優れた細胞膜侵入性を有する遺伝子ナノキャリアの設計

Development of nanocarrier for gene delivery to improve cellular uptake

07125

研究代表者 愛知学院大学薬学部 助教 田 原 耕 平 Kohei Tahara

We previously developed modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanosphere (NS) prepared by an emulsion solvent diffusion (ESD) method as a gene delivery system. In this study, PLGA NS was modified by chitosan (CS) and polysorbate 80 (Tween 80, P80) to improve cellular uptake. We investigated cellular uptake, intracellular distribution and transfection efficiency of P80 modified PLGA NS for a plasmid DNA delivery system in A549 cells. Cellular uptake and transfection efficiency of P80-PLGA NS were greater than CS-PLGA NS. The uptake of unmodified and CS-PLGA NS was mediated, predominantly, by clathrin-mediated endocytosis. In contrast, specific endocytic pathway could not be determined on cellular uptake of P80-PLGA NS. Intracellular distribution of PLGA NS depended on the surface properties of PLGA NS. P80-PLGA NS did not show cytotoxicity for A549 cells. Thus, P80-PLGA NS could serve as an effective gene delivery system, and the surface properties of PLGA NS are key parameters for optimal intracellular uptake and distribution.

研究目的

我々は、生体内適合性・生分解性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）を基材とするナノ粒子（ナノスフェア，NS）を，プラットフォームとし，これに種々の薬物を封入し，DDS（Drug Delivery System：薬物送達システム）への応用を試みてきた。これまでの検討において，ペプチド性薬物をPLGAナノスフェア内へ封入することにより，経肺や経口投与型の新しいDDSの開発に成功している。また，美白剤を封入した機能性ナノ化粧品の開発にも携わっている。さらに，siRNAなどの機能性核酸による治療を目指した遺伝子キャリアの開発を進めている。そのためには，水溶性高分子で酵素分解を受けやすい核酸を細

胞内へ効率的に導入するシステムが必要である。即ち，どのような物性をPLGAナノスフェアに賦与するかが鍵である。また，我々はすでに，粒子表面をカチオン性のキトサンや，界面活性剤などの表面改質剤で修飾することにより，粘膜付着性や細胞内への取り込み量の増加など，新たな機能が賦与され，薬物の吸収量が增大することを確認している。しかし，粒子表面を改質したPLGAナノ粒子は，細胞内への取り込み量が增大することが分かっているが，詳しい取り込みメカニズムは解明されていない。

そこで本研究では，表面修飾ナノ粒子が細胞内へ取り込まれるメカニズムを明らかにする共に，ナノ粒子の細胞内における挙動を詳細に解析する。そこで得られた知見を粒子設計にフィードバックし，より効果的

な遺伝子ナノキャリアの設計を行うことを目的とする。

研究成果の概要

1. 緒言

遺伝子（核酸）医薬治療は、遺伝子やオリゴヌクレオチドを用いて対象となる細胞へ導入し疾患を治療する方法であり、遺伝病や癌などの難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。核酸医薬の作用点は細胞内であるため、治療を達成するためには巨大分子である核酸を細胞内へ導入する必要がある。しかしながら、核酸は水溶性の負電荷高分子であるため、細胞膜を自由拡散により透過することは難しく、また生体内に多く存在する分解酵素などにより分解・変性しその機能を失活する。よって遺伝子治療を達成するためには、遺伝子を外部刺激から保護し、細胞内へ遺伝子を導入する運搬体（ベクター）を使用する必要がある。ベクターにはウイルスを用いる方法が最も細胞内への導入効率が高いが、癌化など予期できない副作用が報告されているため、ウイルスを用いない非ウイルスベクターの開発が強く望まれている¹⁾。

我々はこれまでに、生体内分解性・適合性ポリマーであるポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）を基材とするサブミクロンサイズの生分解性微粒子（ナノスフェア、NS）中に、遺伝子を高効率に封入する技術を開発し、非ウイルスベクターとしての応用展開を目指してきた²⁾。さらに、PLGAナノスフェア表面をカチオン性ポリマーや界面活性剤を用いて表面修飾することで、より多くのナノスフェアがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、遺伝子の細胞内導入量が向上することを見出している³⁾。しかしながら、ウイルスベクターと比較すると遺伝子発現効率は非常に劣り、更なる細胞内導入効率の改善が必要とされる。

