

—平成14年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

## 遺伝子デリバリーを目的とした細胞内生分解性 ナノスフェアの粒子設計

山本浩充

### 1. 緒言

遺伝子治療は、疾患を根本から治療する方法として期待を集め、研究、臨床応用がなされている。遺伝子の細胞内への導入には、ウィルスとその担体（ベクター）として用いる方法と、リポソームや高分子ナノ粒子など非ウィルスベクターを利用する方法がある<sup>1,2)</sup>。ウィルスベクターは非ウィルスベクターに比べ、細胞への遺伝子導入効率が高く、優れたベクターとして利用されてきた。しかしながら、1999年、米国での臨床試験においてウィルス性のショックによる死亡例が報告されて以来、安全性の高い非ウィルスベクターを用いた遺伝子治療システムの開発が望まれている。Panyamらは、数十nmに粒子径を制御した遺伝子封入ナノスフェアが *in vitro* において細胞膜を透過後、すばやくエンド・リソソーム分解経路を回避し、効率良く遺伝子発現すると報告している<sup>3)</sup>。このような非ウィルスベクターは、ウィルスベクターに比べ、免疫原性が低い、調製が簡単であるなどの利点がある反面、遺伝子発現効率が低いなどの欠点も指摘されている。

我々はこれまでに、高い生体適合性、生体内分解性を有するポリ乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）やキトサンなどを用いてナノ粒子を調製し、低分子の薬物をはじめ、ペプチドやタンパク等の高分子量の薬物も封入可能であることを報告してきた<sup>4)</sup>。

そこで本研究では、PLGA及びキトサンを基剤として用いた遺伝子封入ナノスフェアの調製法の確立及びDNAの保護・安定化効果について検討した。

### 2. 実験方法

**pDNA封入PLGAナノスフェアの調製（W/O/Wエマルジョン溶媒留去法）：**モデルプラスミドDNAとして用いたpCMV-Luciferase（pDNA）を溶解したトリス-EDTA緩衝液（pH8.0）を内相とし、PLGA（PLGA7520, WAKO）を溶解したクロロホルムと混和した。この溶液を、超音波処理（Sonifier, ブランソン社, Duty cycle 75%, Out put 2(40~50W), 10sec）し、w/oエマルジョンを得た。10%PVA

溶液2mLを加え、超音波処理（20sec）により二次乳化を行い、w/o/wエマルジョンを調製した。これを10%PVA溶液8mLに攪拌下（HEIDON, 600rpm）滴下し、その後3時間攪拌し、クロロホルムを留去した。精製水を加え、遠心分離（20,000rpm, 4℃, 10min）し、洗浄した。その後、精製水15mLに再分散し、24時間凍結乾燥（FD-81型、東京理化工業）した。

**pDNA封入キトサン微粒子キャリアーの調製（油中エマルジョン溶媒拡散法）：**キトサン（CTA-4, 片倉チッカリン）60mgを100mMのpH4.4酢酸緩衝液6mLに溶解した。これにTween80 100mgを溶解し、さらにエタノール5mLを加えポリマー相とした。2%HGCR含有トリエステル40mL中に攪拌下、ポリマー相を添加し、40℃にて3時間、減圧攪拌した。遠心分離（20,000rpm, 4℃, 10min）後、ヘキサンを添加し、ペレットを再懸濁し、粒子表面上の油を洗浄した。精製水15mLに再懸濁したものを、24時間凍結乾燥した。

**粒子物性の測定：**粒子径、ゼータ電位を、ゼータサイザー（3000HS<sub>A</sub>, MALVERN）により測定した。また、粒子の形状及び表面状態を走査型電子顕微鏡（JSM-T330, 日本電子）にて観察した。

**DNA分解酵素に対する保護作用評価法：**pDNA封入ナノスフェア10mgをトリス-EDTA緩衝液450μL中に懸濁させ、40μg/mLのDNase溶液を50μL添加し、37℃で15分間インキュベートした。インキュベート終了後、DNase阻害剤であるヨード酢酸を最終濃度が100mMとなるように添加し、反応を止めた。遠心エバポレーターにて蒸発乾固し、ナノスフェアを溶解した後、pDNAを抽出した。この溶液について、電気泳動法によりDNAを同定した。

### 3. 結果・考察

#### 1. pDNA封入高分子ナノスフェアの調製

**W/O/Wエマルジョン溶媒留去法によるPLGAナノスフェアの調製：**w/o/wエマルジョン溶媒留去法により製し

た pDNA 封入 PLGA ナノスフェアは、直径約 250nm の球形粒子であった。また、pDNA を処方したナノスフェアのゼータ電位は、pDNA を含んでいない粒子と同一であった。PLGA ナノスフェアから pDNA を抽出し、pDNA の封入状態について検討した。PLGA ナノスフェア懸濁液を遠心分離して得た上清 (Lane5,6) 中には pDNA が検出されなかったのに対し、PLGA ナノスフェアから pDNA を抽出した溶液からは pDNA が検出された (Lane8)。これらの結果より、pDNA は PLGA ナノスフェア表面上への吸着ではなく、粒子内に封入されていることが判明した。しかしながら、Lane8 のバンドが多少テーリングしていることから、pDNA が粒子調製段階で一部破壊されていることが考えられ、今後さらなる調製法の最適化検討が必要であると考えられた。

