細胞に導入された巨大分子の運命とその制御

徳島大学大学院薬学研究科薬物動態学講座 橘 理恵子

Macromolecules such as proteins or nucleic acids have great potentialities as new "drugs" for the treatment of various diseases. To realize the efficient therapy using macromolecules in the near future, it is required to understand the intracellular fate and to develop the multi-functional carrier system for the regulation of the intracellular trafficking. So far, many efforts have been dedicated to optimize the delivery system of macromolecules. I describe here the intracellular fate of macromolecules delivered with carrier and introduce many approaches for the regulation of the intracellular trafficking of macromolecules, especially for gene therapy.

intracellular fate / endocytosis / macromolecules / liposome / gene delivery / nuclear localization signal

1. はじめに

近年、タンパク質や核酸(遺伝子)といった巨大分子を、がん治療などで「薬」として有効に利用する試みが非常に活発に行われている。

一般的に、巨大分子とは、分子量が1万から100万程度のもを指し、細胞内の小さな有機分子と、巨大分子の集合体や細胞小器官の中間に位置するものである。タンパク質・核酸は生体内において独特の機能を持ち、他の分子との相互作用によってその役割を果たしている¹⁾。これらの巨大分子を生体内において独自の活性をもつ「薬」と見なした場合、その薬効を発揮させるためには、細胞内に取り込ませ、さらに、細胞内のあるべき場所にまで送達させなければならない。外来性の巨大分子は、細胞にとっては単なる異物である。期待する効果を発揮させるには、何らかの工夫をして細胞内へ導入し、さらに、無傷のままその細胞内動態を制御する必要がある。しかしながら、これまでの研究では、例えば抗腫瘍効果が期待されるタンパク質(TNF, IFNなど)においてはその抗腫瘍活性によって、また、遺伝子においてはその発現によって、効果が評価されてきたために、それらの具体的な細胞内動態に関しては未解明な部分も多い。筆者らは、これまで曖昧であった巨大分子の細胞内動態の解明とその制御の重要性を認識し研究を行ってきた。本稿では、巨大分子の細胞導入後

の運命とその制御法に関するさまざまな試みについて解説したい。

2. 巨大分子の細胞内運命の制御は可能か?

筆者らはまず、細胞に導入した巨大分子を効率よく細胞質へと放出させ、さらに特定の細胞内器官(具体的には核)に送達させることが可能であるかどうかを調べた²⁾。この実験では、モデル分子として分子サイズが約60 kDaのアルブミンを使用している。図1に、筆者らが試みた制御ルートを示した。

2.1 細胞への導入

タンパク質や遺伝子をそのまま生体内あるいは細胞に投与しても、それらは細胞に取り込まれる前に免疫系による攻撃や酵素による分解を受ける。このため、何らかのキャリアーが必要とされる。筆者らは、キャリアーとしてリボソームを使用した。リボソームは、図1にも示すように、生体膜の構成成分であるリン脂質が水和して形成される脂質二分子膜からなる微細な閉鎖小胞である。リボソームは脂質膜で閉鎖的に水相を内包するため、そのままでは細胞内に入りえない非常に水溶性の高い物質を細胞内に送達できる³⁾。ドラッグキャリアーとしてのリボソームは、生体内分解性で毒性や抗原性が低く、その発見以来、さかんに応用研究が行われており、すでに商品化され臨床で用いられているリボソーム製剤もある。

Intracellular Fate of Macromolecules Delivered with Carrier

Rieko TACHIBANA

Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima

図1 pH感受性リボソーム核局在化シグナルによる巨大分子の細胞内動態制御法

リボソームは、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる(図1-)。直接膜と融合する経路(図1-)については、通常のリボソームでは存在しないと考えられている。しかし真弓らは、センダイウイルスの膜融合タンパク質をリボソーム膜に融合させることによって、細胞膜との直接融合が可能な導入効率のよい膜融合リボソームを開発した⁴⁾。これらの2つの経路は、それぞれ次のような特徴をもつ。エンドサイトーシス経路では、例えば、リボソームをがん細胞に過剰に発現している受容体に対する抗原で修飾することによって細胞特異的な取り込みが可能となり、細胞選択性をもたせることができる。一方、膜融合リボソームを用いる方法は、細胞選択性がないため腫瘍部分などへの局所投与に適している。筆者らは、この経路により細胞内へモデル分子を導入した。

