

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350532

研究課題名(和文)ポリカチオン荷電性ポリマーを用いない多機能型核酸内包ポリプレックスの開発

研究課題名(英文)Development of multifunctional polyplexes without polycations

研究代表者

石原 務 (ISHIHARA, Tsutomu)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：70349554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子治療への応用を目指し、ポリカチオンを用いずに核酸分子を安定に内包したポリプレックスの開発をおこなった。ポリプレックスは末端にアミノ基を導入したポリ乳酸を用い溶媒拡散法により調製した。従来のポリカチオンのポリプレックスに比べ、このポリプレックスは血清中でも核酸分子を安定に保持でき、また一方でポリ乳酸の加水分解に伴い核酸分子を徐放出できることがわかった。このポリプレックスは、細胞毒性が低く、また核酸分子を細胞内に長時間滞留させることが可能であった。さらに、培養細胞で siRNA の配列特異的にタンパク質の発現を抑制できた。以上より、このポリプレックスは遺伝子キャリアとしての利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To achieve the silence specific genes, a novel type of polyplexes was developed in the absence of polycations in this study. The polyplexes were prepared from poly (lactic acid) with a terminal amino group by the solvent diffusion method. The polyplexes exhibited stable nucleic acids retention in the serum, compared with conventional polyplexes formed from polycations, and sustained release of nucleic acids along with degrade of the polymer. The polyplexes also exhibited low cytotoxicity, long retention of nucleic acids in the cultured cells and gene silencing activity. These results suggested that the polyplexes could help to advance the clinical application for gene therapy.

研究分野：医用生体工学

キーワード：核酸デリバリー ポリプレックス ナノ粒子 siRNA 薬物送達システム ポリ乳酸

1. 研究開始当初の背景

1990年米国にて、核酸分子(DNAやsiRNA)を医薬有効成分として用いる革新的な疾患治療法いわゆる遺伝子治療の臨床試験が初めて実施された。しかしながら、現在までに認可された医薬品は三剤にすぎず、この治療法が大きな進歩・発展を遂げているとはいえない。その最大の要因は、核酸を効率良く運搬できるキャリアが開発されていないことである。核酸は分解されやすく、細胞膜透過性が低く、さらに活性発現の場が限定(核あるいは細胞質)されるため、核酸の投与から活性発現に至る一連のルート上に様々な物理的・生物学的ハードルが存在することになる。したがって、それぞれのハードルをクリアするための異なる複数の機能を配した高度で精密なキャリアの設計開発が必要となる。具体的には、組織/細胞選択的ターゲティング、細胞外環境での核酸の安定保持、細胞内への移行、エンドソーム脱出(細胞質への移行)、核内への移行、キャリアからの核酸の解離、薬理効果の持続、宿主に対する安全性、などを充足する機能を全てキャリアに付与しなければならない。

当初は、発現効率の高さからウイルスをキャリアとして用いた臨床試験が先行してきた。しかし、重篤な生物学的有害事象がみられたことから安全性への懸念が広がり、現在ではより安全性が高いと考えられる非ウイルス型キャリアが注視されている。塩基性脂質からなるカチオン性リポソームは、*in vitro*でのトランスフェクションに多用される核酸キャリアであるが、核酸との結合力が弱く生体環境下では核酸の保持安定性に課題が残る。

一方、ポリエチレンイミンやポリリジンなどのポリカチオン荷電性ポリマーは、現在最も有望な核酸キャリアとして期待されている。これらのポリマーは塩基性度や分子構造、分子量などを自由に制御できるため様々な機能を容易に付加できる。しかし、上述したような多機能化が相加的に達成できるわけではない。つまり、一つの機能付与が他の機能を損なう場合があり、この点がキャリア開発を阻むボトルネックである。さらに、ポリカチオン荷電性ポリマー自体細胞毒性が強く、排出や分解までの期間でさえ細胞内に残留し続けることは好ましくない。それゆえ、ポリカチオン荷電性ポリマーを用いずに新しいポリプレックスを作製することが望まれている。

