

博士論文

論文題目 筋組織への遺伝子導入による末梢神経損傷の治療と評価

氏名 長田 和也

要旨

本研究では当研究室で開発されたミセル型核酸キャリアを用いた筋肉への高効率な pDNA の導入法により筋萎縮軽減と神経伸長促進作用をもたらし、末梢神経損傷後の早期機能回復が得られることを示した。しかしながら DNA を用いた遺伝子治療では宿主ゲノムへの挿入変異により重篤な副作用をもたらす可能性がある。この課題を克服するため、宿主ゲノムに挿入されない mRNA を用いての遺伝子治療に取り組んだ。核酸として不安定とされる mRNA でも、ミセル化することで筋において 3 週間の遺伝子発現を得るとともに、末梢神経損傷後、pDNA を用いた場合よりも早期の機能回復を得た。本研究により、mRNA による筋肉をターゲットとした遺伝子治療の可能性を示した。

目次

1	高分子ミセルを用いた pDNA による坐骨神経損傷後の回復促進効果[1].....	6
1.1	序文	6
1.1.1	坐骨神経損傷	6
1.1.2	インスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor-1 IGF-1).....	7
1.1.3	治療用成長因子の導入法ータンパク投与と遺伝子投与ー	7
1.1.4	核酸キャリア	8
1.1.5	非ウイルス性キャリアにおける遺伝子発現の効率化	9
1.1.6	坐骨神経損傷への IGF-1 発現遺伝子導入による治療.....	11
1.2	方法	12
1.2.1	材料	12
1.2.2	動物	13
1.2.3	薬剤の調製	13
1.2.4	ハイドロダイナミクス法による下肢骨格筋への薬剤投与	14
1.2.5	坐骨神経圧挫モデルの作成	14
1.2.6	リアルタイム PCR.....	15
1.2.7	筋萎縮評価	16
1.2.8	運動機能評価	16
1.2.9	糖尿病モデル	17

1.2.10	知覚機能評価.....	17
1.3	結果.....	18
1.3.1	IGF-1 発現 pDNA による末梢神経圧挫後の筋萎縮軽減効果.....	18
1.3.2	運動機能の回復評価.....	22
1.3.3	知覚の回復評価.....	25
1.4	考察.....	26
2	高分子ミセルを用いた mRNA による坐骨神経損傷後の回復促進効果.....	30
2.1	序文.....	30
2.1.1	mRNA を用いた遺伝子治療への期待.....	30
2.1.2	遺伝子治療に mRNA を用いる際の課題と手法の開発意義.....	31
2.2	方法.....	32
2.2.1	材料.....	32
2.2.2	動物.....	33
2.2.3	薬剤の調製と投与.....	33
2.2.4	坐骨神経圧挫モデルの作成.....	34
2.2.5	IVIS.....	34
2.2.6	リアルタイム PCR.....	34
2.2.7	共焦点顕微鏡による導入 mRNA の分布観察.....	35

2.2.8	筋萎縮評価	36
2.2.9	運動機能評価	36
2.3	結果	37
2.3.1	PEG 鎖長とコンドロイチン硫酸の有無による mRNA 発現効率の変化	37
2.3.2	ミセル化による導入 mRNA の残存量の定量	39
2.3.3	IGF-1 発現 mRNA の導入による筋制御因子の発現上昇	40
2.3.4	ハイドロダイナミクス法による薬剤投与と炎症	40
2.3.5	ハイドロダイナミクス法により導入された遺伝子の発現分布	41
2.3.6	IGF-1 発現 mRNA の導入の筋重量への影響	44
2.3.7	IGF-1 発現 mRNA による運動機能回復評価	46
2.4	考察	50
3	全体考察	54
4	引用文献	58
5	謝辞	74

1 高分子ミセルを用いた pDNA による坐骨神経損傷後の回復促進効果[1]

1.1 序文

1.1.1 坐骨神経損傷

下肢筋は坐骨神経、大腿神経、閉鎖神経に支配されており、坐骨神経およびその分枝が、ハムストリングスおよび下腿以遠の筋を支配している。そのために、坐骨神経麻痺では歩行が著しく障害され(あるいは歩行不能となり)、坐骨神経以外が支配する筋群にも廃用を生じる。

坐骨神経が断裂した場合には過誤支配を防ぐため、チューブを用いた神経再生誘導が行われるようになった[2]。軸索断裂の場合には、神経内膜管は保持されているために自然回復が可能であり、断裂部位より遠位でワラー変性が生じ、続いて正常環境では1日1mmのペースで軸索が再生する[3]。神経再生を促進するために、線維芽細胞成長因子(fibroblast growth factor-2, FGF-2)[4]やグリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)[5]、脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)[6]、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)[7], [8]などを用いた手法が開発されてきた。これらのように、末梢神経の回復を可能とする治療法が開発されているが、損傷が近位であるほど治療期間が長期に亘り、その間に廃用性筋萎縮や関節拘縮などの不可逆変化が生じ、最終的に完全な機能回復が得られないことが少なくない。

1.1.2 インスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor-1 IGF-1)

末梢神経損傷後に完全な機能回復を得るためには、1)長期に亘る治療期間に生じうる筋萎縮を防ぐこと、2)軸索伸長を促進し治療期間を短縮すること、の両者を満たすことが重要である。

筋萎縮を防ぐ方法の1つとして、筋肥大を生じさせる成長因子を導入することが考えられる。筋肥大を生じさせる成長因子として、sonic hedgehog (Shh)や IGF-1 を用いた例が報告されている[9]。IGF-1 は筋原性制御因子の1つであり、mammalian target of rapamycin (mTOR)や forkhead box protein O (FOXO)などを介して[10]、筋芽細胞の増殖や分化、筋管の肥大に関わる因子であることが知られている[11]–[13]。また、軸索伸長を促進するタンパクとしては前章に挙げたような種々の成長因子や栄養因子が知られているが、IGF-1 も軸索伸長促進作用をもつことが知られている[14], [15]。

したがって、筋肥大作用と軸索伸長促進作用の両者を有する IGF-1 を導入することにより、末梢神経損傷後の治療期間中の筋萎縮を軽減するとともに、軸索の伸長を促進し、治療期間を短くすることで、最終的な機能回復に寄与できると考えられる。

1.1.3 治療用成長因子の導入法—タンパク投与と遺伝子投与—

成長因子を導入する手段の1つとして、タンパクの直接投与が挙げられる。しかしながら、タンパクの半減期は短い。例えば IGF-1 の場合には血清において、IGF-1 と

結合するタンパクであるインスリン様成長因子結合タンパク 3 (insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)と結合していない場合の半減期は 30 分程度、結合しても 10 時間程度であるために[16], [17]、治療期間が長期に亘る場合には反復投与が必要となり、患者負担や医療コストの増大をもたらす。

これに対して、プラスミド DNA (pDNA)やメッセンジャーRNA (mRNA)などの核酸を導入する遺伝子治療は治療用タンパクを持続的に発現させることができ、がんや単一遺伝子疾患を始め、多くの慢性疾患を対象に治験が実施されている[18]。

1.1.4 核酸キャリア

遺伝子治療を行うためには核酸キャリアが必要であるが、現在開発が進んでいる核酸キャリアは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。ウイルス性ベクターは効率的なタンパク発現を示し、多くの報告がなされている[19], [20]。しかしながらウイルス性ベクターには安全性に大きな課題があり、アデノウイルスベクターを用いた治験で死亡報告がなされているほか[21], [22]、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)の乳幼児に対するレトロウイルスを用いた治験ではホストゲノムへの挿入変異による白血病発症例や死亡例が報告されている[23]–[25]。

非ウイルス性ベクターとしては、カチオン性の脂質やポリマーが広く用いられてい

る。核酸は負に帯電しているため、カチオン性高分子と結合し、リポプレックスやポリプレックスと呼ばれる複合体を形成することで高い発現をもたらす[26]–[29]。しかしながら、これらの手法では複合体を形成するときに用いられるカチオン性高分子が細胞内のアニオン性高分子と相互作用してしまうために、毒性をもたらす[30], [31]、*in vitro* 環境下では高い発現を示すものの、*in vivo* 環境下では十分な発現を示すに至っていない。

1.1.5 非ウイルス性キャリアにおける遺伝子発現の効率化

非ウイルス性キャリアを用いた遺伝子導入では *in vivo* 環境下において毒性を持ち十分な発現を得られないという課題に対し、当研究室ではポリプレックスの表面を生体適合性ポリマーであるポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)で覆うことにより解決を試みた。PEG とポリカチオンが結合したブロックポリマーをアニオマーである pDNA や mRNA などの核酸と混合すると、カチオマー部分とアニオマー部分が静電相互作用して核酸が凝縮し、カチオマーに結合している PEG が凝縮体を覆うミセル構造をとる(図 1)[32]–[34]。PEG のもつ立体反発効果により周囲の分子との結合が阻害されるため、生体内における核酸の分解を回避するステルス効果を得ることができ、*in vivo* 環境下において高い発現をもたらす[35]。

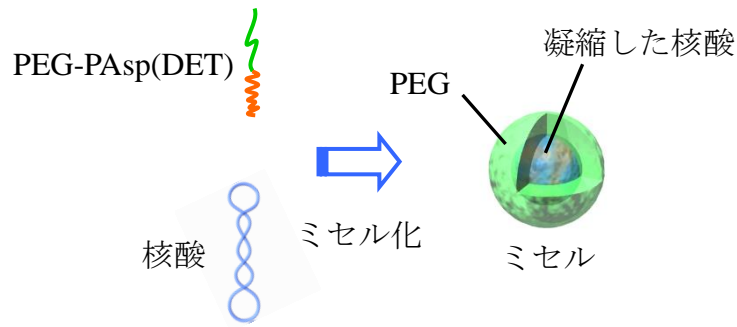
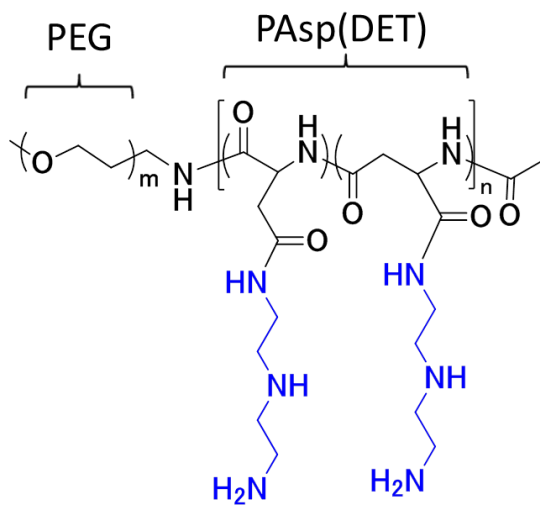


図 1 ミセルの調製と構造

PEG とポリカチオンからなるブロックポリマーと pDNA や mRNA などの核酸を混合すると、核酸とポリカチオンが静電相互作用を起こし、凝縮した核酸を PEG が覆うミセルが形成される。

A



B

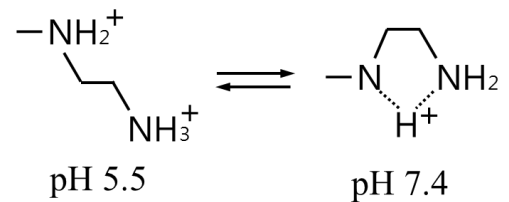


図 2 PEG-PAsp(DET)の構造と pH に応じた構造変化

(A) PEG-PAsp(DET)はポリアスパラギン酸の側鎖にジエチレントリアミンを共有結合させた PAsp(DET)に PEG が共有結合した構造を持つ。(B)DET 部分は中性条件下では安定な構造をとるが、酸性条件下ではプロトン化率が上昇する。

導入核酸が機能するためには、細胞に至るまではミセルの形状を維持しながらも、細胞内に到達した後はミセルが壊れ、核酸が放出される必要がある。このような機能制御にはポリマーのカチオン部分の構造が大きく関与しているが、ミセルが壊れた後もカチオンとして存在する分子では、細胞内において毒性を持つ可能性を残す。当研究室では、カチオンとして poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp(DET))を用いることにより、低毒性かつ高効率な核酸導入を実現した[36], [37]。PAsp(DET)は細胞内外の pH (細胞外:pH 7.4, 細胞内:pH 5.5)に応答して構造を変化させ(図 2)、細胞外ではプロトン化率が低く、したがって正電荷の数が少ないため毒性も弱い。細胞内ではプロトン化率が上がり、エンドソームの膜を破壊することで核酸が細胞内に広がるとともに[36]、PAsp(DET)は 37 °C 条件下で分解され、毒性がほとんどない Asp(DET)モノマーになる[38]。これにより、高い核酸導入効率と、低毒性を実現した[39]。

1.1.6 坐骨神経損傷への IGF-1 発現遺伝子導入による治療

非ウイルス性キャリアによる遺伝子導入法の 1 つに、pDNA や mRNA を直接投与する方法が挙げられる。核酸の直接投与においては導入効率を高めることが必須であり、そのために電ポレーション法[9], [40]やハイドロダイナミクス法[38], [41]のような手法が開発されてきた。

局所投与においてはハイドロダイナミクス法が一過性かつ軽微な組織障害のみで高い遺伝子導入を可能とすることを利用し、ハイドロダイナミクス法と当研究室で開発されたミセルを合わせて用いることにより、より高い遺伝子導入効率をもつ導入法が開発された[42]。

さらに、筋肉へのハイドロダイナミクス法による遺伝子投与の際には、薬剤溶液を PEG-PAsp(DET)中のアミノ基、pDNA 中のリン酸基、コンドロイチン硫酸 A (chondroitin sulfate A, CS)の硫酸基とカルボキシ基の和の比が 20:1:100 となるように調製したものが最も効率よく遺伝子を発現させることが報告されている[43]。ポリカチオンである PAsp(DET)がポリアニオンである pDNA に対して過剰量に供給されているため、アニオンである CS を加える事によって細胞毒性を軽減させる効果がある。

筋肉は効率よくタンパクを発現させるため、遺伝子治療における格好のターゲットであり[20], [44], [45]、筋肉をターゲットとした IGF-1 発現核酸を導入することは、末梢神経損傷後に生じる筋萎縮と軸索伸長の両者への効果が期待され、完全な機能回復を目的とした治療に有用な手法であると考えられる。

1.2 方法

1.2.1 材料

IGF-1 を発現する pDNA (InvivoGen)および β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase, β -gal)を発現する pDNA (Promega)を大腸菌株 DH5 α (Takara)にて増やし、NucleoBond

Xtra EF (Macherey Nagel)にて精製した。pDNA 濃度は 260 nm における吸光度により決定した。CS とストレプトトゾトシンは Sigma Aldrich より購入した。イソフルランはアボットジャパンより購入した。RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits (50), QuantiTect Reverse Transcription Kit はキアゲンより購入した。Cryofilm type IIC9, SCEM コンパウンドは section-lab より購入した。

1.2.2 動物

Balb/c マウス 10-14 週齢を日本チャールズ・リバー株式会社より購入した。すべての動物実験は東京大学動物実験実施規則に基づき実施した。

1.2.3 薬剤の調製

PEG-PAsp(DET)は当研究室所属であった共同研究者の石井武彦氏により合成、供与された[35]。PEG の分子量は 12,000 で、¹H-NMR にて PAsp(DET)の重合度は 69 と同定した。PEG-PAsp(DET)と pDNA を 10 mM の HEPES バッファー (pH 7.4)に別々に溶かし、両者を混合してミセル溶液を調製した。混合されたミセル溶液に CS を加え、PEG-PAsp(DET)中のアミノ基、pDNA 中のリン酸基、CS の硫酸基とカルボキシ基の和の比が 20:1:100 となるように調製した。投与する溶液中の pDNA 濃度は 134 µg/mL に統一した。ハイドロダイナミクス法により投与する直前に 5 M の NaCl 溶液を加え、

