

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14934

研究課題名(和文)次世代細胞内動態制御技術としてのサテライト階層型ナノ粒子の創製

研究課題名(英文)Development of nano satellite-organized architecture as a technology to control an intracellular trafficking

研究代表者

秋田 英万 (Akita, Hidetaka)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：80344472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：人工遺伝子ベクターを用いた効率的な遺伝子導入技術の開発を目的とし、複数の機能性素子(細胞に特異的に取り込まれるリガンドやオルガネラを標的化するリガンド)を最大限に利用可能とする階層性を持ったナノ構造体の構築を試みた。環境感受性脂質様物質ssPalmを基盤材料とし、中性ナノ粒子をオリゴDNAの相補鎖形成により複合体化することで、階層性を持つ構造体を創製した。複数種の異なる粒子から構成される本複合体は細胞により単一の粒子として認識され取り込まれることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：For the development of efficient gene carrier, hierarchically ordered nano-architecture on which functional devices (ligand for specific tissues/cells/organelles) could be placed in desired manner was formulated. Environment sensitive lipid like material which we refer as to SS-cleavable Proton-Activated Lipid-like Material (ssPalm) was employed as a basis of nano-architecture. The hierarchical nano-architecture, Nano-size Satellite-type Organized Lipid-nanoparticle Assembly (Nano-SOLA), was fabricated via double strand formation of PEGylated complementary oligo DNA. The Nano-SOLA composed of multiple primary particles were recognized as one complex by the cells.

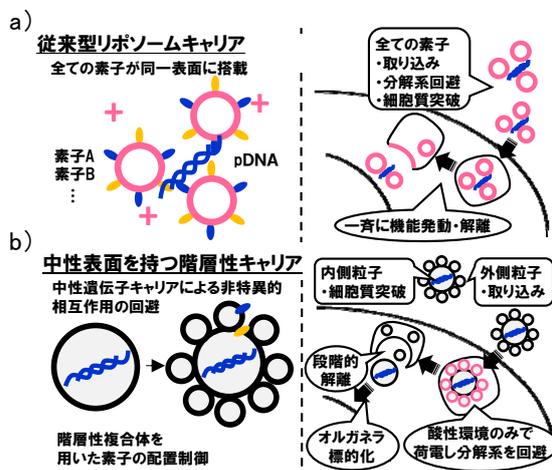
研究分野：薬剤学

キーワード：細胞内動態 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

(1) 人工遺伝子ベクターを用いた効率的な遺伝子導入技術の開発を目的とし、生体バリアを突破するための様々な『機能性素子』が開発されてきた。機能性素子は体内動態制御素子と細胞内動態制御素子に大別される。体内動態制御素子としては、細網内皮系からの捕食を回避するための水溶性ポリマー修飾や、標的組織細胞の膜表面に特異的に存在する分子に対するリガンドが存在する。リガンドの例としては各種膜タンパクに対する抗体や、腫瘍血管内細胞に高発現する $\alpha V \beta 3$ インテグリンに対する環状 RGD ペプチド、飢餓時の脳血管内皮細胞に発現するグルコーストランスポーターに対するグルコースが挙げられるが、これらはごく一部に過ぎない。細胞内動態制御素子はエンドソーム脱出促進素子とオルガネラ標的化素子に大別される。エンドソーム脱出促進素子としては、インフルエンザウイルスの膜蛋白質を模倣した GALA ペプチドなどが挙げられ、オルガネラ標的化素子としては Nuclear Localization Signal (NLS) や Mitochondria Transport Signal (MTS) 等、細胞内シグナル配列の利用が盛んである。

