

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550156

研究課題名（和文） 制御ラジカル重合による遺伝子ベクター用糖質高分子の合成と糖衣ポリプレックスの創製

研究課題名（英文） Synthesis of Cationic Glycopolymer and Development of Sugar-Coated Polyplex for Gene Delivery Application

研究代表者

小幡 誠 (OBATA MAKOTO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：70343267

研究成果の概要（和文）：遺伝子治療や再生医療への応用を目指して、核酸を細胞内に導入するための新たなカチオン性糖質高分子（側鎖に糖を有するポリマー）の合成とその機能評価を行った。その結果、糖（マンノース）を有するモノマーとカチオン性のモノマーを高度に制御して重合することによりブロックコポリマーの合成に成功した。またカチオン性糖質高分子の分子構造と遺伝子導入効率の関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have performed the synthesis of novel cationic glycopolymer, which is synthetic polymer bearing carbohydrate moieties, and the evaluation of their functions as a gene carrier. Block copolymers of cationic monomer with vinyl monomer bearing D-mannose have been successfully synthesized by means of precisely controlled polymerization. Preliminary in vitro experiment afforded a key for the molecular architecture of the efficient cationic glycopolymer as gene carrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：高分子合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ラジカル重合・RAFT重合・糖質高分子・核酸キャリア

1. 研究開始当初の背景

遺伝物質である核酸を人為的に細胞に導入する遺伝子導入は、遺伝子治療や再生医療の基盤技術である。遺伝子導入には無毒化したレトロウイルスを利用するウイルス性核酸キャリアが多用されるが、医療応用には安全性の観点から問題がある。一方、非ウイルス性核酸キャリアは感染やガン化の心配は少ないものの、その遺伝子導入効率が非常に低いことが問題となっている。非ウイルス性

キャリアには polyethyleneimine などのポリアミン、poly(L-lysine)などのカチオン性ペプチド、poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)などのアミノ基を有するアクリルポリマーなどが有望視されている。非ウイルス性核酸キャリアを用いた遺伝子導入には、エンドソームによる取り込み、エンドソーム脱出、核内移行の段階からなっている。一般にエンドソーム脱出はプロトンスポンジ効果によるエンドソームの不安定化によって駆動されて

いると考えられている。一方、核内移行については積極的に改善する手法はあまり報告されていない。しかし近年、フランス国立科学センターの Monsigny 博士らが本来核膜孔を通過できないサイズの分子にある種の糖を修飾することにより核移行が促進されることを報告している。糖は水溶性が高く、細胞毒性がほとんど無いこと、また電荷を帯びていないためポリプレックス形成時に干渉することが無いなど、核酸キャリアへの応用に対して多くの利点がある。

2. 研究の目的

Monsigny 博士らの先駆的な研究により糖が核酸キャリアにとって有用な生理活性を有していることが示唆された。しかし、彼らの合成方法では糖分子の導入量や導入位置が制御されておらず、最適なものとはいえない。ポリプレックスの構造を考慮すると、アニオン性の DNA を凝集させるカチオン性セグメントと糖を側鎖に有するセグメントのブロックコポリマーが合理的であると考えられる。一方、当研究室では制御ラジカル重合に適した結晶性糖モノマーとして 2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl methacrylate (ManEMA) を合成し、そのポリマー poly(ManEMA) がほとんど毒性を示さずにエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることを見出している。本研究ではこの ManEMA とカチオン性モノマーである dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) の統計およびブロックコポリマーを合成し、その核酸キャリアとしての機能評価を行った。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の方法で研究を進めた。

(1) フリーラジカル共重合による ManEMA と DMAEMA の統計コポリマーの合成とその性質

制御ラジカル重合によるコポリマーの合成には構成モノマーの重合性に関する情報が必要である。ここではじめに ManEMA と DMAEMA のラジカル共重合性を調べるためにフリーラジカル重合による統計コポリマーの合成を行った。また得られたコポリマーを用いて、ManEMA ユニットの糖としての生理機能(レクチン結合能)と DMAEMA ユニットの DNA 凝集機能を確認した。

