

Mono-cationic detergent (MCD) を基盤とした 革新的パッケージングコンセプトの創生

学位論文内容の要旨

【背景】

遺伝子治療は先天性遺伝子欠損症の根本的治癒を実現する疾患治療戦略として期待されている。臨床試験が多く実施されているが、ウィルスベクターは安全性が懸念されていた。そこで、安全な物質だけで人工的に構築する非ウィルスベクターの開発が代替戦略として進んでいる。その中の一つとして、当研究室では多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) を開発している。MEND は、ポリカチオンによってナノ粒子化された遺伝子 (pDNA ナノ粒子) が脂質エンベロープ膜に封入された構造からなる。細胞への取込みを促進するアルギニン 8 量体 (R8) を修飾した MEND (R8-MEND) は、ウィルスベクターの中で高いトランスフェクション活性を有するアデノウィルスと同等のトランスフェクション活性を有することが明らかにされている。

しかし、ポリカチオンを用いた従来型の MEND は、*in vivo* において腫瘍や肝臓実質への送達が困難だった。原因として、約 300 nm という比較的大きな粒子径が上述した組織への送達に最適な粒子径を超えていると考えられた。また、不均一な粒子分布が原因となって MEND は製剤化が困難だった。こうした問題の解決は、MEND によるヒトを対象とした遺伝子治療を実現するために必要不可欠であった。

本研究は、封入体である pDNA ナノ粒子、および被封入体であるリボソームの双方に渡るパッケージングの制御を目的とした。はじめに、ポリカチオンと比較して微小かつ均一な pDNA ナノ粒子の形成が可能な Mono-cationic detergent (MCD) を用いて、MCD で構築した pDNA ナノ粒子 (MCD/pDNA ナノ粒子) の封入による MEND の微小化・均一化を行った。次に、MCD の新たな利用法として、MEND 脂質エンベロープ膜への MCD 修飾による脂質膜枚数および封入 pDNA ナノ粒子数の制御について検討を行った。最後に、脂質膜 MCD 修飾法の基盤技術としての有用性に着目し、既存技術よりも核への効率的な遺伝子送達を実現する脂質膜多重膜化法の確立に挑んだ。

【結果と考察】

1. Mono-cationic detergent (MCD) を用いた微小かつ均一な MEND の構築

ポリカチオンと比較して微小かつ均一な MCD/pDNA ナノ粒子を用いて、MEND への MCD/pDNA ナノ粒子の封入を検討することで MEND の微小化・均一化を試みた。MCD は極めて微小かつ均一な pDNA ナノ粒子を構築する可能性のある pDNA ナノ粒子化剤である。はじめに、粒子径を基準として行ったスクリーニングから BDHAC および TB を得た。上述した 2 種の MCD で構築した MCD/pDNA ナノ粒子は、ポリカチオンで構築した時と比較して微小かつ均一だった。次に、MCD/pDNA ナノ粒子を封入した MEND (MEND (MCD)) の構築および評価を行った。R8 を修飾した MEND (MCD) (R8-MEND (MCD)) はアデノウィルスと同等の高いトランスフェクション活性を発揮した。さらに、R8-MEND (MCD) は、ポリカチオン

で構築した従来型の R8-MEND と比較して顕著に粒子径が微小、かつ粒子分布が均一であることが明らかとなった。R8-MEND (MCD)と MCD/pDNA ナノ粒子の物性を比較した時、MCD が脂質膜へ作用することで脂質膜枚数および封入 pDNA ナノ粒子数が制御された可能性が示唆された。

