

研究報告書

「pDNA の量子化折り畳み構造形成の解明と遺伝子送達への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 長田 健介

1. 研究のねらい

タンパク質を発現させて疾患を治療する遺伝子治療には、既存の技術では治療出来なかった難治性疾患を治せる潜在力がある。この治療法を特殊な方法ではなく、誰もが受けられるようにするためには、静脈注射が可能な非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムの完成が不可欠である。この 25 年間、脂質や高分子をベース材料に、ウイルスを用いない合成の遺伝子キャリアの開発が世界中で繰り広げられてきた。その結果、局所投与においては一定の成果が得られるようになってきているが、全身投与となると動物レベルでその効果を示すことすら困難となっている。課題は、これまでの研究がポリカチオンの一次構造と遺伝子キャリア調製条件の探索ならびに機能性分子の導入に注力する一方、本体となる遺伝子キャリアの詳細な構造と物性が不明確であること、さらには、血中投与後、遺伝子発現に至るまでにいくつもあるプロセスのどこが律速になっているのかが明らかになっていないことにあると認識した。本研究では、ブロック共重合体による高分子ミセル型遺伝子キャリア(ポリプレックスミセル)を基盤に、その構造と物性を正確に理解すること、それらと遺伝子キャリアとしての機能発現の相関を明確にすること、そして機能発現に最適な構造体に創り上げるとともに、そこに機能性分子を的確に配置することによって、試行錯誤的でない戦略的な分子設計による遺伝子キャリアを創出することを狙いとす。具体的には、ポリプレックスミセル中に遺伝子を担持したプラスミドDNA (pDNA) がどのような構造で收容されるのか、その收容構造は何によって支配されるのか、また外殻を構成する PEG はどうなっているのかという構造形成の学理を理解することを第 1 の課題とした。これを通じて確立した pDNA の折り畳み構造制御を基盤に、その構造が遺伝子キャリアとしての機能発現とどのような相関があるかについて、遺伝子発現に至るプロセスの段階毎に構造-機能相関を調べ、ライブラリーとしてまとめ上げることを次の課題に設定した。このプロセスを踏むことで、律速段階と求められる構造特性を明らかにし、問題解決のための具体的な分子設計指針を立案する。このように、分子技術に基づく戦略的な分子設計によって、全身投与のための遺伝子キャリア構築の基盤を固めることを本さがけ研究の課題とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究を開始するにあたり、ポリエチレングリコール(PEG)-ポリカチオンブロック共重合体によって pDNA は量子化折り畳み則に従い、ロッド状構造としてポリプレックスミセル中に收容される事を見出していた。一方、pDNA はなぜロッド状に折り畳まれるのか、そのロッド長は何によって決まるのか、またその周囲を PEG はどの程度の密度で覆っているのか、といった構造形成に関わる因子は不明であった。そこで研究課題 1:pDNA の量子化折り畳み構造を理解する、および研究課題 2:pDNA の折り畳み構造(ロッド型、不定型)を決定するのは

何か? ~折り畳みプロセスからの考察~, の 2 つの基盤的課題を設定し、pDNA の折り畳みの学理を理解することから始めた。これにより、ロッド構造についてはポリプレックス内核-水界面に発生する表面自由エネルギーに起因する収縮に対し、折り畳まれた DNA 束の剛直性と高分子ミセル外殻を為す PEG シェルの立体斥力が抗する仕事という図式で理解出来ることを示した。また、ロッド構造とともにしばしば観察される不定形グロビュール状(ロッド構造とも球とも異なる不定型な形状)については、pDNA とブロック共重合体との会合時における PEG の重なり具合でどちらの構造となるかが決まる事を明らかにした。ここで確立した構造形成の制御をもとに、研究課題 3: 折り畳み構造と遺伝子キャリアとしての機能相関、を検証し、構造-機能相関をライブラリーとしてまとめることを行った。特に、転写活性、エンドソーム脱出、細胞取込、血中滞留性に着目した。これにより、デリバリープロセスにおける律速段階と、それを克服するための最適なポリプレックスミセル構造を明らかにした。ここに、各プロセスを効果的に突破していくための機能性分子を装着したブロック共重合体を設計し、全身投与のための構造と機能を集約した遺伝子キャリアを構築するための基盤を創り上げた。このように、pDNA の折り畳み構造制御を基盤に構築した遺伝子キャリアの性能は、難治性である膵臓がんモデルマウスに対する全身投与による治療効果として確認するに至った。

