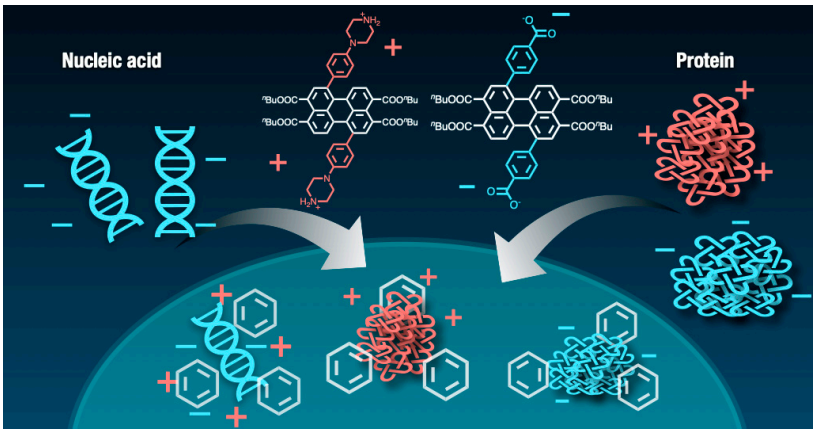
165　難治性疾患治療を目指した生体高分子のDDS	天池　一真

【目的】物質輸送はあらゆる生物分野に関連する基本的な事象である。「何を運ぶか」「どこに運ぶか」によって関連する分野が創薬、植物学、分子生物学、ゲノム編集など多岐にわたるため、新たな輸送法の開発は他分野への大きな進展を期待できる。特に核酸やタンパク質は近年創薬、医学でよく用いられる生体高分子であるが、細胞内において構造安定性に乏しく、プロテアーゼやヌクレアーゼによって分解を受けることでその機能を失ってしまう。それに加え、低分子と比較して製造やライセンスコストが高いため、核酸やタンパク質の機能を最大限に発揮させるには、標的組織の細胞内へと効率的に送り込むことが求められる。ゲノム編集は、医学をはじめとした生命科学のあらゆる分野へ革命をもたらした技術である。ゲノム編集は創薬や医療の分野でも盛んに研究されており、ゲノム編集によって作製された疾患モデル細胞が疾患の発現機構の解明や化合物スクリーニングによる薬剤開発に用いられている。さらに、病気の原因となる遺伝子のノックアウトや欠損遺伝子のノックインのような遺伝子治療を行うことで、難病を根本的に解決できる可能性がある。2020 年に CRISPR がノーベル化学賞の受賞対象にもなったように、基礎研究と応用研究の両面で開発が活発化している。ゲノム編集技術の最大の障壁の一つは、ゲノム編集ツールの細胞への導入にあるため、効率的に導入する方法が依然として求められている。

【方法】本研究ではゲノム編集ツールとなりうる核酸やタンパク質、さらに抗体の細胞内輸送を輸送可能な担体分子の開発を行った。さらに見出した分子群のライブラリー構築をおこない、その詳細な化学構造と輸送効率の相関関係を調査した。

【結果】輸送する核酸の種類、輸送箇所にあわせたナノカーボン分子を合成すべく、ナノカーボン分子の精密合成、核酸輸送に関する構造機能相関を試みた。これまでに、アミノ基を導入したペリレン分子 KTU059、KTU207 およびお椀型分子であるコラニュレン KTU205 が哺乳類細胞において核酸の輸送能を有していることをウエスタンブロッティング解析から見出していた。そのため KTU059、KTU207、KTU205 を出発点として、核酸輸送の想定作用機序に基づいた構造機能相関研究を行った。その結果、アミノ基の種類や化合物の脂溶性が DNA 輸送において非常に重要な要因であることが示唆された。またタンパク質の等電点を参考に、アニオン性の蛍光タンパク質 R-phycoerythrin（R-PE）を標的にカチオン性ペリレン誘導体を用いて輸送実験を行った。バイオイメージングの結果、細胞内に R-PE を確認できた。また、同様にアニオン性の加水分解酵素 β-galactosidase（β-Gal）も細胞内に輸送可能であることを見出し、加えてその生物活性を有していることが示された。さらにアニオン性ペリレン誘導体 SMZ034 および SMZ040 を新たに合成し、カチオン性タンパク質として抗体を標的とした輸送能の調査を行った。するとバイオイメージングの結果、細胞内への輸送が見出された。また SMZ034 をもちいたカチオン性の毒性タンパク質 Trypsin の輸送実験をしたところ、輸送剤なしと比べて有意な差で細胞毒性が示された。

