

# 細胞選択的遺伝子ターゲティングを目的とした糖修飾リポソームの開発に関する研究

京都大学大学院薬学研究科

薬品動態制御学分野

川上 茂

## 1. はじめに

遺伝子治療は、先天性の遺伝子欠損症だけでなく、がん、エイズなどの難治性疾患に対する次世代の治療技術として期待されている。現在、局所疾患に対する遺伝子治療に関しては、既に臨床において、プラスミド DNA の局所投与方法による治療法の有用性が示されている。しかし、局所投与では治療用遺伝子の発現が注入部位のごく限られた部位にしか認められず、今後種々の難治性疾患に対して遺伝子治療を応用していくためには、投与された遺伝子医薬品の体内動態を精密に制御し、疾患の対象となる臓器や細胞へ特異的に送達させる遺伝子デリバリーシステムに関する基盤技術の確立が強く望まれている。標的細胞において実際に遺伝子発現に至るまでには、投与部位から標的細胞内に至るまで、生理学および生物学的システムなどの種々の過程が障壁として存在するため、標的指向型の *in vivo* 遺伝子導入は難しい。したがって、有効な遺伝子治療をおこなうためにはドラッグデリバリーシステム概念に基づき、体内動態を規定する遺伝子医薬品の物理化学的性質ならびに生理学システム等を考慮に入れ、効果を最大限に発揮させる製剤・投与設計が必要である。

## 2. 糖修飾リポソーム開発を用いた細胞選択的遺伝子ターゲティングシステムの開発

現在、臨床における遺伝子治療においては、安全性の観点から非ウイルス性ベクターの開発が重要であるが、非ウイルスベクターは遺伝子発現が低いことが問題である。そこで、非ウイルスベクターの中でも *in vivo* でも比較的高い遺伝子発現を示すカチオン性リポソームを基盤とした細胞選択的遺伝子導入法を構築することで、効果的な遺伝子治療がおこなえると考えた。また、各細胞が有する糖鎖認識機構は細胞に固有で比較的厳密な基質認識性を有することから、遺伝子医薬品の細胞選択的ターゲティングにおける標的指向性のためのリガンドとして有用である<sup>1)</sup>。したがって、*in vivo* で高い機能を発揮する糖修飾カチオン性リポソームを調製するため、i) 糖脂質の安定なりポソームへの封入、ii) レセプターとの認識に重要となる高密度な糖鎖導入を可能とする新規ガラクトース修飾コレステロール誘導体 cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-D-thiogalactosylethyl)amino)butyl)formamide (Gal-C4-Chol),<sup>2)</sup> およびそのマンノース、フコース誘導体、Man-C4-Chol, Fuc-C4-Chol を合成し、本物質により表面を修飾した糖修飾リポソーム、エマルションを開発した。

静脈内投与後、これら糖修飾リポソーム、エマルションが、それぞれ各細胞が有する糖鎖認識機構により、顕著に高い肝臓への取り込みを示し、独自に開発した糖修飾コレステロール誘導体が極めて有効な細胞選択的デリバリー用機能性脂質となり得ることを証明した<sup>3-5)</sup>。また、糖修飾コレステロール誘導体のカチオン性官能基に着目し、高密度な糖を付与した糖修飾リポソームを遺伝子デリバリーキャリアとして開発した。*In vivo* での遺伝子発現を目的とし、体内動態や遺伝子発現を規定する糖修飾リポソーム・pDNA 複合体（リポプレックス）の平均粒子径、表面電荷、安定性、投与経路、細胞内動態などの因子の解析・最適化

