

博士論文（要約）

Preparation and Evaluation of Phenylboronate-Functionalized

ATP-Responsive siRNA Delivery System

（フェニルボロン酸を用いた ATP 濃度応答能を持つ siRNA

デリバリーシステムの設計と機能評価）

内藤 瑞

約 21 塩基対の短い二本鎖 RNA である siRNA (small interfering RNA) が、自身が持つ配列と相補的な配列を持つ内在性の mRNA (messenger RNA) を特異的に切断する現象、RNAi (RNA interference) を誘起することが 2001 年に報告された。それ以降、siRNA は特定の遺伝子発現を抑制する研究ツールや、難治性疾患に対する新たな治療薬となりうるとして期待され、広く研究されてきている。siRNA 治療の標的疾患としてがんやウイルス感染症などを中心に研究が進められている。一方で、siRNA は血中において腎臓からの排泄や酵素による分解を受け、速やかに消失してしまう。加えて、siRNA 自身は水溶性のアニオン性高分子であり、リン脂質二重膜である細胞膜を通過することができず、細胞へと取り込まれにくいいため、siRNA の血中への単独投与では治療効果を得ることは期待できない。そのため、siRNA を標的とする細胞質内へと高効率に送達することができるデリバリーキャリアの開発が siRNA の医療応用には必要不可欠である。特に、全身投与を念頭においたキャリア設計には、siRNA を血流中で酵素分解や腎排泄から siRNA を保護し、標的細胞の細胞表面を認識し、エンドサイトーシスにより細胞内へと侵入した後はエンドソームから細胞質へと移行し、最終的には siRNA を細胞質へと放出するという、多段階の機能の組み込みが求められている。このような要求を満たしうるキャリアとして、当研究室では、生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) とカチオン性のポリアミノ酸誘導体のブロック共重合体と、ポリアニオンである siRNA から形成されるポリイオンコンプレックスミセル (PIC ミセル) に着目して研究を進めてきた。

全身投与型 siRNA デリバリーキャリアの課題の一つとして、血流中での安定性と細胞質内での siRNA の放出という、一見すると相反する機能の両立があげられる。このような二律背反的な機能を実現するためには、生体内環境、特に細胞外と細胞内との環境変化を感知し、自律的に構造変化するスマートキャリアの開発が求められている。本研究では細胞質内に特に豊富に存在するアデノシン-三リン酸 (ATP) を検知し、PIC ミセルから siRNA が放出されるスマートデリバリーキャリアの研究を行った。細胞外での安定化及び、細胞内での siRNA 放出を一手に担う機能性分子としてフェニルボロン酸基 (Phenylboronic acid, PBA) を PIC ミセル内核へ導入した。PBA は自身の pK_a 以上の pH の水溶液中において *cis*-ジオール分子と可逆的な結合を示すことが知られている。siRNA の 3'末端には PBA と結合可能なリボース基が存在しており、PIC 内核での両者の結合が生じることで PIC ミセルの安定化が可能となる。また、ATP にも siRNA 同様リボース基が存在しているため、ATP が豊富に存在する環境においては、可逆的な siRNA と PBA との結合が ATP によって置き換わることで PIC ミセルから siRNA が放出可能になると考えられる。本研究では、このような機構に基づきキャリアを設計し、機能を評価した。

まず、ポリカチオン性のポリアミノ酸セグメントとして、ポリ-L-リシン (PLys) を用いた。長鎖のポリカチオンセグメントは細胞に対して高い毒性を示すことから、初期検討として重合度が比較的短い約 40 の PLys を用い、これと分子量 12,000 の PEG からなるブロック共重合体 (PEG-PLys₄₂) をプラットフォームとして用いた。PBA には pK_a が生体環境の

pH 7.4 以下である 4-カルボキシ-3-フルオロフェニルボロン酸 (FPBA) ($pK_a = 7.2$) を PLys の側鎖の一级アミンに直接アミド結合を介して導入した。FPBA の PEG-PLys への導入は定量的に進行し、任意の比率で FPBA を導入可能であることが確認された。

次いで、PEG-PLys₄₂ に対して FPBA を種々の導入率で導入したポリマー (PEG-PLys(FPBA_X)₄₂, X は FPBA 導入率) と siRNA とを pH 7.3 の 10 mM HEPES 緩衝液中で攪拌混合し、PIC ミセルを調製した。まず、PIC ミセルの安定性を評価するために蛍光相関分光法 (FCS) を用いて生理塩条件下及び、細胞培養環境を模倣したウシ胎児血清タンパク質 (FBS) 存在下での安定性評価を行った。その結果、FPBA を導入したポリマーからは生理塩条件下において会合体の形成が確認された一方、FPBA を導入していない PEG-PLys₄₂ からは多分子の会合体形成は確認されなかった。また、FBS 存在下においては導入率の最も高い $X = 0.56$ からなる会合体のみが安定であり、その他の導入率の低いポリマーからなる PIC ミセルは崩壊し、安定性が低いことが確認された。このことから FPBA の導入によって PIC ミセルの形成能が向上し、更に、導入率に応じて安定性も向上することが示唆された。最も安定であった $X=0.56$ からなる PIC ミセルを用いて、ATP やその他リボース誘導体及びグルコースに対する応答評価を同様に FCS を用いて行った。その結果、リボース構造を有する ATP やウリジン-一リン酸 (UMP) に対してはその添加濃度に応答して siRNA の放出が確認された。一方、*cis*-ジオール構造を有しない低分子の添加に対しては、PIC ミセルからの siRNA の放出は確認されなかった。この結果より、PIC 内部での siRNA と FPBA との結合が、ATP などのリボース構造を有する低分子の添加によって置き換わることで siRNA が放出されていることが示唆された。また、ATP と UMP の添加による siRNA 放出の濃度域において、大きな隔たりが確認されており、この応答濃度域の違いは ATP と UMP の持つリン酸基数に由来していることが確かめられた。三リン酸基のある ATP が一リン酸基の UMP よりも多くのアニオン電荷を有しているために、同様にアニオン電荷を有する siRNA の放出を促進した結果であると考えられる。 $X = 0.56$ の PIC ミセルには、FPBA 基が siRNA 末端に比べ過剰量 (約 100 倍) 存在していることから、FPBA と siRNA との結合が置き換わる前に、まず、PIC 内部に存在する過剰量の FPBA と ATP などの低分子が結合し、静電的なバランスが崩れ、最終的に結合が置き換わることで siRNA が放出されたものと考えられる。また、siRNA の放出の濃度域は細胞外と細胞内の ATP 濃度の境にほぼ一致していることから、細胞外では生体内に存在する分子である ATP やグルコースには応答せず siRNA が PIC ミセル内部に保持される一方、細胞質へと導入された後は細胞質内の ATP 濃度に応答して siRNA が放出される細胞内 ATP 濃度応答性 siRNA デリバリーキャリアの創出に成功した。

