 ± 31	7.1 ± 8.8	15 ± 8.7	46 ± 14
pLuc/chitosan/CS-22	100	95 ± 3.1	95 ± 3.1	97 ± 3.2	98 ± 0.9	97 ± 1.7	96 ± 2.6

Table 3-4 凍結乾燥 7 日後に再水和した pTK 複合体溶液の DNA 濃度 (n = 3)

Relative DNA conc. (%)	Fresh	Freeze-dry -20 °C
pTK/chitosan	100	11 ± 11
pTK/chitosan/CS-22	100	92 ± 2.6

3.3.1.3 アガロースゲル電気泳動による pDNA の状態の解析

保存後の複合体における pDNA の安定性をアガロースゲル電気泳動により試験した。各条件で pDNA 複合体を保存後、キトサナーゼ処理によって pDNA を複合体から解離し、アガロースゲル電気泳動に供した。結果を以下の Fig. 3-5 に示す。

各条件で保存後の pDNA/キトサン複合体においては pDNA の分解を示すフラクションが認められた。この時、安定して存在する（インタクトな状態）pDNA の割合は、用時調製した pDNA/キトサン複合体の 30~50%程度であった。室温保存した凍結乾燥-再水和三元複合体、凍結保存三元複合体、および 4 °C、室温溶液保存した三元複合体においては、インタクトな状態の pDNA 量は 50%程度であった。一方、-20 °C または 4 °C で保存した凍結乾燥-再水和三元複合体のインタクトな pDNA の割合はそれぞれ 88%, 75%であり、高い保存率を示した。これらのデータより、pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を凍結乾燥後に-20 °C で保存し再溶解する方法が pDNA が最も安定な状態で保存される条件であることが示唆された。

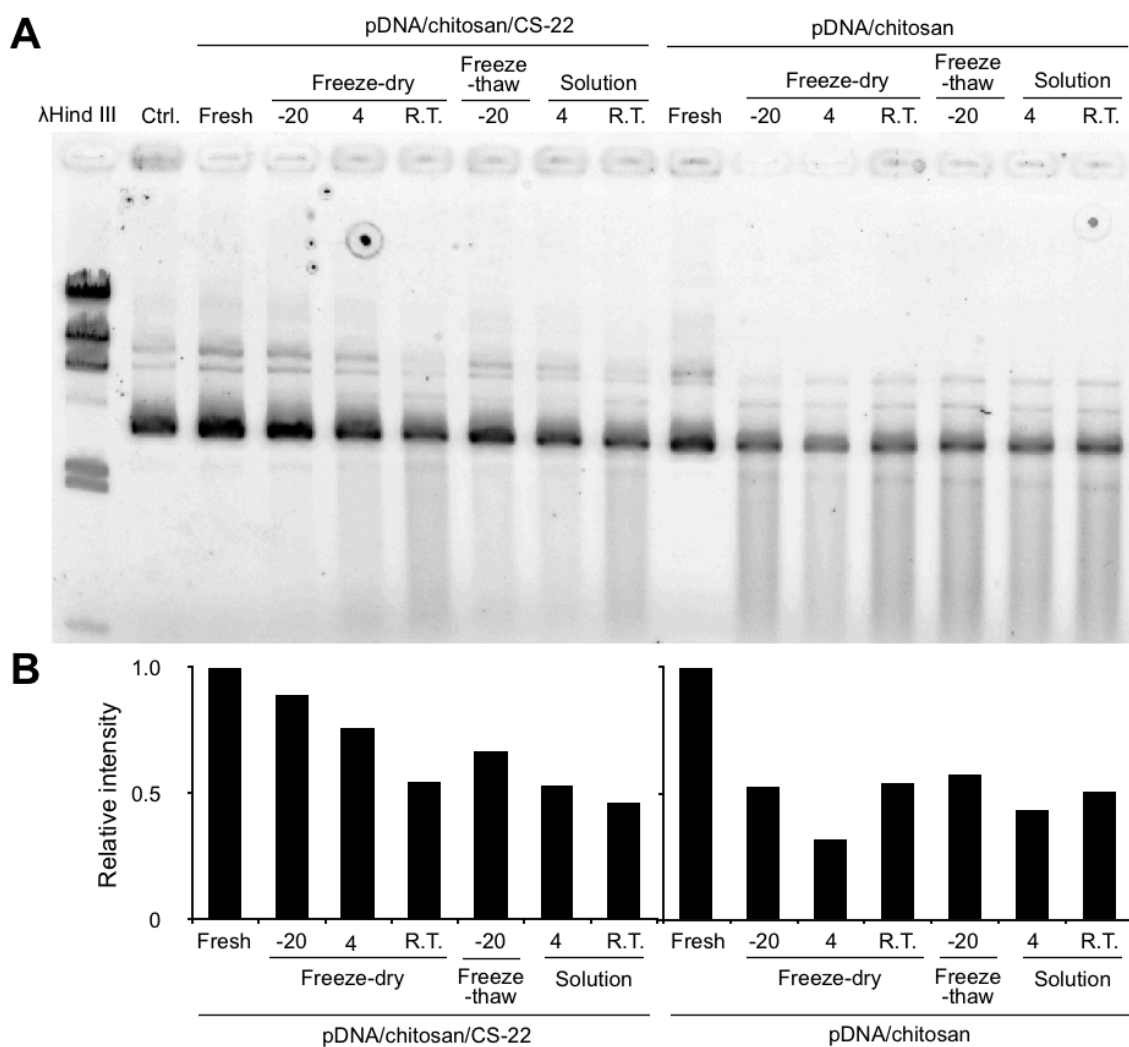


Fig. 3-5 (A) 保存後の複合体溶液の pDNA 泳動像と (B) 定量解析結果
 Naked pLuc, pLuc/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), pLuc/chitosan (P:N = 1:5)
 were electrophoresed on a 1.0% agarose gel at 100 V for 30 min and
 subsequently stained using ethidium bromide., Storage period = 7 days.

(4) ルシフェラーゼアッセイによる保存後の遺伝子発現活性の評価

各条件で保存後の pDNA 複合体の遺伝子発現活性を、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。Huh-7 細胞における保存後の pLuc 複合体の遺伝子発現活性を以下の Fig. 3-6 および Fig. 3-7 に示す。

用時調製した pLuc/キトサン複合体の遺伝子発現活性を 100%とした場合、
-20 °C 保存した凍結乾燥-再水和 pLuc/キトサン複合体のそれは 20%程度を示した。4 °C または室温保存した凍結乾燥-再水和 pLuc/キトサン複合体、凍結保存した pLuc/キトサン複合体、4 °C または室温で溶液保存した pLuc/キトサン複合体の遺伝子発現活性は検出限界以下であった。保存後の pLuc/キトサン複合体の遺伝子発現活性が大きく低下した原因は、複合体溶液中での沈殿物形成による pDNA 濃度の低下、および大部分の pDNA の分解によるものと推察された。

室温保存した凍結乾燥-再水和三元複合体、4 °C または室温で溶液保存した三元複合体の遺伝子発現活性は、用時調製した pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体の示した値の 10%程度であった。それに対し、-20 °C または 4 °C で保存した凍結乾燥-再水和三元複合体および凍結保存した三元複合体の遺伝子発現活性は高い値を示した。特に、-20 °C で 1 日、7 日、または 7 週間保存した凍結乾燥-再水和三元複合体の遺伝子発現活性の保存率はそれぞれ 70%、55%、45%であった (Fig. 3-7)。凍結乾燥-再水和操作により遺伝子発現活性が 30%程度低下するものの、その後の凍結保存期間中における活性低下は比較的緩やかであることが示唆された。同保存条件が三元複合体の遺伝子発現活性を高く保存した要因としては、凝集体形成を回避したことと pDNA の高い安定性によるものと考えられる。

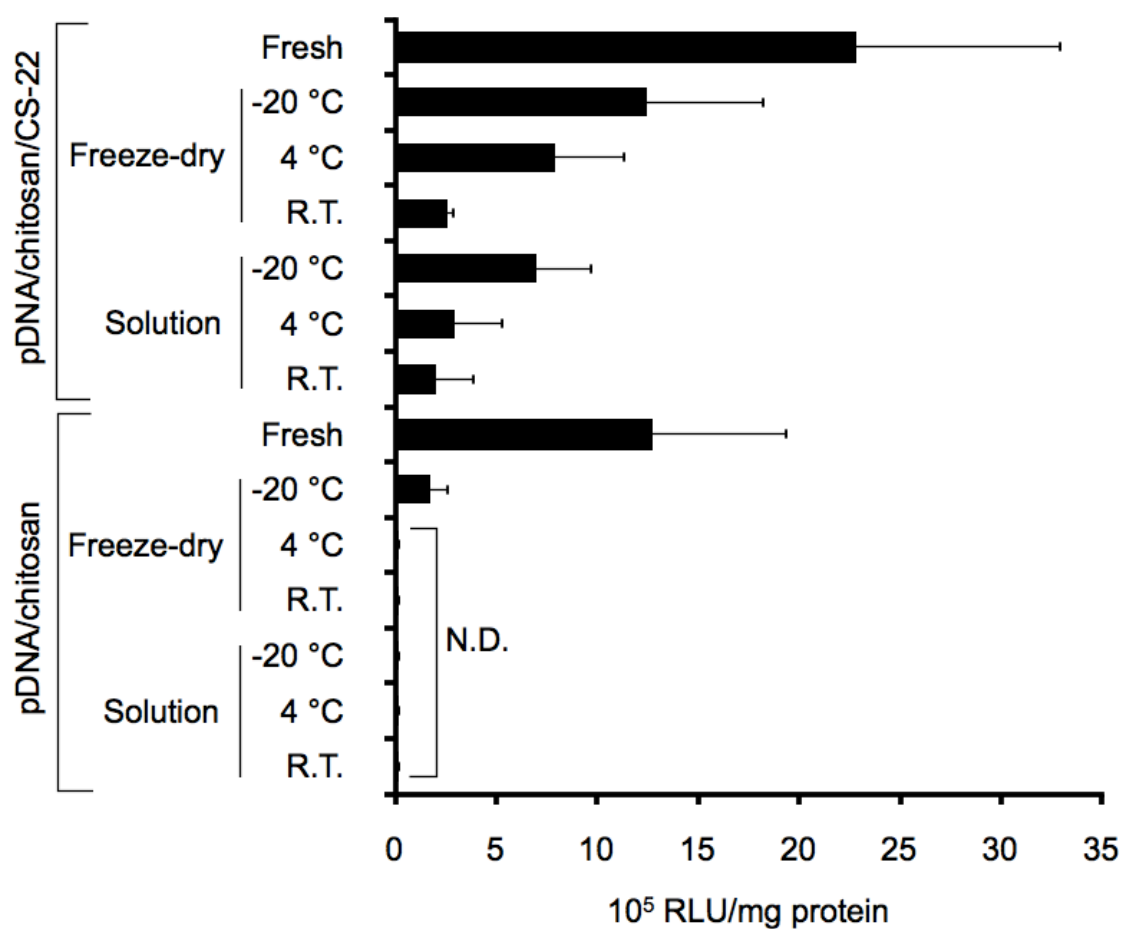


Fig. 3-6 保存後の複合体の遺伝子発現活性 (Huh-7 細胞)

Huh-7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL, pLuc/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), pLuc/chitosan (P:N = 1:5), transfection time = 4h, post transfection time = 24 h, Storage period = 7 days, n = 3.

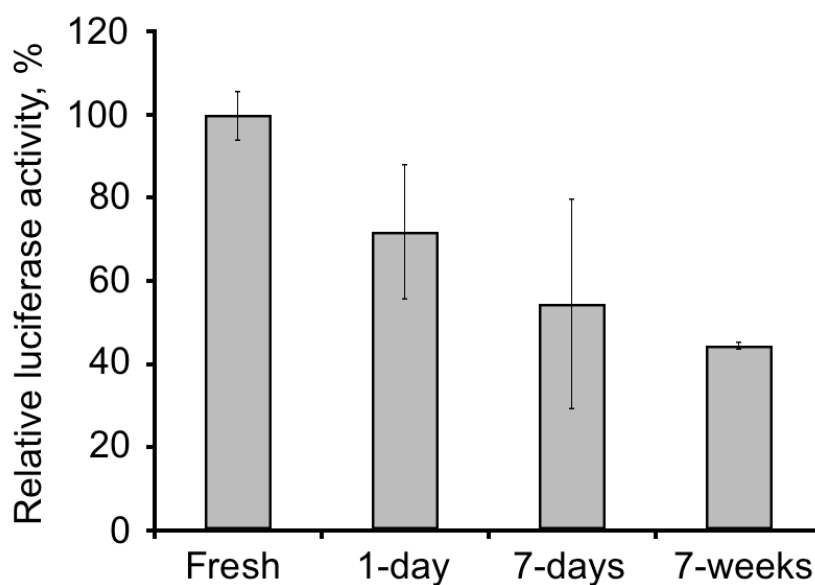


Fig. 3-7 凍結乾燥-再水和三元複合体の相対遺伝子発現活性
 Huh-7 cells in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL,
 pLuc/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:5:16), pLuc/chitosan (P:N = 1:5), transfection
 time = 4 h, post transfection time = 24 h, Storage period = 1-day, 7 days, or
 7-weeks. The luciferase activity of the cells transfected with freshly prepared
 pLuc/chitosan/CS-22 ternary complexes were defined as 100%. n = 3.

