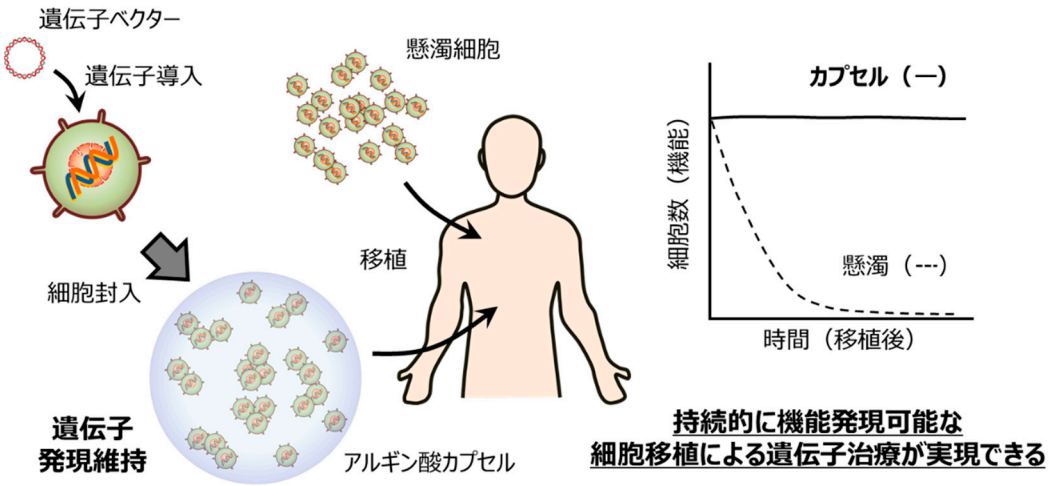
112　細胞を利用した持続型遺伝子治療システムの開発	草森　浩輔

【目的】体内に直接遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療法は、遺伝子発現期間の制御が困難であることや、生体に対して遺伝子を直接導入することによる過剰な免疫応答の危険性など、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。こうした *in vivo* 遺伝子治療法における問題点を解決する方法として、生理活性物質をコードする遺伝子を導入した細胞を生体に移植する治療法が注目されている。この細胞移植による遺伝子治療法は、患者の体内に遺伝子を直接導入する必要がなく、細胞を一度移植するだけで持続的に生理活性物質を放出できることから、細胞を生理活性物質の放出プラットフォームとした効率的な疾患治療が可能である。しかしながら、移植した細胞の大半は移植直後に死滅することから、実際にはその治療効果は一時的であり、それぞれのタンパク質を投与するよりもわずかに長い期間作用する程度に過ぎないことが問題とされる。そこで本研究では、細胞における安定な遺伝子発現とアルギン酸カプセルの利用により、生体に移植した細胞が持続的に遺伝子機能を発現可能な細胞介在型遺伝子治療システムの開発を試みた。

【方法】マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に対して、NanoLuc luciefrase (Nluc) 遺伝子をコードする pEBMulti-Nluc プラスミドをリポフェクション法により導入し、C3H10T1/2/Nluc 細胞を樹立した。次に、1%アルギン酸ナトリウム溶液に懸濁した C3H10T1/2/Nluc 細胞を 10%塩化カルシウム溶液に添加することで、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルを作製した。カプセル内への細胞封入の確認を目的に、C3H10T1/2 細胞を赤色蛍光色素 DiI で染色し、凍結切片を作製後、顕微鏡を用いて観察した。さらに、カプセル内へ封入する細胞数の最適化を目的に、様々な細胞数の C3H10T1/2/Nluc 細胞をアルギン酸カプセルに封入し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。最後に、移植細胞の生存期間の評価を目的に、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルまたは懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞を C3H/He マウスの腹腔内に投与し、経時的に血中のルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果】凍結切片画像の観察から、DiI 標識 C3H10T1/2 細胞はアルギン酸カプセル内に安定に封入されていることが示された。次に、C3H10T1/2/Nluc 細胞を 10^2～10^5 cells/capsule でアルギン酸カプセルに封入した結果、10^3～10^4 cells/capsule において一定のルシフェラーゼ活性を示すことが明らかになった。懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞を移植したマウスの血中ルシフェラーゼ活性は時間とともに減少した。これに対し、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルを移植後の血中ルシフェラーゼ活性は 12 日間ほぼ一定であった。以上のことから、細胞における安定な遺伝子発現とアルギン酸カプセルの利用により、持続的に遺伝子機能を発現可能な細胞介在型遺伝子治療を実現できることが示された。

