

論文の内容の要旨

Development and evaluation of siRNA-polymer conjugate for PIC-based siRNA delivery system

(siRNA-ポリマーコンジュゲート体を用いた siRNA デリバリーシステムの構築と機能評価)

武元 宏泰

small interfering RNA (siRNA)は、細胞内において自身の配列と相補的な mRNA を特異的に切断する現象、RNA interference (RNAi)を誘導することで広く知られている¹。2003 年にヒトゲノム解析が完了して遺伝子治療への道が拓かれた現在、RNAi はその優れた遺伝子選択性のため医療への応用が期待されており、標的疾患としては C 型肝炎や HIV、がん等が盛んに研究されている²。核酸医薬として同様に研究されているプラスミド DNA (pDNA) が核まで送達される必要があるのとは異なり、siRNA は細胞質内に導入されれば RNAi を誘導できる上、遺伝子改変を施さなくてすむという倫理的観点、なおかつその効果は 1 週間程度で無くなるという代謝の観点からも、次世代型の医薬としての期待は大きい。そのような期待に応えるためにも、siRNA を標的細胞内に可能な限り効率的に送達するためのデリバリーシステムが必要となる。

siRNA や pDNA に代表される核酸は、細胞膜と同様に負電荷を帯びているため、細胞膜を容易に透過出来ない。そこで、核酸とカチオン性ポリマーとでポリイオンコンプレックス(PIC)形成を行い、負電荷を中和することにより、細胞内への移行を促進する方法が広く受け入れられている³。この手法では、PIC 内に核酸を内包することで核酸分解酵素からの保護が見込まれる上、PIC の調製自体が簡便であるという長所もある。ところが、siRNA は短い剛直性分子であるため、siRNA 由来の PIC は血清培地中では不安定であることが知られている。そこで本研究では、柔軟なポリマーに対して複数の siRNA 分子をグラフト導入することにより、siRNA 由来の PIC の安定性を改善する手法を開発した⁴。この手法では、siRNA グラフト共重合体の有する電荷数が単量体の siRNA に比べて多いため、カチオン性ポリマーとの静電相互作用が増大し、結果として血清培地中でも安定な PIC 形成が可能となる。さらに、長い二本鎖の RNA は免疫反応を誘導することが知られているが⁵、本研究の分子デザインでは siRNA の主鎖への導入は細胞内環境にตอบสนองして開裂するリンカーを介して行われているため、低い免疫原性でもって効率的に遺伝子発現抑制を誘導することが期待される。

まず本研究では、ポリアスパラギン酸側鎖に対してジスルフィド結合を介して siRNA を導入した PAsp(-SS-siRNA)を開発した(図1)。これは細胞内外の還元環境の差異を利用して PIC の安定性をコントロールするものである。細胞内環境は細胞外に比べてより還元的であり、それは還元性物質であるグルタチオンの細胞外濃度が数 μ M であるのに対し細胞内では数 mM に昇ることに由来する。実際に、PAsp(-SS-siRNA)由来の PIC は血清培地中で安定であったが、還元性物質を加えた条件下では不安定化し、siRNA を遊離することが確認された。さらに、ルシフェラーゼを恒常的に発現するマウスメラノーマ(B16F10-Luc)を用いた細胞実験において、PAsp(-SS-siRNA)由来の PIC は、単量体 siRNA 由来の PIC に比べて 5 倍量の siRNA を細胞内へと送達可能であることがわかった。これは、PAsp(-SS-siRNA)由来の PIC が血清培地においても安定に存在できることに帰結される。遺伝子発現抑制能においても、PAsp(-SS-siRNA)由来の PIC(80%の効果)は単量体 siRNA 由来の PIC(30%の効果)に比べて強力なルシフェラーゼ発現抑制を誘導した。

一方で、PAsp(-SS-siRNA)に代表されるグラフト共重合体では、ポリマー同士のカップリング反応がしばしば合成手法として用いられるが、その反応効率は低いことが多い。実際に、PAsp(-SS-siRNA)の合成ではカップリング効率は 30%程度であり、70%の RNA が無駄となっている。よって、ポリマー同士のカップリング効率を改善することが出来れば、合成の際の RNA の無駄が低減されるだけでなく、液体クロマトグラフィーを利用した煩雑な精製操作も不要となる。そこで、カップリング反応の改善を目指し、Copper free Click Chemistry(CFCC)⁶に着目した。CFCC はアジド基とシクロオクチンとのカップリング反応であり、低温においても高い効率でポリマーを低分子修飾することが可能である。しかし、CFCC でのポリマー同士のカップリングは報告に乏しく、実際に siRNA 末端修飾アジド(siRNA-アジド)と Poly(ethylene glycol)末端修飾シクロオクチン(PEG-シクロオクチン)とのカップリングにより PEG-siRNA の合成を水溶液中で試みたところ、反応溶液を室温にて 2 日間静置しても siRNA-アジドの反応率は 60%と芳しくなかった。siRNA に代表される生体高分子を長時間水中に置くことは、バクテリアの発生や酵素による分解等の問題をはらむため好まれない。そこで、さらなるカップリング反応改善の試みとして、反応溶液の凍結・解凍という簡便なプロセスを通じて、

