

博士論文(要約)

**Development of non-viral gene carrier systems
affordable for cell therapy
based on three-dimensional culture scheme**

(3次元培養に基づく細胞治療への適応を目指した非ウイルス型
遺伝子キャリアシステムの開発)

遠藤 泰輔

様々な難病の治療法として細胞治療が期待されている。細胞治療は機能不全などに陥った疾患部への細胞移植により、低下した機能の補助、回復を試みる治療法である。近年では移植する細胞に遺伝子導入を行い、移植細胞の生存や機能を補って治療効率を高める工夫がなされている¹。細胞治療の効果は主に移植細胞からの分泌タンパク質によると考えられるため²、in vivoにおいて移植細胞のコンディションの維持が重要である。その点で、細胞間相互作用を増加させることにより細胞の長期培養と細胞機能の維持を可能にする三次元培養の1つのスフェロイドが注目されている。また、培養方法のみならず遺伝子導入方法も移植細胞のコンディションを左右する重要な要素である。一般的にウイルス性キャリアが遺伝子導入に用いられるが、ウイルス性キャリアは宿主ゲノムへの組み込みなどの安全性や生産性に難があり、安全性や生産性に優れる非ウイルス型キャリアとして、生体適合性をもつ Poly(ethylene glycol)(PEG)とポリカチオンからなるブロックポリマーを用いた PEG 化ポリプレックスの開発が盛んに行われている。その中でも、低毒性かつ優れた遺伝子導入能をもつポリカチオンと PEG のブロックポリマーである

PEG-*block*-poly[N-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide](PAsp(DET))が注目される。

PAsp(DET)は、側鎖エタンジアミン構造がモノプロトン化状態である生理 pH では細胞膜傷害性が低いものの、エンドソーム pH ではダブルプロトン化によってエンドソーム膜に pH 選択的な傷害を与え、遺伝子導入の障壁となるエンドソーム脱出を促進する作用がある。また、生理条件下で自己断片化機構を備えており、ポリカチオンが速やかに低分子量化するため蓄積毒性が低く、これまでに

PEG-*b*-PAsp(DET)から調製される PEG 化ポリプレックスは in vivo 局所投与条件においても優れた治療効果を達成している。しかし、PEG 化ポリプレックスは細胞との相互作用が低減するために細胞取り込みが減少してしまう。一方でポリカチオンホモポリマーからなるポリプレックスではポリプレックス間の凝集や細胞毒性の高さが課題であった。近年ではこの PEG-*b*-PAsp(DET)ブロックポリマー(B)と PAsp(DET)ホモポリマー(H)を組み合わせてポリプレックスの細胞取り込みと毒性のバランスをとり、毒性を抑えつつ高い遺伝子発現を達成することも報告されている。そこで本研究では、まず、この B/H 混合系ポリプレックスを用いた初代肝細胞スフェロイドへの遺伝子導入を検討した。

まず、スフェロイドの作製手段として微細加工パターン化細胞培養基板に着目した。このパターン基板を用いることによって均一なスフェロイドを多量に作成することが可能になり、スフェロイドに対する遺伝子導入も容易であるというメリットがある。直径 100 μ m の円形にパターン化された基板に二段階肝コラゲナーゼ灌流法により採取した非実質細胞を含む初代肝細胞を播種した結果、一般的にスフェロイド作成の際に用いられるフィーダー細胞を用いずに均一なスフェロイドの形成に成功した。この肝細胞スフェロイドに対して PEG-*b*-PAsp(DET)と homo-PAsp(DET)による B/H 混合系のポリプレックスによって遺伝子導入を行った。市販試薬である FuGENE HD ではスフェロイドが崩れ、肝細胞の機能の一つであるアルブミン産生も失われたのに対し、最適化した B/H 混合系のポリプレックスではスフェロイドを崩さずに、無投与群と同程度のアルブミン産生を維持したまま外挿遺伝子を高発現させることに成功した。また、低温にすると細胞接着が抑制される温度応答性のパターン基板を用いて、トリプシンなどの酵素などを用いずに、物理的なダメージを与えることなく遺伝子導入後のスフェロイドを回収できた。回収したスフェロイドを in vivo を模した環境として Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)マウス腫瘍由来の

細胞外マトリクスである Martigel™ に移植したところ、パターン基板上と同じように無投与群と同等のアルブミン産生を維持したまま、1ヶ月に渡って外挿遺伝子が高発現し続けた。これにより遺伝子導入された肝細胞スフェロイドの細胞移植の実現可能性がより高まる事が期待される³。