細胞における安定な遺伝子発現とカプセル封入による持続的に機能発現可能な細胞介在型遺伝子治療



112. 細胞を利用した持続型遺伝子治療システムの開発

草森　浩輔

東京理科大学 薬学部 生物薬剤学研究室

Key words：遺伝子治療，細胞移植，遺伝子導入，カプセル化

緒　言

遺伝子治療法は、単回の遺伝子導入で長期的な効果が得られる点において優れた治療法である［1］。しかしながら、体内に直接遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療法は、遺伝子機能の発現効率が低いことや発現期間の制御が困難であること、さらには生体に対して遺伝子を直接導入することによる過剰な免疫応答の危険性など、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。こうした *in vivo* 遺伝子治療法における問題点を解決する方法として、生理活性物質をコードする遺伝子を導入した細胞を生体に移植する治療法が注目されている［2］。この細胞移植による遺伝子治療法は、患者の体内に遺伝子を直接導入する必要がなく、細胞を一度移植するだけで持続的に生理活性物質を放出できることから、細胞を生理活性物質の放出プラットフォームとした効率的な疾患治療が可能である。これまでに、抗腫瘍活性を有するインターフェロンベータ発現間葉系幹細胞を担癌マウスに移植することによるがん治療や、造血因子のエリスロポエチン発現筋芽細胞を貧血マウスに移植することによる貧血治療の成功例などが報告されている［3，4］。しかしながら、これらの治療効果は一時的であり、それぞれのタンパク質を投与するよりもわずかに長い期間作用する程度に過ぎないことが問題として指摘されている。その理由として、細胞移植による遺伝子治療法においては、大半の細胞が移植直後に死滅することが挙げられる。したがって、疾患治療に必要な生理活性物質を長期的に患者へ供給するためには、移植細胞において安定に遺伝子を発現させることと、生存率および生存期間を向上する必要があると考えられる。移植細胞の生存期間の延長を目的とした数々の検討は国内外で試みられており、中でも細胞のカプセル化は極めて優れた方法であることが実証されている［5］。中でも、アルギン酸カプセルはアルギン酸のカルボキシル基にカルシウムイオンが結合して形成される不溶性ポリマーを応用した構造体であり、調製時の操作が極めて簡便であるだけでなく、細胞や化合物をカプセル内に安定に固定できる特徴を有する。そこで本研究では、安定に目的遺伝子を発現する細胞を樹立するとともに、細胞封入アルギン酸カプセルが生体内で長期的に生理活性物質を放出可能であることを実証することで、従来の *in vivo* 遺伝子治療法と比較して安全性が高く、生体に移植した細胞が持続的に遺伝子機能を発現可能な遺伝子治療システムの開発を試みた。

方　法

1.　細胞の培養

マウス間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞は賀川裕貴博士（前・京都薬科大学）より供与いただき、15% FBS、0.15%炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で培養した。NanoLuc luciferase（Nluc）を安定発現する C3H10T1/2/Nluc 細胞は、Lipofectamine 3000 を用いて、C3H10T1/2 細胞に pEBMulti-Nluc プラスミドを遺伝子導入した後、1,500 μg/mL G418 で選択することにより樹立した。C3H10T1/2/Nluc 細胞は C3H10T1/2 細胞と同様の条件で培養した。

