

## 細胞内遺伝子・核酸の定量的・動的イメージングを基盤とした 細胞内動態解析及びその制御に関する研究

秋田 英万

### Control and Analysis for Intracellular Trafficking of Nucleic Acids Based on Quantitative and Dynamic Imaging

Hidetaka AKITA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,  
Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan*

(Received June 14, 2011)

In the 21st century the category of biomedicine is now expanding from low-molecular drugs to recombinant proteins, antibodies, and nucleic acids (e.g., siRNA and plasmid DNA). In this era also, development of a novel nanotechnology to control intracellular trafficking is highly desired. For a promising gene therapy, an efficient nuclear delivery vector is a minimum requirement. Quantitative and mechanism-based information on differences in transfection efficiency between viral and non-viral vectors would be highly useful to improve the effectiveness of non-viral vectors. In this review, we will summarize our recent progress in quantitative comparison and underlying mechanisms of the intracellular trafficking between adenovirus vectors and plasmid DNA (pDNA) transfected by non-viral vectors. Our analysis has revealed that poor post-nuclear delivery events, as well as the nuclear delivery process itself are key processes to focus on. Especially, less effective transcription and translation are most likely due to poor nuclear decondensation and excess electrostatic interaction between mRNA and the gene carrier, respectively. Meanwhile, we have developed a multi-functional envelope-type nano device (MEND), in which the pDNA/polycation core is encapsulated in the lipid bilayers. Based on feedback information concerning the rate-limiting processes of gene carriers, we controlled the number of lipid envelopes to enhance the decoating of encapsulated pDNA from the envelope structure. As an expanded application of this concept, we have developed a tetra-lamellar MEND (T-MEND), which is designed to overcome the endosome and nuclear membranes by step-wise membrane fusion.

**Key words**—gene delivery; intracellular trafficking; imaging; siRNA; nanoparticle

#### 1. はじめに～科学と薬学の変遷～

薬学の歴史を振り返ると、劇的に発展した転換期の1つに19世紀を挙げることができよう。1805年、ドイツの薬剤師ゼルチュルナーが初めて阿片からモルヒネの抽出・結晶化に成功し、その後、多くの薬学者により様々な動物や植物から有機化合物が抽出される時代になった。また、1806年にベリセリウスらによって名称が提唱された「有機化学(Organic chemistry)」もこの時代に大きく発展した。1850年前後にはヴェルツやホフマンらによってア

ンモニア、アミンの発見がなされ、それに引き続き、ケークレやクーパーらによって「原子価」理論が提唱されている(1858年)。さらに、2重結合(ブラウン; 1864年)、ベンゼン環(ケークレ; 1866年)などの化学構造が提唱されることにより、分子構造論の基礎が確立された。多くの化学者の興味有機化合物の合成に向けられるとともに、合成された有機化合物を医薬へと利用する試みがなされてきた。いわゆる、合成医薬品の出現である。ブラントンにより亜硝酸アミルが狭心症に適応(1868年)されたのを皮切りに、抱水クロラルの睡眠薬としての有用性(リープライヒ, 1869年)や、アセチルサリチル酸(アスピリン)の解熱鎮痛剤としての優れた効果(ドレッサー, 1899年)が見い出されている。また、パストゥールによってなされた

北海道大学大学院薬学研究院(〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目)

e-mail: akita@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、平成23年度日本薬学会奨励賞受賞を記念して記述したものである。

微生物（酵母）の発見（1857年）や低温殺菌法の開発（1865年）、さらにはワクチン開発（1880–1885年）も、19世紀後半になされた偉業として挙げることができる。

一方で、20世紀は、分子生物学が誕生し、疾患の原因が分子レベルで解明される時代となった。1953年4月、ワトソンとクリック（1962年ノーベル生理学・医学賞受賞）の連名で *Nature* 誌に掲載されたわずか900語たらずの論文は、その後のDNAを中心とした分子生物学の幕開けの原動力となった。また、1960年代後半、アーバー、スミスらによってなされた制限酵素の発見や、1980年代にマリス（1993年ノーベル化学賞受賞）によりなされた polymerase chain reaction (PCR) 反応の発明は、遺伝子クローニング技術を始めた分子生物学の基盤技術となり、本分野の大きな発展をもたらした。これまでに多くの酵素やホルモンが高分子医薬品として開発されてきたが、その初期のものは動物、植物、微生物から精製されたものであった。ヒト以外の生物からの精製タンパクは抗原性が大きな問題であったが、このような問題点を解決したのが、遺伝子組換え技術によるヒト型タンパク質の大量生産技術である。現在では、インスリンや成長ホルモンなどが製品化されている。また、1975年頃にマウスモノクローナル抗体作製技術が確立され、抗体を利用した分子標的薬の開発が進んだ。初期のものは治療効果は低く、抗体医薬開発は一次低迷したが、ヒト化抗体の開発により、抗体医薬は現在のブロックバスターの大部分を占めるほどの大きな成功を収めている。また、1987年には、欠損している遺伝子を補足する遺伝子治療研究の先駆けとして、外来プラスミドDNAそのものを細胞内に導入する技術が報告されている。