2. 研究の目的

遺伝子治療を実現するには、核酸を効率良く運搬できる多機能型キャリアの創製が不可欠である。ポリカチオン荷電性ポリマーは最も有望なキャリアの一つであるが、その多機能化には避けがたいジレンマを伴う。そこで、本研究では、ポリカチオン荷電性ポリマ

ーを用いずに多機能型の核酸内包ポリマー複合体(ポリプレックス)の開発を目指す。核酸は、末端のみをアミノ化した生分解性ポリマーと疑似複合体を形成させた後、溶媒拡散法によりポリプレックス粒子内に物理的に遮蔽包埋する。このポリプレックスは独立した複数の機能(ポリカチオンがなく低い細胞毒性、物理的包埋による核酸の安定保持、ポリマー分解に伴う確実な核酸解離、核酸の徐放出による薬効の長期持続)を兼備できるため、遺伝子治療実現へのブレークスルーとなる可能性を秘める。

3. 研究の方法

核酸分子はポリアニオンに荷電した水溶性が高い高分子であるため、ポリカチオンを利用せずにポリプレックスを作製するのは大変難しい。例えば、スプレードライ法やダブルエマルジョン溶媒留去法により非イオン性ポリマー粒子内に物理的に核酸を包埋した報告があるが、これらの調製法では初期バーストが大きく、また毛細血管栓塞を誘導しない小さな粒径のポリプレックスは作製できない。また、溶媒拡散法や透析法では、小さなポリマー粒子が作製可能だが核酸はほとんど封入できない。したがって、現在研究開発中のほぼ全てのポリプレックスは、ポリカチオン荷電性ポリマーと核酸分子との静電相互作用に基づき作製される。しかし、このようなポリプレックスでは、核酸の保持/解離の二つの機能が静電相互作用に基づく結合力の強さに依存するためジレンマが生じる。

我々はこれまでに、薬理効果を長期持続可能でターゲティング可能なDDS製剤の開発を行ってきた。その結果、様々な水溶性の低分子薬物を効率良く生分解性ポリマーナノ粒子に封入できる独自技術を確立している。これらの製剤では、血中でも薬物を物理的に安定に担持できるのに加え薬物を徐放出可能で、各種疾患モデル動物での有用性が既に報告されている。

そこで、本研究では、これら基礎技術をさらに発展させ、ポリカチオンを用いずに核酸分子を生分解性ポリマーナノ粒子に封入する。具体的には、溶媒拡散法による疎水性ポリマー(ポリ乳酸)の析出・粒子化の工程に静電相互作用を組み入れることで効率良く核酸を包埋させる。水溶性有機溶媒中に片末端にアミノ基を導入したポリ乳酸と核酸分子を溶解し、それらの弱い静電相互作用により疑似複合体を形成させる。この有機溶媒を水に添加するとポリ乳酸が粒子化され同時に核酸がポリプレックス内に包埋される。

ポリプレックスへの核酸封入率や粒径はHPLCやDLSを用い評価した。核酸の安定保持と核酸の解離(徐放出)は電気泳動とHPLCにより、細胞毒性はWST-8アッセイにより評価した。さらに、細胞内への取り込みやそのトラフィックルートは細胞の蛍光観察

により、siRNA を用いた遺伝子発現抑制能は ELISA 法により評価した。

4. 研究成果

ポリプレックスの基材として用いるポリマーは、生分解性のポリ乳酸を用いた。そのカルボキシ基末端にエチレンジアミンを縮合反応により結合させ、片末端のみをアミノ化したポリ乳酸を合成した。ポリプレックスは、このポリ乳酸と核酸を DMSO に溶解し水中に滴下する O/W 型溶媒拡散法により調製した。様々な条件を変え調製し核酸分子の封入率と粒径を測定したところ、末端がカルボキシ基のポリ乳酸に比べ末端アミノ化ポリ乳酸では、粒子内への DNA 封入率が 84 倍増大した。これは、DNA のリン酸基とポリ乳酸のアミノ基間の静電相互作用が起点となり DNA がポリ乳酸粒子内に包埋されたことを示唆している。最終的に、分散安定性が高く粒径が 100nm 程度で核酸分子の封入率が最大となる調製条件を見いだすことができた。

