

Keio University



GAGを用いた 核酸デリバリーシステム

慶應義塾大学理工学部

佐藤智典



遺伝子の細胞内への導入法

- ウィルスベクター

アデノ随伴ウィルス、レンチウィルス、レトロウィルス、アデノウィルス、など

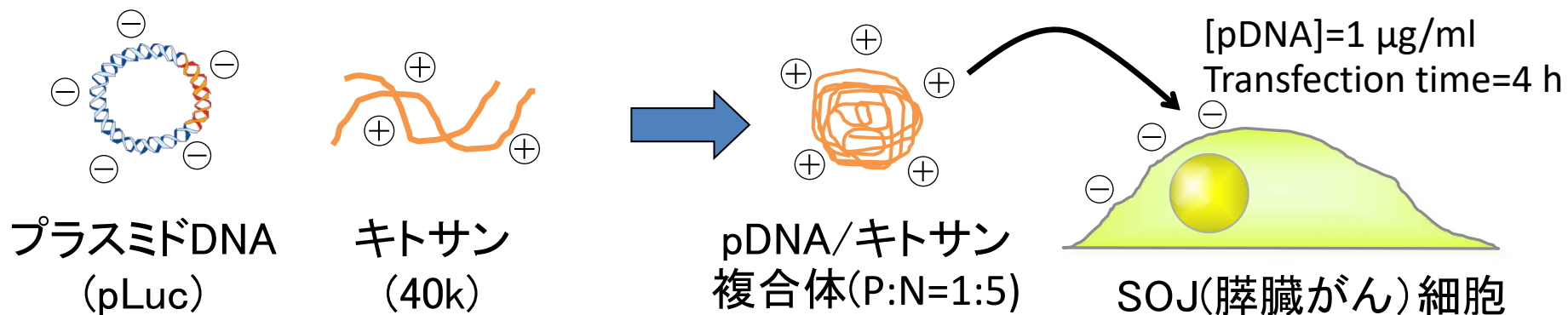
- 非ウィルスベクター

リポソーム、カチオン性脂質、カチオン性高分子、高分子ミセルなど

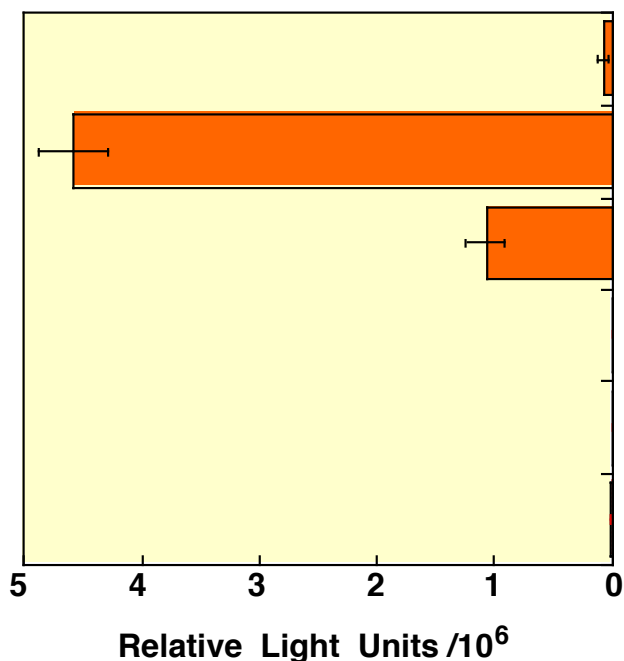
- 物理的な手法

ハイドロダイナミック法、エレクトロポレーション、超音波浮揚法など

キトサンを用いた遺伝子デリバリー



**Luciferase Assay
(Plasmid / Chitosan)**



Chitosan

heptamer

40k

84k

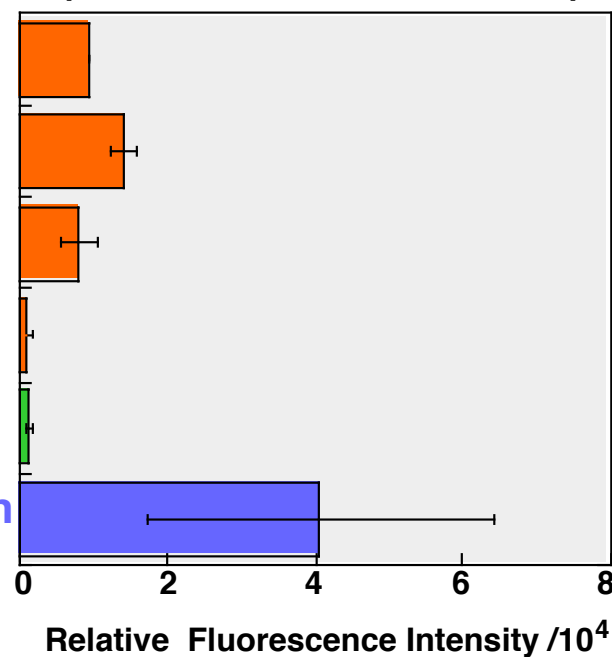
110k

pGalN
10k~30k

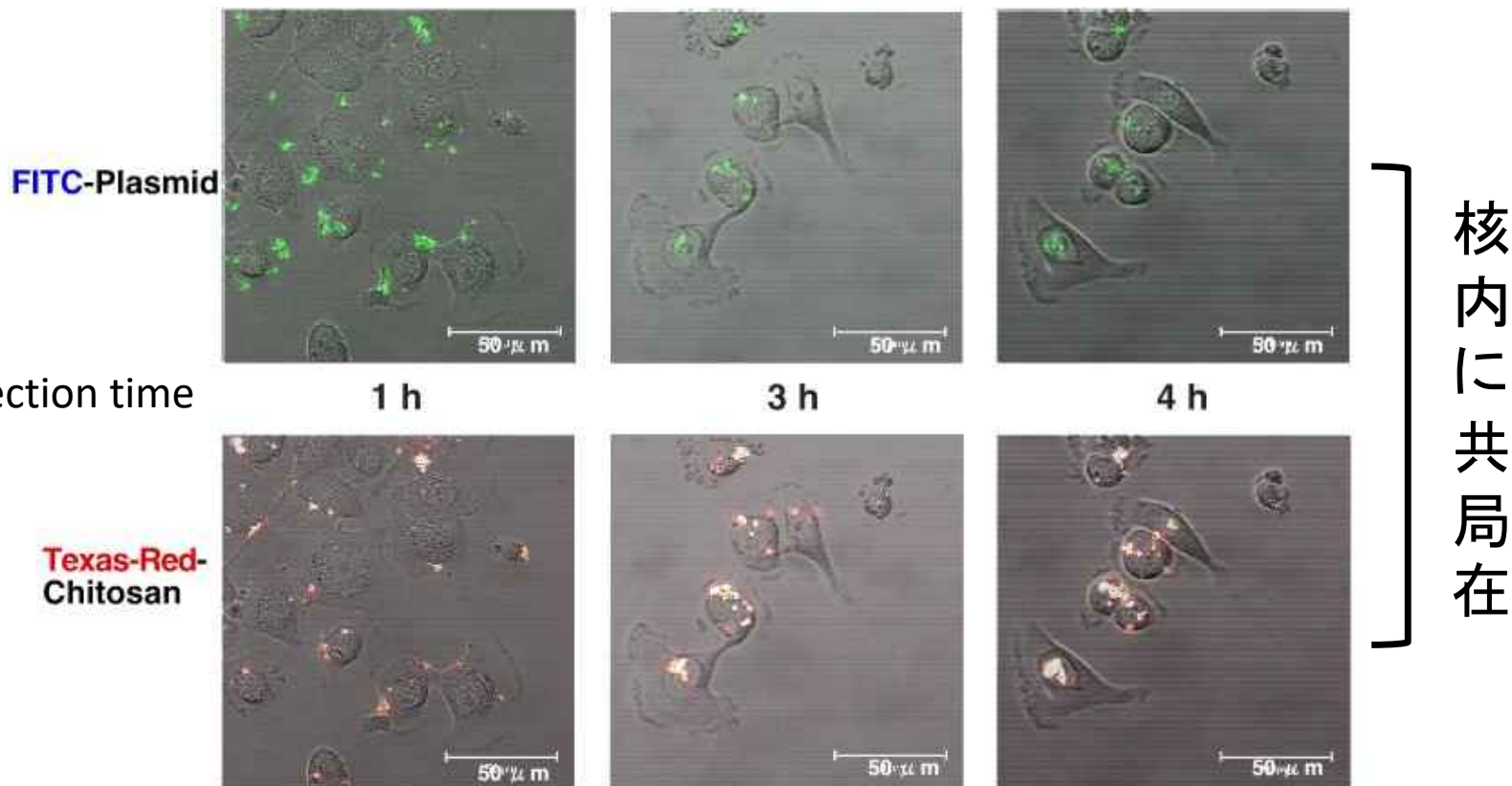
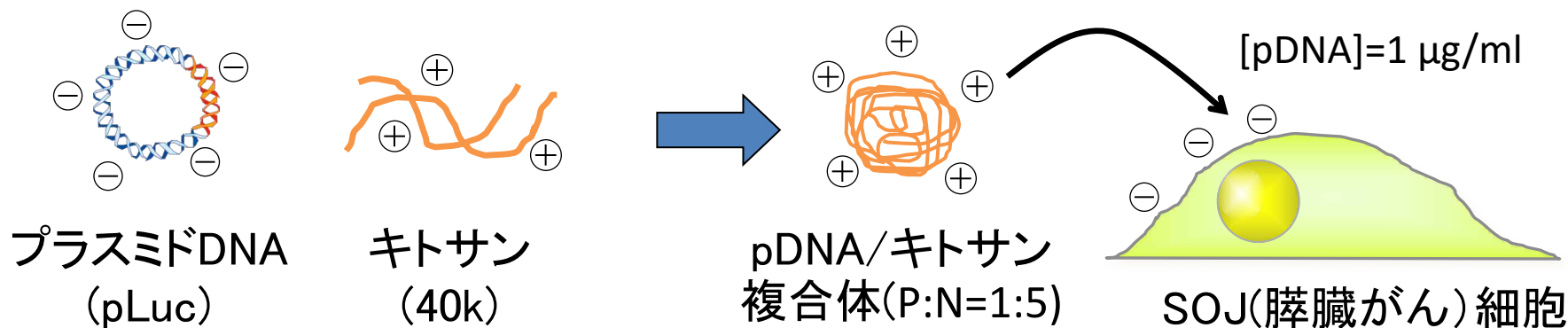
DEAE-Dextran
500k

