光に応答する遺伝子デリバリーシステム ～エンドソーム脱出を中心とした細胞内トラフィック制御～

長崎 健¹, 濱田 勉²

¹大阪市立大学大学院 工学研究科 (〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本3-3-138)

²北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス系 (〒923-1292 石川県能美市旭台1-1)

Photoresponsive Gene Delivery System: Photoregulation of Intracellular Trafficking Using Photoresponsive Liposome

Takeshi NAGASAKI¹ and Tsutomu HAMADA²

¹Graduate School of Engineering, Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

²School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292

(Received June 26, 2017)

Since light as a stimulus can be controlled both temporally and spatially, photo-irradiation improves both the endosomal escape of exogenous DNA and DNA release from the complexes with carriers. When a photo-responsive cationic lipid formed a cell-sized giant vesicle, we observed the photo-isomerization effect of azobenzene on its shape change. Photoswitching the membrane line tension induced reversible transitions between a closed sphere and an opened disk with a bilayer pore. In a transfection experiment using a photoresponsive cationic lipid, UV irradiation improved the transfection efficiency. After the lipoplexes passed through the plasma membrane by endocytosis, trans to cis isomerization of azobenzene moiety destabilized the vesicle membrane, thus accelerating not only the membrane fusion of the photo-responsive lipid vesicles but also the endosomal escape of the exogenous DNA.

Key Words: Photoregulation, Gene delivery, Endosomal escape, Intracellular Trafficking, Liposome

1. はじめに

核酸医薬(プラスミドDNA・siRNA・アンチセンス核酸・CpGオリゴ核酸など)は、それらが機能すべき細胞内オルガネラ(核・細胞質・エンドソーム・ミトコンドリアなど)に存在しなければならない(Fig. 1). つまり、核酸医薬デリバリーシステムは体内組織標的能・細胞標的能を有するに留まらず細胞内トラフィック制御能をもつ効率的デリバリーシステムであることが求められる¹⁾.

CpGオリゴ核酸は非メチル化CpGモチーフを含む約30塩基程度の1本鎖DNAであり²⁾, 強い免疫賦活作用・アジュバント活性を有し, 単独でのがん免疫療法・がんワクチンアジュバントとして期待されている³⁾. このCpGオリゴ核酸は免疫細胞のエンドソーム内膜に発現するTLR-9 (Toll-Like Receptor-9)に結合することで様々な免疫細胞を活性化する^{4,5)}.

21-23塩基の短い2本鎖RNAであるsiRNAは, 細胞質においてDicerやRISCの働きによって標的遺伝子のmRNAを切断し, 特定タンパク質の発現を抑制する^{6,7)}. また13-25

Fig. 1 Nucleic acids delivery requiring regulation of intracellular trafficking.

塩基の1本鎖オリゴ核酸のアンチセンス核酸も細胞質で標的遺伝子のmRNAと特異的に結合し、リボソームでの翻訳過程で立体的な障害・RNase HによるmRNAの切断を介することによって、タンパク質発現を抑制する⁸⁾。

ミトコンドリアゲノムDNAの変異は、筋肉や神経に関する疾患原因となる⁹⁾。治療は、正しくコードされたプラスミドDNA・ゲノムDNA・または変異ゲノムDNAの修復・複製の阻害・分解を引き起こすオリゴ核酸をミトコンドリアにデリバリーする必要がある^{10,11)}。

プラスミドDNAは核内で転写因子やRNAポリメラーゼを利用して正常なmRNA・タンパク質を合成する。外部遺伝子に基づく正常タンパク発現をもたらす遺伝子治療法はがんのみならずADA欠損症など特定遺伝子の欠損・変異による先天遺伝子疾患に対して期待されている^{12,13)}。ゲノムDNAとの3重鎖形成による転写阻害を引き起こすアンチジーン^{14,15)}、転写因子等の活性を抑制するデコイ核酸などのオリゴ核酸¹⁴⁾も、その作用機序から核内に効率的にデリバリーされる必要がある^{16,17)}。

