

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700394

研究課題名 (和文) 高効率遺伝子発現機能をインテグレートした
血中滞留型超分子遺伝子ベクターの創製研究課題名 (英文) Preparation of stable supramolecular gene vector in blood
and improvement of gene expression efficiency

研究代表者

石井 武彦 (ISHII TAKEHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：80415075

研究成果の概要 (和文)：

全身投与による遺伝子治療に必要な、安全な遺伝子ベクター開発を推進すべく、先行研究が進んでいる合成高分子ベースの非ウイルス型遺伝子キャリアの血中滞留性向上に焦点を絞り、疎水性基による会合体の構造安定化を試みたところ、血中滞留性の向上と遺伝子発現効率の増大が達成された。さらにがんを移植したモデルマウスに血管新生を阻害する遺伝子治療を試みたところ、既存キャリアに比べ有意にがんの成長が抑制されることを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

In order to promote the development of safe gene vector, which is desired for gene therapy by systemic administration, we focused on prolonging retention in blood stream of non-viral gene carriers based on synthetic polymer have been studied. As the results, we achieved prolonged blood circulation and enhanced gene expression of the developed gene carrier stabilized by additional hydrophobic functionalization. Furthermore, we tried to cancer gene therapy based on antiangiogenesis strategy, resulting that transplanted and bleeding cancer tissues in mice were significantly suppressed its growth than that of earlier gene carriers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	300,000	1,400,000
2010年度	1,100,000	300,000	1,400,000
総計	3,200,000	900,000	4,100,000

研究分野：高分子化学、生体適合性材料、ドラッグデリバリーシステム

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物送達システム・非ウイルス型遺伝子ベクター

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は将来の先端医療としての革新的治療法として大いに期待されてはいるものの、実際には臨床において安心して使用できるような実用的レベルに至っていない。その主たる要因は、本来異物として認識されるべき外来の治療用遺伝子を体内の標的器官・組織に的確に運び、かつ標的細胞内で効率よく機能発現に導くという一連の遺伝子送達システムを十分に満足し得る安全な輸

送担体 (ベクター) が確立されていないことに他ならない。ウイルスは自身のゲノムを宿主の細胞内に挿入し、効率よく増殖する術を身につけているため、弱毒化したウイルスを用いた遺伝子導入技術の開発も進められている。しかし抗原性による医療事故の問題なども取りざたされており、より安全な遺伝子ベクターが望まれている。

非ウイルス型遺伝子ベクターのこれまでの先行研究として、生体適合性に優れる水溶

性高分子ポリエチレングリコール (PEG) とポリカチオンとを連結させた PEG/ポリカチオンブロック共重合体を使用されている。ポリカチオンが DNA (遺伝子) を水溶液中で凝縮させるとともに、それらの自己会合力によって直径が 100nm 以下の均一な PIC 型高分子ミセルを形成することが知られている。コアに内包された DNA は、表層を覆う PEG の効果により DNA 分解酵素群による分解作用から保護されるだけでなく、生理環境中にてミセル粒子個々の分散安定性を保つことができると考えられていた。さらにカチオン鎖の分子設計が重要であり、適切な分子設計を行うと、分岐型ポリエチレンジアミン (PEI) に代表される既存の遺伝子導入試薬と比較して、同等以上の遺伝子発現効率を満たすとともに、低毒化することができることがすでに明らかされていた。しかし培養細胞への遺伝子導入とは別に、全身投与による遺伝子治療を目指すためには、全身に張り巡らされた血管網を利用して患部に治療遺伝子を送り届けることが理想的であるが、ナノ粒子化した遺伝子の血中滞留性どれも不十分であり、遺伝子発現効率を低下させることなく、よりいっそうの血中滞留性向上を可能とするキャリア開発が求められていた。

2. 研究の目的

より安全性の高い非ウイルス型遺伝子ベクターを用いて全身投与型の遺伝子治療を目指すにあたり、最も重要視される遺伝子とベクターの会合体の血中安定性を高め、目的地で遺伝子を放出させること、つまり血管網を利用して体内深部の疾患部位へ、さらには疾患部位の細胞内部へ、そして核内部まで治療用遺伝子を安全にかつ効率よく送り届けることが本研究の最終目標であり、細胞への取り込みや遺伝子放出、遺伝子発現効率を損なうことなく、血中で安定にナノ粒子形状を維持させるための合成高分子ベクターの分子設計と合成を行い、その効果を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

