

マクロファージにおける高分子医薬品の細胞内動態
制御と効果改善に関する研究

高 木 敏 英

目次

総論の部-----	1
緒言 -----	1
第 I 章 化学修飾による superoxide dismutase の細胞膜親和性および活性酸素消去能の改善- 2	
I - 1 カチオン化 SOD (Cat-SOD) によるマクロファージにおける活性酸素消去作用の改善-----	3
1 - a Cat-SOD の合成および物理化学的特性 -----	3
1 - b マクロファージの単離と培養-----	3
1 - c 実験手技-----	4
1 - d 連続接触実験における活性酸素消去作用 -----	5
1 - e 前処理実験における活性酸素消去作用-----	5
1 - f 活性酸素消去作用に対する前処理時間と温度の影響 -----	7
1 - g 前処理中におけるエンドサイトーシス阻害剤の影響 -----	7
I - 2 Cat-SOD のマクロファージにおける細胞取り込み特性-----	7
2 - a 放射標識体の合成-----	8
2 - b 細胞取り込み特性-----	8
2 - c エンドサイトーシス阻害剤の影響 -----	9
I - 3 Cat-SOD のマクロファージにおける細胞内動態-----	10
3 - a 蛍光標識体の合成-----	10
3 - b 細胞内動態の経時変化-----	11
3 - c エンドサイトーシス阻害剤の影響 -----	11
I - 4 考察-----	11
第 II 章 アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内動態に及ぼすカチオン性リポソームの影響-----	14
II - 1 癌遺伝子 <i>c-myc</i> に対する Oligo によるヒト前単球細胞株 U937 細胞の増殖抑制効果-----	14
1 - a Oligo の塩基配列の選択とその誘導体 -----	15
1 - b Oligo 単独におけるアンチセンス効果 -----	15
1 - c 放射標識体の細胞取り込み特性の評価-----	16
1 - d マクロファージへの細胞取り込み特性-----	17
1 - e 蛍光標識体の細胞内動態 -----	17
1 - f カチオン性リポソームによる細胞取り込みの増大 -----	18

総論の部

緒言

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、薬物の体内動態を精密に制御することにより薬物療法の最適化を実現しようとする薬物投与形態の総称である。生理活性タンパク質等の高い薬理活性を有し、病巣部位へ望ましい濃度-時間パターンのもとに送達することが必要な薬物を医薬品として開発し、これらを用いた有効かつ安全な治療を実現するためには、DDS 技術の導入は必要不可欠であると考えられる。近年、新しい薬物治療法として生理活性タンパク質や遺伝子等の高分子医薬品を用いる試みが注目されているが、薬効を発現するためにこれら高分子医薬品は細胞内のある特定の細胞小器官へ送達されることが必要である場合が多い。従って、高分子医薬品を用いた治療の最適化には、個体レベルにおける動態のみならず、標的細胞における細胞レベルでの動態を厳密に制御する必要があると考えられる。よって、細胞内まで含めた高分子医薬品の動態を評価しその薬効発現との関係を明らかにすることにより、最大の治療効果を得ることができる高分子性 DDS の開発が可能となると思われるが、このような観点に基づき展開された DDS 研究の例は乏しいのが現状である。

そこで著者は、生体内において異物排除や免疫などにおいて重要な役割を演じており、高分子医薬品の標的細胞としてのみならず、全身体内動態を規定する細胞としても重要と考えられるマクロファージを対象に選び、物理化学的性質や細胞内の標的部位が異なる 3 種の高分子医薬品の細胞取り込み動態を解析し、それぞれの生物学的効果との関連を検討した。また、得られた情報に基づき、高分子医薬品を用いた治療の最適化のための細胞内動態制御法の開発指針の確立を試みた。まず最初に、生理活性タンパク質として superoxide dismutase (SOD) を選び、炎症性マクロファージの細胞膜やエンドソーム膜等に存在する NADPH oxidase より産生され、種々の炎症性疾患に関与しているスーパーオキシドアニオンを効率的に消去することを目的に SOD に化学修飾を施し、その修飾効果を評価した。次に、病因遺伝子の発現を特異的に抑制することにより治療効果を発現するアンチセンスオリゴヌクレオチド (Oligo) をとりあげ、Oligo 単独、あるいは効果増強を目的としてカチオン性リポソームとの複合体とした際の、作用部位である核あるいはサイトゾルへの移行性とアンチセンス効果との関連を評価した。さらに、遺伝子治療において非ウイルスベクターとして用いられ、細胞内の標的部位が核に限定されるプラスミド DNA (pDNA) を対象として、pDNA の細胞取り込み動態とマクロファージ活性化との関連について検討を行った。

以下、これらの結果について三章にわたり論述する。

1-g カチオン性リポソームによる細胞内動態の制御	20
1-h カチオン性リポソームによる生物学的効果への影響	21
II-2 inducible nitric oxide synthase (iNOS) に対する Oligo による活性化マクロファージの NO 産生抑制効果	22
2-a Oligo の塩基配列の選択とその誘導体	22
2-b Oligo 単独におけるアンチセンス効果	23
2-c 蛍光標識体の細胞内動態	24
2-d カチオン性リポソームによる細胞内動態の制御	25
2-e カチオン性リポソームによる生物学的効果への影響	26
II-3 考察	27
第三章 プラスミド DNA の取り込みとマクロファージ活性化	30
III-1 マクロファージにおける細胞取り込み特性	31
1-a 常在性マクロファージと滲出性マクロファージの比較	31
1-b 常在性マクロファージにおける結合パラメーターの算出	32
1-c 各種ポリアニオンによる取り込み阻害	32
1-d 蛍光標識プラスミド DNA の細胞内動態	34
III-2 細胞取り込みにおけるスカベンジャーレセプターの関与の有無	34
2-a スカベンジャーレセプター安定発現 CHO(SRA) 細胞株における取り込み特性	35
2-b スカベンジャーレセプター欠損マウス由来マクロファージにおける取り込み特性	35
2-c スカベンジャーレセプター欠損マウス静脈内投与後の体内動態	37
2-d 様々なポリアニオンによる取り込み阻害	38
III-3 プラスミド DNA によるマクロファージの活性化機構	39
3-a プラスミド DNA による各種炎症メディエーターの放出	39
3-b TNF- α の誘導特性と pDNA の取り込み特性との関連	41
III-4 考察	41
結論	44
謝辞	46
実験の部	47
第 I 章 実験の部	47
第 II 章 実験の部	51
第 III 章 実験の部	55
引用文献	58

第 I 章 化学修飾による superoxide dismutase の細胞膜親和性および活性酸素消去能の改善

近年の遺伝子組み替え技術の発達により、種々の生理活性タンパク質を容易に製造することが可能となり、これらの多くは既に医薬品として上市されるにいたっている。これらは微量で強い効果を示すものの、強い副作用を有することや生体内での安定性・半減期等に問題を抱える例などが多いことから、その開発に DDS 技術の導入が活発に進められている。そのなかでもターゲティングは薬物の体内における分布過程を制御する技術であり、薬物投与後の生体内における分布動態を変化させ、薬物を標的臓器や病巣部位へ効率よく送達させることにより副作用の軽減、投与量や投与回数の削減といった Quality of Life の向上につながるものとして期待されている (1, 2)。

superoxide dismutase (SOD) は様々な炎症性疾患に関与していることが報告されている活性酸素であるスーパーオキシドアニオンを特異的に消去することから、活性酸素障害の治療薬としての開発が期待されている生理活性タンパク質である (3)。しかしながら SOD の全身レベルにおける体内動態は、静脈内投与後速やかに腎臓から尿中に排泄され、血中での半減期が約 5 分と非常に短いことから、繰り返し投与を行わないと効果が得られないなどの問題が指摘されている (4, 5)。そこでこのような問題を解決させるため、polyethyleneglycol (PEG) で SOD を修飾することにより血中半減期を顕著に増大させた誘導体の開発や (6-9)、リポソームを利用した製剤化 (10-14)、スチレンマレイン酸エステル誘導体 (15-17)、脂肪酸 (18) やレシチン (19-21) による化学修飾といったアプローチによる SOD の動態制御の試みがなされてきた。一方、SOD に糖分子を導入することにより SOD の体内動態を制御できること、またそれにより薬理効果を改善できる (22-26)

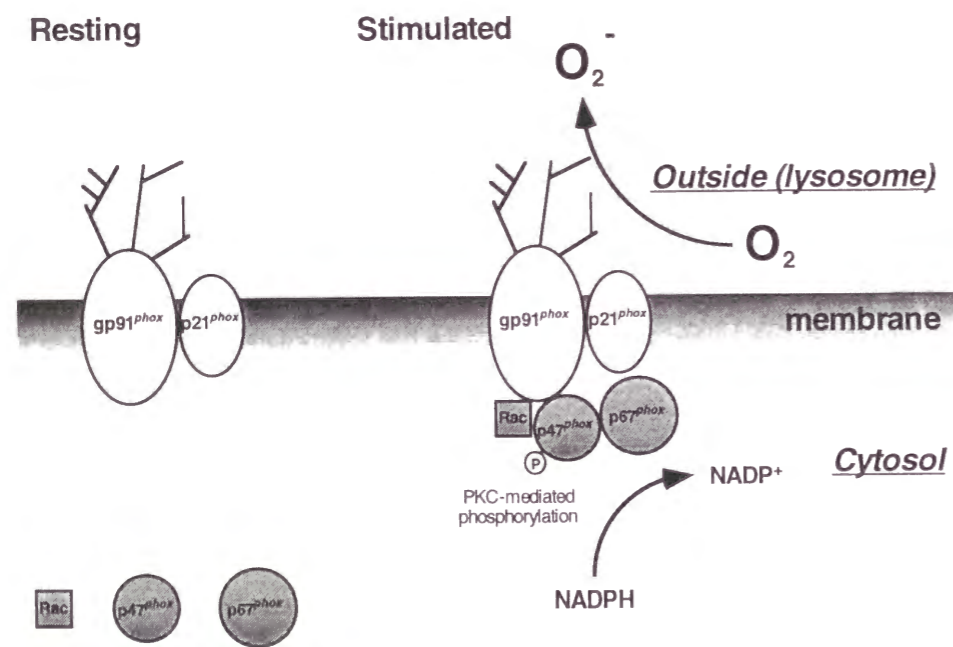


Fig. 1 Schematic structure of NADPH oxidase.

ことが示されている。とりわけマンノース修飾 SOD (Man-SOD) は、マンノースレセプターを介したエンドサイトーシスの機構により炎症性マクロファージに効率よく取り込まれ、優れた活性酸素消去を示したことから、活性酸素による炎症性疾患への治療薬としての可能性が報告されている (27)。炎症時に放出されるスーパーオキシドアニオンは、マクロファージや好中球などの貪食細胞に発現している NADPH oxidase が種々の刺激に反応して産生している (Fig. 1) (28-30)。この NADPH oxidase は細胞膜やエンドソーム膜上に存在していることから、SOD を治療薬として適用すること目的として化学修飾を施す際には、レセプター介在性エンドサイトーシスにより速やかに細胞内に内在化を受けると考えられる Man-SOD のような誘導体よりも、むしろ細胞膜上に長くとどまることにより NADPH oxidase の近傍に存在できるような SOD 誘導体を設計することで、SOD の有する活性酸素消去能を最大限に引き出すことが可能になるとと思われる。

そこで本章においては、細胞膜の負電荷との静電的相互作用に基づき、細胞膜表面に SOD を局在させることを目的として SOD に正電荷を導入したカチオン化 SOD (Cat-SOD) を設計した。そして、マクロファージより放出される活性酸素に対する消去能と細胞取り込み機構との関連に基づき、カチオン化修飾効果の評価を行った (31)。

I - 1 カチオン化 SOD (Cat-SOD) によるマクロファージにおける活性酸素消去作用の改善

I - a Cat-SOD の合成および物理化学的特性

カチオン化 SOD (Cat-SOD) は、1, 6-hexamethylenediamine を SOD のカルボキシル基に導入することにより合成し、クロマトフォーカシングにより等電点が 9.0 以上のものを回収して本実験に用いた。マンノース修飾 SOD (Man-SOD) は、2-imino-2-methoxyethyl 1-thiomannoside を SOD のアミノ基に導入することにより合成した (Fig. 2)。各誘導体の酵素活性は化学修飾に伴い若干減少したが、未修飾 SOD の約 85% の活性を保持していることが示された (Table 1)。過酸化水素で処理した inactivated Cat-SOD (32) では、その酵素活性をほとんど失っていることが確認された。また、化学修飾によって見かけの分子量に大きな変化は認められなかった。

I - b マクロファージの単離と培養

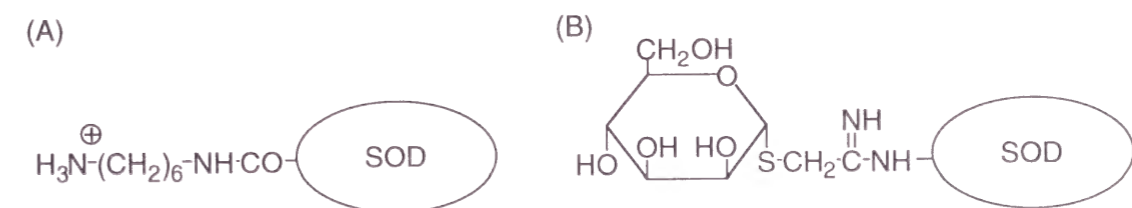


Fig. 2 Chemical structures of Cat-SOD (A) and Man-SOD (B).

Table 1 Physicochemical properties of SOD and SOD derivatives.

Compounds	Number of NH ₂ groups ¹⁾	Molecular weight ²⁾	Enzymatic activity ³⁾ (U/mg)
SOD	24.0	32,000	3,200 (100)
Cat-SOD	35.0	34,000	2,675 (83.6)
Inactivated Cat-SOD	35.0	34,000	63 (1.97)
Man-SOD	3.8	34,000	2,730 (85.3)

¹⁾ The degree of modification of amino groups was determined by measuring the amount of free amino groups with trinitrobenzene sulfonic acid using glycine as a standard.

²⁾ The molecular weight of SOD derivatives was estimated by HPLC. The apparent molecular weight of SOD derivatives was determined by the calibration curve obtained from the marker proteins.

³⁾ Enzymatic activity of SOD was determined by the nitroblue tetrazolium reduction method using an SOD test kit. Numbers in parentheses are retained enzymatic activity expressed as the percentage of native enzyme.

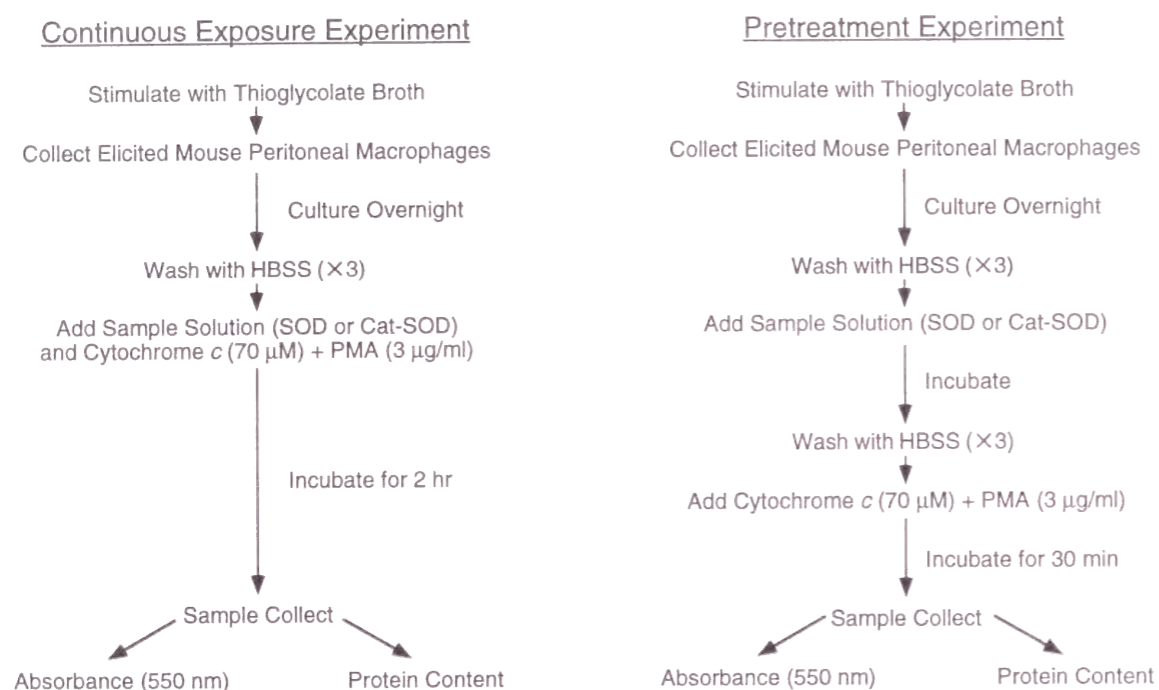


Fig. 3 Experimental procedures of inhibitory effect of SOD or SOD derivatives on superoxide anion release from macrophages stimulated by PMA.

滲出性マウス腹腔マクロファージは、チオグリコレート (TGC) 培地をマウス腹腔内に接種してから 4 日後、RPMI1640 培地を腹腔内に注射し回収することによって採取した。採取した細胞を培地に懸濁させて播種し、2 時間後に非接着の細胞を除くことによりマクロファージを得た。その後 1 日間培養したものを実験に用いた。

1 - c 実験手技

活性酸素消去作用の検討は、マクロファージに phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を添加することにより放出されるスーパーオキシドアニオンを cytochrome *c* 法により測定することにより評価した (33)。Fig. 3 に示すように 2 種類の実験を行ったが、すなわち PMA 添加時に SOD あるいは Cat-SOD を共存させ各タンパク質自身の活性酸素消去能を調べる連続接触実験、および最初にマクロファージと SOD あるいは Cat-SOD とをインキュベートし、あらかじめ細胞に取り込ませた後に細胞を洗浄し PMA を添加して、細胞に取り込まれたタンパク質の活性酸素消去能を調べる前処理実験を行った。

1 - d 連続接触実験における活性酸素消去作用

連続接触実験の結果を Fig. 4 に示すが、Cat-SOD は未修飾 SOD とほぼ同様の濃度依存的な活性酸素消去作用を示し、各化合物とも高い酵素活性を有していることが確認された。また、高濃度領域においては Cat-SOD の方が未修飾 SOD よりも強い効果を示し、カチオン化修飾の影響により効果の増強が現れているものと考えられた。

1 - e 前処理実験における活性酸素消去作用

実際の治療への適用を考えると、*in vivo* において SOD は速やかに血中から消失するため、組織との接触時間は制限されていると思われる。そこでまず、マクロファージと未修飾 SOD あるいは SOD 誘導体を 3 時間インキュベートして前処理し、細胞を洗浄した後 PMA を添加することによ

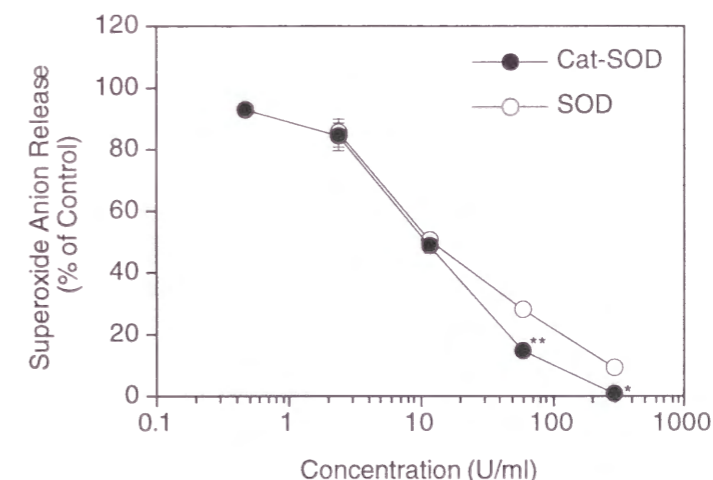


Fig. 4 Inhibitory effect of SOD and Cat-SOD on superoxide anion release from macrophages in continuous exposure experiment. There are statistically significant differences from native SOD by Student's *t*-test: *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$.

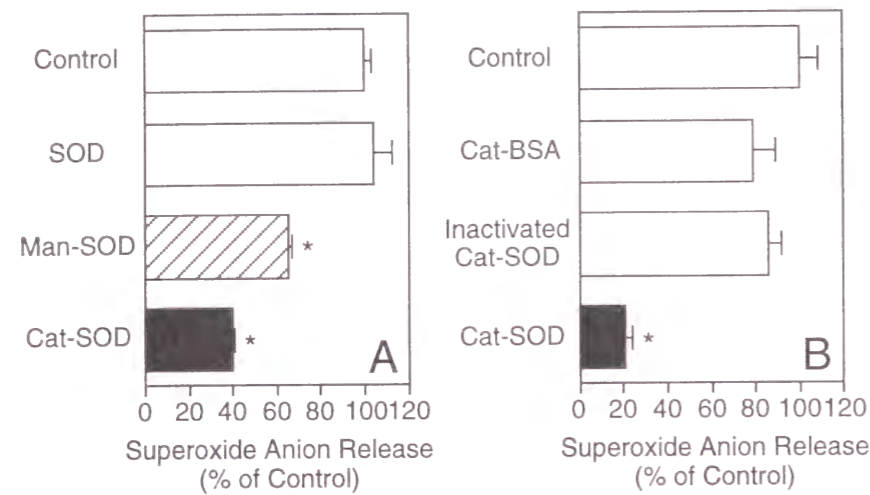


Fig. 5 Inhibitory effect of SOD and SOD derivatives (A; 300 U/ml) or Cat-BSA, Inactivated Cat-SOD and Cat-SOD (B; 100 µg/ml) on superoxide anion release from macrophages in pretreatment experiment. There are statistically significant differences by Student's t-test: *, $p < 0.001$.

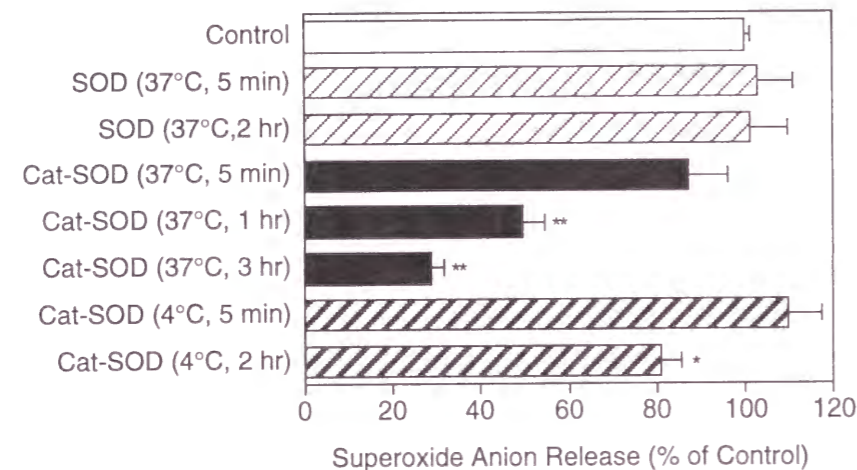


Fig. 6 Effect of incubation time and temperature on inhibitory effect of SOD and Cat-SOD (300 U/ml) on superoxide anion release from macrophages. There are statistically significant differences by Student's t-test: *, $p < 0.01$, **, $p < 0.001$.