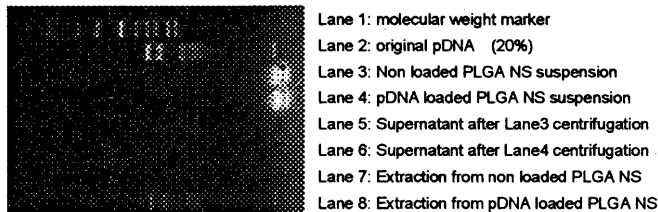


Fig. 1  
Agarose gel electrophoresis of pDNA extracted from various PLGA NS

油中溶媒拡散法によるキトサンナノスフェアの調製：油中溶媒拡散法により調製した pDNA 封入キトサンナノスフェアの粒子径は、調製時の攪拌速度に依存し、攪拌速度が速くなるほど粒子径は減少した (Table 1)。

Table 1 Particle size and zeta potential of pDNA loaded CS NP

	Agitate speed (rpm)	Particle size ( $\mu\text{m}$ )	Zeta potential (mV)
pDNA loaded CS NP	400	2.74	25.3
	800	1.12	23.7
	1200	0.96	26.9

また、キトサンナノスフェアでは、pDNA の構造が破壊されることなく、仕込んだ pDNA をほぼ全量封入できていることが明らかとなった。これは、基剤として用いたキトサンが、pDNA と静電的に相互作用し、粒子内にトラップできたためと考えられる。

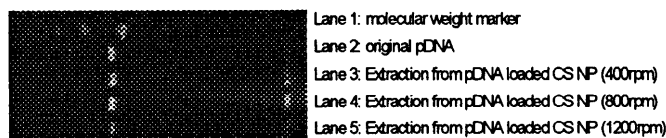


Fig. 2  
Agarose gel electrophoresis of pDNA extracted from various CS NP.

## 2. 高分子ナノスフェアに封入した pDNA の分解酵素に対する安定性

pDNA を高分子ナノスフェア内に封入することで

DNA 分解酵素から保護できるかを検討した。(Fig.3)。

pDNA 溶液を DNase と混合した場合、pDNA は分解し、バンドが認められなくなった (Lane5)。これに対し、pDNA を PLGA ナノスフェア内に封入することで DNase から保護することができた (Lane7)。これは、pDNA がナノスフェア内部に封入できているため、酵素との接触が抑えられたためと考えられる。キトサンナノスフェアにおいても同様に pDNA を粒子内に封入することによる、DNA 分解酵素からの保護作用が認められた。また、その保護作用には粒子径依存性はみられなかった。

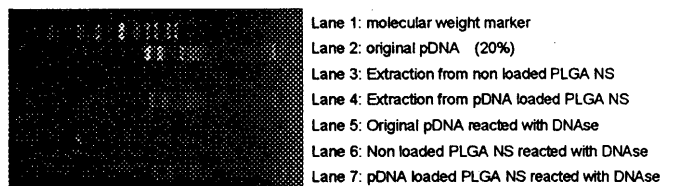


Fig. 3  
Agarose gel electrophoresis for assessment of pDNA integrity after DNase degradation. DNase conc.;  $4\mu\text{g/mL}$ , Incubation time; 15min.

## 4. 結論

微粒子基剤として生体内分解性、生体適合性に優れた PLGA、キトサンを用い、pDNA の微粒子製剤化検討を行った。pDNA 及び PLGA にエマルジョン溶媒留去法を、また pDNA 及びキトサンに油中溶媒拡散法を適用することで、球形の pDNA 封入ナノスフェアを調製することができた。キトサンを基剤として用いることで、pDNA との静電的相互作用により、効率よくナノスフェアを封入することができた。また、pDNA を高分子ナノスフェア内に封入することで DNA 分解酵素から保護することができた。今後さらなる検討を必要とするが、pDNA 封入ナノスフェアは遺伝子発現効率が高くまた安定な非ウイルスベクターの選択肢と成りうると期待される。

## 謝辞

pDNA の提供を受けた京都大学大学院薬学研究科橋田充教授に深謝いたします。

## 5. 引用文献

- 1) Nishikawa M., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, *25*, 275
- 2) D. Luo, K. Woodrow-Mumford, N. Belcheva, W.M. Saltzman, *Pharm. Res.*, **1999**, *16*, 1300
- 3) J. Panyam, W. Zhou, S. Prabha, S.K. Sahoo, V. Labhasetwar, *FASEB J.*, **2002**, *16*, 1217
- 4) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, T. Niwa, *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **1998**, *45*, 41