高分子ナノキャリアによる siRNA デリバリー

特集 RNAi と DDS

位高啓史^{*1,2)}, 片岡一則^{*1)}

Development of supramolecular nanocarrier of siRNA

For *in vivo* therapeutic applications of RNAi, the siRNA delivery systems should possess highly-developed functions such as the controllable onset and duration of gene knockdown at the targeted cells. For this purpose, we developed siRNA nanocarriers formed through the multimolecular assembly of block copolymers. In this review article, the structural design of the carriers, the physicochemical properties, and the gene knockdown abilities are described.

RNAi の臨床への応用に向け、siRNA デリバリーシステムには、標的とする細胞内への効率よい輸送に加え、遺伝子ノックダウン効果の時間的制御といった高度の機能が必要となると考えられる。このような機能を持つシステム構築を目的に、機能性高分子材料をベースとしたナノキャリアを設計し、評価を進めている。本稿では、リン酸カルシウムミセル型キャリアおよびポリイオンコンプレックス型キャリアについて、その分子設計、物性、遺伝子ノックダウン機能を概説する。

Keiji Itaka^{*1,2)}, Kazunori Kataoka^{*1)}

key words : RNAi, siRNA, nanocarrier, block copolymer

RNAi による遺伝子ノックダウンは、ここ数年の生物・医学分野での最大のトピックの一つとなっている。特に Tuschl らにより、21~23 塩基程度の小さな二本鎖 RNA 分子 (siRNA) を利用すると、哺乳動物細胞においても、非特異的なインターフェロン反応を回避して、遺伝子ノックダウンを得ることが可能であることが明らかにされて以降¹⁾、種々の遺伝子の機能解析や臨床医薬への応用への道が開けた。

本稿は、RNAi メカニズムの臨床への応用を想定した siRNA デリバリーシステムに関して、筆者らのこれまでの試みを紹介するものであるが、まずはじめに、その前提となる問題に関して検討したい。すなわち、標的とする細胞、組織において有効な遺伝子ノックダウンを得るための手段として、siRNA そのものを輸送するのがよいのか、あるいは siRNA 発現ベクターの形を用いるのがよいのか、という問題である。

この両者はいずれも、遺伝子ノックダウンが起こ

るための細胞内イベント、すなわち二本鎖 RNA から RISC (RNA-induced silencing complex) 形成、標的 mRNA の分解 (または翻訳抑制) といったステップには違いはないと考えられる。当然ターゲットとなる配列の違いはない。一方、この両者はそこに至るまでの手段に大きな違いがあるわけで、その特徴、メリット、デメリットに関しては、昨年未刊行された Nature Reviews における記事に非常にわかりやすくまとめられている²⁾。すなわち、siRNA を直接輸送する方法 (siRNA transfection) の利点としては、比較的高い効率が得られること、遺伝子の転写、プロセッシングなどのステップを経ないため、作用が迅速であることなどがあげられる。

一方、siRNA 発現ベクター (主にプラスミド DNA) を用いる利点としては、プラスミド DNA の調製が容易であること、そしてなにより長期間の持続的なノックダウンが可能と考えられることであろう。通常の siRNA transfection では、有効なノックダウン効果が得られるのは数日~1 週程度であり、恒常的に発現する遺伝子の抑制は難しい場合も考えられる。

しかし、昨今問題となりつつある off-target

^{*1)} Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo 東京大学大学院工学系研究科

^{*2)} Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo 東京大学医学部整形外科

effect の問題などからも³⁾, RNAi の臨床医学への応用には, 作用の時間的・空間的なコントロールが高いレベルで求められる可能性が高い。発現ベクターを用いる場合, かえって発現しすぎることで, 非特異的な遺伝子機能抑制から深刻な問題が生ずることも考えられないではない。もちろん, このような問題はベクター設計におけるプロモーターや調節因子の工夫により, 解決されうることはあるが, 困難も予想される。また, 発現ベクターの投与自体, いわゆる遺伝子治療であり, 導入効率やベクターの安全性などの問題は避けられない。

その点, siRNA そのものをデリバリーする方法では, siRNA 分子自体は比較的不安定な物質であり, 比較的安全性の高い方法となる可能性は高い。すなわち, 必要とされる一定期間のみ作用し, そのまま生体内で分解されてなくなってしまうという, まさに通常の薬物とまったく同じメカニズムでの作用である。しかし, 標的を殺すことを目的とする治療(たとえば, がん細胞にアポトーシスを誘発させる目的の RNAi)であればともかく, 慢性疾患に対する治療や組織再生を目的とする場合, 数日のみの遺伝子機能の制御で, 十分な治療効果が得られるとはやや考えがたい。もちろん, 普通の薬のように, 定期的に反復投与すればよいのかもしれないが, 遺伝子発現のコントロール, というものが目的となる以上, 一定した遺伝子ノックダウン効果の持続性が, 相当に高い次元で要求される可能性も高い。