以上のように、同じ核酸医薬であっても、その目的に応じて標的細胞内オルガネラが異なり、細胞内トラフィッキング制御は必須である^{18,19)}。特に、プラスミドDNAの遺伝子デリバリーにおいては、標的細胞に到達したとしても、そこから細胞膜の通過・エンドソーム脱出・核内移行・転写と多くの障壁を突破する必要がある。つまり、遺伝子治療に核酸デリバリーシステムを用いようとするれば、標的細胞の核内に到達するまではプラスミドDNAを保護するために強く結合し、数多くの障壁を突破し目的地に到達したならば相互作用を低下させリリースするという相反する機能が求められる。このような仕事を達成するには、刺激に応答し構造や物性を変化させる分子機械の概念を導入することが有用である²⁰⁾。

一般に、遺伝子デリバリーにおいてはカチオン性ポリマーや脂質集合体などを利用した非ウイルスベクターが利用されている²¹⁻²³⁾。そして遺伝子とベクターの複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる²⁴⁾。エンドサイトーシスでは通常、遺伝子はリソソームへと輸送され、分解される²⁵⁾。従って、このリソソームでの核酸医薬の分解を回避するためのエンドソーム脱

出が外部遺伝子からのタンパク発現においては律速段階であることが報告されている²⁶⁾。そこで、本稿では遺伝子デリバリーシステムの中で、光応答性化合物を用いエンドソーム脱出を促進させる遺伝子デリバリーシステムに焦点を絞り紹介する。

2. アゾベンゼンを有する光応答性両親媒性脂質からなるリポソームの光応答性

分子機械の駆動力である物理的シグナルとして、イオン濃度・電子・温度・磁場・放射線など多様なシグナルが存在するが、光はその操作性(波長・強度・照射範囲など)において特に優れ、時空間制御の可能性を有している。エンドソームも脂質二分子膜で覆われた細胞内オルガネラであり、その二分子膜を不安定化させることにより導入遺伝子のエンドソーム脱出を促進可能である。そこで、光異性化や光分裂反応により遺伝子キャリアであるリポソーム二分子膜を不安定化させることが出来れば、エンドソームから細胞質への脱出を促進できるのではないかと考え、アゾベンゼン残基をもつカチオン性脂質(KAON12)を合成した²⁷⁾。

2.1 ナノサイズ一枚膜リポソームの物性・構造変化

アゾベンゼンは*trans*体が熱力学的に安定であり、遮光条件下で保管すると全ての分子が*trans*体となる。*trans*-KAON12を用い超音波法によりリポソームを形成させると動的光散乱法によって平均粒径28.8 nmのナノサイズ人工二分子膜小胞(Small Uni-lamellar Vesicle: SUV)が得られる。この状態で微弱な紫外光照射(365 nm, 3.2 mWcm⁻², 5 min)により、57%が*cis*体へ異性化した平均粒径209 nmの光定常状態となる。このSUVの構造変化を透過型電子顕微鏡で観察すると、紫外光照射によりラメラ構造が見られ(Fig. 3), *trans*体から*cis*体への光異性化が膜構造の安定性に影響を及ぼし、膜融合が誘起されたことが示唆される。

Fig. 2 Photo-isomerization of KAON12.

Fig. 3 Transmission electron micrograph of KAON12 membranes before (A) and after (B) UV irradiation.

3. ジャイアント一枚膜リポソームの動態制御

3.1 ジャイアント一枚膜リポソーム (GUV)

光による二分子膜の不安定化や構造変化を解析するため、光学顕微鏡でリアルタイム観察可能なマイクロメートルスケールの人工脂質二分子膜小胞(Giant Unilamellar Vesicle: GUV)の実験を行った。GUVにて膜の物理現象を人工的に創り出しそのメカニズムを理解できれば、膜の形や動きを制御する新規マテリアル設計の指針となることが期待される。ここでは、光応答性分子を導入したGUVの実験例として、膜で仕切られた界面を物質が透過するために必要な「ポア形成」および「ベシクル融合」の二つの膜形状変化を取り上げる (Fig. 4)。

