

2006年11月30日 日本薬物動態学会

糖修飾リポソームによる細胞選択的遺伝子ターゲティングシステムの開発

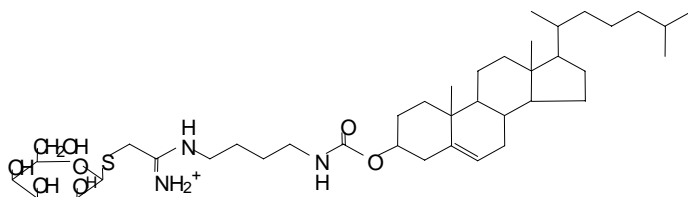
京都大学大学院薬学研究科
薬品動態制御学分野

川上 茂

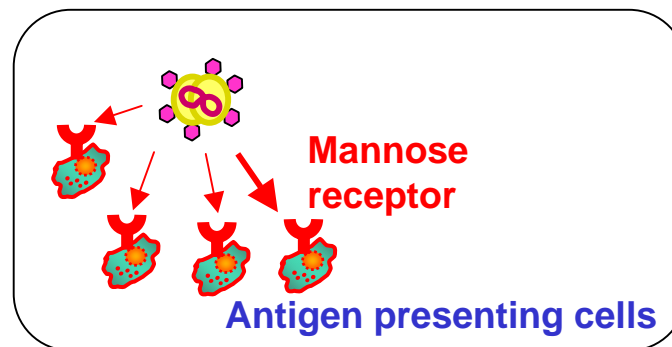
薬物ターゲティングに利用可能な受容体 (endosomotropic receptor)

標的部位・細胞	認識を受けるリガンド
肝臓	
実質細胞	アシアログリコプロテイン、インスリン、EGF、IgA重合体、LDL、HDL、トランスフェリン
Kupfer細胞	マンノース、フコース、フィブロネクチン、 α_2 -マクログロブリン、アセチル化LDL、Fc(免疫複合体)
血管内皮細胞	マンノース、ポリアニオン(Scavenger receptor)、Fcレセプター、硫酸化多糖、Fc(免疫複合体)
脳 (血管内皮細胞)	トランスフェリン、ポリアニオン、インスリン
肺 (肺胞マクロファージ)	マンノース
癌細胞	トランスフェリン、ガラクトース・フコース(一部)葉酸、LDL
線維芽細胞	トランスフェリン、EGF、グルコース-6リン酸
骨髄組織	アシアログリコプロテイン

マンノース修飾誘導体Man-C4-Cholとマンノース修飾リポソームのマクロファージへの取り込み



Cholesten-5-yloxy-N-{4-[(1-imino-2-D-thiomannosyl-ethyl)amino]butyl} formamide (Man-C4-Chol)



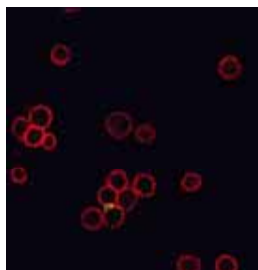
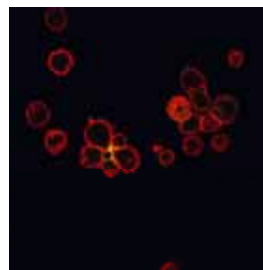
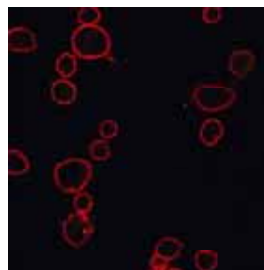
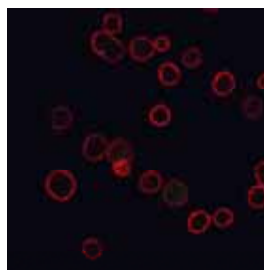
Bare-liposomes

Man-2.5-liposomes

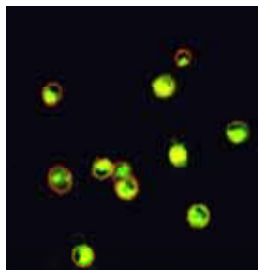
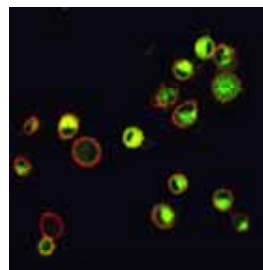
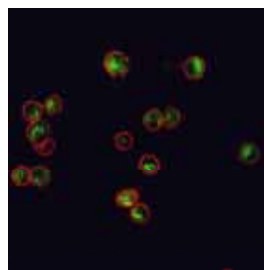
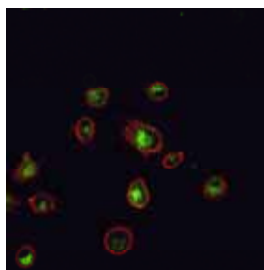
Man-5.0-liposomes

Man-7.5-liposomes

4°C



37°C



Liposomes were labeled with Fluorescein-PE (green),
Plasma membrane of alveolar macrophages was labeled with rhodamine-concanavalin A (red)

薬物動態学会 30PE-12
W. Yeeprae, S. Kawakami, M. Takenaga, R. Igarashi, F. Yamashita, M. Hashida:
“ Effect of mannose density on mannose receptor-mediated cellular uptake of mannose-modified liposomes by primary cultured alveolar macrophages ”

S. Kawakami, A. Sato, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida: Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannose-modified cationic liposomes, *Gene Therapy*, 7 (4), 292-299 (2000)

有効かつ安全な遺伝子ターゲティングシステムの開発

・体内・細胞内動態のターゲティングシステム

・キャリア側の要素

- ・リガンド修飾方法(糖密度)