(2) 水中 RAFT 重合による ManEMA と DMAEMA のブロックコポリマーの合成とその性質

本研究の目的である糖衣ポリプレックスの創製のための ManEMA と DMAEMA のブロックコポリマーの水中 RAFT 重合による合成手法を確立した。またポリプレックス形成

能と遺伝子導入効率に対するマイクロ構造の影響を調べるために、ブロックコポリマーと同程度の分子量と組成を有する統計コポリマーを水中 RAFT 重合により合成した。合成したコポリマーについてプラスミド DNA を用いたゲルシフトアッセイによりポリプレックス形成能を評価した。

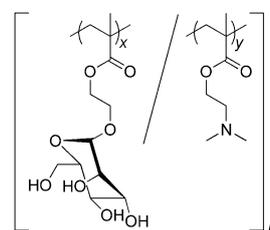
(3) ManEMA と DMAEMA のコポリマーの遺伝子導入効率の評価

ManEMA と DMAEMA のブロックコポリマーと統計コポリマーおよび ManEMA を含まない DMAEMA ホモポリマーについて子宮頸部癌培養細胞株(HeLa)を用いて遺伝子導入実験を行い、その細胞生存率と遺伝子導入効率を評価した。

4. 研究成果

(1) フリーラジカル共重合による ManEMA と DMAEMA の統計コポリマーの合成とその性質

ManEMA と DMAEMA の統計コポリマー-1 (図 1) をフリーラジカル共重合により合成した。



copolymer 1

図 1 統計コポリマー-1

重合は 10 vol% の水を含む DMF 中、全モノマー濃度を 0.5 M とし、開始剤に AIBN (5 mM) を用いて窒素雰囲気下、60°C で行った。重合粗生成物から透析により残存モノマーを除去し、凍結乾燥により白色固体としてポリマー-1 を得た(表 1)。ポリマーの数平均分子量 M_n および分散度 M_w/M_n は、標準プルランで校正した水系 SEC により評価した。その結果、 M_n が 17400~42300、 M_w/M_n が 1.7~3.2 の単峰性の分子量分布を有するポリマー-1 が得られたことが分かった。ポリマー中の ManEMA ユニットのモル分率 F_{ManEMA} は ^1H NMR スペクトルから求めた。 F_{ManEMA} は仕込み組成 f_{ManEMA} に近い値となり、モノマー反応性比は $r_{\text{ManEMA}} = 0.98$ 、 $r_{\text{DMAEMA}} = 1.22$ であった。DMF 中における ManEMA とメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) の共重合では $r_{\text{ManEMA}} = 1.00$ 、 $r_{\text{HEMA}} = 0.50$ と ManEMA の重合性が異常に高く、溶媒効果(Bootstrap 効果)が確認されている。本実験では 10 vol% の水を混合することにより溶媒効果が消失し、理想共重合に近い状態になったと考えられる。

表 1 フリーラジカル重合結果^a

f_{ManEMA}^b	time hr	yield ^c %	F_{ManEMA}^d	$M_n (M_w/M_n)^e$
0	0.5	14.7	0	28500 (1.9)
0.10	0.5	14.2	0.07	33400 (2.0)
0.23	0.5	17.1	0.19	17400 (1.7)
0.30	0.5	12.7	0.28	22900 (3.2)
0.40	0.5	16.9	0.36	33800 (2.3)
0.49	0.5	7.7	0.46	17900 (2.3)
0.60	0.5	18.8	0.57	37600 (2.0)
0.71	1	34.3	0.70	42300 (2.1)
0.82	1	24.2	0.86	41000 (2.2)
0.90	1.5	33.7	0.90	41700 (2.1)

^a [ManEMA + DMAEMA]₀ = 0.5 M; [AIBN]₀ = 10 mM; temp., 60°C. ^b Mole fraction of ManEMA in the monomer feed. ^c Isolated yield. ^d Mole fraction of ManEMA unit in the copolymer was determined by ¹H NMR spectroscopy. ^e Number average molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) were determined by aqueous SEC using Pullulan standards.