3.2 ポア形成

脂質二分子膜にポアが形成すると、脂質分子は疎水基を水から避けるように分子を再配置する (Fig. 4(a))。この様な分子配置は、平らな二分子膜を作りやすい分子構造を備えた脂質分子にとって、自由エネルギーのコストが生じる。この縁の単位長さあたりの自由エネルギーは線張力と呼ばれ、典型的な値はおおよそ10 pNである。このポア形成の自由エネルギーコスト (線張力) を下げることが出来れば、安定なポアを作り出すことができる。これまでに、タリンと呼ばれるタンパク質をGUVに添加することで、安定なポアが膜面に形成されることが報告されている²⁸⁾。また、界面活性剤(Triton-X100等)をGUVに添加すると、ポアが一時的に開き、その後閉じる過程が観察されている²⁹⁾。タリンや界面活性剤は親水部の大きい両親媒性分子の特性を持ち、二分子膜の縁に局在する傾向がある。これにより線張力を下げ、ポアの安定性を高めている。そこで我々は、親水部の大きい両親媒性の光応答性分子KAON12をGUVに加えて、ポアの安定化を試みた³⁰⁾。まずtrans体のKAON12を含むGUVを作製した。KAON12の含有量を増やすと、GUVに形成されたポアが大きくなることを確認した。そして、紫外光でtrans体からcis体へ光異性化させると、ポアが閉

(a) Pore formation

(b) Vesicle fusion

Fig. 4 Molecular transport associated with membrane deformation.

じて膜がカプセル化することを発見した (Fig. 5)。可視光を照射してtrans体に戻すと、ポアを再び作り出せる。すなわち、膜面のポア開閉を可逆的に制御可能である。さらに、熱ゆらぎに起因する膜のダイナミクス解析から、縁の線張力を定量化すると、trans体がcis体よりも小さな値であることが分かった。この光による線張力の増減が、ポア形成・消滅のメカニズムである。

3.3 ベシクル融合

膜融合 (Fig. 4(b)) は、ウイルス感染・神経伝達・細胞内物質輸送などの膜を介した物質移動に必須のプロセスである。我々は、光応答性両親媒性分子Azo-TAB (Fig. 6) をGUVに加えることで、ベシクル融合を人工的に制御出来ることを発見した³¹⁾。UV照射により、二つの隣り合うベシクルが融合し、一つのベシクルに変形する。実験温度が高く、GUV中のコレステロール濃度が高いときに、融合現象が観察される (Fig. 7)。Azo-TAB分子は、trans体とcis体で膜との親和性が異なることが報告されている。trans体からcis体への光異性化によって、Azo-TAB分子は膜から抜ける。すると、膜を構成している1分子あたりの分子面積が増加し、膜が張った状態となり自由エネ

Fig. 5 Reversible photo-regulation of pore formation. (Adapted with permission from Ref.30, Copyright 2010 American Chemical Society).

Fig. 6 Photo-isomerization of AzoTAB.

Fig. 7 Photo-regulation of membrane fusion. Effects of cholesterol mole fraction and temperature on fusion together with images of the fusion and adhesion of two GUVs. (Adapted with permission from Ref.31, Copyright 2017 American Chemical Society).

ギーが増加する。この変化した分子面積を最適面積に戻そうとする復元力は膜張力と呼ばれ、二つのベシクルを融合させる原動力となる。実験から紫外光照射によるGUV面積変化を測定し、膜張力は21 mN/mと見積もった。

