

論文内容の要旨

論文題目 **Impact of polyplex micelles installed with cyclic RGD peptide as ligand on gene delivery to vascular lesions**

和訳 環状型 RGD ペプチドをリガンドとして装着した高分子ナノミセルが、血管疾患への遺伝子導入に与える影響

指導教員 宮田 哲郎 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

加賀谷 英生

序文

遺伝子治療を成功させるには、効果的な遺伝子デリバリーシステムの構築が必須である。近年、ウイルスベクターに代わる候補として高分子ナノミセルが注目を集めるようになってきた。高分子ナノミセルはその特徴的な構造がゆえ、生体適合性、低毒性といった特性を持つ。また、表面にリガンドと呼ばれるペプチドを装着させることにより、様々な特性を加えることが可能である。今回、そのリガンドとして環状 RGD ペプチド(cRGD)を選択した (図 1)。

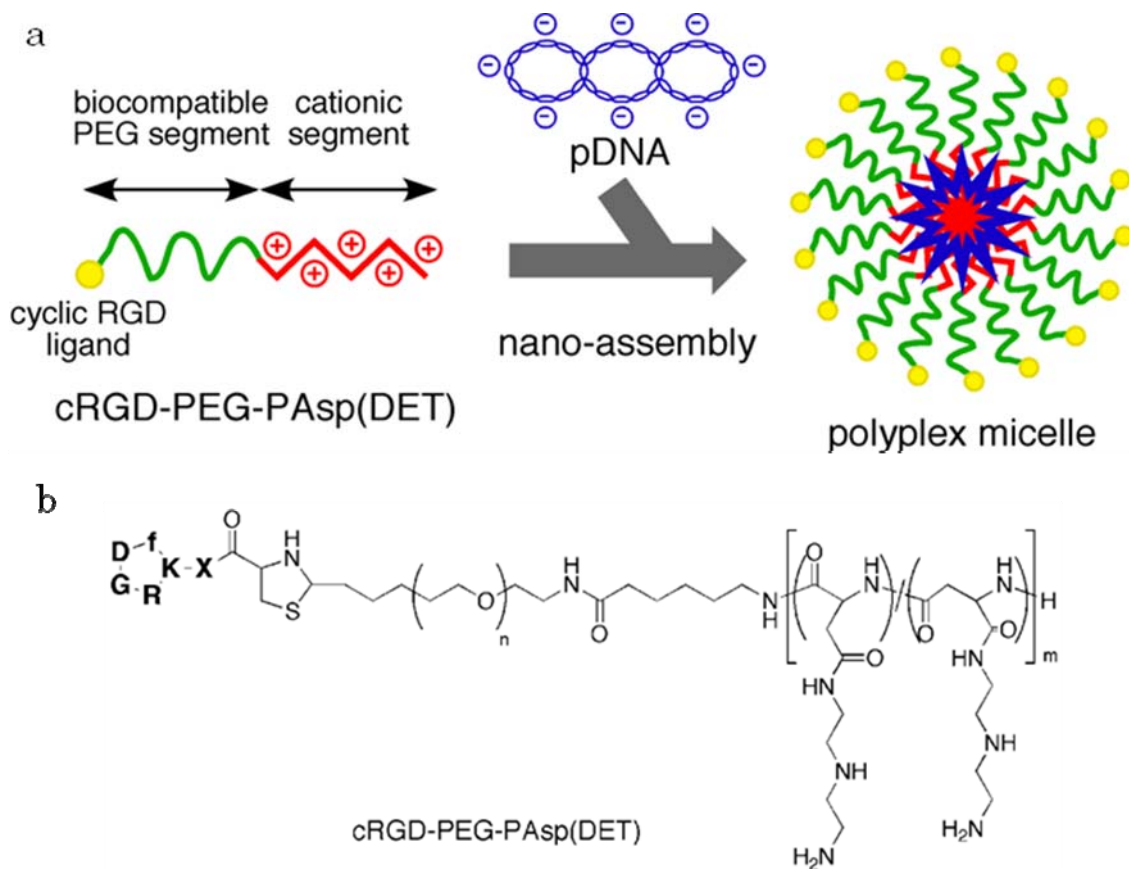


図 1. cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルのシェーマ(a)と化学構造(b)

cRGD は、血管内膜肥厚に関与するとされる $\alpha v\beta 3$ ならびに $\alpha v\beta 5$ インテグリンを選択的に認識する。したがって、cRGD をリガンドとして装着した高分子ナノミセルは、血管病変をターゲットとした遺伝子デリバリーシステムのベクターとして働くことが期待できる。そこで、今回、この cRGD 装着高分子ナノミセルの血管病変に対する遺伝子導入効率評価を目的とした研究を進めることとした。