2.2 細胞質中への放出

エンドサイトーシス経路により細胞内へ導入された物質は、通常はエンドソーム内に存在し、その後リボソームとの融合により加水分解酵素による分解を受ける(図1-)。したがって、次にこの分解を回避する工夫が必要となる。エンドソーム内部のpHはしだいに酸性化するため、筆者らは、これを通常のリボソームではなくpH感受性リボソームを使用することで回避した。pH感受性リボソームの場合には、構成脂質であるdioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE)が中性領域(pH 7)では安定な脂質二重膜を形成しているのに対し、酸性下(pH 6~5)では極性基が内側に会合した構造(ヘキサゴナル)をとるために、膜の急激な不安定化が起こる⁵⁾。その結果、エンドソーム膜とリボソーム

図2 pH感受性リボソームによるFITC-アルブミンのエンドソームから細胞質への放出 - 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光画像
細胞はラット腹腔マクロファージ。リボソーム添加後30分における細胞内の様子を示している。対照のリボソーム(A)では、FITC-アルブミンはエンドソーム内に留まったままであるが、pH感受性リボソーム(B)では、細胞質中に分布している(詳細は原著論文²⁾を参照)。

膜が融合し、内封物質の一部が細胞質中に放出されることが考えられている(図1-)。実際に、FITCで標識したアルブミンを共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、pH感受性リボソームに封入した場合にのみ細胞質中へのアルブミンの放出が観察された(図2)。

エンドソーム経路から物質を脱出させるには、このpHの変化をうまく利用する方法が他にも試みられている。pH感受性GALAペプチド⁶⁾、pH感受性界面活性剤⁷⁾またエンドソームのpHの低下によって膜融合を起こすインフルエンザウイルスの膜融合タンパク質⁸⁾などがその例としてあげられる。

さて、細胞膜、エンドソーム膜という2つの大きな障壁を乗り越え細胞質中に脱出した巨大分子は、その後のような運命をたどるのだろうか。巨大分子の細胞質中での拡散は他の分子との相互作用により比較的遅く、何もしなければ細胞質中で酵素による分解を受けることになる。しかし、遺伝子はもちろん、転写調節に関わるタンパク質などにおいては、核への選択的な送達が必要である。そこで、筆者らは、細胞質中の巨大分子を核内へ選択的に移行させるため「核局在化シグナル」を利用した試みを行った。

2.3 細胞質から核内への移行

核膜には物質輸送のための直径約9 nmの核膜孔が存在している。この孔を自由に拡散で通過できる分子の大きさは40 ~ 45 kDa よりも小さい分子である。核膜孔よりも大きくかつ核内へ移行する必要がある核タンパク質などは、核局在化シグナル(Nuclear Localization Signal; 以下NLSと略す)とよばれる特定のアミノ酸配列を有しており、これによって核内へ能動輸送されることが明らかになっている⁹⁾。図1- に示すように、NLSは細胞質中のタンパク質と複合体を形成し、それが核膜孔に結合することによって、核膜孔が開きタ

ンパク質が核内に移行することが知られている。詳細は引用文献をご参照頂きたい¹⁰⁾。

NLSに関してさらに興味深い点は、NLSの配列を含むペプチドを、本来は核に局在しない分子に化学的に結合させると核内へ移行する活性をもつことである。NLSを結合させることによって、本来は核移行性をもたず、核膜孔を通過できない大きさであるアルブミン(約60 kDa)が、核へ選択的に移行していることが確認された(図3)。つまり、NLSを付加することによって、細胞に導入した巨大分子の行き先を制御し、特定の細胞内器官に選択的に集積させることが可能であることが示された。