FPBA 修飾 ATP 濃度応答性デリバリーキャリアを用いて培養細胞に対して RNAi 活性評価を行ったところ、ポリマーが過剰量存在するという限定的な条件下ではあるが、遺伝子発現の抑制が確認された。更に、モデル動物を用いて血中滞留性を評価したところ siRNA 単体と比べ、滞留性の一定の向上は確認されたものの、期待された高い血中滞留性は得ら

れなかった。

そこで、血中での安定性向上を目指し、 $X=0.56$ よりも FPBA の導入率の高いポリマー ($X=0.69$) を合成し、PIC ミセルを調製した。その結果、血中での滞留性は飛躍的に向上し、2 時間後も 10% 程度の PIC ミセルが血中に残存していることが確認され、FPBA の導入率を増加させることで PIC ミセルの血中での安定性を向上可能であることが確認された。しかし、RNAi 活性は確認されず、細胞への取り込み能が非常に低いことが確認された。PEG-PLys(FPBA_X)₄₂ は、FPBA 導入率を変えることで血中での安定性の向上や RNAi 効果を得ることができたが、両者を同時に達成するようなキャリアの創出には至らなかった。

そこで、培養環境や血中での安定性及び、細胞への RNAi 効果を併せ持った高機能性 PIC ミセルの創出を目指し、PEG-PLys(FPBA) のポリマー組成の最適化を行った。PLys の鎖長として、より長い鎖長の約 75 のポリマーを合成し、PIC ミセル調製及び、安定性評価を行った。その結果、長鎖長の PEG-PLys(FPBA_X)₇₄ から、粒形分布の狭い PIC ミセルの形成が確認され、FBS 含有緩衝液中においても、従来のミセル同様、FPBA の導入率(X)の上昇に応じて安定性が上昇し、従来の鎖長の $X=0.56$ よりも低い導入率の $X=0.23$ から FBS に対する安定性が確認された。FBS に対する安定性が確認された PIC ミセルを用いて培養細胞への遺伝子発現抑制効果の確認をしたところ、 $X=0.23$ と 0.35 の PEG-PLys(FPBA_X)₇₄ から構成される PIC ミセルがポリマーを過剰に添加することなく、有意な RNAi 効果を示すことが確認された。長鎖長のポリマーに対して、エンドソーム脱出能の指標となる、酸性環境下における膜障害活性評価を行ったところ、RNAi 活性の高かった $X=0.23$ と 0.35 において高い膜障害活性を示した。この結果は、酸性条件によって電離の抑えられた FPBA の疎水性が増加し、エンドソーム膜との相互作用が向上した結果であると考えられる。また、導入率の高い $X=0.45$ の障害活性は $X=0.23$ や 0.35 と比べ低く、これは疎水性が強すぎるためポリマー同士が会合体を形成し、細胞膜との相互作用が低下したためであると考えられる。

PLys 鎖長と FPBA の導入率を制御することで FBS に対する安定性とエンドソーム脱出能、及び RNAi 活性を併せ持った PIC ミセルの創出に成功した。一方で、エンドソーム脱出能を有する組成では FPBA の導入率が比較的低いため、PIC ミセルの安定性も低下しており、生体環境下での使用を念頭に入れると、より高い安定性が必要であることが考えられる。そこで、ポリマーの組成は変えず、siRNA に疎水性分子であるコレステロール基を導入した Chol-siRNA を用いることで PIC ミセルの安定性を向上させることを試みた。その結果、Chol-siRNA を内包した PIC ミセルは、siRNA 内包 PIC ミセルに比べ、安定性の向上が確認され、細胞内 ATP 濃度に応答した siRNA の放出も確認された。培養細胞への取り込み能や RNAi 活性も経時的に上昇することが確認され、培養環境下での高い安定性が示唆されている。細胞内の siRNA の動態を評価したところ、エンドソーム脱出後、徐々に PIC ミセルが崩壊していることが確認され、細胞質内への siRNA の安定なデリバリーが示唆されている。

本研究では、ポリカチオンセグメントや FPBA 導入率を最適化することで PIC ミセルの高機能化に成功し、また、コレステロール修飾 siRNA を用いることで安定性の更なる向上

を実現し、細胞質内 ATP 濃度応答性のスマート siRNA デリバリーキャリアの創出に成功した。