Flow Cytometry

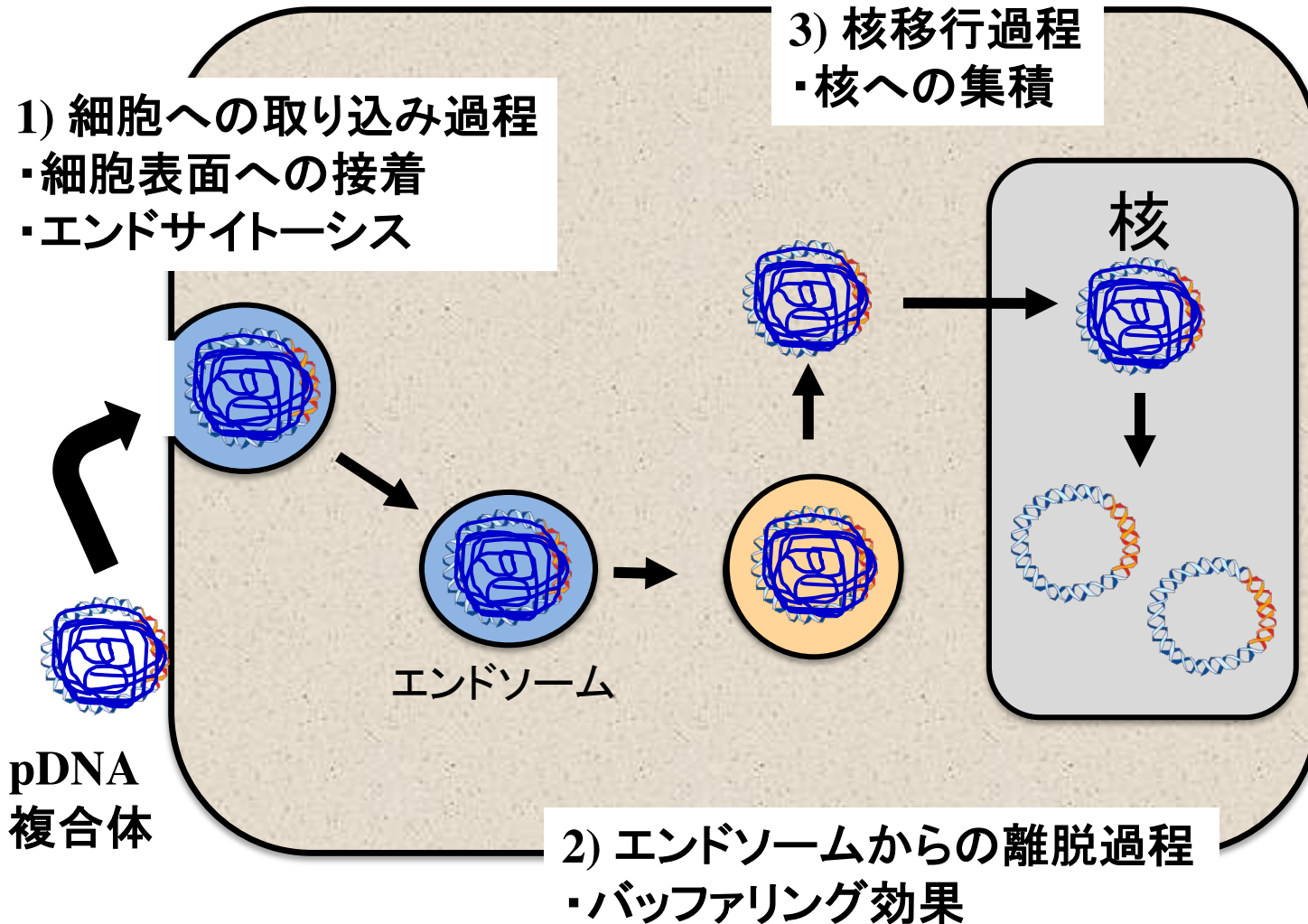
(FITC-Plasmid / Chitosan)



キトサンを用いた遺伝子デリバリー

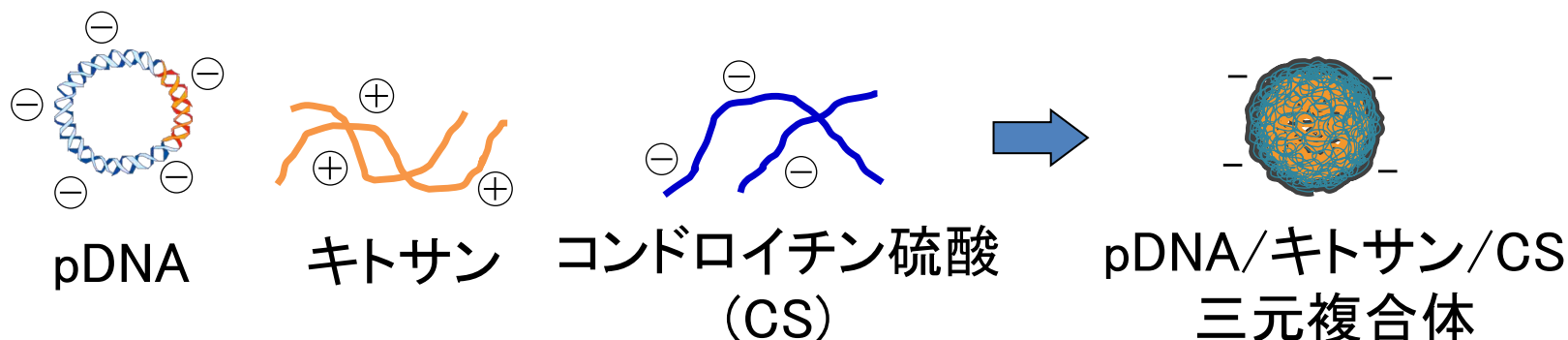


pDNA/キトサン複合体による遺伝子発現機構

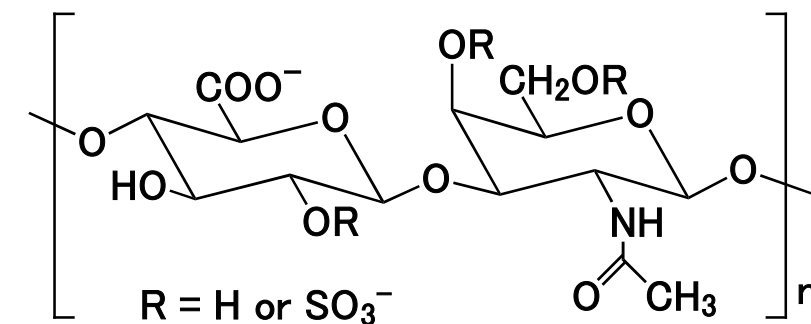


pDNA/キトサン/コンドロイチン硫酸三元複合体

- ・ pDNA/キトサン複合体の改良
- ・ 遺伝子複合体の細胞内導入機構の解明



コンドロイチン硫酸 (CS)



グルクロン酸 N-アセチルガラクトサミン

三元複合体の粒子径とゼータ電位

	CS	分子量 ($\times 10^3$)	硫酸化度 (二糖あたりの 硫酸基の数)	粒子直径 (nm)	ゼータ電位 (mV)
pLuc/ キトサン P:N=1:5	-	-	-	187 \pm 12	+18 \pm 1
	CS-10	10	1.02	1039 \pm 9	-39 \pm 3
	CS-14A	14	1.21	296 \pm 37	-40 \pm 3
pLuc/キトサン /CS P:N:(-)=1:5:16	CS-14B	14	0.96	873 \pm 18	-39 \pm 2
	CS-15	15	1.06	269 \pm 3	-40 \pm 2
	CS-22	22	1.20	186 \pm 8	-39 \pm 3
	CS-40	40	1.08	172 \pm 2	-39 \pm 1

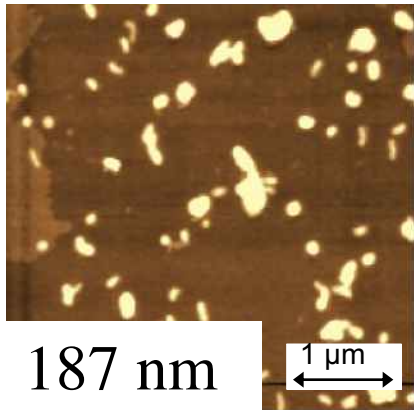
P:N:(-) = リン酸基 (pDNA) : アミノ基 (キトサン) : カルボキシ基と硫酸基 (CS)

n=3

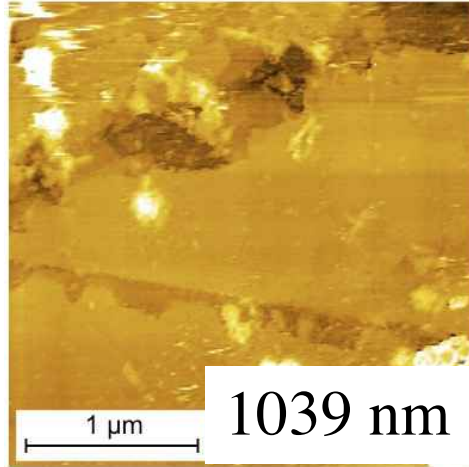
CS-22, CS-40三元複合体は約180 nmの粒子を形成した

AFMによる複合体の形態観察

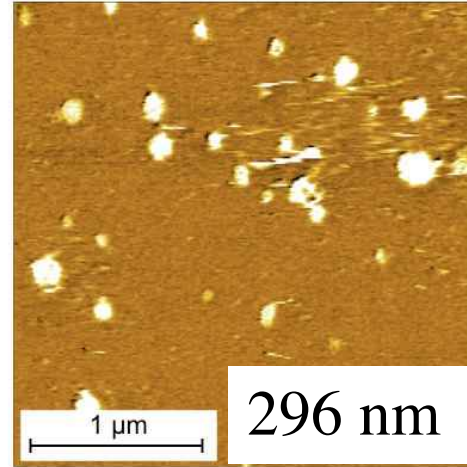
(-)