(5) WST-1 アッセイによる複合体の細胞毒性評価

保存後の pDNA 複合体と Huh-7 細胞の相互作用から 4 時間または 24 時間後の細胞生存率を以下の Fig. 3-8 に示す。

細胞との相互作用時間が 4 時間の場合、pTK/PEI 複合体では 70%程度の細胞生存率であったが、キトサン複合体では細胞生存率の有意な低下は認められなかった。pDNA 複合体との相互作用から 24 時間後においては、pDNA/キトサン複合体を pDNA 濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で投与時に 70%程度の細胞生存率であったが、用時調製または凍結乾燥-再水和コンドロイチン硫酸三元複合体投与時には試験濃度領域内において有意な細胞毒性は生じなかった。pDNA/キトサン複合体は、静電的相互作用で細胞膜表面上に非特異的に吸着・集合した結果、細胞毒性を生じたものと推察される。pDNA/PEI 複合体を pDNA 濃度 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で投与時、細胞生存率は 20%程度であり、高い細胞毒性が認められた。

以上の結果より、キトサン複合体は保存後においても PEI 複合体と比較して細胞生存率に与える影響が有意に小さいことが示された。

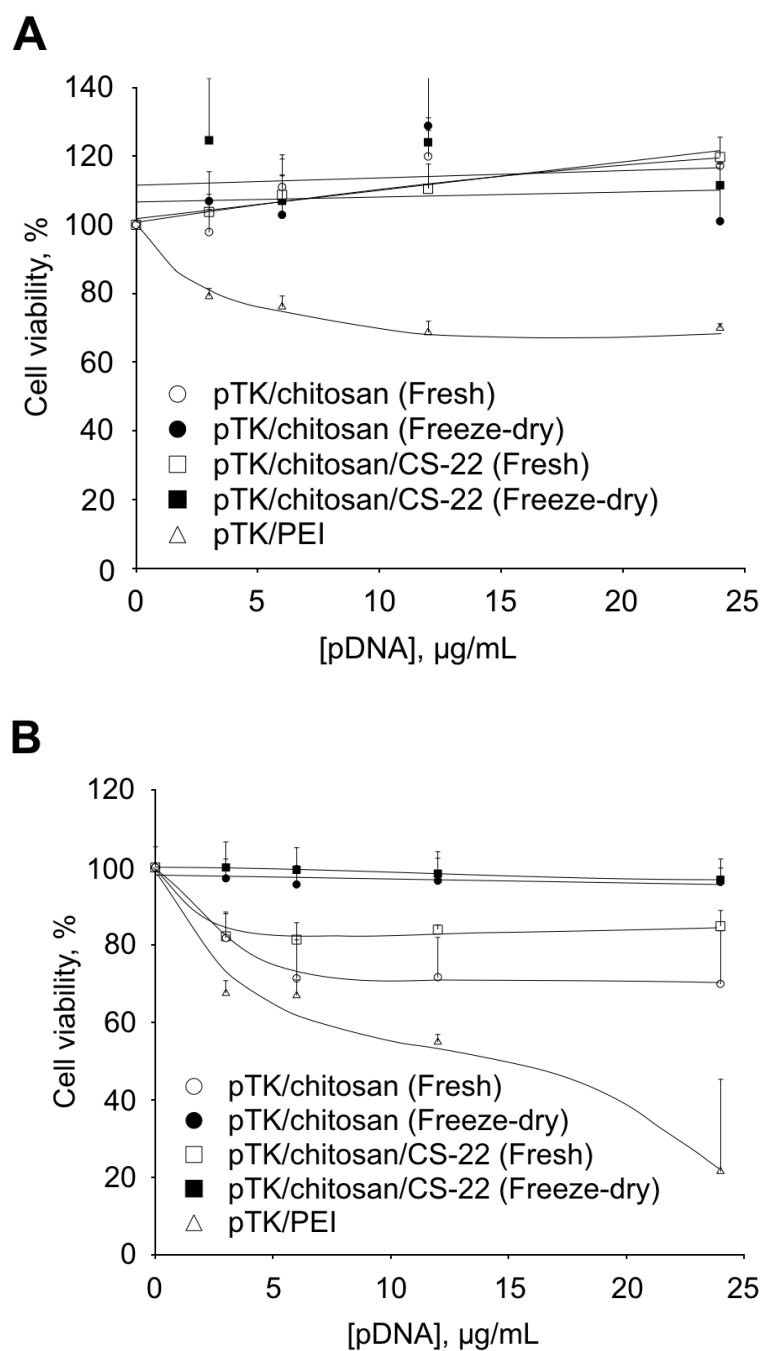


Fig. 3-8 pDNA 複合体投与から (A) 4 時間後および(B) 24 時間後の細胞生存率
 Huh-7 cells were treated with either freshly prepared or freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 ternary complexes (P:N:(-) = 1:8:16), pTK/chitosan complexes (P:N = 1:8), or pTK/PEI complexes (P:N = 1:8) in DMEM containing 10% FBS at a pDNA concentration of 3-24 μg/mL. After incubation for 4 h (A) and 24 h (B), cell viabilities were examined by the WST-1 assay. Control cells were defined as 100%, n = 3.

3.3.2 自殺遺伝子治療による抗腫瘍活性の検討

3.3.2.1 *In vitro* での細胞増殖抑制効果の検討

単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ (HSV-TK) をコードした pDNA (pTK) 複合体を用いて Huh-7 細胞のトランスフェクションを行い、HSV-1 TK の発現をウェスタンブロットティングで確認した。結果を Fig. 3-9 に示す。

pTK/キトサン複合体、pTK/キトサン/CS-22 三元複合体、凍結乾燥-再水和三元複合体によるトランスフェクションから 24 時間、48 時間、72 時間後において HSV-1 TK の発現を確認することができた。用時調製した三元複合体および凍結乾燥-再水和三元複合体でトランスフェクションした場合には 24 時間後または 48 時間後と比較して 72 時間後の発現量が多くなっていた。この点に関しては、三元複合体が細胞質中に安定して存在し核内に向けて徐放されているという可能性、または pTK に搭載された Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA-1) と EBV replication origin of plasmid (oriP) の効果でプラスミドが持続的に複製されたこと [13] による可能性が考えられた。

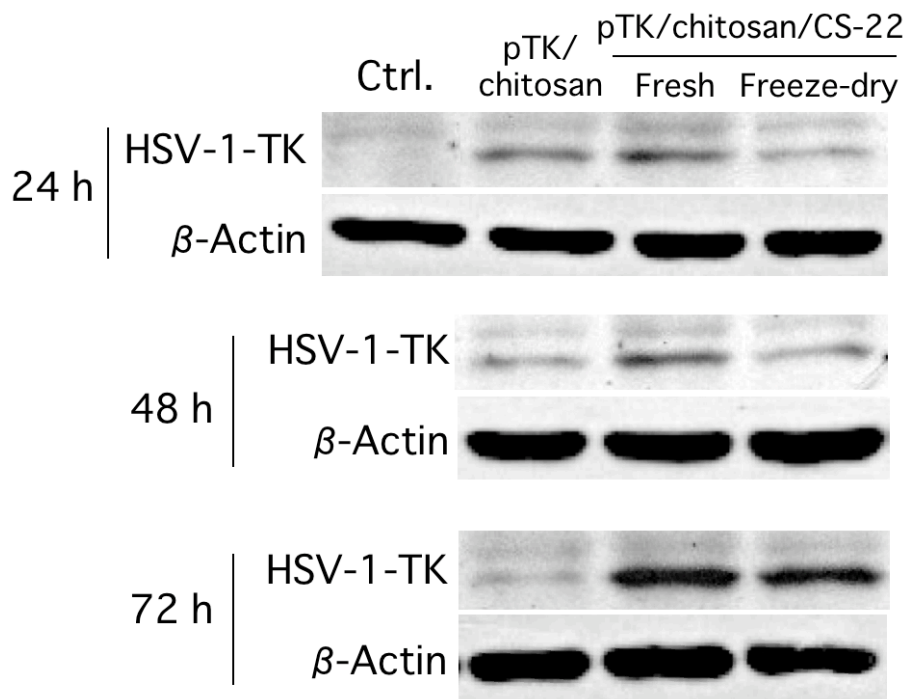


Fig. 3-9 ウェスタンブロッティングによる HSV-1 TK タンパク質の発現確認
 Huh-7 cells/well in DMEM containing 10% FBS, [pDNA] = 3 μ g/mL,
 pTK/chitosan (P:N = 1:8), pTK/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:8:16), Freeze-dried
 rehydrated pTK/chitosan/CS-22 pTK/chitosan/CS (P:N:(-) = 1:8:16),
 transfection time = 4 h, post transfection time = 24, 48, or 72 h.

Huh-7 細胞において、pTK 複合体と Ganciclovir (GCV) の併用による細胞増殖抑制効果を WST-1 アッセイによって評価した。結果を以下の Fig. 3-10 に示す。

pTK 複合体投与群では、GCV 濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で PBS 投与群と比較して有意に細胞生存率が低下した。pTK/キトサン複合体と凍結乾燥-三元複合体投与群は、GCV 濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき細胞生存率は 60%であり、同程度の細胞増殖抑制効果を示した。一方、用時調製した三元複合体では最大の細胞増殖抑制効果を示し、GCV 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき細胞生存率は 30%程度であった。なお、GCV 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合には 20%程度の細胞生存率の低下が認められたため、pTK と GCV の併用による細胞増殖抑制効果の検討には GCV 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を上限とした。

本実験により見出された各複合体の細胞増殖抑制効果はルシフェラーゼ遺伝子発現活性の結果と対応し、用時調製した pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体に次いで pDNA/キトサン複合体または凍結乾燥-再水和三元複合体という順に高い効果が認められた。

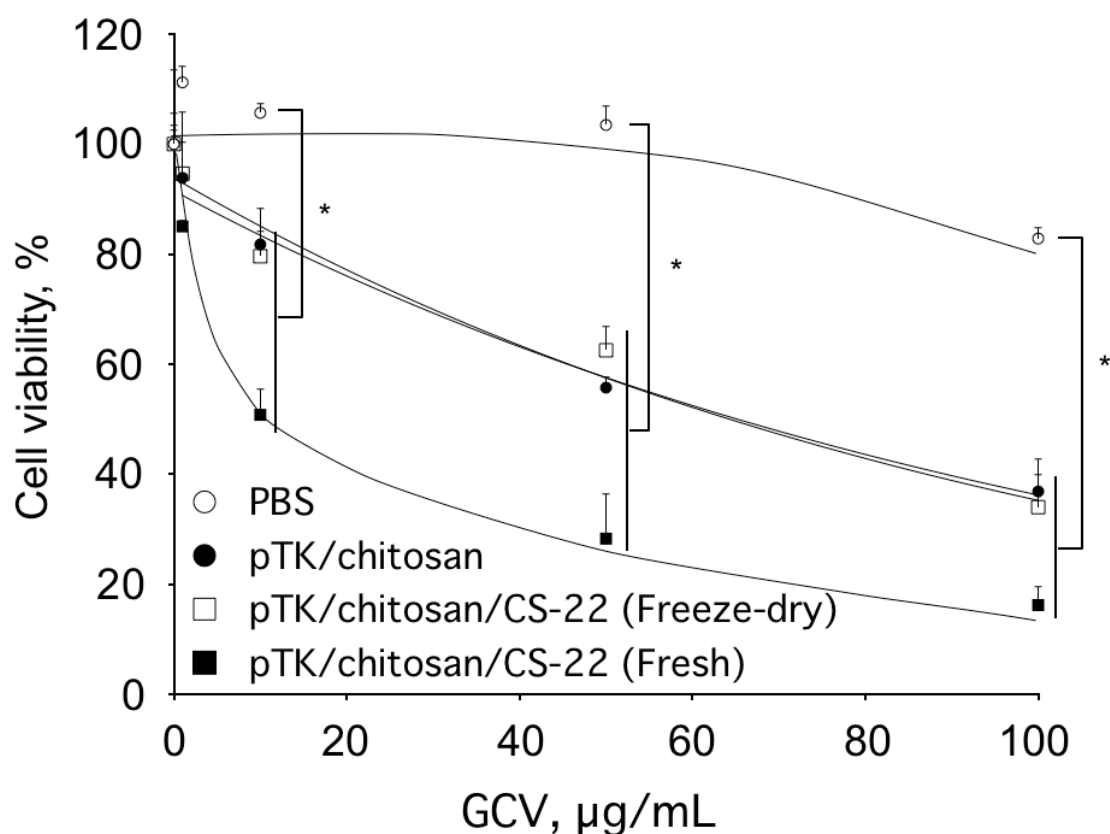


Fig. 3-10 pTK/chitosan/CS-22 三元複合体と GCV による Huh-7 細胞の細胞増殖抑制効果

Huh-7 cells were transfected with either freshly prepared or freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 ternary complexes (P:N:(-) = 1:8:16), or pTK/chitosan complexes (P:N = 1:8). After 24 h of transfection, cells were replated in the culture medium. The following day, cells were treated with 1, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$ of GCV in DMEM containing 10% FBS for 72 h. Cell viability was examined by the WST-1 assay (n = 6). Cell viabilities were compared with non-transfected cells using the Student's t test. * $P < 0.01$.

