

令和元年6月6日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03183

研究課題名(和文) 環状DNA単分子の高密度凝縮化技術による生体個体内未踏空間送達システムの創製

研究課題名(英文) Preparation of highly-condensed plasmid DNA for delivery to unexplored space in vivo

研究代表者

朝山 章一郎 (Asayama, Shoichiro)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：90315755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：環状DNAの陰イオンと一価の陽イオンとの結合体であるモノイオンコンプレックス(MIC)を形成するモノカチオン性ポリエチレングリコール(PEG)の構造最適化の過程で、アミドペンチリミダゾリウムとPEGのスペーサーに生分解性エステル結合を有するPEGを合成し、環状DNAとのMIC形成による送達システムを構築した。得られたMICをマウスの脛骨筋へ局所投与すると、投与1週間後から2週間後にかけて持続的に遺伝子発現量が向上した。この時、組織切片観察からは、脛骨筋組織内の広範囲な遺伝子発現が認められた。これらの結果より、持続的な遺伝子発現を示すMICの未踏空間への拡散性の付与に成功したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一分子から多分子のタンパク質、RNA、RNA誘導型人工ヌクレアーゼを合成する巨大分子である環状DNAを、MICにより微小粒子化し、生体内の今まで辿り着けなかった空間へ送達することが可能となる。すなわち、生体個体内未踏空間への環状DNA一分子の送達は、多分子の治療薬の送達と同義であり、無侵襲的に、生体個体内の任意の空間におけるタンパク質医薬治療、RNA干渉、ゲノム編集を実現させるDDS基盤技術の確立に繋がるため、難治性疾患治療において重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：By optimization of the mono-ion complex (MIC) between our original monocationic PEG and plasmid DNA, we have synthesized omega-amide-pentylimidazolium end-modified PEG with an ester bond for sustainable gene expression in unexplored space. The resulting MIC with pDNA enhanced gene expression after 2 weeks post-transfection in vivo by intramuscular administration in mice. The gene expression was observed in wide area of tibialis muscles with fluorescence microscope. From these results, we have prepared highly-condensed plasmid DNA for delivery to unexplored space in vivo, followed by sustainable gene expression.

研究分野：生体材料学

キーワード：薬物送達システム モノイオンコンプレックス プラスミドDNA ポリエチレングリコール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患をはじめ、未だ死因の第一位であるがんなどの多くの難治性疾患治療分野の革新のために、治療薬の概念は、タンパク質分子、および、RNA 干渉を誘導する siRNA や非コード RNA である microRNA などの RNA 分子へも拡大している。さらに、最近、遺伝子の改変を可能にする RNA 誘導型人工ヌクレアーゼ (CRISPR-Cas9) を用いたゲノム編集技術が台頭したことを鑑み、臨床上の有効性が示された遺伝子治療の工学的実現が期待されている。従って、多分子のタンパク質、RNA、RNA 誘導型人工ヌクレアーゼを一分子から作り出すこと可能な環状 DNA 分子は、治療薬としての優位性を有しており、生体個体内における治療薬送達システム (DDS) を開発する対象として、益々重要な分子となっている。

2. 研究の目的

環状 DNA 単分子の高密度凝縮化技術を開発することにより、環状 DNA を生体個体内の未踏空間へ送達するシステムを創製し、生体個体内の任意の全細胞での無侵襲的な難治性疾患治療のための DDS 基盤技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) モノイオンコンプレックス (MIC) を形成する一価の陽イオンを有する生体適合性高分子

の合成: エステル結合導入型 APe-Im-E-PEG

環状 DNA 単分子の高密度凝縮化技術の開発にあたり、標的細胞へのアクセスを向上させる PEG ジレンマの克服と、細胞質内移行性向上のためのエンドソーム脱出能を付与するため、エステル結合を導入した一価の陽イオンを有する生体適合性高分子の APe-Im-E-PEG を分子設計した (図 1)。

環状 DNA と APe-Im-E-PEG とのモノイオンコンプレックス (MIC) を形成させた後の加水分解において、MIC 側にカルボキシル基が露出する様な分子設計を施し、*in vivo* での持続的発現を試みた。