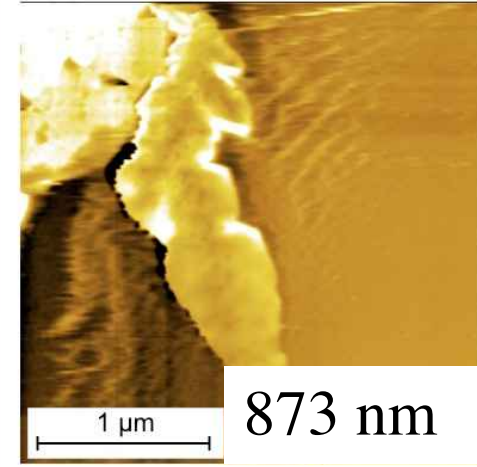
CS-10



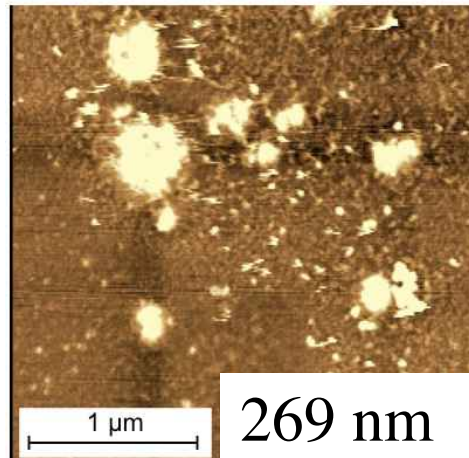
CS-14A



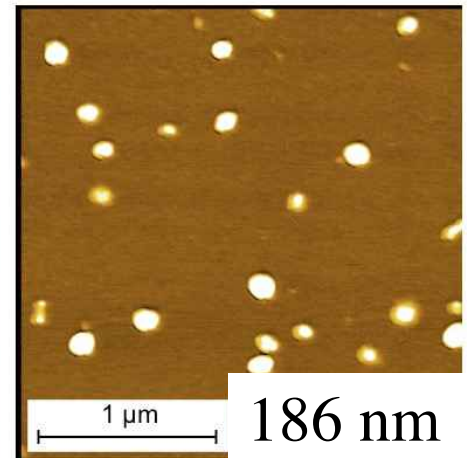
CS-14B



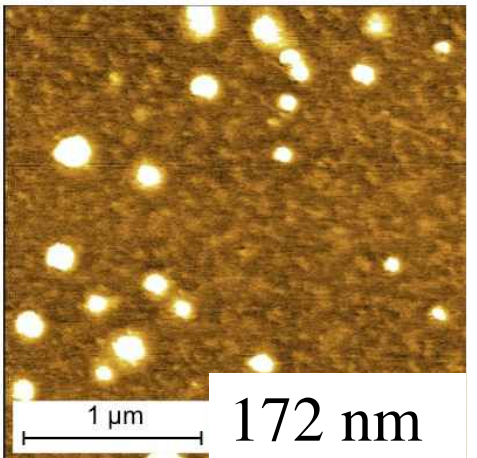
CS-15



CS-22

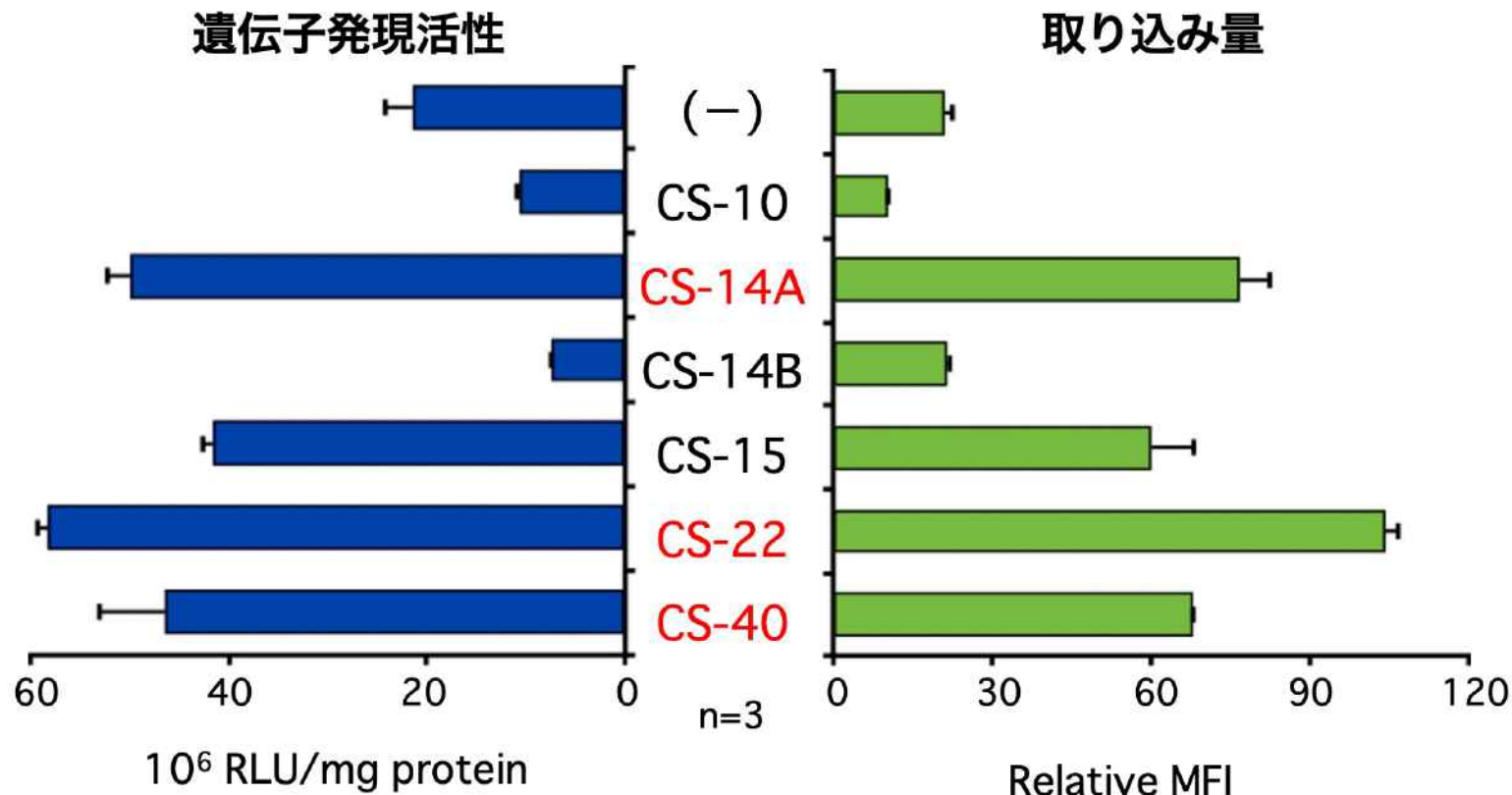
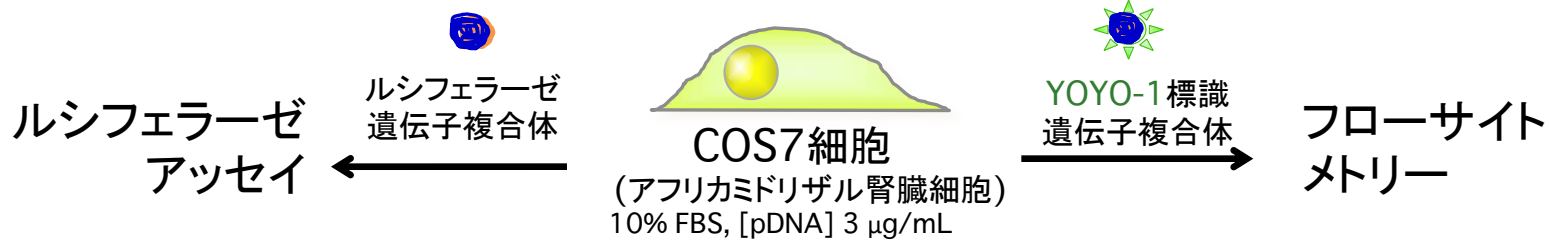


CS-40



CS-14A, CS-22, CS-40三元複合体は均一な球状粒子を形成した

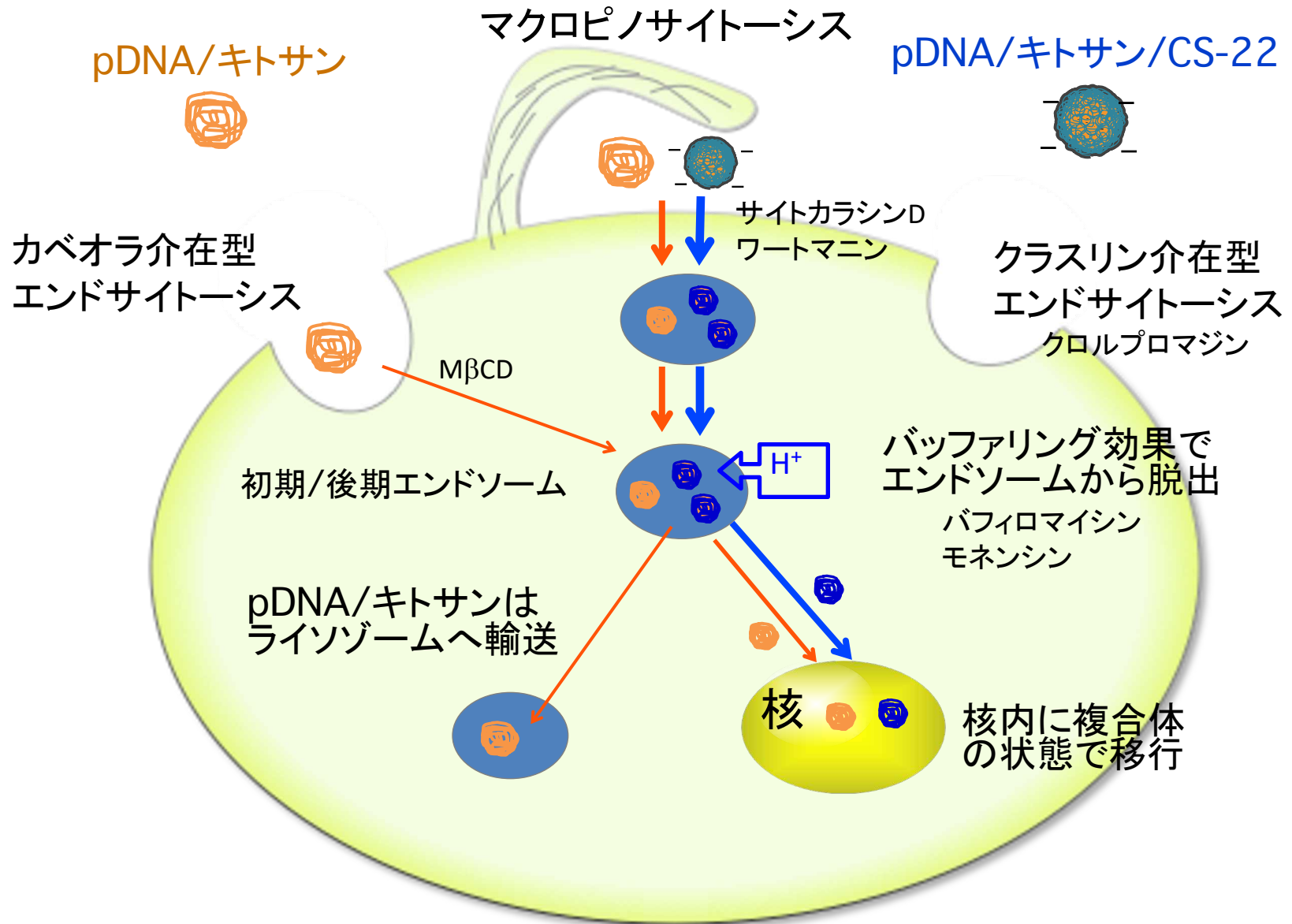
遺伝子発現活性および細胞内取り込み量



CS-14A, 22, 40で
遺伝子発現活性が向上

遺伝子発現活性の向上は、
取り込み量の増加に対応

複合体の細胞内動態のまとめ(COS7細胞)



保存後のpLuc複合体の遺伝子発現活性

pLuc/キトサン
/CS-22

(P:N:(-) = 1:5:16)