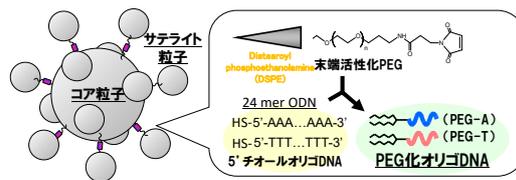
(2) リポソームあるいはエマルションに対し上記の素子を修飾する場合、機能性素子と脂溶性足場を結合させ、疎水性相互作用により表面に挿入する戦略がとられる。本修飾方法は単一の機能性素子を用いる場合は問題とならないが、複数の機能性素子を用いる場合には、全ての素子がキャリア表面に同時に提示されるという問題を引き起こす。全ての素子が同一の表面に存在する場合、静電的相互作用や疎水性相互作用による素子間の非特異的な相互作用が懸念されるほか、機能性素子の機能発動と解離が一斉に起きるため、それぞれの素子の動態制御能を最大限に活用することが出来ない。複数の機能性素子を利用したナノ粒子の動態制御を達成するためには、機能性素子の配置を厳密に制御可能な構造体が必須となる。



2. 研究の目的

(1) 本研究では、搭載素子の時空間的に制御された機能発動を達成するため階層性を持つ遺伝子キャリアの創成を目的とする。具体的には、遺伝子内封コア粒子の周囲に超微小ナノ粒子を集合させた、『電荷的に中性』なサテライト型ナノ構造体 (Nano-size Satellite-Organized Lipid Architecture; nanoSOLA) を創成する。電荷的に中性な膜を形成するための材料として、申請者が独自に開発した脂質様材料 (SS-cleavable and pH-activated lipid-like material: ssPalm) を用いた。

Nano-size Satellite-type Organized Lipid-nanoparticle Assembly (Nano-SOLA)



3. 研究の方法

(1) Nano-SOLA の構成成分であるサテライト粒子について、貧溶媒添加時の塩濃度や緩衝液組成を検討し微小粒子の作成条件を探索した。調製される微小粒子の内部物性や界面物性を評価した。

(2) ナノ粒子階層化を達成するための材料として核酸の脂質コンジュゲートを調製した。これらの素子をナノ粒子と混合することで安定的な表面修飾が行える条件を探索した。

(3) 相補配列を有する核酸脂質コンジュゲートを粒子径の異なる粒子に修飾し、相補鎖形成を行うことで Nano-SOLA を構築した。Nano-SOLA を物理化学的特性の面から解析した。さらに、蛍光標識 Nano-SOLA を細胞へ作用させた際の挙動を解析した。

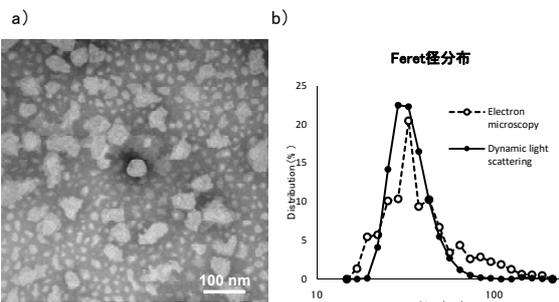
4. 研究成果

(1) サテライト粒子の創成と物性評価 ssPalm は人工的に開発された両親媒性分子であり、核酸キャリアの基盤技術として研究が進められてきた。極性頭部として第三級アミンを有する本脂質は中性表面を持つ遺伝子キャリアを形成可能とする。遺伝子キャリアの表面からカチオン性を排除することにより、生体成分との静電的相互作用が減弱し、血中における凝集や転写・翻訳の阻害といった悪影響を回避できる。pH 感受性脂質により形成されるナノ粒子の物理化学的特性は、脂質からなるリポソームなど、他のナノ粒子に比べ研究が遅れており、特に核酸非存在下における pH 感受性脂質の性質はほとんど知られていない。本項では pH 感受性脂質として ssPalm を用い、pH 感受性脂質のみからなるサテライト粒子の物理化学的特性を明らか

