

(論文内容の要旨)

プラスミド DNA を用いた遺伝子治療は肺癌や慢性閉塞性肺疾患などの難治性の肺疾患に対する新しい治療法として注目を集めており、治療用遺伝子を肺組織へ選択的かつ効率的に送達させることを目的に各種非ウイルスキャリアが開発されている。中でもカチオン性微粒子とカチオン性ポリマーは、静脈内投与後により肺血管内皮細胞への効率的な遺伝子導入を示すことが知られているが、プラスミド DNA の CpG モチーフに対する Toll-like receptor 9 の認識が nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) を活性化し、肝臓 Kupffer 細胞からの炎症性サイトカイン産生を経て肝障害が惹起されるという問題も指摘されている。これまで、これらのキャリアを用いた遺伝子導入法に関する検討の多くは遺伝子発現に焦点が当てられ、副作用に関する情報は十分には得られていない。そこで申請者は、カチオン性微粒子あるいはカチオン性ポリマーとプラスミド DNA との複合体の静脈内投与により誘導される炎症性サイトカイン産生および肝障害に対して総合的な評価を行い、得られた知見をもとに抗炎症性薬物を用いた炎症性サイトカイン産生と組織障害の抑制法の開発を行った。

## 第1章 カチオン性キャリア/プラスミド DNA 複合体の静脈内投与により誘導される炎症性サイトカイン産生と肝障害の評価

最初に、既に高い *in vivo* 遺伝子発現を示すことが知られているカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) と DOTAP/cholesterol から構成されるカチオン性リポソームを対象として、炎症性サイトカイン産生ならびに肝組織障害に関する総合的な評価を行った。PEI/プラスミド DNA 複合体投与群では、プラスミド DNA の投与量ならびに混合比を変えて検討した結果、血清中 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 濃度は正常値と比較して僅かに上昇し、肝臓中活性化 NF $\kappa$ B 量は正常値の範囲であったが、顕著な肝障害が認められた。一方、カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体投与群では、プラスミド DNA 投与量や混合比の増大により、血清中 TNF- $\alpha$  濃度ならびに肝臓中活性化 NF $\kappa$ B 量の有意な上昇、ならびに顕著な肝障害が認められた。以上、PEI 複合体とカチオン性リポソーム複合体では、肝障害の惹起機構が異なり、PEI 複合体ではキャリア自身の細胞毒性により、カチオン性リポソーム複合体では肝臓における NF $\kappa$ B の活性化ならびに炎症性サイトカインの産生により、肝障害が惹起される可能性が示された。

## 第2章 カチオン性微粒子/プラスミド DNA 複合体の静脈内投与により誘導される炎症性サイトカイン産生に対する抑制法の開発

前章の結果より、カチオン性のリポソームや脂質の微粒子を用いた遺伝子導入では、肝臓 NFκB の活性化を抑制する抗炎症薬を適用することで肝毒性惹起の抑制が可能になると考えられることから。エマルジョンに安定に封入できる dexamethasone palmitate を封入したカチオン性エマルジョンとプラスミド DNA との共送達による影響を評価した。dexamethasone palmitate 封入カチオン性エマルジョンとプラスミド DNA の複合体投与群では、肺でカチオン性リポソーム複合体投与群と同程度の高い遺伝子発現が認められ、一方、血清中の炎症性サイトカイン、TNF-α、interferon (IFN)-γ、interleukin(IL)-6 および IL-12 濃度の上昇は抑制され肝障害も認められなかった。次に、カチオン性リポソームに安定に封入でき免疫担当細胞では抗炎症作用を示す一方、癌細胞では分化誘導や TNF レセプター 1 (TNFR 1) 誘導に基づく抗腫瘍作用を示す All-trans retinoic acid (ATRA) を選び、癌遺伝子治療への応用の可能性を検討した。ATRA 封入カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体投与群では、肺では ATRA を包含しないカチオン性リポソーム複合体投与群と同程度の高い遺伝子発現が認められたのに対し、TNF-αおよび IL-6 濃度は有意に抑制され肝障害の惹起も認められなかった。

### 第3章 全トランス型レチノイン酸封入カチオン性リポソーム/IL-12 プラスミド DNA 複合体の静脈内投与による肺転移抑制

NK 細胞を刺激し Th1 細胞を誘導する IL-12 は癌免疫療法への応用が期待されているが、タンパク製剤の投与では全身性の副作用が問題となる。そこで、IL-12 プラスミド DNA と ATRA 封入カチオン性リポソームの複合体を調製し肺癌転移モデルマウスを用いて治療効果を評価した結果、複合体投与群では肺での高い IL-12 発現が認められ、ATRA 封入カチオン性リポソームの単独投与群や IL-12 プラスミド DNA とカチオン性リポソーム複合体の投与群に比べて有意な肺転移の抑制と生存日数の延長が認められた。また、ATRA 封入カチオン性リポソーム/IL-12 プラスミド DNA 複合体投与群では、肺における TNFR 1 mRNA の有意な増加と転移肺組織におけるアポトーシス細胞の増加が認められ、本製剤が肺癌転移の抑制を目的とした遺伝子導入において有効性と低障害性併せ持つことが示された。