以上の結果から分かるように、アゾベンゼンを有する光応答性両親媒性分子の光異性化は二分子膜の構造を動的に変化・制御可能である。

4. トランスフェクション効率の光制御

光応答性脂質の分子集合体形成能低下に基づく膜構造の不安定化、さらにはエンドソーム膜との膜融合によるエンドソーム脱出促進を期待し、トランスフェクション効率の光制御を検討した。

trans-KAON12からなるSUVとルシフェラーゼをコードするプラスミドDNA (pGL3) との複合体を調製し、アフリカ緑ザル腎細胞 (COS-1) 細胞への導入を行った。細胞培養培地地上清にDNA複合体を添加後3時間培養を行い細胞内へ取り込ませた後、培地を交換し、培養プレート底面より紫外光を照射(365 nm, 3.5 mWcm⁻², 10 min)することでトランスフェクションへの光照射効果を検討した。

培地添加3時間後、複合体がエンドソームに最も集積しているタイミングで*trans*体から*cis*体への構造変化を惹起するため、紫外光照射を試みた。最終的な発現タンパク量で評価した場合、光応答性脂質であるKAON12を用い、光照射を行うと、光照射なしの場合と比較し2倍以上の発現効率の向上が見られた (Fig. 8)。一方、光非感受性のリポフェクチンではUV 光照射を行っても有意な発現効率向上は観察されなかった。

5. エンドソーム脱出の光促進

光応答性リポソームとプラスミドDNA複合体の光照射によるエンドソーム脱出促進を確認するために、光異性化と比較し、DNAとの親和性や、二分子膜形成能がより劇的に変化する*o*-ニトロベンジル基を有する光開裂性カチオン脂質(KNBN12)を用いた (Fig. 9)。KNBN12からなるリポソームは紫外光照射により膜融合が促進す

Fig. 8 Transfection Efficiency of DNA Complexes with KAON12. DNA complex was formed using 1 mM lipid dispersion (7.7 mL) and pGL3 (1 mg). After that, transfection was carried out for three hours using COS-1 cells in a 24-well plate, and the activity of luciferase in lysed cell solutions was measured 48 hours later to assess transfection efficiency.

Fig. 9 Structure of photo-cleavable lipid KNBN12.

Fig. 10 Microscopic images showing COS-1 cells incubated with a complex of FITC-labeled pGL3-control DNA and rhodamine-PE-labeled KNBN12 liposome for 3 h at 37°C. Nuclei are post-stained with DAPI. Intracellular trafficking of fluorescently labeled plasmid DNA (FITC) and carrier lipid (Rhodamine) were fixed before (A) and after (B) UV irradiation (3.5 mWcm⁻², 10 min).

る³²⁾。さらに、KNBN12/プラスミドDNA複合体をCOS-1細胞培地に添加し、3時間後に紫外光照射したところ、トランスフェクション効率は約2倍上昇した。そこで、蛍光ラベル化した複合体を用いトランスフェクション3時間後に紫外光照射を行い、蛍光顕微鏡で細胞内局在を観察した (Fig. 10)。光照射後では細胞質全体にプラスミドDNAが拡散し、プラスミドDNAとの親和性低下、さらにはエンドソーム脱出が促進することが証明された。

6. まとめ

アゾベンゼンを基体とする光応答性脂質は*trans-cis*の構造変化によりその分子集合体の形態が大きく変化することが明らかとなった。この変化は光異性化による膜の物性変化に基づく³³⁾。またこの変化により他の二分子膜との融合などが誘起された。エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた場合にはエンドソーム膜との融合により、薬物の細胞内輸送にも大きな影響を与えることが明らかとなった。実際、光開裂性脂質を用いた時、蛍光ラベル化複合体の蛍光顕微鏡観察によりエンドソーム脱出の光促進が確認出来た。

謝 辞

新海 征治教授、高木 昌宏教授、永井 健博士、Anatoly Zinchenko博士をはじめとする論文共著者の方々に深く感謝いたします。本研究は、科学研究費補助金、科学技術振興機構JST-SORST、日本医療研究開発機構AMED-CREST、および滋谷学術文化スポーツ振興財団の支援を受けて行われました。