方法および結果

培養細胞を用いた検討

In vitro での HUVEC ならびに VSMC に対する遺伝子導入

ルシフェラーゼタンパク発現プラスミド DNA (pDNA) と cRGD-PEG-PAsp(DET) を様々な N/P 比 (ポリマーに含まれるアミノ基のモル数と、pDNA に含まれるリン酸のモル数の比) でコンプレックス形成させ、HUVEC ならびに VSMC に投与した。遺伝子発現量は投与より 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定することで評価した。また、PEG-PAsp(DET) に対しても同様の方法で実験を行いコントロールとした。HUVEC に対する遺伝子導入実験では、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセルを用いたルシフェラーゼ活性は、コントロールと比べ、N/P 比 5 および 10 において有意に高かった (図 2 a)。同様に、VSMC に対する遺伝子導入実験では、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセルを用いたルシフェラーゼ活性は、コントロールと比べ、N/P 比 4 および 5 において有意に高かった (図 2 b)。

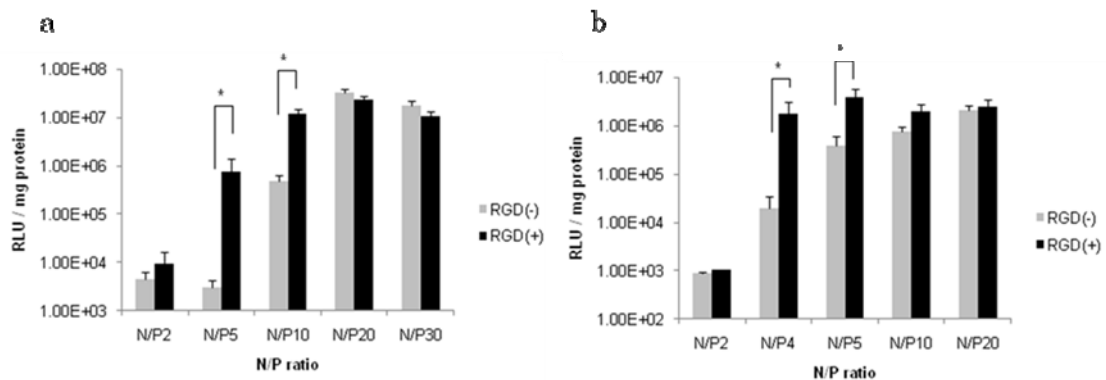


図 2. In vitro でのルシフェラーゼ遺伝子発現の評価 HUVEC (a)ならびに VSMC(b)に対し様々な N/P 比の cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルならびに PEG-PAsp(DET)ミセルを導入した。遺伝子発現は導入後 24 時間でのルシフェラーゼ活性の測定にて評価した。数値は平均値±標準誤差 (* $P < 0.05$)。RGD(-) = PEG-PAsp(DET)ミセル。RGD(+) = cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル。

高分子ナノミセルの細胞内取り込み

培養細胞への cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセルの取り込み量を評価するために、Cy5 を標識した pDNA と cRGD-PEG-PAsp(DET) から形成されるミセル (N/P 比 5) を調製し、HUVEC ならびに VSMC に投与した。投与後 0.5, 1, 3, 6 時間にて、細胞内に取り込まれた Cy5 の蛍光強度をフローサイトメトリーにて定量した。PEG-PAsp(DET) に対しても同様の方法で実験を行いコントロールとした。0.5, 1, 3 時間後の測定において、HUVEC, VSMC とともに、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセルを投与された群はコントロールと比較して有意に Cy5 蛍光強度が高かった (図