このような観点から, siRNA デリバリーシステムに求められる機能も自ずから明らかとなってくる。すなわち, 標的とする細胞内への効率よい輸送は当然のこととして, その効果の時間的な制御, 特にその効果の持続性が必要となる。幸い, RNAi は少量の siRNA によって遺伝子ノックダウン効果が得られると考えられており, たとえば, 細胞内に取り込まれたパーティクルから siRNA 分子が少しずつ放出されて, 一定の効果を長期間維持できるようなシステムが構築できれば, 理想的である。

従来筆者らは, 高分子ミセル型ナノキャリアを用いた, 遺伝子デリバリーシステムの研究開発に携わってきた⁴⁻⁶⁾。このシステムは, 親水性セグメントとカチオンセグメントを連結したブロック共重合体

が, 水溶媒中でアニオンである DNA, RNA などの核酸と, 静電相互作用を駆動力としてミセル形成することを活用するものである。これまでは, プラスミド DNA を用いた遺伝子導入システムを中心として研究が進められ, そのプラスミド DNA 内包高分子ミセルは, 天然のウイルスと類似した大きさ, 構造を持ち, 生体適合性, 生理的環境下での安定性に非常にすぐれたナノキャリアとなることがわかっている⁷⁻⁹⁾。このような性質は, 上述の siRNA デリバリーシステムに求められるニーズにまったく合致するものと考えられる。

リン酸カルシウムミセル型キャリア

まず, siRNA とプラスミド DNA との違いとして, その分子量が大きく異なることが考えられる。高分子のコンプレックス形成においては, 相対するカウンター分子が小さな分子量の物質である場合, 一定以下の低濃度ではコンプレックスの解離が起こってしまう。この critical association concentration について, 15 または 20 塩基鎖長のオリゴ DNA を用いて, ポリエチレングリコール-ポリリシン(PEG-PLL)ブロック共重合体とのコンプレックス形成, 解離挙動を調べているが, コンプレックスの重量濃度として 0.2 mg/mL 程度で解離が起こってしまい, 試験管内での調製はともかく, とても生体内で維持できる濃度とは考えられない¹⁰⁾。実際, ミセル化アンチセンスオリゴ DNA を用いた遺伝子ノックダウンを試みても, コンプレックスの培地中での不安定性のためか, 十分な遺伝子発現抑制効果は観察されていない。

このような問題をクリアする手段として, リン酸カルシウムと核酸との結晶化を利用する方法が考案された¹¹⁾。このリン酸カルシウム法自体, 細胞への遺伝子導入法としては非常に古くからあるものだが, 逆にその結晶形成を制御できないことが, 実験の困難さ, 再現性の低さの原因となっていた。この結晶化をコントロールすることが, ミセル形成によって可能となった。ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体(PEG-PAA)を共存させた状態で, DNA をリン酸および Ca^{2+} 溶

図1 リン酸カルシウム(CaP)の内核を有する高分子ミセル

液と混合すると、DNAを内包するリン酸カルシウム(ヒドロキシアパタイト)微結晶をPEGが覆う、コアシェル型の有機-無機ハイブリッドミセルが構築される(図1)。この有機-無機ハイブリッドミセルは細胞内に導入されると、細胞内でのCa²⁺濃度の低下に同期して内包DNAを効率的に放出する。

この手法は、結晶形成がベースとなっているため、当然先の希釈の問題は回避される。オリゴDNA(ODN)およびsiRNA分子を用いて評価したところ、粒径数百ナノメートルの均一なリン酸カルシウムミセル形成が確認された。蛍光ODNを用いた実験では、ミセルの効率的な細胞質内へのデリバリーおよび核への局在が、レーザー共焦点顕微鏡による観察で確認された¹²⁾。また、siRNA内包リン酸カルシウムミセルで、培養細胞系において顕著な遺伝子ノックダウンが起こるとの結果が、すでに得られている。

リン酸カルシウムは、生体材料としてすでに広い領域で使われている、生体適合性にすぐれた物質であり、ブロック共重合体へのリガンド導入やエンドソームエスケープ能などの機能付加により、安全かつ効率的なsiRNAデリバリーシステムへの発展が期待される。

