

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25年6月6日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22750098
 研究課題名（和文）コンプレックス化の速度論に基づく環状DNAの量子化された折り畳み凝縮機構の解明
 研究課題名（英文） Kinetic-based analysis for quantized folding of closed-circular DNA

 研究代表者
 長田 健介 (OSADA KENSUKE)
 東京大学・大学院工学系研究科・准教授
 研究者番号：10396947

研究成果の概要（和文）：高分子ミセル型遺伝子キャリアに收容されるプラスミド DNA (pDNA) の構造形成機構について検証した。これまでに明らかにした pDNA の量子化折り畳み機構について、折り畳み数を決定する成因を明らかにすることを本研究の目的とした。構造形成プロセスに着目した実験・検証を通し、pDNA の折り畳み構造形成は、高分子の結晶化の動力学と同様に速度論によって支配されると考えると合理的に説明できることを明らかにした。折り畳み機構の理解が深化されたことによって、DNA パッケージングの本質に乗っ取った確かな遺伝子キャリア設計の指針を提供することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：Mechanistic analysis for structural formation of polyplex micelles as gene delivery system was demonstrated. Main object of this work was placed on understanding principle factors to determine the folding number of plasmid DNA (pDNA) within the polyplex micelles, where pDNA is packaged by highly regulated folding manner, namely quantized folding scheme. The research performed on a basis of kinetic analysis approved that folding process of pDNA is consistently described in the same way as kinetics of polymer crystallization. The deeper understanding on the structure formation of polyplex micelles enables secure molecular design for promoting effective gene delivery carriers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生体関連高分子、DNA凝縮

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子キャリアへの DNA パッケージング：未来型の疾患治療法として遺伝子治療に大きな期待が寄せられている。遺伝子治療は、遺伝子発現を制御することによって疾患を治療しようとするもので、その実現には治療用遺伝子を標的部位へ送達し、遺伝子発現を誘導するデリバリーシステム(遺伝子キャリア)の開発が必要不可欠となっている。遺伝子キャリアを高性能化するためには、DNA と正電荷性高分子との自己会合からなる遺伝子キャリアの構造形成メカニズムを理解し、それを的確に制御することが本質的な道筋である。しかしながら、遺伝子キャリアは「粒径およそ 100nm 程度の粒子である」「ロッド形状やトロイド形状になる」という情報に限られ、遺伝子キャリアがどのような構造を持つのか、さらには pDNA がどのように遺伝子キャリア内に収容されているのかといった詳細な構造情報は明らかとなっていなかった。

(2) 我々は、親水性セグメント(ポリエチレングリコール(PEG))とカチオン性セグメントからなるブロック共重合体と pDNA が形成する自己会合体「高分子ミセル」を遺伝子キャリアとして応用する研究を進めてきた。遺伝子キャリアの効用を発展させる実利研究と平行し、その構造を明らかにする研究を進め、pDNA はその全長の 1/2、1/3、1/4、... となる特定の長さに折り畳まれた束として高分子ミセル型遺伝子キャリア内部に収容されるという「pDNA の量子化された折り畳み凝縮機構」(Fig. 1)を見出した(文献 10)。

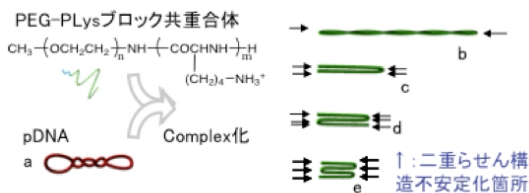


Fig.1. PEG-PLysブロック共重合体とpDNAとのポリイオンコンプレックス形成による遺伝子キャリア。pDNAは定数回折り畳まれたバンドルとして遺伝子キャリア内に収容される。ロッド末端ではDNAの二重らせん構造が局所的に解離することで屈曲している。