って放出されるスーパーオキシドアニオンを定量する前処理実験を行った。この前処理実験では、細胞に結合もしくは取り込まれたものだけが効果を発揮できると考えられる。その結果、未修飾 SOD は全く効果を示さず、前処理後の洗浄によりほとんど取り除かれたためと思われた (Fig. 5A)。これに対し Cat-SOD は有意に活性酸素を消去し、その効果はこれまでに有効性が明らかにされている Man-SOD による効果よりも優れたものであった。また、カチオン化した bovine serum albumin (Cat-BSA) や、過酸化水素の処理によって酵素活性を約 2% にまで減弱させた inactivated Cat-SOD では効果が認められず、Cat-SOD による活性酸素消去作用は、カチオン化を施すことによるポリカチオンとしての細胞毒性によるものではなく、酵素的に活性酸素が消去されていることが確認された (Fig. 5B)。

1-f 活性酸素消去作用に対する前処理時間と温度の影響

1-e で示したように、Cat-SOD が優れた活性酸素消去作用を有することが明らかとなったので、次に前処理中の条件を変化させることによる Cat-SOD の活性酸素消去作用への影響について検討を行った。未修飾 SOD は前処理を 37°C で行っても処理時間に関わらず効果は現れなかったが、Cat-SOD では前処理 1 時間から効果が有意に現れ、前処理時間の延長と共に効果が増強されることが示された (Fig. 6)。また、前処理中の温度を 4°C に低下させることで活性酸素消去作用の低下が見られたことから、Cat-SOD は細胞膜と静電的に結合した後吸着性エンドサイトーシスにより内在化を受けたものも効果発現に関与していることが示唆された。

1-g 前処理中におけるエンドサイトーシス阻害剤の影響

1-f において、細胞内に内在化された Cat-SOD も効果発現に関与していることが示唆されたので、Cat-SOD との前処理中に微小管形成を阻害することによりエンドサイトーシスを阻害する colchicine を共存させた際の影響を調べた。Cat-SOD の活性酸素消去能は colchicine により若干低下したものの、依然として強い効果が認められた (Fig. 7)。しかし、これとは対称的に Man-SOD による効果は colchicine によって完全に阻害され、Cat-SOD とは異なった細胞内動態を示しているものと考えられた。

I-2 Cat-SOD のマクロファージにおける細胞取り込み特性

I-1 において、Cat-SOD がマクロファージが産生する活性酸素に対して優れた消去作用を発揮することが明らかとなったが、その消去作用の発現機構をさらに詳細に検討すること、ならびに既

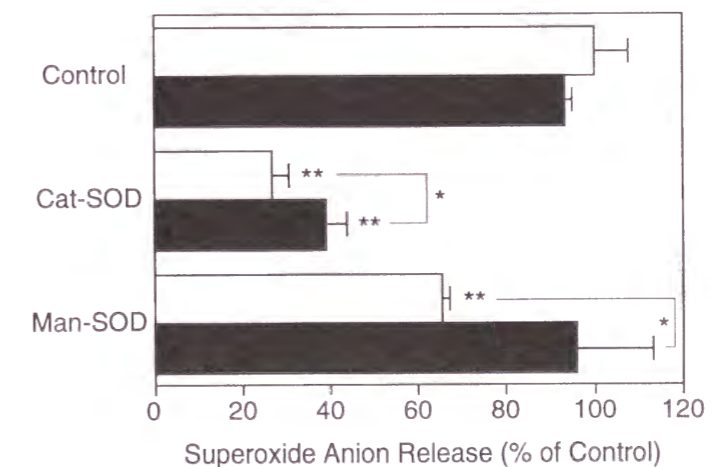


Fig. 7 Effect of colchicine (50 µg/ml) on inhibitory effect of Cat-SOD and Man-SOD (300 U/ml) on superoxide anion release from macrophages. There are statistically significant differences by Student's t-test: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$.

に有用性が明らかにされている Man-SOD との比較検討を行うため、放射標識体を用いた細胞取り込み実験を行った。

2-a 放射標識体の合成

Hnatowich らの方法 (34) に従い、二官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) を SOD あるいは SOD 誘導体のアミノ基に導入後、 $^{111}\text{InCl}_3$ を結合させることにより ^{111}In 標識を施した。

2-b 細胞取り込み特性

細胞取り込み実験では、放射標識した SOD あるいは SOD 誘導体を含む HBSS を細胞と一定時

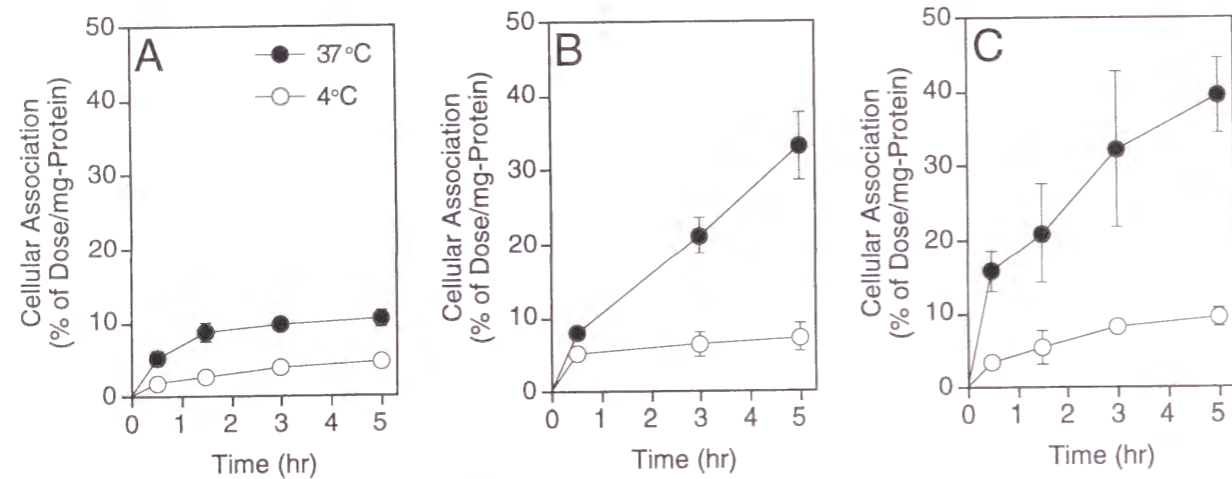


Fig. 8 Cellular association time-courses of [^{111}In]SOD (A), [^{111}In]Man-SOD (B) and [^{111}In]Cat-SOD (C) (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in macrophages.

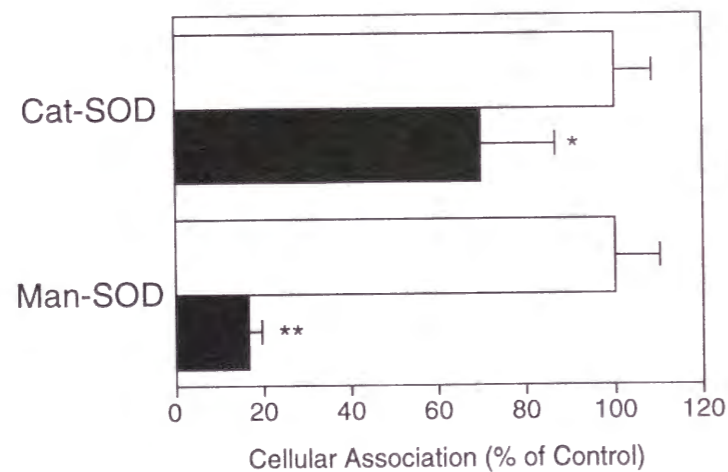


Fig. 9 Effect of colchicine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on cellular association of [^{111}In]Cat-SOD and [^{111}In]Man-SOD (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in macrophages. There is statistically significant difference by Student's t-test: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$.

間インキュベートした後、細胞を Triton X-100 を含む NaOH 水溶液で可溶化し、細胞に取り込まれた放射活性並びにタンパク含量を測定し、単位タンパク量当たりの取り込み量を求めた。その結果、Cat-SOD は 37°C において未修飾 SOD よりも高い細胞取り込みを示した (Fig. 8)。比較のために行った Man-SOD の細胞取り込みは、Cat-SOD と同様に未修飾 SOD よりも高く、これら SOD 誘導体の高い活性酸素消去作用が取り込み量の側面から裏付けられた。また、4°C において細胞取り込みの低下が見られ、37°C において細胞内に内在化されていることが示唆された。

2-c エンドサイトーシス阻害剤の影響

さらに 1-g と同様に、放射標識体の細胞取り込みに対する colchicine の影響について検討を行

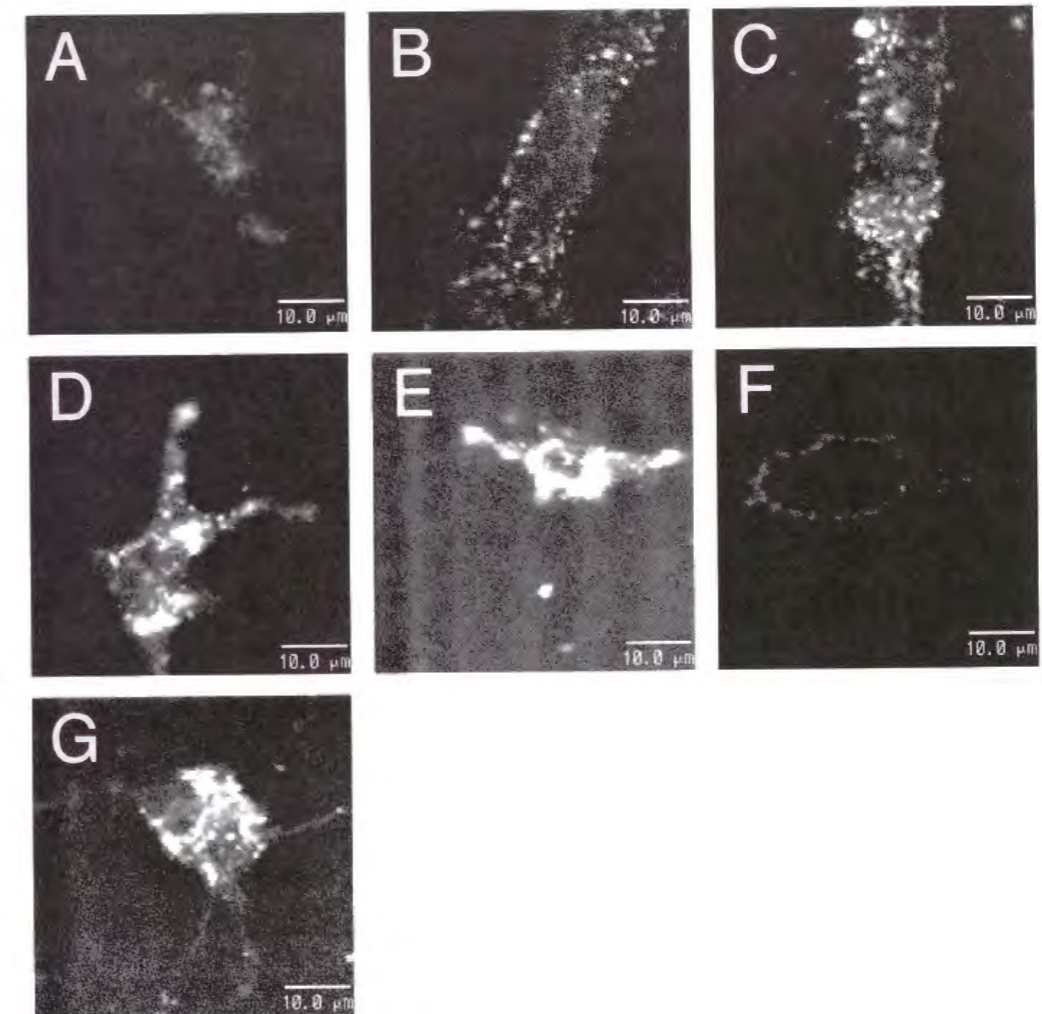


Fig. 10 Confocal microscopic images of FITC-labeled SOD and Cat-SOD (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in macrophages. The cells were incubated with SOD at 37°C for 3 hr (A), with Cat-SOD at 37°C for 10 min (B), 30 min (C), 1 hr (D), 3 hr (E), at 4°C for 3 hr (F), or at 37°C in the presence of colchicine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 hr (G).

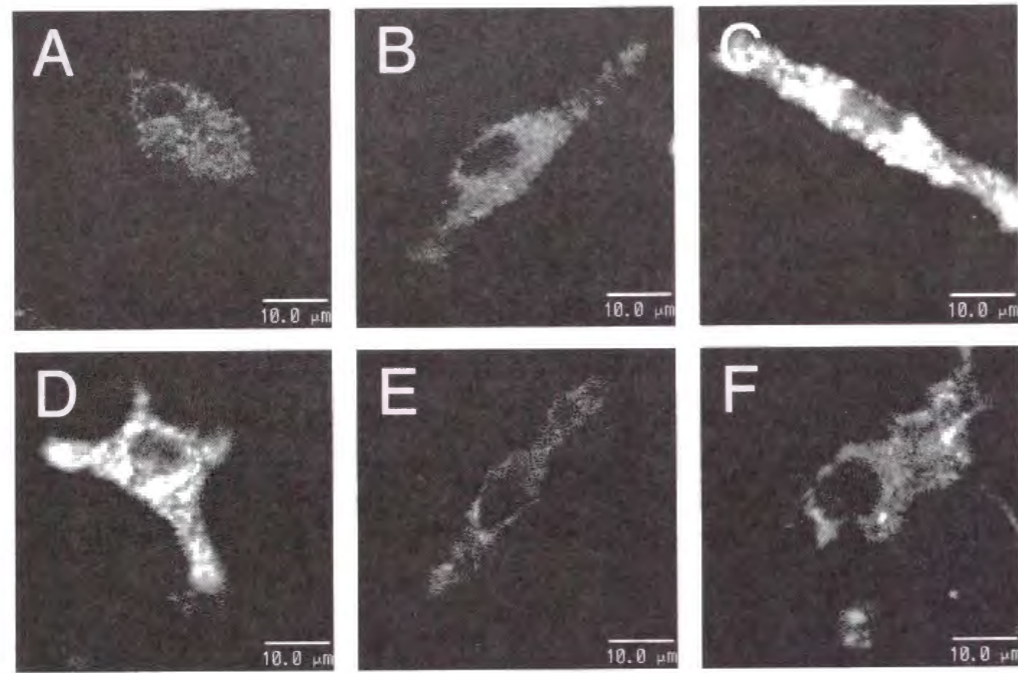


Fig. 11 Confocal microscopic images of FITC-labeled Man-SOD (100 µg/ml) in macrophages. The cells were incubated at 37°C for 10 min (A), 30 min (B), 1 hr (C), 3 hr (D), at 4°C for 3 hr (E), or at 37°C in the presence of colchicine (50 µg/ml) for 1 hr (F).

った。その結果、Man-SOD では 20% 以下にまで取り込みが阻害されたのに対し、Cat-SOD では依然として 70% 程度の取り込みを示した (Fig. 9)。以上より、Man-SOD は colchicine 感受性の細胞取り込み機構によって内在化を受けるのに対し、Cat-SOD は colchicine の影響を受けないと考えられる細胞膜近傍にその多くが分布しているか、もしくは colchicine 非感受性の取り込み機構で内在化されていると考えられ、このような各誘導体の異なった細胞内の挙動が活性酸素消去作用の差に影響を及ぼしているものと推察された。

I-3 Cat-SOD のマクロファージにおける細胞内動態

2-c で示したように、Cat-SOD と Man-SOD の効果発現機構は細胞取り込み動態の差に基づく細胞内動態の違いに起因している可能性が示された。このことを検証するため、蛍光標識した SOD ならびに SOD 誘導体を用いて共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態の観察を行い、活性酸素消去作用との関連について検討した。

3-a 蛍光標識体の合成

Monsigny らの方法 (35) に従い、FITC をアルカリ条件下で反応させ、SOD あるいは SOD 誘導体のアミノ基に結合させることにより FITC 標識を施した。

3-b 細胞内動態の経時変化

共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った結果、未修飾 SOD の取り込みはわずかであったのに対して Cat-SOD と Man-SOD の高い取り込みが確認された (Fig. 10, 11)。また、Cat-SOD は経時的に細胞内へ取り込まれていることが観察され、初期の取り込みは顆粒状の分布を示した (Fig. 10)。また、4°C で取り込ませた場合には細胞表面への局在が観察され、低温条件において Cat-SOD の効果が減少するのは、内在化されるものの減少に起因することが確認された。一方、Man-SOD も Cat-SOD と同様に経時的に細胞内への移行が観察されたが、初期の取り込みにおいて Cat-SOD の場合とは異なり、顆粒状の分布は観察されず、比較的核の近傍への分布を示した (Fig. 11)。

3-c エンドサイトーシス阻害剤の影響

さらに、colchicine の影響についても検討を行った。Man-SOD の取り込みは colchicine によって有意に減少したが、Cat-SOD の取り込みには大きな影響を与えなかった (Fig. 10, 11)。これは、1-g で示した活性酸素消去作用に対する影響、ならびに 2-c で示した細胞取り込み実験で得られた結果と対応するものであった。

I-4 考察

炎症とは、血中の好中球や組織中のマクロファージが組織に侵入した細菌や異物を貪食処理することにより惹起される組織障害、ならびにそれが修復されるまでの過程をいう。好中球やマクロファージは、種々の刺激に応じて細胞外に活性酸素を放出するとともに、貪食した異物を殺菌処理する目的でその食胞内に活性酸素を放出する。この際に産生されるスーパーオキシドアニオンは細胞膜に局在する NADPH oxidase と呼ばれる酵素系によって産生されており (Fig. 1) (28-30)、生体防御上重要な役割を演じている。このことは NADPH oxidase に先天的異常をもつ慢性肉芽腫症患者が重篤な感染症を繰り返すことから明らかにされている (29, 30, 36)。しかしながら一方で、細胞外に放出されたスーパーオキシドアニオンはさらに反応性の高い hydroxyl radical の生成や (37, 38)、NO との反応によって peroxynitrite の生成を引き起こし (39)、周辺組織への障害ひいては種々の疾患の原因となる。従って、マクロファージ等の貪食細胞に活性酸素消去酵素を効率よく送達し、活性酸素産生を精密に制御することは、活性酸素の関与する各種疾患の治療を行う際には有効な手段となると考えられる。なかでも SOD はスーパーオキシドアニオンを酸素分子と過酸化水素に不均化分解する酵素であり、これまでも抗炎症薬としての適用が試みられてきた。炎症時においてスーパーオキシドアニオンを生成する NADPH oxidase は細胞に刺激を与える前は不活性な状態で存在するが、細菌や異物などが細胞表面の受容体に結合することによって protein

kinase C (PKC) を介して活性化される。この NADPH oxidase は細胞膜やエンドソーム膜などに存在しており、細胞外ならびにリソソーム内などにスーパーオキシドアニオンを放出する。しかしながら SOD は細胞膜との親和性が低いため、このままでは効率的な活性酸素を消去する能力は期待できないと考えられる。

そこで本研究では、細胞膜表面の負電荷との静電的相互作用に基づき、細胞膜表面に SOD を局在させることを目的として SOD に正電荷を導入したカチオン化 SOD (Cat-SOD) を設計し、PKC の活性化剤の PMA で処理することによりマクロファージより放出される活性酸素に対する消去作用と細胞取り込み動態との関連を検討し、カチオン化修飾効果の評価を行った。前処理実験による活性酸素消去作用の評価において未修飾 SOD は全く効果を示さなかったが、これは未修飾 SOD が細胞との相互作用が弱く、前処理後の洗浄によりほとんどが取り除かれたためと考えられる。これに対し Cat-SOD は有意に活性酸素を消去し、またその効果が前処理時間および前処理中の温度の影響を受けたこと、さらには colchicine によって阻害を受けたことから、細胞表面に結合したものととも細胞内に内在化された Cat-SOD も効果発現に関与していることが示唆された。この前処理実験では薬物と細胞との接触時間が制限されているため、*in vivo* における治療条件に近い実験系であると考えられるが、Cat-SOD はこの実験系において優れた活性酸素消去作用を示したことから、実際の治療薬としての応用への可能性が示された。

Man-SOD はマンノースレセプターを介したエンドサイトーシスの機構によってマクロファージに取り込まれ活性酸素の関与する疾患に有効であることが示されているが (31)、マンノースレセプターを介した取り込みにより速やかに内在化を受け、分解の場であるリソソームに輸送されることが考えられる (40)。これに対し Cat-SOD は非特異的に細胞表面に吸着し、比較的ゆるやかに内在化を受けることから (41, 42)、スーパーオキシドアニオンを産生しており細胞膜に存在する NADPH oxidase の近傍に局在し、作用を発現するのにより有利であると思われる。また、colchicine による活性酸素消去作用の抑制効果の各誘導体における差は、取り込み初期における共焦点レーザー顕微鏡像の差が表すような細胞内動態の違いによることが明らかとなり、細胞取り込み機構の違いに起因する細胞内動態の差が効果発現に影響を及ぼすことが示された。

本研究では培養細胞を用いて Cat-SOD の取り込みおよび活性酸素消去作用について検討したが、Cat-SOD は *in vivo* 実験系において腎臓の虚血・再灌流障害に対して有意な腎障害抑制効果を示すことが報告されている (43)。この報告では未修飾 SOD、Man-SOD、PEG 修飾 SOD との比較検討を行っているが、そのなかで Cat-SOD は最も優れた効果を示しており、実際の治療薬として応用できる可能性を示唆しているものと考えられる。

以上、本章では SOD に化学修飾により正電荷を導入した Cat-SOD の活性酸素消去作用と細胞取り込み特性を細胞内動態を含めて検討した。その結果、Cat-SOD は細胞膜の負電荷と静電的に相互作用することによって優れた活性酸素消去作用を示すことが明らかとなった。また、細胞膜表面

に結合した Cat-SOD のみならず、内在化されたものもマクロファージから放出される活性酸素の消去に寄与することが明らかとなった。さらに、細胞取り込み機構の違いに起因する細胞内動態の差が効果発現に影響を及ぼすことが示され、Cat-SOD が活性酸素の関与する各種疾患の有効な治療薬となる可能性が示唆された。

第II章 アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内動態に及ぼすカチオン性リポソームの影響

近年、様々な疾病の原因が遺伝子レベルで解明されつつあり、癌、エイズなどの難治性疾患の発症機構についても飛躍的な速度で解明が進んでいる。その病因遺伝子の発現を特異的に抑制できるアンチセンス法は難治性疾患の治療法として大きな注目を集めており、既に欧米ではアンチセンス医薬品の実現を目指した臨床開発も活発に行われている (44-46)。

本アプローチで用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチド (Oligo) は病因遺伝子の mRNA と相補的に結合するように設計された一本鎖 DNA であり、タンパク質への翻訳を制限することによってその効果を発揮する。しかしながら *in vivo* に適用した場合、生体内に豊富に存在するヌクレアーゼによって分解を受けること (47, 48)、腎臓からの速やかな排泄により大量投与することが必要となることなど (49-51)、様々な問題が山積している。また、Oligo の細胞内における標的部位は mRNA が存在する核またはサイトゾルに限定されるため、*in vivo* における体内動態だけではなく、標的細胞に取り込まれた後の細胞内における動態も効果発現に大きく影響を及ぼすものと考えられる。

ところで、マクロファージはサイトカイン、活性酸素など様々な生理活性物質を産生することにより多様な免疫反応に重要な役割を果たしており (52)、これらの産生を Oligo によって精密に制御することが可能になればマクロファージが関与する様々な疾患の治療薬となり得ると考えられることから、Oligo の標的細胞として重要であると思われる。しかしながらマクロファージに対するアンチセンス法の適用はいくつか検討されてはいるものの、Oligo の取り込み機構やその後の細胞内動態についての情報は乏しく、Oligo の細胞取り込み動態とアンチセンス効果との関連を明らかにすることは、Oligo を用いた安全かつ効果的な治療法を確立する上で非常に意義深いことと考えられる。

そこで本章においては、まずマクロファージを用いた検討に先立ち、コントロールの細胞としてヒト前単球細胞株 U937 細胞を用い、Oligo の細胞取り込み特性とアンチセンス効果について細胞内動態との関係を含めて整理することを試みた (53)。次にこの情報に基づき、敗血症時などにおいてマクロファージに誘導され、nitric oxide (NO) を産生することによってエンドトキシンショックへの関与などが報告されている (54) inducible NO synthase (iNOS) に対する Oligo を設計し、マクロファージにおける Oligo 単独、あるいは効果増強を目的として汎用されているカチオン性リポソームとの複合体とした際の細胞取り込みならびに生物学的効果発現について、細胞内動態を含めて評価を行った。

II-1 癌遺伝子 *c-myc* に対する Oligo によるヒト前単球細胞株 U937 細胞の増殖抑制効果

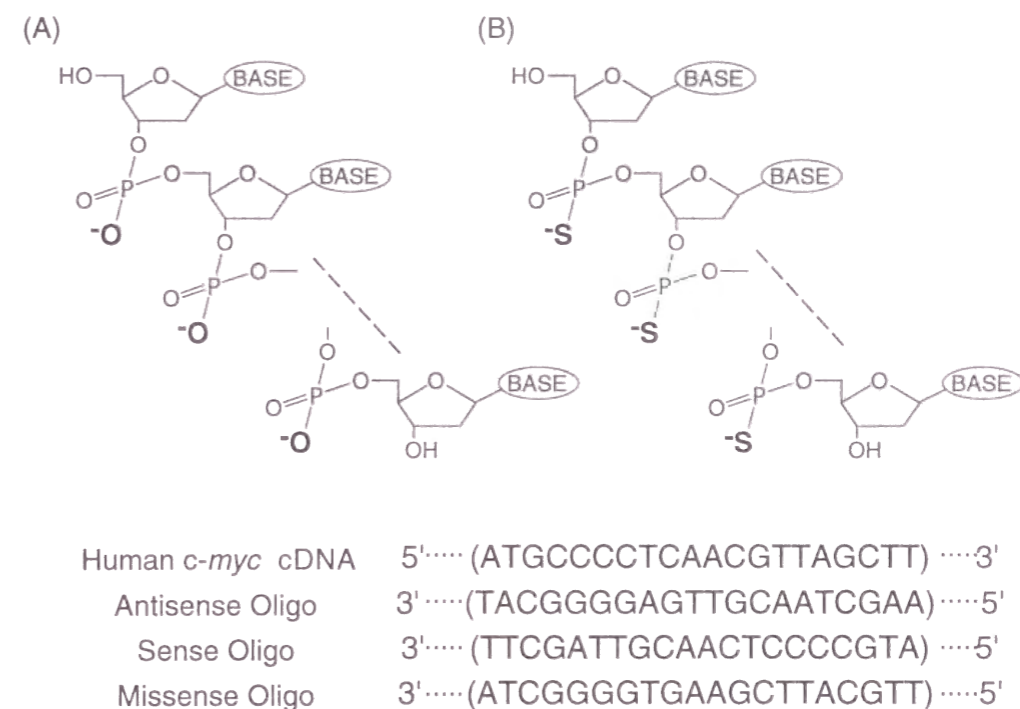


Fig. 12 Schematic structures of P-Oligo (A) and S-Oligo (B) and sequences of human *c-myc* cDNA and antisense, sense and missense Oligos.

