

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02102

研究課題名(和文) 能動的DNAフォールディング制御ポリプレックスによる高効率遺伝子導入の実現

研究課題名(英文) Realization of effective gene transfection by actively DNA folding-controllable polyplexes

研究代表者

原田 敦史 (Harada, Atsushi)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50302774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電荷中和されたplasmid DNAが規則的に折れたたまるという特性を能動的に制御するために、多分岐ポリマー構造を有するカチオン性高分子を合成し、ポリプレックス内でのDNA分子フォールディングの制御を試みた。多分岐ポリマー部分のポリプレックス内密度に着目することにより、さまざまなDNA分子フォールディング状態を誘導し、フォールディング状態と転写効率の相関を明らかとした。DNA分子フォールディング状態が最適化されたポリプレックスは、高効率な遺伝子導入を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんなどの難治性の疾患の遺伝子治療やワクチンなどの免疫治療において、合成材料を用いて高効率な遺伝子発現を可能とするベクター開発は重要な課題となっています。本研究での研究成果は、遺伝子を発現させたい細胞に到達するまでは安定に遺伝子(DNA)を保持し、細胞へ到達した後にDNAを働かせやすい状態へと変化させることによって遺伝子発現効率の向上が可能であることを示しました。DNAだけでなくmRNAなどへの適応性を検討することでさまざまな疾患治療を可能とさせると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized a cationic polymer with a multi-branched polymer structure in order to actively control the property that charge-neutralized plasmid DNA is regularly folded, and then, we tried to control molecular folding of DNA in the polyplex. By focusing on the density in the polyplex of the multi-branched polymer part, various DNA molecule folding states were induced, and the correlation between the folding state and the transcription efficiency was clarified. Polyplexes with optimized DNA molecule folding status exhibited highly efficient gene transfection.

研究分野：生体機能材料学

キーワード：遺伝子ベクター DNAフォールディング アスペクト比 転写過程 多分岐ポリマー カチオン性ポリマ

1. 研究開始当初の背景

生体系においては、リボソームに代表されるように生体高分子が的確に自己組織化した数十ナノメートルスケールの超分子構造体(ナノ構造体)が数多くみられ、環境に呼応した動的構造変化を通じて重要な生体機能の一翼を担っている。このようなナノ構造体の多くは、細胞や組織の中の定められた場所に位置し、ナノ構造体相互の有機的連携の元に高度にシンクロナイズした機能を発現しているが、一方においては、特定の場所に留まるのではなく、生体中を自由に移動し、合目的な物質輸送や化学情報の伝達に関与する構造体も知られている。このナノ運搬体とも言える超分子構造体の中で、特に遺伝情報の宿主細胞への伝達という観点から興味深いシステムがウイルスである。ウイルスには多くの種類があるが、いずれにおいても、コンパクトな形態を取る DNA あるいは RNA のまわりをカプシドと呼ばれるタンパク質が規則正しく覆い、場合によっては、更にエンベロープと呼ばれる脂質二分子膜を主体とする膜構造が最表層に位置するという精緻なナノ組織構造を形成している。この構造は静的(static)なものではなく、外部環境の変化に追従して動的(dynamic)に変化し、適切な宿主細胞へのターゲティングを成就させることに役立つ( Fig. 1)。すなわち、宿主である生体に侵入したウイルスは、まず、生体の異物認識メカニズムを巧みに回避しつつ(ステルス機能)、体内を移動して組織に浸透し(組織浸透機能)、標的宿主細胞を認識してその表面に結合する(標的認識機能)。続いて、エンドサイトーシスによって細胞へ取り込まれる過程において、細胞内エンドソームにおける pH 低下をトリガーとする動的な構造変化を通じて膜融合を生起せしめ(細胞内環境応答機能)、更には、細胞質中を移動して核へと到達し(核移行機能)、核膜孔から核内へと侵入してカプシド構造の解離に基づいてウイルス遺伝子を核内に放出する(エフェクタ機能)。この一連のダイナミック構造変化というプロセッシング、そして、細胞内の定められたポジションにおける遺伝子放出というエフェクタ機能を併せ持つインテリジェント型ナノシステムと呼ぶにふさわしいものである。合成高分子を用いた遺伝子キャリアの設計においては、ウイルスのインテリジェントな機能を組み込む試みが数多く行われ、ステルス機能・組織浸透機能・標的認識機能・細胞内環境応答機能に関しては、類似した機能を発現する材料の報告がなされている。しかし、転写・翻訳過程に関連するエフェクタ機能に関しては、いまだ報告例が少なく、高分子材料の設計指針といえるようなものは報告されていない。

