

# 学位論文要旨

## 遺伝子導入ニオソーム複合体の調製とヒアルロン酸による腫瘍標的化に関する研究

栗原 潤

(MS 明朝、10.5 ポイント、2 頁：図表は不可)

リポソームは遺伝子治療において、優れた DNA 保持能及び遺伝子送達能を有する遺伝子ベクターとして広く利用されているが、その取扱いや生産性、生体内安定性に関していくつかの問題がある。近年、非イオン性界面活性剤 (NIS) が自己会合して生じる閉鎖ベシクル (ニオソーム) が、上記のリポソームの問題点を克服する遺伝子ベクターとして注目されている。そこで、本研究では遺伝子ベクターとして直鎖状 NIS の polyoxyethylene stearyl ether (Steareth) からなるニオソームを調製して遺伝子と複合し、その微粒子の特性、DNA 保持能、遺伝子発現効率及び細胞生存率を検討した。さらに、癌細胞膜表面上に過剰発現する CD44 に注目し、そのリガンドである hyaluronic acid (HA) を微粒子に組合せることで、癌細胞への標的指向性の付与を試みた。

### 第 1 章 pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体の調製とその物性、DNA 保持能及び安定性

本章では、種々親水性エチレンオキシド (EO) 鎖長の Steareth (Steareth-2, Steareth-5 及び Steareth-20)、cholesterol 及びカチオン性脂質の octadecylamine からなるニオソーム、luciferase 遺伝子をコードする plasmid DNA (pDNA) 及び DNA 凝縮を促進する poly-L-ornithine (PLO, 78 kDa) を複合化した三元複合体を調製し、その粒子特性や DNA 保持能、安定性に対するニオソームの質量比及び NIS の親水性鎖長の影響を検討した。また、高い遺伝子発現効率が証明されている Tween 80 ニオソームも調製し、各 Steareth ニオソームと比較した。各 Steareth ニオソームの平均粒子径及び $\zeta$ 電位は、Steareth の EO 鎖長が長くなるほど減少した。透過型電子顕微鏡による観察により、各ニオソームは比較的球形であり、リポソームに類似した層状構造であることを確認した。これらのニオソームを用いて pDNA/PLO 複合体と複合した pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体の粒子特性は、Steareth の EO 鎖長の違いや質量比によらず、複合する前とほとんど変化がみられなかった。次に、pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体の DNA 保持能をアガロースゲル電気泳動及び SYBR Gold<sup>®</sup> assay により評価したところ、各三元複合体はポリアニオン化合物 (デキストラン硫酸ナトリウム、DS) の有無によらず、pDNA/PLO 複合体よりも高い DNA 保持能を示した。DS 非存在下における pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体の DNA 保持能はニオソームの質量比の増加に伴い増大したが、Steareth の EO 鎖長による影響はみられなかった。また、DS 存在下における pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体の安定性は、Steareth の EO 鎖が短くなるほど増大し、中でも pDNA/PLO/Steareth-2 ニオソーム三元複合体による保護効果が最も高くなった。さらに、全ての pDNA/PLO/Steareth-2 ニオソーム三元複合体は核酸分解酵素 (DNase I) に対しても高い保護効果を示した。

### 第 2 章 pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体による遺伝子発現効率と安全性

第 1 章で調製した pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体を各種細胞 (A549 細胞又は HEK293 細胞) に適用し、複合体の遺伝子発現効率や細胞生存率に対する Steareth の親水性鎖長及びニオソームの質量比の影響を検討した。また、各ニオソームの溶血活性も検討した。pDNA/PLO/Steareth ニオソーム三元複合体による遺伝子発現効率は Steareth の EO 鎖長に依存し、Steareth の EO 鎖が短くなるほど増大した。特に、

pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体は、pDNA/PLO/Tween 80 ニオソーム三元複合体による遺伝子導入にも匹敵する高い遺伝子発現効率を示した。さらに、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体による遺伝子発現効率はニオソームの質量比の増加に伴い増大した。溶血活性試験及び MTT assay による安全性評価では、ニオソーム及び pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体による細胞毒性が、Stearth の EO 鎖が短くなるほど減少した。特に、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体は最も細胞毒性が低く、いずれの質量比も高い細胞生存率を示した。遺伝子発現効率に対する血清の影響も検討したところ、いずれの pDNA/PLO/Stearth ニオソーム三元複合体も血清の存在により遺伝子発現効率が僅かに減少したが、pDNA/PLO 複合体よりもその影響は少なかった。以上の結果より、ニオソームの質量比や Stearth の EO 鎖長は、pDNA/PLO/Stearth ニオソーム三元複合体の粒子特性、DNA 保持能、安定性、遺伝子発現効率及び細胞生存率に影響を与えることが示唆された。

### 第3章 pDNA/PLO/ニオソーム/HA 四元複合体の物性と遺伝子発現効率

第1章及び第2章での結果から、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体は優れた安定性、遺伝子発現効率及び安全性を示したが、非特異的な遺伝子導入により目的とする癌組織に効率的に導入できない可能性がある。そこで、遺伝子ベクターの標的細胞への標的指向性を向上させるために、癌細胞に過剰発現することが知られている CD44 を標的として、そのリガンドである HA (1,200 kDa) と pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体に複合した。pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体と HA との複合により、多層構造を有する四元複合体が得られ、HA の質量比の増加に伴い平均粒子径は増大し、 $\zeta$  電位は低下した。次に、複合体による遺伝子発現効率に対する HA の影響を評価するために、調製した pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体を CD44 が発現する肺癌細胞 (A549 細胞) に適用した。pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体による遺伝子発現効率は、pDNA 単独適用及び pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体よりも増大し、その発現効率は DNA 適用量や HA の質量比に依存した。また、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体適用後も高い細胞生存率を示した。pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体による遺伝子導入に CD44 が関与しているかを検証するために、CD44 抗体競合試験を行った。その結果、遺伝子発現効率が 50% 以上有意に抑制され、本複合体による遺伝子導入が静電的相互作用以外に CD44 を介している可能性があることが示唆された。さらに、調製した pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体による DNA 保持能及びポリアニオンや核酸分解酵素に対する安定性も評価したが、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム/HA 四元複合体は pDNA を放出することなく、複合体に保持することが示され、さらに DS による複合体からの pDNA 放出や DNase I による酵素分解に対して高い保護能を有することが明らかとなった。

上記で得られた結果より、Stearth の EO 鎖長は pDNA/PLO/Stearth ニオソーム三元複合体の粒子特性や DNA 保持能、安定性、遺伝子発現効率及び細胞生存率に影響を与えることが明らかとなった。特に、Stearth-2 ニオソームを用いた複合体は、Tween 80 ニオソームに匹敵する高い遺伝子発現効率を有することが明らかとなった。さらに、pDNA/PLO/Stearth-2 ニオソーム三元複合体に HA を複合することで、CD44 を過剰発現する癌細胞に対して標的指向性を増加させる可能性があることが示唆された。

## Thesis abstract

### Preparation of niosome complexes for gene transfer and targeting to tumor cells by complexing with hyaluronic acid

Jun Kurihara

Liposomes have been widely used as gene vectors with high DNA condensation and gene transfection abilities for gene therapy, but there are some problems, such as its handling, productivity and biostability. Recently, niosomes resulting from the self-assembly of non-ionic surfactants (NISs) in aqueous solution have attracted attention as gene vectors that overcome the above-mentioned problems of liposomes. In the present study, niosomes composed of linear NISs, polyoxyethylene stearyl ether (Steareth) were prepared and complexed with genes as gene vectors. The characteristics, DNA condensation ability, gene expression efficiency and cell viability of prepared complexes were assessed. In addition, hyaluronic acid (HA), which was a ligand to CD44 overexpressed on the tumor cell membrane were complexed to target to the cell efficiently.

