

博士論文

筋組織への核酸送達キャリア構築に向けた
ブロック共重合体及び核酸の化学構造設計と機能評価

茶谷 洋行

目次

第1章 序論

1.1	実用化された核酸医薬とその課題	4
1.2	筋組織への核酸送達に向けた生体バリアとその回避・突破方法	9
1.3	極小サイズの核酸封入ポリイオンコンプレックス	10
1.4	本研究の目的	13
	参考文献	15

第2章 ブロック共重合体の設計

2.1	緒言	21
2.2	実験方法	23
2.3	実験結果と考察	28
2.4	結論	50
	参考文献	51

第3章 核酸化学構造の設計

3.1	緒言	53
3.2	実験方法	55
3.3	実験結果と考察	62
3.4	結論	78
	参考文献	79

第4章 筋組織への核酸送達キャリアとしての機能評価

4.1	緒言	82
4.2	実験方法	84
4.3	実験結果と考察	90
4.4	結論	99
	参考文献	100

第 5 章 総括	102
研究業績	104
謝辞	106

第 1 章

序論

1.1 実用化された核酸医薬とその課題

核酸医薬は、DNA や RNA およびその誘導体が化学合成により連結されて構成される医薬品であり、疾患部位の標的遺伝子発現を選択的に制御可能なバイオ医薬として、難病への適用が期待されている [1-4]。細胞の特定の RNA に結合して効果を発揮するタイプの核酸医薬としては、これまでにアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) と small interfering RNA (siRNA) が盛んに研究開発され、近年実用化された例が増加傾向にある。前者は、10–30 塩基程度の 1 本鎖核酸構造であり、標的となるメッセンジャーRNA (mRNA) と結合してその翻訳を阻害する機能や、標的 RNA/ASO の 2 本鎖構造を生体内のヌクレアーゼ (RNase H) によって切断させることで標的 RNA を分解する機能を持つ核酸が開発されてきた [4]。ASO の標的 RNA に対する作用が 1970–80 年代に報告され始めてから 1998 年にサイトメガロウイルス網膜炎治療薬としてホミビルセンが実用化されるまでには、核酸の化学修飾技術が大きく発展し、現在までに承認された ASO には全て化学修飾が施されている (表 1-1) [3-5]。これは天然型の核酸分子が細胞外に豊富に存在する酵素により直ちに分解されてしまう課題を化学修飾技術が解決したこと他にない。核酸の化学修飾構造の代表例としては、ヌクレオシド同士の結合 (ホスホジエステル (PO) 結合) を担っているリン酸基のうち結合に関与していない酸素原子を硫黄原子に置換した構造であるホスホロチオエート (PS) 修飾とリボースの 2' 位修飾が知られている (図 1-1)。PS 修飾は核酸の酵素分解耐性を顕著に向上する目的で導入され、リボースの 2' 位修飾としては 2'-*O*-methoxyethyl (2'-MOE), 2'-*O*-methyl (2'-OMe), 2'-deoxy-2'-fluoro (2'-F), 2'-*O*,4'-*C*-methano-bridged nucleic acid (2',4'-BNA; LNA) などが開

発されてきたが、これらの構造の中には酵素耐性向上のみならず、標的 RNA との結合力を増強させるものも存在する [4-6]。また上記の核酸は負に帯電した高分子であるが、モルフォリノ核酸のような中性で細胞毒性が低いとされる修飾核酸技術も実用化が進んでいる [7]。

表 1-1. 2021 年 5 月までに承認された ASO および siRNA

ASO	化学修飾	承認	適応疾患
ホミビルセン	PS	米国 1998 欧州 1999	サイトメガロウイルス網膜炎
ミポメルセン	PS, 2'-MOE	米国 2013	家族性高コレステロール血症
ヌシネルセン	PS, 2'-MOE	米国 2016 欧州 2017 日本 2017	脊髄性筋萎縮症
イノテルセン	PS, 2'-MOE	米国 2017 欧州 2017	遺伝性トランスサイレチン アミロイドーシス
ボラネソルセン	PS, 2'-MOE	欧州 2019	家族性カイロミクロン血症
エテプリルセン	モルフォリノ	米国 2016	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー
ゴロディルセン	モルフォリノ	米国 2019	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー
ビルトラルセン	モルフォリノ	米国 2020 日本 2020	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー
カシメルセン	モルフォリノ	米国 2021	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー
siRNA	化学修飾	承認	適応疾患
パチシラン	2'-OMe	米国 2018 欧州 2018 日本 2019	遺伝性トランスサイレチン アミロイドーシス
ギボシラン	PS, 2'-F, 2'-OMe	米国 2019 欧州 2020	急性肝性ポルフィリン症
ルマシラン	PS, 2'-F, 2'-OMe	米国 2020 欧州 2020	原発性高シュウ酸尿症 I 型
インクリシラン	PS, 2'-F, 2'-OMe	欧州 2020	家族性高コレステロール血症

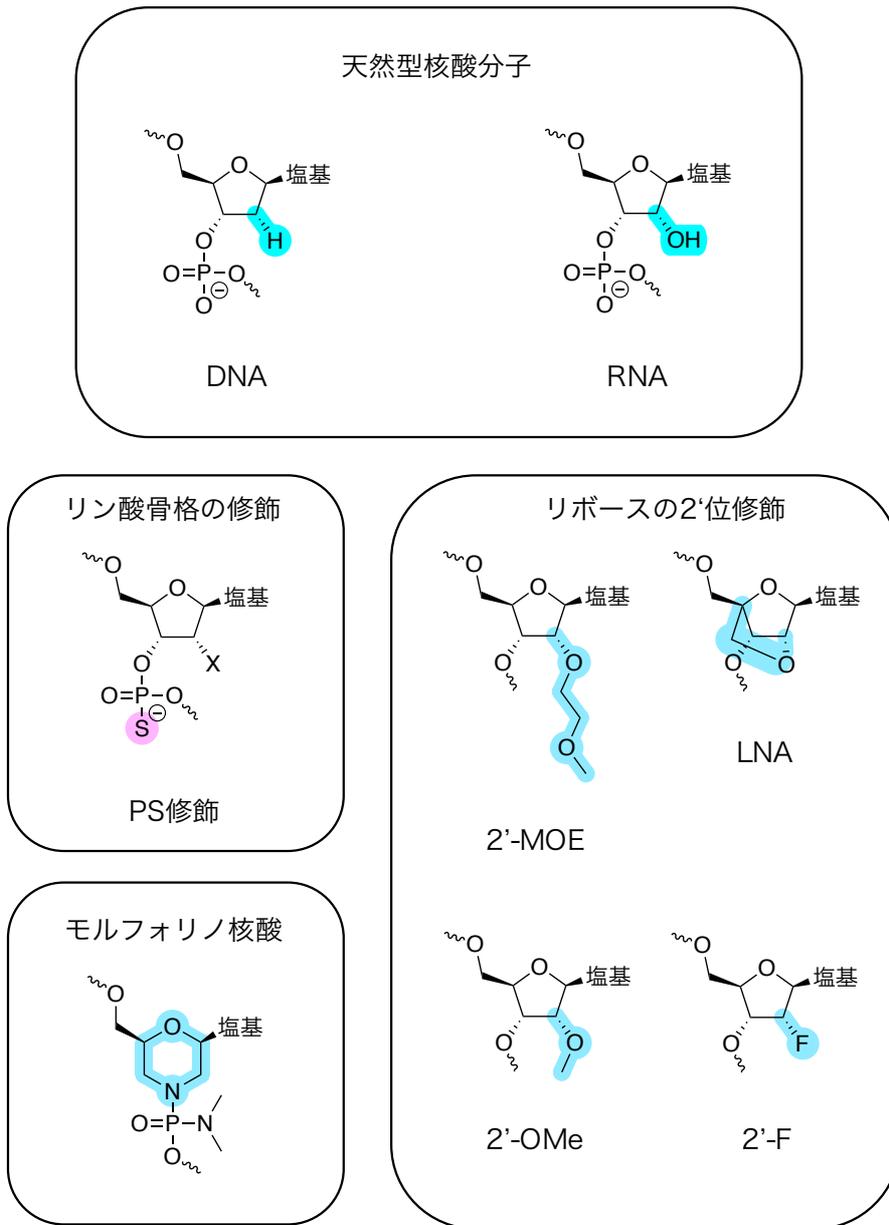


図 1-1. 核酸医薬の化学修飾構造

一方で、約 20 塩基対の 2 本鎖 RNA によって誘導される RNA 干渉 [8-10] を利用した核酸医薬である siRNA においても、これまでに実用化されたものには必ず化学修飾核酸が導入されており (表 1-1) , 修飾核酸技術は核酸医薬の実用化において非常に重要な役割を果たしていると言える。当初報告された siRNA は、標的 mRNA に相補的な 19 塩基の RNA に 2 塩基が 3'末端に付与されたアンチセンス鎖 (AS) と、アンチセンス

RNA に相補的な RNA に 2 塩基が 3'末端に付与されたセンス鎖 (SS) から形成された、19 塩基対に 2 塩基分突出 (オーバーハング) した 2 本鎖構造であり (図 1-2) , 細胞質に取り込まれた siRNA の AS は、アルゴノートタンパク質などと RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) を形成する。そして、AS と相補的な配列を持つ mRNA が RISC 内に誘導されることで標的 mRNA が分解される。siRNA を利用した RNA 干渉は、市販のトランスフェクション試薬を用いるだけで一時的に特定の遺伝子発現のみを抑制できることから、医薬品としての応用に限らず様々な生物学分野で広く活用されてきた [11,12]。それに対し、RNA 干渉の発見から世界初の siRNA 医薬であるパチシランが実用化されるまでに 20 年近くの歳月が必要であったのは、siRNA の酵素分解と低い細胞取り込み効率が大きな課題であったためと考えられる。また、siRNA の分子量は約 10,000 であり、全身投与の場合には速やかな腎排泄も大きな課題である [13]。これらの課題を解決したのが、脂質分子から構成されるナノ粒子技術であり、パチシランはリン脂質、コレステロール、カチオン性脂質、ポチエチレングリコール (PEG) -脂質誘導体より調製した脂質ナノ粒子 (LNP) へと封入されている [14]。静脈投与されたパチシラン封入 LNP は、血中での酵素分解から保護されると同時に ApoE タンパク質と結合することで、肝実質細胞の LDL 受容体を介してエンドサイトーシスにより取り込まれる。カチオン性脂質は生理 pH 条件では中性を保っているが、エンドソーム中で pH が酸性付近に低下するとカチオン性となり、エンドソーム膜と LNP の脂質が融合し、siRNA の細胞質内への取り込みを促進する。そして、肝臓における野生型および変異型トランスサイレチンの発現を抑制することで治療効果を発揮する。ちなみにこの LNP 技術は、本年に本邦でも特例承認された SARS-CoV-2 に対する mRNA ワクチンにも活用されており、各社がそれぞれ最適化したカチオン性脂質を利用している [15, 16]。パチシランにも一部化学修飾が導入されているが、最近承認された 3 つの siRNA (ギボシラン、ルマシラン、インクリシラン) はリボースがほとんど化学修飾され、一部に PS 修飾が導

入された構造である (図 1-2) . さらに, AS の RISC 導入効率を向上するために, AS のみにオーバーハングが導入された 23/21mer 構造を持ち [17], SS の 3'末端には肝実質細胞に豊富に発現しているアシアロ糖タンパク質受容体を認識する N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) がリガンドとして導入されている [3-5,18,19]. リボースを 2'-F あるいは 2'-OMe 修飾し, 末端の PO 結合を 2ヶ所ずつ PS 修飾した構造は, アルナイラム社によって開発された Advanced enhanced stabilization chemistry (ESC)と呼ばれる構造であり [19], 現在も複数の品目が開発段階にあることから, 有望な siRNA の化学修飾パターンであると言える.

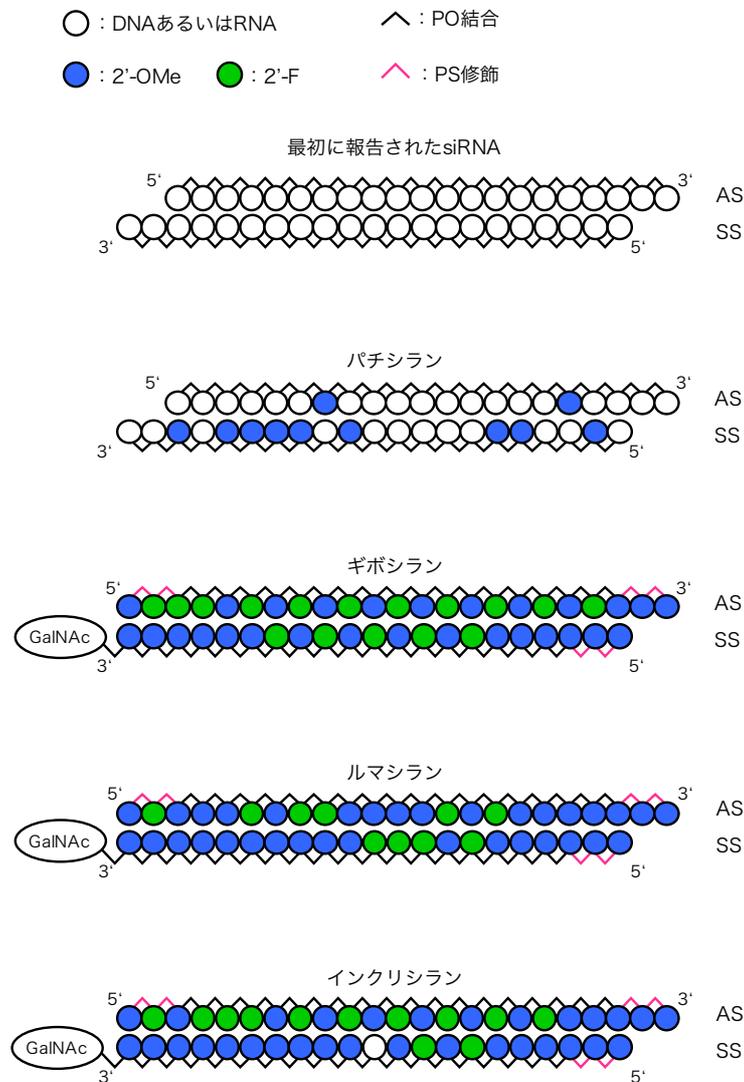


図1-2. siRNAの化学修飾構造

このように、これまでに実用化された核酸医薬の多くは、全身投与を介して肝臓へ効率良く核酸を送達して治療効果を発揮するものの、それ以外の臓器・組織（ただし排泄経路である腎臓は除く）への核酸の送達効率が低いことから [20]、肝臓以外の組織へ核酸を効率的に送達するシステムが強く求められている。核酸医薬の標的となる臓器・組織の例としては中枢神経系や、心臓、骨格筋、腫瘍などが挙げられる [3,4,21,22]。特に、筋肉の遺伝子発現異常に起因する筋原性疾患（筋ジストロフィーなど）は核酸医薬の大きな標的のひとつであり、臨床開発も盛んに進められているが、核酸医薬単体を投与した時の筋組織への送達効率は肝臓と比較して非常に低く [23]、現状では大量の核酸を投与しなければならない。したがって、筋組織へと核酸医薬を効率的に送達するキャリアの構築は医療的にも社会的にも非常に意義が大きいと言える。

1.2 筋組織への核酸医薬送達に向けた生体バリアとその回避・突破方法

核酸医薬を筋組織へ送達する上での大きな課題としては、筋組織に到達するまでに回避、あるいは突破しなければならない生体バリアが存在する。具体的には、1) 腎排泄（10 nm以下を排泄）、2) 細網内皮系による代謝（主に100 nm以上の粒子や異物を貪食）、3) 連続血管内皮バリア（内皮細胞同士が密着し、高分子透過性が非常に低いが、20 nm程度の小穴が存在）が想定される。これらは、臓器毎の毛細血管の内皮構造の透過性の違いに由来し、一般的に非連続性、有窓性、連続性内皮に分類されている [24]。有窓性内皮は腎臓などに見られる構造で、60 nm前後の小孔が内皮上に数多く存在し、その周りを数ナノメートルの間隙を持つ基底膜に覆われていることから、数ナノメートル以下の分子のみを透過して尿中に排泄している。したがって、数ナノメートルのサイズである核酸医薬単体は血中から速やかに腎排泄されてしまう [13]。非連続性内皮構造を持つ肝臓や脾臓といった細網内皮組織には、100 nm–1 μmの間隙が内皮細胞間に存在し、また基底膜も未発達であることから、腎排泄を回避するように10 nm以上に設計

した核酸送達キャリアの分布を避けることは困難である。細網内皮系は異物貪食による生体防御機構を持つことから、肝臓や脾臓での代謝を避けるため、異物認識されない生体適合性（ステルス性）を付与する必要がある。さらに、筋肉を始めとする連続性内皮においては、内皮細胞間隙が数ナノメートルと狭く、高分子物質の透過性が制限されている [25-27]。一方で、20 nm程度の小穴が観察されたとの報告もあり、全く高分子が透過しない訳ではない。血管内から筋組織への高分子の漏出には、内皮間隙を潜り抜ける受動輸送と、内皮細胞を介したトランスサイトosisによる能動輸送が知られている。前者を利用するためには、10–20 nmのサイズに設計された核酸送達キャリアがこれまでの条件を満たす設計である。後者に関しては、核酸医薬と脂質のコンジュゲートが血中のアルブミンと結合することで、内皮表面のFcRn受容体を介してトランスサイトosisされるとの報告がある [28]。しかし、核酸-脂質コンジュゲートは核酸医薬単体と比較して肝臓への移行効率も非常に高くなるため [29]、肝臓でも標的遺伝子が発現している場合には毒性が懸念される。以上より本研究では、10–20 nmのサイズに設計された核酸送達キャリアにより連続血管内皮を受動輸送経路で透過することで筋組織へ核酸医薬を送達することを着想した。さらに炎症の起きている筋疾患においては、連続性内皮よりも透過性が向上していると考えられ、より送達効率の向上が期待できる。

1.3 極小サイズの核酸封入ポリイオンコンプレックス

負に帯電した核酸医薬は、ポリエチレングリコール（PEG）とカチオン性高分子とのブロック共重合体（PEG-ポリカチオン）との間で、粒径数十ナノメートルのポリイオンコンプレックス（PIC）ミセルを形成することから、核酸送達キャリアとして広く研究されてきた [30-39]。その中でもより微小なサイズの核酸送達キャリアがこれまでにいくつ報告されている [40-43]。我々はこれまでのPICミセルに関する研究の中で、PEG-ポリカチオンとポリアニオンのPIC形成挙動が2段階で構成されることを明らかにして

きたが (図1-3) [44-46], 最小構成単位の1次会合体であるユニットPICのサイズが非常に小さいことから10-20 nmのサイズの核酸送達キャリアとして利用できないかと考えた。しかしユニットPICは, 臨界会合濃度 (CAC) 以上になるとユニットPIC同士の二次会合が起きて多分子会合体であるPICミセル (PEGや荷電性ブロックの鎖長によってはベシクルなど様々な形態になる [47-49]) となってしまう。基本的にCACは非常に低いため, ユニットPICそのものを検出することが難しい場合が多く, また多分子会合体であるPICミセルがこれまで注目すべき構造であったことから, ユニットPICの構造や特性はあまり系統的に評価されてこなかった。

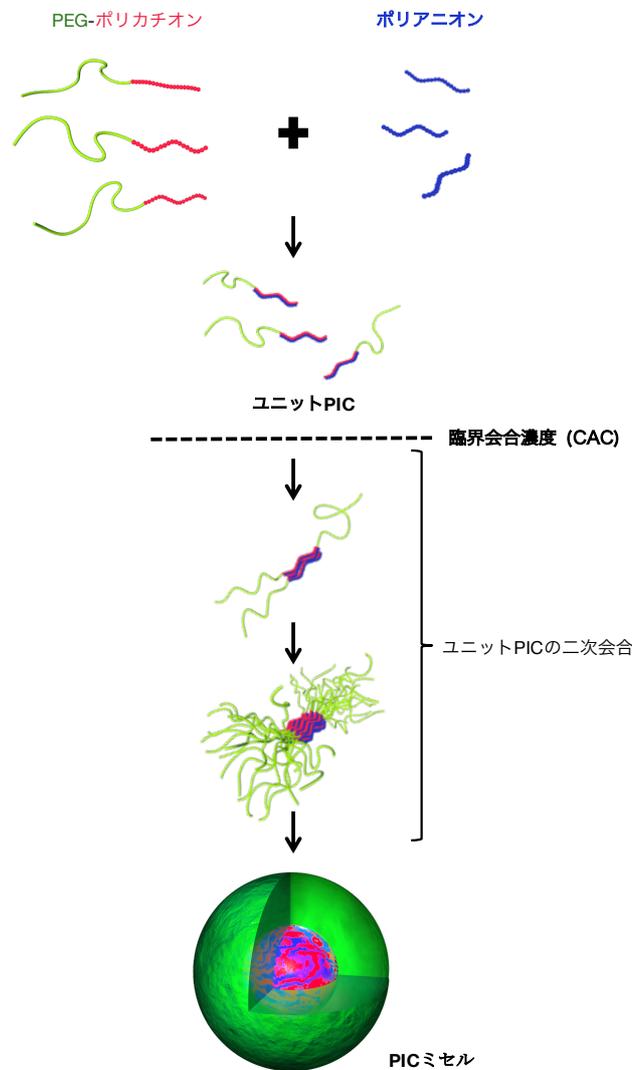


図1-3. PICミセルの形成プロセス

一方で、PEGとpoly-(L-lysine) (PLys) からなるブロック共重合体PEG-PLysとsiRNAより調製したPICが約10 nmのサイズであったことから、ユニットPICが通常の調製条件でも形成出来る可能性が示唆された [50]. そこで、siRNAの電荷数 (-40) に相当する重合度約40のPLys鎖 (= 生理pH条件での正電荷数) を持つPEG-PLysとsiRNAから調製したPICの構造を分析し、1分子同士のPEG-PLysとsiRNAからなる単分散なユニットPICが幅広い濃度域で形成されることを明らかにした [46]. 1本鎖RNAであるsiRNAのASとPEG-PLysよりPICを調製すると濃度に依存した明確なサイズ増加が見られ、二次会合によるPICミセル形成が確認されたことから、安定なユニットPIC形成はsiRNAの構造に起因するものと考えられた。これは、siRNAは1本鎖RNAと比較して剛直な構造を持ち、負電荷の空間的な配置が固定されていることで、PEG-PLysとsiRNAのユニットPICの二次会合によるエントロピー利得が低いためと考察している。さらに、このユニットPICの大きさに着目し、30 nm以上の透過を制限する線維性間質バリアに覆われた難治がん [51,52]の腫瘍深部へとsiRNAを送達することにも成功している [53]. この時に用いたブロック共重合体は、腎排泄を回避可能な1分子当たり37 kDaの2分岐型PEG鎖と重合度約20のPLys鎖から構成されるbPEG-PLysであり、1分子のsiRNAを2分子のbPEG-PLysで保護する2:1ユニットPICを形成していた (図1-4). このユニットPICは過剰なbPEG-PLysと同時に投与することで高い血中滞留性を発揮し、腫瘍血管内皮から透過した後、約18 nmのユニットPICは30 nm以上のサイズの侵入を拒む線維性間質を突破した。腫瘍深部へとsiRNAが送達されたことで腫瘍中の標的遺伝子発現を抑制し、有意な腫瘍増殖抑制効果を示している。また、このbPEG-PLysはASOと1:1ユニットPICを形成し (図1-4), siRNAと比較すると血中滞留性は低かったものの、脳腫瘍同所移植モデルマウスの腫瘍深部へとASOを送達し、明らかな腫瘍退縮を示した。また、このユニットPICには積極的な細胞取り込み機能がなかったことから、生体内環境の温度に応答して疎水化し、細胞取り込みを促進する方法も最近報告されている [54]. 一方で、ブロック共重合体と核酸の化

学構造を系統的に変化させた場合のユニットPICの構造，安定性，および体内動態に与える影響は明らかになっておらず，現状のユニットPICの設計で筋組織へ核酸医薬を送達できるとも限らない．連続性内皮で構成される筋組織へ核酸を送達するためには，受動輸送に長い時間が必要と想定されることから，新たな材料設計により，さらに血中安定性の高い核酸封入ユニットPICの構築が必要ではないかと考えた．

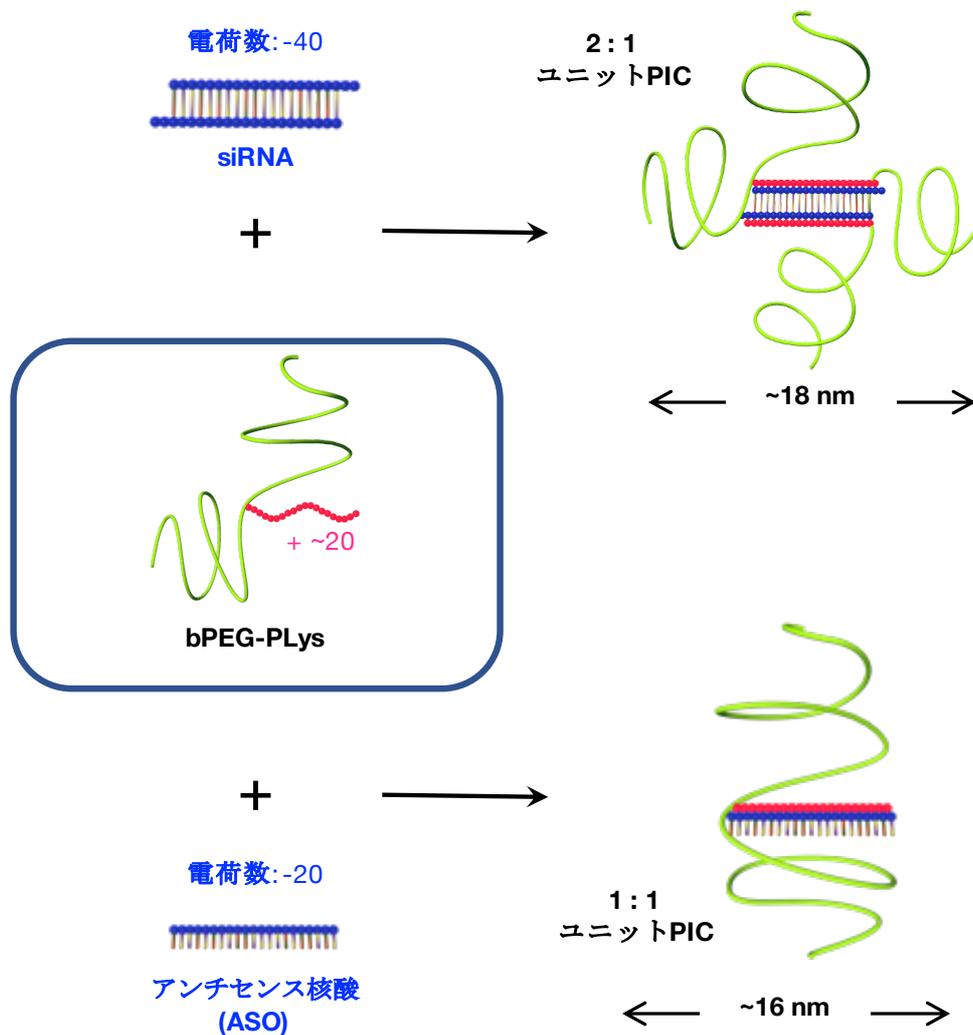


図1-4. siRNA及びASO封入ユニットPICの構造

1.4 本研究の目的

そこで本研究においては，ユニット PIC の構成成分であるブロック共重合体及び核酸の化学構造を精密設計し，形成されたユニット PIC の構造と安定性を明らかにする

こととした。ユニット PIC を調製するためのブロック共重合体としては bPEG-PLys を使用した。親水性連鎖としては、先行研究において 1 分子当たり 37 kDa の分岐型 PEG が高い血中滞留性を示すことが明らかになっていることから [53]、同等の分子量を持つ分岐型 PEG を選択した。カチオン性連鎖としては、生体内で DNA や RNA との結合に利用されていること、分子量分布の狭い高分子を合成できること、これまでに複数の PEG-ポリカチオンを検討してきた結果、PLys を含む siRNA 封入ユニット PIC の安定性が高いことが分かっていることから [55]、PLys を選択した。

第 2 章において、PLys 重合度を系統的に変化させた bPEG-PLys を合成し、siRNA と形成するユニット PIC の構造及び血中安定性を明らかにした。また第 3 章においては、核酸の化学構造に着目し、特に実用化が見込まれる PS 修飾やリボースの 2'位修飾がユニット PIC の構造や血中安定性に与える影響を明らかにした。さらに、第 4 章において、第 2,3 章で得られた（あるいは最適化された）ユニット PIC の筋組織への核酸送達キャリアとしての応用可能性を検証した。健常なマウス及び血管透過性が亢進していると考えられる筋ジストロフィーモデルマウスを用いて、siRNA 封入ユニット PIC の体内動態及び標的遺伝子発現抑制効果を評価し、設計した核酸送達キャリアが筋組織へと核酸医薬を送達するポテンシャルを見極めた。

参考文献

- [1] Lundin, K. E.; Gissberg, O.; Smith, C. I., Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26* (8), 475-485.
- [2] Wittrup, A.; Lieberman, J., Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (9), 543-552.
- [3] Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S. P., The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (6), 421-446.
- [4] Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Crooke, R. M.; Liang, X. H., Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**.
- [5] Wan, W. B.; Seth, P. P., The Medicinal Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (21), 9645-9667.
- [6] Morita, K.; Takagi, M.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M., Synthesis and properties of 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged nucleic acids (ENA) as effective antisense oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (10), 2211-2226.
- [7] Alter, J.; Lou, F.; Rabinowitz, A.; Yin, H.; Rosenfeld, J.; Wilton, S. D.; Partridge, T. A.; Lu, Q. L., Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* **2006**, *12* (2), 175-177.
- [8] Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806-811.
- [9] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-498.
- [10] Caplen, N. J.; Parrish, S.; Imani, F.; Fire, A.; Morgan, R. A., Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (17), 9742-9747.
- [11] Dorsett, Y.; Tuschl, T., siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (4), 318-329.
- [12] Ghildiyal, M.; Zamore, P. D., Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10* (2), 94-108.

