

博士論文(要約)

**Preparation and characterization of unit  
polyion complexes with siRNA utilizing  
PEG-*block*-poly(amino acid)s**

(PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体を用いた  
siRNA 最小単位会合体の調製とその機能評価)

林 光太郎

約21塩基対の短い二本鎖RNAであるsmall interfering RNA (siRNA)は、ほ乳類細胞に対してRNA干渉を誘起することが広く知られている。RNA干渉とは、細胞質内においてsiRNA自身と相補的な塩基配列をもつメッセンジャーRNA (mRNA)を分解する機構であり、その配列特異性からRNA干渉のトリガーとなるsiRNAは、難治性疾患の原因遺伝子を特異的に抑制する核酸医薬として注目されている。しかし、負に帯電したsiRNA単体は、生体内に豊富に存在する核酸分解酵素により迅速に分解されること、また、同じく負電荷を帯びた細胞膜と反発して細胞に取り込まれないことから、その効果を十分に発揮できない。このため、siRNAを標的細胞まで安定に送達するデリバリーキャリアの開発がsiRNAの医療展開に向けて必要となる。

キャリアデザインとして、負電荷をもつsiRNAとカチオン性高分子との間でポリイオンコンプレックス(PIC)を形成させ、ナノ粒子化する手法が広く受け入れられている。siRNAの負電荷を中和することにより細胞膜との静電反発を防ぎつつ、ナノ粒子に封入することにより酵素分解から保護することが期待される。こうしたPICの形成過程に関する研究を通じて、電荷を中和するのに必要な最小単位のPIC (unit PIC, uPIC)がまず形成され、それが二次会合することによってPICミセルなどの多分子会合体が構築されることが報告されている。uPICは、多分子会合体に比べてサイズが小さいため、血管密度が低く厚い間質で覆われた線維性の腫瘍組織に対して優れた組織浸透性を示すキャリアになることが期待されるが、uPICを用いた核酸キャリアは報告されていない。本研究では、siRNAをポリアニオンとするuPICの形成条件を検討し、そのsiRNAキャリアとしての機能を評価する。とりわけ、全身投与型siRNAキャリアとしての展開には生体内における安定性が第一に求められる。よって、血流中で優れた安定性を有するuPICの構築に向け、ポリエチレングリコール(PEG)-ポリアミノ酸ブロック共重合体の構造最適化を行うと共に、その構造がuPICの会合状態および安定性にどのような影響を与えるかを詳細に評価した。

まず、カチオン性ブロック共重合体と二本鎖RNAであるsiRNAと一本鎖RNAとのPIC形成を比較することにより、uPICの形成条件を検討した。ポリカチオン鎖として天然の塩基性アミノ酸であるL-リシンのポリマー(PLL)を選択し、分子量の異なるPEGを用いてブロック共重合体PEG-PLLを合成した。この際、PLLの正電荷数(=重合度(DP))はsiRNAの負電荷(リン酸基)数と同数である40とした。得られたPEG-PLLを用いてsiRNAもしくは一本鎖RNAとの間でPICを形成させ、その会合状態を蛍光相関分光法(FCS)と分析超遠心(AUC)を用いて解析した。一本鎖RNAより調製されるPICでは、低濃度では粒子径が6~15 nmのuPICが形成されるが、ある濃度を越えると30~70 nmの粒子径を有する多分子会合体(PICミセル)を形成することが示された。一方、siRNAから調製されるPICでは、PEGの重なり濃度(C\*)に近い高濃度においても多分子会合体は形成されず、uPICが選択的に得られることが確認された。

この違いは、siRNAの円筒状で剛直な二本鎖構造のために多分子会合によるエンロピー利得が得られないためであると考察された。また、PEGの分子量を2,000から42,000まで変化させても同様のPIC形成挙動が見られたことから、uPICの二次会合にはブロック共重合体のPEGの分子量よりも核酸の構造が強く影響していることが示唆された。

