

194. 核酸医薬の肺選択的送達技術と肺線維症の治療法の開発

黒崎 友亮

長崎大学 薬学部 実践薬学分野

Key words : 肺線維症, 核酸医薬, ドラックデリバリーシステム

緒言

肺線維症の中でも特発性肺線維症 (IPF) は、指定難病である特発性間質性肺炎の 50%以上を占める最も予後不良の疾患であり、診断確定後の平均生存期間は 3 年間から 5 年間といわれている [1]。ステロイドや数種の免疫抑制薬に一定の増悪抑制効果が認められているものの、現時点では根治的な治療法はない。このため、IPF に対する新規治療技術の開発が望まれている。

これまでに、肺の線維化に transforming growth factor β (TGF- β) や platelet-derived growth factor (PDGF) タンパク発現の上昇が関与していることが知られており、これらのタンパク発現を抑制することで肺の線維化を改善できると考えられる [2]。そこで、著者は核酸医薬であるヘアピン型 RNA 発現プラスミド (pshRNA) に注目した。pshRNA は細胞内で標的遺伝子に対する shRNA を発現し、標的遺伝子のタンパク発現を抑制することで、様々な疾患に対して高い有用性が期待されている。一方で、pshRNA などの核酸医薬を生体内へ投与すると血液中の酵素で速やかに分解され、十分な効果が得られないことが知られている。このため、核酸医薬を安定に細胞内へ導入することが可能なドラックデリバリーシステム (DDS) の開発研究が盛んに行われている。

著者は電荷を持った高分子や脂質を用いて特定の臓器へ効率的に核酸医薬を送達することができる DDS 技術の開発を行ってきた [3, 4]。中でも、DNA に正電荷高分子である polyethylenimine (PEI) と、正電荷脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA) を組み合わせたリポポリプレックスが肺で高い遺伝子発現効果を示すことを見出した [5]。さらに、そのリポポリプレックスに負電荷脂質である N-lauroylsarcosine (LS) を添加することで、毒性が軽減され、かつ肺の遺伝子導入効率が劇的に上昇することを見いだした [6]。

そこで本研究では、肺線維症治療への応用を目的として構成成分の最適化を行い、肺に選択的に核酸医薬を送達することができる肺指向型リポポリプレックスの開発を行った。

方法

1. 肺指向型リポポリプレックスの調製

核酸医薬のモデルとしてホタルルシフェラーゼをコードした pDNA を用いた。肺指向型リポポリプレックスの構成成分として、カチオン性高分子である PEI、poly-L-lysine (PLL)、poly-L-arginine (PLA)、dendrigrft-poly-L-lysine (DGL)、カチオン性脂質である DOTMA、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)、 3β -[N-(N', N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol (DC-Chol) を、アニオン性脂質である LS を用いた。各成分の混合比は pDNA のリン酸基 (P) とカチオン性高分子のアミノ基 (N_1)、カチオン性脂質のアミノ基 (N_2)、LS のカルボキシル基 (C) のモル比で計算した。pDNA に様々なカチオン性高分子を $P : N_1 = 1 : 2$ になるように添加し、15 分室温でインキュベートした。また、この複合体にカチオン性脂質を $P : N_1 : N_2 = 1 : 2 : 2$ になるように添加し、さらに 15 分室温でインキュベートした。最後に LS を $P : N_1 : N_2 : C = 1 : 2 : 2 : 2$ になるように添加し、室温で 15 分間インキュベートすることで肺指向型リポポリプレックスを調製した。