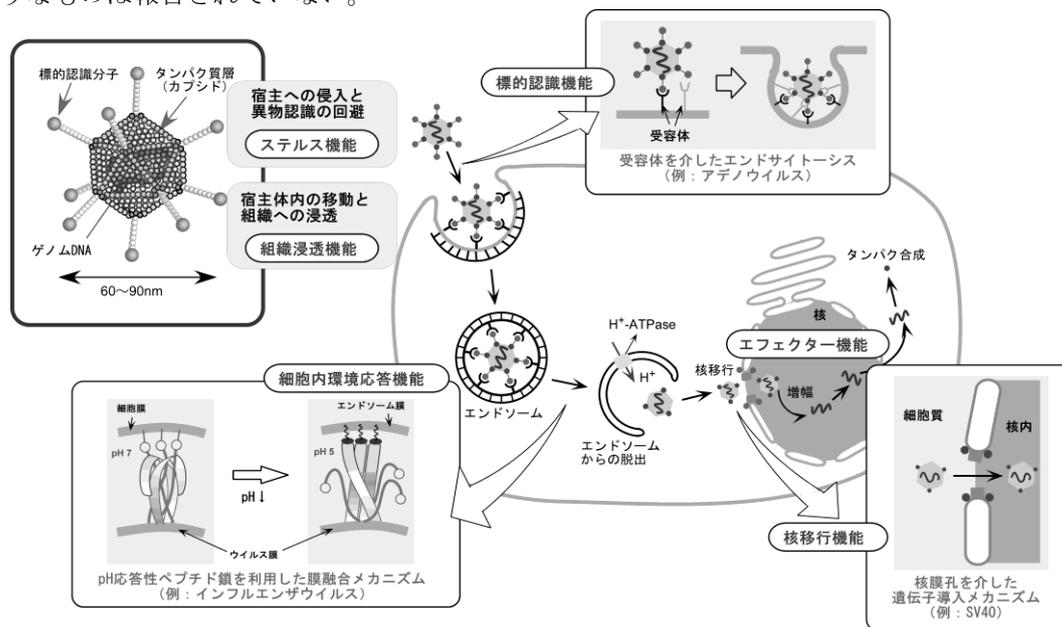


Fig. 1 遺伝情報を伝達するインテリジェント・ナノキャリアとしてのウイルス

2. 研究の目的

我々は、これまでカチオン性高分子である poly(L-lysine)と poly(ethylene glycol) (PEG) などの非イオン性高分子からなるブロック共重合体を遺伝子ベクターとして分子設計し、その特性評価を行ってきた。非イオン性高分子として多分岐 PEG を用いることによって、ポリプレックス形成に伴う DNA 分子の凝縮が抑制されることを見出した。さらに、最近、多分岐 PEG の排除体積を増加させることによって、DNA 分子の凝縮だけでなく、ポリプレックス内において DNA 1 分子が伸長したナノファイバーポリプレックスの調製が可能であることを明らかとした。また、無細胞系遺伝子発現評価により、このナノファイバーポリプレックスは、DNA 分子が凝縮したポリプレックスに比べて、転写・翻訳過程の効率が高いことが確認されている。

本研究では、電荷中和された plasmid DNA が規則的に折れたたまるという特性を能動的に制御することにより、ポリプレックス内での DNA 分子フォールディングの制御による転写過程

の効率化を通じた高効率遺伝子導入を実現する。これまでのカチオン性高分子で報告されている plasmid DNA 分子の電荷中和によるフォールディングは、plasmid DNA 分子の特性によるものであり、フォールディングされた DNA 分子間の凝集過程を抑制した結果であり、受動的な DNA 分子フォールディングであった。申請者のこれまでの研究において、多分岐ポリマー構造を有するカチオン性高分子は、DNA 分子と直接相互作用しない多分岐ポリマー部のポリプレックス表層における排除体積効果によりカチオン性高分子であるにも関わらず DNA 凝縮を誘導せず、多分岐ポリマーの排除体積の増加に伴い、球状凝集体⇒ナノロッド⇒ナノファイバーとポリプレックス形態が伸長することが確認されている。また、ナノファイバーポリプレックス内では、plasmid DNA 1 分子が伸びた形態で存在することが確認されている。このナノファイバーポリプレックスを適切に折りたたむことによって、さまざまな DNA 分子フォールディング状態を誘導し、フォールディング状態と転写効率の相関を明らかとし、高効率な遺伝子導入の実現することを目指した (Fig. 2)。

