HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細胞内動態制御戦略に基づく機能性材料を用いた肝臓標的遺伝子デリバリーシステムの開発
Author(s)	鵜川, 真実
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11413号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11413
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55312
Type	doctoral thesis
File Information	Masami_Ukawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

細胞内動態制御戦略に基づく
機能性材料を用いた
肝臓標的遺伝子デリバリーシステムの開発

北海道大学大学院 生命科学院

生命科学専攻 生命医薬科学コース

薬剤分子設計学研究室

鵜川 真実

目次

略語表 1

序論 3

本論

第 1 章 MEND の MPC ポリマー修飾による細胞内動態改善機構の解明 9
1 - 1 緒言 10
1 - 2 MPC/GALA 修飾 MEND の調製 11
1 - 3 MPC, GALA 修飾による
MEND の遺伝子発現活性への影響の検討 12
1 - 4 定量的 PCR による細胞内・核内遺伝子量の定量 13
1 - 5 イメージングによるエンドソーム脱出効率・
decoating 効率の評価 14
1 - 6 考察 17
1 - 7 まとめ 19

第 2 章 細胞内環境応答性脂質様物質を用いた持続型遺伝子ベクターの
創製とその機構の検討 21
2 - 1 緒言 22
2 - 2 MEND の調製法 24
2 - 3 マウス肝血管における MEND 輸送の観察 26
2 - 4 ssPalmM-MEND の遺伝子発現活性評価
2 - 4 - 1 IVIS を用いた ssPalmM-MEND の肝臓における
遺伝子発現持続性評価 27
2 - 4 - 2 ssPalmM-MEND の臓器選択性の評価 28
2 - 5 マウス肝臓における導入遺伝子量の定量 29
2 - 6 血中サイトカイン値の測定 30
2 - 7 肝毒性の評価 31
2 - 8 まとめ 32

第 3 章 持続型 MEND の改良 35
3 - 1 緒言 36
3 - 2 ポリカチオンを用いないパッケージング法 38

3 - 3 改良型 MEND の粒子径制御 40
3 - 4 遺伝子発現活性の上昇を目指した MEND の改良 42
3 - 5 まとめ 44

総括 45

結語 49

謝辞 51

実験方法
1. 使用した試薬・機器 53
1. プラスミド調製関連
2. 遺伝子キャリア調製関連
3. 細胞培養・顕微鏡観察関連
4. DNA の抽出・定量関連
5. 遺伝子発現活性の測定関連
6. ELISA 関連
7. 使用機器

2. 試薬調製 56
3. 第一章の実験方法 58
4. 第二章の実験方法 63
5. 第三章の実験方法 66

参考文献 68

略語表

本論文では以下の略語を用いた。

略語表

A.C.	autoclaving
BCA	bicinchoninic acid
Chol	Cholesterol
DSG-PEG	1,2-Distearoyl-sn-glycerol, methoxypolyethylene Glycol
DMG-PEG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxypolyethylene Glycol
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOTAP	1,2-dioleyl-3-trimethylammonium propane
DOPE	1, 2-dioleyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
EDTA	ethylenediamine N', N', N', N'-tetraacetic acid
EtOH	ethanol
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
ICR	institute of cancer research
LB	luria-bertani's broth
Luc	luciferase
MEND	Multifunctional envelope type nano device
MPC	2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
NBD-DOPE	1,2-dioleyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine -N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
ssPalmM	SS-cleavable and pH-activated lipid-like materials
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDNA	plasmid deoxyribonucleic acid
PEI	polyethylenimine

Rho-DOPE	1,2-dioleyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine -N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)
rpm	round per minutes
SOPC	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
STR	stearyl
TBE	Tribromoethanol
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

序論

序論

遺伝子の欠損・異常はさまざまな疾患の原因となり、従来の低分子医薬では治療が困難であった。遺伝子治療は、正常な遺伝子の補充や異常な遺伝子の修復などによって不足している遺伝子産物を補うことが出来るため、これらの疾患の画期的な治療法として期待されている。また、肥満や糖尿病などの生活習慣病についても、これらの病態に関連する遺伝子についての知見が多数報告されており、遺伝子治療による治療の対象となると考えられる。

遺伝子治療の最初の臨床応用は 1989 年に行われ、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した腫瘍浸潤リンパ球を転移性メラノーマ(悪性黒色腫)患者に投与するといったものであった[1]。それ以来、世界中で多くの臨床試験が行われ、2013 年までに 1900 例以上の臨床試験が行われている[2]。

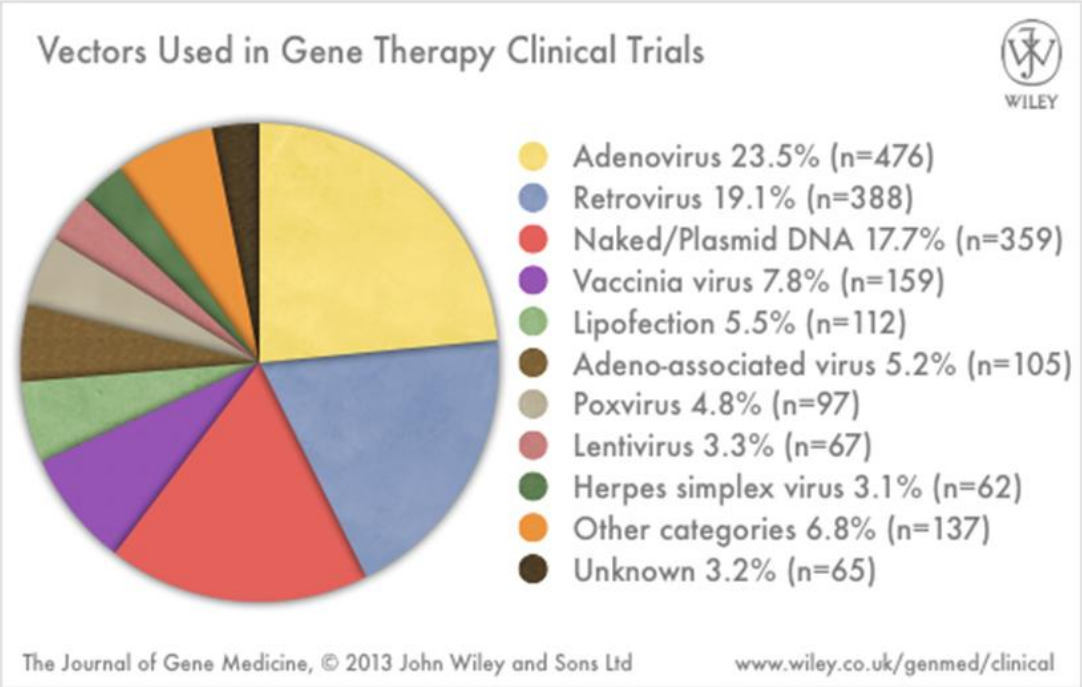


図1遺伝子治療の臨床試験に用いられた遺伝子導入方法

遺伝子の導入方法は、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの 2 種類に大別され、臨床で用いられてきた方法のうち、ウイルスベクターが約 70%を占めている(図 1)[2]。これは、ウイルスベクターが高い遺伝子発現活性をもつことによるが、その一方で臨床試験において重大な事故も発生している。1999 年にはアデノウイルスベクターの大量投与によって死亡例があり[3]、2000 年には、レトロウイルスベクターにより治療遺伝子が患者 DNA に異常な組み込みがなされたことによる白血病が報告された[4]。そこで、ヒトに対する病原性が報告されておらず、免疫活性化を起こしにくいアデノ随伴ウイルス(AAV)が注目されている。2012 年には、AAV ベクターを用いた遺伝子治療薬である Glybera®が欧州医薬品庁(EMA)によって承認された[5]。これは先進国で初の遺伝子治療薬であり、遺伝子治療は今後ますます発展すると考えられる。

一方、ウイルスベクターは変異を起こす可能性があることや、調製コストが高いことなどが欠点として挙げられる。そこで近年、安全性の高いベクターとして、非ウイルスベクターが注目されている。非ウイルスベクターは、安全性に加え、免疫原性が小さいこと、大量調製できることなどの利点がある一方、いまだ遺伝子発現活性ではウイルスベクターに及んでいないため、効率的な非ウイルスベクターの構築が望まれている。

血中投与型の効率的な遺伝子キャリアを構築するためには、血中滞留性や標的臓器への移行性といった体内動態の制御とともに、標的細胞への取り込みや、エンドソーム脱出、核移行といった細胞内動態の制御が必要である[6, 7]。

これらの動態を制御するため、本研究室では、多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND：Multifunctional Envelope-type nano device)の開発を行っている[8-10](図 2)。これは、治療遺伝子をコードしたプラスミド DNA(pDNA)をポリカチオンによって凝縮化させたコアを、血中滞留性やエンドソーム脱出などを改善するための機能性素子を修飾した脂質膜によって封入した構造となっている。本研究では、MEND を改良することにより、肝臓で高い遺伝子発現活性を得られるキャリアの作製を目指している(図 3)。

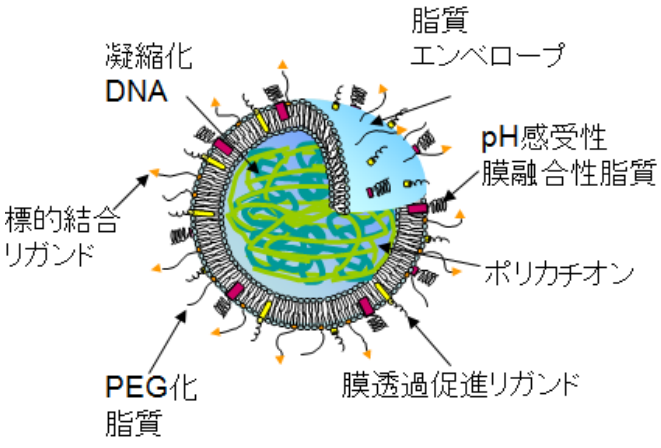


図2: MENDの構造

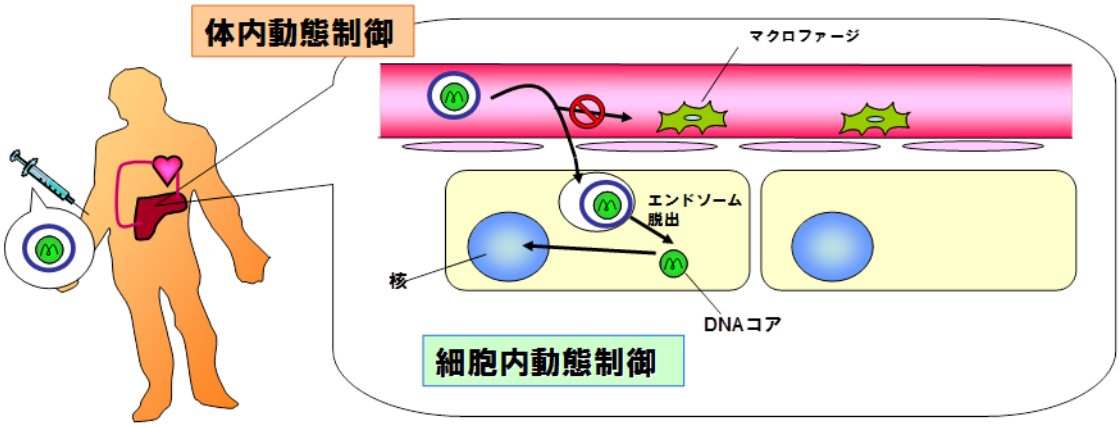


図3 肝臓において導入遺伝子が発現するまでの道程

肝臓は、生体内において栄養分の貯蔵や生理活性物質の合成、代謝や解毒といった重要な役割を担っており、肝臓の疾患は重篤な症状を引き起こす。肝硬変やウイルス性肝炎など、従来の薬物治療では治療が難しい疾患では、遺伝子治療は極めて有効な治療法であると考えられている。

肝臓を標的とした遺伝子デリバリー研究はウイルスベクター・非ウイルスベクター両方において数多く行われている。特にウイルスベクターの分野では臨床応用へ着実に近づいており、2013 年に中国において肝細胞癌治療を目的としたアデノウイルスベクターが第Ⅲ相試験に進んでいる[2]。非ウイルスベクターの分野においては、一般に細胞との相互作用を高めるためにカチオン性の遺伝子キャリアが用いられている[11, 12]。しかし、静脈内投与されたこれらのキャリアは肝臓に送達されたことは確認されるが、遺伝子発現は非常に低いのが現状である[13, 14]。この原因として考えられるのが、肝臓マクロファージによる貪食などによって、肝実質細胞に届いていない可能性、また、エンドソーム脱出や核移行といった細胞内動態に問題がある可能性も考えられる。特に、肝実質細胞は非分裂細胞であり、分裂が盛んな腫瘍細胞などと異なり、核移行が難しいことが考えられる。

近年、RNAi の分野では、Tekmira 社と Alnylam 社によって開発された siRNA 送達キャリアである SNALP (Tekmira's LNP)[15-18]が注目を集めている。SNALP は、脂質によって siRNA を封入した構造の中性電荷のナノ粒子であり、肝臓において高い RNAi 活性を得られている。SNALP は順調に臨床試験が進んでおり、2013 年 11 月には SNALP を用いたトランスサイレチン介在アミロイドーシス(ATTR)治療薬 LNP-Enabled patisiran の第Ⅲ相試験の開始が発表された[19]。ATTR は、トランスサイレチン遺伝子の変異に起因する希少遺伝性疾患であり、アミロイド沈着によって運動障害や自律神経障害を引き起こす。LNP-Enabled patisiran は、主に肝臓において産生される異常なトランスサイ

レチンをノックダウンすることにより治療効果を示す[20]。ATTR への従来の治療法では、それぞれの症状を抑えるための対症療法が主であったが、LNP-Enabled patisiran は種々の症状を引き起こす原因となっているアミロイド蓄積を抑えることができるため、より根本的な治療薬として期待されている。

SNALP による肝臓への siRNA デリバリーの成功は、DNA のデリバリーに対しても強いインパクトを与えるものである。SNALP の特徴は、粒子表面が中性電荷であり、エンドソーム内の酸性 pH においてのみカチオン性を帯びることにより、エンドソーム脱出を促進し、細胞質への siRNA の放出を起こしている。DNA のデリバリーにおいても、細胞質への内容物の放出までの過程は siRNA と同じであるため、こうした戦略は DNA デリバリーにも応用可能であると考えられる。

本研究は、中性電荷を有し、肝臓において効率的に遺伝子を発現させることが可能なベクターの構築を目指している。第一章において、当研究室において MEND に修飾することで in vivo, in vitro 共に遺伝子発現活性を上昇させる結果が得られている MPC ポリマーの細胞内動態への効果について検討し、今後の遺伝子キャリアの改良の参考とした。第二章においては、pH 応答性を有する脂質様物質を用いた遺伝子発現持続能を有する MEND の作製とそのメカニズム評価、第三章においては、第二章の MEND の改良を行った。

第一章

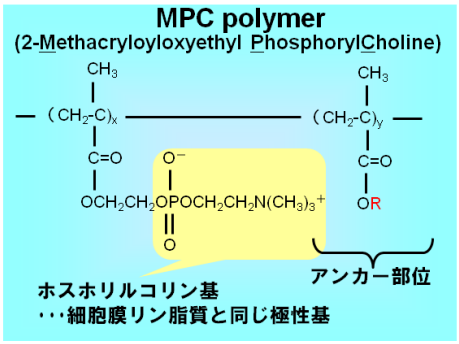
MEND の MPC ポリマー修飾による細胞内動態改善機構の解明

第一章 MEND の MPC ポリマー修飾による細胞内動態改善機構の解明

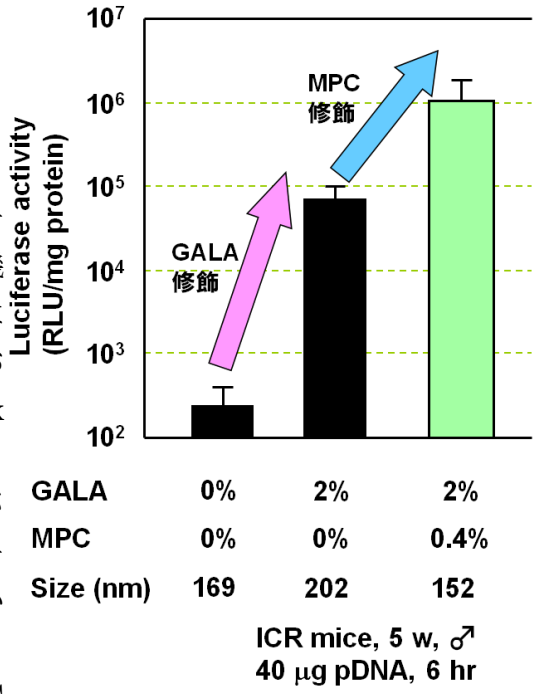
1 - 1 緒言

非ウイルス遺伝子ベクターは、ウイルスベクターと比較して免疫原性が少なく、安全性が高いことが利点である。しかし、非ウイルスベクターにおいても、生体分子との接着によるオプソニン化が起こり、マクロファージに貪食されることが知られており[21]、標的細胞への到達のため、マクロファージによる貪食の回避は極めて重要である。

近年、マクロファージによる貪食を回避する素子として、MPC ポリマー(図 1-1a)が注目されている[22]。本ポリマーは、細胞膜と同じ成分であるホスホリルコリン基をもち、血球やタンパク質との相互作用が極めて弱いと考えられており、生体適合性素材として医療器具のコーティングや化粧品などにも応用されている[23, 24]。



(左)図1-1 (a) MPCポリマーの構造
(上)図1-1 (b) GALAのアミノ酸配列



増田 平成20年度 学位(博士)論文発表より引用

図1-2
in vivoにおけるPMB50とGALAによる遺伝子発現活性の上昇

当研究室の増田らは、MPC ポリマーの一種である PMB50 を MEND の機能性素子として選択した。PMB50 は図 1-1 (a)の MPC ポリ マー構造において、親水基と疎水基が 50 : 50 の比(x = y = 50)となっており、疎水基であるブチル基 (R = $CH_3CH_2CH_2CH_2$)が MEND 脂質膜へ挿入されるアンカー部位となっている。以下の実験においては、PMB50 を MEND に修飾することを単に MPC 修飾と呼称する。MPC 修飾による in vivo 肝臓における遺伝子発現活性への影響を評価した結果、エンドソーム膜融合性ペプチドの

GALA(図 1-1b)と共修飾することにより、遺伝子発現活性が GALA のみを修飾した MEND と比較して 10 倍以上上昇したという結果を得た(図 1 - 2)。

GALA は 30 残基のアミノ酸から構成されており、その配列中にグルタミン酸(E)-アラニン(A)-ロイシン(L)-アラニン(A)の繰り返し配列が存在することが特徴であり、中性 pH ではグルタミン酸の負電荷の静電的反発によってランダムコイル構造となっているが、エンドソーム内の酸性 pH ではグルタミン酸のプロトン化によって中性電荷となり、α-ヘリックス構造をとり、膜融合性を示す [25]。

MPC と GALA の修飾による遺伝子発現活性の上昇は、マクロファージによる貪食の回避によるものと思われたが、マウス肝プライマリー細胞においても同様の上昇がみられたため、MPC 修飾は細胞内動態の改善に寄与している可能性が示唆された。