- [13] Morrissey, D. V.; Lockridge, J. A.; Shaw, L.; Blanchard, K.; Jensen, K.; Breen, W.; Hartsough, K.; Macheimer, L.; Radka, S.; Jadhav, V.; Vaish, N.; Zinnen, S.; Vargeese, C.; Bowman, K.; Shaffer, C. S.; Jeffs, L. B.; Judge, A.; MacLachlan, I.; Polisky, B., Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (8), 1002-1007.
- [14] Adams, D.; Gonzalez-Duarte, A.; O'Riordan, W. D.; Yang, C. C.; Ueda, M.; Kristen, A. V.; Tournev, I.; Schmidt, H. H.; Coelho, T.; Berk, J. L.; Lin, K. P.; Vita, G.; Attarian, S.; Plante-Bordeneuve, V.; Mezei, M. M.; Campistol, J. M.; Buades, J.; Brannagan, T. H., 3rd; Kim, B. J.; Oh, J.; Parman, Y.; Sekijima, Y.; Hawkins, P. N.; Solomon, S. D.; Polydefkis, M.; Dyck, P. J.; Gandhi, P. J.; Goyal, S.; Chen, J.; Strahs, A. L.; Nochur, S. V.; Sweetser, M. T.; Garg, P. P.; Vaishnav, A. K.; Gollob, J. A.; Suhr, O. B., Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379* (1), 11-21.
- [15] Polack, F. P.; Thomas, S. J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J. L.; Perez Marc, G.; Moreira, E. D.; Zerbini, C.; Bailey, R.; Swanson, K. A.; Roychoudhury, S.; Koury, K.; Li, P.; Kalina, W. V.; Cooper, D.; Frenck, R. W., Jr.; Hammitt, L. L.; Tureci, O.; Nell, H.; Schaefer, A.; Unal, S.; Tresnan, D. B.; Mather, S.; Dormitzer, P. R.; Sahin, U.; Jansen, K. U.; Gruber, W. C.; Group, C. C. T., Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383* (27), 2603-2615.
- [16] Baden, L. R.; El Sahly, H. M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S. A.; Rouphael, N.; Creech, C. B.; McGettigan, J.; Khetan, S.; Segall, N.; Solis, J.; Brosz, A.; Fierro, C.; Schwartz, H.; Neuzil, K.; Corey, L.; Gilbert, P.; Janes, H.; Follmann, D.; Marovich, M.; Mascola, J.; Polakowski, L.; Ledgerwood, J.; Graham, B. S.; Bennett, H.; Pajon, R.; Knightly, C.; Leav, B.; Deng, W.; Zhou, H.; Han, S.; Ivarsson, M.; Miller, J.; Zaks, T.; Group, C. S., Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384* (5), 403-416.
- [17] Sano, M.; Sierant, M.; Miyagishi, M.; Nakanishi, M.; Takagi, Y.; Sutou, S., Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (18), 5812-5821.
- [18] Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A., Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19* (10), 673-694.
- [19] Foster, D. J.; Brown, C. R.; Shaikh, S.; Trapp, C.; Schlegel, M. K.; Qian, K.; Sehgal, A.;

- Rajeev, K. G.; Jadhav, V.; Manoharan, M.; Kuchimanchi, S.; Maier, M. A.; Milstein, S., Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Mol. Ther.* **2018**, *26* (3), 708-717.
- [20] Akinc, A.; Goldberg, M.; Qin, J.; Dorkin, J. R.; Gamba-Vitalo, C.; Maier, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Kotliansky, V.; Rohl, I.; Leshchiner, E. S.; Langer, R.; Anderson, D. G., Development of lipidoid-siRNA formulations for systemic delivery to the liver. *Mol. Ther.* **2009**, *17* (5), 872-879.
- [21] Lovett-Racke, A. E.; Cravens, P. D.; Gocke, A. R.; Racke, M. K.; Stuve, O., Therapeutic potential of small interfering RNA for central nervous system diseases. *Arch. Neurol.* **2005**, *62* (12), 1810-1813.
- [22] Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C., Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20-37.
- [23] Roberts, J.; Palma, E.; Sazani, P.; Orum, H.; Cho, M.; Kole, R., Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Mol. Ther.* **2006**, *14* (4), 471-475.
- [24] 片岡一則・原島秀吉編:ドラッグキャリア設計入門 DDS からナノマシンまで, 丸善出版, **2019**
- [25] Michel, C. C.; Curry, F. E., Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* **1999**, *79* (3), 703-61.
- [26] Sarin, H., Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* **2010**, *2*, 14.
- [27] Baltusnikas, J.; Fokin, A.; Winkler, J.; Liobikas, J., Long-term regulation of gene expression in muscle cells by systemically delivered siRNA. *J. Control. Release* **2017**, *256*, 101-113.
- [28] Chappell, A. E.; Gaus, H. J.; Berdeja, A.; Gupta, R.; Jo, M.; Prakash, T. P.; Oestergaard, M.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Mechanisms of palmitic acid-conjugated antisense oligonucleotide distribution in mice. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (8), 4382-4395.
- [29] Biscans, A.; Coles, A.; Haraszti, R.; Echeverria, D.; Hassler, M.; Osborn, M.; Khvorova, A., Diverse lipid conjugates for functional extra-hepatic siRNA delivery in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (3), 1082-1096.
- [30] Harada, A.; Kataoka, K., Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu

- from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
- [31] Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A., DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6* (1), 7-20.
- [32] De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E., Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **2000**, *17* (2), 113-126.
- [33] Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, *47* (1), 113-131.
- [34] Guo, X.; Huang, L., Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 971-979.
- [35] Wagner, E., Polymers for siRNA delivery: inspired by viruses to be targeted, dynamic, and precise. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1005-1013.
- [36] Viereggs, J. R.; Lueckheide, M.; Marciel, A. B.; Leon, L.; Bologna, A. J.; Rivera, J. R.; Tirrell, M. V., Oligonucleotide-Peptide Complexes: Phase Control by Hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (5), 1632-1638.
- [37] Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K., Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (14), 6844-6892.
- [38] Sun, J.; Li, Z., Polyion Complexes via Electrostatic Interaction of Oppositely Charged Block Copolymers. *Macromolecules* **2020**, *53* (20), 8737-8740.
- [39] Sproncken, C. C. M.; Magana, J. R.; Voets, I. K., 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Attractive Soft Matter: Association Kinetics, Dynamics, and Pathway Complexity in Electrostatically Coassembled Micelles. *ACS Macro Lett.* **2021**, 167-179.
- [40] DeRouchey, J.; Schmidt, C.; Walker, G. F.; Koch, C.; Plank, C.; Wagner, E.; Radler, J. O., Monomolecular assembly of siRNA and poly(ethylene glycol)-peptide copolymers. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (2), 724-732.
- [41] Dohmen, C.; Edinger, D.; Frohlich, T.; Schreiner, L.; Lachelt, U.; Troiber, C.; Radler, J.; Hadwiger, P.; Vornlocher, H. P.; Wagner, E., Nanosized multifunctional polyplexes for receptor-mediated siRNA delivery. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 5198-5208.
- [42] Yan, M.; Liang, M.; Wen, J.; Liu, Y.; Lu, Y.; Chen, I. S., Single siRNA nanocapsules for enhanced RNAi delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (33), 13542-13545.
- [43] Kim, H. J.; Yi, Y.; Kim, A.; Miyata, K., Small Delivery Vehicles of siRNA for Enhanced Cancer Targeting. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2377-2390.
- [44] Harada, A.; Kataoka, K., Chain length recognition: core-shell supramolecular assembly from

- oppositely charged block copolymers. *Science* **1999**, *283* (5398), 65-67.
- [45] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K., Living unimodal growth of polyion complex vesicles via two-dimensional supramolecular polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (4), 1423-1429.
- [46] Hayashi, K.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Watanabe, S.; Takemoto, H.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K., Influence of RNA Strand Rigidity on Polyion Complex Formation with Block Cationomers. *Macromolecular Rapid Communications* **2016**, *37* (6), 486-493.
- [47] Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W. D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K., Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 5988-5989.
- [48] Chuanoi, S.; Kishimura, A.; Dong, W.-F.; Anraku, Y.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K., Structural factors directing nanosized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) to form a pair of block anioner/homo cationomers: studies on the anioner segment length and the cationer side-chain structure. *Polymer Journal* **2013**, *46* (2), 130-135.
- [49] Wibowo, A.; Osada, K.; Matsuda, H.; Anraku, Y.; Hirose, H.; Kishimura, A.; Kataoka, K., Morphology Control in Water of Polyion Complex Nanoarchitectures of Double-Hydrophilic Charged Block Copolymers through Composition Tuning and Thermal Treatment. *Macromolecules* **2014**, *47* (9), 3086-3092.
- [50] Shimizu, H.; Hori, Y.; Kaname, S.; Yamada, K.; Nishiyama, N.; Matsumoto, S.; Miyata, K.; Oba, M.; Yamada, A.; Kataoka, K.; Fujita, T., siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21* (4), 622-633.
- [51] Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol* **2011**, *6* (12), 815-823.
- [52] Kano, M. R., Nanotechnology and tumor microcirculation. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *74*, 2-11.
- [53] Watanabe, S.; Hayashi, K.; Toh, K.; Kim, H. J.; Liu, X.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Katsushima, K.; Kondo, Y.; Uchida, S.; Ogura, S.; Nomoto, T.; Takemoto,

H.; Cabral, H.; Kinoh, H.; Tanaka, H. Y.; Kano, M. R.; Matsumoto, Y.; Fukuhara, H.; Uchida, S.; Nangaku, M.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K., In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationomers to target cancers. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 1894.

[54] Kim, B. S.; Osawa, S.; Yum, J.; Naito, M.; Miyata, K., Installation of a Thermoswitchable Hydrophobic Domain into a Unimer Polyion Complex for Enhanced Cellular Uptake of siRNA. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (5), 1320-1326.

[55] 林, 光太朗, n.d., Preparation and characterization of unit polyion complexes with siRNA utilizing PEG-block-poly(amino acid)s: doi:<https://doi.org/10.15083/00073578>.

第 2 章

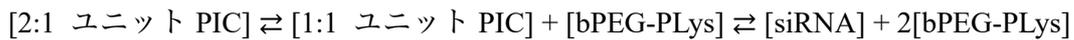
ブロック共重合体の設計

2.1 緒言

反対の電荷を持つ高分子間に働く静電相互作用を駆動力とした自己組織化によって形成されるポリイオンコンプレックス (PIC) は、電荷を持った様々な機能性生体高分子のキャリアとして広く研究されている [1-5]. PIC 調製における最大の課題のひとつは、その構造を厳密に制御し、生理条件で非可逆的な凝集を防ぐことにある。そのための有望な方法論として、親水性連鎖と荷電性連鎖から形成されるブロック共重合体の適用がこれまでに検討されてきた [1,6-10]. 親水性連鎖に生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) を用いたカチオン性ブロック共重合体は、負電荷を持つオリゴ核酸やタンパク質と水中で混合するだけで単分散な数十ナノメートルの PIC ミセルを形成する [7,10,11]. さらに、PEG およびカチオン連鎖の鎖長を調節することでベシクルを始めとする様々な超分子会合体を形成する [12-15]. これまでのカチオン性ブロック共重合体を用いた核酸封入 PIC 形成挙動に関する研究により、PIC ミセル形成は 2 段階で構成されることが明らかになってきている。これは、まず最小単位のイオンペアで電荷中和された構造であるユニット PIC が形成され、臨界会合濃度 (CAC) 以上になるとユニット PIC 同士の二次会合が起きて多分子会合体である PIC ミセルが形成される [16,17]. オリゴ核酸封入 PIC の CAC は非常に低いことから (~ 0.2 mg/mL) [18], ユニット PIC の検出方法に制限があることも多く、その詳細な構造や特性はあまり明らかになっていない。

一方で、small interfering RNA (siRNA) とカチオン性ブロック共重合体の組み合わせによっては、幅広い濃度で単分散なユニット PIC を調製できることがわかってきた [17,

19-22]. 特に、全身投与を指向した siRNA 封入ユニット PIC の構築に向けては、1 分子当たりの分子量が約 40 kDa の 2 分岐型 PEG 鎖と重合度約 20 の poly(L-lysine) (PLys) 鎖を持つブロック共重合体 bPEG-PLys にて siRNA を封入したユニット PIC を調製したところ、厚い線維性間質バリアを突破して難治がんの腫瘍深部へと siRNA を送達することに成功している [22]. この PIC は 2 分子の bPEG-PLys と 1 分子の siRNA から構成される 2:1 ユニット PIC 構造であり、約 18 nm という非常に小さいサイズを持ち、過剰な bPEG-PLys と同時に投与することで初めて高い血中滞留性を示して腫瘍へと siRNA を送達できるという特徴を持っている。これは、ユニット PIC が以下の平衡関係にあることから、



過剰な bPEG-PLys がユニット PIC の動的平衡を安定化しているものと考えられる。腫瘍血管よりも透過性が低い連続血管内皮バリアを透過するためには、siRNA (あるいはユニット PIC) の血中濃度をより長時間保持する必要があると推測されることより、さらなるユニット PIC の血中安定化が必要である。

そこで、ユニット PIC の動的平衡を鑑みて、より血中滞留性の高いカチオン性ブロック共重合体を用いれば、この動的平衡をユニット PIC 側へと安定化し、さらに血中滞留性を向上出来るのではないかと考えた。すなわち本研究では、bPEG-PLys の PLys 鎖長を系統的に変化させ、より血中滞留性の高い siRNA 封入ユニット PIC の構築を試みた。具体的には、siRNA の負電荷数 (-40) に対してその 1/4, 1/3, 1/2, 1, 2 倍となる 10, 13, 20, 40, 80 の正電荷を持つ bPEG-PLys を合成し、siRNA と形成するユニット PIC の構造を解析し、血中安定性を評価した。正電荷数が少ないほど bPEG-PLys の血中滞留性が向上し、会合する bPEG-PLys 分子数の増加によりユニット PIC が siRNA を酵素分解から保護する機能向上も期待される一方で、siRNA との静電相互作用が弱くなることから PIC 解離が起きやすくなることも考えられる。一連の構造解析と安定性評価から、ユニ

ット PIC の血中安定化に最適な正電荷数を持つ bPEG-PLys の設計を明らかにし、10–20 nm のサイズに設計された血中滞留型 siRNA 送達キャリアのための材料設計指針を得た。

2.2 実験方法

材料

α -methoxy- ω -amino 末端を持つ 2 分岐型 bPEG-NH₂ (各 PEG 鎖の分子量は 40,000) は日油(東京, 日本)より購入した。ε-trifluoroacetyl-L-lysine *N*-carboxy-anhydride (L-Lys(TFA)-NCA)は中央化成品(東京, 日本)より購入した。N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)と酢酸はナカライテスク(東京, 日本)より購入し、DMF は減圧蒸留してから使用した。チオウレア、メタノール、水酸化ナトリウム (NaOH)、5N 塩酸 (HCl) aq., ジメチルスルホキシド (DMSO)、塩化ナトリウム (NaCl)、グリセリン、ヘパリンナトリウム、D-PBS(-)は富士フィルム和光純薬(大阪, 日本)より購入した。D₂O と炭酸水素ナトリウム緩衝液は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)より購入した。Alexa Fluor 647 NHS Ester (A647-NHS), 1× PBS (pH 7.4), PBS-T (10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.5) は Thermo Fisher Scientific (Novi, MI, USA)より購入した。滅菌済み HEPES 緩衝液 (1 M, pH 7.3) は Amresco (Solon, OH, USA)より購入した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子発現を抑制する GL3 siRNA は北海道システムサイエンス(北海道, 日本)より購入した。GL3 siRNA の配列は sense 鎖: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT-3'; antisense 鎖: 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT-3'とした。A647 標識された GL3 siRNA (A647-siRNA) はジーンデザイン(大阪, 日本)より購入した。A647 は sense 鎖の 5'末端に結合した。アガロース (PrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS) はタカラバイオ(滋賀, 日本)より購入した。Tris(hydroxymethyl)aminoethane/boronic acid/ethylenediamine-*N,N,N'*, -tetraacetic acid (TBE) 緩衝液は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)より購入した。Cy5 は BroadPharm (San Diego, CA, USA)より購入した。

2 分岐型 poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine)の合成

既報 [17,22]に従い, bPEG-NH₂を開始剤として L-Lys(TFA)-NCA を開環重合させた後, TFA 基を塩基性条件にて脱保護することで bPEG-PLys を合成した. 一例として, PLys 重合度 = 10 となる bPEG-PLys の合成法を以下に示す. まず, チオウレア (7.61 g, 100 mmol) をアルゴン雰囲気下で DMF (100 mL) に溶解し 1 M 溶液を調製した. bPEG-NH₂ (244 mg) を 1 M チオウレア/DMF (2.44 mL)で溶解した. そこへ 1 M チオウレア/DMF (0.360 mL) に溶解した L-Lys(TFA)-NCA (9.00 mg, 33.6 μmol) を滴下し, 25 °C で 3 日間攪拌した. 得られた反応混合物を純水中で透析して精製した後, 凍結乾燥して bPEG-PLys(TFA) (145 mg) を得た. 続いて, bPEG-PLys(TFA) (130 mg)をメタノール (1.30 mL) に溶解し, 1N NaOH aq. (0.130 mL) を加えて 35 °C で 24 時間攪拌した. 反応混合物を 0.01N HCl aq.および純水で透析した後, フィルターろ過した溶液を凍結乾燥して bPEG-PLys (99.4 mg) を得た. 異なる PLys 重合度を持つ bPEG-PLys は, L-Lys(TFA)-NCA と bPEG-NH₂の混合比を変えて合成した. 得られた bPEG-PLys はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と ¹H NMR にて分析した. SEC 分析には示差屈折率 (RI) 検出器 (RID-20A) を搭載した Nexera X2 UHPLC システム (島津製作所, 京都, 日本) を使用し, Superdex Increase 200 5/150 GL カラム (GE Healthcare Ltd., UK) 中を 10 mM 酢酸, 0.5 M NaCl にて溶出させた (流速: 0.3 mL/min, 室温). 分子量分布 (M_w/M_n) は PEG 標準物質の溶出曲線に従い, HPLC 付属のソフトウェアで決定した. ¹H NMR スペクトルは JEOL ECS400 spectrometer (日本電子, 東京, 日本) を用いて測定し (D₂O, 室温), PLys 重合度を PEG (-OCH₂CH₂-, δ = 3.5 ppm) と PLys 側鎖の β, γ, δ メチレン基 (-CH₂CH₂CH₂-, δ = 1.3–1.9 ppm) とのピーク強度比から算出した. A647 標識した bPEG-PLys (bPEG-PLys-A647)は, A647-NHS を用いて合成した. 一例として, PLys 重合度 = 10 となる bPEG-PLys の場合, bPEG-PLys (33.8 mg)を 50 mM NaHCO₃ buffer (0.844 mL)に溶解し, DMSO (0.0704 mL)に溶解した A647-NHS (0.843 mg)を加えて 25 °C で一晩攪拌した. 反応混合

物を 1 M NaCl aq. で置換した PD-10 カラム (GE Healthcare Ltd., UK) にてゲルろ過精製し, ろ液を超純水で希釈して限外ろ過を繰り返して NaCl を除去し, 凍結乾燥して bPEG-PLys-A647 (19.3 mg) を得た.

Small interfering RNA 封入ポリオンコンプレックスの調製

合成した bPEG-PLys と siRNA はそれぞれ 10 mM HEPES buffer (pH 7.3) に溶解し, 様々な混合比 (Lys 側鎖のアミノ基 (N) と核酸のリン酸基 (P) のモル比: N/P 比) にて混合し, PIC を調製した. 最終 siRNA 濃度は 10 μ M とした.

アガロースゲル電気泳動

bPEG-PLys と A647-siRNA を様々な N/P 比で混合して調製した PIC を 50% グリセリン水溶液と 4/1 の体積比で混合した. アガロースゲル (5%, 1 \times TBE) に 5 μ L ずつアプライし, 100 V で 15 分間電気泳動した. A647-siRNA のバンドを Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) にて検出した.

蛍光相関分光法

PIC の流体力学直径 (D_H) と siRNA の会合数 (AN_{siRNA}) は, He-Ne 共焦点レーザー ($\lambda = 633$ nm) を搭載した分子間相互作用解析システム MF20 (オリンパス, 東京, 日本) を用いて測定した. A647-siRNA と bPEG-PLys より調製した PIC を 10 nM siRNA となるように PBS-T で希釈し, 室温で 20 秒測定を 5 回繰り返した. 得られた拡散時間は Cy5 の拡散係数 ($D_c = 360$ μ m²/s) を基準として, 以下のストークス-アインシュタイン則により流体力学直径へと変換した.

$$D_H = k_B T / 3\pi\eta D_c$$

ここで k_B はボルツマン定数, T は測定温度, η は溶液の粘度を表す. 共焦点領域中に検出された蛍光分子数 (N) を用いて, 以下の式から AN_{siRNA} を算出した.

$$AN_{siRNA} = N_{siRNA} / N_{PIC}$$

ここで N_{siRNA} は bPEG-PLys を含まない siRNA のみの場合の A647-siRNA 分子数であり,

N_{PIC} は PIC 水溶液中の A647-siRNA 分子数である。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した ($n = 5$).

また、塩濃度変化時の安定性評価においては、 $N/P = 1$ あるいは 10 で調製した A647-siRNA 封入 PIC を NaCl 濃度が 150–275 mM となるように希釈し（最終 siRNA 濃度: 10 nM）、FCS 測定を実施した。150 mM NaCl における D_H を 1 とし、各塩濃度における相対的な大きさを算出した。

示差屈折率測定

PBS に溶解した様々な濃度の siRNA (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/mL) の RI を Optilab UT-rEX (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) を用いて測定し、 dn/dc を算出した。25 °C で安定化させた RI 検出器にシリンジポンプ (YSP-301, ワイエムシィ, 京都, 日本) を用いて 0.5 mL/min の流速で siRNA を注入し、Astra 7.3.2 を使用して dn/dc を決定した。

流動場分離法

流動場分離法 (FFF) は、Eclipse channel LC (350 μm wide spacer, a Nadir cellulose membrane (10 kDa Low molecular weight cutoff)) を搭載した Eclipse 3+ separation system (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) を用いて実施した。siRNA あるいは siRNA 封入 PIC (30 μM siRNA, 20 μL) は Agilent 1200 series isocratic pump を用いて注入し、1 \times PBS (pH 7.4) で溶出した。Channel-flow rate は 1 mL/min で固定し、cross-flow (CRF) rate は 3 mL/min から指数関数的に減少させた ($V_{\text{CRF}} = 3 \times \exp(-0.177 \times t)$, $t_0 = 5$ min)。260 nm の吸光度は Agilent 1200 series variable wavelength detectors にて検出した。散乱光強度は DAWN EOS (Wyatt Technology Corporation) にて測定した。siRNA 封入 PIC の分子量は吸光度ピーク周辺に対応する散乱光強度のフラクトグラムから Astra 6.1.2 を用いて算出した。bPEG-PLys が 2 分子以上会合する siRNA 封入 PIC の各成分の割合を求める場合においては、1 回の測定当たり 0.1 nmol の siRNA (10 μM siRNA, 10 μL) を注入

し、得られた UV フラクトグラムから OriginPro 2021 (OriginLab, Northampton, MA, USA) のピークフィット機能を用いて、各成分のピークを分離した。そして、様々な N/P 比にて調製された時の各成分のピーク面積比を算出した。

血中滞留性評価および薬物動態解析

動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、承認された実験計画に基づいて実施した。BALB/c マウス (7-8 週齢, 雌) は、日本チャールス・リバー (横浜, 日本) より購入した。A647-siRNA 封入 PIC あるいは bPEG-PLys-A647 をマウス尾部より静脈注射した (2 nmol A647-siRNA/マウス, 4 nmol bPEG-PLys-A647/マウス, n=3)。投与後任意の経過時刻に尾静脈から 5 μ L の血液を採取した。採取した血液は直ちに 5 μ L のヘパリンナトリウム水溶液 (1000 unit/mL) と混合し、さらに 110 μ L の D-PBS(-) で希釈した。希釈した血液中の A647 の蛍光強度を Spark マルチモードマイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) にて測定した。測定条件としては 630 nm で励起し、675 nm の強度を測定した。PBS/ヘパリン/血液 = 110/5/5 (v/v/v) 中の濃度既知 A647-siRNA あるいは bPEG-PLys-A647 より作成した検量線を用いて、採血した血液中の A647-siRNA あるいは bPEG-PLys-A647 濃度を決定した。得られた血中濃度データを元に、Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, St. Louis, MO, USA) を用いてノンコンパートメント解析を実施し、薬物動態パラメータ (全時間の濃度曲線下面積 (AUC_{∞}), 最終消失相の半減期 ($t_{1/2}$), 消失速度 (CL), 分布容積 (V_{ss})) を算出した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した (n = 3)。

2.3 実験結果と考察

2 分岐型 poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine)の合成

カチオン性ブロック共重合体の正電荷数が siRNA 封入 PIC 形成、構造および安定性に与える影響を明らかにするため、様々な PLys 重合度を持つ bPEG-PLys を合成した (図 2-1)。bPEG は、速やかな腎排泄を避けることが可能な分子量であることと、入手性や製造性の観点から 1 本当たり 40 kDa の PEG を使用した。ポリカチオンブロックとして PLys を選択したのは、Lys が生体内で DNA や RNA と会合するために最も利用されている構造のためである。PLys 重合度 (= pH 7 付近における正電荷数) の設計としては siRNA の負電荷数 (-40) に着目し、その 1/4, 1/3, 1/2, 1, 2 倍となる 10, 13, 20, 40, 80 の PLys 重合度を目指して合成した。先行研究においては、PLys 重合度 20 の場合に bPEG-PLys と siRNA の会合数 ($AN_{bPEG-PLys}$ および AN_{siRNA}) がそれぞれ 2 と 1 となるユニット PIC が形成され、PLys 重合度 40 の直鎖型 PEG-PLys の場合には、1 分子同士の PEG-PLys と siRNA からなるユニット PIC が形成されることが分かっている [17,22]。これらの知見から、PLys 重合度 10 と 13 の場合には、 $AN_{bPEG-PLys} = 4$ あるいは 3 となる 1 分子の siRNA を封入したユニット PIC 形成が期待され、PLys 重合度 80 の場合には 2 分子の siRNA を封入し、重量当たりの siRNA 量の増加が期待できる。合成した bPEG-PLys の SEC 分析より、いずれのポリマーも単分散で狭い分子量分布 ($M_w/M_n < 1.1$) を示した (表 2-1, 図 2-2)。¹H NMR 測定の結果 (図 2-3~2-7)、ほぼ狙い通りの PLys 重合度を持つ一連の bPEG-PLys の合成に成功した (表 2-1)。それぞれの bPEG-PLys はこれ以降 40x2-X と表記し、40x2 は bPEG が 40 kDa の PEG 2 本から構成されること、X は目標 PLys 重合度を表している。

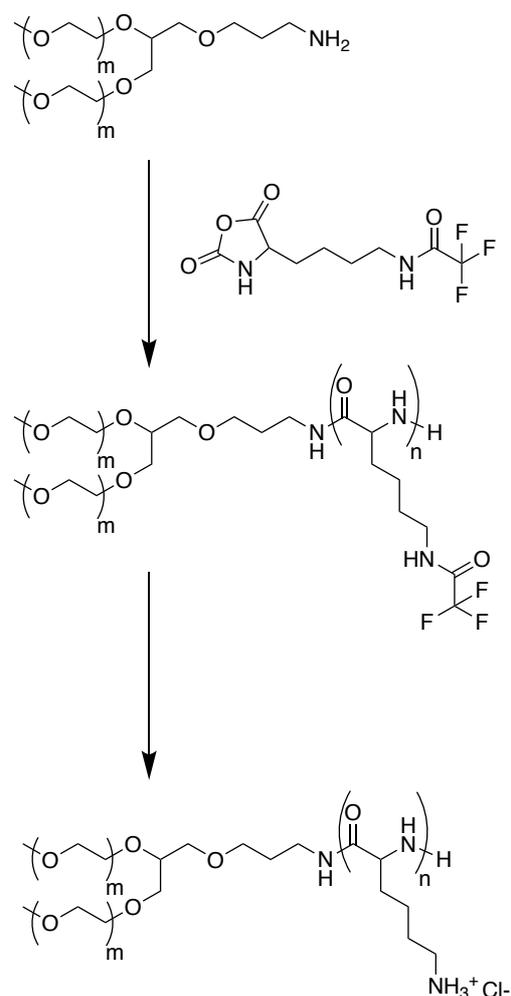


図 2-1. bPEG-PLys の合成スキーム

表 2-1. bPEG-PLys の組成

bPEG-PLys ^a	PLys 重合度 ^b	Mw/Mn ^c	ポリマー分子量 ^d (kDa)
40x2-10	10	1.24	81.6
40x2-13	14	1.23	82.3
40x2-20	19	1.23	83.1
40x2-40	41	1.22	86.7
40x2-80	76	1.29	92.5

^a[X]-[Y]は, [bPEG 分子量 (kDa)]-[目標 PLys 重合度]を表す. ^b値は ¹H NMR にて算出した. ^c値は PEG 標準物質の分子量曲線から SEC にて算出した. ^d値は PEG 分子量 (80 kDa) と PLys 塩酸塩の分子量 ((164.6 g/mol) x PLys 重合度) の合計として計算した.

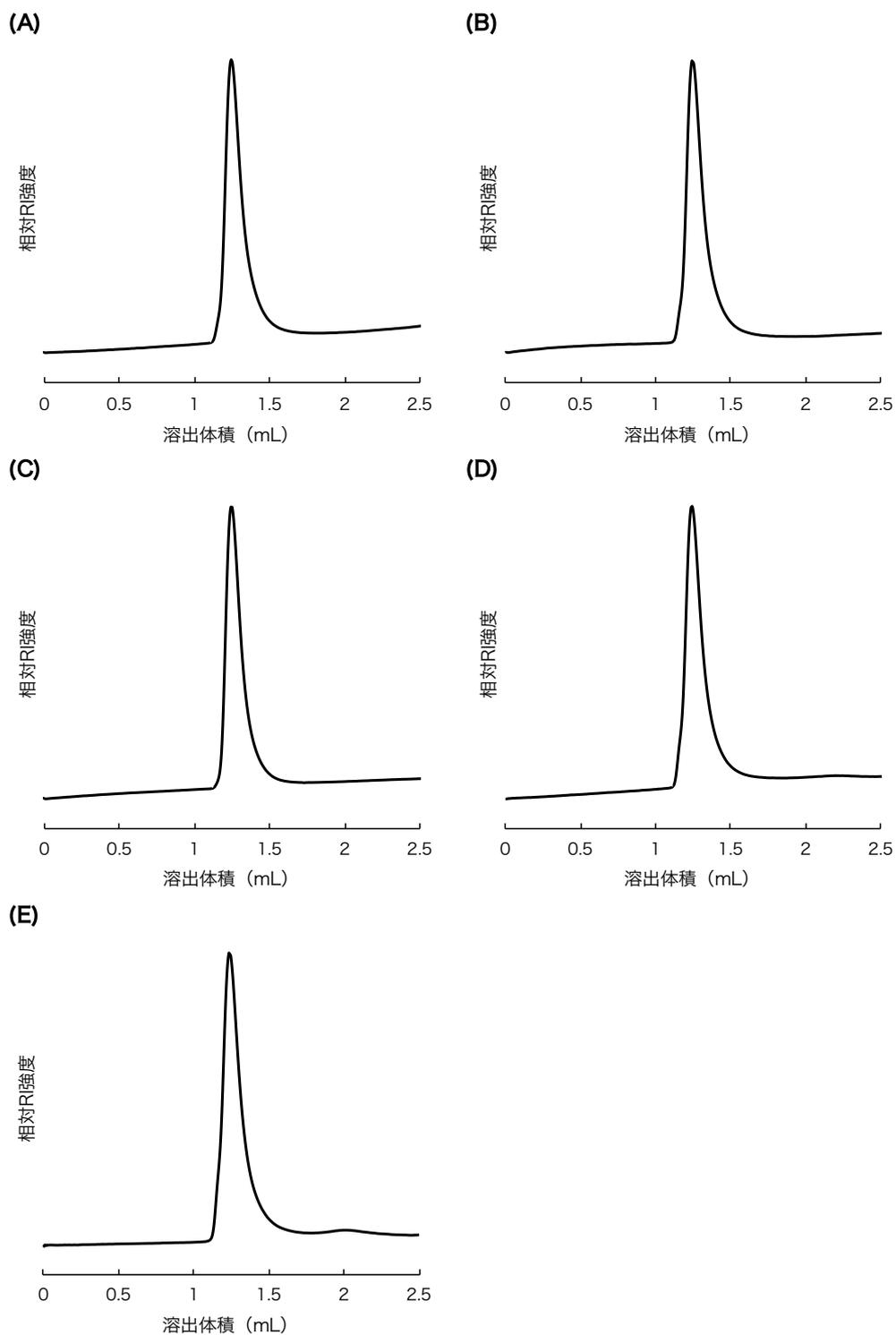


図 2-2. bPEG-PLys の SEC チャート. Superdex 200 Increase 5/150 GL カラムを使用し, 10 mM 酢酸, 0.5 M NaCl にて溶出した (流速: 0.3 mL/min, 30 °C). (A) 40x2-10, (B) 40x2-13, (C) 40x2-20, (D) 40x2-40, (E) 40x2-80