ナノスフェアと共に細胞内に貪食された核酸医薬が、その機能を発揮するためには、エンドソーム小胞を脱出した後、細胞質へ移行し、ナノスフェアから核酸医薬がリリースされる必要がある⁴⁾。ナノスフェアと細胞の相互作用機構やナノスフェアの細胞内運命に影響を与えるファクターが分かれば、これらの情報をナノスフェア設計へフィードバックし、より効率的な遺伝子ベクターの開発が可能となる⁵⁾。そこで本研究では、ナノスフェアの表面特性が細胞内取り込みメカ

ニズム及び細胞内動態に及ぼす影響について評価し、優れた細胞内侵入性を有する遺伝子ナノキャリアの粒子設計を目指した。

2. 実験方法

2.1 水中エマルジョン溶媒拡散法によるPLGAナノスフェアの調製³⁾

100mgのPLGAと 1 mgの6-クマリン（粒子の蛍光マーカー）をアセトン 2 mL中に溶解し、エタノールを 1 mL加え、ポリマー溶液とした。これを、2 %ポリビニルアルコール（PVA）溶液50mL中に、攪拌下ペリスタポンプを用いて滴下した。得られた懸濁液中に残存するPVAを取り除くため、ナノスフェアを遠心分離（20,000rpm, 10min）した。ペレットを精製水で再懸濁した後、再度遠心分離（20,000rpm, 10min）を行った。最終的に得られたペレットを精製水10mLに再懸濁し、24時間凍結乾燥した。ナノスフェアへの表面修飾は、カチオン性の生分解性ポリマーであるキトサン（CS）及び界面活性剤であるTween 80（Polysorbate 80, P80）を用いた。キトサン修飾時には、2 %PVA溶液とキトサンを溶解した酢酸緩衝液（pH4.4）の混液を、Tween 80修飾時には、2 %PVA溶液と 2 %Tween 80溶液の混液を外相とした。PLGAナノスフェア懸濁液の粒子径及びゼータ電位はZetasizer (3000HSA, MALVERN)を用いて測定した。

2.2 MTS試験を用いた細胞毒性試験

培養細胞はヒト肺上皮癌細胞A549を用いた。一定濃度のA549細胞をプレートに播種後、コンフルエントになるまで培養した。培地を除去した後、無血清培地に懸濁したナノスフェアを添加することにより、培養細胞にナノスフェアを取り込ませた。MTS法に基づく CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent（Promega）を用いて、毒性評価実験を行った。

2.3 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内取り込みの視覚的評価

ナノスフェア懸濁液をA549細胞に添加後、4 時間インキュベートし、サンプルを吸引除去した。細胞をPBSで3回洗浄後、細胞を固定化するため4 %パラホルムアルデヒドを添加し、室温で30分間静置した。固定化細胞に0.1 %Triton X-100を添加し5分静置した。TRITC-phalloidin（Sigma）溶液により細胞のアクチ

ンを染色した後、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM510, ZEISS社) により観察した。

2.4 ナノスフェアの細胞内取り込みメカニズム評価⁴⁾

ナノスフェア懸濁液と同時にエンドサイトーシス阻害剤をA549細胞に添加した。一定時間インキュベート後、細胞を溶解し、その溶解液をメタノール/クロロホルム混液 (1 : 1) に添加し、6-クマリン量を蛍光光度計で定量した。クラスリン介在型エンドサイトーシス阻害剤として高張スクロース溶液を、カベオラ介在型エンドサイトーシス阻害剤としてFilipin溶液 (1 µg/ml) を、マクロピノサイトーシス阻害剤として30µM Cytochalasin D溶液を用いた。

2.5 ナノスフェアの細胞内動態評価

ナノスフェアを取り込ませたA549細胞に、1 mLの0.1%プロナーゼ溶液を添加し、4℃で15分インキュベートした⁶⁾。その後100 µLのFBSを加えて、プロナーゼの反応を停止させた後、細胞を回収し、遠心分離 (500×g, 5分) を行った。上清0.5mLを3 mLのメタノール/クロロホルム混液 (1 : 1) に添加し、蛍光光度計により細胞表面に吸着している6-クマリン量を定量した。また、得られたペレットにProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit (メルク) を用いて細胞を分画し、各々の分画の6-クマリン量を定量した。