2. 適切な強度を有するアルギン酸カプセルの調製

Fluorescein isothiocyanate-dextran（FD）4 を 10 mg/mL となるように水で溶解し、続いて 0.25、0.5、1%となるようにアルギン酸ナトリウム（MP Biomedicals 社）を溶解させることで FD4 含有アルギン酸ナトリウム溶液を調製した。FD4 含有アルギン酸ナトリウム溶液 10 μL をピペットマンで採取し、1、2.5、5、10%の塩化カルシウム溶液に滴下することで FD4 封入アルギン酸カプセルを作製した。その後、カプセルの形状を顕微鏡で確認した。

3. 様々な密度で細胞を封入したアルギン酸カプセルにおける経時的な細胞数の評価

C3H10T1/2/Nluc 細胞を 1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5 cells/capsule となるように 1%アルギン酸ナトリウム溶液で懸濁し、それぞれ 10 μL を 10%塩化カルシウム溶液に滴下することでカプセル化した。作製した細胞封入アルギン酸カプセルを細胞培養プレートで培養し、培地を 2 日ごとに交換した。培地交換の際に、回収した培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定することで、細胞の生存率を評価した。

4. DiI 標識 C3H10T1/2 細胞封入アルギン酸カプセルの凍結切片作製

C3H10T1/2 細胞を 10 μM の赤色蛍光色素 DiI で標識した。DiI 標識 C3H10T1/2 細胞を 5×10^3 cells/capsule となるように上記と同様の方法でアルギン酸カプセルに封入した。得られた細胞封入カプセルを包埋容器に移し、Tissue-Tek O.C.T. Compound を流し込んだ後、液体窒素を用いて凍結させた。その後、クライオスタットを用いて凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡を用いて DiI 標識 C3H10T1/2 細胞由来の赤色蛍光を観察した。

5. マウスに移植した細胞封入アルギン酸カプセルにおける細胞の生存率評価

C3H10T1/2/Nluc 細胞を 5×10^4 cells/capsule となるようにアルギン酸カプセルに封入し、10 個のカプセルを C3H/He マウスの腹腔内に移植した。対照群として、C3H10T1/2/Nluc 細胞懸濁液を 5×10^5 cells/100 μL となるように腹腔内に投与した。その後、経日的に血中ルシフェラーゼ活性を測定した。動物実験は東京理科大学薬学部の動物実験実施規程に則ってプロトコルを作成し、動物実験委員会によって承認を受けて実施した。

6. 統計処理

実験結果は、Student's t-test により有意差検定を行い、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

結　果

1. アルギン酸カプセルの形状

様々な濃度のアルギン酸ナトリウムおよび塩化カルシウムで FD4 封入アルギン酸カプセルを作製したところ、それぞれの濃度の上昇に伴い明瞭な形状のアルギン酸カプセルが得られた（図 1）。そこで、細胞をカプセル内に安定に封入するために、最も高い強度のカプセルが得られた 1%アルギン酸ナトリウム溶液および 10%塩化カルシウム溶液の条件を選択した。

2. 様々な細胞密度で封入したアルギン酸カプセルにおける細胞数の変化

1×10^2および 1×10^3 cells/capsule で封入した場合、C3H10T1/2/Nluc 細胞由来のルシフェラーゼ活性は培養開始から約 7 日間まで時間の経過とともにやや増大する傾向が見られ、その後一定のルシフェラーゼ活性を示した。一方、1×10^4および 1×10^5 cells/capsule で封入した C3H10T1/2/Nluc 細胞由来のルシフェラーゼ活性は時間の経過とともに減少し、その後一定のルシフェラーゼ活性を示した。いずれの場合も、最終的には 1×10^3～1×10^4 cells/capsule に相当するルシフェラーゼ活性が維持された（図 2）。

