

## 論文の内容の要旨

論文題目 生体適合性高分子ナノミセルを用いた *in vivo* 核酸デリバリー

内田智士

### 背景 — 生体適合性高分子ナノミセル

核酸デリバリーは生体内へ持続的に治療用タンパク質・ペプチドを供給する手段として有望だ。安全な核酸デリバリーの手段の確立を目指し、当研究室では非ウイルス性ベクターである高分子ナノミセルを開発した。ポリエチレングリコール(PEG)とポリカチオンからなるブロック共重合体とプラスミド DNA (pDNA)やメッセンジャーRNA (mRNA)といった核酸を混合することで、表面に PEG、中心部に凝縮した核酸を持つ粒径 100 nm 以下のナノミセルが形成される。このナノミセルは生理的条件下で高い安定性を持つこと、PEG の立体反発効果により生体内で異物認識を受けにくいこと(ステルス効果)から、特に *in vivo* 環境で優れた効果を示す(Kataoka, K, *et al.* 2001 *Adv Drug Deliv Rev* 47: 113)。さらにブロック共重合体のカチオン部分に当研究室で開発したポリマーである poly{N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp(DET))を用いることで、ナノミセルのエンドソーム脱出効率が向上し効率的な核酸導入が得られる。また PAsp(DET)は生分解性を有するため他のポリカチオン性核酸導入試薬と比べ毒性は低い。このように優れた機能を持つ PEG-PAsp(DET)ナノミセルは、骨欠損や特発性肺動脈高血圧症といった疾患モデル動物への応用において優れた治療効果を示した(Itaka, K, *et al.* 2011 *Curr Gene Ther* 11: 457)。

### ナノミセルの安全性の評価とその更なる向上

本研究では PEG-PAsp(DET)ナノミセルの安全性の評価とその向上に取り組んだ。以前の報告でナノミセルの経気道肺投与 7 日後の肺組織において、ほとんど炎症性変化が観られなかった(Harada-Shiba,

M, *et al.* 2009 *Mol Ther* 17: 1180)。一方、本研究でナノミセルを培養細胞に導入したところ、投与 30 分後に細胞膜傷害が観られた。このようにナノミセルはその生分解性のため蓄積毒性は示さないものの、一定レベルの急性毒性が観られることが分かった。この急性毒性はナノミセルと結合していないフリーポリカチオンが負に帯電した細胞膜に結合することが原因だった。そこでアニオン性高分子であるコンドロイチン硫酸(CS)をナノミセルに添加したところ、CS はフリーポリカチオンと結合することで急性の細胞膜傷害を軽減した。この CS 添加系は、下肢骨格筋へのハイドロダイナミクス法による投与や、経気道肺投与においても、投与に伴う急性の組織傷害を軽減した。

次にフリーポリカチオンが少ない条件でも高い核酸導入効率を得られるシステムを構築することによって急性毒性の軽減を目指した。ミセル表面の PEG は *in vivo* 環境における核酸導入に重要な役割をはたす一方で、ナノミセルの細胞内取り込みや、その後の発現に至るまでの過程を阻害することが知られており PEG ジレンマと呼ばれている。本研究ではミセル表面の PEG 密度を減らすことで、PEG ジレンマの解消を試みた。そこで PEG-PAsp(DET)ブロック共重合体(B)と PEG を持たない PAsp(DET)ホモポリマー(H)を様々な比(B/H 比)で混合して pDNA に添加することで、PEG 密度の低い B-H ナノミセルを調製した。B/H = 50/50 のナノミセルの経気道肺投与を行ったところ、B/H = 100/0 のナノミセルと比べてフリーポリカチオンが少ない状態でも十分な pDNA 導入効率を得ることが出来た。これは、ホモポリマーがナノミセルのエンドソーム脱出を効率化したためであった。一方で、B/H = 50/50 のナノミセルを投与した 4 時間後の肺組織における炎症反応は、B/H = 100/0 のナノミセルと同程度の低いレベルに留まった。このように CS 添加や PEG 密度最適化のシステムを用いることで、ナノミセルの核酸導入効率を低下させることなく、フリーポリカチオンに起因する急性毒性を軽減することに成功した。

### ***In vivo* 環境で PEG が炎症を軽減するメカニズム**

ホモポリマーと pDNA からなる PEG を持たない複合体(非 PEG 化ポリプレックス)は経気道肺投与の 4 時間後に強い炎症反応を惹起したため、結果的に導入 pDNA の発現も低いレベルに留まった。この非 PEG 化ポリプレックスは表面が正に帯電しているため、気管支肺胞洗浄液(BALF)に添加したところ、その直後に凝集が観られた。これと一致して、非 PEG 化ポリプレックスは PEG で覆われたナノミセルと比べて肺組織中でマクロファージの貪食を受けやすかったことから、非 PEG 化ポリプレックスでは投与直後の凝集に伴うマクロファージの活性化によって強い炎症反応が惹起されたものと考えられた。一方で PEG は投与後のナノミセルの凝集を抑制することで *in vivo* デリバリーに伴う炎症反応を軽減した。

