

209. 遺伝子治療を実現するポリエーテル型ミセルの開発

宮崎 拓也

神奈川県立産業技術総合研究所 「貼るだけ人工臓臓」プロジェクト

Key words : 高分子ミセル, ブロック共重合体, 遺伝子治療, メッセンジャーRNA, RNA レプリコン

緒言

RNA レプリコン (RepRNA) は自己複製によりメッセンジャーRNA (mRNA) を産出し、細胞質内において治療用タンパク質を翻訳することから核酸医薬としての応用が期待されている [1]。RepRNA などの核酸医薬は細胞内において多量のタンパク質を産出することから従来のタンパク質製剤に比べて効率的かつ持続的なタンパク質の導入が可能であると考えられる。特に、RepRNA や mRNA は細胞核内への導入が必要なプラスミドDNA に比べてゲノム遺伝子への挿入の危険性が低く、神経細胞などの非分裂細胞への導入が可能であるため様々な細胞種への安全な遺伝子導入法として注目されている [2]。しかし、RepRNA 単体の全身投与では、標的細胞における治療用タンパク質の産出に関して有効性を示さなかった。これは、生体内に存在する RNA 分解酵素が障壁となって、RepRNA が分解されタンパク質を翻訳できないうえ、RepRNA が惹起する副作用が原因で投与量を増やすことができないためであると考えられる。このような背景の中で、RNA 分解酵素の障壁を超えて RepRNA を効率的に標的細胞内に送り届けることで、副作用を回避しながら遺伝子治療を奏功させるためのドラッグデリバリーシステムの開発が切実に求められている。

そこで、核酸医薬を標的細胞に届けるために、カチオン性脂質やレトロウイルスを用いた手法が試みられてきたが、カチオン性脂質を用いた手法においては RNA 分解酵素に対する低い安定性が [3]、レトロウイルスを用いた手法においては内包できる RNA の分子量に大きな制限があることが問題となり、生体応用の障壁となっている [4]。一方で我々は、高分子ミセルのコア形成鎖として柔軟なポリエーテル鎖を導入することで、分子量の大きな mRNA を 100% という非常に高い効率で高分子ミセルのコアに内包することができ、既存 DDS の 50 倍にも上る非常に高い RNA 分解酵素に対する安定性を付与することができることを示した [5~7]。また、柔軟なポリエーテル鎖にグアニジノ基を導入することで、ミセル構造を安定化し、RNA 分解酵素に対する耐性をさらに向上させた [8]。柔軟なポリエーテル鎖をコア形成鎖とする高分子ミセルは、コアに内包する RNA の構造に応じてコア形成鎖の立体構造が変化することから、分子量の非常に大きな RepRNA とも高い結合力を有することが予想される。本研究では、このようなポリエーテル型ミセルの優れた特徴を活かして、RNA と強く結合するアミノ酸に着目し、このアミノ酸をポリエーテル型ミセルを導入することによって RepRNA の RNA 分解酵素に対する安定性の向上を狙う (図 1)。具体的には、ミセルのコア形成鎖であるポリエーテル鎖の側鎖構造にトリプトファン、チロシン、ロイシンを導入することによって、RepRNA との π - π 相互作用および疎水性相互作用によるミセル構造の安定化を目指す。また、トリプトファンを導入する際に生分解性エステル結合を用いることによって、標的細胞内での RepRNA 放出後のミセルの分解を目指す。RepRNA を内包したポリエーテル型ミセルを調製し、まず粒径分布と表面電位を最適化する。ここで、生体内での安定性を高めるためには、ミセルの粒径が 100 nm 以下に制御され、表面電荷が中和されている必要がある [9]。続いて、構築されたポリエーテル型ミセルの RepRNA 送達効果および安全性を確認するために、ポリアニオン・RNA 分解酵素に対する安定性、培養細胞における遺伝子発現効率、生分解性エステル結合の開裂を、蛍光相関分光 (FCS) 法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法、ルシフェラーゼアッセイ法、フルオレスカミン法により評価する。