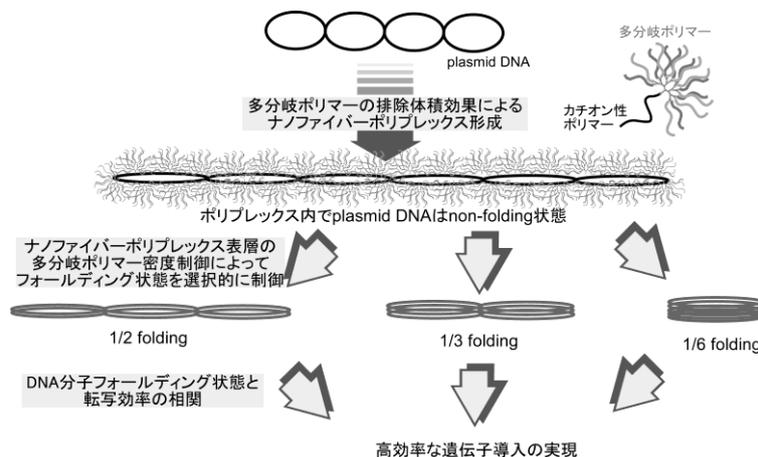


Fig. 2 ナノファイバーポリプレックスを利用した能動的 DNA 分子フォールディング制御

### 3. 研究の方法

maPEG-PLL (PEG5k×16-PLL72)及び PLL ホモポリマー(PLL96)の PBS(-)溶液(3 mg/mL)をストックソリューションとし、このストックソリューションを混合することでポリマー混合溶液を得た。このときの maPEG-PLL のモル比を maPEG content (%)と定義した。次に、total N/P 比が 1 となるように pDNA の PBS(-)溶液をポリマー溶液に加え、室温で一晩インキュベートすることでポリプレックスを調製した。調製したポリプレックスについて、EtBr exclusion assay、原子間力顕微鏡 (AFM) による形態評価、ポリプレックスの PCR 効率評価などの特性解析を行った。

### 4. 研究成果

これまでの研究によりポリプレックス表層の PEG 混み合い度と DNA 凝縮状態やポリプレックス機能には密接な関係があることが示唆されている。そこで、多分岐 PEG 導入 PLL (PEG5k×16-PLL72) と非導入 PLL (PLL96) の混合比 (maPEG content) を制御することでポリプレックス内の PEG 混み合い度を変化させ、PEG 混み合い度が DNA 凝縮状態やポリプレックス機能へ及ぼす影響について検討した。まず、maPEG content 100%に相当する PEG5k×16-PLL72 ポリプレックスと maPEG content 0%に相当する PLL96 ポリプレックス複合体形成挙動評価をアガロースゲル電気泳動により行った結果を Fig. 4-1 に示した。PEG5k×16-PLL72 は非協同的なコンプレックス形成を表す階段型の挙動を、PLL96 は協同的なコンプレックス形成を表す all or none 型の挙動を示した。いずれにおいても N/P 比 1 において遊離の DNA は見られずポリプレックス形成が完了していることが確認されたので、total N/P 比を 1 に固定し種々 maPEG content のポリプレックスを調製し電気泳動を行った。いずれの maPEG content においても遊離の DNA は見られず、すべての DNA がポリプレックスを形成していることが確認されている。PEG5k×16-PLL72 と PLL96 の DNA への結合力が同様であると仮定すると、両ポリカチオンをともに含有したポ

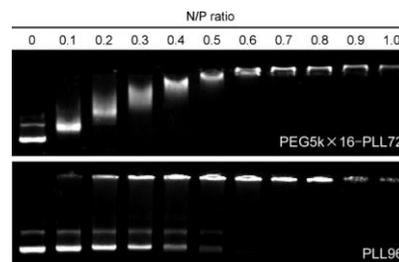


Fig. 4-1 Electrophoresis images of pDNA complexed with maPEG-PLL or PLL homopolymer at varying N/P ratios.