3.3.2.2 腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療

Huh-7 細胞を皮下投与された腫瘍形成マウスモデルにおいて、GCV と pTK 複合体の併用による自殺遺伝子治療を行い、pDNA 複合体の抗腫瘍活性について検討した。GCV 投与日を 100 とした場合の相対的な腫瘍サイズの推移を Fig. 3-11 および Fig. 3-12 に示す。

Naked pTK および pTK 不含有のキトサン/CS-22 複合体投与群において抗腫瘍活性は認められず、PBS 投与群と同程度のサイズまで腫瘍が成長した(Fig. 3-12)。それに対し、用時調製した三元複合体および凍結乾燥-再水和三元複合体投与群では、腫瘍成長が有意に抑制された (Fig. 3-11)。特に、用時調製した三元複合体は腫瘍成長を抑制しただけでなく、10 µg pDNA 量投与された群では 7 例中 6 例において 40~60%にまで、5 µg pDNA 量投与群では 4 例中 3 例で 25% まで腫瘍が縮小された。凍結乾燥-再水和三元複合体を pDNA 量 10 µg または 20 µg 投与した群では 90~115%の腫瘍サイズを示し、有意な腫瘍成長抑制効果が認められた。それに対し、pTK/キトサン複合体投与群では抗腫瘍活性は認められず、腫瘍サイズは 1500%まで成長した。

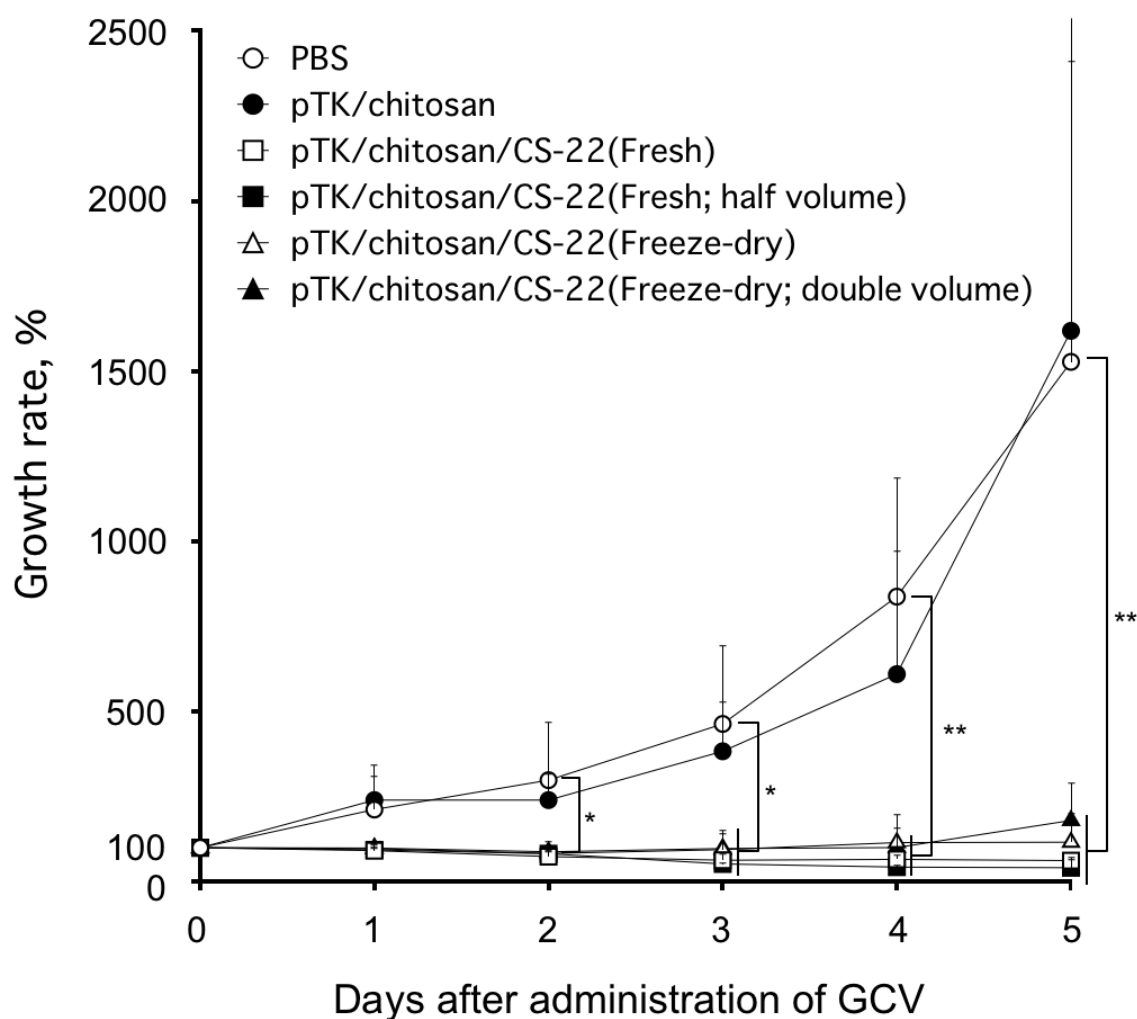


Fig. 3-11 自殺遺伝子治療法による腫瘍形成マウスの治療実験

Freshly prepared or freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 ternary complexes (P:N:(-) = 1:8:16) and freshly prepared pTK/chitosan complexes (P:N = 1:8) were intratumorally injected (pDNA of 5, 10, or 20 μ g) once a day for three days. The following day, GCV was intraperitoneally injected (100 mg/kg) once a day for five days. Growth rates were compared with the PBS-administrated group using the Mann-Whitney U test. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$. n = 4-7.

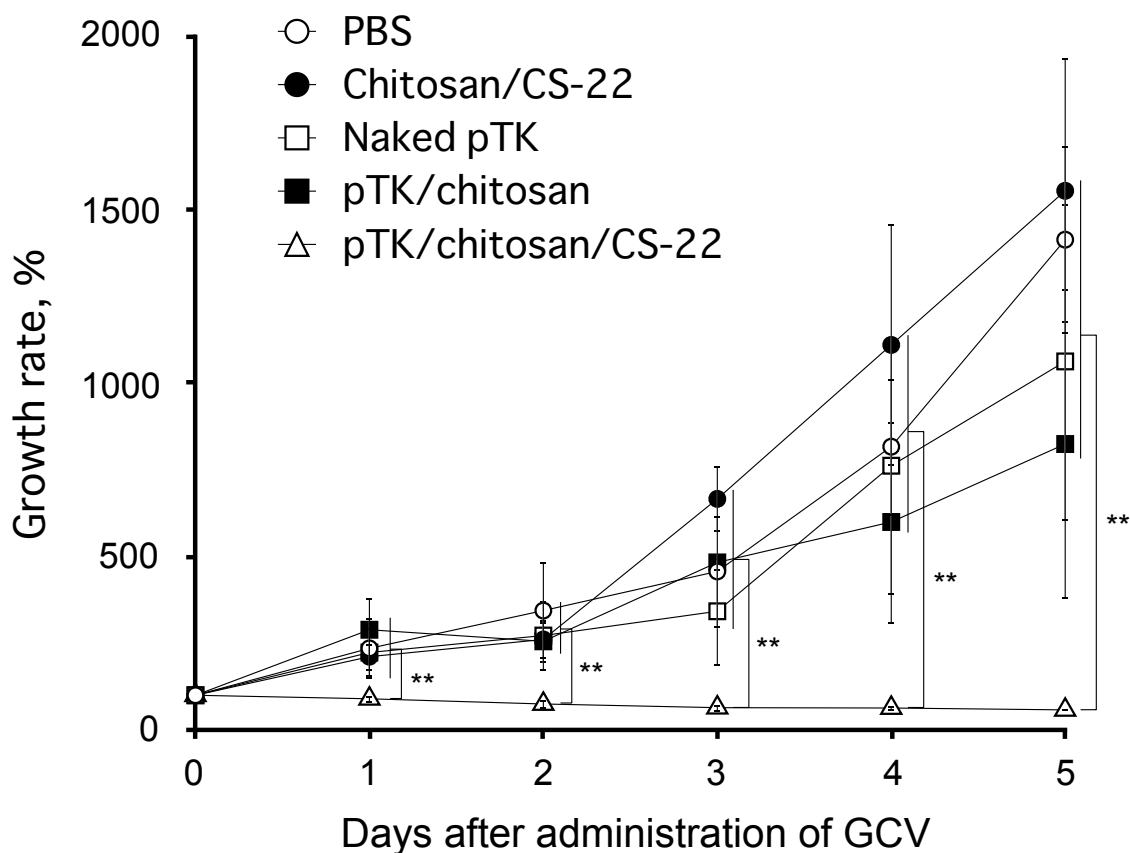


Fig. 3-12 自殺遺伝子治療法による腫瘍形成マウスの治療実験 (コントロール群)
 Freshly prepared pTK/chitosan/CS-22 ternary complexes (P:N:(-) = 1:8:16)
 and freshly prepared pTK/chitosan complexes (P:N = 1:8) were
 intratumorally injected (pDNA of 10 μ g) once a day for three days. The
 following day, GCV was intraperitoneally injected (100 mg/kg) once a day for
 five days. n = 3-5. Growth rates were compared with the
 pTK/chitosan/CS-22-administrated group using the Student's t test.
 ** $P < 0.01$.

pTK 複合体と GCV による腫瘍形成マウスの自殺遺伝子治療後、腫瘍切片をヘマトキシリン/エオジン染色し、病理組織学的検査を行なった。各群より代表的な1例を選択し、マクロ写真像を Fig. 3-13 に、ミクロ写真像を Fig. 3-14 に示す。

PBS 群、pTK 群、pTK/キトサン複合体群、キトサン/CS-22 複合体群では、群間に大きな差は無く真皮から皮下組織にかけて腫瘍細胞巣が観察された。観察された腫瘍細胞は、多型で核異型を呈し、核分裂を伴う活動的な腫瘍細胞であった (Fig. 3-14, 黒三角)。また、活発な腫瘍組織に特徴的な新生血管が多く観察された。一方、pTK/キトサン/CS-22 三元複合体群では、前述の活動的な腫瘍細胞も一部観察されたが、変性・壊死に陥った腫瘍細胞を示す均質無構造部位が散見された (Fig. 3-14, アステリスク)。したがって、三元複合体投与群においては腫瘍組織の成長が抑制されただけでなく、病理組織学的にも抗腫瘍効果を確認することができた。

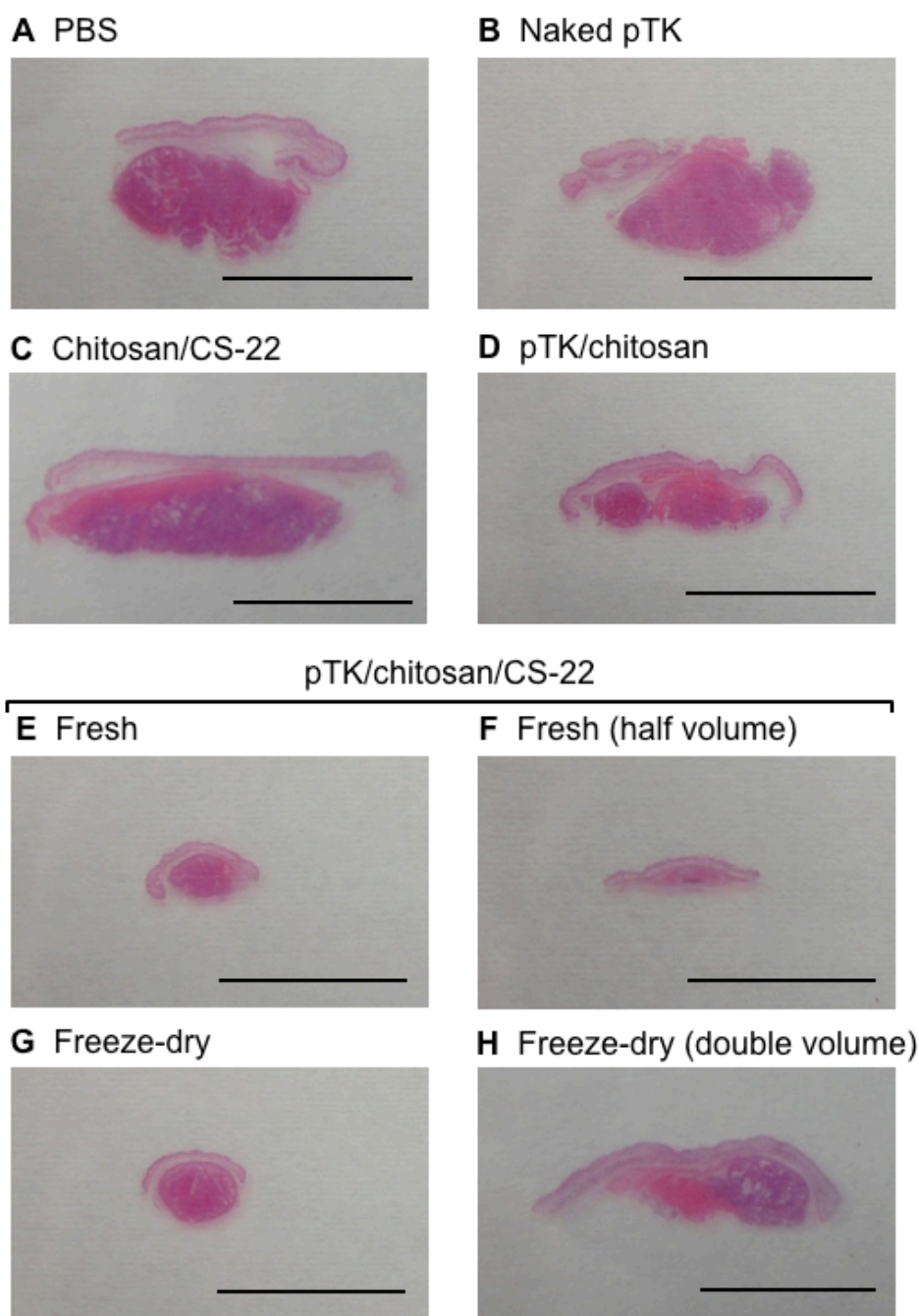


Fig. 3-13 HE 染色した腫瘍切片のマクロ写真像

(A) PBS, (B) naked pTK, (C) chitosan/CS-22 (N:(-) = 8:16), (D) pTK/chitosan (P:N = 1:8), (E) freshly prepared pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 10 μ g), (F) freshly prepared pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-)= 1:8:16 pDNA, of 5 μ g), (G) freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 10 μ g), and (H) freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 20 μ g), Bar = 1 cm.