2. MCD を用いた脂質膜枚数および封入 pDNA ナノ粒子数制御法の確立

MCD の新たな利用法として、脂質膜への MCD 修飾による脂質膜枚数および封入 pDNA ナノ粒子数の制御を試みた。脂質膜への作用のみを評価するために、脂質膜への修飾のみに MCD を使用し、pDNA ナノ粒子の構築にはポリカチオンを使用した。MCD には、MCD/pDNA ナノ粒子の構築に最適と判断した TB を用いた。脂質膜に TB を修飾した MEND (TB-MEND) は、TB 修飾量依存的に粒子径が減少した。さらに、最適な TB 修飾率において、TB-MEND は 1 粒子の pDNA ナノ粒子に極めて近い粒子径であり、R8 修飾 TB-MEND は TB 未修飾時と比較して分裂細胞におけるトランスフェクション活性が飛躍的に増大することが明らかとなった。脂質膜枚数を相対的に評価した時、TB-MEND は 1 枚膜リポソームと同等の傾向を示した。以上の結果から、TB は、脂質薄膜に含有させるだけで脂質膜枚数が制御されるとともに、MEND1 粒子につき 1 粒子の pDNA ナノ粒子が封入された 1 粒子パッケージングが実現することを明らかとした。

3. MCD 含有脂質膜を用いた革新的な脂質膜多重膜化法の確立

4 枚膜の T-MEND は生体膜の融合を介して核への遺伝子送達を行うナノキャリアである。しかし、2 枚ごとの多重膜化だったので、エンドソーム膜・核膜の合計 3 枚の生体膜と融合し、核へ送達した後も T-MEND 由来の脂質膜が 1 枚残る可能性があった。核への効率的な遺伝子送達を達成するためには、多重膜化によって脂質膜を 3 枚とする必要だった。そこで、脂質膜枚数が 1 枚に制御された可能性のある MCD 含有脂質膜に着目し、本章では、2 枚膜の D-MEND を MCD 修飾脂質膜へ封入することで 3 枚膜からなる Triple-layered MEND (TL-MEND)の構築を行った。負電荷脂質からなる D-MEND を正電荷脂質からなる MCD 修飾最外膜へ封入を試みたが、脂質膜同士の融合により D-MEND の封入が困難だった。D-MEND の封入は、D-MEND と同じ負電荷脂質からなる MCD 修飾最外膜を用いた時のみにおいて達成されることが明らかとなった。さらに、効率的な D-MEND 封入を目的として BSA 修飾 D-MEND を封入した R8 修飾 TL-MEND は、遺伝子導入が困難な非分裂細胞モデルにおいて T-MEND を凌駕するトランスフェクション活性を有することを明らかとした。

【まとめ】

モノカチオンである MCD は、ポリカチオンと比較して微小かつ均一な pDNA ナノ粒子を形成した。脂質膜に MCD を修飾した MEND は、pDNA ナノ粒子の 1 粒子パッケージングと同時に、飛躍的なトランスフェクション活性の増大を実現した。BSA 修飾 D-MEND を封入した 3 枚膜の R8/TB-修飾 TL-MEND は、遺伝子導入が困難な非分裂細胞モデルに対し既存技術である R8-T-MEND よりも優れたトランスフェクション活性を発揮した。本研究は、MCD による脂質膜枚数制御法を基盤として、粒子の微小性に着目した *in vivo* デリバリーへの応用や脂質膜枚数制御に着目した細胞質を標的とする薬物 (機能性核酸、タンパク質)への応用が期待される。さらに、組成の異なる脂質膜について 1 枚ずつ多重膜化を行う革新的なパッケージングコンセプトの可能性を創出した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	原 島 秀 吉
副 査	准教授	秋 田 英 万
副 査	教 授	菅 原 満
副 査	准教授	武 隈 洋

学 位 論 文 題 名

Mono-cationic detergent (MCD) を基盤とした 革新的パッケージングコンセプトの創生

人工的に構築される遺伝子ナノキャリアは、ウィルスに依らない遺伝子治療戦略として実用化が急務となっている。しかし、*in vivo* における効率的な遺伝子発現を達成するためには、遺伝子ナノキャリアは標的とする臓器・組織と血管との間に存在する間隙の通過が可能な粒子径であることが必要であった。したがって、微小なナノキャリアを構築する遺伝子パッケージングコンセプトは非常に重要であると考えられる。