21世紀に入り、さらに既存の概念を覆す研究が次々と報告されている。その1つとして、ファイアーやメロー（2006年ノーベル医学生理学賞受賞）らのグループにより2000年前後に発見されたRNA interference (RNAi) が挙げられよう。これは相補的な2本鎖からなる短鎖RNAにより引き起こされる現象であり、アンチセンス鎖と相補的な配列を有するmRNAを特異的に切断することで、特定のタンパク発現レベルを抑えることが可能となる。本現象の発見は、RNAの存在意義に関して大

きなパラダイムシフトを起こしており、従来から捉えられてきたセントラルドグマの中間体としてのmRNAから、分化調節・がん化に係わる中心的な機能分子としてのmicroRNA (miRNA) へと、その生理的意義の議論は大きな広がりを見せている。折りしも、2003年にはヒトゲノムの解読が完了し、本配列情報はバイオインフォマティクスの発展とともに、新規遺伝子の同定に大いに役立つものと期待されている。特に、数万から数十万という膨大な種類の細胞内遺伝子発現レベルを一度に解析できるマイクロアレイ技術は、疾患に関連する遺伝子・miRNAを網羅的に探索することを可能とする。欠損遺伝子を補足可能な遺伝子治療や特定の遺伝子をノックダウン可能なsiRNAは、これらバイオインフォマティクスから得られる情報を治療へと発展させる上でも有用であり、また、がんなどの疾患の「個性」にも対抗可能な有力な次世代医薬として大きな期待がかかる。

以上のように、1950年代に幕を開けた分子生物学の劇的な変遷に伴い、バイオ医薬は従来からの低分子化合物だけでなく、抗体やサイトカイン、遺伝子、核酸などの多岐にわたる高分子へと広がりを見せており、大きなパラダイムシフトが起きているといっても過言ではない。

ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) の概念は1970年頃から提唱されており、初期研究においては薬物放出制御が中心的な目的であったが、現在ではその概念はより広く捉えられており、薬物の投与部位から血中への吸収改善を目指した「生体膜・生体組織バリアの克服」や、積極的な病巣部位への薬物輸送を目指した「標的指向性の付与 (ターゲティング)」、さらに、化学修飾などによる「副作用の回避」などもその目的として含まれるようになった。

さらに、現在、バイオ医薬の高分子化に伴い、DDS研究も、大きな転換期を迎えていると考えられる。

## 2. DDSの新たな課題：細胞内動態制御

薬の機能を適切かつ効果的に発揮させ、また、副作用を軽減させるためには、薬理作用部位まで特異的に送達させるためのDDSの構築が不可欠である。抗がん剤などは脂溶性に富んだ低分子薬物である。したがって、これら薬物は、リボソームなどの

輸送キャリアによって腫瘍組織まで運ばれ、細胞外で放出されれば、自発的に細胞内に取り込まれて薬効を示すことができる。一方で、高分子においては、サイズなどの物性の問題から細胞への取り込みが著しく制限される。特に、遺伝子・siRNAなどの核酸医薬は高い負電荷を帯びた高分子であり、細胞表面の負の表面電荷との反発をうけるために細胞内への取り込みは低い。したがって、細胞膜の突破が第一の関門となる。さらに、送達させる高分子によって、細胞内の送達させるべきオルガネラを考慮する必要がある。例えば、siRNAは、細胞質に存在するアクセプタータンパクである RNA-induced silencing (RISC) complex に認識させる必要がある。一方、プラスミド DNA を送達する遺伝子治療においては、転写を受ける部位である核まで送達させる必要がある。このように、従来の低分子薬物において、個々の薬物の作用機序を考慮した体内動態制御（臓器標的化）が必要であったように、遺伝子・核酸などの高分子医薬においては、それらの作用メカニズムを考えて特定のオルガネラに輸送するための細胞内動態制御（オルガネラ標的化）が新たな重要な課題となる。