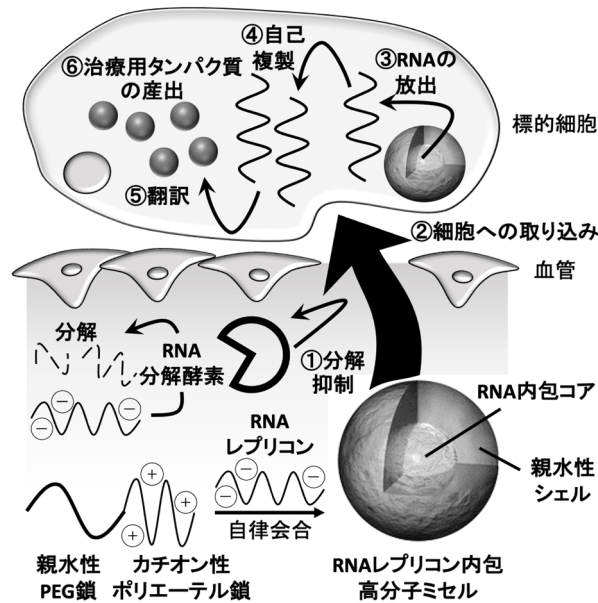


図1. 本研究で開発した RepRNA 内包高分子ミセルの概念図

ミセルの親水性シェルにより内包した RNA を RNA 分解酵素から保護し、標的細胞内で放出した RepRNA の自己複製および翻訳により治療用タンパク質を大量合成する。

方法

1. アミノ酸導入ポリエーテルの合成および機能評価

ポリエチレングリコール (PEG) のヒドロキシル基末端を開始剤とするアニオン重合法により PEG - ポリエピクロロヒドリン (PECH) を合成した。また、水酸化ナトリウム水溶液による加水分解により側鎖構造にヒドロキシル基を導入し、縮合剤によるエステル化によりトリプトファン・チロシン・ロイシン・グリシンを導入した。得られたポリマーの組成を¹H-NMR 法、分子量分布をゲル浸透クロマトグラフィー法により評価した。その後、合成したポリマーの生分解性をポリマー中の1級アミン量を定量することで評価した。さらに、培養細胞に対する安全性をCCK-8アッセイにより評価した。

2. mRNA 内包高分子ミセルの安定性試験

ガウシアルシフェラーゼを発現する mRNA を 10 mM HEPES バッファー (pH 7.3) に溶解し、ポリマーを添加することで mRNA 内包ミセル (mRNA/m) を調製した。また、得られたミセルのサイズおよび粒径分布を動的光散乱 (DLS) 法により評価した。調製した mRNA/m にポリアニオンおよび血清を添加することで、安定性の指標とした。ここで、生体内においてポリイオンコンプレックスがグリコサミノグリカンにより分解することが知られていることから [10]、ポリアニオンとしてヘパリンを用いた。具体的には、Cy5 標識した mRNA を内包したミセルにヘパリンを添加し、mRNA の放出に伴う拡散係数の増大を FCS 法により追跡した。また、mRNA/m にウシ胎児血清 (FBS) を添加し、残存した mRNA 量を RT-PCR 法により定量した。

3. RepRNA 内包高分子ミセルの *in vitro* 機能評価

mRNA/m と同様の方法で RepRNA 内包ミセル (RepRNA/m) を調製した。調製したミセルを Huh-7 細胞から作製したスフェロイドに添加し、ルシフェラーゼアッセイ法により RepRNA の発現量を経時的に追跡した。

結果および考察

1. アミノ酸導入ポリエーテルの合成

¹H-NMR 法および GPC 法より、分子量分布の狭いポリマーの形成を確認した (表 1)。また、エステル結合をもたない PEG-ポリリジン (PLL) において 1 級アミン量が変化しなかった一方で、エステル結合を有する PEG-PGTrp、PEG-PGTyr、PEG-PGLeu、PEG-PGGly において 1 級アミン量が経時的に減少したことから、エステル結合の開裂によるアミノ酸の放出が示唆された (図 2A)。その結果、アミノ酸を導入したポリマーは、培養細胞に対して低い毒性を示し、ポリマーへの生分解性の付与による安全性の向上が達成された (図 2B)。

