

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成13年度採択研究代表者

片岡 一則

(東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

本研究のコンセプトは、ウイルスの機能と構造に学びつつ、合成高分子や脂質分子の的確な自己組織化を通じて、ウイルスの宿主細胞への感染機能を模したナノ構造デバイスを構築し、さらには、磁場や熱などの外場応答機能や天然の核酸医薬を越える機能性人工核酸の搭載、遺伝子以外の薬物やセンサー物質を標的細胞に送達するといった、いわば天然のウイルス機能を超越するインテリジェント・ナノ構造デバイスを創製する事である。このような「インテリジェント・ナノ構造デバイス」は、ウイルスベクターに代わる安全かつ高機能の合成ベクターとして遺伝子治療分野において広範な応用が期待出来るとともに、数々の知的資産の形成を通じて新産業の育成にも貢献する事が確信される。

本プロジェクトの第四年目に相当する平成16年度においては、昨年度に引き続いてデバイスへのインテリジェント機能の創り込みを効率的に推進し、in vivoにおける治療効果の確認に成功するという当初目標を大幅に上回る進捗を示した。さらに、今後のin vivo展開を加速するためのデバイス構造設計を推進するとともに、高い遺伝子発現効果や機能性核酸効果を導くメカニズムの解明についても本格的な取り組みを行っている。すなわち、①スムーズな細胞質内移行を示すナノ構造デバイスの構築とin vivo局所投与による遺伝子治療効果の確認、②3層構造型インテリジェント・ナノ構造デバイスによる固形がん選択的遺伝子デリバリーの達成、③非分裂型細胞への効率的遺伝子導入を目指したナノ構造デバイスの開発、④インテリジェント人工核酸のナノ構造デバイスへの搭載と細胞系での機能検証、⑤細胞内動態解析等を駆使したナノ構造デバイス機能発現メカニズムの解明、という主要5項目に関してグループ内の緊密な連携の元、系統的な研究を実施した。

2. 研究実施内容

片岡グループ

片岡グループでは、細胞内還元環境下において効率良く内包DNAを放出する架橋型ナノ構造デバイスの構造最適化を引き続き行うとともに、スムーズな細胞質内移行を達成可能なデバイス構造の特定に成功し、in vivo局所投与による優れた遺伝子治療効果を確認した。さらに、血流中での安定性と細胞内環境におけるスムーズな内包DNA放出を実現可能

な3層構造デバイスの構築にも成功している。また、今後のin vivo展開を加速するためのブロック共重合体設計を系統的に推進するとともに、その過程において、これまで知られていない新規エンベロープ型ナノ構造デバイス (PICsome) の構築条件を特定する事にも成功した。一方、デバイスに内包されたDNAの凝縮構造と遺伝子発現能についても検討を行い、規則的な折れ畳み構造を保持する形でのDNA格納が高い遺伝子発現を達成する上で重要である事を見出している。以下、項目ごとに成果を詳細に説明する。

1) 高分子ミセル型ナノ構造デバイスへの環境応答型架橋の導入効果

昨年度までに、ポリエチレングリコール-ポリ(L-リシン) (PEG-PLL) ブロック共重合体のカチオン連鎖上の荷電密度を適度に減少させる形でチオール基を導入することによって、ジスルフィド結合の架橋形成による細胞外での高い安定性と細胞内還元環境下での架橋開裂、さらには荷電密度の低下に基づく細胞内での速やかなpDNA放出を達成し、遺伝子導入効率を飛躍的に向上させることに成功した。本年度は荷電密度制御をより厳密に推し進める形で、エステル-アミド交換反応を用いて、pKaの高いリシン残基とpKaの低いモルホリン残基をポリカチオン連鎖にランダムに配置したブロック共重合体を新たに合成し、これより調製したナノ構造デバイスについて培養細胞への遺伝子導入と無細胞系での転写実験の比較を行った。その結果、荷電密度の過度の増加はデバイスからのpDNA放出を妨げ、無細胞系での転写効率を下げる事が判明した。すなわち、細胞内動態面からはナノ構造デバイスの安定性を高める事が有効であるが、一方、転写過程においては速やかなデバイスの不安定化に基づくpDNA放出の達成が重要であり、この点で細胞内環境応答型架橋と精密な荷電密度制御を併せ持ったナノ構造デバイスを構築するという本研究戦略の妥当性が確認された。また架橋導入率を変えた詳細な検討より、架橋率13%以上のナノ構造デバイスにおいて、賦形剤なしでの凍結乾燥保存が可能である事を明らかとした。一方、分子量の低いアンチセンス核酸 (ODN) 内包デバイスにおいては、荷電密度低下は大幅な安定性低下につながり、むしろ荷電密度を維持した形での架橋導入が最も高い効果を示す事も判明した。以上より、内包DNAのサイズに応じて荷電密度を制御しつつ架橋を導入するという、架橋型ナノ構造デバイスの分子設計戦略を確立する事が出来た。

2) 高分子ミセル型ナノ構造デバイスによる非分裂性初代肝細胞への遺伝子導入

非分裂性初代細胞に対するナノ構造デバイスの有効性を実証するため、デバイス表層部に肝細胞アシアロ糖タンパクレセプターのリガンドとして機能するラクトースを導入し、単層培養したラット初代肝細胞に対し遺伝子発現効率を評価したところ、ラクトース導入ナノ構造デバイスは非導入型と比べ数倍高い遺伝子発現量を与えた。この結果は、適切なリガンドをデバイス表層部に導入する事によって、非分裂性初代培養細胞に対して外来遺伝子を効率良く導入できることを示している。しかし単層培養系による評価結果は、in vivoでのデバイス機能を十分に反映しているとは限らない。例えば、単層培養系では細胞を飽和状態まで成長させるとその生存能力が急激に減少し、ナノ構造デバイスと細胞との相互作用を長期間観測することが困難である。そこで臨床応用に適するナノ構造デバイスのin vivo挙動を、より正確に評価できるモデル実験系として、三次元的な細胞培養が可

