

【目的】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。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。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、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。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。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、この様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に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)。

【方法】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 $\pi$ - $\pi$ 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した。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図った。mRNA を内包したポリエーテル型ミセルを調製し、まず粒径分布を最適化した。続いて、構築されたポリエーテル型ミセルの mRNA 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、生分解性エステル結合の開裂を、蛍光相関分光法、RT-PCR、フルオレスカミン法により評価した。さらに、RepRNA を内包したミセルを調製し、培養細胞における遺伝子発現効率をルシフェラーゼアッセイ法により評価した。

【結果】合成したポリマーに関して、生理塩条件下で効果的な生分解性を示し、その結果、培養細胞に対して低い毒性を示した。また、ポリマーから調製したミセルは 60 nm 程度のサイズを示し、トリプトファン (PEG-PGTrp) から調製したミセルが最も優れた安定性を示した。そこで、PEG-PGTrp を用いて RepRNA ミセルを調製したところ、RNA 分解酵素共存下で培養細胞における高いトランスフェクション効率を示し、mRNA から調製したミセルに比べて効率的かつ持続的なトランスフェクションを達成した。

本研究で開発した RepRNA 内包高分子ミセルの概念図