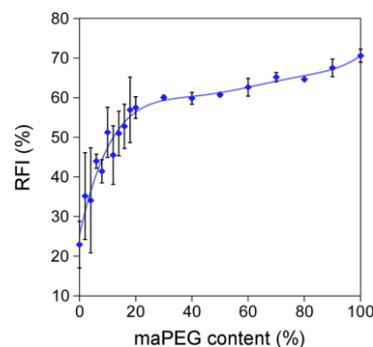


Fig. 4-2 Ethidium bromide exclusion assay of polyplexes prepared from polycation mixtures at varying maPEG-PLL contents.

リプレックスが形成していると考えられる。続いて、これらポリプレックス中の DNA 状態を EtBr exclusion assay により評価した。

ポリマーを加えていない場合 (EtBr+pDNA) の蛍光強度を 100%、EtBr のみの蛍光高度を 0% とした相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity, RFI) を Fig. 4-2 に示す。PLL96 ポリプレックス (maPEG content 0%) は 20% 程度の RFI を示し多くの EtBr が DNA から排除されているのに対し、PEG5k×16-PLL72 ポリプレックス (maPEG content 100%) は 70% 程度の RFI を保ち、EtBr がインターカレートした状態を保持していることがわかる。凝縮・凝集した PLL ポリプレックスの状態から maPEG content を増加させることで RFI の向上がみられた。特に 10% 付近の領域で急激な RFI の増加が確認され、この領域において DNA 状態に顕著な変化が生じていることが示唆される。これはおそらく、この領域においてポリプレックス表面への PEG 層形成によりポリプレックス同士の凝集が抑制された結果であると考えられる。急激な RFI の増加が完了した 30% 付近においてすべてのポリプレックスが DNA1 分子会合体となり、その後ポリプレックス表層の PEG 混み合い度 (maPEG content) の増加に伴い DNA 凝縮が軽減し、緩やかに RFI が増加していると推測される。続いて、凝集が抑制され DNA1 分子会合体と考えられるポリプレックス (maPEG content = 30, 60, 90, 100) の形態を原子間力顕微鏡により評価した。ポリプレックス (maPEG content = 30, 60, 90, 100) の AFM イメージを Fig. 4-3 に示した。さらに、形態を表す指標として、長軸・短軸の長さを測定しアスペクト比の分布をとった結果を Fig. 4-4 に示した。30% ではアスペクト比が 1 に近い球状の形態が多く見られ、maPEG content の増加に伴いアスペクト比が大きい伸長した形態が多く観察された。これよりポリプレックス表層の PEG 混み合い度 (maPEG content) が大きいポリプレックスほど、電荷中和による DNA 凝縮を効果的に抑制し伸長した形態のポリプレックスを形成することが示唆され、ポリプレックス表層の PEG 混み合い度がポリプレックス形態へ影響することが確認された。続いて、転写効率の指標として、種々 maPEG content ポリプレックスの PCR 効率を測定した。

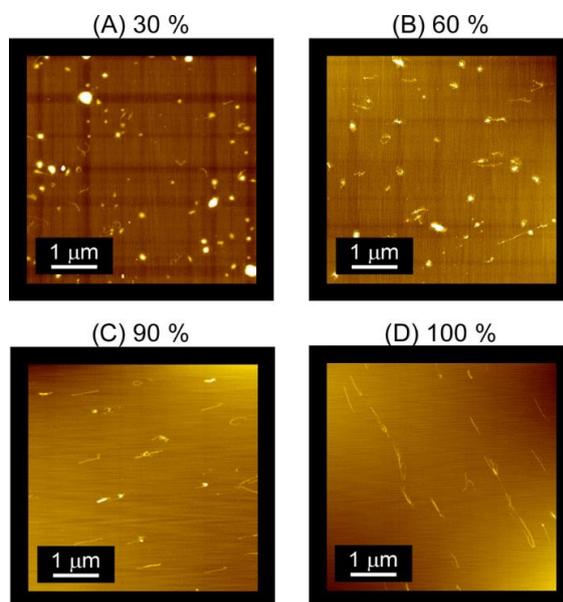


Fig. 4-3 AFM images of polyplexes prepared from polycation mixtures at varying maPEG-PLL contents.