能な「スフェロイド培養細胞系」を用い、肝細胞での遺伝子発現量を評価した。スフェロイド培養された肝細胞は分化状態を長期間にわたって高く維持でき、細胞特性として *in vivo* に近い状態となる。非ウイルス性遺伝子ベクター開発においては、遺伝子発現量の大小のみならず、遺伝子発現の時空間的制御を考慮した設計が重要であり、生体内の組織に近いスフェロイド培養系を用いた長期の評価は、臨床応用が可能なナノ構造デバイスを設計する上では非常に重要な評価系と位置づけられる。非架橋型ナノ構造デバイスでは肝スフェロイドに対して発現が認められないのに対し、項目 1) で開発した架橋型デバイスでは時間依存的に遺伝子発現量の増大が確認された。ここで遺伝子発現はナノ構造デバイス投与から3~5日が経過した時点で確認され、共焦点顕微鏡観察による評価と併せて、従来の株化ガン細胞による評価では困難だったナノ構造デバイスによる遺伝子発現の時空間プロファイルが観測できるようになった。なお、既存ベクターであるポリエチレンイミン (PEI) とリポフェクタミンによる対照実験では顕著な細胞毒性が認められたことから、高分子ミセル型ナノ構造デバイスは低毒性の点からも初代培養細胞に対する優れた遺伝子導入系であると結論された。

3) スフェロイド培養細胞への抗がん剤内包ナノ構造デバイスの組織浸透性と *in vivo* との相関

固形がん組織は細胞間マトリクスによって緻密な構造を形成し、血管から遠い組織深層部までは酸素や栄養物質が浸透するのに限界がある。このような組織浸透性の問題は、遺伝子・人工核酸・薬物などを組織内の標的細胞に正確かつ安定に送達し、細胞内環境変化と連動し選択的に機能するインテリジェント・ナノ構造デバイスを設計する上でも極めて重要な課題である。この点で、従来より用いられている単層培養系では細胞が平面状に並び3次元的な組織を形成できないため、適切なモデル実験系にはなり得ない。そこで本研究では、項目 2) で用いたスフェロイド培養の手法をがん細胞系にも適用し、かつ浸透性を

追跡するプローブとして蛍光性の制がん剤であるアドリアマイシン (ADR) を内包するナノ構造デバイスを構築して検討を行った。このナノ構造デバイスは、粒径約60 nmであり、pHが4~5に低下する細胞内後期エンドソームで選択的にADRを放出して蛍光を発するように設計してある事が特徴である。図1に示すように、このナノ構造デバイスはスフェロイドの表面から約100 μm 離れた中心部に位置する細胞まで到達し、内包するADR

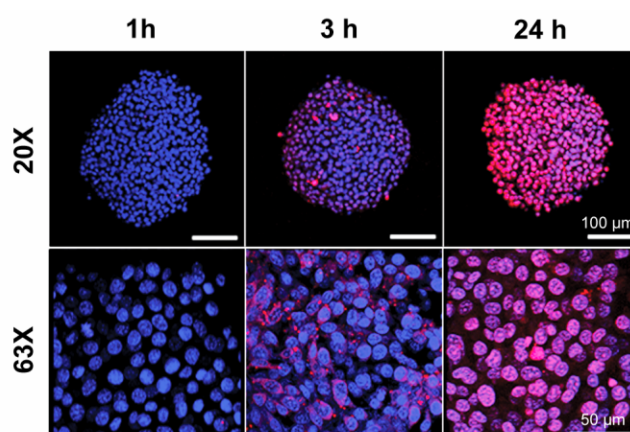


図1 がんスフェロイド内部へのナノ構造デバイスの浸透性評価

を細胞内pHに応答して選択的に放出し得る事が明らかである。これより、高分子ミセル型

ナノ構造デバイスは高い組織浸透性を有し、固形がんをはじめとして、緻密な体内組織の内部に存在する標的細胞の治療に効果的である事が示唆された。

4) 標的指向性リガンド導入ナノ構造デバイスの創製とin vivo への展開

ナノ構造デバイスの全身投与では、血流による移動や拡散の影響が大きく作用し、デバイスを標的細胞に選択的に取り込ませるには困難を伴う。従って疾患部位を認識する機能をデバイス表層に装着させ、能動的標的指向性を向上させることが有効な解決策となり得る。ここでは、血管新生や血管内膜肥厚、悪性腫瘍の増殖・転移に関与する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを認識する環状RGDペプチドをデバイスに装着させ、その効果を検討した。すなわち、PEG末端にアルデヒド基を有するPEG-PLLに、N末端にCys残基を有するcyclo(RGDfK)ペプチドをチアゾリジン環を介して導入した。このリガンド導入高分子とpDNAより調製されるナノ構造デバイスについて数種類の培養細胞を用いて遺伝子導入効率を評価したところ、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを有するHeLa細胞において特異的に遺伝子発現効率が上昇した。また、HeLa細胞においてはcyclo(RGDfK)化ナノ構造デバイスの取り込み増加も確認された。このペプチドリガンド導入法は、N末端にCys残基を有する全てのペプチドに適用でき、ファージディスプレイ法によって臓器及び疾患特異的に集積するペプチド配列が見つけられている昨今、用途に応じて様々なペプチドリガンドをデバイスの表層に賦与させることが可能となる点でも重要な進展である。また、がん細胞には葉酸レセプターが過剰発現していることが知られており、葉酸を利用したactive targetingも有望である。そこで本年度は、ヒドラジド型葉酸の新規合成経路を開発する（特許出願済み）とともにデバイス表層への装着を行った。この他にも汎用性の高いリガンド導入法として、水中で反応が行えるアルキンとアジド化合物による1,3-双極付加反応に着目し、末端にアルキンを導入した新規ヘテロ二官能性PEGの合成法を確立しつつある。