とすることを目的とした。

①ssPalm は常温常圧下において無色透明の油液状の性状を取る。ssPalm の巨視的な pH 感受性を観察したところ、中性緩衝液に重層した ssPalm は緩衝液と相分離状態を維持した一方で、酸性緩衝液に重層した ssPalm は攪拌により白濁した分散液を形成することが明らかとなった。本分散液は酸性条件下でプロトン化されて界面活性作用を得た ssPalm が、自身からなる油相を安定化することで形成した自己エマルジョンであると考えられる。本エマルジョンを中性条件下で安定化するため、ポリエチレングリコール修飾脂質、コレステロールを加えエタノール希釈法により粒子を調製した。本方法はアンチソルベント法の一つであり、脂質の良溶媒であるエタノールへ緩衝液を添加することで、Ouzo 効果を利用しエマルジョンを形成させる方法である。粒子形成の際に加える緩衝液を pH3.0 程度の酸性とし、氷温で粒子形成を行うことで 34~40 nm の粒子径を持ち、200 時間以上安定に存在するエマルジョン（サテライト粒子）を創製した。

②透過型電子顕微鏡を用いネガティブ染色像を観察した。その結果、本粒子はリポソームのベシクル構造とは異なり、内水層を持たない油滴構造を持つことが明らかとなった。

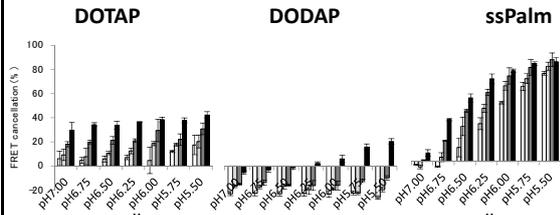


③サテライト粒子の界面物性を蛍光色素 Laurdan により解析した。その結果、本粒子の界面は酸性条件下で流動性を獲得すること、および弱酸性領域におけるサテライト粒子の極性は予想外にも二相性を示すことが明らかとなった。後者は一般的な脂質膜では起きえない現象であり、現在までに報告もないことから、pH 感受性脂質に特有の現象であると考えられる。

③アシル部位の流動性を蛍光色素 DPH により解析した。その結果、界面とは異なり、内部は pH に対する感受性を示さず常に流動的であることが明らかとなった。

④細胞内動態を効率的に制御するためには、Nano-SOLA の最外層を形成するサテライト粒子がエンドソーム膜と効率よく融合できることが望ましい。そこでモデルエンドソーム膜との融合能を評価した。その結果、ssPalm からなるサテライト粒子は、中性条件下では膜融合能を全く示さないが、エンドソーム内 pH では 90%以上の膜融合効

率を示すことが明らかとなった。この膜融合効率は、従来型カチオン性脂質 (DOTAP) や pH 感受性脂質 (DODAP) に比べ優れていることが明らかとなった。



以上より、ssPalm からなるサテライト粒子の物性を明らかにするとともに、Nano-SOLA の構成材料として適することを見出した。

(2) 脂質核酸コンジュゲートの開発

本項では、脂質からなるナノ粒子表面に対し DNA を提示するため、脂質と核酸のコンジュゲートを開発した。

①脂質核酸コンジュゲートの開発は、末端活性化 PEG 脂質とチオール修飾オリゴ DNA の不可反応により行った。研究開始当初は T_m 値が高く、安定な二本鎖を形成可能なポリグアニン-ポリシトシンペア (20 mer) で合成を試みた。しかし、ポリグアニンの溶解性が問題となって脱保護反応が進行しないことが明らかとなったため使用を断念した。

②そこで、核酸のペアをポリアデニン-ポリチミンペアに変更した。この変更により二本鎖の安定性に問題が生じたため、塩基数を延長すること (24 mer) により解決を試みた。緩衝液や共存界面活性剤、反応温度を検討し、脂質核酸コンジュゲートを合成した。本コンジュゲート体は、サテライト粒子あるいはコア粒子と混合し 60℃でインキュベーションすることにより、その表面に修飾可能である。