3. 実験結果及び考察

3.1 表面修飾PLGAナノスフェアの粒子物性

我々はこれまでにDDS用のドラッグキャリアの調

製法として水中エマルション溶媒拡散法の開発に成功し、微粒子キャリアの有用性について検討してきた。そこで、水中エマルション溶媒拡散法により、種々のポリマーで表面修飾したPLGAナノスフェアを調製し、その粒子物性を評価した (Table 1)。

調製時の外水相に粒子分散安定化剤としてPVA水溶液を用いて調製して得られたナノスフェア (未修飾, Non-PLGA NS) は、粒度分布が均一で、平均粒子径は約250nmであった。カチオン性ポリマーであるキトサンで表面修飾したPLGAナノスフェア (CS-PLGA NS) のゼータ電位は、未修飾の粒子と比べ、その値が正側にシフトし、キトサンで表面修飾されていることが確認された。さらに、粒子径も増加傾向を示した。これは、粒子表面がキトサンで修飾されることにより、ポリマー層が形成されたためと考えられた。外水相中にTween 80 (P80) 溶液を添加して粒子調製を行った粒子 (P80-PLGA NS) の場合、未修飾の粒子と比較しても、粒子径及びゼータ電位に大きな変化は見られず、これらの物性からではコーティングされていることは確認できなかった。

3.2 細胞毒性評価

キトサンのようなカチオン性物質や、Tween 80のような界面活性剤は、稀に高い細胞親和性などに由来する細胞毒性を示す場合がある。そこで、生細胞内においてテトラゾリウム塩がホルマザン産物に変換される変色反応を原理とするMTS試験を用い、細胞毒性評価を行った (Fig.1)。いずれの表面修飾剤においても、0.05%の低濃度で細胞毒性評価を行った場合、毒性は認められなかったが、0.05%以上の濃度では細胞生存率は60%以下となり強い細胞毒性が観察された。

Table.1 Physico-chemical properties of surface-modified PLGA NS

Modifier	Particle size (nm)		Zeta potential (mV)	Polydispersity
	Before freeze dry	After freeze dry		
Unmodified (Non)	251.2	254.5	-31.0	0.098
Chitosan (CS)	298.5	309.1	18.6	0.190
Tween 80 (P80)	247.4	248.1	-30.9	0.084

Fig.1 Cytotoxicities of the different PLGA NS formulations and surface modifier solutions for A549 cells. Cell viability of treated cells was determined by MTS assay. Symbols represent means $\pm$ SD (n = 6).

これらの結果から、キトサンやTween 80を生体に投与する際、極力低濃度で使用する必要性が示唆された。

PLGAは生体内分解性、適合性に優れているものの、細胞にとっては異物であり、毒性を示す可能性がある。そこで、これまでに調製されたキトサン修飾及びTween 80修飾PLGAナノスフェアについての細胞毒性評価を行った。キトサンやTween 80水溶液は強い細胞毒性を示すことが明らかとなったが、これらのポリマーを表面修飾剤として用いた表面修飾PLGAナノスフェアにおいては、細胞毒性は認められなかった。ナノスフェアへの表面修飾時には、外水相にキトサンやTween 80溶液を添加するが、遠心分離操作によってその大部分は除去される。PLGAナノスフェア表面に吸着しているキトサンやTween 80は、細胞生存率には影響しない程度の非常に少ない量であることが示唆された。

3.3 表面修飾PLGAナノスフェアの細胞内取り込み評価

粒子径がサブミクロンサイズになると、粒子が細胞内へ取り込まれうることが多数報告されている。この時、粒子の取り込みには、その粒子表面特性が大きく影響する。そこで本節では、表面修飾したナノスフェアについて、6-クマリンで蛍光標識し、その細胞内取り込みについて共焦点レーザー走査顕微鏡により観察し、視覚的評価を行った (Fig.2)。なお、粒子添加後のインキュベーション時間は4時間とし、細胞のアクチンをTRITC-phalloidin (赤) で染色して観察を行った。いずれの粒子においても、細胞内に蛍光が観察され、粒子が細胞内に取り込まれていることが確認された。また蛍光の強度は、未修飾の粒子よりも表面修飾した

Fig.2 Confocal laser microscope images of A549 cells incubated with surface-modified PLGA NSs. After 4 h incubation with a suspension of 6-coumarin (green)-containing PLGA NSs at 37 °C, A549 cell actin was stained with Alexa Fluor® 488 conjugated phalloidin (red) and examined using a confocal microscope. (a) Non-PLGA NS; (b) CS-PLGA NS; (c) P80-PLGA NS.