5) ナノ構造デバイスの高度インテリジェント化へ向けての新規ブロック共重合体の開発

昨年度までに α 末端にアセタール基を有するPEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体の合成ルートを確立し、リガンドであるラクトースやオリゴペプチドの α 末端への導入に成功した。また、PEG-ポリ(β -ベンジルアスパルテート) (PEG-PBLA) の側鎖ベンジル基の定量的アミノリシスにより種々のアミノ基を導入したブロック共重合体を得る方法論を確立し、後述するin vivo適用型ナノ構造デバイス構築へ応用しつつある。本年度は、広範囲なin vivo遺伝子治療に活用可能な高度インテリジェントナノ構造デバイスの構築に向けて、①pHや還元環境に応答してPEGが脱離するブロック共重合体と、②ナノ構造デバイスの血中滞留性向上を目的とした新規2本鎖PEGの合成経路確立、という2項目を重点的に検討した。

pH開裂型ブロック共重合体に関しては、弱酸性条件下で速やかに開裂するアセタール誘導体をPEGの片末端にリンカーとして導入し、この末端からアミノ酸の酸無水物であるNCAを重合させる設計とした。リンカーには5員環の1,3-dioxolaneや6員環の1,3-dioxane誘導体を採用し、種々のアセタール化合物の合成に成功した。現在、これらのアセタール化合物とPEGとのカップリングにより得られた誘導体をマクロ開始剤として、NCAの重合検討を

行っている。還元環境開裂型ブロック共重合体としては、ブロック連結部分に細胞内還元環境で開裂するジスルフィド結合を有する高分子を開発した。この高分子とpDNAとから形成されるナノ構造デバイスは、細胞外ではPEGによりpDNAを安定に内包しつつも、標的細胞内の還元環境下ではPEGの脱離によりデバイスの安定性が著しく低下し、pDNAの速やかな放出が促進されるシステムとなる。一方、2本鎖PEGの合成では、水酸基を2つ有するグリセロール誘導体を開始剤としてエチレンオキシドの重合を行い、V字型（ペガサス型）PEGの合成に成功した。この2本鎖PEGからA₂B型ブロック共重合体への展開が可能であり、ナノ構造デバイス表層のPEG密度制御が容易になるものと期待される。

また、外部環境応答型デバイス設計の一環として、温度応答性のポリ(2-イソプロピル-2-オキサゾリン) (PiPrOx)の精密重合とω末端への1級アミノ基の定量的導入をこれまでに確立したが、本年度はさらに、このMe-PiPrOx-NH₂をマクロイニシエーターとして、NCAの開環重合を行い、PiPrOxとポリアミノ酸からなる荷電性ブロック共重合体を定量的に合成する経路を確立した。PiPrOx鎖を表層に有するナノ構造デバイスは明確な温度応答性を示すことから、局所加熱による遺伝子発現のon-off制御への展開が期待される。

6) S1ヌクレアーゼによる凝縮DNAの位置特異的分解反応と無細胞系による評価

pDNA内包ナノ構造デバイスの構造・物性並びに内包pDNAの凝縮過程解明という基盤的側面から、凝縮DNAの最適形態についての知見をもとにデバイス設計指針を確立する事を目指し、AFMによる構造観察及び一本鎖DNAを特異的に切断する核酸分解酵素S1ヌクレアーゼを用いてpDNA上の解離している二重らせんの位置特定を行った。その結果、pDNAが棒状あるいはトロイド状に凝縮している混合比(N/P比)0.7-1.5において、pDNAは全長に対し10/12, 9/12, 8/12, 6/12, 4/12, 3/12, 2/12の長さの7つの断片へと切断された。この規則的断片化はpDNAの種類に依存しない一般的性質である。ブロック共重合体との複合体形成に伴うpDNAの凝縮過程においては、pDNAは超らせん構造を保持しつつ凝縮を強いられることに起因し、環状DNAに特有の構造上のストレスが生じるが、pDNAはこれを緩和させるため回文(パリンδροーム)配列領域の二次構造を十字構造(クルシフォーム)へと転移させ、その高次構造を小さくする。この結果生じた一本鎖ループをS1ヌクレアーゼが切断するというスキームで規則的断片化を説明することに成功している。

一方、N/P比が2以上の領域ではpDNAはより高度に凝縮し球状構造をとるが、S1ヌクレアーゼにより非特異切断されることから、凝縮度の高い二重らせんにおいて非特異的な解離が生じている事が示唆された。この凝縮様式の違いと遺伝子発現との相関を明らかにするために、無細胞系遺伝子発現を検討したところ、過剰に小さく凝縮されたpDNAからの発現は見られなかった。この結果は遺伝子発現を目的としたベクターの開発において、過度の凝縮をもたらす「より小さいベクター設計」ではなく、生理的な凝縮度でベクターを調製することで「より発現能の高いベクター設計」が可能であることを示唆するものであり、これまでにない新しいベクター設計指針の発見である。

7) 細胞内移行促進機能を有するマルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの構築と機能評価

ナノ構造デバイスによる標的細胞での効率的な遺伝子導入実現には、デバイスの細胞内

への侵入経路であるエンドソームから細胞質への移行効率向上が重要であるが、本プロジェクトでは、(1)ブロック共重合体側鎖への細胞質移行促進セグメントの導入、(2)光エネルギーを利用した移行効率の促進という2つの方法でこの問題にアプローチしている。前者において昨年度は、複合体形成と細胞質内移行性促進のため、2種類の異なるアミノ基を単一側鎖内に導入したブロック共重合体を用いるという機能分担型分子設計の有効性を実証したが、本年度は側鎖カチオン構造の最適化を行い、ジエチレントリアミンを導入したブロック共重合体(PEG-DET: 図2)が、既存の遺伝子ベクター(ExGen500等)よりも極めて低毒性でありながらも高い遺伝子発現活性を有し、これまで非ウイルスベクターでは導入が困難であった血管内皮前駆細胞やヒト滑膜由来初代繊維芽細胞等の初代細胞系にも効率的に遺伝子導入できることが確認された。