血液の浸透圧の半分の濃度となるようにした。

1.2.4 ハイドロダイナミクス法による下肢骨格筋への薬剤投与

下肢骨格筋へのハイドロダイナミクス法による薬剤投与は、当研究室での先行研究と同じ方法によって行った[42], [43]。マウスを3%イソフルランにて吸入麻酔した後、駆血帯により大腿近位部を圧迫し、一時的に静脈還流を阻害した。伏在大静脈遠位より薬剤溶液 375 μL を 5 秒で投与し、5 分後に駆血帯を外した。

1.2.5 坐骨神経圧挫モデルの作成

ハイドロダイナミクス法による遺伝子投与から 1 時間後に、坐骨神経に凍結圧挫モデル[46]を作成した。マウスを 3%イソフルランにて吸入麻酔した後、右下肢大転子付近を切開、筋組織を傷つけないように坐骨神経を展開し、鉗子で神経を掴んだまま、30 秒間液体窒素にて冷やした鑷子により 30 秒間圧迫する操作を 2 回行った(図 3)。



図 3 坐骨神経圧挫モデルマウスの作成

坐骨神経圧挫モデルは、大転子付近を切開し、神経を鉗子で圧迫することにより作成した。

1.2.6 リアルタイム PCR

筋肉における IGF-1, myoD, myogenin の遺伝子発現を確かめるため、mRNA の発現をリアルタイム PCR によって行った。ハイドロダイナミクス法による遺伝子投与の 7 日後にマウスを安楽死させ、大腿四頭筋と下腿三頭筋を摘出した。RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits を用いて摘出した筋肉から mRNA を精製し、精製した mRNA を QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写した後、ABI Prism 7500 Sequence Detector によりリアルタイム PCR にかけた。各因子のプライマーについて、myoD と myogenin については Taqman[®] gene expression assays を用いた (MyoD: Mm01203489_g1, myogenin: Mm00446195_g1)。IGF-1 と β -actin は以下の配列のものを用いた。

IGF-1	forward TGGATGCTCTTCAGTTCGTG
	reverse GTCTTGGGCATGTCAGTGTG
β -actin	forward AGATGTGGATCAGCAAGCAG
	reverse GCGCAAGTTAGGTTTTGTTCA

すべての因子は β -アクチンをハウスキーピング遺伝子として $\Delta \Delta Ct$ 法により評価した。

1.2.7 筋萎縮評価

ハイドロダイナミクス法により薬剤を投与してから 7 日後に下腿三頭筋を摘出し、筋重量を計測した。

投与 7 日後と 16 日後に、Cryofilm type IIC9 を用いて凍結切片を作成した[47], [48]。マウスを安楽死させ、下肢を切除した。切除した下肢は液体窒素で冷やしたイソペンタンで凍らせた。凍らせた下肢を SCEM コンパウンド中に浸し、-100°Cにて再度凍らせた。切片は CM3050S クリオスタット(ライカマイクロシステムズ)を用いて、膝蓋骨から 10 mm の位置で大腿四頭筋の 10 μm 厚の切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジンにて染色した。染色された切片から、筋繊維の断面積を Image J (National Institutes of Health)により計測した。

1.2.8 運動機能評価

運動機能の回復を評価するため、walking track analysis を行った[49]。マウスの足をインクに浸した後、4.5 cm 幅、35 cm 長の通路を暗室にて歩行させ、足跡を取得した。第 1 趾と第 5 趾の間隔を計測し、Toe Spread (TS)とし、第 3 趾と踵部の間隔を Print length (PL)とした。TS と PL を用いて、以下の式に基づき、Sciatic Functional Index (SFI)を算出した。

$$SFI = 118.9 \frac{ETS - NTS}{NTS} - 51.2 \frac{EPL - NPL}{NPL} - 7.5$$

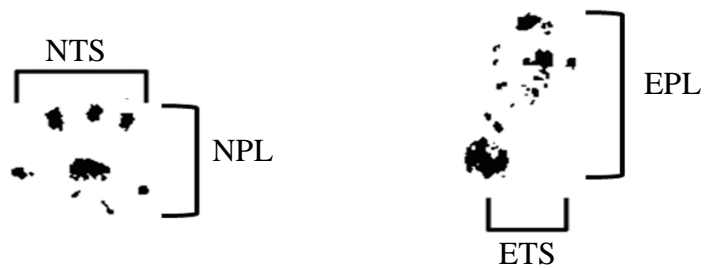


図 4 SFI の算出法

マウスの足跡において、第 1 趾と第 5 趾の間隔を示す TS と、第 3 趾と踵部までの感覚を示す PL を計測し、SFI を算出した。正常状態(N)のマウスでは力をかけることで TS が広く、PL は狭い状態を保っているが、麻痺状態(E)では ES が狭く、PL が広くなる。

EPL および ETS は疾患モデル側(experimental)の足に関する指標を示し、NPL および NTS は健側(normal)に関する指標を示す。

1.2.9 糖尿病モデル

糖尿病を惹起するため、ストレプトゾトシンを生理食塩水に溶かし、200 mg/kg 体重となるように腹腔内投与した。ストレプトゾトシンの投与 7 日後に、血中グルコース濃度を Fuji DRI-CHEM slide GLU-WIII(富士フイルム)を用いて計測し、300 mg/dL を超えるものを糖尿病マウスとして用いた[50]。

1.2.10 知覚機能評価

後肢における坐骨神経損傷後の機能回復を評価するため、paw pressure test および

アセトン試験を行った。Paw pressure test ではマウス後肢を木製のクリップで挟むことにより一定圧をかけ、マウスが足を動かすまでの時間を計測した[51]。過剰な刺激を避けるため、30 秒間反応が見られない場合は試験を中止し、30 秒を記録とした。アセトン試験ではマウスの後肢をアセトンに浸した後、速やかにマウスをケージ内に移動させ、1 分間に足を動かした回数をカウントした[52]。

1.3 結果

1.3.1 IGF-1 発現 pDNA による末梢神経圧挫後の筋萎縮軽減効果

薬剤投与および末梢神経圧挫の 7 日後に、下腿三頭筋および大腿四頭筋における IGF-1 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により計測した。ミセル化した IGF-1 発現 pDNA を投与したマウスは、無投与のマウスと比較して大腿四頭筋で 37 倍の、下腿三頭筋で 4 倍の IGF-1 の mRNA の発現が確認された(図 5 A, C)。IGF-1 発現 pDNA をミセル化せずに naked の状態のまま投与しても IGF-1 の発現の上昇はみられたが、ミセル化した時に比べるとその発現レベルは低い。筋肉の増殖・分化において発現することが知られている、筋原性制御因子である myogenin および myoD の発現についても、ミセル化した IGF-1 発現 pDNA を投与したマウスは saline を投与したマウス、および無投与群に対して有意に高い発現を示した(図 5 B, D)。また、予備実験により、 β -gal 発現 pDNA を投与したマウスの下腿三頭筋における IGF-1, myogenin, myoD の発現量は saline を投与した場合とほぼ同程度であることが確認された。

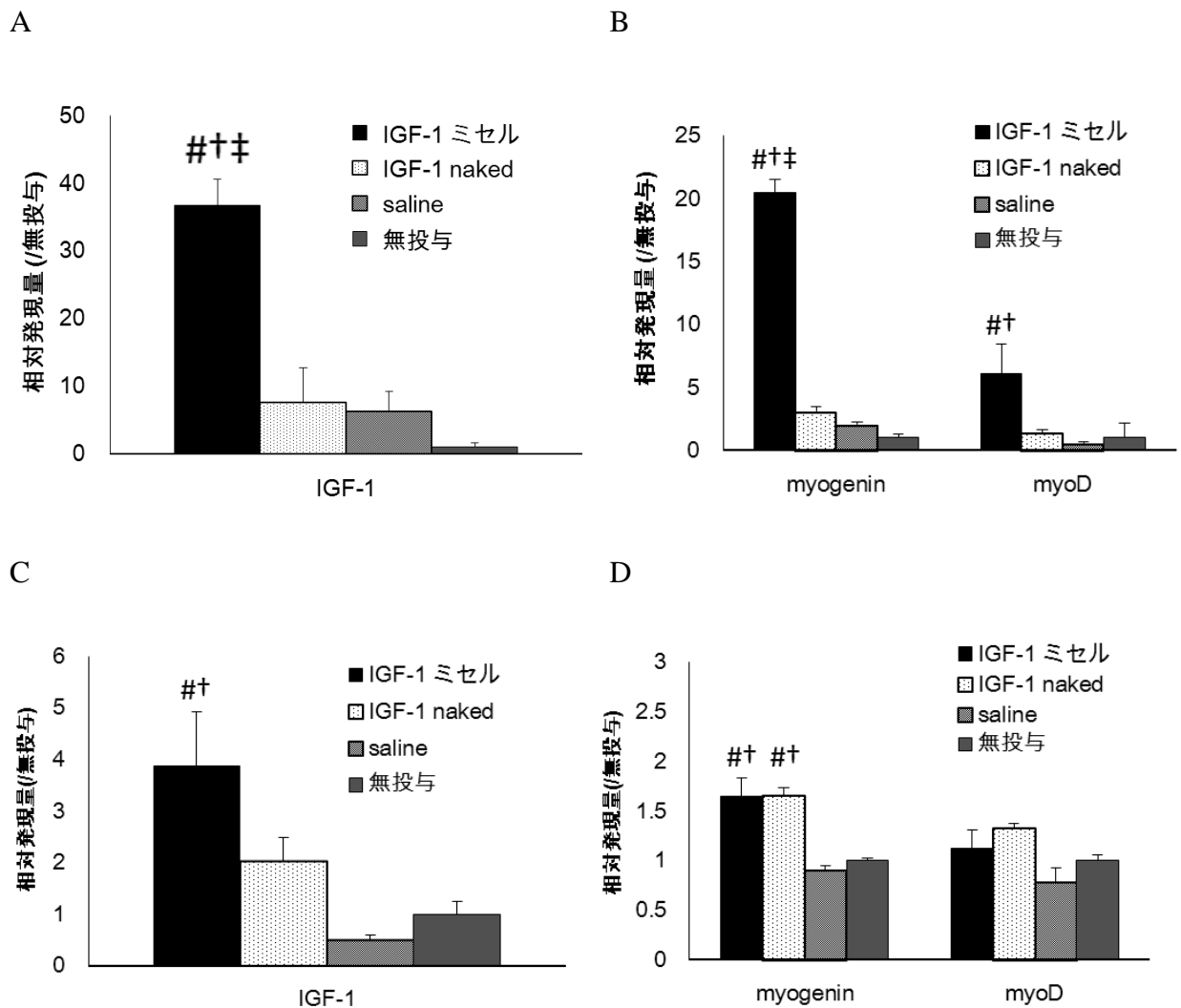


図5 薬剤投与7日後におけるIGF-1, myogenin, myoDの発現

IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した群、naked のまま投与した群、saline を投与した群、無投与群における大腿四頭筋(A, B)および下腿三頭筋(C, D)での IGF-1 (A, C), myogenin, myoD (B, D)の発現量を PCR により定量し、無投与群を基準としてデータは平均値+標準誤差で示した。大腿四頭筋は各群 n = 4、下腿三頭筋は各群 n = 5 である。#P < 0.05 vs. saline、† P < 0.05 vs. 無投与、‡ P < 0.05 vs. IGF-1 naked を示す。

IGF-1 発現 pDNA の投与により、末梢神経圧挫後の筋萎縮が軽減されることを評価するため、投与及び末梢神経圧挫の7日後に両足の下腿三頭筋を摘出した。健側と比

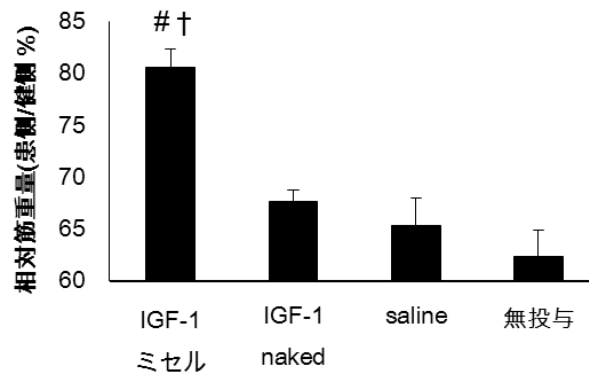


図 6 薬剤投与および末梢神経圧挫 7 日後における下腿三頭筋の相対重量(患側/健側 %)

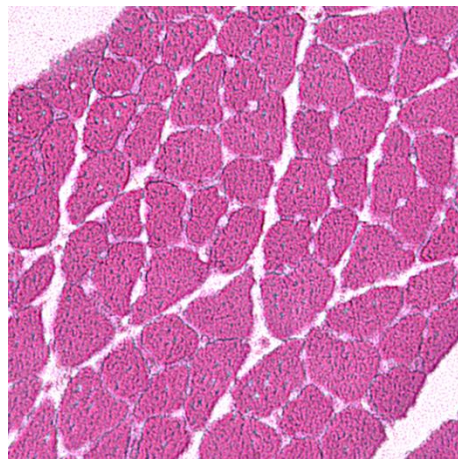
両脚の下腿筋を摘出し、神経を圧挫した右足(患側)の筋肉重量の左足(健側)に対する重量比率を算出した。データは平均値±標準誤差(n = 5)を示す。#P < 0.05 vs. saline、†P < 0.05 vs. 無投与を示す。

較して、saline 投与群および無投与群では 65%以下まで筋重量が減少していた。一方、IGF-1 発現 pDNA を naked のまま投与した群では 68%、ミセル化して投与した群では 80%の筋重量があり、筋萎縮が軽減されていることが確認された(図 6)。

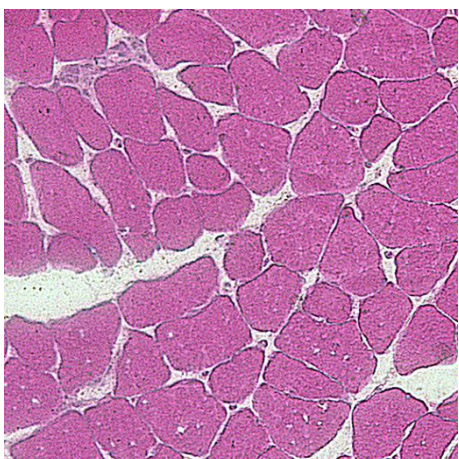
IGF-1 発現 pDNA の投与による末梢神経圧挫後の筋萎縮の軽減効果を細胞レベルで確認するため、坐骨神経圧挫および薬剤投与の 7 日後に大腿四頭筋の垂直断面を取得し、筋繊維の断面積を評価した(図 7、図 8)。IGF-1 発現 pDNA をミセルで投与された群では、それ以外の IGF-1 発現 pDNA を naked で投与された群、β-gal 発現 pDNA を投与された群、および saline を投与された群と比較して、筋繊維断面積が有意に大きかった。従って、ミセル化とハイドロダイナミクス法により効率的に導入された IGF-1 発現 pDNA は、筋原性制御因子の発現を向上させることにより、筋萎縮を軽減させたと考えられる。



