

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300179

研究課題名(和文)高分子材料へのエフェクター機能創り込みによるインテリジェント・ナノキャリアの構築

研究課題名(英文)Creation of intelligent nanocarrier by effector-function elaboration to polymer materials

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)・准教授

研究者番号：50302774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子ベクターの開発においては、血清タンパク質共存下での安定性、細胞取込、細胞内移行、転写・翻訳過程を効率よく行わせるための機能創り込みが重要となる。これらの項目に多くの研究がなされてきているが、転写・翻訳過程の効率化に関する研究はほとんど行われていない。本研究では、高効率な転写・翻訳効率を発現しうる高分子材料を開発し、その機能発現メカニズムを明らかとした。さらに、細胞取込、細胞内移行の効率化を目的とし、カチオン性脂質との複合化による高効率な遺伝子導入を達成した。

研究成果の概要(英文)：The functional elaborations including stability in serum medium, cellular uptake, cellular distribution and transcription / translation process are important in the development of the gene vector. Many studies have been performed for these subjects, but there are only a few reports on the promotion of efficiency of a transcription process yet. In this study, we developed the polymeric materials that could exhibit effective a transcription / the translation efficiency and also clarify the mechanism for these materials. Furthermore, we achieved the effective gene expression through the combination of the developed polymeric materials with cationic lipids.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：遺伝子治療 ナノキャリア 多分岐ポリエチレングリコール ポリ-L-リシン ナノファイバーポリプレックス

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参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っている。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(エフェクター機能)。この一連のダイナミック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ー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。このようなウイルスの機能と構造に学びつつ、合成高分子や脂質分子的に自己組織化を通じて、ウイルスの宿主細胞への感染機能を模したナノ構造体を構築する研究が数多く展開されている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞への取込過程においてベクター内での DNA 相転移を惹起させることによって、DNA が転写・翻訳されやすい状態へと変化するエフェクター機能を有する高分子材料設計を通して、ウイルス機能に啓発されたインテリジェント・ナノキャリアの開

発を目的とする。巨大分子である DNA は、カチオン性化合物と複合体形成することによってコイル-グロビュール転移することが知られている。カチオン性高分子や脂質分子とコンプレックス形成する場合も例外ではなく、多くのベクター内で DNA が凝縮状態を取っている。ベクターとしてのカチオン性高分子に関する研究の初期には、DNA の凝縮により転写酵素との接触抑制する過剰な安定化が懸念されたが、現状では、ヌクレアーゼとの接触回避によって安定性を向上させるなど利点として考えられている。しかし、遺伝子発現を示すためには、転写酵素と DNA の反応は欠くことができないものであり、ベクターが効率良く遺伝子発現を示すためには、DNA 相転移(脱凝縮)を惹起させ転写・翻訳過程へと移行させることは重要であろう。これまでにカチオン性高分子とコンプレックスを形成した状態において、DNA が凝縮状態であるか脱凝縮状態であるかによって、転写・翻訳効率が著しく異なることを見出している。本研究では、この DNA 凝縮抑制能発現機構を解析し、膜融合性カチオン性脂質をも組み合わせた高効率転写活性を示しうるナノキャリアの構築を行った。

3. 研究の方法

数平均分子量 2000 もしくは 5000 の PEG を先端に導入した polyamidoamine dendron (世代数 3, 4) を、分岐数が 8、16 本の mPEG として用い、そのフォーカルポイントのアミノ基より ϵ -benzyloxy carbonyl L-lysine N-carboxyanhydride [Lys(Z)-NCA] を開環重合させた後、Z 基を酸処理により除去することで多分岐 PEG 導入 poly(L-lysine) (maPEG-PLL) を得た。合成の確認は、GPC 測定及び ^1H NMR 測定により行った。種々組成の maPEG-PLL と pDNA とのポリプレックス形成をアガロースゲル電気泳動により評価し、ポリプレックスの形態を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。さらに、PEG5k \times 16-PLL71 を用いて種々 N/P 比の polyplex を調製し、それら polyplex と lipofectamine (Promega) との複合化を行い、ハイブリッドベクターの調製を行った。調製したハイブリッドベクターについて、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞への遺伝子導入効率の評価、フローサイトメーターによる細胞内取り込み評価、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態観察を行った。

4. 研究成果

アガロースゲル電気泳動による Gel retardation assay によりポリプレックス形成を評価した。ポリマー組成によって pDNA との混合比 (N/P ratio) を変化させた時の DNA バンドの泳動パターンに違いが観察された。典型的な例として PLL と PEG5k-DG3.0-PLL66 のデータを図 1 に示す。PLL が all or none 型の協同的なポリプレックス形成をするのに