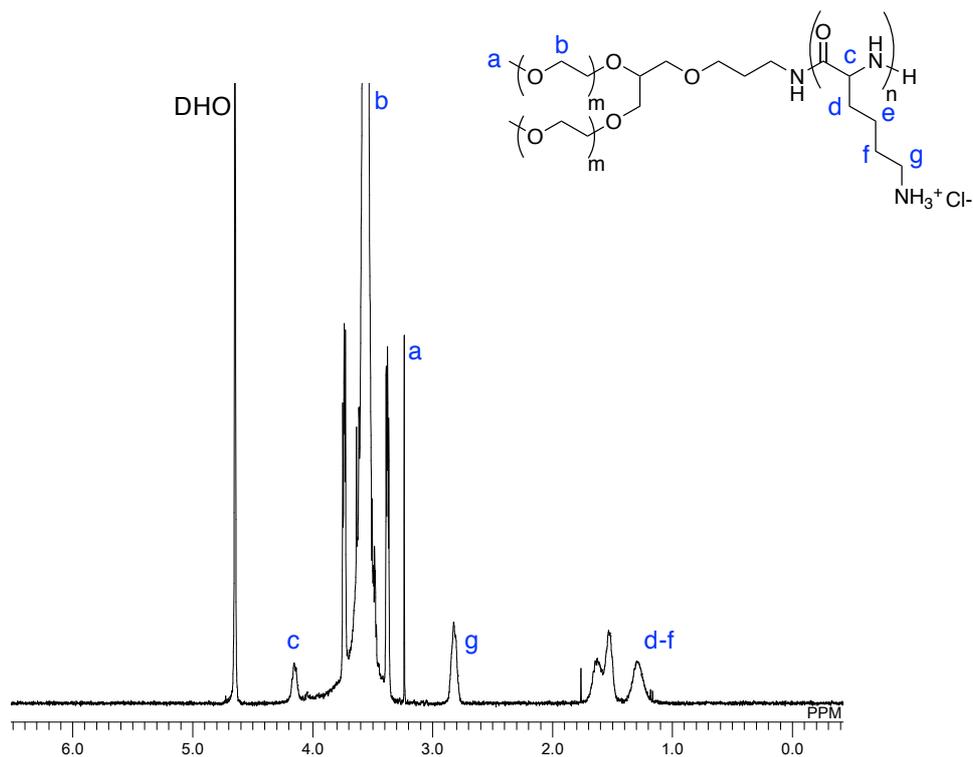


図 2-3. bPEG-PLys (目標 PLys 重合度: 10)の ¹H NMR スペクトル (20 mg/mL, D₂O, 室温)

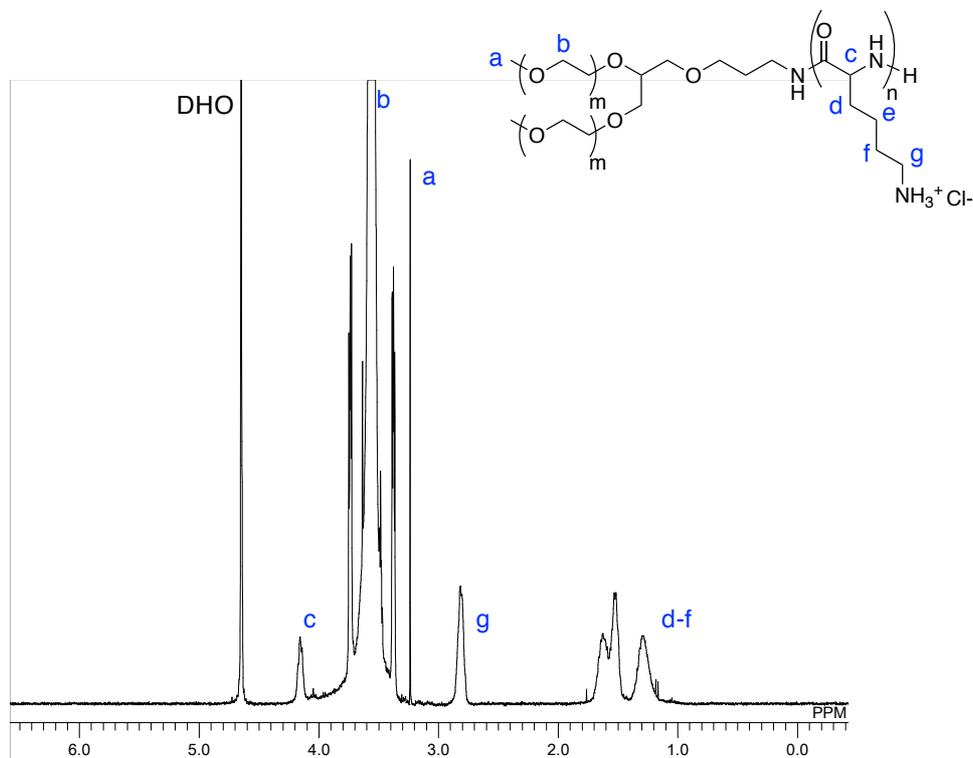


図 2-4. bPEG-PLys (目標 PLys 重合度: 13)の ¹H NMR スペクトル (20 mg/mL, D₂O, 室温)

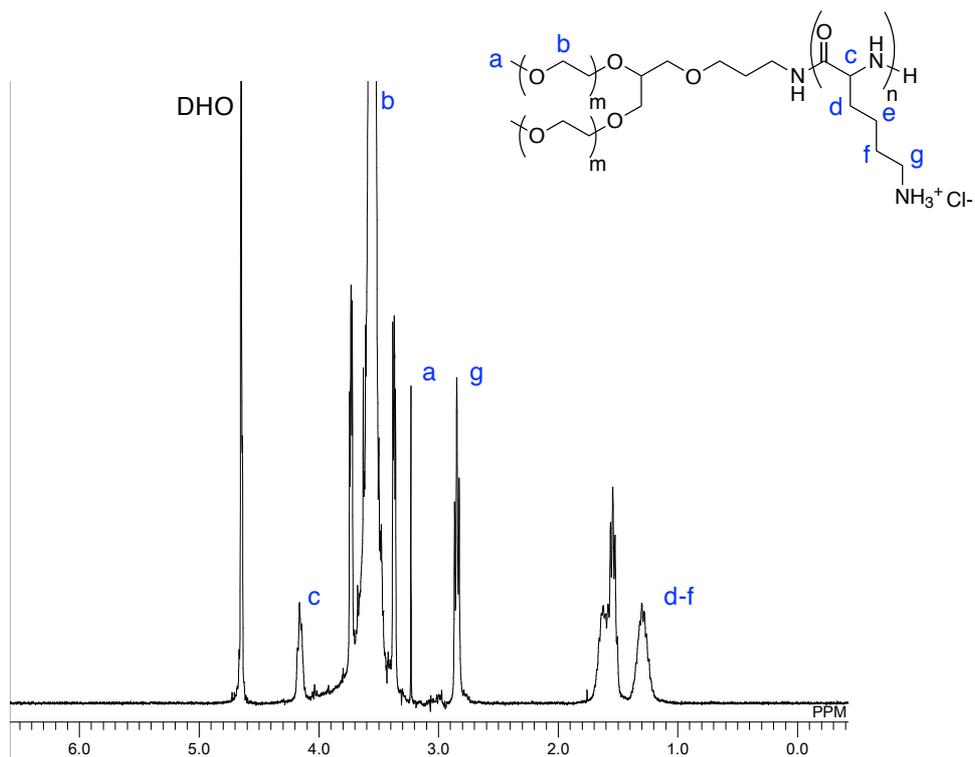


図 2-5. bPEG-PLys (目標 PLys 重合度: 20)の 1H NMR スペクトル (20 mg/mL, D₂O, 室温)

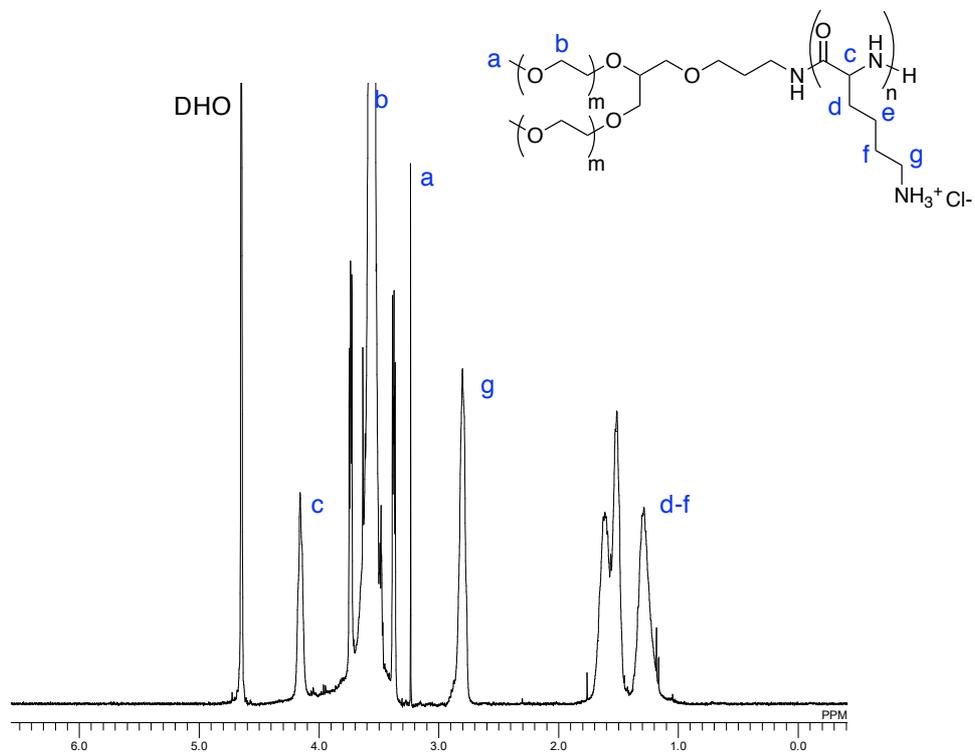


図 2-6. bPEG-PLys (目標 PLys 重合度: 40)の 1H NMR スペクトル (20 mg/mL, D₂O, 室温)

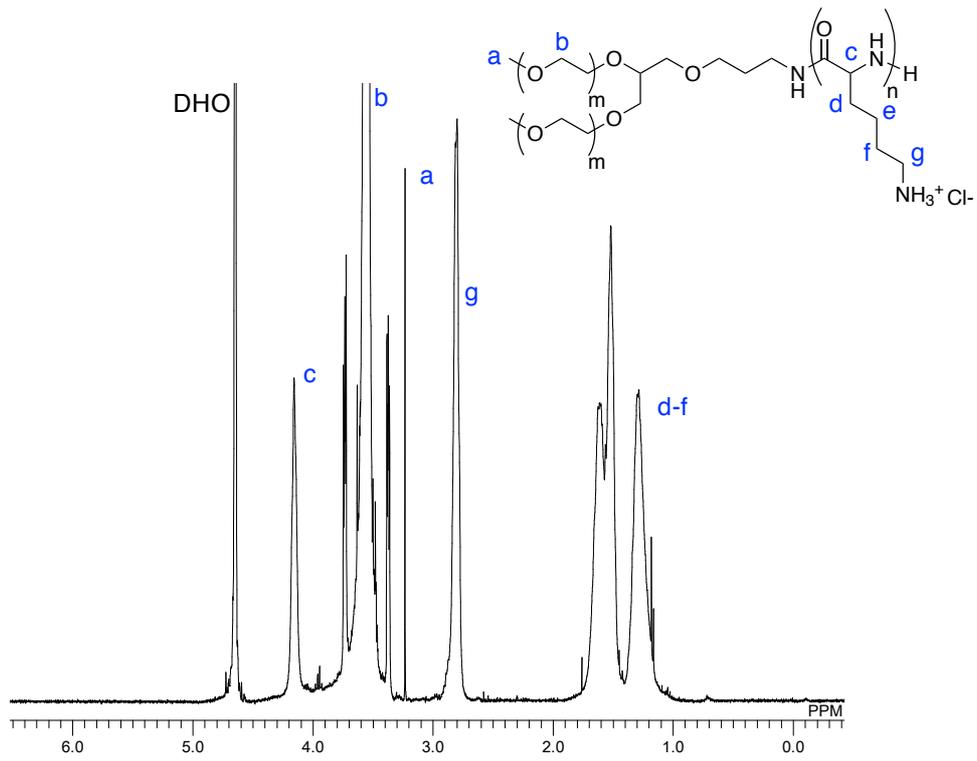


図 2-7. bPEG-PLys (目標 PLys 重合度: 80)の ¹H NMR スペクトル (15 mg/mL, D₂O, 室温)

Small interfering RNA 封入ポリオンコンプレックスの調製

合成した bPEG-PLys が siRNA と PIC 形成することを確認するため、bPEG-PLys と A647-siRNA をそれぞれ 10 mM HEPES 緩衝液に溶解した後、様々な N/P 比で混合した。アガロースゲル電気泳動により、40x2-10, 40x2-13, 40x2-20 においては $N/P \geq 0.5$ でフリーの siRNA のバンドが消失し、40x2-40 と 40x2-80 においては $N/P \geq 1$ で同様に消失が見られたことから、これらの条件では siRNA が PIC 形成していることが示された (図 2-8)。さらに FCS による D_H 測定の結果から、いずれの bPEG-PLys においても N/P 比の増加に伴ってサイズが 5 nm から 15–20 nm まで増大し、 $N/P \geq 1$ においてはプラトーに達したことから PIC 形成が示された (図 2-9)。このサイズは先行研究における PLys 重合度 20 の bPEG-PLys を用いた siRNA 封入ユニット PIC と一致したことから、今回合成した bPEG-PLys においてもユニット PIC が形成されていることが示唆された。より詳細な PIC サイズの違いに注目すると、40x2-10, 40x2-13, 40x2-20 では 18–20 nm であり、40x2-40 と 40x2-80 では約 15 nm であったことから、前者の方が bPEG-PLys の会合数が多いことが示唆された。また、 $N/P \geq 1$ においていずれの PIC もサイズが増大しなかったことから、これらの条件では過剰な bPEG-PLys の会合や PIC 同士の二次会合が起きていないことが示唆された。したがって、 $N/P \geq 1$ ではユニット PIC と過剰な bPEG-PLys が平衡状態にあると考えられた。

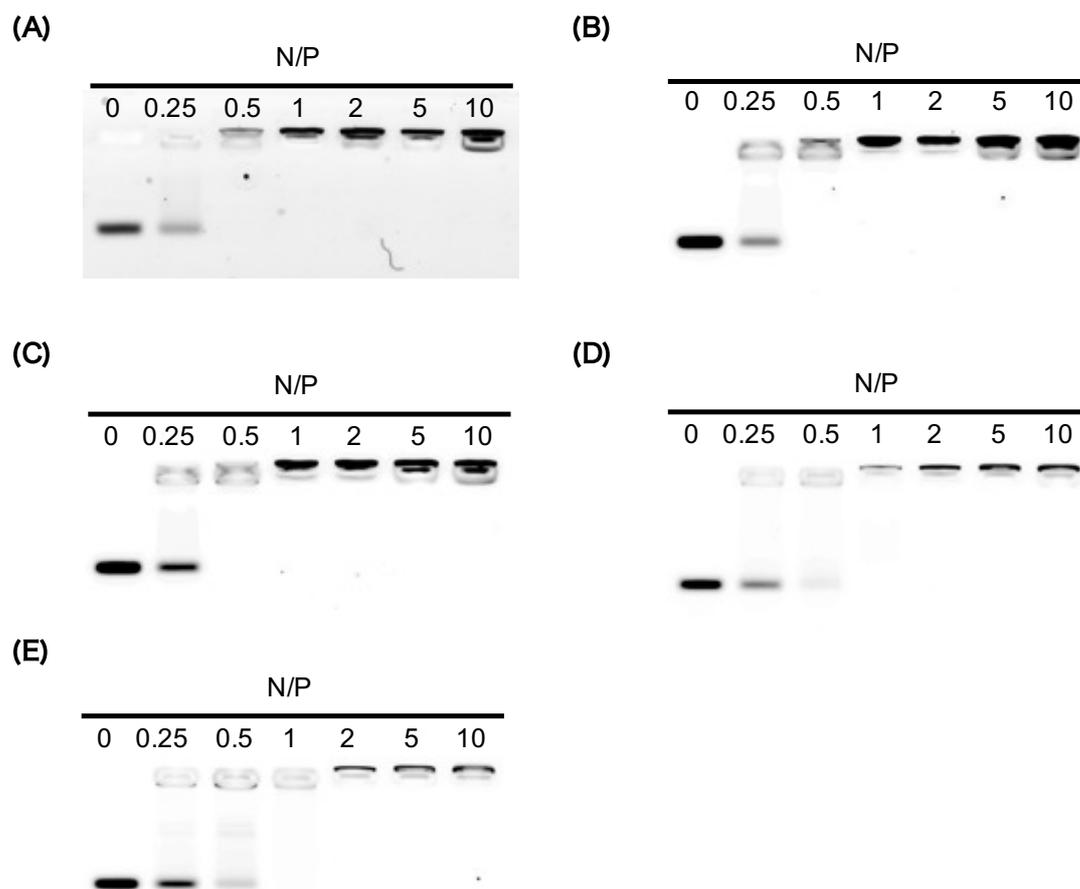


図 2-8. bPEG-PLys と A647-siRNA より調製した PIC のアガロースゲル電気泳動. Molecular Imager FX にて A647 の蛍光強度を検出した. (A) 40x2-10, (B) 40x2-13, (C) 40x2-20, (D) 40x2-40, (E) 40x2-80

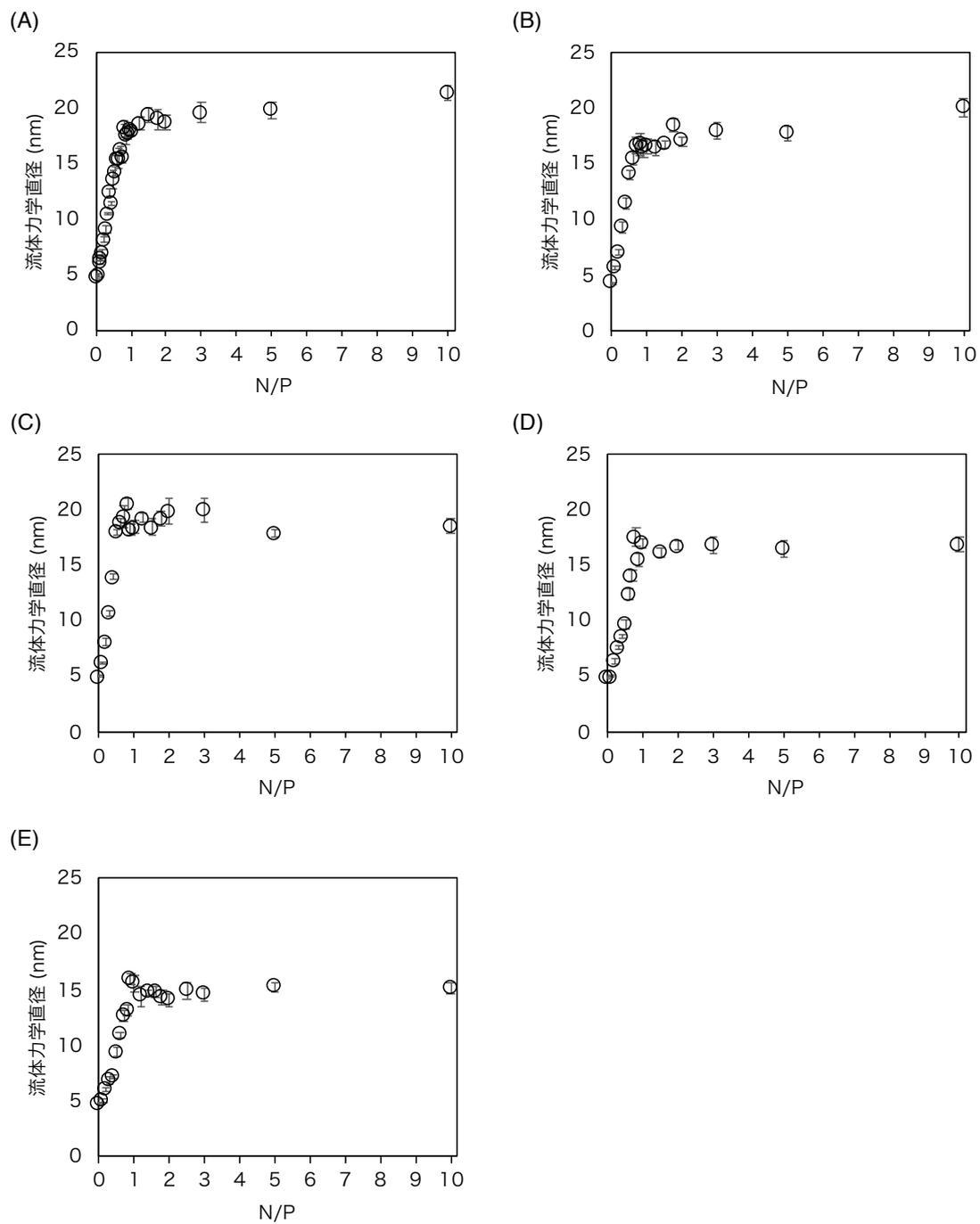


図 2-9. bPEG-PLys と A647-siRNA より調製した PIC の流体力学直径. 分子間相互作用解析システム MF20 にて測定した. (A) 40x2-10, (B) 40x2-13, (C) 40x2-20, (D) 40x2-40, (E) 40x2-80

Small interfering RNA 封入ポリイオンコンプレックスの構造解析

様々な重合度の PLys を持つ bPEG-PLys と siRNA からなる PIC がユニット PIC を形成することを証明し、その構造 (bPEG-PLys と siRNA の会合数) を明らかにするため、FCS による AN_{siRNA} の測定と FFF による PIC の分子量 (PIC_{MW}) 測定を実施した。FCS によって A647-siRNA のみを含む溶液中で検出された蛍光分子数と PIC 溶液中の蛍光分子数を比較することで、様々な N/P 比で調製した siRNA 封入 PIC の AN_{siRNA} を算出した (図 2-10)。40x2-80 を除く全ての bPEG-PLys は N/P=0-10 において AN_{siRNA} は約 1 であった。40x2-80 より調製した siRNA 封入 PIC は N/P=1 に到達するまでに AN_{siRNA} が 2 へと増大し、N/P = 2 に近づくに連れて AN_{siRNA} は 1 へと減少した。この結果より、N/P = 1 において 40x2-10, 40x2-13, 40x2-20, 40x2-40 では 1 分子の siRNA を封入したユニット PIC, 40x2-80 においては 2 分子の siRNA を封入したユニット PIC が形成されたことが示された。N/P=1 にて調製した siRNA 封入 PIC を FFF で分析した結果、siRNA と比べていずれの PIC も保持時間の増加した単峰性のピークを示した (図 2-11)。ピーク頂点付近の平均分子量 (PIC_{MW}) を、散乱光強度および PIC の dn/dc より算出した (表 2-2)。PIC の dn/dc は bPEG-PLys (PEG の文献値: 0.135 mL/g [23]) と siRNA (実測値: 0.244 mL/g) の値の重量平均を利用した。得られた PIC_{MW} と bPEG-PLys と siRNA の分子量から、 $AN_{\text{bPEG-PLys}}$ を以下の式に従って決定した (表 2-2)。

$$AN_{\text{bPEG-PLys}} = (MW_{\text{PIC}} - MW_{\text{siRNA}} \times AN_{\text{siRNA}}) / MW_{\text{bPEG-PLys}}$$

その結果、40x2-10 では 2 分子以上の bPEG-PLys を会合しているユニット PIC, 40x2-13 および 40x2-20 では $(AN_{\text{bPEG-PLys}}, AN_{\text{siRNA}}) = (2, 1)$, 40x2-40 では $(AN_{\text{bPEG-PLys}}, AN_{\text{siRNA}}) = (1, 1)$, 40x2-80 では $(AN_{\text{bPEG-PLys}}, AN_{\text{siRNA}}) = (1, 2)$, となるユニット PIC が主として形成されていることが示された。40x2-20 においては、先行研究における同等の PLys 重合度の場合と矛盾しない結果であった [22]。一方で、40x2-10 と 40x2-13 においては、狙いと比べて $AN_{\text{bPEG-PLys}}$ が 1 以上小さく、PIC 中で電荷が完全に中和されていないことが示唆さ

れた。これは PIC 中の PEG 鎖同士の立体反発が強いことと短い PLys と siRNA との静電相互作用が弱いことに起因していると考えた。また、PLys 重合度(正電荷数)が siRNA の電荷数の 2 倍となる約 80 であれば 2 分子の siRNA を封入したユニット PIC が調製できることを確認した。

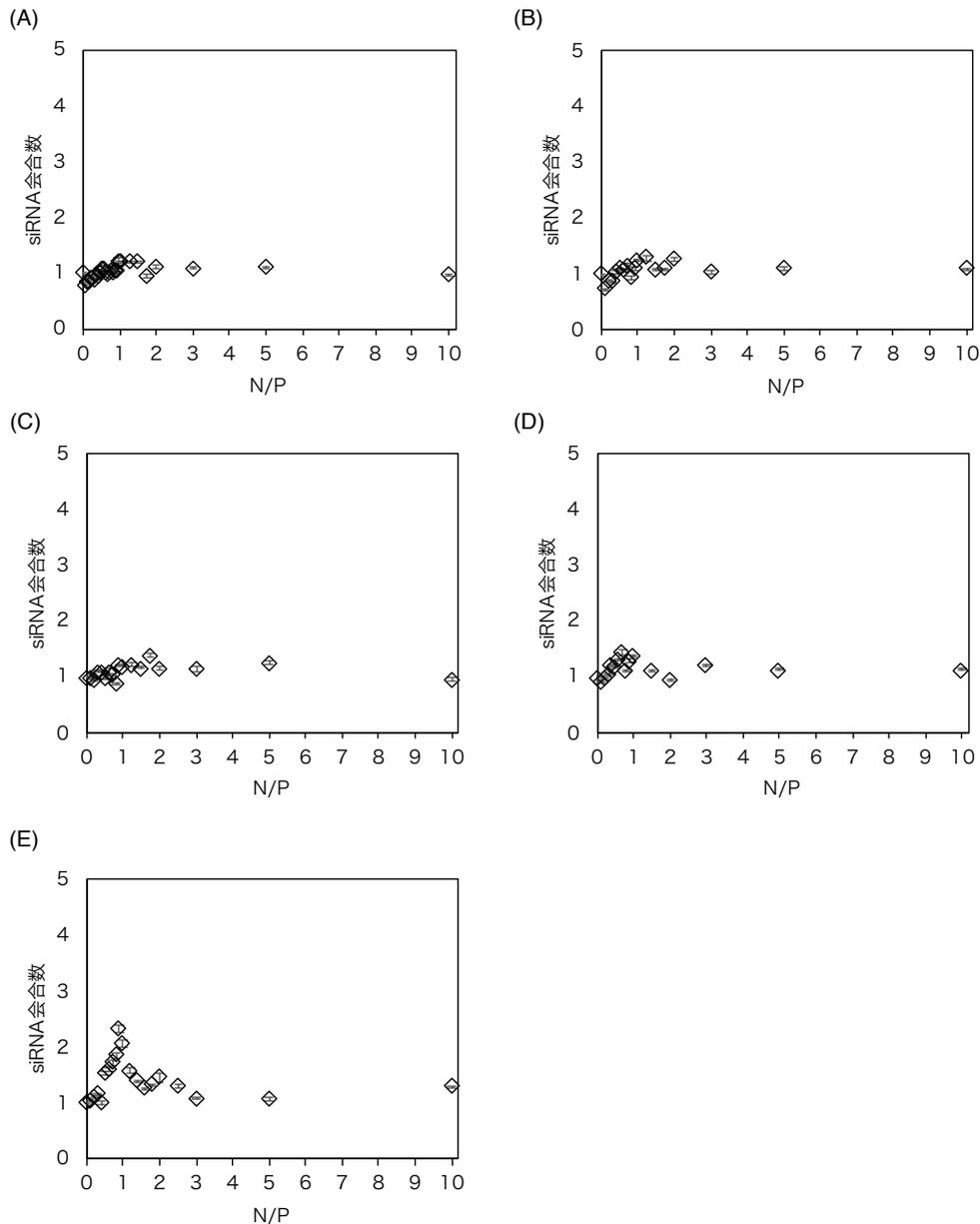


図 2-10. bPEG-PLys と A647-siRNA より調製した PIC 中の siRNA 会合数. 分子間相互作用解析システム MF20 にて測定した. (A) 40x2-10, (B) 40x2-13, (C) 40x2-20, (D) 40x2-40, (E) 40x2-80

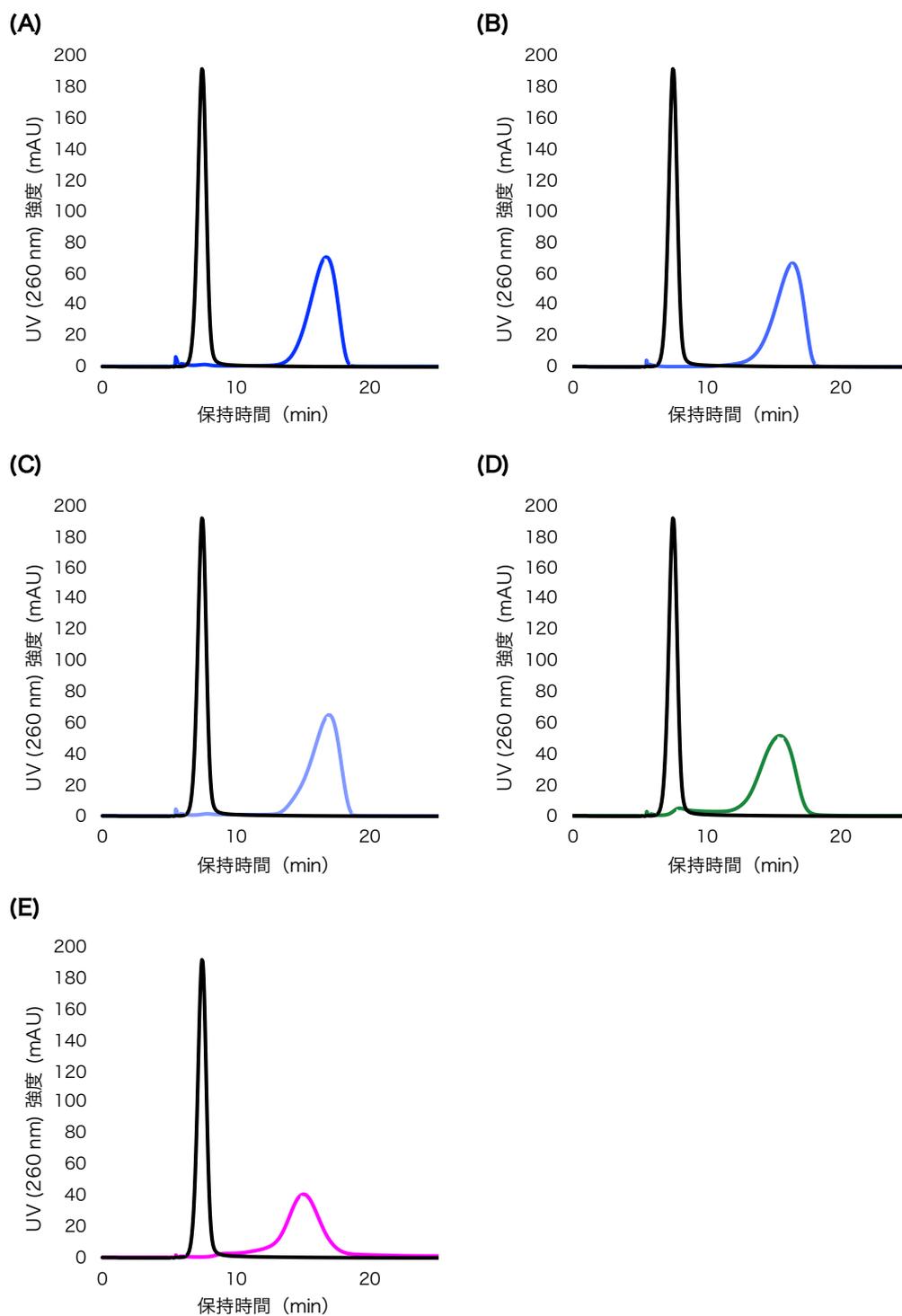


図 2-11. FFF にて測定した siRNA およびユニット PIC (N/P=1) の UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$) フラクトグラム. 測定毎に 0.6 nmol siRNA 注入した. $V_{\text{CHF}} = 1 \text{ mL/min}$, $V_{\text{CRF}} = 3 \times \exp(-0.177 \times t) \text{ mL/min}$, $t_0 = 5 \text{ min}$. (A) 40x2-10, (B) 40x2-13, (C) 40x2-20, (D) 40x2-40, (E) 40x2-80

表 2-1. bPEG-PLys と siRNA より調製した PIC (N/P=1) の構造

bPEG-PLys ^a	dn/dc (mL/g) ^b	MW _{PIC} (kDa) ^c	AN _{bPEG-PLys} ^d	AN _{siRNA} ^e
40x2-10	0.139	204	2.3	1.2
40x2-13	0.141	139	1.5	1.2
40x2-20	0.143	168	1.8	1.2
40x2-40	0.150	106	1.0	1.3
40x2-80	0.158	126	1.1	2.1

^a[X]-[Y]は, [bPEG 分子量 (kDa)]-[目標 PLys 重合度]を表す. ^b値は bPEG-PLys (0.135 mL/g) と siRNA (0.244 mL/g) の dn/dc の重量平均として計算した. ^cFFF にて測定した UV ピーク付近の散乱光強度から算出した. ^d値は MW_{PIC}, AN_{siRNA}, bPEG-PLys と siRNA の分子量から $AN_{bPEG-PLys} = (MW_{PIC} - MW_{siRNA} \times AN_{siRNA}) / MW_{bPEG-PLys}$ の式を用いて算出した. ^eFCS にて測定した.