1-a Oligo の塩基配列の選択とその誘導体

アンチセンス効果の対象とする遺伝子は、様々な癌細胞においてその関与が報告されている (55) 癌遺伝子 *c-myc* を選択し、開始コドンから 20 塩基に相補的な配列をアンチセンス配列として採用した (Fig. 12)。またアンチセンス効果のコントロールとして、センス配列、ならびにアンチセンス配列中のアデニン残基とチミン残基を入れ替えたミスセンス配列の 2 種を用いた。さらに Oligo のリン酸結合部位としては、phosphodiester 結合を有する天然体 (P-Oligo)、リン酸結合部位中のひとつの酸素原子を硫黄原子に置換する phosphorothioate 化修飾をすべてのリン酸結合部位に行なったもの (S-Oligo)、および phosphorothioate 化修飾を 3' 末端から 3 個のリン酸結合部位に対して行なったもの (PS₃-Oligo) の 3 種を用いた。

1-b Oligo 単独におけるアンチセンス効果

まずはじめに、各種 Oligo による前単球細胞株 U937 細胞の増殖に対する抑制効果を検討した。その結果を Fig. 13 に示すが、アンチセンス S-Oligo によって投与量依存的に細胞増殖は阻害された。これに対しアンチセンス P-Oligo や PS₃-Oligo では効果は見られなかったことから、phosphorothioate 化修飾することが効果発現には必要であり、また phosphorothioate 化修飾を 3' 末端から 3 個のリン酸結合部位に施す程度ではアンチセンス効果発現は影響を受けないことが示された。さらに、センス配列やミスセンス配列を持つ S-Oligo では効果が見られなかったことから、

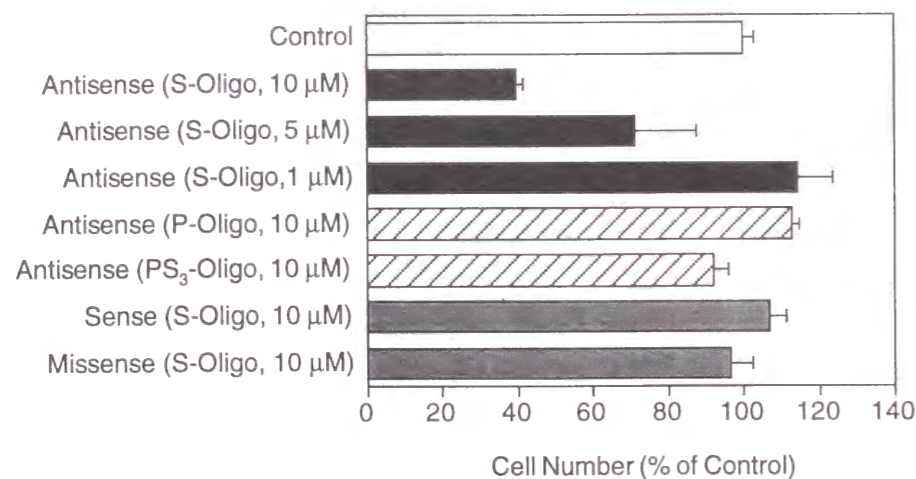


Fig. 13 Effect of human c-myc Oligo on U937 cell proliferation. The cells were incubated with Oligo for 4 days and the numbers of the cells were determined by MTT method.

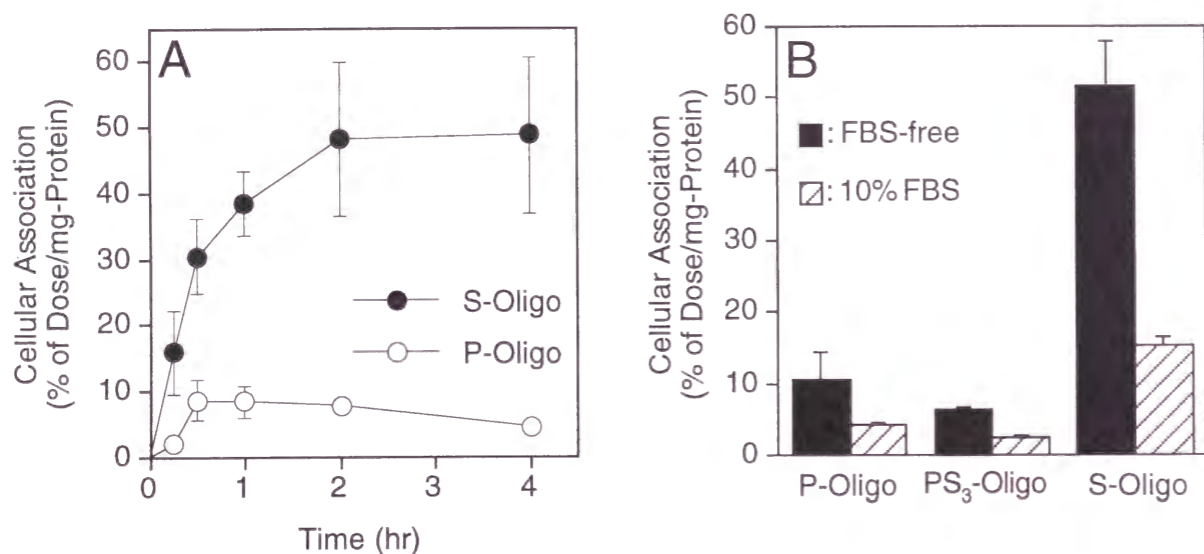


Fig. 14 Cellular association time-courses of [³⁵S]P-Oligo and [³⁵S]S-Oligo (1 μM) at 37°C in FBS-free medium (A), and effect of FBS in the medium on cellular association of [³²P]P-Oligo, [³²P]PS₃-Oligo and [³²P]S-Oligo (1 μM) at 37°C for 1 hr (B).

アンチセンス S-Oligo によって配列特異的に増殖阻害効果を示していることが確認された。

1 - c 放射標識体の細胞取り込み特性の評価

Fig. 14A に放射標識した Oligo の細胞取り込みの経時変化を示す。S-Oligo、P-Oligo とも経時的に U937 細胞に取り込まれ、S-Oligo は P-Oligo よりも有意に高い取り込みを示した。また、取り込みに対する血清添加の影響を検討したところ、どの Oligo についても同様の割合で細胞取り込みが阻害され (Fig. 14B)、非特異的な血清タンパク質への結合により非結合型の Oligo の濃度が減少し、それによって取り込みが減少したものと推察された。

1 - d マクロファージへの細胞取り込み特性

比較の目的で、マウス腹腔マクロファージにおける取り込み特性についても検討を行った。その結果、S-Oligo は P-Oligo、PS₃-Oligo に比べ高い細胞取り込みを示し、U937 細胞での結果と同様であった (Fig. 15)。さらにマクロファージにおける S-Oligo の取り込みは、U937 細胞での結果 (Fig. 14A) に比べ単位タンパク量当たり約 3 倍と大きな値を示した。

1 - e 蛍光標識体の細胞内動態

Oligo の標的部位は核、またはサイトゾルであることから、細胞に取り込まれた後の細胞内にお

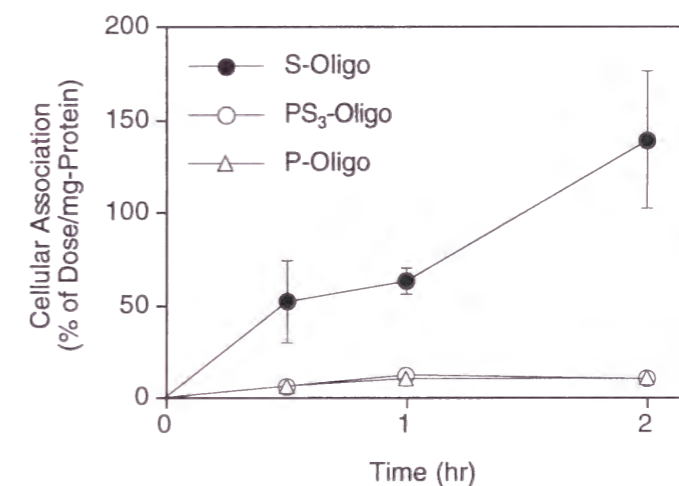


Fig. 15 Cellular association time-courses of [³⁵S]P-Oligo, [³⁵S]PS₃-Oligo and [³⁵S]S-Oligo (1 μM) in macrophages.

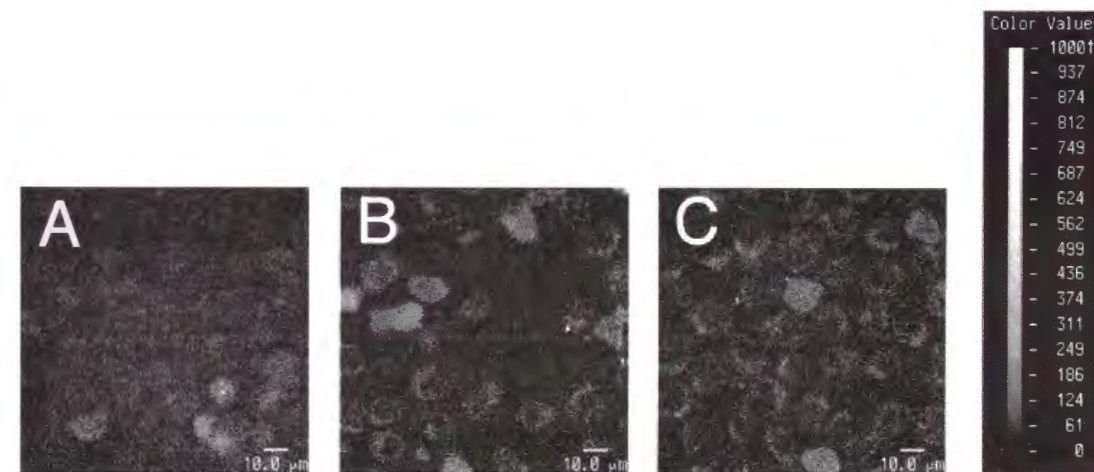


Fig. 16 Confocal microscopic images of FITC-labeled P-Oligo (1 μM) in U937 cells for 1 hr (A), 3 hr (B) and 5 hr (C).

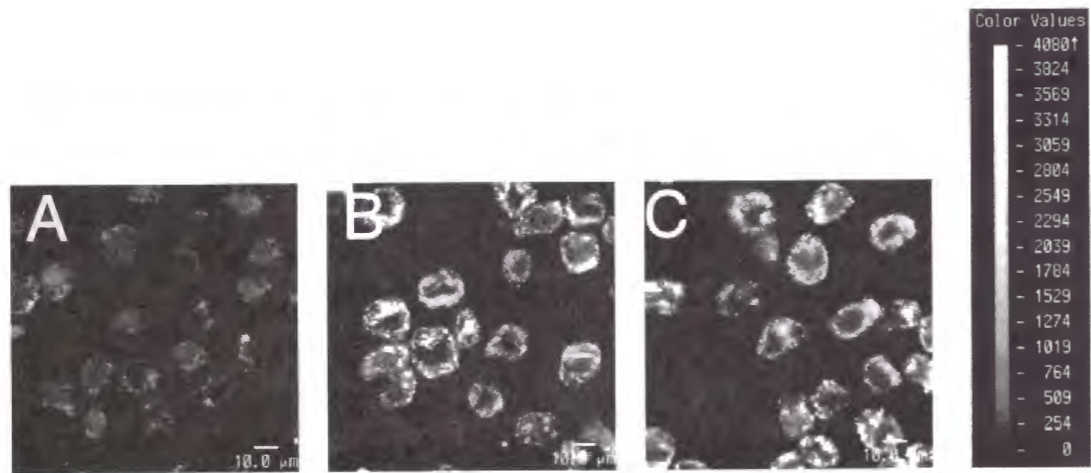


Fig. 17 Confocal microscopic images of FITC-labeled S-Oligo (1 μM) in U937 cells for 1 hr (A), 3 hr (B) and 5 hr (C).

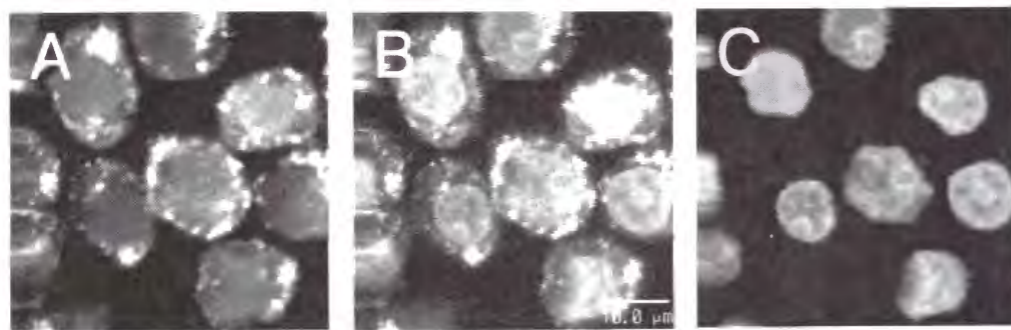


Fig. 18 Intracellular localization of FITC-labeled S-Oligo (1 μM) in U937 cells after 1 hr incubation at 37°C. (A); FITC-labeled S-Oligo, (C); nuclear staining with PI, (B); dual image of (A) and (C).

ける Oligo の動態は効果発現に大きな影響を及ぼすと考えられる。そこで蛍光標識した Oligo を用い、細胞取り込み後の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡によって観察し評価した。P-Oligo における結果を Fig. 16 に示すが、明瞭な観察像が得られないほど取り込みが少なかった。これに対し、S-Oligo は経時的に顕著に細胞に取り込まれ、Fig. 14A に示した放射標識体を用いた結果と良く対応していた (Fig. 17)。S-Oligo の取り込み 1 時間後における細胞内分布を核染色試薬 propidium iodide (PI) との二重染色により観察したが、S-Oligo は多くが細胞質内に顆粒状に分布しており、核への移行はほとんど観察されなかった (Fig. 18)。また 24 時間後においても同様に顆粒状の分布が観察された。よって、多くの Oligo はエンドサイトーシスの機構で細胞に取り込まれた後、エンドソームやリソソームといった細胞内小胞の中にトラップされた形で存在していると考えられ、このような細胞内動態を改善することによりさらに有効なアンチセンス効果が得られるものと思われた。

1 - f カチオン性リポソームによる細胞取り込みの増大

以上 Oligo 単独における検討より、S-Oligo を用いることによってアンチセンス効果は配列特異的に見られるものの、その細胞内における分布は標的部以外への移行がほとんどであった。このような細胞内分布特性を変化させ、エンドソームやリソソームからサイトゾルへの Oligo の放出を促進させることが可能となれば効果の増強が期待でき、少量の Oligo によって十分なアンチセンス効果を得ることができると考えられる。そこで、アンチセンス効果を増強させる目的で汎用されているカチオン性リポソームの一つである Lipofectin をとりあげ、Oligo との複合体を形成させた時の様々な影響について検討を行った。

まず、放射標識した Oligo の細胞取り込みへの影響について検討を行った。P-Oligo、S-Oligo とも重量比で 1:4 で Lipofectin と混合した複合体とした時にもっとも高い細胞取り込みを示した (Fig. 19)。しかしながら、それ以上に Lipofectin を添加すると細胞取り込みは減少し、Oligo の取

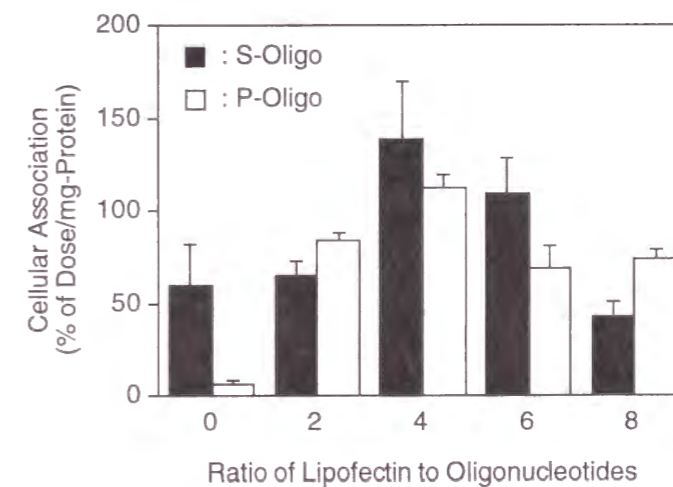


Fig. 19 Cellular association of [³⁵S]P-Oligo and [³⁵S]S-Oligo (1 μM) complexed with Lipofectin by U937 cells for 1 hr.

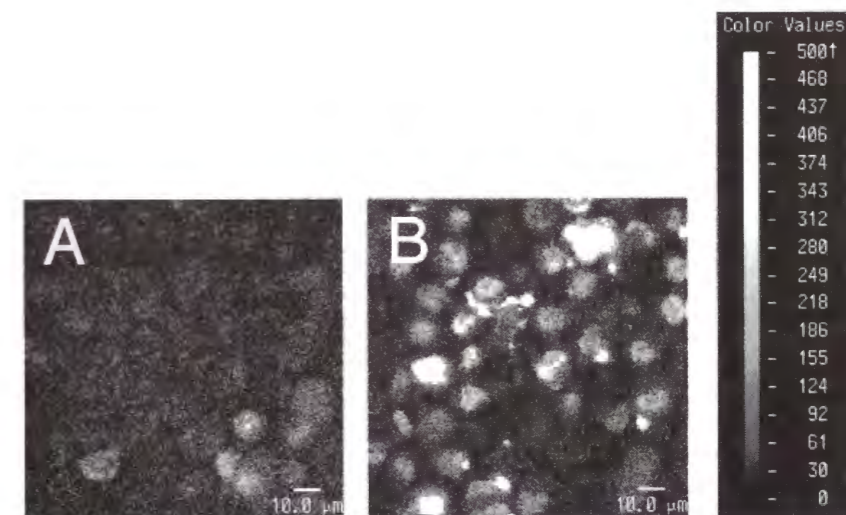


Fig. 20 Effect of Lipofectin on intracellular localization of FITC-labeled P-Oligo (1 μM) in U937 cells. FITC-labeled P-Oligo alone (A) or its complex with Lipofectin (B) (1:4 w/w) were incubated for 1 hr.

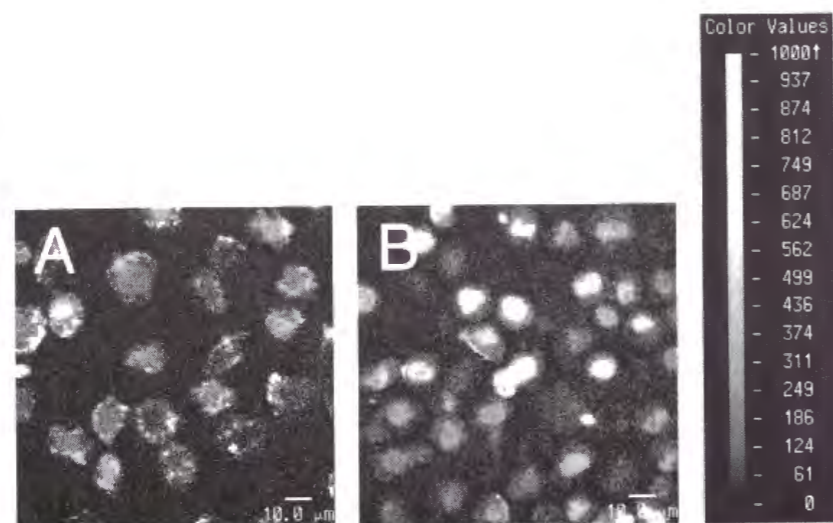


Fig. 21 Effect of Lipofectin on intracellular localization of FITC-labeled S-Oligo (1 μ M) in U937 cells. FITC-labeled S-Oligo alone (A) or its complex with Lipofectin (B) (1:4 w/w) were incubated for 1 hr.

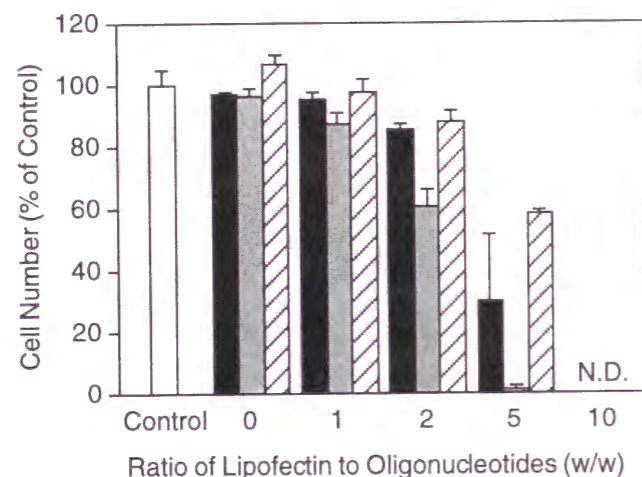


Fig. 22 Effect of human *c-myc* Oligo (1 μ M) complexed with Lipofectin on U937 cell proliferation. The cells were incubated with the complexes for 4 days and the numbers of the cells were determined by MTT method.

り込み量を増大させるには至適な混合比率が存在することが示唆された。また P-Oligo では Lipofectin 無添加時には非常に取り込みが低かったものの、Lipofectin を添加することによる細胞取り込みを増大させる効果は S-Oligo に適用した場合よりも顕著であった。

1 - g カチオン性リボソームによる細胞内動態の制御

蛍光標識した Oligo と Lipofectin との複合体の細胞取り込み後の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡によって観察し、その像を Fig. 20、21 に示す。Oligo の細胞内分布は、重量比 1:4 に Lipofectin を添加することによって Oligo 単独の場合から大きく変化し、核への顕著な移行が観察された。P-Oligo の場合は細胞取り込みに細胞間のばらつきが見られ、非常に高い取り込みを示す細

胞が存在した。

1 - h カチオン性リボソームによる生物学的効果への影響

以上のように Lipofectin との複合体とすることによって Oligo はエンドソームやリソソームといったコンパートメントからサイトゾルへ放出され、細胞内標的部位のひとつである核へ顕著に送達されたことからアンチセンス効果の改善が期待される。そこで、細胞増殖抑制効果に対する Lipofectin 添加の影響について検討を行った。その結果、重量比 1:5 の複合体にすることで Oligo 単独では効果の現れない濃度においてアンチセンス P-Oligo、S-Oligo とともに細胞増殖を抑制した (Fig. 22)。しかしながらセンス S-Oligo によっても抑制効果が見られたことから、アンチセンス効果だけではなく、複合体による配列非特異的な細胞毒性によっても細胞増殖が抑制されていると考えられた。



Fig. 23 Sequences of murine iNOS cDNA and antisense, sense and missense Oligos.