本研究では、GALA 修飾 MEND に対する MPC 修飾の影響を、核移行やエンドソーム脱出などといった細胞内動態の観点から検討した。

1 - 2 MPC/GALA 修飾 MEND の調製

序章でも述べたとおり、MEND は遺伝子とポリカチオンの凝縮体(Core)を脂質膜で封入した構造を有する。MEND の調製方法を図 1 - 3 に示す。

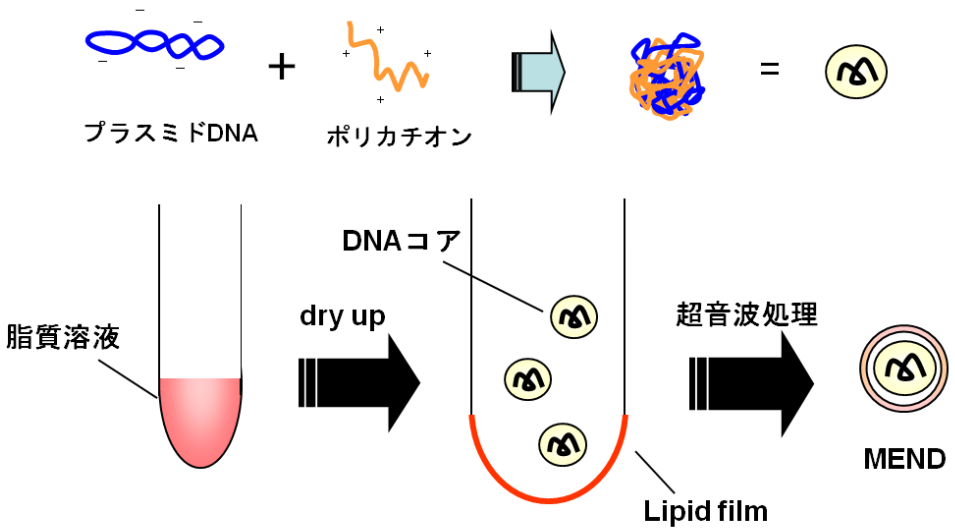


図1-3 MENDの調製法
プラスミドDNAとポリカチオンの静電的相互作用によってコア粒子が形成される。脂質溶液を乾燥させることによって作製したLipid filmにコア粒子を添加し、超音波処理を行うことにより、コア粒子が脂質にコーティングされ、MEND粒子が形成される。

本章では、pDNA の凝縮化剤として、精子核に特異的に存在する塩基性タンパク質である protamine を用いて DNA コアを調製した。この際、pDNA に対して電荷比(N/P 比)が 1.0 となるように protamine を添加した。本コアを用い、

PMB50 と GALA を修飾した MEND、GALA のみを修飾した MEND、いずれも修飾していない MEND の 3 種類の MEND を調製した。なお、本章では、PMB50 と GALA を修飾した MEND を MPC/GALA-MEND、GALA のみを修飾した MEND を GALA-MEND、いずれも修飾していない MEND を未修飾 MEND と記載する。

これらの MEND と Core について、Zetasizer Nano を用いて粒子径と、表面電位であるζ電位を測定し、表 1-1 に示した。表の PdI とは、Polydispersity index の略語で、粒子の均一性の指標となる値である。

	粒子径 (nm)	ζ電位 (mV)	PdI
Core	103±8	-34.0±9.5	0.13±0.02
未修飾MEND	206±23	29.1±2.7	0.27±0.03
GALA-MEND	167±21	13.9±1.4	0.25±0.02
MPC/GALA-MEND	190±3	-1.6±4.9	0.22±0.01

表1 - 1 各MEND、Coreの粒子径・ζ電位

表 1 - 1 の結果より、負電荷をもつ Core が正電荷をもつ MEND の脂質膜で封入されていることが示唆される。各 MEND 間に粒子径や PdI の差はほとんどないが、ζ電位は未修飾 MEND > GALA-MEND > MPC/GALA-MEND となっている。GALA は負電荷をもつペプチドであるため、MEND の脂質膜表面に修飾することにより、MEND のζ電位を低下させたと考えられる。また、PMB50 は電気的に中性であるが、これを修飾することによって MEND のζ電位は大きく低下し、中性電荷の粒子となった。

1 - 3 MPC, GALA 修飾による MEND の遺伝子発現活性への影響の検討

in vitro において遺伝子発現活性を測定するため、ICR マウス♂5 ~ 8 週齢から採取したマウス肝プライマリー細胞に、未修飾 MEND、GALA-MEND、MPC/GALA-MEND を Transfection し、6 時間後、24 時間後の遺伝子発現活性を測定した。

その結果、6 時間後の遺伝子発現活性は、未修飾 MEND < GALA-MEND < MPC/GALA-MEND の傾向はあるものの、GALA-MEND と MPC/GALA-MEND の遺伝子発現活性は数倍程度の差であった(data not shown)が、24 時間後では PMB50 の修飾によって 100 倍以上遺伝子発現活性が

上昇していた(図 1 - 4)。

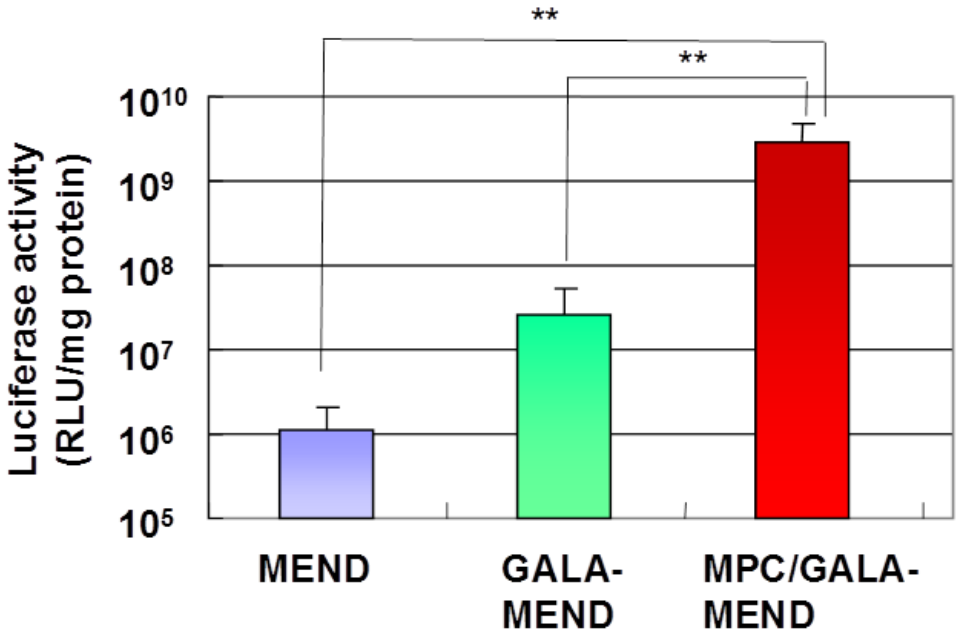


図1-4: マウス肝プライマリー細胞における
MPCポリマー修飾MENDの遺伝子発現活性

各種MENDを用いてマウス初代培養細胞に遺伝子導入を行い、24時間後の遺伝子発現活性を評価した。なお、GALA修飾量は総脂質量の2mol%、MPC修飾量は総脂質量の0.2wt%である。
n = 3, One way ANOVA followed by SNK test, **P<0.01

1 - 4 定量的 PCR による細胞内・核内遺伝子量の定量

各 MEND の細胞への取り込み量と核移行量を測定するため、MEND を細胞に Transfection した後、定量的 PCR を用いて 6 時間後、24 時間後の細胞内・核内遺伝子量を定量した。

その結果、MPC 修飾後の遺伝子発現活性が大幅に上昇した 24 時間後では、GALA-MEND, MPC/GALA-MEND ともに細胞内・核内遺伝子量が未修飾 MEND と比べて極端に低い結果となった。一方、遺伝子発現活性が同等であった 6 時間後においては、GALA-MEND と MPC/GALA-MEND の細胞内・核内遺伝子量に大きな差がみられた。

24 時間後において GALA-MEND や MPC/GALA-MEND の遺伝子量が極端に低い原因として、以下のことが考えられる。24 時間後の時点において遺伝子発現活性が高いことから、より前の時刻において取り込まれた遺伝子が転写・翻訳されて生じた遺伝子産物の量は多いと考えられる。しかし、その時点におい

て導入された遺伝子そのものは大半が分解されていると考えられる。そこで、核移行後遺伝子発現効率は、24 時間後の遺伝子発現活性を、6 時間後の核内遺伝子量で除して算出した(図 1 - 5)。

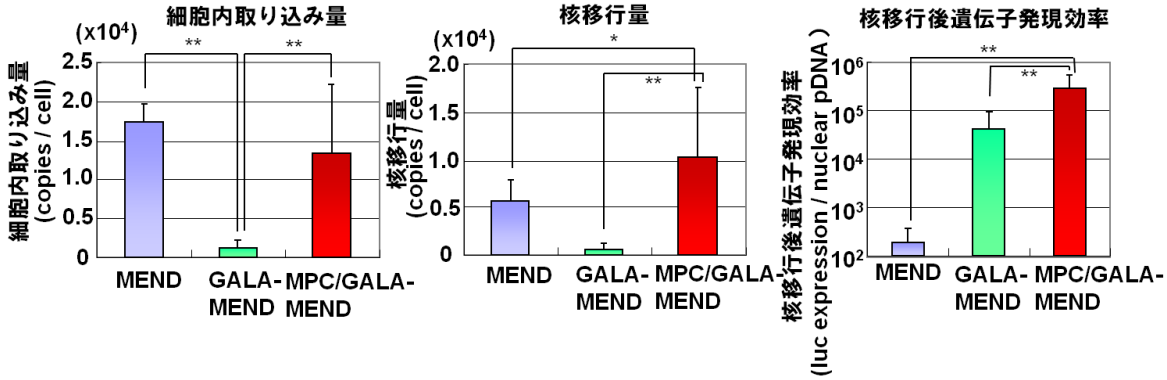


図1-5：定量的PCR法を用いた細胞内取り込み・核移行評価

各種MENDを用いてマウス初代培養細胞に遺伝子導入を行い、6時間後の細胞画分および核画分に含まれるルシフェラーゼ遺伝子量およびβアクチン遺伝子量を定量的PCR法によって測定した。βアクチン遺伝子量から細胞数を算出し、1細胞あたりのルシフェラーゼ遺伝子量を算出した。
n = 3, One-way ANOVA followed by SNK test *P <0.05, **P<0.01

MEND に GALA を修飾すると、細胞内取り込み量は大きく低下した。これは、ζ電位が正である MEND に負電荷の GALA を修飾したことで表面電位が低下し、負に帯電している細胞膜との相互作用が弱まったことが原因と考えられる。一方、MPC 修飾により、さらにζ電位が低下し、中性電荷となっているが、細胞内取り込みは MPC 非修飾の GALA-MEND と比較して大きく上昇している。

また、核内取り込み量は細胞内取り込み量とほぼ同等の推移となった。このため、PMB50 は核移行過程の改善効果はもたないことが示唆された。一方、核移行後遺伝子発現効率は、GALA 修飾によって大きく上昇し、さらに PMB50 を修飾することにより 10 倍程度上昇した。この結果より、PMB50 は MEND の核移行後の転写・翻訳に寄与していることが示唆された。

1 - 5 イメージングによるエンドソーム脱出効率・decoating 効率の評価

遺伝子キャリアが遺伝子を発現するために、核移行と並んで重要な過程が、エンドソーム脱出である。MEND は、遺伝子コアが脂質膜で封入された構造となっており、脂質膜がエンドソーム膜と融合することによってエンドソーム脱出が起こると考えられている。MEND は一般に複数枚の脂質膜で封入されており、エンドソーム脱出の際には、全ての膜がエンドソーム膜との融合に伴って除かれてコアのみの状態になる可能性と、外側の膜のみがエンドソーム膜と融合し、脂質膜に封入された状態で細胞質に放出される可能性の 2 つが考えられる(図 1 - 6)。

遺伝子が転写される際には、プラスミド DNA が単体の状態になることが必要であるため、脂質膜に封入された状態よりも脂質膜が脱被覆された状態のほうが DNA を放出しやすく、遺伝子発現に有利であると考えられる。このことを踏まえ、a) MEND 脂質膜とエンドソームの共局在 b) MEND 脂質膜と DNA の共局在の 2 つを評価することとした。

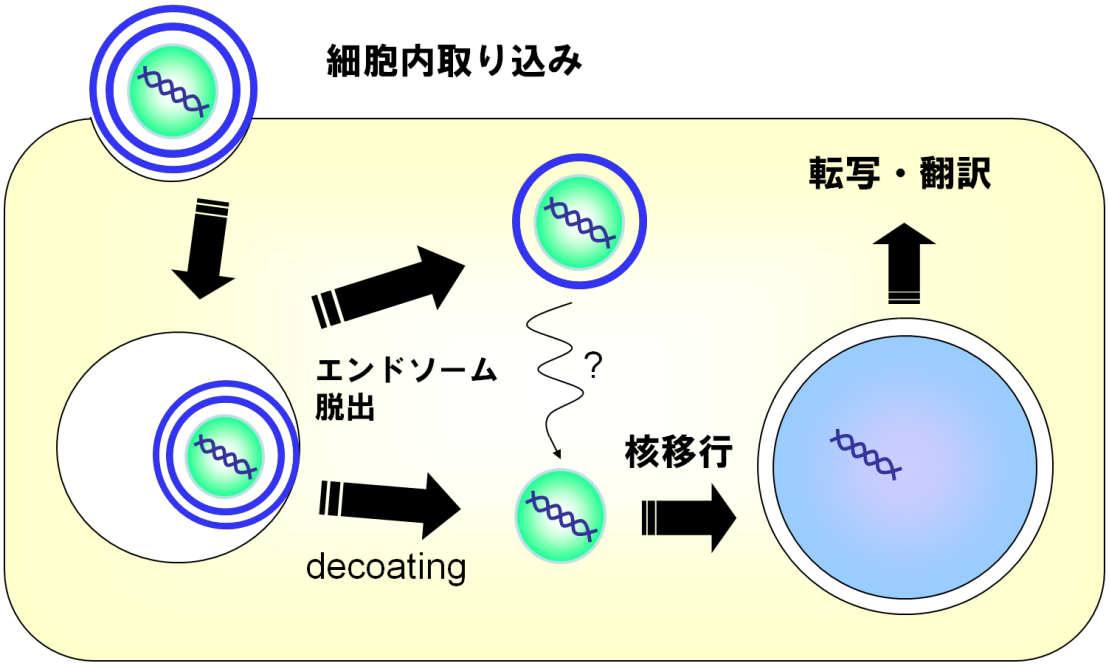
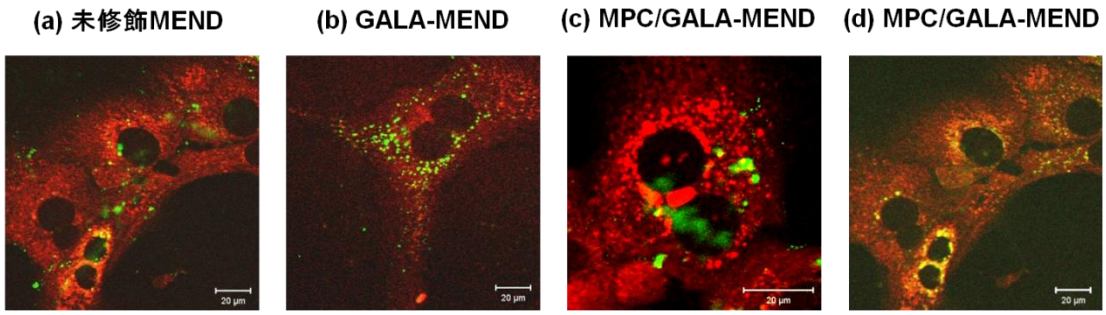


図1-6：定量的PCR法を用いた細胞内取り込み・核移行評価

a) MEND 脂質膜とエンドソームの共局在の評価

まず、MEND 脂質膜のエンドソーム脱出効率の評価を行った。

MEND 脂質膜を NBD-DOPE、PMB50 を Rhodamine ラベルした MEND をマウス肝プライマリー細胞に Transfection し、6 時間後にエンドソームを Lysotracker Blue で染色して観察した。(図 1 - 7)



a, b, c　Green : MEND脂質膜, Red : endosome, yellow : 共局在
d　Green : PMB50, Red : endosome, yellow : 共局在

図1-7 MEND脂質膜のエンドソーム脱出評価 (bars : 20 mm)

脂質膜もしくはPMB50を蛍光ラベルした各種MENDを用いてマウス初代培養細胞に遺伝子導入を行い、6時間後に顕微鏡観察を行った。観察30分前にLysotracker Blueを用いてエンドソームの染色を行った。蛍光ラベルしたMEND構成成分とエンドソームの共局在を見やすくするため、エンドソームを赤、MEND構成成分を緑として疑似カラー表示している。

エンドソーム膜融合ペプチドである GALA を修飾していない MEND(図 1 - 7 a)においても、脂質膜とエンドソームの共局在はほとんどみられなかった。また、GALA 修飾 MEND でも同様にこれらの共局在はほとんどみられず、脂質の多くが細胞表面付近に存在することが示唆された(図 1 - 7 b)。この時刻における定量的 PCR の結果によると、GALA-MEND は、未修飾 MEND と比較して細胞内遺伝子量が 10%以下であることから、GALA 修飾 MEND では細胞内に取り込まれずに細胞表面に結合している MEND が多いと考えられる。

MPC/GALA-MEND でも、MEND 脂質膜のエンドソームとの共局在はあまりみられず(図 1 - 7 c)、その一方、PMB50 はほとんどがエンドソームと共局在していることが示唆された(図 1 - 7 d)。

MEND 脂質膜がエンドソーム膜と融合することによってエンドソーム脱出すると考えられているため、MEND の最外膜の外側に修飾されている PMB50 がエンドソームに残るのは合理的であると考えられる。

以上の結果より、MEND 脂質膜のエンドソーム脱出効率は今回検討したどの MEND においても十分に高く、これは MPC/GALA-MEND の遺伝子発現活性の上昇の重要な原因ではないと考えられる。

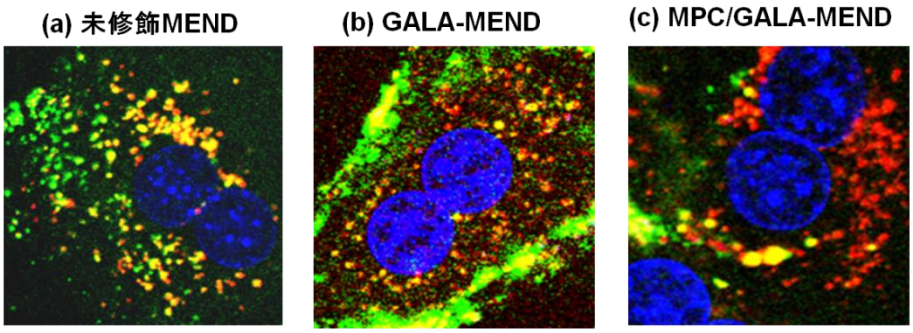
b) MEND 脂質膜と DNA の共局在の評価

次に、MEND 脂質膜と DNA の共局在の評価を行った。

MEND 脂質膜を NBD-DOPE, DNA を Rhodamine でラベルした MEND をマウス肝プライマリー細胞に Transfection し、核を Hoechst33342 で染色して観察を行った。

その結果、未修飾 MEND では、脂質膜と DNA が共局在した黄色のドットが多いのに対し、GALA-MEND では DNA 単独の赤いドットが増え、MPC/GALA-MEND では赤いドットが大半となった(図 1 - 8)。この結果より、PMB50 は decoating 過程を大きく改善していることが示唆された。

前項の結果より、MPC ポリマーはほとんどがエンドソームと共局在しており、細胞質に放出されていないことが示唆されているため、細胞質に放出された MEND の脱被覆には PMB50 は関与し得ないと考えられる。よって、PMB50 はエンドソーム脱出に伴う脱被覆を促進したと考えられる。



Green : MEND脂質膜, Red : 脱被覆DNA, yellow : 共局在(被覆DNA), Blue : 核

図1-8 : 脱被覆効率の評価

脂質膜とDNAを蛍光ラベルした各種MENDを用いてマウス初代培養細胞に遺伝子導入を行い、6時間後に顕微鏡観察を行った。観察10分前にHoechst33342を用いて核の染色を行った。