対し、PEG5k-DG3.0-PLL66 ではバンドの泳動距離が N/P ratio の増加により徐々に短くなる非協同的なポリプレックス形成をした。

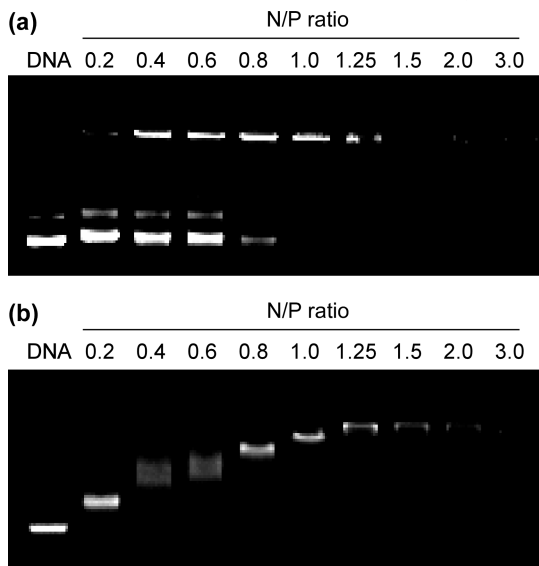


図1 アガロースゲル電気泳動によるポリプレックス形成評価 (a: PLL、 b: PEG5k-DG3.0-PLL66)

このように、ポリマーによってコンプレックスの形成挙動に差異が現れた原因としては以下のことが考えられる。一般にポリアニオンである DNA とポリカチオンを混合するとカウンターイオンのリリースによるエントロピーの増大を主なドライビングフォースとして電荷の中和が起こるが、コンプレックスの形成挙動の違いは巨大分子である DNA のコンフォメーション変化に伴うエントロピーの変化が影響する。電荷の中和が起こると均等にポリカチオンが分布し DNA のコンフォメーションはポリカチオンによって均等に制約されるが、DNA のコンフォメーションが大きく制約される場合には一部の DNA 分子にポリカチオンを局在させ犠牲にすることで他の DNA 分子の制約を軽減する高分子電解質特有の現象が起こる。PEG2k-DG3.0-PLL72、PEG5k-DG3.0-PLL66、PEG2k-DG4.0-PLL36、PEG2k-DG4.0-PLL75、PEG5k-DG4.0-PLL71 の場合は同一ポリマー内でヘッド部が PLL 部に対して大きいため PEG によるポリマー間での多分岐 PEG クラウディング効果により、DNA の凝縮が起きにくく DNA のコンフォメーションの制約は比較的小さい。そのため N/P 比を大きくしていくと、DNA の中和が徐々に起こり階段型の泳動挙動を示す。一方で PLL127 は多分岐 PEG によるクラウディング効果を有していないため DNA のコンフォメーションの制約は大きくなり all or none 型の泳動挙動を示す。PEG2k-DG4.0-PLL140 は、他の多分岐 PEG 修飾 PLL の PLL 鎖長のほぼ倍の PLL 鎖長を有するためにヘッド部とテイル部のバランスが PLL127 により近くなり協同的なコンプレックス形成をしたと考えられる。以上のこと

より PEG2k-DG3.0-PLL72、PEG5k-DG3.0-PLL66、PEG2k-DG4.0-PLL36、PEG2k-DG4.0-PLL75、PEG5k-DG4.0-PLL71 のように非協同的なコンプレックス形成を示すポリマーは十分に多分岐 PEG クラウディング効果を有し、DNA の電荷を徐々に中和することから DNA の過度の凝縮を抑制できることが示唆される。

次に、ポリプレックス形成が完全に終了している N/P 比が 3.0 のポリプレックスについて原子間力顕微鏡 (AFM) による形態観察を行った (図2)。ポリプレックス形態に関しては、さまざまな報告例が多くあるが、その多くは球状凝集体であるが、多分岐 PEG 導入 PLL では、nanorod や nanofiber 状のポリプレックスが観察された。ゲル電気泳動において非協同的なポリプレックス形成したポリプレックスでは図2のような形態が観測される傾向があった。

