

論文の内容の要旨

Preparation and Biological Characterization of Smart Polyplex Micelles

Sensitive to Intracellular Environment

(細胞内環境に応答する高分子ミセル型遺伝子キャリアの構築とその機能評価)

氏名 宮田 完二郎

近年、ヒトゲノム解析に代表される分子生物学の目覚ましい進歩とともに、遺伝物質のように、細胞内シグナル伝達に関与する新規薬物が数多く登場してきた。これらの薬物は、癌治療・再生医療・ワクチンなど潜在的には非常に幅広い疾患への応用が期待されている。しかしながら、生体由来の薬物は、体内での代謝により失活しやすく、十分な治療効果を得ることは難しい。ドラッグデリバリーシステムは、薬剤の体内分布をコントロールすることにより、その治療効果を最大限に生かそうとする技術であり、遺伝物質のように不安定な薬剤の利用に際し、必要不可欠な技術として大きな注目を集めている。これまで、遺伝子キャリアとして最も効率が良く、また臨床で用いられてきたのは、ウィルスベクターであった。これは、ウィルスが DNA を保護するカプシド蛋白質と、特定の細胞を感知し、核までの移行を促進するエンベロープ蛋白質を備えているからである。しかしながら、現在ではウィルスのもたらす免疫反応や突然変異による危険性が非常に問題視されており、これに変わる非ウィルス性遺伝子キャリアの研究開発が盛んに行われている。本稿はその一つの試みとして、筆者が平成 15 年 4 月から現在に至るまで過去 3 年間の博士課程在学中に行った、細胞内の還元環境や pH 変化に応答して機能を発揮するインテリジェント高分子ミセル型遺伝子キャリア (polyplex micelle) に関する研究を、その実験結果に基づいて、材料学、生物学、薬学的な観点から考察した内容を学位論文としてまとめたものである。

第 1 章では、これまでの非ウィルス性遺伝子キャリアに関する研究を紹介するとともに、血中への投与から細胞内の核に至るまでに、キャリアシステムに望まれる機能に関して記述した。特に重要なのは、血中におけるキャリアの安定性とエンドソームから細胞質への移行である。ポリエチレングリコール-ポリリシンのブロック共重合体(PEG-PLys)とプラスミド DNA(pDNA)から形成される高分子ミセル型遺伝子キャリアは、生体適合性の高い PEG 鎖で覆われており(図 1 参照)、表面電位が中性に近く、立体反発を生じるため、血中蛋白質などとの非特異的相互作用が低減される。この性質から、有望な *in vivo* 用遺伝子キャリアの一つとして考えられているが、より効率の良い遺伝子治療に向け、いくつかの改良点が考えられる。それらに対して取り組んだ研究内容について、2 章から 4 章にかけて詳細に記述した。

第 2 章では、PEG-PLys ミセルの血中滞留性のさらなる向上を目指し、還元環境に応答するジスルフィド架橋の導入を行い、それに対する結果と考察に関してまとめた[1]。Lys ユニットは DNA との相互作用が強く、バッファー中では比較的な安定な complex 形成に貢献する。しかしながら、Polyplex は DNA とカチオン性高分子の間の静電相互作用を介して形成されてい