1 - 6 考察

ここまでの結果より、PMB50 は、細胞内取り込み、エンドソーム脱出に伴う MEND 脂質膜の脱被覆、核移行後遺伝子発現効率の改善効果があることが示唆された。

細胞内取り込みの改善については、PMB50 分子そのものの性質によるものであると考えられる。PMB50 は高い細胞膜透過性があることが報告されており、その一方、疎水基をもたない MPC ポリマーは細胞に取り込まれにくいことが報告されている[26]。一方、PMB50 が MEND 粒子表面に修飾されるとき、疎水基が脂質エンベロープに挿入され、親水基が粒子の外側を向くように修飾されると考えられ、親水基のみが外側を覆っている粒子では、細胞内取り込みが上昇することは考えにくい。そのため、PMB50 の疎水基のうち MEND の脂質膜表面に修飾されていない部分が細胞と相互作用していることが考えられる。分子量の小さい PMB50 を用いた場合には遺伝子発現活性上昇が減弱する現象がみられ(data not shown)、分子量の大きい PMB50 は分子が嵩高いために、脂質エンベロープに挿入されない疎水基が重要であることが示唆されている。

decoating 効率の改善については、エンドソーム膜との融合能の上昇によるも

のであると考えられる。MEND の細胞内輸送過程のうち、decoating が起こりうる段階は二つ考えられる。一つは、エンドソーム脱出時に MEND の脂質膜が全てエンドソーム膜と融合することにより decoating が起こるという場合、もう一つは、脂質膜に封入された状態でエンドソームから脱出した後、脂質膜が崩壊して decoating が起こるといった場合である。図 1-7(D)に示されているように、PMB50 はエンドソーム脱出時にエンドソームに残っていることが示唆されているので、エンドソーム脱出後の過程に PMB50 が関与しているとは考えにくい。そのため、脂質膜とエンドソーム膜の融合促進により decoating 効率が向上したと考えられる。

PMB50 はエンドソーム脱出の際にエンドソームに残っているため、PMB50 が核移行後の過程に直接関与したとは考えにくい。そこで、核移行後遺伝子発現効率の改善は、脱被覆効率の改善と関連していると考えた。MEND 脂質膜が脱被覆化されることにより、コアの脱凝縮が促進され、転写が起こりやすくなった可能性が考えられる。一方、当研究室の濱等の研究により、細胞質に放出された MEND のカチオン性脂質が、導入遺伝子が転写された mRNA と静電的に相互作用することにより、翻訳に悪影響を与えることが報告されている[27]。脱被覆効率が高く、カチオン性脂質が細胞質に放出されなくなることにより、こうした翻訳の阻害が抑制されると考えられる。

次に、PMB50 がどのような機構により decoating 効率を向上させたかについて考察した。表 1 - 1 の結果より、PMB50 は中性分子であるにもかかわらず、GALA-MEND の表面に修飾することにより、ζ 電位の低下を引き起こす。また、GALA 非修飾の MEND では in vivo で PMB50 の修飾によって遺伝子発現活性が上昇しないことが確認されている(Data not shown)が、このとき、PMB50 の修飾によってζ電位は変化しないという結果が得られている。

そこで、ζ 電位の低下が、内封 DNA の漏出などの他の要因によるものではないことを確かめるため、このたび用いた MEND と同じ脂質組成の空リポソームを調製し、GALA +/-, PMB50 +/-でζ電位を比較した。

	PMB50非修飾	PMB50修飾
Liposome	30.2±3.1	32.9±6.9
GALA-Liposome	24.8±0.7	11.7±3.5

表1-2 空リポソームのζ電位に対するGALA, PMB50修飾の影響

空リポソームにおいても、GALA 非修飾のものでは PMB50 の修飾によってζ電位が低下せず、GALA 修飾のものではζ電位が大きく低下した(表 1-2)。これらの結果より、PMB50 修飾によるζ電位低下は GALA によるものであることが示唆された。

これらのことから、PMB50 が GALA の脂質膜上での提示が改善されたことが示唆される。考えられるモデルを図 1 - 9 に示す。GALA は負電荷をもつペプチドであり、カチオン性脂質を含む脂質膜と静電的に相互作用し、ペプチド本来の機能を十分に発揮できないと考えられる。しかし、PMB50 の修飾により、これらの静電的相互作用が抑えられることにより、GALA の提示が改善されると考えられる。その結果、エンドソーム膜融合性が高まり、エンドソーム脱出の際に DNA コア周辺の脂質膜が全て脱被覆される確率が高まったと考えられる。

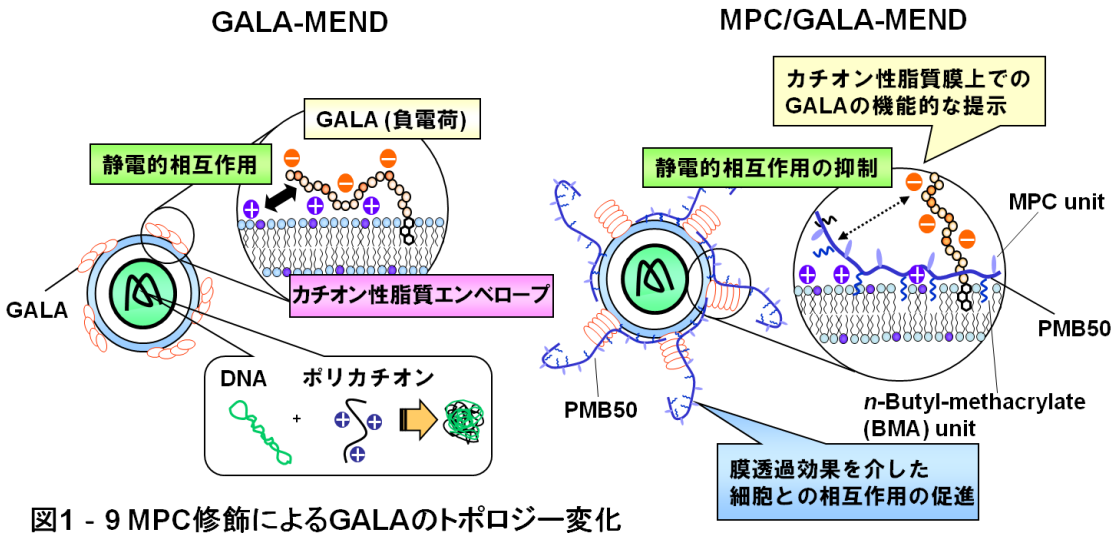


図1 - 9 MPC修飾によるGALAのトポロジー変化

1 - 7 まとめ

本章では、PMB50 が GALA-MEND に与える影響について、細胞内動態の観点から検討した。

PMB50 の修飾により、細胞内取り込み量、核移行後遺伝子発現効率が上昇した。顕微鏡観察の結果より、PMB50 の修飾によって decoating 効率が上昇した、これが核移行後遺伝子発現効率の上昇に寄与したと考えられる。PMB50 は GALA のトポロジーを改善することによって GALA のエンドソーム膜融合機能を高めることによって decoating 効率を向上させたと考えられる。

第二章

細胞内環境応答性脂質様物質を用いた持続型遺伝子ベクターの創製とその機構の検討

第 2 章 細胞内環境応答性脂質様物質を用いた持続型遺伝子ベクターの創製とその機構の検討

2 - 1 緒言

人工遺伝子ベクターの臨床応用に向けて解決すべき問題の一つが、遺伝子発現活性の持続性の弱さである。遺伝子発現活性の持続性を向上させるため、プラスミド DNA の改良が多く試みられてきた。改良戦略は、1）治療遺伝子の染色体への組み込みと、2）免疫反応による遺伝子発現活性低下の回避に大別される。

染色体への遺伝子の組み込みを目的としたベクターは、レトロウイルス科のウイルスベクターが代表的である。非ウイルスベクターの分野においては、1994 年にレトロウイルスが自身の遺伝子を宿主細胞に組み込むために用いるインテグラーゼをプラスミド DNA と共導入することによる遺伝子導入法が報告された[28]。しかし、この戦略はレトロウイルスによる遺伝子導入で危惧されていた、外来遺伝子の組み込み位置の特異性の低さによる挿入変異の可能性を含んでおり、染色体の変異による発癌などの重大な副作用の可能性が残っていた。そこで、より組み込み位置の選択性が高いバクテリオファージ由来 PhiC31 integrase[29, 30]や PiggyBac Transposon[31, 32]などを用いた方法が現在では主流となっている。

一方、免疫反応による遺伝子発現活性低下の回避方法として成功しているのが、プラスミド DNA 配列からの非メチル化 CpG 配列の排除である。非メチル化 CpG 配列はバクテリア由来の DNA に特徴的であり、動物細胞においてはエンドソーム内の Toll-like Receptor 9 によって認識される[33]。これによって TNF-α などの炎症性サイトカインの産生が起こり、外来遺伝子の発現の抑制が起こっていることが報告されている[34]。プラスミド DNA 上の CpG 配列を排除することにより、肺や肝臓において遺伝子発現活性が持続することが報告されている。

肝臓標的人工遺伝子ベクターのもう一つの問題点は、臓器選択性の乏しさである。肝臓標的遺伝子ベクターにはカチオン性粒子が多く用いられていたが、これには肝臓以外の臓器、特に肺や脾臓に集積しやすいという欠点がある。遺伝子ベクターを静脈内投与すると、肺や、肝臓や脾臓などの細網内皮系に取り込まれることが知られている[35]。カチオン性粒子は血清中のアニオン性タンパク質と相互作用し、凝集を起こすことにより、肺の毛細血管を詰まらせたり[36]、脾臓に集積したり[37]することが報告されている。カチオン性粒子はアニオン性の細胞膜と相互作用しやすいため、細胞種にかかわらずこれらの臓器を構成する細胞に取り込まれ、肺や脾臓においても遺伝子を発現させると考えられる。

第一章で用いた MPC/GALA-MEND においてこれらの問題点が改善されているか否かを確認するため、CpG 配列を含むプラスミド DNA (CpG+)と、CpG 配列を含まないプラスミド DNA (CpG－)を封入した MPC/GALA-MEND をマウスに投与し、ルシフェラーゼ活性を比較した(図 2-1)。その結果、遺伝子発現活性の持続性には有意な差がみられなかった。このため、MPC/GALA-MEND 中の何らかの成分がプラスミド DNA 本来の遺伝子発現持続能を妨げている可能性が示唆された。また、肺・脾臓における遺伝子発現活性は肝臓と同程度または一桁程度高く、臓器選択性に乏しいことが示唆された。

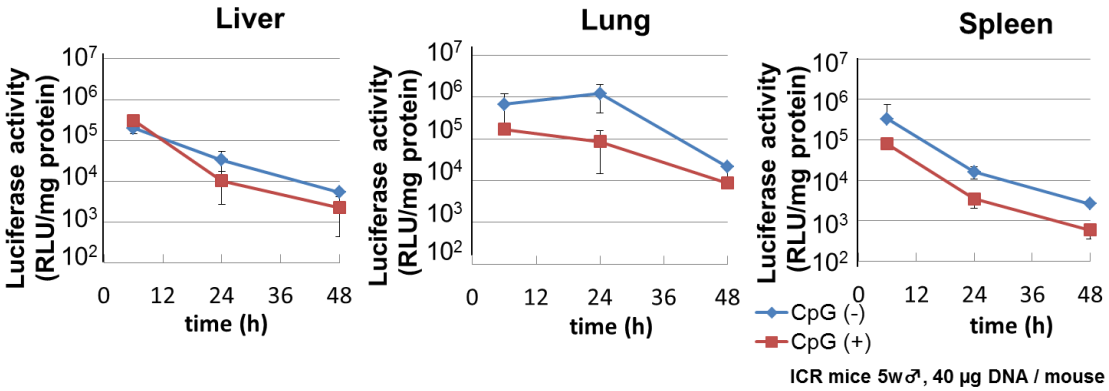


図2-1 MPC/GALA-MENDの遺伝子発現活性に対する非メチル化CpG配列の影響

遺伝子発現持続能を妨げている可能性があるものとして、カチオン性脂質が挙げられる。カチオン性脂質は細胞内において mRNA と相互作用を起こし、遺伝子発現を阻害している可能性が報告されている[38]。また、近年カチオン性リポソームやそれを用いた lipoplex がアジュバントとして用いられ、ワクチンなどに利用される例がいくつかある[39-41]。非メチル化 CpG 配列による免疫系の刺激が遺伝子発現活性の持続に対して抑制的に働いていることから、カチオン性脂質を含むベクターが免疫反応を惹起し、遺伝子発現活性の持続を妨げている可能性は十分に考えられる。

また、MPC/GALA-MEND はゼータ電位が中性であるにも関わらず、肺や脾臓への集積性についてはカチオン性遺伝子ベクターと同様の傾向を示した。これは、PMB50 の細胞内取り込み促進効果がポリマー自身の両親媒性に起因[26]し、肝細胞特異的な経路を介したものではないと考えられているため、カチオン性粒子と同様に臓器非選択的な取り込みを引き起こしたと考えられる。

そこで、MPC ポリマーを用いない中性ベクターを作製することとした。中性電荷のベクターでは、カチオン性ベクターが有していたアニオン性生体膜との静電的相互作用が起きないため、その部分が問題となる。細胞内取り込みに関しては、肝臓においてはむしろ中性電荷の方が好ましいと考えられる。中性電

荷のリポソームは血中で ApoE と結合することにより、肝細胞の LDL レセプターによって取り込みが起こることが報告されている[42]。一方、他の臓器、特にカチオン性リポソームの場合に集積が起こりやすい肺や脾臓においては細胞内取り込みを引き起こす駆動力が特に存在しないため、結果的に肝臓への臓器選択性が高まると考えられる。

中性電荷の遺伝子ベクターにおいて、最も問題となるのがエンドソーム脱出である。カチオン性ベクターでは、アニオン性のエンドソーム膜とカチオン性のベクター表面が相互作用することにより融合が起こるが、中性ベクターではそのような駆動力が存在しないため、エンドソーム脱出効率の低下が予想される。この問題を解決するため、近年、pH 応答性脂質が用いられている。pH 応答性脂質は、血中の生理的 pH においては中性電荷を有し、エンドソーム内酸性 pH においてはカチオン性を帯び、エンドソーム膜との相互作用を起こす。序論において詳述したように、siRNA キャリアである SNALP[15-18]が pH 応答性脂質を用いて臨床応用へ着実に歩を進めている[19]ことは、pH 応答性脂質を用いた脂質ナノ粒子が肝臓を標的とした核酸送達に極めて有用であることを示している。

本研究では、pH 応答性脂質様物質として ssPalmM (SS-cleavable and pH-activated lipid-like materials) (図 2-2)を用いた。本物質は一分子中に三級アミン構造を 2 個含んでおり、この部分が酸性 pH において正に荷電する。また、分子内にジスルフィド結合を有しているのも大きな特徴である。ジスルフィド結合は細胞質の還元的環境において分解を受けやすく、DNA コアの脱被覆化を促進する。

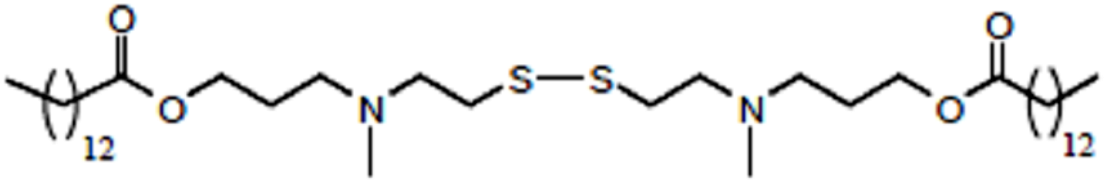


図2-2 ssPalmMの構造

本章では、ssPalmM を用いた MEND に、CpG 配列を含む DNA (pcDNA3.1(+)-Luc)と CpG 配列を含まない DNA (CpGfree-Luc)を封入し、遺伝子発現活性の持続性・臓器選択性評価、ならびにそのメカニズムの検討を行った。また、肝臓への選択性が高いカチオン性 MEND である R8/GALA-MEND[43]を比較対象として用いた。

2‐2 MEND の調製法

R8/GALA-MEND は MPC/GALA-MEND と同じ単純水和法で調製を行った

が、ssPalmM-MEND はエタノール希釈法を用いた。エタノール希釈法は、脂質のエタノール溶液を水で希釈することによって溶解度を下げ、リポソームを形成させる方法である。この原理を核酸のリポソームへの封入に用いたシステムである Wrapped liposome[44, 45]が 2006 年に報告された。Wrapped liposome の調製においては、脂質のエタノール溶液と lipoplex の水溶液を混合し、脂質がリポソーム形成を起こさず lipoplex は不溶であるような比較的高いエタノール濃度の段階を経た後、それを希釈することにより、脂質を lipoplex の周りに集合させ、パッケージングを行っている。

この方法を ssPalmM-MEND の調製に応用した。調製法の概念図を図 2-3 に示す。このようなエタノール希釈法の原理を利用した MEND 調製法を以下、単に「エタノール希釈法」と呼称する。

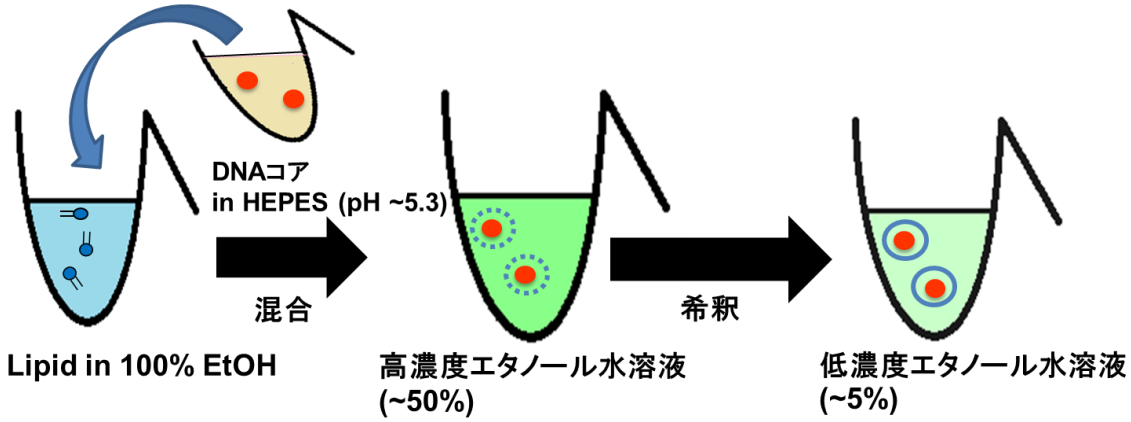


図2-3 エタノール希釈法を利用したMEND作製方法

図 2-2 に示した方法を用い、protamine/pDNA, N/P = 1.2 のコアを、ssPalmM：SOPC：Cholesterol = 3：4：3, DSG-PEG$_{2000}$ 3%の組成の脂質で封入を行った。

2 - 3 マウス肝血管における MEND 輸送の観察

最初に、ssPalmM を用いた中性電荷 MEND とカチオン性 MEND が肝血管内を流動する様子を共焦点レーザースキャン顕微鏡で観察を行った。脂質溶液に Rhodamine-DOPE を 1 mol%加えて MEND を作製し、ICR マウス(5-10w, ♂)に 50 mg/mL TBE を 300 - 500 μL 程度腹腔内投与して麻酔を行った。麻酔下で FITC ラベル isolectin (原液を HEPES buffer で 4 倍希釈)を 200 μL 尾静脈投与し、10 分以上経過した後に開腹し、肝臓をレンズ上に載せた状態で MEND を投与した。マウスの心臓の拍動による観察位置のずれを防ぐため、吸引デバイス[46]で肝臓を吸いつけながら観察を行った。投与後 10 分間程度動画を記録した。ssPalmM-MEND の組成は、ssPalmM：SOPC：Cholesterol = 3：4：3,

DSG-PEG$_{2000}$ 3%の脂質組成で、DNA コアは pcDNA3.1(+)-Luc と protamine を凝縮化させたコアを用いた。比較対象のカチオン性 MEND として R8/GALA-MEND を用いようとしたが、R8/GALA-MEND は Rhodamine-DOPE を加えて調製すると凝集が起こった。本研究室において、肝臓への MEND の集積性の決定に重要なのは R8 であることが示されている[47]ため、GALA を抜いた組成でこの実験を行った。

その結果、カチオン性 MEND は、血中で凝集して大きな粒子となり、血管内で滞っている様子が観察された。一方、中性 MEND は凝集がみられず、血管内に広がってスムーズに流れている様子が観察され、投与 9 分後には血管から MEND が漏れ出し、肝細胞への移行が始まっている様子が観察された(図 2－4)。以上の結果より、中性 MEND は血管を詰まらせにくく、安全性が高いことが示唆された。