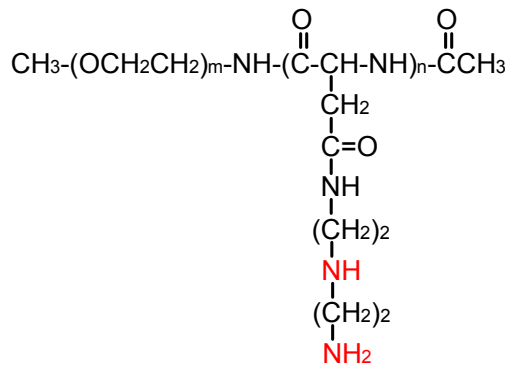


図2 細胞質内移行促進効果を有するブロック共重合体構造 (PEG-DET)

続いて、この機能分担型分子設計概念をさらに拡張し、生体適合性セグメント、バッファー能を有する低pKaカチオンセグメント及びpDNAを凝縮させるための高pKaカチオンセグメントの3種の異なる機能性セグメントを直列に連結したA-B-C型三元ブロック共重合体を新たに設計した。この三元ブロック共重合体からは、約90nmの粒径で中性の表面電位を有し、pDNAを凝縮した内核、バッファー能を有する中間層および生体適合性のPEG外殻からなる3層構造型のナノ構造デバイスの構築が可能である。このデバイスは、中間層のバッファー効果により従来型デバイスと比較して、培養細胞に対して約50倍の遺伝子発現を実現した。

一方、光を利用するシステムについて本年度は、核移行シグナルを有するカチオン性ペプチドとDNAからなる複合体の表面にアニオン性の dendrimer 型光増感剤を配列させた新規三元系ナノ構造デバイスを構築した。この三元系ナノ構造デバイスは、長期培養においても極めて低毒性であり、培養がん細胞に対し200倍の光選択的遺伝子導入を実現することが確認された。また、本システムは次の項目にも記述するように、in vivoにおいても光選択的遺伝子導入が可能である事が明らかとなりつつある。

8) マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスのin vivo機能評価

本年度は、項目7)で開発した細胞内移行促進機能を有するナノ構造デバイス(PEG-DET系)のin vivo機能評価を重点的に行った。まず、固形がんのin vitro実験モデルとしてがん細胞スフェロイドに対しPEG-DETデバイスによる蛍光タンパク(YFP)発現pDNAの遺伝子導入を評価したところ、スフェロイド内部での長期に渡る遺伝子導入が達成された。次に、in vivo遺伝子治療評価系として、骨芽細胞への分化誘導に働く転写因子遺伝子(Runx2)発現pDNAとPEG-DETから形成されたナノ構造デバイスをヒドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中に包含し、マウス頭頂骨の骨欠損モデルに対して適用した。そ

の結果、移植部におけるRunx2遺伝子の長期持続的発現による骨芽細胞分化誘導が得られ、担体周囲での新生骨形成が明瞭に観察された(図3)。この結果は、ウイルス型及び非ウイルス型を問わず遺伝子治療によるin vivo骨再生に成功した世界で初めての例である。

また経肺投与では、既存の最も強力な非ウイルス型遺伝子ベクターであるPEI

(ExGen500) に比べて1000倍以上のレポーター遺伝子発現を導く事に成功し、かつ毒性面においても、顕著な急性毒性のために投与マウスのお大半が死亡するExGen500に対して、PEG-DET系では全く毒性を示さず、死亡例も皆無であった。さらに、循環器分野での治療応用を視野に入れて、高脂血症モデル動物であるアポE欠損マウスに対して、アポE遺伝子をPEG-DETナノ構造デバイスの経肺投与によって導入したところ、血中コレステロール濃度が有意に低下することが確認された。さらに、PEG-DET系デバイスを筋組織内に投与したところ、2ヶ月以上の長期に渡り遺伝子発現が維持されることが確認された。この様に、低毒性と効率的な遺伝子導入を実現したPEG-DETナノ構造デバイスは、in vivo局所遺伝子治療において、既存システムを凌駕する実用上極めて有用な遺伝子ベクターであると考えられる。

一方、全身投与による標的選択的な遺伝子デリバリーの実現には、効率的な遺伝子発現と低毒性に加え、血流中でナノ構造デバイスが解離せずに安定に循環できる特性が必要となる。A-B-C型三元ブロック共重合体から形成される3層構造型ナノ構造デバイスは、遊離のポリマーが存在しない条件において高い遺伝子発現を達成することから、全身投与による遺伝子デリバリーに応用可能であると考えられる。本研究では、担がんマウスの尾静脈より3層構造型ナノ構造デバイスを全身投与したところ、固形がん特異的に遺伝子発現が誘導できることが明らかとなった。このような固形がん選択的遺伝子発現はプラスミドの単独投与では達成されず、また汎用遺伝子ベクターであるPEIによる静脈内投与ではすべてのマウスが毒性死したことから、3層構造型ナノ構造デバイスは全身投与による遺伝子デリバリーに極めて有用であると考えられる。

本年度はさらに、光エネルギーを利用したシステムに関しても、ラット結膜への遺伝子導入を試みた。 dendriマー型光増感剤を表面に有する三元系ナノ構造デバイスを結膜内に投与し、半導体レーザーを用いて光照射を行ったところ、光照射部位のみに蛍光タンパクの遺伝子発現を誘導できることが確認された(図4)。この結果は、in vivoにおいて光照射により遺伝子ベクターの機能発現の時空間制御を実現した世界で初めて