コポリマー1は『ManEMAの糖としての生理機能』と『DMAEMAのカチオン性によるDNA凝集機能』の2つの機能の発現が期待される。そこで、はじめに糖の生理機能が発現することを確認するために、マンノースを認識するタンパク質(レクチン)であるコンカナバリンA(ConA)を用いて、ポリマー1への結合能を濁度法により評価した。ConA(1 μM)を含むHEPES緩衝溶液にManEMAユニット濃度が50 μMになるようにポリマー1のHEPES緩衝溶液を混合し、420 nmの波長の光の透過率変化により凝集速度を評価した。全てのポリマーにおいて混合溶液が白濁したことからポリマー1のマンノースがConAに正しく認識されたことを確認した。またManEMAユニット濃度一定条件下でも F_{ManEMA} が大きいほど、すなわちポリマー中にManEMAが密集しているほど凝集速度が速いことが分かった。すなわち糖質高分子によく知られている局所濃度効果(Cluster Glycoside Effect)が確認された。

つぎにDMAEMAのDNA凝集機能をプラスミドDNA(PEGFP-N1, 4.7 kbp)(pDNA)を用いてゲルシフトアッセイにより評価した。ポリプレックス形成は純水もしくはリン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS, pH = 7.4)中で、最終pDNA濃度20 μg/mL一定条件で所定のN/P比(DMAEMAとヌクレオチドのモル比)になるようにポリマー1を混合し、25°Cで30分間静置することにより行った。調製したポリプレックス溶液をアガロースゲル電気泳動により分析した。その結果、ManEMAを含まないpoly(DMAEMA)は純水およびPBS中で

N/P比4で安定なポリプレックスを形成することが分かった。一方、ポリマー1は純水中では $F_{\text{ManEMA}} < 0.2$ の組成のポリマー1においてN/P比6で安定なポリプレックス形成が確認された。しかし、 $F_{\text{ManEMA}} > 0.2$ の組成のポリマー1ではN/P比にかかわらず安定なポリプレックスを形成することができなかった。一方、PBS中では $F_{\text{ManEMA}} = 0.08$ という条件下でも安定なポリプレックス形成ができなかった。その原因としてカチオン性のDMAEMAセグメントにManEMAが統計的に挿入されることにより核酸との静電相互作用が効果的に阻害されたためであると推測した。

(2) 水中RAFT重合によるManEMAとDMAEMAのブロックコポリマーの合成とその性質

フリーラジカル重合で合成した統計コポリマー1では安定なポリプレックスが形成出来なかった。そこでRAFT重合によりManEMAとDMAEMAのブロックコポリマー2(図2)の合成を行った。

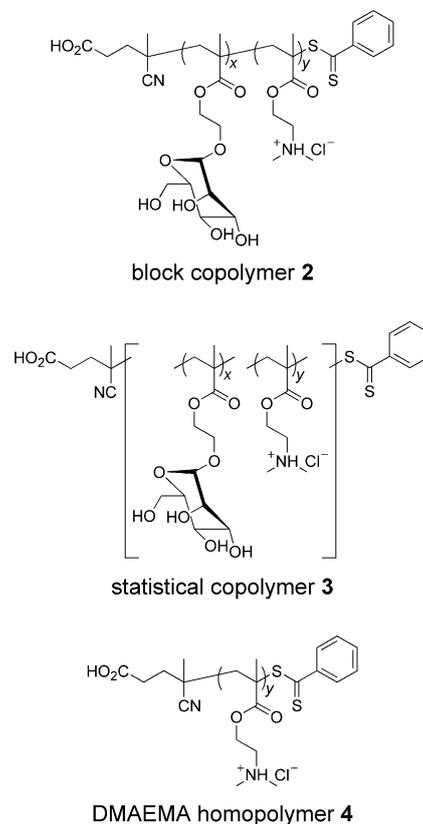
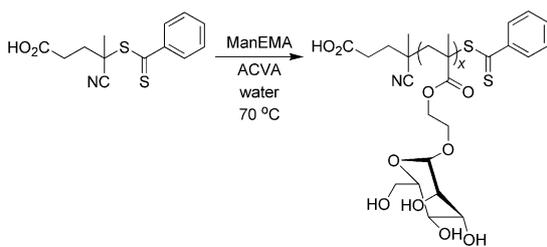