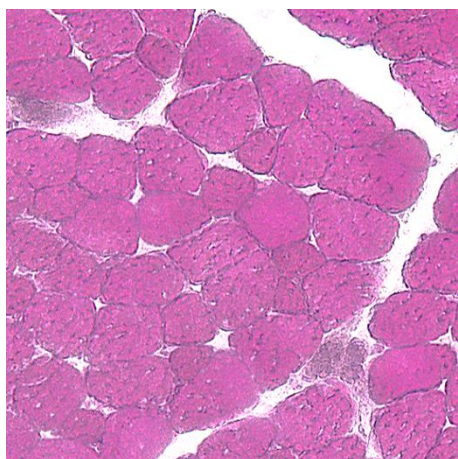
IGF - 1 ミセル



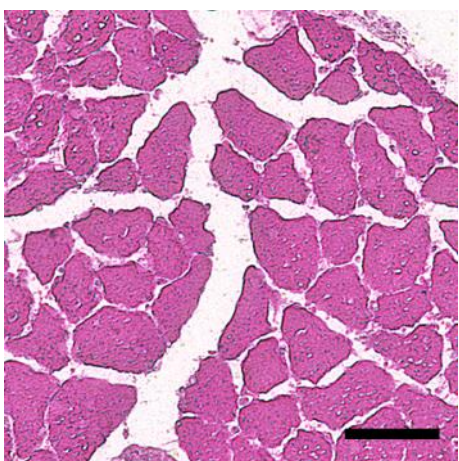
IGF - 1 naked



β - gal ミセル



β - gal naked



saline

図7 薬剤投与および末梢神経圧挫
7日後の組織切片
大腿四頭筋の筋垂直断面の凍結切片
を10 μ m厚で得た。Bar : 50 μ m

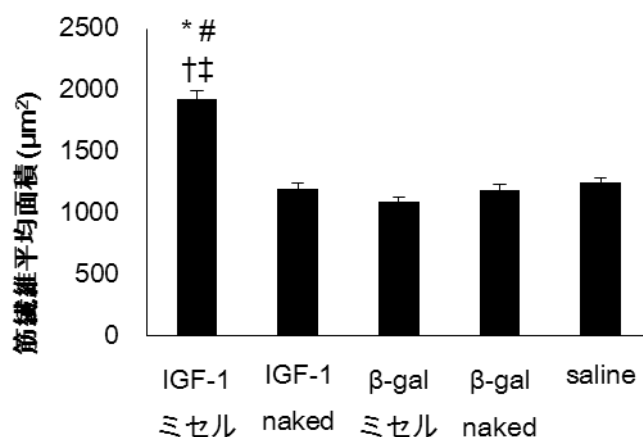


図 8 薬剤投与および末梢神経圧挫 7 日後における筋繊維面積

IGF-1 をミセル化した群、naked のまま投与した群、β-gal をミセル化した群、naked のまま投与した群、saline を投与した群のそれぞれにおいて、大腿四頭筋の膝蓋骨から 10 mm 近位での筋の垂直断面の切片から、筋繊維の平均面積を計測した。100 以上の筋繊維の面積を算出し、データは平均値 + 標準誤差を示す。*P < 0.05 vs. saline、#P < 0.05 vs. β-gal (naked)、†P < 0.05 vs. β-gal (ミセル)、‡P < 0.05 vs. IGF-1 (naked)を示す。

1.3.2 運動機能の回復評価

運動機能の評価を行うため、歩行解析を行い、SFI を算出した(図 9)。無処置のマウスに対する予備実験における SFI 値が -12.4 ± 4.8 (n = 4)であったことから、SFI > -20 を正常とした。坐骨神経圧挫の 10 日後まではすべてのマウスで機能回復は見られなかった。その後、IGF-1 発現 pDNA を投与されたマウスは他の群のマウスに比べて有意に速い回復を示し、坐骨神経の圧挫 18 日後までにすべてのマウスが完全な回復を示した。一方で、他の群のマウスでは 25 日後でも十分に回復しないマウスが存在した。

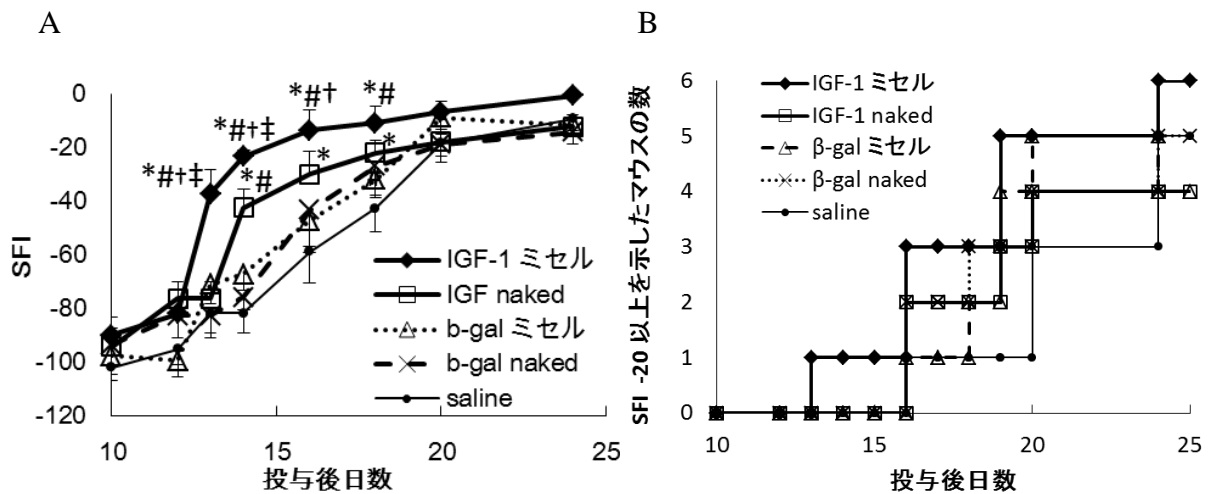


図9 薬剤投与および坐骨神経圧挫後の運動機能回復の経過

IGF-1 をミセル化した群、naked のまま投与した群、β-gal をミセル化した群、naked のまま投与した群、saline を投与した群のそれぞれにおいて、SFI を算出した。各群 n = 6 で、(A) 平均値 ± 標準誤差を示す。(B) SFI > -20 を示したマウス数を示す。*P < 0.05 vs. saline、#P < 0.05 vs. β-gal naked、†P < 0.05 vs. β-gal ミセル、‡P < 0.05 vs. IGF-1 naked を示す。

さらに、投与方法の差による運動機能回復に及ぼす影響を評価するため、IGF-1 発現 pDNA を筋注した群との比較を行った(図 10)。ハイドロダイナミクス法により薬剤投与を行った群では無投与群と比較して有意に速い回復を示したのに対し、筋注を行った群の運動機能の回復は無投与群と同様の回復を示した。以上のことから、pDNA をミセル化してハイドロダイナミクス法により投与する手法は、治療上有用であることが強く示唆される。

また、一般に機能回復が遅れるとされる糖尿病モデルマウス[53], [54]において運動機能回復の評価を行ったところ、神経損傷の 14 日後に IGF-1 をミセル化して投与した群のみが有意に速い回復をみせた(図 11)。

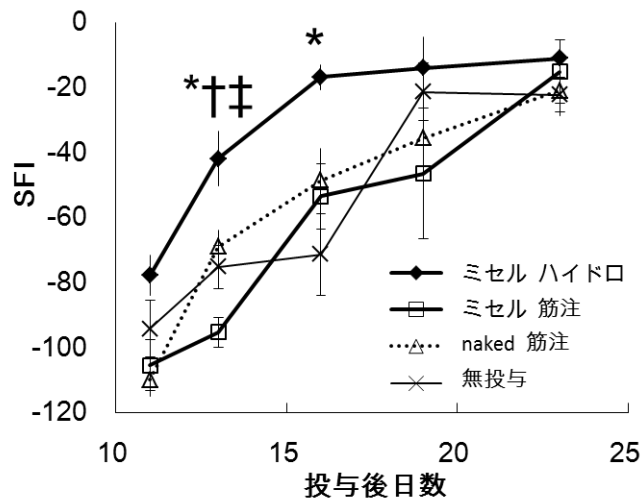


図 10 投与法による運動機能回復の差

IGF-1 をミセル化し、ハイドロダイナミクス法によって投与した群、筋肉注射をした群、naked のまま筋肉注射をした群、無投与群のそれぞれにおいて、SFI を算出した。データは平均値±標準誤差(n=5)を示す。*P<0.05 vs. 無投与、†P<0.05 vs. ミセル 筋注、‡P<0.05 vs. naked 筋注を示す。

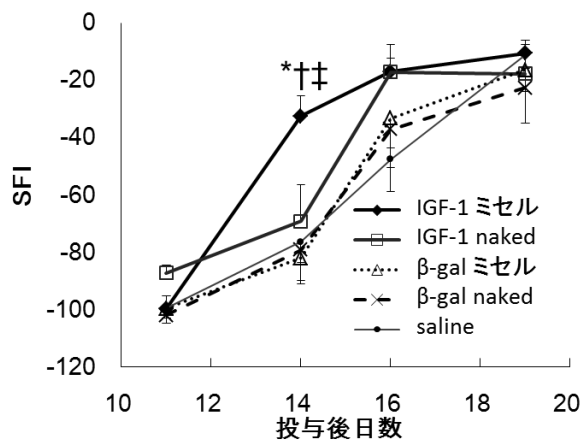


図 11 糖尿病モデルマウスにおける末梢神経圧挫後の運動機能回復の経過

糖尿病モデルマウスに薬剤投与と坐骨神経圧挫を行った後、運動機能の回復を SFI により評価した。データは平均値±標準誤差(n=5)を示す。*P<0.05 vs. saline、†P<0.05 vs. β-gal naked、‡P<0.05 vs. β-gal ミセルを示す。

1.3.3 知覚の回復評価

糖尿病モデルマウスにおいて知覚の回復評価を行うため、paw pressure test およびアセトン試験を行った。機械刺激への応答を評価する paw pressure test では、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与したマウスは2日後の時点で比較的応答時間が短く、その後もこの群だけが短い応答時間を示し続け、その他の群は末梢神経損傷の16日後に応答を示さなくなった(図12)。さらに、温度応答を評価するアセトン試験では、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した群だけが早期の回復を示し、他の群では22日後に正常の反応まで回復した(図13)。

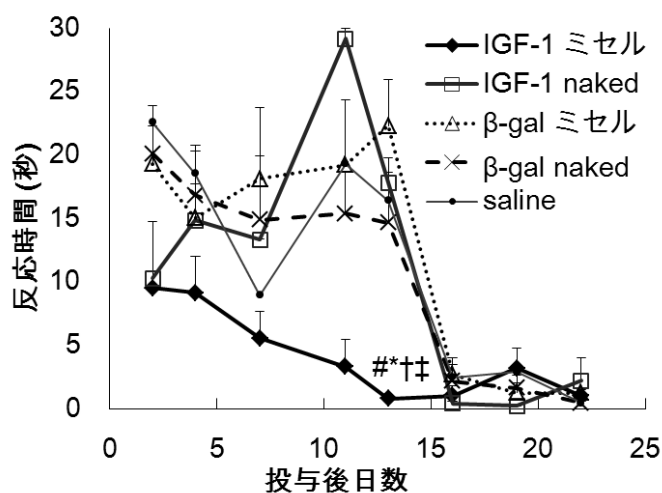


図12 paw pressure test における反応時間

糖尿病モデルマウスに薬剤投与と坐骨神経圧挫を行った後、圧迫に対する反応時間を計測した。データは平均値+標準誤差(n=5)を示す。#P<0.05 vs. saline、*P<0.05 vs. β-gal naked、†P<0.05 vs. β-gal ミセル、‡P<0.05 vs. IGF-1 naked を示す。

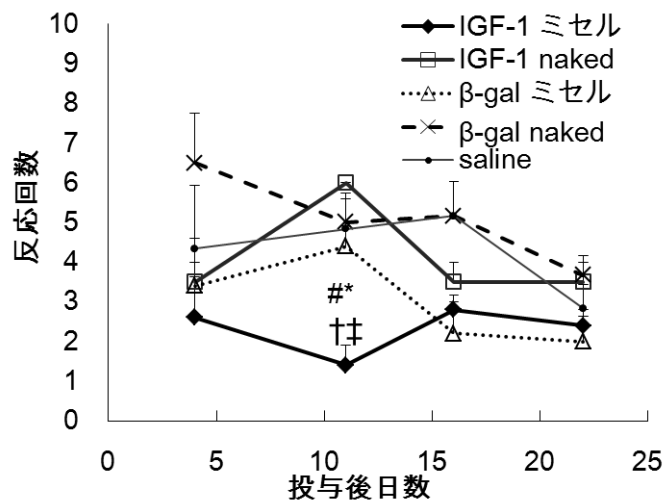


図 13 アセトンテストにおける反応回数

糖尿病モデルマウスに薬剤投与と坐骨神経圧挫を行った後、アセトンに対する反応時間を計測した。データは平均値+標準誤差(n=5)を示す。#P<0.05 vs. saline、*P<0.05 vs. β-gal naked、†P<0.05 vs. β-gal ミセル、‡P<0.05 vs. IGF-1 naked を示す。

1.4 考察

本研究により、末梢神経圧挫に対して IGF-1 発現 pDNA を投与することが治療法として有効であることが示された。IGF-1 は筋肥大因子として治療期間の末梢神経圧挫後の筋萎縮を防ぐことに加えて、麻痺が生じている筋肉においてタンパクを発現させることによって運動機能や知覚の早期回復をもたらした。

肝臓へのハイドロダイナミクス法による遺伝子投与の際には、尾静脈から多量の溶液を導入することにより、肝細胞の表面に孔が開くことによって核酸が導入されることが報告されている[55]。したがって、筋肉においても、血管内皮および筋細胞表面に小孔が開くことで核酸が導入されたと考えられる。ミセルのサイズは 10 - 100 μm

であり、肝臓への導入において報告されている小孔(10 μm 程度)に比較すると大きい。このことから、ミセルを用いたハイドロダイナミクス法においてもエンドソームを形成して細胞内に導入され、その後、PEG-PAsp(DET)の持つ特性である 1)pH 応答性の細胞傷害能、2)生分解性により、投与遺伝子が効率よく導入され、かつポリマーは安全に分解されたと考えられる。組織の違いから、筋肉ではより大きい孔が開き、エンドソームが形成されずにミセルのまま細胞質へと導入された可能性も考えられるが、この場合においても、細胞までにミセルの形状を保つこと、および導入後に生分解性をもたせることの2点において、PEG-PAsp(DET)を用いることが有用であるといえる。

IGF-1 発現 pDNA を導入した後の IGF-1 や myogenin の発現には、大腿四頭筋と下腿三頭筋でその上昇の効果に差がある傾向が確認される(図 5)。これは、ハイドロダイナミクス法によって遺伝子を導入する際には静水圧がかかることが必要となるが、導入溶液は駆血帯をおいた大腿側に多く溜まり、このために大腿では下腿にくらべより高い圧力がかかり、より効率的に遺伝子が導入されたためであると考えられる。しかしながら、いずれの筋においても saline 群や無投与群などと比較して IGF-1 や myogenin などの遺伝子発現は優位に高くなっており、先行研究で確認されたようにミセルを用いたハイドロダイナミクス法による投与は筋肉注射に比べて広範囲に遺伝子を導入できる、という利点があるといえる[38]。このことは効率よく遺伝子を発現する筋肉をターゲットとした遺伝子治療を行う上で、より多くの細胞を用いることが

