12S3-02

DNA・カチオン性リポソーム複合体の物性・動態・発現解析と遺伝子治療への応用

○櫻井文教、山下富義、高倉喜信、橋田 充

京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野

RELATIONSHIP BETWEEN PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS, DISTRIBUTION OF DNA-CATIONIC LIPOSOME COMPLEXES AND THEIR GENE EXPRESSION, AND APPLICATION TO GENE THERAPY

Fuminori SAKURAI, Fumiyoshi YAMASHITA, Yoshinobu TAKAKURA, Mitsuru HASHIDA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

【目的】プラスミド DNA-カチオン性リポソーム複合体は複合体の調製、細胞表面への吸着及び取り込み、核への DNA の移行など、様々な過程を経て最終的な遺伝子発現に至る。これらの各過程は複合体の物理化学的性質によって規定されると考えられる。したがって物理化学的性質と各過程との関連を明らかにしていくことは重要と考えられる。そこで本研究においては組成の異なる複合体の物理化学的性質と遺伝子発現に至る各段階との関連について検討した。さらに得られた情報に基づき、*in vivo* 遺伝子治療への応用の可能性について検討した。

【実験方法】DNA-カチオン性リポソーム複合体の調製：カチオン性脂質 DOTMA 及び中性脂質 DOPE もしくはコレステロール(Chol)をモル比 1 : 1 で混合し、ボルテックス法にてリポソームを作成した。またプラスミド DNA としてはルシフェラーゼをコードした pCMV-Luc を用いた。また複合体の細胞内取り込みにおいては ^{32}P 放射標識したプラスミド DNA を用いた。*In vitro* 遺伝子発現実験：各電荷比で調製した複合体を各種培養細胞に添加し 48 時間後の遺伝子発現量を測定した。複合体からの DNA の放出：Szoka らの方法に従い検討した¹⁾。*In vivo* 遺伝子発現実験：電荷比+2.24 で調製した複合体をマウス尾静脈より投与し 24 時間後の各臓器での遺伝子発現量を定量した。肺転移モデルマウスにおける治療効果：CDF₁ マウスにマウス大腸癌細胞 CT-26 を静脈内投与し肺転移モデルマウスを作成した。移植 7 日後にインターフェロン β 及び γ 遺伝子、pI:pC とカチオン性

リポソームとの複合体を投与した。移植 17 日後に開胸し肺転移結節数を計測した。

【結果・考察】DNA-カチオン性リポソーム複合体の構造・物性と培養細胞への遺伝子導入効率との関連²⁾：種々の電荷比で調製した複合体の構造及び物理化学的性質について様々な角度から検討した。粒子径に関しては、電荷比 1 付近で粒子径の増大が観察されたが、それ以外では約 200nm であった。ゼータ電位は電荷比の増加に伴い上昇し、電荷比+1.68 以上ではリポソーム単独と同じ値を示し (+47 mV)、DNA が脂質に覆われていることが示唆された。原子間力顕微鏡を用いて複合体の形状を観察したところ、電荷比の上昇に伴い DNA の収縮が観察され、電荷比+2.24 では DNA がリポソームに完全に覆われていた (Fig.1)。各培養細胞における遺伝子発現量は細胞によって大きく異なり、最大 1000 倍もの差が見られ、また最適電荷比も細胞によって異なっていた。一方、複合体の各細胞における細胞内取り込みは、電荷比の上昇

Fig.1 Atomic Force Microscopic Images of pDNA-Cationic Liposome Complexes (A) Chol-containing complex (+1.12), (B) Chol-containing Complex (+2.24), (C) DOPE-containing complex (+1.12), (D) DOPE-containing complex (+2.24)

と共に増加したが、遺伝子発現量に直接的な相関は見られなかった。そこで複合体からの DNA の放出について検討したところ、電荷比の上昇に伴い DNA がより多くの脂質に覆われているため、DNA の放出が減少することが明らかとなった。以上の結果より遺伝子発現における最適電荷比を支配する要因について複合体から細胞質への DNA の放出も大きな要因であることが示された。