2. 物理化学的性質の評価

作製した肺指向型リポポリプレックスの粒子径と表面電荷を測定した。また、肺指向型リポポリプレックス内への pDNA の封入をアガロースゲル電気泳動で確認した。

3. 肺指向型リポポリプレックスの細胞内取り込みメカニズムの評価

ヒト肺癌細胞株である A549 細胞を用いて PEI と DOTMA を用いた肺指向型リポポリプレックス (pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体) の細胞内取り込みメカニズムを評価した。A549 細胞を 24 時間の前培養の後に 37°C または 4°C 条件下で pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体と 2 時間インキュベートし、22 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。また、fluorescein isothiocyanate で蛍光標識した PEI (FITC-PEI) を用いて pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体を作製し、少量の 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rh-DOPE) を加えて脂質層を蛍光標識した。この蛍光標識した pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体を A549 細胞に添加し、細胞内の蛍光像を観察した。細胞の核は Hoechst33342 を用いて染色した。

4. 肺指向型リポポリプレックスの肺における遺伝子導入効果の評価

実験動物として 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。動物実験は長崎大学動物実験規則に従ってプロトコールを作成し、長崎大学動物実験委員会によって承認を受けた後に行った。様々な組み合わせで調製した肺指向型リポポリプレックスをマウスへ尾静脈内投与し、6 時間後に肺を摘出した。肺のホモジネートを遠心し、上清のルシフェラーゼ活性を測定した。

5. pshRNA を内包した肺指向型リポポリプレックスによる遺伝子発現抑制効果の評価

マウス肺癌細胞株である lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を用いた。LLC 細胞を TGF- β に対する pshRNA と DGL, DOTMA, LS からなる肺指向型リポポリプレックスと 2 時間インキュベートし、46 時間後の TGF- β の mRNA 発現量の変化を Realtime PCR 法を用いて測定した。

結果および考察

1. 肺指向型リポポリプレックスの調製と物理化学的性質の評価

pDNA に様々なカチオン性高分子とカチオン性脂質、LS を段階的に混合し、肺指向型リポポリプレックスを調製した (図 1)。調製された肺指向型リポポリプレックスの粒子径と表面電荷を測定した結果、全ての組み合わせにおいて粒子径が約 180~200 nm のカチオン性の微粒子が形成された。また、肺指向型リポポリプレックスをアガロースゲルで電気泳動した結果、pDNA の流出は認められなかった。以上より、安定に pDNA を内包した肺指向型リポポリプレックスの調製に成功した。