- ・キャリア自身の安定性改善 (Gal-C4-Chol, Man-C4-Chol, Fuc-C4-Chol)

・複合体側の要素

- ・物理化学的性質(粒子径、電荷)の最適化

- ・イオン強度の最適化(SCR法)

・その他の要素

- ・投与経路の影響の評価

S. Kawakami *et al.*, *Gene Ther.* 7 (4), 292-299 (2000)

S. Fumoto *et al.*, *Mol. Ther.*, 10 (4), 719-729 (2004)

S. Kawakami *et al.*, *J. Gene Med.*, 7 (12) 1526-1533 (2005)etc.

・毒性の評価および制御

・キャリア側の要素

- ・キャリア自身の細胞毒性

・複合体側の要素

- ・複合体の免疫応答の評価(CpGモチーフ)、その制御法

- ・複合体の血液成分への影響の評価

S. Fumoto *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315 (2), 484-493 (2005)

S. Kawakami *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317 (3), 1382-1390 (2006) ...etc.

プラスミドDNA “DNAワクチンによる抗原特異的CTL誘導”

標的細胞：樹状細胞

キャリア：マンノース修飾リポソーム

デコイ型DNA “NFκBデコイによる転写抑制”

標的細胞：Kupffer細胞

キャリア：フコース(マンノース)修飾リポソーム

siRNA “siRNAによる遺伝子発現抑制”

標的細胞：肝実質細胞

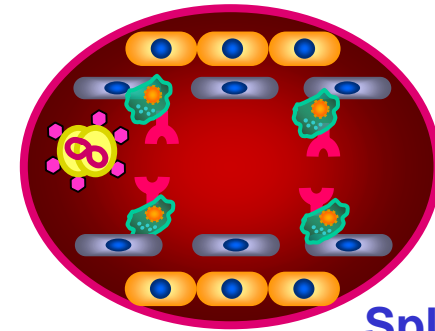
キャリア：ガラクトース修飾リポソーム

マンノース修飾カチオン性リポソームの腹腔内投与による抗原提示細胞への遺伝子導入

局所投与方法 (腹腔内、気道内、鼻腔内)

- ・血中と比べ蛋白成分が少ない
- ・直接免疫担当細胞へ到達可能
- ・複合体が滞留可能

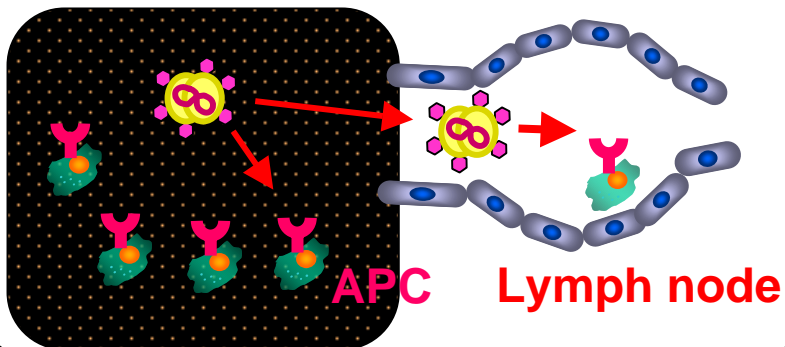
Intravenous administration



Spleen

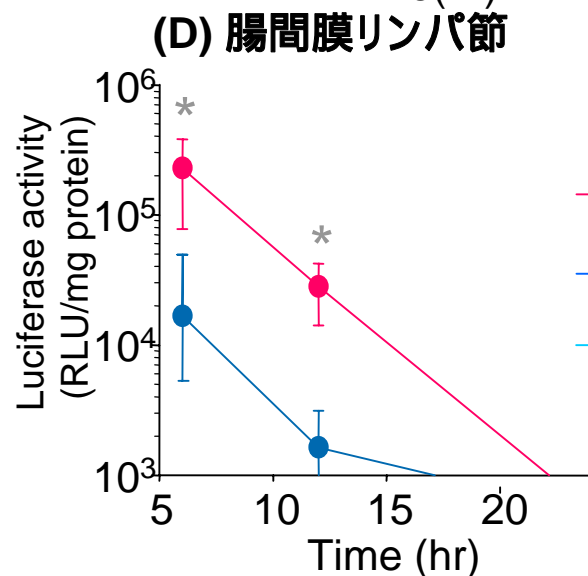
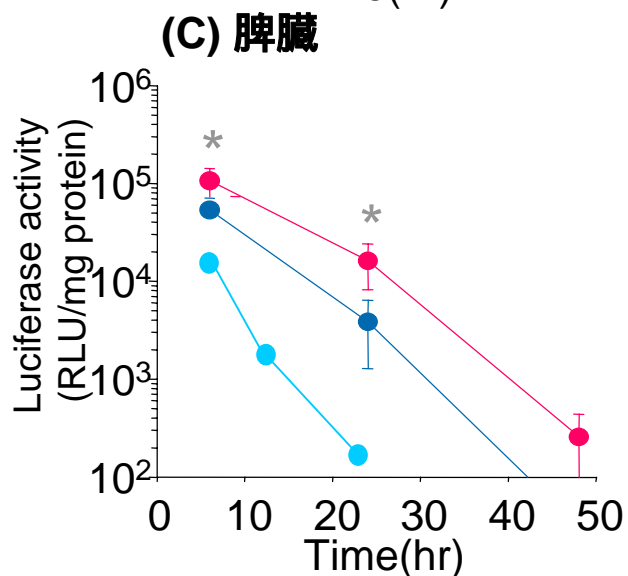
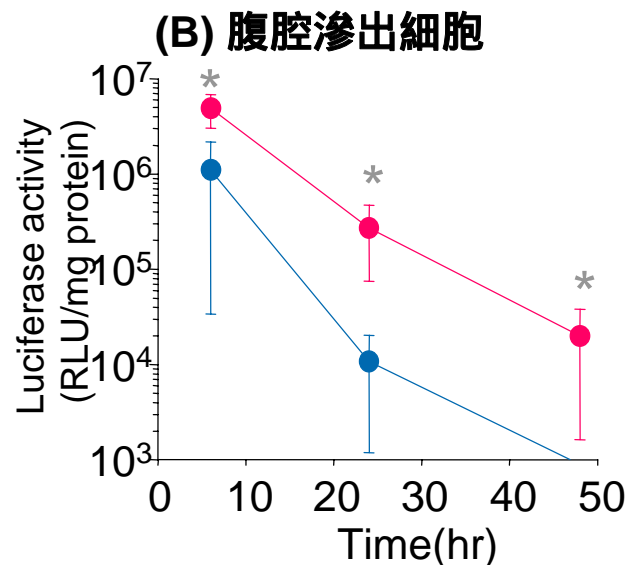
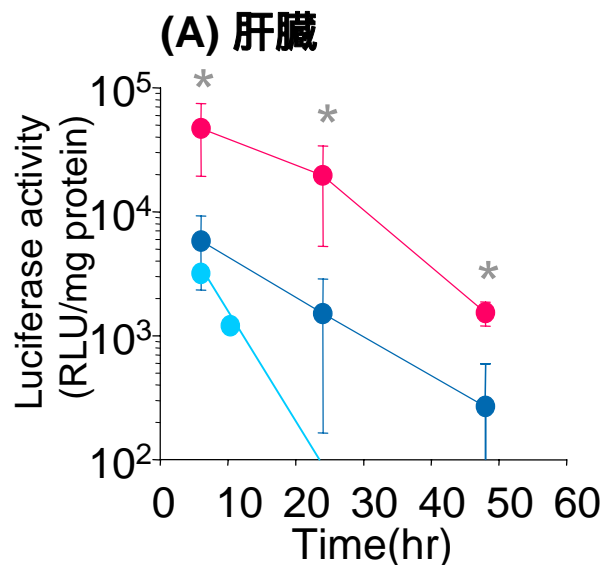
Y. Hattori, S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida: "Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 992-999 (2004)