AN_{bPEG-PLys} > 1 となる 1 分子 siRNA 封入ユニット PIC の会合挙動をより詳細に明らかにするため, 様々な N/P 比で 40x2-10, 40x2-13, 40x2-20 と siRNA を混合して PIC を調製した. FFF で測定した UV フラクトグラムから, siRNA, 異なる AN_{bPEG-PLys} を持つユニット PIC のピークを分離分析し, 各成分の割合を求めた (図 2-12). 40x2-10 においては, 電気泳動にてフリーの siRNA が消失した N/P=0.5 においても明瞭な siRNA のピークが確認された (図 2-12A). これは FFF 測定を生理塩条件にて実施しているため, 一部の PIC が解離してしまったと考えられる. この結果は, 40x2-10 より調製したユニット PIC の安定性が低いことを示唆している. 40x2-10 においては, bPEG-PLys が過剰に存在する N/P = 2 まで逐次上昇させた際に, 3 つの異なる保持時間の PIC ピークが確認されたことから (図 2-12A), 保持時間の小さい方から順に (AN_{bPEG-PLys}, AN_{siRNA}) = (1, 1), (2, 1), (3, 1) となるユニット PIC として各成分比を算出した (図 2-12B). また, 40x2-13 においては 2 つの異なる保持時間の PIC ピークが確認されたことから (図 2-12C), 保持時間の小さい方から順に (AN_{bPEG-PLys}, AN_{siRNA}) = (1, 1), (2, 1) となるユニット PIC として各成分比を算出した (図 2-12D). いずれの PIC においても, フリーの siRNA が消失

する前に $AN_{bPEG-PLys} > 1$ となるユニット PIC も形成され始めていることから (図 2-12B,D), bPEG-PLys の会合が非協同的ではないことが示唆された。これは, 1:1 ユニット PIC の正味の電荷数 (40x2-10: -30, 40x2-13: -27) および siRNA の負電荷数 (-40) と比較して, bPEG-PLys (+10 あるいは+13) の正電荷数が半分以下と小さく, 1:1 ユニット PIC と siRNA のいずれに対しても会合し易いことに起因すると考えられる。さらに N/P = 1 の時における成分比から平均分子量を算出すると, 散乱光強度より測定した分子量と大きくは矛盾しない結果であった。この結果より, 40x2-10 と 40x2-13 においては, それぞれ電荷を完全に中和する $(AN_{bPEG-PLys}, AN_{siRNA}) = (4, 1), (3, 1)$ となるユニット PIC が N/P > 1 であっても生理塩条件では形成されないことが示唆された。

一方で, 40x2-20 においては, N/P = 0.5 (bPEG-PLys/siRNA = 1.05) に到達するまで主に 1:1 ユニット PIC が形成され, $0.5 \leq N/P \leq 1$ の間で 1:1 ユニット PIC から 2:1 ユニット PIC が形成されることが示された (図 2-12E,F)。この結果より 40x2-20 は siRNA の会合は非協同的に起きていることが分かった。また, N/P = 1.25 にてほとんど PIC が 2:1 ユニット PIC となることが示された。

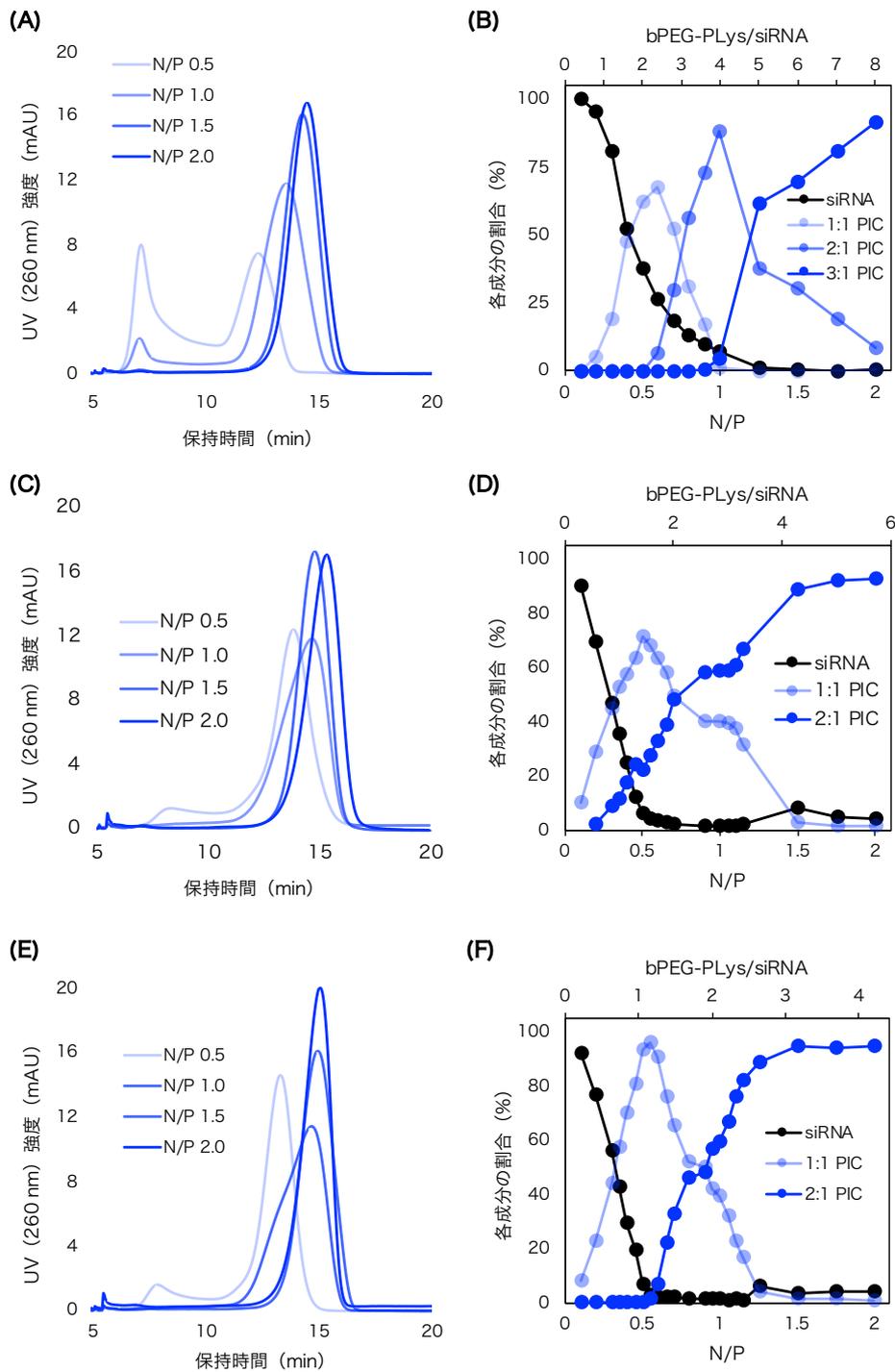


図 2-12. 様々な N/P 比で調製した siRNA 封入ユニット PIC の各成分の存在比. FFF の UV フラクトグラム各成分のピーク面積比より算出した. (A) 40x2-10 の UV フラクトグラム, (B) 40x2-10 の各成分比, (C) 40x2-13 の UV フラクトグラム, (D) 40x2-13 の各成分比, (E) 40x2-20 の UV フラクトグラム, (F) 40x2-20 の各成分比.

会合数の異なる siRNA 封入ユニット PIC の安定性を比較するため、異なる塩濃度条件下における PIC のサイズ変化を FCS にて測定した (図 2-13)。生理塩条件 (150 mM NaCl) 下における D_H を 1 として塩濃度変化時の相対的なサイズを算出したところ、 $N/P = 1$ においては、40x2-10 を用いて調製した PIC のサイズが塩濃度の増加にしたがって顕著に減少した。PLys 重合度が 13, 20 へと増加するに従いサイズ減少が抑制されたことから、PLys 重合度が 20 未満の bPEG-PLys と siRNA の静電相互作用は、PLys 重合度が 20 以上の bPEG-PLys と比べて弱いことが示唆された。一方で、 $N/P = 10$ で調製した場合にはいずれの bPEG-PLys を用いたユニット PIC においてもサイズ減少が少なかった。これは、過剰に存在する bPEG-PLys が $[bPEG-PLys] + [siRNA] \rightleftharpoons [ユニット PIC]$ の動的平衡をユニット PIC 側へ安定化しているからと考えられる。

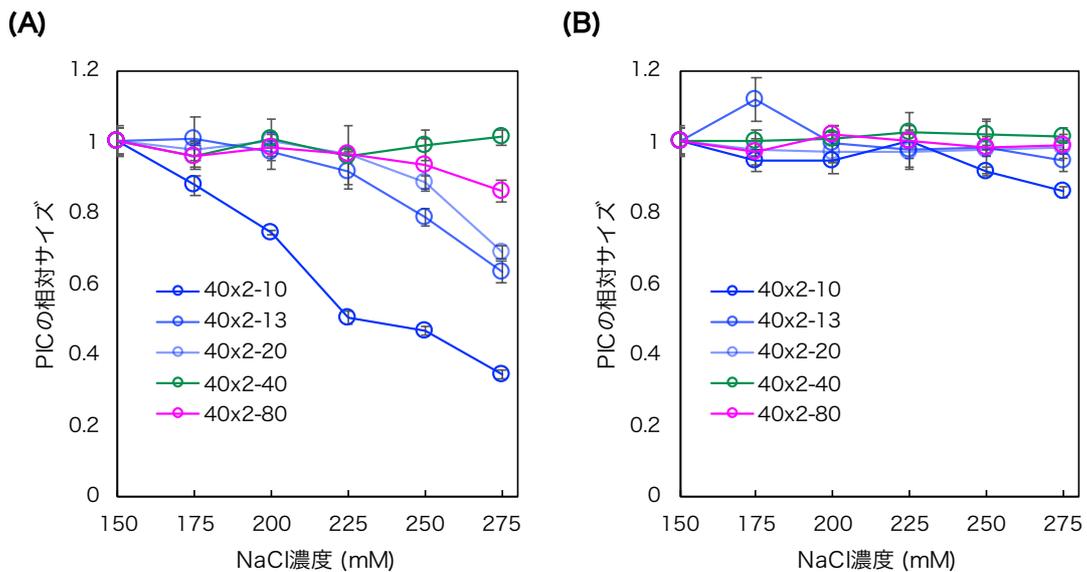


図 2-13. 塩濃度変化時における siRNA 封入ユニット PIC のサイズ変化。最終 A647-siRNA 濃度 = 10 nM の溶液を分子間相互作用解析システム MF20 にて測定した。(A) $N/P = 1$ にて調製した PIC, (B) $N/P = 10$ にて調製した PIC。

Small interfering RNA 封入ユニットポリイオンコンプレックスの血中滞留性評価

bPEG-PLys の正電荷数が siRNA 封入ユニット PIC の血中での安定性に与える影響を明らかにするため、N/P = 1 で調製したユニット PIC をマウスに静脈投与し、投与から 10, 30 分, 1, 2, 3 時間後の血中の siRNA 濃度を A647 由来の蛍光強度から算出した (図 2-14A)。検出下限以下となった以降の時点はプロットしなかった。いずれのユニット PIC も siRNA 単体を投与した時と比べて高い血中濃度推移を示したが、中でも 40x2-20 が最も高い血中滞留性を示した。これまでの結果より、siRNA に 2 分子の bPEG-PLys が会合したユニット PIC の血中安定が高く、さらに bPEG-PLys の会合数を増加させるために PLys を短くすると PLys と siRNA の結合力が低下し、血中での PIC の解離が促進されてしまったことが示唆された。

先行研究において PLys 重合度 20 の bPEG-PLys の場合、bPEG-PLys 過剰存在下、すなわち N/P = 10 で調製したユニット PIC の血中滞留性が顕著に高いことが分かっている [22]。これは、過剰な bPEG-PLys が血中に存在することで、PIC が解離してもすぐに別の bPEG-PLys 分子と PIC 形成できる動的平衡状態にあるためと考えている。そこで、高い血中滞留性を持つ bPEG-PLys を用いたユニット PIC の動的平衡化を検討するため、bPEG-PLys の血中滞留性を検証した (図 2-45B)。その結果、PLys 重合度が短いほど顕著に血中滞留性が向上することが明らかとなった。PLys 重合度 10 と 20 を比較すると、40x2-10 の投与 2 日後の血中濃度は 40x2-20 の投与 1 時間後の値よりも高かった。一方で、40x2-40 と 40x2-80 は、投与後 1 時間以内に 90%以上が血中から消失していた。この結果から、過剰な bPEG-PLys と血中で動的平衡を保つことが出来るのは PLys 重合度 20 以下の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys だけであると考えられた。そこで、 $AN_{\text{bPEG-PLys}} > 1$ のユニット PIC を形成可能な 40x2-10, 40x2-13, 40x2-20 を用いて N/P = 10 のユニット PIC を調製し、血中滞留性を比較した (図 2-14C)。投与から 3 時間以内ではいずれのユニット PIC も N/P = 1 と比較して顕著に高かったが、5 時間後には正電荷数の最も少ない

40x2-10 の血中 siRNA 濃度が最も高く、40x2-13 や 40x2-20 と比較して 1.5–2 倍高い血中濃度を示した。いずれのユニット PIC でも 24 時間後には siRNA が検出されなかった。この結果は、結合の弱い 40x2-10 であっても過剰な bPEG-PLys が血中に豊富に存在することで、動的平衡に基づいてユニット PIC を安定化しているためと考えられた。さらに同じ N/P 比で投与した場合、PLys 重合度が短い方が投与する bPEG-PLys 分子数が増加するため、より血中 bPEG-PLys 濃度が高くなることが想定されることから、PLys 重合度が短いほど過剰な bPEG-PLys との動的平衡によるユニット PIC の血中安定性向上が期待できる。しかし、10 よりも短い PLys 鎖では siRNA との結合が弱くて PIC 形成出来ない可能性もある。また、核酸医薬による治療スケジュールは基本的に複数回投与が想定され、bPEG-PLys のみが血中を長く滞留し続けると 2 回目以降の投与時の動態に大きく影響してしまい、治療効果の制御が困難となってしまうため、本研究ではさらに短い PLys の検討は実施しなかった。

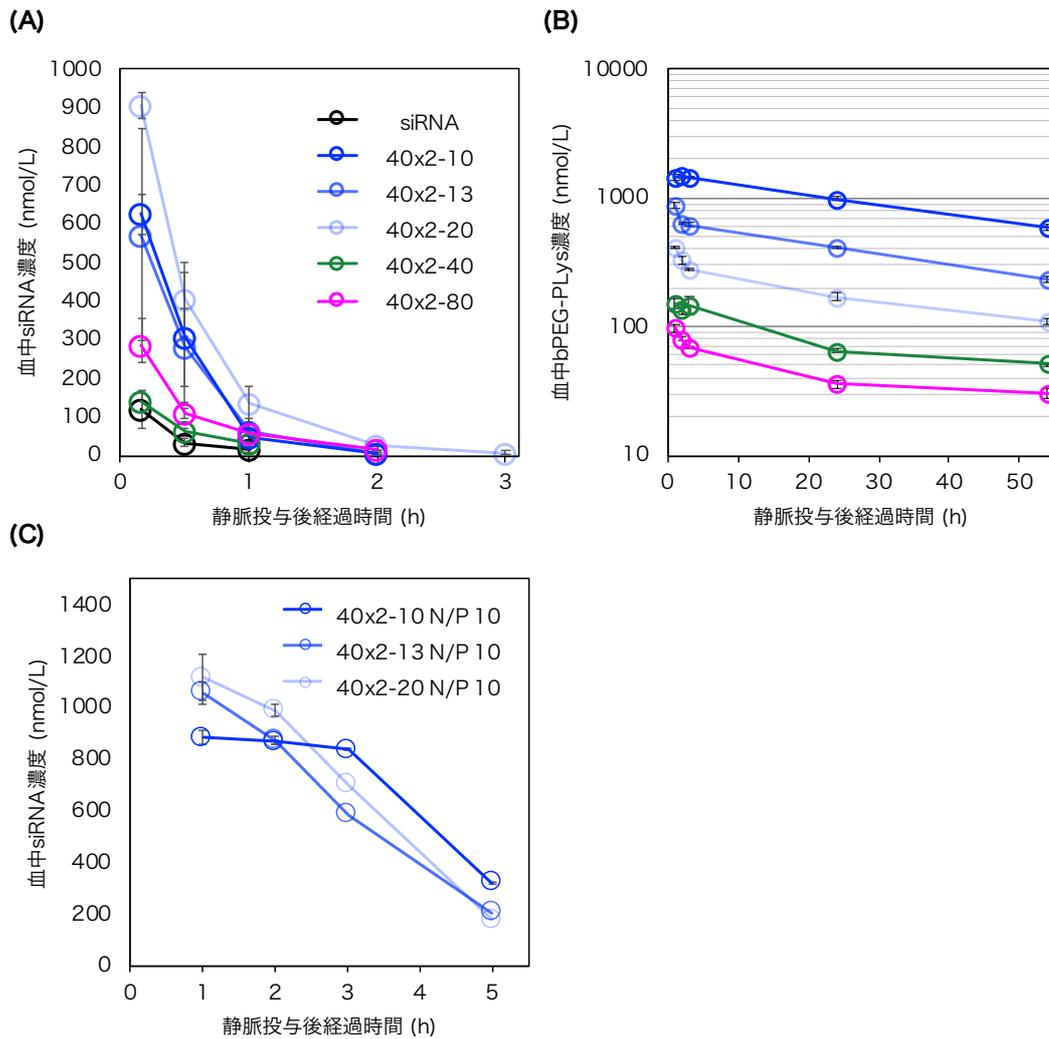


図2-14. siRNA 封入ユニット PIC および bPEG-PLys の血中滞留性評価. 濃度既知の A647-siRNA あるいは bPEG-PLys-A647 の蛍光強度から作成した検量線を元に, 血中の siRNA あるいは bPEG-PLys 濃度を算出した. (A) siRNA 単体および N/P = 1 で調製したユニット PIC. (B) N/P = 10 で調製したユニット PIC. (C) A647 で標識した bPEG-PLys.

より詳細にユニット PIC と bPEG-PLys の血中動態の差を明らかにするため、これらの血中濃度推移をノンコンパートメント解析することで各種薬物動態 (PK) パラメータを算出した (表 2-3)。ノンコンパートメント解析は、特別なモデルに依存しない薬物動態解析手法であり、モデルのバイアスを受けることなく容易に解析可能であるため、本手法を採用した。結果より、ユニット PIC 形成は全時間の濃度曲線下面積 (AUC_{∞}) を数倍増加させ、消失速度 (CL) を数分の 1 に低下させる効果があり、過剰な bPEG-PLys によるユニット PIC の動的平衡化によりその効果はさらに著しく上昇し、siRNA 単体と比較して 10 倍から数十倍の変化が認められた。これはユニット PIC の動的平衡化により、siRNA が安定に血流中を循環できる量を増加させたことを示唆している。一方で siRNA の最終消失相の半減期 ($t_{1/2}$) は、siRNA の血中での酵素分解に大きく影響を受けると考えられるが、N/P=1 ではあまり延長が見られなかった。これは、ユニット PIC 単独では天然型の siRNA を酵素耐性から保護するには不十分であることを示唆している。PLys 重合度が大きい方が比較的 $t_{1/2}$ が延長していたのは、塩基性アミノ酸により核酸を認識するヌクレアーゼと PLys 鎖との静電反発が強いことが影響している可能性がある。

またポリマー自体の PK パラメータを比較すると、興味深いことに $t_{1/2}$ は PLys 鎖長によらず同様の値を示した。これは bPEG-PLys が分子量分布を持っていることから、長い PLys 鎖長を持つ bPEG-PLys が投与直後に血中から消失し、分布の中で短い PLys 鎖長を持つ bPEG-PLys だけが血中を滞留している可能性が考えられる。また、 AUC_{∞} を比較すると、PLys 重合度 20 を境にして PLys 重合度が低いと急激に値が上昇することが分かった (図 2-15)。これは PLys の生体内分子との非特異的な結合性と分岐型 PEG のステルス性のバランスの境界を示している可能性がある。生理塩環境からわずかに塩濃度を上昇させただけで重合度 20 未満の PLys を持つ bPEG-PLys は siRNA を放出してしまったことから、生体適合性を保ちつつ siRNA との結合を維持するためには重合度約 20 の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys が最適であると考えられる。そして、核酸医薬としての

実用上の観点から、N/P=10 と bPEG-PLys の PK パラメータの乖離が小さい方が望ましい。40x2-20 は、40x2-10 と比べると AUC_{∞} や CL の N/P=10 と polymer との乖離が5分の1程度であり、PLys 重合度が約 20 の bPEG-PLys が核酸医薬送達キャリアのために適したブロック共重合体の設計であることが明らかとなった。

表 2-3. siRNA 封入ユニット PIC および bPEG-PLys の薬物動態パラメータ

		$t_{1/2}$ (h)	AUC_{∞} (h \cdot nmol/L)	CL (mL/h)	Vss (mL)
siRNA		0.26 ± 0.04	71.2 ± 24.1	33.0 ± 14.6	10.0 ± 3.3
40x2-10	N/P = 1	0.26 ± 0.05	403 ± 68	5.09 ± 0.77	1.65 ± 0.22
	N/P = 10	2.01 ± 0.35	$4,784 \pm 1,013$	0.44 ± 0.08	1.43 ± 0.40
	polymer	39.9 ± 3.7	$87,036 \pm 7,719$	0.046 ± 0.004	2.58 ± 0.04
40x2-13	N/P = 1	0.26 ± 0.06	381 ± 127	6.04 ± 2.42	2.34 ± 1.01
	N/P = 10	1.45 ± 0.19	$4,094 \pm 125$	0.49 ± 0.01	1.15 ± 0.12
	polymer	35.7 ± 1.5	$34,748 \pm 1,524$	0.12 ± 0.01	5.69 ± 0.15
40x2-20	N/P = 1	0.46 ± 0.06	642 ± 67	3.15 ± 0.31	1.42 ± 0.11
	N/P = 10	1.18 ± 0.11	$4,274 \pm 579$	0.48 ± 0.07	1.02 ± 0.14
	polymer	37.9 ± 4.3	$16,100 \pm 1,315$	0.25 ± 0.02	13.2 ± 0.6
40x2-40	N/P = 1	0.40 ± 0.12	106 ± 29	20.2 ± 4.8	10.7 ± 3.7
	N/P = 10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	polymer	33.9 ± 4.6	$6,932 \pm 217$	0.58 ± 0.02	29.0 ± 4.8
40x2-80	N/P = 1	0.51 ± 0.09	219 ± 51	9.57 ± 19.0	5.41 ± 0.94
	N/P = 10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	polymer	35.3 ± 1.3	$3,920 \pm 357$	1.03 ± 0.09	55.3 ± 2.9

BALB/c マウスに投与後の血中 siRNA あるいは bPEG-PLys 濃度を A647 由来蛍光強度から測定し、Phoenix WinNonlin 6.3 を用いてノンコンパートメント解析を実施して算出した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した (n=3)。

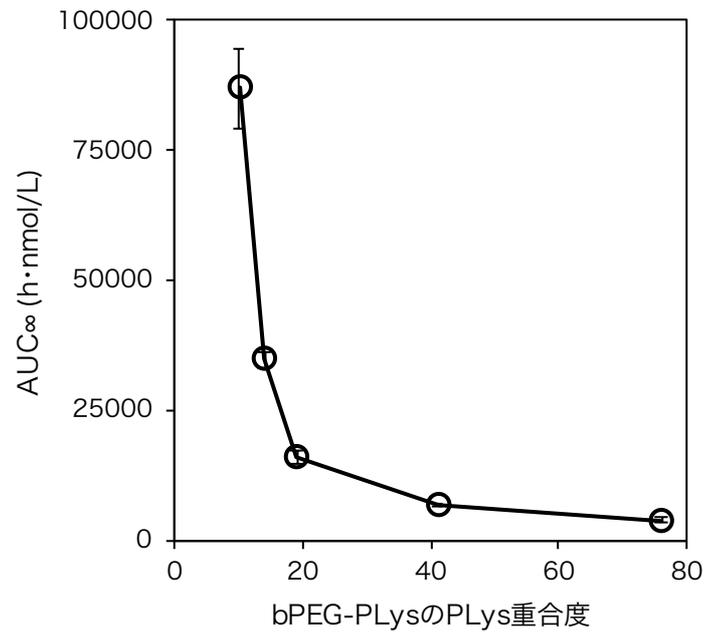


図 2-15. bPEG-PLys の PLys 重合度と PK パラメータの関係

2.4 結論

本研究では、様々な重合度の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys と siRNA からユニット PIC を調製し、その構造解析と血中滞留性評価を実施した。得られた結果から PLys 重合度、すわなち bPEG-PLys の正電荷数によって siRNA 封入ユニット PIC の構造と血中安定性を制御できることが明らかとなった。具体的には、bPEG-PLys の正電荷数に基づいてユニット PIC 中の bPEG-PLys および siRNA の会合数が制御され、特に PLys 重合度が 20 の時に 1 分子の siRNA の電荷を 2 分子の bPEG-PLys で中和したユニット PIC が最も高い血中安定性を示した。さらに短い PLys 鎖長を持つ bPEG-PLys と siRNA の結合力は PLys 重合度 20 の bPEG-PLys と比較して PIC 中の電荷を完全に中和出来ないほど弱く、ユニット PIC の血中安定性も低かったが、過剰な bPEG-PLys と同時に投与することで同等以上の血中滞留性を示した。これは PLys 鎖長が短いほど bPEG-PLys の血中滞留性が高く、より豊富に血中に存在する bPEG-PLys が PIC の動的平衡に基づき、ユニット PIC の血中安定性を向上しているものと考えられた。これらの結果は、所望のユニット PIC を調製するための高分子材料設計指針に関する知見を与えるのみならず、siRNA 送達キャリアの血中滞留性を向上させるための新たな戦略を示すものである。一方で、核酸医薬としての実用上の観点では、ユニット PIC が消失した後も bPEG-PLys が血中を滞留し続けることは 2 回目以降の投与において問題となることから、ユニット PIC としての安定性が最も高い PLys 重合度 20 の bPEG-PLys を以降の研究に用いることとした。

参考文献

- [1] Kabanov, A. V.; Kabanov, V. A. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 7–20.
- [2] De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113–126.
- [3] Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113–131.
- [4] Wagner, E. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1005–1013.
- [5] Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2562–2574.
- [6] Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6183–6188.
- [7] Kataoka, K.; Togawa, H.; Harada, A.; Yasugi, K.; Matsumoto, T.; Katayose, S. *Macromolecules* **1996**, *29*, 8556–8557.
- [8] Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 2123–2133.
- [9] Katayose, S.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 702–707.
- [10] Kakizawa, Y.; Kataoka, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 203–222.
- [11] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 288–294.
- [12] Koide, A.; Kishimura, A.; Osada, K.; Jang, W.-D.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5988–5989.
- [13] Chuanoi, S.; Kishimura, A.; Dong, W.-F.; Anraku, Y.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Polym. J.* **2014**, *46*, 130–135.
- [14] Wibowo, A.; Osada, K.; Matsuda, H.; Anraku, Y.; Hirose, H.; Kishimura, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **2014**, *47*, 3086–3092.
- [15] Kim, B. S.; Chuanoi, S.; Suma, T.; Anraku, Y.; Hayashi, K.; Naito, M.; Kim, H. J.; Kwon, I. C.; Miyata, K.; Kishimura, A.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3699–3709.
- [16] Harada, A.; Kataoka, K. *Science* **1999**, *283*, 65–67.
- [17] Hayashi, K.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Watanabe, S.; Takemoto, H.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K. *Macromolecular Rapid Communications* **2016**, *37*, 486–493.
- [18] Harada, A.; Togawa, H.; Kataoka, K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 35–42.
- [19] DeRouchey, J.; Schmidt, C.; Walker, G. F.; Koch, C.; Plank, C.; Wagner, E.; Rädler, J. O. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 724–732.
- [20] Shimizu, H.; Hori, Y.; Kaname, S.; Yamada, K.; Nishiyama, N.; Matsumoto, S.; Miyata, K.; Oba, M.; Yamada, A.; Kataoka, K.; Fujita, T. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 622–633.
- [21] Kim, H. J.; Takemoto, H.; Yi, Y.; Zheng, M.; Maeda, Y.; Chaya, H.; Hayashi, K.; Mi, P.;

Pittella, F.; Christie, R. J.; Toh, K.; Matsumoto, Y.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K. *ACS Nano* **2014**.

[22] Watanabe, S.; Hayashi, K.; Toh, K.; Kim, H. J.; Liu, X.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Katsushima, K.; Kondo, Y.; Uchida, S.; Ogura, S.; Nomoto, T.; Takemoto, H.; Cabral, H.; Kinoh, H.; Tanaka, H. Y.; Kano, M. R.; Matsumoto, Y.; Fukuhara, H.; Uchida, S.; Nangaku, M.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1894.

[23] Devanand, K.; Selser, J. C. *Macromolecules* **1991**, *24*, 5943-5947.

第3章

核酸化学構造の設計

3.1 緒言

核酸医薬は、化学合成されたオリゴヌクレオチドで、細胞内の DNA から転写された疾患に関連する特定の mRNA と相互作用することでその発現量を制御出来る有望なバイオ医薬である。代表例として、small interfering RNA (siRNA) やアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) がこれまでに臨床で承認されており、現在も様々な遺伝性疾患やがんなどの治療を目的として臨床開発が進められている [1-4]。核酸医薬が標的 mRNA に到達するまでには、細胞外環境におけるヌクレアーゼによる分解や全身投与後の迅速な腎排泄などの様々な障害を超えて、標的の細胞質に到達しなければならない。これらの課題を克服するために、化学修飾核酸やナノ粒子への封入技術がこれまでに開発されてきた [2,3]。特に、これまでに承認あるいは現在臨床開発中の siRNA や ASO のほとんどに化学修飾核酸技術が導入されており、2'-*O*-methoxyethyl (2'-MOE), 2'-*O*-methyl (2'-OMe), 2'-deoxy-2'-fluoro (2'-F), 2'-*O*,4'-*C*-methano-bridged nucleic acid (2',4'-BNA; LNA), ホスホロチオエート (PS)修飾などがこれまでに開発されてきた [5]。これらの化学修飾は、ヌクレアーゼに対する高い分解耐性を付与するだけでなく、標的 RNA との結合を増強する構造も存在する。一方で、オリゴ核酸は化学修飾を導入しても腎排泄の閾値(10 nm 以下) よりも小さいサイズであるために容易に血中から消失してしまい [6,7]、標的組織への送達効率はあまり高くない。そこで、核酸医薬の見かけの大きさを増加させることで腎排泄を回避するため、脂質や高分子材料を用いたナノ粒子化が検討されてきた [2,3,8]。これらのナノ粒子は、脂質や高分子のカチオン性部分を利用して、核酸医薬の細胞内取り込みやエンドソーム脱出を促進することができる。これまでに、siRNA を封

入した脂質ナノ粒子製剤 (LNP) が肝臓を標的とした siRNA 送達キャリアとして承認されており [9], 最近では SARS-CoV-2 に対する mRNA ワクチンとしても LNP が開発中であり, 実用化が進んでいる [10-12].