#### 1. Preparation of pDNA/PLO/niosome ternary complexes and evaluation of the physicochemical properties, DNA condensation ability and protective effect

The ternary complexes designed from plasmid DNA (pDNA) encoding luciferase gene, poly-L-ornithine (PLO, 78 kDa) enhancing DNA condensation, niosomes consisting of various Steareths (Steareth-2, Steareth-5 and Steareth-20), cholesterol and a cationic lipid (octadecylamine) were prepared. The effect of the weight ratio and hydrophilic ethylene oxide (EO) chain length in Steareths on the physicochemical properties, DNA condensation ability and stability of pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes were assessed. Tween 80 niosome which was the most frequently utilized in niosome preparation and shows high gene expression efficiency was also used for comparison with Steareth niosomes. The size and  $\zeta$  potential of Steareth niosomes were decreased with lengthening of the EO chain in Steareth. It was also confirmed that each niosome had spherical in shape and a layered structure similar to liposomes by a transmission electron microscope. The size and  $\zeta$  potential of pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes were comparable to Steareth niosomes alone, regardless of the EO chain length and the weight ratio in Steareth. The DNA condensation ability was determined by agarose gel electrophoresis and SYBR Gold<sup>®</sup> assay. As the results, each pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes had higher condensation ability than pDNA/PLO complexes in the absence or presence of polyanion, dextran sulfate sodium (DS). While the DNA condensation ability of pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes was increased with increasing the weight ratio of niosome in the absence of DS, there was no difference in that between Steareths with different EO chain lengths. The protective effect of pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes was increased with shortening of the EO chain in the presence of DS; that of pDNA/PLO/steareth-2 niosome ternary complexes were the highest. In addition, the release of pDNA from pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes was significantly inhibited by increasing the weight ratio of niosomes. All ternary complexes also showed high protective effect against nuclease (DNase I).

#### 2. Evaluation of the gene expression efficiency and safety in pDNA/PLO/niosome ternary complexes

The ternary complexes were transfected to various cells (A549 or HEK293 cells) to assess the effect of the EO chain length in Steareths and the weight ratio of niosomes on the gene expression efficiency and cell viability. The hemolysis caused by niosomes was also investigated. The gene expression efficiency determined by luciferase assay of pDNA/PLO/Steareth niosome ternary complexes was increased with shortening of the EO chain in Steareths in

each cell; that of pDNA/PLO/stearth-2 niosome ternary complexes were the highest and were higher than pDNA/PLO/Tween 80 niosome ternary complexes. Moreover, the gene expression efficiency of pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes was increased with increasing the weight ratio of niosomes. The results determined by hemolysis and MTT assay indicated that the cytotoxicity decreased with shortening of the EO chain of Steareth in the niosomes and pDNA/PLO/Stearth niosome ternary complexes. Particularly, pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes was the lowest cytotoxicity, and the cell viability was high at each weight ratio of niosomes. Furthermore, the effect of serum on gene expression efficiency was also assessed. The gene expression efficiency of pDNA/PLO/Stearth niosome ternary complexes was slightly reduced in the presence of serum compared to that in the absence of serum, but the effect was less than pDNA/PLO complexes. Therefore, it was suggested that the EO chain length in Steareth and the weight ratio of niosomes affected the physicochemical properties, protective effect, gene expression efficiency and cell viability of pDNA/PLO/Stearth niosome ternary complexes.

### **3. Evaluation of the physicochemical properties and gene expression efficiency in pDNA/PLO/niosome/HA quaternary complexes**