### 3. 細胞内動態解析に基づく人工ベクターにおける律速段階の同定

われわれはこれまで、遺伝子治療用ベクターの開発を主な研究として展開してきた。遺伝子治療用ベクターを開発する上では、エンドソーム膜や核膜などの生体膜や、細胞質における DNase, RNase などの分解酵素を主とする様々な生体内バリア（セルバリア）を突破し、最終的な転写部位である核まで遺伝子を送達する必要がある。これらのバリアを突破するためには、性質や機能の異なる素子を1つのナノ粒子に搭載することが極めて重要である。ウイルスは、長年の進化と淘汰を経る中で、これらのセルバリアを突破するための様々な機能を獲得している。さらに、これらを1つのナノ粒子内に効率よく搭載した究極的な構造体と言える。実際、遺伝子ベクターはウイルスベクターと人工ベクターの2種に分類されるが、現在の臨床試験の多くはウイルスベクターを用いたものである。<sup>1)</sup> この原因は主に、「ウイルスベクターのほうが人工ベクターよりも発現効率が低い」ことに起因する。一般的にこのことが認知されてから長い年月が経過しているが、なぜ人工

ベクターの効率は劣っているのか？ この疑問に対する答えはブラックボックスであった。この大きな要因として、遺伝子の細胞内動態の定量法自体が確立されていなかったことが挙げられる。そこで、細胞内動態を解析する新たな方法として、われわれは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、エンドソーム/リソソーム、細胞質、核内の遺伝子量を同時に測定する方法論を開発した。<sup>2)</sup> 蛍光ラベルした遺伝子を細胞内に導入した際、時間の間はクラスターとして検出される。<sup>3)</sup> この現象を利用し、エンドソーム/リソソーム、及び核などのオルガネラを蛍光により染め分けをし、ローダミンラベルした遺伝子の局在を明らかにした上で、「遺伝子のクラスター面積」を遺伝子量の指標として3次元的に定量する方法を開発した (Fig. 1)。われわれはこの方法を Confocal Image-assisted 3-Dimensionally Integrated Quantification (CIDIQ) 法と名付けている。本方法を用いることにより、単一細胞レベルで遺伝子のオルガネラ局在分率についての情報を得ることができる。また、RealTime PCR を用いて求めることが可能な遺伝子のコピー数に関する情報を統合することで、細胞内動態で考慮すべきエンドソーム、核オルガネラに存在する遺伝子量をコピー数として算出することができる。本方法を用い、われわれは、人工ベクターとウイルスベクターの代表として、カチオン性リポソームを用いた市販の試薬「Lipofectamine PLUS (以下、LFN と記載)」とアデノウイルスベクターを選び、両者の細胞内動態比較を行った。<sup>4)</sup>

最適化されたプロトコールに従いトランスフェクションしたところ、両ベクターともトランスフェクション後、3時間で遺伝子発現が認められ、以後の時間における両ベクターの発現活性はほぼ同じであることが明らかとなった。一方、RealTime PCR により投与量をマーカー遺伝子のコピー数として表記して比較した結果、同程度の活性を示すのに必要なコピー数は、人工ベクターにおいてアデノウイルスと比較して数千から1万倍多いことが示された。<sup>4)</sup> *in vivo* への応用などを考えると、投与量を最小にするためには、単位コピーあたりの発現活性を向上させる必要がある。したがって、細胞内のどの過程にこの要因があるのかを明らかにすることは、人工ベクターを開発する上で有用である。本研究を開始した当初、このような3-4桁にも及ぶ遺伝子発現効