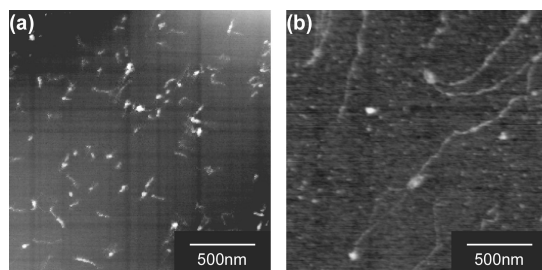


図2 調製されたポリプレックスの AFM イメージ (a: PEG5k-DG3.0-PLL66, b: PEG5k-DG4.0-PLL71)

多分岐 PEG のポリプレックス内クラウディング効果によりポリプレックス形態の伸長は、AFM イメージにおいて観察されたポリプレックスの長軸及び短軸長を計測し算出されるアスペクト比の分布から明らかとなった (図3)。

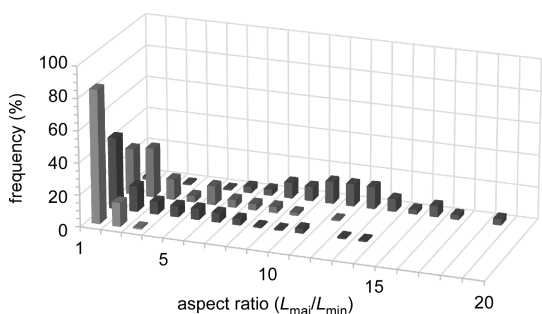


図3 ポリプレックスのアスペクト比分布 (手前から順に、PEG2k-DG3.0-PLL72、PEG2k-DG4.0-PLL75、PEG5k-DG3.0-PLL66、PEG5k-DG4.0-PLL71)

以上のような多分岐 PEG 部の効果は、無細胞系での遺伝子発現評価においても興味深い関係を示した。多分岐 PEG 部のサイズの指標として、多分岐 PEG 部の GPC 測定により直鎖状 PEG 換算の分子量を決定し、相当する回転半径を算出した。つまり、回転半径の大きな多分岐 PEG の方が、ポリプレックス表面で混みあった状態となり、クラウディング効果を発現すると考えられる。図4に naked

pDNA の発現を基準とした相対遺伝子発現と多分岐 PEG 回転半径の関係を示す。

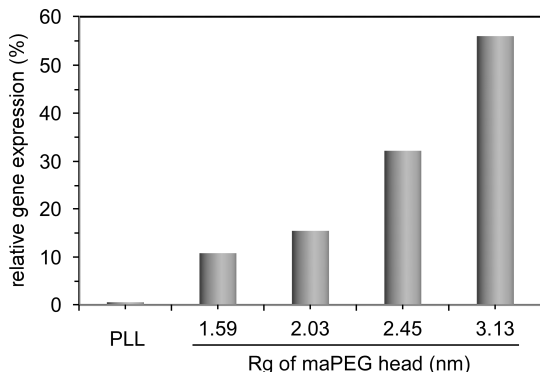


図4 無細胞系遺伝子発現への多分岐 PEG 部の影響

多分岐 PEG を持たず pDNA が凝縮した状態となる PLL ではほとんど発現が認められないが、多分岐 PEG 部を有する PLL では数十%の発現が確認された。また、その相対遺伝子発現は、多分岐 PEG 部が大きなほど、つまりポリプレックスが伸長した形態をとるほど高い傾向があることが確認された。この結果は、ポリプレックス形態が転写・翻訳過程の効率に影響を及ぼすことを示しており、伸長した形態ほど高効率であることを示している。

最も効果的な多分岐 PEG クラウディング効果を示し nanofiber ポリプレックスを形成している状態が転写・翻訳効率が高いことが確認されたが、その状態ではほとんど細胞へ取り込まれず、結果として、培養細胞に対する遺伝子導入効率は低調なものであった。そこで、nanofiber ポリプレックスとカチオン性脂質型の遺伝子導入試薬である lipofectamine とのハイブリッドベクターの調製を検討した。Lipofectamine は、膜融合性脂質を含んでいるため細胞取込過程でのエンドソーム脱出能の増強も期待できる。