ナノカーボン分子をもちいた核酸やタンパク質の細胞内輸送



165. 難治性疾患治療を目指した生体高分子の DDS

天池　一真

名古屋大学 物質科学国際研究センター 有機化学研究室

Key words：核酸輸送，タンパク質輸送，ナノカーボン分子，ゲノム編集

緒　言

物質輸送はあらゆる生物分野に関連する基本的な事象である。「何を運ぶか」「どこに運ぶか」によって関連する分野が創薬、植物学、分子生物学、ゲノム編集など多岐にわたるため、新たな輸送法の開発は他分野への大きな進展を期待できる。特に核酸やタンパク質は近年創薬、医学でよく用いられる生体高分子であるが、細胞内において構造安定に乏しく、プロテアーゼやヌクレアーゼによって分解を受けることでその機能を失ってしまう。それに加え、低分子と比較して製造やライセンスコストが高いため、核酸やタンパク質の機能を最大限に発揮させるには、標的組織の細胞内へと効率的に送り込むことが求められる。また神経疾患を治療するためには、病巣である脳内に効率的に医薬品を届ける必要がある。脳は血液脳関門（BBB）と呼ばれる強固な障壁を有しており、神経疾患治療を妨げる大きなボトルネックとなっている。これらを通過する輸送担体分子を創製することで難治性疾患の治療を大きく前進させることが期待できる。

これまで生体高分子の輸送としては物理的方法、生物学的方法、化学的手法が報告されている。その中でも化学的手法は物理的手法とは異なり特殊な機器を必要とせず実験操作が簡便であり、生物学的方法のようにウイルスを用いないため安全性が高いことから広く利用されている。しかし、細胞毒性があることや細胞種によっては輸送効率が低いことが課題とされている。生命現象の理解と制御のさらなる高度化が必要な今、効率や選択性はもちろんのこと生体直交性、緻密な時空間制御などの多様な機能を有する輸送法が求められている。化学的手法は、緻密な化学構造の制御による機能調整が可能であるため、この分野の未来を担っているといえる。

近年、カチオン性カーボンナノチューブをはじめとする炭素材料（ナノカーボン）がその高い生体直行性、腎臓選択的な局在といった興味深い挙動から、次世代の輸送分子として注目を集めている［1］。また、ナノカーボンは構造によって、エンドサイトーシス経由ではなく、脂質二重膜を直接貫通することが計算および実験事実として知られている［2］。そのためナノカーボンは、従来の核酸輸送で問題となっている「エンドソームからの脱出効率の低さ」を突破できる新たな物質群であると期待できる。一方、これまでに報告された輸送可能なナノカーボンは、分子構造が単一に決まっていない複雑な混合物であり、その構造と輸送効率との相関関係が不明であるばかりでなく、種々の機能の付与・調整が可能な実用的な分子骨格の開発には至っていない。ごく最近、我々はアミノ基を導入したペリレン分子 KTU059、KTU207 およびお椀型分子であるコラニュレン KTU205 が哺乳類細胞において核酸輸送能を有していることを見出している（特願 2022-019637）。このような構造が精密に制御され、サイズの小さなナノカーボン分子は生体適合性が高く、安全かつ効率的な輸送分子となりうると期待されている。そこで、本研究において分子輸送を加速させる全く新しいナノカーボン分子をはじめとする新たな分子群を提供することで、分子輸送の分野に新たな風を吹き込む。

ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 を標的として、輸送担体の構造機能相関研究を遂行し効率的なゲノム編集を目指す。ゲノム編集は、医学をはじめとした生命科学のあらゆる分野へ革命をもたらした技術である。ゲノム編集は創薬や医療の分野でも盛んに研究されており、ゲノム編集によって作製された疾患モデル細胞が疾患の発現機構の解明や化合物スクリーニングによる薬剤開発に用いられている。さらに、病気の原因となる遺伝子のノックアウトや欠損遺伝子のノックインのような遺伝子治療を行うことで、難病を根本的に解決できる可能

性がある。2020 年に CRISPR がノーベル化学賞の受賞対象にもなったように、基礎研究と応用研究の両面で開発が活発化している。ゲノム編集技術の最大の障壁の一つは、ゲノム編集ツールの細胞への導入にある。そこで本研究ではゲノム編集ツールを標的に輸送担体の化学構造と輸送効率の相関関係を明らかにし、難治性疾患治療を指向したテーラーメイドな輸送担体分子を合成する。