次に、ポリプレックスの DNA 担持安定性を評価した。ポリカチオンを用いた従来のポリプレックスにポリアニオンを添加すると、容易に DNA と置換されたのに対し、このポリプレックスでは大過剰のポリアニオンを添加しても DNA は置換されずポリプレックス内に留まっていた (図 1)。さらに、血清中でポリプレックスをインキュベートすると、従来のポリプレックスでは DNA が酵素分解されたのに対し、このポリプレックスでは分解されなかった (図 2)。これらの結果より、このポリプレックスではポリ乳酸粒子内に DNA が物理的に安定に包埋されていることが明らかになった。

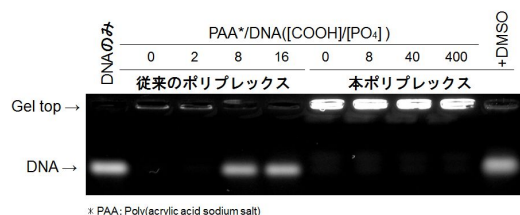


図 1 ポリプレックスの DNA 担持安定性

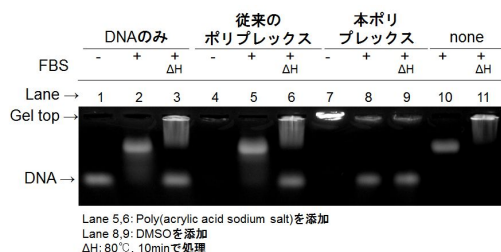


図 2 血清中での DNA の分解

一方、ポリプレックスからの DNA の遊離挙動を 37 下生理食塩水中にて解析したところ、従来のポリプレックスでは核酸の放出は認められなかったのに対し、このポリプレックスでは約 30 日にわたり少しずつ放出され

た。これは、生分解性のポリ乳酸の加水分解に伴い、物理的に包埋されていた DNA が徐々に放出されたためだと考えられる。以上より、このポリプレックスでは核酸保持と遊離の両機能が独立していると考えられる。

蛍光ラベル DNA を内包したポリプレックスを作製し、マクロファージに分化させた U937 細胞やマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞との相互作用を評価したところ、それらの細胞に顕著に取り込まれることがわかった。DNA の細胞内滞留性をカチオン性リポソームの市販品 (リポフェクタミン 3000) と比較すると、このポリプレックスの方が長時間細胞内に残留していることがわかった。また、従来のポリカチオンからなるポリプレックスでは濃度依存的に強い細胞毒性がみられたのに対し、このポリプレックスでは毒性はみられなかった。

内因性遺伝子に対する siRNA を封入したポリプレックスは、コントロール配列の siRNA を用いたポリプレックスに比べ、培養細胞での遺伝子発現を有意に抑制した。この結果は、このポリプレックスが *in vitro* で遺伝子発現抑制効果を有することを示している。また、細胞小器官との共染色試験から、ナノ粒子はリソソームに局在し、そのリソソーム内 pH が強く酸性化していたことから、この変化に応答する分子を用いることでエンドソーム脱出が誘導できることが示唆された。