図 2 ブロックコポリマー2、統計コポリマー3、DMAEMAホモポリマー4

はじめにManEMAをRAFT剤にCPADB、開始剤にAVCA、溶媒に水を用いて、70°Cで12分間加熱することによりマクロRAFT剤5を合成した(図3)。



macro-RAFT reagent 5

図3 マクロ RAFT 剤 5 の合成

標準プルランで校正した水系 SEC によりマクロ RAFT 剤 5 は $M_n = 4900$ 、 $M_w/M_n = 1.20$ のポリマーであることが分かった。またマクロ RAFT 剤 5 の $^1\text{H NMR}$ スペクトルには末端のジチオベンゾエート基のピークが確認でき、ピーク面積比より 33 量体であることが分かった。このマクロ RAFT 剤 5 を用いて DMAEMA を重合することによりブロックコポリマー 2 を得ることができる。しかしマクロ RAFT 剤 5 は DMF のような高極性有機溶媒か水にしか溶けないため、まずこれらの溶媒中での DMAEMA の RAFT 重合を検討した。溶媒には DMF、NMP、1M 酢酸緩衝溶液および pH を 5.3 に調整した水を用い、DMAEMA を RAFT 剤に CPADB、開始剤に AVCA を用いて 60°C で重合を行った。DMF および NMP 中では重合を開始してから 120 分で重合が停止し、分子量に低いポリマーしか得ることが出来なかった。また 1M 酢酸緩衝溶液中では生成ポリマーが析出し重合が停止してしまった。一方、pH を 5.3 に調整した水中ではほぼ定量的に重合が進行し、最終的に $M_n = 20700$ 、 $M_w/M_n = 1.49$ のポリマーを得ることができた。そこで DMAEMA を RAFT 剤にマクロ RAFT 剤 5 を、開始剤に AVCA を、溶媒に pH を 5.3 に調整した水を用いて 60°C で重合を行いブロックコポリマー 2 を得た。DMAEMA とマクロ RAFT 剤 5 の仕込み比を調整することにより DMAEMA セグメント長の異なるブロックコポリマー 2 を 4 種類合成した。さらにポリプレックス形成および遺伝子導入効率に対するポリマーのマイクロ構造と ManEMA ユニットの効果を調べるために、ブロックコポリマーと同程度の分子量と F_{ManEMA} 値を有する統計コポリマー 3 および DMAEMA のホモポリマー 4 を RAFT 重合法により合成した(図 2)。得られたポリマーの M_n 値および M_w/M_n 値は標準プルランで校正した水系 SEC で、 F_{ManEMA} 値は $^1\text{H NMR}$ スペクトルより求めた(表 2)。得られたポリマーの PBS 中におけるポリプレックス形成能をゲルシフトアッセイにより評価した。DMAEMA のホモポリマー 4 は N/P 比 4 で安定なポリプレックスを形成した。一方、

ManEMA を含むポリマー 2 と 3 では分子量が比較的高い(すなわち F_{ManEMA} 値が小さい)2c、2b、3c および 3d について N/P 比 4 以上で安定なポリプレックスの形成が確認された。一方、同程度の分子量、 F_{ManEMA} をもつブロックコポリマー 2 と統計コポリマー 3 ではポリプレックス形成能に差は見られなかった。すなわち、ManEMA と DMAEMA のコポリマーの場合、そのマイクロ構造はポリプレックス形成能に影響を与えないことが分かった。

表 2 RAFT 重合結果

	F_{ManEMA}^a	$M_n (M_w/M_n)^b$	$M_{n,\text{NMR}}^c$
2A	0.25	11100 (1.26)	28900
2B	0.19	15000 (1.25)	37000
2C	0.15	17000 (1.44)	46100
2D	0.12	22000 (1.40)	56600
3A	0.25	13500 (1.18)	
3B	0.17	13300 (1.32)	
3C	0.13	19300 (1.35)	
3D	0.09	27500 (1.91)	
4A	0	7700 (1.29)	
4B	0	15500 (1.70)	
4C	0	16600 (1.64)	
4D	0	19300 (1.84)	

^a Mole fraction of ManEMA unit in the copolymer, determined by $^1\text{H NMR}$ spectroscopy. ^b Number average molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) determined by aqueous SEC using a pullulan standard. ^c Number average molecular weight calculated from $^1\text{H NMR}$ spectrum.