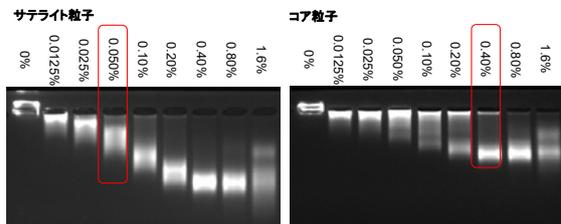
以上より、複数種の粒子を複合体化するための分子として脂質核酸コンジュゲートの開発に成功した。

(3) Nano-SOLA の創成

ナノ粒子のアセンブリーは、従来から DNA ナノテクノロジーと組み合わせられてきた。特に、金ナノ粒子はその凝集状態により吸光波長が変化する特性を持つため、特定の配列を持つ DNA を検出する試みがなされてきた。また、金ナノ粒子同士の相対配置を厳密に制御することによる結晶形成や、6 nm 程度の金ナノ粒子をクラスター化し、見かけの粒子径を増大させ、生体投与時に尿中排泄を回避する DDS 戦略が報告されている。脂質ナノ粒子の場合にも、DNA ナノテクノロジーとの組み合わせは試みられてきたが、その応用については、DNA の検出技術への応用や、SNARE タンパク質を模した膜融合の誘起などに限定されている。本項では前項で示した脂質コンジュゲート修飾ナノ粒子を複合体化し、階層性を持つナノ構造体の創成を行った。

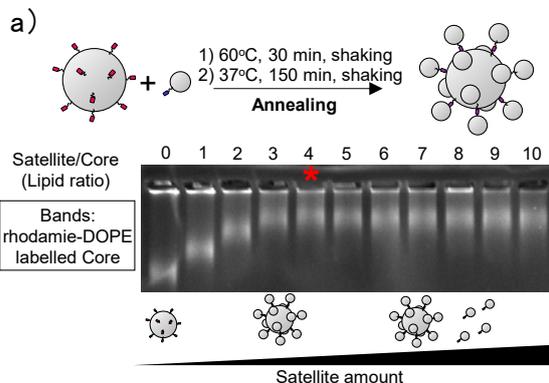
①Nano-SOLA の階層性構造を作成するために

は、コア粒子の周囲をサテライト粒子で被覆できるように、コア粒子上には修飾できる最大量のオリゴ DNA を修飾する必要がある。一方、形成した Nano-SOLA の最外部には余剰の DNA が存在しないことが望ましい。そこで、コア粒子についてはコンジュゲートの修飾量が飽和に達する点を選択した。サテライト

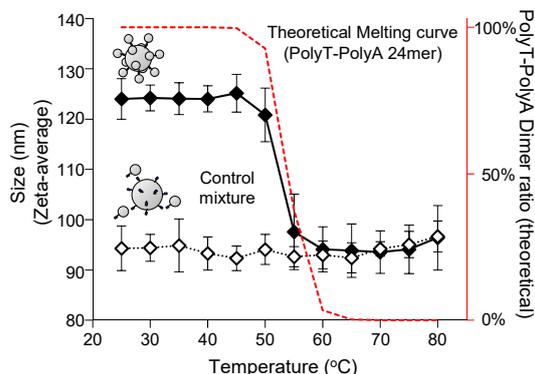


粒子については全ての粒子に一分子以上の核酸脂質コンジュゲートが存在する点を選択した。

②上記 2 種の粒子を混合し、加温のち放冷することで粒子径の増大が認められた。本結果は、粒子が DNA の二本鎖形成で架橋することにより複合体が形成することを見出している。コア粒子に対するサテライト粒子の量比を最適化し、過剰のサテライト粒子が存在しない条件を探索した。その結果、コア粒子とサテライト粒子の量比を、脂質モル比率で 1 : 4 とすることで過不足なく Nano-SOLA を形成可能であることが明らかとなった。