7日間保存

ルシフェラーゼ
アッセイ



Huh7細胞

[pDNA]=3 µg/mL, pH6.5

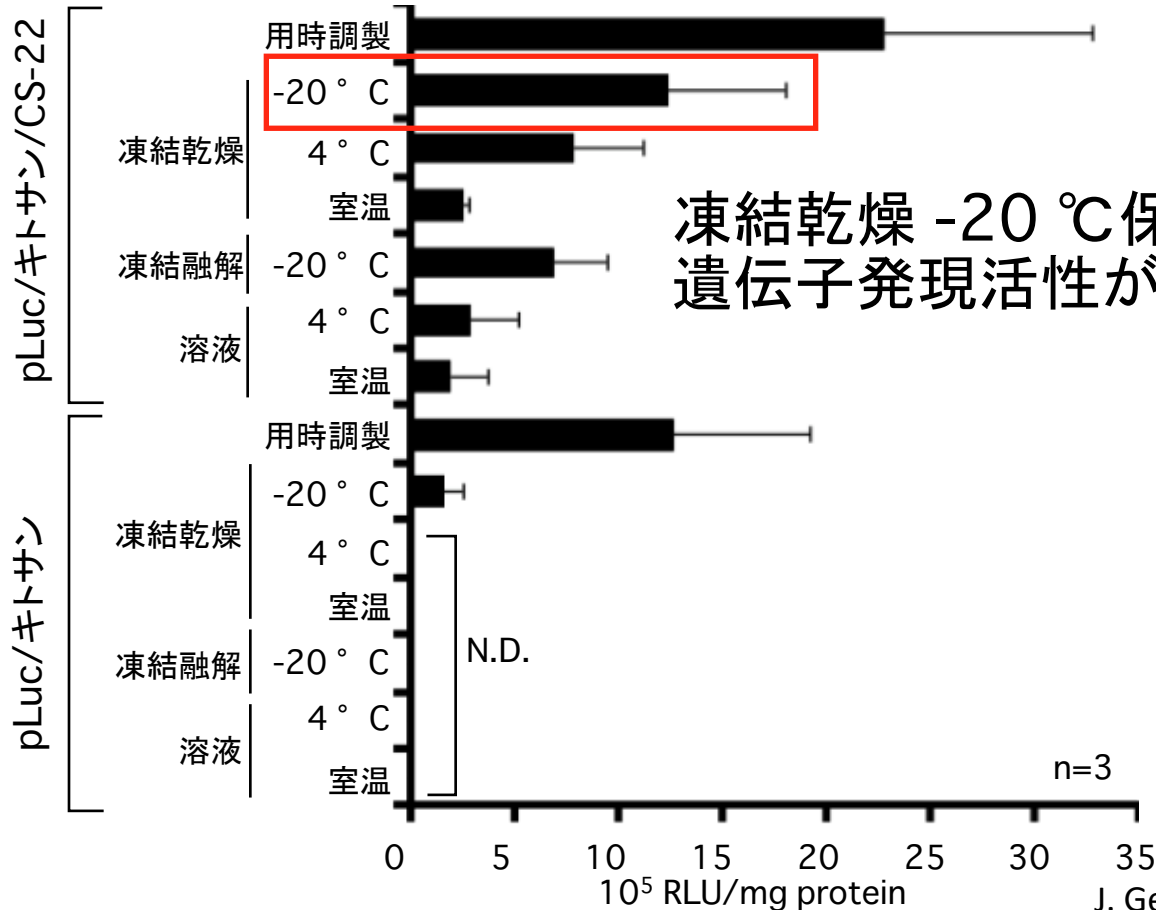
pLuc/キトサン
(P:N = 1:5)



凍結乾燥保存 (-20 °C, 4°C, 室温)→再水和

凍結保存 (-20 °C)→解凍

溶液保存 (4°C, 室温)