表 1. アミノ酸導入ポリエーテルの構造解析

	Mw/Mn ^a	DP of PEG ^a	DP of polycation ^b
PEG-PGTrp	1.07	261	71
PEG-PGTyr	1.08	261	75
PEG-PGLeu	1.03	261	79
PEG-PGGly	1.05	261	74

a : GPC法により決定、b : H-NMR法により決定。

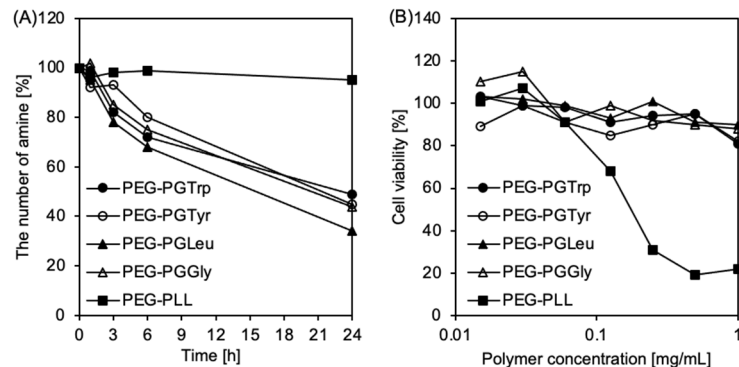


図 2. 生理塩条件下でのポリマー中の 1 級アミン量の変化とポリマー添加後の培養細胞の生存率
ポリマー中のアミノ酸の放出により 1 級アミン量が減少していると考えられる。1 級アミン量の減少により細胞毒性が減少していると考えられる。

2. mRNA 内包高分子ミセルの安定性試験

DLS 法より、粒径分布の狭い 60 nm サイズの mRNA/m の形成を確認した (表 2)。また、FCS 法より、ポリマーへのアミノ酸導入により mRNA の拡散係数の増加が抑制できたことから、ポリマー中のアミノ酸と mRNA の相互作用によりミセル構造が安定化されたことが示唆された (図 3A)。特に、PEG-PGLeu から調製した mRNA/m (mRNA/mPGLeu) はロイシンによる疎水性相互作用を介して、PEG-PGTrp や PEG-PGTyr から調製した mRNA/m (mRNA/mPGTrp、mRNA/mPGTyr) はトリプトファンやチロシンと mRNA 中の塩基との π - π 相互作用を介してミセル構造を安定化させたと考えられる。その結果、RNA 分解酵素に対する安定性も向上し、mRNA/mTrp と mRNA/mTyr が最も優れた組成であることが示された (図 3B)。そこで、RNA レプリコンの機能評価には PEG-PGTrp をキャリアとして用いた。

表 2. mRNA 内包高分子ミセルの構造解析

	Size [nm, d, volume] ^a	PDI ^a
mRNA/mPGTrp	59	0.18
mRNA/mPGTyr	55	0.19
mRNA/mPGLeu	60	0.15
mRNA/mPGGly	58	0.19

a : DLS法により決定。

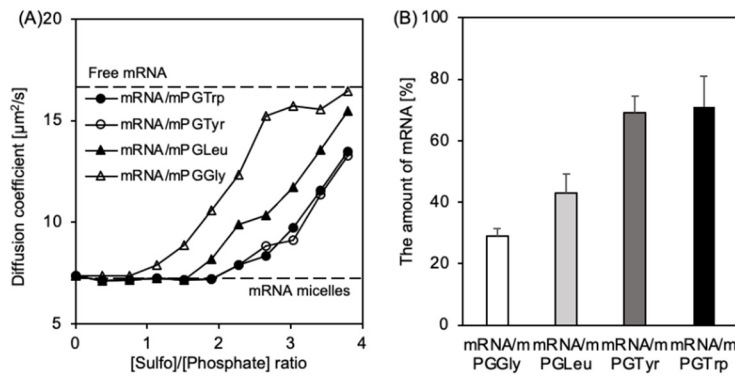


図 3. ヘパリン添加後の mRNA の拡散係数の変化と FBS 添加後の mRNA 残存量

- (A) mRNA の拡散係数の増加はミセルの崩壊に対応していると考えられる。
- (B) ミセル構造の維持により mRNA の残存量が増加していると考えられる。