APe-Im-E-PEG は、1-(3-アミノプロピル)イミダゾールと末端に活性エステルを有するエステル基含有ポリエチレングリコール (PEG) との反応後、6-プロモヘキサナムドを用いて、イミダゾールの 4 級化反応を行い合成した。

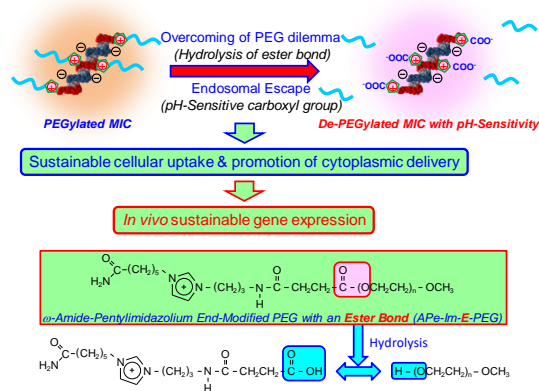


図 1 エステル結合導入型モノカチオン性 PEG (APe-Im-E-PEG) の合成

(2) 環状 DNA と APe-Im-E-PEG との MIC の *in vivo* 遺伝子発現評価

MIC の形成は、APe-Im-E-PEG と環状 DNA (pDNA) を 24 時間 37°C の条件下で混合し、アガロースゲル電気泳動で評価した。MIC の粒径およびゼータ電位は、上記と同様の方法で MIC を調製し、動的光散乱法 (DLS) および電気泳動光散乱法 (ELS) によって測定した。*In vivo* 持続的遺伝子発現は、ルシフェラーゼコード pDNA (pGL3) で調製した MIC をマウス脛骨筋に局所投与し、1 週間後と 2 週間後に組織を回収後、基質ルシフェリン発光強度測定により評価した。更に、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) をコードした pDNA で調製した MIC を同様に投与後、脛骨筋の凍結組織切片を作製し、本研究費で購入したオールインワン蛍光顕微鏡観察により、遺伝子発現評価を行った。

4. 研究成果

(1) APe-Im-E-PEG の合成と加水分解評価

APe-Im-E-PEG の合成は、¹H NMR で確認した。ω-アミドペンチル基 (APe)、プロピレンイミダゾリウム基 (Im)、コハク酸化 PEG (E-PEG) のシグナルを確認し、その積分比から、合成の成功を確認した。

得られた APe-Im-E-PEG を、pH 7 の緩衝溶液中で、2 週間インキュベート後、ゲル透過クロマトグラフィーを行ったところ、溶出が徐々に遅延した。溶出の遅延は、分子量の低下を示している。従って、2 週間の長期に渡る APe-Im-E-PEG の加水分解の進行が確認された。

(2) APe-Im-E-PEG の細胞毒性評価

APe-Im-E-PEG を培養細胞 (HepG2) へ添加後、1 日後の細胞生存率をアラマーブルー法で評価すると、ほぼ 100% の生存率を示した (図 2)。この時、コントロールであるポリリジン (PLL) や分岐型ポリエチレンイミン (b-PEI) では、同じカチオン数で比較したところ、有意な細胞毒性を示した。これらの結果は、APe-Im-E-PEG のイミダゾリウムカチオンは、PLL や b-PEI のアンモニウムカチオンより、細胞膜破壊毒性が低いことを示唆している。

さらに、1 週間、および、2 週間インキュベート後の APe-Im-E-PEG を、pH 7、または、pH 5 の緩衝溶液中で、赤血球と共にインキュベートすると、pH に依存した溶血活性を示した。本研究では、pH 5 において、2 週間インキュベートした APe-Im-E-PEG が、pH 7 と比較して、最も溶血活性が向上した（データ省略）。このことは、インキュベート時間に依存して、APe-Im-E-PEG の加水分解が起こり、露出したカルボキシル基の量が増したことを示唆している。すなわち、露出したカルボキシル基の pH 応答性により、pH 5 でのカルボキシル基のプロトン化に伴い、赤血球膜破壊活性が亢進したと考えられる。