(2) 詳細

研究課題 1: pDNA の量子化折り畳み構造を理解する

ここでは量子化折り畳み則に従って形成されたロッド構造の長軸長が何によって決定されるのかについて、ロッド構造の支配因子を明らかにする事を行った。ポリプレックスミセル中の DNA は反対電荷のポリカチオンで中和されているため脱水和している。したがって DNA/ポリカチオン複合体-水界面には大きな表面自由エネルギーが発生している。これを減少させるべくポリプレックス内核には収縮力が働く(図 1)。一方、収縮するためには、束として折り畳まれている DNA/ポリカチオン複合体の持つ剛直性と、その周囲を覆う PEG シェルの立体斥力(浸透圧とコンフォメーションの自由度が減少する事によるエントロピー不利)に対して仕事をしなければならない(図 1)。ロッド長はこれらの拮抗により決定されるものと考えた。この図式を検証するために、PEG-ポリリシン(PEG-PLys)ブロック共重合体を用い、PLys 重合度の変調を通じて pDNA に会合する PEG 本数を調節し、PEG の立体斥力効果とロッド長との関係を調べた。その結果、PEG 本数が増えるほどロッド長は長く、反対に PEG 本数が少なくなるほどロッド長は短くなり、上述した図式の確からしさを認めた。また、この理解が正しければ、内核の収縮力を高めるとロッド長は短くなるはずである。これを確かめるため、カチオン性連鎖末端に強い疎水性を示すコレステリル基を導入したブロック共重合体を用意した。実際、pDNA はより短いロッド構造に折り畳まれることを認め、上述の図式の確からしさを再確認した。さらに、PEG の立体斥力がロッド構造を支える要素となっていることを直接確かめるため、ロッド構造ポリプレックスミセルから PEG を徐々に抜いていく系を設計した。その結果、期待通り PEG が抜けるとロッド状からグロビュール状へ転移が確認された。興味深いことに、PEG は連続的に脱離しているにもかかわらず、ロッド長は一定を保ち、あるところで一気にグロビュール状へ転移することが観

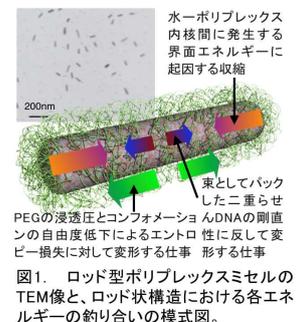


図1. ロッド型ポリプレックスミセルのTEM像と、ロッド状構造における各エネルギーの釣り合いの模式図。

察された。PEG 密度の解析から、グロビュール状への転移は隣接 PEG 間の重なりが無くなる時に起こることが示された。これは、PEG 立体斥力に加え、束として折り畳まれた DNA の剛直性がグロビュール状への転移を支えていることが見えたものと理解される。これらの検討から、PEG の立体斥力と DNA の剛直性がポリプレックス内核の収縮と拮抗することでロッド長が決定されるとの図式(図 1)を重ねて確認した。

研究課題 2: pDNA の折り畳み構造(ロッド型、不定型)を決定するのは何か? ~折り畳みプロセスからの考察~

課題 1 では形成されたロッド構造を取り扱ったが、ここではコイル状の DNA がブロック共重合体と会合し、折り畳まれていくプロセスに焦点を当てた。さきがけ研究開始時まで、pDNA は量子化折り畳みによるロッド状構造と、ロッド状構造とも球状とも異なる不定形に丸まったような構造(不定形グロビュール状)をとり、それが PEG-PLys ブロック共重合体の PLys 鎖長で決まる事を見出していた。具体的にはおよそ PLys 重合度 100 を境界に、それより短いときロッド状、長いとき不定形グロビュール状をとるという傾向を見出していた。課題 2 は、この臨界鎖長が何を意味しているのか、なぜ折り畳み形態が異なるのかについて、PLys 重合度と PEG 重合度を振り、PEG の効果の視点から解析した。その結果、pDNA とブロック共重合体との会合時、pDNA 上に PEG を配置した際の隣接 PEG 間の重なり程度が、その後の収縮プロセスに違いを生じさせ、結果としてロッド状、不定形グロビュール状を分ける要因となっていることを明らかにした。詳しくは、隣接 PEG が重なっていないときは内核表面積がより小さいグロビュール状に転移するのに対し、隣接 PEG がすでに重なっているときはロッド状構造への転移となることを明らかにした。ここで、前者は不定形グロビュール状と、表面積を最小とする真球とならないのは、二重らせん構造 DNA の剛直性によるものと考えられる。このように、pDNA がロッド状構造か不定形グロビュール状構造をとるかは、コイル状の DNA にブロック共重合体が会合したときの PEG 被覆率で決定される事を明らかにした。