3. RepRNA 内包高分子ミセルの *in vitro* 機能評価

ルシフェラーゼアッセイ法より、RepRNA/m において発光が検出されたことから、PEG-PGTrp により RNA 分解酵素による阻害を回避できたことが示唆された (図 4)。また、mRNA/m よりも効率的かつ持続的な遺伝子発現が得られたことから、PEG-PGTrp により細胞内での RepRNA の自己複製が促進されていることが示唆された。

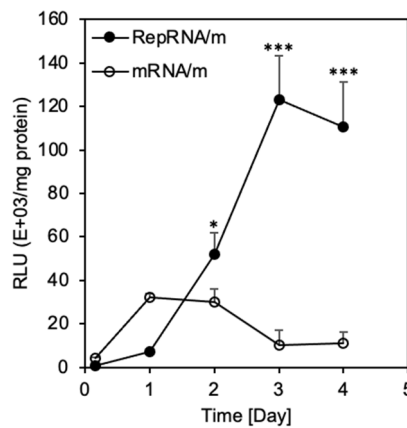


図 4. RepRNA/m の遺伝子発現量

縦軸は RNA から翻訳されたガウシアルルシフェラーゼの発光強度を表している。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (Student の t-test により決定)。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻のカブラルオランオ准教授および京都府立医大医学研究科の内田智士准教授のご協力により実施された。

文 献

- 1) Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261-79. Epub 2018/01/13. doi: 10.1038/nrd.2017.243. PubMed PMID: 29326426; PubMed Central PMCID: PMC5906799.
- 2) Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759-80. Epub 2014/09/23. doi: 10.1038/nrd4278. PubMed PMID: 25233993.
- 3) Démoulines T, Milona P, Englezou PC, Ebensen T, Schulze K, Suter R, et al. Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines. *Nanomedicine.* 2016;12(3):711-22. Epub 2015/11/26. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.001. PubMed PMID: 26592962.
- 4) Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 2004;11 Suppl 1:S10-7. Epub 2004/09/30. doi: 10.1038/sj.gt.3302364. PubMed PMID: 15454952.
- 5) Uchida S, Perche F, Pichon C, Cabral H. Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery. *Mol Pharm.* 2020;17(10):3654-84. Epub 2020/08/28. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618. PubMed PMID: 32845639.
- 6) Miyazaki T, Uchida S, Nagatoishi S, Koji K, Hong T, Fukushima S, et al. Polymeric Nanocarriers with Controlled Chain Flexibility Boost mRNA Delivery In Vivo through Enhanced Structural Fastening. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(16):e2000538. Epub 2020/06/26. doi: 10.1002/adhm.202000538. PubMed PMID: 32583633.
- 7) Miyazaki T, Uchida S, Miyahara Y, Matsumoto A, Cabral H. Development of Flexible Polycation-Based mRNA Delivery Systems for In Vivo Applications. *Materials Proceedings.* 2021;4(1):5. PubMed PMID: doi:10.3390/IOCN2020-07857.
- 8) Miyazaki T, Uchida S, Hatano H, Miyahara Y, Matsumoto A, Cabral H. Guanidine-phosphate interactions stabilize polyion complex micelles based on flexible cationomers to improve mRNA delivery. *European Polymer Journal.* 2020;140:110028. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110028>.
- 9) Cabral H, Miyata K, Osada K, Kataoka K. Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. *Chem Rev.* 2018;118(14):6844-92. Epub 2018/06/30. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00199. PubMed PMID: 29957926.
- 10) Zuckerman JE, Choi CH, Han H, Davis ME. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):3137-42. Epub 2012/02/09. doi: 10.1073/pnas.1200718109. PubMed PMID: 22315430; PubMed Central PMCID: PMC3286910.