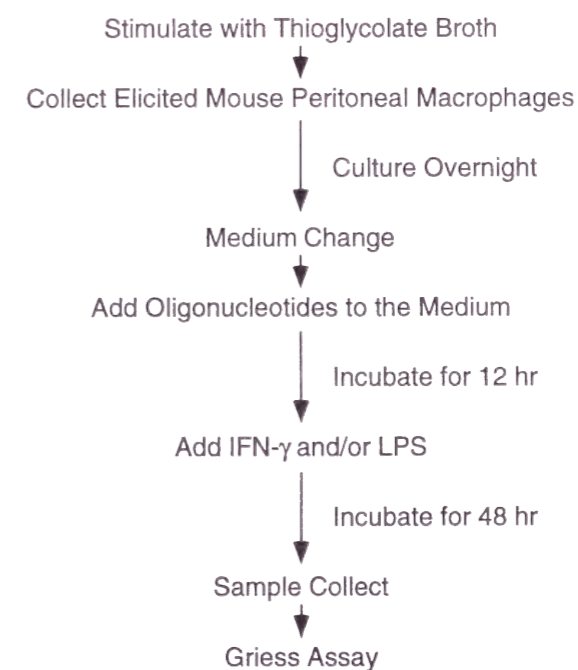


Fig. 24 Experimental procedure of biological effect of murine iNOS antisense Oligo on NO release from macrophages.

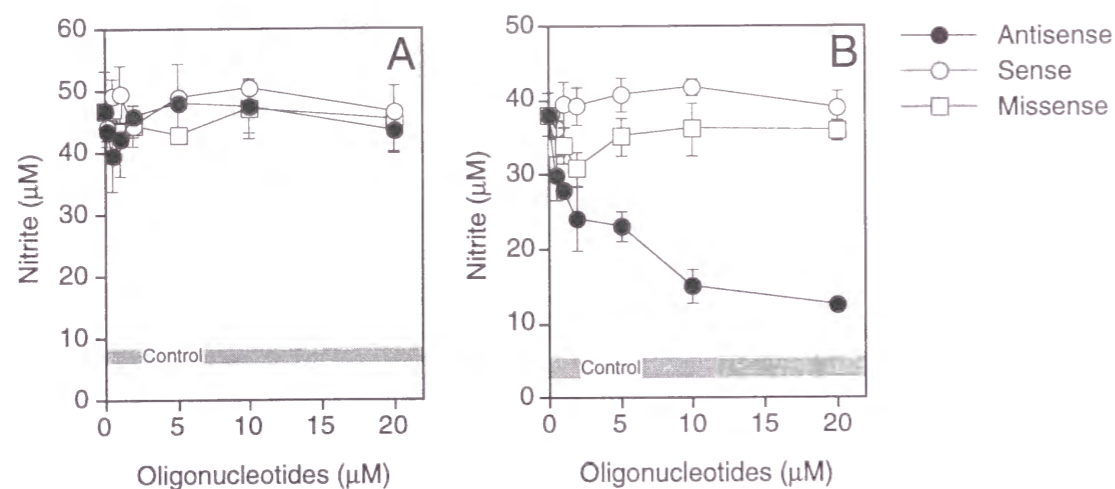


Fig. 25 Effect of murine iNOS P-Oligo (A) or S-Oligo (B) on NO release from macrophages.

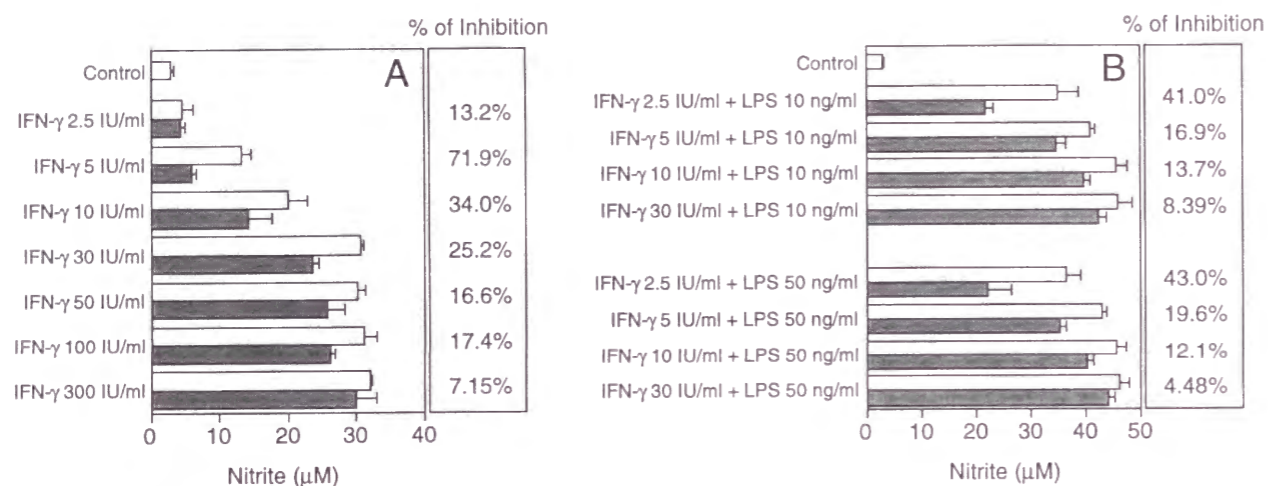


Fig. 26 Effect of murine iNOS antisense S-Oligo (10 μM) on NO release from macrophages stimulated by IFN-γ alone (A), or IFN-γ and LPS (B).

II-2 iNOS に対する Oligo によるマクロファージの NO 産生抑制効果

前節において、U937 細胞を用い Oligo の細胞取り込み特性とカチオン性リポソームによる細胞内動態の変化、さらに生物学的効果発現との関連について整理してきた。そこで本節ではマクロファージに対する Oligo の適用を目的とし、iNOS に対する Oligo を設計してそのアンチセンス効果と細胞取り込み機構、さらに細胞内動態について検討した。

2-a Oligo の塩基配列の選択とその誘導体

アンチセンス効果の対象とする遺伝子は iNOS を選択し、開始コドンから 20 塩基に相補的な配列をアンチセンス配列として採用した (Fig. 23)。またアンチセンス効果のコントロールとして、セ

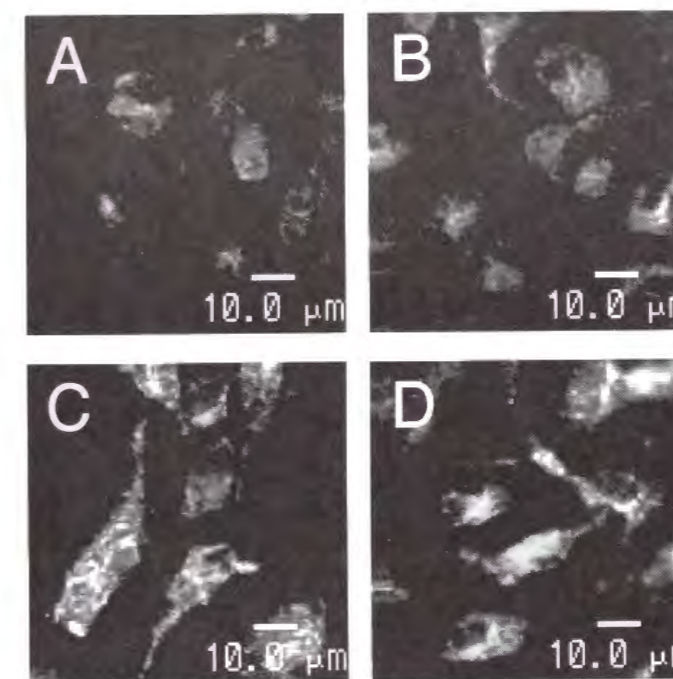


Fig. 27 Confocal microscopic images of FITC-labeled S-Oligo (1.0 μM) in macrophages. The cells were incubated with S-Oligo for 1 hr (A), 3 hr (B), 5 hr (C) or 12 hr (D).

ンス配列、ならびにミスセンス配列の 2 種を用いた。さらに Oligo のリン酸結合部位としては、phosphodiester 結合を有する天然体 (P-Oligo) と phosphorothioate 化修飾をすべてのリン酸結合部位に行ったもの (S-Oligo) の 2 種を用いた。

2-b Oligo 単独におけるアンチセンス効果

マクロファージにおけるアンチセンス効果は、細胞と各種 Oligo を 12 時間インキュベート後インターフェロン γ (IFN-γ) を添加し、その後 48 時間までに培地中に放出された NO の代謝物である nitrite を定量することにより行った (Fig. 24)。Fig. 25 に S-Oligo による NO 放出抑制効果について示すが、アンチセンス S-Oligo によって投与量依存的に NO 放出抑制効果が見られたのに対し、センスならびにミスセンス配列を持つ S-Oligo では効果が見られず、アンチセンス S-Oligo によって配列特異的に効果を発現していることが明らかになった (Fig. 25B)。また、同様の検討をアンチセンス P-Oligo を用いて行ったが効果は発揮されなかった (Fig. 25A)。

Fig. 26 では IFN-γ の添加量を変化させたり、IFN-γ とともにリポポリ多糖 (LPS) を同時に添加することによりマクロファージの活性化の程度を変化させた時のアンチセンス効果に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ほとんどマクロファージを活性化できなかった 2.5 IU/ml の場合を除き、IFN-γ の添加量の増大に伴い NO の産生が亢進し、アンチセンス効果は減弱された (Fig. 26A)。また、LPS の濃度を一定にした条件下で IFN-γ の添加量を増加させた場合においてもアンチセンス効果の減弱が見られ、IFN-γ 2.5 IU/ml と LPS 50 ng/ml を同時に添加したときよりもアンチセンス効果が強く発揮された (Fig. 26B)。

2 - c 蛍光標識体の細胞内動態

Fig. 27 に蛍光標識した S-Oligo のマクロファージによる取り込み後の細胞内動態の共焦点レーザー顕微鏡による観察像を示す。S-Oligo は経時的にマクロファージに取り込まれ、細胞内におけ

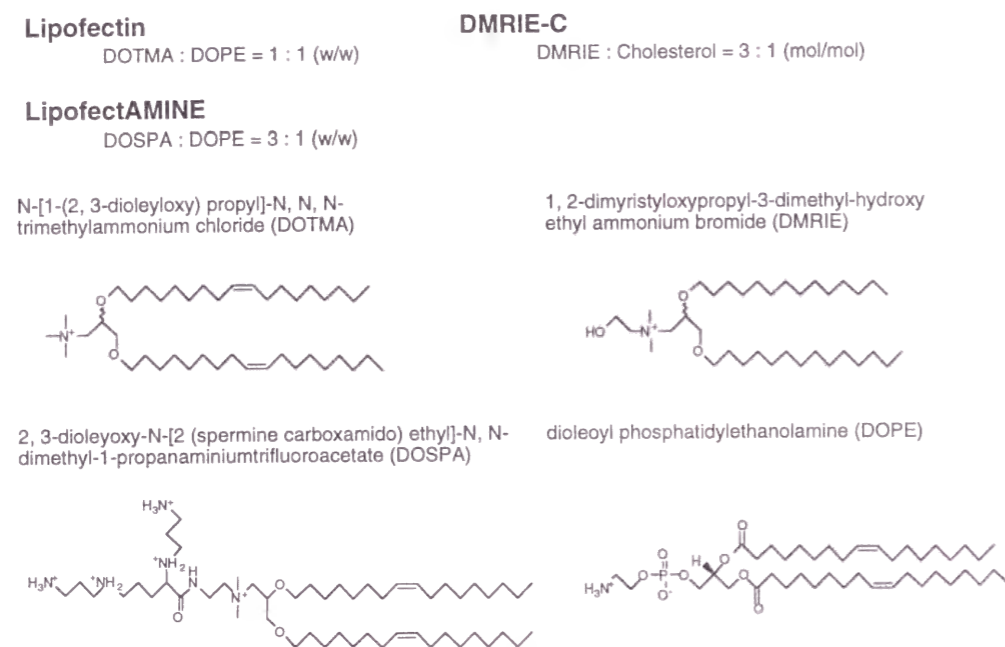


Fig. 28 Chemical structures of cationic lipids.

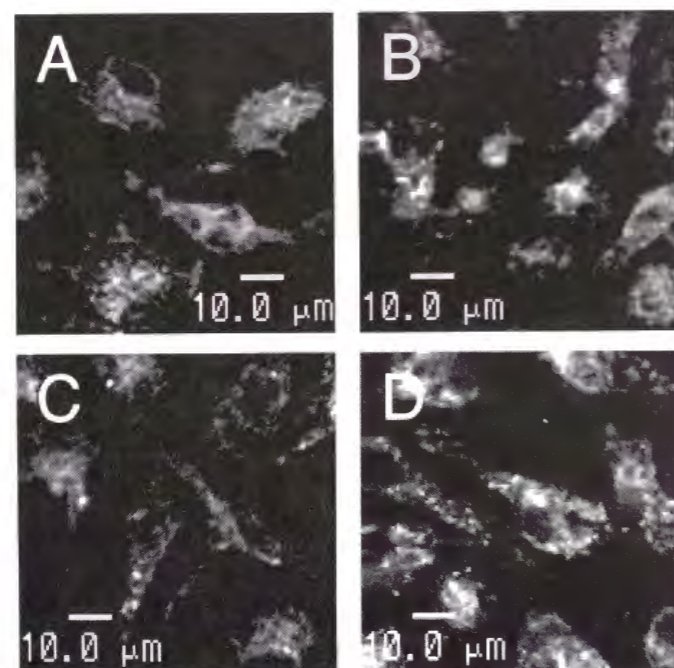


Fig. 29 Confocal microscopic images of FITC-labeled S-Oligo (0.2 μM) in macrophages. The cells were incubated with S-Oligo alone (A), Lipofectin complex (B), DMRIE-C complex (C) or LipofectAMINE complex (D) at a ratio of 1:6 (w/w) for 3 hr.

る分布はそのほとんどが核以外の部分に顆粒状に存在しており、エンドサイトーシスで取り込まれた後エンドソームやリソソームなどに分布しているものと考えられた。

2 - d カチオン性リポソームによる細胞内動態の制御

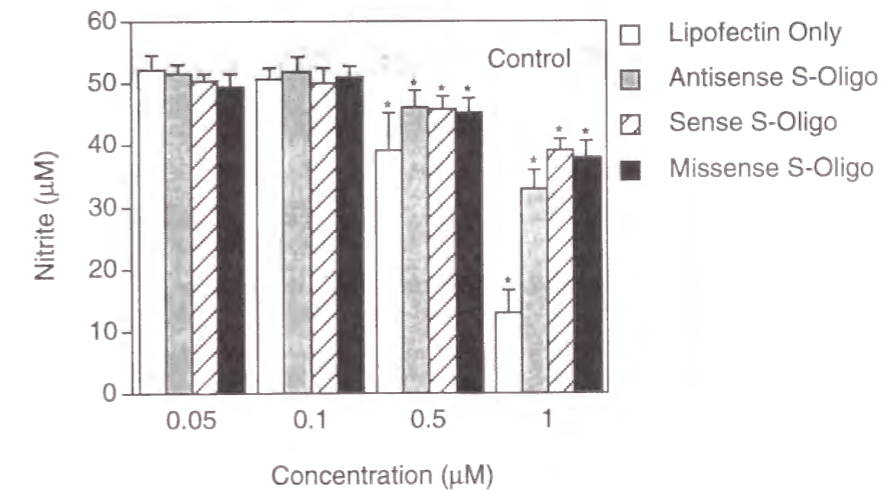


Fig. 30 Effect of murine iNOS S-Oligo complexed with Lipofectin (1:6 w/w) on NO release from macrophages. There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.01$.

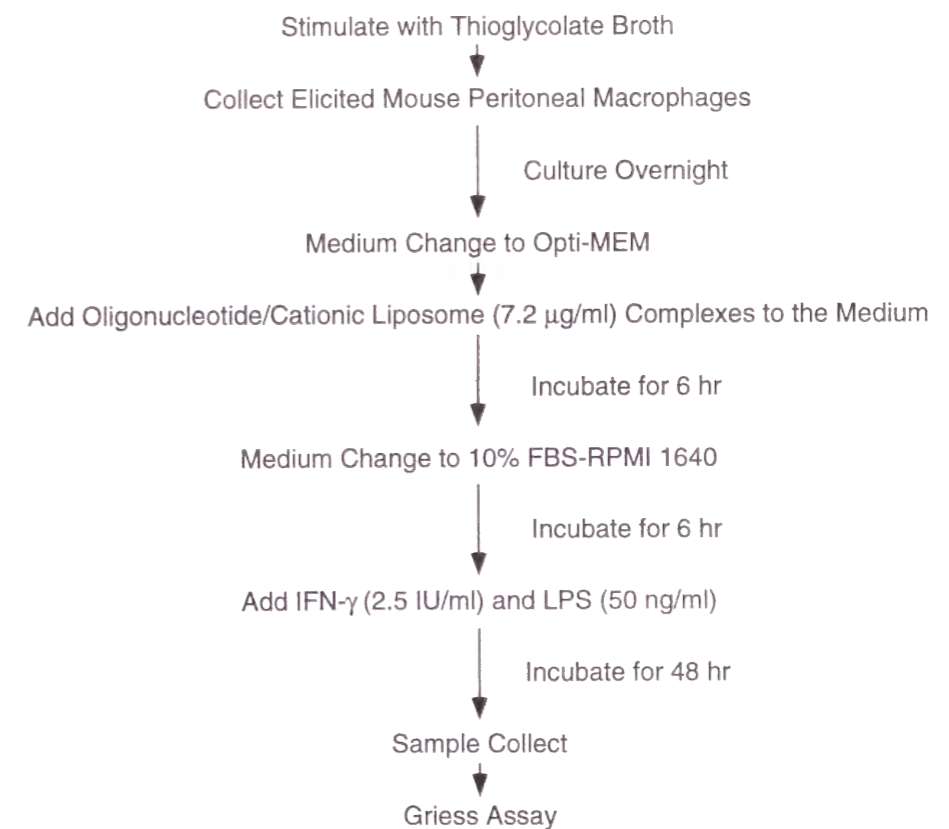


Fig. 31 Short-time exposure experiment of biological effect of murine iNOS antisense Oligo complexed with cationic liposomes on NO release from macrophages.

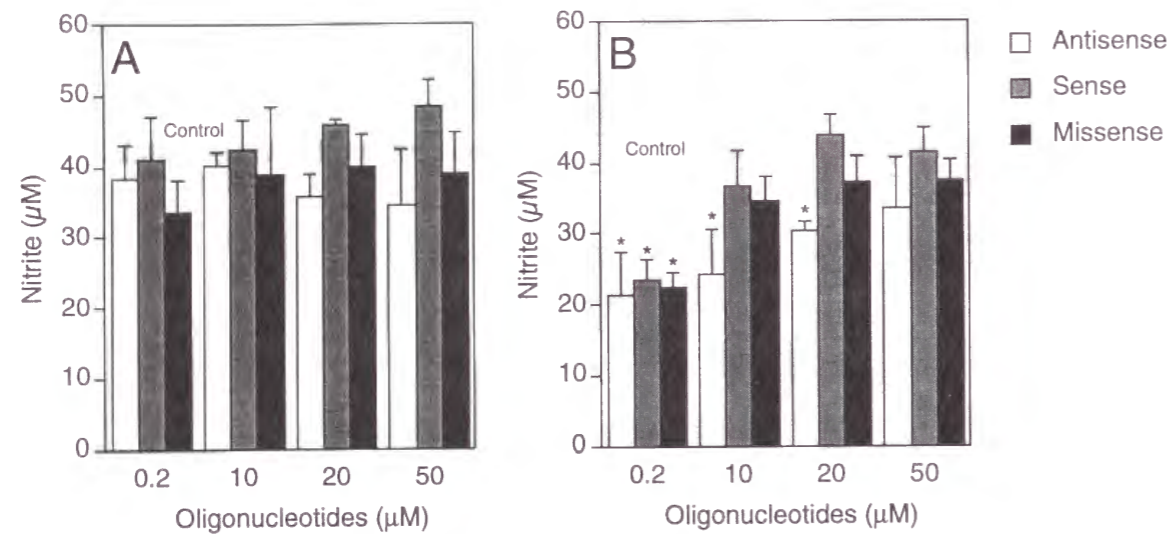


Fig. 32 Effect of murine iNOS S-Oligo complexed with Lipofectin (A) or LipofectAMINE (B) on NO release from macrophages in short-time exposure experiment. There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.01$.

U937 細胞においてはカチオン性リポソームを添加することにより Oligo の細胞内動態は大きく変化し、核への顕著な移行が観察されたが (Fig. 20, 21)、同様の結果がマクロファージにおいても得られるか検討を行った。カチオン性リポソームとしては Lipofectin、LipofectAMINE、DMRIE-C の 3 種を用いて検討を行った (Fig. 28)。しかしながら、いずれのカチオン性リポソームを用いた場合にも S-Oligo 単独の場合と同様に核への移行は観察されず、LipofectAMINE によって取り込みの上昇が認められただけであった (Fig. 29)。

2-e カチオン性リポソームによる生物学的効果への影響

以上のように、マクロファージの場合は U937 細胞とは異なりカチオン性リポソームを添加しても Oligo の細胞内動態に大きな影響を与えなかった。そこで生物学的効果へのカチオン性リポソームの影響を検討し、細胞内動態との関係を明らかにすることを試みた。重量比 1:6 で Lipofectin との複合体を形成させた際のアンチセンス効果は、Oligo の濃度を 0.5 μM と 1 μM とした際に配列に依存しない NO 放出抑制効果が見られ、また対照として行った Lipofectin のみの添加によっても顕著な抑制が見られたことから、Lipofectin の添加による細胞毒性とみられる効果が NO 産生に影響を及ぼしているものと考えられた (Fig. 30)。また、細胞毒性が現れない濃度では Lipofectin の添加によるアンチセンス効果の増強は全く見られなかった。

そこで次に、カチオン性リポソームによる細胞毒性の影響を最小限に抑えた条件においてアンチセンス効果への影響を評価することを試みた。カチオン性リポソームの濃度は 7.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の一定量に設定し、またマクロファージとの接触時間も 6 時間に限定することによって細胞毒性を軽減させた (Fig. 31)。さらに、Fig. 27B に示した検討において NO が顕著に産生され、かつアンチセン

ス効果が明確であった IFN- γ 2.5 IU/ml および LPS 50 ng/ml を同時に添加することによりマクロファージを活性化させた条件を選択した。それにも関わらず Lipofectin との複合体では S-Oligo をいずれの濃度で添加しても効果は現れなかった (Fig. 32A)。これに対し LipofectAMINE との複合体では 10 μM と 20 μM においてアンチセンス効果の増強が見られた (Fig. 32B)。しかしながら 0.2 μM では配列に依存しない抑制効果が見られ、また 50 μM ではアンチセンス効果の増強が消失してしまったことから、マクロファージにおいてカチオン性リポソームがアンチセンス効果の増強を示すためには、非特異的な細胞毒性とのバランスを適度に保つことが重要であると考えられた。

II-3 考察

血管内皮細胞由来血管弛緩因子 (EDRF) の本体が NO であることが提唱されて以来、NO の持つ多彩な生理的作用が循環器系だけでなく中枢神経系や免疫担当細胞などにおいて明らかにされてきた (56, 57)。その NO を合成する酵素 (nitric oxide synthase: NOS) には 3 種類のアイソザイムが存在しており、神経細胞に主に発現する神経型 NOS (nNOS)、内皮細胞に主に発現する内皮型 NOS (eNOS)、そしてマクロファージ系の細胞などに認められる誘導型 NOS (iNOS) が発見されている (Fig. 33)。なかでも iNOS の産生する NO は細菌感染等に対する生体防御機構に関与している一方 (58-60)、敗血症時におけるエンドトキシンショックへの関与 (54) や NO とスーパーオキサイドアニオンとの反応により生ずる peroxynitrite (ONOO⁻) が強力な傷害性を有するといった報告 (61-64) もなされており、NO の産生を制御できる薬物治療法の確立が強く望まれている。そこ

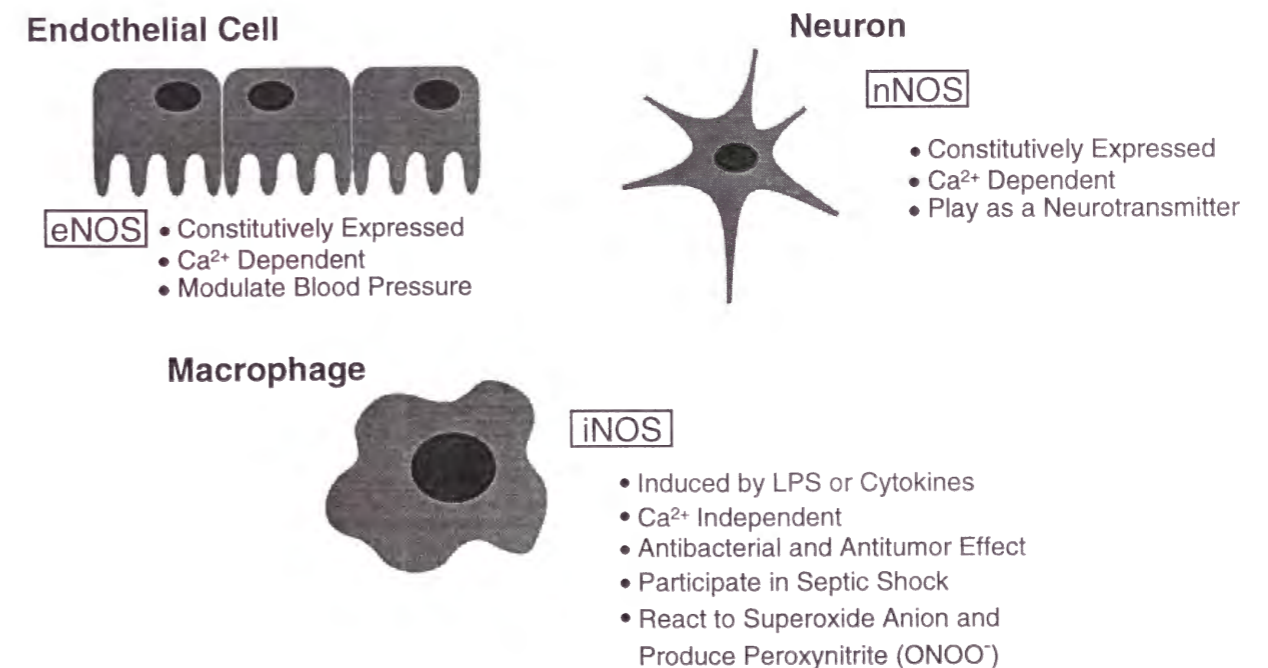


Fig. 33 NOS isoforms.