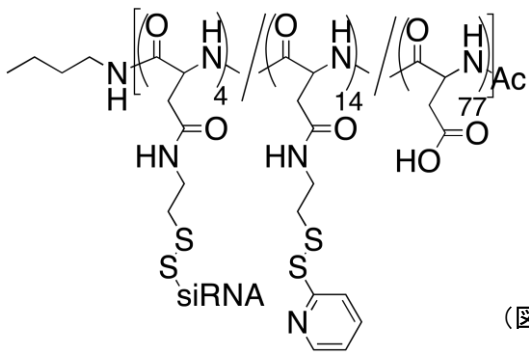
凍結の際に誘起される溶質の濃縮現象に基づいて反応率を向上させる手法を開発した⁷。siRNA-アジドとその2倍のモル量のPEG-シクロオクテンとを水溶液中で混合し、-30°Cにて一晚凍結した後に4°Cで解凍すると、siRNA-アジドの反応率は約95%であった。このことから、凍結・解凍処理により反応率が飛躍的に向上することが示された。また、凍結温度を-80°Cにすると反応率は解凍温度に依らず約10%であり、凍結温度を-30°Cとしても解凍温度を42°Cにすると反応率は約75%となったことから、凍結・解凍の温度が反応率向上に重要であることが明らかとなった。一般に、凍結時に高い温度を設定することで水分子の結晶化が誘起されやすくなり、それに伴って溶質分子が系内で追いやられることで溶液が局所的に濃縮される⁸。凍結・解凍処理によるCFCCカップリング反応の促進においても同様の現象が起きていると考えられる。さらに、凍結・解凍処理により合成されたPEG-siRNAが(変性などを起こさずに)生物活性を維持していることを調べるために、ルシフェラーゼ安定発現ヒト子宮頸がん細胞(HeLa-Luc)に対して市販の遺伝子導入試薬(Lipofectamine RNAiMAX)を用いたトランスフェクション実験を行った。結果として、PEG-siRNAは通常の単量体siRNAと同等のルシフェラーゼ発現抑制を誘導した。このことから、凍結・解凍処理の後でもsiRNAの生物活性が維持されていることが確認された。

さらに、この凍結/融解の手法を用いることにより、後期エンドソーム内pHに相当する弱酸性条件下で、電荷がアニオンからカチオンへ反転するポリマー(Charge Conversional Polymer, CCP)を主鎖としてsiRNAが側鎖に導入された新規siRNAグラフト共重合体(CCP(-siRNA))を開発した(図2)。CCP(-siRNA)では弱酸性条件下にて主鎖の電荷が反転する際にsiRNAが遊離し、反転した後に生成したカチオン性ポリマーがエンドソーム膜を破壊することで、エンドソーム内包物の細胞質への移行を促進するように設計されている(CCP(-releasable siRNA))(図2a)。実際に、CCP(-siRNA)は合成時のカップリング効率が約95%であり、そのPICをルシフェラーゼ安定発現ヒト卵巣がん細胞(SKOV3-Luc)に対してトランスフェクションすると、単量体siRNA由来のPIC(エンドソームとの共局在率70%)に比べて効果的にsiRNAがエンドソームから細胞質へと移行する様子(エンドソームとの共局在率30%)が確認された。さらに、CCP(-siRNA)由来のPICは、単量体siRNA由来のPIC(10%の効果)に比べて有意に高い遺伝子発現抑制(50%の効果)を達成した。また、CCPが電荷反転を起こしてもsiRNAがポリマー主鎖から遊離しないように設計されたポリマー(CCP(-unreleasable siRNA))(図2b)を用いてPICを調製すると、CCP(-releasable siRNA)由来のPICと同等の遺伝子発現抑制を実現するものの、有意に高い免疫反応(IFN α 産生)を誘導した。このことから、低い免疫原性を備えた分子設計に対して、siRNAが主鎖から遊離する機能の重要性が示唆された。