本研究で開発した新規のポリプレックスは、静電相互作用を起点とした物理的な遮蔽により核酸分子を包埋できる。また一方で包埋した核酸分子はポリマーの加水分解によるナノ粒子の瓦解に伴い不可逆的かつ確実に解離されることが明らかになった。このように保持と解離の機構がそれぞれ独立しているため、干渉し合うことなく同時に両機能を発揮させることができる。さらに、このポリプレックスでは、ポリマーの種類や分子量を変えることで核酸放出速度を変更でき疾患に応じた薬効持続時間の制御が可能である。また、過剰なカチオンを必要としないため細胞毒性も低減できる。以上より、このポリプレックスは遺伝子治療を実現する新型の核酸キャリアとして期待できる。

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 6 件)

Kihara Y, Maeda R, Imaizumi A, Ichikawa T, Nemoto N, Ishihara T, Hirano N, and Haruki M. Alkyne-functionalized cationic polysiloxane polymers conjugated with targeting molecules by click reactions for DNA delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17, 5081-5089 (2017) (査読有)
DOI:10.1166/jnn.2017.13121

Ishihara T, Shibui M, Hoshi T, Mizushima T. Scavenging of superoxide anions by lecithinized superoxide dismutase in HL-60 cells. *Molecular BioSystems*, 12, 274-82 (2016)(査読有) DOI:10.1039/c5mb00631g

Ishihara T, Hayashi E, Yamamoto S, Kobayashi C, Tamura Y, Sawazaki R, Tamura F, Tahara K, Kasahara T, Ishihara T, Takenaga M, Fukuda K, Mizushima T. Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: Analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *J Control Release*. 197, 97-104 (2015) (査読有) DOI:10.1016/j.jconrel.2014.10.029.

Ishihara T, Kaneko K, Ishihara T, Mizushima T. Development of biodegradable nanoparticles for liver-specific ribavirin delivery. *J Pharm Sci*. 103, 4005-4011 (2014)(査読有) DOI:10.1002/jps.24219.

Kihara Y, Ichikawa T, Abe S, Nemoto N, Ishihara T, Hirano N, Haruki M. Synthesis of alkyne-functionalized amphiphilic polysiloxane polymers and formation of nanoemulsions conjugated with bioactive molecules by click reactions. *Polymer Journal* 46, 175-183 (2014)(査読有) DOI:10.1038/pj.2013.86

Ishihara T, Nara S, Mizushima T. Interactions of Lecithinized Superoxide Dismutase with Serum Proteins and Cells. *J Pharm Sci*. 103, 1987-1994 (2014)(査読有) DOI:10.1002/jps.24031.

〔学会発表〕(計 7 件)

山下勇一、齋藤菜美恵、石原務、肝硬変治療を目指したセレコキシブ封入ナノ粒子の開発、第 59 回日本大学工学部学術研究報告会、2016 年 12 月 3 日、日本大学(福島県郡山市)

佐藤佳純、石原務、ポリカチオンを用いない核酸内包高分子ナノ粒子の開発、2016 高分子学会東北支部研究発表会、2016 年 11 月 10 日、山形大学(山形県米沢市)

石原務、レシチンを修飾したタンパク医薬の開発、2015 高分子学会東北支部研究発表会、2015 年 11 月 13 日、秋田大学(秋田県秋田市)

金子昂平、石原務、肝指向性高分子ナノ

粒子の開発、第 64 回高分子学会討論会、2015 年 9 月 15 日、東北大学(宮城県仙台市)

金子昂平、石原務、水島徹、肝炎治療を目指したリバビリン封入高分子ナノ粒子の開発、第 31 回日本 DDS 学会、2015 年 7 月 3 日、京王プラザホテル(東京都)

金子昂平、石原務、肝炎治療を目指したリバビリン封入高分子ナノ粒子の開発、平成 26 年度化学系学協会東北大会、2014 年 9 月 21 日、山形大学(山形県米沢市)

石原務、薬物放出速度を制御可能な生分解性高分子ナノ粒子の開発、第 30 回日本 DDS 学会、2014 年 7 月 30 日、慶應大学(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 務 (ISHIHARA, Tsutomu)

日本大学・工学部・教授

研究者番号:70349554