方法、結果および考察

1. 核酸の細胞内輸送を加速するナノカーボン分子の開発

輸送する核酸の種類、輸送箇所にあわせたナノカーボン分子を合成すべく、ナノカーボン分子の精密合成、核酸輸送に関する構造機能相関を試みた。これまでに、アミノ基を導入したペリレン分子 KTU059、KTU207 およびお椀型分子であるコラニュレン KTU205 が哺乳類細胞において核酸の輸送能を有していることをウエスタンブロッティング解析から見出していた。そのため KTU059、KTU207、KTU205 を出発点として、核酸輸送の想定作用機序に基づいた構造機能相関研究を行った。

核酸を細胞内に輸送するためには、輸送担体と核酸の複合体形成、複合体の細胞膜透過、細胞内での複合体の解離といった 3 つのステップが重要であると考えられた。そのため、各ステップにおける分子の構造と機能の相関研究を行うことでより核酸輸送効率の高い分子の設計に繋がると考え、まず KTU059 を用いて核酸との複合体形成能およびその物性評価を行い、それらと核酸輸送効率との相関関係から輸送条件の最適化を検討した（図 1）。化合物と核酸の複合体形成時に用いる溶媒の種類や塩強度、pH、複合体形成にかける時間が複合体の動態に及ぼす影響をゲルシフトアッセイや動的光散乱（DLS）を用いた粒子径およびゼータ電位測定を用いて調査した。その結果、化合物／DNA 複合体形成には溶液の pH が大きく影響することが明らかとなり、pH 5.8 の MES 緩衝液および pH 7.1 の HEPES 緩衝液を用いた条件において複合体が 1,000 nm オーダーの凝集体を形成することが示唆された。続いて、哺乳細胞に Nanoluc plasmid DNA を輸送し、発現した NanoLuc（ルシフェラーゼ）を定量することで DNA 輸送活性を評価した。その結果、化合物／DNA 複合体形成時に用いる溶媒は pH 7.1 の HEPES 緩衝液が最適であることや、複合体形成が 30 分間で終結することが示唆された。