研究課題 3: 折り畳み構造と遺伝子送達デバイスとしての機能相関

血中投与後、遺伝子発現を得るためには次の要件を満たす必要がある。(1)血流中で解離しない構造安定性、(2)生体内での安定性(ステルス性と DNA 分解酵素耐性)、(3)血中滞留性、(4)血管から組織への移行性、(5)細胞取込、(6)細胞内動態(エンドソームからの脱出)、(7)核移行、(8)転写を受ける状態への構造変態。この中で、局所投与では項目(5)-(8)を満たせばよいが、全身投与では(1)-(8)全てが求められる。しかしながら、上記のどの段階が律速になっているのか、さらにはどのような構造が適しているのかについて明確となっておらず、そのためこれまでの開発は推測と試行錯誤の中でいい物を見つけ出すというスクリーニング的手法で進められてきた。これに対し本研究では、課題 1、2 を通じて用意したポリプレックスミセルの構造ライブラリーを基に、上記(1)-(8)の各ステージにおける機能特性を精査し、構造-機能特性相関をライブラリーとして整理することを行った。その結果、血中滞留性と細胞取込との背反関係が大きな律速過程となっていることが明らかとなった。すなわち、血中ステルス性と DNA 分解酵素耐性を高めるべく PEG 密度を高めると、PEG の立体斥力効果によってより長いロッド構造が形成される。ロッド長 200nm を越えると細胞取込が極端に低下し、遺伝子発現が得られなくなってしまうことが明らかとなった。反対に、細胞取込と遺伝子発現を高めるにはロッド長を 200nm 以下とすることが効果的で、これは PEG 密度を低下させれば得られる。しかしながらこれでは血中安定性が低下してしまう。この背反要件こそがこれまで全身投与を

実現する遺伝子キャリアが見出せてこなかったことの主要因と認識できた。問題が分かれば、構造形成の基本原則を抑えていることから、それを克服する具体的な分子設計が立案できる。すなわち、「PEG 密度を高めつつロッド長を短くする」という背反要件を克服すればよいのである。これは、ブロック共重合体のカチオン性連鎖末端に疎水性のコレステリル基を導入することで克服した。静電相互作用に加えて疎水性相互作用を利用することで、電荷中和以上のポリマーを結合させつつ、ポリプレックスミセル内核の疎水性を高め、収縮力を上げることでロッド長を短くするという設計である。実際 PEG 密度の大幅な強化とロッド長の縮小を同時に達成し、血中滞留性を向上させることに成功した。加えて、細胞表面の受容体を認識するリガンド分子をポリプレックスミセル表層に装着することで、細胞取込を強化した。さらに、エンドソーム pH に応答したプロトン化挙動を示すポリカチオンとコレステリル基の疎水性とを組み合わせたエンドソーム脱出促進機能を組み込み、遺伝子発現の増強を行った。ここで導入したリガンド分子は、狙った細胞を標的化することを可能としている。このように全身投与で狙った細胞に遺伝子を発現させる構造と機能を戦略的に集約したポリプレックスミセルを構築した。これによりさきがけ研究で設定した課題を達成したが、さらにその効果を実証するために、難治性がんとして知られる膵臓がんの治療を試みた。その結果、腫瘍の血管内皮細胞を標的に血管新生阻害遺伝子を発現させるという治療戦略によって、疾患モデルマウスに対し、優れた治療効果を得ることに成功した(図 2)。

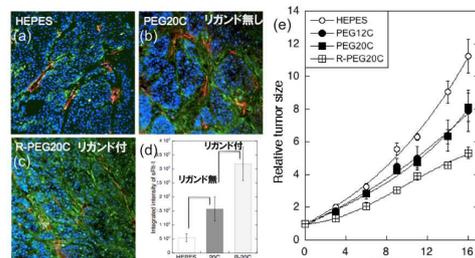


図2. 膵臓がんモデルマウスに対する血管新生阻害療法による治療効果。腫瘍組織における可溶性VEGF受容体遺伝子(緑)の発現[(a)コントロール、(b)リガンド無しポリプレックスミセル、(c)リガンド有りポリプレックスミセル]とその定量(d)。 (e)抗腫瘍効果。