2. 研究の目的

これまでに遺伝子キャリアへの pDNA の収容機構として量子化折り畳み則を明らかにしたものの、折り畳みがなぜ量子化されるのか、

折り畳み数は何によって規定されるのかといった根本的な原因を理解するには及んでいない。その主要因は、遺伝子キャリアはブロック共重合体と DNA との静電相互作用に基づく会合とそれに続く DNA 凝縮というコイル-グロブユール転移によって形成されるが、それが非常に短時間で完了する(数マイクロ秒程度)ため、直接観察が極めて困難であることに帰着される。そこで、本研究では PEG-ポリカチオンブロック共重合体を pDNA に滴定混合し、コンプレックス化を段階的に進めることで、①凝縮過程を素過程として単離する系を立ち上げる、②その過程に対し、速度論に基づく解析を行う、ことを計画した。これらの検討を通して量子化折り畳み則によるロッド型遺伝子キャリアの構造形成メカニズムを理解し、それを制御する因子を明らかにすることを目的とした。このアプローチによって、より確実に、より効率よく遺伝子発現を誘導する遺伝子キャリアを創製するための分子設計指針が明確化される。

3. 研究の方法

pDNA の量子化された折り畳み凝縮の形成原理を理解するために以下の研究課題を実施した。

(1) 滴定混合による構造体形成の素過程観察：pDNA 凝縮に至る各素過程を観察する系を得るため、等温条件下、滴定混合によりコンプレックス化を段階的に進めた。これらに対し、ブロック共重合体-pDNA 間の会合、核生成-核成長、DNA 凝縮の各過程に着目し、原子間力顕微鏡 (AFM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) から構造を同定するとともに、等温滴定熱測定から熱収支を見積もった。

(2) pDNA 凝縮の動力学的解析：続いて遺伝子キャリアの構造形成の速度依存性を検討するため、滴定速度(滴定間隔、滴定量)を調整し、核生成頻度、核成長速度に注目した観察と、形成された折り畳み構造を解析し、等温滴定熱測定と合わせて速度論と熱力学に基づいた考察を行った。

(3) 折り畳み構造解析：凝縮過程の in situ 観察系を構築し、コンプレックス化から凝縮に至る過程の直接観察を通して上記の解析結果を検証することを試みた。また、真空中、大

気中ではない水中での構造を詳細に解析するために氷包埋法による Cryo-TEM 観察系を確立した。

4. 研究成果

(1) 滴定混合による構造体形成の素過程観察：PEG-ポリカチオンブロック共重合体として poly(ethylene glycol)-*b*-poly(lysine), (PEG-PLys) を合成し、滴定混合で pDNA とコンプレックス化させることで段階的に DNA 凝縮を誘起した。特に凝縮過程の初期段階である pDNA に対する PEG-PLys の電荷比 (N/P 比) 0.2 において、AFM による構造観察から、pDNA が局所的に凝縮したと推定される構造を局所的な高さとして認識できることを見出した (Fig2)。

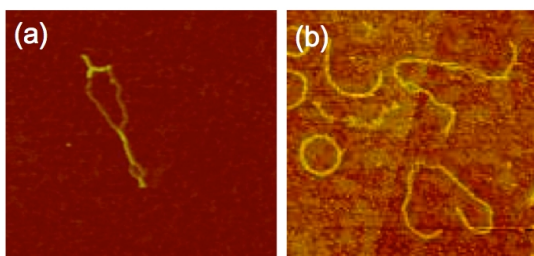


Fig.2. AFMによるpDNA凝縮プロセスの観察。(a)途中経過観察(N/P比0.2)。ブロック共重合体が結合していない(低い)部分と、結合している部分(核形成-成長過程(高い))の共存が観察される。(b)凝縮プロセスの終点(N/P1)。ロッド状、トロイド状構造が確認される。

さらに N/P 比を上げていくと電荷の中和点に達する前に凝縮形態が大きく変わり、紐状からロッド状になることを見出した。この過程を等温滴定熱測定で追跡したところ、電荷の中和点に達する前である電荷比 0.7-0.8 程度で大きな熱収支が観測された。AFM による構造解析との相関から、電荷比 0.7-0.8 あたりで DNA のコンフォメーション変化を伴う大きな構造転移をおこすことが明らかになった。これらのことから pDNA の凝縮過程が、(i)PEG-PLys と DNA との会合により DNA の電荷が失われる。(ii) DNA-DNA 間会合がおこる(核形成)、(iii)コンプレックス化の進行により DNA-DNA 間会合がジッパー的に進む(核成長)、(iiii) (iii)の会合体同士が会合し、折り畳まれる(凝縮)、との素過程からなることを実験的に確認することに成功した。