さらに、本研究では PEG-*b*-PAsp(DET) から調製されるポリプレックスの遺伝子導入効率をさらに高めるための新たなポリマーの設計を試みた。PEG-*b*-PAsp(DET) から調製される PEG 化ポリプレックスはアニオン性タンパク質との相互作用を完全には防げず徐々に不安定化されるという課題が残されていた。不安定化されたポリプレックスの pDNA は系中に含まれる DNA 分解酵素によって分解される。そこで、PEG 化ポリプレックスの安定化によって移植細胞での遺伝子発現効率を向上させるために、PEG 保護層の増強に着目して二分岐型 PEG の導入を試みた。二分岐型 PEG を用いて PAsp(DET) とのブロックポリマーを合成し、PEG の分子構造の違いによる物性および機能の違いを直鎖型 PEG-*b*-PAsp(DET) と比較した。その結果、二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) と pDNA との電荷量論比(N/P = 2)において作成されたポリプレックスは直鎖型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた時より効果的にポリプレックスコアを保護できることがわかった。また、高 N/P 比(N/P > 2)においては通常ポリカチオンと pDNA との電荷量論比で飽和するポリマー会合本数が二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた場合は飽和せず、N/P が高くなるにつれてポリマー会合本数も増加する多層吸着と考えられる吸着挙動を示した。この特異な吸着挙動は二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) が2つの PEG 鎖と相溶性のない1つのカチオン鎖を1点で結合するという構造を有しているために、従来の PEG 鎖とカチオン鎖の2つのブロックからなるブロックポリマーよりも立体的に込み合うことに起因するものと推察された。また、この吸着によると思われる培地中での安定性の向上およびエンドソーム脱出能の向上により特に高 N/P 比において従来の直鎖型 PEG-*b*-PAsp(DET) から形成されるポリプレックスよりも 10 倍高い遺伝子発現を達成した。

そこで、この二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) を B/H 混合系のポリプレックスに適用することにより、細胞機能を維持しつつ肝細胞スフェロイドへの外挿遺伝子発現をさらに向上させられるかをブロックポリマー(B)とホモポリマー(H)の比(B/H 比)を変えて検討した。その結果、どの B/H 比においても二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた B/H 混合系ポリプレックスで直鎖型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた B/H 混合系ポリプレックスよりも高い遺伝子発現を示した。同条件で homo-PAsp(DET) のみを用いて遺伝子導入を行ったところ、遺伝子発現効率は高いものの遺伝子導入後 15 日でスフェロイドが崩れ、それに伴いアルブミン産生も失われた。一方で、二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた B/H 混合系ポリプレックスのうち最も遺伝子発現効率が高かった(B/H = 3/7)ポリプレックスではホモポリマーのみを用いた時と同等の発現を示しつつスフェロイドの形状を保ち、細胞機能も無投与群と同等のアルブミン産生を1ヶ月維持した。これらのことから、二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET) を用いた B/H 混合系ポリプレックスが初代肝細胞スフェロイドに対しても有効な遺伝子キャリアとなりうる事が示された。

以上、本論文は、細胞治療の治療効率向上を目指し、細胞スフェロイド移植を念頭に置いた遺伝子キャリアの開発についてまとめたものである。温度応答性パターン基板を用いて作製したスフェロイドに PEG-*b*-PAsp(DET) と homo-PAsp(DET) の B/H 混合系ポリプレックスを用いて遺伝子導入することにより、細胞の機能を維持したまま1ヶ月に渡り高い外挿遺伝子の発現を達成した。加えて、PEG-*b*-PAsp(DET) から調製されるポリプレックスの課題であった、培地中や生体内でのアニオン性タ

ンパク質との相互作用による不安定化を克服するため、新規に二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET)を開発した。実際、二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET)は培養細胞に対して高い安定性と遺伝子導入効率を示す一方、物理化学的に特異な吸着挙動を示すことが明らかとなり、遺伝子導入効率の増大との関連性を詳細に検討した。その結果 PEG 層の保護効果増大による安定化に加え、ポリマーのポリプレックスへの多層吸着によるポリプレックスの安定化とエンドソーム脱出能の向上が、高い遺伝子発現をもたらすことを明らかとした。さらに、この二分岐型 PEG-*b*-PAsp(DET)に B/H 混合系ポリプレックスの概念を適用し、肝細胞スフェロイドへの遺伝子導入に用いたところ、homo-PAsp(DET)のみを用いた場合ではできなかった細胞機能の維持を可能とし、1ヶ月に渡り homo-PAsp(DET)と同等の高い遺伝子発現を達成した。本研究で用いた初代培養細胞スフェロイドに対しても適用可能な低毒性かつ高遺伝子発現効率をもつ遺伝子キャリアと移植技術は、今後の再生医療や遺伝子治療の発展に貢献できるものと期待される。

[参考文献]

- [1] Haider H, Mustafa A, Feng Y, Ashraf M. (2011). *Mol. Pharm.* **8**, 1446-57.
- [2] Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, et al. (2012). *Nat. Commun.* **3**, 608-619.
- [3] Endo T, Itaka K, Shioyama M, Uchida S, Kataoka K. (2012). *Drug delivery and translational research* **2**, 398-405.