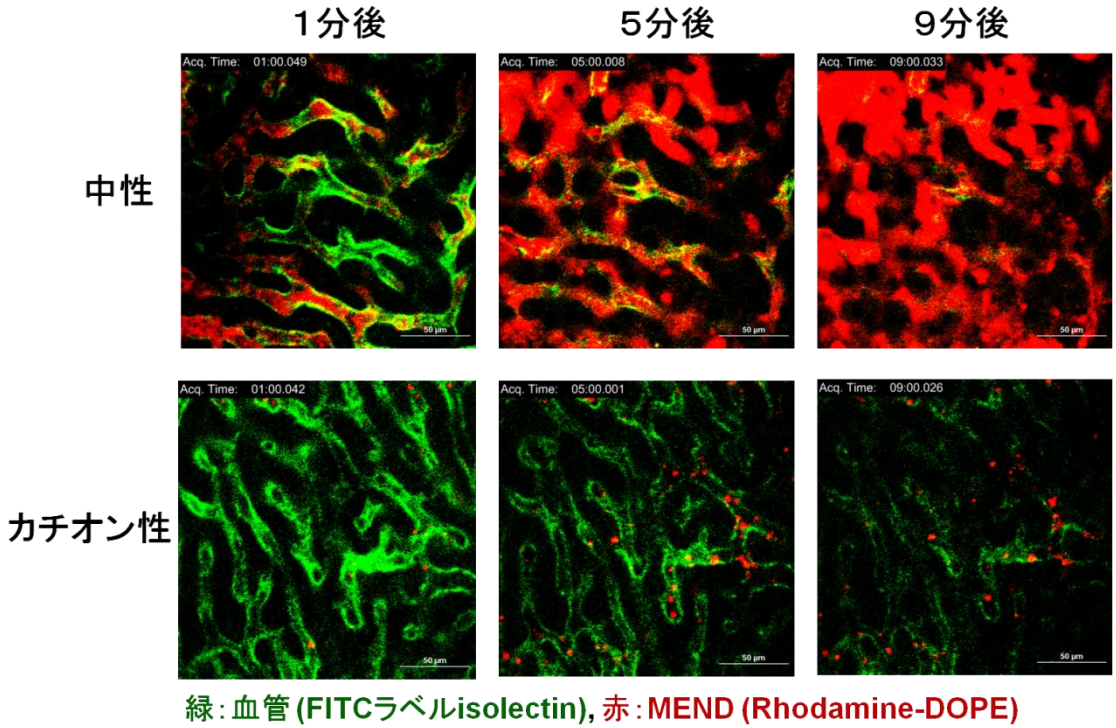


図2-4：肝臓内におけるナノ粒子の動的イメージング
マウスにFITCラベルisolection溶液を尾静脈投与し、約10分後にマウスの肝臓を露出させ、RhodamineラベルMENDの投与を行い、肝血管内を流動するMEND粒子の動画撮影を約10分間行った。

2 - 4 ssPalmM-MEND の遺伝子発現活性評価

ssPalmM-MEND の遺伝子発現活性について、肝臓における持続性と肝臓選択性の観点から評価を行った。

2 - 4 - 1 IVIS を用いた ssPalmM-MEND の肝臓における遺伝子発現持続性評価

ssPalmM-MEND 、 R8/GALA-MEND にそれぞれ、CpG 配列を含む pcDNA3.1(+)-Luc と CpG 配列を含まない CpGfree-Luc を封入し、ICR マウス 5w♂に 40 μg/mouse で投与した。以下の実験では、pcDNA3.1(+)-Luc を CpG(+)、CpGfree-Luc を CpG(−)と表記する。一匹のマウスの肝臓におけるルシフェラーゼ活性を経時的に測定するため、MEND 投与から一定時間後にマウスに麻酔をかけ、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与した際の発光を遺伝子発現の指標とした。IVIS (in vivo イメージングシステム)を用いてルシフェラーゼによる発光を画像化し、解析ソフトを用いてマウス腹部の発光量の定量を行った。その結果、R8/GALA-MEND はどちらのプラスミド DNA を封入した場合でも、投与 6 時間後に遺伝子発現活性がピークとなり、24 時間後には大きく低下し、3 日後には全く検出されなかった。一方、ssPalmM-MEND では、CpG(+)のプラスミド DNA を封入した場合には R8/GALA-MEND と同様に投与 6 時間後から遺伝子発現活性が単調に低下したが、CpG(−)のプラスミド DNA を封入した場合には投与 6 時間後から遺伝子発現活性がゆるやかに上昇し、1 週間後までピーク値付近で持続がみられた。その後、2 週間後にかけて大きく低下し、3 週間後には検出されなくなった(図 2-4)。そこで、遺伝子発現活性の持続には ssPalmM を含む脂質組成と CpG 配列を含まないプラスミド DNA の両方が必要であることが示唆された。

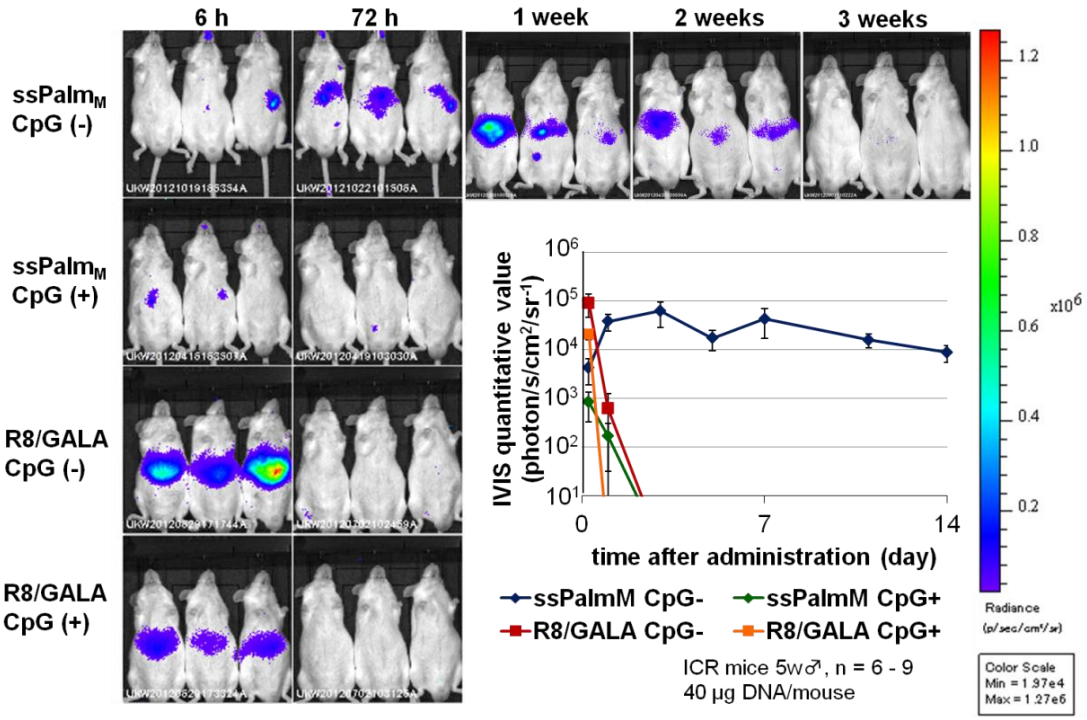


図2-5 遺伝子発現活性の時間依存性
マウスに各種MENDを投与し、一定の時間が経過した後、マウスにルシフェリンを腹腔内投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ遺伝子発現活性をIVISによって定量した。

一方、今回使用した CpGfree プラスミド(CpGfree-Luc)と同じプロモーター・エンハンサーの組み合わせ(mCMV プロモーター/hEF1 エンハンサー)を有するプラスミド DNA (CpG 配列を 3 つ含む)をマウスにハイドロダイナミクス法で投与すると、2 週間程度遺伝子発現活性が高値で持続し、その後急激に低下することが報告されている[48]。プラスミド DNA において遺伝子発現活性の強度を決定する主要因はプロモーターとエンハンサーであることを考慮すると、CpGfree-Luc をハイドロダイナミクス法で投与した場合、遺伝子発現活性の推移はこの報告と同様の結果となることが予想できる。それならば、CpGfree-Luc プラスミドが本来有している持続性は 2 週間程度であると考えられ、このたび ssPalmM-MEND において遺伝子発現活性が検出可能であった期間と一致する。この結果より、R8/GALA-MEND では CpGfree-Luc の遺伝子発現にサイレンシングが起こったが、ssPalmM-MEND に封入することによって CpGfree-Luc が本来有していた遺伝子発現持続性が保持されたと結論付けられる。

なお、CMV-Luc は、ハイドロダイナミクス法で投与した場合に投与後 3 日までに遺伝子発現活性が大きく低下し、低い発現レベルで 1 週間程度まで持続することが報告されている[49]。ssPalmM-MEND に CMV-Luc を封入した場合、ハイドロダイナミクス法と比較して最初の発現量がかなり低いため、後半の低い発現レベルの部分が観測されなかったと考えられる。

2 - 4 - 2 ssPalmM-MEND の臓器選択性の評価

ssPalmM-MEND の臓器選択性を、第一章の実験で用いていた MPC/GALA-MEND、市販の肝臓標的遺伝子導入試薬である in vivo JetPEI™ Galactose conjugate (in vivo jetPEI™-Gal)と比較した。遺伝子発現活性はそれぞれのサンプルにおいてピーク値となる時刻において比較しており、ssPalmM-MEND では 48 時間後、in vivo JetPEI-Gal と MPC/GALA-MEND は投与 6 時間後に肝臓・肺・脾臓を摘出し、ホモジネートを作製してルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ssPalmM-MEND の遺伝子発現活性は肝臓においては他のサンプルと同程度であるのに対し、肺と脾臓においては他サンプルと比較して遺伝子発現活性が低かった(図 2-6)。

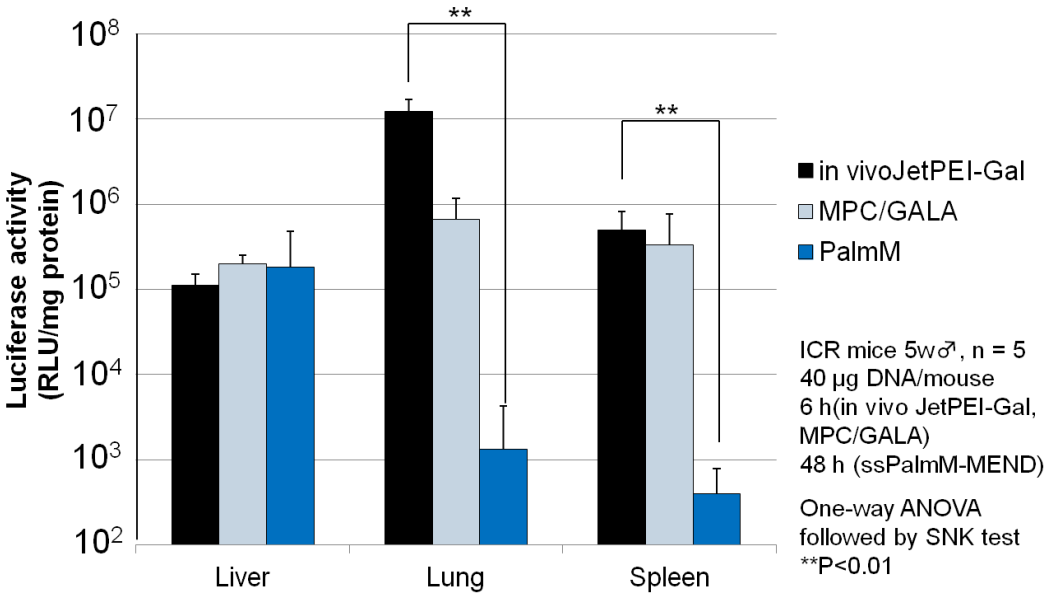


図2-6 遺伝子発現活性の臓器選択性
マウスにMENDを投与した後、ssPalmM-MENDでは48時間後、残りのベクターでは6時間後にマウスを安楽死させ、肝臓・肺・脾臓を摘出した。これらのサンプルからホモジネートを作製し、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性の測定を行った。

以上の結果より、本研究により開発された MEND は、従来のカチオン性ベクターと異なり、肝臓への選択性が高い遺伝子ベクターであることが示唆された。

2-5 マウス肝臓における導入遺伝子量の定量

持続性の有無のメカニズムを知るため、持続性を有する MEND である ssPalmM-MEND (CpG-)と、持続性を持たなかった MEND である ssPalmM-MEND (CpG+)、R8/GALA-MEND (CpG-)を投与したマウスにおいて、投与 6 時間後、1 日後、7 日後における肝臓内のルシフェラーゼ遺伝子量をリアルタイム PCR によって定量した。その結果、投与 6 時間後には R8/GALA-MEND が ssPalmM-MEND よりも 10 倍程度遺伝子量が高かったが、投与 1 日後には

すべてのサンプルにおいて遺伝子量が同程度となった(図 2-7)。

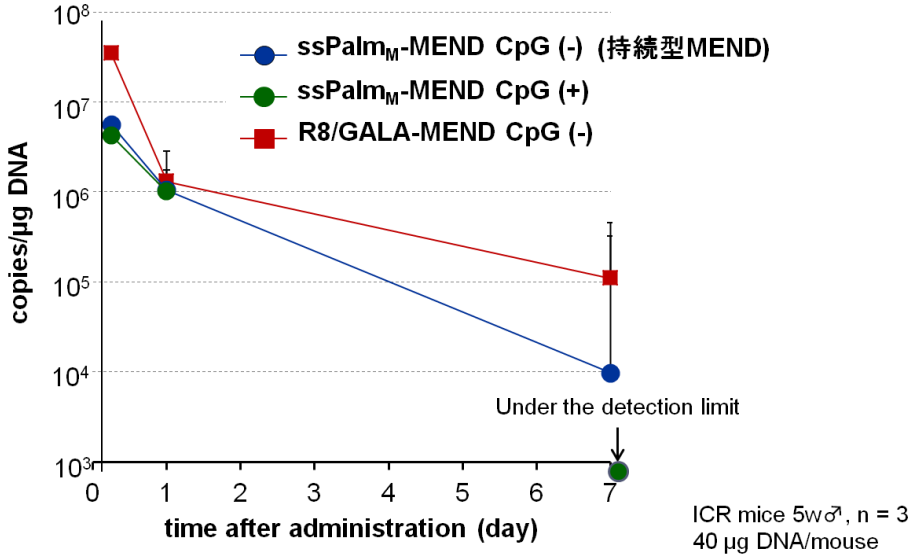


図2-7 遺伝子量の時間依存性
マウスにMENDを投与後、6時間後、1日後、7日後の時点でマウスを安楽死させ、肝臓を摘出した。肝臓からDNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いて遺伝子量の定量を行った。抽出したDNAの総量を吸光光度計を用いて測定し、ルシフェラーゼ遺伝子量(copies)を総遺伝子量(μg)で除し、グラフに表示した。

図 2-5 に示したように、持続性をもたない MEND を投与したマウスでは、投与 1 日後において遺伝子発現活性の低下がすでに起こっている。それにもかかわらず、この時点においてサンプル間の遺伝子量の差がほとんどみられないことから、遺伝子発現活性の低下は、遺伝子量の低下に起因するものではないと考えられる。また、投与 7 日後には R8/GALA-MEND (CpG-)の遺伝子発現は検出されなくなっているものの、肝臓内遺伝子量は遺伝子発現活性が持続している ssPalmM-MEND (CpG-)を上回っている。この結果より、遺伝子発現活性の持続の有無は遺伝子量では説明できず、なんらかの質的な要因が関与していると考えられる。

2-6 血中サイトカイン値の測定

2-1 の項で詳述したように、CpG 配列の有無による遺伝子発現活性の持続性の違いには免疫反応が関与していることが示唆されている。そこで、血中サイトカイン値の測定を行った。

その結果、ssPalmM-MEND (CpG+)を投与したマウスにおいては、TNF-α が投与 3 時間後、IL12 が 6 時間後に有意に高値を示した。一方、R8/GALA-MEND においては、IFN-γ が投与 6 時間後に有意に高値を示した(図 2-8)。

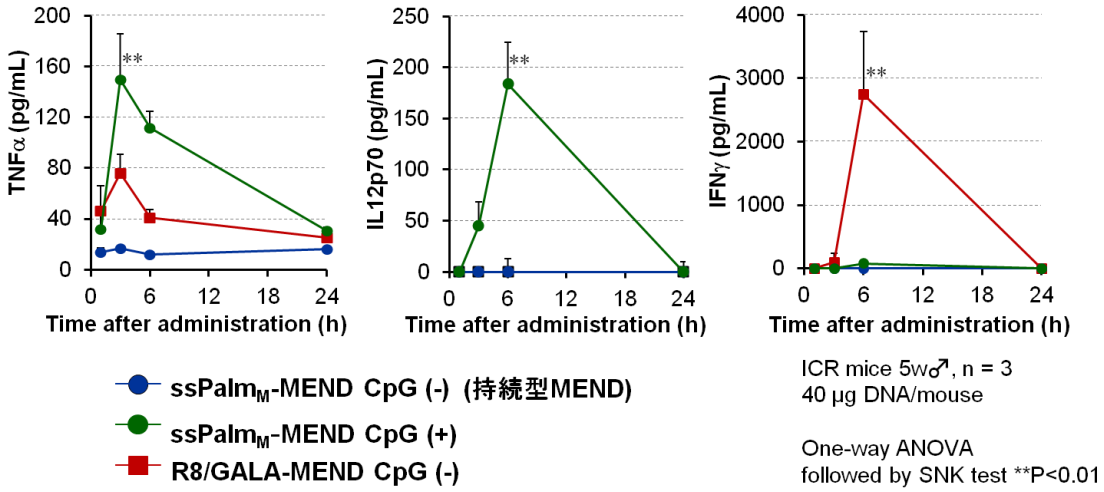


図2-8 血中サイトカイン値の推移
マウスにMENDを投与し、6時間後、1日後、7日後にマウスを安楽死させ、心臓から血液を採取し、血清を得た。ELISA kitを用い、血清中のサイトカイン値を測定した。

TNF-α と IL-12 が CpG 配列を含むプラスミド DNA の投与によって上昇することは過去の報告と一致している[50]。IFN-γ は IL-12 によって誘導されるにもかかわらず CpG+プラスミドによる有意な上昇がみられていないが、IL-12 の値は IFN-γ が高値を示す場合の血中濃度と比較してかなり低いことが原因であると考えられる。一方、R8/GALA-MEND では、CpG 配列が含まれないにもかかわらず IFN-γ 産生が起こっている。lipoplex や市販のカチオン性トランスフェクション試薬などによってプラスミド DNA を導入することで、TLR9 欠損マウス由来の細胞においてもサイトカインの産生が起きることが報告されている[51-53]ため、TLR9 非依存的な免疫活性化経路が存在すると考えられる。

2-7 肝毒性の評価

R8/GALA-MEND および ssPalmM-MEND の肝毒性を評価するため、血清中の AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ), ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)値の測定を行った。これらの酵素は肝細胞に多く含まれ、肝細胞の変性や破壊によって血液中に漏出することが知られている。日本 SLC 社が発表した ICR マウスのデータ集(2013 年版)によると ICR マウス 10 週齢♂の血清中 AST, ALT 値は、それぞれ 70±35.9, 36±33.4 (平均±SD, N=10)と報告されている。このデータの平均・標準偏差が母集団の平均・標準偏差と等しいと仮定し、一般的な医学検査で使用される基準範囲と同様に平均±2SD を基準範囲とすると、AST と ALT の基準範囲の上限はそれぞれ 142, 103 と計算される。

マウスに MEND を尾静脈投与後 6 時間、1 日、7 日後に血液を採取し、トラ

ンスアミナーゼ C-II テストワコーを用いて AST, ALT 値を測定した。その結果、投与 1 日後において R8/GALA-MEND (CpG-)において ssPalmM-MEND よりも AST、ALT ともに高い傾向があり、基準範囲を超えた値となっていた(図 2-8)。一方、遺伝子発現活性の持続性を有する ssPalmM-MEND (CpG-)では、どのタイムポイントにおいても AST, ALT 値は基準範囲を超過しなかった。

R8/GALA-MEND において AST, ALT 値がやや高く、肝臓の傷害が起きていることが示唆されたが、これは IFN-γ が高値を示したことと関連している可能性が考えられる。IFN-γ は肝炎における肝細胞傷害に関与していると考えられており[54, 55]、in vitro においてマウス初代培養肝細胞にアポトーシスを引き起こす[56]ことも知られている。また、TNF-α も肝細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告されている[57]ため、R8/GALA-MEND や ssPalmM-MEND (CpG+)における AST, ALT 値上昇に関与している可能性があると考えられる。