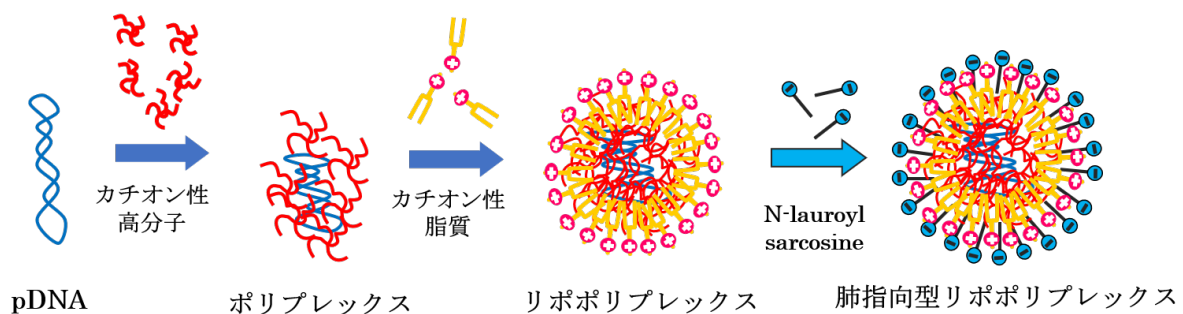


図 1. 肺指向型リポポリプレックスの調製

2. 肺指向型リポポリプレックスの遺伝子導入メカニズムの評価

非ウイルス性の遺伝子導入ベクターの多くはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれることが知られている [7]。一方で、肺指向型リポポリプレックスは微粒子の外側に脂質層を有していると考えられるため、エンドサイトーシスだけでなく、膜融合で細胞内へ取り込まれる可能性もある。そこで、肺指向型リポポリプレックスの細胞内取り込みメカニズムの評価を行った。pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体を 37°C またはエンドサイトーシスを阻害する 4°C 条件下で A549 細胞とインキュベートし、遺伝子導入効率を評価した。この結果、pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体の遺伝子導入効率は 4°C 条件下で顕著に低下した (図 2)。また、FITC で PEI を、脂質層を Rh-DOPE で蛍光標識した pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体を A549 細胞に添加し、細胞内の蛍光像を観察した。pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体の細胞内取り込みに膜融合が関与している場合には、膜融合の際に脂質層の Rh-DOPE が細胞膜に移行し、FITC-PEI とは異なった細胞内挙動を示すと考えられる。しかしながら、図 3 に示すように FITC-PEI と Rh-DOPE の蛍光は細胞内で共局在しており、細胞膜における Rh-DOPE の蛍光は観察されなかった。以上のことから、肺指向型リポポリプレックスは膜融合ではなく、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれていることが示唆された。

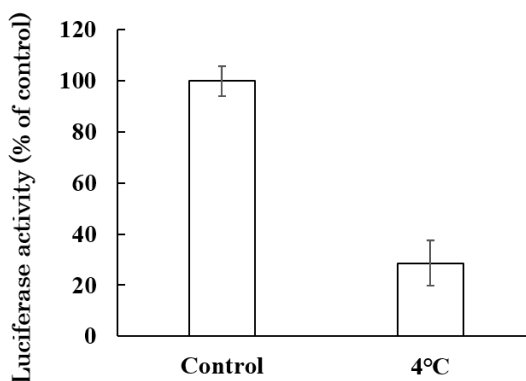


図 2. 肺指向型リポポリプレックスの遺伝子導入効果に及ぼす温度の影響

pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体を 37°C または 4°C 条件下で A549 細胞とインキュベートし、遺伝子導入効率を評価した。データは平均±標準誤差で示した。

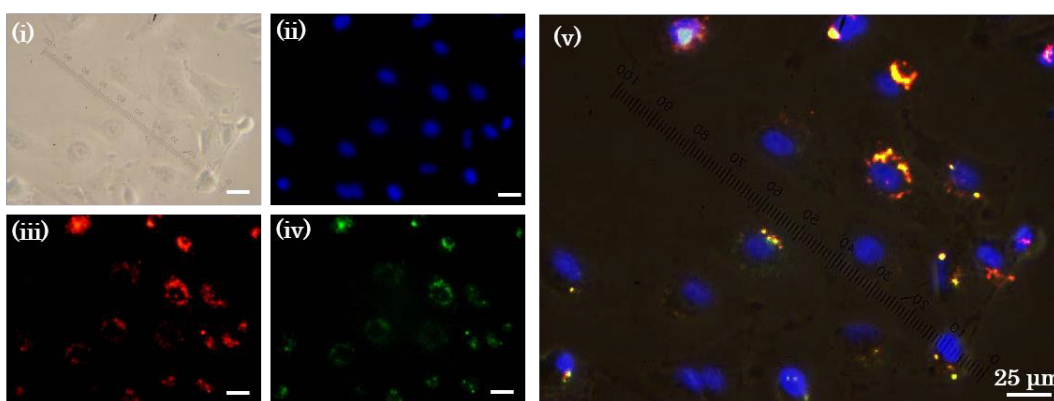


図 3. 蛍光標識した肺指向型リポポリプレックスの細胞内挙動の観察

蛍光標識した pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体と A549 細胞をインキュベートし、Hoechst33342 による核染色の後に、細胞内の蛍光像を観察した。

- (i) 細胞の位相差顕微鏡観察画像、(ii) Hoechst33342 の蛍光、(iii) Rh-DOPE の蛍光、(iv) FITC-PEI の蛍光、(v) i-iv の合成画像。