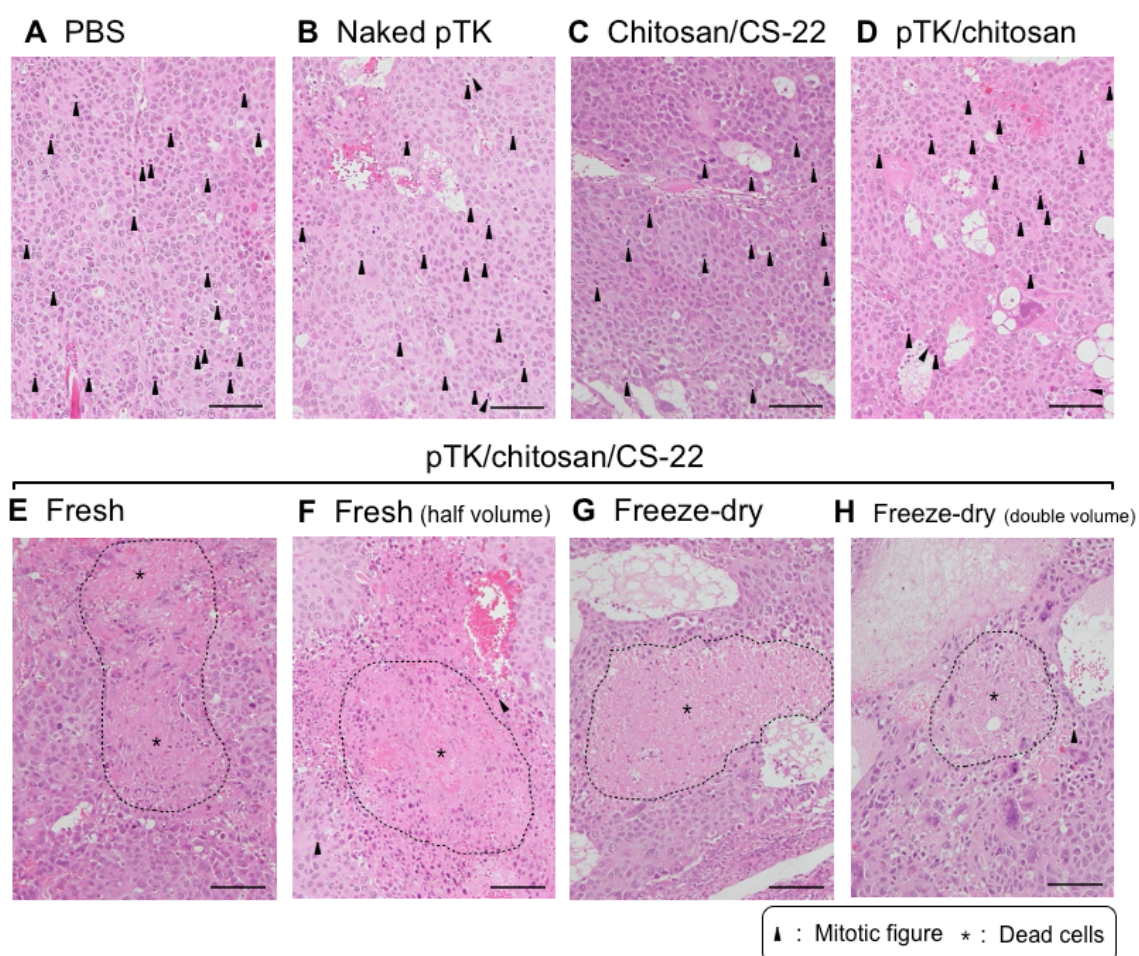


Fig. 3-14 HE 染色した腫瘍切片のマイクロ写真像

(A) PBS, (B) naked pTK, (C) chitosan/CS-22 (N:(-) = 8:16), (D) pTK/chitosan (P:N = 1:8), (E) freshly prepared pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 10 μ g), (F) freshly prepared pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16 pDNA, of 5 μ g), (G) freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 10 μ g), and (H) freeze-dried thawed rehydrated pTK/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16, pDNA of 20 μ g), Bar = 100 μ m.

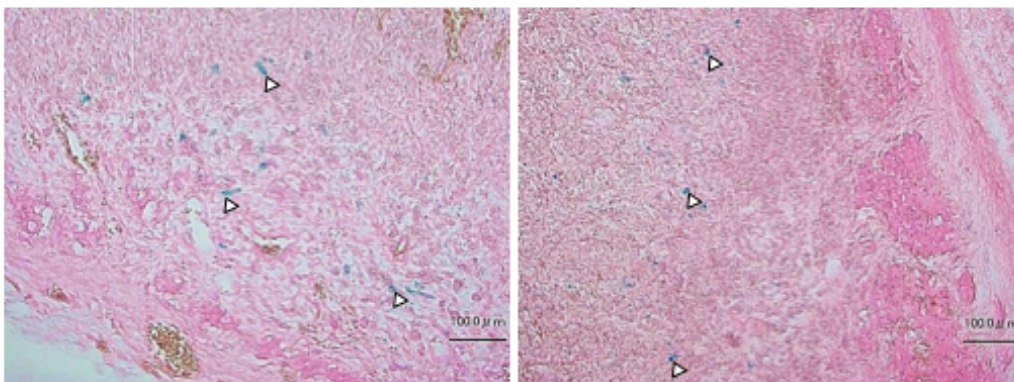
(3) 腫瘍組織での β -ガラクトシダーゼアッセイ

pGal (β -Galactosidase coding pDNA) 複合体を腫瘍組織に局所投与し、X-gal 染色することで遺伝子発現の分布を調べた。染色像を以下の Fig. 3-15 に示す。

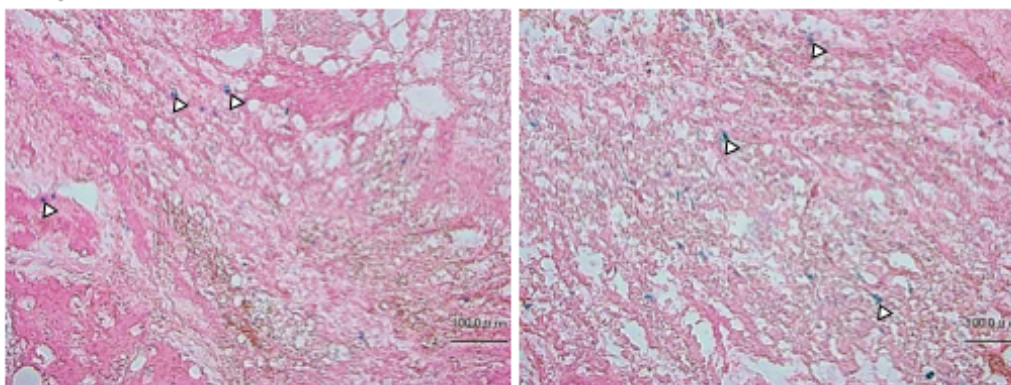
Naked pGal および pGal/キトサン複合体投与時に β -ガラクトシダーゼ発現細胞は局限していた (Fig. 3-15 A,B)。 *in vitro* で pDNA/キトサン複合体は細胞増殖抑制効果が認められたのに対して *in vivo* では抗腫瘍活性を示さなかった理由は、腫瘍組織内での遺伝子発現が局所的であることが要因の 1 つであることが明らかになった。この点に関し、pDNA/キトサン複合体が細胞膜、赤血球、血清タンパク質等の生体物質と静電相互作用することで腫瘍組織における浸潤性が低下したものと考えられた。

一方、用時調製または凍結乾燥再水和した pGal/キトサン/CS-22 三元複合体投与時は腫瘍内に広く分布した遺伝子発現が認められた (Fig. 3-15 C,D)。さらに、pGal 三元複合体群では Naked pGal および pGal/キトサン複合体群と比較し、 β -ガラクトシダーゼ発現細胞数は有意に増加していた (Fig. 3-15 E)。コンドロイチン硫酸被覆により、pDNA 複合体が血中成分や細胞膜との非特異的相互作用を免れ腫瘍内での安定性や組織浸潤性が向上したことで、*in vivo* においても高い遺伝子発現活性が示されたものと考えられる。

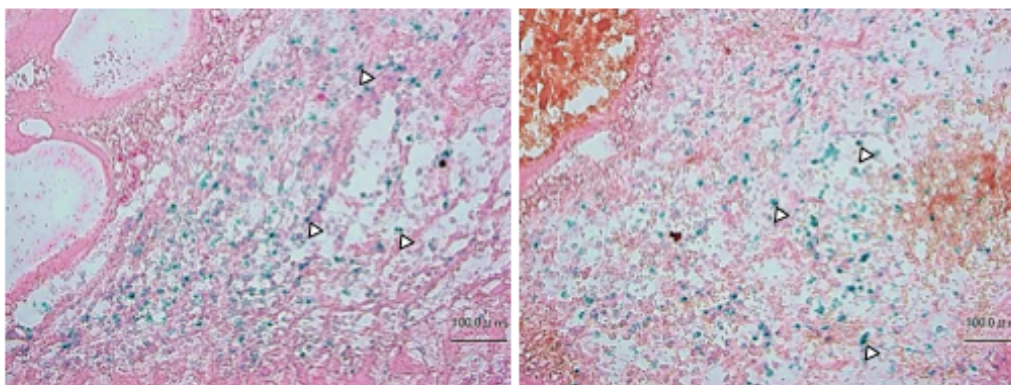
A Naked pTK



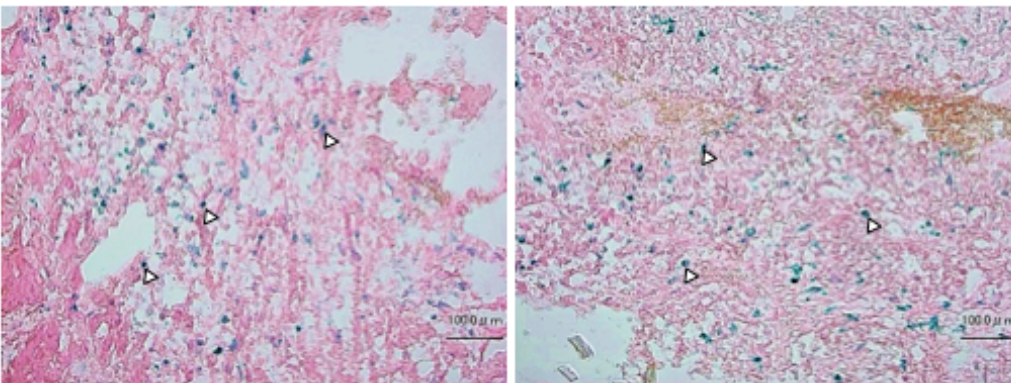
B pTK/chitosan

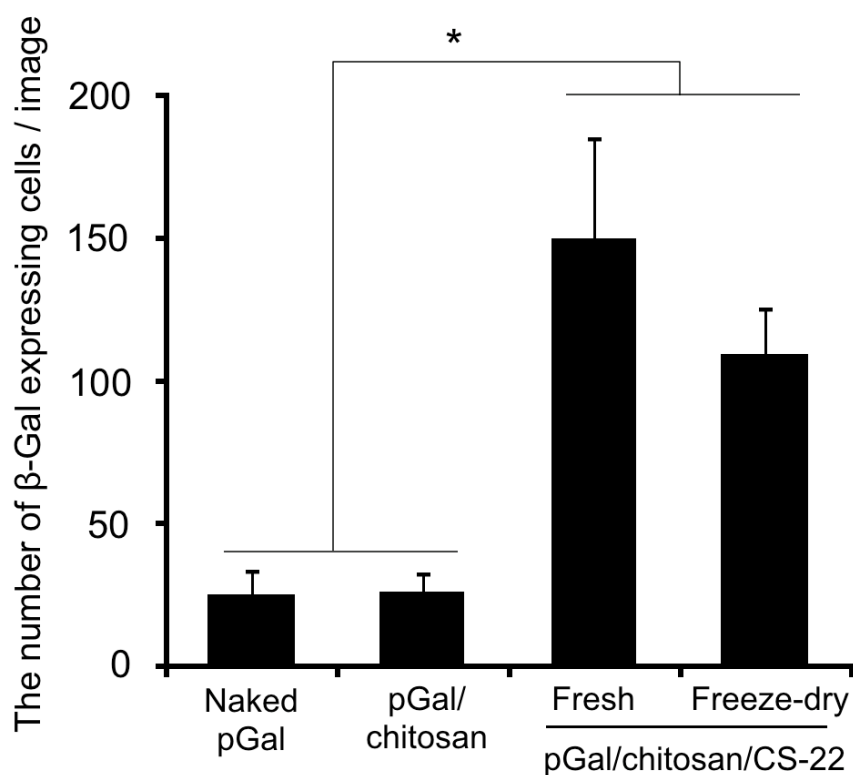


C pTK/chitosan/CS-22 (Fresh)



D pTK/chitosan/CS-22 (Freeze-dry)



E The number of the β -galactosidase expressing cellsFig. 3-15 *in vivo* での β -ガラクトシダーゼ遺伝子発現

(A) Naked pGal, (B) pGal/chitosan (P:N = 1:8), (C) freshly prepared pGal/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16), (D) freeze-dried thawed rehydrated pGal/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:8:16), Bar = 100 μ m. (E) the number of the β -galactosidase expressing cells (blue). The numbers of the cells were compared with the naked pGal-administrated group using a Student's t test. * $P < 0.01$, $n = 6$.