### **ナノミセルを用いた中枢神経系(CNS)への mRNA デリバリー**

次にナノミセルに内包させる核酸の安全性について検討した。pDNA デリバリーは偶発的にホストゲノムへ取り込まれることで挿入変異をもたらす危険性、さらにゲノムに挿入された pDNA からの発現が制御できなくなる危険性を持つ。そこで、本研究ではこのような危険のない mRNA のデリバリー

に取り組んだ。

mRNA はヌクレアーゼが豊富な生体内で不安定であること、さらに Toll 様受容体(TLR)を介して強い免疫応答を惹起することから、その *in vivo* デリバリーに関する報告は非常に少なかった。これらの問題を解決するために、本研究では mRNA を PEG-PAsp(DET)ナノミセルに内包させた。分泌型ルシフェラーゼタンパク質(Gluc)をレポーターとして用いて、mRNA 内包ナノミセルをラットのくも膜下腔へ導入したところ、1 週間近くはわたって脳脊髄液中にて Gluc の発現が確認された。一方で Gluc タンパク質の直接投与では投与後 4 時間以内にほとんどの Gluc が脳脊髄液中から消失したことから、mRNA 内包ナノミセルが生体へ持続的にタンパク質・ペプチドを供給するシステムとして有効であることが分かった。

免疫原性に関して、複合体形成をしていない naked mRNA を用いた場合、導入 4 時間後の CNS 組織で強い炎症反応が観られたが、ナノミセルを用いた場合の炎症反応はバッファー投与群と同程度の低いレベルに留まった。この炎症に対する TLR シグナルの関与を調べるために、TLR7 を恒常発現する HEK293 細胞を用いた評価を行ったところ、naked mRNA で TLR 特異的な炎症反応が観られたが、ナノミセルではそのような反応は観られなかった。ナノミセルではそのステルス効果のためエンドソーム内における TLR の mRNA 認識が回避された状態でエンドソームを脱出したものと考えられた。このようにナノミセルを用いることで、*in vivo* mRNA デリバリーに伴う不安定性と免疫原性の問題を解決できた。

### ナノミセルを用いた核酸導入スフェロイド移植

最後にナノミセルのその他の応用法として、核酸導入細胞移植に取り組んだ。移植の際に 3 次元細胞塊であるスフェロイドの培養システムを用いることで、その効果が高められないかと考えた。当研究室では以前、肝細胞スフェロイドに対して PEG-PAsp(DET)ナノミセルを用いて pDNA を導入することで、細胞の機能を保ったまま 1 か月以上の pDNA 発現が得られたことを報告した(Endo, T, *et al.* 2012 *Drug Deliv and Transl Res* 2: 398)。本研究では *ex vivo* で pDNA を導入した肝細胞スフェロイドをマウス皮下に移植することで、このシステムの治療応用への可能性について検討した。スフェロイドを用いた場合宿主組織において 1 か月以上の pDNA 発現が得られ、さらにエリスロポエチン発現 pDNA を用いることで造血効果を得ることに成功した。一方で単層培養細胞に pDNA を導入して移植した場合の pDNA の発現効率はスフェロイドと比べて有意に低かった。

また、アルブミン産生能を指標に移植後の肝細胞の機能を調べたところ、スフェロイドを用いることで移植細胞の機能が向上することが分かった。さらに EFGP 発現細胞を用い宿主組織中における移植細胞の分布を調べたところ、スフェロイドを用いた場合にのみ移植細胞の血管周囲への局在が観られた。スフェロイドを用いることで宿主組織中での酸素化・栄養化が促進されたため、移植細胞の機能が向上したと考えられた。

## 結語

本研究では CS 添加や PEG 密度最適化といったシステムを用いることで、ナノミセル溶液中のフリーポリカチオンに起因する急性毒性の軽減に成功した。また、核酸としてより安全な mRNA の導入にナノミセルを用いたところ、mRNA の問題点であった不安定性と免疫原性が克服され、中枢神経系において 1 週間近くにわたる持続発現を実現した。ナノミセルを核酸導入スフェロイド移植に用いることで、生体内で 1 か月以上にわたる治療用タンパク質産生が可能となった。ここに述べた PEG-PAsp(DET)ナノミセルを用いたシステムは、生体への安全かつ持続的な治療用タンパク質・ペプチドの供給を実現できるため、今後の臨床応用に向けて有望である。