鈴木亮佑君は、凝縮化させた外来遺伝子を脂質小胞に封入した多機能性エンベロップ型ナノ構造体 (MEND) について、Mono-cationic detergent (MCD) を用いた構築制御による MEND の微小化を試みた。さらに、MCD を含有する脂質膜の特性に着目し、遺伝子導入が困難な非分裂細胞に対して高い遺伝子発現が可能な新規ナノキャリアの開発に成功した。

第一部では、MEND の微小化を目指して、微小な凝縮化遺伝子 (pDNA ナノ粒子) を封入した MEND の開発を試みている。MCD はポリカチオンと比較して極めて微小かつ均一な pDNA ナノ粒子を構築する一方、このナノ粒子は不安定なので細胞膜上との結合のみによって崩壊することが知られている。そこで、MEND の微小化、pDNA ナノ粒子の安定化の双方を達成すると考え、MEND への封入を行った。はじめに、粒子径を基準として行ったスクリーニングから BDHAC および TB を得た。上述した 2 種の MCD で構築した MCD/pDNA ナノ粒子は、ポリカチオンで構築した時と比較して微小かつ均一であった。次に、MCD/pDNA ナノ粒子を封入した MEND (MEND (MCD)) を構築した。アルギニン八量体 (R8) を修飾した MEND (MCD) (R8-MEND (MCD)) はアデノウィルスと同等の高いトランスフェクション活性を発揮した。さらに、ポリカチオンで構築した従来型の R8-MEND と比較して、R8-MEND (MCD) は粒子径が顕著に微小、かつ均一な粒子分布であることを明らかとした。

第二部 第一章では、脂質膜枚数の制御による MEND の微小化を試みている。前部での検討から、MCD による脂質膜枚数への影響が考えられた。そこで、ポリカチオンで調製した pDNA ナノ粒子を用いて、脂質膜に MCD を含有する MEND の構築を行った。MCD には、MCD/pDNA ナノ粒子の構築に最適と判断した TB を用いた。脂質膜に TB を含有する MEND (TB-MEND) は、TB 含有量依存的に粒子径が減少した。さらに、最適量の TB を含有する時、TB-MEND は 1 粒子の pDNA ナノ粒子に極めて近い粒子径であり、R8 修飾 TB-MEND は TB 未含有時と比較

して分裂細胞におけるトランスフェクション活性が飛躍的に増大することを明らかとした。脂質膜枚数を相対的に評価した時、TB-MEND は 1 枚膜リボソームと同等の傾向を示した。以上の結果から、TB は脂質薄膜に含有させるだけで脂質膜枚数が制御されるとともに、MEND1 粒子につき 1 粒子の pDNA ナノ粒子が封入された 1 粒子パッケージングが実現することを明らかとした。

第二部 第二章では、TB 含有脂質膜の汎用性を示すために、非分裂細胞の核を標的とした脂質膜重層化ナノキャリアの構築を行っている。非分裂細胞は生体の大半を占める一方、遺伝子導入が困難であることが知られている。そこで、2 枚膜の D-MEND を TB 含有脂質膜へ封入することで 3 枚膜からなる Triple-layered MEND (TL-MEND) の構築を行った。負電荷脂質からなる D-MEND を正電荷脂質からなる MCD 修飾最外膜へ封入を試みた。しかし、脂質膜同士の融合により D-MEND の封入が困難であった。D-MEND の封入は、D-MEND と同じ負電荷脂質からなる MCD 修飾最外膜を用いた時のみにおいて達成されることを明らかとした。さらに、効率的な D-MEND 封入を目的として BSA 修飾 D-MEND を封入した R8 修飾 TL-MEND は、遺伝子導入が困難な非分裂細胞モデルにおいて T-MEND を凌駕するトランスフェクション活性を有することを明らかとした。

以上、鈴木亮佑君は、遺伝子ナノキャリアの構築制御によって大幅な微小化を達成し、さらに本技術を発展させ 3 枚の脂質膜から構成されるナノキャリアを開発することに成功した。本研究は、遺伝子治療用キャリアの基盤技術として大きく貢献すると確信する。

よって鈴木亮佑君は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。