

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800016

研究課題名(和文)機能性高分子による効率的なmRNAデリバリーシステムの創製

研究課題名(英文)Development of functional polycation for efficient mRNA delivery system

研究代表者

内田 寛邦(Hirokuni, Uchida)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：60637677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：核酸とポリカチオンの複合体(ポリプレックス)は治療用核酸キャリアとして期待されている。Messenger RNA (mRNA) はゲノム組み込みがなく、安全な治療用核酸として注目を集めているが、生体環境で分解されるため、効率的な導入は未だに困難である。そこで本研究では側鎖構造を僅かに変えたポリカチオンとmRNAのポリプレックスを作成し、それらのmRNA導入機構を比較することで、化学構造と導入能の相関を調べた。その結果、奇数回のアミノエチレン構造を有するポリカチオンは偶数回のものより高いmRNA導入能と細胞質内での安定性を示した。このような結果はさらなる高効率なキャリア設計に有益と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Polyion complexes formed from nucleic acids and polycations, which were termed polyplex, has been attracted attention because of their therapeutic potential. Messenger RNA (mRNA) was recognized as a new candidate for the safe nucleic acids drug because of no risk of mutagenesis. However mRNA possessed labile nature in physiological condition. Herein, we synthesized the polycations possessing slightly different chemical structure in their side chain and compared their mRNA delivery mechanism to get the insight for the design of polycations achieving safe and efficient mRNA delivery. In the results, the polycations possessing odd-numbered aminoethylene units in their side chain showed efficient mRNA delivery and higher cytoplasmic stability than those even one. We concluded that the fine-tuning of chemical structure of polycations can enhance the cytoplasmic stability and mRNA expression of polyplexes.

研究分野：科学

科研費の分科・細目：医用生体学・生体材料学

キーワード：mRNA ドラッグデリバリー 機能性高分子

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬はがんや遺伝性疾患などの難治性疾患を治療する次世代の治療法として期待されている。ただし、核酸は生体環境で容易に酵素によって分解されてしまうため、核酸を効率的に生体組織に運べるキャリアーの開発が必要である。このようなキャリアーの中でもポリカチオンと核酸の複合体(ポリプレックス)は内包する核酸の酵素分解を効率的に阻害し、かつ免疫刺激などの副作用も少なく安全に核酸を細胞へ導入できるため、盛んに研究がなされてきた。さらに、ポリカチオンの化学構造を様々に変えることによって、ポリプレックスの核酸導入能をさらに向上させることができる事が明らかとなり、ポリカチオンの化学構造と核酸導入機構の相関を調べる研究が近年注目されている。

ポリプレックスに内包する核酸医薬としては長らく plasmid DNA (pDNA)が使用されてきたが、ゲノムへの挿入によるがん誘起や非分裂細胞への導入が困難であるといった問題があった。そこで、pDNA に代わる核酸医薬候補として messenger RNA (mRNA)が注目されている。mRNA はゲノムへの挿入によるがん誘起の恐れもなく、非分裂細胞への導入も可能であり pDNA と比較して安全性に優れているという利点がある。しかし、一方で pDNA よりも、生理的環境下で不安定であり、かつ発現も一過的であるという問題が指摘されている。そのため、これら mRNA の問題点を克服するキャリアーの開発は安全な核酸医薬による難治性疾患の治療の臨床応用の実現するにあたって非常に重要であるといえる。

2. 研究の目的

安全な核酸医薬として近年 messenger RNA (mRNA)とポリカチオンからなるポリプレックスが注目されている。しかし、mRNA は生体環境で簡単に酵素分解を受

けてしまう点や、発現が一過的であるといった問題は未だに解決されていない。このような問題はそもそも、使用されているポリカチオンは従来の pDNA 導入に最適化されたものが大半であり、mRNA とポリカチオンの最適化やポリカチオンの化学構造とその導入機構の相関は未だにほとんど研究がなされていない。そこで本研究では mRNA 導入の問題を解決すべく、ポリカチオンの化学構造と mRNA の導入機構の相関を詳細に調べ、どのような化学構造を有していれば mRNA を安全かつ効率的に導入できるかを明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

mRNA ポリプレックスを作成するためのポリカチオンとして、側鎖に繰り返し数 1~4 回のアミノエチレン構造を有するポリアスパルタמידを合成した。同一主鎖かつ同一重合度のポリアスパルタמידの側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数のみを変えたポリカチオンを合成することで、アミノエチレン構造の繰り返し数がどのように mRNA 導入に影響するかを厳密に議論することが出来る。これらのポリアスパルタמידと mRNA からポリプレックスを作成し、培養ヒト肝がん細胞 (Huh-7)への mRNA 導入を行った。さらに、mRNA ポリプレックスの細胞毒性、取り込み量を評価した。さらに細胞内分布、細胞内安定性を共焦点レーザー顕微鏡観察から評価した。

さらに、ポリアスパルタמידと Polyethyleneglycol (PEG)のブロックコポリマーを合成し、このブロックコポリマーと mRNA から複合体を形成させた。こうすることで複合体の外側を生体適合性の高い PEG が覆ったミセルを形成させた。このミセルをマウス尾静脈から投与し、mRNA ミセルの血中滞留性を評価した。