3. 肺指向型リポポリプレックスの構成成分の最適化

著者はこれまでに pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体が肺で非常に高い遺伝子発現を示すことを見いだした。また、その構成成分の比率を変えて、遺伝子導入効果を評価し、多変量解析を行った結果、肺の高い遺伝子発現には LS が大きく寄与していることを明らかにした [6]。一方で、pDNA/PEI/DOTMA/LS 複合体の構成成分の PEI は生体内で非分解性の高分子であり、人体への使用は困難であると考えられる。そこで、PEI に変わる高分子として生体分解性の PLL や PLA、DGL を検討した。pDNA にカチオン性高分子として PEI または PLL、PLA、DGL のいずれかと DOTMA、LS を加えた肺指向型リポポリプレックスを調製した。これらの肺指向型リポポリプレックスをマウスへ静脈内投与し、肺の遺伝子発現効果を評価したところ、PEI を用いた肺指向型リポポリプレックスと比較して、PLL と PLA を用いた肺指向型リポポリプレックスでは遺伝子導入効果が顕著に低下した。一方で、DGL を用いた肺指向型リポポリプレックスは PEI を用いた肺指向型リポポリプレックスに匹敵する遺伝子導入効果を示した。前述の通り、肺指向型リポポリプレックスは細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれる可能性が高い。PEI は高い緩衝能によってエンドソームを不安定化し、pDNA をエンドソームから細胞質へ効率的に放出することが知られている [8]。また、DGL についても PLL と比較して緩衝能が高いことが報告されている [9]。PEI と DGL を用いた肺指向型リポポリプレックスの高い遺伝子発現には、これらの高分子の高い緩衝能が寄与していると考えられる。そこで、肺指向型リポポリプレックスに用いるカチオン性高分子としては、生分解性でありながら PEI に匹敵する高い遺伝子発現効果を示した DGL を選択した。

次に、肺指向型リポポリプレックスに用いるカチオン性脂質の選択を行った。pDNA とカチオン性高分子として DGL、カチオン性脂質として DOTMA または DOTAP、DC-Chol のいずれかと LS を添加し、肺指向型リポポリプレックスを調製した。調製した肺指向型リポポリプレックスをマウスへ静脈内投与し、肺の遺伝子発現効果を評価した。この結果、DOTMA を用いた肺指向型リポポリプレックスと比較して、DOTAP と DC-Chol を用いた肺指向型リポポリプレックスでは肺における遺伝子導入効果が顕著に低下した。特に DC-Chol を用いた場合の遺伝子導入効果は DOTMA や DOTAP を用いた肺指向型リポポリプレックスと比較して 1000 分の 1 から 100 分の 1 にまで低下したことから、カチオン性脂質におけるグリセロ脂質構造が重要な役割を担っている可能性がある。また、DOTMA と比較して DOTAP を用いた肺指向型リポポリプレックスの遺伝子導入効果が低いことから、脂質構造中のエステル結合にも何らかの影響があると考えている。以上の検討から、肺指向型リポポリプレックスのカチオン性脂質として DOTMA を選択した。