できることを意味する。運動機能の回復の指標の1つである SFI はマウスの足の指間距離である toe spread を算出に用いるが、これは小さな筋肉によって支配されるパラメタであり、一部の筋肉だけでなく、広く遺伝子が導入されることが重要と言える。さらに、当該の導入法は一時的かつ最小限な障害のみで遺伝子を導入できる。筋肉に障害が生じるとクレアチンフォスホキナーゼ(CPK)値が高値となるが、数日後には CPK 値は正常値に戻ることが示されている[38], [56]。加えて、ミセル化し CS を添加することにより、カチオンによる毒性を軽減することで遺伝子発現を高めることができた[43]。また、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与する際に、CS があるものとならないもので機能回復の差を評価したところ、CS の有無による機能回復の差は確認されなかった。これらの特性により、IGF-1 発現 pDNA をハイドロダイナミクス法により投与することで、運動機能や知覚を早期回復させることができた(図 9、図 12、図 13)。

IGF-1 発現 pDNA を投与してわずか2日後から知覚の回復が見られた。メカニズムは不明であるが、IGF-1 は知覚の回復を促進することが報告されている[39-41]。導入した IGF-1 発現 pDNA が発現、IGF-1 が分泌されることにより血中の IGF-1 濃度が上昇し、坐骨神経の損傷部位に集積、治療効果をもたらした可能性がある。実際に、可溶性血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)レセプター1(sFlt-1)を発現する pDNA を筋に導入することにより血中 sFlt-1 濃度を上昇させたことが報告さ

れている[42]。別の可能性としては IGF-1 により筋萎縮が軽減されている筋肉による神経への作用の可能性もある。これについては、トレッドミル運動の刺激によりシユワン細胞の増殖の活性化を通じて、神経伸長を促進させたことが報告されている[57]。知覚の早期回復に関するメカニズムは未解明であるが、知覚の早期回復は筋萎縮の軽減と合わせて、予後の改善に寄与することは明らかである。

本研究の限界として、ハイドロダイナミクス法による薬剤投与を行うと、坐骨神経の圧挫モデルを作成した部位に神経にさらに二次的な影響がおよぶ懸念があるとともに、坐骨神経の圧挫モデルを先に作成した場合には投与した薬剤が漏出する可能性が考えられたため、薬剤投与を行ってから坐骨神経を損傷させた。薬剤を投与してから1時間後に坐骨神経の圧迫を行っていることと、投与した pDNA は投与7日後まで次第に発現量が増加し、その後、一定量の発現が持続する、という発現プロファイル[42]から、坐骨神経が損傷を受けてから pDNA を投与しても回復効果は得られると考えられる。

したがって、本研究は筋肉に遺伝子を導入し、坐骨神経損傷後に筋萎縮軽減と神経伸長促進、さらには早期機能回復をもたらすことを示したと言える。

2 高分子ミセルを用いた mRNA による坐骨神経損傷後の回復促進効果

2.1 序文

2.1.1 mRNA を用いた遺伝子治療への期待

核酸を用いた遺伝子治療において、pDNA を用いた場合には長期の治療効果の持続が期待される一方で、ホストゲノムへの挿入が副作用をもたらす可能性があるという実用上の困難を抱えている。具体例として、X-SCID の乳幼児に対するレトロウイルスを用いた治療でのホストゲノムへの挿入変異による白血病発症例や死亡例がある [23]–[25]。多くの再生医療が対象とする非致死的な疾患分野では、死亡の危険性を含むものは実際の治療応用としては許容されない。したがって、再生医療においては pDNA を遺伝子治療に用いることは事実上不可能である。

これに対して mRNA はホストゲノムへの挿入がない。IGF-1 をはじめとする成長因子は癌を惹起する可能性があることが示唆されており [58], [59]、治療後も高い発現が続くことは望ましくない。このようなタンパクを発現する遺伝子として pDNA を用いるとホストゲノムへの挿入の結果として半永久的な発現が生じる可能性があるが、mRNA ではホストゲノムへの挿入がないために、治療後には導入 mRNA が分解されることが期待される。

また、pDNA を用いた場合には細胞に送達された pDNA はさらに核へと移行する必要があるが、mRNA は細胞質で翻訳されるため核への移行が不必要で、投与後速やか

な薬効が期待される。加えて、Anti-Reverse Cap Analog (ARCA)キャップ構造を付加することにより、翻訳可能な RNA のみを合成することを可能とする手法が開発され、mRNA の翻訳効率も著しく向上している[60]。さらに、非分裂細胞にも導入することが可能であるため、近年、より効率的な治療遺伝子として注目されている[61], [62]。

2.1.2 遺伝子治療に mRNA を用いる際の課題と手法の開発意義

一方、mRNA は非常に不安定であり、また mRNA 自身が免疫原性を持つため、遺伝子治療に用いることは難しいとされてきた[63], [64]。この課題に対して、当研究室で開発された、PEG-PAsp(DET)を用いたミセル化の手法を用いることにより、免疫応答を軽減して mRNA をターゲット部位まで送達し、治療に応用することが可能であることが示唆されている[65], [66]。

筋肉をターゲットに mRNA を安定させて導入することができれば、pDNA を導入した時と同様に、筋肉において合成されたタンパクが分泌されることが期待できる。同時に、pDNA のもつ宿主ゲノムへの挿入の危険性を回避し、投与後速やかな薬効が期待でき、かつ治療後には導入 mRNA が分解されることが期待される。すなわち、導入遺伝子を長期に発現させることができ、かつ pDNA のもつ、宿主ゲノムへの挿入や核への移行を必要とするといった実用上の困難を克服しつつ、効率的な治療法となる可能性を持つ。したがって、非致死の疾患である末梢神経損傷の治療に IGF-1 発

現 mRNA を導入する治療法の可能性を示すことは、遺伝子治療を実現するために重要な知見となると言える。

2.2 方法

2.2.1 材料

T7 プロモーターを含む pSP73 ベクター(Promega)にタンパクを発現する断片を挿入し、*in vitro* 転写法によって mRNA を作成した[65]。タンパクを発現する断片は、*Photinus pyralis* 由来ルシフェラーゼ(Luc2)を含む pGL4 ベクター(Promega)を制限酵素 XbaI (Takara)および HindIII (Takara)により処理したもの、*Aequorea coerulea* 由来 green fluorescent protein (AcGFP)を含む pSP73 ベクター(クロンテック)、IGF-1 を含む pBLAST ベクター(Invivogen)を制限酵素 SalI (Takara)および HpaI (Takara)により処理したものをを用いた。タンパクを発現する断片と、脱リン酸化を行った pSP73 ベクターのライゲーションは Ligation high ver.2 (TOYOBO)にて行い、大腸菌株 One Shot[®] Stbl3 コンピテントセル(Invitrogen)にて増やした後、NucleoBond Xtra EF (Macherey Nagel)にて精製した。得られた pDNA を制限酵素 BsmBI (BioLabs)でリニアライズし、T4 DNA polymerase (Takara)により末端平滑化を行い、mRNA 合成のテンプレートとした。

in vitro 転写法は、ARCA キャップ構造を付加する mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion)を用いて行った。作成した mRNA は QIAquick PCR purification kit (Qiagen)

を用いて精製し、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)で Agilent RNA 6000 Nano Assay を使用してサイズと純度を評価した。mRNA 濃度は 260 nm における吸光度により決定した。CS は Sigma Aldrich より購入した。イソフルランはアボットジャパンより購入した。RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits (50)、 QuantiTect Reverse Transcription Kit は Qiagen より購入した。Cryofilm type IIC9、 SCEM コンパウンドは section-lab より購入した。

2.2.2 動物

Balb/c マウス 8-9 週齢を日本チャールズ・リバー株式会社より購入した。すべての動物実験は東京大学動物実験委員会の承認(承認番号 P11-076)を受け、東京大学動物実験実施規則に基づき実施した。

2.2.3 薬剤の調製と投与

1 章と同様に、PEG-PAsp(DET)は当研究室所属であった石井武彦氏により合成[35]、供与された。PEG の分子量が 12,000 および分子量 42,000 のものを用いて、それぞれ $^1\text{H-NMR}$ にて PAsp(DET)の重合度を同定した。ミセル溶液の調製および投与は 1 章と同様に、PEG-PAsp(DET)と核酸、CS を用いて調製した核酸濃度は 134 $\mu\text{g/mL}$ の溶液をハイドロダイナミクス法によって投与した。

2.2.4 坐骨神経圧挫モデルの作成

1章と同様に、ハイドロダイナミクス法による遺伝子投与から1時間後に、坐骨神経に凍結圧挫モデル[46]を作成した。

2.2.5 IVIS

D-luciferin(住商ファーマインターナショナル)を 150 mg/kg 腹腔内投与した後、IVIS™ Imaging System (Xenogen)にて観察・定量した。

2.2.6 リアルタイム PCR

筋肉内における IGF-1、myoD、myogenin、myomaker、Luciferase および Interleukin-6 (IL-6)の遺伝子発現を確かめるため、mRNA の発現をリアルタイム PCR によって行った。Myomaker は筋芽細胞の融合と筋肉の形成において発現する、筋再生に重要な因子である[67], [68]。ハイドロダイナミクス法による遺伝子投与の3日後および7日後に、マウスを安楽死させ、下腿三頭筋を摘出した。mRNA の精製および PCR は1章と同じ手法で行った。各因子のプライマーについて、myoD、myogenin、IL-6 については Taqman® gene expression assays を用いた(MyoD: Mm01203489_g1, myogenin: Mm00446195_g1, IL-6: Mm00446190_m1)。IGF-1 と glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、myomaker、Luciferase は以下の配列のものを用いた。

IGF-1 forward TGGATGCTCTTCAGTTCGTG
 reverse GTCTTGGGCATGTCAGTGTG

GAPDH forward GGATGCAGGGATGATGTTCT
 reverse TGCACCACCAACTGCTTAG

myomaker forward ATCGCTACCAAGAGGCGTT
 reverse CACAGCACAGACAAACCAGG

Luciferase forward CAAGCTATTCTCGCTGCACA
 reverse TCTTACCGGTGTCCAAGTCC

すべての因子はGAPDHをハウスキーピング遺伝子として $\Delta \Delta Ct$ 法により評価した。

2.2.7 共焦点顕微鏡による導入 mRNA の分布観察

GFP 発現 mRNA をミセル化しハイドロダイナミクス法によって導入したマウスにおいて、投与の 3 日後に、生体内共焦点顕微鏡で GFP の発現の分布を確認した。撮影の直前に Hoechst 33342 (Lonza Group Ltd.)およびエバンスブルーをそれぞれ 5 mg/kg, 2.5 mg/kg 静脈内投与することで、核および血管を染色した。共焦点顕微鏡は Nikon A1R 共焦点顕微鏡と正立顕微鏡 ECLIPSE FN1(Nikon)を組み合わせたシステムにて Nikon Plan Apo 対物レンズ(20x, NA 0.75)を用いて撮像した。

2.2.8 筋萎縮評価

1章と同様に、ハイドロダイナミクス法により薬剤を投与してから7日後に下腿三頭筋を摘出し、筋重量を計測した。切片は踵から6 mmの位置で下腿三頭筋の10 μm 厚の切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジンにて染色した。染色された切片から、筋繊維の断面積をImage Jにより計測した。

2.2.9 運動機能評価

運動機能の回復評価はCatwalk (Noldus)を用いて行った[69]。Catwalkはwalking track analysisを機械上で計測できるようにしたものであり、自然歩行の解析ができる。紙面上の実験に加えて、圧力や歩行の様子を示す動画などを得ることができ、損傷の回復評価に用いられている[70], [71]。Catwalkにより得られる指標の1つであるduty cycleは $\text{stand time (足を地につけている時間)} / \text{stand time} + \text{swing time (足を地につけている時間} + \text{足を動かしている時間)}$ により算出され、痛みの評価に用いられている[72], [73]。Catwalkを用いてwalking track analysisと同様にSFIを求めるとともに、足跡データから回復の経過をステージ2)踵落とし歩行群：踵のみをついて歩行しているマウス、ステージ3)末端麻痺群：末端まで回復ができておらず第1趾と第5趾に力が入らないために踵も検出されるマウス、ステージ4)正常歩行：指先の検出がされ、かつ踵が検出されないマウスとして、段階評価した。

2.3 結果

2.3.1 PEG 鎖長とコンドロイチン硫酸の有無による mRNA 発現効率の変化

mRNA 導入における遺伝子担体としてミセルが有効であることを示すため、Luc 発現 mRNA を導入し、IVIS によって発現を確認した(図 14)。mRNA を naked のまま投与した群や市販されている遺伝子導入薬である PEI や PAsp(DET)のような、PEG を持たないホモポリマーによって導入した場合、投与後すぐの段階ではごくわずかではあるが発現が確認された。しかしながら、その発現はホモポリマーでは3日後には確認できなくなり、naked で投与した場合には1週間には発現が確認できなかった。

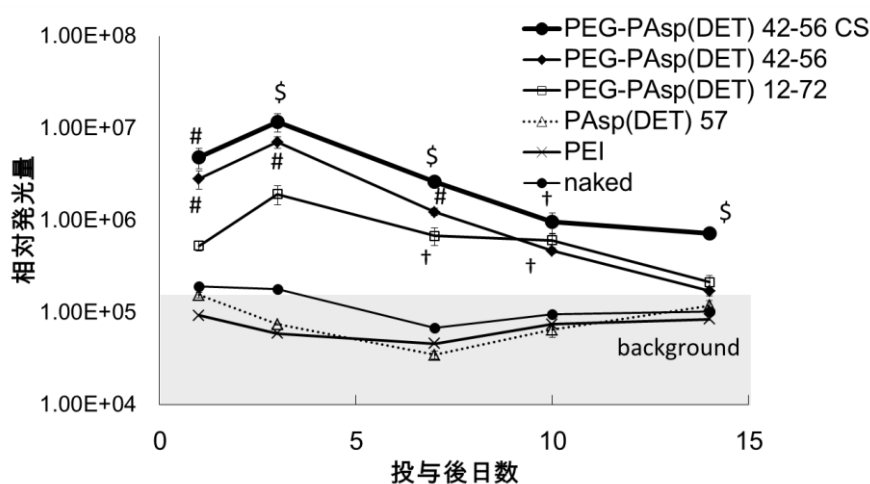


図 14 Luc 発現遺伝子投与後の遺伝子発現のキャリア間比較

ルシフェラーゼ発現 mRNA を投与して 1、3、7、10、14 日後における各薬剤投与群の相対発光量を示した。データは平均値±標準誤差(n=4)を示す。PAsp(DET) 42-56 によりミセル化し、さらにコンドロイチン硫酸を加えて投与した群では有意に高い発現を示し続けた。\$P < 0.05 vs. PEG-PAsp(DET) 42-56、PEG-PAsp(DET) 12-72、PAsp(DET) 57、#P < 0.05 vs. PEG-PAsp(DET) 12-72、PAsp(DET) 57、PEI、naked、saline、PEI、naked、†P < 0.05 vs. PAsp(DET) 57、PEI、naked を示す。

一方、PEG-PAsp(DET)を用いてミセル化して導入した場合には、PEGの鎖長によらず、2週間の発現が確認された。さらに、PEGの分子量が42,000となるPEG-PAsp(DET)では、投与1日後、3日後、7日後において、他のPEG-PAsp(DET)12-72やホモポリマーを用いた場合やnakedのまま投与した群と比較して、有意に高い発現を示した。さらに、コンドロイチン硫酸を加えてmRNAを導入すると、mRNAの発現量が増加するだけでなく、発現期間が長期化し、投与3週後も発現を確認することが可能であることが示された(図15)。また、5週後には発現は確認されなかった。これらから、mRNAを筋肉に対して導入するミセルは、PEG鎖長が42,000のポリマーを用いてコンドロイチン硫酸を加えて作成することとした。