From the above results, pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes showed better protective effect, gene expression efficiency and safety. However, the complexes might hard to deliver to the target cells by non-specific interaction. Therefore, in order to enhance gene delivery to target cells (tumor cells), quaternary complexes consisting of pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes and HA (1,200 kDa), which was a ligand to CD44 overexpressed on tumor cell membrane were prepared. Complexation with pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes and HA resulted in quaternary complexes with a multilayer structure. The size of pDNA/PLO/Stearth-2 niosome/HA quaternary complexes increased with increasing the weight ratio of HA, while the  $\zeta$  potential decreased. Secondly, the prepared quaternary complexes were transfected to A549 lung cancer cells, which is overexpressed CD44, to assess the effect of HA on gene expression efficiency. The expression efficiency of pDNA/PLO/Stearth-2 niosome/HA quaternary complexes was significantly higher than that of naked pDNA and pDNA/PLO/Stearth-2 ternary complexes, depending on the weight ratio of HA and the dose of pDNA. The high cell viability was shown even after applying the quaternary complexes to A549 cells. Furthermore, in order to verify the increased gene expression efficiency via the CD44-mediated pathway in pDNA/PLO/Stearth-2 niosome quaternary complexes, CD44 antibody competition assay was performed. As a result, the gene expression efficiency of the quaternary complexes was significantly inhibited by pre-treatment with CD44 antibody. This result suggested that the quaternary complexes may be taken up into the cells via a CD44-mediated pathway as well as electrostatic interactions with cell membrane. The DNA condensation ability and protective effect of the quaternary complexes were also investigated. It was indicated that the quaternary complexes were formed without releasing pDNA from the complexes and had resistance to release of pDNA from the complexes by DS and enzymatic degradation reaction via DNase I.

From the above results, it was found that the hydrophilic EO chain length in Steareth affect the physicochemical properties, DNA condensation ability, protective effect, gene expression efficiency and cell viability of pDNA/PLO/niosome ternary complexes. Particularly, the complex using Steareth-2 niosome showed high gene expression efficiency comparable to pDNA/PLO/Tween 80 niosome ternary complexes. In addition, it was suggested that complexing with pDNA/PLO/Stearth-2 niosome ternary complexes and HA would enhance the targeting ability to CD44-overexpressing tumor cells.

## 論文審査の結果の要旨

ニオソームは、非イオン性界面活性剤（NIS）が自己会合することにより形成される閉鎖ベシクルであり、その内部に低分子および高分子薬物を封入して薬物キャリアとして利用できるばかりでなく、遺伝子を封入した非ウイルスベクターとして細胞への遺伝子導入にも有用である。ニオソームは、従来、非ウイルスベクターとして検討されてきたリポソームに比べて、粒子安定性が高く、また安価に調製できることから、薬物送達や遺伝子治療の分野で汎用性が期待されている。本研究では、種々エチレンオキシド（EO）鎖長を有するポリオキシエチレンステアリルエーテル（Steareth、鎖長の順に Steareth-2、Steareth-5、および Steareth-20）を NIS としてニオソームを調製し、ポリカチオンである poly-L-ornithine（PLO）：遺伝子：ニオソームからなる三元複合体化した微粒子キャリアの遺伝子ベクターとしての有用性を評価している。また、がん細胞表面に過剰発現している CD44 をモデルターゲットとして、そのリガンドであるヒアルロン酸（HA）でさらに複合体化したベクターを調製し標的指向性について検討している。本研究では、レポーター遺伝子として luciferase がコードされた plasmid DNA（pDNA）をモデル遺伝子として遺伝子導入効果を検討している。

第 1 章では、まず EO 鎖長の異なる Steareth から調製したニオソームの粒子特性を評価し、EO 鎖長の増大に伴って平均粒子径およびプラスの電位が低下すること、および対照として用いた Tween 80 から調製したニオソームと比べて粒子安定性が優れていることを明らかにした。次に、Steareth を脂質としたニオソームを用いて pDNA/PLO/ニオソーム三元複合体を調製し、複合体の pDNA 保持能および複合体中での pDNA 安定性を検討した。PLO に対する競合ポリアニオンであるデキストラン硫酸 Na（DS）および DNA 分解酵素である DNase I 共存下、電気泳動法およびインターカレーション法により評価したところ、三元複合体中のニオソーム配合比が高くなるほど pDNA 保持能が高くなり、pDNA 安定性も増すという結果を得た。さらに、ニオソームを構成する Steareth の EO 鎖長の影響を検討し、EO 鎖長が短いほど複合体中の pDNA 安定性が高くなることを明らかにした。複合体化による粒子安定性に関して、試験したニオソーム配合比および EO 鎖長の範囲ではそれらの影響は認められず、安定な複合体粒子を維持できることを示している。