Topical administration



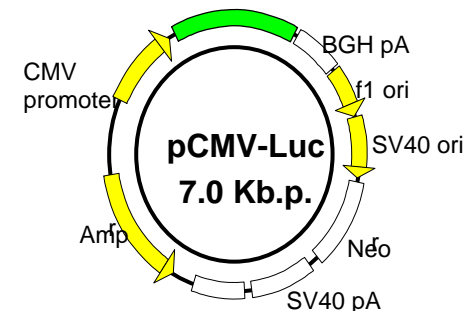
樹状細胞に対して、
効率的、長期的な遺伝子導入が可能

マンノース修飾カチオン性リポソームのマウス腹腔内投与後の遺伝子発現



pCMV-Luc

Firefly luciferase cDNA



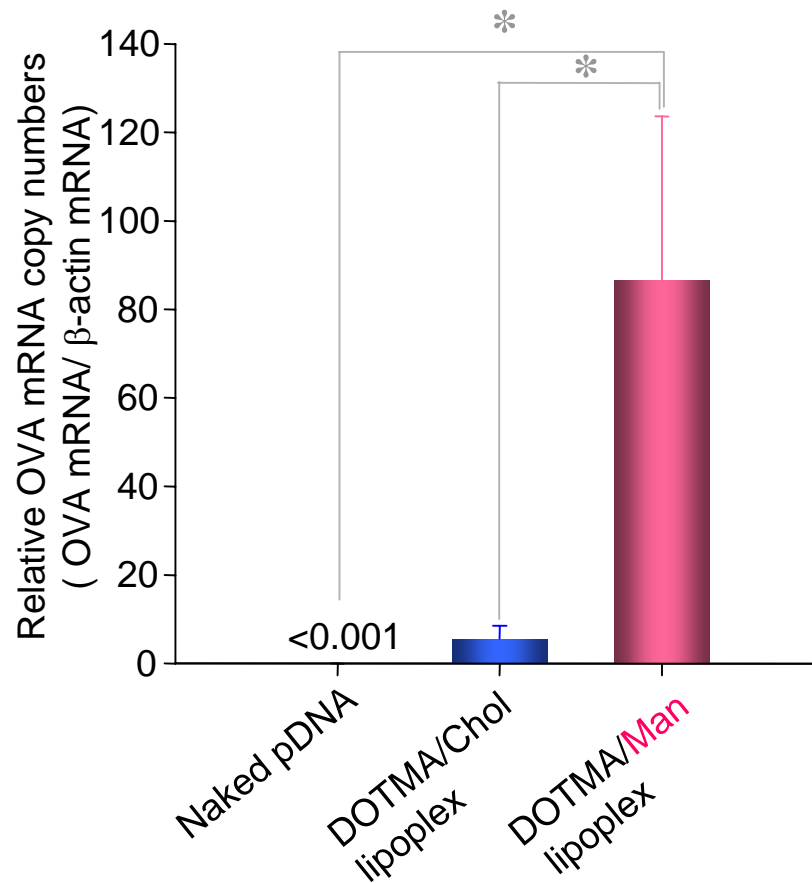
- DOTMA/Man lipoplex
- DOTMA lipoplex
- Man/DOPE lipoplex (i.v.)