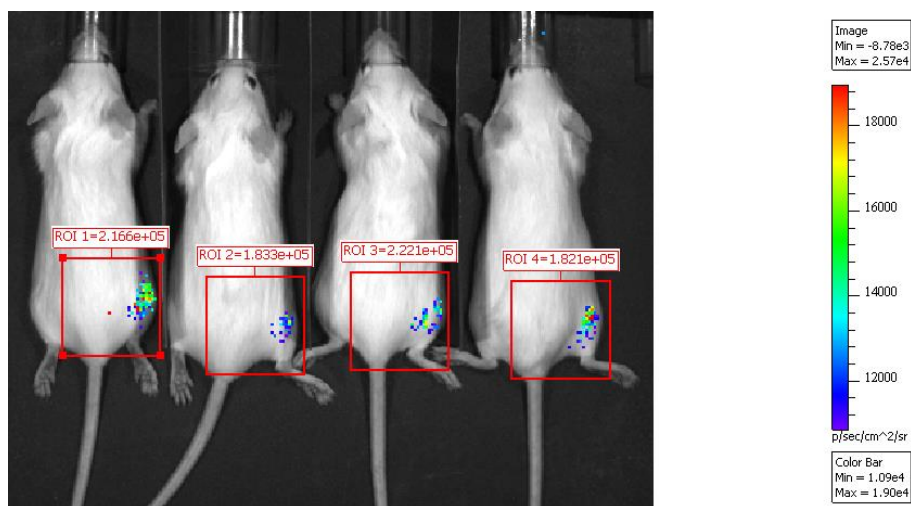


図15 21日後におけるPEG-PAsp(DET)42-56 CS群の発光

ルシフェラーゼ発現mRNAを投与から21日後においても、PEG-PAsp(DET)42-56とCSを用いてmRNAを導入したマウスでは発光が確認された。

2.3.2 ミセル化による導入 mRNA の残存量の定量

ミセル化により導入した mRNA が保護されていることを確認するため、Luc 発現 mRNA を投与した後、下腿三頭筋を摘出し、残存 mRNA 量を PCR により定量した(図 16)。投与 10 分後における mRNA の残存量は、ミセル化して投与した場合には PEI や naked で投与した時と比較して有意に多いことが確認された。さらに、naked の状態で投与した場合には 1 日後には検出できなかったのに対して、PEG-PAsp(DET)によってミセル化して投与した場合には 7 日後でも mRNA が残っていることが確認された(ミセルで投与した場合の 10 分後と比較して $2.2 \pm 1.4\%$)。これにより、ミセル化することによって mRNA が体内の酵素による分解から保護されていることが示された。

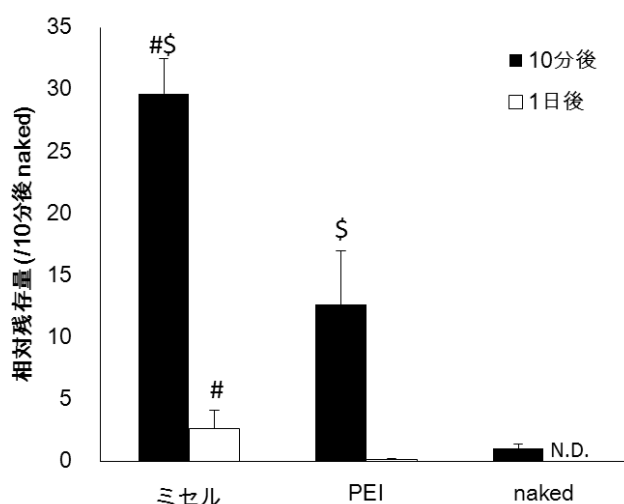


図 16 Luc 発現 mRNA 投与後の mRNA 残存量の定量

Luc 発現 mRNA を投与して 10 分後および 1 日後における mRNA 残存量を定量 PCR によって定量した。データは投与 10 分後の naked 投与群における残存量を 100% とし、平均値 ± 標準誤差 (n=4) を示す。PAsp(DET) 42-56 によりミセル化し、さらにコンドロイチン硫酸を加えて投与した群では有意に高い量の mRNA が定量された。#P < 0.05 vs. PEI、\$P < 0.05 vs. naked を示す。

2.3.3 IGF-1 発現 mRNA の導入による筋制御因子の発現上昇

IGF-1 発現 mRNA を導入してから 3 日後、7 日後における筋制御因子の mRNA 量を PCR によって定量した(図 17)。3 日後において、mRNA をミセル化して投与した群では IGF-1、myomaker、myoD がコントロール群よりも有意に高い発現を示した。myogenin についても、有意差はでなかったが、mRNA 量が多い傾向を示した。IGF-1 発現 mRNA を naked のまま投与した群でも myomaker は無投与群よりも有意に高い発現を示したが、他の因子については無投与群とほぼ同等であった。IGF-1 発現 pDNA を投与した群では、IGF-1 と myomaker については無投与群よりも有意に高い発現を示したが、myogenin や myoD といった、筋肥大に関与する因子については無投与群との間に有意差は見られなかった。7 日後においては、IGF-1 発現 mRNA をミセルによって投与した群では IGF-1、myomaker、myogenin、myoD のすべての因子が無投与群や saline 投与群と比較して有意に高い発現を示した。mRNA を naked で投与した群や pDNA をミセルで投与した群では、saline 投与群や無投与群と比較して myomaker の発現が有意に高い値を示した。

2.3.4 ハイドロダイナミクス法による薬剤投与と炎症

mRNA を投与した際の免疫応答を評価するため、IL-6 を定量 PCR によって定量した。mRNA を naked で投与した群では、IL-6 の発現量が有意に多いことが示された。

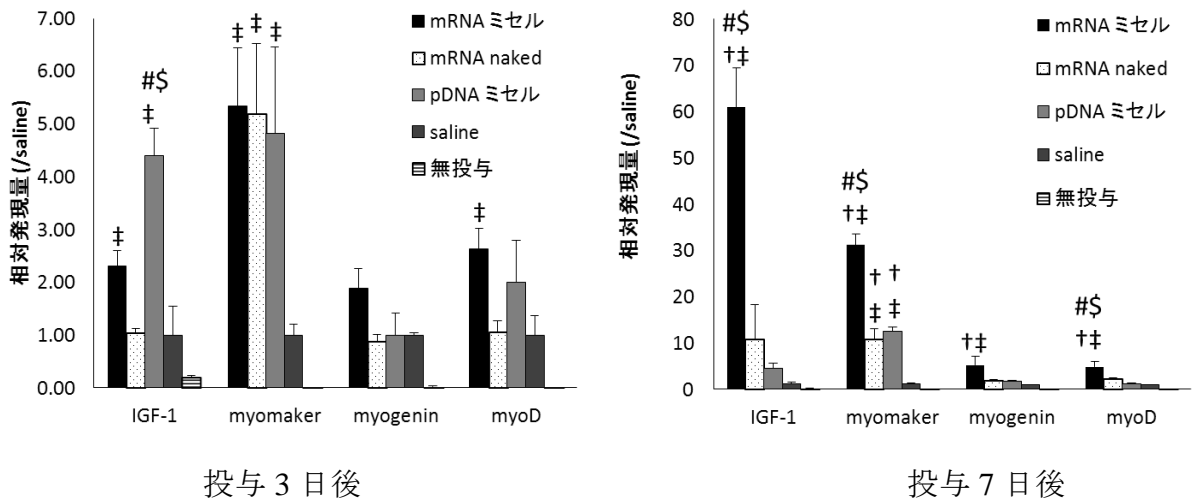


図 17 薬剤投与後における筋制御因子の発現

薬剤投与後の下腿三頭筋での IGF-1、myomaker、myogenin、myoD の発現量を定量 PCR により定量し、saline 投与群を基準としてデータは平均値+標準誤差(n = 4)で示した。#P < 0.05 vs. mRNA naked、\$P < 0.05 vs. pDNA ミセル、†P < 0.05 vs. saline、‡P < 0.05 vs. 無投与を示す。

(図 18)。組織切片においても、mRNA を naked で投与した群にのみ炎症が生じている様子が確認された(図 19)。これらにより、mRNA をミセル化して投与することにより、免疫応答を緩和することができたことが示された。

2.3.5 ハイドロダイナミクス法により導入された遺伝子の発現分布

ハイドロダイナミクス法により導入された mRNA が広く分布し発現することを確認するため、GFP 発現 mRNA を導入して生体内共焦点顕微鏡で観察した。核が筋繊維の辺縁部に位置するとともに、血管が筋繊維を覆い、筋繊維の内部において GFP が発現していることが確認された(図 20)。

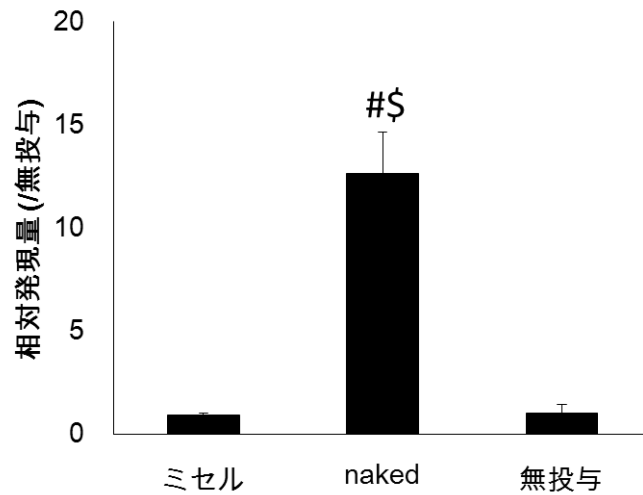


図 18 mRNA 投与 3 日後における IL-6 の定量

mRNA の投与 3 日後に下肢筋を摘出し、IL-6 の mRNA 量を定量した。データは平均値+標準誤差(n = 4)を示す。#P < 0.05 vs. mRNA micelle、\$P < 0.05 vs. control を示す。

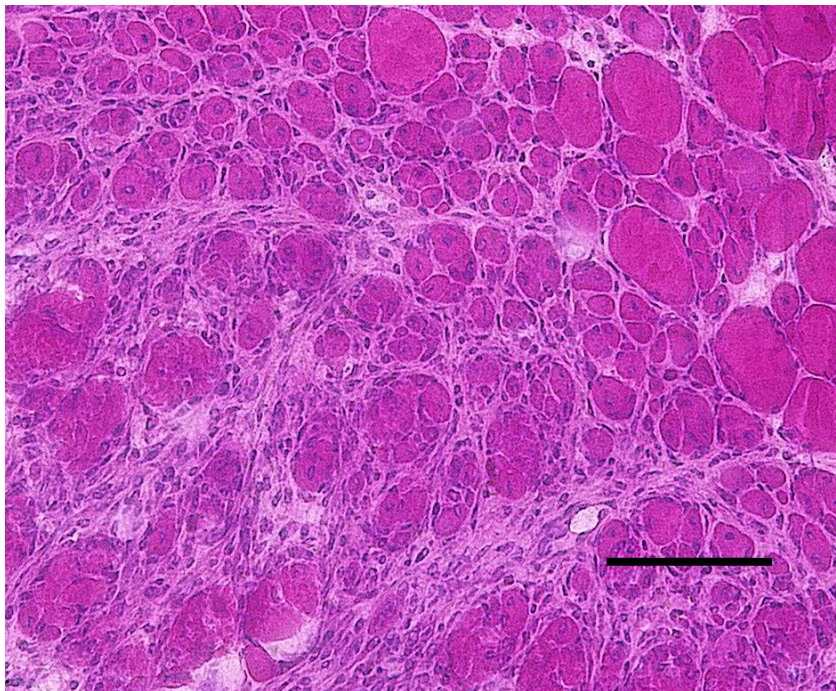


図 19 mRNA を naked にて投与および末梢神経圧挫 7 日後の下腿三頭筋の組織切片

IGF-1 発現 mRNA を naked で投与したマウスでは、炎症を起こしている様子が確認された。

Bar: 100 μ m

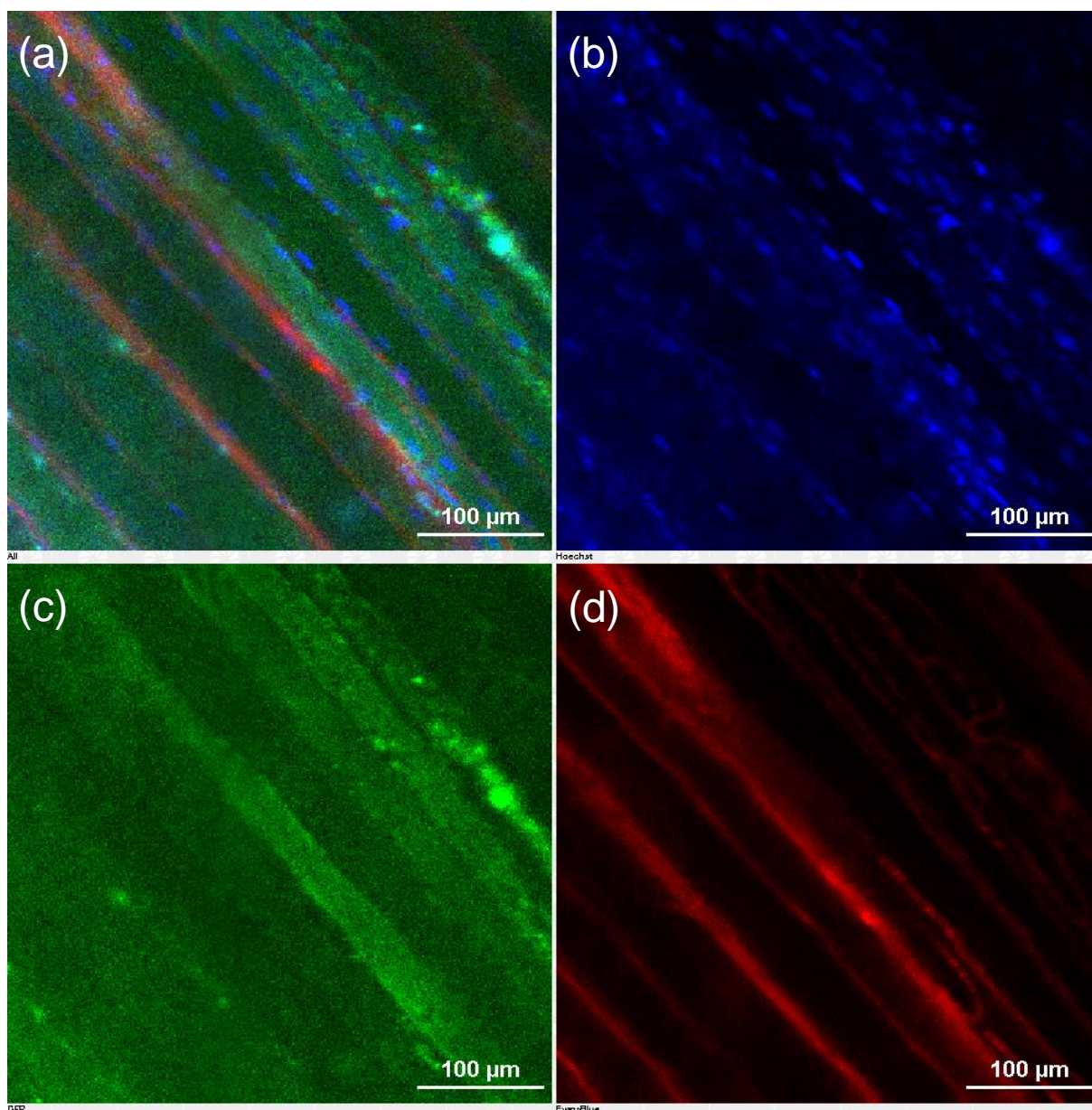


図 20 筋組織における GFP の分布

GFP 発現 mRNA をミセル化して投与した 3 日後に生体内共焦点顕微鏡を用いて GFP の分布を観察した。(a)merge, (b)Hoest 33342 による核染色,(c) GFP, (d) エバンスブルーによる血管染色を示す。