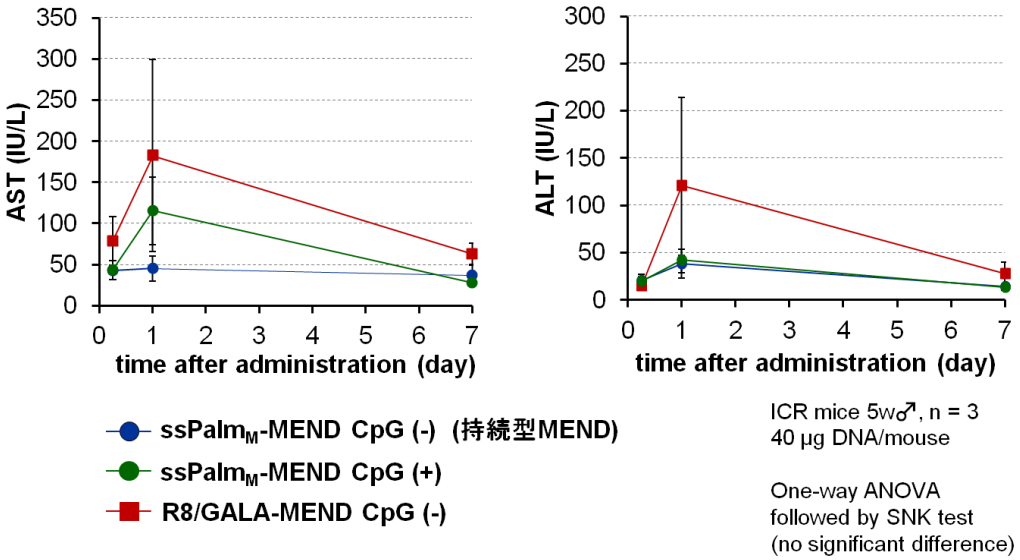


図2-9 血中AST, ALT値の推移
マウスにMENDを投与し、6時間後、1日後、7日後にマウスを安楽死させ、心臓から血液を採取し、血清を得た。測定キットの推奨プロトコールに従い、血清中のAST, ALT値の測定を行った。

2-8 まとめ

本章では、pH 応答性脂質用物質 ssPalmM を用いた中性の表面電荷を有する MEND を作製し、遺伝子発現活性を 2 週間後まで有意な遺伝子発現活性を得ることに成功した。本 MEND は炎症性サイトカインの産生を引き起こさず、肝毒性が低いことから、安全性が高いことが示唆された。

本研究において、同じプラスミド DNA (CpGfree-Luc)を用いた場合においても、DNA を封入した脂質エンベロープの性質によって遺伝子発現活性の持続性

の有無が決定することが明らかとなった。これは、プラスミド DNA を用いた製剤の開発にとって重要な情報であると考えられる。現在まで、非ウイルスベクターの持続性を向上させるために、プロモーターやエンハンサーの最適化や染色体への組み込みなど、主にプラスミド DNA の配列の最適化が行われてきた。これらのプラスミド DNA の機能を評価する際には、肝臓において高い遺伝子発現活性を得ることが可能なハイドロダイナミクス法が主に用いられているが、この方法はマウスの肝臓に一過性ではあるが傷害をもたらすことが明らかとなっており[58]、臨床へ応用する際に問題となると考えられる。そのため、通常の静脈内投与で遺伝子発現を起こすためにリポソームなどのキャリアが開発されてきたが、それらのキャリアにプラスミド DNA を搭載した際に、キャリアが遺伝子発現の持続を阻害するケースが存在することが明らかとなった。そのため、ssPalmM-MEND は pDNA の遺伝子発現持続を阻害しない担体として有用であると考えられる。

現状の ssPalmM-MEND の遺伝子発現活性は、本研究室でこれまで開発されてきた肝臓標的 MEND と比較して高いものではなく、臨床試験が盛んに行われているアデノウイルスと比較するとルシフェラーゼ活性で 1/100～1/1000 程度であると考えられる。このため、遺伝子発現活性の向上は重要な目標である。また、持続性に関しては、封入するプラスミド DNA によって大きく変化すると考えられる。例えば、染色体に遺伝子を組み込むタイプのプラスミド DNA を用いた場合、遺伝子発現活性の持続性の向上が見込まれる。

遺伝子発現活性の持続性の有無を決定しているのは遺伝子量ではなく、遺伝子のサイレンシングの有無であることが示唆された。このサイレンシングには、サイトカイン産生が関わっている可能性が示唆されたが、サイトカインそのものが遺伝子発現のサイレンシングに関わっている確証はなく、詳細なメカニズム検討が必要である。また、投与 3 週間後には遺伝子発現活性が消失していたが、この原因が遺伝子量とサイレンシングのどちらにあるのかは明らかになっていない。これらについても検討が必要であると考えられる。

第三章

持続型 MEND の改良

第 3 章 ssPalmM-MEND の改良

3 - 1 緒言

第 2 章において、遺伝子発現活性が持続する人工遺伝子ベクターの開発を行った。ssPalmM- MEND は従来の MEND と比較して遺伝子発現持続性は大きく向上したが、遺伝子発現活性の絶対値が小さいことなどの問題点が存在する。そのため、ssPalmM-MEND の改良を行った。

改良戦略として、ssPalmM-MEND の主要なカチオン性成分であるポリカチオンを用いずにパッケージングを行うという方法を選択した。従来の MEND は、DNA とポリカチオンを凝縮化させたコアを脂質エンベロープで封入した構造をしており(図 3-1)、DNA を脂質エンベロープに封入可能なサイズのナノ粒子とするためにポリカチオンが必要であった。

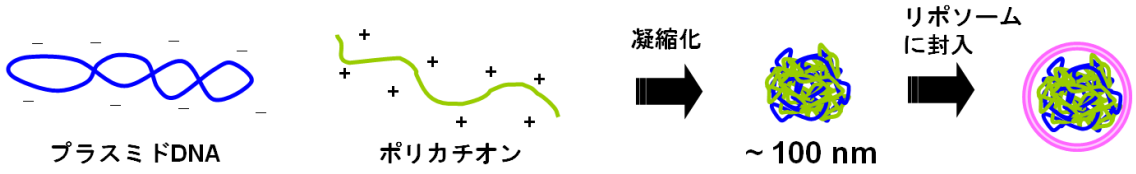


図3-1 MENDの調製過程

ポリカチオンを用いない MEND は、体内動態・細胞内動態の面で、従来のポリカチオンを用いた MEND と比較して優れていると考えられる。これらの MEND をヒト肝臓に適用した場合に想定される動態の差について、図 3-2 に図示した。

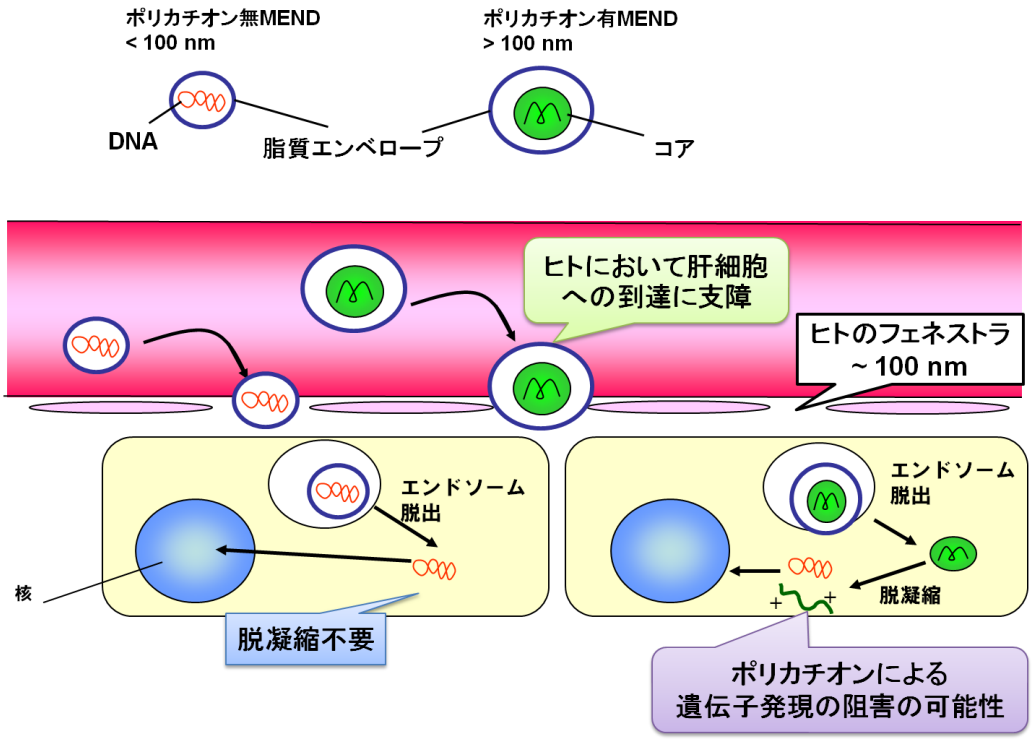


図3-2 ポリカチオンを用いないMENDの従来型MENDに対する体内・細胞内動態の優位性

体内動態の面でポリカチオン無の MEND が有利であると考えられる点は、粒子径である。これまで用いてきた protamine/pDNA コアは、それ自体が 100 nm 程度のサイズを有するため、これを脂質エンベロープで封入すると、須らくそれ以上のサイズとなる。肝実質細胞へナノ粒子を送達するためには、肝類洞内皮のフェネストラと呼ばれる間隙を通過する必要があるが、フェネストラの大きさはマウスで 140 nm 程度、ヒトで 100 nm 程度[59]となっているため、100 nm を超える粒子径の粒子は、ヒトへ応用した際に、肝臓への到達率が大きく低下することが考えられる。ポリカチオン無の MEND は、コアの粒子径による粒子径制限が存在しないため、調製法の最適化によって 100 nm 以下の粒子を作製することが可能であると考えられる。

細胞内動態の面では、ポリカチオンを用いない MEND では、細胞質、もしくは核内において、DNA とポリカチオンを解離する段階(脱凝縮)が不要であるということが利点である。また、第二章の結果より、カチオン性脂質が遺伝子発現活性の持続性を妨げていることが示唆されたため、同じくカチオン性の分子であるポリカチオンが遺伝子発現に悪影響を与えている可能性も否定できない。

ポリカチオンを用いないパッケージングは以上のようにさまざまな利点が考えられるが、プラスミド DNA は分子量 100 万を超えるポリアニオンであり、分子内の電気的反発が大きいため、自然にコアのような構造をとるとは考えにくい。そのため、DNA を小さく折りたたみ、脂質エンベロープへ封入する方法の

検討が必要である。

3 - 2 ポリカチオンを用いないパッケージング法

まず、第 2 章と同条件で、DNA コアの代わりに naked pDNA を加え、調製を行った。その結果、protamine コア MEND と比較して粒子径の増大と封入率の低下が起こった(表 3-1 従来条件)。DNA は水溶性分子であることや、この組成で空のリポソームを作製した場合には 50 nm 程度の小さな粒子となる(data not shown)ことから、単純に DNA を含まないリポソームが形成された場合には、平均粒子径は空のリポソームとほぼ同等になることが予想される。また、30%程度の DNA は封入されており、粒子の多分散性の指標である PdI が大きくなっていることから、凝集した DNA が一部リポソームに封入され、空のリポソームと、凝集した DNA を封入した大きいリポソームという二種類の粒子が生成し、粒子分布がブロードになった可能性が示唆された。そこで、調製法について考察を行った。

第 2 章において示したエタノール希釈法の概念図を図 3-2 に再掲する。エタノール希釈法では、DNA コア水溶液と脂質のエタノール溶液を混合し、DNA コアの周辺に脂質を集合させ、それを希釈することによってリポソーム構造とする。ここで、希釈前の高濃度エタノール水溶液の段階(a)に着目した。DNA は水溶性が高い一方、エタノールへの溶解性は低い。そのため、この段階において DNA の少なくとも一部が析出している可能性が考えられる。

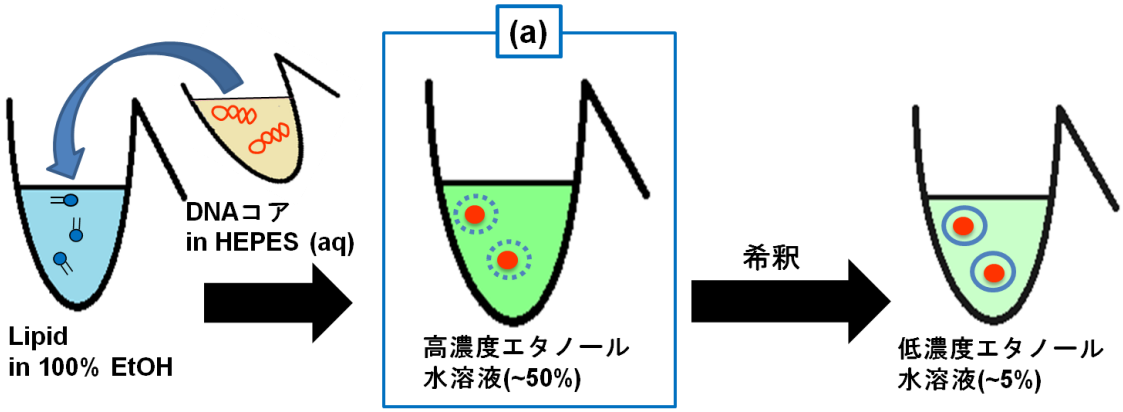


図3-3 エタノール希釈法の概念図

そこで、脂質を入れない条件で DNA 水溶液とエタノールを混合し、粒子径の測定を行った。その結果、平均粒子径が 200-300 nm 程度のブロードな分布の粒子が形成された(図 3-4a)。この結果より、確かに DNA が一部析出し、ナノ粒子化していることが示された。

次に、エタノール水溶液中で析出するナノ粒子の物性のコントロール方法の検討を行った。ここで、DNA を精製するための実験手法であるエタノール沈殿法

の原理を参考とした。核酸の水溶液にエタノールを 2 倍量程度加えても，核酸はほとんど沈殿しない．これは水溶液中でリン酸部分が解離して核酸が全体的に負電荷を帯びているので，核酸分子同士が静電的に反発して凝集しにくいためである。これに塩を加えると、陽イオンが DNA 分子間の静電的反発を中和し、他の DNA 分子と架橋様の構造を作ることにより沈殿させることができる。

一方、プラスミド DNA は数 kbp もの大きなポリアニオン分子であり、十分に低い濃度の DNA 溶液に塩とエタノールを加えた場合、陽イオンとの静電的相互作用による架橋構造の形成は分子間よりもむしろ分子内において優勢となると考えられる。これは DNA が小さく折りたたまれることを意味する。むろん、DNA 濃度が高すぎる場合や塩濃度が高すぎる場合には、DNA 分子間の架橋が起こって沈殿が起こると考えられる。つまり、DNA の分子内架橋を起こし、分子間の架橋を起こさないような最適条件(エタノール濃度、DNA 濃度、塩濃度)が存在すると考えられる。

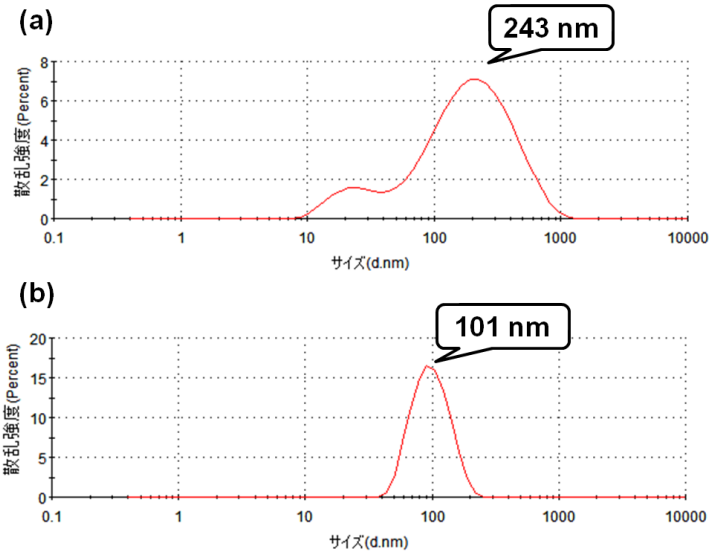


図3-4 エタノール水溶液中のDNA粒子径分布
(a)従来MEND調製時の条件(EtOH : water = 1 : 1, 0 mM NaCl
(b)最適化後の条件 (EtOH : water = 2 : 3, 10 mM NaCl)
プラスミドDNAとNaClの水溶液にエタノールを加え、5分以内にゼータサイザーを用いて粒子径の測定を行った。

そこで、エタノール水溶液中の DNA の粒子径・PdI を指標にこれらの条件のスクリーニングを行った。その結果、DNA 0.075 mg/mL、水とエタノールの混合比が 3：2、NaCl 濃度 10 mM において、DNA コアと同様の粒子径分布を有する粒子が得られた(図 3-4b)。

DNA 水溶液と脂質エタノール溶液の混合時に条件となるようにエタノール希釈法で MEND を調製した。その結果、封入率は大きく上昇し、平均粒子径と PdI の減少がみられた(表 3-1)。

	粒子径 (nm)	Polydispersity index	ζ電位 (mV)	封入率(%)
従来条件	194±35	0.33±0.13	-22±1	29±10
最適化後の条件	109±13	0.20±0.03	-11±3	54±11

表3-1 混合段階の条件最適化前後のMENDの物理化学的性質

そこで、この MEND を in vivo に応用したところ、遺伝子発現活性は平均すると protamine コアの従来型と比較して高い傾向があったが、再現性に乏しく、実験ごとに最大で 100 倍もの遺伝子発現活性の個体間変動が生じた(data not shown)。

これまで用いられていた HEPES は、protamine/pDNA コアの作製においては適したバッファーであったが、分解性を有し、MEND 調製時の酸性 pH ではバッファー能を持たないという問題点があった。DNA は pH が低下すると負電荷の量が減り、疎水性が増す性質を有する。DNA の疎水性が上昇すると、水よりも極性の低い溶媒であるエタノールへの溶解性が上昇すると考えられる。DNA のエタノールへの溶解性の上昇は、エタノール水溶液中における DNA のナノ粒子化や凝集を抑える方向に働くため、MEND 粒子の形成に大きく影響したと考えられる。そこで、分解性を有さず、酸性 pH において十分なバッファー能を有する酸性バッファーを用いることとした。

3-3 改良型 MEND の粒子径制御

ポリカチオンを有しない MEND において期待されることの一つが、粒子径が 100 nm 以下になることである。そこでまず、DNA のエタノール溶液中の粒子径で最適条件を探索した。その結果、いくつかの条件で 100 nm を下回る粒子が観測されたが、粒子径測定時間(~1 min)の間に粒子径が増大する現象がみられた。粒子径が小さいほど DNA の比表面積が増大し、粒子が不安定化したことが原因であると考えられる。

しかし、このような問題は、実際の調製過程で脂質を加えていることにより解決される可能性がある。エタノール希釈法の概念図(図 3-2)より、DNA 粒子の形成と脂質の集合はほぼ同時に起きると考えられる。DNA 粒子の凝集が脂質の集合よりも十分に遅い場合、DNA 粒子単体の不安定性は問題にならない可能性がある。

そこで、DNA 単体の粒子径を指標にすることは困難であると考え、MEND 調製時の封入率や粒子径で評価を行うこととした。その結果、以下のように条件を変更した。

10 mM HEPES, 10 mM NaCl

→ 13.3 mM Malate-NaOH buffer (pH 5.1, [Na+] = 20 mM)

MEND の粒子径は、PEG 修飾量が多いほど小さくなることが知られているため、PEG 10%の条件で実験を行った。その結果、DSG-PEG2000 において粒子径が最も小さく、良好な封入率の MEND が得られた(表 3-2) 。

	粒子径 (nm)	Polydispersity index	ζ電位 (mV)	封入率 (%)
DSG2k	78.12	0.102	-4.07	84
DSG5k	82.64	0.071	-2.91	79
DMG2k	100.3	0.183	-6.23	56
DMG5k	108	0.134	-4.49	64