ここまで述べてきたように、筆者らは導入する巨大分子やそのキャリアーにあらかじめ工夫を施すことによって、巨大分子を1)細胞内に効率的に取り込ませ、2)細胞内での分解を回避し、最終的に3)核に選択的に移行させることに成功した。すなわち、巨大分子の細胞内動態をある程度制御できることが実証された。また、これまでの巨大分子の細胞内動態の研究では、マイクロインジェクション法や膜の透過性を亢進させる方法により非生理的条件下で巨大分子を細胞質中へ直接導入する手法が用いられてきた。しかし、これらの方法では、個体に対する遺伝子治療などの実際の応用段階で使用することは困難である。これに対して、筆者らが構築した方法は生理的条件下での巨大分子の細胞への導入であり、実際の治療などに応用できる可能性がある。

3. 遺伝子の細胞内動態とその制御

タンパク質と同様に巨大分子として分類される核酸(遺伝子)も基本的には同じ細胞内運命をたどるが、分子量が数万から数十万のタンパク質に対して、実際に遺伝子治療において使用されるプラスミド遺伝子の分子量は、数百万に及ぶ。したがって、その制御法においては、タンパク質よりも困難である部分も多い。次に、“超”巨大分子ともいえる遺伝子の細胞内動態とその制御法に関して、タンパク質と大きく異なる点を中心に述べたい。

3.1 遺伝子の細胞内導入法

遺伝子を細胞に導入させるために用いられる遺伝子導入ベクターは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。現時点で、細胞への導入効率は、ウイルスベクターの方が非常に高いが、ウイルスベクターは安全性の面で常に大きなデメリットを抱えている。非ウイルスベクターは、導入効率は劣るものの、安全性の面では非感染性、低毒性、低免疫原性といった長所を有しており、大量調製の点においてもウイルスベ

図3 NLSによるFITC-アルブミンの核への選択的輸送 - 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光画像
細胞はラット腹腔マクロファージ。リボソーム添加後4時間における細胞内の様子を示している。(A) FITC-アルブミン-NLS、(B) ヨウ化プロビジウムで染色された核、(C) 位相差顕微鏡写真、(D) A, Bを重ね合わせたもの。FITC-アルブミン-NLSとヨウ化プロビジウムの蛍光が重なっていることからFITC-アルブミン-NLSが核内へ集積していることが確認された(詳細は原著論文²⁾を参照)。

クターよりも容易である。ゆえに、非ウイルスベクターを用いた、より安全で有効な遺伝子導入技術の開発を目指し現在さかんに研究が行われており、筆者らも非ウイルスベクターによる遺伝子治療を念頭に置き研究を行っている。

非ウイルスベクターによる遺伝子導入においては、Felgnerらによって、正電荷の合成脂質を用いた正電荷リボソームと遺伝子からなるDNA-正電荷リボソーム複合体による遺伝子導入法が開発されて以来¹¹⁾、負電荷を有する遺伝子と正電荷を有するリボソームやポリマーを静電的に結合させたコンプレックス型による方法が主流である。この方法は、図1に示すような、それまでの封入型リボソームと比較して発現効率を飛躍的に上昇させ、リボソームによる遺伝子の細胞内導入法に新しい概念をもたらした。DNA-正電荷リボソーム複合体においても、取込過程はエンドサイトーシスである。遺伝子導入に用いる正電荷リボソームは、正電荷脂質に加え前述の膜融合脂質DOPEを含むものが多い。このようなリボソームは、膜融合脂質を含むためpH感受性があり、前述したように、pHの低下に伴ってエンドソームとの膜融合をひき起こすと考えられている。さらにエンドソームからの遺伝子の移行を促進させる方法は前述の通りである。なお、正電荷リボソームによる遺伝子導入法については、本誌211号中西による「ひとくふう」も参照頂きたい。