3.3.3 総括

本章では、凍結乾燥製剤への応用に向け pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の粒子径、ゼータ電位、粒子形態、pDNA の安定性、遺伝子発現活性について評価した。さらに *in vivo* で腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療を行い、三元複合体の抗腫瘍効果について論じた。

pDNA/キトサン複合体は、凍結乾燥保存・凍結保存・溶液保存後に沈殿物を形成し、再水和または再分散が困難であった。一方、pDNA/キトサン複合体をコンドロイチン硫酸で被覆した場合には、これらの条件で保存後に再水和・再分散することが可能であった。用時調整した三元複合体と比較し、凍結乾燥-再水和した三元複合体ではわずかに粒子径の増大が認められたものの、コンドロイチン硫酸で十分に被覆されたグローブ構造は維持されていることが分かった。pDNA の安定性試験より、凍結乾燥-再水和三元複合体は pDNA の分解を抑制し、ルシフェラーゼ遺伝子およびチミジンキナーゼ遺伝子発現活性を十分に保持していることが示された。これらの結果より、三元複合体を凍結乾燥後に-20 °C で保存し使用直前に再水和する「凍結乾燥-再水和型」の保存方法が適していることが明らかになった。

in vivo での腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療実験の結果、コントロール群と比較し pDNA/キトサン複合体群では腫瘍が顕著に増大した。それに対し、三元複合体群においては腫瘍成長が有意に抑制され、凍結乾燥-再水和三元複合体群においても同等の抗腫瘍効果が認められた。三元複合体が投与された腫瘍組織では壊死部位が散見され、残存した腫瘍細胞は増殖期から外れ静止期に移行していることが示唆された。したがって、病理組織学的にも三元複合体の抗

腫瘍効果を確認することができた。

以上より、pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は *in vivo* においても高い遺伝子発現活性を有する、凍結乾燥-再水和型製剤としての可能性が示された。

3.4 参考文献

- [1] M.C. Molina, S.D. Allison, T.J. Anchordoquy, Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators., *J. Pharm. Sci.* 90, 1445-1455 (2001).
- [2] S.D. Allison, T.J. Anchordoquy, Mechanisms of protection of cationic lipid-DNA complexes during lyophilization., *J. Pharm. Sci.* 89 682-691 (2000).
- [3] B. Li, S. Li, Y. Tan, D.B. Stolz, S.C. Watkins, L.H. Block, et al., Lyophilization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes., *J. Pharm. Sci.* 89, 355-364 (2000).
- [4] D.M. Pardoll, Paracrine cytokine adjuvants in cancer gene therapy., *Annu. Rev. Immunol.* 13, 399-415 (1995).
- [5] D.M. Pardoll, Cancer vaccines, *Nat. Med.* 4, 525-531 (1998).
- [6] E.H. Oldfield, Z. Ram, D.W. Culver, H.L. DeVroom, R.M. Blaese, Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral

- transduction with the thymidine kinase gene and intravenous gancyclovir., *Hum. Gene Ther.* 4, 39-69 (1993).
- [7] K. Ono, M. Ishihara, K. Ishikawa, Y. Ozeki, H. Deguchi, M. Sato, H. Hashimoto, Y. Saito, H. Yura, A. Kurita, T. Maehara, Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung., *Br. J. Cancer* 86, 1803-1812 (2002).
- [8] T. Ito, C. Yoshihara, K. Hamada, Y. Koyama, DNA/polyethyleneimine /hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice., *Biomaterials* 31, 2912-2918 (2010).
- [9] M.C. Molina, S.D. Allison, T.J. Anchordoquy, Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators., *J. Pharm. Sci.* 90, 1445-1455 (2001).
- [10] T.J. Anchordoquy, J.F. Carpenter, D.J. Kroll, Maintenance of transfection rates and physical characterization of lipid/DNA complexes after freeze-drying and rehydration., *Arch. Biochem. Biophys.* 348, 199-206 (1997).
- [11] C.T. Lee, C.P. Huang, Y.D. Lee, Preparation of amphiphilic poly(L-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior., *Biomacromolecules* 7, 1179-1186 (2006).
- [12] K. Osada, H. Oshima, D. Kobayashi, M. Doi, M. Enoki, Y. Yamasaki, K.

Kataoka, Quantized folding of plasmid DNA condensed with block cationer into characteristic rod structures promoting transgene efficacy., *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12343-12348 (2010).

- [13] O. Mazda, E. Satoh, K. Yasutomi, J. Imanishi, Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors., *J. Immunol. Methods*, 204, 143-151 (1997).

第4章 pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の転写 および翻訳効率

4.1 緒言

非ウイルスベクターが目的の遺伝子を発現するまで、細胞内への取り込み、エンドソーム脱出、核内への移行、mRNA への転写およびタンパク質への翻訳といった多段階にわたるステップを通過する必要がある[1]。これらの細胞外および細胞内動態における各ステップに進行した割合を調べることにより、非ウイルスベクターの遺伝子発現活性の低さがどのステップを律速としているのか、明らかにする手法が提案された[2]。Hama らは、市販の遺伝子導入試薬であるカチオン性脂質 LipofectAMINE PLUS (LFN) およびアデノウイルスベクターの両者において上記の各ステップへの進行量を定量的に検討し、核移行後の遺伝子発現活性はアデノウイルスの方が LFN よりも数千倍高いことを示した。すなわち、LFN とアデノウイルスによる遺伝子発現活性の大きな差は、核移行後の転写効率および翻訳効率の違いに起因するといえる。このような核移行後の発現活性に着目した例として、Masuda らは、脂質エンベロープ型遺伝子キャリアーにテトラエチレングリコール (TEG) 修飾コレステロールを組み込むことで細胞内部への取り込み量ならびに転写効率が向上し、TEG 未修飾時の 100 倍の遺伝子発現活性を得ることに成功した[3]。転写効率の向上は核内で pDNA 複合体の解離が促進された結果によるものであった。

これまでに、pDNA/キトサン複合体をコンドロイチン硫酸で被覆することに

で血清タンパク質や赤血球存在下での安定性が向上し、細胞内部への取り込み量、*in vitro* と *in vivo* で遺伝子発現活性が向上することが明らかになった。本章では、三元複合体の細胞内への取り込み量、核内への移行量、および遺伝子発現活性に関し、リアルタイム PCR を用いてより定量的に評価する。pDNA 複合体によるトランスフェクション後、pDNA の核移行量とセントラルドグマの中間体である mRNA レベルでの発現量を測定することで、遺伝子発現活性を「転写効率」と「翻訳効率」の指標に分離して評価する。pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の物理化学的な性質の違いから、転写および翻訳効率との関連性について論じる。

4.2 実験方法

4.2.1 材料

pLuc、キトサン、およびコンドロイチン硫酸は第二章と同様のものを使用した。ヒアルロン酸 (HA-1300, $M_w = 1300$ kDa) は生化学工業株式会社より提供された。

4.2.2 複合体の作製

トランスフェクションに用いる pDNA 複合体、共焦点レーザー顕微鏡観察およびフローサイトメトリーに用いる YOYO-1 標識 pDNA 複合体は、2.2.2 の通り作製した。

4.2.3 YOYO-1 pDNA 複合体を用いた蛍光消光アッセイ

YOYO-1 標識した pDNA/キトサン複合体 (P:N = 1:5)、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体 (P:N:(-) = 1:5:16)、pDNA/キトサン/HA-1300 三元複合体 (P:N:(-) = 1:5:16) を 10 mM MOPS (pH 6.5) で pDNA 濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した。それぞれの溶液を 96 ウェルプレート (greiner) に添加し、励起フィルター 485/20 nm、蛍光フィルター 528/20 nm、下方測定の場合でマイクロプレートリーダー (POWERSCAN HT, DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて測定した。

4.2.4 細胞培養

COS7 細胞の培養および継代方法は 2.2.11 の通り行った。

4.2.5 トランスフェクション

トランスフェクション当日に 70-80%コンフルエントになるよう COS7 細胞が播種された 6 ウェルプレート (IWAKI) に pDNA/キトサン複合体 (P:N = 1:5) または pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体 (P:N:(-) = 1:5:16) を pDNA 濃度 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう 添加し、DMEM 10% FBS (pH 6.5) 中で所定時間培養した。

4.2.6 トランスフェクション後の細胞の回収

トランスフェクション 1, 2, 4 時間後に、20 units/mL Heparin (Wako) /PBS(-) で 3 回洗浄し、1, 2, 4 時間用サンプルをトリプシン処理によって回収した。8, 24 時間用サンプルは DMEM 10%FBS で所定時間インキュベーション後、PBS(-)

で洗浄しトリプシン処理によって細胞を回収した。

4.2.7 核の単離

核画分の単離は文献[4]に従い、以下の通り行った。4.2.6で回収した細胞ペレットに対し、CellScrub Buffer (フナコシ) 375 μ L を加えて懸濁しさらに cell lysis solution (2% IGEPAL CA630, 40 mM NaCl, 12 mM $MgCl_2$ and 40 mM Tris-HCl, pH 7.4) 125 μ L を添加し緩やかに攪拌した。その後、4 $^{\circ}C$ で 9200 $\times g$, 2 分間遠心して上清を除去した。この操作を慎重に 3 度繰り返した。最終的に得られたペレットを核画分として使用した。

4.2.8 Total DNA の抽出・精製

Total DNA の抽出と精製操作は、DNeasy kit (QIAGEN) に付属のプロトコールに従い以下の通り行なった。4.2.6で回収した細胞ペレットを 200 μ L PBS(-) に懸濁し、4 μ L RNase A (100 mg/mL) を加え、2 分間室温で静置した。20 μ L Proteinase K, 200 μ L Buffer A1 を加えて振盪後、70 $^{\circ}C$ で 10 分間静置した。その後、200 μ L EtOH (96-100%)を加え、DNeasy mini spin column に溶液を移した。6,000 $\times g$ で 1 分遠心し、素通り画分を除去した。カラムを 2 mL collection tube に載せ、500 μ L buffer AW1 を添加し、6,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。再びカラムを新しい collection tube に載せ、500 μ L buffer AW2 を添加し、12,000 $\times g$ で 3 分間遠心した。1.5 mL チューブにカラムを載せ換え、200 μ L buffer AE を添加し、1 分間室温で静置した。その後、6,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、DNA を溶出した。

4.2.9 Total RNA の抽出・精製

Total RNA の抽出は RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従い以下の通り行った。全ての操作は、RNase コンタミネーション防止のために手袋とマスクをして行った。また、Total RNA 抽出成分に DNA のコンタミネーションしないよう事前にオンカラム DNase 処理を行なった。

オンカラム DNase 処理は以下の通り行なった。RNeasy スピんカラムに 350 μ L Buffer RW1 を添加し、8,000 \times g で 15 秒間遠心した。素通り画分を除去し、70 μ L Buffer RDD に DNase I 溶液 (QIAGEN) を 10 μ L 加え、混合溶液を全量 RNeasy スピんカラムに添加した。室温で 15 分間静置後、350 μ L Buffer RW1 を添加し、8,000 \times g で 15 秒間遠心して素通り画分を捨てた。回収した細胞ペレットに、1% 2-メルカプトエタノール含有 RLT 溶液 350 μ L を加えた。ピペッティングにより細胞を溶解した後、RNeasy スピんカラムにライセートを回収し、16,000 \times g, 2 分間室温で遠心した。素通り画分に RNase free water で希釈した 70%エタノール (nacalai tesque) を 350 μ L ずつ加え、ピペッティングによりよく混和した。これを RNeasy スピんカラムにアプライし、8,000 \times g, 35 秒間室温で遠心しカラムに RNA を吸着させた。素通り画分を捨て、RW1 を 700 μ L 加え、8,000 \times g, 35 秒間室温で遠心した。素通り画分を捨て、4 倍量のエタノールを加えた RPE を 500 μ L 加え、8,000 \times g, 15 秒間室温で遠心した。再び素通り画分を捨て、4 倍量のエタノールを加えた RPE を 500 μ L 加え、16,000 \times g, 2 分間室温で遠心した。スピんカラムを新しい 2 mL コレクションチューブにセットし、16,000 \times g, 1 分間室温で遠心した。カラムを新しい 1.5 mL チューブにセ

ットし、キット付属の RNase free H₂O を 50 μL 加え、8,000 ×g, 1 分間室温で遠心することにより RNA を溶出した。

4.2.10 リアルタイム PCR

(1) 原理

リアルタイム PCR とは、PCR の増幅量をリアルタイムでモニターして解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。この方法にはサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイム PCR 専用の装置が必要である。

今回は蛍光モニター法として、SYBR Green I を用いるインターカレーター法を用いた (Fig. 4-1)。SYBR Green I は二重らせん構造をとる DNA 鎖と特異的に結合し、DNA と結合することで青色光 ($\lambda = 488 \text{ nm}$) を吸収し、緑色光 ($\lambda = 522 \text{ nm}$) の蛍光を発する。PCR 反応系に混在させると、PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA に結合して励起光の照射により蛍光を発するため、この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニタリングすることが可能である。

インターカレーター法は遺伝子ごとに専用プローブが必要なく、実験コスト、手間が省けるのがメリットである。その反面、蛍光色素は二本鎖 DNA 全てを検出するため、プライマーダイマーやミスプライミングによる増幅産物も同時に検出してしまうというデメリットがある。

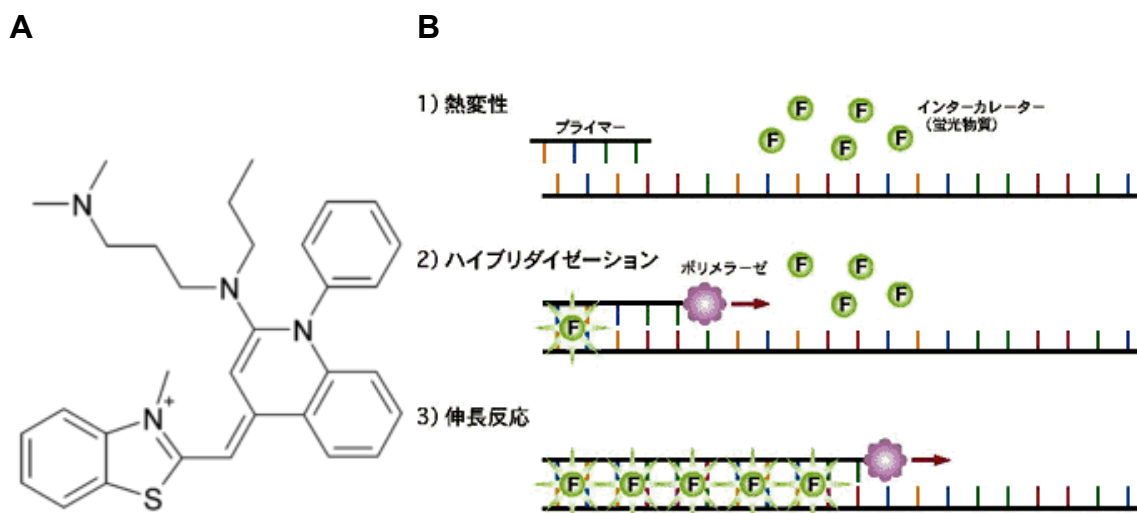


Fig. 4-1 (A) SYBR Green I の構造式と
 (B) インターカレーター法の原理 ([5]より引用)

(2) pLuc の定量

リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を使い、LightCycler (Roche Diagnostics) で行った。PCR 反応プロトコール、使用したプライマー配列、リアルタイム PCR 反応溶液の組成は以下に示す。得られた Crossing Point の値 (以下 Cp 値) を測定値とした。

PCR 反応プロトコール

95 °C, 30 sec → [95 °C, 5 sec → 57 °C, 20 sec → 72 °C, 10 sec] x 50 cycle

Table 4-1 使用したプライマー配列

Name	Forward Primer	Reverse Primer	Product size
<i>Luciferase</i>	TTGACCGCCTGAAGTCTCTGA	ACACCTGCGTCGAAGATGTTG	103 bp
<i>β-actin</i>	CGTGCGTGACATTAAGGAGAAG	TTGCCAATGGTGATGACCTG	132 bp