第 2 章では、溶血性試験により第 1 章で調製したニオソーム単独の細胞毒性を評価するとともに、ヒト肺基底上皮腺がん細胞株（A549）およびヒト胎児腎細胞株（HEK293）を用いて三元複合体をベクターとした遺伝子導入性と細胞毒性について検討している。EO 鎖長の異なる Steareth からなるニオソーム単独で赤血球を処理したところ、EO 側鎖の短い Steareth-2 および Steareth-5 ニオソームでは対照として用いた Tween 80 ニオソームに比べて溶血性が低く、一方、EO 鎖長の長い Steareth-20 処理では著しい溶血性を示した。このことから、Steareth-2 および Steareth-5 からなるニオソームにより引き起こされる細胞膜傷害性

に伴う細胞毒性は低いという結果を得ている。次に、これらニオソームから調製した三元複合体を用いて A549 および HEK293 にトランスフェクションし、luciferase 活性を指標にして遺伝子導入を確認した。対照である Tween 80 ニオソームからなる複合体からの活性と比べ、Stearth-2 および Steareth-5 ニオソーム複合体では同等またはそれ以上の活性が確認された。一方、Stearth-20 ニオソーム複合体での活性は Tween 80 ニオソーム複合体よりも低下した。これら複合体で 4 時間処理した後の細胞生存性は、Stearth-2 ニオソーム複合体で 80%以上であったのに対し、最も低い Steareth-20 ニオソーム複合体では 10%以下であった。luciferase 活性および細胞生存性に対する三元複合体による効果は、細胞の種類によらず同等であるという結果を得ている。Stearth-2 ニオソーム複合体を用い、ニオソーム配合比の影響を検討したところ、ニオソーム配合比が高くなるほど luciferase 活性が増大し、一方、細胞生存性は配合比の影響をほとんど受けず、試験した条件では pDNA : PLO : Steareth-2 ニオソーム比が 1 : 4 : 30 の条件が遺伝子導入と細胞生存性の点で最適であるとの結果を得ている。EO 鎖長の短い Steareth で効果が高く細胞毒性が低い理由は明らかではないが、鎖長が長くなるほど立体障害により細胞表面での相互作用が抑制されることによると考察している。

第 3 章では、三元複合体に HA を複合体化した四元複合体を調製し、細胞への標的指向性の付与について検討している。細胞表面に CD44 発現が確認できた A549 を四元複合体で処理し遺伝子導入効果を評価したところ、HA を含まない三元複合体に比べて有意に高い luciferase 活性が得られ、その効果は四元複合体中の HA 配合比の増大とともに増大との結果を得ている。この効果は、対照である pDNA/Lipofectamine® 2000 複合体によるトランスフェクションから得られた luciferase 活性に匹敵し、一方、細胞生存性については四元複合体のほうが優れているという結果であった。四元複合体によるトランスフェクションの効果は、CD44 抗体で A549 を前処理したときに有意に低下したことから、リガンドとして用いている HA が効果的な遺伝子導入を可能にしていることを示唆し、本研究で検討したニオソーム複合体ベクターに標的指向性を付与することが可能であると明らかにしている。

以上、本論文の結果から、汎用性の高い NIS から調製したニオソーム、ポリカチオン性高分子、および pDNA からなる三元複合体が粒子安定性の高い非ウイルスベクターとして利用できることが示された。この複合体に細胞特異的なリガンドをさらに複合体化することにより標的指向性を与えることも示され、今後、安価、かつ汎用性、安全性、および細胞特異性の高い遺伝子導入ベクターの創製に対して新たな知見を与えるものであると評価できる。適切な方法で複合体の特徴づけもなされており、学術的にも意義深い内容であると判断できる。よって本論文は、本研究科課程による博士（薬学）の論文に十分に値するものと判断する。