粒子の方が強く、キトサンやTween 80で表面修飾を施すことによって細胞内への取り込みが促進されることが示唆された。特に、表面修飾剤としてTween 80を用いたナノスフェアを添加した細胞に最も強い蛍光が観察された。キトサン修飾ナノスフェアは正のゼータ電位を持つことから、負に帯電している細胞表面と静電的に相互作用したため細胞内への取り込み量が増大したと考えられた。Tween 80は界面活性剤であることから、Tween 80と接触した細胞膜にゆらぎが生じ、粒子が取り込まれやすくなったと考えられた。

次に各種エンドサイトーシス阻害剤を用い、ナノスフェアの表面特性が粒子の細胞内取り込み経路に及ぼす影響について検討した。結果をTable 2に示す。高張スクロース溶液で細胞内取り込み量が減少したことから、未修飾及びキトサン修飾のナノスフェアはクラスリン介在型エンドサイトーシスが主の経路であることが示された。Tween 80修飾ナノスフェアの細胞内取り込みは、今回使用したすべての阻害剤で、減少したことからエンドサイトーシス経路を特定できなかった。

3.4 PLGAナノスフェアと細胞表面との相互作用評価

細胞表面と強く相互作用している粒子を、細胞に損傷を与えず細胞表面に存在する膜タンパク質のみを除去することができるプロナーゼで処理することによって除去し、表面に吸着している粒子と細胞内に完全に含まれている粒子量を定量的に評価した (Fig.3)。細胞内に取り込まれている未修飾PLGAナノスフェア量は、細胞表面に吸着している粒子のおよそ2倍であった。また、サンプルを除去した後、細胞培養を継続

Table.2 Effects of incubation temperature and endocytosis inhibitors on uptake of PLGA NS into A549 cells. Two different temperatures (4 and 37 °C) were used to evaluate the uptake of surface-modified PLGA NS. Cellular uptake of PLGA NS by A549 cells in the presence of hypertonic growth medium (inhibitor of clathrin-mediated endocytosis), filipin (inhibitor of caveolae-mediated endocytosis), and cytochalasin D (inhibitor of macropinocytosis). Results are percentage of control (non-treated A549 cells). Results are the means $\pm$ SD (n = 3), ** p < 0.01, *p < 0.05, significantly different compared with control.

	37 °C (Non-treated)	4 °C	sucrose	Filipin	Cytochalasin D
Non-PLGA NS	100.0 $\pm$ 18.1	11.7 $\pm$ 1.4 **	66.3 $\pm$ 6.9 *	125.1 $\pm$ 6.6 *	97.1 $\pm$ 2.8
CS-PLGA NS	100.0 $\pm$ 8.2	21.6 $\pm$ 6.2 **	67.4 $\pm$ 3.4 **	113.0 $\pm$ 2.3 *	90.5 $\pm$ 15.9
P80-PLGA NS	100.0 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 1.7 **	20.5 $\pm$ 1.6 **	79.6 $\pm$ 3.6 **	17.2 $\pm$ 1.4 **

Fig.3 Time course of cell binding and uptake of surface modified PLGA NS by A549 cells. Different surface properties for (a) Non-PLGA NS, (b) CS-PLGA NS, (c) P80-PLGA NS. A549 cells were incubated with NS suspension for 30 min, washed, and incubated with fresh medium (0 min time point). Medium was removed and cells were washed and analyzed for NS cellular uptake levels at different time points (60 and 120 min). Results are percentages of all PLGA NS added in the system. Symbols represent means $\pm$ SD (n = 3).

