

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

片岡 一則 ((国) 東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科 教授)

主たる共同研究者

原島 秀吉 ((国) 北海道大学大学院薬学研究科 教授)

長崎 幸夫 ((国) 筑波大学大学院数理物質科学研究科 教授)

佐々木 茂貴 ((国) 九州大学大学院薬学研究院 教授)

3. 研究内容及び成果：

3-1. 研究課題全体

この研究は、ウイルスの機能と構造に学んで、それを超越する人工的な遺伝子ベクターを創製しようとするものである。研究グループは、(1) 高分子ミセル型ナノ構造デバイス、(2) 多機能型エンベロープ構造デバイス、(3) ナノ構造デバイス構築に必要なマルチ機能性高分子の合成、(4) デバイスに搭載するインテリジェント人工核酸を合成、で構成された。

高分子ミセル型デバイスでは、親水・非イオン性連鎖であるポリエチレングリコール(PEG)とポリカチオンのブロック共重合体に、マイナスに荷電しているDNAを加え、自己組織化によって直径数10nm のミセルを形成させる。ポリカチオンとしてポリアスパラギン酸の側鎖にジエチレントリアミンを導入することによって、低毒性で極めて遺伝子発現効率の高いナノ構造デバイスの創製に成功した。これを用いて、骨芽細胞への分化誘導に働く転写因子遺伝子を発現するDNAをマウス頭頂骨の欠損モデルにおいて、*in vivo* で新生骨の形成に成功するなど、いくつかの世界初の成果を得ており、この分野で世界最先端の成果を上げている。

多機能型エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)においては、MENDの表面に細胞透過性ペプチドであるアルギニン8量体(R8)を導入することによって、子宮癌細胞においては目標とするアデノウイルスに匹敵する遺伝子導入効率を達成するなど目覚ましい成果を上げている。また、細胞内に導入後のDNAの挙動を観察することに成功し、DNAを核内に導入するだけでは発現が困難であることを明らかにして、今後の研究に対して非常に重要な情報を与えている。細胞内の複数の膜障壁(エンドソーム膜、2枚の核膜)を突破するために、異なるエンベロープが重層された多重膜MENDの構築技術も開発しており、より高度な機能性を持つMENDの誕生が期待される。

ナノ構造デバイスのための高分子設計においては、ブロック共重合技術をベースにして、センシング→プロセッシング→エフェクター活性という1連の動作を的確に行うナノデバイスのための高分子を作成している。生体適合性が高いPEGの片末端に目的細胞表面レセプターを認識するリガンドを導入し、細胞内の pH や還元性雰囲気に応答してDNAやRNAをリリースするもので、その合成に成功している。これは天然型のアンチセンスDNAより高い遺伝子発現機能を有するものである。

インテリジェント人工核酸の創製では、目的とするシトシンにクロスリンクして特異的に発現を阻害する反応性ヌクレオシドや、安定な3本鎖を形成してアンチジーン効果を示す人工核酸、核酸に反応性のニトロシル基を組み込むことによってシトシンをチミジンに変換する人工核酸の合成等に成功し、その効果の検証が進んでいる。

3-2. グループ毎

1) 片岡グループ

このグループでは、インテリジェントな機能(血液中での安定性、標的細胞への選択的取り込み、エンドソームからの脱出、効率よく且つ持続的な遺伝子発現)を持つ高分子ミセル型ナノ構造デバイスの調整とその特性評価を担当している。初年度から2年度にかけて、それまで評価系の無かった細胞内の遺伝子動態について、共焦点レーザー顕微鏡をもちいて細胞質・核内の遺伝子量を測定する方法を開発し、その後の研究の重要な基盤を確立している。