表3-2 各種PEG修飾MENDの物理化学的性質

また、これらの MEND をマウスに尾静脈投与し、IVIS を用いて遺伝子発現活性を評価した結果、従来型の protamine コア MEND と比較してやや遺伝子発現活性が上昇し、PEG の種類による有意な遺伝子発現活性の差はみられなかった(図 3-5)。

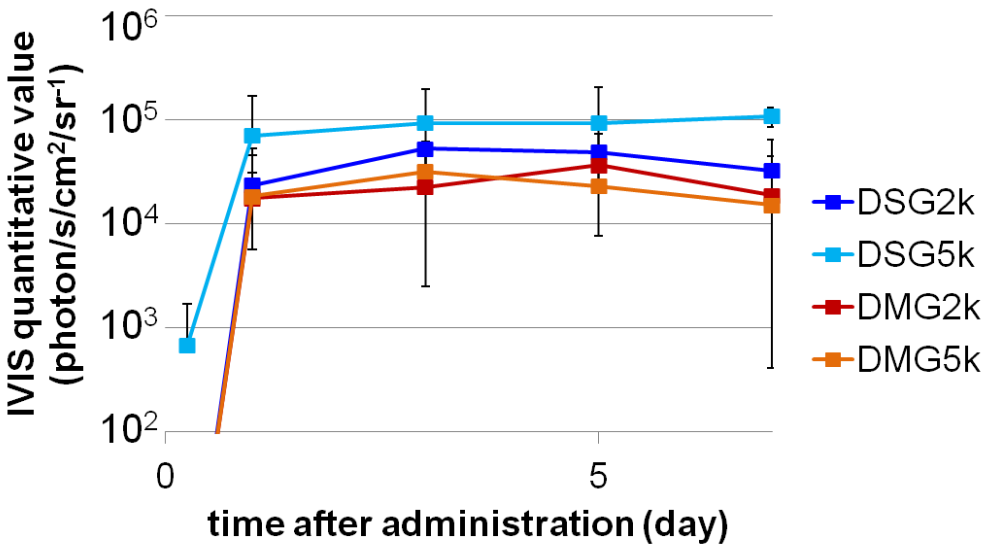


図3-5 各種PEG修飾MENDの遺伝子発現活性
ssPalmM : SOPC : Chol = 3 : 4 : 3の組成のMENDに各種PEGを10 mol%修飾した組成のMENDをマウスに投与し、IVISを用いて遺伝子発現活性を評価した。

DSG-PEG と DMG-PEG は、血中におけるリポソーム表面からの脱離性に大きく差があることが報告されていた[60]が、遺伝子発現活性には大きな差はみられなかった。PEG がリポソーム表面に修飾されていることは、血中安定性においてはプラスに、細胞内取り込みやエンドソーム脱出に対してはマイナスに働くため、これらの要因が互いに相殺し、PEG の種類によらず同程度の活性となったと考えられる。

また、粒子径も肝細胞への到達率に大きく影響するが、今回の 4 種の MEND では、最小の粒子径が 78 nm, 最大の粒子径が 108 nm であるため、マウスのフェネストラが 140 nm 程度であることから考えると、どちらも肝細胞への到達に支障がないと考えられる。ヒトのフェネストラは 100 nm 程度であることから、ヒトへ応用した際には肝細胞への到達率に差が生じ、遺伝子発現活性に大きな差が出る可能性があるが、マウスにおいて、粒子径の縮小による遺伝子発現活性の上昇を確認するのは難しいと考えられる。

そこで、本システムが遺伝子発現能において有用であることを示すため、粒子径の縮小ではなく遺伝子発現の向上を目的とした改良を行うこととした。

3-4 遺伝子発現活性の上昇を目指した MEND の改良

本 MEND の脂質組成において、遺伝子発現を向上させるための機能性素子は ssPalmM のみであるため、1 粒子あたりの ssPalmM 含量を増加させるために以下のような改良を行った。

脂質組成 ssPalmM：SOPC：Cholesterol = 3：4：3 → 6：3：1

DNA 溶液との混合段階における総脂質濃度 1.65 mM → 3.3 mM

その結果、protamine コアの従来型と比較して遺伝子発現活性が大きく上昇した(図 3-6a)。また、これらの MEND を投与したマウス肝臓におけるルシフェラーゼ発光の分布を IVIS で確認したところ、従来型 MEND ではマウス個体間の発光量のばらつきが大きく、肝臓の一部から発光がみられるのに対し、改良後の MEND では肝臓全体に発光が広がっていた(図 3-6b)。

	粒子径(nm)	Polydispersity index	ζ電位(mV)	封入率(%)
従来型(ポリカチオン有)	136 ± 12	0.28 ± 0.03	-0.4 ± 2.1	67 ± 5
改良型(ポリカチオン無)	134 ± 10	0.13 ± 0.01	-1.0 ± 1.1	66 ± 10

表3-3 従来型MENDと改良型MENDの物理化学的性質 n = 3, mean±SD

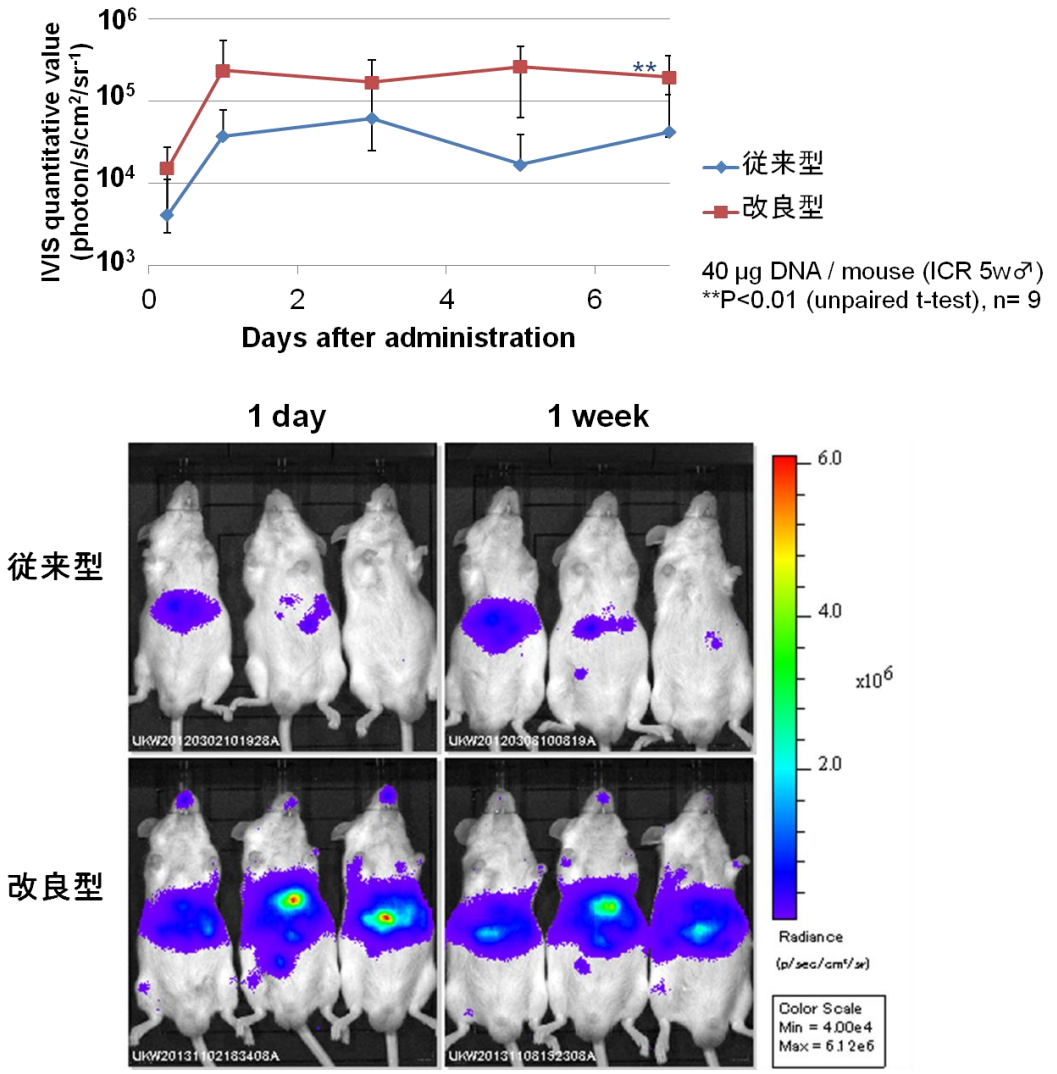


図3-6 改良型MENDと従来型MENDの遺伝子発現活性の比較
a) 発光量の時間依存性
b) MEND投与マウスのルシフェラーゼ発光分布
従来型MEND (第2章で用いたssPalmM-MEND)と改良型MENDの遺伝子発現活性をIVISを用いて比較した。

以上のように、ssPalmM の MEND への搭載量増加によって活性上昇がみられたことから、ssPalmM による改善が期待される細胞内素過程、すなわちエンドソーム脱出と細胞質における脱被覆のいずれか、もしくは両方において、従来型 MEND に改良の余地があったと考えられる。また、粒子径、ゼータ電位などの物理化学的性質は、従来型 MEND と改良型 MEND は極めてよく類似している(表 3-3)。このため、肝臓内における MEND 粒子の分布は同等になると予想され、肝臓内のルシフェラーゼ活性の分布が大きく異なるのは予想外のことで

あった。調製時脂質量が増加したことによって粒子の脂質膜が厚くなり、血中における安定性が増したことにより、肝臓の隅々まで粒子が到達できた可能性が考えられる。また、肝臓はヘテロな細胞集団であり、特定の細胞種で強い遺伝子発現活性が得られた場合に肝臓内分布が偏ることも考えられるため、今後、肝臓の実質細胞・非実質細胞における遺伝子発現量を分けて定量することも必要となると考えられる。

3-5 まとめ

第三章では、ポリカチオンを用いずに MEND を作製する方法を確立し、従来の protamine コア MEND よりも高い活性を得ることに成功した。

本章では、ヒトへの応用に適した 100 nm 以下の粒子径の MEND と、高い遺伝子発現活性を得ることを目的とした MEND の二種類を開発した。しかし、臨床応用を目指すためには、小さな粒子径と遺伝子発現活性を両立させる必要がある。このたび、DSG-PEG2000 を 10 mol%修飾した MEND において粒子径の縮小に成功したが、PEG 修飾量が過剰であると、細胞内動態に悪影響を与える。そのため、PEG、特に粒子表面から脱離しにくい DSG-PEG 修飾量を増加させること以外の方法で粒子径を制御することが必要となると考えられる。また、ssPalmM の修飾量を増加させると粒子径が増大するため、他の機能性素子によって遺伝子発現活性の上昇を図る必要があることも示唆された。

遺伝子発現活性上昇は総脂質量や ssPalmM を増加させる戦略によって達成されたが、これは従来型 MEND において、エンドソーム脱出や遺伝子の脱被覆、もしくは血中における安定性において改良の余地が存在したことを示している。このたびの改良においては、総脂質量、ssPalmM の総脂質量に対する比の最適化を行い、総脂質量や ssPalmM の搭載量が過剰であると遺伝子発現活性が低下することも確認している(Data not shown)。これは、ssPalmM や総脂質量が過剰であると MEND の物理化学的性質を損なうことが原因であると考えられ、ssPalmM 搭載量が細胞内素過程の改善に十分な量であることを意味するものではない。このため、ssPalmM が改善しているエンドソーム脱出などの細胞内素過程を他の機能性素子によって補強することにより、さらに遺伝子発現活性を増強することは可能であると考えられる。

以上のように ssPalmM-MEND はいまだ改良の余地があり、さらに強力な遺伝子ベクターとなることが期待される。

総括

本研究では、MEND を用いた肝臓での効率的な遺伝子治療の実現を目指し、遺伝子送達研究に取り組んだ。従来の人工遺伝子ベクターはアニオン性の細胞膜・エンドソーム膜との相互作用を意図してカチオン性表面のものが多かった。しかしカチオン性ベクターは、血中における凝集性、臓器選択性の乏しさなどの問題点を有していた。

第一章では、本研究室において in vivo 肝臓で高い遺伝子発現活性が得られていた中性電荷のベクターである MPC/GALA-MEND について、MPC ポリマー修飾による細胞内動態改善メカニズムの検討を行った。その結果、細胞内取り込み、遺伝子の脱被覆、核移行後遺伝子発現効率について MPC ポリマーによる改善がみられた。それ自身は中性の電荷を有する MPC ポリマーの修飾により GALA 修飾 MEND のゼータ電位の低下がみられたことから、MEND 表面における GALA のトポロジーが MPC ポリマーによって変化したことが示唆された。その結果、GALA の膜融合活性が上昇し、エンドソーム脱出に伴う脱被覆が促進し、細胞質に放出される脂質成分が減少したことにより、核移行後の遺伝子発現の阻害が抑制されたと考えられる。細胞内取り込みの上昇は、MPC ポリマーそれ自身の細胞膜透過性によることが示唆された。これは遺伝子発現活性の向上には寄与したが、肝細胞に特異的ではない経路を介した細胞内取り込みを促進していることも示唆しているため、前述のカチオン性脂質の問題点の一つである臓器選択性の改善には役立たなかったと考えられる。

第二章では、pH 応答性脂質様物質（ssPalmM-MEND)を用いて中性電荷の MEND を作製した。このとき、人工遺伝子ベクターのもう一つの弱点である遺伝子発現持続性の乏しさを克服するため、分子内に非メチル化 CpG 配列を含まないプラスミド DNA（CpGfree-Luc)を封入した。その結果、第一章の MPC/GALA-MEND や、本章において比較対象として用いたカチオン性 MEND の R8/GALA-MEND では、CpGfree-Luc を封入した場合でも遺伝子発現活性の持続はみられなかったが、ssPalmM-MEND を用いた場合には遺伝子発現活性が 2 週間程度持続した。一方、CpG 配列を含むプラスミド DNA(pcDNA3.1(+)-Luc)では ssPalmM-MEND を用いた場合でも持続性はみられなかった。これらのプラスミド DNA を封入した ssPalmM-MEND の持続時間は、それぞれ類似した構造のプラスミド DNA をハイドロダイナミクス法で投与した場合の持続時間の報告とほぼ一致しており、ssPalmM-MEND はプラスミド DNA の遺伝子発現持続能を阻害しない担体として有用であることが示唆された。また、遺伝子発現の持続性をもたない MEND を投与した場合でも、肝

臓内遺伝子量は持続性を有する MEND と有意な差はなく、免疫反応を介したサイレンシングが起きていることが示唆された。非メチル化 CpG 配列による TLR9 を介した免疫反応によるサイレンシングは比較的研究が進んでいるが、カチオン性成分によるサイレンシングについてはいまだ不明な点が多く、今後のベクター開発にとって、このサイレンシング機構の解明も重要であると考えられる。

第三章では、第二章で構築した ssPalmM-MEND の改良を行った。改良戦略として、ポリカチオンを用いずにパッケージングを行うこととした。第二章において、カチオン性成分が遺伝子発現のサイレンシングに関わっていることが示唆されたほか、DNA/ポリカチオンから成るコアのサイズが MEND のサイズを制限し、ヒト肝類洞血管内皮のフェネストラの通過に支障が生じるおそれがあるからである。第二章の MEND 作製に用いたエタノール希釈法において、DNA が不溶となるエタノール濃度を経ることを利用した。本エタノール濃度における塩濃度を調整し、不溶化した DNA の粒子径を制御することによって ssPalmM 脂質エンベロープに封入することに成功した。また、脂質組成を変化させることにより、ヒトへの適用に適した 100 nm 以下の MEND や、従来の protamine コア MEND よりも 10 倍程度遺伝子発現活性の高い MEND を作製することに成功した。しかし、将来的に臨床応用を行う際、小さな粒子径と高い遺伝子発現活性は両立させなければならない。

第三章のポリカチオンを用いない ssPalmM-MEND をベースに改良を行う時、以下のような改良戦略が考えられる。一つは、pH 応答性脂質様物質の改良を行うことである。ssPalmM を多く搭載した MEND では遺伝子発現活性が増加する一方、粒子径は増大する。修飾率を増やしても脂質エンベロープの曲率に影響が少ない物質であればこの問題は解決されると考えられる。

もう一つの戦略は、核移行過程の改善である。当研究室において、遺伝子の核移行量と遺伝子発現効率の関係に正の非線形性が認められることが報告されている。また、核移行した遺伝子量のみならず、核内へ移行した時の遺伝子の局在も重要となると考えられる。核内には、転写活性化領域であるユークロマチン領域と転写不活性化領域であるヘテロクロマチン領域があることが知られている[61]。ユークロマチン領域は核膜孔付近に存在するため、アデノウイルスは核膜孔を通過して核移行することが非ウイルスベクターよりも遺伝子発現活性が高い原因の一つと考えられている[27, 62]。また、遺伝子発現が持続するか否かを決定しているのは核移行後の過程であると考えられるため、核移行の様式によって遺伝子発現の持続性に影響が生じる可能性も考えられる。

また、第二章の DNA 定量の結果より、ssPalmM-MEND の投与 6 時間後の遺伝子量は、R8/GALA-MEND と比較して 1/10 程度であり、細胞内取り込み量が

カチオン性 MEND と比較して少ないことが示唆された。よって、肝細胞への取り込みを増加させる戦略が必要である。この時、細胞種非特異的に取り込みを上昇させる物質を用いると臓器選択性が損なわれるおそれがあるため、肝細胞特異的なリガンドの修飾が有効である可能性がある。

最後に、ssPalmM-MEND を遺伝子治療に応用する際には治療遺伝子を搭載することとなるが、この時の遺伝子の選定には注意が必要である可能性がある。肝疾患の代表的なものにウイルス性肝炎や肝がんがあるが、これらの疾患では、サイトカインをはじめとした免疫に関わるタンパク質がしばしば治療に用いられる。第二章の結果より、遺伝子発現の持続性を免疫反応が阻害している可能性が示唆されたため、例えばサイトカインを発現する遺伝子を ssPalmM-MEND のシステムで用いた場合、自らの遺伝子産物によって効果が減弱する可能性が考えられる。このため、サイトカイン産生と MEND の一過性遺伝子発現の因果関係について今後、評価する必要があると考えられる。

結語

本研究において、中性電荷の MEND を用いた肝臓への効率的な遺伝子送達研究に取り組んだ結果、以下の知見を得た。

1) MPC ポリマーと GALA を組み合わせることにより、MEND の効率的な脱被覆を引き起こし、遺伝子発現活性の上昇が起きることを見出した

2) ssPalmM を含む中性電荷の MEND に CpGfree プラスミド DNA を封入することにより、遺伝子発現活性を 2 週間程度持続させることを可能とした

3) ポリカチオンを用いずに ssPalmM-MEND を作製する方法を確立し、脂質組成の最適化を行うことにより、肝臓における遺伝子発現活性を大きく上昇させることに成功した。

本研究で得られた知見が、人工遺伝子ベクターの発展、さらには将来の遺伝子治療の実現の一助となることを期待し、本稿を終える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室教授・原島秀吉先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室准教授・秋田英万先生に心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益なるご助言や実験手技のご指導を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院未来創剤学研究室助教・林泰弘先生に心から感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御教示・御指導と有益なる御助言を賜りました、愛媛大学大学院理工学研究科環境機能科学専攻分析化学研究室教授・紙谷浩之先生、ならびに北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室助教・山田勇磨先生、同助教・中村孝司先生、北海道大学大学院薬学研究院未来創剤学研究室特任准教授・梶本和昭先生、同特任助教・畠山浩人先生、兵藤守先生、櫻井遊先生に深く感謝いたします。

MPC ポリマーをご供与頂きました東京大学工学系研究科教授・石原一彦先生に深く感謝申し上げます。

本論文を審査していただき、貴重なご指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室教授・前仲勝実先生、並びに同准教授・尾瀬農之先生に深く感謝いたします。

動物実験に用いるマウスを世話していただき、また温かい励ましを賜りました、北海道大学薬学部動物舎の横山継育殿、細川千晶殿に深く感謝いたします。

研究生活を送る上で同期として苦楽を共にしてきた、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室・田丸みな修士、安崎友香理修士、佐藤悠介修士、山内順修士に深く感謝いたします。

