

GAG とキトサンを用いたナノ粒子による遺伝子デリバリー

佐藤 智典

慶應義塾大学 理工学部

遺伝子の細胞内への導入技術は遺伝子治療のみならず再生医療においても重要になっている。実用性を高めるために、安全で効率の良い遺伝子のデリバリーシステムの開発が期待されている。キトサンは遺伝子デリバリーにおいて広く用いられている[1,2]。しかしながら、安定性や *in vivo* での発現効率が低い事が問題になっている。そこで、我々は、pDNA/キトサン複合体の表面をアニオン性の多糖であるグリコサミノグリカン(GAG)で被覆した複合体を作成し、物理化学的性質、細胞との相互作用、および *in vitro* および *in vivo* での遺伝子発現について検討した。

遺伝子/キトサン複合体[3,4]

平均分子量が40kDa程度のキトサンは遺伝子の細胞内へのデリバリーに適していた。血清存在下で高い遺伝子発現活性が観察され、グロビュール構造のナノ粒子が形成されていた。細胞との相互作用解析により、エンドサイトーシスの後、バッファリング効果によりエンドソームからリリースされ、また核への輸送が観察された。

遺伝子/キトサン/GAG三元複合体

遺伝子/キトサン複合体は正の電荷を有することから血清存在下で凝集が誘起された。また、*in vivo*での実験では遺伝子発現効率が低く、抗腫瘍効果が見られなかった。そこで、カチオン性の遺伝子/キトサン複合体をアニオン性のGAGで被覆した三元複合体を作製し、遺伝子デリバリーとしての性能の評価を行った。その結果、ヒアルロン酸HAやコンドロイチン硫酸CS[5,6]を用いた三元複合体では、高い遺伝子発現活性が観察された。物理化学的キャラクタリゼーションにより、ゼータ電位は約-30mV程度で、安定性に優れたグロビュール構造のナノ粒子が形成されていることが示された。さらに、細胞との相互作用機構の解析により、遺伝子/キトサン/

HA(CS)三元複合体は受容体を介してマクロピノサイトーシスで細胞内に取り込まれ、ライソゾームを回避して核内に移行することが示された。さらに、自殺遺伝子であるpTKを含んだ三元複合体を担癌マウスに投与したところ顕著な抗腫瘍効果が見られた。また、pTK/キトサン複合体では凍結乾燥により活性を失ってしまうが、三元複合体では凍結乾燥した後に一定期間保存しても、再溶解後に発現活性を保持していた。

以上の様に、キトサンとGAGを併用した遺伝子デリバリーシステムは安定性や遺伝子発現活性という点で非常に優れていた。

【引用文献】

- 1) Hashimoto, M. *et al.*, *Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery*, Springer, 63-74 (2005).
- 2) Hagiwara, K. *et al.*, *Current Drug Discovery Technologies*, **8**, 329-339 (2011).
- 3) Sato, T. *et al.*, *Biomaterials*, **22**, 2075-2080 (2001).
- 4) Ishii, T. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1514**, 51-64 (2001).
- 5) Hagiwara, K. *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 7251- 7260 (2012). 6) Hagiwara, K. *et al.*, *J. Gene Med.*, **15**, 83-92 (2013)