ポリプレックスミセルの構造形成が明確となったことで、光選択的遺伝子導入を全身投与で実現することに成功した。ここでは、pDNA を担持する正電荷性連鎖、光によりエンドソーム脱出を促進するための光増感材内包 dendrimer を担持する中間正電荷性連鎖、血中ステルス性を担う PEG 連鎖からなるトリブロック共重合体を設計した。これにより、親水性外殻層、光増感剤搭載中間層、DNA 内包内核層からなる三層構造遺伝子キャリアを構築した。皮下腫瘍モデルマウスに対し、全身投与後に固形がんへ光照射を行うことで、光選択的な遺伝子導入を実現した。この成果は、全身投与でがんへ光選択的遺伝子に成功した初めての例としてプレス発表を行い、新聞記事として報道された。

このように、本さきがけ研究で掲げた“構造形成を知り、その制御技術を基に構造-機能相関を明確にすることで、構造と機能を戦略的に組み込んだポリプレックスミセル型遺伝子デリバリーシステムを創出する”という研究目標を達成するのみならず、全身投与による遺伝子治療効果としてその成果を結実した。

3. 今後の展開

ブロック共重合体により pDNA を積みこんだロッド状高分子ミセルを基盤に、構造と機能を戦略的に集約させることで、全身投与のための遺伝子キャリアの基盤技術を築くことに成功した。その成果は、膵臓がんモデルマウスに対する治療効果として結実した。今後は、治療効果と安全性をいっそう高めていく努力を継続するとともに、膵臓がんに限らず対象疾患を拡張し、局所投与を含め、「遺伝子で治せる」、「遺伝子だから治せる」という実証例を提示していく。こ

の取り組みによって、遺伝子治療の実現を加速する。一方において、pDNAを同心円状に巻かせたトロイド構造を選択的に創り出すことに最近成功している。この構造体は、転写効率が高いという特徴を持ち、またウイルスのゲノムパッケージング様式に相同することから、ウイルス様遺伝子キャリアとして期待が持たれる。ロッド型遺伝子キャリアと並んでその可能性を追求する。また、さきがけ研究を通じて得た知見は、遺伝子発現を抑制する siRNA や体内における極度の不安定性ゆえに実現されてこなかった mRNA にも展開しており、核酸治療の持つ大きなポテンシャルを実現するべく尽力する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

超高齢化社会を迎えるにあたり、革新的疾患治療法の開発が求められている。タンパク質で疾患を治療する遺伝子治療は、その一つとして期待が寄せられている。そのためには安心安全な遺伝子キャリアの開発が必須となる。本研究では、最も低侵襲かつ汎用性のある全身投与での遺伝子治療を実現するための人工の遺伝子キャリアの開発を目標に掲げ、(1)構造を理解する、(2)構造を制御する、(3)構造-機能相関を明らかにする、(4)問題点を克服する機能性分子の導入と構造制御、というスキームで戦略的に研究を進めた。研究は、高分子合成から構造評価、生物評価、動物実験までをこなす博士研究員を含む学生 4~5 名体制で行った。この間導入した、DNA のパッケージングを検証するための円二色性分光装置、遺伝子キャリアを構成する高分子を定量する超遠心機、ならびに形態観察のための原子間力顕微鏡は、基盤となる構造形成の学理研究を大いに加速し、その結果、当初計画した全身投与用遺伝子キャリア設計の基本指針を作るという目標を上回り、治療効果を検証するまで進展した。これにより、難治性である膵臓がんに対する全身投与による治療効果として成果を結実するに至っており、研究目標は十分に達成したと判断している。分子の力で DNA の折り畳みを制御し、それにより全身投与で難治性がんの治療を実証したことは、分子技術が今後の医療、社会ひいては経済活動をも変えていく原動力となることを示す一例となると自己判断している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

遺伝子治療は難治療性疾患に対する療法として注目されているが、全身投与に適する遺伝子キャリアの開発が課題であった。長田研究者は、試行錯誤的でない戦略的な分子設計による遺伝子キャリアを創出することを目的としてさきがけ研究を進めた。研究は、①遺伝子を担持したプラスミドDNA(pDNA)の量子化折り畳み構造生成の仕組み解明、②その構造生成の制御手法開発、③遺伝子送達デバイスとしての機能付与手法開発、と明快なステップを踏んで進められさきがけ研究で設定した課題を達成した。そのみならず、さらにその効果を実証するために、難治性がんとして知られる膵臓がんに対し、疾患モデルマウスにて優れた治療効果を得ることに成功する成果を上げている。この成果は、全身投与でがんへ光選択的遺伝子に成功した初めての例としてプレス発表を行い、新聞記事として報道された。当初の目標である“全身投与用遺伝子キャリア設計の基本指針を作る”を上回り、治療効果を検証するまで進展