以上、申請者はカチオン性ポリマーや微粒子とプラスミド DNA との複合体が静脈内投与により誘導する炎症性サイトカイン産生および肝障害に対して総合的な評価を行うと共に、得られた知見をもとにカチオン性エマルジョンへの dexamethasone palmitate 封入や、カチオン性リポソームへの ATRA 封入に基づく、炎症性サイトカイン産生および肝障害の抑制法を開発した。これらの知見は、非ウイルスキャリアを用いた遺伝子治療法の開発に対して有益な基礎的情報を与えると考えられる

## (論文審査の結果の要旨)

プラスミド DNA を用いた遺伝子治療は肺癌や慢性閉塞性肺疾患などの難治性の肺疾患に対する治療法として注目され、治療用遺伝子を肺組織へ選択的かつ効率的に送達させることを目的に各種非ウイルスキャリアが開発されている。中でもカチオン性微粒子とカチオン性ポリマーは、静脈内投与により肺血管内皮細胞へ効率的な遺伝子導入をもたらすが、プラスミド DNA の CpG モチーフに対する Toll-like receptor 9 の認識が nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) を活性化し、肝臓 Kupffer 細胞からの炎症性サイトカイン産生を経て肝障害を惹起する問題も指摘されている。申請者は、カチオン性微粒子あるいはカチオン性ポリマーとプラスミド DNA との複合体投与により誘導される炎症性サイトカイン産生および肝障害に対して総合的な評価を行い、得られた知見をもとに抑制法の開発を行った。

最初に、ポリエチレンイミン (PEI) と DOTAP/cholesterol から構成されるカチオン性リポソームを対象として、炎症性サイトカイン産生ならびに肝組織障害に関する総合的な評価を行った。PEI/プラスミド DNA 複合体投与群では、血清中 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 濃度は正常値と比較して僅かに上昇し、肝臓中活性化 NF- $\kappa$ B 量は正常値の範囲であったが、顕著な肝障害が認められた。一方、カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体投与群では、血清中 TNF- $\alpha$  濃度ならびに肝臓中活性化 NF- $\kappa$ B 量の有意な上昇と顕著な肝障害が認められた。以上、両複合体間で肝障害の惹起機構が異なり、PEI 複合体ではキャリア自身の細胞毒性で、カチオン性リポソーム複合体では肝臓における NF- $\kappa$ B の活性化と炎症性サイトカインの産生により、肝障害が惹起される可能性が示された。

以上の結果より、微粒子性キャリアを用いた遺伝子導入では肝臓 NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する抗炎症薬の併用により肝毒性の抑制が可能になると考えられることから dexamethasone palmitate を封入したカチオン性エマルジョンとプラスミド DNA との共送達による影響を評価した。dexamethasone palmitate 封入カチオン性エマルジョンとプラスミド DNA の複合体投与群では、肺でカチオン性リポソーム複合体投与群と同程度の高い遺伝子発現が認められ、一方、血清中の炎症性サイトカイン、TNF- $\alpha$ 、interferon (IFN)- $\gamma$ 、interleukin (IL)-6 および IL-12 濃度の上昇は抑制され肝障害も認められなかった。次に、免疫担当細胞では抗炎症作用を示す一方、癌細胞では分化誘導や TNF レセプター 1 (TNFR1) 誘導に基づく抗腫瘍作用を示す All-*trans* retinoic acid (ATRA) を選び、癌遺伝子治療への応用の可能性を検討した結果、ATRA 封入カチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体投与群では、肺で高い遺伝子発現が認められたのに対し、TNF- $\alpha$  および IL-6 濃度は有意に抑制され肝障害も認められなかった。

さらに、NK 細胞を刺激し Th1 細胞を誘導する IL-12 プラスミド DNA と ATRA 封入カチオン性リポソームの複合体を調製し肺癌転移モデルマウスを用いて治療効果を評価した結果、複合体投与群では肺で高い IL-12 発現が認められ、有意な肺転移の抑制と生存日数の延長が認められた。また、ATRA 封入カ

チオン性リポソーム/IL-12 プラスミド DNA 複合体投与群では、肺における TNFR 1 mRNA の有意な増加と転移肺組織におけるアポトーシス細胞の増加が認められ、本製剤が肺癌転移の抑制を目的とする遺伝子導入に対して有効性と低障害性を併せ持つことが示された。

以上、申請者はカチオン性ポリマーや微粒子とプラスミド DNA との複合体が誘導する炎症性サイトカイン産生および肝障害に対して総合的な評価を行い、得られた知見をもとにカチオン性エマルジョンへの dexamethasone palmitate や ATRA 封入に基づく、炎症性サイトカイン産生および肝障害の抑制法を開発した。これらの知見は、非ウイルスキャリアを用いた遺伝子治療法の開発に対して有益な基礎的情報を与えるものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。さらに、平成 21 年 8 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。