ポリイオンコンプレックス型キャリア

一方、プラスミドDNAなどにおいてこれまで主に研究されてきたポリイオンコンプレックス型キャ

リア、すなわちポリエチレングリコール(PEG)-ポリカチオンブロック共重合体と核酸分子との、静電相互作用による自律会合、ポリイオンコンプレックス形成を利用するシステムでも、siRNAの有効なデリバリーが可能であることが明らかとなった。PEG-PLLブロック共重合体とルシフェラーゼ遺伝子(GL3)をターゲットとするsiRNAとの間で形成されるポリイオンコンプレックスにより、あらかじめウミホタル(GL3)およびウミシイタケ(RL)の2種のルシフェラーゼ遺伝子をtransfectionした培養細胞に対する、GL3の選択的なノックダウンを評価したところ、RLの発現を標準として、30~40%のGL3発現の抑制が観察された。GL3をターゲットしないnegativeコントロール配列のsiRNAではまったく変化がみられず、またsiRNAを単独で培地中に投与してもまったく効果は得られないことから、本ポリイオンコンプレックスによって、有効なsiRNAの細胞内へのデリバリーが達成されていることが示された。

アンチセンスODNでは、十分な効果がみられなかったこととくらべ、siRNAでは比較的容易に遺伝子ノックダウンが観察される原因としては、siRNAは二本鎖核酸であり、荷電密度が相対的に大きいため、より安定なコンプレックス形成が得られていることも考えられるが、やはり細胞内メカニズムとしての、RNAiの効率の高さの証左であろう。また、遺伝子発現系と異なり、クロロキンなどのエンドソーム溶解試薬^{13,14)}を用いない結果であることも注

図 2 ブロック共重合体(PEG-DPT)と siRNA によるポリイオンコンプレックス型キャリア

目される。しかし、この PEG-PLL/siRNA コンプレックスを用いて、種々の内在性遺伝子のノックダウンを試みたところ、残念ながらほとんど効果は得られず、まだこの目的のためには十分な効率となっていないことが示唆された。

一方、最近合成に成功した、カチオン部分を変化させた新規ブロック共重合体(PEG-DPT)が、効率よい siRNA デリバリーに非常に適した性質を持つことが明らかとなった(図 2)¹⁵⁾。このポリマーの特徴は、カチオン部分に異なった pKa を持つ二つのアミノ基を含むことで、生理的条件下では、低い pKa を持つアミノ基はプロトン化していないため、siRNA とのコンプレックス化に関与しないことが想定される。このようなアミノ基は、一方で細胞に取り込まれたあとは、エンドソーム内の酸性環境下ではバッファー効果、すなわちポリエチレンジアミンでしばしば議論されるプロトンポンジ効果と同様の機能を持つことが期待される^{16,17)}。

この PEG-DPT によるコンプレックス形成の様子を、電気泳動および EtBr exclusion assay で観察したところ、先の PEG-PLL や、カチオン部分が 2 級アミンのみで構成されているブロック共重合体(PEG-DMAPA)とくらべても、想定どおり 1 級アミンとほぼ選択的に静電相互作用した siRNA コンプレックスが形成されていることが示唆された。これらのコンプレックスによる、培養細胞への遺伝子ノックダウン能も、物性ときわめてよく相関し、特にブロック共重合体のカチオンと核酸のアニオンとの電荷比(N/P)が比較的高いコンプレックスで、市販 siRNA 導入試薬である RNAiFect をも上回る、非常に効率よいノックダウンが得られた(図 3)。す

図 3 ポリイオンコンプレックス型キャリアによるルシフェラーゼ遺伝子(GL3)のノックダウン

なわち、siRNA の有効なデリバリーには、まず siRNA 分子の十分なコンプレックス化、安定化が必要であり、細胞内に取り込まれたあと、低い pKa を持つアミノ基によるエンドソームエスケープ能が加わることで、効率よい遺伝子が達成されるものと推測された。

さらに、ブロック共重合体をベースとした他のミセル型キャリアにも共通して観察されることであるが^{8,9)}、血清共存下などの生理的条件下でも、その機能はほとんど変化しない。この siRNA/PEG-DPT コンプレックスでも、50%血清中で 30 分インキュベーションしたあと実験に用いても、RNAiFect などの脂質ベースのキャリアと異なり、ほとんど遺伝子ノックダウン能は影響を受けない。したがって、siRNA の *in vivo* デリバリーに対して、本キャリアは非常に期待される性質を持っているといえる。

現在、本システムによる内在性遺伝子ノックダウンの評価を進めており、がんの走化因子などの遺伝

子に対して、最大 90%以上の発現抑制の結果が得られている。また、遺伝子ノックダウンの持続期間として、RNAiFect とくらべ、オンセットが遅れるものの、その後明らかに長期にわたって持続する傾向が観察されている。すなわち、先に述べた、遺伝子ノックダウン効果の時間的な制御が可能なシステムとしての可能性を秘めていると考えられる。ただ、現状では、やはり *in vivo* 環境での使用を想定した場合、希釈された条件下でのコンプレックスの解離は避けられない可能性が高い。その対策として、架橋によるミセルの安定化を考えており^{18,19)}、現在その評価を進めているところである。また、細胞への取り込みの効率を上げ、標的細胞、組織への選択性を得るために、コンプレックス表面へのリガンド分子の導入も²⁰⁻²²⁾、非常に有効となるものと考えている。