3 a, b)。

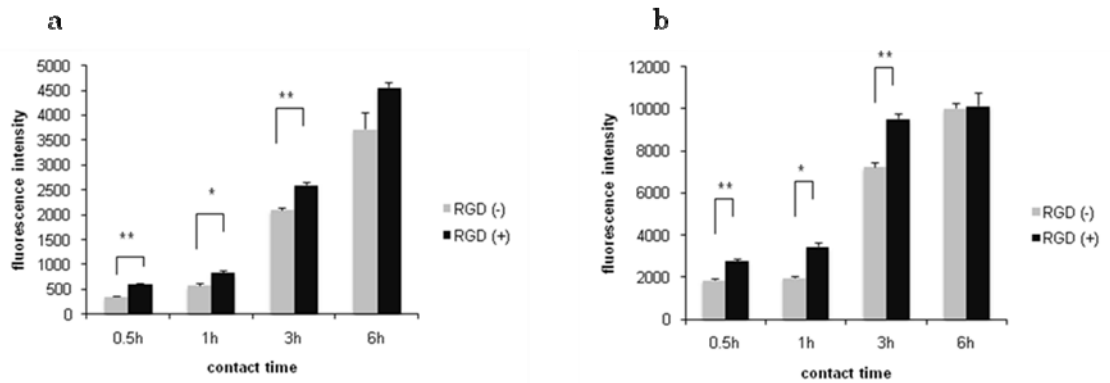


図 3. ミセルの細胞取り込みの評価(N/P 比 5) Cy5-pDNA と cRGD-PEG-PAsp(DET) から形成されるミセル(N/P 比 5) を調製し重合し、HUVEC (a) ならびに VSMC(b) に投与した。同様の方法で PEG-PAsp(DET) ミセルを調製、投与しそれをコントロールとした。両者を様々な培養時間にて測定し、平均蛍光強度を比較した。数値は平均値±標準誤差 (* P < 0.05, ** P < 0.01)。 RGD(-) = PEG-PAsp(DET) ミセル。RGD(+) = cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセル。

高分子ナノミセルの細胞内動態

高分子ナノミセルの細胞内動態を評価するために、cRGD-PEG-PAsp(DET) または PEG-PAsp(DET) と Cy5 標識 pDNA(Cy5-pDNA) から形成されるミセル(N/P 比 5) を調製し、HUVEC ならびに VSMC に投与後、6 および 24 時間の Cy5-pDNA (赤) の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。また同時に、HUVEC ならびに VSMC を LysoTracker Green (緑) あるいは cholera toxin subunit B (CT-B) Alexa Fluor 488 (緑) を用いて染色し、それぞれ、エンドソームならびにライゾソーム、あるいはカベオソームへの局在を明らかにし、同部位に含まれる Cy5-pDNA を解析した。HUVEC を用いた観察では、投与後 6 および 24 時間の観察でともに、PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA は、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA と比較して、より LysoTracker Green と共局在する頻度が高かった (図 4 b)。それとは逆に、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA は、PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA と比較して、より CT-B と共局在する頻度が高かった (図 4 a)。これらの所見は共局在比率の定量解析によっても確認された (図 4 c, d)。VSMC に対しても同様の方法で実験を行ったが、投与後 6 および 24 時間の観察において、ともに、cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA は、CT-B と共局在する傾向にあり、また、PEG-PAsp(DET) ミセル投与後の Cy5-pDNA は LysoTracker Green と共局在する傾向にあった。こちらも同様に定量解析によ