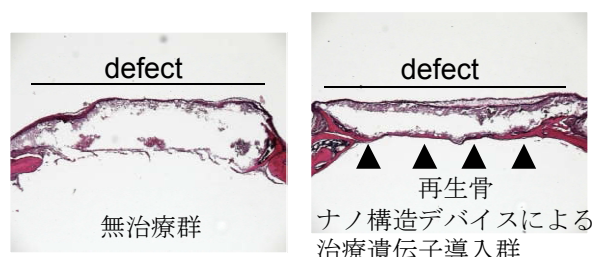


図3. PEG-DET型ナノ構造デバイスを利用したRunx2遺伝子導入による骨再生

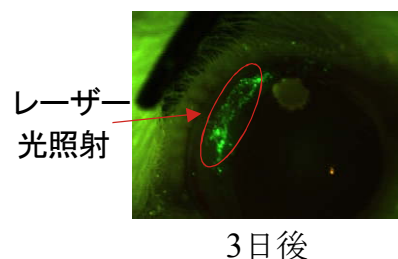


図4. 3元系ナノ構造デバイスのラット結膜への光選択的遺伝子導入

の研究例である。

本年度は上記の通り、種々のインテリジェント・ナノ構造デバイスによる *in vivo* 遺伝子導入に成功した。これらの実験事実は、ナノ構造デバイスが他の遺伝子ベクターと比較して、効率的な遺伝子発現と低毒性を実現していることを実証するものであり、またレポーター遺伝子のみならず治療遺伝子の導入により治療効果を確認できたことは当初の計画をはるかに上回る進捗状況であると言える。

9) 内水相を有する新規エンベロープ型ナノ構造デバイスの創製

上記1)～8)の項目を展開する過程において、一定の条件下で反対荷電を有するブロック共重合体ペアを混和させると、 μm サイズのリポソーム状中空構造を有する全く新しい会合体 (PICsome) が形成される事を発見した。このブロック共重合体ペアは同一ポリマーを出発物質とするため、高度に分子量と分子量分布が制御されているため、ポリオンコンプレックス (PIC) 形成によって均一な膜構造を形成するのに有利であるものと考えられる。水溶性薬物や遺伝子等の内包が可能な高分子系中空会合体が有機溶媒を要するプロセスを経ずに、水溶液中において静電相互作用を形成駆動力として形成されることが見出されたのは世界で初めてであり、今後、新しい形のエンベロープ型ナノ構造デバイスとしての展開が期待できる。さらに前述の温度応答性 P iPrOx 型ブロック共重合体と PEG 型ブロック共重合体を組み合わせる事によって温度応答性 PICsome の形成も可能であり、インテリジェント機能の賦与も期待される。

原島グループ

原島グループでは、多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス (MEND) 構築のための基本計画として、機能性素子のエンベロープへの組み込み技術の確立、コア構造の制御と最適化、基本アSEMBリー技術の確立、の3段階で研究を進めている。本年度は特に、*in vivo* を指向した多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイスの構築、遺伝子の細胞内動態の定量的評価系の構築とその応用、核内動態制御に関する検討、の3項目について重点的に研究を展開した。以下にその詳細を報告する。

1) *in vivo* を指向した多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイスの構築

前年度報告した脂質膜水和法によって構築した MEND は、粒子径が大きく均一性を欠くものであった。これは *in vivo* への応用を考えた場合に非常に不利であるので、粒子径が小さく均一な MEND を構築するために新しい構築方法である SUV*fusion 法を開発・確立した。SUV*fusion 法で構築した MEND は、粒子径が小さく (150nm) 均一なものであった。さらに *in vivo* を指向して、エンベロープに配置された PEG 先端に、特異的リガンドであるトランスフェリン (Tf) を化学的に修飾するとともに、エンドソーム脱出素子である pH 応答性膜融合ペプチド GALA をエンベロープ表面と PEG 先端に修飾した、Tf-MEND (GALA) を構築することに成功した。遺伝子発現活性を測定したところ、2種類の GALA 誘導体を導入することによって、遺伝子発現活性を 100 倍にも向上させることに成功した。次年度は、この MEND を用いて *in vivo* における MEND の遺伝子発現能力の評価を行うとともに、強力な遺伝子発現活性を有する R8-MEND の *in vivo* (局所投与) への応用を検討する。

2) 遺伝子の細胞内動態の定量的評価系の構築とその応用

平成15年度において確立した細胞内動態評価系を用い、ウイルスベクターの代表としてアデノウイルスを、人工ベクターの代表としてLipoplexを用いて、両者の細胞内動態の比較検討を行った。その結果、人工ウイルスにおいては、アデノウイルスと同程度の発現を示すのに、数千倍の遺伝子量が必要である事、そのような大きな遺伝子発現効率の差の原因は、核内転写効率に由来する事を明らかとした。また、プロタミンは核移行性因子として有用である事がこれまで示唆されてきたが、そのメカニズムは不明であった。我々は、細胞質内マイクロインジェクションと核内マイクロインジェクションを組み合わせ、核移行効率と核内転写効率を分離評価する方法論を確立し、その結果、プロタミン/プラスミドDNA複合体は、poly-L-lysine等と比較し、有意に高い核移行性と核内転写効率を併せ持つ事を明らかとした。

3) 核内動態制御に関する検討

核内において外来DNAが断片化・メチル化されていること、DNA 1コピー当たりの発現量が急激に減少すること (silencing)、及びこのsilencingはメチル化に依存しないことを *in vivo*で見出した。おそらくヒストン修飾が原因と思われる。また、複製型プラスミドは、効率よく蛋白質を発現することを見出した。次年度は、DNA量や発現量低下の原因となりうるヒストン修飾及びDNAメチル化を制御する方法を検討する。また、核からの排出によるDNA量低下を克服するため、本年度は、核内に安定に保持されるための遺伝子配列の探索を開始し、これを現在、継続中である。一方、センス一本鎖にオリゴヌクレオチドをアニーリングさせたtailed二本鎖DNAを用いることにより、修復効率が従来法の約20倍に上昇することを見出した。次年度は、本年度に開発したこの新規修復用DNA断片によるゲノムDNA変異の修復を培養細胞と *in vivo*で行うことを計画している。