るため、電荷を帯びた物質が数多く存在する生体内では、キャリア粒子の凝集、または解離を起しやす。そこで、キャリアの構造安定化が必要となる。ジスルフィド結合は、細胞内の還元環境に反応して開裂することから、細胞外(グルタチオン濃度 1~10mM)でのキャリア安定化に貢献しつつ、細胞内(グルタチオン濃度 10  $\mu$ M)における DNA の放出を妨げないものと予想される。しかしながら、これまでの研究において、環境応答性の架橋であっても、キャリアを過剰に安定化してしまい、遺伝子発現効率を低下させることが報告されてきた。この問題を解決するために、架橋導入に伴い、キャリアの安定性に大きく影響を与えるカチオン性高分子の荷電密度の減少を試みた。PEG-PLys と N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP)を反応させることで、PLys 側鎖のアミノ基がチオール基に置き換えられた PEG-PLys-MP を得た。一方、PEG-PLys と Traut 試薬を反応させることにより、チオール基と同時にイミノ基が導入され、側鎖の荷電密度が変化しない PEG-PLys-IM を得た。これらの SH 基導入 PEG-PLys から架橋ミセルを調製し、安定性評価を行ったところ、非還元環境においては SH 基導入方法に関わらず高い安定性を示す一方で、還元環境における DNA 放出挙動に関しては大きな違いが見られた。すなわち、PEG-PLys-IM を用いた架橋ミセルは、還元環境(25mM dithiothreitol)においても DNA を放出しなかったが、PEG-PLys-MP の架橋ミセルにおいては、遺伝子の放出が確認された。また培養細胞を用いた遺伝子導入実験では、DNA 放出が見られなかった架橋ミセル(-IM)の発現効率は、非架橋ミセルに比べ大幅に低下したが、放出が見られた架橋ミセル(-MP)は 10 倍以上の発現効率を示した。以上の結果から、架橋と荷電の両密度を適切に制御することにより、非還元環境での高い安定性と細胞内での速やかな遺伝子放出が達成された。

第 3 章においては、PEG-PLys-MP-架橋ミセルのさらなる評価として、in vivo での遺伝子発現機能評価と共に、より実用面からの評価としてミセルの凍結乾燥保存についての評価を行った結果とそれに対する考察に関して記述した[2]。多くの非ウイルス性遺伝子キャリアは、コロイド安定性が低く、調製後数日の間に沈殿してしまい、長期に渡る保存が困難であり、使用に際しては要事調製を必要とする。キャリアの凍結乾燥保存が可能になれば、長期保存に加え、投与に向けての濃度調製や大量生産が容易になり、実用面で非常に大きな長所となり得る。ミセルの凍結乾燥/再溶解処理を行ったところ、架橋が導入されていないミセルは、再溶解後、粒径が  $\mu$ m オーダーまで増加し、培養細胞への遺伝子導入効率は 1/100 にまで低下した。一方、架橋導入率が側鎖のアミノ基に対して 13%以上の架橋ミセルは、凍結乾燥/再溶解処理による粒径や形状の変化は見られず、100nm 前後の粒径を維持していた。さらに培養細胞への遺伝子発現効率の減少も見られなかった。これより、ミセルへの架橋導入は、その構造安定化の寄与により、非ウイルスキャリアの凍結乾燥保存をも可能にすることが示された。さらに架橋ミセルの in vivo での遺伝子発現実験を行ったところ、架橋導入率が高いミセルは、静脈投与を介して肝臓や肺への遺伝子導入を可能とした。さらに臓器における発現パターンを観察するために、蛍光遺伝子(Venus)を発現する DNA を用いて実験を行ったところ、投与 5 日後において、ほぼ全ての肝実質細胞に遺伝子が導入されるという結果が得られた。この結果は、架橋導入によりミセルの血中安定性が向上し、より多くのミセルが各細胞に到達したためと考えられる。

第4章では、ミセルのエンドソームからの細胞質への速やかな移行を目指し、エンドソームの低pH環境に応答するpKaを有するカチオンユニットをPEG-PLyと組み合わせ、その機能評価に関して記述した[3]。一般に、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた高分子物質は、エンドソーム(pH6-7)を経由した後に、リソソーム(pH5-6)に送られ代謝されてしまう。これを防ぐために、遺伝子キャリアは何らかの方法で細胞質へ移行しなければならない。5-7前後のpKaを有するアミノ基は、エンドソーム内でプロトン化することにより、エンドソーム内の浸透圧上昇(バッファー効果)や膜障害を引き起こし、細胞質への移行を促進することが知られている。この一方で、pKaの低いアミノ基から成るカチオン性高分子は、pH7付近ではDNAとの相互作用が弱く、安定なpolyplex形成は困難である。そこで、DNAとの親和性が高いLysと、高いエンドソーム移行機能を有するdiethylenetriamine 導入アスパルタミド(Asp(DET))ユニットをランダム共重合することにより(PEG-*b*-(PLys-*r*-PAsp(DET)))、安定かつエンドソーム脱出機能を有するミセル型キャリアを構築した。得られたミセルを血清中でincubationしたところ、Asp(DET)ユニットのみから成るミセルに比べ、Lysユニットを含むランダムポリマーミセルは高い安定性を示した。また、培養細胞への遺伝子導入実験においては、Lysユニットのみから成るミセルに対して、ランダムポリマーミセルは10倍以上の遺伝子導入効率を示した。以上の結果から、PEG-*b*-(PLys-*r*-PAsp(DET))から成るミセルは、LysとAsp(DET)の両ユニットの長所、安定かつエンドソーム脱出機能を有することが確認された。