しかしながら, 従来型の LNP や高分子キャリアでは数十ナノメートル以上のサイズになってしまうことから, 血管透過性の低い連続内皮を持つ筋組織などへの核酸医薬送達に向けては, より小さなサイズの核酸送達キャリアを構築するための新たなアプローチが必要である [13-16]. 我々は, 生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) 鎖とカチオン性ポリアミノ酸である PLys 鎖からなるブロック共重合体 PEG-PLys が, 1 分子の siRNA と最小単位の会合体である“ユニットポリイオンコンプレックス (PIC)”を幅広い濃度域で形成することから, 血中滞留性の高い 10-20 nm の核酸送達キャリアとして着目した [17-19]. 第 2 章において, PLys 重合度を系統的に変化させた bPEG-PLys によるユニット PIC 形成挙動及び安定性を評価した結果, 重合度約 20 の PLys 鎖を持つ分岐型 PEG-PLys (bPEG-PLys) が 1 分子の siRNA の電荷を完全に中和した 2:1 ユニット PIC を形成し, 最も血中安定性が高いことを明らかにした. 一方で, 過剰な bPEG-PLys が存在しないと血中からの消失が早く酵素分解耐性が不十分ではないかと考えられた (図 3-1A,B). また, bPEG-PLys の会合数が多いほど, bPEG-PLys の同時投与によってユニット PIC の血中安定性を向上できることを示した. これらの結果から, 正電荷数の調節がユニット PIC の構造及び血中安定性に大きく影響したことは明らかであり, 負電荷数の設計 (核酸医薬の構造) もユニット PIC の血中動態に大きく影響することが考えられる.

そこで負電荷数が容易に減少しない酵素耐性の高い siRNA をユニット PIC に導入すれば, ユニット PIC の血中安定性をさらに向上し, 過剰に投与する bPEG-PLys の量を減らすことが出来るのではないかと考えた. 酵素耐性の高い化学修飾構造としては, 既に実用化された siRNA であるギボシランなどに導入実績のあるホスホロチオエート (PS)

修飾及びリボースの 2'位修飾である 2'-*O*-methyl (2'-OMe)と 2'-deoxy-2'-fluoro (2'-F)Me 修飾 (F/OMe 修飾) [20]の効果をそれぞれ検証した。さらに酵素分解耐性の高い核酸医薬として知られる ASO を封入したユニット PIC の血中滞留性を向上するべく、ASO の負電荷数を増やして、bPEG-PLys の会合数を増加させる方法論を検証した。具体的には ASO に相補的な RNA をハイブリダイゼーションし、二本鎖核酸とした。これはヘテロ二本鎖核酸 (HDO) と呼ばれる構造で [21], 相補鎖に様々な標的指向性リガンドを導入することで ASO の活性を大幅に増強できる核酸である。以上のように、PIC に封入する核酸分子の負電荷数を制御することで(図 3-1C), より血中安定性の高いユニット PIC の構築を試みた。

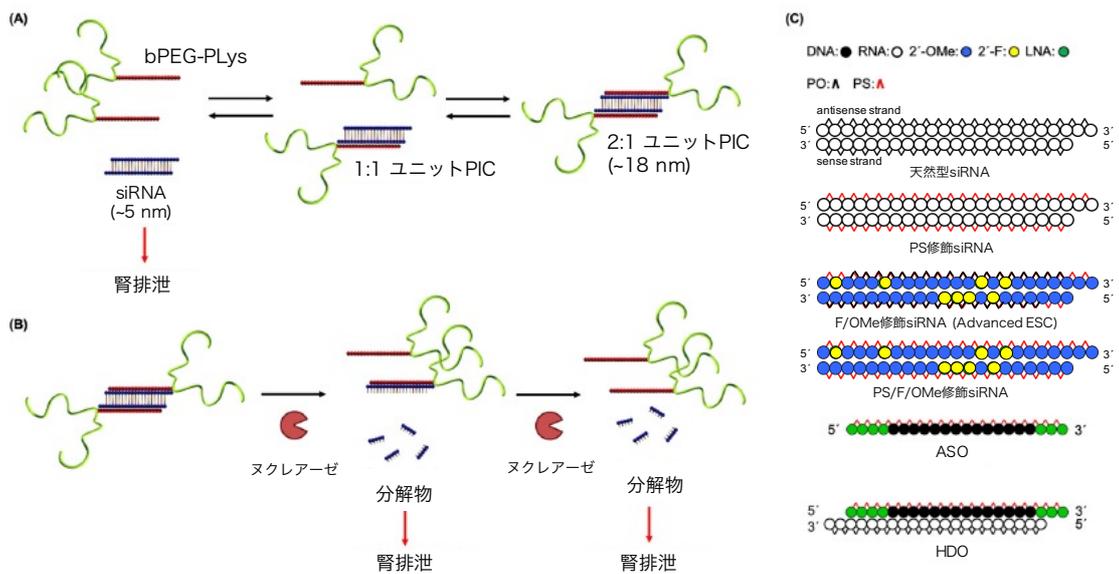


図 3-1. 化学修飾核酸封入ユニット PIC の設計

3.2 実験方法

材料

bPEG-PLys (各PEG鎖の分子量は40,000でPLys重合度は19) は第2章にて合成したポリマーを使用した。ジメチルスルホキシド (DMSO), トリエチルアミン (TEA), 塩化ナト

リウム (NaCl), グリセリン, D-PBS(-), ヘパリンナトリウム, デキストラン硫酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬 (大阪, 日本) より購入した. Alexa Fluor 488 NHS Ester (A488-NHS), 1× PBS (pH 7.4), PBS-T (10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.5), NuPAGE 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Gel, MES SDS Running BufferはThermo Fisher Scientific (Novi, MI, USA)より購入した. リボヌクレアーゼA (RNase A) はSigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)より購入した. 滅菌済みHEPES緩衝液 (1 M, pH 7.3) はAmresco (Solon, OH, USA)より購入した. 蛍光標識していないオリゴ核酸は北海道システムサイエンス (北海道, 日本) より購入した. Alexa Fluor 647 (A647) 標識されたオリゴ核酸はジーンデザイン (大阪, 日本) より購入した. アガロース (Agarose L03あるいはPrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS) はタカラバイオ (滋賀, 日本) より購入した. Tris(hydroxymethyl)aminoethane/boronic acid/ethylenediamine-*N,N,N'*-tetraacetic acid (TBE) 緩衝液はBio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)より購入した. BALB/cマウス (雄) の血漿はInnovative Research (Westbury, NY, USA)より購入した. Cy5はBroadPharm (San Diego, CA, USA)より購入した. 塩化マグネシウム水溶液 (1 M MgCl₂)は, ニッポンジー (東京, 日本) より購入した.

核酸化学構造の設計

ポロ様キナーゼ1 (PLK1) を標的とする siRNA を設計し, 同一配列で異なる化学修飾を導入した4つの siRNA を購入した. 天然型 siRNA は sense 鎖: 5'-GAA GAU CAC CCU CCU UAA AUA-3', antisense 鎖: 5'-UAU UUA AGG AGG GUG AUC UUC UU-3'の配列および構造, PS 修飾 siRNA は sense 鎖: 5'-G[^]A[^]A[^]G[^]A[^]U[^]C[^]A[^]C[^]C[^]U[^]C[^]C[^]U[^]U[^]A[^]A[^]A[^]U[^]A-3', antisense 鎖: 5'-U[^]A[^]U[^]U[^]U[^]A[^]A[^]G[^]G[^]A[^]G[^]G[^]U[^]G[^]A[^]U[^]C[^]U[^]U[^]C[^]U[^]U-3'の配列および構造, F/OMe 修飾 siRNA は sense 鎖: 5'-G[^]A[^]AGAUCacccUCCUAAAAUA-3', antisense 鎖: 5'-U[^]a[^]UUUaAGGAGGGuGaUCUUC[^]U[^]U-3'の配列および構造, PS/F/OMe 修飾 siRNA は

sense 鎖：5'-GAAGAUcAcccUCCUUAAAUA-3' , antisense 鎖：5'-UaUUUaAGGAGGGGuGaUCUUCUU-3'の配列および構造とした。また、ASO および cRNA は、taurine-upregulated gene 1 (TUG1) 長鎖ノンコーディング RNA を標的として設計し、配列と構造はそれぞれ ASO (5'-*T*GAAtttcaatcatttgaGAT-3')、cRNA (5'-CUCAAAUGAUUGAAAUUCAUU-3')とした。ここで、大文字と小文字のアルファベットはそれぞれ天然型の RNA と DNA を示し、下線付き大文字と小文字はそれぞれ 2'-OMe, 2'-F 修飾 RNA, 斜体の大文字は LNA を示している。また、(^)は PS 修飾を示している (図 3-2)。A647 標識は siRNA の sense 鎖の 5'末端と ASO の 3'末端に導入した。これらの構造は、図 3-1 に模式図として示した。

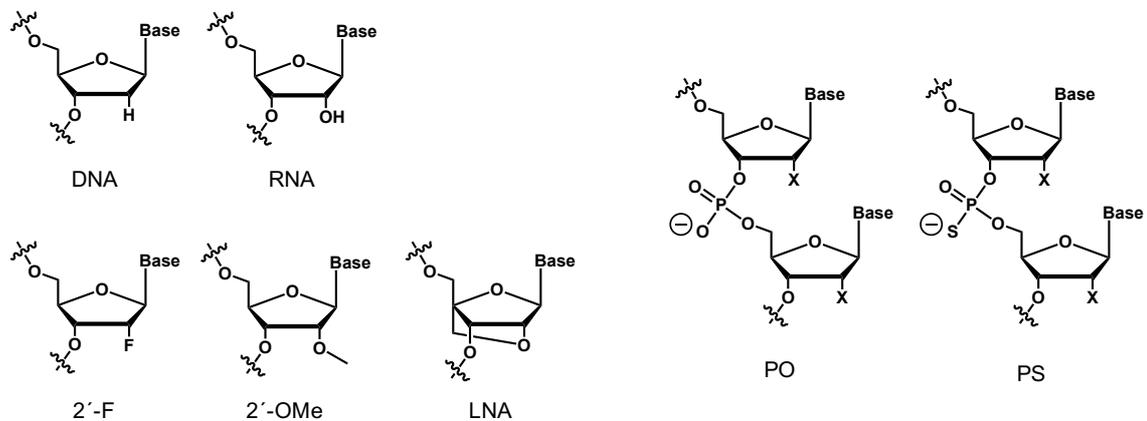


図 3-2. 天然型及び修飾核酸の化学構造。

2 分岐型 poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine)の合成

bPEG-PLys (各 PEG 鎖の分子量は 40,000 で PLys 重合度は 19) は第 2 章にて合成したポリマーを使用した。A488 標識した bPEG-PLys (bPEG-PLys-A488)は、A488-NHS を用いて合成した。まず 10 mg/mL の bPEG-PLys の DMSO 溶液を調製し、PLys 側鎖のアミノ基に対して 2 当量の TEA と A488-NHS を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を 1 M NaCl aq.で希釈して限外ろ過 (Vivaspin 6, MWCO: 10 kDa, GE Healthcare) 精製

した後、1 M NaCl aq.で置換した PD-10 カラム (GE Healthcare Ltd., UK) にてゲルろ過精製した。さらに、ろ液を超純水で希釈して限外ろ過を繰り返して NaCl を除去し、凍結乾燥して bPEG-PLys-A488 を得た。

化学修飾核酸封入ポリイオンコンプレックスの調製

オリゴ核酸と bPEG-PLys を、それぞれ 60 μ M と 40 mg/mL となるように 10 mM HEPES buffer (pH 7.3)で溶解し、様々な混合比 (Lys 側鎖のアミノ基 (N)と核酸のリン酸基 (P)のモル比 : N/P 比) となるように bPEG-PLys 溶液濃度を調製しながら核酸と 5:1 の体積比で混合し、PIC を調製した。

アガロースゲル電気泳動

bPEG-PLys と A647 標識されたオリゴ核酸を N/P = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 で混合して調製した PIC を 10%グリセリン水溶液で 10 倍希釈した。アガロースゲル (5%, 1 \times TBE) に 5 μ L ずつアプライし、100 V で 20 分間電気泳動した。A647 標識核酸由来のバンドを Ettan DIGE 蛍光イメージャー (GE Healthcare) にて検出した。

流動場分離法

流動場分離法 (FFF)は、Eclipse channel LC (350 μ m wide spacer, a Nadir cellulose membrane (10 kDa Low molecular weight cutoff))を搭載した Eclipse 3+ separation system (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) を用いて実施した。siRNA あるいは siRNA 封入 PIC (10 μ M siRNA, 20 μ L)は Agilent 1200 series isocratic pump を用いて注入し、1 \times PBS (pH 7.4)で溶出した。Channel-flow rate は 1 mL/min で固定し、cross-flow (CRF) rate は 3 mL/min から指数関数的に減少させた ($V_{CRF} = 3 \times \exp(-0.250 \times t)$, $t_0 = 5$ min)。260 nm の吸光度は Agilent 1200 series variable wavelength detectors にて検出した。

蛍光相関分光法

PIC の流体力学直径 (D_H)と siRNA の会合数 (AN_{siRNA})は、He-Ne 共焦点レーザー ($\lambda = 633$ nm)を搭載した分子間相互作用解析システム MF20 (オリンパス, 東京, 日本) を用

いて測定した。A647 標識オリゴ核酸と bPEG-PLys より調製した PIC を PBS-T で希釈し、A647-siRNA, A647-ASO, A647-HDO 濃度がそれぞれ 1, 20, 10 nM となるように調整した。希釈した溶液は室温で 20 秒測定を 5 回繰り返した。得られた拡散時間は Cy5 の拡散係数 ($D_c = 360 \mu\text{m}^2/\text{s}$) を基準として、以下のストークス-アインシュタイン則により流体力学直径へと変換した。

$$D_H = k_B T / 3\pi\eta D_c$$

ここで k_B はボルツマン定数, T は測定温度, η は溶液の粘度を表す。共焦点領域中に検出された蛍光分子数 (N) を用いて、以下の式からオリゴ核酸の会合数を算出した。

$$AN = N_{\text{核酸のみ}} / N_{\text{PIC}}$$

ここで $N_{\text{核酸のみ}}$ は bPEG-PLys を含まないオリゴ核酸のみの場合の A647 標識核酸分子数であり、 N_{PIC} は PIC 水溶液中の A647 標識核酸分子数である。

また、同様の条件下で、ユニット PIC 中の bPEG-PLys-A488 の会合数を、PIC 試料中の蛍光分子数と A488-bPEG-PLys のみの蛍光分子数により測定した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した ($n = 5$)。

マウス血漿および RNase A 溶液中のオリゴ核酸安定性評価

10 μM で調製した A647 標識オリゴ核酸をマウス血漿 ($v/v = 1/1$) と混合し、37 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした。その後 0.1 mg/mL のヘパリンナトリウムを含む PBS-T で 250 倍希釈し、直ちに MES SDS Running buffer 中で 4%–12% Bis-Tris SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動 (150 V, 40 min) を行った。ゲル上の A647 由来蛍光シグナルは Ettan DIGE 蛍光イメージャーを用いて検出した。

A647-siRNA またはその siRNA を封入したユニット PIC (最終 siRNA 濃度: 10 μM) を、RNase A 溶液 (10 mg/mL, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) で 10 倍希釈した。37 $^\circ\text{C}$ で任意の時間静置した後、この溶液と 100 mM MgCl_2 溶液と 50 mg/mL のデキストラン硫酸ナトリウム溶液を 1:5:10 の体積比で混合し、アガロースゲル (5%, 1 \times TBE) にアプライして、

100 V で 20 分間電気泳動に供した。ゲル上の A647 由来蛍光シグナルは、Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて検出した。得られた画像から分解されていないオリゴ核酸の量を ImageJ 1.52p (NIH) [22] を用いて定量した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 3)。

さらに、RNase A と静置後のユニット PIC の安定性を評価するため、流体力学的直径を FCS により測定した。10 μ M siRNA となるように調整した A647-siRNA とそれらの PIC を RNase A 水溶液 (10 mg/mL, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) と 1:9 の体積比で混合し、37 °C でインキュベートした。その後、10 mM MgCl₂ を含む PBS-T で 100 倍希釈し、上述の条件と同様に FCS 測定した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 5)。

生体内共焦点顕微鏡観察による連続的な血中滞留性評価

本実験は、ナノ医療イノベーションセンター (川崎, 日本) の倫理委員会の承認を受けた後、当該施設の倫理規定に準拠して実施した。BALB/c マウス (6–8 週齢, 雌) を日本チャールス・リバー (横浜, 日本) より購入した。ダイオードレーザー (λ = 640nm) と 700/75 nm バンドパスフィルターを搭載した Nikon A1R IV-CLSM システム (ニコン, 東京, 日本) を用いて A647 標識オリゴ核酸を封入したユニット PIC の血中滞留性を評価した。麻酔下のネズミの耳介皮膚血管における A647 由来蛍光強度をユニット PIC の尾静脈投与 10 秒前から連続的に観察した。血管内の A647 由来蛍光強度は Nikon NIS-Elements AR ソフトウェア (ニコン, 東京, 日本) を用いて定量した。得られた蛍光強度は、投与直後の最大蛍光強度により規格化し、相対蛍光強度として示した。

薬物動態解析

本実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、承認された実験計画に基づいて実施した。A647 標識オリゴ核酸または核酸封入ユニット PIC を調製し、1 匹当たり siRNA および HDO の場合には 2 nmol, ASO の場合には 4 nmol を BALB/c マウス (7–9 週齢, 雌) に尾静脈投与した。投与後任意の経過時刻に尾静脈から 5 μ L の血液を採取

した。採取した血液は直ちに 5 μ L のヘパリンナトリウム水溶液 (1000 unit/mL)と混合し、さらに 140 μ L の D-PBS(-)で希釈した。希釈した血液中の A647 の蛍光強度を Spark マルチモードマイクロプレートリーダー (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)にて測定した。測定条件としては 630 nm で励起し、675 nm の強度を測定した。PBS/ヘパリン/血液 = 140/5/5 (v/v/v)中の濃度既知 A647-siRNA あるいは bPEG-PLys-A647 より作成した検量線を用いて、採血した血液中の A647-siRNA, ASO, HDO 濃度を決定した。得られた血中濃度データを元に、Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, St. Louis, MO, USA) を用いてノンコンパートメント解析を実施し、薬物動態パラメータ (全時間の濃度曲線下面積 (AUC_{∞}), 最終消失相の半減期 ($t_{1/2}$), 消失速度 (CL), 分布容積 (V_{ss})) を算出した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した (n = 3)。

溶血試験

本実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、承認された実験計画に基づいて実施した。まず、BALB/c マウス (7-9 週齢, 雌) から採取した血液を D-PBS(-)で 3 回洗浄した (500 g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)。続いて、得られた 1 mL の沈殿物を 600 μ L の D-PBS(-)と混合した。N/P=10 で調製した 20 μ L のユニット PIC (10 μ M siRNA または HDO, 20 μ M ASO) に 180 μ L の血液/D-PBS(-)混合液 (v/v=4/5) を加えて、37 $^{\circ}$ C で 1 または 2 時間静置した。これらのオリゴ核酸の濃度は血中滞留性評価における投与直後の血中濃度と近くなるように設定した。静置後の試料を遠心分離 (500 g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) した後、上清の吸光度を Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。解析にはヘモグロビン測定モードを使用した。得られた値を 100%溶血した時の値で規格化して溶血活性を定量した。血液/D-PBS(-)/純水 = 50/30/120 で混合した溶液を 100%溶血したと仮定した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した (n = 3)。

3.3 実験結果と考察

化学修飾核酸の設計

まず、設計した化学修飾核酸の酵素耐性を比較するため、A647 標識した天然型、PS 修飾、F/OMe 修飾、PS/F/OMe 修飾 siRNA あるいは ASO をマウス血漿と混ぜて 37 °C で静置した後、電気泳動にて安定性を評価した。F/OMe 修飾はアルナイラム社によって開発された Advanced enhanced stabilization chemistry (ESC)構造 [20]に従って設計し、PS/F/OMe 修飾は Advanced ESC に加えて全ての PO 結合を PS 修飾した構造である。Advanced ESC は最近欧米で承認されたギボシラン（急性肝性ポルフィリン症治療薬）やルマシラン（原発性高シュウ酸尿症 I 型治療薬）に導入されており、実用上で非常に期待されている。ASO は、完全に PS 修飾した DNA の両末端に LNA を導入することで、高い酵素耐性と標的 RNA との結合力向上が期待される Gapmer 型とした。これらのオリゴ核酸の中で、天然型 siRNA はマウス血漿中で直ちに分解され、PS 修飾 siRNA は天然型よりも分解は遅かったが、30 分以内にほとんど完全に分解された（図 3-3）。この結果とは対照的に、F/OMe 修飾および PS/F/OMe 修飾 siRNA と ASO はマウス血漿中で 3 時間以上全く分解されなかった。これらの結果より、RNA のリボースの 2'位修飾と DNA の PS 修飾が、血中でのオリゴ核酸安定性を顕著に向上する設計であることが明らかとなった。

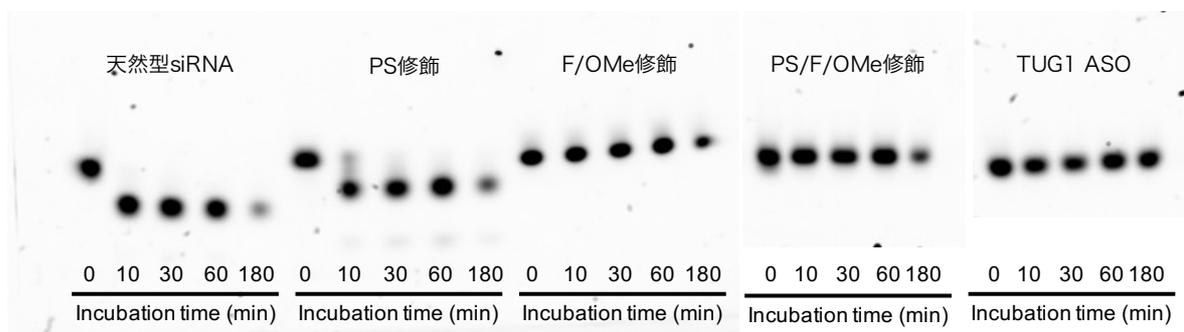


図 3-3. オリゴ核酸のマウス血漿中での安定性評価。

化学修飾 small interfering RNA 封入ユニットポリイオンコンプレックスの調製

これまでに我々は、生体適合性の高い親水性の2分岐型 PEG とカチオン性の PLys からなるブロック共重合体 "bPEG-PLys" が siRNA の血中滞留性を顕著に向上できることを示してきた [18]. この bPEG-PLys は 40 kDa の PEG 2 分子と重合度約 20 の PLys 鎖から構成され、高い血中滞留性を示すと共に 1 分子の siRNA を 2 分子の bPEG-PLys で保護するユニット PIC を形成する. これまで検討されてきたのはほとんど天然型の siRNA であり、化学修飾が導入された siRNA との PIC 形成や、その安定性は明らかとなっていない. そこで、設計した天然型, PS 修飾, F/OMe 修飾, PS/F/OMe 修飾 siRNA と、2 本の PEG 鎖 (40 kDa) および重合度約 20 の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys (40x2-20) から PIC を調製し、その構造を FFF と FCS にて解析した. まず、N/P=0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, あるいは 10 で調製した A647 標識 siRNA 封入 PIC のアガロースゲル電気泳動の結果、いずれの siRNA を用いても N/P=0.5 以上で siRNA のみのバンドが消失したことから、核酸化学構造に関係なく PIC 形成したことが示唆された (図 3-4). この結果から、N/P = 0.5 の時、モル比が bPEG-PLys/siRNA = 1.1 であることから、2:1 ユニット PIC と siRNA の混合状態ではなく、1:1 ユニット PIC を形成しているのではないかと考えた. 実際に、FFF によって得られた UV フラクトグラムから、N/P = 0.5 で調製した PIC は siRNA と比べて明らかに大きな保持時間のピークを示し、PIC に封入されていない siRNA はほとんど存在しなかった (図 3-5). さらに、このピークは N/P = 1.0 で調製した PIC のピーク保持時間よりも小さく、第 2 章で得られた結果と矛盾せず、N/P=0.5 と 1.0 でそれぞれ 1:1 ユニット PIC と 2:1 ユニット PIC が形成されていることが示された.

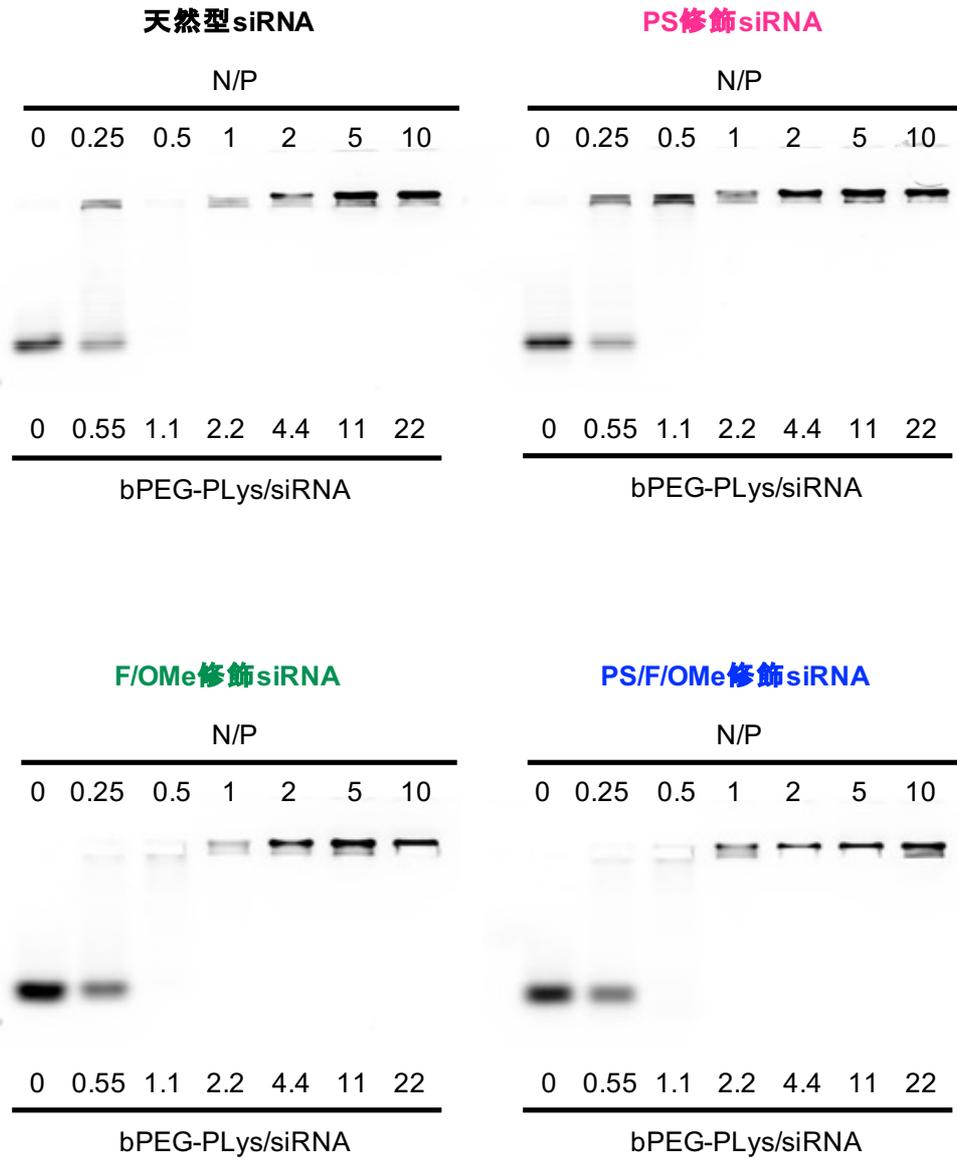


図 3-4. 化学修飾 siRNA 封入 PIC のアガロースゲル電気泳動.

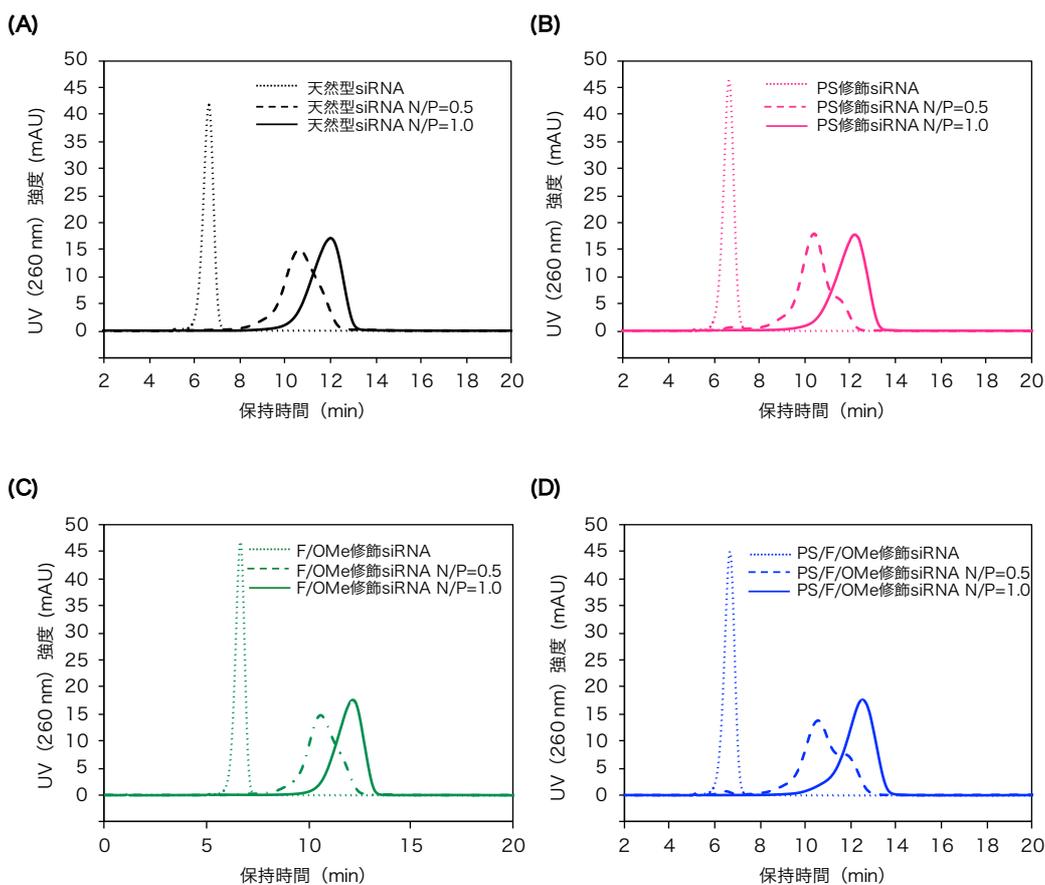


図 3-5. 化学修飾 siRNA 封入 PIC の FFF 測定で得られた UV フラクトグラム。

次に、PIC のサイズを FCS にて測定した (図 3-6)。設計した 4 種類の全ての siRNA で、 $N/P = 0$ から 0.5 にかけて流体力学直径 (D_H) が 5 nm から 17 nm へと増大し、 $N/P = 1.0$ 以上で D_H はプラトーに達し、この時の PIC サイズは約 18 nm 前後であった。さらに、 $N/P = 1.0$ における bPEG-PLys と siRNA の会合数 ($AN_{\text{bPEG-PLys}}$ および AN_{siRNA}) をそれぞれの蛍光標識体を用いて測定したところ、いずれの siRNA においても約 2 分子の bPEG-PLys と約 1 分子の siRNA を封入したユニット PIC が形成されていることが分かった (表 3-1)。これは第 2 章や先行研究 [18] の結果と矛盾しない。また、 $N/P = 1$ 以上における D_H と AN_{siRNA} に変化がなかったことから、ユニット PIC の会合状態に変化が起きておらず、これらの条件では過剰な bPEG-PLys とユニット PIC が平衡状態で共存していることが示唆された。

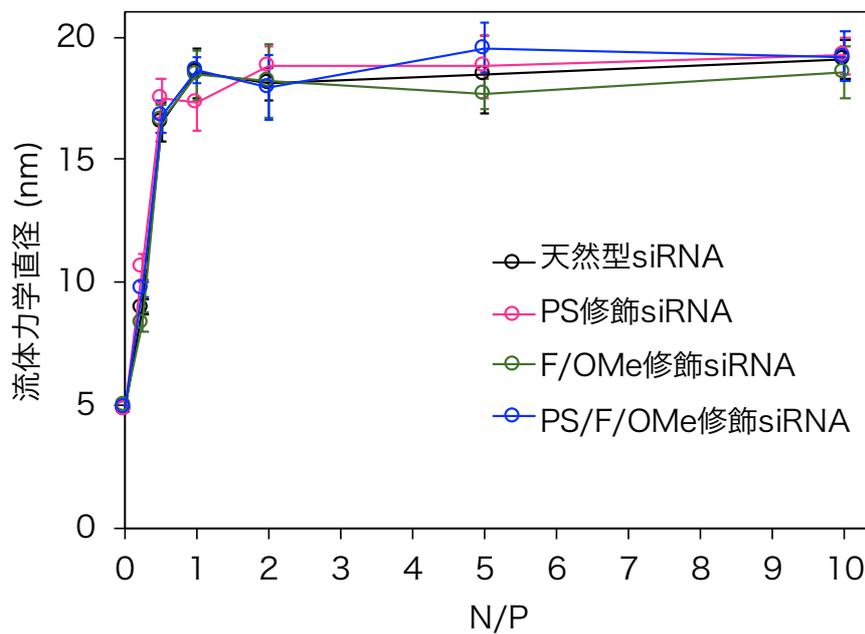


図 3-6. 化学修飾 siRNA 封入 PIC の流体力学直径.