で iNOS 阻害剤の開発が行われているが、 N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) や N^G -nitro-L-arginine (L-NA) といった NOS の基質となるアルギニンの類似体は iNOS だけでなく他の nNOS や eNOS に対しても阻害効果を示し (65-67)、その選択性の低さから臨床応用は困難であると考えられる。

そこで本研究では、特定のタンパク質の発現を抑制できるアンチセンスオリゴヌクレオチドをマクロファージの iNOS から産生される NO の選択的阻害剤としての適用の可能性を検討するとともに、マクロファージを対象としたアンチセンス治療を考える際の Oligo の細胞内動態とその効果発現との関連について評価を行い、その特徴について考察を加えた。アンチセンス S-Oligo がマクロファージから産生される NO を投与量依存的に抑制したのに対し、センスおよびミスセンス S-Oligo では効果が見られなかったことから、この効果はアンチセンス配列に特異的であることが示された。近年、アンチセンス治療においてアンチセンス配列に依存しない非特異的な効果が報告されており、その原因としてはグアニン残基が 4 個以上連続する配列と (68, 69)、シトシン残基とグアニン残基が連続する CpG motif (70-75) とが考えられている。本研究で用いた Oligo は *c-myc*、iNOS に対する Oligo の両方とも、アンチセンス配列中にグアニン残基が 4 個連続する配列が存在する。しかしながら、コントロールとして用いたミスセンス配列にも同様にこの配列が存在しているものの影響が見られなかったことから、今回の検討では、非特異的な効果の関与はないと思われた。

Oligo の細胞取り込み特性はリン酸結合部位の構造により大きく異なり、アンチセンス効果が発揮される S-Oligo においては高い取り込みが見られたのに対し、効果の見られなかった P-Oligo、 PS_3 -Oligo では取り込みは低く、アンチセンス効果と細胞取り込みとに相関が見られた。 PS_3 -Oligo は phosphorothioate 化修飾を 3' 末端から 3 個のリン酸結合部位に対して行ったが、細胞取り込みも低くアンチセンス効果を発揮するには到らなかったことから、修飾が不十分であると考えられた。また、マクロファージにおける S-Oligo の取り込みは U937 細胞における結果よりも約 3 倍高く、細胞によって大きく異なることが明らかとなった。よって細胞取り込み特性の点ではマクロファージは Oligo の適用対象として有効であることが示唆された。

カチオン性リポソームは Oligo の効果を増強させることを目的としてしばしば利用されてきたが、その機構については不明な点が多い。本検討においてはカチオン性リポソームが U937 細胞における Oligo の細胞内動態を大きく変化させたのに対し、マクロファージにおいてはこのような影響は観察されなかった。核への Oligo の移行がカチオン性リポソームによって促進されることは各種細胞において報告されており (53, 76-80)、カチオン性リポソームによる効果増強の機構において重要なステップであると考えられる。しかしながらマクロファージでは細胞内動態に変化を及ぼさなかったこと、ならびに Oligo が核へ移行するようになった U937 細胞の場合においてもアンチセンス効果だけではなく、正電荷の影響と思われる細胞毒性によって配列に依存しない効果が見られたことから、単球・マクロファージ系の細胞に対するカチオン性リポソームの適用には

大きな制限があることが明らかとなった。特にマクロファージの場合は、アンチセンス効果の増強を得るためには細胞毒性を回避するような詳細な条件設定が必要であり、実際の治療への応用を考えるとむしろ Oligo 単独で用いる方が適していると思われる。カチオン性リポソームによって細胞内に取り込まれた Oligo がエンドソームから放出される機構について、Zelphati らによって仮説が提唱されている (78, 80)。この仮説においては、カチオン性リポソームとエンドソーム膜の融合後、リポソーム中の正電荷を持つ脂質と細胞膜の負電荷を持つ脂質とが混合されることによって電荷を打ち消し合い、それに伴って静電的に結合していた Oligo が脂質膜から遊離しサイトゾルへ放出されると考えられている。しかしながら本検討で得られた結果だけでなく、マクロファージにおいてはカチオン性リポソームによってアンチセンス効果が減弱されたとする報告 (81) や、herpes simplex virus type 1 に感染した Vero 細胞においても効果が増強されなかったという報告 (82) もあり、Oligo の細胞内動態にカチオン性リポソームが及ぼす影響については細胞間の違いを含めてさらなる情報の蓄積が必要であろう。

以上、本章ではマクロファージにおける Oligo 単独、あるいはカチオン性リポソームとの複合体とした際の細胞取り込み特性を細胞内動態まで含めて評価し、アンチセンス効果との関連を考察した。その結果、S-Oligo は P-Oligo や PS_3 -Oligo に比較し細胞取り込みが高く、その取り込み量とアンチセンス効果発現とが相関していることが示された。しかしながら S-Oligo はその多くが細胞内でエンドソーム等に分布しており、細胞内動態としては望ましいものではなかった。U937 細胞においてはカチオン性リポソームによって Oligo の動態を細胞内標的部位のひとつである核へ送達することが可能であったものの、マクロファージではそのような効果は発揮されず、またアンチセンス効果の増強もある限られた条件においてのみ認められるにとどまった。したがって、カチオン性リポソームはマクロファージにおけるアンチセンス効果増強のための有効なキャリアーとはならず、他の動態制御法の導入が必要であると考えられた。

第Ⅲ章 プラスミド DNA の取り込みとマクロファージ活性化

プラスミド DNA (pDNA) は、非ウイルスベクターによる遺伝子治療や DNA ワクチン治療において用いられ、その医薬品としての適用について大きな注目を集めている環状二本鎖 DNA である。pDNA を医薬品として直接生体内に投与することにより治療上有効なタンパク質を発現させ、その効果を期待する *in vivo* 遺伝子治療法の確立を目指した研究が活発に展開されており、それを実現するための遺伝子導入キャリアーとしてカチオン性リポソーム (83-85)、pH 感受性リポソーム (86-88)、膜融合リポソーム (89, 90)、ポリアミノ酸 (91-94)、カチオン性ポリマー (95-97) などが開発され、これらのアプローチの有用性が数多く報告されている。

pDNA の場合、細胞内における標的部位は核のみに限定される。pDNA の細胞レベルにおける取り込み機構と細胞内動態の評価は、その後の細胞内動態制御法の確立に重要な情報を与えるものと考えられるが、その詳細についてはほとんど明らかにされていない。これまでに静脈内に投与された pDNA が肝臓の非実質細胞に効率よく取り込まれ、その取り込みがポリイノシン酸 (poly[I]) やデキストラン硫酸などのポリアニオンによって阻害されたもののポリシチジン酸 (poly[C]) では阻害されなかったことより、pDNA の血中からのクリアランスにはポリアニオンの立体構造を特異的に認識するスカベンジャーレセプター (SR) 様の機構が関与することが示唆されている (98, 99)。SR は肝臓においては常在性マクロファージである Kupffer 細胞に多く発現していることから、マクロファージは pDNA の体内動態を規定している重要な細胞であると考えられる。

また、免疫原性が高く安全性に問題を有するウイルスベクターを用いた方法よりも、非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入のアプローチはこれらの難点を克服する有効な方法であると考えられてきたが、DNA 自体が免疫原性を持つこと、またそれにより様々な炎症性サイトカイン等の産生誘導を起こすことが報告されている (70, 71, 100-102)。その原因としては塩基配列中に存在する CpG motif の関与が強く示唆されており、その配列を持つ DNA によって B 細胞や単球・マクロファージ系の細胞が活性化し TNF- α などの産生が誘導される。このような免疫原性は大腸菌等の細菌由来の DNA では見られるものの脊椎動物由来の DNA では観察されず、これは CpG motif の配列が脊椎動物において抑えられていることとともに、CpG motif のシトシン残基がメチル化されていることによることが明らかにされている (103)。pDNA も大腸菌由来の DNA であることからシトシン残基のメチル化は起こらず、それによって免疫原性があるものと考えられている。しかしながら pDNA のマクロファージ等の免疫担当細胞による取り込み機構とそれに伴う活性化機構についてはほとんど明らかにされておらず、安全な遺伝子治療の実現のためにはその解明が必須であると思われる。

そこで本章においては、まずマクロファージにおける pDNA の取り込み特性を詳細に評価した。そして取り込み特性とそれに伴う活性化機構との関連を整理することにより、その解明を試みた (104, 105)。

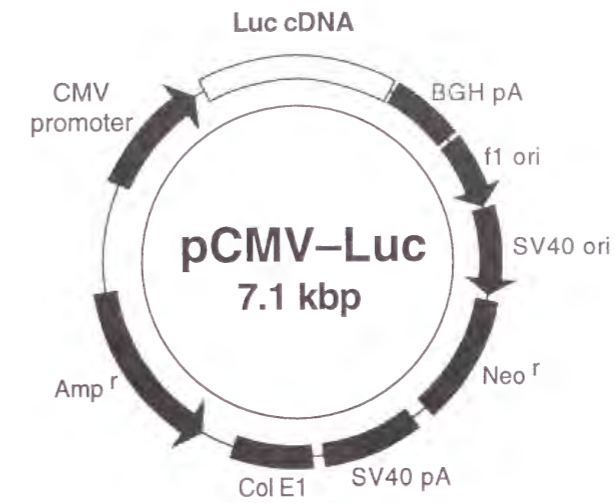


Fig. 34 Structure of pDNA containing firefly luciferase cDNA (pCMV-Luc).

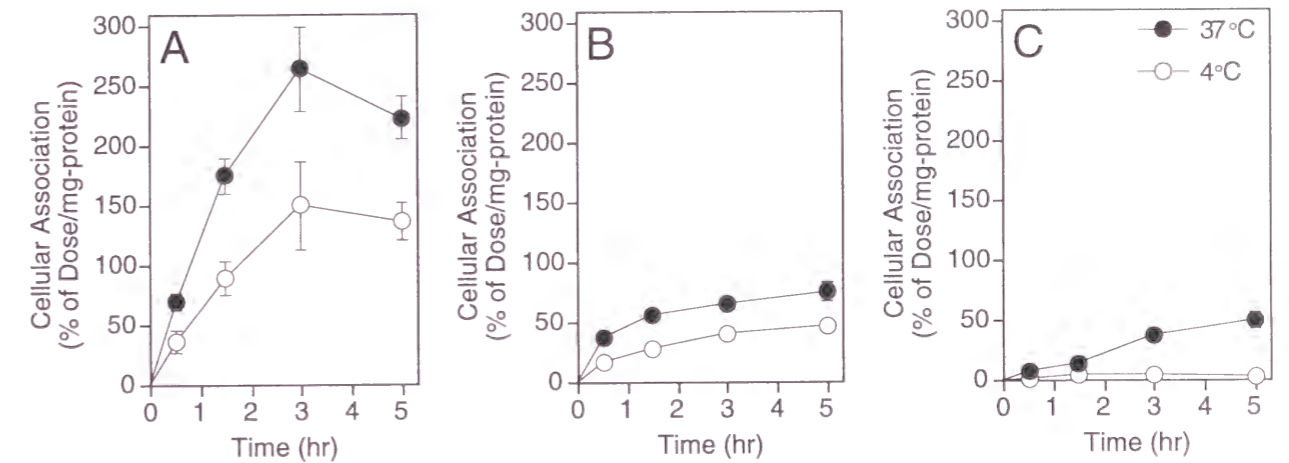


Fig. 35 Cellular association time-courses of $[^{32}\text{P}]$ pDNA (0.1 $\mu\text{g/ml}$) in resident macrophages (A), elicited macrophages (B) and CHO cells (C).

Ⅲ-1 マクロファージにおける細胞取り込み特性

検討にはモデル pDNA として、遺伝子導入時に強い転写活性を促す CMV プロモーター (106) を有し、ホタル・ルシフェラーゼをコードした pCMV-Luc (約 7100 bp) を用いた (Fig. 34)。

1-a 常在性マクロファージと滲出性マクロファージの比較

まず、放射標識した pDNA の細胞取り込みについて検討を行った。その結果、チオグリコレート刺激せずに採取した常在性マクロファージでは高い取り込みが見られた (Fig. 35A)。これに対し、チオグリコレート刺激後採取した滲出性マクロファージではその取り込みは低く (Fig. 35B)、対照として用いた CHO 細胞による取り込みも非常に低いものであった (Fig. 35C)。

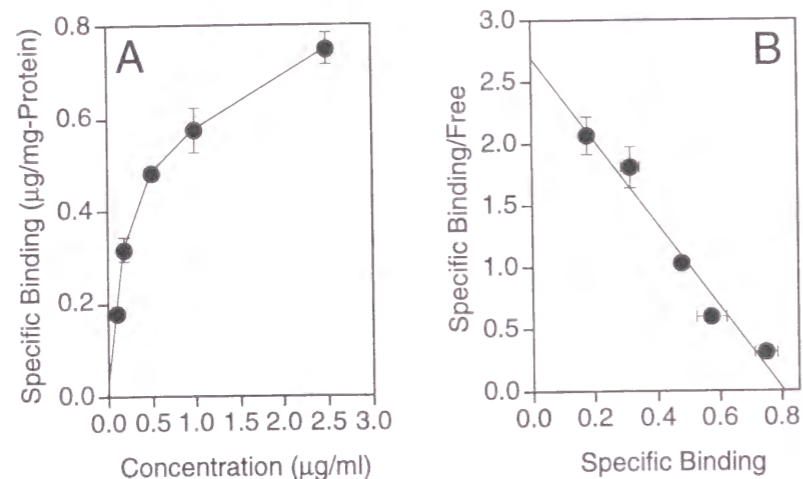


Fig. 36 Concentration dependence of [³²P]pDNA binding in resident macrophages represented by a normal (A) and Scatchard (B) plot. The cells were incubated with 0.1-2.5 µg/ml [³²P]pDNA at 4°C for 3 hr.

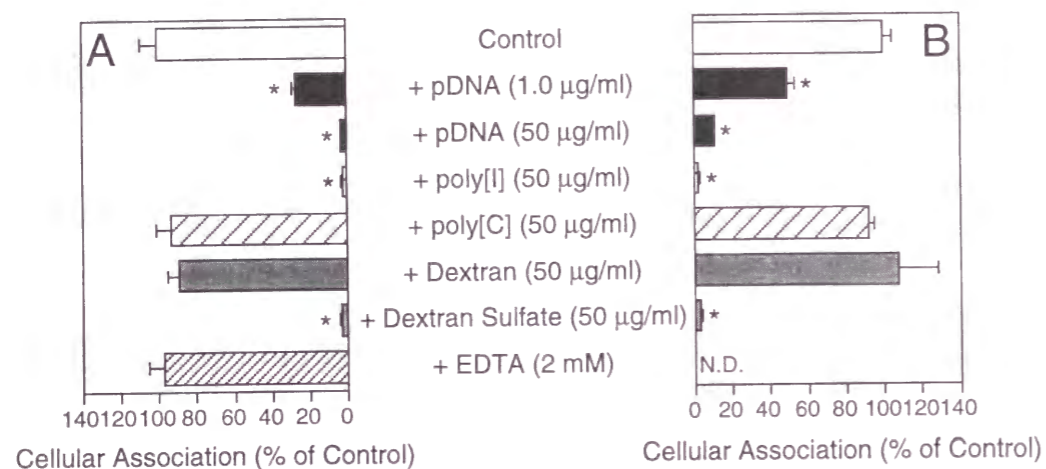


Fig. 37 Inhibition of cellular association of [³²P]pDNA with resident macrophages at 4°C (A) or 37°C (B). The cells were incubated with 0.1 µg/ml [³²P]pDNA for 3 hr in the presence of various inhibitors. There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.01$. N. D.; not determined.

1 - b 常在性マクロファージにおける結合パラメーターの算出

高い取り込み能を示した常在性マクロファージについてさらに詳細な検討を行い、結合の濃度依存性に基づく結合パラメーターの算出を試みた。その結果、pDNA の 4°C における結合は pDNA の濃度の上昇と共に飽和を示した (Fig. 36A)。そこで、過剰の非標識体添加時の結合を非特異的な結合とみなし、差を算出することにより特異的な結合を評価し Scatchard 解析を行ったところ、解離定数 (K_D) が 0.30 µg/ml、最大結合量 (B_{max}) が 0.81 µg/mg-protein となった (Fig. 36B)。

1 - c 各種ポリアニオンによる取り込み阻害

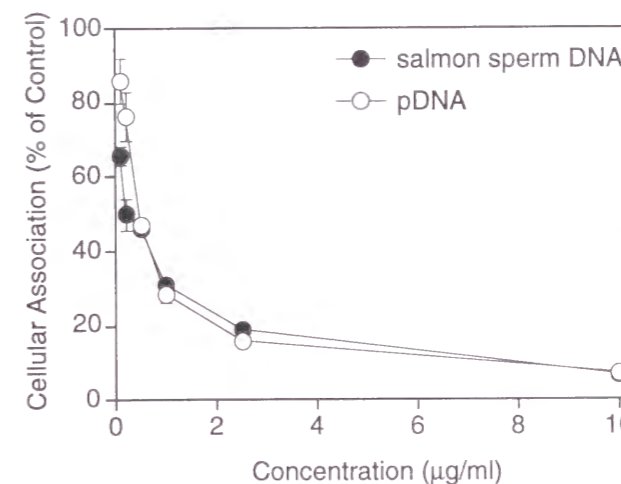


Fig. 38 Inhibition of cellular association of [³²P]pDNA with resident macrophages at 4°C by salmon sperm DNA. The cells were incubated with a tracer amount of [³²P]pDNA for 3 hr in the presence of 0.1-10 µg/ml unlabeled pDNA (open circle) or salmon sperm DNA (closed circle).

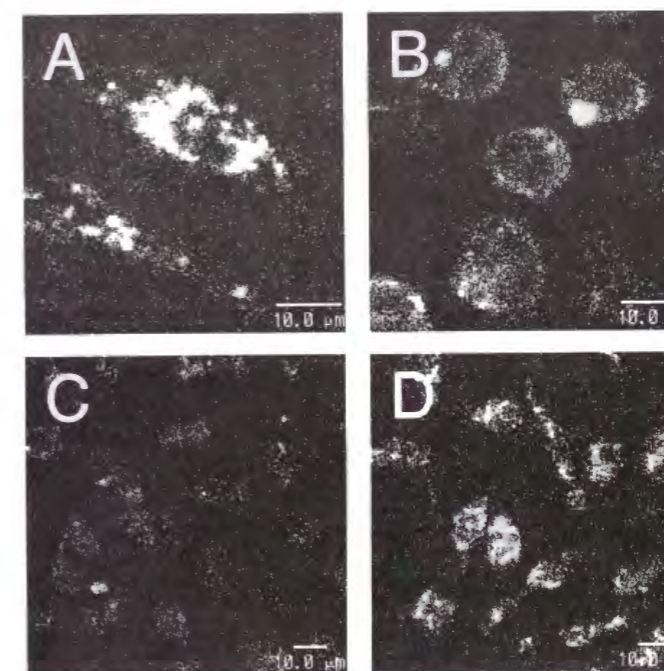


Fig. 39 Intracellular localization of fluorescein-labeled pDNA (5.0 µg/ml) in resident macrophages. The cells were incubated for 3 hr at 37°C (A), or 4°C (B). The uptake was inhibited by the presence of 50 µg/ml poly[I] (C), but not by 50 µg/ml poly[C] (D).

pDNA の結合認識特性を明らかにすることを目的として、各種ポリアニオンを共存させた際の pDNA のマクロファージへの結合と取り込みに対する影響について検討を行った。過剰量の非標識体を添加したところ、その結合と取り込みは著しく阻害された (Fig. 37)。さらに、SR の基質である poly[I] とデキストラン硫酸によって強い阻害が見られたものの、基質ではない poly[C] とデキストランでは全く影響を受けなかった (Fig. 37)。この結果は *in vivo* (98)、あるいは *in situ* で得られた結果 (99) と同様であり、SR 様の機構によりマクロファージに取り込まれていることが示された。また、SR のリガンド認識には二価カチオンが必要でないことが報告されているが (107, 108)、

pDNA の結合はキレート剤である EDTA の添加によっても影響を受けず、あわせて pDNA の結合における SR の関与の可能性が示唆された (Fig. 37)。

さらに結合認識特性を明らかにすることを目的として、大腸菌由来の pDNA とは異なり CpG motif のシトシン残基がメチル化されているサケ精子 DNA を用いて結合阻害実験を行った。トレーサー量の pDNA のマクロファージへの結合は、非標識の pDNA を添加した場合と同程度に非標識のサケ精子 DNA の添加によって濃度依存的に阻害され、10 $\mu\text{g/ml}$ においてほぼ特異的な取り込みは飽和に達した (Fig. 38)。よってマクロファージは DNA の分子内のメチル化の有無や、pDNA のような環状、あるいはサケ精子 DNA のような直鎖状の構造にかかわらず、二本鎖 DNA を認識している可能性が示された。

1 - d 蛍光標識 pDNA の細胞内動態

細胞表面に結合した pDNA が内在化を受けることを確認するため、fluorescein で蛍光標識した pDNA の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。pDNA は 37°C において細胞内に顆粒状に存在しており、エンドサイトーシスによって内在化を受けていることが示された (Fig. 39A)。また、低温条件下では細胞表面への分布を示すようになった (Fig. 39B)。さらに、細胞取り込みは poly[I] によって阻害され、poly[C] では影響を受けなかった (Fig. 39C, D)。

III - 2 細胞取り込みにおけるスカベンジャーレセプターの関与の有無

前節において、pDNA は SR 様の認識特性を持つレセプターによってマクロファージに認識され細胞内に取り込まれることが明らかとなった。そこで SR が pDNA をリガンドとして認識するか否かについて直接証明することを目的として、SR ファミリーの中で最もリガンド特異性が明らかにされているクラス A スカベンジャーレセプター (SRA) を安定に発現する CHO 細胞 (CHO(SRA)) を用い、その取り込みへの関与について検討を行った。

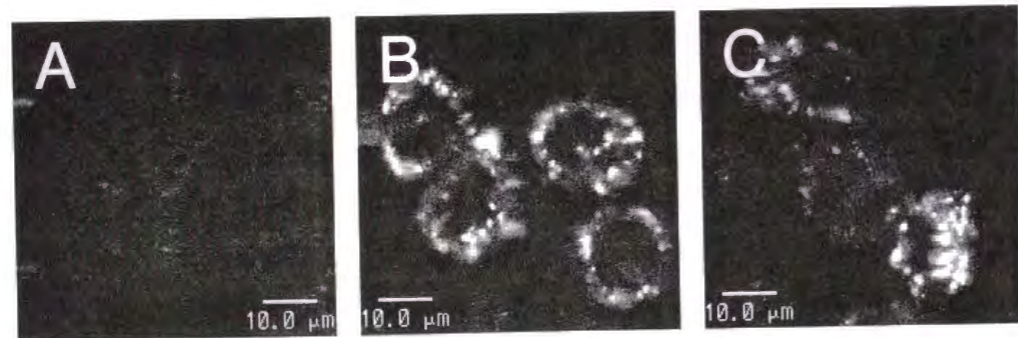


Fig. 40 Confocal microscopic images of DiI-Ac-LDL uptake by CHO cells (A) and CHO(SRA) cells (B, C). These cells were incubated for 16 hr at 37°C in the absence (A, B) or the presence (C) of 10 $\mu\text{g/ml}$ pDNA.