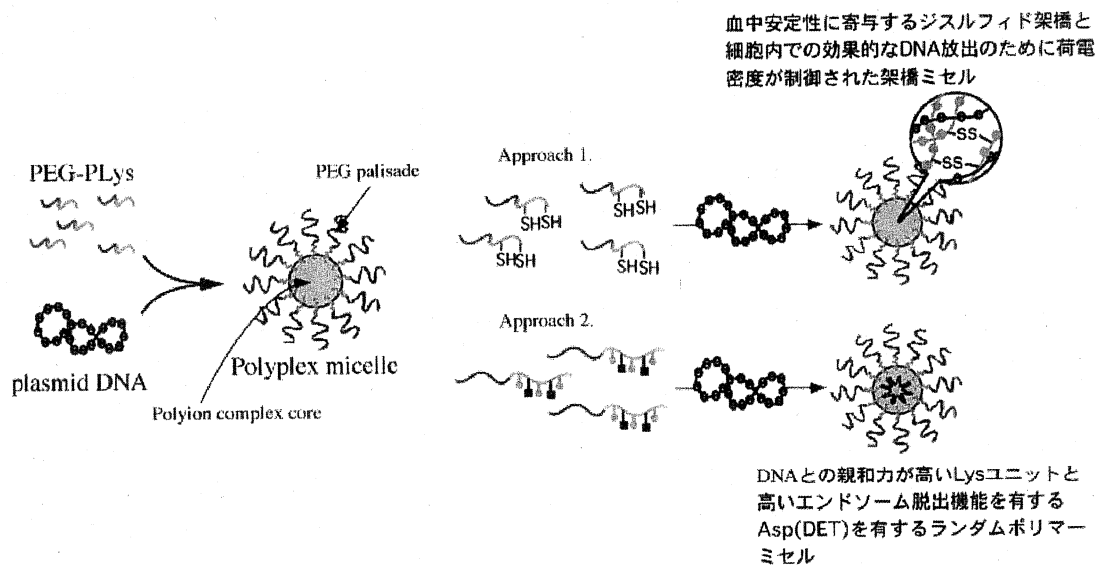


図 1.

PEG-PLys と plasmid DNA から成る高分子ミセル型遺伝子キャリアと本研究で行ったアプローチ

以上のように、本論文は、効率の良い非ウイルス遺伝子キャリアを目指し、細胞内の還元環境、もしくはpH変化に応答して機能を発揮するインテリジェント高分子ミセルの構築とその機能評価について述べられている。結果として、ジスルフィド架橋の導入により、ミセルの安定性が増加し、各臓器における遺伝子発現効率の上昇が見られた。また低pKaを有するAsp(DET)とLysユニットの共重合により、効率良くエンドソームから細胞質へ移行し、高い遺伝子発現効率を示すミセルの構築が成された。これらの結果は、非ウイルス性遺伝子キャ

リアの性能は、カチオン性高分子のわずかな化学修飾により、大幅に向上されることを示しており、将来的には、さらなる高機能化遺伝子キャリアによって、幅広い疾患に対し、高い治療効果を備えた超機能化ナノデバイスの実現が期待される。

- [1] K. Miyata, et al. Block cationer polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression, *J. Amer. Chem. Soc.* 2004, 126, 2355-1361.
- [2] K. Miyata, et al. Freeze-dried formulations for in vivo gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver, *J. Contl. Release*, 2005, 109, 15-23.
- [3] K. Miyata, et al. Preparation of polyplex micelles composed of PEG-*b*-random polycations possessing anchoring units and endosomal escaping units, in preparation.