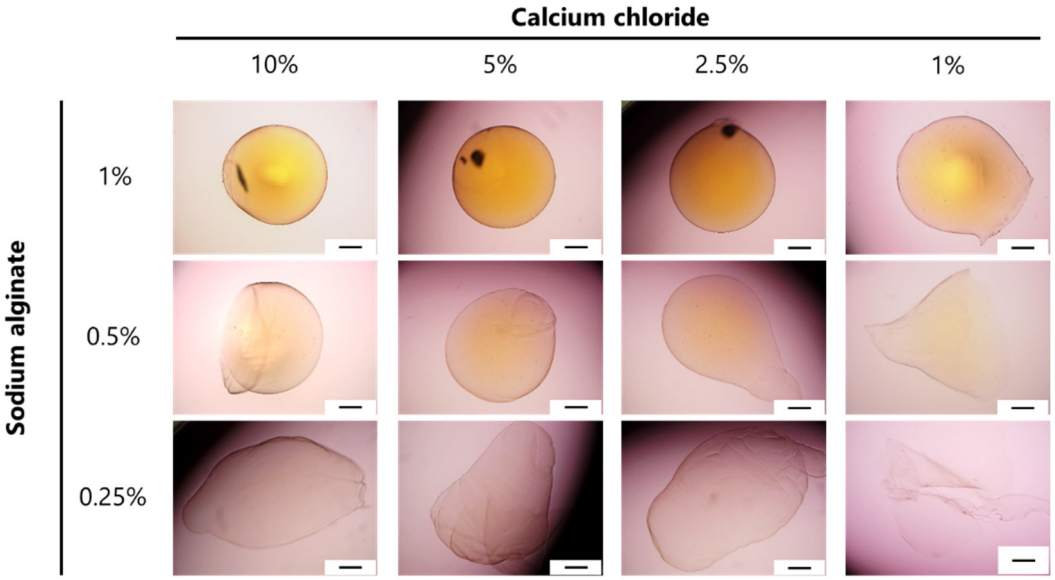


図 1. 様々な濃度のアルギン酸ナトリウム溶液および塩化カルシウム溶液で調製した FD4 含有アルギン酸カプセルの形状

0.25、0.5、1%のアルギン酸ナトリウム溶液および 1、2.5、5、10%の塩化カルシウム溶液で調製したアルギン酸カプセルの形状。カプセル内には FD4 を内包した。スケールバーは 500 μm。

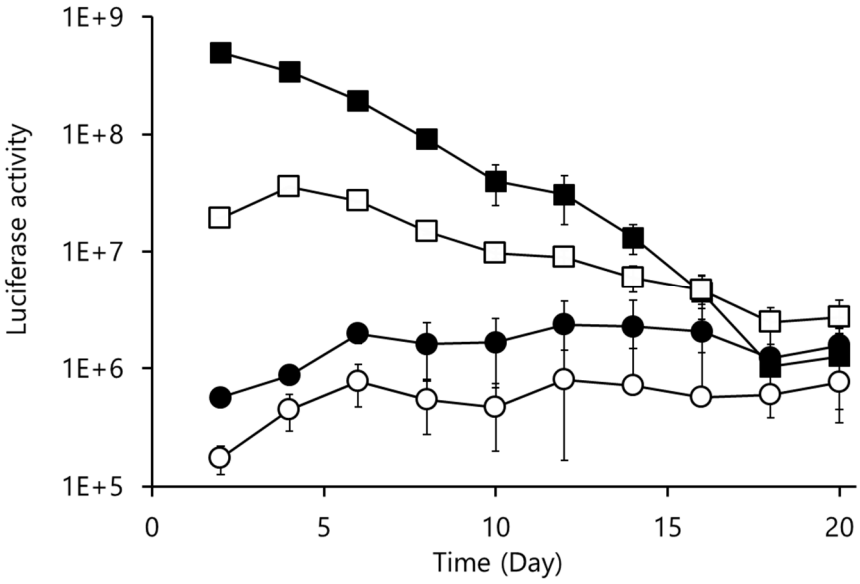


図 2. 様々な細胞数でアルギン酸カプセルに封入した C3H10T1/2/Nluc 細胞のルシフェラーゼ活性の経時変化

C3H10T1/2/Nluc 細胞を 1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5 cells/capsule となるようにアルギン酸カプセルに封入した。2 日おきに培地交換を行い、回収した培養上清中のルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。