でも確認された (図 4 e-h)。

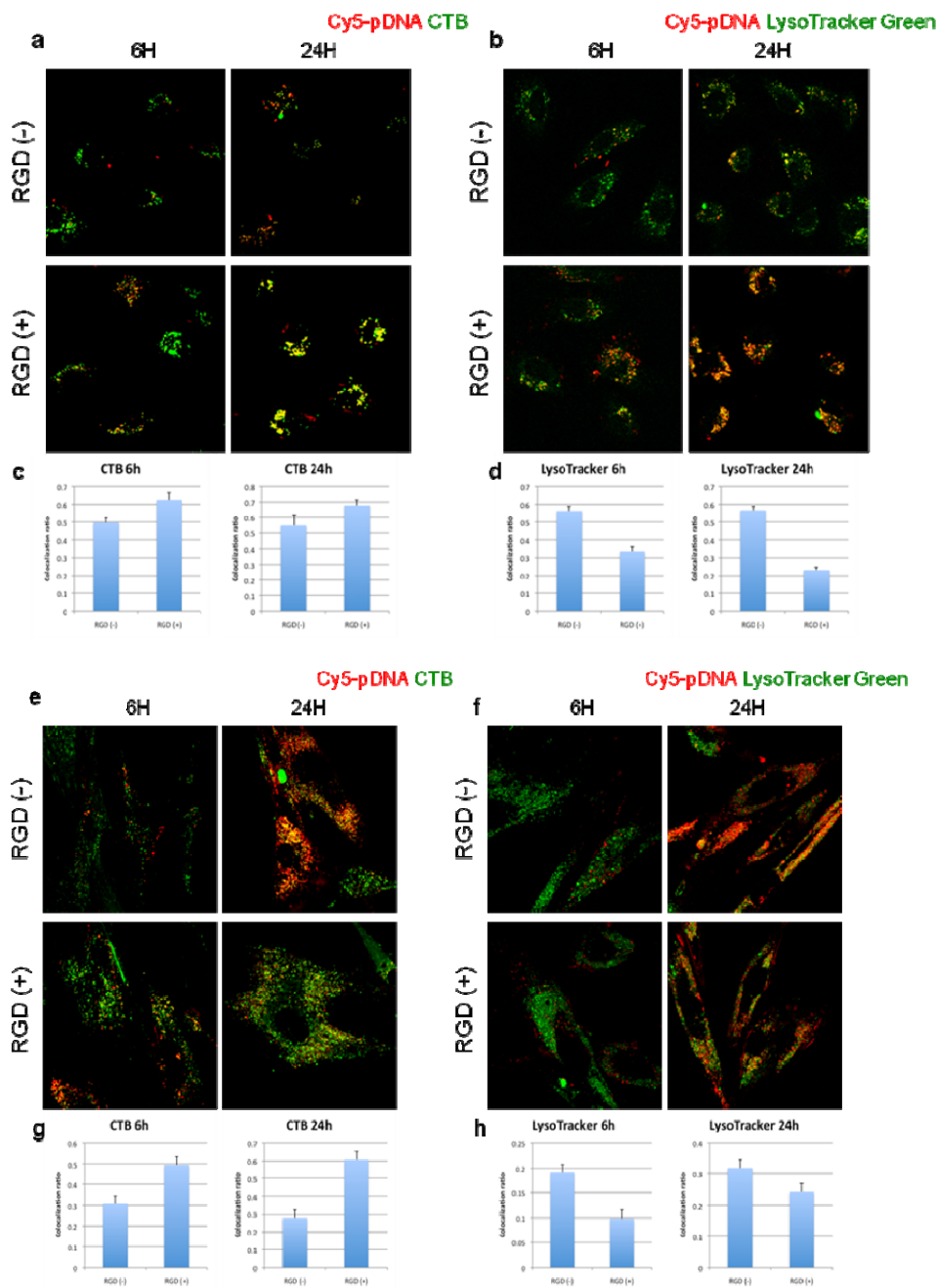


図 4. ミセルにより導入された pDNA の細胞内分布 Cy5 をラベルした pDNA を内包した cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルおよび PEG-PAsp(DET)ミセルを HUVEC (a, b)ならびに VSMC (e, f)とともに 6 時間ならびに 24 時間保温培養した。共焦点レーザー顕微鏡による観察を 63 倍の対物レンズを用いて行った。エンドソームとライソソームは LysoTracker Green で緑に染まり、カベオソームは CT-B Alexa Fluor 488 で同じく緑に染まった。Cy5-pDNA と LysoTracker Green または CT-B Alexa Fluor 488 の共局在の比率の定量解析を行った (c, d, g, h)。数値は平均値±標準誤差。RGD(-) = PEG-PAsp(DET)ミセル。RGD(+) = cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル。