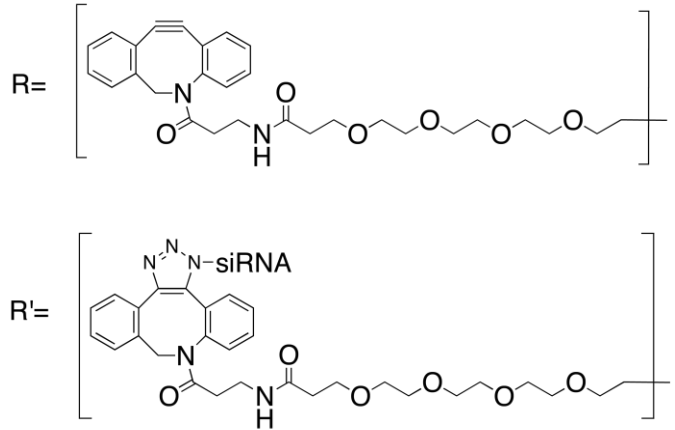
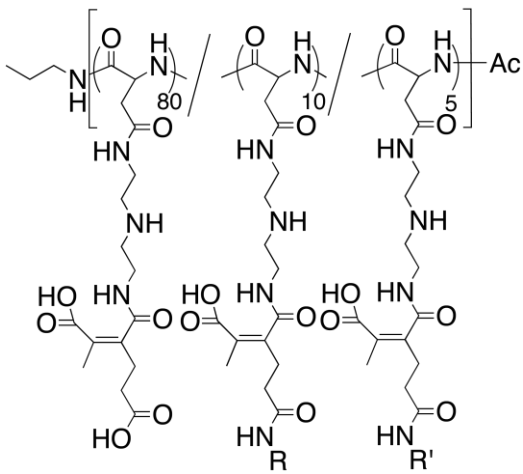
本研究では、siRNAグラフト共重合体を基盤としてPIC型siRNAデリバリーを展開することにより、効率的な遺伝子発現抑制の誘導に成功した。次に、siRNAグラフト共重合体を合成する際に課題となっていたカップリング効率を飛躍的に向上させる合成手法を新規に考案し、その手法を応用することによりsiRNAグラフト共重合体合成時に生じる未反応のsiRNA量を大幅に削減した。また、siRNAグラフト共重合体の主鎖としてエンドソーム脱出能を有する機能性ポリマー(CCP)を採用することにより、siRNAを効率的に細胞質へ送達することに成功した。さらに、siRNAグラフト共重合体においてsiRNAが主鎖から遊離する機能(化学結合)を組み込むことで免疫原性が低下することを実証し、低い免疫原性と高い薬理活性を両立する新規siRNAプロドラッグの開発に成功した。

[参考文献]

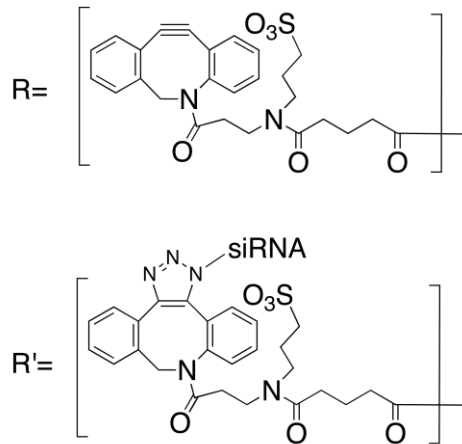
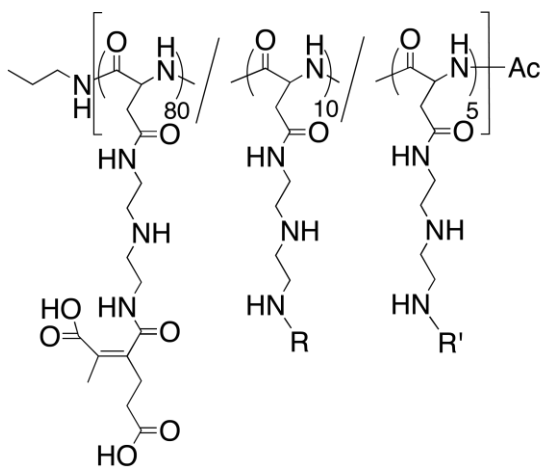
- 1 Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* 2001, 411, 494-498
- 2 Castanotto, D.; Rossi, J. J. *Nature* 2009, 457, 426-433
- 3 Kircheis, R.; Wightman, L.; Wagner, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 53, 341-358.
- 4 Takemoto, H.; Ishii, A.; Miyata, K.; Nakanishi, M.; Oba, M.; Ishii, T.; Yamasaki, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Biomaterials* 2010, 31, 8097-8105
- 5 Manche, L.; Green, S. R.; Schmedt, C.; Mathews, M. B. *Mol. Cell Biol.* 1992, 12, 5238-5248
- 6 Jewetta, J. C.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1272-1279
- 7 Takemoto, H.; Miyata, K.; Hattori, S.; Osawa, S.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 1503-1506
- 8 Hagiwara, T.; Mao, J.; Suzuki, T.; Takai, R. *Food Sci. Technol. Res.* 2005, 11, 407-411



(図1 PAsp(-SS-siRNA)の構造式)



(図2 CCP(-releasable siRNA))



(図3 CCP(-unreleasable siRNA))