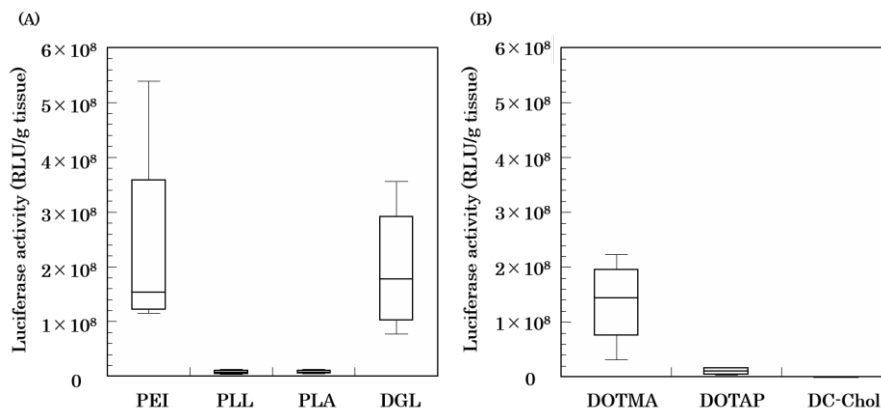


図 4. 肺指向型リポポリプレックスの遺伝子導入効果に及ぼすカチオン性高分子 (A) とカチオン性脂質 (B) の影響

- (A) pDNA にカチオン性高分子として PEI または PLL、PLA、DGL のいずれか、カチオン性脂質として DOTMA とアニオン性脂質である LS を加えた肺指向型リポポリプレックスをマウスへ静脈内投与し、6 時間後の肺における遺伝子発現量を評価した。
- (B) pDNA とカチオン性高分子として DGL、カチオン性脂質として DOTMA または DOTAP、DC-Chol のいずれか、アニオン性脂質として LS を混合し、肺指向型リポポリプレックスを調製した。肺指向型リポポリプレックスをマウスへ静脈内投与し、6 時間後の肺における遺伝子発現量を評価した。

4. 肺指向型リポポリプレックスの肺線維症への応用について

TGF- β に対する pshRNA と DGL、DOTMA、LS からなる肺指向型リポポリプレックスをマウス肺癌細胞株である LLC 細胞に導入した結果、TGF- β の mRNA 量が未処理の細胞と比較して顕著に低下することを確認した。さらに、ddY 系雄性マウスにブレオマイシン 8 mg/kg を経肺投与することによって、肺線維症モデルマウスの構築にも成功した。

現在は、肺指向型リポポリプレックスを用いて肺線維症モデルマウスに TGF- β に対する pshRNA を導入する治療実験を行っている。

文 献

- 1) Fernández Fabrellas E, Peris Sánchez R, Sabater Abad C, Juan Samper G. Prognosis and Follow-Up of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Med Sci (Basel)*. 2018 Jun 14;6(2). pii: E51. PMID: 29904028 DOI: 10.3390/medsci6020051
- 2) Chanda D, Otoupalova E, Smith SR, Volckaert T, De Langhe SP, Thannickal VJ. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol Aspects Med*. 2019 Feb;65:56-69. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30130563 DOI: 10.1016/j.mam.2018.08.004
- 3) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Niidome T, Kodama Y, Nakagawa H, To H, Sasaki H. Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials*. 2009 May;30(14):2846-53. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19232715 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.055
- 4) Kurosaki T, Kitahara T, Kawakami S, Nishida K, Nakamura J, Teshima M, Nakagawa H, Kodama Y, To H, Sasaki H. The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule. *Biomaterials*. 2009 Sep;30(26):4427-34. Epub 2009 May 26. PMID: 19473696 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.041
- 5) Matsumoto M, Kishikawa R, Kurosaki T, Nakagawa H, Ichikawa N, Hamamoto T, To H, Kitahara T, Sasaki H. Hybrid vector including polyethylenimine and cationic lipid, DOTMA, for gene delivery. *Int J Pharm*. 2008 Nov 3;363(1-2):58-65. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18687391 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.010
- 6) Kurosaki T, Kishikawa R, Matsumoto M, Kodama Y, Hamamoto T, To H, Niidome T, Takayama K, Kitahara T, Sasaki H. Pulmonary gene delivery of hybrid vector, lipopolyplex containing N-lauroylsarcosine, via the systemic route. *J Control Release*. 2009 Jun 19;136(3):213-9. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19233236 DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.02.005
- 7) Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*. 2005 Dec;12(24):1734-51. PMID: 16079885 DOI: 10.1038/sj.gt.3302592
- 8) Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med*. 2001 Mar-Apr;3(2):135-44. PMID: 11318112 DOI: 10.1002/jgm.173
- 9) Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H. Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014 Aug;87(3):472-9. Epub 2014 May 9. PMID: 24813391 DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.04.013