ポリエチレングリコール鎖を親水性グループとしてポリカチオンとのコンジュゲートを合成し、プラスミドDNAを内包したミセルを作成する方法の研究において、ポリカチオンの研究をすすめた。ポリアスパラギン酸の側鎖に種々のアミノ基の導入をおこない、その中からエチレンジアミン(DET)ユニットを導入したブロック共重合体 PEG-PAsp(DET) がすぐれた遺伝子導入効率を示すのみでなく、非常に毒性も低いことを見出している。この研究成果は、その後の研究の展開にとって非常に重要な意味を持つものとなった。PAsp(DET) は MEND の研究においても内核構成物質としての展開が行われている。PEG-PAsp(DET) から構成されるナノ構造デバイスによって、初代培養細胞を含めた種々の細胞に対する低毒性で効率的な遺伝子導入が可能となった。高脂血モデルマウスへのアポE遺伝子の経肺投与による血中コレステロールの低下や、マウス頭頂部の欠損モデルマウスへの分化誘導転写因子導入による骨芽細胞分化誘導などを確認し、その成果は広く注目されることとなった。今後の展開に大いに期待出来る成果である。

ナノ構造デバイスの標的細胞による取り込みの効率を上げるためのデバイス表面へのリガンドの導入や内核を構成するカチオンであるアミンの -SS- 結合導入による細胞外での安定化、デンドリマーを用いた光応答性ナノデバイスを用いたラット角膜でのルシフェラーゼの選択的発現(世界初)など、多くの世界最先端の成果を上げている。

2) 原島グループ

このグループは、多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)を中心に、デバイスの多機能化や構造体形成手法の研究を担当している。エンベロープ型ウイルスに対応するものとして、人工ウイルスとでもいうカプシドの表面を脂質2分子膜が覆う構造のナノデバイスの創製を目指すとともに、遺伝子の細胞内動態を定量的に解析する手法の開発も行っている。先の片岡グループでも細胞内の遺伝子動態の解析手法の開発が行われているが、これらの手法の開発がその後の研究に与えた影響は非常に大きいものであったと考えられる。

この手法を駆使して、ウイルスベクターと比較しながら遺伝子発現のメカニズムを明らかにしている。細胞への取り込み、取り込まれたエンドソームからの細胞質への脱出、核内への送達、核内での発現のそれぞれの段階でバリアがあり、それぞれに対応出来るデバイスが必要であることを示した。オクタアルギニン(R8)修飾MENDが細胞への優れた導入効率を示すが、非分裂細胞においては核内へ移行しにくいこと、核移行性シグナル(NLS)を表面に提示したMENDが核内への送達能力を示すこと等を明らかにしている。また、核内に導入されただけでは遺伝子の発現は十分ではなく送達時の凝縮系から解離する必要があり、外来遺伝子に対するサイレンシングや分解も起こっていることで発現効率が低下しているであろうことを推定して、そのメカニズムを明らかにしつつある。このことは、従来からの遺伝子を核内に移行すれば発現するという考え方を覆すものである。

これらのMENDを用い、in vivo で、マウス背中の毛根での遺伝子発現、腫瘍細胞でのマーカーの発現に成功している。さらに発展型として、突破しなければならない膜障壁に合わせた機能を持つ複数の

脂質膜を有する多重型MENDの開発を進めている。

3) 長崎グループ

このグループは、高分子ミセルに機能性を与えるための素材である高分子コンジュゲートの合成を担当している。高分子の精密合成技術を駆使して、インテリジェント機能をしめす結合を盛り込んだ高分子を提供している。親水性ブロックとしてPEG(ポリエチレングリコール)、その片末端にリガンド分子、他の末端に siRNA を導入した核酸医薬を指向するコンジュゲートは、細胞内で既存の lipoplex より高いルシフェラーゼ発現阻害効果を有することが確認されており、佐々木グループが合成したアンチセンスDNA を導入したコンジュゲートは、天然型アンチセンスDNA より高い遺伝子発現抑制能を有していることが確認されている。ウイルスベクターがその病原性の不安から敬遠され、合成ベクターに研究が集中しているが、このグループは、センシング→プロセッシング→エフェクター効果を示す合成キャリアの創出に成功している。その他にも、血流中から細胞内移行した際の pH 変化に応答して解離するチオエステル結合やジスルフィド結合を導入したデバイスで、高いエンドソームエスケープ能を達成し、遺伝子発現効率を高めることに成功している。