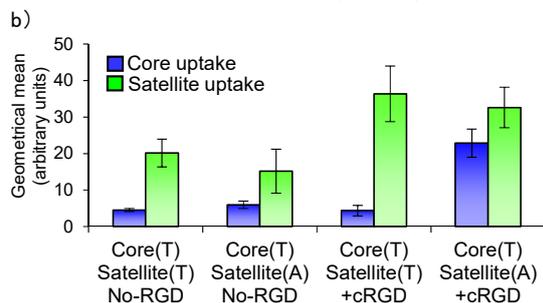
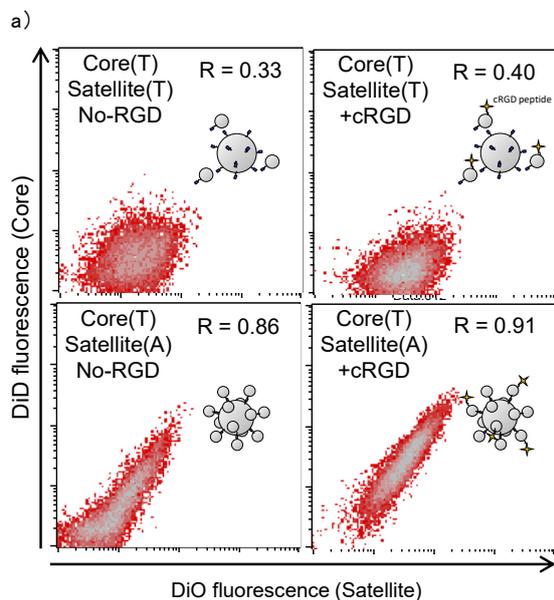


③Nano-SOLA の粒子径の温度依存性を解析した。90 nm 程度のコア粒子と 30 nm 程度のサテライト粒子からなる Nano-SOLA は平均して 120 nm 程度の粒子径を示した。本粒子を加温すると 55°C 付近で急激な粒子径低下が認められた。本挙動は、脂質核酸コンジュゲートの融解挙動と完全に一致するものであった。



また、減少後の粒子径が、コア-サテライト粒子混合物と同一であったことから、Nano-SOLA が DNA の二本鎖形成により物理的に結合していることが確認された。また、コア粒子とサテライト粒子の共沈が認められたことから物理的な結合が確認された。

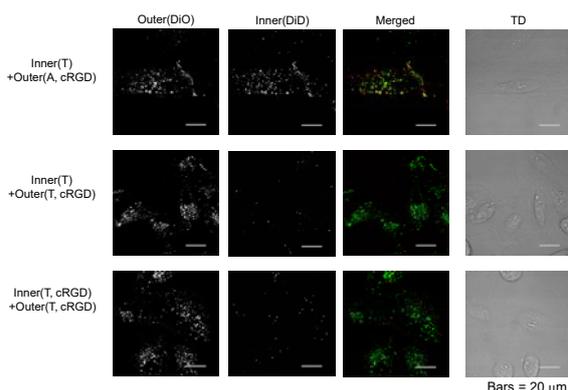
④コア粒子とサテライト粒子を異種の蛍光色素で修飾し、細胞との相互作用を認識した。この際、モデルリガンドとして cyclic RGD ペプチドを使用しサテライト粒子上に修飾した。コア粒子とサテライト粒子の蛍光をそれぞれ軸にとり細胞内取り込み量を展開すると、脂質核酸コンジュゲートのペアが相補の場合のみ、蛍光の相関関数が上昇した。本結果は、両粒子を Nano-SOLA として複合体化させることで、挙動が同期したことを示している。また、コア粒子に対する cyclic RGD ペプチドの効果が Nano-SOLA でのみ発揮されたことから、Nano-SOLA が機能性素子の配置を制御可能な階層性構造体であることが示唆された。



⑤最後に、Nano-SOLA の細胞内動態を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、細胞内においてもコア粒子とサテライト粒子の共局在が認められ、Nano-SOLA が単一の構造体として細胞に認識されることが明らかとなった。