外殻で覆われた制がん剤内包ミセルとの間にこのような差が生じている要因は、ミセル構造の不安定さと不十分なミセル表層 PEG 密度にあると考えられる。これまでの遺伝子ベクター開発は *in vitro* 実験での発現効率にばかり注力されてきたが、本研究開発では、全身投与型の治療を達成し得る遺伝子ベクターを創出すべく、より安定で血中滞留性に優れたベクターを開発することを目的とした。治療用遺伝子として環状プラスミド DNA (pDNA) を用いる場合、pDNA はポリカチオンによる凝縮作用を受けてコンパクトに折り畳まれているが、二重鎖 DNA は持

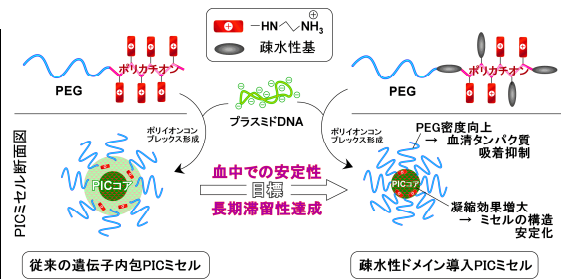


図 1. 血中長期滞留を目指した高分子ミセル型遺伝子ベクター設計

続長が 50nm ともいわれる剛直な高分子鎖であるため、立体的な制限によりコアを形成する会合力が弱く、全体として‘ゆるい’会合体となっていると考えられる。実際このようにして調製される PIC ミセルは、表層が非イオン性の PEG で覆われているにもかかわらず、コアの電荷が完全には遮蔽されていない。つまり PEG 密度が不十分であるため、コア部のポリカチオンが露出し、血清存在下においてアニオン性の血清タンパク質の吸着に起因する一連の異物認識機構を誘起する要因となっていると考えられる。そこで血中滞留向上を達成するため(1) ミセル表層 PEG 密度の増大、(2) DNA の凝縮力、またはコンプレックス会合力の増大に基づく、ミセル構造安定化を達成する戦略として、凝縮したコンプレックスを疎水性相互作用によってさらに強く凝縮させる戦略を採用した。具体的には、予め疎水性ドメインを組成中に組み込んだ PEG/ポリカチオンブロック共重合体を合成し、PIC ミセルの構造安定化および表層 PEG 密度の向上を図った (図 1)。この際、疎水性ドメインを組み込む位置、および組成など、血中滞留性の向上と遺伝子放出能のバランスを考慮した PIC ミセルの適度な構造安定化を目指した。

一方において、発現効率向上の観点から細胞取り込み後の動態についても考慮する必要がある。特にエンドサイトーシスを経由

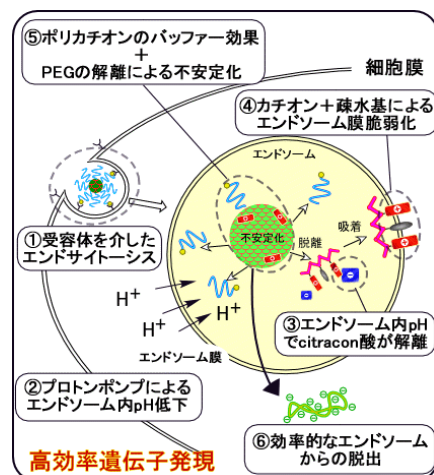


図 2. 細胞内動態を考慮した PIC ミセル設計

して細胞内に取り込まれた後、細胞内の消化器官ともいえるエンドソームから、DNA をいち早く脱出させる必要がある。ここで使用したポリカチオンはいわゆるプロトンスポンジ効果 (J.P.Behr *et al.*, *PNAS*, 92, 7297(1995)) のみならず、pH に依存した細胞膜傷害活性を有するポリアスパラギン酸側鎖にエチレンジアミン構造を配した PAsp(DET)を用いた。この PAsp(DET)はエンドソーム内の pH 低下に応じてエンドソーム膜を脆弱化する特徴を有する (K. Miyata *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 16287(2008))。また、PEG 化された PIC ミセルは、ポリカチオンのエンドソーム膜傷害時にその働きを妨害する恐れがあり、PEG 化の是非についても検証を行った。(図 2)