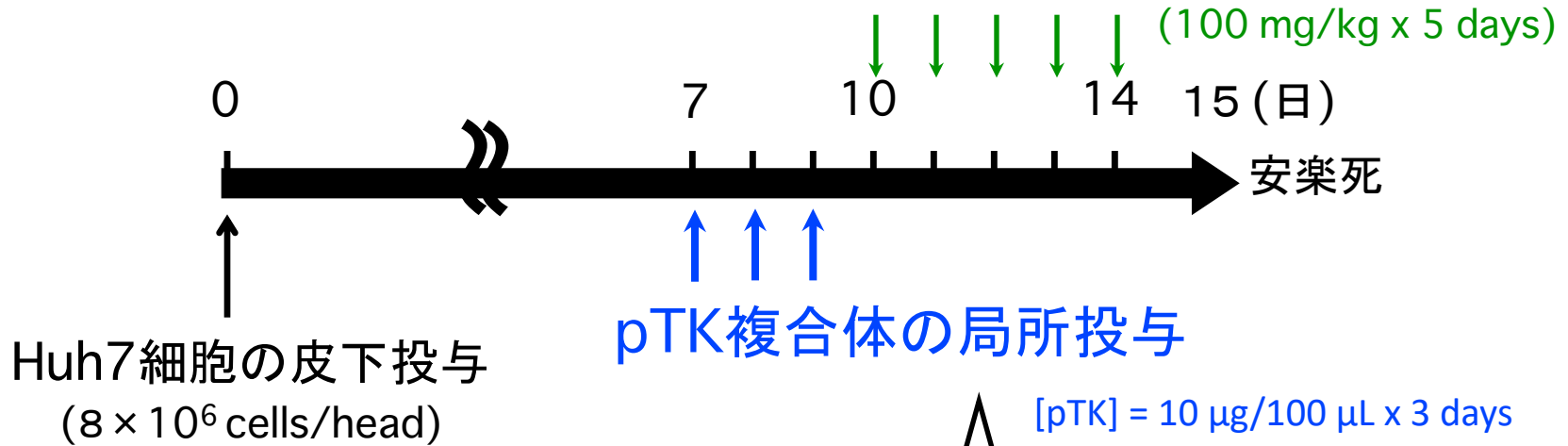


凍結乾燥 -20 °C保存後、
遺伝子発現活性が維持されていた

n=3

腫瘍皮下移植マウスでの自殺遺伝子治療

プロドラッグ: GCV腹腔内投与



- pTK/キトサン/CS-22

P:N:(-) = 1:8:16

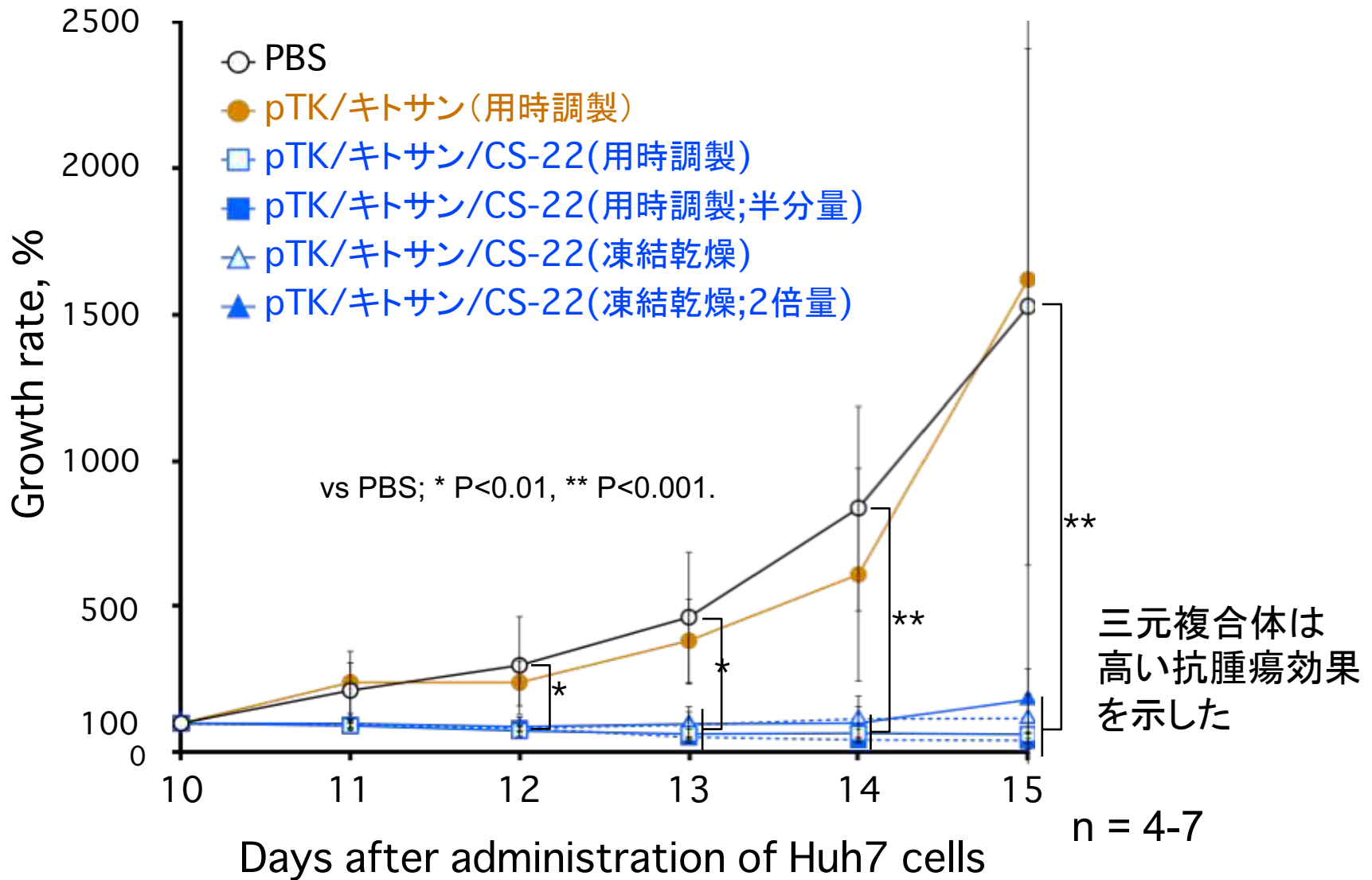
- pTK/キトサン

P:N = 1:8



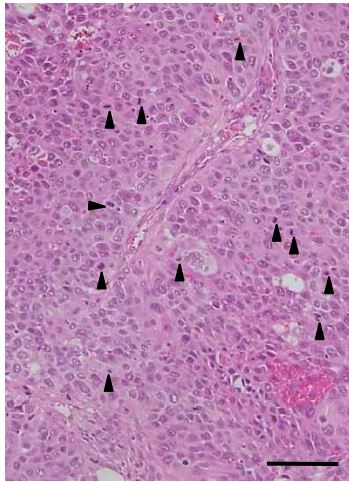
pTK: 単純ヘルペス-1型-チミジンキナーゼコードpDNA

腫瘍皮下移植マウスでの自殺遺伝子治療実験

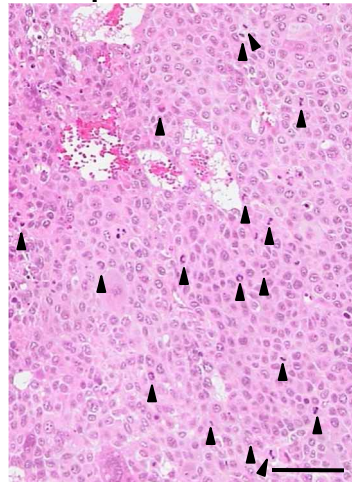


腫瘍切片の病理組織学的解析

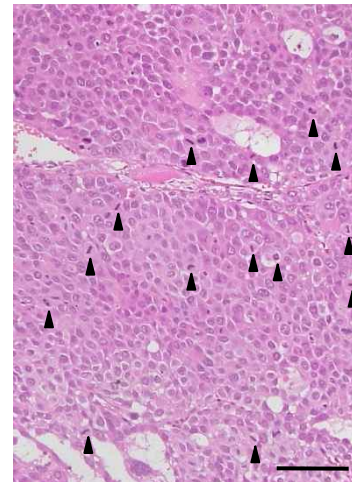
PBS



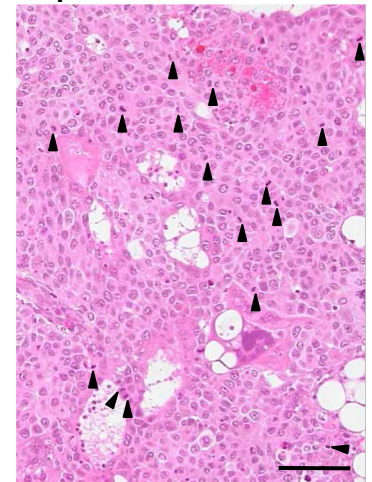
pTK単独



キトサン/CS-22

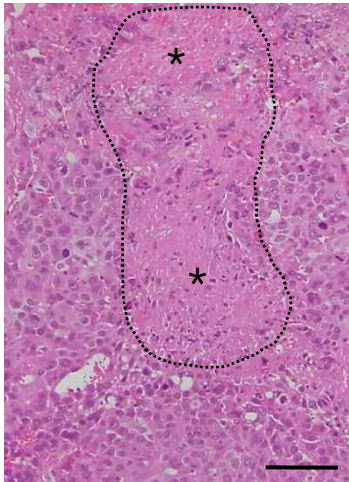


pTK/キトサン

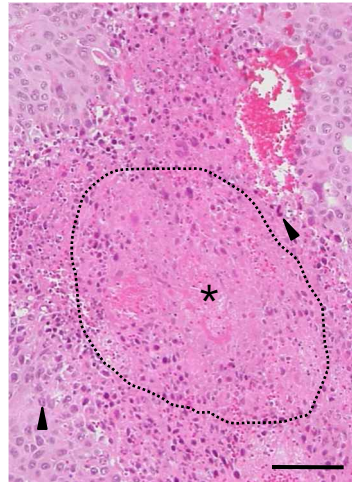


pTK/キトサン/CS-22

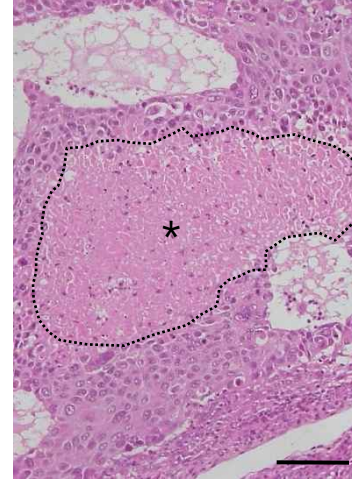
用時調製



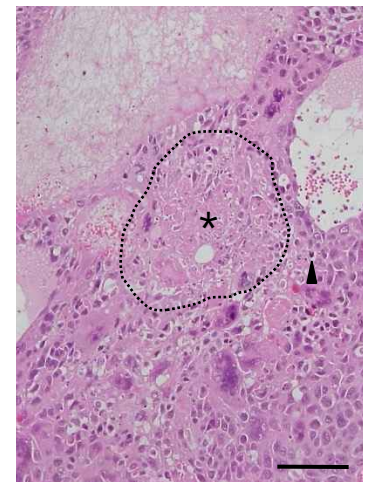
用時調製(半分量)



凍結乾燥



凍結乾燥(2倍量)



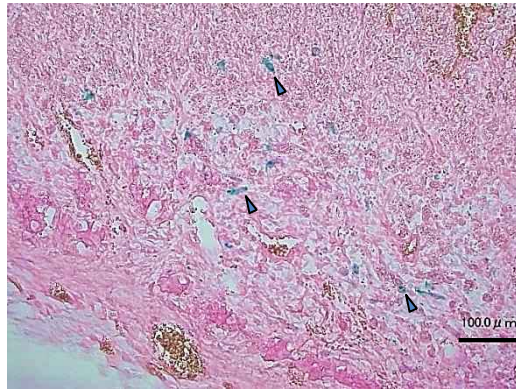
Bar = 100 μ m

▲核分裂像

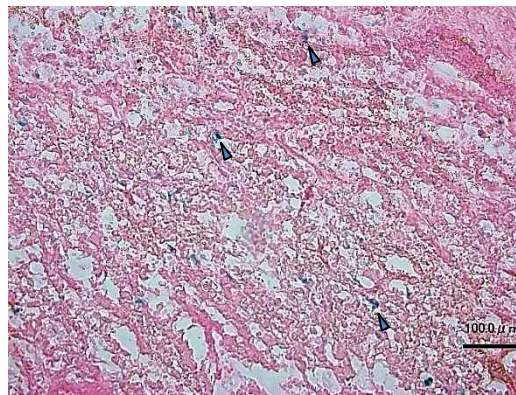
*壊死部

腫瘍切片のX-Gal染色像

pGal単独

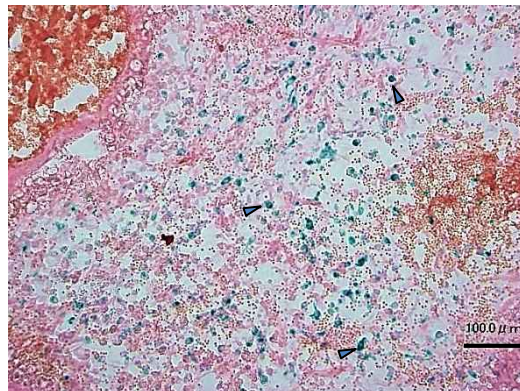


pGal/キトサン

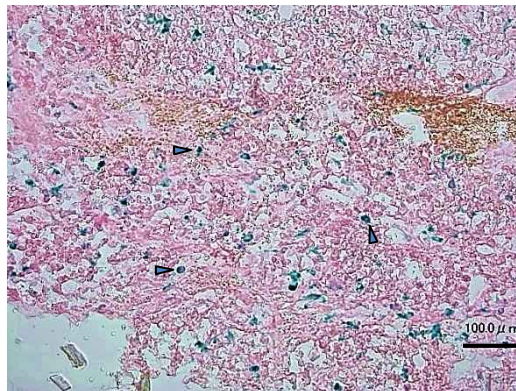


pGal/キトサン/CS-22

用時調製



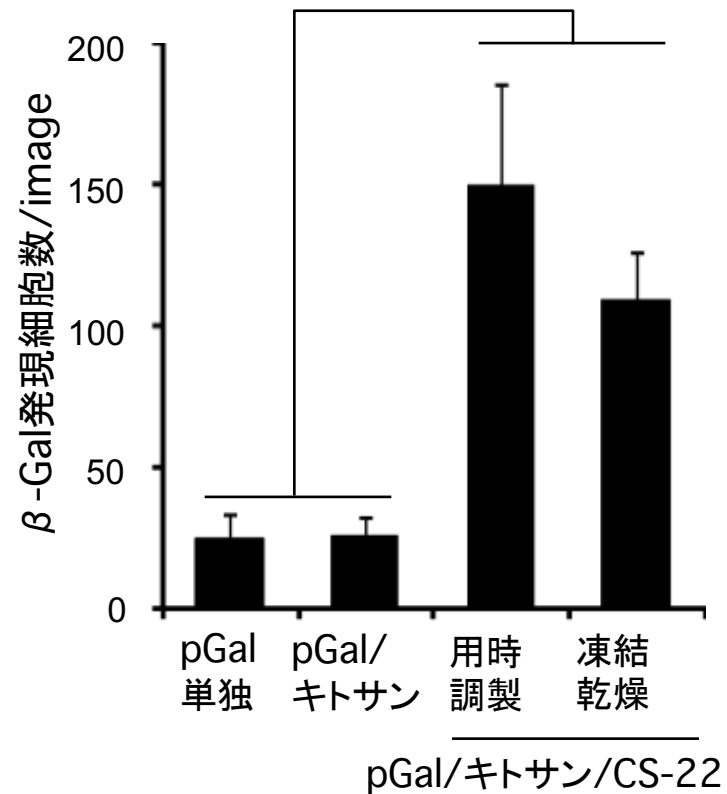
凍結乾燥



▲: β-Gal発現細胞の典型例

定量解析

* P<0.01

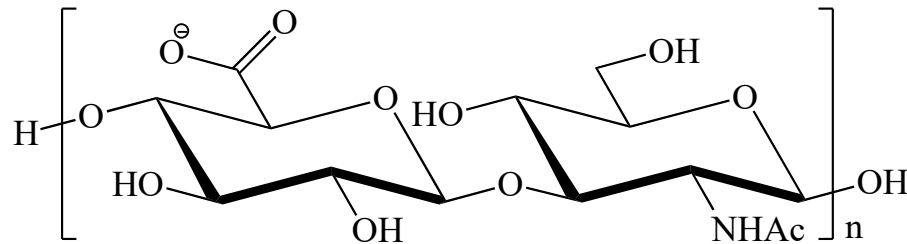
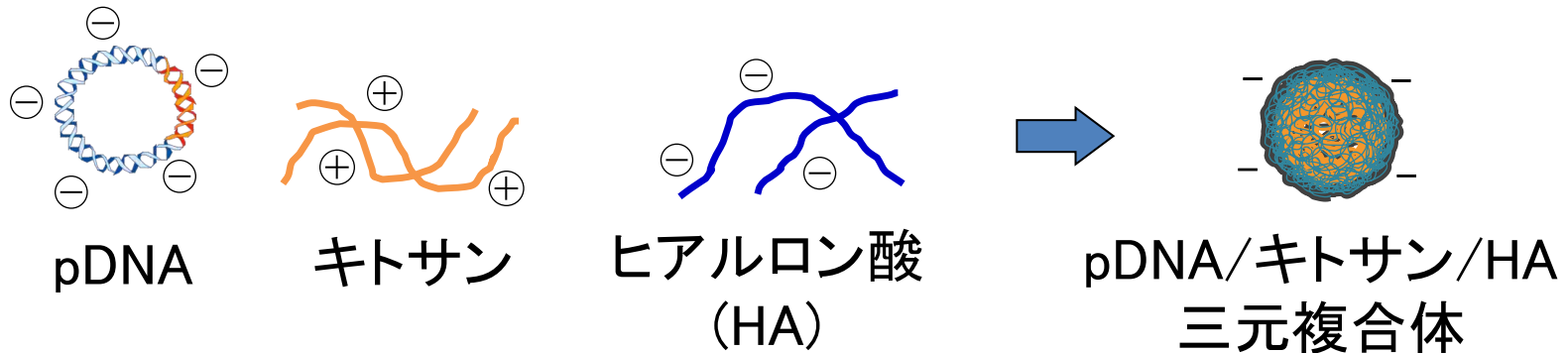