○：1×10^2 cells/capsule、●：1×10^3 cells/capsule、□：1×10^4 cells/capsule、■：1×10^5 cells/capsule。

実験結果は 4 サンプルの平均（±SD）で示した。

3. アルギン酸カプセル封入細胞の凍結切片

DiI 標識 C3H10T1/2 細胞を 5×10^3 cells/capsule となるようにアルギン酸カプセルに封入し、凍結切片を作製した結果、カプセル内に細胞由来の赤色蛍光が点在する様子が観察された（図 3）。

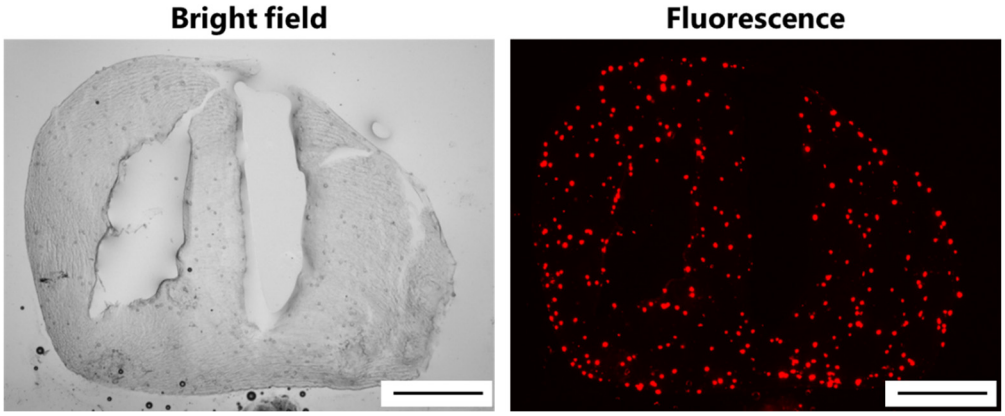


図 3. DiI 標識 C3H10T1/2 細胞封入アルギン酸カプセルの凍結切片画像
DiI 標識 C3H10T1/2 細胞を 5×10^3 cells/capsule となるようにアルギン酸カプセルに封入した。切片の観察には蛍光顕微鏡を用いた。スケールバーは 500 μm。

4. マウスに移植した C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルの細胞生存率

Hanks 液で懸濁した C3H10T1/2/Nluc 細胞を腹腔内に投与後のマウスの血中ルシフェラーゼ活性は、時間の経過とともに減少した。一方、C3H10T1/2/Nluc 細胞を封入したアルギン酸カプセルをマウスの腹腔内に投与後のマウスの血中のルシフェラーゼ活性は移植後から 12 日間ほぼ一定の値を示し、移植から 4 日目以降は懸濁細胞と比較して有意に高い血中ルシフェラーゼ活性を示した（図 4）。