研究生活を送る上で、様々な面で支えていただきました、北海道大学大学院薬学い研究院薬剤分子設計学研究室の先輩、同期、後輩に心から感謝いたします。

最後になりましたが、これまで私を支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。

実験方法

1. 使用した試薬・機器

1. プラスミド調製関連

本研究におけるプラスミド DNA は、pcDNA3.1(+)-luc および pCpGfree-luc を用いた。これらプラスミド DNA は、当研究室で構築されたものを使用した。アンピシリンナトリウムは和光純薬工業株式会社より、Zeocin は Invitrogen より、Endofree Plasmid Giga kit は QIAGEN より、アガロース S は株式会社ニッポンジーンより、Bacto Tripton および Bacto Yeast Extract は Becton-Dickinson より、EcoRV、BglⅡ、NcoI は東洋紡績株式会社から購入した。

2. 遺伝子キャリア調製関連

DOTAP、DOPE、Cholesterol、Rhodamine-DOPE、NBD-DOPE は AVANTI POLAR LIPIDS より、ssPalmM、SOPC および DSG-PEG_{2000} は日油株式会社より、STR-PEG_{2000} は和光純薬株式会社より、脂質薄膜調製用試験管(P TYPE TEST TUBE/P12-M)は日電理化硝子株式会社より、HEPES は同仁化学研究所より、Protamine sulfate は CALBIOCHEM より、Chol-GALA (Purity >41%) は Neo MPS, Inc.より購入した。MPC ポリマー(PMB50)およびその蛍光標識体は、東京大学大学院工学系研究科の石原一彦先生より提供していただいたものを使用した。限外ろ過の際には、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membrane を用いた。

3. 細胞培養・顕微鏡観察関連

Label IT CX-Rhodamine Labeling kit はタカラバイオ株式会社より、NBD-DOPE は AVANTI POLAR LIPIDS より、fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Griffonia simplicifolia lectin isolectin B4 は Vector Laboratories より、DMEM、 L-glutamine, Lysotracker Blue は Invitrogen より、Hoechst33342 は同仁化学研究所より、GELATIN は関東化学株式会社より、William's E medium は SIGMA より、 Collagenase は和光純薬株式会社より、Trypsin inhibitor は SIGMA より購入した。FBS は Hyclone より購入した。ペニシリン G カリウムは萬有製薬株式会社より、硫酸ストレプトマイシンは明治製菓株式会社より購入した。細胞培養用 dish およびコニカルチューブは Falcon より、6-well plate, 24-well plate は CORNING より、35 mm Glass base dish は IWAKI より購入した。

4. DNA の抽出・定量関連

Cellscrub buffer は Gene Therapy system より、IGEPAL CA 630、GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep kit は SIGMA より、Sepagene はエーディアより、SYBR Green Realtime PCR Master Mix は東洋紡績株式会社より、MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate および Optical Caps は Applied Biosystems より購入した。

使用したプライマーの配列を以下に示す。

【第一章の実験】

Luciferase upper： 5’-GGTCCTATGATTAATGTCCGGTTATG-3’
Luciferase lower： 5’-ATGTAGCCATCCATCCTTGTCAAT-3’
β-actin upper： 5’-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3’
β-actin lower： 5’- CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3’

【第二章の実験】

pcDNA3.1(+)-Luc 用のプライマーは第一章と同じものを用いた。CpGfree-Luc 用のプライマーは以下の配列のものを用いた。

Luciferase upper： 5’-AGTGGTGCTGATGTATAGGTTTG-3’
Luciferase lower： 5’-CTTGGCAAAGAAGCTGAACAGAG-3’

5. 遺伝子発現活性の測定関連

Reporter Lysis buffer、Luciferase Assay substrate、VivoGlo™ Luciferin, in vivo grade は Promega より、BCA protein assay kit は PIERCE より、セルスクレイパーは IWAKI より、ルシフェラーゼ活性測定用チューブはアシストより購入した。

その他の試薬は特に記述のない限り、市販の特級および一級のもの、またはそれに準ずるものを使用した。

6. ELISA 関連

TNF-α、IL-12p70、IFN-γ の血清中濃度は、R&D systems 社の以下のキットを用い、添付のプロトコールに従って測定した。

・Quantikine® Mouse TNF-α Immunoassay
・Quantikine® Mouse IL-12 p70 Immunoassay
・Quantikine® Mouse IFN-γ Immunoassay

7. 使用機器

大腸菌培養には Bioshaker BR-11UM (TAITEC)および Microincubator M-36 を使用した。

細胞培養のための CO_2 インキュベーターは BNA-111 (ESPEC)もしくは 5400 (NAPCO)を用いた。

遠心機は MX-200 (TOMY)、himac CF7D2 (日立工機)を用いた。

超高速冷却遠心機は CR22E [ローター:#RPR9-2-537(500 mL プラスチック瓶)、#R12A2 (50 mL コニカルチューブ)]を用いた。

動物を用いたルシフェラーゼ活性のイメージングには、IVIS ® Lumina II を用いて行い、付属の解析ソフトである Living Image® 4.1 を用いて解析を行った。

超遠心機は Optima™ L-90K Ultracentrifuge [ローター : Sw41Ti] (Beckman Coulter)を使用した。

脂質膜の調製には、ポンプ DIVAC1.2, トラップ EYELA UNI TRAP UT-1000 を用いた。

ルミノメーターは Luminescenser AB-2200 (ATTO)を使用した。

サンプルのインキュベーションには MULTI REACC MR-40(和科盛商会)を使用した。

サンプルの加熱処理には MULTIHEATER TYPE MH-36 (和科盛商会)を使用した。

定量的 PCR には、ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems)を使用した。

Bath type ソニケーターは AU-25C (アイワ医科工業)を使用した。

粒子径・ζ 電位の測定には Zetasizer Nano ZS (Sysmex)を用いて行った。

顕微鏡観察(第一章)には、Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss)、対物レンズ Plan-Apochromat 63×/NA 1.4 Oil(DICⅢ)を用いた。

in vivo イメージングには、Nikon A1 (Nikon)、対物レンズ Plan Apo VC 60x WI DIC N2 を用いた。

アガロースゲル電気泳動には Mupid®-2x (タカラバイオ)を用い、ゲルの写真撮影には GelDoc EZ Imager (BIORAD)を用いた。

2. 試薬調製

LB 培地：

Bacto Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, NaCl 5 g, 1N NaOH 1.25 mL を DDW 1 L に溶解し、高圧蒸気滅菌を行った。

PBS (-)：

ダルベッコ PBS (-) 4.8 g を DDW 500 mL に溶解し、高圧蒸気滅菌を行った。

0.1% GELATIN in PBS

ダルベッコ PBS (-) 4.8 g, 0.5 g GELATIN を DDW 500 mL に溶解し、高圧蒸気滅菌を行った。

20 U / mL Heparin in PBS

PBS (-)に Heparin を 20 U/mL となるように加え、4℃で保存した。

IGEPAL buffer (4×)

2% IGEPAL CA 630、40 mM NaCl、12 mM MgCl、40 mM Tris (pH 7.4/HCl)

DMEM (Antibiotics+)

DMEM 29.94 g, ペニシリン G 50 mg, 硫酸ストレプトマイシン 0.3 g, NaHCO3 11.1 g / 3 L DDW (4℃保存)

DMEM (FBS+)

DMEM (Antibiotics+) 450 mL/非働化 FBS 50 mL

0.5% トリプシン/ 5 mM EDTA 溶液

2.5%トリプシン、EDTA・2Na・2H_2O 0.19 g、NaCl 0.63 g、NaH_2PO4・2H_2O 0.19 g / DDW 100 mL

HEPES buffer (10 mM, pH 7.4)

HEPES 119 mg を DDW 40 mL 程度に溶解し、1N NaOH で pH 7.4 とした後、50 ml にメスアップし、フィルターろ過滅菌を行った。

1×HEPES buffer (5 mM)

HEPES 596 mg、NaCl 3.945 g、KCl 201 mg、$MgCl_2$・6H_2O 102 mg、$CaCl_2$・

$2H_2O$ 132 mg を DDW 500 mL に溶解し、1 N NaOH で pH 7.3 とした後、クリーンベンチ内でフィルターろ過滅菌を行った。また、使用時に Glucose を 10 mM となるように加えた。

脂質溶液
脂質を少量の $CHCl_3$ に溶解した後、目的濃度になるように EtOH で希釈した。なお、エタノール希釈法による MEND のパッケージングに供した際は、MEND 溶液への $CHCl_3$ の残留を防ぐため、EtOH のみで溶解した。
Pre-perfusion buffer
137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.50 mM $NaHPO_4$, 0.42 mM $NaHPO_4$, 4.17 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.51 mM EDTA･2Na, 5.0 mM Glucose

Collagenase Buffer (-)
137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.50 mM $NaHPO_4$, 0.42 mM $NaHPO_4$, 4.17 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES

Collagenase Buffer (+)
6.67 mM $CaCl_2$, 0.5 mg/ml collagenase, 0.05 mg/ml trypsin inhibitor
in collagenase buffer (-) (pH 7.5/NaOH)

William's E medium (+)
William's E medium 450 mL, 非働化 FBS 50 mL, insulin 1 nM, dexamethasone 1 nM, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μg/mL, L-glutamine 2 mM

DNA 抽出用 buffer
0.25 M スクロース、3 mM Tris, 0.1 mM EDTA･2Na となるように各試薬を加え、HCl で pH 7.4 とした。

in vivo 用 lysis buffer
0.1% Triton-X100, 2 mM EDTA･2Na、0.1 M Tris となるように各試薬を加え、HCl で pH 7.8 とした。

TBE ストック溶液
2,2,2-tribromoethanol (1g) を 2-Methyl-2-butanol (1ml) で溶解し、4℃で保存した。

3. 第一章・実験方法

1) プラスミド DNA (pcDNA3.1(+)-Luc)の大量調製

(a) 大腸菌の培養・DNA の精製

LB 培地に対し、アンピシリンを 20 μg/mL となるように加えた培地(LB 培地(+amp))を用いた。pDNA (pcDNA3.1(+)-luc)を含む大腸菌ストックを LB 培地(+amp)に混ぜたのち 37℃で半日振とう培養した。半日振とうした培養液 7 mL を 2.5 L の LB 培地(+amp)に加え、37℃で一晩振とう培養した。

一晩振とうした培養液をプラスチック瓶 2 本に 500 mL ずつ移し、6000 rpm、4℃で 15 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit のプロトコルに従い、精製した。

(b) プラスミド DNA の定量

260 nm、280 nm、320 nm の吸光度を測定することにより、DNA の純度および濃度を以下の式より算出した。

$$\text{DNA 純度} = A_{260} / A_{280}$$

$$\text{DNA 濃度} = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{希釈倍率} \div 1000$$

(c) 制限酵素処理

調製した pDNA を、制限酵素 NcoI で処理することにより、目的のプラスミド DNA が得られていることを確認した。

1 サンプルにつき、0.5 mg/mL に希釈した pDNA 1 μl、Nco I or 滅菌水 1 μl、10×H Buffer 1 μl を滅菌水 7 μl に加え、37℃で 2 h インキュベーションした。このサンプルに Loading dye を加えて、1 %アガロースゲルを用いてアガロースゲル電気泳動を 15 分間行い、エチジウムブロマイド染色したゲルの泳動写真を撮影した。

2) MPC/GALA-MEND の調製

(a) Core の作製

pDNA (pcDNA3.1(+)-luc)溶液を 0.1 mg/mL、protamine 溶液を 0.067 mg/mL になるように HEPES buffer (pH 7.4)で希釈し、vortex しながら protamine 溶液を pDNA 溶液に滴下した。(N/P = 1.0)

(b) MEND の作製

5 mM DOTAP、1 mM Cholesterol、10 mM STR-PEG_{2000} を、DOTAP : Chol : STR-PEG_{2000} = 3 : 6 : 1, 脂質終濃度が 0.55 mM になるように試験管に添加し、

1 mM Chol-GALA を総脂質量の 2%になるように加え、$CHCl_3$ を加えて全体量を 250 μl にし、デシケーターで減圧乾燥を行い、Lipid film を作製した。

この Lipid film に、①で作製した Core を 250 μl 添加し、10 分間水和させた後、40 秒程度バス型ソニケーターで超音波処理を行った。

(c) MPC ポリマーの修飾

(b)で作製した MEND 溶液に対し、0.2 (w/v) %となるように PMB50 の溶液を加え、vortex を行った後、30 分間静置した。

3) マウス肝プライマリー細胞の採取

50 mg/mL ネンブタールを生理食塩水で 5 倍希釈した溶液を 5～8 週齢の ICR マウス♂に 200 μl 腹腔内投与して麻酔した。開腹して門脈に針を入れて固定し、約 10 分間 pre-perfusion buffer を用いて灌流し、約 7 分間 Collagenase buffer を用いて灌流を行った後、肝臓を摘出した。

DMEM (serum－, antibiotics+)中で解剖用ハサミを用いて肝臓を細かく裁断し、cell strainer (70 μm BD Falcon)で細胞を濾した。4℃, 50 g, 1 min で遠心操作を行い、沈殿物を新しい DMEM で懸濁する操作を 3 回行い、最後の遠心の後に William's E medium (+)で細胞を懸濁し、セルカウントで細胞数と細胞生存率を測定した。細胞懸濁液は、4℃に保存した。

細胞を播種する予定の dish を DMEM と PBS で wash し、0.1% GELATIN in PBS を入れて(24-well plate では 250 μl/well, glass-base dish では 2 mL/dish) 37℃ CO_2 インキュベーター内で 40 分程度静置した。ゼラチン溶液を除去し、目的濃度に希釈した細胞溶液を dish に播種し、37℃ CO_2 インキュベーター内で培養を行った。

約 3 時間後、PBS で wash して死細胞を除き、新しい William's E medium (+) を加えて CO_2 インキュベーター内で培養を行った。

4) MEND の Transfection (24-well plate)

Transfection の 24 時間前に、2×10^4 cells/well でマウス肝プライマリー細胞を 24-well plate に播種し、その 3 時間後に medium change を行って張り付かなかった細胞を除去した。

MEND 溶液を 250 μl William's E medium (+10% FBS, antibiotics－)に溶解し William's E medium で 1 回 wash した後、各 well に添加した。(0.4 μg / well)

3 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、William's E medium (+)を 250μl 添加した。

MEND を添加してから 24 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、lysis buffer

(1×)を 75μl 添加し、-80℃保存した。

cell scraper を用いて細胞を剥がし、サンプルチューブに回収して 15,000 rpm, 4℃, 2 min で遠心して上清をとり、これを遺伝子発現活性測定用のサンプルとした。

5) 遺伝子発現活性の測定

サンプル溶液 20 μl と Luciferase assay substrate (Promega)溶液 50 μl を混合し、20 μl あたりのルシフェラーゼ活性(RLU)を Luminescenser-PSN (AB2200 ATTO)により測定した。

また、サンプル中のタンパク質濃度を、BCA protein assay kit を用いて定量し、遺伝子発現活性を RLU / mg protein として測定した。

6) 細胞内・核内 DNA 量の測定

(a) MEND の Transfection

Transfection の 24 時間前に、1×10^5 cells/well でマウス肝プライマリー細胞を 6-well plate に播種し、その 3 時間後に medium change を行って張り付かなかった細胞を除去した。

MEND 溶液を 1.25 mL William's E medium (+10% FBS, antibiotics－)に溶解し William's E medium で 1 回 wash した後、各 well に添加した。(2.0 μg / well)

この際に、同じサンプルを 2 つの well に Transfection し、一方を細胞内遺伝子量の定量、もう一方を核内遺伝子量の定量に用いることとした。

3 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、William's E medium (FBS+, insulin+, dexamethasone+, antibiotics+)を 2 mL 添加した。

MEND を添加してから 24 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、20U Heparin in PBS で 2 回 wash し、0.02%トリプシン 700 μl を加え、2 分間インキュベーションした。

各 well に DMEM(+) 800 μl を加え、氷上にてサンプルチューブに回収し、このうち DNA 抽出用を 1200 μl、ルシフェラーゼ測定用を 300 μl とした。

DNA 抽出用のサンプルは、3,000 rpm, 4℃, 3 min で遠心して細胞を沈殿させ、ペレットをヘパリン溶液で再懸濁し、再び遠心する操作を 2 回繰り返した。

(b) 細胞からの核単離

核抽出用のサンプルに対し、cellscrub buffer 250 μl を加えて vortex を行い、4℃で 30 分間振盪を行った後、4℃, 10,000 rpm, 2 min で遠心分離し、上清を除去した。Cellscrub buffer 375 μl を添加して懸濁させた後、IGEPAL buffer (4×) 125 μl を加えて転倒混和した。4℃, 10,000 rpm, 2 min で遠心分離し、上清

を除去した後、再び Cellscrub buffer 375 μl を添加して懸濁させた後、IGEPAL buffer（4×）125 μl を加えて転倒混和した。この懸濁液を 4℃, 10,000 rpm, 2 min で遠心分離し、上清を除去した後、同じ操作を再度繰り返した。こうして得られたペレットを核画分とした。

(c) DNA 抽出

細胞画分および核画分より、GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit を用いて添付の方法に従い、DNA を抽出した。この際、DNA は滅菌水に溶解させる形で抽出した。

(d) Real-time PCR 法による DNA 定量

SYBR Green 法に基づいた絶対定量法を用いて、細胞画分および核画分から抽出した DNA 中の Luciferase 遺伝子量を定量した。

抽出した total DNA 5 μl に滅菌水を加え、全量を 11.5 μl とした。この DNA 溶液に対し、10 μM Upper primer 0.5 μl、10 μM Lower primer 0.5 μl、SYBR Green Master Mix 12.5 μl を添加し、混合した後、95℃、10 min で初期変性を行った後、95℃、30 min の PCR 変性反応、60℃、1 min のアニーリング/伸長反応を 1 サイクルとして 40 サイクル PCR 反応を行った。pDNA 量は、既知量の pDNA を用いて検量線を作成することで算出した。また、β-actin 遺伝子量を定量することで、細胞数の補正を行った。この際、既知量のマウス肝プライマリー細胞より抽出した DNA を基に検量線を作成することで、細胞数を算出した。算出した細胞内 pDNA 量および核内 pDNA 量を細胞数で除することで、1 細胞あたりの細胞内 pDNA 量および核内 pDNA 量として評価に用いた。

7) プライマリー細胞を用いた顕微鏡観察 (エンドソーム脱出効率の評価)

Transfection の 24 時間前に、5×10^4 cells/dish でプライマリー細胞を 24 well plate にまき、その 3 時間後に medium change を行って張り付かなかった細胞を除去した。

MEND 溶液(NBD-DOPE 1%, MPC+では MPC 修飾量の 20%を Rho-MPC に置換)を 1 mL William's E medium (+10% FBS, antibiotics－)に溶解し William's E medium で 1 回 wash した後、各 well に添加した。

2 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、William's E medium (+)を 2 mL 添加した。

観察の 30 分前に medium の 1/1000 量の Lysotracker Blue を添加した。

MEND を添加してから 6 時間後、各 dish を 1×HEPES buffer で wash し、2 mL の 1×HEPES buffer を入れて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

8) プライマリー細胞を用いた顕微鏡観察 (decoating 効率)

Transfection の 24 時間前に、5×10^4 cells/dish でプライマリー細胞を 24 well plate にまき、その 3 時間後に medium change を行って張り付かなかった細胞を除去した。

MEND 溶液(NBD-DOPE 1%, Rho-DNA)を 1 mL William's E medium (+10% FBS, antibiotics－)に溶解し William's E medium で 1 回 wash した後、各 well に添加した。

2 時間後、各 well を PBS(-)で wash し、William's E medium (+)を 2 mL 添加した。

観察の 10 分前に medium を PBS 1mL に換え、5 μl の Hoechst33342 を添加した。

MEND を添加してから 6 時間後、各 dish を 1×HEPES buffer で wash し、2 mL の 1×HEPES buffer を入れて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 第 2 章・実験方法

1) プラスミド DNA (pCpGfree-Luc)の大量調製

LB 培地に対し、Zeocin を 40 μg/mL となるように加えた培地(LB 培地(+zeo))を用い、第一章の pcDNA3.1(+)-Luc と同様の手順で大腸菌の培養・DNA の精製を行った。