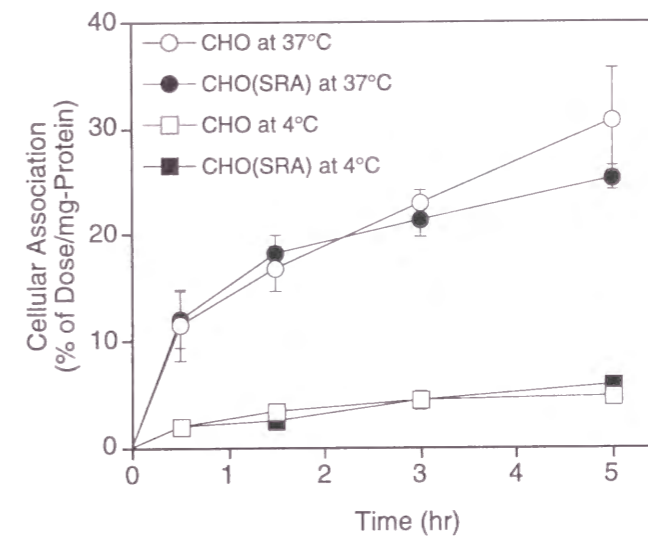


Fig. 41 Cellular association time-courses of [^{32}P]pDNA (0.1 $\mu\text{g/ml}$) in CHO cells and CHO(SRA) cells.

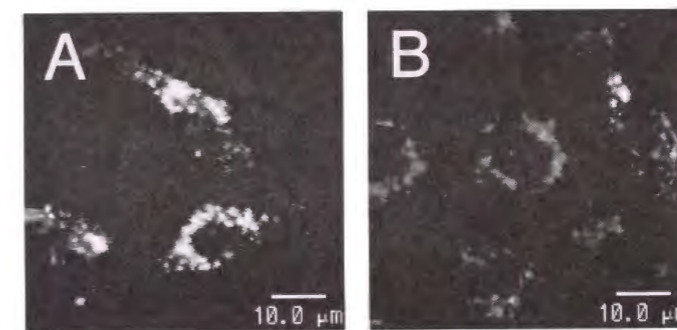


Fig. 42 Confocal microscopic images of DiI-Ac-LDL uptake by wild-type (A) or SRA-deficient (B) macrophages at 37°C for 16 hr.

2 - a スカベンジャーレセプター安定発現 CHO(SRA) 細胞株における取り込み特性

まず、CHO(SRA) 細胞の機能を確認するため、SRA の代表的なリガンドであるアセチル化 LDL (Ac-LDL) を 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI) で蛍光標識した DiI-Ac-LDL の細胞取り込みを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、CHO 細胞ではほとんど取り込みが見られなかったのに対し、CHO(SRA) 細胞では顕著な取り込みが観察され、導入した SRA がその機能を発揮していることが確認された (Fig. 40A, B)。

次に CHO(SRA) 細胞を用い、放射標識した pDNA の細胞取り込み実験を行った。しかしながら CHO(SRA) 細胞における pDNA の取り込みは、野生型である CHO 細胞における結果と同程度しか得られなかった (Fig. 41)。また、CHO(SRA) 細胞における DiI-Ac-LDL の取り込みは pDNA の添加によって影響を受けないことが共焦点レーザー顕微鏡による検討からも示され、SRA は pDNA を認識しないことが示唆された (Fig. 40C)。

2 - b スカベンジャーレセプター欠損マウス由来マクロファージにおける取り込み特性

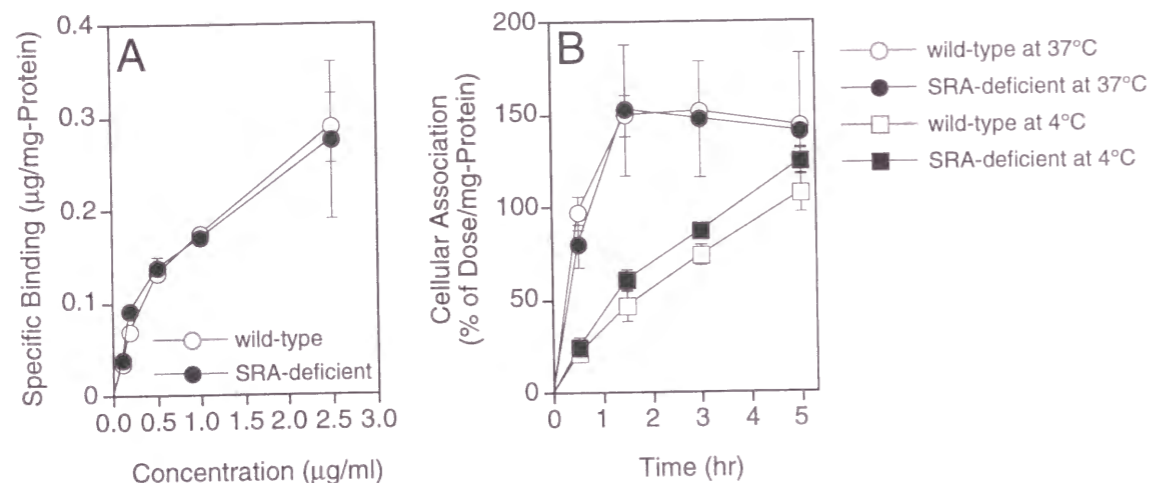


Fig. 43 Concentration dependence of [^{32}P]pDNA binding at 4°C for 3 hr (A) and cellular association time-courses of 0.1 µg/ml [^{32}P]pDNA (B) with wild-type or SRA-deficient macrophages.

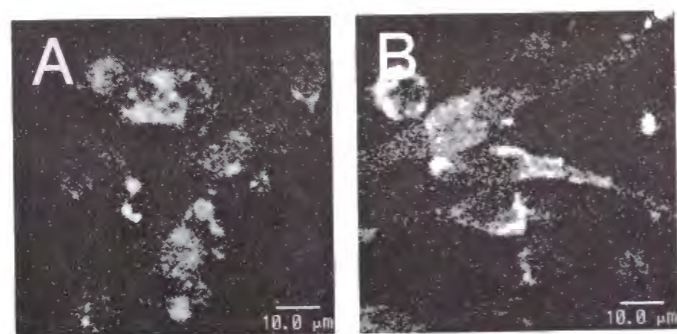


Fig. 44 Confocal microscopic images of fluorescein-labeled pDNA uptake by wild-type (A) or SRA-deficient (B) macrophages at 37°C for 5 hr.

2-a において pDNA のマクロファージによる認識には SRA は関与しないことが示唆されたが、この結果を検証する目的で、SRA を欠損させたノックアウトマウス (109) から採取した常在性マクロファージを用い、その関与の有無についてさらに検討を加えた。

SRA 遺伝子欠損の影響を確認するため、DiI-Ac-LDL の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生型のマクロファージでは顕著な取り込みが見られたのに対し、SRA 欠損マクロファージではその取り込みは低く、SRA 遺伝子の欠損によって Ac-LDL の取り込み能が減弱していることが確認された (Fig. 42)。

そこで次に、放射標識した pDNA を用いて細胞取り込み特性について検討を行った。その結果、SRA 欠損マクロファージにおいて pDNA は経時的に顕著に取り込まれ、野生型マクロファージでの結果とほぼ同様であった (Fig. 43B)。また、結合における濃度依存性にも両者に差は認められなかった (Fig. 43A)。さらに、蛍光標識した pDNA の細胞取り込みを比較した結果においても、SRA 欠損マクロファージと野生型とは同程度の取り込みを示すことが明らかとなった (Fig. 44)。

以上の結果より、pDNA はマクロファージに発現している SRA のリガンドとはならないことが

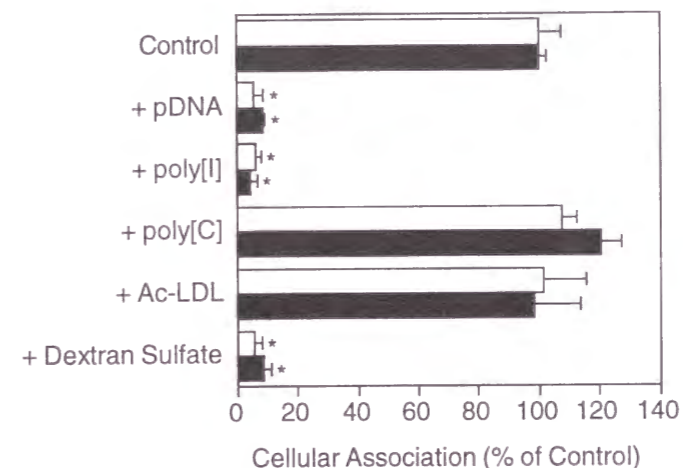


Fig. 45 Inhibition of cellular association of [^{32}P]pDNA (0.1 µg/ml) with wild-type (open bars) and SRA-deficient (closed bars) macrophages at 4°C. These cells were incubated for 3 hr in the presence of various inhibitors (50 µg/ml). There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.01$.

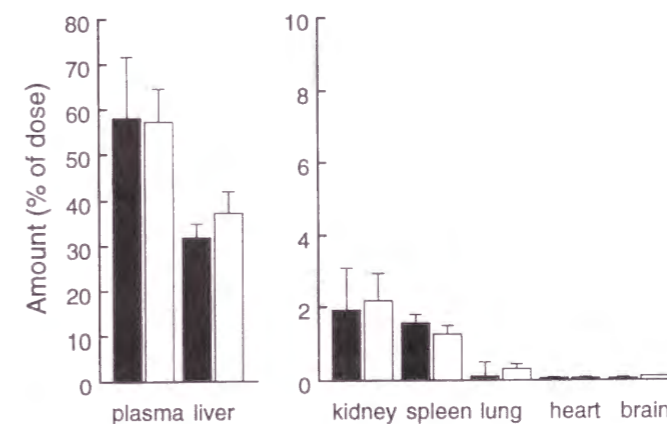


Fig. 46 Tissue distribution of [^{32}P]pDNA 10 min after intravenous injection in wild-type (closed bars) and SRA-deficient (open bars) at a dose of 1 mg/kg.

明らかとなった。さらに、SRA 欠損マクロファージにおいて pDNA 取り込みの阻害実験を行ったところ、SRA が欠損しているにも関わらず poly[I] とデキストラン硫酸によって強い阻害が認められた。この結果は野生型における結果と全く同様であり、SRA の欠損の影響は認められなかった (Fig. 45)。また Ac-LDL によっても阻害が見られなかった。

2-c スカベンジャーレセプター欠損マウス静脈内投与後の体内動態

CHO(SRA) 細胞ならびに SRA 欠損マクロファージを用いた *in vitro* 細胞取り込み実験の結果から、pDNA の取り込みに SRA が関与しないことが明らかとなったが、SRA 欠損マウスにおける *in vivo* 分布実験を行い、全身レベルにおける体内動態特性についても検討を行った。その結果

を Fig. 46 に示すが、静脈内投与 10 分後における臓器分布は SRA 欠損マウス、野生型ともに肝臓への高い移行を示し、*in vivo* においても SRA は pDNA の動態に影響を与えないことが示された。

2-d 様々なポリアニオンによる取り込み阻害

これまでの結果より、pDNA のマクロファージによる取り込みは SRA ではない他の分子が関与しているものの、SRA によるリガンド認識特性と非常に類似した性質を有していることが明らかとなった。また、poly[I]、サケ精子 DNA といった核酸類と、デキストラン硫酸の硫酸化多糖によって強く阻害を受けることが示された。そこでさらに詳細に特性を検討することを目的に、種々の核酸、変性 LDL、負電荷タンパク質、硫酸化多糖を用いた結合阻害実験を行った。pDNA の結合は、核酸では pDNA 自身と poly[I] の他に、二本鎖 DNA である poly[dI:dC] によってわずかに阻害を受けた (Fig. 47A)。一方、変性 LDL である Ac-LDL と 酸化 LDL (Ox-LDL) によっては阻害が見られなかった (Fig. 47B)。現在までに多数の SR ファミリーがクローニングされているが、いずれも Ac-LDL もしくは Ox-LDL をリガンドとしていることから (110)、pDNA の取り込みには変性 LDL レセプターとしての SR ファミリーではない他の機構によってマクロファージに認識されていることが推察された。さらに、負電荷タンパク質では影響が全く見られなかった (Fig. 47C)。硫酸化多糖ではデキストラン硫酸の他に、ヘパリンによって強い阻害が認められることがさらに明らかになった (Fig. 47D)。また、デルマトン硫酸でも弱いながら阻害が認められた。

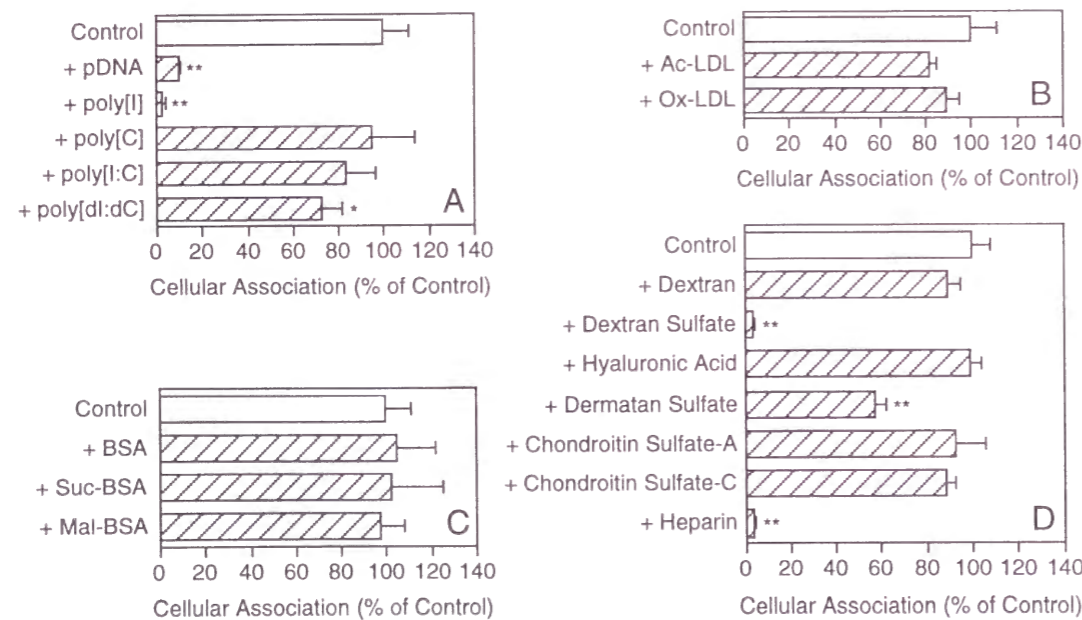


Fig. 47 Inhibition of cellular association of [³²P]pDNA (0.1 µg/ml) with resident macrophages by nucleic acids (A), modified LDL (B), modified BSA (C) or polysaccharides (D) (50 µg/ml). There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

III-3 プラスミド DNA によるマクロファージの活性化機構

前節までの結果より、pDNA のマクロファージにおける取り込み特性が明らかになった。そこで pDNA の取り込み特性とマクロファージの活性化機構との関連を明らかにすることを試みた。

3-a プラスミド DNA による各種炎症メディエーターの放出

まず、pDNA 処理によってマクロファージが産生する様々な炎症メディエーターについて検討を行った。実験としては pDNA 単独の場合と、Lipofectin との複合体として投与する場合とで行った。その結果を Table 2 にまとめたが、pDNA 単独の場合には NO はほとんど産生されず、インターフェロン (IFN) 活性も検出限界以下であった。これに対し TNF- α は pDNA を 10 µg/ml 以上添加した際に有意に産生され、添加量を 100 µg/ml まで上昇させても産生量に飽和は見られず、活発に培地中に放出されていた。

Lipofectin 複合体として添加した場合 NO 産生はわずかに増強され、pDNA 5.0 µg/ml: Lipofectin 25 µg/ml においてコントロール条件との間に有意差が認められた。また、IFN 活性と TNF- α については pDNA 単独で検出できなかった 1.0 µg/ml においても、Lipofectin との複合体とすることによってそれぞれの活性が認められた。pDNA 単独 100 µg/ml と pDNA 5.0 µg/ml: Lipofectin 25 µg/ml の結果を比較すると、IFN 活性については複合体の方が高い活性を示したが、TNF- α 産生については pDNA 単独の方が産生量が多くなり、それぞれのサイトカインの産生メカニズムは別個の制御を受けていることが示唆された。さらに、この実験において遺伝子発現についても同時に検討したが、いずれの条件においても発現は検出できず、pDNA は発現可能な形で核まで送達されていないことが考えられ、核への移行は大きく制限されていることが示唆された。

Table 2 Release of inflammatory mediators from macrophages stimulated by pDNA.

	NO release (µM)	IFN activity (IU/ml)	TNF- α (pg/ml)
Control	2.52 ± 0.766	< 1.4	85.0 ± 6.87
pDNA 1.0 µg/ml	1.49 ± 0.465	< 1.4	81.9 ± 4.29
pDNA 10 µg/ml	3.14 ± 0.547	< 1.4	134.1 ± 2.57
pDNA 100 µg/ml	4.10 ± 0.846	< 1.4	2006.0 ± 458
Control	1.74 ± 0.821	< 1.4	71.0 ± 14.6
pDNA 1.0 µg/ml + Lipofectin 5.0 µg/ml	1.39 ± 0.657	9.6	211.2 ± 1.72
pDNA 5.0 µg/ml + Lipofectin 25.0 µg/ml	4.22 ± 0.383	32.5	385.3 ± 48.9

ところで、マクロファージは LPS によって活性化され、NO、IFN- $\alpha\beta$ 、TNF- α などを産生することが知られている (52)。そこで、pDNA によるマクロファージの活性化が LPS の混入によるものかどうかを検証するために、pDNA を DNase I 処理することによる分解物による TNF- α 産生能を評価した。その結果、TNF- α 産生量は有意に減少したが、しかしながら約 25% 程度の活性が認められ (Fig. 48)、完全な分解を受けなかった低分子のフラグメント DNA によってまだ活性が発揮されているものと推察された。また、pDNA 中に含まれるエンドトキシン量を Limulus amoebocyte lysate assay によって確認したが、0.022 ng/ μ g pDNA 以下と十分に少量であったことから、LPS によって活性化しているのではないことが示された。さらにサケ精子 DNA では TNF- α の産生は全く検出されず、CpG motif のシトシン残基がメチル化されていることによってマクロファージの活性化が抑えられたものと考えられた (Fig. 48)。

次に、TNF- α 産生の経時変化について検討を行ったところ、4 時間後までは培養時間に依存して産生量は直線的に増大した (Fig. 49)。その後の培地中の TNF- α 活性はほぼ一定であり、48 時

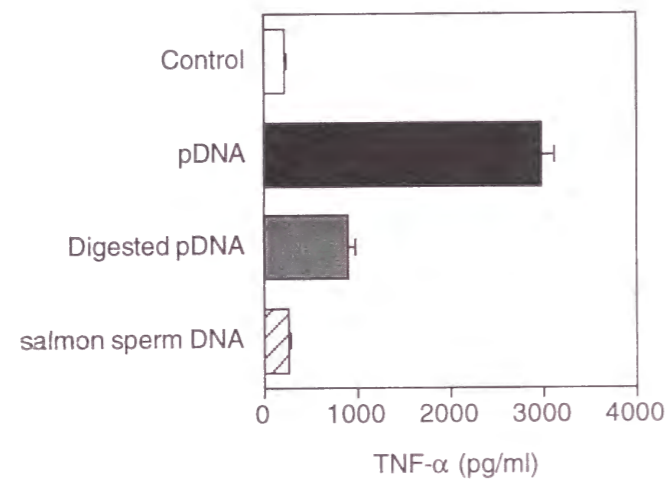


Fig. 48 Production of TNF- α from resident macrophages by nucleic acid (50 μ g/ml).

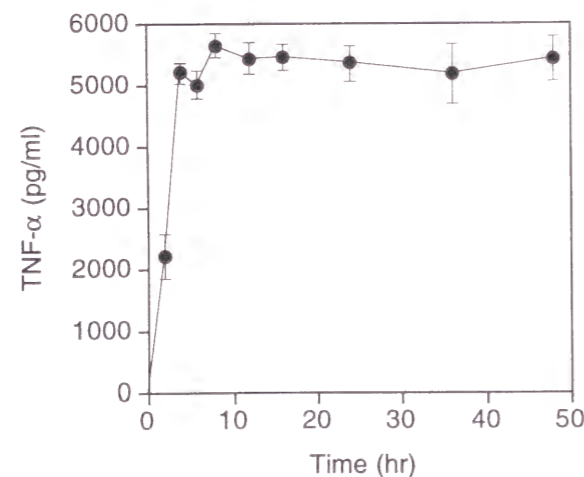


Fig. 49 Production time-course of TNF- α from resident macrophages by pDNA (50 μ g/ml).

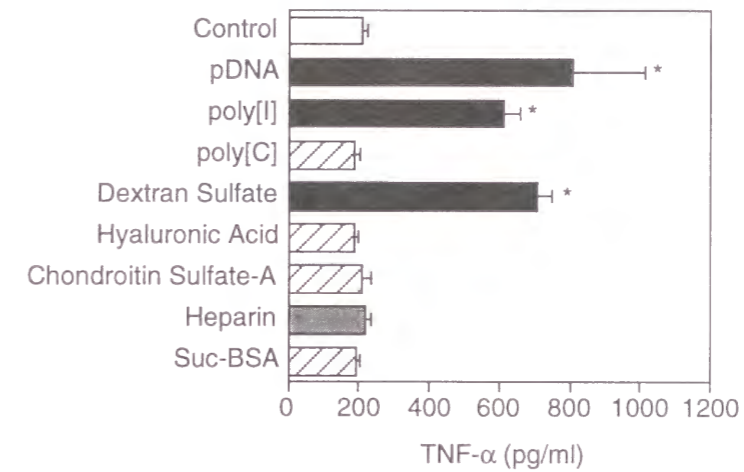


Fig. 50 Production of TNF- α from resident macrophages by polyanions (50 μ g/ml). There are statistically significant differences by ANOVA: *, $p < 0.01$.