n = 6

三元複合体は腫瘍組織内での浸潤性が向上

pDNA/キトサン/ヒアルロン酸三元複合体

- ・ pDNA/キトサン複合体の改良
- ・ 遺伝子複合体の細胞内導入機構の解明



グルクロン酸 N-アセチルグルコサミン

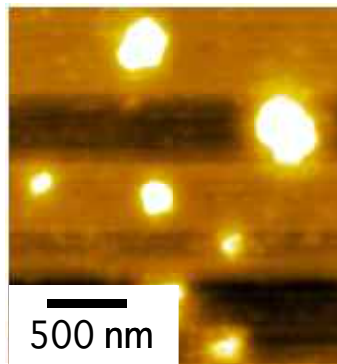
三元複合体のキャラクタリゼーション

- アガロースゲル電気泳動による複合体の形成確認
- 粒子径およびゼータ電位測定

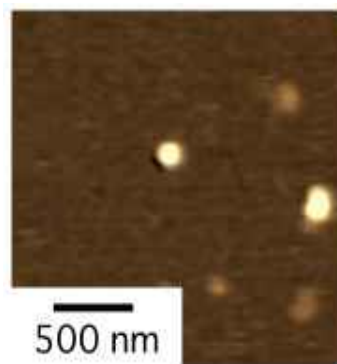
種類	分子量	P:N:C	粒子径	ゼータ電位
HA-400	約400k	1:5:16	264 nm	-41.6 mV
HA-600	約600k	1:5:16	311 nm	-41.3 mV
HA-700	約700k	1:5:16	317 nm	-44.8 mV
HA-1300	約1300k	1:5:16	336 nm	-45.4 mV

P : N : C = リン酸基(pDNA) : アミノ基(キトサン) : カルボキシ基(ヒアルロン酸)

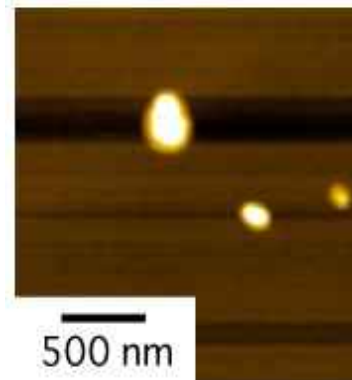
- 原子間力顕微鏡による観察結果



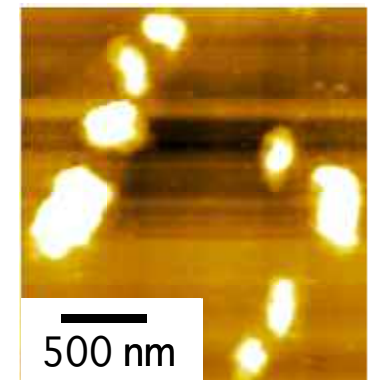
HA-400



HA-600

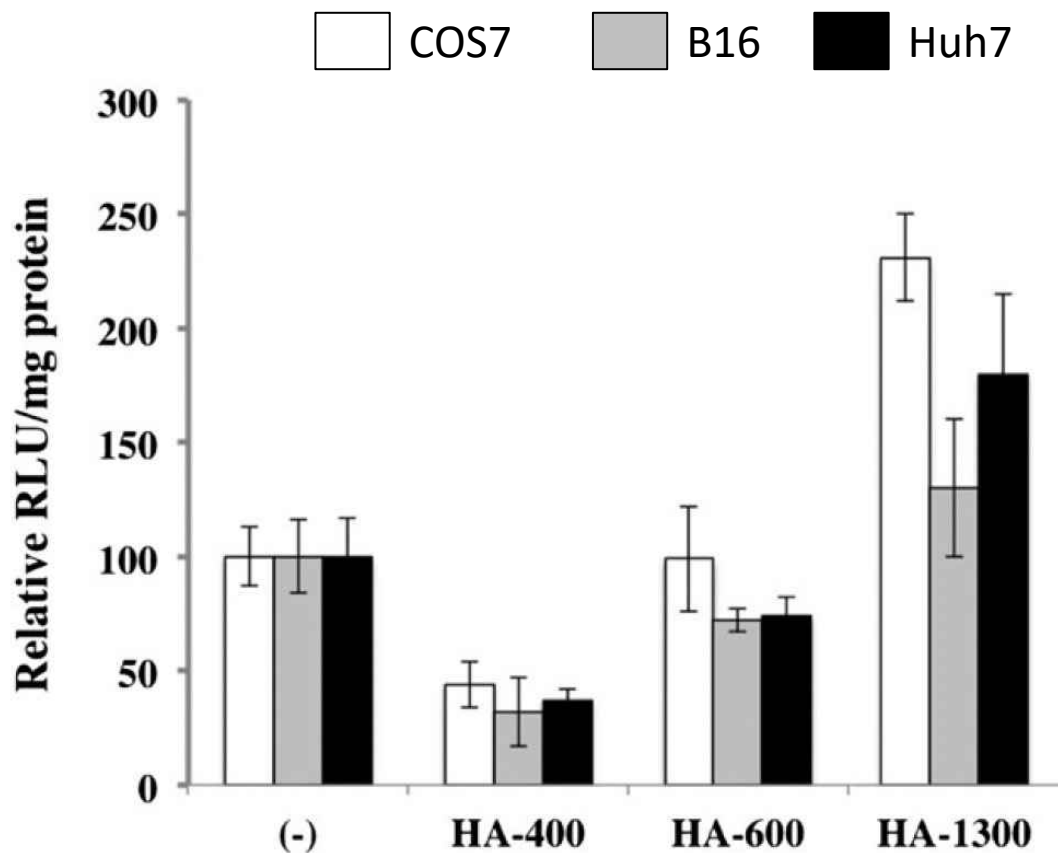
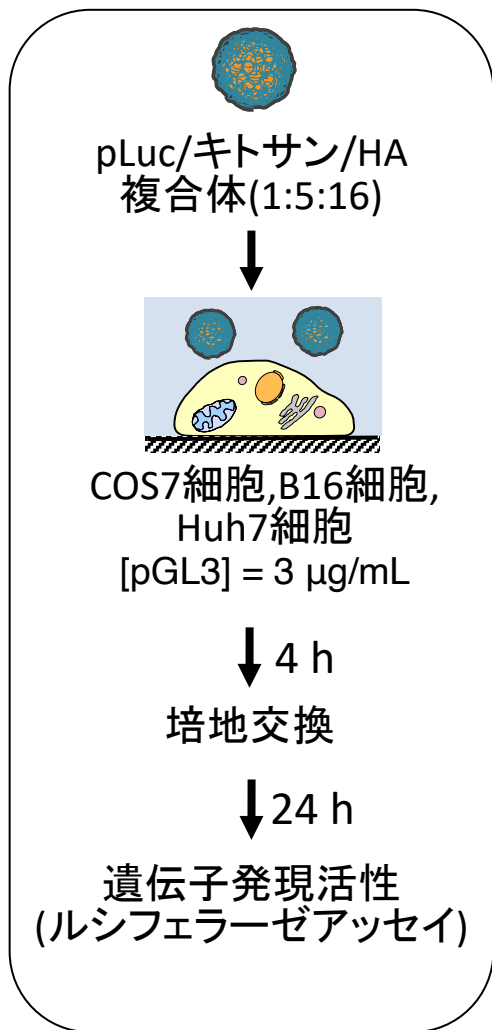


HA-700



HA-1300

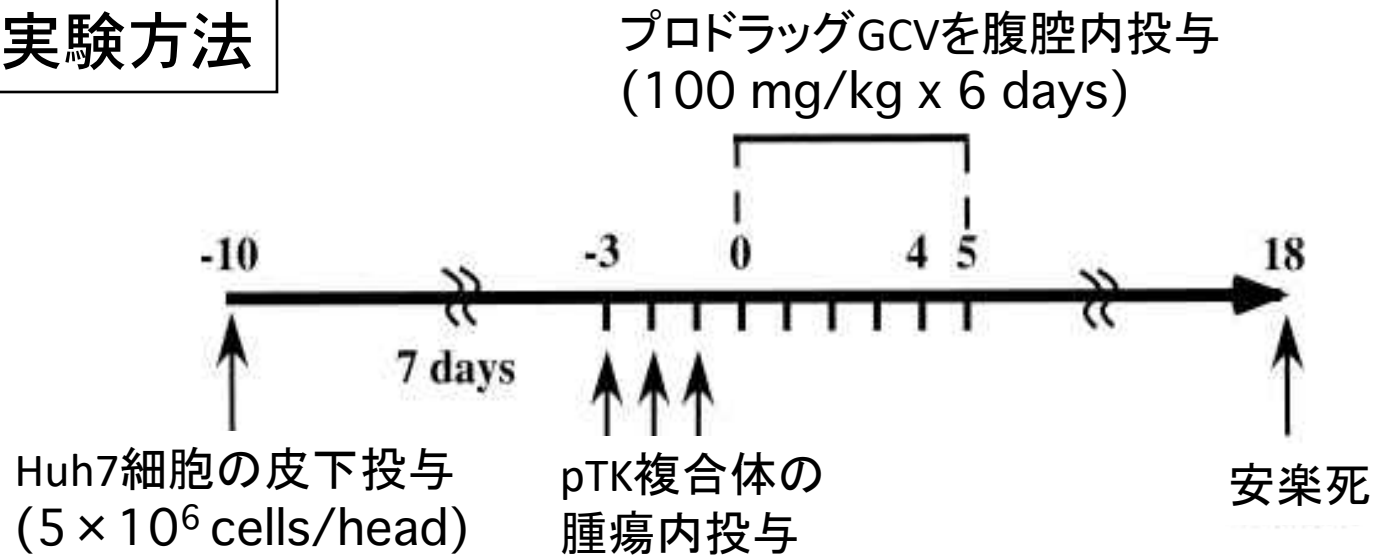
pDNA/キトサン/HA三元複合体の遺伝子発現活性(*in vitro*)