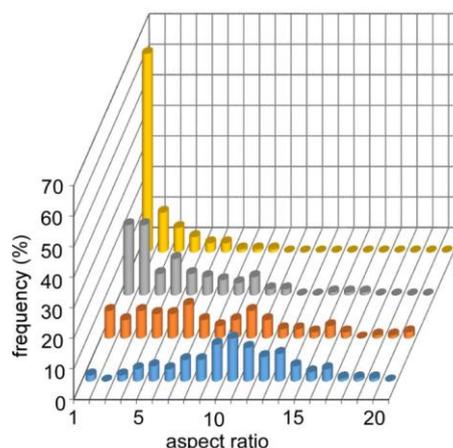


Fig. 4-4 Aspect ratio distributions of polyplexes prepared from polycation mixtures at varying maPEG-PLL contents.

種々 maPEG content ポリプレックスを用いてリアルタイム PCR を行った増幅曲線を Fig. 4-5 (A) に示した。凝縮・凝集した PLL ポリプレックス (maPEG content 0%) は増幅曲線が非常に遅いサイクルで立ち上がり、PCR の著しい阻害が示唆された。一方、maPEG を導入したポリプレックスは PLL ポリプレックスと比較して早いサイクルで増幅曲線が立ち上がり、PCR 阻害の著しい軽減が確認された。そこで、ポリプレックスの Ct 値に相当する naked pDNA の初期 DNA 量を検量線により算出し、実際にポリプレックスに含まれている初期 DNA 量 ( $10^7$  copies) を 100% とした割合を PCR 効率と定義した。種々 maPEG content ポリプレックスそれぞれの PCR 効率を算出した結果を Fig. 4-5 (B) に示した。maPEG content の増加に伴い、PCR 効率の向上が確認され、また maPEG content 10-30% の領域と 45-100% 領域で異なる傾きの直線性が確認された。EtBr exclusion assay の結果も考慮すると、これは前者が凝集抑制過程、後者が凝縮抑制過程を示しているのではないかと考えられる。ポリプレックスの maPEG content 増加により、まずポリプレックス間の凝集が抑制されることにより PCR 阻害が軽減され、凝集抑制されたものの中でも maPEG content が高く DNA 凝縮が抑制されたポリプレックスほどさらに PCR 阻害が軽減された。この結果は、ナノロッド状ポリプレックスと比較してナノファイバーポリプレックスの PCR 効率が高いという結果と矛盾しない。また、それぞれの直線の傾きの大きさを考慮すると、DNA

凝縮よりもポリプレックス間の凝集が酵素反応へよりクリティカルな影響を及ぼしているのではないかと推測される。

maPEG-PLL ポリプレックスへポリリシンホモポリマーを混合することによりポリプレックス表層の PEG 混み合い度をより精密に調製したところ、PEG 混み合い度の増加に伴う DNA 凝集・凝縮の抑制、形態の伸長が確認された。また、凝集が抑制されたポリプレックスは高い PCR 効率を示し、その中でも PEG 混み合い度が大きく形態が伸長したポリプレックスほど PCR 効率が高いことが示唆された。これらの結果から、ポリプレックス表層の PEG 混み合い度を調製することで DNA 凝縮状態・酵素反応効率を制御することができると考えられる。

ポリカチオンを用いた非ウイルスベクターの研究において、血中安定性、標的細胞への取り込み促進、エンドソーム脱出促進、核移行促進など核内へ DNA をデリバリーするための設計に重点が置かれ肝心の転写過程を最適化するための設計は多くないというのが現状である。凝縮が抑制された maPEG-PLL ポリプレックスがヌクレアーゼ耐性を示しつつポリメラーゼ反応を行うことが可能であり、効果的な転写が期待できることが分かった。本研究で得られた DNA 凝縮状態と遺伝子ベクターとしての機能との相関は、今後の非ウイルスベクターの設計、特に転写過程の最適化において有用な知見であると考えられる。一方で、DNA を凝縮させずに核まで送り届けられるかが高発現な遺伝子ベクター創製の鍵であると考えられる。本研究で得られた転写過程に関する知見を組み合わせることで、高発現な非ウイルスベクターの創製が可能であると考えられる。