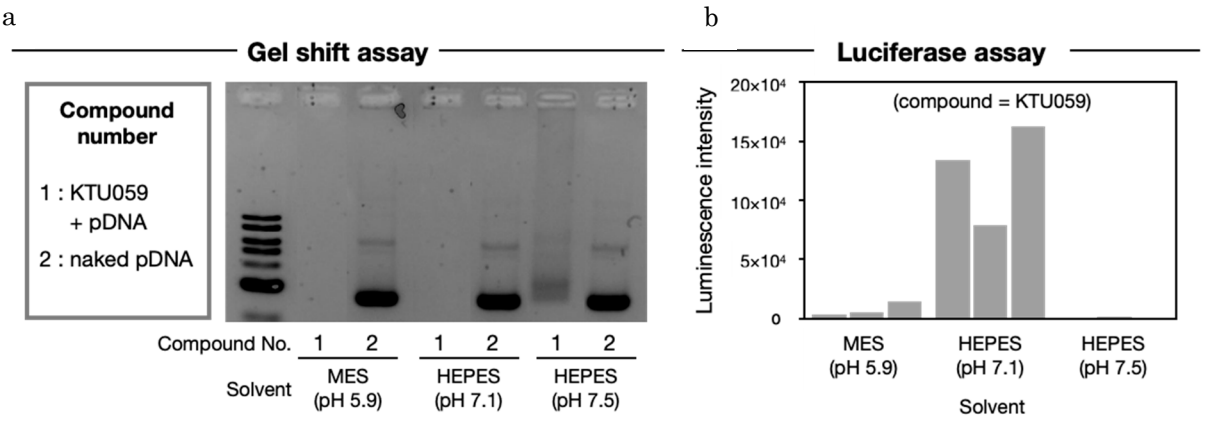


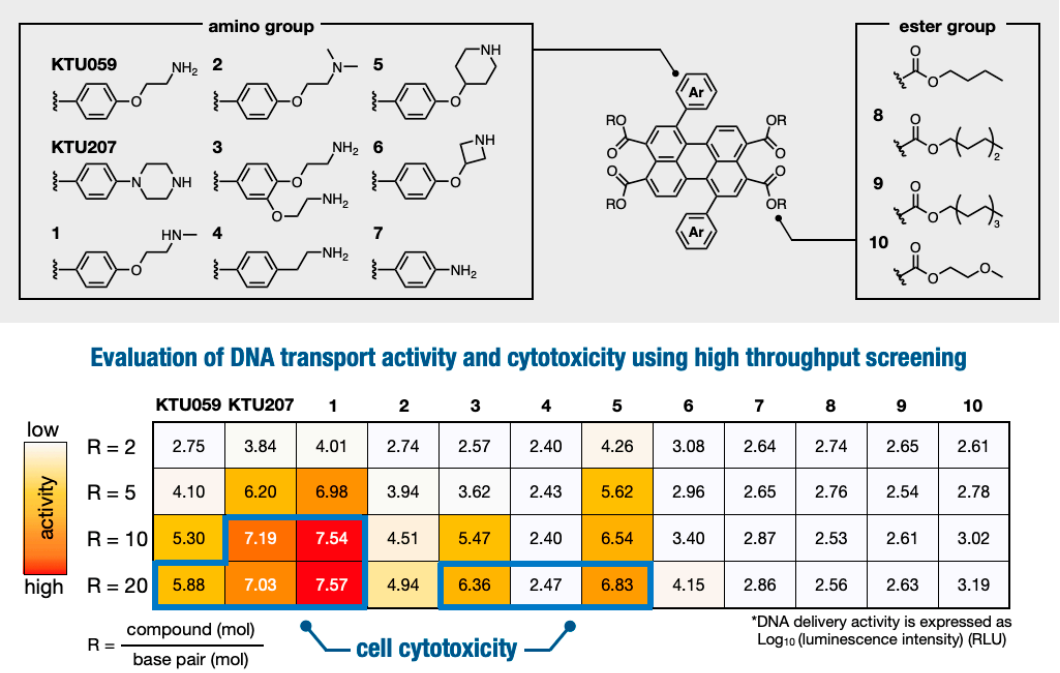
図 1. ナノカーボン分子をもちいた核酸輸送評価

a） 核酸とナノカーボン分子の複合体形成評価のためのゲルシフトアッセイ。

b） ルシフェラーゼアッセイ。

詳細な構造機能相関研究を行うため、KTU059 および KTU207 を参考に種々のアミノ基およびエステル基を有する新たなペリレン誘導体を合成し、NanoLuc をコードしたプラスミドをモデル核酸として活性評価を行った（図 2）。ゲルシフトアッセイを用いた複合体形成能の評価の結果、化合物／DNA の塩基対比（R 値）や化合物の pKa 値、立体構造が複合体形成能に大きく影響することが明らかになった。また、ルシフェラーゼアッ

セイによる DNA 輸送効率の評価および MTT アッセイによる細胞毒性の評価を行った結果、R 値と DNA 輸送効率および細胞毒性に正の相関が確認され、多くの化合物は R 値が 5 以下の条件において低い細胞毒性を示した。第二級アミンをもつ LH017、KTU207、LH044 が KTU059 を上回る DNA 輸送効率を示し、第一級アミンよりも第二級アミンを有する化合物の方が高い DNA 輸送効率を有することが明らかとなった。化合物／DNA 複合体形成が確認されなかった化合物が DNA 輸送活性を示さなかったことから、複合体形成が DNA 輸送において非常に重要なステップであることが示唆された。また、エステル基上の置換基を調整することで脂溶性を増加させた化合物は化合物／DNA 複合体形成が確認されなかったのに対し、脂溶性を低下させた化合物は高い複合体形成能を示したが DNA 輸送活性が確認されなかった。これは脂溶性の低下による複合体の細胞膜透過能または細胞内での複合体解離能の低下が原因であると考えられる。このようにアミノ基の種類や化合物の脂溶性が DNA 輸送において非常に重要な要因であることが示唆された。



	KTU059	KTU207	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R = 2	2.75	3.84	4.01	2.74	2.57	2.40	4.26	3.08	2.64	2.74	2.65	2.61
R = 5	4.10	6.20	6.98	3.94	3.62	2.43	5.62	2.96	2.65	2.76	2.54	2.78
R = 10	5.30	7.19	7.54	4.51	5.47	2.40	6.54	3.40	2.87	2.53	2.61	3.02
R = 20	5.88	7.03	7.57	4.94	6.36	2.47	6.83	4.15	2.86	2.56	2.63	3.19