(3) ManEMA と DMAEMA のコポリマーの遺伝子導入効率の評価

RAFT 重合により合成した 12 種類のポリマーについて遺伝子導入効率を評価した。細胞には子宮頸部癌培養細胞株 (HeLa) を用い、プラスミド DNA に EGFP-N1 を用いた。また比較物質として市販の核酸キャリアである SuperFectTM を用いた。ゲルシフトアッセイと同じ条件・手順でポリプレックス溶液を調製し、それを 5 倍に希釈して HeLa 細胞に添加した。2 時間培養後、PBS で洗浄し、培地に交換した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で 48 時間培養後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞の写真を撮影し、その後 WST-8 法で細胞生存率を評価した。遺伝子導入効率は全細胞数に対する GFP を発現している細胞の割合に細胞生存率を掛けて評価した。細胞生存率はどのポリマーにおいても N/P 比増加に伴い減少し、ブロックコポリマーおよび統計コポリマーのいずれも ManEMA の導入による効果は確認できなかった。一方、遺伝子導入効率はブロックコポリマーではほとんど遺伝子導入されないのに対し、分子量の低い

(すなわち F_{ManEMA} 値の大きい)統計コポリマー 3_A の遺伝子導入効率が 9%程度となった。残念ながら市販の SuperFect™ の遺伝子導入効率(15%程度)よりも低い値となってしまった。

(4) まとめ

ManEMA と DMAEMA のコポリマーをフリーラジカル共重合ならびに RAFT 重合により合成し、そのポリプレックス形成能と遺伝子導入効率を評価した。その結果、下記のことことが判明した。

- ①ManEMA と DMAEMA のコポリマーは ManEMA のレクチン結合能と DMAEMA の DNA 凝集能(ポリプレックス形成能)の両方の機能を発揮する。
- ②ただし ManEMA はポリプレックス形成を阻害するため、その組成 F_{ManEMA} を高くすることはできない($F_{\text{ManEMA}} = 0.2$ 程度が限界)。
- ③ManEMA と DMAEMA のコポリマーのポリプレックス形成能はそのマイクロ構造(統計/ブロック)に依存しない。
- ④ManEMA と DMAEMA のブロックコポリマーではほとんど遺伝子導入されない。一方、統計コポリマーでは 9%程度の遺伝子導入が確認された。したがって核酸キャリア用コポリマーとしては ManEMA と DMAEMA の統計コポリマー構造がよい。

残念ながら遺伝子導入効率は向上しなかったが、当初計画していた ManEMA と DMAEMA のブロックコポリマーの合成ならびにポリプレックス形成による糖衣ポリプレックスの創製は達成した。

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 10 件)

1. Shigenobu Yano, Shiho Hirohara, Makoto Obata, Yuichiro Hagiya, Shun-ichiro Ogura, Atsushi Ikeda, Hiromi Kataoka, Mamoru Tanaka, Takashi Joh, Current states and future views in photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem. Rev.*, **2011**, *12*, 46-67. (査読有り)
2. Makoto Obata, Mayumi Shimizu, Tomoko Ohta, Aya Matsushige, Kaoru Iwai, Shiho Hirohara, Masao Tanihara, Synthesis, Characterization and Cellular Internalization of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) bearing α -D-Mannopyranose, *Polym. Chem.*, **2011**, *2*, 651-658. (査読有り)
3. Chunhong Zhang, Xiande Shen, Ryosuke

Sakai, Michael Gottschaldt, Ulrich S. Schubert, Shiho Hirohara, Masao Tanihara, Shigenobu Yano, Makoto Obata, Nao Xiao, Toshifumi Satoh, Toyoji Kakuchi, Syntheses of 3-Arm and 4-Arm Star-Branched Polystyrene Ru(II) Complexes by the Click-to-Chelate Approach, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2011**, *49*, 746-753. (査読有り)

4. Liliane A. Onambebe, Daniel Koth, Justyna A. Czaplewska, Ulrich S. Schubert, Helmar Görls, Shigenobu Yano, Makoto Obata, Michael Gottschaldt, Aram Prokop, Mitochondrial mode of action of a thymidine-based cisplatin analog breaks resistance in cancer cells, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 14498-14505. (査読有り)