4. 研究成果

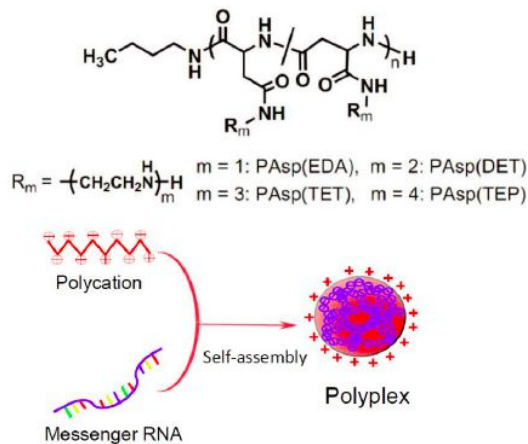


Figure 1 4種のポリカチオンとポリプレックス概要図

mRNA と側鎖のアミノエチレンの繰り返し数のみを4種のポリアスパルタמיד (Fig. 1)からポリプレックスを作成し、培養ヒト肝がん細胞(Huh-7)への mRNA 導入実験を行った。これらの導入効率において、ポリアスパルタמיד側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数が偶数か奇数かで大きく異なることが判明した。導入直後(~12h)では側鎖に偶数回のアミノエチレンの繰り返し数を有するポリアスパルタמיד (PA-Es)から作成したポリプレックスが高い発現を示すが、24h 以後の長時間培養後では PA-Es ポリプレックスの発現が頭打ちになるのに対し、奇数回を有するポリアスパルタמיד (PA-Os)から作成したポリプレックスの発現は持続し、48h 後では三回の繰り返しアミノエチレン構造を有するポリアスパルタמידから作成したポリプレックスが最大の発現を示した。これらのポリプレックスの細胞内動態を Cy3 修飾 mRNA から作成したポリプレックスを培養細胞に導入し、さらに細胞内酸性オルガネラを Lysotracker で染色後に共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察することで評価した。すると、PA-Es ポリプレックスは有意に PA-Os ポリプレックスよりも効率的に細胞質内へ移行していることが明らかとなっ

た。つまり、PA-Es はエンドソームから取り込まれたあとに効率的に細胞質へ移行するために、導入直後は高い発現を示したとかがえられる。さらに、細胞質移行後のポリプレックスの状態を評価するために、Cy5, Cy3 でダブルラベルした mRNA からポリプレックスを作成し、細胞導入後の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を CLSM 観察画像から測定することで、mRNA ポリプレックスの細胞質内安定性を評価したところ。すると、PA-Os ポリプレックスは PA-Es ポリプレックスよりも有意に細胞質内で安定な状態を長く保てることが判明した。このような結果は、PA-Os は細胞質内で安定であるために発現が持続したために、長時間培養後での発現が最大となり、一方で PA-Es は細胞質への移行は効率的だが細胞質内では不安定であるために発現が一過的になったと考えられる。

さらに、PA-O の持つ高い酵素分解耐性は生体環境下において mRNA を生体環境のターゲットへデリバリーするのに最適であると考え、ついでこれらのポリアスパルタמיד側鎖の生体適合性を上昇させるために末端に PEG 鎖を付与した PEG block ポリマーの合成を行った。これらの Block ポリマーと mRNA からミセルを作成し、Homo ポリマーから作成したポリプレックスと同様に側鎖構造依存的に内包 mRNA を保持できるかを評価するために、FBS と混合し、37 で 1 時間インキュベート後に内包 mRNA を回収し、逆転写後 Realtime-PCR で残存 mRNA 量を評価した。結果 Block ポリマーにおいても、側鎖に奇数回のアミノエチレン繰り返し構造を有するポリマーは高い内包 mRNA の残存量を示した。さらに、これらのミセルをマウス尾静脈から投与し、その後マウスの血液中の mRNA を回収後に同様に Realtime-PCR で残存 mRNA 量を評価した。すると、奇数回のアミノエチレ

ン繰り返し構造を有するポリマーから作成したミセルは偶数回よりも有意に高い残存量を示した。これらの結果は、ポリカチオンの化学構造を精密設計することによって内包 mRNA を生体環境においても効率的に保持し、ターゲット部位へとデリバリーできうることを示唆しており、有益な知見であると考えられる。しかし、in vivo 環境での残存量は未だに治療に使用するには少なく、今後はさらに安定的かつ効率的な mRNA carrier の開発が今後の課題であることも合わせて判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

S. Uchida, K. Itaka, H. Uchida, K. Hayakawa, T. Ogata, T. Ishii, S. Fukushima, K. Osada, K. Kataoka, In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One* **8** (2) e56220 (2013) (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

内田寛邦, 位高啓史, 宮田完二郎, 石井武彦, 西山伸宏, 片岡一則、ポリアスパルタמיד側鎖のアミノエチレン構造が mRNA デリバリーに及ぼす影響、日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012、2012/11/26-27、仙台国際センター

Hirokuni Uchida, Keiji Itaka, Kanjiro Miyata Takehiko Ishii, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Development of N-substituted polyaspartamides optimized for mRNA delivery, ICBS 2013, 2013/3/20-22, つくば国際会議場

内田寛邦, 位高啓史, 宮田完二郎, 石井武彦, 西山伸宏, 片岡一則, ポリアスパルタמיד側鎖構造の mRNA ポリプレックス安定性とその発現持続性への影響について, 第 35 回バイオマテリアル学会大会, 2013/11/25-26, タワーホール船橋

内田寛邦, 位高啓史, 宮田完二郎, 石井武彦, 西山伸宏, 片岡一則, ポリアスパルタמיד側鎖に導入した繰り返しアミノエチレン構造の核酸デリバリー特性に及ぼす効果, 第 23 回インテリジェント材料シンポジウム, 2014/1/14, 東京女子医科大学

内田寛邦, 位高啓史, 宮田完二郎, 石井武彦, 西山伸宏, 片岡一則, mRNA ポリプレックスの細胞内安定性と発現持続性においてポリアスパルタמיד側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数に見られる偶奇性について, 第 63 高分子年次大会, 2014/5/28-30, 名古屋国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 内田寛邦

(Hirokuni Uchida)

東京大学・大学院医学系研究科 特任研究員

研究者番号: 60637677