おわりに

昨今は、種々の臨床分野でドラッグデリバリーシステムの重要性が強く認識されつつあり、総合科学技術会議が推進する府省連携プロジェクトにおける重点項目としても、“革新的ナノ薬物送達システム(DDS)のための担体材料開発”があげられている。そのなかでも、この RNAi メカニズムの疾患治療への応用に向けては、デリバリーシステムは本質的に重要なポイントとなると考えられ、その効率的なシステム開発に対する期待はきわめて大きいといえる。

siRNA そのもののデリバリーにせよ、発現ベクターを用いる系にせよ、これを広範囲の疾患治療や、再生医療分野へ適応可能な普遍的な手法へ発展させるためには、安全性や機能性にすぐれた非ウイルス型デリバリーシステムの開発が急がれる。その目的のために、本稿で取り上げた機能性高分子材料をベースとしたナノキャリアをはじめとして、そのキャリアのデザイン、生体環境での動態を制御する方法論の確立、さらには細胞内での挙動を定量的かつ経時的に計測する新規分析技術の開発など、医学・生物、工学、薬学の各分野の融合に基づく、集学的な取り組みが不可欠であると考えられる。

- 1) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Tuschl T et al. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001.
- 2) Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA : Killing the messenger : short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 : 457-467, 2003.
- 3) Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Collins FS et al. : Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 1892-1897, 2004.
- 4) Harada A, Kataoka K : Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments. *Macromolecules* 28 : 5294-5299, 1995.
- 5) Kataoka K, Togawa H, Harada A, Yasugi K, Katayose S et al. : Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline. *Macromolecules* 29 : 8556-8557, 1996.
- 6) Katayose S, Kataoka K : Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem* 8 : 702-707, 1997.
- 7) Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Shimokado K, Kataoka K et al. : Polyion complex micelles as vectors in gene therapy-pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther* 9 : 407-414, 2002.
- 8) Itaka K, Harada A, Nakamura K, Kawaguchi H, Kataoka K : Evaluation by fluorescence resonance energy transfer of the stability of nonviral gene delivery vectors under physiological conditions. *Biomacromolecules* 3 : 841-845, 2002.
- 9) Itaka K, Yamauchi K, Harada A, Nakamura K, Kataoka K et al. : Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system : physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* 24 : 4495-4506, 2003.
- 10) Harada A, Togawa H, Kataoka K : Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligodeoxynucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur J Pharm Sci* 13 : 35-42, 2001.
- 11) Kakizawa Y, Kataoka K : Block copolymer self-assembly into Monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. *Langmuir* 18 : 4539-4543, 2002.
- 12) Kakizawa Y, Furukawa S, Kataoka K : Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. *J Control Release*, (in press).
- 13) Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P : Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 225 : 186-194, 1996.
- 14) Itaka K, Miyata K, Harada A, Nakamura K, Kataoka K : Clinically Available Endosomolytic Agent for Gene Delivery. *ACS Symposium series* 879 : 154-160, 2004.
- 15) 金山直樹, 位高啓史, 片岡一則 : ポリエチレングリコール/ポリカチオンブロック共重合体による siRNA デリバリーにおけるカチオン構造の効果. 第 53 回高分子学会年次大会, III Pd 192, 2004.

- 16) Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Behr JP et al. : A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* : polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 7297-7301, 1995.
- 17) Behr JP : The proton sponge : a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* 51 : 34-36, 1997.
- 18) Kakizawa Y, Harada A, Kataoka K : Environment-sensitive stabilization of core-shell structured polyion complex micelle by reversible cross-linking of the core through disulfide bond. *J Am Chem Soc* 121 : 11247-11248, 1999.
- 19) Kakizawa Y, Harada A, Kataoka K : Glutathione-Sensitive Stabilization of Block Copolymer Micelles Composed of Antisense DNA and Thiolated Poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) : A Potential Carrier for Systemic Delivery of Antisense DNA. *Biomacromolecules* 2 : 491-497, 2001.
- 20) Erbacher P, Remy JS, Behr JP : Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 6 : 138-145, 1999.
- 21) Shi G, Guo W, Stephenson SM, Lee RJ : Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J Control Release* 80 : 309-319, 2002.
- 22) Wakebayashi D, Nishiyama N, Yamasaki Y, Itaka K, Kataoka K et al. : Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system : their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG 2 cells. *J Control Release* 95 : 653-664, 2004.