したことは当人の大きな成長を物語るものであり、19報の論文と共に本分野のトップランナーとして注目され多くの国際学会の招待講演、共同研究につながっている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. A. Tockary, K. Osada, Q. Chen, K. Machitani, A. Dirisala, S. Uchida, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Itaka, K. Nitta, K. Nagayama, K. Kataoka, Tethered PEG crowdedness determining shape and blood circulation profile of polyplex micelle gene carriers. *Macromolecules* **46** (16) 6585-6592 (2013)
2. Z. Ge, Q. Chen, K. Osada, X. Liu, T. A. Tockary, S. Uchida, A. Dirisala, T. Ishii, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, M. Oba, M. R. Kano, K. Itaka, K. Kataoka, Targeted gene delivery by polyplex micelles with crowded PEG palisade and cRGD moiety for systemic treatment of pancreatic tumors. *Biomaterials* **35** (10) 3416-3426 (2014)
3. T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* **5** 3545 (2014)
4. A. Dirisala, K. Osada, Q. Chen, T. A. Tockary, K. Machitani, S. Osawa, X. Liu, T. Ishii, K. Miyata, M. Oba, S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, Optimized rod length of polyplex micelles for maximizing transfection efficiency and their performance in systemic gene therapy against stroma-rich pancreatic tumors. *Biomaterials* **35** (20) 5359-5368 (2014)
5. T. A. Tockary, K. Osada, Y. Motoda, S. Hiki, Q. Chen, K. M. Takeda, A. Dirisala, S. Osawa, K. Kataoka, Rod-to-globule transition of pDNA/PEG-poly(L-lysine) polyplex micelles induced by a collapsed balance between DNA rigidity and PEG crowdedness. *Small* in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1.

発明者: 片岡一則、長田健介、セオフィルス・トゥッカー

発明の名称: 核酸内包高分子ミセル複合体及びその製造方法

出願人: 科学技術振興機構、

出願日: 2013 年 8 月 6 日

出願番号: 2013-163106

PCT/JP2014/070567 (2014 年 8 月 5 日)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な海外招待講演

1. K. Osada, K. Kataoka, Block copolymer assemblies for systemic gene therapy, Seminar in Department of Chemistry, Technical University Dresden, Dresden, Germany, 2015.03.09



2. K. Osada, K. Kataoka, Control of DNA packaging in polyplex micelles for promoting gene delivery, FSU-UT Symposium “Current Trend in Nanomedicine”, Yena, Germany, 2015.03.05 (2015.03.04-05)
3. K. Osada, K. Kataoka, Control of DNA packaging in polyplex micelles for promoting gene delivery, Spring School of the CRC 1066, Mainz, Germany, 2015.03.02 (2015.03.02-04)
4. K. Osada, K. Kataoka, Nanoparticles for gene delivery, Annual meeting of the NGS-NANO, Eastern University Finland, Kuopio, Finland, 2014.06.03 (2014.06.03-04)
5. K. Osada, K. Kataoka, Control of DNA packaging for efficient gene delivery, SAS-IVF-JST Workshop, Smolenice Castle, Bratislava, Slovakia, 2013.07.11 (2013.07.09-11)

受賞

1. 新化学技術推進協会 第一回新化学技術研究奨励賞(H24. 5)
2. インテリジェント材料・システム研究会 (高木賞(H25.1)

著作物

1. 長田健介、DNA の折り畳みを操る。～高分子ミセル型遺伝子デリバリーシステムの創出～
CSJ カレントレビュー 第 24 号「化学で医療・診断・創薬の革新を目指す」日本化学会
(2015)
2. K. Osada, Development of functional polyplex micelles toward systemic gene therapy. *Polym. J.* **46** 469-475 (2014)
3. 長田健介、分子技術のナノ集合体“高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステム(DDS)”の
開発 第二次先端ウォッチング調査[社会の持続的発展のための分子技術] 日本化学会
(2014)
4. 長田健介、悶える DNA を御す 高分子 **63**, 15, (2014)
5. 長田健介、片岡一則 高分子ミセル型ドラッグデリバリーシステム(DDS)-普及のインパクト・
課題と求められる新技術- 研究開発リーダー **9**, 11, 54-59 (2013)

プレスリリース

光に反応して目的の遺伝子をがんへ届ける～三層構造高分子ミセルをベースに光応答性ナノマシンの開発に成功～ (平成 26 年 4 月 2 日(水))

発表雑誌:T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* **5** 3545 (2014)