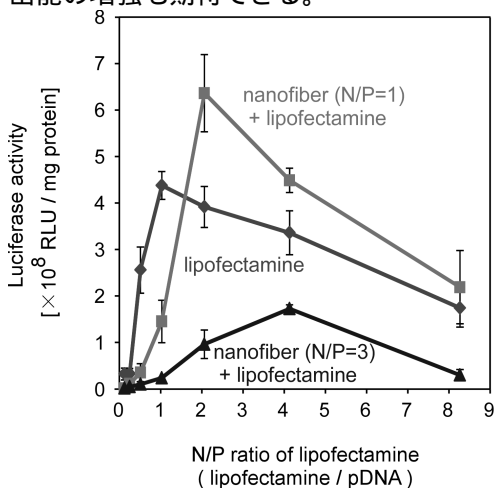


図5 ハイブリッドベクターの HeLa 細胞への遺伝子導入活性

Nanofiber ポリプレックスと lipofectamine を種々比率で混合することによって調製したハイブリッドベクターの培養細胞に対する

遺伝子導入効率を評価した結果を図5に示す。nanofiber ポリプレックスの調製条件 (N/P ratio) の違いによりハイブリッドベクターの遺伝子発現は全く異なる変化を示した。Nanofiber ポリプレックスの違いの影響を検討するために細胞取込をフローサイトメーター、細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡観察により評価したが、両評価において顕著な違いは認められなかった。しかし、無細胞系遺伝子発現評価では、明らかな違いがあり、N/P=3 の nanofiber ポリプレックスを用いて調製したハイブリッドベクターでは、nanofiber ポリプレックスの利点である高効率な転写・翻訳効率が損なわれていることが確認された。一方で N/P=1 で調製された nanofiber ポリプレックスを用いて調製したハイブリッドベクターは、nanofiber ポリプレックスの長所を維持したまま、細胞取込が促進され、結果として、良好な遺伝子導入効率を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ryuta Aono, Eiji Yuba, Atsushi Harada, Kenji Kono, Nanofiber polyplex formation based on the morphology elongation by the intra-polyplex PEG crowding effect, ACS Macro Letters, 3, 333-336 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/mz500072k

〔学会発表〕(計13件)

Ryuta Aono, Eiji Yuba, Atsushi Harada, Kenji Kono, Preparation of Hybrid Vector from Nanofiber-Polyplexes and Lipofectamine for Effective Gene Expression, 247th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2014年3月17日, ダラス, アメリカ

Ryuta Aono, Eiji Yuba, Atsushi Harada, Kenji Kono, Preparation of hybrid vectors from nanofiber-polyplexes and lipofectamine, 13th Pacific Polymer Conference, 2013年11月21日, 高雄, 台湾

原田敦史, 青野留太, 弓場英司, 河野健司, 多分岐 PEG クラウディング効果によるポリプレックス形態制御, 第62回高分子討論会, 2013年9月12日, 金沢大学

Atsushi Harada, Ryuta Aono, Eiji Yuba, Kenji Kono, Morphological Control of Multi-arm PEGylated Poly(L-lysine) Polyplexes for Effective Gene Expression, 4th Asian Biomaterials Congress, 2012年6月28日, 香港, 中国

青野留太, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司, ナノファイバーポリプレックスとの複合化による lipofectamine の遺伝子発現増強, 第62回高分子学会年次大会, 2013年5月30日, 京都国際会館

原田敦史, 多相系高分子材料への機能創

り込みによる DDS 設計,新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」第一回 若手の会(招待講演),2012年9月22日,名古屋大学

原田敦史,異種高分子連結高分子電解質のポリオンコンプレックス形成,ゲルワークショップ イン 名古屋(招待講演),2012年9月21日,KKR ホテル名古屋

青野留太,弓場英司,原田敦史,河野健司,多分岐 PEG 導入 poly(L-lysine)ポリプレックス形成における多分岐PEG排除体積効果の検討,第41回医用高分子シンポジウム,2012年6月25日,東京大学先端科学技術研究センター

青野留太,弓場英司,原田敦史,河野健司,種々排除体積効果を有する多分岐ポリエチレングリコール結合ポリ-L-リシンの合成と特性解析,第61回高分子学会年次大会,2012年5月30日,パシフィコ横浜

原田敦史,機能性デンドロンのバイオメディカル分野への応用,第61回高分子学会年次大会(招待講演),2012年5月30日,パシフィコ横浜

原田敦史,木村佑香,弓場英司,河野健司,ヘッド テイル型ポリカチオンベクターへの PEG 鎖導入効果,第60回高分子討論会,2011年9月30日,岡山大学津島キャンパス

Atsushi Harada, Yuka Kimura, Eiji. Yuba, Kenji Kono, Effective Elevation of In Vitro Gene Expression by Multi-Arm PEG-Installed Poly(L-lysine) with Inhibition Ability of DNA Condensation, 3rd Asian Biomaterials Congress, 2011年9月15日, BEXCO (韓国・釜山)

原田敦史,高分子材料への機能創り込みによるナノキャリア設計,第76回高分子若手研究会(招待講演),2011年8月5日,京都府立ゼミナールハウス

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 敦史 (HARADA, Atsushi)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 50302774