*p<0.05

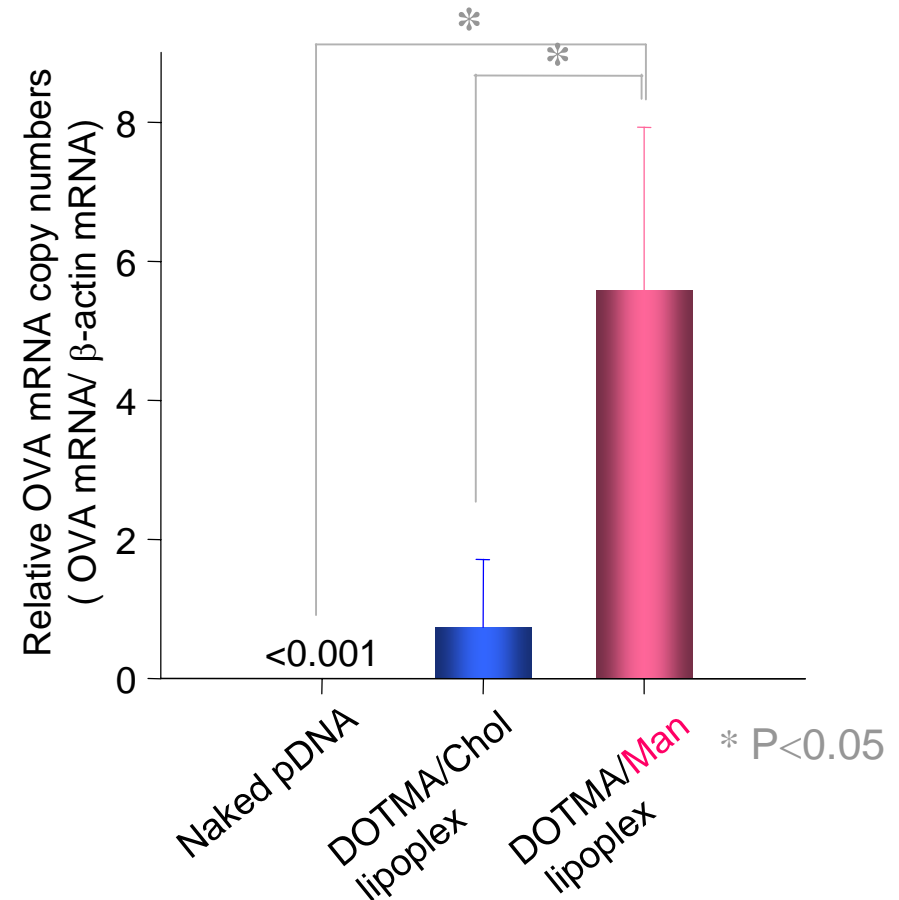
Y. Hattori S. Kawakami, K. Nakamura, F. Yamashita, and M. Hashida: Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by in vivo gene delivery with mannosylated lipoplex via intraperitoneal route, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(2):828-834 (2006).

腹腔内投与後の各臓器中の樹状細胞における遺伝子発現評価

a) 腹腔内のCD11c⁺ cells

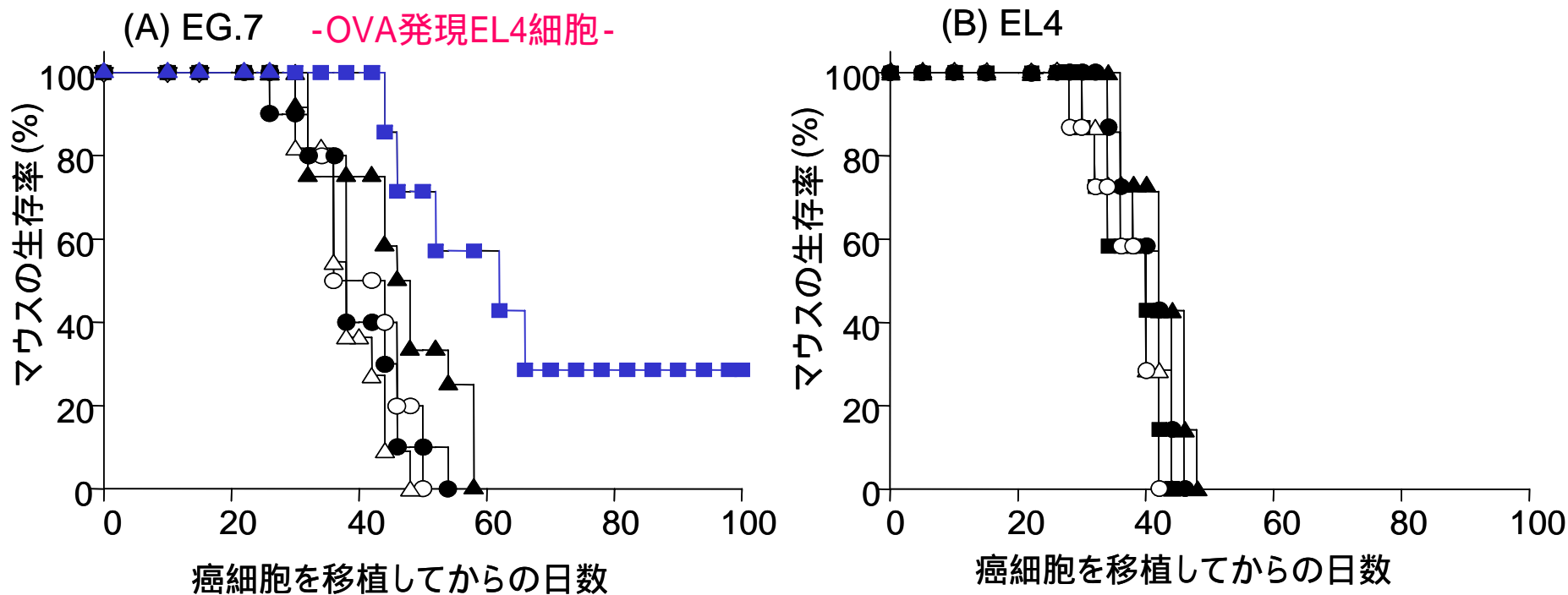


b) 脾臓中のCD11c⁺ cells



Y. Hattori, S. Kawakami, Y. Lu, K. Nakamura, F. Yamashita, M. Hashida: Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration, *J. Gene Med.*, 8 (7), 824-834 (2006).