表 3-1. 化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC の構造

核酸構造	流体力学直径 (nm) ^a	AN _b PEG-PLys ^a	AN _{siRNA} ^a
天然型 siRNA	18.5 ± 1.0	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1
PS 修飾 siRNA	17.3 ± 1.1	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1
F/OMe 修飾 siRNA	18.5 ± 1.0	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
PS/F/OMe 修飾 siRNA	18.6 ± 0.5	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1

^a 値は FCS にて測定した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 5).

化学修飾 small interfering RNA 封入ユニットポリイオンコンプレックスの酵素耐性と血中滞留性評価

siRNA の酵素耐性が bPEG-PLys とのユニット PIC 形成に与える影響を明らかにするため、N/P=0, 1, 2, 10 にて調製した 4 種類の siRNA あるいはそのユニット PIC に RNase A を添加し、核酸の酵素耐性とユニット PIC の安定性を評価した。RNase A は、ピリミジン残基を持つリボースの 3'位の PO 結合を切断するエンドリボヌクレアーゼであり、RNA は図 3-7 のように切断されることが知られている [23]。分解にはリボースの 2'位水酸基とリン酸が関与していることから、リボースの 2'位と PS 修飾した siRNA の酵素耐性を評価可能と考えて RNase A を使用した。siRNA あるいはユニット PIC を RNase A と混合して 37℃ にて静置し、10, 30, 60, 180 分後にデキストラン硫酸を添加して PIC から siRNA を放出させ、直ちにゲル電気泳動を実施した。残存 siRNA のバンドを ImageJ にて定量した結果、天然型 siRNA と PS 修飾 siRNA はユニット PIC 形成により酵素分解が抑制され、特に N/P 比が高いほど分解が抑制される傾向にあった (図 3-8)。これは過剰な bPEG-PLys が RNase A と siRNA の接触を抑制しているものと考えられる。また、天然型と PS 修飾 siRNA を比較すると、N/P 比が高いほど残存 siRNA 量が増加していた。これまでに我々は、オリゴ核酸の PS 修飾構造が PO 結合と比較してイオン結合性が高いことを報告しており [24]、PS 修飾 siRNA と bPEG-PLys の結合は天然型 siRNA よりも強いために、N/P 比が高いほど酵素分解が抑制されたと考えられる。一方で、F/OMe 修飾および PS/F/OMe 修飾 siRNA はユニット PIC 形成に関係なく、3 時間以上全く分解が観察されなかった。さらに酵素との接触時間を 100 時間まで延長させても再現性よく全く分解が見られなかった。この結果から、siRNA の RNase A に対する安定性向上にはリボースの 2'位修飾が非常に有望であることが明らかとなった。これは RNase A による分解メカニズムにおいて 2'位水酸基の活性化が非常に重要であることを示している。

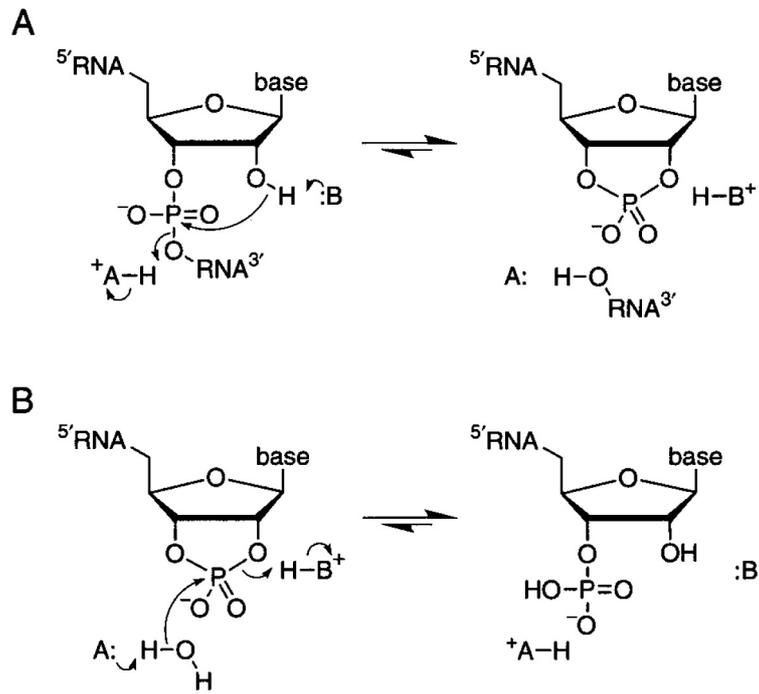


図 3-7. RNase A による RNA の分解機構 [23].

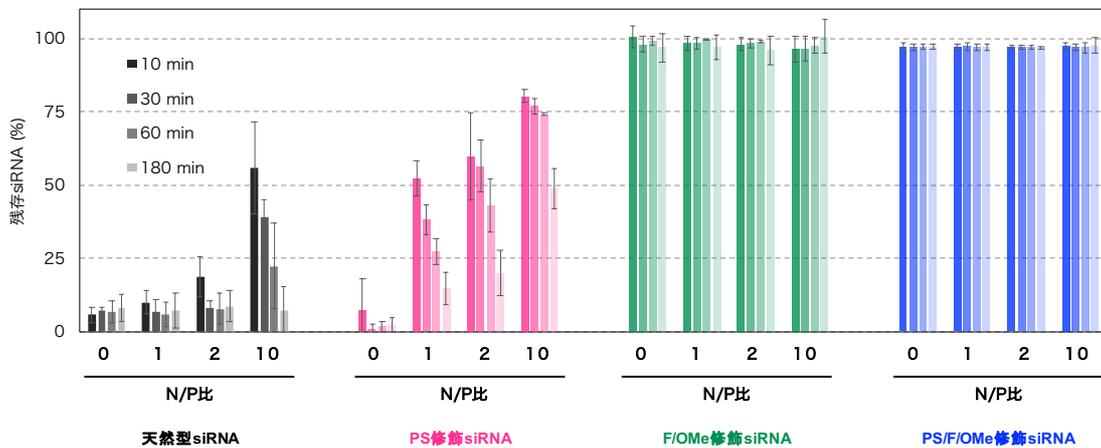


図 3-8. 天然型及び化学修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC を RNase A 分解後の残存 siRNA の定量評価.

次に、RNase A による分解後のユニット PIC の安定性を評価するため、FCS にて D_H の変化を測定した (図 3-9)。5 nm の天然型 siRNA は分解されると 2 nm 程度までサイズが減少したが、天然型 siRNA および PS 修飾 siRNA はユニット PIC に封入することでサイズ減少が抑制され、特に N/P 比が高いほどサイズ減少が抑制される傾向にあった。また、F/OMe 修飾と PS/F/OMe 修飾 siRNA はユニット PIC の有無に関係なくほとんどサイズ変化が見られず電気泳動の結果と矛盾しない結果であった。これらの結果から、bPEG-PLys と siRNA より調製したユニット PIC のヌクレアーゼ存在下での安定性向上には、過剰な bPEG-PLys の添加以上に酵素耐性を持つ化学修飾核酸の導入が有効であることが示された。

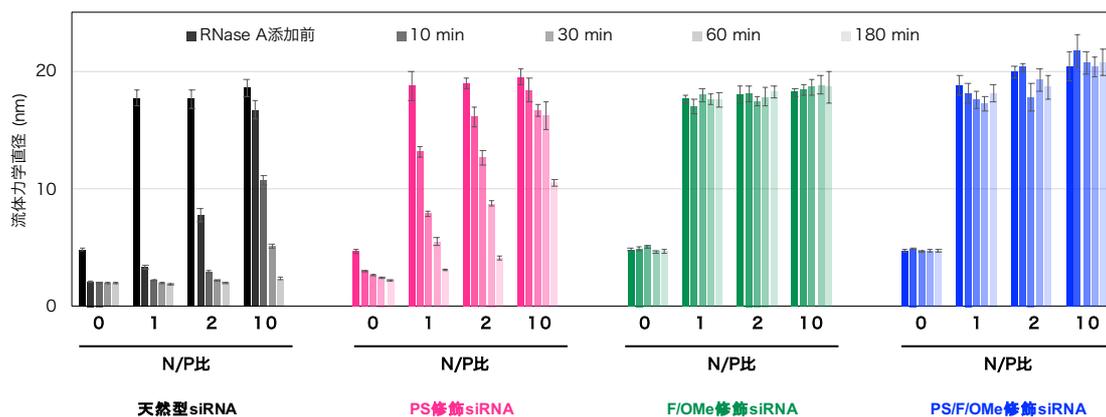


図 3-9. 天然型及び化学修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC を RNase A と混合して 37 °C で静置後の流体力学直径。

さらに siRNA の化学修飾構造 (酵素耐性) がユニット PIC の血中安定性に与える影響を明らかにするため、N/P=0, 1, 10 にて調製した A647-siRNA 封入ユニット PIC をマウスに尾静脈投与し、生体内共焦点顕微鏡を用いて耳介皮膚血管を観察し、連続的に血中滞留性を評価した (図 3-10 A-E)。N/P=1 にて調製したユニット PIC は、siRNA 単体を投与した時と比較して血中滞留性の向上が見られたが、特に PS, F/OMe および PS/F/OMe 修飾 siRNA において顕著な差があった。具体的には、siRNA 単体投与時には

投与後 1 時間程度で 10%以下程度まで蛍光強度が低下し、天然型 siRNA 封入ユニット PIC では投与 3 時間後には 3%未満に蛍光強度が低下した一方で、化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC においては 3 時間後でも 40-50%以上が滞留していた。化学修飾 siRNA 同士を比較すると F/OMe 修飾 siRNA の滞留性が最も高かった。これは、数多くの PS 修飾が導入された核酸は血中タンパクと相互作用し易いことからユニット PIC が血中タンパクによって解離し易い可能性が考えられた。実際、siRNA 単体投与の場合の血中滞留性は PS 修飾が導入されている方が長く、これは血中タンパクとの相互作用によるものと考えられる。また、過剰な bPEG-PLys の存在する N/P = 10 にて調製したユニット PIC を投与した時の血中滞留性はいずれの siRNA を用いてもさらに安定性が向上する結果であった (図 3-10E)。しかし、投与から 8 時間以上経過すると天然型 siRNA 封入ユニット PIC のみ蛍光強度の減少速度が増加しており、これは siRNA の酵素耐性の差ではないかと考えられる。以上の結果から、化学修飾 siRNA はユニット PIC の血中安定性を、特に低い N/P 比において顕著に向上することが明らかとなった。さらに siRNA は 2 本鎖 RNA であることから、この 2 次構造が安定性向上に寄与しているかを検証するため、siRNA の 2 本鎖を 1 本に繋いだ長さ (21+23=44 mer) の 1 本鎖 RNA (ssRNA) を封入したユニット PIC の血中滞留性を評価した。化学修飾としては、siRNA で最も血中滞留性の高かった F/OMe 修飾を導入した。ssRNA 単体投与と比べて N/P = 1 にて調製したユニット PIC は明らかに血中滞留性が向上し、F/OMe 修飾 siRNA 封入ユニット PIC と同等の安定性であった (図 3-10F)。この結果から、ユニット PIC の血中滞留性向上には、核酸の 2 次構造ではなく電荷数が重要であることが示された。

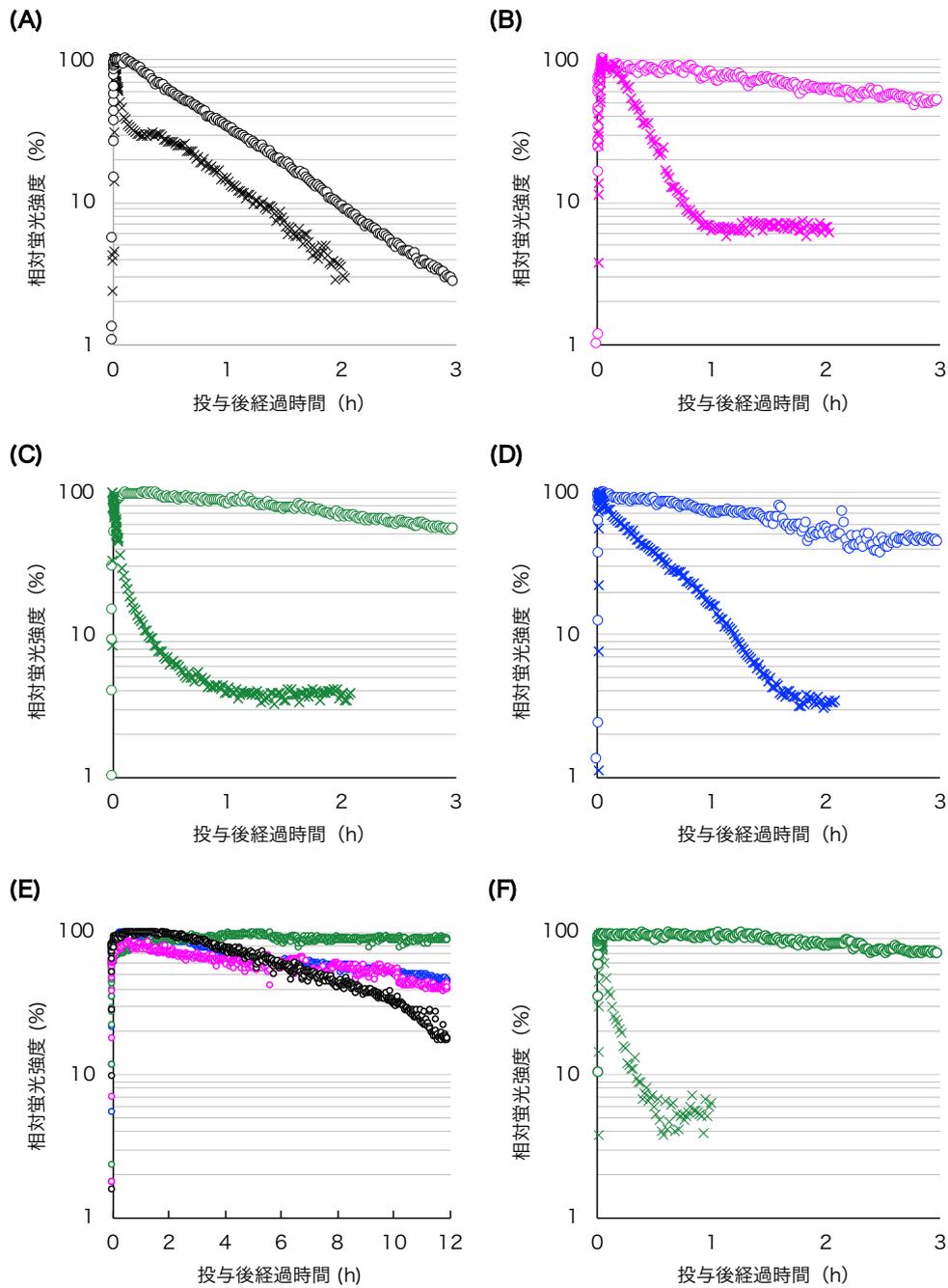


図 3-10. 化学修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC の血中滞留性評価. (A) 天然型 siRNA (×) 及びのユニット PIC (N/P=1, ○) (B) PS 修飾 siRNA (×) 及びのユニット PIC (N/P = 1, ○) (C) F/OMe 修飾 siRNA (×) 及びのユニット PIC (N/P = 1, ○) (D) PS/F/OMe 修飾 siRNA (×) 及びのユニット PIC (N/P = 1, ○) (A) N/P = 10 のユニット PIC. 黒:天然型;マゼンタ:PS 修飾;緑:F/OMe 修飾;青:PS/F/OMe 修飾 (E) F/OMe 修飾 1 本鎖 (44mer) RNA (×) 及びのユニット PIC (N/P = 1, ○)

Small interfering RNA 封入ポリイオンコンプレックスの薬物動態解析

ユニット PIC が血中から消失するまでの詳細な薬物動態を解析するため、静脈投与後の任意の時刻にマウス尾部より採血し、その蛍光強度から A647-siRNA 封入ユニット PIC の血中濃度推移を測定した (図 3-11)。この結果を元に、Phoenix WinNonlin 6.3 を用いてノンコンパートメント解析を実施し、薬物動態 (PK) パラメータを算出した (表 3-2)。siRNA の化学修飾構造の影響を検証するため、天然型 siRNA と PS/F/OMe 修飾 siRNA を比較した。ユニット PIC 形成により、siRNA 単体投与と比較して AUC の顕著な増大、消失速度 (CL) と分布容積 (V_{ss}) の減少が確認され、過剰な bPEG-PLys の存在する N/P = 10 で最終消失相の半減期 ($t_{1/2}$) の増大が見られたが、N/P = 1 においては PS/F/OMe 修飾 siRNA のみで $t_{1/2}$ の増加が見られた。これは、化学修飾による酵素耐性向上が siRNA の電荷数の減少を抑制することでユニット PIC 構造が血中で安定に保たれて消失が遅延し、結果として 7 倍近い AUC の差が生じたと考えられる。

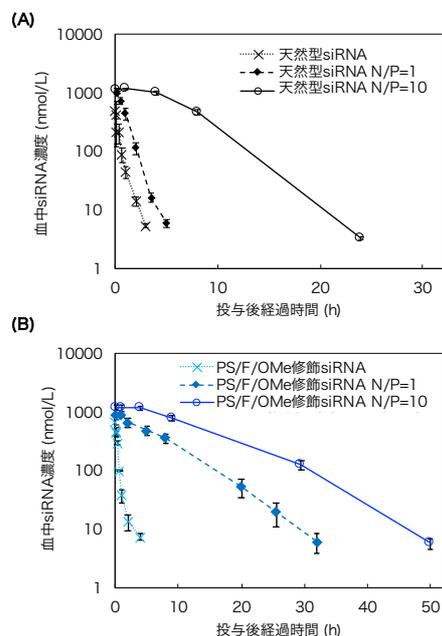


図 3-11. BALB/c マウスに投与した A647-siRNA の血中濃度推移 (2 nmol siRNA/マウス)。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した ($n=3$)。 (A) N/P = 0, 1, 10 にて調製した天然型 siRNA 封入ユニット PIC。 (B) N/P = 0, 1, 10 にて調製した PS/F/OMe 修飾 siRNA 封入ユニット PIC

表 3-2. 化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC の薬物動態パラメータ

	N/P	t _{1/2} (hour)	AUC _∞ (h•nmol/L)	CL (mL/h)	V _{ss} (mL)
天然型 siRNA (N = 42)	0	0.67 ± 0.09	220 ± 74	9.82 ± 3.24	6.42 ± 3.23
	1	0.62 ± 0.02	1,178 ± 185	1.73 ± 0.27	1.40 ± 0.14
	10	2.37 ± 0.06	11,234 ± 613	0.18 ± 0.01	0.88 ± 0.04
PS/F/OMe 修飾 siRNA (N = 42)	0	0.79 ± 0.32	296 ± 30	6.80 ± 0.72	4.50 ± 0.15
	1	4.02 ± 0.16	7,494 ± 1,077	0.27 ± 0.04	1.66 ± 0.11
	10	6.05 ± 0.24	2,0625 ± 2,683	0.10 ± 0.01	0.93 ± 0.09

BALB/c マウスに投与後の血中 siRNA 濃度を A647 由来蛍光強度から測定し、Phoenix WinNonlin 6.3 を用いてノンコンパートメント解析を実施して算出した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 3)。

アンチセンスオリゴヌクレオチドへの適用可能性検討

これまでに siRNA の負電荷数がユニット PIC の血中安定性に強く影響することが明らかとなった。そこで、負電荷数が-20 である ASO とその相補的な配列を持つ RNA とハイブリダイゼーションさせた HDO (負電荷数-40) をユニット PIC に封入し、血中滞留性を比較することで ASO への応用可能性を検討した。bPEG-PLys (40x2-20) と ASO あるいは HDO を様々な N/P 比で混合して PIC を調製し、アガロースゲル電気泳動と FCS にて分析した (図 3-12 および表 3-3)。ASO 単体のバンドが N/P = 1 (bPEG-PLys/ASO = 1.1) にて消失したことを電気泳動にて確認し (図 3-12A), N/P = 1 以上で約 17 nm の 1:1 ユニット PIC を形成し、それ以上添加された bPEG-PLys はユニット PIC と平衡にあることが FCS により示された (図 3-12C および表 3-3)。これは先行研究の結果と矛盾しない [18]。一方で、bPEG-PLys と HDO より調製した PIC においては N/P = 0.5 以上で HDO 単体のバンドが消失し (図 3-12B), N/P = 1 以上にて約 18 nm の 2:1 ユニット PIC が形成されることを示した (図 3-12C, 表 3-3)。その結果、siRNA と同様に HDO を用いることで 2:1 ユニット PIC 調製が出来ることを明らかにした。

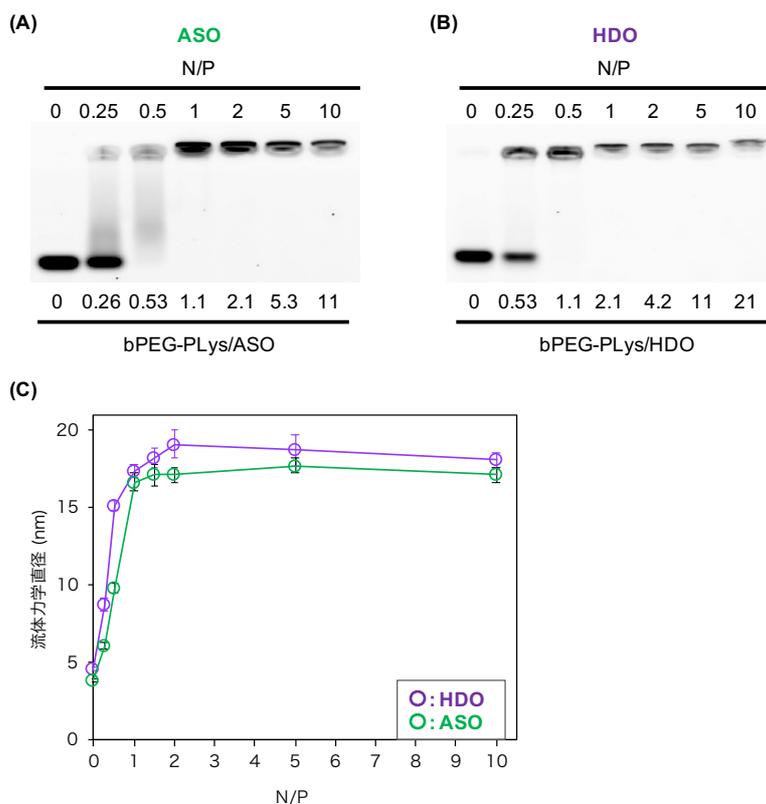


図 3-12. ASO および HDO 封入ユニット PIC の構造解析. (A) ASO 封入 PIC のアガロースゲル電気泳動. (B) HDO 封入 PIC のアガロースゲル電気泳動. (C) FCS にて測定した ASO あるいは HDO 封入 PIC の流体力学直径.

表 3-3. ASO あるいは HDO 封入ユニット PIC の構造

核酸構造	流体力学直径 (nm) ^a	AN _{bPEG-PLys} ^a	AN _{siRNA} ^a
ASO 負電荷数: -20	16.7 ± 0.6	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2
HDO 負電荷数: -40	17.4 ± 0.4	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1

^a値は FCS にて測定した. 結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 5).

ASO および HDO 封入ユニット PIC の血中滞留性比較するため, マウスに尾静脈投与後の耳介皮膚血管の蛍光強度を生体内共焦点顕微鏡にて連続的に測定した (図 3-13).

N/P = 10 にて調製した A647 標識 ASO 封入ユニット PIC は, ASO が高い酵素耐性を持

つにも関わらず、天然型 siRNA 封入ユニット PIC (図 3-10E) よりも低い滞留性を示した。一方で、HDO 封入ユニット PIC は、ASO の半分の投与量 (2 nmol HDO と 4 nmol ASO で、合計リン酸基数は同一) にも関わらず、ASO 封入ユニット PIC よりも高い血中滞留性を示した。これは、ASO は 1 分子の bPEG-PLys と解離してしまうと速やかに排泄されてしまうが、HDO は 2 分子の bPEG-PLys が解離しない限りは腎排泄の閾値よりも大きいサイズを保てるため、1:1 ユニット PIC より 2:1 ユニット PIC の方が血中で高い安定性を示すと考えられる。siRNA においても 2 分子以上の bPEG-PLys を会合したユニット PIC が高い血中安定性を示すことを第 2 章で確認していることから、核酸の種類に関係なく、核酸の負電荷数を制御して bPEG-PLys を 2 分子以上会合させることがユニット PIC の血中安定性向上に重要であることが明らかとなった。

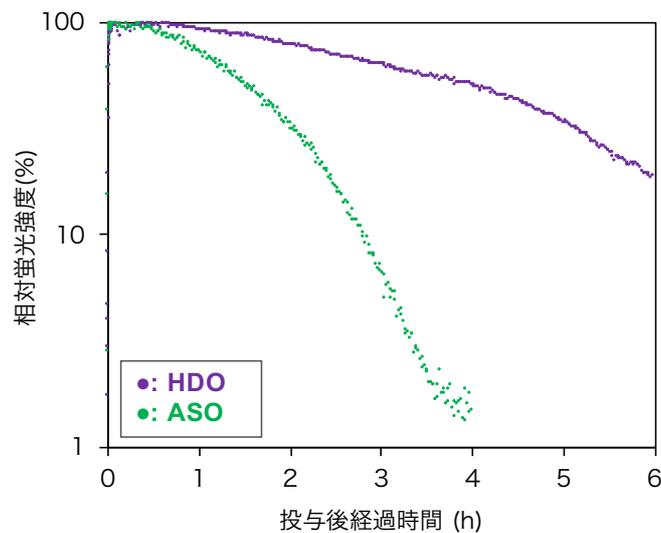


図 3-13. BALB/c マウスに投与した A647-ASO および HDO 封入ユニット PIC (N/P=10) の生体内共焦点顕微鏡観察による血中濃度評価 (4 nmol ASO/マウス, 2 nmol/マウス)。

ASO および HDO 封入ユニット PIC のより詳細な薬物動態解析を実施するため、尾静脈投与後のマウス尾部より経時的に採血し、それぞれの核酸の血中濃度推移を評価し (図 3-14)、Phoenix WinNonlin 6.3 を用いたノンコンパートメント解析により PK パラ

メータを決定した (表 3-4)。その結果, HDO 化により $t_{1/2}$ と AUC_{∞} が 2 倍程度に増加することが明らかとなった。これは, 天然型 RNA 構造のため酵素耐性を持たない cRNA であっても, 負電荷数の増加により bPEG-PLys の会合数を増やすことが出来ればユニット PIC の血中滞留性を顕著に向上出来ることを示している。以上の検討の結果, bPEG-PLys を用いたユニット PIC は siRNA のみならず, ASO においても HDO 化の設計をすることで血中滞留性の高い核酸送達キャリアとして機能する可能性が示された。

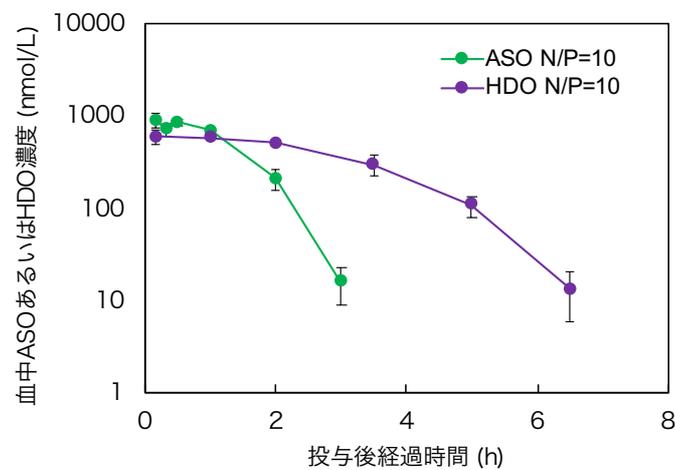


図 3-14. BALB/c マウスに投与した A647-ASO あるいは HDO 封入ユニット PIC の血中濃度推移 (4 nmol ASO/マウス, 2 nmol HDO/マウス)。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 3)。

表 3-4. ASO および HDO 封入ユニット PIC の薬物動態パラメータ

核酸構造	N/P	$t_{1/2}$ (hour)	AUC_{∞} (h·nmol/L)	CL (mL/h)	V_{ss} (mL)
ASO 負電荷数: -20	10	0.41 ± 0.14	1,367 ± 153	2.95 ± 0.33	2.54 ± 0.21
HDO 負電荷数: -40	10	0.86 ± 0.19	2,123 ± 141	0.94 ± 0.06	1.93 ± 0.10

BALB/c マウスに投与後の血中 ASO あるいは HDO 濃度を A647 由来蛍光強度から測定し, Phoenix WinNonlin 6.3 を用いてノンコンパートメント解析を実施して算出した。結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 3)。

化学修飾核酸封入ユニットポリイオンコンプレックスの安全性評価

全身投与されたカチオン性高分子キャリアは、構造や投与量によって赤血球を溶血させるなどの毒性を示す可能性がある。そこで本研究にて用いたユニット PIC (N/P=10) が溶血作用を示すかどうかを、血液と混合した後に溶液中に遊離したヘモグロビン量を測定することで評価した。静脈投与直後と同等の濃度となるようにユニット PIC を血液と混合して 37℃ で 2 時間静置した後、上清の吸光度を測定してヘモグロビン量を算出し、溶血活性へと変換した結果、全てのユニット PIC で溶血活性は 2%未満であり、ほとんど溶血していないことが示された (図 3-15)。これは、bPEG-PLys における分岐型 PEG (40 kDa×2 本) の立体反発効果が非常に大きいことから、赤血球とユニット PIC あるいは bPEG-PLys の相互作用が抑えられたものと考えられる。

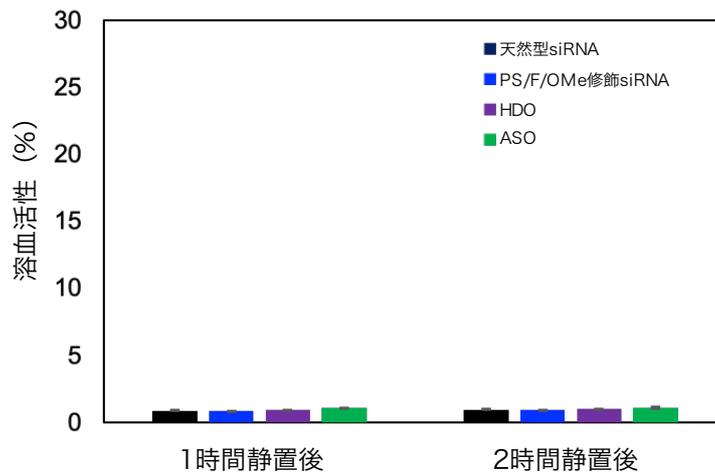


図 3-15. BALB/c マウスの赤血球を使用した溶血試験。

3.4 結論

本研究では、これまで核酸送達キャリアの研究において注目されてこなかった核酸化学構造が核酸封入 PIC に与える影響を評価するため、様々な化学修飾核酸を含む siRNA と 1 分子当たり 40 kDa の PEG 鎖および重合度約 20 の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys よりユニット PIC を調製した。核酸化学構造に関係なく $N/P \geq 1$ にて 2:1 ユニット PIC の形成が確認され、ヌクレアーゼに対するユニット PIC の安定性は過剰な bPEG-PLys の存在あるいは化学修飾核酸によって向上し、特にリボースの 2'位修飾 (2'-F および 2'-OMe) が siRNA の酵素耐性およびユニット PIC の安定性を顕著に向上することを示した。さらに $N/P=1$ にて調製したユニット PIC の血中滞留性は、天然型 siRNA と比較して全ての化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC の方が顕著に高く、化学修飾核酸の導入による siRNA の構造 (あるいは負電荷数) の保持がユニット PIC の血中安定性に寄与することが示唆された。また、酵素耐性の不十分な PS 修飾 siRNA においても、bPEG-PLys との静電相互作用が強いことで高い血中滞留性を示していると考えられた。

ユニット PIC の核酸送達キャリアとしての適用範囲を拡大するため、酵素耐性の高い化学修飾構造を持つ ASO を封入したユニット PIC を調製し、その血中安定性を向上させる方法を検討した。ASO 封入ユニット PIC は酵素耐性のない天然型 siRNA 封入ユニット PIC よりも血中滞留性が低かったが、これはそれぞれ 1:1 ユニット PIC と 2:1 ユニット PIC を形成しており、bPEG-PLys の会合数に差があることが原因と考え、ASO に相補的な RNA と 2 本鎖核酸を形成させた HDO を設計した。HDO 封入ユニット PIC は ASO 封入ユニット PIC よりも顕著に高い血中滞留性を示したことから、核酸の負電荷数を増加させて bPEG-PLys の会合数を増やすことがユニット PIC の血中安定性に寄与することが示唆された。

参考文献

- [1] Lundin, K. E.; Gissberg, O.; Smith, C. I., Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26* (8), 475-485.
- [2] Kaczmarek, J. C.; Kowalski, P. S.; Anderson, D. G., Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med.* **2017**, *9* (1), 60.
- [3] Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S. P., The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (6), 421-446.
- [4] Levin, A. A., Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380* (1), 57-70.
- [5] Khvorova, A.; Watts, J. K., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 238-248.
- [6] Morrissey, D. V.; Lockridge, J. A.; Shaw, L.; Blanchard, K.; Jensen, K.; Breen, W.; Hartsough, K.; Macheimer, L.; Radka, S.; Jadhav, V.; Vaish, N.; Zinnen, S.; Vargeese, C.; Bowman, K.; Shaffer, C. S.; Jeffs, L. B.; Judge, A.; MacLachlan, I.; Polisky, B., Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (8), 1002-1007.
- [7] Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F., Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *87*, 46-51.
- [8] Kim, H. J.; Kim, A.; Miyata, K.; Kataoka, K., Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *104*, 61-77.
- [9] Adams, D.; Gonzalez-Duarte, A.; O'Riordan, W. D.; Yang, C. C.; Ueda, M.; Kristen, A. V.; Tournev, I.; Schmidt, H. H.; Coelho, T.; Berk, J. L.; Lin, K. P.; Vita, G.; Attarian, S.; Plante-Bordeneuve, V.; Mezei, M. M.; Campistol, J. M.; Buades, J.; Brannagan, T. H., 3rd; Kim, B. J.; Oh, J.; Parman, Y.; Sekijima, Y.; Hawkins, P. N.; Solomon, S. D.; Polydefkis, M.; Dyck, P. J.; Gandhi, P. J.; Goyal, S.; Chen, J.; Strahs, A. L.; Nochur, S. V.; Sweetser, M. T.; Garg, P. P.; Vaishnav, A. K.; Gollob, J. A.; Suhr, O. B., Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379* (1), 11-21.
- [10] Polack, F. P.; Thomas, S. J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J. L.; Perez Marc, G.; Moreira, E. D.; Zerbini, C.; Bailey, R.; Swanson, K. A.; Roychoudhury, S.; Koury, K.; Li, P.; Kalina, W. V.; Cooper, D.; Frenck, R.