以上より、脂質核酸コンジュゲートを介し二種のナノ粒子を物理的に複合体化することに成功した。また、本複合体が単一の粒子として細胞に認識されることや、機能性素子

の配置を制御可能であることを明らかとした。



(4) 総括

以上本研究では、pH感受性脂質を素材として用い30 nm程度の微小粒子調製法を確立するとともにその物性を明らかとした。また、脂質核酸コンジュゲートを開発し、二種のナノ粒子を複合体化することで Nano-sized Satellite-type Organized Lipid nanoparticle Assembly (Nano-SOLA)を開発した。本粒子はDNAの二本鎖形成を駆動力とし物理的に結合した粒子であり、単一の粒子として細胞に認識された。Nano-SOLAは特定の表面に任意の機能性素子を配置可能な構造体であることから、細胞内動態、ひいては体内動態を含めたナノ粒子の厳密な動態制御に有用なプラットフォームであると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Miura N, Akita H, Tateshita N, Nakamura T, Harashima H. Modifying Antigen-Encapsulating Liposomes with KALA Facilitates MHC Class I Antigen Presentation and Enhances Anti-tumor Effects. *Mol Ther.* 25(4):1003-1013 (2017)
- ② Tanaka H, Oasa S, Kinjo M, Tange K, Nakai Y, Harashima H, Akita H. Temperature and pH sensitivity of a stabilized self-nanoemulsion formed using an ionizable lipid-like material via an oil-to-surfactant transition. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 151:95-101 (2017)
- ③ Watanabe A, Tanaka H, Sakurai Y, Tange K, Nakai Y, Ohkawara T, Takeda H, Harashima H, Akita H. Effect of particle size on their accumulation in an inflammatory lesion in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model. *Int J Pharm.* 509(1-2):118-22 (2016)
- ④ Tanaka H, Sato Y, Harashima H, Akita H.

Cellular environment-responsive nanomaterials for use in gene and siRNA delivery: molecular design for biomembrane destabilization and intracellular collapse. *Expert Opin Drug Deliv.* 13(7):1015-27 (2016)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hidetaka Akita Particle formed with ssPalm as a multi-nanoDDS platform. 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo Nov. 28. 2016 Tokyo Univ.
- ② 秋田英万 細胞内環境応答性脂質様材料を基盤としたマルチ創剤基盤 日本薬物動態学会 第31回年会 2016年10月15日 松本
- ③ 田中浩揮 秋田英万 中性表面を持つ脂質ナノ液滴の体内動態と低分子薬物送達に関する検討 遺伝子・デリバリー研究会 第16回夏季セミナー 2016年9月12-13日 長崎
- ④ 秋田英万 【受賞講演】効率的な肝臓への siRNA デリバリーのためのビタミンE骨格、pH 応答性並びにジスルフィド結合開裂能を有する脂質様物質の分子チューニング 第16回油脂優秀論文賞受賞講演会(日本油化学会第55回年会) 2016年9月7日 奈良女子大学
- ⑤ 田中浩揮 秋田英万 中性表面を持つ脂質ナノ粒子の体内動態に関する検討 第32回日本DDS学会学術集会 2016年6月30日、7月1日 静岡
- ⑥ 田中浩揮 秋田英万 環境感受性脂質からなる微小液滴の体内動態解析 日本薬劑学会第31回年会 2016年5月19-21日 岐阜
- ⑦ 秋田英万 体内・細胞内動態の情報に基づくベクター開発と蛍光技術を用いたナノ粒子物性評価 日本薬学会 第136年会 2016年3月29日 横浜
- ⑧ 田中浩揮 秋田英万 細胞内環境感受性脂質からなるナノ粒子のセンシング機能評価 第25回インテリジェント材料/システムシンポジウム 2016年1月11日 東京女子医科大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakubutu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 英万 (AKITA, Hidetaka)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：86344472