間後まで変化は認められなかった。

3 - b TNF- α の誘導特性と pDNA の取り込み特性との関連

前節までに pDNA の細胞取り込みは poly[I]、サケ精子 DNA、デキストラン硫酸、ヘパリンによって強く阻害され、poly[C] など他のポリアニオンによっては影響を受けないことが明らかにされたが、認識機構が同じであるならば、pDNA 以外の結合阻害作用を有するポリアニオンによってもマクロファージの活性化が誘導される可能性が考えられた。そこで、種々のポリアニオンをマクロファージに添加することによって TNF- α が産生されるかについて検討を行った。その結果を Fig. 50 に示すが、poly[I] とデキストラン硫酸によって pDNA と同程度の TNF- α の産生が検出された。しかしながら、ヘパリンにはこのようにマクロファージを活性化させるような作用はなく、取り込み機構と活性化機構とは直接関連していないことが示唆された。

III-4 考察

本章では、pDNA の体内動態を規定する機構の解明を目的としてマクロファージにおける pDNA の取り込み特性を詳細に検討し、pDNA を用いた遺伝子治療において炎症などの副作用の原因となると考えられるマクロファージの活性化機構との関連について、主に TNF- α の産生を指標にして検討を行った。

pDNA のマクロファージにおける結合と取り込み特性には、pDNA の持つポリアニオンとしての物理化学的性質を認識する機構が関与していることが明らかになった。そして、そのリガンド認識特性からポリアニオンの立体構造を特異的に認識する SR の関与が示唆されたものの、CHO(SRA) 細胞や SRA 欠損マウスを用いた検討により SRA はその取り込みに影響を及ぼさないことが明らかになった。これまで Ac-LDL 等の変性 LDL の SR による認識を競合的に阻害す

ることから poly[I] やデキストラン硫酸などは SR のリガンドであるとされてきたが、本検討から得られた結果はこれらのポリアニオンが SR 以外の分子にも認識されていることを示している。よって、様々なポリアニオンの細胞取り込みにおける SR の関与の有無を poly[I] やデキストラン硫酸などのポリアニオンを用いた阻害実験のみから結論づけることの危険性、さらにマクロファージにおいて様々なポリアニオンの認識メカニズムが存在している可能性が考えられた。

そこでさらにポリアニオンの種類を増やし、核酸や多糖類などによる阻害実験を行ったところ硫酸化度の高い多糖類であるヘパリンによっても強い阻害が認められ、pDNA の取り込みに関わる分子は広い認識特性を持つことが示された。本検討から得られた結果から pDNA の取り込みに関与するレセプターの実体を特定することはできなかったが、比較的サイズの小さい一本鎖 DNA である Oligo の多形核白血球による取り込みは、細胞表面に存在する接着分子のインテグリンファミリーに属する Mac-1 (CD11b/CD18, α M β 2) が関与することが報告されていることから (111)、同じ核酸類である pDNA も同様に Mac-1 の関与する機構でマクロファージに取り込まれている可能性が考えられる。また、Mac-1 のリガンドである細胞外マトリックス成分のひとつであるフィブロネクチンがその分子内に少なくとも 4 箇所の DNA ならびにヘパリンと結合するドメインが存在していることから (112-118)、pDNA の細胞取り込みにおける関与について今後の検討が必要であると思われる。

DNA による免疫原性は、自己免疫疾患の一種の全身性エリテマトーデスにおける抗 DNA 抗体の生成メカニズムの研究を通じて明らかにされてきた。非ウイルスベクターとして用いる pDNA は大腸菌由来の DNA であることからその免疫原性についても検討が行われているが、pDNA の取り込み機構との関連を詳細に検討した例は見当たらない。本検討から pDNA のマクロファージによる取り込みは 10 μ g/ml でほぼ特異的な取り込みは飽和に達したが、マクロファージの活性化は 100 μ g/ml まで飽和は起こらなかった。また Lipofectin との複合体にすることで活性化が増強されたことから、pDNA は細胞表面への結合に伴って細胞内にシグナルが伝達されるような活性化メカニズムを介するのではなく、細胞内に pDNA が特異的な機構に限らず何らかの機構によって内在化されたものが活性化を引き起こしていることが推察される。さらに活性化に伴う TNF- α 産生と IFN 活性とが並列な関係ではなく、それぞれ別個の活性制御機構が存在していることが示唆された。CpG motif を持つ Oligo を用いた検討において、それ以外の配列を変化させることで産生されるサイトカインの量的バランスが変化することも報告されており (119)、細胞内において複雑な機構によって活性制御が行われていると考えられた。

pDNA の細胞取り込み特性と活性化現象との関連を検討した結果、pDNA の細胞取り込みを強く阻害した poly[I] とデキストラン硫酸によって pDNA と同程度のマクロファージの活性化が観察され、pDNA だけでなく強い負電荷を有するポリアニオンに免疫原性があることが明らかになった。しかしながら、同様に強い取り込み阻害を示したヘパリンにはマクロファージを活性化させる効果はなく、pDNA による活性化のアンタゴニストとなりうる可能性が考えられた。これらの情報

に基づきさらに詳細な検討を行うことによって、活性化現象まで含めた機構の解明につながるものと考えられる。

以上、本章ではマクロファージにおける pDNA の取り込み特性を詳細に評価し、pDNA はポリアニオンとしての物理化学的性質に基づき認識されていることを示した。さらに、活性化現象との関連を検討した結果、pDNA によるマクロファージの活性化は pDNA が内在化された後に複雑な活性化機構を介して起こっていることが示唆された。これらの知見は pDNA を医薬品として用いる際の基礎的情報である生体による認識特性と、免疫担当細胞を介した副作用発現機構の解明に有用な情報を与えるものと考えられる。

結 論

以上、著者は三章にわたり、マクロファージにおける高分子医薬品の細胞取り込み機構を細胞内動態まで含めて評価し、これらの生物学的効果発現との関連について検討した。そしてこれらの高分子医薬品を用いた治療の最適化を可能にする細胞内動態制御法を開発するための指針確立を試み、以下の結論を得た。

(I) 化学修飾による superoxide dismutase の細胞膜親和性および活性酸素消去能の改善

生理活性タンパク質として superoxide dismutase (SOD) を選び、マクロファージの細胞膜に存在する NADPH oxidase より産生され種々の炎症性疾患に関与しているスーパーオキシドアニオンを効率的に消去することを目的に、SOD に化学修飾を施しその効果を評価した。培養マウス腹腔マクロファージを用いて活性酸素消去能および細胞取り込み動態を評価した結果、未修飾 SOD がほとんど取り込まれず全く効果を示さなかったのに対し、分子全体として正電荷を導入したカチオン化 SOD (Cat-SOD) は負電荷を有する細胞膜と強い静電的相互作用を示すと共に吸着性エンドサイトーシスの機構に基づき取り込まれ、優れた活性酸素消去作用を示した。また内在化を阻害することによって効果が減弱したことから、細胞膜表面に結合した Cat-SOD のみならずエンドサイトーシスを受けたものもマクロファージから放出される活性酸素の消去に寄与することが明らかとなった。さらに、レセプター介在性エンドサイトーシスにより取り込まれるマンノース修飾 SOD と比較したところ、Cat-SOD はより優れた効果を示し、細胞取り込み機構の違いに由来する細胞内動態の差が影響しているものと考えられた。以上の結果より、SOD にカチオン化修飾を施すことにより、マクロファージ由来の活性酸素が関与する各種疾患に対する有効な治療薬となる可能性が示された。

(II) アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内動態に及ぼすカチオン性リポソームの影響

次に、病因遺伝子の発現を特異的に抑制することにより治療効果を発現するアンチセンスオリゴヌクレオチド (Oligo) をとりあげ、マクロファージに存在する nitric oxide (NO) 合成酵素 inducible NO synthase (iNOS) に対する Oligo をモデルに用いて検討を行った。NO 産生阻害を指標にアンチセンス効果を評価したところ、phosphorothioate 化された S-Oligo が配列特異的な効果を示したものの、高濃度かつ長時間の処理が必要であった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識体の細胞取り込みと細胞内動態を検討した結果、経時的な細胞内への移行が確認されたが、標的分子である mRNA が存在する核やサイトゾルへの移行はほとんど認められず、エンドソームやリソソーム内への局在を示唆する顆粒状の細胞内分布が観察された。そこでカチオン性リポソームと

の複合体形成の効果を検討した結果、ヒト前単球細胞株 U937 細胞においては S-Oligo の核への移行が顕著に促進されたが、マクロファージにおいては大きな細胞内動態の変化は観察されず、わずかにアンチセンス効果の改善が認められるにとどまった。以上の結果より、アンチセンス効果発現における Oligo の細胞内動態の重要性が明らかとなり、さらにマクロファージにおいてはカチオン性リポソームの効果が不十分で、他の動態制御法の導入が必要であることが示された。

(III) プラスミド DNA の取り込みとマクロファージ活性化

さらに、遺伝子治療において非ウイルスベクターとして用いられ、細胞内の標的部位が核に限定されるプラスミド DNA (pDNA) を対象に検討を行った。負電荷を帯びた巨大分子であるにも関わらず、マクロファージに pDNA が速やかに取り込まれることが明らかとなったが、遺伝子発現は全く認められず核への移行が大きく制限されていることが示唆された。一方、pDNA の取り込みに伴い、大量の tumor necrosis factor- α (TNF- α) の誘導などが認められ、マクロファージの活性化が示された。取り込み特性を解析した結果、pDNA の持つポリアニオンとしての物理化学的性質を認識する何らかの機構の関与が示唆され、リガンド認識特性にポリアニオンの立体構造を特異的に認識するスカベンジャーレセプター (SR) との類似性が認められたので、最も良く知られるクラス A の SR (SRA) を安定に発現する CHO 細胞および SRA のノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージを用いて検討を行った結果、pDNA の取り込みには SRA は関与せず、他の機構によることが明らかになった。また、負電荷を持つ種々のタンパク質、多糖類、核酸を用いて詳細な検討を行った結果、マクロファージによる pDNA の取り込み特性と活性化現象との関連を明らかにすることができた。

以上、著者は従来情報の乏しかったマクロファージにおける高分子医薬品の細胞内動態と生物学的な効果発現との関係を検討し、治療最適化の実現に必要なデリバリーシステムの設計指針の基礎となる知見を得た。これらの知見は、高分子医薬品を用いた有効かつ安全な薬物治療法を確立するための有用な情報となるものと考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都大学高倉喜信教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、実験に際し有益な御助言を戴くと共に、試料を御提供戴きました京都大学渡部好彦助教授、大阪大学土井健史教授、大阪大学今西 武教授、中外製薬創薬資源研鈴木宏志氏、東京大学児玉龍彦教授に心から感謝の意を表します。

また、多くの有益な御助言と御指導を戴いた京都大学山下富義助教授に心からの感謝の意を表します。さらに、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学西川元也助手、藤沢薬品工業徳田英昭博士、並びに京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学、病態情報薬学教室員一同に深謝いたします。

最後に、実験の一部に御協力戴いた升田 貞博士、Ram I. Mahato 博士、金丸太郎修士、北野真希子学士、平松徹彦学士、橋口美和学士、安田 圭学士、村尾有紀学士に深く感謝いたします。

実験の部

第 I 章 実験の部

【1】試薬

ヒト型遺伝子組み替え Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD: 111-Ser) は旭化成株式会社より供与されたものを用いた。ウマ心臓 ferricytochrome *c* (Type VI, Cyt *c*)、phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)、fluorescein isothiocyanate (FITC) および colchicine は Sigma 社より購入した。 ^{111}In InCl₃ は日本メジフィジックス株式会社より供与されたものを用いた。

【2】SOD の化学修飾

(1) cationized SOD (Cat-SOD) の合成 (120)

2M 1,6-hexamethylenediamine 水溶液 30 ml に 10% SOD 溶液を 5.0 ml 滴下し、30 分間、氷冷下で攪拌した。その後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) 0.5 g を加え 1 時間攪拌し、さらにもう一度 EDC 0.5 g を加えた。全ての操作中、反応液の pH は 6.5 に固定した。一晚室温で反応させた後、水に対して透析を行い限外濾過および凍結乾燥により、粗 Cat-SOD を得た。さらに、クロマトフォーカシングにより等電点が 9.0 以上の画分を採取し、限外濾過および凍結乾燥により精製 Cat-SOD を得た。cationized bovine serum albumin (Cat-BSA) も同様の方法で合成した。

(2) mannosylated SOD (Man-SOD) の合成 (121)

マンノース修飾 SOD (Man-SOD) は、Lee らの方法に従い合成した。mannose 7.5 g を acetic anhydride 10 ml 中室温で 3 時間攪拌後、30% HBr/AcOH 20 ml 中冷所で一晚インキュベーションしアセトハロ糖を調製した。次いで、これを thiourea と 1:1 のモル比で acetone に溶解後 15 分間還流し、反応生成物 4.5 g と ClCH₂CN 3.33 g、K₂CO₃ 1.49 g、NaHSO₃ 1.95 g を水/acetone (1:1) 20 ml 中で 2 時間氷冷下で反応させ、cyanomethyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thiomannoside (CMN-thiomannoside) を合成した。得られた CMN-thiomannoside を MeOH 中 0.01 M CH₃ONa と室温で一晩インキュベートし 2-imino-2-methoxyethyl 1-thiomannoside (IME-thiomannoside) を合成した。最終的に、SOD 100 mg を含む 50 mM borate buffer (pH 9.5) 10 ml に IME-thiomannoside を 1:25 のモル比で加え、3 時間反応させることにより Man-SOD を合成し、Sephadex G-25 (fine, Pharmacia 社) カラムを用いたゲル濾過により精製した。

【3】SOD および SOD 誘導体の物理化学的性質の評価

(1) 分子量

分子量の測定は、島津製作所株式会社の Shim-pack Diol-300 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより行った。溶出液には phosphate buffered saline (pH 7.4) を用い、既知の分子量を持つ 8 種類の標準タンパク質 (Pharmacia 社) を用いて作成した検量線から各誘導体の見かけの分子量を決定した。

(2) アミノ基の定量

Habeeb の方法に準じて glycine を標準物質として trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を用いた呈色反応 (122) により行った。

(3) 糖残基数の定量

Man-SOD の糖残基数は、mannose を標準物質として anthrone-硫酸法 (123) により行った。

(4) 酵素活性の定量

SOD テストワコー (和光純薬株式会社) を用いて nitroblue tetrazolium (NBT) 還元法により行った。

【4】Cat-SOD の不活性化

Hodgson らの方法 (124) に従い、Cat-SOD を過酸化水素で処理することにより行った。

【5】SOD および SOD 誘導体の放射標識体及び蛍光標識体の合成

(1) ¹¹¹In 標識

Hnatowich らの方法 (125) に従い二官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) を用いて [¹¹¹In]InCl₃ により放射標識した。Cat-SOD 10 mg を 0.1 M HEPES buffer (pH 7.0) 1 ml に溶解し、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した DTPA を 10 μl (タンパク質の 2 倍当量) 加え、30 分間室温で反応させた後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応 DTPA を除去、限外濾過により濃縮した。次いで、0.1 M acetate buffer (pH 6.0) 20 μl と [¹¹¹In]InCl₃ 溶液 (74 MBq/ml) 20 μl の混液に 40 μl の DTPA 結合 Cat-SOD を加え 30 分間室温で放置することにより標識を行った後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過および限外濾過により精製した。

(2) FITC 標識

SOD ならびに SOD 誘導体の FITC 標識体は Monsigny らの方法 (126) に従い合成した。タンパク質 20 mg を 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) に溶解し、そこに同 buffer に溶解した FITC をタンパク質の 3 倍当量加え、5 時間室温で反応させた。次いで、溶出液を水/n-butanol (95:5) として Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応の FITC を除去した。さらに、水に

対して透析を行い、限外濾過および凍結乾燥により精製 FITC 標識 SOD ならびに SOD 誘導体を得た。

【6】滲出性マウス腹腔マクロファージの単離と培養

ICR 系雄性マウス (5 週齢) に TGC 培地 (日水製薬株式会社) を腹腔内に投与し、4 日後に RPMI1640 培地 (日水製薬株式会社) を用いてマウス腹腔より単離した。単離したマクロファージは、10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した RPMI1640 培地に懸濁させて播種し、2 時間後に洗浄して接着しなかった細胞を取り除き、一晚培養した後実験に用いた。

【7】SOD および SOD 誘導体による活性酸素消去効果

マウス腹腔マクロファージに PMA を添加することにより放出されるスーパーオキシドアニオンを cytochrome c (Cyt c) 法により測定し、SOD および SOD 誘導体の活性酸素消去能を評価した。

(1) 連続接触実験

細胞を Hanks' balanced salt solution (HBSS、日水製薬株式会社) で洗浄後、SOD あるいは Cat-SOD と Cyt c および PMA を同時に加え、スーパーオキシドアニオンの生成を測定した。

(2) 前処理実験

細胞を HBSS で洗浄後、SOD あるいは SOD 誘導体と一定時間インキュベートして、細胞にこれらタンパク質を取り込ませた。その後、一度細胞を HBSS で洗浄した後に、Cyt c および PMA を添加し、スーパーオキシドアニオンの生成を測定した。

(3) スーパーオキシドアニオンの定量

Cyt c および PMA を添加し、一定時間後に反応液を採取し、氷冷下遠心してその上清を得た。上清の 550 nm における吸光度の単位時間当たりの変化を測定し、スーパーオキシドアニオンの生成量を求めた。

【8】SOD および SOD 誘導体のマウス腹腔マクロファージによる *in vitro* 取り込み実験

細胞を HBSS で洗浄し、実験する温度 (37°C あるいは 4°C) で 20 分インキュベートした。その後、HBSS を取り除き ¹¹¹In で放射標識した SOD あるいは SOD 誘導体を含む HBSS を加えた。細胞を一定時間インキュベートした後、氷冷した HBSS で洗浄し、0.1% Triton X-100 含有 0.3 M NaOH 水溶液で細胞を可溶化した。その溶液を回収し放射活性を測定し、さらに、Lowry 法 (127) によりタンパク量を測定して細胞単位タンパク量当たりの取り込み量を求めた。

【9】 SOD および SOD 誘導体の細胞内動態

細胞を HBSS で洗浄し、実験する温度 (37°C あるいは 4°C) で 20 分インキュベートした。その後、HBSS を取り除き FITC 標識した SOD あるいは SOD 誘導体を含む HBSS を加えた。細胞を一定時間インキュベートした後、氷冷した HBSS で洗浄し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 30 分間インキュベートして固定した後、共焦点レーザー顕微鏡 (ACAS 570、Meridian 社) で観察した。

【10】 ¹¹¹In 放射標識体の定量 (放射活性の測定)

カウンティングチューブにサンプリング後、特別な操作は行わずにそのまま well 型 γ 線シンチレーションカウンター (ARC-500、Aloka 社) で測定した。

第 II 章 実験の部

【1】 試薬

すべてのオリゴヌクレオチドは GENSET 社より購入した。マウス IFN- γ は京都大学大学院薬学研究科渡部好彦助教授より供与して頂いたものを用いた。リポポリ多糖 (E. coli O127:B8、LPS) は Sigma 社より購入した。

【2】 オリゴヌクレオチドの設計

(1) ヒト *c-myc* に対する Oligo

ヒト癌遺伝子 *c-myc* の開始コドンから 20 塩基 (ATGCCCTCAACGTTAGCTT) に相補的な配列 (AAGCTAACGTTGAGGGGCAT) をアンチセンス配列として選択した。アンチセンス効果の対照としてセンス配列 (ATGCCCTCAACGTTAGCTT)、ならびにアンチセンス配列中のアデニン残基とチミン残基を入れ替えたミスセンス配列 (TTGCATTCGAAGTGGGGCTA) を選択した。リン酸結合部位としては天然型の phosphodiester 結合を有する天然体 (P-Oligo)、リン酸結合部位中のひとつの酸素原子を硫黄原子に置換する phosphorothioate 化修飾をすべてのリン酸結合部位に行ったもの (S-Oligo)、および phosphorothioate 化修飾を 3' 末端から 3 個のリン酸結合部位に対して行ったもの (PS₃-Oligo) の 3 種を用いた。

(2) マウス iNOS に対する Oligo

マウス inducible nitric oxide synthase (iNOS) の開始コドンから 20 塩基 (ATGGCTTGCCCTGGAAGTT) に相補的な配列 (AACTTCCAGGGGCAAGCCAT) をアンチセンス配列として選択した。アンチセンス効果の対照としてセンス配列 (ATGGCTTGCCCTGGAAGTT)、ならびにアンチセンス配列中のアデニン残基とチミン残基を入れ替えたミスセンス配列 (TTCAACCTGGGGCTTGCCTA) を選択した。リン酸結合部位としては天然体 (P-Oligo)、および phosphorothioate 化修飾をすべてのリン酸結合部位に行ったもの (S-Oligo) の 2 種を用いた。

【3】 細胞の単離と培養

(1) ヒト白血病細胞株 U937 細胞

U937 細胞は JCRB (Japanese Cancer Research Resources Bank) より入手した。10% FBS を添加した RPMI1640 培地で培養し、実験に用いた。

(2) 常在性マウス腹腔マクロファージ

ICR 系雄性マウス (5 週齢) より RPMI1640 培地を用いてマウス腹腔より単離した。単離した

マクロファージは、10% FBS を添加した RPMI1640 培地に懸濁させて播種し、2 時間後に洗浄して接着しなかった細胞を取り除き、一晚培養した後実験に用いた。

(3) 滲出性マウス腹腔マクロファージ

Balb/c 系雄性マウス (5 週齢) に TGC 培地 を腹腔内に投与し、4 日後に RPMI1640 培地を用いてマウス腹腔より単離した。単離したマクロファージは、10% FBS を添加した RPMI1640 培地に懸濁させて播種し、2 時間後に洗浄して接着しなかった細胞を取り除き、一晚培養した後実験に用いた。

【4】Oligo の放射標識体の合成

(1) ³²P 標識

Oligo の 5' 末端の水酸基を [γ -³²P]ATP と T4 polynucleotide kinase (宝酒造株式会社) でリン酸化することにより行った。

(2) ³⁵S 標識

Oligo の 3' 末端に [α -³⁵S]ddATP を terminal deoxyribonucleotidyl transferase (宝酒造株式会社) を用いて付加することにより行った。

【4】Oligo/カチオン性リボソーム複合体の調製

まず等量の RPMI1640 もしくは Opti-MEM (GIBCO-BRL 社) から成る Oligo 溶液およびカチオン性リボソーム溶液を調製し、室温で 30 分間放置した。その後、Oligo 溶液をカチオン性リボソーム溶液に少量ずつ添加して混合した後、約 20 分間室温放置したものをを用いた。

【5】c-myc に対する Oligo による細胞増殖抑制の評価

U937 細胞を 10% FBS を添加した RPMI1640 培地に懸濁させて 24 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種した後、Oligo 単独もしくはカチオン性リボソームとの複合体を添加した。添加してから 4 日後細胞を回収し、細胞数を MTT 法 (128) により測定した。

【6】iNOS に対する Oligo による NO 放出抑制の評価

(1) Oligo 単独による効果

96 穴プレートに播種された滲出性マウス腹腔マクロファージを RPMI1640 培地で洗浄した後、10% FBS を添加した RPMI1640 培地を加え、Oligo を添加した。12 時間後 50 IU/ml IFN- γ を添加し、さらに 48 時間インキュベートした後培地を回収し、nitrite の量を測定した。

(2) 一定比率で調製した Oligo/カチオン性リボソーム複合体による NO 放出抑制の評価

96 穴プレートに播種された滲出性マウス腹腔マクロファージを RPMI1640 培地で洗浄した後、10% FBS を添加した RPMI1640 培地を加え、重量比 1:6 に調製した Oligo/カチオン性リボソーム複合体を添加した。12 時間後 50 IU/ml IFN- γ を添加し、さらに 48 時間インキュベートした後培地を回収し、nitrite の量を測定した。

(3) 一定量のカチオン性リボソームと調製した Oligo/カチオン性リボソーム複合体による NO 放出抑制の評価

96 穴プレートに播種された滲出性マウス腹腔マクロファージを Opti-MEM で洗浄した後、7.2 μ g のカチオン性リボソームと Oligo との複合体を添加した。6 時間後細胞を洗浄し培地を 10% FBS を添加した RPMI1640 培地に換えてさらに 6 時間培養した。その後 2.5 IU/ml IFN- γ と 50 ng/ml LPS を添加し、さらに 48 時間インキュベートした後培地を回収し、nitrite の量を測定した。