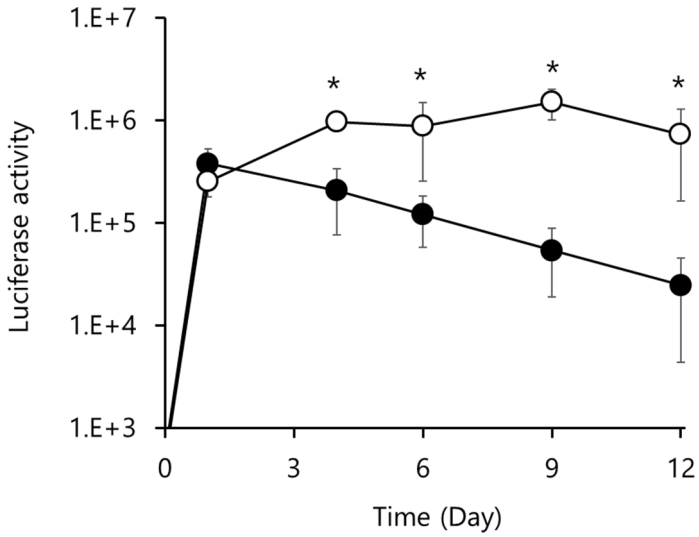


図 4. C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルを移植したマウスの血中ルシフェラーゼ活性の経時変化
C3H10T1/2/Nluc 細胞を 5×10^4 cells/capsule となるように封入した 10 個のアルギン酸カプセルと 5×10^5 cells/100 μL の C3H10T1/2/Nluc 細胞を C3H/He マウスの腹腔内にそれぞれ投与し、経時的にマウスの血中ルシフェラーゼ活性を測定した。○：C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセル、●：懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞。実験結果は 4 匹のマウスの平均（±SD）で示した。*$p < 0.05$（懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞との比較）。

考　察

本研究では、Nluc 遺伝子を安定に発現させた C3H10T1/2/Nluc 細胞を樹立し、細胞の封入に最適なアルギン酸カプセルの調製法を確立することで、マウスに移植後、細胞からタンパク質を安定かつ持続的に産生するシステムを開発した。アルギン酸カプセルの強度は、使用するアルギン酸ナトリウムの分子量やマンヌロン酸とグルロン酸の組成比によっても大きく異なり、本研究で利用した MP Biomedicals 社以外の会社で販売されているアルギン酸ナトリウムでは、得られるカプセルの強度が異なることを明らかにしている。したがって、再現性の高い細胞カプセル化を実現するためには、アルギン酸カプセルの強度とアルギン酸ナトリウムの純度や分子量、粘度等の物性値との相関を明らかにする必要がある。また、アルギン酸カプセルに封入した細胞由来のルシフェラーゼ活性が培養時間とともに一定値に収束したことから、カプセルに封入可能な細胞数はカプセルのサイズにより規定されることが推察された。図 3 の結果において、収束細胞数に近いと想定される 5×10^3 cells/capsule で封入した細胞の周りには十分な空間が残されていることから、カプセル内において十分な空間を細胞に提供することが適切な細胞数の維持に重要であると考えられる。また、カプセル化細胞を移植したマウスでは、移植後 12 日までほぼ一定の血中ルシフェラーゼ活性が得られたことから、本カプセル技術は細胞介在型遺伝子治療に対して極めて有用な技術であることが示唆された。今後、細胞介在型遺伝子治療の臨床応用に向けた取り組みを試みる予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に関しまして、東京理科大学薬学部生物薬剤学研究室の西川元也教授ならびに鈴木凌太氏に深く御礼申し上げます。

文　献

1) Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. EMBO Mol Med. 2013 Nov;5(11):1642-61. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24106209 DOI: 10.1002/emmm.201202287

2) Mohammadian M, Abasi E, Akbarzadeh A. Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016 Aug;44(5):1206-11. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26148175 DOI: 10.3109/21691401.2015.1029624

3) Orive G, De Castro M, Ponce S, Hernández RM, Gascón AR, Bosch M, Alberch J, Pedraz JL. Long-term expression of erythropoietin from myoblasts immobilized in biocompatible and neovascularized microcapsules. Mol Ther. 2005 Aug;12(2):283-9. PMID: 15935736 DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.04.002

4) Xie C, Xie DY, Lin BL, Zhang GL, Wang PP, Peng L, Gao ZL. Interferon-β gene-modified human bone marrow mesenchymal stem cells attenuate hepatocellular carcinoma through inhibiting AKT/FOXO3a pathway. Br J Cancer. 2013 Sep 3;109(5):1198-205. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23887606 DOI: 10.1038/bjc.2013.422

5) Hashemi M, Kalalinia F. Application of encapsulation technology in stem cell therapy. Life Sci. 2015 Dec 15;143:139-46. Epub 2015 Nov 7. PMID: 26556151 DOI: 10.1016/j.lfs.2015.11.007