内膜肥厚モデルを用いた検討

内膜肥厚モデルにおける遺伝子発現

はじめに、動脈硬化を近似したモデルを作成するため、ラットの頸動脈をバルーンカテーテルにて擦過し、内膜肥厚を励起させた。続いて、ルシフェラーゼ発現 pDNA と cRGD-PEG-PAsp(DET) とを N/P 比 5 で調製し、擦過より 21 日後の内膜肥厚をきたしたラットの頸動脈に投与した (図 5)。

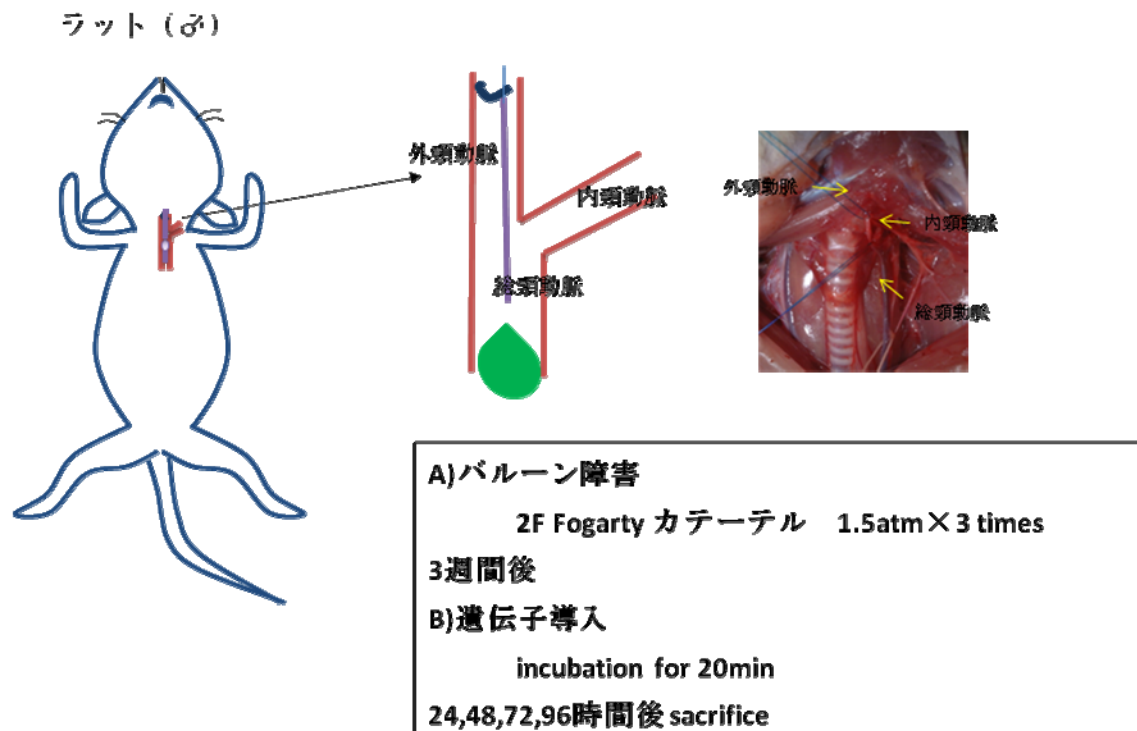


図 5. ラットを用いた遺伝子導入実験

投与 1, 2, 3 ならびに 4 日後に頸動脈を採取してルシフェラーゼ活性を測定し、頸動脈における遺伝子発現を評価した。PEG-PAsp(DET)に対しても同様の方法で実験を行いコントロールとした。cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された動脈では投与後 day 2 の時点におけるルシフェラーゼ活性がもっとも高く、投与後 day 3 ならびに day 4 のルシフェラーゼ活性は投与後 day 1 のそれとほぼ同等であった (図 6)。一方、PEG-PAsp(DET)を投与された動脈では、ルシフェラーゼ活性は投与後 day 1 でピークを迎え、投与後 day 3 ならびに day 4 はごくわずかであった。統計学的解析では、投与後 day 1 での比較において PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された群のルシフェラーゼ活性は、cRGD-PAsp(DET)ミセルを投与された群に比べ有意に高かった。しかしながら、投与後 day 3 ならびに day 4 での比較においては、逆に cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された群は、

PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された群に比べ有意に高かった。

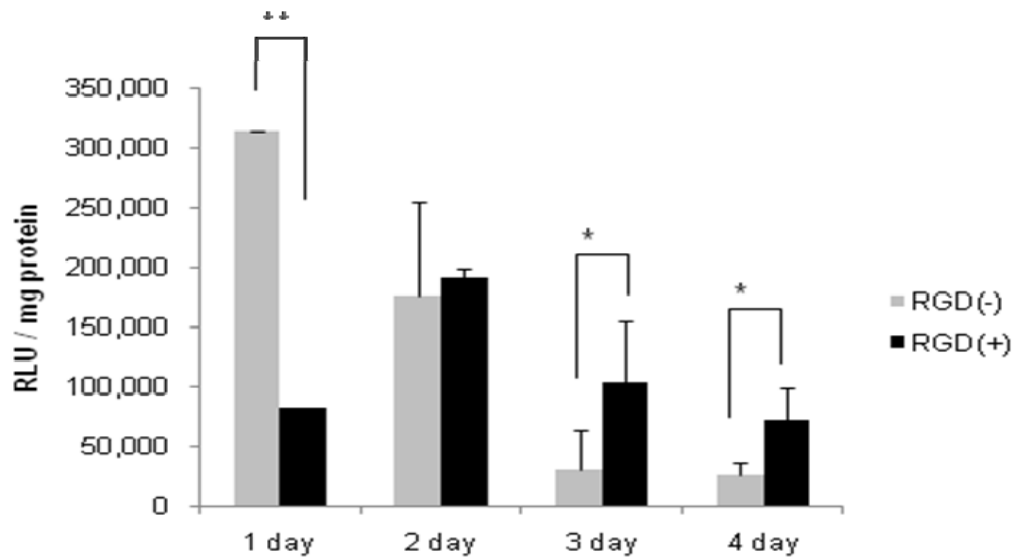


図 6. *in vivo* でのルシフェラーゼ遺伝子発現の評価 cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルならびに PEG-PAsp(DET)ミセルを pDNA と N/P 比 5 で調製し、内膜肥厚をきたしたラットの頸動脈に投与した。投与後 1, 2, 3, 4 日後に頸動脈を採取し、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定した。数値は平均値±標準誤差 (* P < 0.05, ** P < 0.01)。RGD (-) = PEG-PAsp(DET)ミセル。RGD (+) = cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル。

In vivo での高分子ナノミセルの取り込み

内膜肥厚をきたしたラットの頸動脈への取り込みを評価するために、Cy3 を標識した pDNA と cRGD-PEG-PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)とのミセルを N/P 比 5 で調製して、ラットの頸動脈へ前述の実験と同様の方法で投与した。ミセル投与 1 日後、頸動脈を採取して蛍光顕微鏡にて動脈断面を観察した。cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを投与した動脈では、肥厚した内膜に Cy3 の蛍光が密に認められるのに対し、PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された動脈では、Cy3 の蛍光は内膜にまばらに認めるのみであった (図 7 a, b)。Cy3 の強度は、蛍光強度を測定することで定量的に評価され、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された動脈の蛍光強度は、PEG-PAsp(DET)ミセルを投与された動脈のそれよりも有意に高かった (図 7 c)。