すると、細胞表面に存在する粒子、細胞内に取り込まれた粒子はともに減少する傾向がみられた。細胞表面の粒子は時間の経過とともに細胞内へ取り込まれ、エンドソーム内の粒子はリソソーム中で分解されたか、もしくはリサイクリング経路により細胞外へ分泌されている可能性が示唆された。キトサン、Tween 80で表面修飾した粒子はいずれも、未修飾ナノスフェアに比べ、細胞表面に吸着している粒子量、細胞内に取り込まれた粒子量はともに増加し、特にTween 80修飾

ナノスフェアを投与した細胞で取り込み粒子量は最も増加した。また、サンプルを除去した後、細胞培養を継続すると、未修飾の場合と同様に、細胞表面に存在する粒子、細胞内に取り込まれた粒子はともに減少する傾向がみられた。またTween 80で表面修飾したナノスフェアでは、細胞表面に比べ、細胞内に取り込まれた粒子の割合が高い値を示した。

3.5 細胞分画法を用いた微粒子の細胞内挙動の解析

Fig.4 Time course of intracellular distribution of surface modified PLGA NS. Different surface properties for (a) Non-PLGA NS, (b) CS-PLGA NS, (c) P80-PLGA NS. A549 cells were incubated with NS suspension for 30 min, washed, and incubated with fresh medium (0 min time point). Medium was removed and cells were washed and analyzed for NS intracellular distribution at different time points (60 and 120 min). Symbols represent means $\pm$ SD (n = 3).

プロナーゼ処理を施したA549細胞を、細胞分画法を適用することにより、細胞器官を細胞質ゾル、膜・オルガネラ、核、細胞骨格の4分画に分離して粒子を定量することにより、PLGAナノスフェアの細胞内動態を経時的に評価した (Fig.4)。未修飾PLGAナノスフェアの細胞内分布は、時間の経過とともに、細胞骨格の割合が増加することがわかった。また、正に帯電しているキトサン修飾PLGAナノスフェアは、膜・オルガネラ分画に集積する傾向が見られた。これは、膜・オルガネラの負に帯電している脂質二重膜と正に荷電しているナノスフェア表面のキトサンが静電的な相互作用をしたためと考えられた。Tween 80で修飾したPLGAナノスフェアでは、未修飾やキトサン修飾粒子のように特定の分画に集積する傾向は見られなかった。以上の結果より粒子の表面特性を変化させることによって、細胞内における高分子ナノスフェアの挙動をコントロールすることが可能であることが示唆された。

今後の研究の見通し

本研究において、PLGAナノスフェアは、キトサンやTween 80で表面修飾することにより、細胞内への取り込み量が増大し、その細胞内取り込みメカニズム及び細胞内挙動は、粒子表面特性に大きく依存することが明らかとなった。カチオン性ポリマーであるキト

サンで表面修飾することにより、粒子・細胞間の静電的相互作用が働き、また、界面活性剤であるTween 80表面修飾することにより、複数のエンドサイトーシス経路が関与することにより、細胞内への取り込み量が向上すること可能性が示唆された。今後の検討としては、キトサンやTween 80のような機能の異なる2種類の表面修飾物質でコーティング (ハイブリッドコーティング) をを試み、細胞内への更なる遺伝子導入効率向上を目指していきたい。

参考文献

- 1) J. Smith, Y. Zhang, R. Niven, Toward development of a nonviral gene therapeutic, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 26 (1997) 135-150.
- 2) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, T. Niwa, Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 41-48.
- 3) K. Tahara, T. Sakai, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene deliver, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 210-216.
- 4) J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 55 (2003) 329-347.

- 5) IA. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev.* 58 (2006) 32-45.
- 6) D. Eboue, R. Auger, C. Angiari, T. Le Doan, J.P. Tenu, Use of a simple fractionation method to evaluate binding, internalization and intracellular distribution of oligonucleotides in vascular smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem.* 111 (2003) 265-272.

発表論文

K. Tahara, H. Yamamoto, H. Takeuchi, N. Hirashima, and

Y. Kawashima. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 198-204.

学会発表

- 1) 田原耕平, 山本浩充, 川島嘉明 PLGAナノスフェアの細胞内取り込みメカニズムと細胞内挙動の解析 日本薬剤学会第23年会 札幌コンベンションセンター 2008/5/20
- 2) 田原耕平, 山本浩充, 川島嘉明 薬物送達用生分解性ナノ粒子の細胞内侵入性とその安全性評価 秋期粉体工学会 幕張メッセ国際会議場 2008/10/30