- ・発現活性はヒアルロン酸の分子量依存的であった。
- ・阻害実験によりCD44の関与が示唆された(COS7細胞)。

腫瘍皮下移植マウスでの自殺遺伝子治療

実験方法

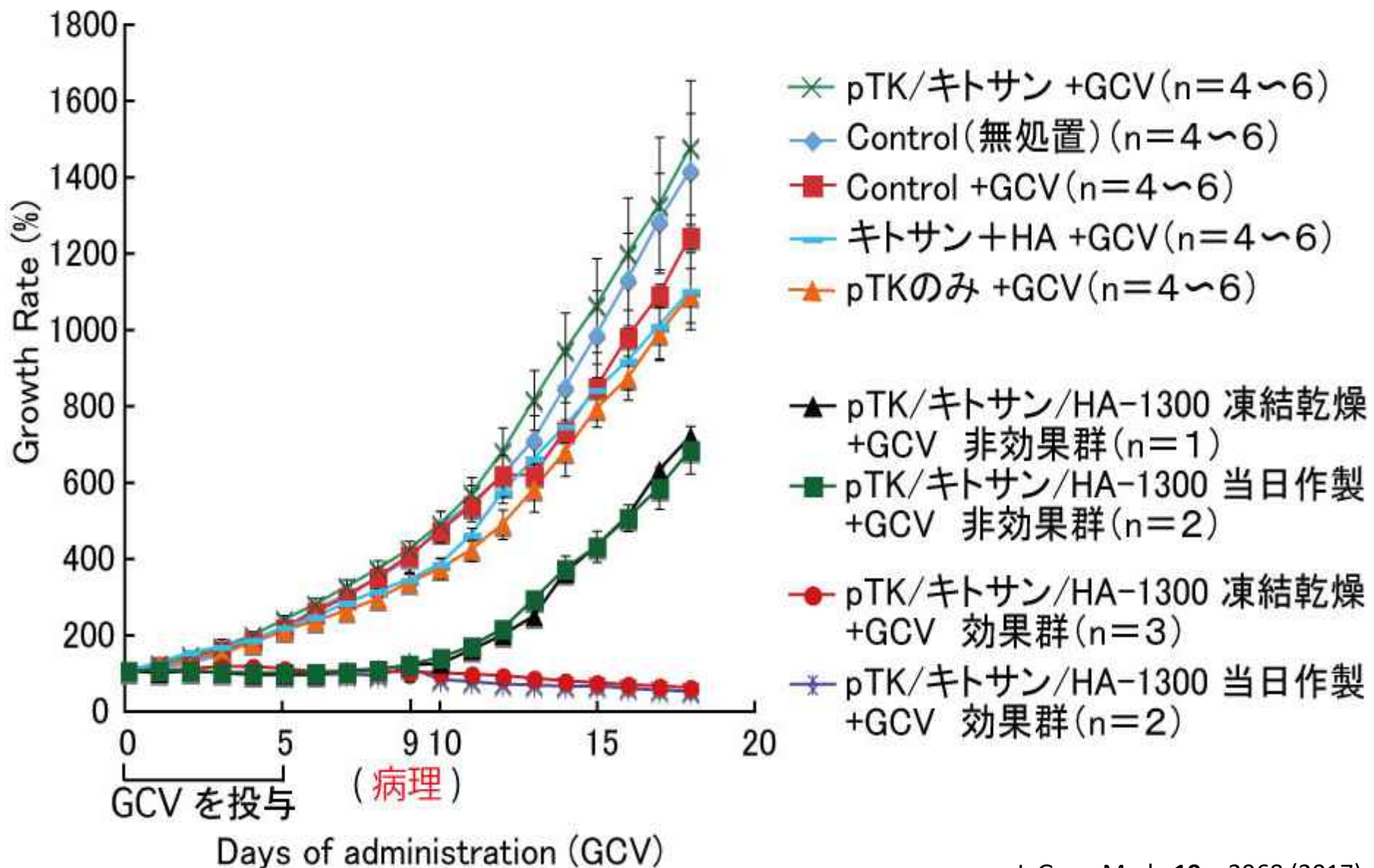


- pTK/chitosan/HA
P:N:C = 1:8:16

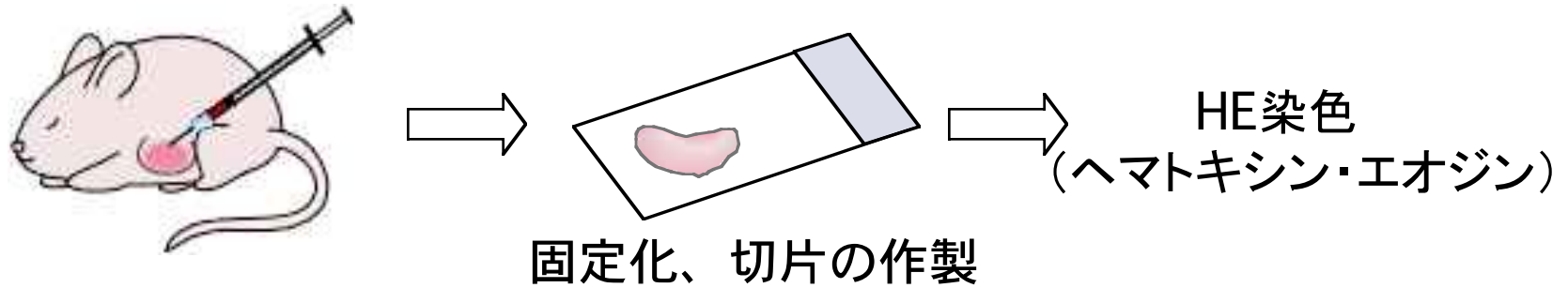
- pTK/chitosan
P:N = 1:8

[pTK] = 10 μ g/100 μ L x 3 days

pTK/キトサン/HA三元複合体による抗腫瘍効果



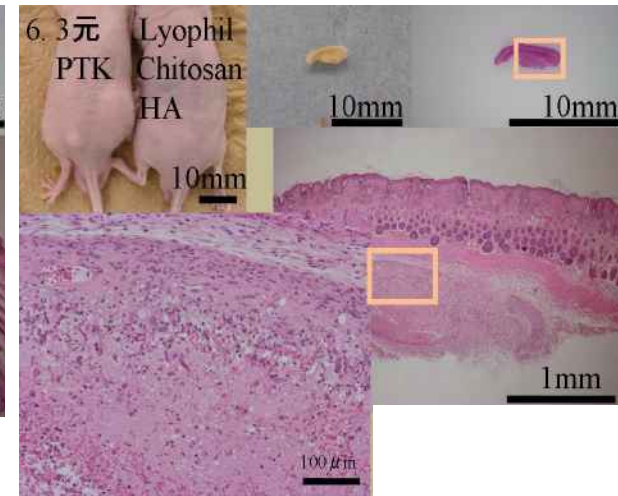
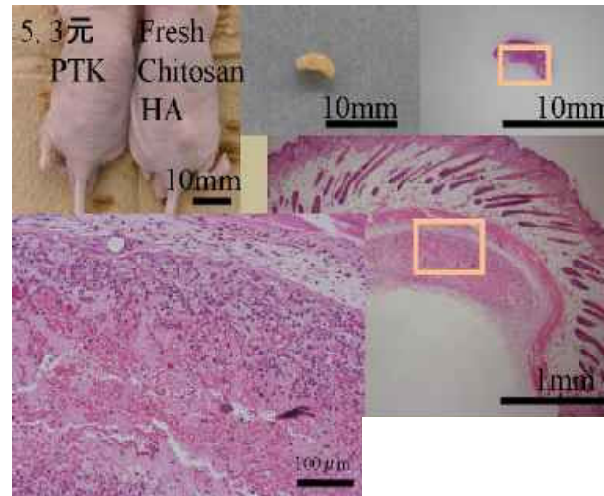
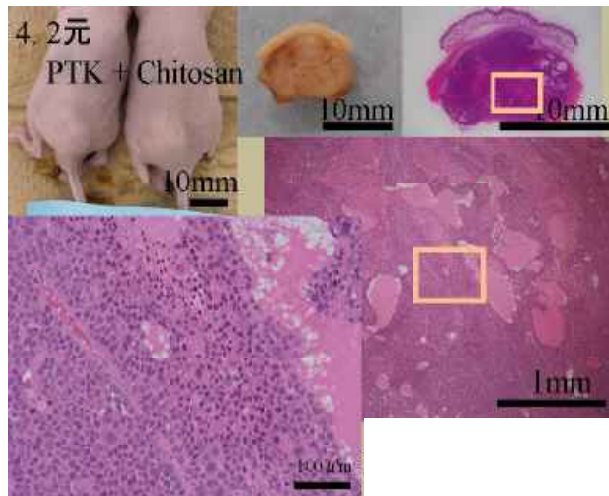
*in vivo*における自殺遺伝子療法の結果～病理学的検査～



pTK/キトサン
(当日作製)

pTK/キトサン/HA-1300
当日作製

凍結乾燥



腫瘍の増殖
ごく一部で壊死

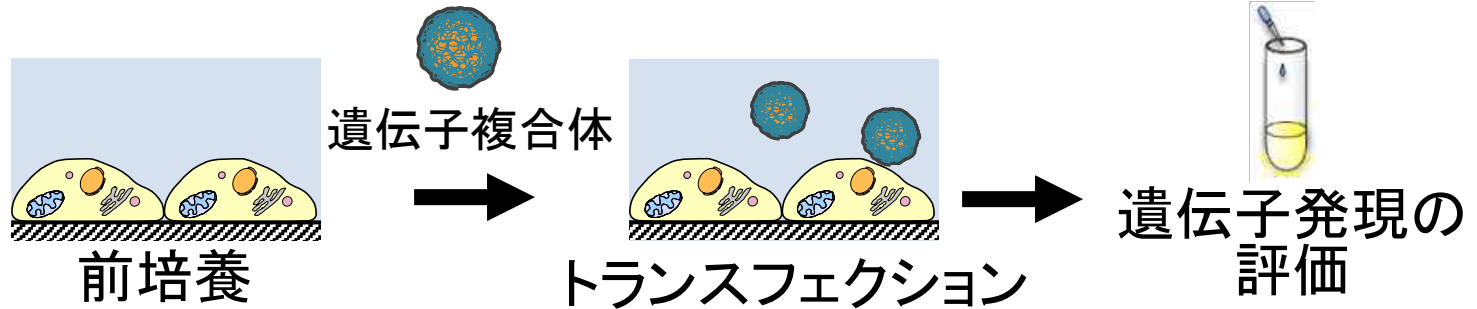
腫瘍の完全壊死

2元複合体と3元複合体の比較

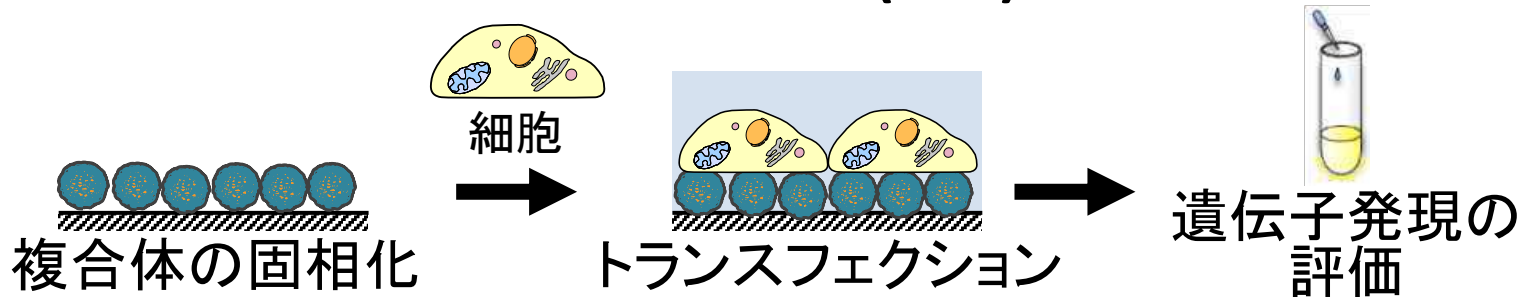
	pDNAのみ	pDNA/キトサン 二元複合体	pDNA/キトサン/ HA(CS) 三元複合体
安定性（凝集など）	×	×	○
<i>in vitro</i> での発現活性	×	○	○
核への遺伝子導入	×	○	○
細胞特異性	×	×	○
保存安定性	—	×	○
<i>In vivo</i> 自殺遺伝子療法	×	×	○