2.3.6 IGF-1 発現 mRNA の導入の筋重量への影響

IGF-1 発現 mRNA を導入することにより、末梢神経圧挫後の筋萎縮が軽減されることを示すため、薬剤投与および神経圧挫の7日後に下腿三頭筋を摘出し、筋重量を計測するとともに、垂直断面の組織切片をとり、筋繊維の断面積を評価した。

筋重量を計測すると、IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した群では IGF-1 発現 mRNA を投与した群や saline 投与群と比較して有意に萎縮が軽減されていることが確認された。また、IGF-1 発現 pDNA を投与した時と比較すると、有意差は得られなかったが、筋重量比に差がある傾向が見られる(図 21)。

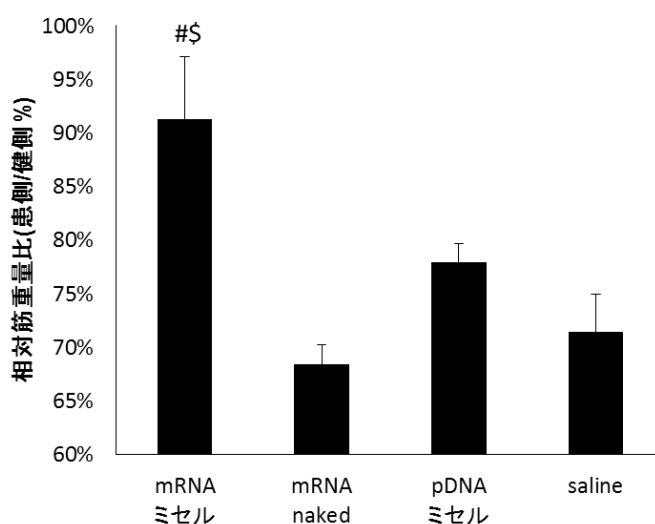


図 21 末梢神経圧挫7日後における下腿三頭筋の筋重量比(患側/健側%)

IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した群、naked のまま投与した群、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した群、saline を投与した群において、坐骨神経圧挫の7日後に右脚(患側)および左脚(健側)の下腿三頭筋を摘出し、重量を計測した。データは平均値+標準誤差(n=4)を示す。#P < 0.05 vs. mRNA naked 群、 \$P < 0.05 vs. saline 群を示す。

末梢神経圧挫後の筋萎縮の軽減効果を細胞レベルで確認するため、坐骨神経圧挫および薬剤投与の7日後に下腿三頭筋の垂直断面を取得し、筋繊維の断面積を評価した(図 22、図 23)。IGF-1 発現 mRNA をミセルで投与された群では、それ以外の IGF-1 発現 mRNA を naked で投与された群、IGF-1 発現 pDNA を投与された群、および saline を投与された群と比較して、筋繊維断面積が有意に大きかった。従って、ミセル化とハイドロダイナミクス法により効率的に導入された IGF-1 発現 mRNA は、筋原性制御因子の発現を向上させることにより、筋萎縮を軽減させた、と考えられる。

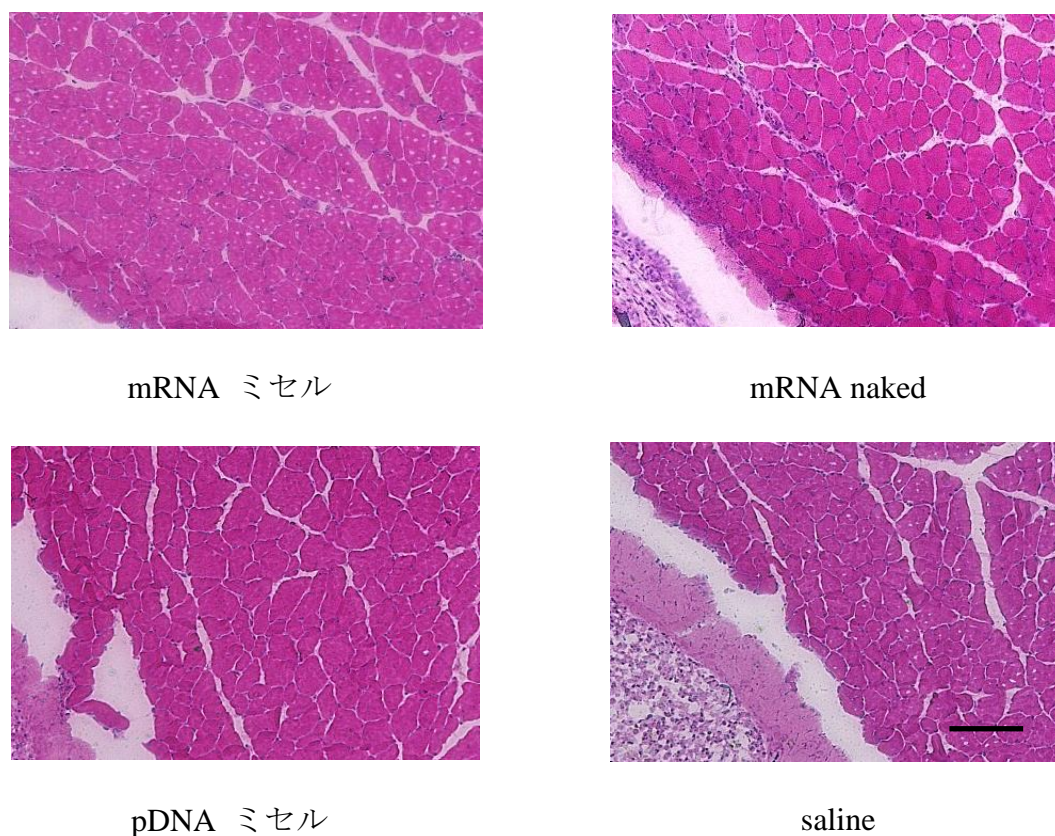


図 22 末梢神経圧挫 7 日後の下腿三頭筋の組織切片

IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した群、naked のまま投与した群、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した群、saline を投与した群において、坐骨神経圧挫の 7 日後の下腿三頭筋の垂直断面の凍結切片を得た。Bar: 100 μ m

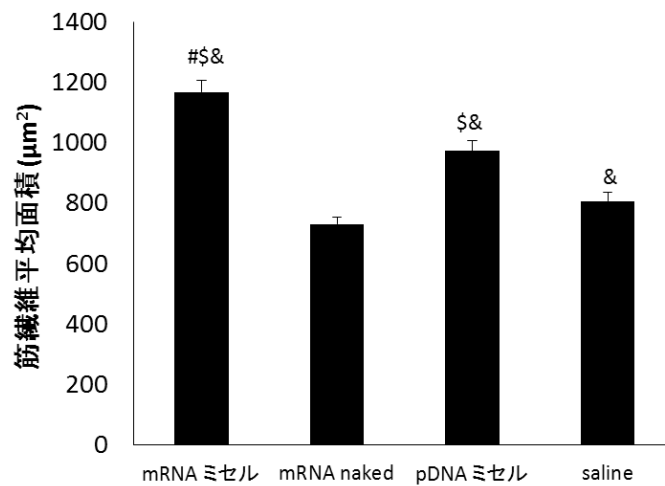


図 23 末梢神経圧挫 7 日後の下腿三頭筋の筋繊維断面積

IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した群、naked のまま投与した群、IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した群、saline を投与した群において、坐骨神経圧挫の 7 日後に下腿三頭筋を摘出し、筋繊維の断面積を計測した。データは平均値+標準誤差(n=4)で示した。#P<0.05 vs. pDNA ミセル群、\$P<0.05 vs. saline 投与群、&P<0.05 vs. mRNA naked 群を示す。

2.3.7 IGF-1 発現 mRNA による運動機能回復評価

Catwalk を用いて運動機能の回復評価を行った。坐骨神経圧挫の 10 日後まではすべてのマウスで機能回復は見られなかった。その後、IGF-1 発現 mRNA を投与されたマウスは他の群のマウスに比べて有意に速い回復を示した(図 24)。

さらに、Catwalk によって得られる指標の 1 つである duty cycle について評価を行った。坐骨神経圧挫の 10 日後に IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した群では Luc 発現 mRNA を投与した群に対して有意に高い値を示している(図 25)。Duty cycle は足を地面につけている時間を、足を地面につけている時間と足を浮かせている時間の和で割った値であることから、この値が正常値よりも小さいことは知覚異常であること

を意味する。したがって、IGF-1 発現 mRNA を投与することにより、知覚を早期に回復させたと言える。

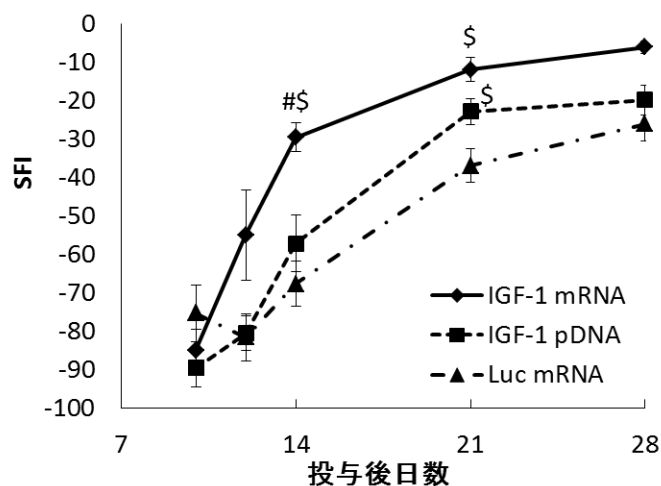


図 24 末梢神経圧挫後の運動機能回復の経過

IGF-1 発現 mRNA をミセル化した群、IGF-1 発現 pDNA を投与した群、Luc 発現 mRNA をミセル化して投与した群のそれぞれにおいて、SFI を算出した。データは平均値±標準誤差(n = 8)を示す。#P < 0.05 vs. IGF-1 pDNA 群、 \$P < 0.05 vs. Luc mRNA 群を示す。

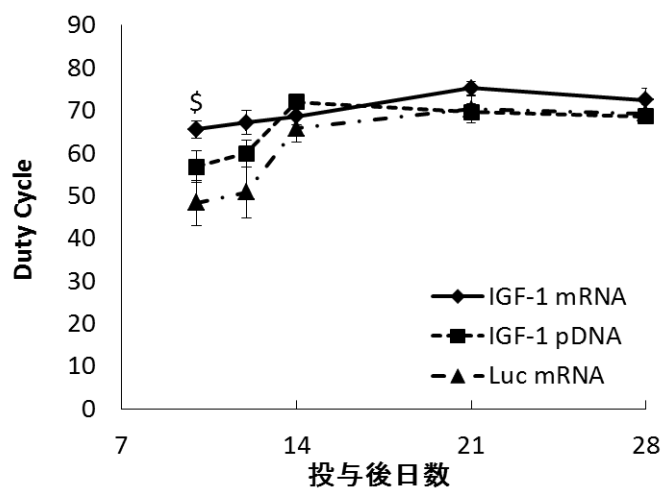


図 25 末梢神経圧挫後の患肢における duty cycle 値の評価

IGF-1 発現 mRNA をミセル化した群、IGF-1 発現 pDNA を投与した群、Luc 発現 mRNA をミセル化して投与した群のそれぞれにおいて、duty cycle 値(=standing time/(standing time + swing time))を得た。データは平均値±標準誤差(n = 8)を示す。\$P < 0.05 vs. Luc mRNA 群を示す。

また、得られた足跡により、坐骨神経損傷後のマウスは 1)パタパタ歩行、2)踵落とし歩行、3) 末端麻痺、4)正常歩行の 4 段階を経て回復する様子が確認された。末梢神経に損傷が生じると、まずは力を加えられない状態となるが、これは圧に応じた皮膚の色の変化を検出する Catwalk では検出することが難しいが、回復が進むにつれて、図 26(左)のように、踵に力がかかるように歩くようになる様子が確認された。この時点では足の爪先の感覚はないか、あるいはあっても力を加える事ができないため、踵のみが検出される。機能の回復が進むと、つま先に力を入れることができるようになるが、それが十分ではない段階では図 26(中)のようになる。この段階では、足を接地するときに踵に荷重をかけるが、蹴りだしにおいて十分な力がかけられない。さらに回復が進むと、図 26(右)のように、足を接地する瞬間に最大圧を示し、その後ほぼ一定の圧力のまま蹴り出す。これは、マウスの正常歩行では常に第 1 趾と第 5 趾に力を入れ、四指基部とで体を支えているためである。末梢神経圧挫後の回復の経過において、それぞれの段階にいるマウスの数をカウントし、正常回復を示した日をそのマウスのスコアとした(図 27)。IGF-1 発現 mRNA を投与した群では Luc 発現 mRNA を投与した群に比べて 10 日後から 21 日後まで、継続してより回復状態が良いことを示している。また、IGF-1 発現 pDNA を用いた場合でも、10 日後や 21 日後では Luc 発現 mRNA 投与群よりもより回復状態が良いことを示した。

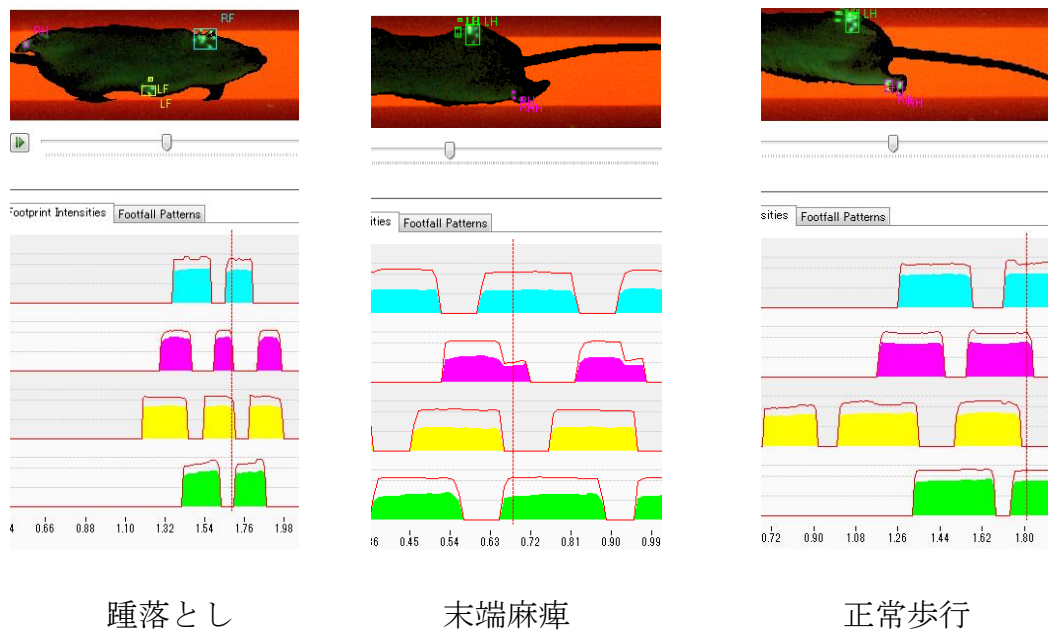


図 26 Catwalk を用いた足跡パターンからの回復経過分析

末梢神経圧挫後、運動機能が回復する過程を Catwalk により同定した。上部は歩行しているマウスの様子を、下部はマウスの足にかかっている圧力を時間軸で示したもので、上から順に右前肢、右後肢、左前肢、左後肢を示す。