また、目的 DNA の確認に用いた酵素は、EcoRV と BglⅡを用い、DNA 量の定量は pcDNA3.1-Luc と同様の方法で行った。

2) 単純水和法を用いた R8/GALA-MEND の作製

(a) Core の作製

pDNA 溶液を 0.1 mg/mL、PEI 溶液を 0.062 mg/mL になるように HEPES buffer (pH 7.4)で希釈し、vortex しながら PEI 溶液を pDNA 溶液に滴下した。(0.125 μg/μL DNA, N/P = 1.5)

(b) MEND の作製

10 mM DOPE、1.3 mM STR-R8、1 mM Chol-GALA を、8.5∶2∶0.5 の比で、脂質終濃度が 0.625 mM になるように試験管に添加し、EtOH を加えて全体量を 250 μl とした。なお、脂質エンベロープの Rhodamine ラベルを行う際には、この脂質溶液に Rhodamine-DOPE を総脂質量の 1 mol%となるように加えた。脂質溶液をデシケーターで減圧乾燥後、EtOH∶$CHCl_3$ = 1∶1 の混液 200 μL を加えて再乾燥し、Lipid film を作製した。

この Lipid film に、①で作製した Core を 250 μl 添加し、10 分間水和させた後、40 秒程度バス型ソニケーターで超音波処理を行った。

3) エタノール希釈法を用いた ssPalmM-MEND の作製

(a) Core の作製

pDNA 溶液を 0.3 mg/mL、protamine 溶液を 0.235 mg/mL になるように酸性 HEPES 溶液 (pH ~5.3)で希釈し、vortex しながら protamine 溶液を pDNA 溶液に滴下した。(N/P = 1.2)

(b) MEND の作製

10 mM ssPalmM, 10 mM SOPC, 10 mM Cholesterol を、脂質終濃度 1.65 mM, PalmM∶SOPC∶Cholesterol = 3∶4∶3 となるようにエタノールに溶解し、総脂質濃度の 3 mol%の 5 mM DSG-PEG_{2000} を加えた。マウス 1 匹につきこの溶液 350 μL を作製した。脂質エンベロープの Rhodamine ラベルを行う際には、こ

の脂質溶液に Rhodamine-DOPE を総脂質量の 1 mol%となるように加えた。この溶液を Vortex しながら 1)で作製した等体積の Core 溶液を一気に加え、この混合液を 9 倍量(マウス 1 匹分につき 6.3 mL)の酸性 HEPES 溶液に一気に加えることによって希釈した。この時、9 倍量 HEPES 溶液を vortex しながら操作を行った。この溶液を Amicon® Ultra-15 を用いて限外ろ過を行い、100 mM HEPES buffer (pH 7.4)で限外ろ過前の体積までメスアップした。これを再度限外ろ過し、10 mM HEPES buffer で 0.15 μg/μL となるようにメスアップした。

3) マウス肝臓の in vivo イメージング

TBE ストック溶液を滅菌水で 20 倍希釈し、400 μL 程度マウスの腹腔内に投与した。麻酔下において、10 mM HEPES buffer で 4 倍希釈した FITC ラベル isolectin を 200 μL 尾静脈投与した。その後、マウスの腹部を小さく開き、肝臓を一部露出させた。尾静脈に翼状針を置針し、糸で固定した。顕微鏡のレンズ上に吸引デバイスを設置し、その上にマウスをうつぶせに置き、肝臓を軽く吸引して固定した。置針した翼状針に MEND 溶液(1% Rhodamine 修飾)を満たしたシリンジを接続し、動画の撮影を開始した後にシリンジを押して投与を行った。動画の撮影は 10 分間程度行った。

4) IVIS を用いた遺伝子発現活性持続性の評価

マウスにエスカインで吸入麻酔を行い(2～2.5%)、Luciferin, in vivo grade を 3 mg / 200 μL Saline / mouse で腹腔内投与した。同じ MEND を投与したマウス 3 匹を一度に測定し、露光時間は 1 分とした。この際、マウスにルシフェリンを投与してから測定するまでの時間が 2 分から 10 分までの間となるようにした。得られた画像は付属の解析ソフト LivingImage®4.1 を用いて解析した。

5) 臓器ホモジネートを用いた遺伝子発現活性評価

マウスから肝臓・肺・脾臓を摘出し、ハサミで細かく裁断した後、0.02 g 分を Microsmash 用のチューブに取った。これにジルコニアビーズ φ 5.0 を一つ加え、800 μL の in vivo 用 Lysis buffer を加え、Microsmash を用いて 4,000 rpm, 30 sec で破砕を行った。この懸濁液を別のサンプルチューブに 700 μL 程度移し、13,000 rpm, 4℃, 10 min で遠心して上清を採取し、サンプルとした。遺伝子発現活性の測定は、第一章と同じ方法で行った。

6) 肝臓内遺伝子量の定量

マウスから肝臓を摘出し、ハサミで細かく裁断した後、0.1 g 分を Microsmash 用のチューブに取った。DNA 抽出用バッファーを 1 mL 加え、4,500 rpm, 30 sec

の条件で破砕した。この懸濁液を 12,000 rpm, 5 min, 4℃で遠心し、上清を取り除いた。この沈殿物を抽出用サンプルとし、Sepagene を用い、添付のプロトコールに従って DNA 抽出を行った。

リアルタイム PCR は第一章と同様の方法でルシフェラーゼ遺伝子コピー数を定量した。DNA サンプル溶液の吸光度(A260)を測定することにより total DNA 量を求め、ルシフェラーゼ遺伝子量を copies / μg DNA として算出した。

7) 血清中サイトカイン量の定量

マウスをエーテル過麻酔によって安楽死させ、心臓から 25G の注射針と 1 mL のシリンジで採血を行い、サンプルチューブに移して 3 時間程度室温でインキュベーションした。これを 3,500 rpm, 4℃, 10 min で遠心し、上清を採取して血清サンプルとした(-80℃保存)。

このサンプルについて、Quantikine® ELISA kit の添付プロトコールに従ってサイトカイン定量を行った。

8) 血清中 AST, ALT 値の測定

前項の方法で得られた血清サンプルを、トランスアミナーゼ CⅡテストワコーを用い、添付のプロトコールに従って測定した。

5. 第 3 章・実験方法

1) DNA のエタノール水溶液中における粒子径測定

エタノール水溶液中において粒子径を測定する場合、問題となるのは溶媒の粘度である。エタノールと水の混合溶媒の粘度は温度や混合比によって大きく変動する[63]。zetasizer において測定されるのは粒子の拡散速度であり、これを用いて以下の式で粒子径は算出される。

$$(\mathrm{Size}) = \frac{K_B T}{3\pi\eta D}$$ (K_B： ボルツマン定数, T： 絶対温度, η： 粘度, D： 拡散速度)

粘度はビスコスティック(ビスコテック社)を用いて測定し、粒子径測定の際に粘度測定値を入力することにより粒子径の値を補正した。

エタノール水溶液中の DNA 濃度は 0.15 mg/mL とし、エタノールと混合後 5 分以内に測定を行った。

2) MEND の封入率測定

MEND (DNA 0.15 μg 相当)を水または 1% SDS 水溶液に加え、アガロースゲル電気泳動を行い、15 分間程度 EtBr を用いてゲルを染色し、Gel Doc EZ imager を用いてゲル写真を撮影した。得られたバンドの濃度を Image Lab ソフトウェアを用いて定量し、SDS 添加サンプルのバンド強度を 100%とし、SDS 無添加サンプルのバンド強度(未封入 DNA を反映)から封入率を算出した。なお、protamine コアの MEND についてこの実験を行う際には、コアの状態の DNA はゲル上でバンドとして検出されないため、SDS 添加/無添加の両サンプルに対し、1 mg/mL となるようにポリアスパラギン酸を添加し 10 分間室温でインキュベーションすることにより、コアの分解を行ってから電気泳動を行った。

3) コアを用いない MEND パッケージング

(a) 当初の条件(HEPES-NaCl)

10 mM ssPalmM, 10 mM SOPC, 10 mM Cholesterol を、脂質終濃度 4.125 mM, PalmM : SOPC : Cholesterol = 3 : 4 : 3 となるようにエタノールに溶解し、総脂質濃度の 3 mol%の 5 mM DSG-PEG_{2000} を加えた。この溶液を vortex しながら 1.5 倍の体積の DNA 水溶液(0.125 mg/mL DNA, 10 mM HEPES, 16.7 mM NaCl)を一気に加え、この混合液を 7 倍量の酸性 HEPES 溶液 (10 mM NaCl +) に加えることによって希釈した。この時、7 倍量 HEPES 溶液を vortex しながら操作を行った。例えばマウス一匹分の MEND を作製する際には、280 μL の EtOH と 420 μL の DNA 水溶液を混合し、4.9 mL の酸性 HEPES 溶液を用いて希釈した。この溶液を Amicon® Ultra-15 を用いて限外ろ過を行い、100 mM

HEPES buffer (pH 7.4, 50 mM NaCl +)で限外ろ過前の体積までメスアップした。これを再度限外ろ過し、PBS でマウスへの投与に適した体積(200～400 μL)にメスアップした。

(b) 粒子径の小さな MEND の調製方法

10 mM ssPalmM, 10 mM SOPC, 10 mM Cholesterol を、脂質終濃度 4.125 mM, PalmM : SOPC : Cholesterol = 3 : 4 : 3 となるようにエタノールに溶解し、総脂質濃度の 10 mol%の 5 mM DSG-PEG_{2000} を加えた。この溶液を DNA 水溶液(0.125 mg/mL DNA, 22.2 mM Malate buffer, pH 5.1)と 2 : 3 の体積比で混合し、7 倍量のリンゴ酸バッファー (16.7 mM, pH 5.1)で希釈した。混合・希釈操作は(a)の項と同じ方法を用いた。この溶液を Amicon® Ultra-15 を用いて限外ろ過を行い、PBS で限外ろ過前の体積までメスアップした。これを再度限外ろ過し、PBS でマウスへの投与に適した体積にメスアップした。

(c) 遺伝子発現活性の観点で最適化した MEND の調製方法

10 mM ssPalmM, 10 mM SOPC, 10 mM Cholesterol を、脂質終濃度 8.25 mM, PalmM : SOPC : Cholesterol = 6 : 3 : 1 となるようにエタノールに溶解し、総脂質濃度の 3 mol%の 5 mM DSG-PEG_{2000} を加えた。この溶液を DNA 水溶液(0.125 mg/mL DNA, 22.2 mM Malate buffer, pH 5.1)と 2 : 3 の体積比で混合し、7 倍量のリンゴ酸バッファー (16.7 mM, pH 5.1)で希釈した。この溶液を Amicon® Ultra-15 を用いて限外ろ過を行い、PBS で限外ろ過前の体積までメスアップした。これを再度限外ろ過し、PBS でマウスへの投与に適した体積にメスアップした。

参考文献

1. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med. 1990 Aug 30;323(9):570-8.
2. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. 2014 [cited; Available from: http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/
3. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science. 1999 Dec 17;286(5448):2244-5.
4. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science. 2003 Oct 17;302(5644):415-9.
5. Melchiorri D, Pani L, Gasparini P, Cossu G, Ancans J, Borg JJ, et al. Regulatory evaluation of Glybera in Europe - two committees, one mission. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(9):719.
6. Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Nov 19;52(3):153-64.
7. Kamiya H, Akita H, Harashima H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy. Drug Discov Today. 2003 Nov 1;8(21):990-6.
8. Kogure K, Moriguchi R, Sasaki K, Ueno M, Futaki S, Harashima H. Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. Journal of Controlled Release. 2004 8/11/;98(2):317-23.
9. Kogure K, Akita H, Yamada Y, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system. Adv Drug Deliv Rev. 2008 Mar 1;60(4-5):559-71.
10. Kogure K, Akita H, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device for non-viral gene delivery: concept and application of Programmed Packaging. J Control Release. 2007 Oct 8;122(3):246-51.
11. Charoensit P, Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M. Incorporation of all-trans retinoic acid into lipoplexes inhibits nuclear factor kappaB

activation mediated liver injury induced by lipoplexes in mice. J Gene Med. 2008 Jan;10(1):61-9.
12. Song YK, Liu F, Chu S, Liu D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. Hum Gene Ther. 1997 Sep 1;8(13):1585-94.
13. Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. Pharm Res. 2000 Mar;17(3):306-13.
14. Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, Nakano T, Hattori Y, Fumoto S, et al. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. Mol Ther. 2003 Feb;7(2):254-61.
15. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. Nat Biotechnol. 2010 Feb;28(2):172-6.
16. Ursic-Bedoya R, Mire CE, Robbins M, Geisbert JB, Judge A, Maclachlan I, et al. Protection Against Lethal Marburg Virus Infection Mediated by Lipid Encapsulated Small Interfering RNA. J Infect Dis. 2013 Sep 16.
17. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. Nat Biotechnol. 2005 Aug;23(8):1002-7.
18. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. Nature. 2006;441(7089):111-4.
19. Tekmira's Partner Initiates Phase III Trial With LNP-Enabled Patisiran (ALN-TTR02) (NASDAQ:TKMR). 2013 [cited; Available from: http://investor.tekmirapharm.com/releasedetail.cfm?releaseid=806013
20. Alnylam. 2013 [cited; Available from: http://www.alnylam.com/Programs-and-Pipeline/Alnylam-5x15/TTR-Amyloidosis.php
21. Liu F, Liu D. Serum independent liposome uptake by mouse liver. Biochim Biophys Acta. 1996 Jan 12;1278(1):5-11.
22. Nakabayashi N, Williams DF. Preparation of non-thrombogenic materials using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. Biomaterials. 2003 Jun;24(13):2431-5.

23. Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. Preparation of Phospholipid Polylners and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. Polymer Journal. 1990 1990-05-01;22(5):355-60.
24. Iwasaki Y, Ishihara K. Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications. Anal Bioanal Chem. 2005 Feb;381(3):534-46.
25. Li W, Nicol F, Szoka FC, Jr. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Apr 23;56(7):967-85.
26. Goda T, Goto Y, Ishihara K. Cell-penetrating macromolecules: direct penetration of amphipathic phospholipid polymers across plasma membrane of living cells. Biomaterials. 2010 Mar;31(8):2380-7.
27. Hama S, Akita H, Iida S, Mizuguchi H, Harashima H. Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex. Nucleic acids research. 2007;35(5):1533.
28. Shoji-Tanaka A, Mizuochi T, Komuro K. Gene transfer using purified retroviral integrase. Biochem Biophys Res Commun. 1994 Sep 30;203(3):1756-64.
29. Umemoto Y, Kawakami S, Otani Y, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M. Evaluation of long-term gene expression in mouse liver using PhiC31 integrase and hydrodynamic injection. Biol Pharm Bull. 2012;35(7):1182-6.
30. Olivares EC, Hollis RP, Chalberg TW, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. Nat Biotechnol. 2002 Nov;20(11):1124-8.
31. Owens JB, Mathews J, Davy P, Stoytchev I, Moisyadi S, Allsopp R. Effective Targeted Gene Knockdown in Mammalian Cells Using the piggyBac Transposase-based Delivery System. Mol Ther Nucleic Acids. 2013;2:e137.
32. Di Matteo M, Matrai J, Belay E, Firdissa T, Vandendriessche T, Chuah MK. PiggyBac toolbox. Methods Mol Biol. 2012;859:241-54.
33. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
34. Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. Nat Biotechnol. 2008 May;26(5):549-51.

35. Mahato RI, Anwer K, Tagliaferri F, Meaney C, Leonard P, Wadhwa MS, et al. Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. Hum Gene Ther. 1998 Sep 20;9(14):2083-99.
36. Audouy SA, de Leij LF, Hoekstra D, Molema G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. Pharm Res. 2002 Nov;19(11):1599-605.
37. Liu D, Mori A, Huang L. Large liposomes containing ganglioside GM1 accumulate effectively in spleen. Biochim Biophys Acta. 1991 Jul 22;1066(2):159-65.
38. Hama S, Akita H, Iida S, Mizuguchi H, Harashima H. Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex. Nucleic Acids Res. 2007;35(5):1533-43.
39. Barnier-Quer C, Elsharkawy A, Romeijn S, Kros A, Jiskoot W. Adjuvant effect of cationic liposomes for subunit influenza vaccine: influence of antigen loading method, cholesterol and immune modulators. Pharmaceutics. 2013;5(3):392-410.
40. Chen W, Yan W, Huang L. A simple but effective cancer vaccine consisting of an antigen and a cationic lipid. Cancer Immunol Immunother. 2008 Apr;57(4):517-30.
41. Dong L, Liu F, Fairman J, Hong DK, Lewis DB, Monath T, et al. Cationic liposome-DNA complexes (CLDC) adjuvant enhances the immunogenicity and cross-protective efficacy of a pre-pandemic influenza A H5N1 vaccine in mice. Vaccine. 2012 Jan 5;30(2):254-64.
42. Yan X, Kuipers F, Havekes LM, Havinga R, Dontje B, Poelstra K, et al. The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Mar 4;328(1):57-62.
43. Khalil IA, Hayashi Y, Mizuno R, Harashima H. Octaarginine- and pH sensitive fusogenic peptide-modified nanoparticles for liver gene delivery. J Control Release. 2011 Dec 20;156(3):374-80.
44. Yamauchi M, Kusano H, Saito E, Iwata T, Nakakura M, Kato Y, et al. Development of wrapped liposomes: novel liposomes comprised of polyanion drug and cationic lipid complexes wrapped with neutral lipids. Biochim Biophys Acta. 2006 Jan;1758(1):90-7.
45. Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, et al. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA

inhibits tumor growth in vivo. Cancer Res. 2009 Aug 15;69(16):6531-8.
46. Shimizu K, Higuchi Y, Kozu Y, Hashida M, Konishi S. Development of a suction device for stabilizing in vivo real-time imaging of murine tissues. J Biosci Bioeng. 2011 Nov;112(5):508-10.
47. Mudhakir D, Akita H, Khalil IA, Futaki S, Harashima H. Pharmacokinetic analysis of the tissue distribution of octaarginine modified liposomes in mice. Drug Metab Pharmacokinet. 2005 Aug;20(4):275-81.
48. Magnusson T, Germany UoMDoPM, Haase R, Germany UoMDoPM, Schleef M, Germany PFGaCKB, et al. Sustained, high transgene expression in liver with plasmid vectors using optimized promoter - enhancer combinations. The Journal of Gene Medicine.13(7-8):382-91.
49. Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, et al. Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. J Gene Med. 2009 May;11(5):435-43.
50. Kako K, Nishikawa M, Yoshida H, Takakura Y. Effects of inflammatory response on in vivo transgene expression by plasmid DNA in mice. J Pharm Sci. 2008 Aug;97(8):3074-83.
51. Martin DA, Elkon KB. Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway. Arthritis Rheum. 2006 Mar;54(3):951-62.
52. Shirota H, Ishii KJ, Takakuwa H, Klinman DM. Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA. Immunology. 2006 Jul;118(3):302-10.
53. Yasuda K, Ogawa Y, Yamane I, Nishikawa M, Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. J Leukoc Biol. 2005 Jan;77(1):71-9.
54. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. J Immunol. 1997 Aug 1;159(3):1418-28.
55. Kusters S, Gantner F, Kunstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. Gastroenterology. 1996 Aug;111(2):462-71.

56. McCullough CT, Tura BJ, Harrison DJ. c-Myc partially mediates IFNgamma-induced apoptosis in the primary hepatocyte. Int J Exp Pathol. 2007 Jun;88(3):129-36.
57. Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. J Biol Chem. 2000 Apr 21;275(16):11814-23.
58. Herweijer H, Zhang G, Subbotin VM, Budker V, Williams P, Wolff JA. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. J Gene Med. 2001 May-Jun;3(3):280-91.
59. Jacobs F, Wisse E, De Geest B. The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. Am J Pathol. 2010 Jan;176(1):14-21.
60. Ambegia E, Ansell S, Cullis P, Heyes J, Palmer L, MacLachlan I. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. Biochim Biophys Acta. 2005 May 20;1669(2):155-63.
61. Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. Science. 1998 Apr 24;280(5363):547-53.
62. Hama S, Akita H, Ito R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Harashima H. Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. Mol Ther. 2006 Apr;13(4):786-94.
63. Kay RL, University C-M, Broadwater TL, University C-M. Solvent structure in aqueous mixtures. III. Ionic conductances in ethanol-water mixtures at 10 and 25°C. Journal of Solution Chemistry. 1976;5(1):57-76.