- W., Jr.; Hammitt, L. L.; Tureci, O.; Nell, H.; Schaefer, A.; Unal, S.; Tresnan, D. B.; Mather, S.; Dormitzer, P. R.; Sahin, U.; Jansen, K. U.; Gruber, W. C.; Group, C. C. T., Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383* (27), 2603-2615.
- [11] Baden, L. R.; El Sahly, H. M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S. A.; Rouphael, N.; Creech, C. B.; McGettigan, J.; Khetan, S.; Segall, N.; Solis, J.; Brosz, A.; Fierro, C.; Schwartz, H.; Neuzil, K.; Corey, L.; Gilbert, P.; Janes, H.; Follmann, D.; Marovich, M.; Mascola, J.; Polakowski, L.; Ledgerwood, J.; Graham, B. S.; Bennett, H.; Pajon, R.; Knightly, C.; Leav, B.; Deng, W.; Zhou, H.; Han, S.; Ivarsson, M.; Miller, J.; Zaks, T.; Group, C. S., Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384* (5), 403-416.
- [12] Wang, Z.; Schmidt, F.; Weisblum, Y.; Muecksch, F.; Barnes, C. O.; Finkin, S.; Schaefer-Babajew, D.; Cipolla, M.; Gaebler, C.; Lieberman, J. A.; Oliveira, T. Y.; Yang, Z.; Abernathy, M. E.; Huey-Tubman, K. E.; Hurley, A.; Turroja, M.; West, K. A.; Gordon, K.; Millard, K. G.; Ramos, V.; Da Silva, J.; Xu, J.; Colbert, R. A.; Patel, R.; Dizon, J.; Unson-O'Brien, C.; Shimeliovich, I.; Gazumyan, A.; Caskey, M.; Bjorkman, P. J.; Casellas, R.; Hatziioannou, T.; Bieniasz, P. D.; Nussenzweig, M. C., mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* **2021**, *592* (7855), 616-622.
- [13] DeRouchey, J.; Schmidt, C.; Walker, G. F.; Koch, C.; Plank, C.; Wagner, E.; Radler, J. O., Monomolecular assembly of siRNA and poly(ethylene glycol)-peptide copolymers. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (2), 724-732.
- [14] Dohmen, C.; Edinger, D.; Frohlich, T.; Schreiner, L.; Lachelt, U.; Troiber, C.; Radler, J.; Hadwiger, P.; Vornlocher, H. P.; Wagner, E., Nanosized multifunctional polyplexes for receptor-mediated siRNA delivery. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 5198-5208.
- [15] Yan, M.; Liang, M.; Wen, J.; Liu, Y.; Lu, Y.; Chen, I. S., Single siRNA nanocapsules for enhanced RNAi delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (33), 13542-13545.
- [16] Kim, H. J.; Yi, Y.; Kim, A.; Miyata, K., Small Delivery Vehicles of siRNA for Enhanced Cancer Targeting. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2377-2390.
- [17] Hayashi, K.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Watanabe, S.; Takemoto, H.; Osada, K.;

- Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K., Influence of RNA Strand Rigidity on Polyion Complex Formation with Block Cationomers. *Macromolecular Rapid Communications* **2016**, *37* (6), 486-493.
- [18] Watanabe, S.; Hayashi, K.; Toh, K.; Kim, H. J.; Liu, X.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Katsushima, K.; Kondo, Y.; Uchida, S.; Ogura, S.; Nomoto, T.; Takemoto, H.; Cabral, H.; Kinoh, H.; Tanaka, H. Y.; Kano, M. R.; Matsumoto, Y.; Fukuhara, H.; Uchida, S.; Nangaku, M.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K., In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationomers to target cancers. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 1894.
- [19] Kim, B. S.; Osawa, S.; Yum, J.; Naito, M.; Miyata, K., Installation of a Thermoswitchable Hydrophobic Domain into a Unimer Polyion Complex for Enhanced Cellular Uptake of siRNA. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31* (5), 1320-1326.
- [20] Foster, D. J.; Brown, C. R.; Shaikh, S.; Trapp, C.; Schlegel, M. K.; Qian, K.; Sehgal, A.; Rajeev, K. G.; Jadhav, V.; Manoharan, M.; Kuchimanchi, S.; Maier, M. A.; Milstein, S., Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Mol. Ther.* **2018**, *26* (3), 708-717.
- [21] Nishina, K.; Piao, W.; Yoshida-Tanaka, K.; Sujino, Y.; Nishina, T.; Yamamoto, T.; Nitta, K.; Yoshioka, K.; Kuwahara, H.; Yasuhara, H.; Baba, T.; Ono, F.; Miyata, K.; Miyake, K.; Seth, P. P.; Low, A.; Yoshida, M.; Bennett, C. F.; Kataoka, K.; Mizusawa, H.; Obika, S.; Yokota, T., DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing. *Nat Commun* **2015**, *6*, 7969.
- [22] W.S. Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, 1997-2018. <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- [23] Raines, R. T., Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (3), 1045-1066.
- [24] Kim, B. S.; Naito, M.; Chaya, H.; Hori, M.; Hayashi, K.; Min, H. S.; Yi, Y.; Kim, H. J.; Nagata, T.; Anraku, Y.; Kishimura, A.; Kataoka, K.; Miyata, K., Noncovalent Stabilization of Vesicular Polyion Complexes with Chemically Modified/Single-Stranded Oligonucleotides and PEG-b-guanidinylated Polypeptides for Intracavity Encapsulation of Effector Enzymes Aimed at Cooperative Gene Knockdown. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (10), 4365-4376.

第 4 章

筋組織への核酸送達キャリアとしての機能評価

4.1 緒言

核酸医薬の現状の最大の課題のひとつとして、肝臓（および排泄経路である腎臓）以外の臓器・組織への集積量が低いことが挙げられ、肝臓以外の臓器（例えば中枢系、心臓、骨格筋、腫瘍など）へ核酸を効率的に送達するシステムの構築が求められている [1-5]。特に、筋ジストロフィーを始めとする筋原性疾患は核酸医薬の大きな標的であり、数多くの臨床開発が進められている [6-9]。しかしながら、核酸医薬単体を投与した時の筋組織への送達効率が非常に低いことが課題となっている [10]。筋組織は全身に分布していることから、全身投与によるアプローチが必須であるが、血流中に暴露された核酸分子は 10 nm 以下であることから速やかに腎排泄されてしまう [11]。全身投与された核酸医薬が筋組織へ送達するまでの生体バリアとしては他に、細網内皮系による代謝と連続血管内皮バリアが想定される。前者は肝臓や脾臓に存在する貪食細胞が主に 100 nm 以上の粒子や異物を代謝する生体防御機構であり、後者は内皮細胞同士が密着結合しており細胞間隙が非常に狭く、高分子物質の透過性が制限されている [12-14]。しかし、筋組織の連続血管内皮の中には 20 nm 程度の小穴の存在が示唆される報告があることや、筋ジストロフィーなどの筋組織で炎症が起きている疾患においては筋組織血管内皮の透過性が亢進していると考えられることから、10–20 nm のサイズに設計された生体適合性に優れた高分子キャリアであれば、上記の生体バリアを回避、あるいは突破して筋組織へと核酸医薬を送達できるのではないかと考えた。

そこで、これまでに構築した血中安定性の非常に高い約 18 nm の化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC の筋組織への核酸送達キャリアとしてのポテンシャルを評価した。化

学修飾核酸としては、第4章にて酵素耐性が非常に高いことが分かった、リボースの2'位を2'-O-methyl (2'-OMe)と2'-deoxy-2'-fluoro (2'-F)Me修飾 (F/OMe修飾)した構造に加えて末端の一部にホスホロチオエート (PS)修飾が導入された siRNA を用いた。これはアルナイラム社によって開発された siRNA 医薬であるギボンランなどに導入されている Advanced enhanced stabilization chemistry (ESC)に含まれる構造であり、臨床上非常に期待できる siRNA の化学構造設計である [15]。この F/OMe 修飾 siRNA を、生体適合性の高い分岐型ポリエチレングリコール (PEG) 鎖とカチオン性ポリアミノ酸である PLys 鎖からなるブロック共重合体 bPEG-PLys と混合し、最小単位の会合体である“ユニットポリイオンコンプレックス (PIC)” [16]を調製し、10-20 nm のサイズに設計された長期血中滞留性を持つ核酸送達キャリアとして筋組織への送達効率を評価した (図4-1)。まず、健常なマウスを用いて筋組織内皮からの漏出を観察した後、siRNA の体内分布及び標的遺伝子発現抑制効果を検証した。続いて、炎症により血管内皮の透過性が亢進していると考えられる筋ジストロフィーモデルマウスを用いて体内分布及び標的遺伝子発現抑制効果を評価し、化学修飾 siRNA 封入ユニット PIC の筋組織への核酸送達キャリアとしての応用可能性を示した。

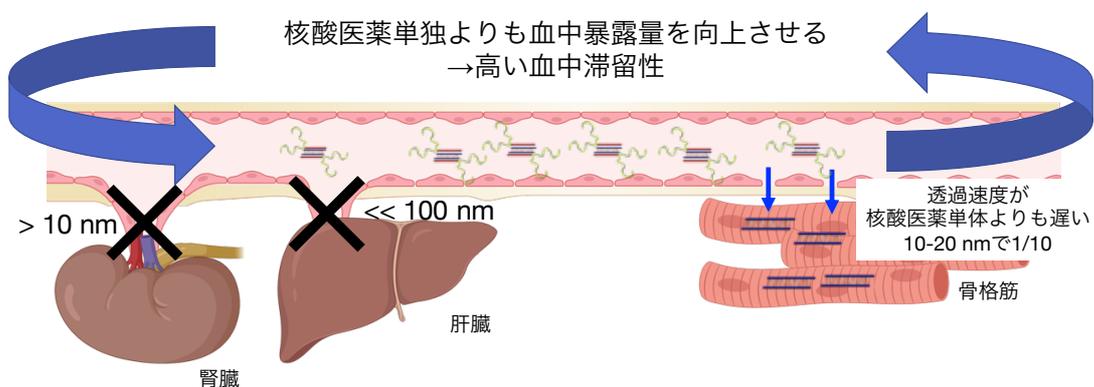


図4-1. 筋組織への核酸送達キャリア構築に向けた必要要件

4.2 実験方法

材料

bPEG-PLys (各PEG鎖の分子量は40,000でPLys重合度は19) は第2章にて合成したポリマーを使用した。ジメチルスルホキシド (DMSO), 塩化ナトリウム (NaCl), グリセリン, ヘパリンナトリウム, デキストラン硫酸ナトリウム, エタノールは富士フィルム和光純薬 (大阪, 日本) より購入した。Alexa Fluor 405 NHS Ester (A405-NHS), 1×PBS (pH 7.4), PBS-T (10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.5), TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNGはThermo Fisher Scientific (Novi, MI, USA)より購入した。炭酸水素ナトリウム緩衝液はSigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)より購入した。化学修飾siRNAとエコノスピнкаラムはジーンデザイン (大阪, 日本) より購入した。マウスのどのmRNAにも特異的でないように設計したScramble siRNAの配列はsense鎖：G[^]G[^]UUAACAcguUUUAGAUCAA, Antisense鎖：U[^]u[^]GAUcUAAAACGuGuUAACC[^]A[^]Gとし、sense鎖の5'末端にAlexa Fluor 647を導入した (A647-siRNA)。Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HRPT) siRNAの配列はsense鎖：U[^]C[^]CUAUgAcugUAGAUUUUAU, Antisense鎖：A[^]u[^]AAAaUCUACAGuCa-UAGGA[^]A[^]Uとした。ここで、下線付き大文字と小文字はそれぞれ2'-OMe, 2'-F修飾RNA, (^)はPS修飾を示している。滅菌済みHEPES緩衝液 (1 M, pH 7.3) はAmresco (Solon, OH, USA)より購入した。アガロース (PrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS) はタカラバイオ (滋賀, 日本) より購入した。Tris(hydroxymethyl)aminoethane/boronic acid/ethylenediamine-N,N,N',-tetraacetic acid (TBE) 緩衝液はBio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)より購入した。Cy5はBroadPharm (San Diego, CA, USA)より購入した。RNAprotect Tissue ReagentとRNeasy Mini KitはQiagen (Venlo, the Netherlands) より購入した。Proteinase KはPromega (Madison, WI, USA) より購入した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Removerは東洋紡 (大阪, 日本) より購入した。FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)は

Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) より購入した。

2 分岐型 poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine)の合成

bPEG-PLys (各 PEG 鎖の分子量は 40,000 で PLys 重合度は 19) は第 2 章にて合成したポリマーを使用した。A405 標識した bPEG-PLys (bPEG-PLys-A405)は、A405-NHS を用いて合成した。bPEG-PLys の 40 mg/mL 溶液を 50 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液にて調製し、DMSO に溶解した A405-NHS (13.4 μ M)を PLys 側鎖のアミノ基に対して 1.6 当量加えて 25 °C で一晩攪拌した。反応混合物を 1 M NaCl aq.で置換した PD-10 カラム (GE Healthcare Ltd., UK) にてゲルろ過精製し、ろ液を超純水で希釈して限外ろ過を繰り返して NaCl を除去し、凍結乾燥して bPEG-PLys-A405 を得た。

Small interfering RNA 封入ポリイオンコンプレックスの調製

bPEG-PLys と siRNA はそれぞれ 10 mM HEPES buffer (pH 7.3)に溶解し、様々な混合比 (Lys 側鎖のアミノ基 (N)と核酸のリン酸基 (P)のモル比 : N/P 比) にて bPEG-PLys と siRNA 溶液を 2/1 = v/v で混合し、siRNA 封入 PIC を調製した。

アガロースゲル電気泳動

bPEG-PLys と A647-siRNA を N/P=0, 0.25, 0.5, 1, 2 で混合して調製した PIC (最終 siRNA 濃度 10 μ M) を 50%グリセリン水溶液と 4/1 の体積比で混合した。アガロースゲル (5%, 1 \times TBE) に 5 μ L ずつアプライし、100 V で 15 分間電気泳動した。A647-siRNA のバンドを Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)にて検出した。

蛍光相関分光法

PIC の流体力学直径 (D_H)と siRNA の会合数 (AN_{siRNA})は、He-Ne 共焦点レーザー ($\lambda = 633$ nm)を搭載した分子間相互作用解析システム MF20 (オリンパス, 東京, 日本) を用いて測定した。A647-siRNA と bPEG-PLys より調製した PIC を 10 nM siRNA となるように PBS-T で希釈し、室温で 20 秒測定を 5 回繰り返した。得られた拡散時間は Cy5 の拡散係数 ($D_c = 360 \mu\text{m}^2/\text{s}$) を基準として、以下のストークス-アインシュタイン則により

流体力学直径へと変換した.

$$D_H = k_B T / 3\pi\eta D_C$$

ここで k_B はボルツマン定数, T は測定温度, η は溶液の粘度を表す. 共焦点領域中に検出された蛍光分子数 (N) を用いて, 以下の式から AN_{siRNA} を算出した.

$$AN_{\text{siRNA}} = N_{\text{siRNA}} / N_{\text{PIC}}$$

ここで N_{siRNA} は bPEG-PLys を含まない siRNA のみの場合の A647-siRNA 分子数であり, N_{PIC} は PIC 水溶液中の A647-siRNA 分子数である. 結果は平均値 \pm 標準偏差で表した ($n = 5$).

流動場分離法

流動場分離法 (FFF)は, Eclipse channel LC (350 μm wide spacer, a Nadir cellulose membrane (10 kDa Low molecular weight cutoff))を搭載した Eclipse 3+ separation system (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) を用いて実施した. siRNA あるいは siRNA 封入 PIC (10 μM siRNA, 10 μL)は Agilent 1200 series isocratic pump を用いて注入し, 1 \times PBS (pH 7.4)で溶出した. Channel-flow rate は 1 mL/min で固定し, cross-flow (CRF) rate は 3 mL/min から指数関数的に減少させた ($V_{\text{CRF}} = 3 \times \exp(-0.177 \times t)$, $t_0 = 5$ min). 260 nm の吸光度は Agilent 1200 series variable wavelength detectors にて検出した.

生体内共焦点顕微鏡観察

本実験はナノ医療イノベーションセンター (川崎, 日本) の倫理委員会での承認を受けた後, 当該施設の倫理規定に準拠して実施した. C57BL/6 マウス (6 週齢, 雄) を日本チャールス・リバー (横浜, 日本) より購入した. bPEG-PLys-A405 と A647-siRNA より調整したユニット PIC (N/P=1) を麻酔下のマウスの尾静脈から投与し, Nikon A1R IV-CLSM システム (ニコン, 東京, 日本) を用いて大腿筋組織周辺を観察した. 測定はユニット PIC の尾静脈投与の 1 分前から開始し, 1 分間隔で連続的に撮影した. Alexa405 の観察には 405 レーザーと 450/50 バンドパスフィルター, Alexa647 の観察には 640 レ

ーザーと 700/75 バンドパスフィルターを用いた。

Stem-loop PCR を用いた組織中 siRNA 量の定量評価

本実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、承認された実験計画に基づいて実施した。F/OMe 修飾 HPRT siRNA とそのユニット PIC を C57BL/6 あるいは C57BL/10-*mdx* マウス (7-8 週齢, 雄)の尾部より静脈注射した (1, 3, あるいは 10 mg siRNA/kg, n = 3)。C57BL/10-*mdx* マウスは日本クレア (東京, 日本) より購入した。投与から 3 日後に麻酔下で放血後、各臓器を摘出し、RNAprotect Tissue Reagent を入れたチューブ内で保管した。臓器の一部 (5-10 mg 程度) を切って秤量し、10 mg/mL となるように 0.25% Triton-X 100 を含む D-PBS(-)を添加した。プローブ式ソニケーターでホモジナイズした後、95 °C で 10 分間加熱した。氷上にて粗熱を除去した後、遠心して上清を回収した。再び 95 °C で 10 分間加熱した後、5 µL の上清と 4°C で静置しておいた 10 µL の TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (100 mM dNTPs 0.15 µL, MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL) 1.0 µL, 10x Reverse Transcription Buffer 1.5 µL, RNase inhibitor (20 U/µL) 0.19 µL, Nuclease-free water 4.16 µL, RT primer (250 nM) 3.0 µL)を混合し、逆転写反応した (反応条件: 16 °C, 30min; 42 °C, 30 min; 85 °C, 5 min)。この時、10 nM siRNA を最大濃度として 0.25% Triton-X 100 を含む D-PBS(-)で 10 倍ずつ段階希釈した濃度既知 siRNA 溶液も同時に逆転写反応し、検量線として使用した。RT primer およびこれ以降使用したプライマーおよびプローブの配列は表 4-1 に記載した。この RT primer はステム-ループ構造を分子内で形成し、ステム部 3'末端の 6 塩基が HPRT siRNA の antisense 鎖の 3'末端側から 6 塩基と相補的になるように設計した。逆転写反応により得られた cDNA を Nuclease-free water で 2 倍希釈し、4 µL の希釈 cDNA に対して、2 µL の 2 µM TaqMan MGB probe, 2 µL の 15 µM SL forward primer, 2 µL の 7 µM SL reverse primer, 10 µL の TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG を加えて定量 PCR を実施した。Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific)

を用いて、95℃で15秒、60℃で60秒を1サイクルとして40サイクルのPCRによる増幅を行い、蛍光シグナルが有意に増加したサイクル数 (Ct) より、siRNA 濃度を決定した。得られた siRNA 濃度から組織中の siRNA 量を算出し、結果は平均値 ± 標準偏差で表した (n = 3)。

定量 PCR を用いた組織中の標的遺伝子発現量の定量評価

本実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、承認された実験計画に基づいて実施した。生理食塩水あるいは F/OMe 修飾 HPRT siRNA とそのユニット PIC を C57BL/6 あるいは C57BL/10-*mdx* マウス (7-8 週齢, 雄)の尾部より静脈注射した (1, 3, あるいは 10 mg siRNA/kg, n=3)。投与から 3 日後に麻酔下で放血後、各臓器を摘出し、RNAprotect Tissue Reagent を入れたチューブ内で保管した。メーカー付属のプロトコルに従い、RNeasy Mini Kit を用いて臓器中の RNA を抽出した。800 μ L の 1% β -メルカプトエタノールを含む Buffer RLT 中に臓器の一部を浸漬し、プローブ式ソニケーターにて氷上でホモジナイズした。遠心した後に回収した 350 μ L の上清に 350 μ L の 70%エタノールを加えた。大腿四頭筋などの線維性組織に関しては、150 μ L の上清に 290 μ L の Nuclease-free water と 10 μ L の Proteinase K を添加し、56℃で10分間静置した。氷冷した後遠心して 400 μ L の上清を回収し、100%エタノールを 200 μ L 加えた。これらのエタノールを含む組織ホモジナイズ液の上清をエコノスピнкаラムに添加し、遠心(8,000 g, 1 min)した。Buffer RWI と Buffer RPE にてそれぞれ 1 回、2 回ずつ洗浄し、完全に溶液を除去した後、30 μ L の Nuclease-free water で RNA を抽出した。抽出した RNA 濃度は Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific)にて測定し、< 500 ng/ μ L となるように Nuclease-free water で希釈して逆転写反応を実施した。RNA 溶液を 65℃で5分間静置した後、2 μ L 回収して ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover の 4 \times DN Master Mix を 4 μ L、Nuclease-free water を 10 μ L 加えて 37℃で5分間静置しゲノム DNA を除去した。続いて 4 μ L の 5 \times RT Master Mix II を加えて逆転写反応 (30℃, 30 min; 50℃, 5 min; 98℃, 5

min; 4 °C, hold) した。得られた cDNA を Nuclease-free water で 2 倍希釈し、4 μL の希釈 cDNA に 0.2 μL ずつの forward および reverse primer (10 μM) と 5.6 μL の Nuclease-free water, 10 μL の FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) を加えてコントロール遺伝子である β-Actin および標的遺伝子である HPRT の定量 PCR を実施した。Applied Biosystems 7500 Fast リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95 °C で 15 秒、60 °C で 60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR による増幅を行い、蛍光シグナルが有意に増加したサイクル数 (Ct) を求め、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて β-Actin に対する HPRT mRNA の相対的な発現量を定量した。生理食塩水を投与したマウスの発現量を 100% として、siRNA あるいはそのユニット PIC を投与したマウスにおける発現量を比較した。結果は平均値 \pm 標準偏差で表した (n = 3)。

表 4-1. プライマーおよびプローブの塩基配列

Primer/Probe	配列
RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACT GGATACGACATTCCT-3'
TaqMan probe	5'-FAM-TGGATACGACATTCCTAT-MGB-3'
SL forward primer	5'-GCGCATAAAATCTACAGTCATA-3'
SL reverse primer	5'-AGTGCAGGGTCCGAG-3'
β-Actin primer 1	5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAG-3'
β-Actin primer 2	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTG-3'
HPRT forward primer	5'-TAACCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'
HPRT reverse primer	5'-CTCCTCAGACCGCTTTTTCG-3'

β-Actin 用を除く全てのプライマーは Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA) より購入した。β-Actin 用プライマーは Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) より購入した。TaqMan probe は Thermo Fisher Scientific (Novi, MI, USA) より購入した。FAM: Fluorescein Amidite, MGB: Minor Groove Binder.

4.3 実験結果と考察

化学修飾 small interfering RNA 封入ユニットポリオンコンプレックスの調製

筋組織への核酸送達キャリアとしてのユニット PIC の機能を評価するため、これまでの結果を踏まえ、最もユニット PIC の血中安定性の高かった 1 本当たり 40 kDa の PEG 鎖と重合度約 20 の PLys 鎖を持つ bPEG-PLys および F/OMe 修飾 siRNA を N/P = 0, 0.25, 0.5, 1, 2 となるように混合して PIC を調製した。この siRNA 配列はいずれのマウス RNA にも結合しない Scramble 配列とした。アガロースゲル電気泳動の結果より、第 2, 3 章と同様に N/P = 0.5 以上にて siRNA 単体のバンドが消失したことから PIC 形成が示唆された (図 4-2A)。また、FFF の UV フラクトグラムより N/P = 0.5 にて siRNA 単体のピークはほとんど消失して保持時間が約 12.4 分の単峰性ピークを示したことから PIC 形成が認められ、bPEG-PLys の保持時間 (約 13 分) と同等であったことから (図 4-2C) 1:1 ユニット PIC 形成が示唆された。また、N/P = 1 以上においては N/P = 0.5 よりも保持時間の大きい一定の単一ピークを示したことから、N/P=1 以上において 2:1 ユニット PIC が形成され、過剰な bPEG-PLys はフリーポリマーとして存在することが示唆された (図 4-2B)。さらに FCS にて流体力学直径 (D_H) と siRNA の会合数 (AN_{siRNA}) を測定した結果、確かに 1 分子の siRNA を含む約 18 nm のユニット PIC が形成されていることを確認した (図 4-2D)。

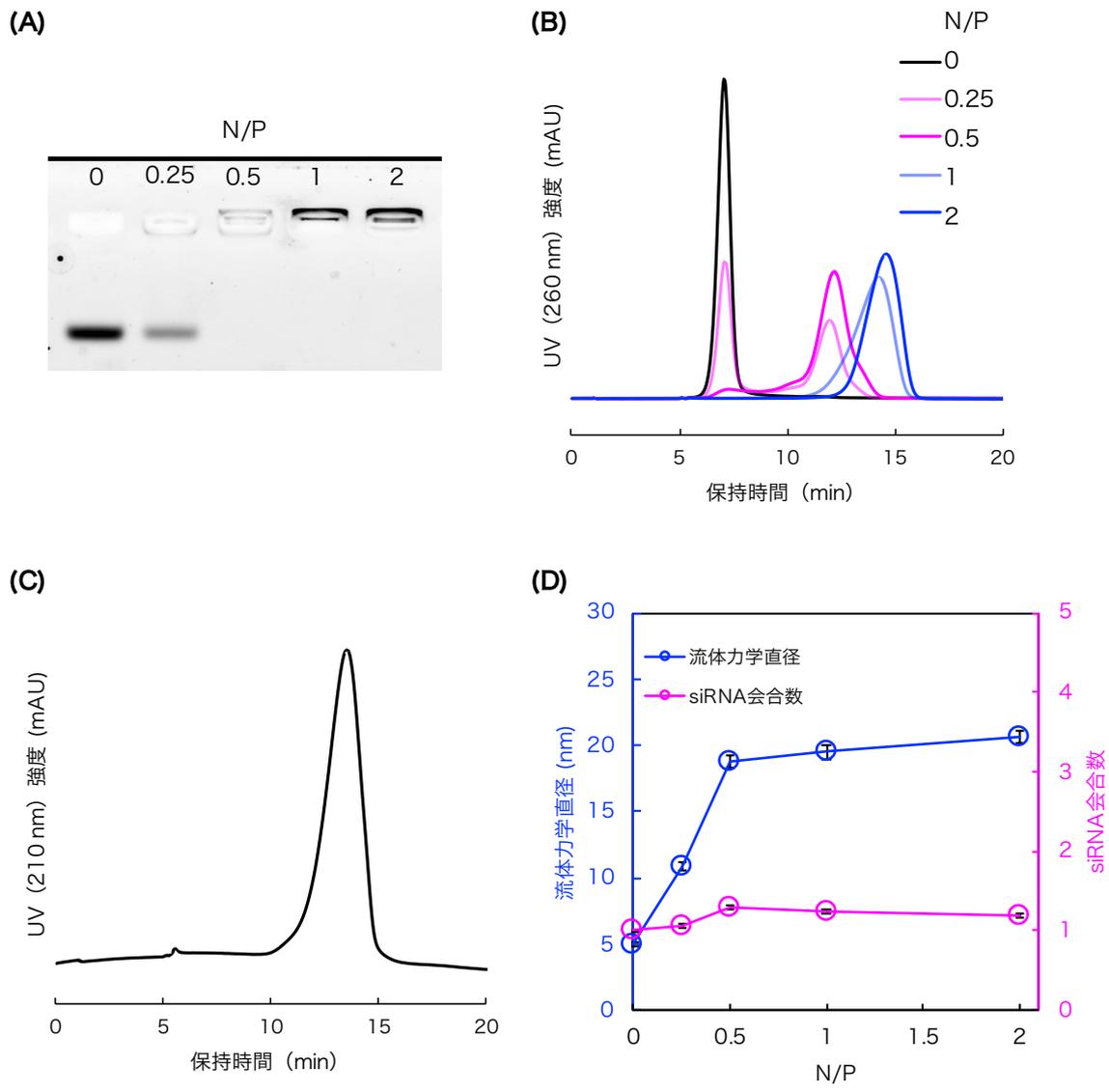


図 4-2. F/OMe 修飾 siRNA 封入ユニット PIC の構造解析 (A) アガロースゲル電気泳動, (B) FFF 測定による siRNA 及びユニット PIC の UV フラクトグラム, (C) FFF 測定による bPEG-PLys の UV フラクトグラム, (D) FCS 測定により測定された siRNA 封入ユニット PIC の流体力学直径と siRNA 会合数.