長崎グループ

本グループでは、センシング→プロセッシング→エフェクター活性という一連の動作を的確に行うインテリジェント・ナノ構造デバイスの構築にとって不可欠なマルチ機能性高分子の精密分子設計を目的とし、本年度は下記に示す3項目を重点的に検討した。

1) 機能性核酸およびsiRNA搭載のためのインテリジェント・ナノ構造デバイスの機能評価

PEG末端に官能基（ラクトース基およびフェニルアセタール基）を有し、細胞内環境応答性結合（エステル結合およびジスルフィド結合）を介して、アンチセンスDNAをPEGに連結させたアンチセンスDNA-PEGコンジュゲート（ブロック共重合体）の調製に成功した。また同様に、siRNA-PEGコンジュゲートおよび機能性核酸-PEGコンジュゲートの調製にも成功した。これらコンジュゲートは、生理条件下でポリカチオンと混合することにより100 nm程度の単分散なナノ構造デバイスを形成することが明らかとなった。さらに、これらナノ構造デバイスは、DNA分解酵素および血清存在下においても安定に存在し、エンド

ソーム内pH環境および細胞質内還元環境に応答し、PEGと核酸医薬のつなぎ目に存在する細胞内環境応答性結合が切断されることを確認した。また、ラクトース受容体を表面に有する培養細胞系(HuH-7細胞)において本インテリジェント・ナノ構造デバイスの機能の評価したところ、ラクトース基(リガンド分子)、環境応答性結合および佐々木らが創製した機能性核酸が効果的に機能し、既存のlipoplex型ベクターよりもはるかに高い遺伝子発現抑制効果を示すことに成功するなど、当初計画を上回る進捗を達成した。

2) 新規pH応答性PEG化ブロック共重合体によるインテリジェント・ナノ構造デバイスの構築と機能評価

これまでの研究から、遺伝子導入においては、エンドソーム及びリソソームから細胞質への移行過程(エンドソームエスケープ)が大きなハードルであることが明らかとなってきた。したがって新たに、細胞内エンドソームpHに応答してダイナミックな構造変化(コンホメーション転移)を誘起し、スムーズなエンドソームエスケープを惹起する新規pH応答性ポリマー(ポリサイラミン(PSA0))並びにDNAを効率よく保持する機能を有するポリメタクリル酸2-*N,N*-ジメチルアミノエチル(PAMA)という2つのセグメントを一本の連鎖中に有するPEG化ブロック共重合体を合成し、これよりpDNAを内包する新規インテリジェント・ナノ構造デバイスを構築した。培養細胞系(HuH-7細胞)においてこのpH応答型インテリジェント・ナノ構造デバイスを評価したところ、PSA0鎖のコンホメーション転移に基づくと考えられるエンドソームエスケープの惹起により、高い遺伝子発現効率を達成することに成功した。

3) PEG化量子ドットを用いた細胞内動態の新規定量法の確立

上記項目3)で合成法を確立した、ヘテロ二官能性PEGおよび末端官能基を有するPEG/PAMAブロック共重合体を用い、粒径制御可能なPEG化半導体量子ドット(CdSeおよびCdS)の簡便な調製法を開発した。これらPEG化半導体量子ドットは、生理条件下においても高い分散安定性と強い発光を維持し、かつ粒径により発光色を制御できることを確認した。さらに、PEG化量子ドットのPEG末端にリガンド分子を導入する事によって、特定の生体分子を認識し、かつPEG化量子ドットと蛍光ラベルを施した生体分子間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した高感度生体分子検出法を確立した。

佐々木グループ

佐々木グループでは、高分子ミセル型ナノ構造デバイスに搭載する機能性核酸の設計と機能発現の検討を行っている。本年度は、クロスリンク核酸の細胞内アンチセンス効果の評価、アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン評価および特異的かつ効率的な塩基変換を達成する機能性核酸を用いた機能評価の3点を中心に検討を行った。以下に具体的な成果を詳述する。

1) クロスリンク核酸-PEGコンジュゲート体を用いた細胞内アンチセンス効果の評価

昨年度合成した、クロスリンク核酸-PEGコンジュゲートを用いてアンチセンス効果を長崎グループとの連携の元、ルシフェラーゼ(Firefly/Renillaルシフェラーゼ)発現細胞を

用いて評価した。その結果、クロスリンク核酸-PEGコンジュゲートとポリリシンのポリイオンコンプレックス (PIC) ミセル型デバイスでは、 $10\ \mu\text{M}$ で約80%の阻害効果を示し、天然型アンチセンス核酸 (PIC化したもので約50%の阻害効果) に比べたクロスリンク核酸の高い有効性が確認された。さらに天然型アンチセンス核酸ではフルマッチの配列とミスマッチをひとつ含む配列でその阻害効果にはほとんど差が見られなかったが、クロスリンク核酸ではミスマッチをひとつ含む配列では阻害効果の増強作用はみられず、クロスリンク核酸の高い配列認識能が示された。次年度以降は、病態モデル動物を用いて長崎および片岡らと共同でin vivo評価へと展開する計画である。

2) アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン評価

本研究グループでは遺伝子センシングのこれまでの限界を拡張する可能性のある人工塩基としてWNAを設計している。これらの分子は従来アンチジーン法ではセンシングできなかった遺伝子領域をも標的化することを可能にするものであり、遺伝子そのものを標的とする技術を大きく発展させることが可能である。本年度は、従来天然型の核酸では阻害できなかった遺伝子を標的にした細胞内におけるアンチジーン効果について検討した。まずWNAを含むオリゴDNAのPEGコンジュゲート体を合成し、片岡グループとの連携のもと、細胞内内在性遺伝子であるc-mycを標的としたアンチジーン効果を調べた。その結果PEGコンジュゲートとポリリシンのポリイオンコンプレックス (PIC) ミセル型デバイスでは有意な阻害効果は観測されなかった。そこで、設計戦略を変更し、末端にアミノ基を有するWNAを含むオリゴDNAを片岡グループ項目7) に示した機能分担型カチオン性ブロック共重合体からなるナノ構造デバイスにポリイオンコンプレックス形成を利用して搭載し、同様の評価を行ったところ、 $1\ \mu\text{M}$ という極めて低い濃度においても非常に高いアンチジーン効果に基づく細胞の増殖阻害が観測された。本結果はアンチジーン核酸のin vivo展開の可能性を示すものであり、今後、詳細な細胞実験を行うとともに、in vivo評価へと展開する予定である。

3) 塩基変換を達成する機能性核酸を用いた機能評価

昨年度までにS-ニトロシル化チオグアノシンを含むオリゴDNAが、シトシンに対して選択的にNOを転移し、配列および塩基特異的に塩基構造を変化させることを明らかにした。本年度はまずS-ニトロシル化チオグアノシンを含むオリゴDNAと反応させた標的オリゴDNAをテンプレートにして、in vitroにおいてポリメラーゼによる伸長反応を検討した。その結果、NO転移反応の後、標的オリゴDNAを酸処理した時、NOが転移したシトシンに対してアデノシンが取り込まれたDNAが伸長されることがわかった。この結果はS-ニトロシル化チオグアノシンがピンポイント的に標的であるシトシンからチミンへの点変異を誘導していることを示唆している。次に6-チオグアノシンを含むオリゴDNAのPEGコンジュゲート体を用いて、テロメラーゼの鋳型RNAを標的にして細胞内における効果を調べた。細胞内ではNOが高濃度存在すると考えられ、6-チオグアノシンが細胞内でS-ニトロシル化チオグアノシンに変換されNO転移反応が進行するものと期待したが、細胞増殖の阻害は観測されなかった。この原因として、前述したようにPEGコンジュゲート体ではアンチジーン効果

が観測されないことからPEGコンジュゲートオリゴDNAが核内に到達していない可能性が考えられるため、今後は、末端にアミノ基を有する6-チオグアノシンを含むオリゴDNAを用いて細胞内における効果について検討する予定である。

3. 研究実施体制

片岡グループ

- ① 研究分担グループ長：片岡 一則（東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科、教授）
- ② 研究項目：
 - ㉠高分子ミセル型ナノ構造デバイスへの環境応答型架橋の導入効果
 - ㉡高分子ミセル型ナノ構造デバイスによる非分裂性初代肝細胞への遺伝子導入
 - ㉢スフェロイド培養細胞への抗がん剤内包ナノ構造デバイスの組織浸透性と *in vivo* との相関
 - ㉣標的指向性リガンド導入ナノ構造デバイスの創製と *in vivo* への展開
 - ㉤ナノ構造デバイスの高度インテリジェント化へ向けての新規ブロック共重合体の開発
 - ㉥S1ヌクレアーゼによる凝縮DNAの位置特異的分解反応と無細胞系による評価
 - ㉦細胞内移行促進機能を有するマルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの構築と機能評価
 - ㉧マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの *in vivo* 機能評価
 - ㉨内水相を有する新規エンベロープ型ナノ構造デバイスの創製

原島グループ

- ① 研究分担グループ長：原島 秀吉（北海道大学大学院薬学研究科、教授）
- ② 研究項目：
 - ㉠ *in vivo* を指向した多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイスの構築
 - ㉡遺伝子の細胞内動態の定量的評価系の構築とその応用
 - ㉢核内動態制御に関する検討

長崎グループ

- ① 研究分担グループ長：長崎 幸夫（筑波大学大学院数理物質科学研究科、教授）
- ② 研究項目：
 - ㉠機能性核酸およびsiRNA搭載のためのインテリジェント・ナノ構造デバイスの機能評価
 - ㉡新規pH応答性PEG化ブロック共重合体によるインテリジェント・

ナノ構造デバイス構築と機能評価

◎PEG化量子ドットを用いた細胞内動態の新規定量法の確立

佐々木グループ

- ① 研究分担グループ長：佐々木茂貴（九州大学大学院薬学研究院、教授）
- ② 研究項目：①クロスリンク核酸-PEGコンジュゲート体の細胞内アンチセンス効果の評価
 - ③アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン効果
 - ④機能性核酸によるゲノム塩基の特異的変換

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- M. Oishi, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-labile linkages, *ChemBioChem* 6(4), 718-725 (2005).
- Y. Yang, K. Kataoka, F. M. Winnik, Synthesis of diblock copolymers consisting of hyaluronan and poly(2-ethyl-2-oxazoline), *Macromolecules* 38(6), 2043-2046 (2005).
- S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated polyplex micelles from triblock cationers with spatially ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 127(9), 2810-2811 (2005).
- S. Takae, Y. Akiyama, H. Otsuka, T. Nakamura, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: Regulated interaction of RCA120 lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface, *Biomacromolecules* 6(2), 818-824 (2005).
- M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile β -thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells, *J. Am. Chem. Soc.* 127(6), 1624-1625 (2005).
- K. Uchida, H. Otsuka, M. Kaneko, K. Kataoka, Y. Nagasaki, A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific SPR sensing with a high S/N ratio: the substantial role of a short under-brushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption, *Anal. Chem.* 77(4), 1075-1080 (2005).