Table 4-2 PCR 反応溶液の組成

Reagents	μL
2 x SYBR premix Ex Taq	10
Forward Primer (10 μM)	0.8
Reverse Primer (10 μM)	0.8
Total DNA solution	1
Distilled Water	7.4
Total	20

トランスフェクションから各時間における COS7 細胞単離核の Total DNA をリアルタイム PCR に供し、細胞数に対する *β -Actin* の Cp 値の検量線を作製した。また 1 mg/mL の pLuc 溶液から 10 倍希釈系列を作製し、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-8}$ mg/mL の溶液を検量線用サンプルとして pLuc 濃度と *Luciferase* の Cp 値の検量線を作成した。得られた検量線から各サンプルの細胞数と pLuc 濃度を求め、核内または細胞内に到達した pLuc のコピー数を算出した。

(3) *Luciferase* mRNA の定量

リアルタイム PCR は QuantiTect RT-PCR (タカラバイオ) を用い、LightCycler で行った。PCR 反応プロトコール、使用したプライマー配列、リアルタイム PCR 反応溶液の組成は以下に示す。

PCR 反応プロトコール

95°C, 30 sec \rightarrow [95°C, 5 sec \rightarrow 57°C, 20 sec \rightarrow 72°C, 10 sec] x 50 cycle

Table 4-3 使用したプライマー配列

Name	Forward Primer	Reverse Primer	Product size
<i>Luciferase</i>	TTGACCGCCTGAAGTCTCTGA	ACACCTGCGTCGAAGATGTTG	103 bp
<i>GAPDH</i>	CTGCCGTCTGGAAAAACCTGCC	AAGGTGGAAGAGTGGGTGTCGCT	147 bp

Table 4-4 PCR 反応溶液の組成

Reagents	μL
2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10
Forward Primer (10 μM)	1
Reverse Primer (10 μM)	1
Template RNA	1
QuantiTect RT Mix	0.2
RNase-free water	6.8
Total	20

トランスフェクションから各時間における COS7 細胞の Total RNA をリアルタイム PCR に供し、細胞数に対する *GAPDH* の C_p 値の検量線を作製した。また 1 mg/mL の pLuc 溶液から 10 倍希釈系列を作製し、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-8}$ mg/mL の溶液を検量線用サンプルとして pLuc 濃度と *Luciferase* の C_p 値の検量線を作成した。得られた検量線から各サンプルの細胞数と *Luciferase* mRNA 濃度を求め、細胞あたりの *Luciferase* mRNA コピー数を算出した。

4.2.11 転写および翻訳効率の算出

転写効率と翻訳効率は文献[3]に従い、以下の通り算出した。転写効率は、*Luciferase* mRNA 発現量のピーク値までの AUC (area under the curve) を、核内 pLuc 量のピーク値までの AUC で除した値とした。翻訳効率は、*Luciferase* タンパク質発現量のピーク値までの AUC を、*Luciferase* mRNA 発現量のピーク値までの AUC にて除した値とした。転写翻訳効率は、*Luciferase* タンパク質発現量のピーク値までの AUC を、核内 pLuc 量のピーク値までの AUC で除した値とした。

4.2.12 データの取り扱いおよび統計処理

複数回測定したデータに関しては、各データの平均値を採用し、エラーバーは標準偏差値として示した。統計処理は各図キャプションに記した方法に基づき行なった。

4.3 結果および考察

4.3.1 YOYO-1 pDNA 複合体を用いた蛍光消光アッセイ

YOYO-1 標識した pDNA は、カチオン性高分子との相互作用でパッキングされると自己消光し蛍光強度が低下する[6]。この現象を利用することで、pDNA 複合体のパッキング強度を評価する手法が確立された[7]。小山らは、pDNA 複合体のパッキングを緩めるよう分子設計することで、pDNA から mRNA への転写効率が向上することを報告した[8]。本項では、pDNA/キトサン複合体と三元複合体のパッキング強度を YOYO-1 蛍光消光アッセイにより比較評価した。

pDNA 複合体形成後の複合体溶液の蛍光強度を Fig. 4-2 に示す。

Naked pDNA の蛍光強度を 100%とした場合、pDNA/キトサン複合体の蛍光強度は 20%程度に低下した。したがって、キトサンにより pDNA が強くパッキングされ、複合体内部において YOYO-1 蛍光分子が密に集合することで自己消光していることが示された。一方、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体または pDNA/キトサン/HA-1300 三元複合体の蛍光強度はそれぞれ 70%、60%程度を示した。よって、両三元複合体は pDNA/キトサン複合体よりも比較的緩やかにパッキングされた粒子形態をとることが考えられた。また、コンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸三元複合体間での有意な蛍光強度の違いは ($P<0.01$)、pDNA/キトサン複合体の被覆に用いるアニオン性高分子の性質によってパッキング強度が変化することを示唆するものである。この効果は、コンドロイチン硫酸の硫酸基に富み電荷密度が高い性質が、キトサンによる pDNA パッキング強度を緩めたことに起因すると推察された。

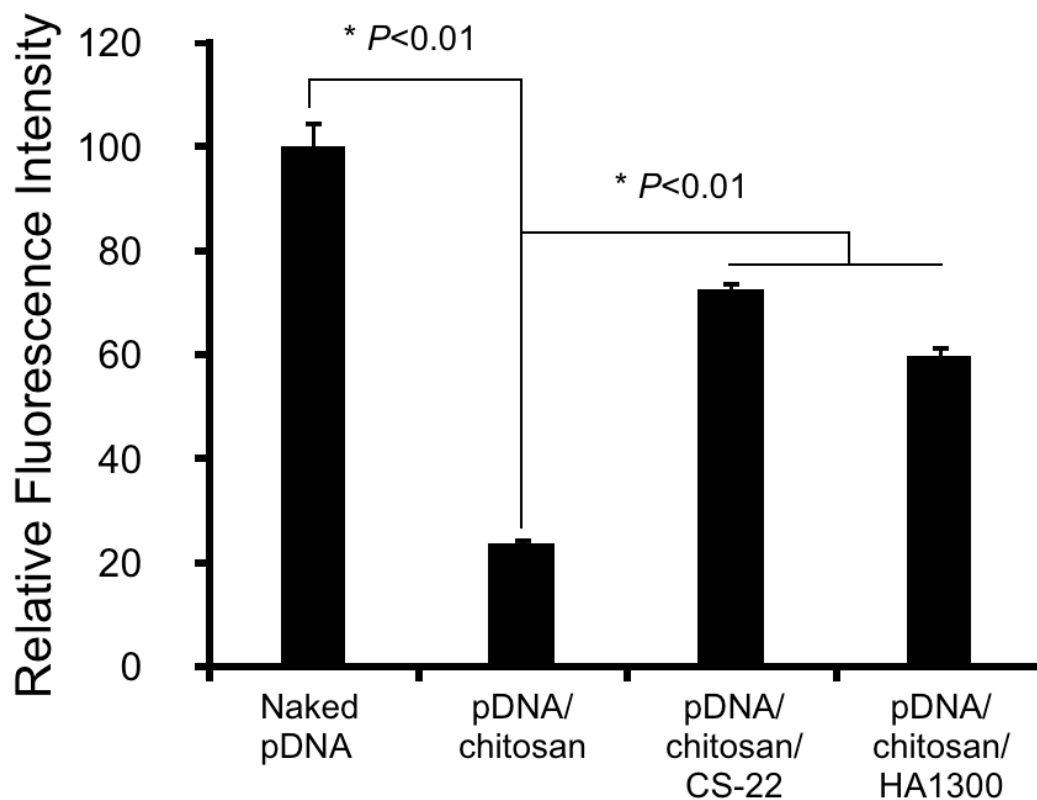


Fig. 4-2 YOYO-1 標識 pDNA 複合体の蛍光消光アッセイ

Fluorescence intensities of naked pDNA, YOYO-1 pLuc/chitosan (P:N = 1:5), YOYO-1 pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), and YOYO-1 pLuc/chitosan/HA-1300 (P:N:(-) = 1:5:16) were measured. Student's t test, $n = 3$.

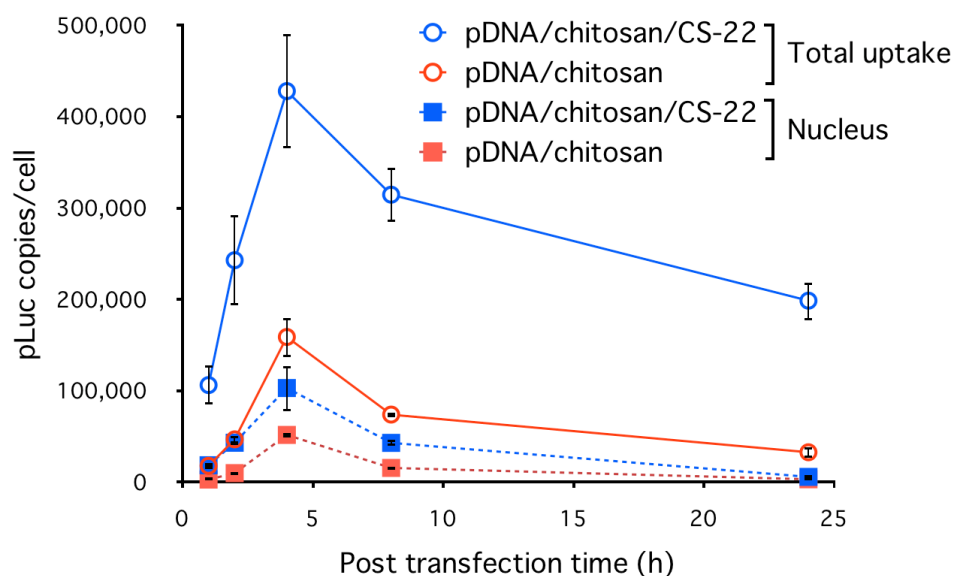
4.3.2 細胞内および核内の pLuc 量

細胞内および核内に取り込まれた pLuc のコピー数をリアルタイム PCR によって定量した。pLuc/キトサン複合体または pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体による COS7 細胞をトランスフェクション後の pLuc 量の定量的な解析結果を Fig. 4-3 に示す。

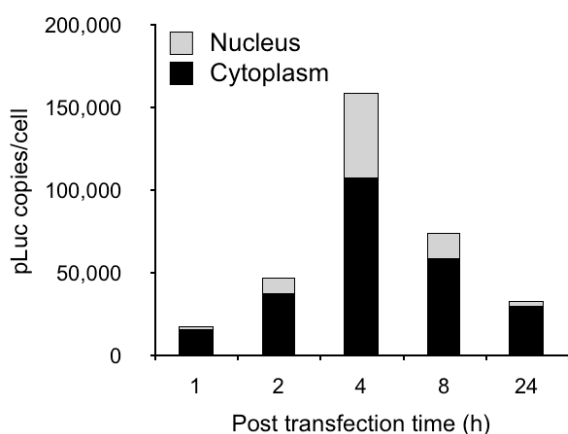
pLuc/キトサン複合体によるトランスフェクションの場合、4 時間後において細胞内への pLuc の取り込み量は最大となった。この時点での細胞内 pLuc 量を 100%としたとき、8 時間後には 47%、24 時間後には 21%を示した。同様に、pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体によるトランスフェクションの場合、細胞内への到達量は 4 時間後に最大を示した。この時点での pLuc 量を 100%としたときに、8 時間後に 74%、24 時間後に 46%を示した。これらの結果より、pDNA/キトサン複合体と比べて三元複合体によるトランスフェクションでは細胞内部に取り込まれる pLuc が多く、経時的な減少率は緩やかであった。この現象は、pDNA/キトサン複合体がライソゾームに移行する一方、三元複合体は移行しないために長期的に安定して細胞内に存在することに起因することが示唆された。

また、核内への移行量は、pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体でのトランスフェクションから 4 時間後に最大を示した。このときの pLuc 量を 100%とした場合、両複合体で 8 時間後に 30~40%、24 時間後に 5%程度を示した。したがって、核内への移行効率という観点では、両複合体で有意な差異はないと考えられる。

A



B pLuc/chitosan



C pLuc/chitosan/CS-22

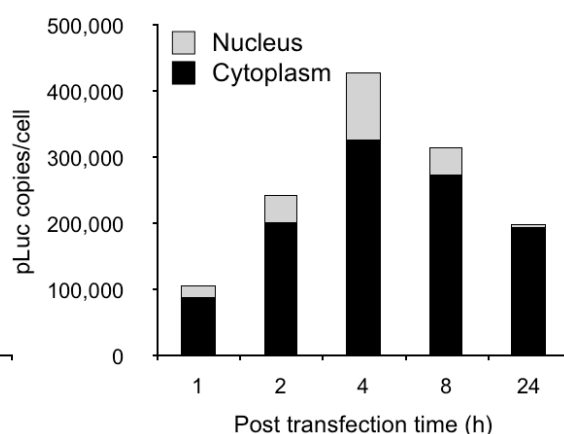


Fig. 4-3 COS7 細胞内の pLuc のコピー数

(A) COS7 cells were transfected by pLuc/chitosan (P:N = 1:5) or pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), and pLuc copies were quantified using Realtime PCR. Transfection time = 4 h, Post transfection time = 1, 2, 4, 8, 24 h. n = 3. (B, C) pLuc copies in nucleus or cytoplasm of COS7 cells after transfection by pLuc/chitosan (P:N = 1:5) or pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16).