3.2 遺伝子の核内移行

核膜が遺伝子導入における非常に大きな障壁であることはこれまでの研究から明らかであるが、その移行メカニズムについてはまだ不明な点が多い。がん細胞などのように細胞分裂がさかんな場合は、その分裂時に核膜が消失した際、プラスミドの移行が促進されるという報告もある¹²⁾。しかしそれと同時に、分裂していない細胞においても遺伝子が発現しているという報告は多くなされており、核膜孔を介した遺伝子の核内移行の存在も示唆されている。

核膜に存在する核膜孔の大きさは、NLSによる能動輸送において最大26 nmまで開くことが知られている¹³⁾。一方、3 ~ 11 kbp (2 ~ 7 MDa) のプラスミドの大きさは、90 ~ 130 nm であり¹⁴⁾、また1個のプラスミドをどんなに小さく折り畳んでも25 nm程度までにしか小さくならない¹⁵⁾。このように、その大きさを比較しても、遺伝子の核内移行をスムーズに行わせることの難しさは容易に想像できる。NLSは、非常に魅力的なツールであることから、これまでにNLSを利用し遺伝子の核内移行を効率よく促進させようという試みが行われている。以下にそれらを紹介したい。

初期の段階では、NLSを直接DNAに結合させるのではなく、(NLSは、LysやArgなどの塩基性アミノ酸に富むため)静電的相互作用により、DNA/正電荷リボソーム/NLSの複合体を細胞に導入した実験が行われたが、その効果は期待されたNLSによる核移行促進によるものではなく、むしろDNA分子がNLSの正電荷によってさらにコンパクト化されたためであることが示唆された^{16), 17)}。

それでは、直接DNAに結合させた場合に関してはどうか。Wolffらは、共有結合によってNLSをプラスミドにランダムに結合させ核への送達効率の上昇を目指した。しかし、1 kbpあたり約50 ~ 100個のNLSを付加しなければ核への選択的な集積効果は得られず、このレベルまで修飾を行ったDNAはDNAとしての機能を失う結果となった¹⁴⁾。しかし、これとは対照的に、たった1分子のNLSで、発現効率を飛躍的に上昇させた例もある。Behrらは、ルシフェラーゼをコードしたDNAの両端をキャッピングし、その一端にNLSを結合させた。このとき、NLSが結合していない場合、あるいは環状プラスミドと比較すると、10 ~ 200倍の発現効率の上昇がみられた¹⁵⁾。これはDNAをNLSによって核内に能動的に移行促進させた結果、発現効率が増したと考えられる最初の例である。

また、同じく核膜孔を介した核内への遺伝子の移行促進を目指した、少し違った興味深いアプローチも報告されている。Deanらは、SV40ウイルスのもつプラスミドDNAの核内への移行が、NLSによる巨大分子の能動輸送機構と類似していることを明らかにした。彼らは、その核移行に関与していると考えられる約300 bpの特定の塩基配列を他のプラスミドに組み込むことによって非分裂細胞での発現効率を上昇させている¹⁸⁾。

以上さまざまな試みが行われているが、遺伝子の場合においても工夫次第で核内への移行を促進させることができると考えられる。

4. 現在の筆者らの試み

冒頭にも述べたように、これまでは、最終目的である遺伝子の発現効率を上昇させることばかりに重きが置かれ、基礎的な研究が欠落している感は否めなかった。例えば、核へ遺伝子を効率よく送達させるための多くの努力がなされているにも関わらず、では一体どれくらいの遺伝子が核へ移行しているのかといった単純な疑問に対する答えはなかった。この原因として、確立された定量法がないことが考えられた。そこで、筆者らは遺伝子の核内移行量の定量法の確立に着手し、核1個当たりの移行量を定量評価することを可能とした(橘