(3) APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC 形成評価

APe-Im-E-PEG と pDNA とを混合し、アガロースゲル電気泳動実験を行った（図 3）。混合電荷比 (+/-) 16 において、フリーな pDNA のバンドが消失し、MIC の形成が示された。この時、ゲル内サンプル注入部位へのリターデーションが見られなかったことは、MIC が負のゼータ電位を有していることを示唆しており、実際に測定すると（図 4 右縦軸）、-10mV 程度であった。粒子径は、約 30nm を下回っており（図 4 左縦軸）、MIC に特徴的なサイズであると考えられる。

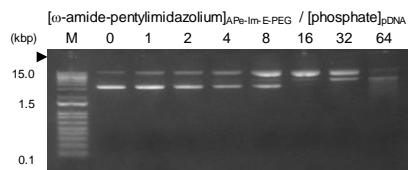


図 3 APe-Im-E-PEG と pDNA とのアガロースゲル電気泳動による MIC 形成評価

さらに、MIC の透過型電子顕微鏡観察 (TEM) を行うと、電荷比 (+/-) 依存的に pDNA が凝縮傾向を示した。しか

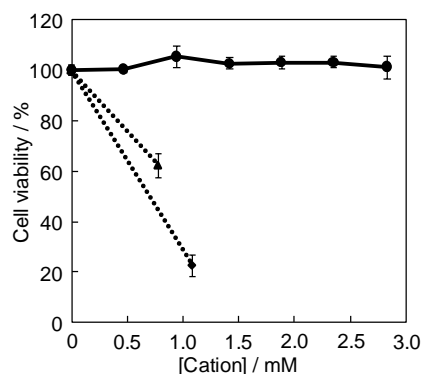


図 2 APe-Im-E-PEG の細胞毒性評価：(●) APe-Im-E-PEG、(▲) PLL、(◆) b-PEI

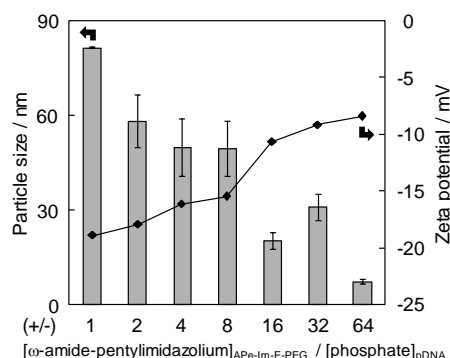


図 4 APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC の粒径およびゼータ電位評価

pDNA 微粒子 (MIC) の電荷比

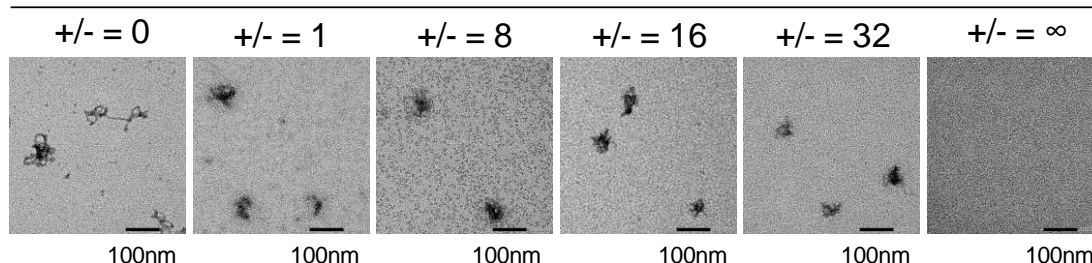


図 5 APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC の透過型電子顕微鏡観察結果

し、観察された凝縮傾向は、完全に球状ではなかったため、フレキシブルな構造であることが考えられる。

(4) APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC の安定性評価

得られた MIC の安定評価のために、ポリアニオンであるデキストラン硫酸 (DS) との競争的置換反応を行った（結果省略）。すなわち、DS 存在下、アガロースゲル電気泳動を行うと、混合電荷比 (+/-) 16 と 32 では、MIC のバンドが維持されていた。従って、混合電荷比 (+/-) 16 と 32 の APe-Im-E-PEG/pDNA MIC では、一価の電荷での相互作用にも関わらず、多価の静電的相互作用の置換に対して、安定であると考えられる。