マンノース修飾カチオン性リポソームの腹腔内投与による抗腫瘍効果



- () 未処置群
- () pCMV-OVA水溶液, 腹腔内投与
- () pCMV-OVA/カチオン性リポソーム複合体, 腹腔内投与
- () **pCMV-OVA/マンノース修飾リポソーム複合体, 腹腔内投与**
- () pCMV-OVA水溶液, 筋肉内投与

Y. Hattori, S. Kawakami, Y. Lu, K. Nakamura, F. Yamashita, M. Hashida: Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration, *J. Gene Med.*, 8 (7), 824-834 (2006).

デコイ型DNAによる転写制御とNFκBデコイ

デコイ型DNAによる転写制御

- (・転写因子と核酸の相互作用を利用)
- ・結合塩基配列でデコイのデザインが可能
- ・転写レベルでの抑制が可能

遺伝子治療・機能解析に有用

サイトカイン産生

TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, G-CFS, GM-CFS, IFN- γ , etc.

急性炎症関連タンパク質

Angiotensinogen, serum amyloid protein, complement etc.

接着分子

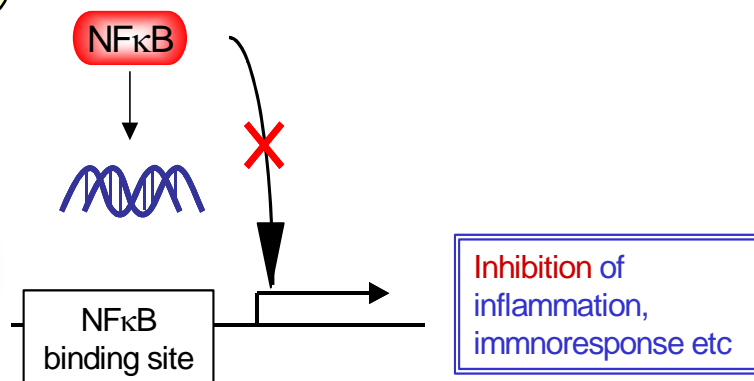
ICAM-1, VCAM-1, etc.

NFκB デコイ

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'

3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'

(Under line: NFκB binding site)



NFκBに関連する疾患

- ・ウイルス性肝炎・肝硬変・移植片拒絶
- ・がん転移・虚血再灌流障害
- ・リウマチ性疾患・腎炎
- ・アトピー性皮膚炎
- など。

フコース修飾リポソームを用いた静脈内投与によるNFκBデコイの肝非実質細胞選択的送達

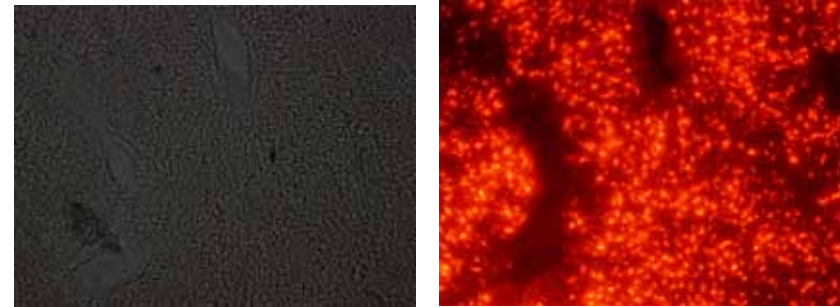
フコース修飾リポソーム



Kupffer細胞ターゲティング

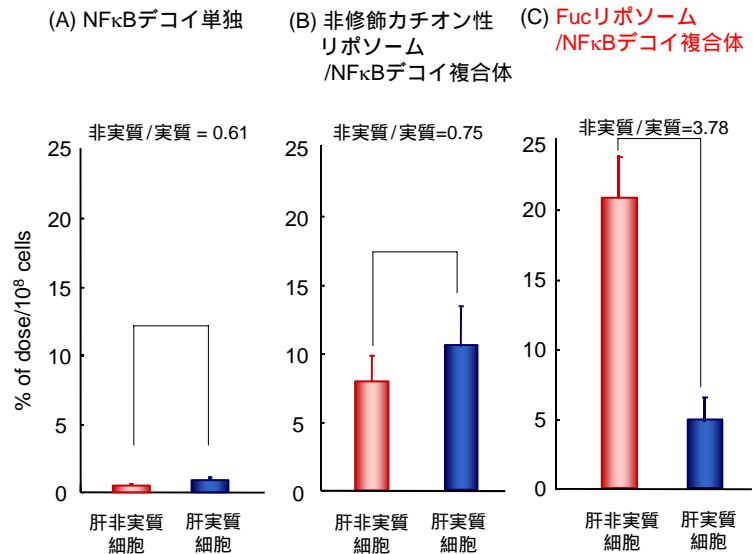
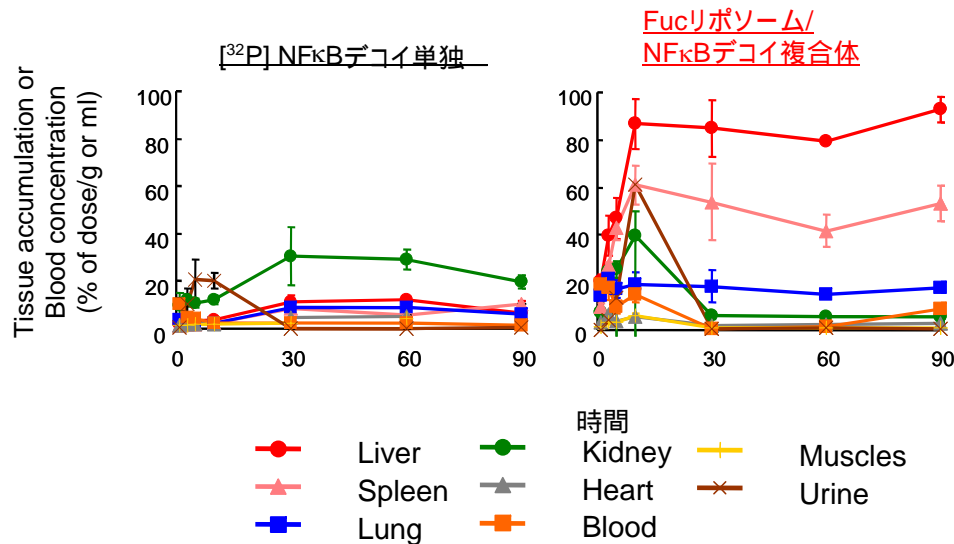
S. Kawakami, J. Wong, A. Sato, Y. Hattori, F. Yamashita, M. Hashida: "Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice" *Biochim Biophys Acta* 1524(2-3):258-265 (2000).