参考文献

- 1) R. Duncan: Biochem. Soc. Trans. **35** (2007) 56.
- 2) G. Hartmann and A. M. Krieg: J. Immunol **164** (2000) 944.
- 3) A. M. Krieg: Nat. Rev. Drug Discov. **5** (2006) 471.
- 4) H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Masumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, *et al.*: Nature **408** (2000) 740.
- 5) E. Latz, A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock: Nat. Immunol **5** (2004) 190.
- 6) E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon: Nature **409** (2001) 363.
- 7) S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Bezch, and G. J. Hannon: Nature **404** (2000) 293.
- 8) L. K. Lee and C. M. Roth: Curr. Opin. Biotechnol **14** (2003) 505.
- 9) R. McFarland, R. W. Taylor, and D. M. Turnbull: Curr. Top. Dev. Biol. **77** (2007) 113.
- 10) Z. Chen, R. Felsheim, P. Wong, L. B. Augustin, R. Metz, B. T. Kren, and C. J. Steer: Biochem. Biophys. Res. Commun **285** (2001) 188.
- 11) R. W. Taylor, P. F. Chinnery, D. M. Turnbull, and R. N. Lightowlers: Nat. Genet. **15** (1997) 212.
- 12) M. L. Edelstein, M. R. Abedi, and J. Wixon: J. Gene. Med. **9** (2007) 833.
- 13) M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon, and R. M. Edelstein: J. Gene. Med. **6** (2004) 597.
- 14) R. Piva and R. Gambari: Minerva Biotechnol **11** (1999) 193.
- 15) R. V. Guntaka, B. R. Varma, and K. T. Weber: Int. J. Biochem. Cell Biol. **35** (2003) 22.
- 16) A. Bene R. C. Kurten, and T. C. Chambers: Nucleic Acids Res. **32** (2004) e142.
- 17) M. Sakaguchi, T. Nukui, H. Sonogawa, H. Murata, and J. Futami: Nucleic Acids Res. **33** (2005) e88.
- 18) S. Hama, H. Akita, R. Ito, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, and H. Harashima: Mol. Ther. **13** (2006) 786.
- 19) J. Zhoh, J. W. Yockman, S. W. Kim, and S. E. Kern: Pharm. Res. **24** (2007) 1079.
- 20) T. Nagasaki and S. Shinkai: J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. **58** (2007) 1091.
- 21) I. S. Zuhorn, J. B. F. N. Engberts, and D. Hoekstra: Eur. Biophys. J. **36** (2007) 349.
- 22) M. Breunig, S. Bauer, and A. Goepferich: Eur. J. Pharm. Biopharm **68** (2008) 112.
- 23) L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, and S. H. Alvarez: Gene Ther. **12** (2005) 1734.
- 24) J. Rejman A. Bragonzi, and M. Conese: Mol. Ther. **12** (2005) 468.
- 25) A. L. Schwartz: Pediatr. Res. **38** (1995) 835.
- 26) T. Hashimoto, T. Kawazu, T. Nagasaki, A. Murakami, and T. Yamaoka: Sci. Technol. Adv. Mater. **13** (2012) 025009.
- 27) T. Nagasaki, K. Wada, and S. Tamagaki: Chem. Lett. **32** (2003) 88.
- 28) A. Saitoh, K. Takiguchi, Y. Tanaka, and H. Hotani: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95** (1998) p. 1026.
- 29) T. Hamada, Y. Hirabayashi, T. Ohta, and M. Takagi: Phys. Rev. E Stat. Nonlin: Soft Matter Phys. **80** (2009) 051921.
- 30) T. Hamada, R. Sugimoto, M. Vestergaard, T. Nagasaki, and M. Takagi: J. Am. Chem. Soc. **132** (2010) 10528.
- 31) Y. Suzuki, K. H. Nagai, A. Zinchenko, and T. Hamada: Langmuir **33** (2017) 267.
- 32) T. Nagasaki, A. Taniguchi, and S. Tamagaki: Bioconjug. Chem. **14** (2003) 517.
- 33) T. Hamada, Y. T. Sato, K. Yoshikawa, and T. Nagasaki: Langmuir **21** (2005) 7626.