

論文の内容の要旨

論文題目 Mechanistic Study on Structural Regulation and Shear Stress-triggered Effects
 for Block Copolymer-based Gene Delivery Carrier
(ブロック共重合体を用いた遺伝子キャリアの構造制御およびせん断応力
 による影響の検証)

氏 名 武田 香織

近年、難治性疾患に対する新療法として遺伝子治療が注目され、治療用遺伝子がコードされたプラスミドDNA (pDNA)の核酸医薬としての活用を目指した研究が盛んに取り組まれている。遺伝子治療の実用化に向けては、pDNAを安定に標的細胞に送達した上で高効率に遺伝子を発現させる、遺伝子キャリアの開発が求められている。その一つとして、poly(ethylene glycol) (PEG)とpoly(L-lysine) (PLys)からなるブロック共重合体(PEG-PLys)がpDNAと形成するポリプレックスミセル (PMs)を用いた研究が行われてきた。PMsはpDNAとPLysの会合体をPEGが覆った二重構造となっており、PEG被覆によりpDNAの生体環境下での安定性が見込まれる。しかしながら、全身投与型で遺伝子治療に応用するには血中での安定性が不十分なことや、PMs中に凝縮体として内包されるpDNAの構造制御手法が確立されていないことが、大きな課題となっている。

PMsへのpDNAのパッケージング機構に着目したこれまでの研究で、pDNAはDNA二重鎖の局所的解離を伴う屈曲機構により秩序高く折りたたまれ、rod状構造を形成することが明らかとなっている。DNAが束状にパッキングされたこの構造は、DNA二重鎖の剛直性によく適合した凝縮形態である。一方で、DNA凝縮の駆動力が、電荷中和により脱水したpDNAの表面エネルギーを下げる要求であることを考えると、表面積が最小となる球形への凝縮が適している。実際、ホモポリカチオンによる凝縮では、球形(globule状)が形成されることが報告されている。これは、rod状構造の形成にPEGが寄与していることを示唆するものと考えられるが、その詳細について理解は及んでいない。また、rod状/globule状の形態制御因子が明らかとなっていないため、形態と遺伝子発現効率との相関も不明である。そこで本研究では第一に、pDNAのrod状パッケージングにおけるPEGの役割を解明することでPMsの形態制御を可能とすること、さらにはPMs構造と遺伝子発現効率との相関を検討することを目的とした。

実験方針としてはまず、凝縮開始時点のpDNA上のPEG量を変化させ、パッケージン

グ形態との相関を検討することとした。pDNAとPEG-PLysは電荷中和によって会合するため、PLys重合度を変化させるとpDNA1分子あたりのポリマー会合本数が変化する。また、PEG分子量を変化させるとPEG鎖1本あたりの占有体積が変化する。そこで、種々のPEG分子量 (2k ~ 42k)とPLys重合度 (20 ~ 145) からなる19種類のPEG-PLysを用意し、PLys鎖の持つ正電荷 (N)がpDNAのリン酸基の持つ負電荷 (P)と等しくなるよう (N/P = 1.0) pDNAと混合することで、PMsを調製した。なお、混合したポリマーが各組成においてほぼ全てpDNAに会合したことは、超遠心を用いた手法により確認した。

各組成のPEG-PLysによるpDNAのパッケージング形態を透過型電子顕微鏡 (TEM)を用いて観察したところ、特にPEGが少なくなる組成 (PEG分子量2k や PLys重合度50以上)において、rod状とは異なるglobule状の形態が混在することが確認された。ここでglobule状凝縮体の長軸長は、DNA二重鎖の持続長 (46 nm)よりも短いことが着目される。これはDNAの二重鎖構造の折りたたみ機構によって形成されたものとは理解し得ないことから、globule状凝縮体内部では二重鎖が解離し、持続長が数nmの柔軟な一本鎖DNAとなっているものと推察した。この検証のため、一本鎖DNA特異的分解酵素を用いた実験を行ったところ、rod状凝縮体はrod末端以外ではDNA二重鎖が保持されたまま規則正しく折りたたまれる機構によって形成された構造である一方、globule状凝縮体はDNA二重鎖が非局所的に柔軟な一本鎖へと解離する機構によって形成された構造であることを示す結果が得られた。

次に、rod状/globule状の形態選択とpDNA上のPEG量との関係を定量的に議論するため、pDNAへのポリマー会合本数の定量値から、凝縮開始時点のpDNA上におけるPEGの混み具合を算出した。パッケージング形態との相関を検討した結果、PEGが空いているほどglobule状の形成率が高くなるとの相関が見出され、PEG鎖同士に隙間がある状態からはglobule状、PEG鎖同士が重なり合う状態からはrod状が主に形成されることが明らかとなった。これについて、PEG鎖の重なり合いによって立体反発効果が大きくなった場合には、表面積の小さいglobule状構造表層の限られた空間にPEGを押し込めることより、DNAの剛直性の点で安定なrod状への秩序高い折りたたみが優先されたものと理解される。

続いて、PMsの構造と遺伝子発現効率との関係を検討した。ここでは無細胞遺伝子発現系におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を評価した。まずPLys重合度を約70に固定し、PEG分子量に対する依存性を検討したところ、PMs表層のPEG密度がある閾値を超える条件となると、遺伝子発現が有意に抑制されることが明らかとなった。これは密度の高すぎるPEG層が転写因子のpDNAへの結合を阻害したためと考えられる。続いてPEG分子量を12kとし、PLys重合度に対する依存性を評価した。その結果、PLys重合度が高くなりglobule状の形成率が高くなるほど、遺伝子発現効率が低くなるとの相関が確認された。これについて、globule状ではDNA二重鎖の非局所的な解離が転写因子によるプロモーター領域の認識を阻害したものと推察される。以上より、ポリマー組成を適切に選