4. 研究成果

研究開始当初、ブロック共重合体の中間セグメントに疎水性基を導入した系を検証したが、後の検討で疎水性リンカーによる効果がコンプレックス形成時に隣り合った PEG 鎖同士が十分に近接することが困難であるため、十分な効果は期待できないという結論に至った。そこで疎水基をポリカチオンの重合末端に導入することとした。疎水基にあたっては、安全性を考慮し、最終的に生体中に存在する会合性の高いコレステロール基を選択した。その合成にあたっては、縮合反応時に特異な分子内反応によりポリアミノ酸主鎖が不安定となって若干の分解が見られたが、現在までのところ、合成法をさらに改良し、分解反応なく疎水基を導入できるようになっている。ポリカチオン主鎖末端へのコレステロール導入により、pDNA との会合体である PIC ミセルは、血清存在下および希釈条件下においてもその会合安定性が高まり、実際、*in vivo* においてコレステロール修飾していないブロックポリマーと比較して、血中滞留性が大きく改善された。図 3 に蛍光標識した pDNA を内包した PIC ミセルの血中残存量の経時変化を示した。疎水基による会合力

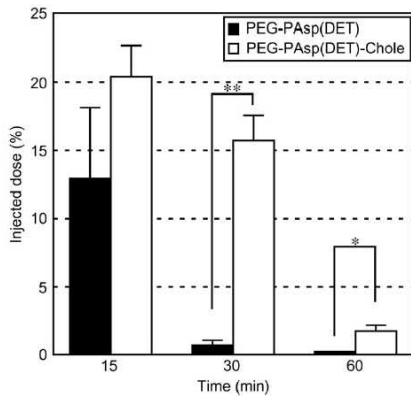


図 3. コレステロール修飾によるPICミセルの血中滞留性向上

増強により、大幅に血中滞留性を向上させることに成功した。またこのように安定化された PIC ミセルはコレステロール未修飾の PIC ミセルと比較しても培養細胞に対する遺伝子導入効率と毒性について遜色ない値を示しており、コレステロール基の導入によって毒性の増大や遺伝子の細胞内動態を変化させることがないことも確認した。

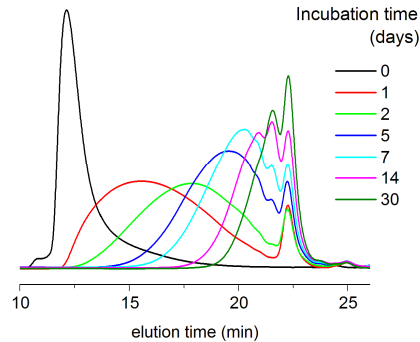


図 4. PAsp(DET)の中性pHバッファー中における分子量変化(GPC測定)

一方、本研究を遂行するにあたり、PAsp(DET)をはじめとするポリアスパルトアミド誘導体が、非常に特異な分子内反応による自己分解性を有していることを見出し、その詳細なメカニズムを検証した。図 4 には中性 pH バッファー中における PAsp(DET)の分子量が経時的に低分子量化していく様子を示した。ポリアミノ酸においてこのような中性条件での主鎖分解は酵素の介在なくしては起こり得ないが、PAsp(DET)をはじめとするポリアスパルトアミドは、側鎖のアミノ基が同じく側鎖のアミド基を活性化し、活性化された側鎖アミド基が主鎖のアミド基を切断しているという結論に至った。側鎖アミド基が主鎖カルボニルを求核攻撃する際に 5 員環構造を形成するが、その活性化エネルギーが低いことがこの構造特異的な主鎖分解に強く関与している。このことは遺伝子キャリアに使用するポリカチオンの細胞毒性を経時的にかつ劇的に低減させることに大きく貢献している。実際、分解により低分子量化した PAsp(DET)は分解に応じて細胞毒性が劇的に低下するのみならず、*in vivo* においても炎症反応の発生を劇的に改善していることから、きわめて実用性の高いポリカチオン構造であると結論付けられる。またこの分解挙動はブロック共重合体にあっては PEG との結合部位において特に進行しやすく、そのことは生理条件下の PIC ミセルにおいて徐々に PEG が脱離していくことを意味しており、エンドソーム脱出の際にエンドソーム膜への傷害性を高めている可能性も十分にある。

このように優れた血中滞留性と遺伝子発現効率を実現したコレステロール基導入

PEG-PAsp(DET)については、*in vivo* 実験によってがん治療への可能性を検証した。具体的にはがん組織が誘導する栄養血管の新生を阻害する遺伝子をコードした pDNA をこの遺伝子ベクターを用いて血中投与し、事前に移植したがん組織の体積変化をモニターする事によって性能を評価した。その結果を図 5 に示す。血中滞留性に乏しいコレステロール