(5) APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC による *in vivo* での持続的遺伝子発現評価

図 6 にマウス脛骨筋への遺伝子発現評価の結果を示す。pDNA 単独では、MIC 投与後 1 週間から 2 週間にかけて、25% 遺伝子発現が低下した。混合電荷比 (+/-) 32 では、pDNA 単独と比較して、約 5 倍高い遺伝子発現を示した。しかし、2 週間後には、20% の発現量に低下した。

電荷比 (+/-) 16 では、1 週間後では、pDNA 単独と比較して、1.5 倍高い遺伝子発現を示した。特筆すべきことに、2 週間後には、pDNA 単独と比較して、8.5 倍高い遺伝子発現を示した。すなわち、1 週間から 2 週間後にかけて、発現量が 50% 増加した。これらの結果は、電荷比 (+/-) 16 の APe-Im-E-PEG/pDNA MIC が、本実験条件下、*in vivo* 持続的遺伝子発現に最適構造であることを示唆している。この時、蛍光組織切片観察からも、拡散的な発現が示唆された（図 7）。

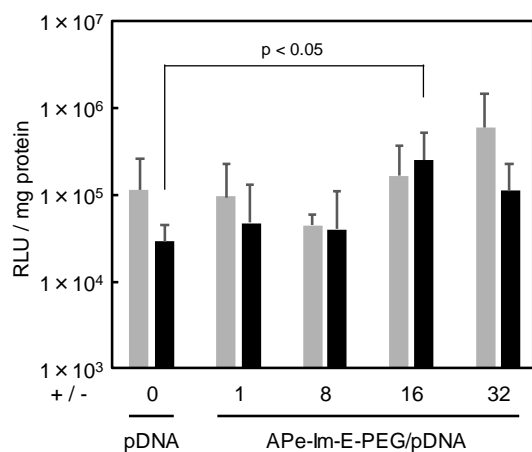


図6 APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC の持続的 *in vivo* 遺伝子発現評価

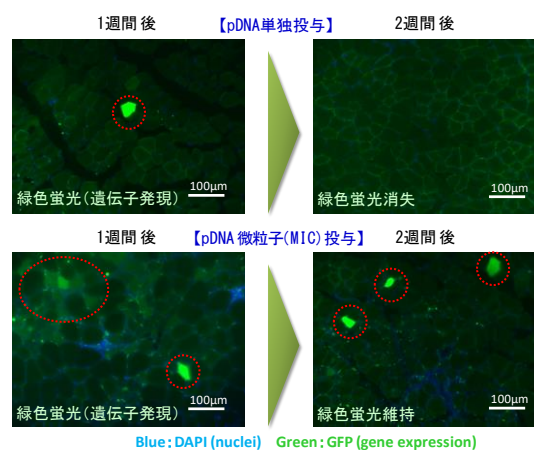


図7 APe-Im-E-PEG と pDNA との MIC の持続的 *in vivo* 遺伝子発現の組織観察結果

以上の結果は、難治性疾患治療に対する DDS 基盤技術の確立に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① R. Kubota, S. Asayama, H. Kawakami, Catalytic antioxidants for therapeutic medicine, Journal of Materials Chemistry B, 7, 2019, 3165-3191. (査読有)
DOI:10.1039/c8tb03365j
- ② R. Kubota, T. Takabe, K. Arima, H. Taniguchi, S. Asayama, H. Kawakami, New class of artificial enzyme composed of Mn-porphyrin, imidazole, and cucurbit[10]uril toward use as a therapeutic antioxidant, Journal of Materials Chemistry B, 6, 2018, 7050-7059. (査読有)
DOI:10.1039/C8TB01204K
- ③ S. Asayama, K. Nagashima, H. Kawakami, By-Product-Free Intact Modification of Insulin by Cholesterol End-Modified Poly(ethyleneglycol) for In Vivo Protein Delivery, Bioconjugate Chemistry, 29, 2018, 67-73. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00593
- ④ S. Asayama, K. Nagashima, H. Kawakami, Facile Method of Protein PEGylation by a Mono-Ion Complex, ACS Omega, 2, 2017, 2382-2386. (査読有)
DOI: 10.1021/acsomega.7b00462
- ⑤ S. Asayama, M. Sakata, H. Kawakami, Structure-Activity Relationship between Zn²⁺-Chelated Alkylated Poly(1-vinylimidazole) and Gene Transfection, Journal of Inorganic Biochemistry, 173, 2017, 120-125. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.05.007
- ⑥ M. Matsuho, R. Kubota, S. Asayama, H. Kawakami, Lactoferrin-modified nanoparticles loaded with potent antioxidant Mn-porphyrins exhibit enhanced antioxidative activity in vitro intranasal brain delivery model, Journal of Materials Chemistry B, 5, 2017, 1765-1771. (査読有)
DOI:10.1039/C6TB02599D