蛍光標識複合体の静脈内投与後の肝臓内分布



放射標識複合体の静脈内投与後の体内動態

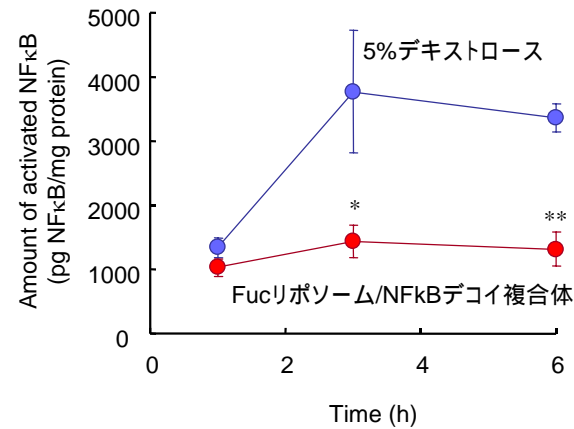
放射標識複合体の静脈内投与後の肝臓内分布



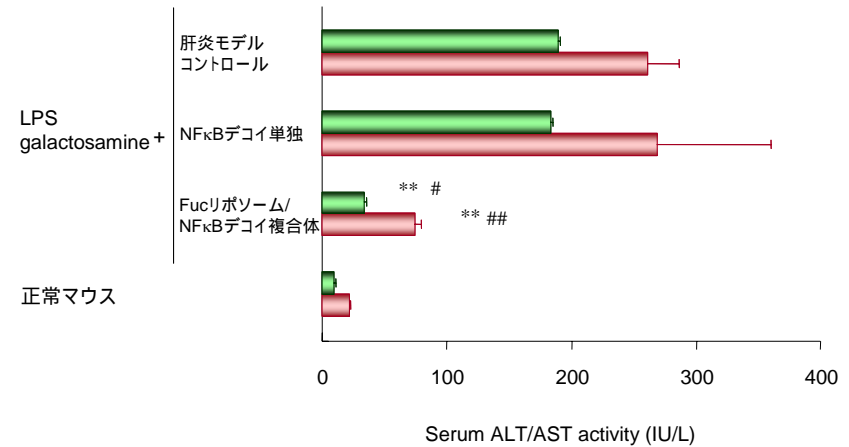
Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida. The potential role of fucosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease. *Biomaterials*, 28 (3), 532-539 (2007).

フコース修飾リポソームを用いたNFκBデコイの肝非実質細胞選択的送達による肝障害抑制

LPS誘発性肝炎におけるNFκB活性化抑制効果

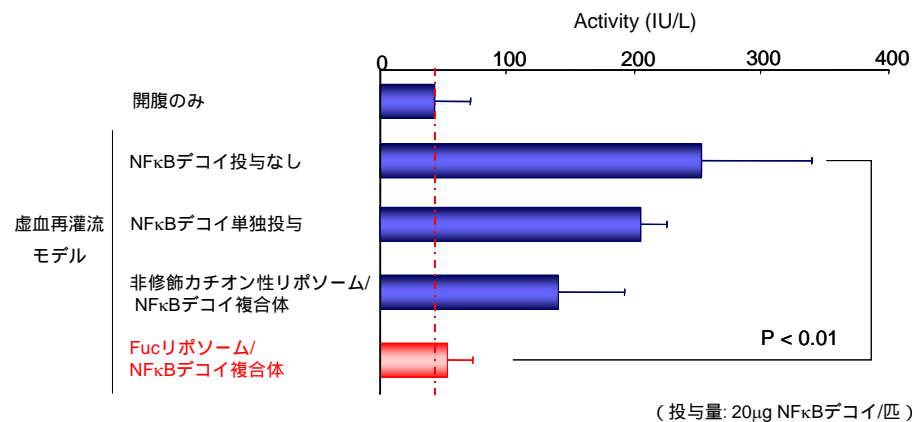


LPS,galactosamine誘発性肝炎抑制効果

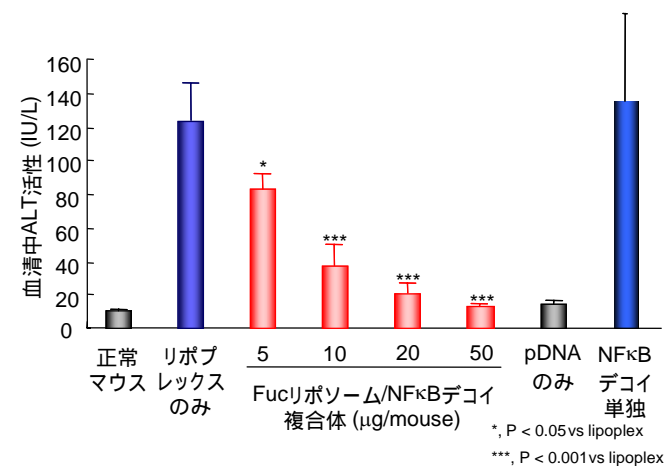


Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida. The potential role of fucosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease. *Biomaterials*, 28 (3), 532-539 (2007).