化学修飾 small interfering RNA 封入ユニットポリイオンコンプレックスの正常マウスにおける体内動態および薬効評価

ユニット PIC による筋組織への siRNA 送達が起こる様子を生体内共焦点顕微鏡にて観察するため、A405 にて標識した bPEG-PLys と A647-siRNA より N/P = 1 のユニット PIC を調製した。マウス尾静脈投与後の大腿筋組織血管を連続的に観察した結果、投与直後から 1 時間後までは毛細血管中を流れる siRNA が明瞭に観察された (図 4-3A,B)。2 時間経過後において徐々に siRNA 由来の蛍光が血管外にて粒状に確認され始め、同時に筋繊維に沿って bPEG-PLys が検出され始めた (図 4-3C)。5 時間経過すると毛細血管中よりも血管外に顆粒状に分布した siRNA が目立つようになり、bPEG-PLys が筋繊維方向に分布している様子もはっきりしてきた (図 4-3D)。最終的に bPEG-PLys 由来の蛍光が筋繊維に沿って明瞭に観測され、siRNA は毛細血管中には観測されず、顆粒状に分布していたことから (図 4-3E)、血管から漏出した siRNA と bPEG-PLys はそれぞれ骨格筋の異なる領域へと分布したことを確認した。ユニット PIC が血管から漏出する詳細な経路および PIC の解離が起こる場所の解明は今後の検討課題であるが、この結果はユニット PIC が筋組織へ siRNA を送達できることを明らかにするものである。

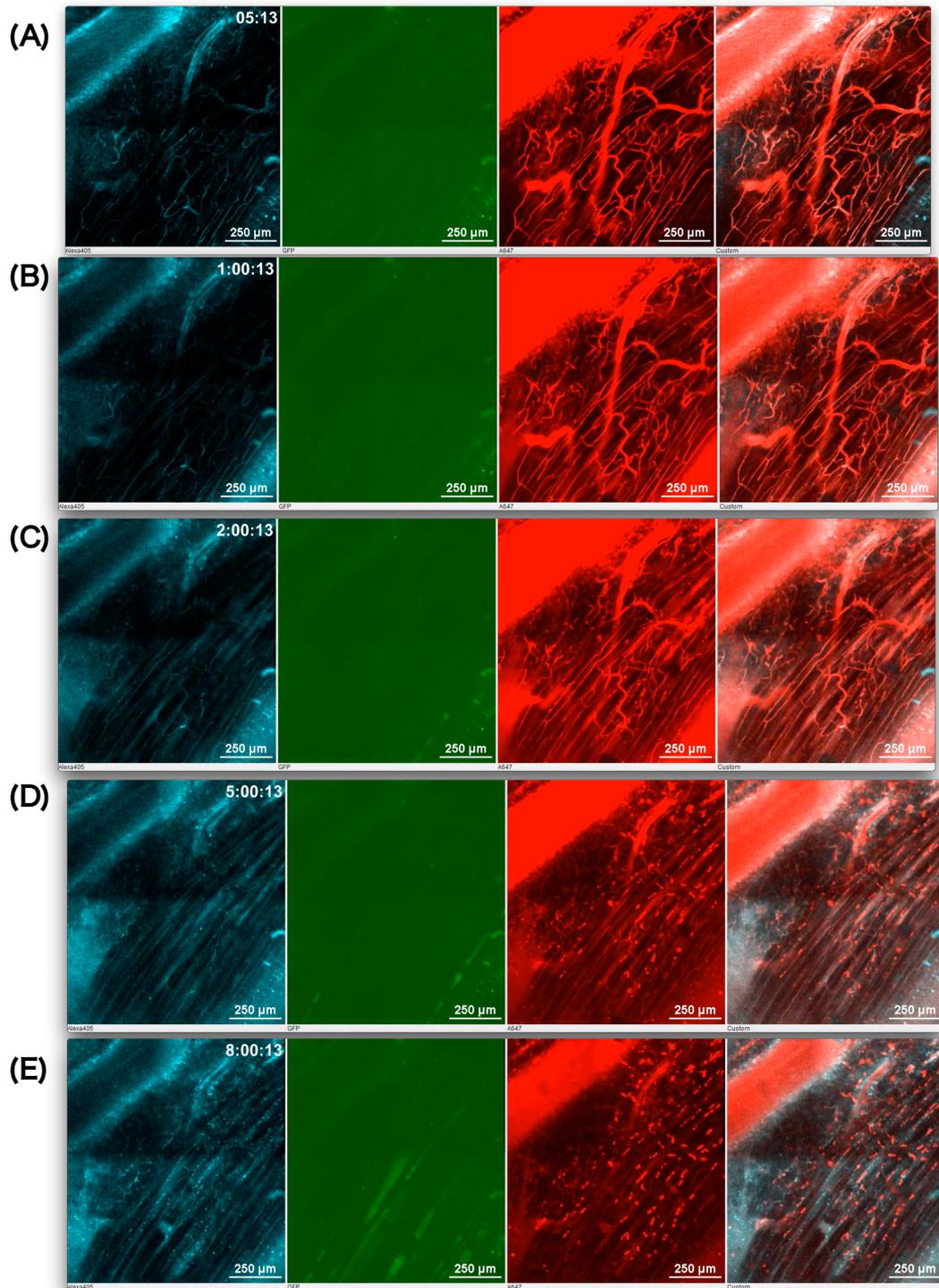


図 4-3. F/OMe 修飾 siRNA 封入ユニット PIC 投与後の筋組織血管の生体内共焦点顕微鏡観察. A405 と A647 はそれぞれ bPEG-PLys と siRNA の蛍光を示している. 左から A405, 筋組織の自家蛍光, A647, A405 と A647 の重ね合わせ. (A) 投与 5 分後, (B) 投与 1 時間後, (C) 投与 2 時間後, (D) 投与 5 時間後, (E) 投与 8 時間後.

筋組織へと送達される siRNA 量がユニット PIC を用いることで増加することを検証するため、組織中の siRNA 集積量を定量的に評価した。siRNA の配列には、全身の幅広い臓器で発現しているハウスキーピング遺伝子のひとつである HPRT を標的とする siRNA を設計した。siRNA 単体あるいは N/P = 1 にて調製したユニット PIC を 1, 3, 10 mg siRNA/kg で投与し、3 日後の各臓器中の siRNA 量を stem-loop PCR によって定量したところ、大腿四頭筋および心臓において、10 mg/kg の投与時にユニット PIC 投与群は siRNA 単体投与群と比較してそれぞれ約 2 倍と 5 倍量の siRNA が集積していた (図 4-4)。これらの結果から、ユニット PIC は長い血中滞留性を持ち、徐々に血管を透過することで siRNA 単体よりも効率よく骨格筋および心筋へと送達していることが示唆された。4-4 肝臓における集積量も約 7 倍になっていたが、核酸-脂質コンジュゲートの報告では少なくとも 10 倍以上に増加していたことから [17]、実験条件は異なるために単純比較できないものの、ユニット PIC の安全性がより優れている可能性を示した。

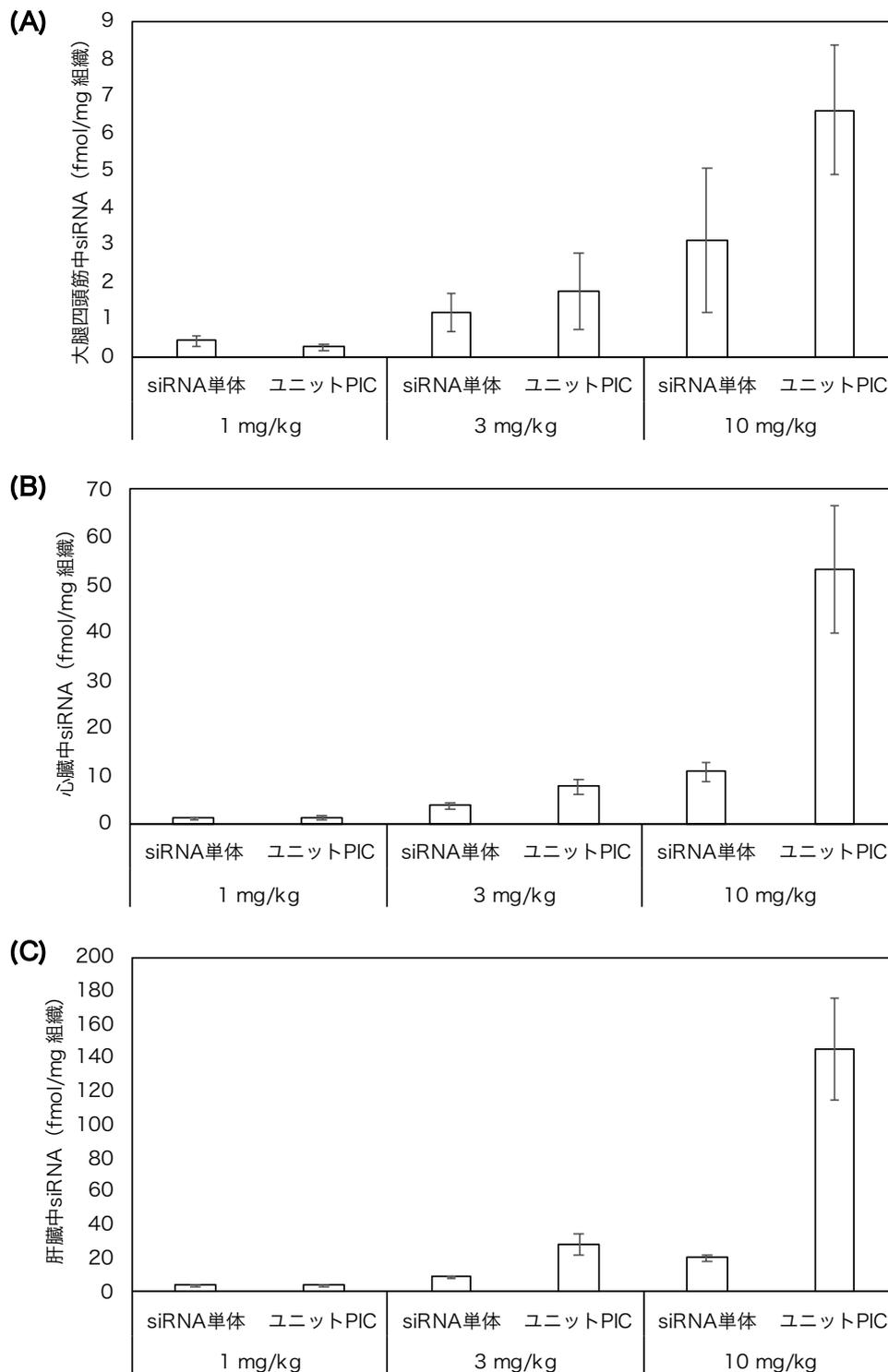


図 4-4. C57BL/6 マウスに投与した F/OMe 修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC (N/P=1) の大腿四頭筋, 心臓, 肝臓中の siRNA 集積量. Stem-loop PCR によって濃度既知 siRNA の検量線を元に定量した.

筋組織へと送達された siRNA が核酸医薬として機能を発揮することを確認するため、生理食塩水投与群に対して siRNA 単体、ユニット PIC (N/P = 1) 投与群が各組織中で HPRT 発現量を低下させたかどうかを検証した。各臓器中の β -Actin に対する HPRT 発現量を定量 PCR にて測定した結果、心臓において 10 mg/kg のユニット PIC 投与群でのみ HPRT の発現量の有意な低下が認められた (図 4-5)。大腿四頭筋においても減少傾向が確認された。一方で他の臓器においては HPRT の発現抑制が見られなかった。この結果は、筋組織 (心筋、骨格筋) のみで核酸医薬としての機能が発揮されることを示唆するものであり、筋組織への核酸送達キャリアとして有望であることが示された。

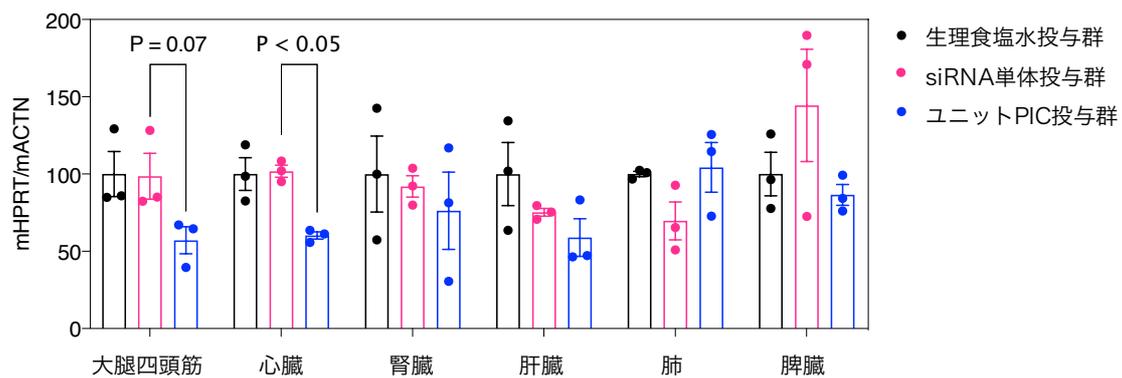


図 4-5. C57BL/6 マウスに F/OMe 修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC (N/P = 1) 投与した 3 日後の各臓器中の HPRT mRNA の相対発現量。定量 PCR を用いた $\Delta\Delta C_t$ 法により定量した。

化学修飾 small interfering RNA 封入ユニットポリオンコンプレックスの筋ジストロフィーモデルマウスにおける体内動態および薬効評価

ユニット PIC が健常なマウスの筋組織へと siRNA を送達できることが明らかになったが、筋組織血管内皮の透過性が亢進していると考えられる筋原性疾患においては、よりその集積量や効果の増強が期待できることから、筋ジストロフィー疾患モデルマウス (*mdx* マウス) にて同様の評価を実施した。まず大腿四頭筋における siRNA の集積量を評価するため、siRNA 単体あるいはユニット PIC (N/P=0.5, 1, 2) を *mdx* マウスに 10 mg/kg 投与してから 3 日後の組織を回収し、stem-loop PCR にて siRNA 量を算出した (図 4-6)。siRNA 単体投与群においては C57BL/6 マウスと同程度の集積量であった一方で、ユニット PIC (N/P=1) 投与群は siRNA 単体投与群と比較して 10 倍以上の siRNA が集積した。さらにその量は N/P 比依存的に増加し、N/P = 2 にて調製したユニット PIC 投与群は siRNA 単体投与群と比較して 30 倍近い siRNA 集積量を示した。この結果は、過剰な bPEG-PLys によるユニット PIC の動的平衡化で血中滞留性をより向上させることが筋組織への siRNA 送達に有効であることを示唆している。

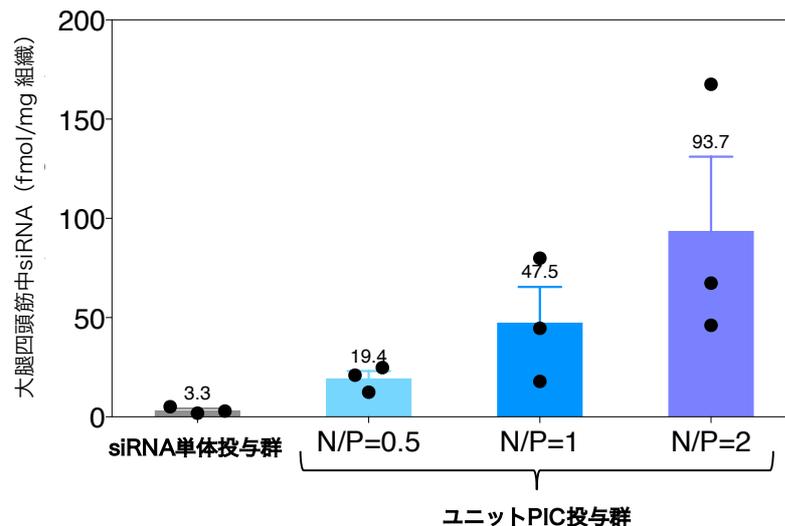


図 4-6. *mdx* マウスに投与した F/OMe 修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC の大腿四頭筋中の siRNA 集積量。Stem-loop PCR によって濃度既知 siRNA の検量線を元に定量した。

健常なマウスにおける評価と同様に、*mdx* マウスの筋組織へと送達された siRNA が核酸医薬として機能を発揮することを確認するため、生理食塩水投与群に対して siRNA 単体、ユニット PIC (N/P = 0.5, 1, 2) 投与群が組織中で HPRT 発現量を低下させたかどうかを検証した。各臓器中の β -Actin に対する HPRT 発現量を定量 PCR にて測定した結果、全ての臓器で siRNA 単体あるいはユニット PIC 投与群で HPRT の発現量の有意な低下が確認された (図 4-7)。これは、*mdx* マウスにおいてジストロフィンの欠損が起きていることから細胞膜構造が脆弱になっていると考えられ、その結果 siRNA の細胞内取り込みが亢進し、HPRT 発現を抑制するためには 10 mg/kg の siRNA 単体投与の集積量で十分であった可能性が考えられる。投与量を低下させてユニット PIC 投与群の骨筋中 siRNA 集積量が約 3 fmol/mg になった時には siRNA 単体では遺伝子発現抑制には不十分な量の siRNA しか集積できないと期待されることから、より低用量での評価が今後の検討課題である。また、異なる siRNA 標的に必要な siRNA 集積量は、HPRT と異なる場合もあり、標的遺伝子によって最適な siRNA 投与量を検討する必要もある。

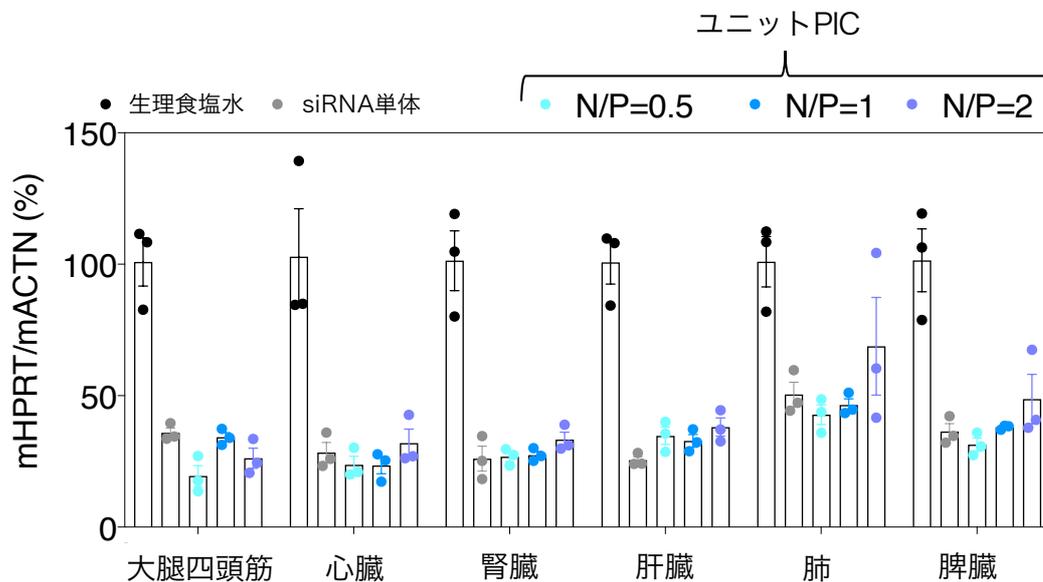


図 4-7. *mdx* マウスに F/OMe 修飾 siRNA あるいはそのユニット PIC 投与した 3 日後の各臓器中の HPRT mRNA の相対発現量。定量 PCR を用いた $\Delta\Delta C_t$ 法により定量した。

4.4 結論

本研究では、化学修飾siRNAを封入した2:1ユニットPICを用いて筋組織へのsiRNA送達能を検証した。生体内共焦点顕微鏡による筋組織血管の経時的な観察からbPEG-PLysとF/OMe修飾siRNAから調製したユニットPICは血管から漏出し、bPEG-PLysとsiRNAがそれぞれ骨格筋へと分布することを確認した。そしてユニットPICによる筋組織へのsiRNA送達量および核酸医薬としての機能を評価するため、ハウスキーピング遺伝子の一つであるHPRTを標的とするF/OMe修飾siRNAを封入したユニットPICをN/P = 1にて調製し、マウスに静脈投与して各臓器のsiRNAの集積量とHPRTの発現量を定量PCRにて測定した。ユニットPIC投与群はsiRNA単体投与群と比較して骨格筋及び心臓（心筋が含まれる）でのsiRNAの集積量がそれぞれ約2倍と5倍に増加し、ユニットPIC投与群のみでHPRTの発現抑制が認められた。さらに、筋組織血管内皮の透過性が亢進していると考えられる筋ジストロフィー疾患モデルマウスにて同様の評価を実施し、siRNA単体投与群では正常マウスと同程度のsiRNA集積量であった一方で、ユニットPIC投与群ではsiRNA単体と比べて10倍以上の効率で骨格筋に集積することを明らかにした。これらの結果より、F/OMe修飾siRNA封入ユニットPICは筋疾患への核酸送達キャリアとして有望であることが示された。

参考文献

- [1] Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S. P., The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (6), 421-446.
- [2] Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Crooke, R. M.; Liang, X. H., Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**.
- [3] Lovett-Racke, A. E.; Cravens, P. D.; Gocke, A. R.; Racke, M. K.; Stuve, O., Therapeutic potential of small interfering RNA for central nervous system diseases. *Arch. Neurol.* **2005**, *62* (12), 1810-1813.
- [4] Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C., Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20-37.
- [5] Kaczmarek, J. C.; Kowalski, P. S.; Anderson, D. G., Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med.* **2017**, *9* (1), 60.
- [6] Shen, X.; Corey, D. R., Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (4), 1584-1600.
- [7] Bennett, C. F., Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu. Rev. Med.* **2019**, *70*, 307-321.
- [8] Quemener, A. M.; Bachelot, L.; Forestier, A.; Donnou-Fournet, E.; Gilot, D.; Galibert, M. D., The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2020**, *11* (5), e1594.
- [9] Scharner, J.; Aznarez, I., Clinical Applications of Single-Stranded Oligonucleotides: Current Landscape of Approved and In-Development Therapeutics. *Mol. Ther.* **2021**, *29* (2), 540-554.
- [10] Roberts, J.; Palma, E.; Sazani, P.; Orum, H.; Cho, M.; Kole, R., Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Mol. Ther.* **2006**, *14* (4), 471-475.
- [11] Morrissey, D. V.; Lockridge, J. A.; Shaw, L.; Blanchard, K.; Jensen, K.; Breen, W.; Hartsough, K.; Macherer, L.; Radka, S.; Jadhav, V.; Vaish, N.; Zinnen, S.; Vargeese, C.; Bowman, K.; Shaffer, C. S.; Jeffs, L. B.; Judge, A.; MacLachlan, I.; Polisky, B., Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (8), 1002-1007.
- [12] Michel, C. C.; Curry, F. E., Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* **1999**, *79* (3), 703-761.

- [13] Sarin, H., Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* **2010**, 2, 14.
- [14] Baltusnikas, J.; Fokin, A.; Winkler, J.; Liobikas, J., Long-term regulation of gene expression in muscle cells by systemically delivered siRNA. *J. Control. Release* **2017**, 256, 101-113.
- [15] Foster, D. J.; Brown, C. R.; Shaikh, S.; Trapp, C.; Schlegel, M. K.; Qian, K.; Sehgal, A.; Rajeev, K. G.; Jadhav, V.; Manoharan, M.; Kuchimanchi, S.; Maier, M. A.; Milstein, S., Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Mol. Ther.* **2018**, 26 (3), 708-717.
- [16] Watanabe, S.; Hayashi, K.; Toh, K.; Kim, H. J.; Liu, X.; Chaya, H.; Fukushima, S.; Katsushima, K.; Kondo, Y.; Uchida, S.; Ogura, S.; Nomoto, T.; Takemoto, H.; Cabral, H.; Kinoh, H.; Tanaka, H. Y.; Kano, M. R.; Matsumoto, Y.; Fukuhara, H.; Uchida, S.; Nangaku, M.; Osada, K.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K., In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationomers to target cancers. *Nat Commun* **2019**, 10 (1), 1894.
- [17] Biscans, A.; Coles, A.; Haraszti, R.; Echeverria, D.; Hassler, M.; Osborn, M.; Khvorova, A., Diverse lipid conjugates for functional extra-hepatic siRNA delivery in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47 (3), 1082-1096.

第 5 章

総括

本研究では、筋組織への核酸医薬送達を目的とする新たな高分子キャリアを設計した。核酸医薬単体で投与すると筋組織への移行効率低く、これを解決するためには筋組織へ到達するまでの生体バリアを突破・回避する必要がある。そのために、核酸送達キャリアのサイズを 10–20 nm に厳密に制御し、生体適合性を高くする必要があり、本研究では核酸医薬とカチオン性ブロック共重合体が構成する最小単位の複合体であるユニットポリオンコンプレックス (PIC) に着目した。これまでに血管内皮透過性が比較的亢進している腫瘍組織への核酸医薬の送達にはユニット PIC が有望であることは明らかになってきたが、連続性血管内皮を持つ筋組織への核酸送達キャリアとしてユニット PIC を用いることができるかは明らかになっていなかった。また構成成分であるブロック共重合体と核酸医薬の構造が変化した時にどのような構造と特性を持つユニット PIC が形成されるかも分かっていなかった。

そこで、第 2 章においてカチオン性ブロック共重合体の組成を系統的に変化させた時に形成されるユニット PIC の構造を明らかにし、その生体内安定性を評価した。その結果、ブロック共重合体の重合度 (正電荷数) 調節によりユニット PIC の構造と生体内での安定性を制御できることを明らかにした。さらに第 3 章においては、核酸医薬の化学修飾構造がユニット PIC の構造及び安定性に与える影響を明らかにし、酵素耐性の高い修飾核酸の導入により大幅に血中動態を改善することに成功した。そして、得られた知見を基に調製したユニット PIC を用いて、第 4 章にて筋組織への核酸送達キャリアとしての機能を評価した。核酸医薬単体投与と比較して、健常なマウスにおいては約 2 倍から 5 倍の核酸を骨格筋及び心筋に送達して核酸医薬としての機能を発揮し、さらに

筋原性疾患のひとつである筋ジストロフィーモデルマウスにおいては、約 30 倍の核酸を骨格筋に送達することに成功した。

以上、本研究ではブロック共重合体の重合度（正電荷数）調節によりユニットPICの構造と安定性を制御できることを明らかにすると共に、核酸化学構造設計によりユニットPICの血中動態を大幅に改善し、筋組織へ核酸医薬を効率的に送達するキャリアの創出に成功した。

研究業績

投稿論文：

1. **Hiroyuki Chaya**, Masaru Cho, Mitsuru Naito, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, “Selective reparation and stabilization of small interfering RNA-loaded unit polyion complexes by charge-tuning of PEG-block-cationomers”, *in preparation*
2. Mitsuru Naito, **Hiroyuki Chaya**, Kazuko Toh, Beob Soo Kim, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Tetsuya Nagata, Takanori Yokota, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, “Structural tuning of oligonucleotides for enhanced blood circulation properties of unit polyion complexes prepared from two-branched poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine)”, *Journal of Controlled Release*, 330 (2021) 812–820
3. **Hiroyuki Chaya**, Kazuko Toh, Mitsuru Naito, Masaru Cho, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, “Chemically modified small interfering RNA-loaded unit polyion complexes to target skeletal and cardiac muscles, “ *in preparation*

学会・講演会の会議録等：

1. **Hiroyuki Chaya**, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Mitsuru Naito, Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, Antisense oligonucleotide self-assemblies featuring improved physicochemical stability by chemical modification of nucleotides, The 46 International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Poster), Tokyo, 2019/10/29-31
(受賞：ISNAC Outstanding Poster Award 2019)
2. **Hiroyuki Chaya**, Mitsuru Naito, Kazuko Toh, Beob Soo Kim, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, Prolonged blood circulation of siRNA-loaded ultrasmall polymeric nanocarriers by fine-tuning of oligonucleotide structures, The 48th Annual Meeting of the Controlled Release Society (Oral), Online, 2021/7/25-29
3. **茶谷洋行**, 林光太朗, 内藤瑞, キムヒョンジン, 福島重人, 片岡一則, 宮田完二郎, 核酸医薬とカチオン性ブロック共重合体の精密設計に基づくナノ構造体の形成挙動制御, 第28回インテリジェント・ナノ材料シンポジウム(口頭), 東京, 2019/1/11
4. **Hiroyuki Chaya**, Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Mitsuru Naito, Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, and Kanjiro Miyata, Preparation of characterization of polyion complexes comprising chemically modified oligonucleotides and cationic block copolymers for

antisense oligonucleotide delivery, 19th Symposium for Gene and Delivery (Poster), Chiba, 2019/5/8

5. **Hiroyuki Chaya**, Sumiyo Watanabe, Kotaro Hayashi, Kazuko Toh, Hyun Jin Kim, Shigeto Fukushima, Kanjiro Miyata, and Kazunori Kataoka, Enhanced stabilization of oligonucleotides by in vivo rendezvous with charge-matched block cationomers to target intractable cancers, 日本核酸医薬学会第 5 回年会 (ポスター), 大阪, 2019/7/10-12
6. **Hiroyuki Chaya**, Stabilization of polyion complex micelles with chemically-modified nucleic acids for antisense oligonucleotide delivery, UTokyo-NTU Joint Conference 2019 (Oral), Tokyo, 2019/12/9-10
7. **茶谷洋行**, 内藤瑞, 藤加珠子, キムボブス, 林光太郎, 福島重人, 片岡一則, 宮田完二郎, 1 分子核酸内包キャリアの血中滞留性向上を指向した核酸医薬の精密構造設計, 第 15 回ナノ・バイオメディカル学会大会 (口頭), オンライン, 2020/11/4-5
8. **茶谷洋行**, 渡邊秀美代, 林光太郎, 藤加珠子, キムヒョンジン, 内藤瑞, キムボブス, 片岡一則, 宮田完二郎, 高分子材料及び核酸化学構造の精密設計に基づく極小核酸送達システムの構築と難治がん治療応用への展開, 日本薬学会第 141 年会 (口頭), オンライン, 2021/3/26-29
9. **茶谷洋行**, 内藤瑞, 藤加珠子, 林光太郎, 福島重人, 片岡一則, 宮田完二郎, 血中動態の改善を指向した化学修飾 siRNA 封入ユニットポリイオンコンプレックスの構築, 第 37 回日本 DDS 学会学術集会 (ポスター), 千葉/オンライン, 2021/6/29-30

謝辞

本論文は、筆者が東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻博士課程在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻准教授でおられる宮田 完二郎先生には指導教員として本研究実施の貴重な機会を与えて戴き、その遂行にあたって懇切丁寧なご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻教授 岡本 晃充 先生、並びに、同研究科マテリアル工学系専攻教授 吉田 亮 先生、同専攻准教授 山崎 裕一 先生、同専攻准教授 江島 広貴 先生には本論文の副査としてご助言を戴くとともに、細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。本論文の第3章の研究において、ナノ医療イノベーションセンター センター長兼ラボ長兼主幹研究員、東京大学未来ビジョン研究センター特任教授、東京大学名誉教授でおられる片岡 一則先生、並びにナノ医療イノベーションセンター副主幹研究員 福島 重人 氏、同センター研究員 藤 加珠子 博士、同センター研究員 林 光太郎 博士、並びに、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科医歯学系専攻認知行動医学講座脳神経病態学分野主任教授 横田 隆徳 先生、同分野プロジェクト准教授 永田 哲也先生には、核酸の設計や動物評価にご協力頂いた。ここに深謝の意を表す。さらに、藤 加珠子 博士には第4章における骨格筋への核酸医薬の送達を可視化して頂いた。益々の深謝の意を表す。東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学本専攻宮田研究室の皆様には研究遂行にあたって日頃より有益なご討論ご助言を戴いた。ここに感謝の意を表す。特に、内藤 瑞 博士、小倉 里美 氏、谷脇 香 博士には、数々の実験に協力戴いた。ここに深謝の意を表す。また、社会人の身分を持ちながら快く大学へと送り出し下さった、第一三共株式会社バイオロジクス本部モダリティ研究所元所長 高橋 亘 博士と現所長 橋本 隆

二 博士を始めとして所員の方々に感謝の意を表す。

最後に、いつも休日や平日深夜まで大学で研究しているために中々家に帰って来ず、多大な気苦労をかけてばかりにも関わらず、温かく出迎えてくれる妻の有里絵と長男の航佑を始めとする家族に深謝の意を表す。

2021年6月吉日

茶谷 洋行