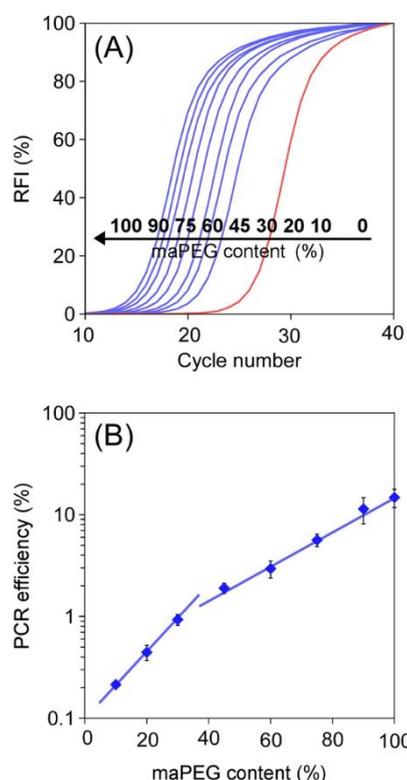


Fig. 4-5 Amplification curves (A) and PCR efficiency (B) of polyplexes prepared from polycation mixtures at varying maPEG-PLL contents.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Takuya, Yuba Eiji, Harada Atsushi, Kono Kenji	4. 巻 8
2. 論文標題 Preparation of photothermal-chemotherapy nanohybrids by complexation of gold nanorods with polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) and hydrophobic chains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2826 ~ 2833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9TB02163A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Takuya, Hirata Tomoya, Yuba Eiji, Harada Atsushi, Kono Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Light-Activatable Transfection System Using Hybrid Vectors Composed of Thermosensitive Dendron Lipids and Gold Nanorods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 239 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12030239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Takuya, Hirai Yuji, Yuba Eiji, Harada Atsushi, Kono Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Temperature-Responsive Molecular Assemblies Using Oligo(Ethylene Glycol)-Attached Polyamidoamine Dendron Lipids and their Functions as Drug Carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Functional Biomaterials	6. 最初と最後の頁 16 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jfb11010016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Harada Atsushi, Nomura Kenta, Yuba Eiji, Kono Kenji	4. 巻 5
2. 論文標題 Gene Expression of Aspect Ratio-Controlled Polyplexes Based on the Effect of Multi-Arm Poly(ethylene glycol)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 5681 ~ 5687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.8b01498	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aono Ryuta, Nomura Kenta, Yuba Eiji, Harada Atsushi	4. 巻 1350
2. 論文標題 Comparison of In Vitro Performances of Nanorod and Nanofiber Polyplexes Prepared from Plasmid DNA and Poly(L-lysine) Terminally Bearing Multi-Arm PEG	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers in Therapeutic Delivery, ACS Symposium Series	6. 最初と最後の頁 13~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/bk-2020-1350.ch002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 T. Hashimoto, E. Yuba, A. Harada, K. Kono
2. 発表標題 Near infrared light-activated transfection system using hybrid vectors composed of thermosensitive dendron lipids and gold nanorods
3. 学会等名 19th Symposium for Gene Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 敦史, 勝圓 由紀子, 弓場 英司
2. 発表標題 多分岐PEG導入ポリリシンからなるナノファイバーポリプレックスへの温度応答性付与
3. 学会等名 第48回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田敦史
2. 発表標題 PEG鎖連結高分子電解質の自己組織化におけるPEG鎖の役割
3. 学会等名 第36回関西界面科学セミナー：ソフトコロイドの界面構造および機能発現 - 基礎から応用まで (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田敦史
2. 発表標題 高分子電解質へのPEG鎖導入効果
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Harada, Eiji Yuba
2. 発表標題 Gene Expression of Aspect-Ratio-Controlled Polyplexes Based on the Effect of Multi-Arm Poly(ethylene glycol)
3. 学会等名 ACS Spring 2019 National Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 敦史，山本 聡，大村 啓輔，弓場 英司
2. 発表標題 siRNAデリバリーのための高分子材料設計
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第3回年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田 敦史，勝圓 由紀子，野村 健太，弓場 英司，河野 健司
2. 発表標題 多分岐PEG被覆ポリプレックスの形態及び表面特性制御
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 A. Harada, E. Yuba, K. Kono
2. 発表標題 Aspect ratio-controllable polyplexes prepared from poly(L-lysine) terminally bearing multi-arm PEG
3. 学会等名 255th ACS National Meeting & Expositions (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関