択することによってPMsの構造制御が可能であり、それにより遺伝子発現も調節可能であることが示された。

しかしながら、全身投与型遺伝子キャリアとしてPMsを用いることを考えた場合には、血中安定性の確保も課題となる。PMs中のpDNAはPEG被覆によってある程度安定性を得ており、90%血清中で数時間にわたって静置してもほぼ100%残存することが報告されている。一方で、マウスに静脈投与した場合には、血中から1hr以内に消失してしまう。*in vitro*と*in vivo*の条件の違いは数多くあるが、*in vivo*では血流によってせん断応力が生じていることは明白な違いの一つであり、これがPMsの構造不安定化の引き金となって血中消失を促す可能性がある。しかしながら、血管内のせん断応力とPMsの安定性との関係については、未だ検討されていない。そこで本研究では第二に、血管内相当のせん断応力によるPMsの構造不安定化、およびそれに起因したPMsの遺伝子キャリアとしての性能低下について検証することを目的とした。

ここでは、PEG分子量12k、PLys重合度37のPEG-PLysを用いてN/P = 2.0で調製したPMsを用いた。また、*in vitro*でのせん断応力負荷に際しては、全て回転レオメーターを用いた。まず、血管内相当のせん断応力を負荷した場合のPMs構造への影響をTEM観察により評価した。ここで負荷するせん断応力は30、70、100 dyne/cm² (ヒト細静脈、ヒト細動脈、マウス大動脈相当)とした。観察の結果、せん断応力を負荷したPMsでは多分子の凝集体が形成されていた。しかしながら、通常はPEGのシールディング効果によって凝集は抑制されている。このことから多分子凝集の形成は、PEGのシールディング効果の低下、すなわちPMsからポリマーが引き剥がされたことを示唆するものと考えた。そこでせん断応力負荷前後でPMsに結合しているポリマー本数を超遠心を用いた手法により定量したところ、pDNA1分子あたりに結合しているポリマー本数は、30 dyne/cm²のせん断応力の負荷によって実際に減少したことが確認された (負荷前: 428.8 ± 2.2本, 負荷後: 313.4 ± 4.1本)。

このようなポリマーの引き剥がしは、PEGのシールディング効果によって得られているPMs中のpDNAのDNA分解酵素耐性を損なう可能性があると考え、RT-PCRによる評価を行った。その結果、せん断応力の無い場合は1 hr後にPMs中のpDNAが84%残存するDNase I濃度条件で、30 dyne/cm²のせん断応力下では45%、100 dyne/cm²のせん断応力では18%にまで分解されるという結果が得られた。このことより、せん断応力によるPMsの構造の崩れは、生体環境中でのpDNAの安定性に影響し得ると考えられる。

この対策として、PMsにジスルフィド架橋を導入することによるせん断応力耐性向上を試みた。PEG-PLys (PEG分子量12k、PLys重合度37)のリシン側鎖のアミノ基に2-iminothiolane (IM)を結合させることで、側鎖に49%の導入率でチオール基を導入したPEG-PLys (IM)を合成し、これによって架橋導入PMs (Crosslinked PMs, CPMs)を調製した。CPMsについてもPMsと同様に30、70、100 dyne/cm²のせん断応力を負荷してTEM観察を行ったところ、せん断応力負荷後でも凝集体の形成は観察されず、ポリマーの会合

本数にもせん断応力の負荷による有意な変化はなかった（負荷前: 381.5 ± 8.8 本, 負荷後: 379.5 ± 31.2 本）。

せん断応力耐性の差が実際に*in vivo*での安定性に影響するかを考察するため、マウスに尾静脈投与したPMsとCPMsの血中滞留を*in vivo*共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、投与直後は両者に差異は無かったものの、一定時間経過後にPMsの血中残存量の急激な低下が観察された。一方CPMsでは、このような滞留挙動の変化は観察されなかった。*In vivo*でのPMsの血中消失は*in vitro*で評価したPMsのせん断応力による構造変化の時間依存と連動しており、せん断応力による構造不安定化がPMsの血中消失の一要因となっていることが示唆された。

せん断応力によるPMs構造の崩れは、血中滞留性のみならず標的細胞に到達後の遺伝子発現効率にも影響する可能性がある。そこで、ヒト膀胱癌由来細胞（BxPC3細胞）を用い、 30 dyne/cm^2 のせん断応力を60 min負荷したPMsのルシフェラーゼ遺伝子の発現効率を評価した。その結果、せん断応力の負荷によってPMsの遺伝子発現は有意に低下した。一方、CPMsではせん断応力による遺伝子発現の有意な低下は観察されず、せん断応力下での構造安定性が遺伝子発現能の保持にもつながることが示された。さらにBxPC3細胞の皮下移植マウスを用いた実験では、pCAG-sFlt-1（可溶性 VEGF 受容体（sFlt-1）を発現するpDNA）を内包したCPMsを尾静脈投与した場合、同じpDNAを内包したPMsと比較して有意に高い抗腫瘍効果が確認された。以上より、全身投与型の遺伝子治療においてPMsの血中安定性および遺伝子発現効率の向上を目指す上では、せん断応力耐性を確保することが有効であると考えられる。

本研究により、今後PMsを遺伝子キャリアとして開発してゆく上でのPMsの構造制御、およびせん断応力耐性向上の重要性が提示されたとともに、その解決に向けての具体的指針が示された。