5. Masaya Mitsuishi, Hiroyuki Tanaka, Makoto Obata, Tokuji Miyashita, Plasmon-Enhanced Luminescence from Ultrathin Hybrid Polymer Nanoassemblies for Microscopic Oxygen Sensor Application, *Langmuir*, **2010**, *26*, 15117-15120. (査読有り)

6. Shiho Hirohara, Masataka Nishida, Kohei Sharyo, Makoto Obata, Tsuyoshi Ando, Masao Tanihara, Synthesis, Photophysical Properties and Photocytotoxicity of Mono-, Di-, Tri- and Tetra-Glucosylated Fluorophenylporphyrins, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 1526-1535. (査読有り)

7. Makoto Obata, Noriko Matsuura, Kazunori Mitsuo, Hiroki Nagai, Keisuke Asai, Masafumi Harada, Shiho Hirohara, Masao Tanihara, Shigenobu Yano, Oxygen-Sensing Properties of 5,10,15,20-Tetraphenylporphyrinato Platinum(II) and Palladium(II) Covalently Bound on Poly(isobutyl-co-2,2,2-trifluoroethyl methacrylate), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2010**, *48*, 663-670. (査読有り)

8. Masanori Horie, Akiko Fukuhara, Yoshio Saito, Yasukazu Yoshida, Hiroe Sato, Hiromi Ohi, Makoto Obata, Yuji Mikata, Shigenobu Yano, Etsuo Niki, Antioxidant action of sugar-pendant C₆₀ fullerenes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5902-5904. (査読有り)

9. Shiho Hirohara, Makoto Obata, Hiroki Alitomo, Kohei Sharyo, Tsuyoshi Ando, Masao Tanihara, Shigenobu Yano, Synthesis, photophysical properties and sugar-dependent in vitro photocytotoxicity of pyrrolidine-fused chlorins bearing S-glycosides, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **2009**, *97*, 22-33. (査読有り)

10. Makoto Obata, Masafumi Harada, Hiromi Ohi, Shiho Hirohara, Michael Gottschaldt, Shigenobu Yano, EXAFS Study on Reaction of Anti-tumor Platinum Complexes with Reduced Glutathione, *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, *57*, 1107-1109. (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

1. 小幡誠, 小堀智也, カチオン性セグメントを有する糖質高分子の合成とポリプレックス形成, 第92回日本化学会春季年会, 慶應義塾大学 日吉キャンパス・矢上キャンパス, 2012年3月27日
2. 小幡誠, 小堀智也, マンノースを側鎖に有するカチオン性糖質高分子の合成とその性質, 第60回高分子討論会, 岡山大学 津島キャンパス, 2011年9月30日
3. 小幡誠, 太田智子, 廣原志保, 谷原正夫, マンノピラノシル基を有するメタクリル酸エステルの合成と重合およびその細胞内取り込み, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, つくば国際会議場, 2011年9月12日
稿集発行のみ)
4. 小幡誠, 清水真弓, 岩井薫, 廣原志保, 谷原正夫, マンノースを側鎖に有する糖質高分子の合成と性質, 第4回バイオ関連化学シンポジウム, 大阪大学豊中キャンパス, 平成22年9月26日
5. 小堀智也, 小幡誠, メタクリル酸 2-(α -D-マンノピラノシルオキシ)エチルとメタクリル酸ジメチルアミノエチルのラジカル共重合, 第59回高分子年次大会, パシフィコ横浜, 2010年5月26日
6. 清水真弓, 岩井薫, 小幡誠, メタクリル酸 2-(α -D-マンノピラノシルオキシ)エチルとメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルのラジカル共重合, 第59回高分子年次大会, パシフィコ横浜, 2010年5月26日
7. 小幡誠, メタクリル酸マンノピラノシルオキシエチルとメタクリル酸ジメチルアミノエチルのラジカル共重合, 日本化学会第90春季年会, 近畿大学, 大阪, 2010年3月28日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~mobata/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 誠 (OBATA MAKOTO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：70343267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし