

細胞内動態解析情報に基づく遺伝子送達用 ナノ粒子デザイン

北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室
秋田英万



1953年4月、ジェームス・ワトソンとフランシス・クリック(1962年ノーベル生理学・医学賞受賞)の連名でNature誌に掲載されたわずか900語たらずの論文は、その後のDNAを中心とした分子生物学の幕開けの原動力となり、その後の遺伝子クローニング

技術を始めとした基盤技術は、本分野の大きな発展をもたらした。この結果、蛋白、抗体を医療に応用するバイオ医薬が生まれている。折しも、21世紀初頭に完了したヒトゲノム計画は、バイオインフォマティクスや次世代シーケンサー技術の発展をもたらした。その結果、疾患関連遺伝子の同定や機能解析が急速に進展している。この時代背景の中で、遺伝子を薬として利用する遺伝子治療の応用は、先天的疾患に対する遺伝子補足療法を目的としたものから、成長因子等の遺伝子発現による後天的な末梢疾患治療へと益々広がりを見せている。

薬の機能を適切かつ効果的に発揮させ、また、副作用を軽減させるためには、薬理作用部位まで特異的に送達させるためのドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の構築が不可欠である。抗癌剤など、脂溶性に富んだ低分子薬物は、リポソームなどの輸送キャリアによって腫瘍組織まで運ばれ、細胞外で放出されれば、自発的に細胞内、さらに核まで移行して薬効を示すことができる。一方で、遺伝子や核酸医薬においては、サイズなどの物性の問題から細胞への取り込みが著しく制限される。さらに、その作用機序に応じて、オルガネラの標的化も重要な課題となる。特に、遺伝子は転写をうけるための核が標的部位であるが、その過程において、エンドソーム膜や核膜といった生体膜バリアを突破する必要がある。また、転写や翻訳といった核移行後の過程についても考慮したデザインが必要となる。

遺伝子治療研究にはウイルスベクターを用いたアプローチが先行してきた。しかし、レトロウイルスを用いた重症複合型免疫不全症治療あるいは、アデノウイルスを用いたOrnithine Transcarbamylase (OTC)欠損症治療に対する臨床試験において、これらウイルスベクターの癌原性や免疫原性が顕在化することとなり開発が遅れてきた。一方、近年では、より免疫原性の少ないアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた研究が盛んに行われており、2012年には、先進国(欧州)ではじめて、リポ蛋白質リパーゼ欠損症

に対する遺伝子治療薬として『Glybera(ユニキュア社)』が承認されるに至っている。

一方、安全性の観点からは、人工材料から形成される非ウイルスベクターを用いたアプローチにも極めて大きな期待がかかる。非ウイルスベクターに関しては、1987年にFelgner博士らによってはじめてカチオン性リポソームを用いた方法が報告されて以来、カチオン性材料(カチオン性リポソームやカチオン性ポリマー等)を用いた応用研究が多くなされてきた¹⁾。遺伝子は負電荷ポリマーとしての性質を有する巨大分子であり、細胞への取り込み効率が極めて低いが、カチオン性材料は静電的複合体形成を介して遺伝子を簡便に微粒子化できる点や、細胞が取り込みやすい正電荷の粒子を形成できる点で理にかなったものである。しかしながら長年の研究にもかかわらず、未だに非ウイルス性ベクターの実用化には至っていないのが現状である。そこで筆者は、カチオン性ベクターにおける現状の問題点を探るべく、アデノウイルスとの細胞内動態比較解析を行ってきた。本稿では、比較により見えてきた人工ベクターにおける課題点と、本解析結果に基づいて考案している新しいベクターのデザインについて紹介したい。

アデノウイルスと人工ベクター間の細胞内動態比較

ウイルスは、長年の進化と淘汰を経るなかで、細胞内の様々なバリアを突破するための機能を獲得し、さらにこれら機能を担う素子が単一のナノ粒子内に効率良く搭載された究極的な構造体と言えよう。ウイルスの細胞内動態を人工ベクターのそれと比較することで、現時点における人工ベクターの問題点(遺伝子発現の律速段階)を解明できれば、今後の開発方針を与える上で極めて有用な情報となる。私達は共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング画像をもとに、エンドソーム/リソソーム、細胞質、核内の遺伝子量を同時に測定する方法論を開発し²⁾、分裂細胞におけるカチオン性リポプレックスとアデノウイルスの細胞内動態比較を行った^{3,4)}。本研究を開始した当初は、4~5桁にも及ぶ遺伝子発現効率の差は、細胞内動態のどこかに原因があると考えて研究を進めてきた。しかし、結果の全貌が見えてくるにつれ、はじめの仮説は筋違いであることが明らかとなった。すなわち、両者の間の細胞内動態(核への輸送効率)は、アデノウイルスのほうが3倍程度しか優位性がなく、大きな発現効率の差は、細胞内動態よりも、むしろ核に移行した後の過程(転写・翻訳)に起因することが明らかとなった。同様の結果は、他のグループにより、ポリカチオンを用いた遺伝子導入時でも得られている⁵⁾。さらに、mRNAの定量化を行うことにより、人工ベクターにおける3桁~4桁にも及ぶ低い核移行後発現効率における転写、翻訳過程の寄与を解析した結果、転写過程において約1桁、さらに翻訳過程において約2桁相当

分が寄与することを明らかとした。さらにそのメカニズムに関して詳細に解析した結果、転写に関しては、核内における遺伝子のベクターからの解離が悪いことがその要因であることが示唆された。一方、翻訳過程においては、カチオン性ベクターと mRNA の静電的相互作用が低い効率の要因となることが示唆されている³⁾。このような低い転写・翻訳効率は人工ベクターに起因するもう一つの課題点である細胞間における非均一性 (heterogeneity) にも関連する事象であることも明らかとなっている⁶⁾。

細胞内動態評価情報を基にした考案した 粒子デザイン

我々の所属する研究室においては、遺伝子とポリカチオンの凝縮化コア粒子を脂質膜 (リポソーム) によりコーティングした多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multi-functional envelope-type nano-device: MEND) を基盤とし、遺伝子や核酸のデリバリーシステムを構築してきた。上述したように、これまでのベクター開発の多くは、遺伝子とカチオン性材料との複合体を基盤として開発が進んできた。MEND の粒子に関して、これまでカチオン性ペプチドの表面修飾や、カチオン性脂質を利用することで、高い細胞内取り込みと遺伝子発現を達成できることを実証している。しかし、カチオン性材料は、細胞毒性を引き起こすのみでなく、さらに上記に示したような転写、翻訳効率への悪影響が懸念される (図 1 左)。

そこで、筆者は、これまでの遺伝子デリバリーベクター開発に頻用されてきたカチオン性成分を、あえて極力排除するという新たな設計の基、ベクター開発を開始している (図 1 右)。すなわち、遺伝子をコンパクションするためのポリカチオン量を最小限にとどめると共に、脂質エンベロープについても、細胞質内の生理的 pH では表面電荷を有さない点、さらには積極的に崩壊させることができる点が大きな特徴となる。本粒子デザインを実現するための開発された分子が、脂質様サーファクタント (SS-cleavable pH-activated lipid-like material: ssPalm) である (図 2)。本分子は、2つの脂溶性基 (脂肪鎖) を有しているため、脂質同様にエンベロープ膜を形成することができる。さらに、本分子には、細胞内環境に応答するユニットを2種類有している。一つ目は、2つの3級アミンユニットである。本ユニットは、エンドソーム内の低 pH に環境に応答してプロトン化を受け、正に帯電することができる。この帯電は、エンドソーム膜の不安定化に伴う細胞質への放出を促進する上で極めて重要な駆動力となる。一方、細胞質に脱出した後は細胞質の中性 pH 環境に応じて正電荷が消失し、mRNA との静電的相互作用も回避できると考えられる。もう一つは、2つの脂溶性基 (脂肪鎖) と三級アミンユニットを連結するジスルフィド結合であり、細胞質内における還元環境下に応答して切断される。本ユニットの切断により ssPalm は2本の脂肪鎖から1本の脂肪鎖へと変換されるために、エンベロープ膜の不安定化が誘起され、遺伝子

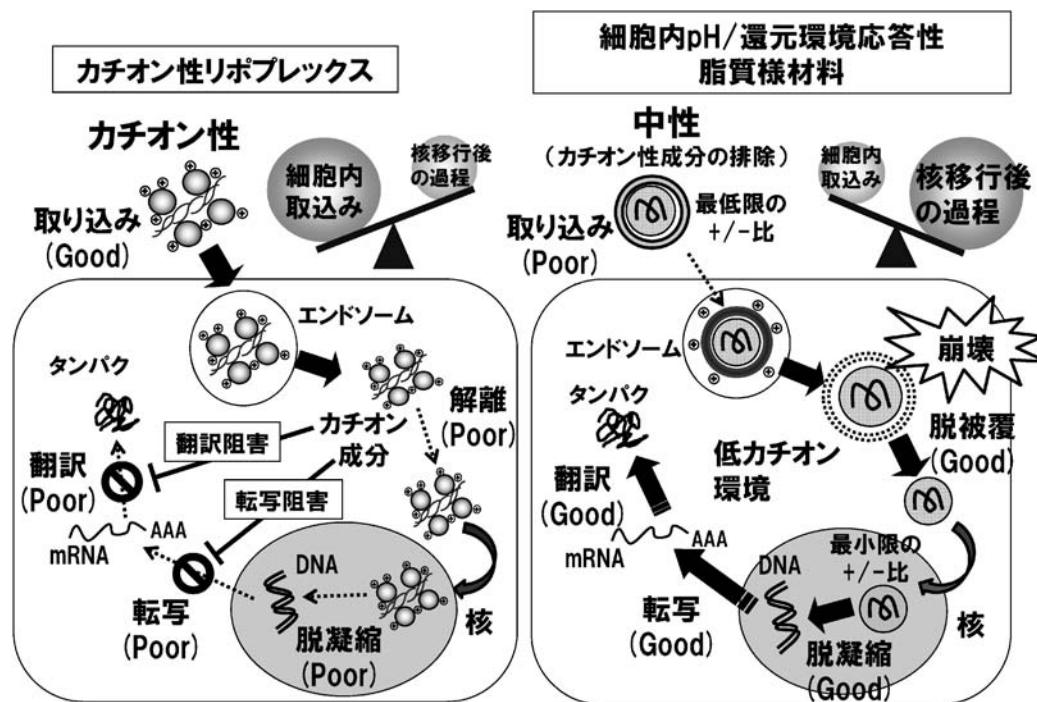


図 1 従来のカチオン性ベクターの問題点(左)と新しい遺伝子ベクター用な粒子設計(右)の概念図

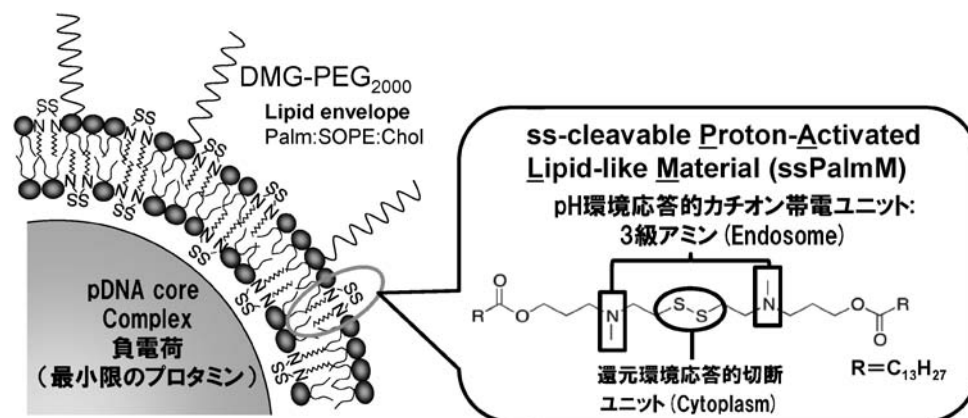


図2 ssPalmの構造式と本分子から形成される粒子の模式図

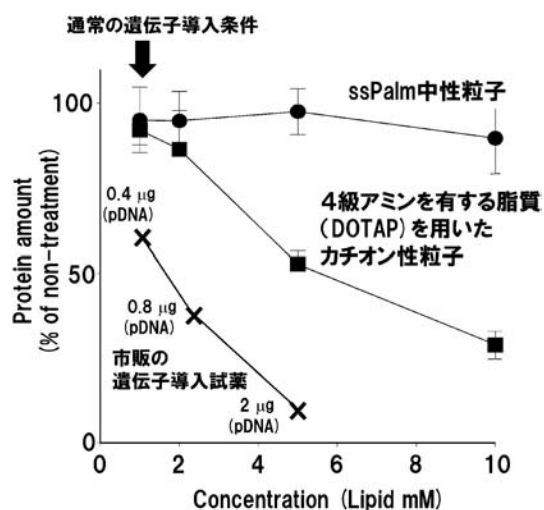


図3 ssPalm粒子及びカチオン性ベクターの細胞毒性比較

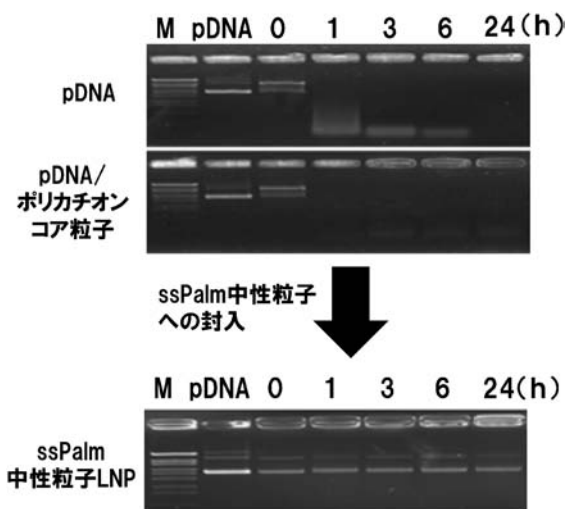


図4 ssPalm中性粒子への封入によるプラスミドDNAの血清中安定性評価

が脱被覆されるように設計されている(図1右)⁷⁾。本ssPalmから形成される中性粒子は、従来の4級アミン含有カチオン性脂質(1,2-dioleoyl-3-(trimethylammonium) propane: DOTAP)を用いた粒子と比較して低い取り込みながら同程度の遺伝子発現効率を示すことから、細胞内へ取り込まれた後の効率が優れていることが明らかとなった。

現在までに、本ssPalmを用いた粒子を基盤技術とした*in vivo*における応用研究を開始している。ssPalmを用いた粒子は、細胞毒性が極めて低いことを明らかとしている。市販の遺伝子導入試薬やカチオン性粒子においては、投与量依存的に遺伝子導入後のタンパク量が減少していくが、ssPalmを用いた中性粒子に関しては、通常の遺伝子導入条件と比べて10倍高い投与量を加えても細胞毒性が全く見られない(図3)⁷⁾。さらに、ssPalm中性粒子は、マウス血清中において高い安定性を示すことも明らかとしている(図4)。裸のプラスミドDNAあるいは、プラスミド

とポリカチオンから成るコア粒子をマウス血清中でインキュベーションすると、1時間以内に速やかに分解してしまうが、ssPalm中性粒子に封入した場合、少なくとも24時間は安定に遺伝子を保持できる事を見出している⁷⁾。

in vivo 応用展開の第一歩として、肝臓への遺伝子導入システムを考えている。従来からの報告、あるいは我々自身の検討により、カチオン性遺伝子ベクターを血中に投与した際には、①血液で凝集塊を形成し、肺血管を閉塞させてしまうこと、②発現持続性が低いこと(6時間をピークとし、2日以内に発現消失)、③サイトカイン産生を誘起してしまうことなどが問題点として考えられてきた。一方、ssPalm中性粒子を静脈内に投与し、*in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、肝臓血液中を極めて分散した形で血液を流れ、さらに肝臓中へ速やかに取り込まれることが明らかとなっている。さらに、ssPalmを用いた中性粒子に関しては、2週間まで発現が持続する

ことが明らかとなった。また、本持続性に関しては、搭載するプラスミド DNA に大きく依存しており、非メチル化 CpG 配列を含有しないプラスミド DNA を用いた際のみ得られることが明らかとなっている。さらに、従来のカチオン性粒子あるいは、CpG 配列含有プラスミド搭載粒子においては、種々のサイトカイン類(IL-12や IFN γ など)が産生されるが、CpG 配列非含有 DNA を搭載した ssPalm 粒子に関しては、これら免疫応答は認められない。これらのことから、ssPalm を用いた中性粒子は、従来のカチオン性ベクターにおいて解決すべき問題点であった発現持続性の低さや免疫応答性を克服できる有用なキャリアであることが示された。

まとめ

以上、ssPalm から形成される粒子は、中性であるが故に細胞内取り込みが低いという問題点があるものの、従来型のカチオン性脂質を用いた粒子と比較しても全く遜色ない遺伝子導入効率が得られることが明らかになった。さらに、中性であるが故に、血中投与型製剤への展開を考える上でも高い有用性が期待された。上記に肝臓への遺伝子送達の実例を挙げたが、その他の標的として例えば癌を考えると、従来のカチオン性粒子を用いた場合には、血中滞留性を維持するために高密度で水溶性ポリマーを修飾しなければならない。一方、高密度の水溶性ポリマー修飾は、エンドソーム脱出効率を阻害してしまうなどのジレンマを抱え、十分な遺伝子発現効率を得ることが困難となる。中性粒子は、血中滞留性を考慮する上でも有利であり、少ない水溶性ポリマー修飾で十分血中滞留性を獲得することができる点でも癌への遺伝子デリバリーシステムとしての発展性も期待できる。さらに将来的にはリガンド修飾などにより、取り込みを促進することでさらなる機能促進や組織標的化も期待できる。今後 *in vivo* 適応についても積極的に

展開したいと考えている。

参考文献

- 1) Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., *et al.*: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7413-7417 (1987).
- 2) Akita, H., Ito, R., Khalil, I. A., Futaki, S. and Harashima, H.: Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Mol. Ther.*, **9**: 443-451 (2004).
- 3) Hama, S., Akita, H., Iida, S., Mizuguchi, H. and Harashima, H.: Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex. *Nucleic Acids Res.*, **35**: 1533-1543 (2007).
- 4) Hama, S., Akita, H., Ito, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T. and Harashima, H.: Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Mol. Ther.*, **13**: 786-794 (2006).
- 5) Varga, C. M., Tedford, N. C., Thomas, M., Klibanov, A. M., Griffith, L. G. and Lauffenburger, D. A.: Quantitative comparison of polyethylenimine formulations and adenoviral vectors in terms of intracellular gene delivery processes. *Gene Ther.*, **12**: 1023-1032 (2005).
- 6) Akita, H., Ito, R., Kamiya, H., Kogure, K. and Harashima, H.: Cell cycle dependent transcription, a determinant factor of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *J. Gene Med.*, **9**: 197-207 (2007).
- 7) Akita, H., Ishiba, R., Hatakeyama, H., Tanaka, H., Sato, Y., Tange, K., *et al.*: A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like material as a carrier for plasmid DNA. *Adv. Healthc. Mater.*, **2**: 1120-1125 (2013).