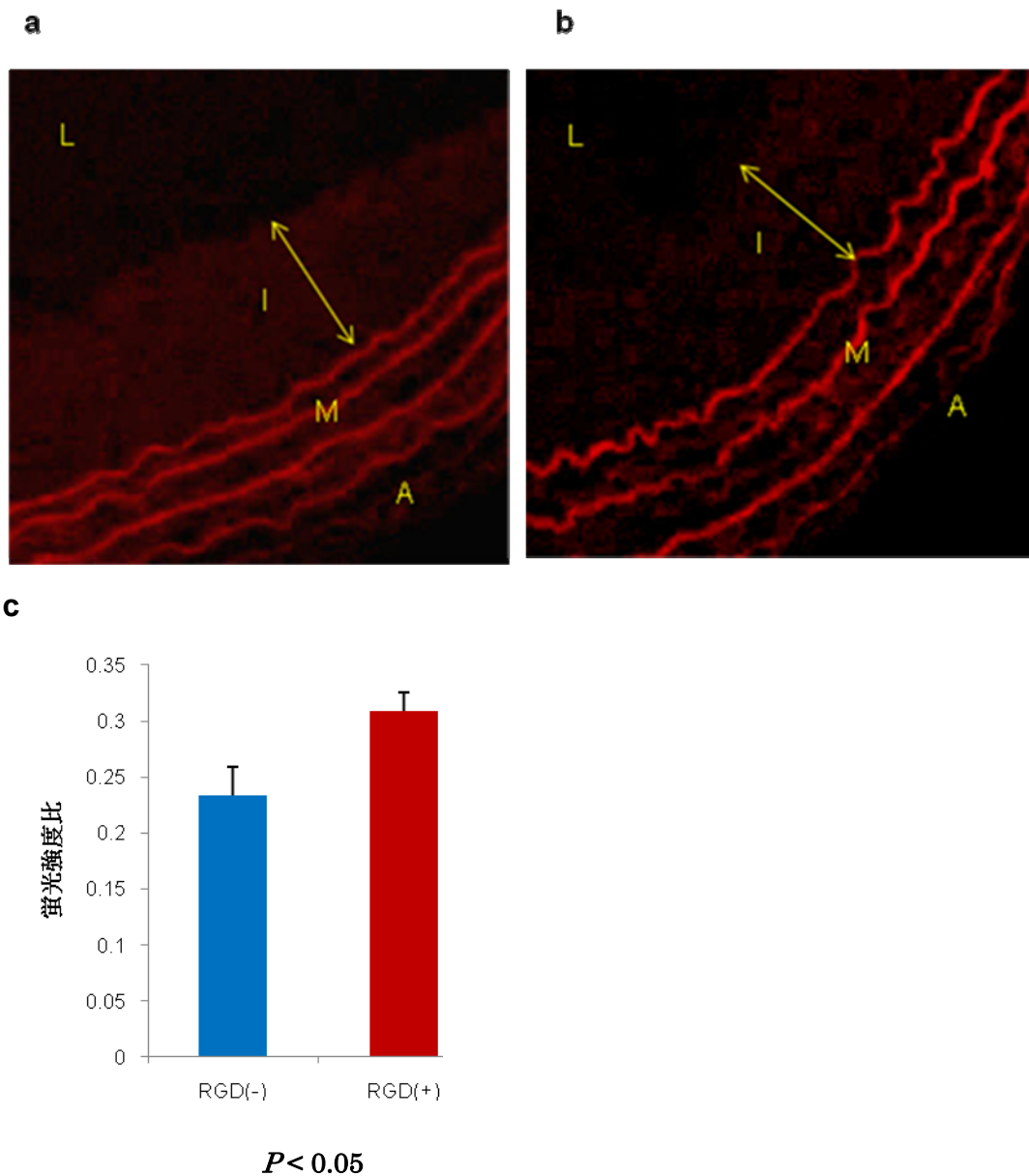


図 14. ミセル投与後のラットの頸動脈の断面の蛍光顕微鏡写真

Cy3-pDNA と cRGD-PEG-PAsp(DET)を N/P 比 5 で合成させ、ラットの頸動脈に投与し、24 時間にて頸動脈を採取し、断面を観察した (a)。同様の方法で PEG-PAsp(DET)ミセルを合成、投与しコントロールとした (b)。両者の蛍光強度指数を定量解析し、平均値を比較した (c)。RGD (-) = PEG-PAsp(DET)ミセル。RGD (+) = cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル。(L:内腔、I:肥厚内膜、M:中膜、A:外膜)。

考察

本研究は、cRGD を、 $\alpha\beta3$ および $\alpha\beta5$ インテグリンを選択的に認識するリガンドとして PEG-PAsp(DET)ミセルの表面に導入し、そしてその培養細胞ならびに動脈硬化近似モデルに対する遺伝子導入効率を評価した。