する開発手法により、従来難しいとされていた *in vivo* での細胞選択的な遺伝子導入に成功した<sup>6-12)</sup>。

### 3. 細胞選択的遺伝子ターゲティングシステムの DNA ワクチン療法への応用

抗原をコードした遺伝子を抗原提示細胞内で発現させ細胞性免疫誘導をおこなう DNA ワクチン療法が、がん、エイズ、C 型肝炎など種々の難治性疾患に対する新しい免疫療法として期待されている。現在、臨床にて行われた DNA ワクチン療法としては、プラスミド溶液の筋肉内や皮内への局所投与による免疫感作が試みられているが、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化に重要な抗原提示細胞内における遺伝子発現効率は極めて低く、十分な効果は未だ得られていない。したがって、DNA ワクチン療法の臨床応用に向けて、安全に適用できる非ウイルスベクターを基盤とし、*in vivo* において抗原提示細胞選択的に遺伝子導入できる標的指向型遺伝子導入キャリアシステムの開発が望まれる。最近、我々は非ウイルスベクターの中でも、カチオン性リポソームはカチオン性ポリマーと比べて、最適値において遺伝子導入効率は同等であるが免疫応答が高いことを明らかにした<sup>13)</sup>。また、抗原提示細胞は細胞固有で比較的厳密な基質認識特性を示すマンノースレセプターを有することが知られている。そこで、マンノース修飾コレステロール誘導体 (Man-C4-Chol) を用い、マンノース修飾リポプレックスによる抗原提示細胞選択的 *in vivo* 遺伝子ターゲティングにより、効果的な DNA ワクチン療法が可能になると考えた。実験は、モデル抗原の ovalbumin (OVA) をコードしたプラスミド DNA (pCMV-OVA) を構築し、マンノース修飾リポソームを用いて調製した DNA ワクチン製剤の有効性を評価した。

リポプレックスの遺伝子発現効率は、抗原提示細胞への取り込みと安定性、そして非標的細胞への移行性など複数の因子のバランスにより決定される。マンノース修飾リポプレックスの腹腔内投与は、血管内投与に比べ投与後の滞留性と安定性の改善が期待できるとともに、腹腔内およびリンパ節内に存在する多数の抗原提示細胞への遺伝子導入が可能であった<sup>14)</sup>。そこで、pCMV-OVA を用い腹腔内投与後の免疫誘導効果に関して検討をおこなった。マンノース修飾リポプレックスを腹腔内投与後、脾臓および PEC より抗原提示細胞を単離し、OVA の遺伝子の発現レベルを細胞レベルで評価した結果、マンノース修飾リポプレックスは naked pDNA およびリポプレックスと比べ、顕著に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また、リポプレックス投与後の OVA 特異的 CTL 活性を評価した結果、naked pDNA およびリポプレックスの腹腔内投与や従来の感作法である naked pDNA の筋肉内投与と比べて、強力な CTL 活性を誘導できることが示された。さらに、がん治療における有用性を評価することを目的に、免疫感作後に OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞あるいはその親株 EL4 細胞を皮下へ移植し、がん細胞移植後の生存日数を評価した結果、マンノース修飾リポプレックス投与群では、naked pDNA およびリポプレックス腹腔内投与群や naked pDNA 筋肉内投与群と比べ、OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞特異的に生存日数が大きく延長するとともに、一部ではがんの完全拒絶が認められた。以上、マンノース修飾リポプレックスによる抗原提示細胞選択的ターゲティングにより DNA ワクチン効果の増強に成功した<sup>15)</sup>。

### 4. 細胞選択的遺伝子ターゲティングシステムの肝炎療法への応用

種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子、アポトーシス関連分子といった、炎症関連遺伝子群の発現を誘導する転写因子 NFκB に対するデコイ型 2 本鎖オリゴヌクレオチド (NFκB デコイ) は、炎症性疾患や免疫疾患への治療が期待されているが、現在、局所投与では効果があるものの、静脈内投与では酵素分解などのため標的細胞に充分量の NFκB デコイが到達せず治療効果は得られない。したがって、NFκB デコイを用いた効果的な全身レベルでの治療法を確立するためには、治療の標的となる細胞、例えば、全身性サイトカイン産生細胞である Kupffer 細胞に対する細胞選択的なデリバリーシステムの開発が必要である。Kupffer 細胞には、厳密な基質認識性を有するマンノースレセプターが細胞特異的に発現しているため、NFκB デコイのマンノース修飾リポソームによるターゲティングにより、肝炎治療が可能とできると考えた。