次に、ポリカチオン1分子当たりの正電荷数がsiRNAとのPIC形成に影響を与えると考え、異なる重合度のPLL鎖を含むPEG-PLLを用いてPICを調製し、その構造解析を行った。この際、siRNAが40の負電荷を有することに着目し、PLLの正電荷数をその1/2倍～2倍となるDP = 20, 30, 40, 60, 80となるようにPEG-PLLを合成した。合成したPEG-PLLをsiRNAと混合し、得られたPICにおけるsiRNAとPEG-PLLの会合数(AN)をそれぞれAUCとFCSを組み合わせることにより算出した。その結果、PEG-PLLの正電荷数がsiRNAの負電荷数の1/2倍、等倍、2倍となるDP = 20, 40, 80のときそれぞれ、 $(AN_{\text{PEG-PLL}}, AN_{\text{siRNA}}) = (2, 1), (1, 1), (1, 2)$ となり、電荷が中和された単一のuPICが形成することが明らかとなった。一方、siRNAの電荷の約数でも倍数でもないDP = 30, 60のときは、 $(AN_{\text{PEG-PLL}}, AN_{\text{siRNA}}) = (1.2, 1), (1.3, 2)$ となり、PEG-PLLの会合数が整数とならず、二種類以上のPICが系の中に存在していることが示唆された。これらの結果より、単一のuPICを選択的に調製するためにはブロック共重合体の正電荷数をsiRNAの負電荷の約数、同数、または倍数に調節することが重要であると考えられる。

これまでに調製方法を確立したuPICについて、siRNAキャリアとしての機能を検討した。まず、siRNA uPICの生体内での安定性の指標となる血中滞留性について、PEG-PLLのPEGおよびPLL重合度の影響を調査した。PLL重合度に関しては、DP = 20と40の比較より、2分子のPEG-PLLからなるuPICが長い血中半減期を有し、高い安定性を示すことが明らかになった。これは、1つのuPIC中に含まれるPEGの本数が増加したことで、生体成分との非特異的相互作用が抑制された(“ステルス効果”が強まった)ためであると考えられる。一方、PEGについては、その分子量の増加および分岐型PEGによる本数の増加に伴い、uPICの血中半減期が延長されることを見出した。これは高分子量のPEGまたはより多くのPEG鎖による高いステルス効果によるものであると考えられる。また、uPICと過剰量のPEG-PLLを同時投与することにより、血中滞留性が劇的に向上することも明らかになった。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いたin vitroおよびin vivoの解析により、この血中での安定性向上には、uPIC中のPEG-PLLと過剰のPEG-PLLとの置きかわりが関与していることが示された。最適化されたuPICは、リポソーム製剤などが到達しづらいとされる間質の多い膀胱がん(BxPC3)の皮下移植モデルマウスにて、効率良く腫瘍組織へと集積することが明らかになった。さらに、同モデルマウスにて、治療用siRNAを搭載したuPICの投与により、非治療用siRNA搭載uPICの投与や生理食塩投与に比べ、有意に高い遺伝子抑制作用および抗腫瘍効果が得られた。以上のことから、uPICがsiRNAキャリアとして高い将来性を有することが明らかになった。

さらに、uPICにおけるポリアミノ酸構造の影響を検証し、siRNAキャリアとしての改善を試みた。siRNAの構造(具体的にはリン酸基の配置)に空間的にマッチするカチオン性ポリアミノ酸が高い安定性を有するuPICを形成すると仮説を立て、リシンと同じく一級アミンを有するカチオン性ポリアミノ酸として側鎖スペーサー長が少しずつ異なるPEG-ポリ(アミノアルキル-L-グルタミド) (PEG-PLG(ACn))およびPEG-ポリ(-L-オルニチン) (PEG-PLO)を、ポリアミノ酸重合度を20に固定して合成した。合成されたPEG-ポリアミノ酸とsiRNAとを混合してPIC形成を行い、AUCとFCSを通じてその会合数と安定性を比較した。その結果、側鎖構造の異なるポリカチオン鎖を用いた場合でもPEG-PLLと同様に、 $(AN_{\text{polymer}}, AN_{\text{siRNA}}) = (2, 1)$ となるuPICの形成が確認され、ポリカチオン構造に関わらずuPICが形成されることが示された。さらに、これらのuPICのポリアニオンとの置き換えに対する耐性を比較したところ、側鎖スペーサー長が短いポリアミノ酸ほど高い耐性を示すことが見出された。これは、スペーサー長がsiRNAの二本鎖らせん構造のmajor grooveにフィットし、siRNAとブロック共重合体の結合が強くなったためと考察された。続いてuPICの血中滞留性を評価したところ、ポリアニオンに対する耐性が最も高かったPEG-PLOから調製されるuPICが最も長い血中半減期を示した。また、PEG-PLOからなるuPICは、より少量のポリマー添加の条件下でも優れた血中滞留性を示したことから、siRNAキャリアとして実用化に適していることがわかった。

以上より本研究は、siRNA搭載uPICの選択的な調製条件を確立すると共に、ブロック共重合体のPEGおよびポリカチオン構造の最適化を通じて新たなsiRNAキャリアプラットフォームを創出した。