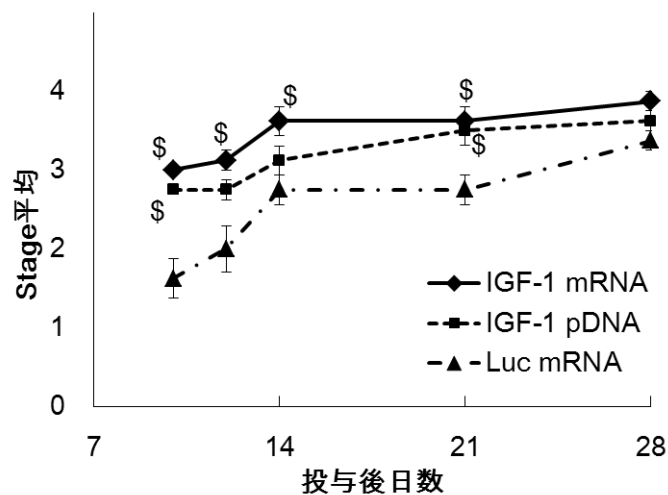


図 27 末梢神経圧挫後の薬剤投与マウスにおける回復の経過

IGF-1 発現 mRNA をミセル化した群、IGF-1 発現 pDNA を投与した群、Luc 発現 mRNA をミセル化して投与した群のそれぞれにおいて、回復の stage を決定した。データは平均値±標準誤差(n = 8)を示す。\$P < 0.05 vs. Luc mRNA 群を示す。

2.4 考察

当研究室で開発された筋への pDNA の導入法を mRNA に応用、改良することにより、高効率かつ長期の発現を得られる骨格筋への mRNA の導入法を確立した。

PEG の分子量が 12,000 のものと 42,000 のものでは 42,000 を用いてミセル化した時のほうが mRNA の発現量が増加することが示された(図 14)。これは、PEG 鎖長が長いものを用いた時のほうが、1 つの mRNA あたりの PEG の分子量が増加し、PEG の密度が増加することによって mRNA を保護する機能が高められたためであると考えられる[74]。さらに、CS を加える事によって発現の長期化を可能とした。これは、ミセル化の際には正電荷を帯びたポリマーを等電点よりも過剰になるように加えているが、この過剰なポリマーが細胞毒性をもつ可能性があるのに対して、CS により電荷バランスを取り、過剰なポリマーによる毒性を抑えたことによる効果であると考えられる[43]。細胞毒性が抑えられたことは、mRNA を naked で投与した場合に見られた炎症がミセル化することにより緩和されたことから確認される(図 18、 図 19)。

mRNA の導入において、naked 核酸の発現を上昇させるハイドロダイナミクス法単独では投与後 3 日しか発現が確認できなかったが[41]、投与法の最適化を行うことにより、3 週間後でも発現が確認できた(図 15)。これは、筋肉においては mRNA の分解に寄与する polyA binding protein 1 の発現が他の臓器に比べて少ないためであると考えられる。しかしながら、polyA binding protein 1 は筋の再生時にはその発現が上昇する

ことが知られており、遺伝子の導入時にはいかなる手法を用いても何らかの形で筋に傷害を及ぼすこと、および本研究においてミセルで mRNA を投与した場合でもその残存量が投与 1 日後に急激に減少したことが示されていることから、polyA binding protein 1 の発現が高い間、ミセルによって mRNA を分解から保護したことが長期の発現につながった、と考えられる。このように、ミセルによって長期の発現が得られるという知見は、不安定であることが薬剤として利用する上での課題であった mRNA による遺伝子導入を考える上で、重要であると言える。

ハイドロダイナミクス法を用いて薬剤を投与したマウスの下肢筋肉において、筋の再生において膜に発現する myomaker が[67] 高い発現を示したことは、ハイドロダイナミクス法は一時的かつ軽微ではあるが、筋障害を生じさせるためであると考えられる(図 17、図 19)。また、mRNA をミセル化して投与した場合に、3 日後においては myoD の発現は有意に高かったが myogenin の発現は高い傾向があるのにとどまったものが、7 日後ではどちらも有意に高い発現を示した(図 17)。これは、筋の増殖、分化においては、myoD が myogenin に先行して発現するためであると考えられる[75], [76]。IGF-1 発現 pDNA をミセル化して導入した場合と比較しても、IGF-1 発現 mRNA を投与した群は投与 7 日後には IGF-1 や myoD が有意に高い発現を示した。

また、ハイドロダイナミクス法を用いて mRNA を導入した際には、核を辺縁部に持つ筋細胞の内部で GFP の発現が確認され、筋細胞を覆う血管では GFP の発現はほ

ば確認されなかった(図 20)。このことから、本研究で用いた投与方法による mRNA 導入は主に筋細胞をターゲットとしていると考えられる。

導入遺伝子としての mRNA は pDNA と比較して核への移行や分裂を必要としないため発現までのプロセスが短く、導入後から速やかに機能すると考えられる。この結果として、筋萎縮を軽減したほか(図 21、 図 23)、末梢神経圧挫モデルマウスに対して mRNA を導入した場合に、pDNA に比較して運動機能で有意差のある早期の回復が得られた(図 24)。Duty cycle の値から、IGF-1 発現 mRNA は IGF-1 発現 pDNA よりも早期の回復を示唆しているほか(図 26)、Catwalk において末梢神経損傷後の回復経過を評価したところ、IGF-1 発現 mRNA を導入した場合には IGF-1 発現 pDNA を用いて導入した場合よりも常により良い回復傾向にあることが示された(図 27)。回復経過では、IGF-1 発現 pDNA を用いた群では投与 12 日後、14 日後に Luc 発現 mRNA を用いた群と有意差がなく、IGF-1 発現 mRNA に比べて回復が遅れている。これは、mRNA を用いると、pDNA よりも早期の回復が得られることを示唆している。

IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した場合には 35 日後には発現が確認されなくなっており、IGF-1 が恒常的に発現することによって副作用をもたらす、という危険性も低いと考えられる。筋萎縮軽減、運動機能回復、知覚回復のいずれも早期から効果が得られていることから、治療に必要なタンパク発現も得られているものと考えられる。したがって、本研究で用いた mRNA を用いた遺伝子導入法は、早期から、

治療期間のみ必要な遺伝子発現を得ることができる手法となりうることを示したと言える。

3 全体考察

本研究では、核酸を用いた遺伝子治療の可能性を示した。pDNA、mRNA のいずれの核酸を用いても、坐骨神経圧挫モデルにおける運動機能および知覚の回復促進効果が得られた。

坐骨神経損傷後において、大腿四頭筋では筋が萎縮するにあたり、大小不同が確認されるとともに、筋繊維の間隔が広がっている様子が確認された(図 7)。下腿三頭筋では群萎縮を起こしている様子が確認された (図 19)。これは、坐骨神経は下腿の筋肉を支配しており[77]、坐骨神経損傷後に生じる筋萎縮は、大腿四頭筋では廃用性筋萎縮、下腿三頭筋においては脱神経性筋萎縮が生じているためであると考えられる。廃用性筋萎縮を生じた筋では IGF-1 の発現が減少するのに対し[78]、神経原性筋萎縮である脊髄性筋萎縮症や筋萎縮性側索硬化症において、筋肉内における IGF-1 の発現については特に変化がないことが報告されている[79], [80]。従って、大腿四頭筋と下腿三頭筋において IGF-1 や myogenin, myoD の発現に差が見られた(図 5)のは、ハイドロダイナミクス法による投与において部位によって圧力差が生じたためだけでなく、筋萎縮のメカニズムの違いにより saline 投与群や無投与群における遺伝子発現に差が生じていたことも 1つの要因であると考えられる。

筋繊維断面積の比較では mRNA を用いた場合のほうが pDNA を用いた場合よりも筋萎縮がより軽減されていることが確認された。SFI を用いた運動機能回復では、

IGF-1 発現 pDNA をミセル化して投与した場合には、 β -gal 発現 pDNA や Luc 発現 mRNA をミセル化して投与した群よりも速い回復を示している。IGF-1 発現 pDNA よりも早い運動機能回復を示した IGF-1 発現 mRNA は、最も早い機能回復を実現したと言える。Catwalk により得られる動画の解析でも、mRNA による治療群は早い機能回復を示した。Duty cycle の指標を用いることで、IGF-1 発現 mRNA をミセル化して投与した場合には、プラセボである Luc 発現 mRNA を投与した場合と比較して有意に早期に知覚の回復を示した。IGF-1 発現 pDNA を投与しても早期に回復する傾向はあるが、それよりも早い回復を示す傾向があることから、mRNA による遺伝子治療が pDNA を用いた遺伝子治療に比べて早期に薬効をもたらすことができると言える。末梢神経損傷後に mRNA を投与したマウスが pDNA を投与したマウスよりも早期の回復を示したのは、治療に用いた pDNA がタンパクに翻訳されるまでには核への移行や mRNA への転写、そして翻訳と多くの段階を経る必要があるのに対して、mRNA を投与した場合にはそのまま翻訳され、早期からタンパク発現が得られたためであると考えられる。

また、pDNA を導入した場合には投与後 4 週にわたる遺伝子発現が確認され、投与後 2 週から 4 週にかけては発現がほとんど減少しない傾向がみられているが[42]、本研究においては半減期が短いとされる mRNA を用いて 3 週にわたる発現を確認したものの、5 週間には発現が得られなくなっていた。このことは、pDNA を用いた遺

伝子治療ではホストゲノムへのランダムな挿入があり、副作用をもたらす危険性がある一方で、不安定で遺伝子治療の薬剤として用いるには不向きとされてきた mRNA でも長期の薬効を期待することができる上、治療後に発現が生じることがないことを示唆している。

IGF-1 タンパクは 1 mg あたり 4 万円程度で購入可能であるが、実際に治療に使用する場合には複数回の投与を必要とする。タンパク医薬は mg 単位での投与を必要とするため、治療期間が 3 週であったとして、IGF-1 BP3 と結合した際の半減期が 10 時間程度であることを考慮し、1 日 2 回、2 mg 投与を行うとすると、その薬剤費用は 336 万円にのぼる。投与した IGF-1 が IGF-1 BP3 と結合する前に分解されてしまう可能性を考慮すると、その薬剤費用はさらに高価となる。一方、ARCA Cap 構造を有する mRNA 1 mg を作成するためにかかる費用は 35 万円程度である。また、ロシアにおいて認可されている遺伝子治療用の pDNA である Neovasculgen (VEGF を発現する pDNA) は筋肉に導入することを目的としているが、おおよそ 2 mg が投与されている [81]。本研究の予備実験において、導入核酸として mRNA を導入した場合のタンパク発現は、同質量の pDNA を導入した場合よりも高いことが確認されたことや、Neovasculgen を末梢神経損傷に対して 1.2 mg 投与する治験が行われようとしていることなどから、末梢神経損傷に対しても本研究のような IGF-1 発現 mRNA を導入する際には 1 mg 程度の mRNA で治療可能であると考えられる。マウス同様 3 週程度の

発現が得られるとすると、投与は1回で、ミセル作成に必要なポリマーは100円/mg程度、コンドロイチン硫酸は10円/mg未満であることから、その薬剤費用は40万円程度となる。また、mRNAは酵素反応によって作成することが可能であるため、実際に薬剤として使用されることとなり、大量に作成する場合にはさらなるコストダウンが見込まれる。このように、核酸を用いた遺伝子治療は、タンパク投与に比べて投与回数が少なく、患者負担や医療コストを下げることができるが、pDNAを用いた場合には宿主ゲノムへの挿入による、死亡を含めた重大な副作用をもたらす危険性を含んでいた。これに対して本研究で用いたmRNAの投与法は、pDNAを用いた場合と同様に薬剤の投与回数を減らすことができるだけでなく、pDNAの持つ問題であった宿主ゲノムへの挿入の問題を解決し、かつpDNAを用いた場合と比較して早期からの治療効果を得ることができると示された。特に、遺伝子治療にmRNAを用いて3週間もの発現を示した研究は他になく、mRNAを用いても十分長期な治療効果が得られることを示した本研究はmRNAを用いた遺伝子治療を実現するにあたり重要である。

核酸としてpDNAを用い血中のsFlt-1を増加させた報告[42]のように、効率よくタンパクを発現する筋をターゲットとしてmRNAを導入すると、本研究による知見は、末梢神経損傷のみならず、他の疾患の治療法にもなりうる。従って、本研究は遺伝子治療の実現に向けて、重要な知見を示したものといえる。

4 引用文献

- [1] K. Nagata, K. Itaka, M. Baba, S. Uchida, T. Ishii, and K. Kataoka, “Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury,” *J. Control. Release*, vol. 183, no. 1, pp. 27–34, 2014.
- [2] K. J. Wangenstein and L. K. Kallianen, “Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis,” *Hand (N. Y.)*, vol. 5, no. 3, pp. 273–7, 2010.
- [3] D. Grinsell and C. P. Keating, “Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–13, 2014.
- [4] V. T. Ribeiro-Resende, A. Carrier-Ruiz, R. M. R. Lemes, R. a M. Reis, and R. Mendez-Otero, “Bone marrow-derived fibroblast growth factor-2 induces glial cell proliferation in the regenerating peripheral nervous system,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 7, p. 34, 2012.
- [5] S. Barati, P. R. Hurtado, S. H. Zhang, R. Tinsley, I. a Ferguson, and R. a Rush, “GDNF gene delivery via the p75(NTR) receptor rescues injured motor neurons,” *Exp. Neurol.*, vol. 202, no. 1, pp. 179–88, 2006.

- [6] V. J. Tom, H. R. Sandrow-Feinberg, K. Miller, C. Domitrovich, J. Bouyer, V. Zhukareva, M. C. Klaw, M. a. Lemay, and J. D. Houlé, “Exogenous BDNF enhances the integration of chronically injured axons that regenerate through a peripheral nerve grafted into a chondroitinase-treated spinal cord injury site,” *Exp. Neurol.*, vol. 239, pp. 91–100, 2013.
- [7] A. Brockington, C. Lewis, S. Wharton, and P. J. Shaw, “Vascular endothelial growth factor and the nervous system,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 427–446, Oct. 2004.
- [8] F. R. Pereira Lopes, B. C. G. Lisboa, F. Frattini, F. M. Almeida, M. a Tomaz, P. K. Matsumoto, F. Langone, S. Lora, P. a Melo, R. Borojevic, S. W. Han, and a M. B. Martinez, “Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy.,” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 600–12, 2011.
- [9] M. B. Alzghoul, D. Gerrard, B. a Watkins, and K. Hannon, “Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo.,” *FASEB J.*, vol. 18, no. 1, pp. 221–3, 2004.
- [10] F. Mourkioti and N. Rosenthal, “IGF-1, inflammation and stem cells:

interactions during muscle regeneration,” *Trends Immunol.*, vol. 26, no. 10, pp. 535–542, 2005.

[11] A. Musarò, K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, G. Dobrowolny, M. Molinaro, E. R. Barton, H. L. Sweeney, and N. Rosenthal, “Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle.,” *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 2, pp. 195–200, Feb. 2001.