静脈内投与 NFκB デコイによる効率的な治療の為には、肺通過および細胞内へのデリバリーも重要となるため<sup>16)</sup>、Man-C4-Chol と pH 感受性脂質 DOPE を脂質組成とする処方 of マンノース修飾リポソームを調製した。マウスへ静脈内投与後、マンノース修飾リポソーム/[<sup>32</sup>P] 標識 NFκB デコイ複合体は、対照の NFκB デコイ単独およびカチオン性リポソーム複合体に比べ、有意に高く肝臓へ集積した。また Kupffer 細胞への取り込みを確認するため、Kupffer 細胞に障害を与える GdCl<sub>3</sub> を前投与したところ、マンノース修飾リポソーム複合体の肝臓への集積が有意に減少した。マウス LPS 誘導性肝炎モデルにおいて、マンノース修飾リポソーム/NFκB デコイ複合体では、肝臓における NFκB 量の有意な減少ならびに血中 TNFα 濃度の減少が認められた。また、マンノース修飾リポソーム/NFκB デコイ複合体投与により、肝炎発症の抑制が可能であった。一方、NFκB デコイ単独もしくはカチオン性リポソーム複合体においては、有意な治療効果の改善は認められなかった。以上、マンノース修飾リポソーム/NFκB デコイ複合体による Kupffer 細胞選択的ターゲティングにより肝炎抑制に成功した<sup>17)</sup>。

## 5. まとめ

以上、新規糖修飾脂質を合成し、糖鎖認識機構を利用した *in vivo* 細胞選択的遺伝子導入システムを開発した。また、効果を最大限に発揮させる製剤・投与設計の最適化をおこない、細胞選択的ターゲティングに基づいたがん、感染症、炎症を対象疾患とする新規遺伝子治療システムの構築に成功した。

## 6. 謝辞

終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野 橋田 充教授に衷心より深甚な謝意を表します。また、終始御指導・御助言を頂きました京都大学 山下富義助教授に深く感謝の意を表します。さらに、これまでの研究活動において共に研究を推進して頂きました京都大学 麓伸太郎博士 (現長崎大)、服部芳幸博士 (現第一三共)、樋口ゆり子博士ならびに多くの共同研究者の皆様に深謝します。

## 7. 参考文献

- 1) S. Kawakami, et al.: Glycosylated cationic liposomes for cell-selective gene delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 19, 171-190 (2002).

- 2) S. Kawakami et al.: Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 78-83 (1998).
- 3) S. Kawakami, et al.: Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice, *Biochim. Biophys. Acta*, 1524, 258-265 (2000).
- 4) Y. Hattori, et al.: Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting *J. Control. Release*, 69, 369-377 (2000).
- 5) W. Yeeprae, et al.: Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannosylated O/W emulsions by macrophages, *J. Control. Release*, in press.
- 6) S. Kawakami, et al.: Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes, *Gene Ther.*, 7, 292-299 (2000).
- 7) S. Kawakami, et al.: *In vivo* gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes, *Pharm. Res.*, 17, 306-313 (2000).
- 8) S. Fumoto, et al.: Enhanced hepatocyte-selective *in vivo* gene expression by stabilized galactosylated liposome/plasmid DNA complex using sodium chloride on complex formation, *Mol. Ther.*, 10, 719-729 (2004).
- 9) M. Yamada, et al.: Tissue and intrahepatic distribution and subcellular localization of mannosylated cationic liposome/plasmid DNA complex after intravenous administration in mice, *J. Control. Release*, 98, 157-167 (2004).
- 10) S. Fumoto, et al.: Interaction with blood components plays a crucial role in asialoglycoprotein receptor-mediated *in vivo* gene transfer by galactosylated lipoplex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315, 484-493 (2005).
- 11) Y. Hattori, et al.: The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for targeted *in vivo* gene transfer to liver non-parenchymal cells following intravenous administration of mannosylated cationic liposomes, *J. Control. Release*, 108, 484-495 (2005).
- 12) S. Kawakami, et al.: Enhanced gene expression in lung by a stabilized lipoplex using sodium chloride for complex formation, *J. Gene Med.*, 7, 1526-1533 (2005).
- 13) S. Kawakami, et al.: Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317, 1382-1390 (2006).
- 14) Y. Hattori, et al.: Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannosylated lipoplex via intraperitoneal route, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
- 15) Y. Hattori, et al.: Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration, *J. Gene Med.*, 8, 824-834 (2006).
- 16) Y. Hattori, et al.: The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for targeted *in vivo* gene transfer to liver non-parenchymal cells following intravenous administration of mannosylated cationic liposomes, *J. Control. Release*, 108, 484-495 (2005).
- 17) Y. Higuchi, et al.: Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/NF $\kappa$ B decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model, *FEBS Lett.*, 580, 3706-3714 (2006).