In vitro での遺伝子発現実験では、HUVEC, VSMC どちらの細胞においても、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルの遺伝子発現効率は PEG-PAsp(DET)ミセルのそれよりも高かった。この結果は、cRGD が遺伝子発現効率を改善させる可能性を持つことを示すものと考えられた。これを説明する機序として、第一に、cRGD と $\alpha\beta3$ ならびに $\alpha\beta5$ インテグリンの関係により、レセプターを介したエンドサイトーシスが実現し、それによって細胞内取り込みを効果的に上昇させている可能性があるということが考えられた。実際、HUVEC ならびに VSMC どちらの細胞においても、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを用いた Cy5-pDNA の取り込みは、PEG-PAsp(DET)ミセルを用いたそれよりも有意に上昇していた。第二に、cRGD が、取り込まれた後のミセルの細胞内動態を制御している可能性があるということが考えられた。共焦点レーザー顕微鏡による HUVEC, VSMC の観察では、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルによって導入された pDNA はカベオソームと共局在する傾向にあり、また PEG-PAsp(DET)ミセルによって導入された pDNA はエンドソームやライソゾームに局在する傾向にあった。このことは cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルの細胞内取り込みの主要経路が、通常のクラスリン介在型から、カベオラ介在型エンドサイトーシスに変化した可能性を示唆しているものと思われた。クラスリン介在型とは対照的に、カベオラ介在型エンドサイトーシスによる細胞内取り込み経路は、代謝分解を促すオルガネラを回避し、pH の低下に関与しないことが知られている。それゆえ、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルは細胞内酵素による代謝分解を回避し、その結果、遺伝子発現効果を高めている可能性が考えられた。

In vivo での遺伝子発現実験では、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルと PEG-PAsp(DET)ミセルとで明確な差を示した。すなわち、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを用いた遺伝子導入は、遺伝子発現効果が持続する作用を発揮したのに対し、一方、PEG-PAsp(DET)ミセルを用いて導入された遺伝子は、反応は早いが速やかにその効果が消退する発現反応を示した。これら二つのミセルの間にみられた対照的な遺伝子発現反応は、細胞内に取り込まれた後の動態の相違によって説明し得ると考えられた。cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルは細胞内酵素による代謝分解を回避することで、細胞内での pDNA の半減期を延長させ、そのため導入された遺伝子が持続性の発現を示すようになった可能性があったと考えられた。加えて、pH の低下を回避することは、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル内の

PAsp(DET)カチオンポリマーにてエンドソーム膜の不安定化が起こりにくくなることを意味し、それによって導入された遺伝子の細胞質への移行を遅延させている可能性も考えられた。実際、*in vivo*での遺伝子取り込みを評価した実験では、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを用いた Cy3-pDNA の取り込みは、導入後 day1 で、PEG-PAsp(DET)ミセルを用いたそれよりも多かったのにもかかわらず、遺伝子発現を評価した実験では、導入後 day1 では PEG-PAsp(DET)ミセルを用いた遺伝子発現が cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルを用いたそれよりも高かった。対照的に、PEG-PAsp(DET)ミセルの大部分は、クラスリン介在型エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、エンドソームに送り込まれるのではないかと考えられた。エンドソーム内の低い pH は一部の PEG-PAsp(DET)ミセルをプロトン化し、そしてエンドソーム膜を不安定化することによって遺伝子の細胞質への移行を促進させ、そのことによって導入された遺伝子の素早い発現を促している可能性があると考えられた。しかしながら、PEG-PAsp(DET)ミセルは最終的にライソゾームに送り込まれ、そこで酵素による加水分解をうけて代謝されてしまうため、遺伝子発現効果は一過性のものとなる傾向が出るのではないかと考えられた。

結論

cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルは、培養細胞に対しての遺伝子発現および細胞内取り込みのいずれも、PEG-PAsp(DET)ミセルよりも効果的であることが示された。また、細胞内動態に関する検討では、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルはカベオラ介在型、PEG-PAsp(DET)ミセルはクラスリン介在型エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが示された。さらに、内膜肥厚モデルを用いての遺伝子導入に関する検討では、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルは持続性の、PEG-PAsp(DET)ミセルは即効性かつ一過性の遺伝子発現効果を示した。以上より、cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルと PEG-PAsp(DET)ミセルは、遺伝子発現において明確に異なる特徴を有しており、血管病変に対しての非ウイルスベクターとして効果的に機能するものであると考えられた。