ら、投稿中)。さらに核内移行量と発現量との関係を見たところ、核内移行量が少ない場合ではその増加とともに発現量も増加したが、その後、核内移行量が増加しているにも関わらず発現量には飽和がみられた。実際には遺伝子の核への送達後にも何らかの飽和過程が存在していることが示唆されたことから、その原因を解明し核移行後の過程においても工夫をする必要があると考えられる。今後は、さまざまな条件下における核移行量と発現量の関係をさらに詳細に明らかにするとともに、エンドソームから細胞質への移行量の定量法の確立にも挑戦していきたい。

5. おわりに

遺伝子治療に関する多くの期待と関心の高まりとともに、巨大分子の細胞への導入技術はもはや生体工学に必須のテクノロジーとなりつつある。遺伝子治療は、当初「夢の」、「成功すればすべてが解決する」治療法として大きな期待が寄せられ、楽観的な見方をされていた。しかし、実際には多くの問題点が残されており、最近では、遺伝子導入後の細胞内動態など、もっと基礎的な研究に目を向けるべきであるという気運が高まりつつある。筆者にとっては非常に心強い限りである。

文 献

- 1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of The Cell* (3rd Ed.), pp.89-138, Garland Publishing Inc., New York & London.
- 2) Tachibana, R., Harashima, H., Shono, M., Azumano, M., Niwa, M., Futaki, S. and Kiwada, H. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 538-544.
- 3) 際田弘志 (1995) *DDSの進歩 1995-1996*, pp.44-48, 中山書店, 東京.
- 4) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakagawa, S. and Mayumi, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 402-407.
- 5) Lee, R. J. and Huang, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8481-8487.
- 6) Simoes, S., Slepishkin, V., Gaspar, R., de-Lima, M. C. and Duzgunes, N. (1998) *Gene Ther.* **5**(7), 955-964.
- 7) Liang, E., Hughes, J. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1369**, 39-50.
- 8) Schoen, P., Chonn, A., Cullis, P. R., Wilschut, J. and Scherrer, P. (1999) *Gene Ther.* **6**(5), 823-832.
- 9) Jans, D. A. and Hubner, S. (1996) *Physiol. Rev.* **76**, 651-685.
- 10) Yoneda, Y. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 811-817.
- 11) Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **84**, 7413-7.
- 12) Tseng, W. C., Haselton, F. R. and Giorgio, T. D. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* **1445**, 53-64.
- 13) 今本尚子, 米田悦啓 (1991) *実験医学* **9**(17), 2196-2202, 羊土社, 東京.
- 14) Sebestyen, M. G., Ludtke, J. J., Bassik, M. C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E. A., Hagstrom, J. E. and Wolff, J. A. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 80-85.
- 15) Zanta, M. A., Belguise-Valladier, P. and Behr, J. P. (1999) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **96**, 91-96.
- 16) Aronsohn, A. I. and Hughes, J. A. (1998) *J. Drug Target.* **5**, 163-169.
- 17) Fritz, J. D., Herweijer, H., Zhang, G. and Wolff, J. A. (1996) *Hum. Gene Ther.* **7**, 1395-404.
- 18) Dean, D. A., Byrd, J. N. Jr. and Dean, B. S. (1999) *Curr. Eye. Res.* **19**, 66-75.

橋 理恵子

橋 理恵子 (たちばな りえこ)

日本学術振興会特別研究員 (DC), 徳島大学大学院薬学研究科薬物動態学講座博士後期課程2年

徳島大学際田弘志教授, 原島秀吉助教授 (現北海道大学教授) の指導の下, 高分子医薬品の細胞内動態の解明およびその制御法に関する研究を行っている. 現在は, 特に遺伝子治療におけるドラッグデリバリーシステムの構築を目指し研究に取り組んでいる.

連絡先: 〒770-8505 徳島市庄町1-78-1 E-mail: s29218@stn.ph.tokushima-u.ac.jp