【7】nitrite の定量

NO の代謝物である nitrite を定量することにより評価した。回収したサンプルと等容量の Griess 試薬とを混合し室温で 10 分間放置した。その後 550 nm における吸光度を測定し、NaNO₂ を標準物質として nitrite を定量した。

【8】Oligo の *in vitro* 取り込み実験

(1) U937 細胞における取り込み実験

細胞を RPMI1640 培地で洗浄した後、24 穴プレートに 3.5×10^4 cells/well で播種した後、³²P もしくは ³⁵S で放射標識した Oligo 単独もしくはカチオン性リボソームとの複合体を添加した。細胞を一定時間インキュベートした後、氷冷した phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、0.1% Triton X-100 含有 0.3 M NaOH 水溶液で細胞を可溶化した。その溶液を回収し放射活性を測定し、さらに、Bradford 法 (129) によりタンパク量を測定して細胞単位タンパク量当たりの取り込み量を求めた。

(2) マウス腹腔マクロファージにおける取り込み実験

常在性マウス腹腔マクロファージを RPMI1640 培地で洗浄した後、³⁵S で放射標識した Oligo を添加した。細胞を一定時間インキュベートした後、氷冷した phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、0.1% Triton X-100 含有 0.3 M NaOH 水溶液で細胞を可溶化した。その溶液を回収し放射活性を測定し、さらに、Bradford 法によりタンパク量を測定して細胞単位タンパク量当たりの取り込み量を求めた。

【9】 Oligo の細胞内動態

細胞を RPMI1640 培地もしくは HBSS で洗浄し、FITC 標識した Oligo 単独もしくはカチオン性リポソームとの複合体を添加した。細胞を一定時間インキュベートした後、氷冷した HBSS で洗浄し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 30 分間インキュベートして固定した。核を染色する際には固定した細胞をさらに 15 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (type 1-A, Sigma 社) で 37°C、20 分間処理し、さらに 0.5 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (Sigma 社) で 20 分間処理することにより行った (130)。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (ACAS 570, Meridian 社) により行った。

【10】 放射標識体の定量 (放射活性の測定)

^{32}P ならびに ^{35}S 放射活性の測定は、各サンプルを HCl で中和後、液体シンチレーション用メディアウム (Clear-Sol I, ナカライテスク社) を 5 ml 加えて液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C, Beckman 社) で測定した。

第III章 実験の部

【1】 モデル pDNA およびカチオン性リポソーム

firefly luciferase 発現ベクター pCMV-Luc は、pGL3-control ベクターから切り出した cDNA フラグメントを、pcDNA3 ベクター (Invitrogen 社) のマルチクローニングサイト (*Hind III*/*Xba I* サイト) に挿入することにより作成した。pDNA は、大腸菌 *DH5 α* に transform した後、2 \times YT 培地中で増殖させ、pDNA 精製キット QIAGEN Plasmid Giga Kit と EndoFree Plasmid Buffer Set (ともに QIAGEN 社) により抽出・精製を行った。pDNA は、endotoxin-free の生理食塩水に 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で溶解させ凍結保存した。精製した pDNA 中のエンドトキシン量は *Limulus ameobocyte lysate assay* によって確認したところ、0.022 ng/ μg pDNA 以下であった。*in vitro* 細胞取り込み実験、*in vivo* 分布実験に際しては、pDNA をニックトランスレーション法により ^{32}P 標識したものを用いた。共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態の検討においては、FastTag FL labeling kit (Vector Laboratories 社) により fluorescein を導入した蛍光標識体を用いた。カチオン性リポソームとしては Lipofectin® (GIBCO-BRL 社) を用いた。

【2】 細胞の単離と培養

(1) 常在性マウス腹腔マクロファージ

第II章【3】(2)と同様の方法で行った。

(2) Chinese Hamster Ovary (CHO) と CHO(SRA) 細胞

CHO 細胞は大日本製薬より購入した。10% FBS を添加した Ham's F-12 培地 (日水製薬株式会社) で培養した。クラス A スカベンジャーレセプター安定発現細胞株 CHO(SRA) 細胞は、大阪大学大学院薬学研究科土井健史教授より供与して頂いたものを用い、CHO 細胞と同様にして培養した。

(3) クラス A スカベンジャーレセプター欠損マウス由来常在性腹腔マクロファージ

クラス A スカベンジャーレセプター欠損マウスは中外製薬創薬資源研鈴木宏志氏、東京大学児玉龍彦教授らによって作成されたもの (109) を供与して頂き実験に用いた。常在性マウス腹腔マクロファージの単離は【2】(1)と同様の方法で行った。

【3】 スカベンジャーレセプターの機能確認

CHO(SRA) 細胞とスカベンジャーレセプター欠損マウスより採取したマクロファージにおけるスカベンジャーレセプターの機能は、1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI) で蛍光標識したアセチル化 LDL (Ac-LDL) の細胞取り込みを第I章【9】と同様

の方法で観察することにより行った。

【4】 pDNA の *in vitro* 取り込み実験
第 I 章【8】と同様の方法で行った。

【5】 pDNA の細胞内動態
第 I 章【9】と同様の方法で行った。

【6】 pDNA のスカベンジャーレセプター欠損マウスにおける *in vivo* 分布実験
pentobarbital (30 mg/kg) で麻酔したマウスに、1 mg/kg の投与量で ³²P 標識した pDNA を尾静脈内に投与後、経時的に頸静脈より採血した。投与 10 分後大静脈より採血し、屠殺して肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、脳を摘出した。臓器重量を測定後 Soluene-350 (Packard 社) により可溶化し、2N-HCl で中和後、放射活性を測定した。

【7】 pDNA によるマクロファージの活性化実験
マクロファージの培地中にプラスミド DNA を添加し、48 時間培養した後回収し遠心した上清をサンプルとして各種炎症メディエーターの測定を行った。

【8】 各種炎症メディエーターの測定
(1) nitrite の定量
第 II 章【7】と同様の方法で行った。

(2) IFN 活性の定量
培養上清中の IFN 活性は渡部らの方法 (131, 132) に従い、以下のような bioassay により行った。1 日目に 96 穴プレートにマウス繊維芽細胞 L 細胞を 3×10^5 cells ずつ播く。2 日目にサンプルを L 細胞に添加する。3 日目にその L 細胞を水泡性口内炎ウイルス (VSV) を感染させる。4 日目にウイルスによる細胞変性効果を観察し、生細胞をクリスタルバイオレットで染色する。次に対照 IFN による効果と比較することにより国際単位 (IU) を算出する。

(3) TNF- α の定量
培養上清中の TNF- α は、ELISA キット (Factor-Test-X™, Genzyme 社) を用いて添付プロトコールに従って測定した。

【9】 遺伝子発現の測定

細胞を PBS で洗浄後セルスクレイパーで剥がして回収した。次に、37°C の湯浴および液体窒素に交互に浸すことにより計 4 回凍結・融解を繰り返した。遠心操作 (14,000 rpm、10 分) の後、上清の内 10 μ l をルシフェラーゼ発光基質溶液 (ピッカ・ジーン、東洋インキ) 100 μ l と混合し、直ちにルミノメーター (Lumat LB 9507、EG & G Berthold Japan 社) にて 10 秒間の累積発光量 (relative light unit: RLU) を測定した。

【10】 放射標識体の定量 (放射活性の測定)
第 II 章【10】と同様の方法で行った。

引用文献

- 1) 瀬崎 仁編、薬物送達法、医薬品の開発第 13 巻、廣川書店、1989.
- 2) 橋田 充、最新生物薬剤学 (粟津荘司、小泉 保編)、南江堂、1991、pp. 187.
- 3) 大柳善彦、SOD と活性酸素調節剤、日本医学館、1989.
- 4) P. S. Pyatak, A. Abuchowski and F. F. Davis, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **29**: 113 (1980).
- 5) B. Odline, L.-E. Appelgren, A. Baytai and M. Wolgast, *Pharmacol. Toxicol.* **62**: 95 (1988).
- 6) J. S. Beckman, R. L. Minor, C. W. White, J. E. Repine, G. M. Rosen and B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.* **263**: 6884 (1988).
- 7) C. O. Beauchamp, S. L. Gonias, D. P. Menapace and S. V. Pizzo, *Anal. Biochem.* **131**: 25 (1983).
- 8) F. M. Veronese, E. Boccù, O. Schiavon and G. P. Velo, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**: 757 (1983).
- 9) A. Conforti, L. Franco, R. Milanio and G. P. Velo, *Pharmacol. Res. Commun.* **19**: 287 (1987).
- 10) B. A. Freeman, S. L. Young and J. D. Crapo, *J. Biol. Chem.* **258**: 12534 (1983).
- 11) P. Briscoe, I. Caniggia, A. Graves, B. Benson, L. Huang, A. K. Tanswell and B. A. Freeman, *Am. J. Physiol.* **268**: L374 (1995).
- 12) A. M. Michelson, K. Puget, B. Perdereau and C. Barbaroux, *Mol. Physiol.* **1**: 71 (1981).
- 13) A. M. Michelson, K. Puget and P. Durosay, *Mol. Physiol.* **1**: 85 (1981).
- 14) A. M. Michelson and K. Puget, *Free Rad. Res. Commun.* **2**: 43 (1986).
- 15) Y. Ando, M. Inoue, S. Araki and Y. Morino, *Biochim. Biophys. Acta* **1073**: 374 (1991).
- 16) M. Inoue, I. Ebashi, N. Watanabe and Y. Morino, *Biochemistry* **28**: 6619 (1989).
- 17) N. Watanabe, M. Inoue and Y. Morino, *Biochem. Pharmacol.* **38**: 3477 (1989).
- 18) Y. Ando, M. Inoue, T. Utsumi, Y. Morino and S. Araki, *FEBS Lett.* **240**: 216 (1988).
- 19) R. Igarashi, J. Hoshino, A. Ochiai, Y. Morizawa and Y. Mizushima, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1672 (1994).
- 20) Y. Hori, J. Hoshino, C. Yanazaki, T. Sekiguchi, S. Miyauchi, S. Mizuno and K. Horie, *Jpn. J. Pharmacol.* **74**: 99 (1997).
- 21) M. Yunoki, M. Kawauchi, N. Ukita, Y. Noguchi, S. Nishio, Y. Ono, S. Asari, T. Ohmoto, M. Asanuma and N. Ogawa, *J. Neurotrauma* **14**: 739 (1997).
- 22) T. Fujita, M. Nishikawa, C. Tamaki, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 971 (1992).
- 23) T. Fujita, H. Furitsu, M. Nishikawa, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 191 (1992).
- 24) Y. Takakura, K. Mihara and M. Hashida, *J. Controlled Rel.* **28**: 111 (1994).
- 25) K. Mihara, K. Sawai, Y. Takakura and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 296 (1994).
- 26) K. Mihara, Y. Oka, K. Sawai, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Drug Targeting* **2**: 317 (1994).
- 27) Y. Takakura, S. Masuda, H. Tokuda, M. Nishikawa and M. Hashida, *Biochem. Pharmacol.* **47**: 853 (1994).
- 28) B. M. Babior, *J. Clin. Invest.* **73**: 599 (1984).
- 29) R. M. Smith and J. T. Curnutte, *Blood* **77**: 673 (1991).
- 30) S. Umeki, *Ann. Hematol.* **68**: 267 (1994).
- 31) T. Takagi, M. Kitano, S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura and M. Hashida, *Biochim. Biophys. Acta* **1335**: 91 (1997).
- 32) E. K. Hodgson and I. Fridovich, *Biochemistry* **14**: 5294 (1975).
- 33) J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **244**: 6049 (1969).
- 34) D. Hnatowich, W. W. Layne and R. Childs, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **12**: 327 (1982).
- 35) M. Monsigny, A. C. Roche and P. Midoux, *Biol. Cell.* **51**: 187 (1984).
- 36) J. T. Curnutte, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **67**: S2 (1993).
- 37) C. L. Ramos, S. Pou, B. E. Britigan, M. S. Cohen and G. M. Rosen, *J. Biol. Chem.* **267**: 8307 (1992).
- 38) B. Y. Yu, *Physiol. Rev.* **74**: 139 (1994).
- 39) X. Shi, A. Lenhart and Y. Mao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1515 (1994).
- 40) P. D. Stahl, P. H. Schlesinger, E. Sigardson, J. S. Rodman and Y. C. Lee, *Cell* **19**: 207 (1980).
- 41) K. Nishida, K. Mihara, T. Takino, S. Nakane, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **8**: 437 (1991).
- 42) W. M. Pardridge, D. Triguero and J. Buciak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**: 821 (1989).
- 43) T. Fujita, Y. Takakura, H. Sezaki and M. Hashida, *Pharm. Sci.* **1**: 371 (1995).
- 44) M. R. Bishop, P. L. Iversen, E. Bayever, J. G. Sharp, T. C. Greiner, B. L. Copple, R. Ruddon, G. Zon, M. Arneson, J. O. Armitage and A. Kessinger, *J. Clin. Oncol.* **14**: 1320 (1996).
- 45) A. Webb, D. Cunningham, F. Cotter, P. A. Clarke, F. D. Stefano, P. Ross, M. Corbo and Z. Dziewanowska, *Lancet* **349**: 1137 (1997).
- 46) E. G. Hanania, J. Kavanagh, G. Hortobagyi, R. E. Giles, R. Champlin and A. B. Deisseroth, *Am. J. Med.* **99**: 537 (1995).
- 47) S. T. Crooke, In: *Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery*, pp. 297, eds.: V. H. L. Lee, M. Hashida and Y. Mizushima, Harwood Academic Publishers, Chur (1995).
- 48) S. Agrawal, *Trends Biotechnol.* **14**: 376 (1996).
- 49) T. Miyao, Y. Takakura, T. Akiyama, F. Yoneda, H. Sezaki and M. Hashida, *Antisense Res. Dev.* **5**: 115 (1995).
- 50) K. Sawai, T. Miyao, Y. Takakura and M. Hashida, *Antisense Res. Dev.* **5**: 279 (1995).

- 51) K. Sawai, R. I. Mahato, Y. Oka, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**: 284 (1996).
- 52) 徳永 徹編、マクロファージ実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1992.
- 53) T. Kanamaru, T. Takagi, Y. Takakura and M. Hashida, *J. Drug Targeting* **5**: 235 (1998).
- 54) J. D. MacMicking, C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q.-W. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen and J. S. Mudgett, *Cell* **81**: 641 (1995).
- 55) M. Einat, D. Resnitzky and A. Kimichi, *Nature* **313**: 597 (1985).
- 56) S. Moncada, R. M. J. Palmer and E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **43**: 109 (1991).
- 57) C. Nathan and Q.-w. Xie, *Cell* **78**: 915 (1994).
- 58) R. G. Knowles, M. Salter, S. L. Brooks and S. Moncada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**: 1042 (1990).
- 59) S. Liu, I. M. Adcock, R. W. Old, P. J. Barnes and T. W. Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 1208 (1993).
- 60) T. Akaike, Y. Noguchi, S. Ijiri, K. Setoguchi, M. Suga, Y. M. Zheng, B. Dietzschold and H. Maeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2448 (1996).
- 61) J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1620 (1990).
- 62) R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush and B. A. Freeman, *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 481 (1991).
- 63) R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush and B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.* **266**: 4244 (1991).
- 64) J. P. Crow and J. S. Freeman, *Adv. Exp. Med. Biol.* **387**: 147 (1996).
- 65) J. B. Hibbs, R. R. Taintor and Z. Vavrin, *Science* **235**: 473 (1987).
- 66) R. G. Knowles, M. Palacios, R. M. Palmer and S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 5159 (1989).
- 67) R. M. Palmer and S. Moncada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 348 (1989).
- 68) P. Yaswen, M. R. Stampfer, K. Ghosh and J. S. Cohen, *Antisense Res. Dev.* **3**: 67 (1993).
- 69) T. L. Burgess, E. F. Fisher, S. L. Ross, J. V. Bready, Y.-X. Qian, L. A. Bayewitch, A. M. Cohen, C. J. Herrera, S. S.-F. Hu, T. B. Kramer, F. D. Lott, F. H. Martin, G. F. Pierce, L. Simonet and C. L. Farrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4051 (1995).
- 70) A. M. Krieg, A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman, *Nature* **374**: 546 (1995).
- 71) K. J. Stacey, M. J. Sweet and D. A. Hume, *J. Immunol.* **157**: 2116 (1996).
- 72) T. Sparwasser, T. Miethke, G. Lipford, K. Borschert, H. Häcker, K. Heeg and H. Wagner, *Nature* **386**: 336 (1997).
- 73) T. Sparwasser, T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Häcker, K. Heeg and H. Wagner, *Eur. J.*

- Immunol.* **27**: 1671 (1997).
- 74) G. B. Lipford, T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E.-S. Koch, K. Heeg and H. Wagner, *Eur. J. Immunol.* **27**: 3420 (1997).
- 75) A.-K. Yi, R. Tuetken, T. Redford, M. Waldschmidt, J. Kirsch and A. M. Krieg, *J. Immunol.* **160**: 4755 (1998).
- 76) C. F. Bennett, M.-Y. Chiang, H. Chan, J. E. Shomaker and C. K. Mirabelli, *Mol. Pharmacol.* **41**: 1023 (1992).
- 77) O. Zelphati and F. C. Szoka, Jr., *Pharm. Res.* **13**: 1367 (1996).
- 78) O. Zelphati and F. C. Szoka, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 11493 (1996).
- 79) F. C. Szoka, Y. H. Xu and O. Zelphati, *Advanced Drug Delivery Rev.* **24**: 291 (1997).
- 80) E. G. Marcusson, B. Bhat, M. Manoharan, C. F. Bennett and N. M. Dean, *Nucleic Acids Res.* **26**: 2016 (1998).
- 81) M. F. Taylor, J. D. Paulauskis, D. D. Weller and L. Kobzik, *Cytokine* **9**: 672 (1997).
- 82) Y. Shoji, M. Norimatsu, J. Shimada and Y. Mizushima, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**: 255 (1998).
- 83) P. L. Felgner, Y. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northop, G. M. Ringold and M. Danielson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 7413 (1987).
- 84) R. Leventis and J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta.* **1023**: 124 (1990).
- 85) X. Gao and L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 280 (1991).
- 86) C.-Y. Wang and L. Huang, *Biochemistry* **28**: 9508 (1989).
- 87) J.-Y. Legendre and F. C. Szoka, *Pharm. Res.* **9**: 1235 (1992).
- 88) C.-Y. Wang and L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 7851 (1987).
- 89) H. Mizuguchi, T. Nakagawa, M. Nakanishi, S. Imazu, S. Nakagawa and T. Mayumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 402 (1996).
- 90) Y. Saeki, N. Matsumoto, Y. Nakano, M. Mori, K. Awai and Y. Kaneda, *Hum. Gene Ther.* **8**: 2133 (1997).
- 91) J. G. Duguid, C. Li, M. Shi, M. J. Logan, H. Alila, A. Rolland, E. Tomlinson, J. T. Sparrow and L. C. Smith, *Biophys. J.* **74**: 2802 (1998).
- 92) G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **263**: 14621 (1988).
- 93) J. C. Perales, T. Ferkol, H. Beegan, O. D. Ratnoff and R. W. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 4086 (1994).
- 94) M. Hashida, S. Takemura, M. Nishikawa and Y. Takakura, *J. Control. Release* **53**: 301 (1998).
- 95) J. Haensler and F. C. Szoka, Jr. *Bioconj. Chem.* **4**: 372 (1993).
- 96) J. F. Kukowsa-Latillo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia and J. R. Baker, Jr. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 4897 (1996).
- 97) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7297 (1995).
- 98) K. Kawabata, Y. Takakura and M. Hashida, *Pharm. Res.* **12**: 825 (1995).
- 99) M. Yoshida, R. I. Mahato, K. Kawabata, Y. Takakura and M. Hashida, *Pharm. Res.* **13**: 599 (1996).
- 100) D. S. Pisetsky, *J. Immunol.* **156**: 421 (1996).
- 101) J. P. Messina, G. S. Gilkeson and D. A. Pisetsky, *J. Immunol.* **147**: (1991).
- 102) J. H. Chace, N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg and J. S. Cowdery, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **84**: 185 (1997).
- 103) A. P. Bird, *Trends Genet.* **3**: 342 (1987).
- 104) T. Takagi, M. Hashiguchi, R. I. Mahato, H. Tokuda, Y. Takakura and M. Hashida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**: 729 (1998).
- 105) Y. Takakura, T. Takagi, M. Hashiguchi, M. Nishikawa, F. Yamashita, T. Doi, T. Imanishi, H. Suzuki, T. Kodama and M. Hashida, *Pharm. Res.* in press.
- 106) L. Cheng, P. R. Ziegelhoffer and N. S. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 4455 (1993).
- 107) I. Fraser, D. Hughes and S. Gordon, *Nature* **364**: 343 (1993).
- 108) I. Shechter, A. M. Fogelman, M. E. Haberland, J. Seager, M. Hokom and P. A. Edwards, *J. Lipid Res.* **22**: 63 (1981).
- 109) H. Suzuki, Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki, Y. Yakashima, Y. Kawabe, O. Cynshi, Y. Wada, M. Honda, H. Kurihara, H. Aburatani, T. Doi, A. Matsumoto, S. Azuma, T. Noda, Y. Toyoda, H. Itakura, Y. Yazaki, S. Horiuchi, K. Takahashi, J. K. Kruijt, T. J. C. van Berkel, U. P. Steinbrecher, S. Ishibashi, N. Maeda, S. Gordon and T. Kodama, *Nature* **386**: 292 (1997).
- 110) 稲葉寿守、山田信博、血管と内皮 7 pp. 260 (1997).
- 111) L. Benimetskaya, J.D. Loike, Z. Khaled, G. Loike, S.C. Silverstein, L. Cao, J.E. Khoury, T.-Q. Cai and C.A. Stein, *Nature Med.* **3**: 414 (1997).
- 112) L. Zardi, A. Siri, B. Carnemolla, L. Santi, W. D. Gardner and S. O. Hoch, *Cell* **18**: 649 (1979).
- 113) H. Pande, J. Calaycay, D. Hawke, C. M. Ben-Avram and J. E. Shively, *J. Biol. Chem.* **260**: 2301 (1985).
- 114) G. K. McMaster and L. Zardi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 609 (1982).
- 115) M. Hayashi and K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **257**: 5263 (1982).
- 116) S. O. Hoch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**: 1353 (1982).
- 117) J. Calaycay, H. Pande, T. Lee, L. Borsi, A. Siri, J. E. Shively and L. Zardi, *J. Biol. Chem.* **260**: 12136 (1985).

- 118) K. Skorstengaard, M. S. Jensen, T. E. Petersen and S. Magnusson, *Eur. J. Biochem.* **154**: 15 (1986).
- 119) G. B. Lipford, T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E.-S. Koch, K. Heeg and H. Wagner, *Eur. J. Immunol.* **27**: 3420 (1997).
- 120) W. M. Pardridge, A. K. Kumagai and J. B. Eisenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 307 (1987).
- 121) Y. C. Lee, C. P. Stowell and M. J. Krantz, *Biochemistry* **15**: 3956 (1976).
- 122) A. F. S. A. Habeeb, *Anal. Biochem.* **14**: 328 (1966).
- 123) T. A. Scott and E. H. Melvin, *Anal. Chem.* **25**: 1565 (1953).
- 124) E. K. Hodgson and I. Fridovich, *Biochemistry* **14**: 5294 (1975).
- 125) D. Hnatowich, W. W. Layne and R. Childs, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **12**: 327 (1982).
- 126) M. Monsigny, A. C. Roche and P. Midoux, *Biol. Cell.* **51**: 187 (1984).
- 127) C.-S. Wong and R. L. Smith, *Anal. Biochem.* **63**: 414 (1975).
- 128) T. J. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65**: 55 (1983).
- 129) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**: 248 (1976).
- 130) A. D. Deitch, H. Law and R. D. White, *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 967 (1982).
- 131) Y. Watanabe, K. Kuribayashi, S. Miyatake, K. Nishihara, E. Nakayama, T. Taniyama and T. Sakata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 9456 (1989).
- 132) Y. Watanabe and Y. Kawade, In: *Lymphokines and Interferons: a Practical Approach*, pp. 1, ed.: M. J. Clemens, A. G. Morris and J. M. Gearing, Elsevier, Amsterdam (1987).