[12] G. R. Adams and S. a McCue, “Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 84, no. 5, pp. 1716–1722, 1998.

[13] a F. Aguiar, I. J. Vechetti-Júnior, R. W. Alves de Souza, E. P. Castan, R. C. Milanezi-Aguiar, C. R. Padovani, R. F. Carvalho, and M. D. P. Silva, “Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats.,” *Int. J. Sports Med.*, vol. 34, no. 4, pp. 293–301, 2013.

[14] E. D. Rabinovsky, “Targeted Expression of IGF-1 Transgene to Skeletal Muscle Accelerates Muscle and Motor Neuron Regeneration,” *FASEB J.*, vol. 17, no. 1, pp. 53–55, Nov. 2002.

[15] P. J. Apel, J. Jun, M. Callahan, C. N. Northam, T. B. Alton, W. E. Sonntag, and Z. Li, “Regeneration During Aging : an Experimental Study,” *Muscle Nerve*, vol.

41, no. 3, pp. 335–341, 2011.

[16] H. P. Guler, J. Zapf, C. Schmid, and E. R. Froesch, “Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates.,” *Acta Endocrinol. (Copenh)*., vol. 121, no. 12, pp. 753–8, 1989.

[17] R. C. Baxter and J. L. Martin, “Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function,” *Prog Growth Factor Res*, vol. 1, no. 1, pp. 49–68, 1989.

[18] S. L. Ginn, I. E. Alexander, M. L. Edelstein, M. R. Abedi, and J. Wixon, “Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update,” *J. Gene Med.*, vol. 15, no. 2, pp. 65–77, Feb. 2013.

[19] E. R. Barton-Davis, D. I. Shoturma, a Musaro, N. Rosenthal, and H. L. Sweeney, “Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 26, pp. 15603–15607, 1998.

[20] B. K. Kaspar, J. Lladó, N. Sherkat, J. D. Rothstein, and F. H. Gage, “Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model.,” *Science*, vol. 301, no. 5634, pp. 839–842, 2003.

[21] N. I. H. Response, P. D. Possibly, A. To, T. H. E. Use, O. F. An, and a D.

Vector, “Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee.,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 13, no. 1, pp. 3–13, 2002.

[22] T. Hollon, “Researchers and regulators reflect on first gene therapy death,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 129, no. 5, p. 701, 2000.

[23] M. Cavazzana-Calvo, “Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease.,” *Science (80-.)*, vol. 288, no. 5466, p. 669, 2000.

[24] S. Hacein-Bey-Abina, “LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1,” *Science (80-.)*, vol. 302, no. 5644, pp. 415–419, Oct. 2003.

[25] S. Hacein-Bey-Abina, J. Hauer, A. Lim, C. Picard, G. P. Wang, C. C. Berry, C. Martinache, F. Rieux-Laucat, S. Latour, B. H. Belohradsky, L. Leiva, R. Sorensen, M. Debré, J. L. Casanova, S. Blanche, A. Durandy, F. D. Bushman, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo, “Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 4, pp. 355–364, Jul. 2010.

[26] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen, “Lipofection: a highly efficient,

lipid-mediated DNA-transfection procedure.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 21, pp. 7413–7417, 1987.

[27] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. a Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 16, pp. 7297–301, 1995.

[28] Y. H. Kim, J. H. Park, M. Lee, Y.-H. Kim, T. G. Park, and S. W. Kim, "Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier," *J. Control. Release*, vol. 103, no. 1, pp. 209–219, 2005.

[29] S. C. De Smedt, J. Demeester, and W. E. Hennink, "Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems," vol. 17, no. 2, 2000.

[30] S. Moghimi, P. Symonds, J. Murray, a Hunter, G. Debska, and a Szewczyk, "A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy," *Mol. Ther.*, vol. 11, no. 6, pp. 990–995, 2005.

[31] A. Beyerle, M. Irmeler, J. Beckers, T. Kissel, and T. Stoeger, "Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications," *Mol. Pharm.*, vol. 7, no. 3, pp. 727–737, 2010.

[32] K. Kataoka, a Harada, and Y. Nagasaki, "Block copolymer micelles for

drug delivery: design, characterization and biological significance.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 1, pp. 113–131, 2001.

[33] K. Osada, R. J. Christie, and K. Kataoka, "Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery," *J. R. Soc. Interface*, vol. 6, no. Suppl_3, pp. S325–S339, 2009.

[34] K. Miyata, N. Nishiyama, and K. Kataoka, "Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2562–2574, 2012.

[35] N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. Il Chung, and K. Kataoka, "A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells.," *ChemMedChem*, vol. 1, no. 4, pp. 439–444, 2006.

[36] K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, and K. Kataoka, "Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 48, pp. 16287–16294, 2008.

- [37] K. Itaka and K. Kataoka, "Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 3, pp. 475–483, 2009.
- [38] K. Itaka, T. Ishii, Y. Hasegawa, and K. Kataoka, "Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3707–14, 2010.
- [39] K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U.-I. Chung, and K. Kataoka, "Gene delivery with biocompatible cationic polymer: pharmacogenomic analysis on cell bioactivity.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5169–75, 2007.
- [40] T. Takahashi, K. Ishida, K. Itoh, Y. Konishi, K.-I. Yagyu, a Tominaga, J.-I. Miyazaki, and H. Yamamoto, "IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model.," *Gene Ther.*, vol. 10, no. 8, pp. 612–20, 2003.
- [41] F. Liu, Y. Song, and D. Liu, "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA.," *Gene Ther.*, vol. 6, no. 7, pp. 1258–1266, 1999.
- [42] K. Itaka, K. Osada, K. Morii, P. Kim, S. H. Yun, and K. Kataoka, "Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle," *J. Control. Release*, vol. 143, no. 1, pp. 112–119, 2010.

- [43] S. Uchida, K. Itaka, Q. Chen, K. Osada, K. Miyata, T. Ishii, M. Harada-Shiba, and K. Kataoka, "Combination of chondroitin sulfate and polyplex micelles from Poly(ethylene glycol)-poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} block copolymer for prolonged in vivo gene transfection with reduced toxicity," *J. Control. Release*, vol. 155, no. 2, pp. 296–302, 2011.
- [44] Q. L. Lu, G. Bou-Gharios, and T. a Partridge, "Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory.," *Gene Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 131–142, 2003.
- [45] H. M. Blau and M. L. Springer, "Muscle-Mediated Gene Therapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 23, pp. 1554–1556, Dec. 1995.
- [46] J. Sjöberg and M. Kanje, "Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve.," *Brain Res.*, vol. 485, no. 1, pp. 102–108, 1989.
- [47] T. Kawamoto, "Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants.," *Archives of histology and cytology*, vol. 66, no. 2. pp. 123–143, 2003.
- [48] T. Kawamoto and M. Shimizu, "A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues.,"

Histochem. Cell Biol., vol. 113, no. 5, pp. 331–339, 2000.

[49] M. M. Inserra, D. a. Bloch, and D. J. Terris, “Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse,” *Microsurgery*, vol. 18, no. 2, pp. 119–124, 1998.

[50] M. L. Graham, J. L. Janecek, J. a. Kittredge, B. J. Hering, and H. J. Schuurman, “The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: Differences between animals from different sources,” *Comp. Med.*, vol. 61, no. 4, pp. 356–360, 2011.

[51] M. Nakamura-Craig and R. L. Follenfant, “Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE₂ and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes.,” *Pain*, vol. 63, no. 1, pp. 33–37, 1995.

[52] Y. Choi, Y. W. Yoon, H. S. Na, S. H. Kim, and J. M. Chung, “Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain.,” *Pain*, vol. 59, no. 3, pp. 369–376, 1994.

[53] P. Muangman, L. a Muffley, J. P. Anthony, M. L. Spenny, R. a Underwood, J. E. Olerud, and N. S. Gibran, “Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice,” *Wound Repair Regen.*, vol. 12, no. 1, pp. 44–52, 2004.

[54] J. M. Kennedy and D. W. Zochodne, “Impaired peripheral nerve

regeneration in diabetes mellitus,” *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS*, vol. 10, no. 2, pp. 144–157, 2005.

[55] G. Zhang, X. Gao, Y. K. Song, R. Vollmer, D. B. Stolz, J. Z. Gasiorowski, D. a Dean, and D. Liu, “Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery.,” *Gene Ther.*, vol. 11, no. 8, pp. 675–682, 2004.

[56] J. Hagstrom, “A Facile Nonviral Method for Delivering Genes and siRNAs to Skeletal Muscle of Mammalian Limbs,” *Mol. Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 386–398, 2004.

[57] T. B. Seo, M.-J. Oh, B.-G. You, K.-B. Kwon, I.-A. Chang, J.-H. Yoon, C.-Y. Lee, and U. Namgung, “ERK1/2-Mediated Schwann Cell Proliferation in the Regenerating Sciatic Nerve by Treadmill Training,” *J. Neurotrauma*, vol. 26, no. 10, pp. 1733–1744, Oct. 2009.

[58] S. E. Hankinson, W. C. Willett, G. a Colditz, D. J. Hunter, D. S. Michaud, B. Deroo, B. Rosner, F. E. Speizer, and M. Pollak, “Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer.,” *Lancet (London, England)*, vol. 351, no. 9113, pp. 1393–6, 1998.

[59] R. Baserga, F. Peruzzi, and K. Reiss, “The IGF-1 receptor in cancer biology,” *Int. J. Cancer*, vol. 107, no. 6, pp. 873–877, 2003.

- [60] U. Sahin, K. Karikó, and Ö. Türeci, “mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 10, pp. 759–80, 2014.
- [61] S. Üzgün, G. Nica, C. Pfeifer, M. Bosinco, K. Michaelis, J. F. Lutz, M. Schneider, J. Rosenecker, and C. Rudolph, “PEGylation improves nanoparticle formation and transfection efficiency of messenger RNA,” *Pharm. Res.*, vol. 28, pp. 2223–2232, 2011.
- [62] A. Yamamoto, M. Kormann, J. Rosenecker, and C. Rudolph, “Current prospects for mRNA gene delivery.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 3, pp. 484–9, 2009.
- [63] G. Tavernier, O. Andries, J. Demeester, N. N. Sanders, S. C. De Smedt, and J. Rejman, “mRNA as gene therapeutic: How to control protein expression,” *J. Control. Release*, vol. 150, no. 3, pp. 238–247, 2011.
- [64] D. Weissman and K. Karikó, “mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy,” *Mol. Ther.*, vol. 23, no. 9, pp. 1416–1417, 2015.
- [65] M. Baba, K. Itaka, K. Kondo, T. Yamasoba, and K. Kataoka, “Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles,” *J. Control. Release*, vol. 201, pp. 41–48, 2015.
- [66] S. Uchida, K. Itaka, H. Uchida, K. Hayakawa, T. Ogata, T. Ishii, S.

Fukushima, K. Osada, and K. Kataoka, “In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56220, 2013.

[67] D. P. Millay, J. R. O’Rourke, L. B. Sutherland, S. Bezprozvannaya, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby, and E. N. Olson, “Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. (Supp),” *Nature*, vol. 499, no. 7458, pp. 301–5, 2013.

[68] D. P. Millay, L. B. Sutherland, R. Bassel-duby, and E. N. Olson, “Myomaker is essential for muscle regeneration Myomaker is essential for muscle regeneration,” pp. 1641–1646, 2014.

[69] A. Bozkurt, R. Deumens, J. Scheffel, D. M. O’Dey, J. Weis, E. a. Joosten, T. Führmann, G. a. Brook, and N. Pallua, “CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 173, no. 1, pp. 91–98, 2008.

[70] R. Deumens, G. C. Koopmans, W. M. M. Honig, F. P. T. Hamers, V. Maquet, R. Jérôme, H. W. M. Steinbusch, and E. a J. Joosten, “Olfactory ensheathing cells, olfactory nerve fibroblasts and biomatrices to promote long-distance axon regrowth and functional recovery in the dorsally hemisectioned adult rat spinal cord.,” *Exp*

Neurol, vol. 200, no. 1, pp. 89–103, 2006.

[71] C. F. Vogelaar, D. H. Vrinten, M. F. M. Hoekman, J. H. Brakkee, J. P. H. Burbach, and F. P. T. Hamers, “Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome.” *Brain Res.*, vol. 1027, no. 1–2, pp. 67–72, 2004.

[72] M. Miyagi, T. Ishikawa, H. Kamoda, M. Suzuki, Y. Sakuma, S. Orita, Y. Oikawa, Y. Aoki, T. Toyone, K. Takahashi, G. Inoue, and S. Ohtori, “Assessment of Pain Behavior in a Rat Model of Intervertebral Disc Injury Using the Catwalk Gait Analysis System,” *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 38, no. 17, pp. 1459–1465, 2013.

[73] S. S. Parvathy and W. Masocha, “Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund’s adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system.” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 14, no. 1, p. 14, 2013.

[74] T. a. Tockary, K. Osada, Q. Chen, K. Machitani, A. Dirisala, S. Uchida, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Itaka, K. Nitta, K. Nagayama, and K. Kataoka, “Tethered PEG crowdedness determining shape and blood circulation profile of polyplex micelle gene carriers,” *Macromolecules*, vol. 46, no. 16, pp. 6585–6592, 2013.

[75] W. E. Wright, D. a Sassoon, and V. K. Lin, “Myogenin, a factor regulating

myogenesis, has a domain homologous to MyoD,” *Cell*, vol. 56, no. 4, pp. 607–617, 1989.

[76] N. Zanou and P. Gailly, “Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, no. 21, pp. 4117–4130, 2013.

[77] C. dric J. Laedermann, M. Pertin, M. R. Suter, and I. Decosterd, “Voltage-gated sodium channel expression in mouse DRG after SNI leads to re-evaluation of projections of injured fibers,” *Mol. Pain*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2014.

[78] B. Awede, J. P. Thissen, P. Gailly, and J. Lebacqz, “Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle,” *FEBS Lett.*, vol. 461, pp. 263–267, 1999.

[79] M. Bosch-Marce, C. D. Wee, T. L. Martinez, C. E. Lipkes, D. W. Choe, L. Kong, J. P. Van Meerbeke, A. Musaro, and C. J. Sumner, “Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 9, pp. 1844–1853, 2011.

[80] R. M. Evans, S. D. R. Harridge, C. P. Velloso, S. Y. Yang, G. Goldspink, and R. W. Orrell, “Investigation of MGF mRNA expression in patients with

amyotrophic lateral sclerosis using parallel in vivo and in vitro approaches.”

Amyotroph. Lateral Scler., vol. 11, no. 1–2, pp. 172–7, 2010.

[81] J. M. Isner, A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, T. Asahara, K. Rosenfield, S. Razvi, K. Walsh, and J. F. Symes, “Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb,” *Lancet*, vol. 348, pp. 370–374, 1996.

5 謝辞

本研究の遂行にあたり、学部より7年にわたって材料科学や医工学など、様々な視点からのご意見を賜り、ご指導ご鞭撻をいただいた片岡一則教授に謹んで御礼申し上げます。

鄭雄一教授をはじめ、学位審査をご担当いただきました芳賀信彦教授、伊藤大知准教授、渡辺昌文講師、泉谷昌志講師には多くの貴重なご教示を頂きました。深く御礼申し上げます。

位高啓史准教授には、詳細な実験方法、データの解釈、学会発表、論文指導など、研究に関して、数多くの丁寧なご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

内田智士助教、内田寛邦助教、石井武彦さん、馬場美雪さん、守井克江さん、小倉里美さんには日々の実験において様々なご指導、ご協力を頂きました。深く感謝いたします。