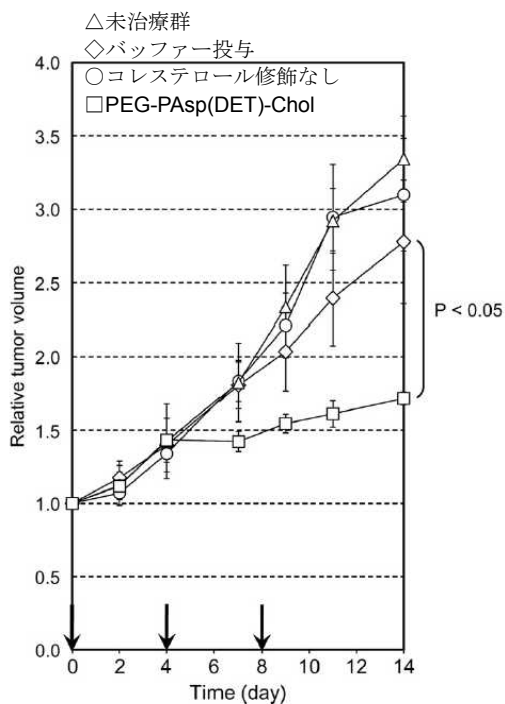


図 5. 遺伝子治療による腫瘍成長抑制

修飾なしの PEG-PAsp(DET)は未治療群やバッファ投与群と比較して腫瘍の成長抑制効果がかなり限定的であったのに対し、コレステロール修飾した PEG-PAsp(DET)を用いて PIC ミセルとして投与した遺伝子は効果的に腫瘍の成長を抑制させることに成功した。この遺伝子治療ではがんそのものを攻撃するだけでなく、周りの栄養血管の構築を妨げるものであるため、腫瘍の消滅には至らないものの、制がん剤治療と併用することで、相乗効果を生み出すことができるため、非常に有用な治療法となりうるが、今回非ウイルス型ベクターを用いても十分にその治療効果を実証することに成功した。

今後も同様のアプローチによりさまざまな難治性疾患に対する、‘安全な’遺伝子治療の可能性が十分にあり、社会に貢献できる技術として引き続き検証を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Makoto Oba, T. Ishii (他 11 名中 7 番目) : Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block

copolymers for systemic gene delivery.

Biomaterials, (査読有) 32, (2010),652-663

- (2) K. Itaka, T. Ishii, H. Hasegawa, K. Kataoka : Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. Biomaterials, (査読有) 31(13), (2010), 3707-3714
- (3) Y. Lee, T. Ishii (他 8 名中 2 番目) : Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. Angew. Chem. Int. Ed. (査読有) 49(14), (2010), 2552-2555
- (4) Y. Lee, T. Ishii (他 8 名中 4 番目) : Charge-Conversion Ternary Polyplex with Endosome Disruption Moiety: A Technique for Efficient and Safe Gene Delivery. Angew. Chem. Int. Ed. (査読有) 47(28), (2008), 5163-5166

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 石井武彦 (他 2 名) : 自己触媒型生分解性を有するポリアミノ酸ベース 遺伝子キャリアの生体適合性評価, 第 58 回 高分子討論会, 平成 21 年 9 月 18 日, 熊本大学
- (2) 石井武彦 (他 7 名) : 疎水性ドメインにより構造安定化された PEG 化ポリオンコンプレックスミセルの遺伝子ベクターとしての機能評価, 第 25 回日本 DDS 学会, 平成 21 年 4 日, 東京ドームホテル
- (3) 早川佳之 (他 4 名, 4 番目) : ポリオンコンプレックスの構造安定性と遺伝子発現の最適化を目指した疎水性ドメインを有する PEG ブロック共重合体の合成と機能評価, 第 57 回高分子学会討論会, 平成 20 年 9 月 26 日, 大阪市立大学
- (4) 早川佳之 (他 4 名, 4 番目) : ポリオンコンプレックスの安定化を目指した疎水性ドメインを有する新規 PEG ブロック共重合体の合成と機能評価, 第 18 回バイオ・高分子シンポジウム, 平成 20 年 7 月 25 日, 上智大学
- (5) 早川佳之 (他 4 名, 4 番目) : ポリオンコンプレックスの構造安定性と遺伝子発現の最適化を目指した疎水性ドメインを有する PEG ブロック共重合体の合成と機能評価, 第 57 回高分子学会年次大会, 平成 20 年 5 月 29 日, パシフィコ横浜 など

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 疎水基を導入したカチオン性高分子より形成される高効率 siRNA デリバリーシステム

発明者：片岡一則・宮田完二郎・西山伸宏・
石井武彦・呉寿栄・Kim HyunJin
権利者：東京大学
種類：特願
番号：2009-031799
出願年月日：平 21 年 2 月 13 日
国内外の別：国内

[その他]

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井武彦 (ISHII TAKEHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・助手

研究者番号：80415075