肝虚血再灌流傷害抑制効果



リポプレックス誘発性肝炎におけるNFκB活性化の関与



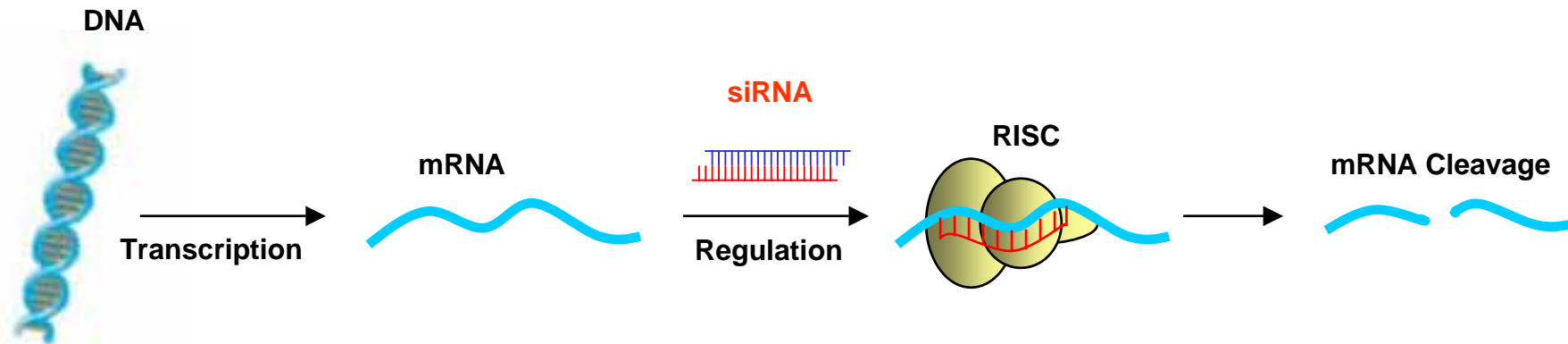
siRNAとその問題点

siRNA

- ・遺伝子配列に基づき論理的な種々のsiRNAデザインが可能
- ・種々の遺伝子発現の抑制が可能

遺伝子治療・機能解析に有用

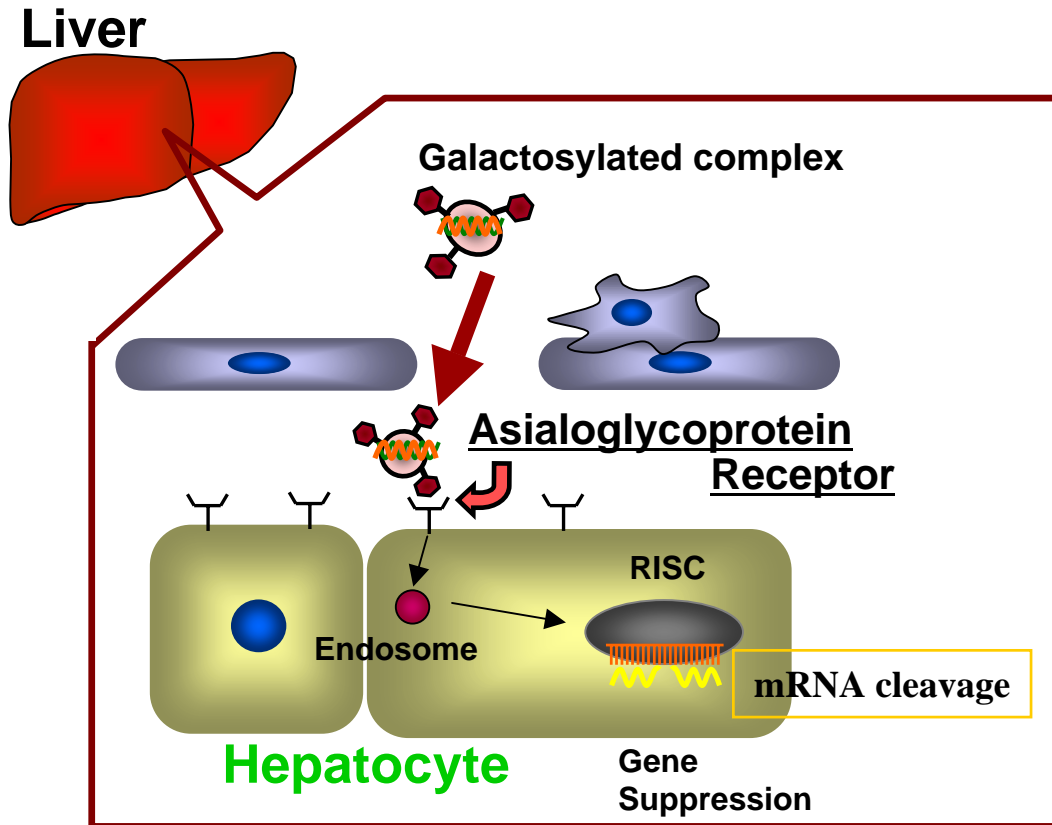
RNA interference (RNAi)