(2)pDNA 凝縮の動力的解析：混合に際する滴定速度の関係を検討した。折り畳み構造を動的散乱測定および TEM 観察から解析し、

滴定速度が遅いとき (24 時間かけて両者を混合) は折り畳み数 0 もしくは 1 回のものが主として観察されるのに対し、滴定速度を速くしていくにつれロッド構造の長さが短くなり、瞬時混合においては折りたたみ数 4-7 からなるより短いロッド長の折り畳み構造が主として観測されることを見出した。ここで、pDNA の折り畳みが高分子の結晶化と同様に記述できるとするならば、滴定速度が速いときには折り畳み頻度の多い短いロッド構造が、滴定速度が遅いときには折り畳み頻度の少ない長いロッド構造が得られるものと予想される。この予想は今回見られた折り畳み数の滴定速度依存性とよく一致しており、pDNA の折り畳みは、高分子の結晶化の動力学と同様に速度論によって支配されると考えても良い結果を得た。

(3) 折り畳み構造解析：高分子ミセルの構造形成過程の in situ 観察を目指し、液中 AFM による直接観察を試みたが、DNA と基盤との物理吸着の影響により、折り畳み過程を定量的に観察することが困難であった。一方、溶液中の凝縮形態を高解像度で“生”で見るために、岡崎自然科学研究機構の永山昭昭教授と共同で位相差 TEM により無染色・氷包埋法を行った。興味深いことに、TEM グリッド試料作成の過程で遺伝子キャリアが高濃度に濃縮されうることを見出した。そこを観察することで折り畳まれた DNA の構造だけでなく、周囲を覆う PEG 層の厚みに関する情報を得ることに成功した。これにより初めて PEG のコンフォメーションに関する議論を可能にした(投稿中)。

(4) 上記の構造形成機構を明らかにする研究に加え、遺伝子キャリアとしての実用展開も並行して進めた。上で得たパッケージング形態制御を基に、折り畳み数の異なるロッド型遺伝子キャリアを調製し、遺伝子発現との相関を検証した。その結果、折り畳み数の少ないロッド型(より長いロッド長)の転写効率が高く、細胞に取り込まれた後の遺伝子発現効率が高まることを見出した(文献 6)。

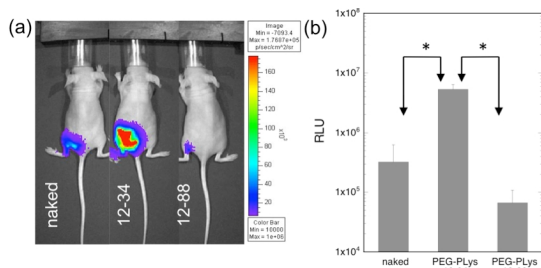


Fig.3. 折り畳み数の異なるロッド型遺伝子キャリアによる遺伝子導入。大伏静脈より投与、骨格筋への遺伝子導入。(a)ルシフェラーゼ遺伝子発現のin vivo imaging(a)とその定量(b)。遺伝子キャリア中でのpDNAの平均折り畳み数12-34は約4回、12-88は10回。

この知見を基に、担がんマウスに対し血管新生阻害療法に基づく治療実験を行い、遺伝子治療による優れた治療効果を得ることに成功した(文献 11)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. K. Osada, H. Cabral, Y. Mochida, S. -E. Lee, K. Nagata, T. Matsuura, M. Yamamoto, Y. Anraku, A. Kishimura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bioactive polymeric metallosomes self-assembled through block copolymer-metal complexation. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (32) 13172-13175 (2012) (DOI: 10.1021/ja304615y) 査読有
2. M. Kumagai, S. Shimoda, R. Wakabayashi, Y. Kunisawa, T. Ishii, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Nakano, Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J. Control. Release* **160** (3) 542-551 (2012) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.03.021) 査読有
3. R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* **6** (6) 5174-5189 (2012) (DOI: 10.1021/nn300942b) 査読有
4. S. Uchida, K. Itaka, Q. Chen, K. Osada, T. Ishii, MA. Shibata, M. Harada-Shiba, K. Kataoka, PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol Ther.* **20** (6) 1196-1203 (2012) (DOI: 10.1038/mt.2012.20) 査読有
5. Q. Chen, K. Osada, T. Ishii, M. Oba, S. Uchida, T. A. Tockary, T. Endo, Z. Ge, H. Kinoh, M. R. Kano, K. Itaka, K. Kataoka, Homo-cationer integration into PEGylated polyplex micelle from block-cationer for systemic antiangiogenic gene therapy for fibrotic pancreatic tumors. *Biomaterials* **33** 4722-4730 (2012) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.017) 査読有
6. K. Osada, T. Shiotani, T. A. Tockary, D. Kobayashi, H. Oshima, S. Ikeda, R. J. Christie, K. Itaka, K. Kataoka, Enhanced gene expression promoted by the quantized folding of pdna within polyplex micelles. *Biomaterials* **33** 325-332 (2012) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.046) 査読有
7. R. J. Christie, K. Miyata, Y. Matsumoto, T. Nomoto, D. Menasco, T. -C. Lai, M. Pennisi, K. Osada, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer Comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* **12** (9) 3174-3185 (2011) (DOI: 10.1021/bm2006714) 査読有
8. S. Uchida, K. Itaka, Q. Chen, K. Osada, K. Miyata, T. Ishii, M. Harada-Shiba, K. Kataoka, Combination of chondroitin sulfate and polyplex micelles of poly(ethylene glycol)-poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamid

- e} : A block copolymer for prolonged in vivo gene transfection with reduced toxicity. *J. Control. Release* **155** (2) 296-302 (2011) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.026) 査読有
9. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* **32** (2) 652-663 (2011) (DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.09.022) 査読有
 10. K. Osada, H. Oshima, D. Kobayashi, M. Doi, M. Enoki, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Quantized folding of plasmid DNA condensed with block cationomer into characteristic rod structures promoting transgene efficacy. *J. Am. Chem. Soc.* **132** (35) 12343-12348 (2010) (DOI: 10.1021/ja102739b) 査読有
 11. K. Itaka, K. Osada, K. Morii, P. Kim, S. -H. Yun, K. Kataoka, Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J. Control. Release* **143** (1) 112-119 (2010) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.12.014) 査読有

[学会発表] (計 17 件)

1. K. Osada, K. Kataoka, Control of DNA Packaging and Gene Expression Efficiency for Gene Delivery (6th Annual Symposium on Nanobiotechnology "Kyoto Cell-Material Integration 2012" 2012/11/7-11/9, Kyoto University, Kyoto, Japan)
2. K. Osada, K. Kataoka, Control of DNA Packaging and Gene Expression Efficiency for Gene Delivery (1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN) 2012/10/21-10/26, Mercure Hotel,

- Brisbane, Queensland, Australia)
3. K. Osada, K. Itaka, K. Kataoka, Enhanced Gene Expression through the Quantized Folding of plasmid DNA within Polyplex Micelle (ACS Spring 2012 National Meeting & Exposition, 2012/3/25-3/29, San Diego, USA)
 4. K. Osada, T. Tockary, K. Kataoka, Observation of PEG thickness of PEG-PLys based polyplex micelle. (International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010/12/15-12/20, Honolulu, USA)
 5. K. Osada, H. Oshima, D. Kobayashi, M. Doi, M. Enoki, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Quantized folding of plasmid DNA packaged into polyplex micelle. (NanoBio-Zurich 2010, 2010/8/24-8/27, Zurich, Switzerland)

[図書] (計 1 件)

長田健介、片岡一則、高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステム(DDS)-普及のインパクト・課題と求められる新技術- 研究開発リーダー, Vol.9 No.11 54-59 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 核酸デリバリー用ユニット構造体
 発明者: 片岡一則、宮田完二郎、西山伸弘、長田健介、渡辺秀美代、福島重人、茶谷洋行、武元宏泰、加藤泰己
 権利者: 国立大学法人東京大学、ナノキャリア株式会社

種類: 発明

番号: 2012-102841

出願年月日: 2012.04.27

国内外の別: 国際

名称: 核酸送達用組成物及び担体組成物、それを用いた医薬組成物、並びに核酸送達方法
 発明者: 片岡一則、石井武彦、長田健介、陳麒先、位高啓史、内田智士
 権利者: 国立大学法人東京大学
 種類: 発明
 番号: PCT/JP2011/065815

出願年月日：2011.07.11

国内外の別：国際

名称：ブロックコポリマー、ブロックコポリマー-金属錯体複合体、及びそれを用いた中空構造体キャリア

発明者：片岡一則、長田健介、岸村顕広、西山伸宏、オラシオ・カブラル

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：発明

番号：PCT/JP2010/058238

出願年月日：2010.5.10

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田健介 (OSADA KENSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：10396947