[学会発表] (計 28 件)

1. Y. Sone, H. Kawakami, S. Asayama, High-density modification of poly(propylene) surface with cholesterol end-modified poly(ethylene glycol) for biocompatibility, 1st G' L' owing Polymer Symposium in KANTO (2018)
2. 曾根祐哉, 川上浩良, 朝山章一郎, コレステロール末端修飾 PEG を用いた非共有結合による高密度 PEG ブラシ表面構築, 第 89 回武蔵野地区高分子懇話会 (2018)
3. 朝山章一郎, 種市さくら, 川上浩良, 根岸洋一, In Vivo 持続的遺伝子発現を実現する pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの分子設計, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会 (2018)
4. 朝山章一郎, 曾根祐哉, 川上浩良, 根岸洋一, コレステロール末端修飾 PEG を用いた非共有結合によるバイオインターフェイス構築, 第 67 回高分子討論会 (2018)
5. 竹間恒佑, 有間晃平, 田端 大, 篠原良輔, 窪田 陸, 朝山章一郎, 川上 浩良, 糖尿病治療のためのエピジェネティクスコントロールキャリアによる細胞分化誘導, 第 47 回医用高分子シンポジウム (2018)

6. 朝山章一郎, 長嶋果南, 川上浩良, 根岸洋一, コレステロール末端修飾 PEG/インスリン複合体による in vivo プロテインデリバリー, 第 47 回医用高分子シンポジウム (2018)
7. 曾根祐哉, 川上浩良, 朝山章一郎, コレステロール末端修飾 PEG を用いた非共有結合による高密度 PEG ブラシ構築, 第 47 回医用高分子シンポジウム (2018)
8. 朝山章一郎, 種市さくら, 川上浩良, 根岸洋一, pDNA/PEG モノイオンコンプレックスによる in vivo 持続的遺伝子発現, 第 34 回日本 DDS 学会学術集会 (2018)
9. 曾根祐哉, 川上浩良, 朝山章一郎, コレステロール末端修飾 PEG を用いた非共有結合による高密度ポリプロピレン表面修飾, 第 67 回高分子学会年次大会 (2018)
10. S. Asayama, S. Taneichi, H. Kawakami, Y. Negishi, Biocompatible highly condensed plasmid DNA by mono-ion complexes for in vivo diffusive gene delivery, American Society of Gene & Cell Therapy 21st Annual Meeting (2018)
11. 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, インスリン/コレステロール末端修飾 PEG 複合体による血糖降下作用, 日本薬学会第 138 年会 (2018)
12. 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, コレステロール末端修飾 PEG によるインスリンの非共有結合 PEGylation, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (2017)
13. S. Asayama, A. Nohara, S. Taneichi, Y. Negishi, H. Kawakami, Biocompatible Highly Condensed Plasmid DNA for In Vivo Diffusive Delivery, The 25th Anniversary Congress of the European Society of Gene & Cell Therapy (2017)
14. 朝山章一郎, 長嶋果南, 川上浩良, プロテインモノイオンコンプレックスによるカタラーゼの PEGylation 効果, 第 66 回高分子討論会 (2017)
15. 朝山章一郎, 長嶋果南, 川上浩良, モノイオンコンプレックスによるタンパク質の非共有結合 PEGylation, 第 46 回医用高分子シンポジウム (2017)
16. S. Asayama, A. Nohara, S. Taneichi, Y. Negishi, H. Kawakami, Design of Mono-Ion Complex for In Vivo Diffusive Plasmid DNA Delivery, 44th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2017)
17. 朝山章一郎, 長嶋果南, 根岸洋一, 川上浩良, インスリンの非共有結合 PEGylation: コレステロール末端修飾 PEG とインスリンの複合体形成, 第 33 回日本 DDS 学術集会 (2017)
18. 朝山章一郎, 種市さくら, 根岸洋一, 川上浩良, pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの機能向上とオリゴイオンコンプレックスの形成, 第 66 回高分子学会年次大会 (2017)
19. 朝山章一郎, 永倉大賀, 根岸洋一, 川上浩良, Zn²⁺/pDNA 共送達システムのインスリン肝クリアランス抑制機構解析, 第 66 回高分子学会年次大会 (2017)
20. 朝山章一郎, 種市さくら, 根岸洋一, 川上浩良, 持続的遺伝子発現型 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの分子設計, 遺伝子・デリバリー研究会第 17 回シンポジウム (2017)
21. S. Asayama, A. Nohara, Y. Negishi, H. Kawakami, Mono-ion complex for in vivo plasmid DNA delivery, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (2016).
22. 朝山章一郎, 種市さくら, 根岸洋一, 川上浩良, PEG ジレンマ解消型 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの持続的 in vivo 遺伝子発現評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (2016)
23. 種市さくら, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, PEG ジレンマ解消型超泳動 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの生体組織内拡散性, 第 65 回高分子討論会 (2016)
24. 種市さくら, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, PEG ジレンマ解消型 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの分子設計, 第 45 回医用高分子シンポジウム (2016)
25. 長嶋果南, 朝山章一郎, 川上浩良, コレステロール末端修飾 PEG を用いた非共有結合によるインスリン PEGylation, 第 32 回日本 DDS 学術集会 (2016)
26. 種市さくら, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, 超泳動 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスへの生分解性エステル基導入効果, 第 65 回高分子学会年次大会 (2016)
27. S. Asayama, A. Nohara, Y. Negishi, H. Kawakami, Plasmid DNA mono-ion complexes with poly(ethylene glycol) for in vivo diffusive gene delivery, 10th World Biomaterials Congress (2016)
28. 種市さくら, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, 超泳動 pDNA/PEG モノイオンコンプレックスの PEG ジレンマ解消, 遺伝子・デリバリー研究会第 16 回シンポジウム (2016)

〔図書〕 計 2 件

- ① 杉本直己, 内藤昌信, 橋詰峰雄, 高橋俊太郎, 田中直毅, 建石寿枝, 遠藤玉美樹, 津本浩平, 長門石暁, 松原輝彦, 上田実, 朝山章一郎, 講談社, 生体分子化学 基礎から応用まで (2017)
- ② 朝山章一郎, 川上浩良, (株) エヌ・ティー・エス, 刺激応答性高分子ハンドブック (2018)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: タンパク吸着抑制表面処理剤
発明者: 朝山章一郎, 川上浩良, 長嶋果南
権利者: 同上

種類：特許
番号：特許願2017-13942 号
出願年：平成29年
国内外の別：国内
② 名称：表面処理剤
発明者：朝山章一郎，川上浩良，長嶋果南，曾根祐哉
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願2018-010232 号
出願年：平成30年
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）
名称：界面活性材様化合物
発明者：朝山章一郎，野原 敦，川上浩良，根岸洋一
権利者：公立大学法人 首都大学東京
種類：特許
番号：特許第6358661号
取得年：平成30年
国内外の別：国内

〔その他〕
研究室 HP: <http://www.comp.tmu.ac.jp/asayama-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：川上 浩良
ローマ字氏名：Hiroyoshi Kawakami
所属研究機関名：首都大学東京
部局名：都市環境科学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：10221897

研究分担者氏名：根岸 洋一
ローマ字氏名：Yoichi Negishi
所属研究機関名：東京薬科大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50286978