- W-D. Jang, N. Nishiyama, G-D. Zhang, A. Harada, D-L. Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with polyethylene glycol to enhance intracellular photodynamic efficacy, *Angew. Chem., Int'l Ed.* 44(3), 419-423 (2005).
- Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, Y. Matsumura, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 16(1), 122-130 (2005).
- H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, K. Kataoka, Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) loaded polymeric micelles, *J. Control. Release* 101(13), 223-232 (2005).
- H. Tsuchiya, T. Matsuda, H. Harashima, and H. Kamiya, Cytokine induction by a bacterial DNA-specific modified base, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(4), 777-781 (2005).
- H. Tsuchiya, H. Harashima, and H. Kamiya, Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA, *J. Gene Med.* 7(4), 486-493 (2005).
- M. Tabuchi, Y. Katsuyama, K. Nogami, H. Nagata, K. Wakuda, M. Fujimoto, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, A design of nanosized PEGylated-latex mixed polymer solution for microchip electrophoresis, *Lab on a Chip* 5(2), 199-205 (2005).
- T. Ishii, M. Yamada, T. Hirase, Y. Nagasaki, New synthesis of heterobifunctional poly(ethylene glycol) possessing a pyridyl disulfide at one end and a carboxylic acid at the other end, *Polymer J.* 37(3), 221-228 (2005).
- T. Kawasaki, F. Nagatsugi, Md. Monsur Ali, M. Maeda, K. Sugiyama, K. Hori and S. Sasaki, Hybridization-promoted and cytidine-selective activation for cross-linking with the use of 2-amino-6-vinylpurine derivatives, *J. Org. Chem.* 70(1), 14-23 (2005).
- J. S. Park, Y. Akiyama, F. M. Winnik, K. Kataoka, Versatile synthesis of end-functionalized thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazolines), *Macromolecules* 37(18), 6786-6792 (2004).
- H. Hayashi, M. Iijima, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-Sensitive nanogel possessing reactive PEG tethered chains on the surface, *Macromolecules*

37(14), 5389–5396 (2004).

- H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Characterization of aldehyde-PEG tethered surfaces: influence of PEG chain length on the specific biorecognition, *Langmuir* 20(26), 11285–11287 (2004).
- Y. Nagasaki, T. Ishii, Y. Sunaga, Y. Watanabe, H. Otsuka, K. Kataoka, Novel molecular recognition via fluorescent resonance energy transfer using a biotin-PEG/polyamine stabilized CdS quantum dot, *Langmuir* 20(15), 6396–6400 (2004).
- E. Jule, Y. Yamamoto, M. Thouvenin, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Thermal characterization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles based on pyrene excimer formation, *J. Control. Release* 97(3), 407–419 (2004).
- Y. Kakizawa, S. Furukawa, K. Kataoka, Block copolymer-coated calcium-phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery, *J. Control. Release* 97(2), 345–356 (2004).
- Y. Kakizawa, K. Miyata, S. Furukawa, K. Kataoka, Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid), *Advanced Materials* 16(8), 699–702 (2004).
- D. Wakebayashi, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyata, Y. Yamasaki, A. Harada, H. Koyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Polyion complex micelles of pDNA with acetal-poly(ethylene glycol)-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) block copolymer as gene carrier systems: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficacy, *Biomacromolecules* 5(6), 2128–2136 (2004).
- K. Itaka, N. Kanayama, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationic copolymer carrying diamine side-chain with distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing, *J. Am. Chem. Soc.* 126(42), 13612–13613 (2004).
- E-C. Kang, A. Ogura, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Preparation of water-soluble PEGylated semiconductor nanocrystals, *Chem. Lett.* 33(7), 840–841 (2004).
- H. Otsuka, A. Hirano, Y. Nagasaki, T. Okano, Y. Horiike, K. Kataoka, Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface, *ChemBioChem* 5(6), 850–855 (2004).
- T. Ishii, Y. Sunaga, H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Preparation of

water soluble CdS quantum dots stabilized by functional poly(ethylene glycol) and its application for bioassay, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 17(1), 95-98 (2004).

- H. Katakura, A. Harada, K. Kataoka, M. Furusho, F. Tanaka, H. Wada, K. Ikenaka, Improvement of retroviral vectors by coating with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer (PEG-PLL), *J. Gene Med.* 6(4), 471-477 (2004).
- H. Hatakeyama, H. Akita, K. Maruyama, T. Suhara, H. Harashima, Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo, *Int. J. Pharm.* 281(1-2), 25-33 (2004).
- K. Kogure, R. Moriguchi, K. Sasaki, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima, Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, *J. Control. Release* 98(2), 317-323 (2004).
- T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya, H. Harashima, Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide, An artificial viral-like delivery system, *Biochemistry* 43(19), 5618-5628 (2004).
- H. Akita, R. Ito, I.A. Khalil, S. Futaki, H. Harashima, Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by non-viral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy, *Mol. Ther.* 9(3), 443-451 (2004).
- I.A. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya, H. Harashima, Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearyl-lation of octaarginine, Enhanced cellular association by hydrophobic core formation, *Gene Therapy* 11(7), 636-644 (2004).
- A. Hirano, M. Iijima, K. Emoto, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Multi-layered nanoball as high performance permselective membrane, *Materials Science and Engineering*, C24(6-8), 761-767 (2004).
- Md. M. Ali, Md. R. Alam, T. Kawasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Sequence- and base-specific delivery of nitric oxide to cytidine and 5-methylcytidine leading to efficient deamination, *J. Am. Chem. Soc.* 126(29), 8864-8865 (2004).
- S. Sasaki, F. Kurosaki, T. Haradahira, F. Yamamoto, J. Maeda, T. Okauchi, K. Suzuki, T. Suhara, M. Maeda, Synthesis of ¹⁴C-labeled bis(phenylalkyl)amine and their in vitro and in vivo binding properties in rodent and monkey brains, *Biol. Pharm. Bull.* 27(4), 531-537 (2004).

○ F. Nagatsugi, S. Sasaki, Chemical Tools for Targeted Mutagenesis of DNA Based on Triple Helix Formation, Biol. Pharm. Bull. 27(4), 463-467 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：24件（CREST研究期間累積件数：35件）