固相リバーstransフェクション (RTF)

● フォワードトランスフェクション (FTF)

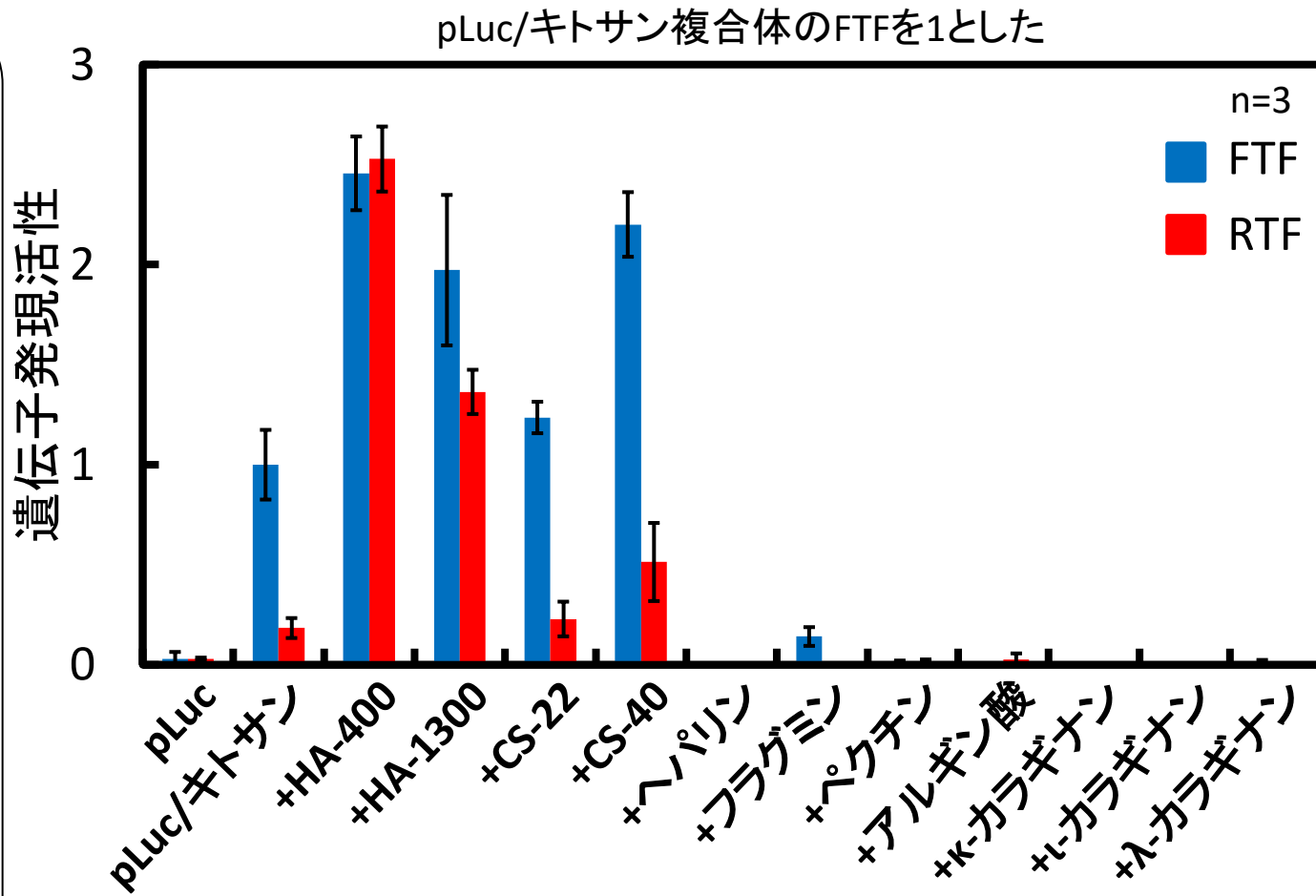
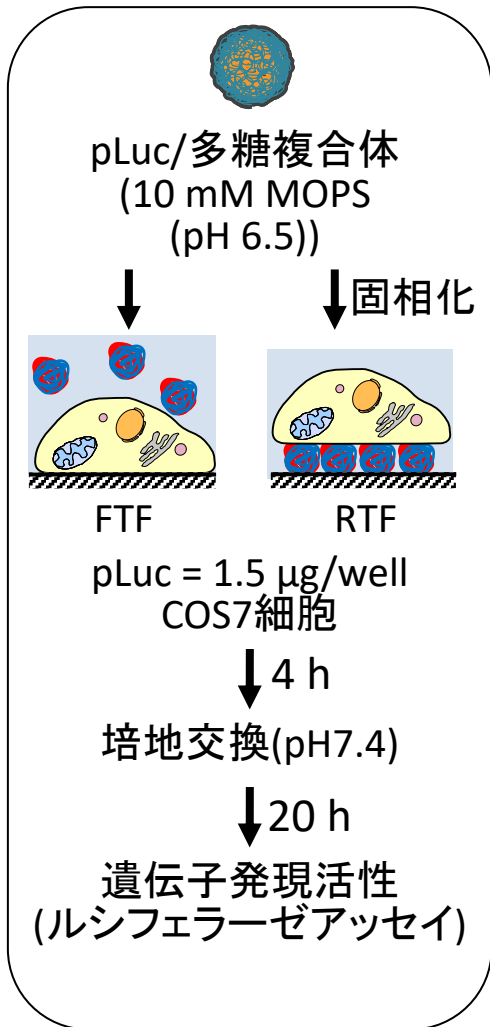


● 固相リバーstransフェクション (RTF)



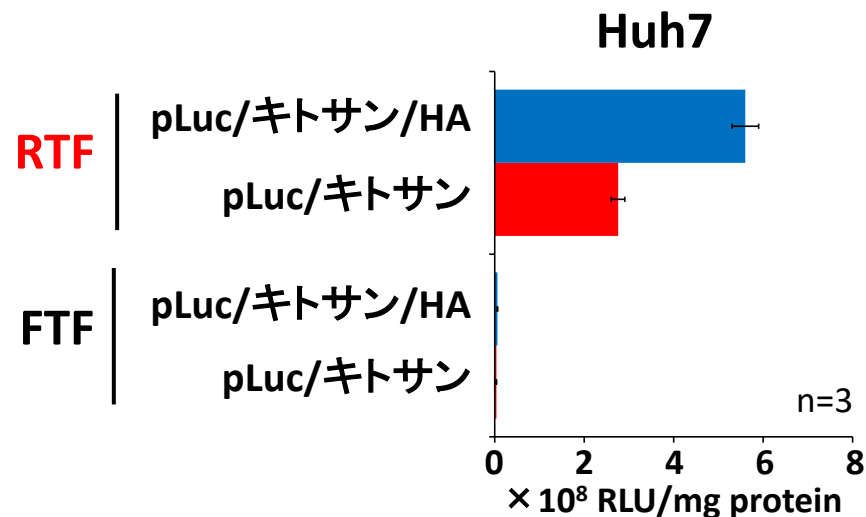
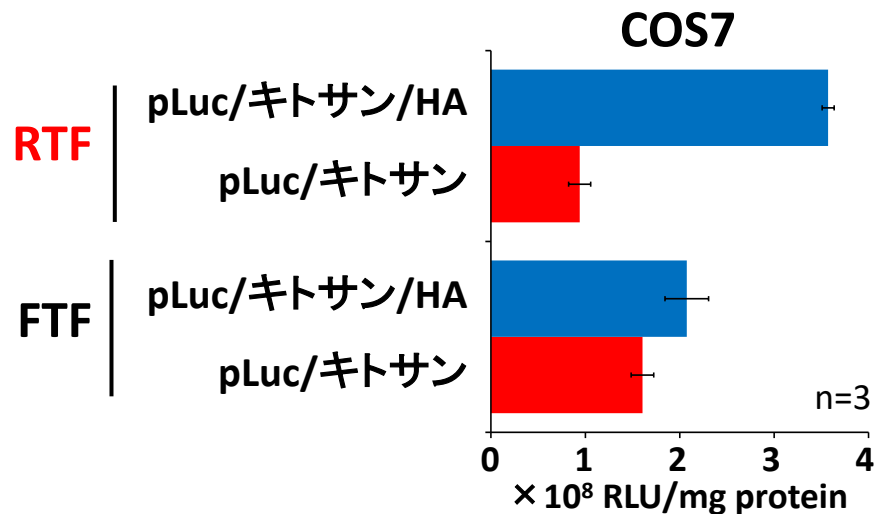
- ・ 細胞アレイの開発に有用
- ・ 検討されているキャリアが限定され、遺伝子発現メカニズムが解明されていない

RTFでの遺伝子/多糖複合体による遺伝子発現活性



ヒアルロン酸三元複合体はRTFに適する

RTFにおける遺伝子発現の細胞依存性



RTFでHA三元複合体の遺伝子発現が向上

pLuc/キトサン/HA-840複合体の細胞内輸送 (Huh7)

pLuc 複合体 (投与量) copies/cell	細胞内 取込み量 copies/cell	核内 移行量 copies/cell	mRNA 発現量 copies/cell	遺伝子 発現活性 RLU/mg protein
----------------------------------	----------------------------	--------------------------	----------------------------	-------------------------------

FTF

1.2×10^7	3.9×10^5	6.0×10^2	1.3×10^3	5.2×10^7
	3.3%	0.15%	$2.1 \times 10^2\%$	$4.0 \times 10^{6\%}$

RTF

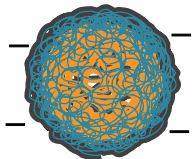
1.2×10^7	5.8×10^5	1.5×10^4	5.2×10^4	2.0×10^9
	4.8%	2.6%	$5.2 \times 10^2\%$	$3.8 \times 10^{6\%}$

Huh7細胞は、
CD44とRHAMM
の両方を発現

RTFでは、
微小管を介した核内
への移行効率の向上

HAは、
転写効率
高い

RTFでは、
遺伝子発現効率
の向上



多糖ナノ粒子の成果のまとめ

pDNA／キトサン／コンドロイチン硫酸三元複合体

- ・マクロピンサイトーシスによる取り込み
- ・凍結乾燥による保存安定性
- ・*in vivo*での遺伝子発現と抗腫瘍効果

pDNA／キトサン／ヒアルロン酸三元複合体

- ・ヒアルロン酸受容体介在型エンドサイトーシス
- ・微小管を介在した核内への効率的な輸送
- ・凍結乾燥による保存安定性
- ・*in vivo*での遺伝子発現と抗腫瘍効果
- ・固相リバーstransフェクション法による遺伝子発現の向上