上記の pLuc コピー数の解析結果をふまえ、pDNA 複合体によるトランスフェクションの定量的な模式図を Fig. 4-4 に示す。

細胞内部への移行効率は pDNA/キトサン複合体で 15%、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体で 40%であったのに対し、核への移行効率は、pDNA/キトサン複合体で 33%、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体で 24%と算出された。コンドロイチン硫酸で被覆することにより、細胞内部への移行効率は 2 倍以上に向上したが、細胞質から核内への移行効率では pDNA/キトサン複合体より 8%程度の低下が認められた。負帯電した三元複合体が核膜とは静電的に反発し、正帯電の pDNA/キトサン複合体よりも核との相互作用が弱まったことが影響したと考えられる。

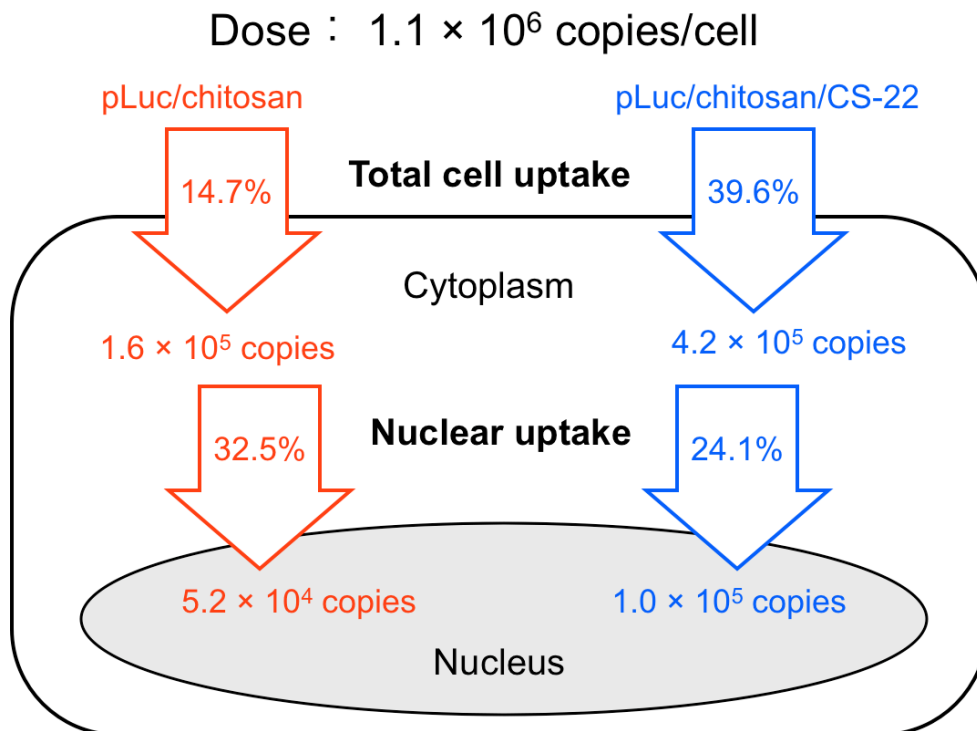


Fig. 4-4 pDNA 複合体の細胞内動態の定量的評価

4.3.3 *Luciferase* mRNA の発現解析

pLuc/キトサン複合体または pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体による COS7 細胞のトランスフェクション後、リアルタイム PCR を用いて *Luciferase* mRNA の発現量を測定した。結果を以下の Fig. 4-5 に示す。

核内に到達した pLuc は両複合体においてトランスフェクションから 4 時間後に最大を示したのに対し (Fig. 4-3)、細胞内で発現した *Luciferase* mRNA は 48 時間後に最大を示した。このとき、pDNA/キトサン複合体でトランスフェクションした場合と比較し、三元複合体では 6 倍程度の mRNA 発現量を示した。この点は、(i) 細胞質中に安定して存在する三元複合体が核内に供給され続け、(ii) 核内に移行した三元複合体の凝縮が緩みトランスフェクションから 24~48 時間後付近で活発的に mRNA への転写が行われたことが要因として考えられた。

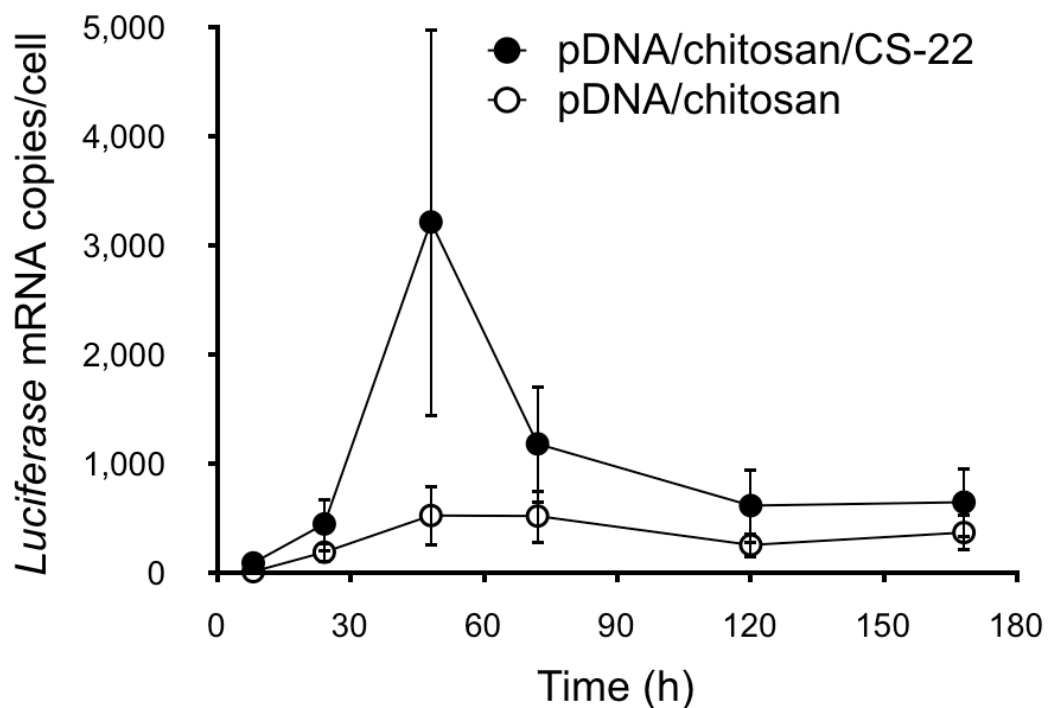


Fig. 4-5 COS7 細胞における *Luciferase* mRNA の発現量

COS7 cells were transfected by pLuc/chitosan (P:N = 1:5) or pLuc/chitosan/CS-22 (P:N:(-) = 1:5:16), and *Luciferase* mRNA copies were quantified using Realtime PCR. Transfection time = 4 h, Post transfection time = 8, 24, 48, 72, 120, 168 h. n = 3.

4.3.4 転写・翻訳効率

これまでの検討により、pLuc/キトサン/CS-22 三元複合体でのトランスフェクションによる核内への pLuc 移行量 (Fig. 4-3A)、*Luciferase* mRNA 発現量 (Fig. 4-5)、*Luciferase* タンパク質発現量 (Fig. 2-15) が求められた。これらのデータより、三元複合体の転写および翻訳効率を文献[3]をもとに算出した。以下の Fig. 4-6 に pDNA/キトサン複合体および pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の転写効率、翻訳効率、転写翻訳効率を示す。

pDNA/キトサン複合体と比較し、pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の転写効率は有意に高い値を示した。この結果より、pDNA/キトサン複合体と三元複合体における pDNA の凝縮度の違いが、RNA ポリメラーゼによる転写活性に影響を与える可能性が考えられた。一方、pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の翻訳効率は有意に低い値を示した。類似した現象として、市販の遺伝子導入試薬である Lipofectamine PLUS (LFN, カチオン性脂質) による遺伝子導入後の翻訳効率は、アデノウイルスベクターの場合よりも有意に低いことが報告されている[2]。mRNA とベクター間との相互作用がアデノウイルスベクターよりも LFN の方で強いために、細胞質における翻訳が阻害されたことが要因であった。本系で pDNA/キトサン複合体より三元複合体の翻訳効率が低い値が示された理由として、(i) 細胞質中に存在し続けたコンドロイチン硫酸三元複合体が翻訳を阻害した可能性、(ii) 三元複合体によるトランスフェクションでは mRNA 産生量が多いために、見かけ上、翻訳効率が低く見積もられたことが要因であると推察された。一方、転写効率および翻訳効率をまとめた値として、転写翻訳効率では両者に有意な違いはなかった。

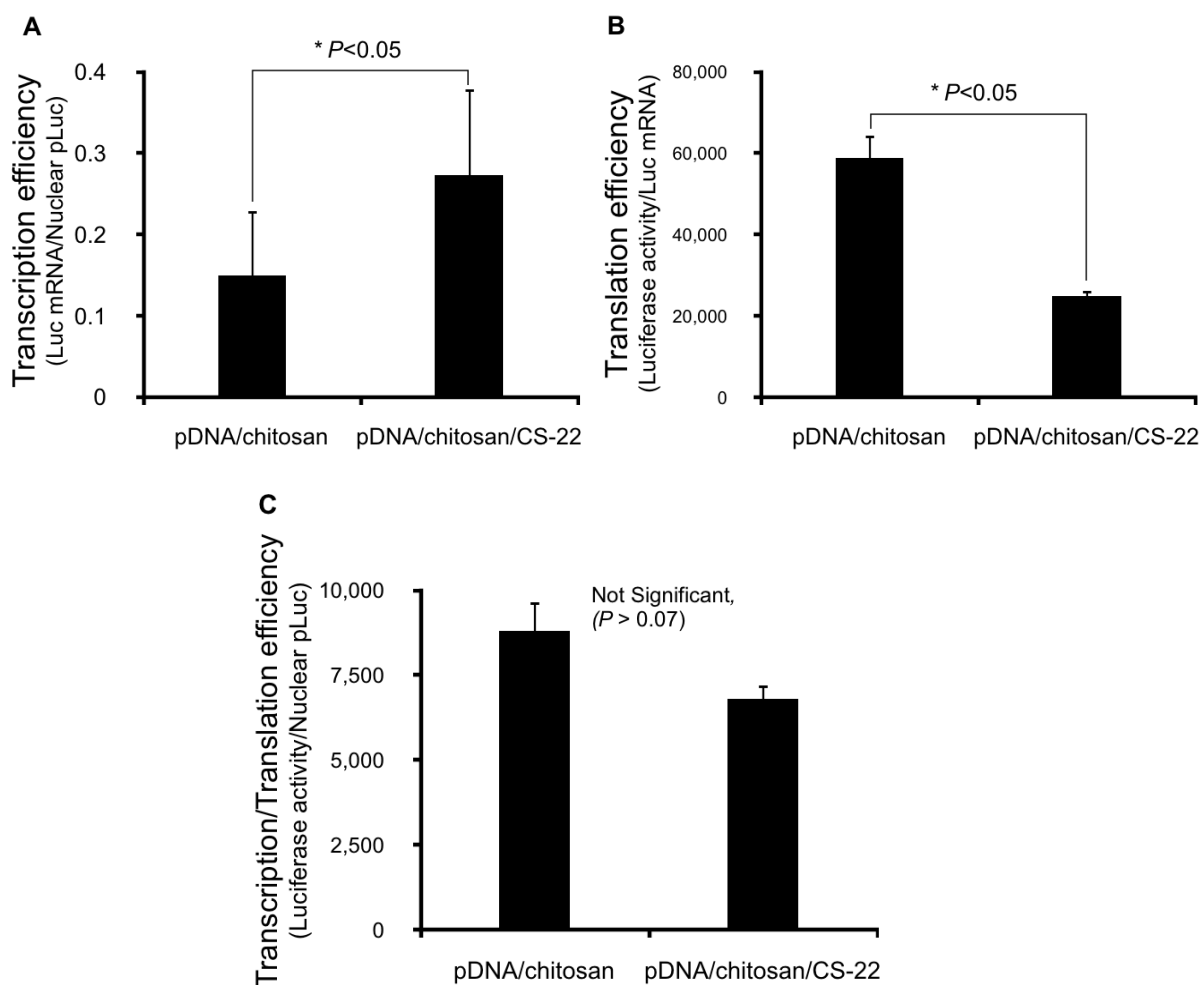


Fig. 4-6 pDNA 複合体の(A)転写効率、(B)翻訳効率、(C)転写翻訳効率
 Transcription efficiency = AUC (area under the curve) of *Luciferase* mRNA copies (8-48 h) /AUC of nuclear pLuc copies (1-4 h), Translation efficiency = AUC of Luciferase protein (8-72 h) /AUC of *Luciferase* mRNA copies (8-48 h), Transcription Translation efficiency = AUC of Luciferase protein (8-72 h) /AUC of nuclear pLuc copies (1-4 h). Student's t test, n = 3.

4.4 総括

本章では、pDNA/キトサン複合体と pDNA/キトサン/CS-22 三元複合体の凝縮度という粒子の形態学的な特徴の違いと、転写効率・翻訳効率・遺伝子発現活性という指標との関連性について論じた。

はじめに、pDNA/キトサン複合体とコンドロイチン硫酸またはヒアルロン酸三元複合体間では、YOYO-1 標識した複合体溶液の蛍光強度に大きな差異があることが見出された。この結果より、pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子で被覆することにより、粒子の凝縮度が緩やかになることが示唆された。その効果は、ヒアルロン酸よりもコンドロイチン硫酸を用いた場合の方が顕著であり、コンドロイチン硫酸の電荷密度の高さが粒子内部構造の形成に影響を及ぼしていることが分かった。

pDNA 複合体の細胞内動態についてリアルタイム PCR を用いた定量的解析を行い、細胞質および核内に移行した pDNA の絶対量を算出した。コンドロイチン硫酸による被覆は、細胞内部への取り込み量を有意に向上させる効果がある一方、核移行効率はわずかに低下させることが示唆された。mRNA レベルでの遺伝子発現活性評価により、pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の転写効率は向上することが分かった。粒子凝縮度が緩やかになったことで核内の転写効率は促進されたと考えられる。一方、三元複合体の翻訳効率は有意な低下が認められた。この点に関して詳細は不明であるが、mRNA が過剰に産生されたこと、細胞質中に多く存在する三元複合体が翻訳過程を阻害したことが原因として推察された。

4.5 参考文献

- [1] A.L. Parker, C. Newman, S. Briggs, L. Seymour, P.J. Sheridan, Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine., *Expert Rev. Mol. Med.* 5, 1-15 (2003).
- [2] S. Hama, H. Akita, S. Iida, H. Mizuguchi, H. Harashima, Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex., *Nucleic Acids Res.* 35, 1533-1543 (2007).
- [3] T. Masuda, H. Akita, K. Niikura, T. Nishio, M. Ukawa, K. Enoto, R. Danev, K. Nagayama, K. Ijio, H. Harashima, Envelope-type lipid nanoparticles incorporating a short PEG-lipid conjugate for improved control of intracellular trafficking and transgene transcription., *Biomaterials* 30, 4806-4814 (2009).
- [4] A. Iwasa, H. Akita, I. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, Cellular uptake and subsequent intracellular trafficking of R8-liposomes introduced at low temperature., *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 713-720 (2006).
- [5] タカラバイオ株式会社 [<http://catalog.takara-bio.co.jp/>]
- [6] G. Krishnamoorthy, G. Duportail, Y. Mély, Structure and dynamics of condensed DNA probed by 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-diazaundecamethylene)bis[4-[[3-methylbenz-1,3-oxazol-2-yl]methylidene]-1,4-dihydroquinolinium] tetraiodide fluorescence.,

Biochemistry 41, 15277-15287 (2002).