4) 佐々木グループ

このグループは、ベクターが運ぶ機能性核酸の合成を担当している。2本鎖DNAを架橋反応により発現阻害する試みでは、2-アミノ-6-ビニルプリンヌクレオチドをスルフィドで保護した誘導体がシトシンを標的としてビニル基を経由して架橋することを見出し、そのアンチセンス効果が天然型より優れていることを明らかにしている。ユニークな反応としては、S-ニトロシル-6-チオグアノシンを導入したDNAは、相補的配列との複合体を形成することで反応性が誘起されて、配列特異性と高い塩基特異性によってシトシンのアミノ基をニトロシル化、アミノ化、脱アミノ化してシトシンをデオキシウラシルに変化させることを明らかにし、ピンポイントに塩基構造を改変出来ることを示した。その効果をオリゴDNAを用いて、非細胞系ルシフェラーゼ発現系の阻害効果で確認している。

2-アミノ-6-ビニルプリンヌクレオチド誘導体を高分子ミセル型ナノ構造デバイスに搭載し、培養細胞系においてルシフェラーゼ遺伝子発現抑制効果を確認した。その効果は天然型アンチセンスよりも高いものであり、化学反応性ヌクレオチドの創製に成功している。

さらに、アンチジーン薬としての展開を目指して、3本鎖DNA形成オリゴヌクレオチドの研究も進めている。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
164	4	163	422	96	140	48	79	20	66

論文、口頭発表、講演の数、質共に群を抜いている。片岡チームの発表のみだけでなく、各グループが満遍なく発表しているところに、研究活動の順調さと成果の大きさが表れている。遺伝子の発現には多くのバリエーションがあるが、従来の研究がそれらの一つ又はいくつかを対象とするものであったのに較べて、当チームではそれらの全てに対応する手段を検討し、解決の道筋をつけてきた。臨床応用を目指す手本とも言える成果である。なかでも、遺伝子送達能が高く毒性の低い PEG-PAsp(DET) の発見や、遺伝子を核内に送達しても発現に必要な条件を整えなければ、発現に制限があることなど、この分野での画期的な成果を得ている。それぞれのグループが刺激し合い成果を競い合うと共に、PAsp(DET) を原島グループの

MEND に入れて効果を上げるなど、他のグループの成果を取り入れて得意分野で補完しあって成果を高めることに成功している。

デンドリマーの利用による光応答性の遺伝子ベクター開発は、当初の想定にはなかった新しい遺伝子発現法であり、レーザー照射法の改良によって癌などの治療法を広げ得るものと期待される。

特許についても、国内、海外共に驚異的な数の出願がなされている。この分野の研究は世界中で行われており、競争の激しい分野である。研究の成果を有効に還元するためには、知的財産の取得は非常に重要で、その意味でもきめ細かい特許出願が要請されるが、その要請に十分応えている。特に外国出願の多さが今後の進展に有利な要素となって来るであろう。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

安全性に問題のあるウイルスベクターに替わる人工ベクターの創製への期待は高い。その期待に応えるべく、高分子ミセル型とエンベロープ型のベクターの創製を目指して開始された研究であるが、2つのタイプの人工ベクターを臨床応用に近づけた成果は世界をリードするものであり、他の追随を許していない。遺伝子ベクターがいくつかのバリヤを突破するために要求される性能の各段階において成果をあげており、そのうちの何点かは従来の概念を打ち破るものであって、注目を浴びている。当初の計画と期待を上回る成果が得られており、高く評価できる。このチームが引き続き新たな CREST の研究領域で採択されたことは、ここまで進んだ成果を応用へ持って行くために、非常に喜ばしいことである。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○ 受賞

2002年 薬学会学術振興賞 佐々木 茂貴 教授

2004年 Fellow of the International Union of Societies for Biomaterials Science and Engineering
片岡 一則 教授

2005年 Clemson Award for Basic Research Winner 片岡 一則 教授

○ 研究成果が評価され、平成18年度募集の CREST研究領域「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」に採択され、チームに医療関係研究者・企業を加えて、「具体的に医療現場で使えるもの」を目指して発展させることとなった。

共同研究者が定期的にミーティングを行い、成果を競い合うことによって、お互いの長所や短所を自覚することができ相乗効果があった、とのことであり、チームとして非常に効果的なマネジメントがなされていたことを特筆しておきたい。