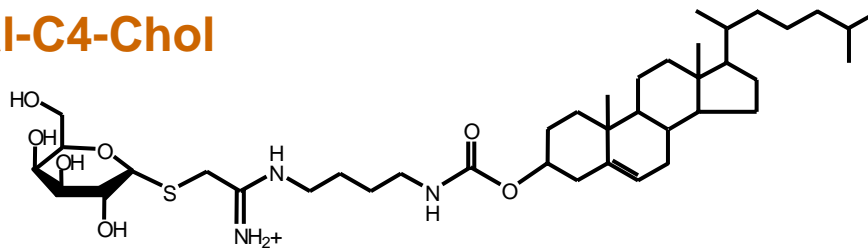
siRNAの*in vivo*デリバリーにおける問題点

- ・ヌクレアーゼによる分解
- ・低い細胞膜透過性

siRNAの肝実質細胞へのターゲティング



Gal-C4-Chol



静脈内投与による肝実質細胞へのターゲティング方法

・ハイドロダイナミクス法

大容量の溶液の急速投与による遺伝子導入法

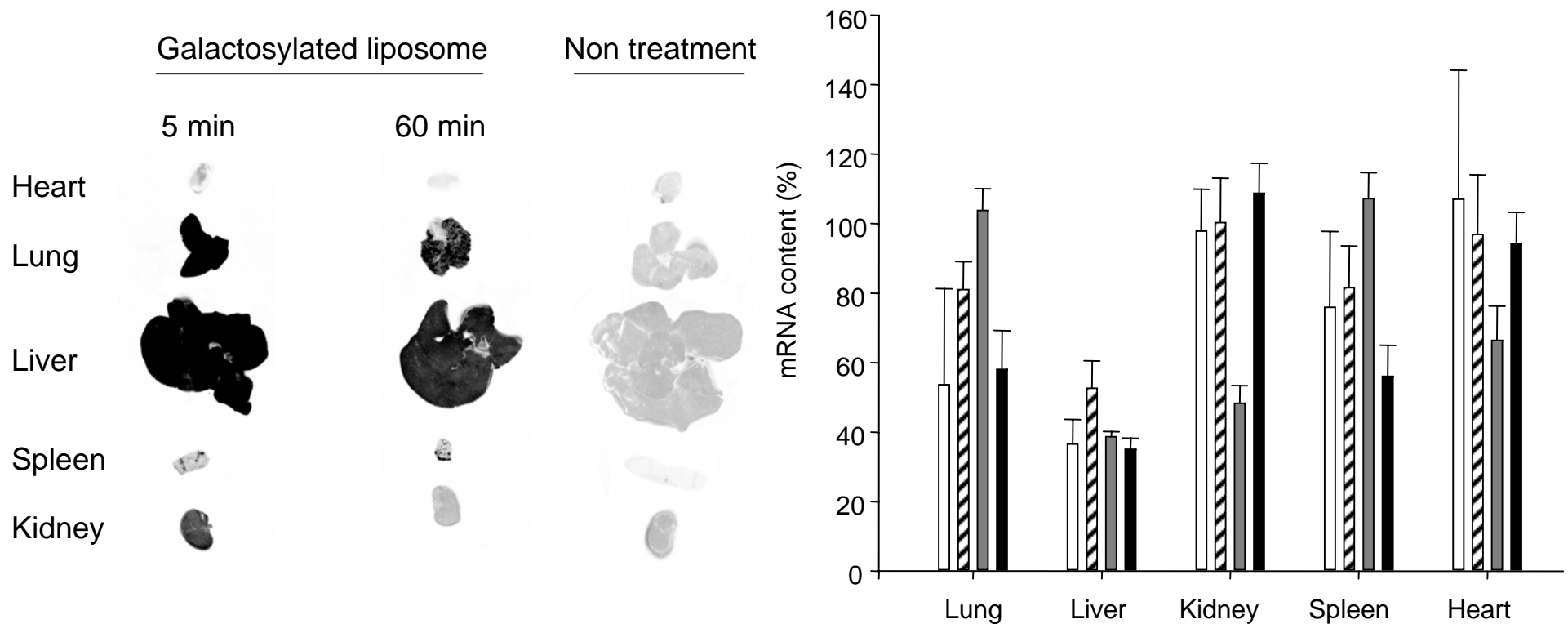
肝臓実質細胞

酵素、トランスポーター、
肝炎ウイルス感染等

↓
**ガラクトース修飾リポソームによる
肝実質細胞ターゲティング**

S. Kawakami, F. Yamashita, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida: Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252 (1), 78-83 (1998)

Ubc13-siRNA /ガラクトース修飾リポソームをマウス静脈内投与後の動態および遺伝子発現抑制効果



Ubc13-siRNA complexed with Gal-C4-Chol/DOPE liposomes (white bar), Gal-C4-Chol/cholesterol/DOPE liposomes (hatched bar), Gal-C4-Chol/EggPC liposomes (gray bar) or Gal-C4-Chol/DOPC liposomes (black bar)

A. Sato, M. Takagi, A. Shimamoto, S. Kawakami, M. Hashida: Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration with galactosylated cationic liposomes, *Biomaterials*, in press

謝 辞

京都大学大学院薬学研究科
薬品動態制御学分野

橋田 充教授

山下富義助教授

麓伸太郎

服部芳幸

樋口ゆり子

伊藤佳孝

重田耕佑

呂 言

Wassana Yeeprae

中村和美

前家理宏

岩井美栄子

岡 真千子

神谷勇輝

中西秀之

ゴ サン (敬称略)

京都大学大学院薬学研究科
病態情報薬学分野

西川元也助教授

ジーンケア研究所

嶋本 顕研究員

佐藤あゆみ研究員