- [7] R.S. Burke, S.H. Pun, Extracellular barriers to in Vivo PEI and PEGylated PEI polyplex-mediated gene delivery to the liver., *Bioconjug. Chem.* 19, 693-704 (2008).
- [8] Y. Koyama, M. Yamashita, N. Iida-Tanaka, N. T. Ito, Enhancement of transcriptional activity of DNA complexes by amphoteric PEG derivative., *Biomacromolecules* 7, 1274-1279 (2006).

第5章 結論

安全かつ効果的な遺伝子治療を実現するために、生体への重篤な影響が懸念されるウイルスベクターに対し、キトサンは生体親和性に優れ低毒性で安全な非ウイルスベクターとして利用されてきた。キトサンによる遺伝子導入では、*in vitro* では比較的高い遺伝子発現活性を得られる一方、生体中での安定性および遺伝子発現活性の低さが大きな問題点であった。

本研究では、pDNA/キトサン複合体をアニオン性高分子であるコンドロイチン硫酸で被覆し、物理化学的な安定性と遺伝子発現活性の向上を目指したpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体を開発した。三元複合体のキャラクタリゼーション、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子導入を行ない、コンドロイチン硫酸を被覆剤として使用することの意義を論じた。

第1章 遺伝子治療の歴史的背景および現状についてまとめ、本研究を行うことの意義と目的について述べた。

第2章 pDNA/キトサン複合体を分子量と硫酸化度の異なるコンドロイチン硫酸 (CS) で被覆したpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体のキャラクタリゼーションを行った。複合体の性質はコンドロイチン硫酸の種類に依存しており、適切なコンドロイチン硫酸を用いることで、粒子径200 nm未満で負帯電性の球状粒子が得られた。BSAおよび赤血球との非特異的な相互作用が回避され、核酸分解酵素耐性も示された。また、*in vitro*で種々の細胞株に遺伝子

導入を行い、遺伝子発現活性と細胞内取り込み量を評価した。COS7細胞およびHuh-7細胞において、三元複合体の細胞内取り込み機構および細胞内輸送経路を解析した。その結果、三元複合体は主にマクロピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、プロトンスポンジ効果でエンドソームから細胞質中に脱出し、複合体の状態を維持して核内に侵入していることが明らかになった。

第3章 凍結乾燥-再水和したpDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体のキャラクタリゼーションおよび*in vitro*と*in vivo*での遺伝子発現活性を評価した。粒子径、ゼータ電位、粒子形態、pDNAの安定性、*in vitro*での遺伝子発現活性といった観点から、凍結乾燥-再水和した三元複合体は用時調製時と比較して粒子径・ゼータ電位・粒子形態に大きな影響はなくpDNAが安定に保存され、遺伝子発現活性も保持されていた。また、*in vivo*で腫瘍形成マウスモデルの自殺遺伝子治療を行ったところ、三元複合体は有意に高い抗腫瘍効果を発揮し、さらに凍結乾燥-再水和した三元複合体も同等の効果を有していた。三元複合体によって高い治療効果が得られた理由は、腫瘍組織内における広範囲かつ高効率な遺伝子発現によるものであった。pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は*in vivo*においても凍結乾燥-再水和製剤として使用できることが示された。

第4章 pDNA/キトサン複合体と三元複合体の転写効率・翻訳効率について検討した。pDNA/キトサン複合体と三元複合体間ではYOYO-1標識した複合体溶液の蛍光強度に大きな差異があることが分かり、この結果はpDNA/キトサン複

合体をコンドロイチン硫酸で被覆することにより粒子の凝縮度が緩やかになることを示唆するものであった。また、pDNA 複合体の細胞内動態についてリアルタイム PCR を用いた定量的解析を行い、細胞質および核内に移行した pDNA の絶対量を算出した。コンドロイチン硫酸による被覆は、細胞内部への取り込み量を有意に向上させる効果がある一方、核移行効率はわずかに低下した。

mRNA レベルでの遺伝子発現活性の評価により、pDNA/キトサン複合体と比較して三元複合体の転写効率は有意に向上し、この点はコンドロイチン硫酸の存在により粒子の凝縮度が緩やかになったことで核内での転写効率が促進されたと考えられた。コンドロイチン硫酸による被覆は、粒子の物理化学的な安定性や細胞への取り込み量の増加をもたらすだけでなく、転写効率の向上にも寄与する、有用性の高い被覆剤であることが示された。

本研究で得られた重要な知見は以下の3点である。

(1) pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体の物理化学的な性質（粒子径、ゼータ電位、粒子形態、核酸分解酵素耐性、血中安定性、粒子の凝縮度）が、細胞での遺伝子発現活性の結果と良い相関性を示した。このように、非ウイルスベクター開発の初期段階で粒子のキャラクタリゼーションを通してスクリーニングを行うことが可能であり、画期的な遺伝子治療薬の創製をより効率的にすることが期待される。

(2) pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は特定のエンドサイトーシス機構を活性化し、細胞内への取り込みを促進していた。従来の研究では薬剤の治療効果や代謝性が第一優先とされ細胞内部というミクロな環境での動態に関してはほとんど議論されてこなかったが、近年では分子標的治療薬の創製に重要な過程として注目されている。したがって、特定のエンドサイトーシス機構を介して細胞内に薬剤を送達する技術や知見は、より高機能な治療薬の開発への可能性を広げるものと考えられる。

(3) pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体は *in vivo* においても高い遺伝子発現活性を有する凍結乾燥-再水和型製剤としての利用が可能であった。一般的に、カチオン性高分子による遺伝子導入では高い治療効果を得るために用時調製が必要な場合が多く、凍結乾燥-再水和型製剤はこの問題点を解決するものである。コンドロイチン硫酸は、複合体の物理化学的な安定性を向上するだけでなく凍結乾燥後の再水和をも可能にする有望な被覆剤となる可能性が示唆された。

既存の治療法では根治が不可能な難治性疾患に対し、遺伝子治療は全く新しい画期的な医療分野になることが期待されている。遺伝子治療に関する研究の歴史は長く、当初はウイルスベクターが使用されていたものの治療においては安全性が第一に確保されるべきものとして非ウイルスベクターの存在感が増してきた。その中でも特に、遺伝子、キトサン、コンドロイチン硫酸で構成された三元複合体は、特別な取扱訓練をする必要がなくとも溶液を混合するのみで容易かつ安価に作製でき、種々の細胞株に対し高効率に遺伝子を導入することが可能である。同複合体は特に固形癌治療一局所投与可能な皮膚癌や静脈投与した際にEPR効果で標的臓器への集積が期待される肝臓癌や肺癌への応用が適していると考えられる。また、遺伝子を「補充」するだけでなく、異常亢進された遺伝子発現を siRNA や miRNA 等の低分子二本鎖核酸を用いて「抑制」する治療戦略にも柔軟に対応できるであろう。さらに、特別な添加剤を使用しなくとも凍結乾燥-再水和型製剤としての利用が可能であり、家庭用冷凍庫でも十分に保存が可能という実用性をも兼ね備えている。

以上のように、本研究で開発したキトサンとコンドロイチン硫酸による遺伝子導入では、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の最大の懸念事項であった安全面、コスト面、実用面での問題点を解決することが可能であり、非ウイルスベクターとして重要かつ必須な性質を兼ね備えた有望なキャリアーになることが期待される。材料の入手、複合体作製、保存や取り扱いが容易である糖鎖を基にした遺伝子治療製剤は、将来的により身近な治療戦略の1つとして選択できる日が来ることを信じてやまない。

発表論文

本論文に関する原著論文

- (1) Kenji Hagiwara, Mitsuhiro Nakata, Yoshiyuki Koyama, Toshinori Sato.
The effects of coating pDNA/chitosan complexes with chondroitin sulfate on physicochemical characteristics and cell transfection, *Biomaterials*, **33** (2012), 7251-7260.

- (2) Kenji Hagiwara, Satoko Kishimoto, Masayuki Ishihara, Yoshiyuki Koyama, Osam Mazda, Toshinori Sato. *In vivo* gene transfer using pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes: Influence of chondroitin sulfate on the stability of freeze-dried complexes and transgene expression *in vivo*, *The Journal of Gene Medicine*, **15** (2013), 83-92.

その他発表論文

- (1) Kenji Hagiwara, Riany Anastasaia, Mitsuhiro Nakata, Toshinori Sato.
Physicochemical Properties of pDNA/Chitosan Complexes as Gene Delivery Systems. *Current Drug Discovery Technologies*, **8** (2011), 329-339.

本論文に関する学会発表

国際会議発表

- (1) Kenji Hagiwara, Mitsuhiro Nakata, Satoko Kishimoto, Masayuki Ishihara, Yoshiyuki Koyama, Toshinori Sato. Mechanism of cell uptake and intracellular trafficking with pDNA/chitosan/chondroitin sulfate complexes as a vector for suicide gene, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Hokkaido University, 2011/11/9

国内講演会発表

- (1) Kenji Hagiwara, Mitsuhiro Nakata, Masayuki Ishihara, Yoshiyuki Koyama, Toshinori Sato. In vitro and In vivo gene delivery by pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes and their expression mechanism analyses, 60th SPSJ Annual Meeting, Grand Cube Osaka, 2011/5/25 (English Oral Presentation)
- (2) 萩原健司, 中田晃尋, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による in vitro および in vivo での遺伝子デリバリー, FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2011, 野口研究所, 2011/8/6
- (3) 萩原健司, 中田晃尋, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. pDNA/キト

サン/コンドロイチン硫酸三元複合体による *in vitro* および *in vivo* での遺伝子導入, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 大阪大学コンベンションセンター, 2011/9/1

- (4) 佐藤智典, 萩原健司, 中田晃尋, 小山義之, 岸本聡子, 石原雅之. DNA とイオン性多糖からなる高分子集合体のキャラクタリゼーションと DDS への利用, 第 60 回 高分子討論会, 岡山大学, 2011/9/28
- (5) 萩原健司, 中田晃尋, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. 天然多糖のキトサンとコンドロイチン硫酸を用いた細胞内への遺伝子導入, GlycoTOKYO 2011 シンポジウム, 理化学研究所, 2011/12/9
- (6) 萩原健司, 中田晃尋, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による遺伝子発現機構の解析と自殺遺伝子療法への応用, 高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 2012/5/29
- (7) 萩原健司, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体による遺伝子発現機構の解析と癌モデルマウスの自殺遺伝子治療, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 仙台市民会館, 2012/9/25
- (8) 萩原健司, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. キトサンとコンドロ

イチン硫酸を用いた遺伝子複合体による *in vitro* と *in vivo* での遺伝子導入,
GlycoTOKYO2012, 慶應義塾大学, 2012/11/17

- (9) 萩原健司, 岸本聡子, 石原雅之, 小山義之, 佐藤智典. 天然多糖のキトサンとコンドロイチン硫酸を用いた遺伝子デリバリーと自殺遺伝子療法への応用, 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 仙台国際センター, 2012/11/26

その他関連する学会発表

国際会議発表

- (1) Kenji Hagiwara, Yoko Kondo, Tetsuro Suzuki, Toshinori Sato. Delivery of siRNA to the HCV gene by lactose-modified chitosan particles, Pacifichem 2010, Honolulu, HI, USA, 2010/12/16

国内講演会発表

- (1) 萩原健司, 近藤洋子, 鈴木哲朗, 佐藤智典. 糖修飾キトサンを用いた siRNA のデリバリーによる C 型肝炎ウイルス遺伝子の発現抑制, 遺伝子デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム, 北海道大学, 2010/6/3
- (2) 萩原健司, 近藤洋子, 鈴木哲朗, 佐藤智典. 糖修飾キトサンを用いた siRNA のデリバリー, FCCA グライコサイエンス若手フォーラム 2010, 慶應義塾大学, 2010/8/7

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からご指導、ご教示をいただきました。ここに深甚なる謝意を表します。

特に、慶應義塾大学理工学部生命情報学科 佐藤智典教授には熱心なご指導と激励をいただきました。

本論文をまとめるに際し、慶應義塾大学理工学部生命情報学科 井本正哉教授、岡浩太郎教授、慶應義塾大学理工学部応用化学科 藤本啓二教授に貴重なご指導とご意見を賜りました。厚く御礼申し上げます。

防衛医科大学研究センター 石原雅之教授、岸本聡子研究員に動物実験の実施、投稿論文の執筆に関して多大なご協力およびご助言いただきました。ここに感謝の意を表します。

京都府立医科大学大学院医学研究科 松田修教授より pGEG.TK (チミジンキナーゼプラスミド) を提供していただきました。厚く御礼申し上げます。

実験装置の使用、実験技術に関して多くの知識や示唆、ご指導いただいた慶應義塾大学理工学部生命情報学科 土居信英准教授ならびに土居研究室の皆様 に心より感謝致します。

日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた慶應義塾大学理工学部生命情報学科 佐藤研究室の皆様 に感謝致します。

最後に、研究生生活を様々な面で支えていただき、多くの助言、激励をいただきました両親に心より感謝致します。

平成 25 年 3 月

萩原 健司