複合体の静脈内投与による in vivo 遺伝子導入に及ぼす構造・物性の影響³⁾：静脈内投与による in vivo 遺伝子導入においてカチオン性リポソームを構成する中性脂質の違いが複合体の物性、動態及び遺伝子発現にどのように関連するか、中性脂質として DOPE と Chol を用いて検討した。X 線小角散乱及び原子間力顕微鏡を用いて検討した結果、Chol を含む複合体では脂質成分が極めて安定なラメラ構造をとっているのに対し、DOPE を含む複合体では脂質部分の曲率が高い、極めて不安定な構造であった (Fig.1)。また両複合体ともマウス全血液と混合すると、約 40%は血球と結合するが、DOPE を含む複合体は赤血球同士の融合を引き起こした (Fig.2)。In vivo 体内動態およびラット肺灌流系の結果より Chol を含む複合体は赤血球と凝集を引き起こさないため肺の毛細血管を通過する際に赤血球から外れ血管内皮細胞に結合するの

Fig.2 Erythrocyte-erythrocyte Fusion induced by the complexes. A) untreated erythrocytes B) incubated with Chol-containing complexes C) incubated with DOPE-containing complexes

に対し、DOPE を含む複合体は赤血球と凝集体を形成することで毛細血管に一時的に塞栓するが、血管内皮細胞と相互作用することなく肺から消失していくと推察された。両複合体をマウス尾静脈より投与したところ、Chol を含む複合体は DOPE を含む複合体に比べ 10~1000 倍高い発現を示した。また両複合体を赤血球懸濁液と混合した後に静脈内投与したところ、Chol の場合と異なり DOPE を含む複合体では顕著に遺伝子発現が低下した (Fig.3)。以上の結果より、DOPE を含む複合体ではその不安定な脂質構造から静脈内投与後、赤血球同士の融合を引き起こすことで遺伝子導入活性を失うことが示唆された。

肺転移モデルマウスにおける in vivo 遺伝子導入による治療効果：Chol を含む複合体は静脈内投与後肺で特に高い発現を示すことから、複合体による肺癌の in vivo 遺伝子治療への応用が期待される。そこで肺転移モデルマウスを作成し、複合体によるインターフェロン遺伝子導入による治療効果を検討した。各遺伝子のうちインターフェロン β 遺伝子及び pI:pC で有意な結節数の減少が見られた。これらの結果より、DNA-カチオン性リポソーム複合体による癌の in vivo 遺伝子治療の可能性が示された。

Fig.3 In vivo gene expression with pDNA-DOTMA/Chol liposome and pDNA-DOTMA/DOPE liposome complexes pre-incubated with mouse erythrocytes. The complexes were incubated with erythrocyte suspensions at the indicated concentration

【Abstract】 Cationic liposome-mediated transfection is a useful method for in vitro and in vivo gene transfer. However, there is little information on the relationship between physicochemical and structural properties of DNA-cationic liposome complexes and their transfection efficiency. In this study, we have systemically studied the relationship between various properties of DNA-cationic liposome complexes and their transfection efficiency in vivo and in vitro. Our results demonstrated that for both in vitro and in vivo transfection, structural and physicochemical characteristics of the complexes were significantly related to their transfection efficiency. In in vitro transfection, the charge ratio between DNA and cationic liposome significantly affects the release of plasmid DNA complexed with the cationic liposomes from the complexes, which is an important determinant of the optimal charge ratio. For in vivo intravenous transfection, Chol-containing complexes with a higher transfection activity showed a stable lamellar structure and was more stable to the interaction with erythrocytes. DOPE-containing complexes, a less efficient vector, induced the fusion between erythrocytes due to its fusogenic property and lost their transfection activity. These results indicate that the interaction with erythrocytes is an important factor for intravenous gene delivery.

【References】 1) Xu et al. *Biochemistry* **35**, 5616-5623 (1996), 2) F. Sakurai et al. *J Control. Rel.* **66**, 255-269 (2000) 3) F. Sakurai et al. *Gene Therapy* submitted.