図 2. ナノカーボン分子の構造機能相関研究
赤色になるにつれ高い輸送活性を示しており、青色で囲った条件は細胞生存率が 70%以下を示したものである。

2. タンパク質の細胞内輸送を加速するナノカーボン分子の開発

Cas9 タンパク質と gRNA の複合体（RNP）は表面電荷が負であることがわかっている。そのため核酸輸送にもちいられるナノカーボン分子が適用可能であることが予想される。まずはタンパク質の等電点を参考に、アニオン性の蛍光タンパク質 R-phycoerythrin（R-PE）を標的にカチオン性ペリレン誘導体を用いて輸送実験を行った。バイオイメージングの結果、細胞内に R-PE を確認できた。つづいて、ペリレン誘導体を用いて輸送されたタンパク質が生物活性を維持するかどうかを検証するために、アニオン性の加水分解酵素 β-Gal の輸送を行った。β-Gal は基質の X-Gal（5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside）を分解し青色の色素を生成することが知られている。輸送された β-Gal が生物活性を維持していれば、細胞内で酵素反応が起こり、青色色素の生成を観察することができる。イメージングの結果、細胞内に青色の色素が観察されたことから、ペリレン誘導体を用いて輸送されたタンパク質が生物活性を維持していることが強く示唆された。

またアニオン性ペリレン誘導体 SMZ034 および SMZ040 を新たに合成し、カチオン性タンパク質の輸送能の

調査を行った。カチオン性タンパク質として蛍光標識された抗体をもちいて輸送実験を行った。バイオイメージングの結果、細胞内への輸送が見出された。カチオン性ペリレン誘導体 KTU207 では輸送されなかったことから、タンパク質と化合物の複合体形成には静電相互作用が重要であることが示唆された。また SMZ034 をもちいたカチオン性の毒性タンパク質 Trypsin の輸送実験をしたところ、輸送剤なしと比べて有意な差で細胞毒性が示された（図 3)。

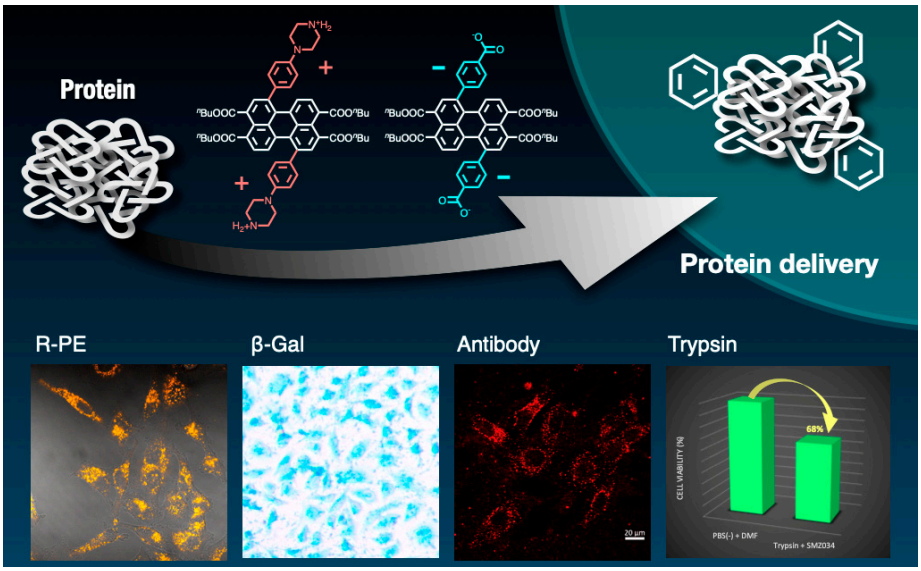


図 3. ナノカーボン分子をもちいたタンパク質の輸送
ナノカーボン分子をもちいて、R-PE、β-Gal、抗体、トリプシンの輸送を達成した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所開拓研究本部伊丹分子創造研究室の伊丹健一郎主任研究員、名古屋大学大学院理学研究科有機化学研究室の宇佐見享嗣特任助教、山田早人特任助教、深津美羽氏、清水大輔氏である。

文　献

1） Alidori S, Akhavein N, Thorek D L J, Behling K, Romin Y, Queen D, Beattie B J, Manova-Todorova K, Bergkvist M, Scheinberg D A, McDevitt M R. Targeted fibrillar nanocarbon RNAi treatment of acute kidney injury. Sci Transl Med. 2016 Mar 23;8(331):331ra39. PMID: 27009268 DOI: 10.1126/scitranslmed.aac9647.