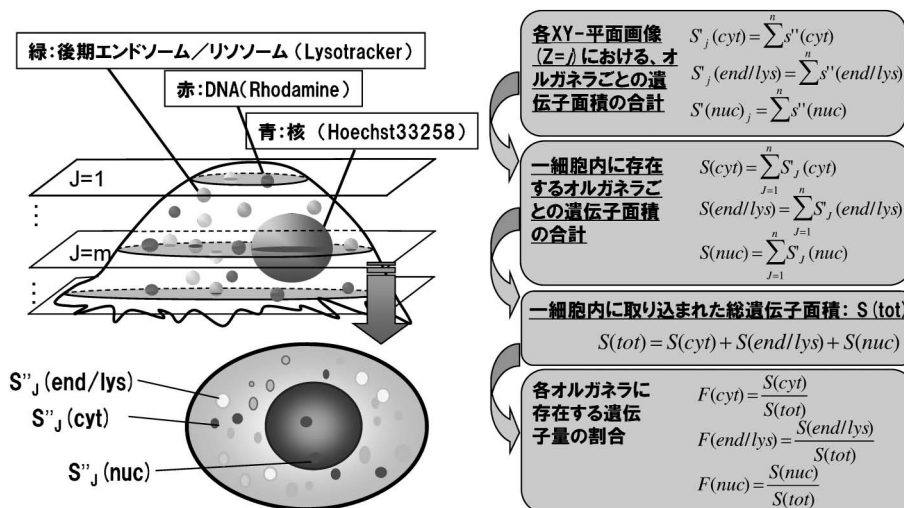


Fig. 1. Quantitative Analysis Method for the Intracellular Distribution of pDNA

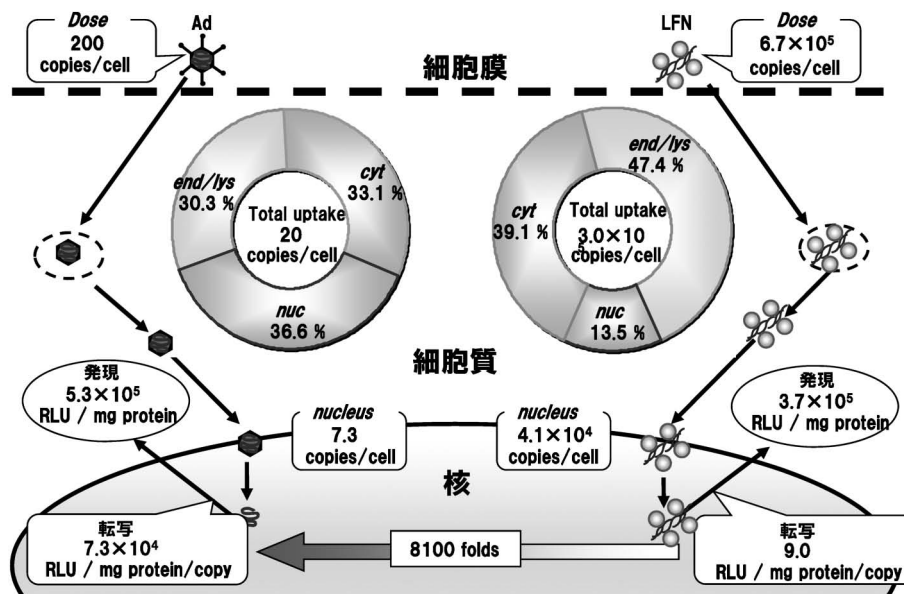


Fig. 2. Quantitative Comparison of Intracellular Distribution between Lipofectamine PLUS (LFN) and Adenovirus

率の差は、細胞内動態の違いから生まれると考えて研究を進めてきた。しかし、全貌がみえてくるにつれ、両者の間の細胞内動態（核への輸送効率）は、アデノウイルスのほうが数倍程度しか優位性がなく、大きな発現効率の差は、細胞内動態よりも、むしろ核に移行した後の過程（転写・翻訳）に起因することが明らかとなった (Fig. 2).<sup>4)</sup>

以上、上記の解析結果より、効率的な非ウイルスベクターを開発するためには、遺伝子を核に送達した後の効率を考慮する必要があるということが明らかとなった。もちろん、本研究は細胞内動態の重要性を否定するものではない。細胞内動態と核内動態

過程は直列でつながっており、特に、非分裂細胞における遺伝子導入においては、核膜が大きな障壁となることが示されていることから（後述）、両者をとともに制御することが極めて重要となる。

#### 4. 人工ベクターの細胞質輸送機構の解明

上記のように、当初の予想に反して、人工ベクターの核送達効率は、アデノウイルスと比較して若干劣るものの、大きな差はないことが明らかとなった。一方、細胞質中におけるプラスミド DNA の拡散係数は極めて低いという報告もあることから、<sup>5,6)</sup> 細胞質内における遺伝子の動きの制限が核輸送を考える上で大きなバリアとなると考えられてきたこと

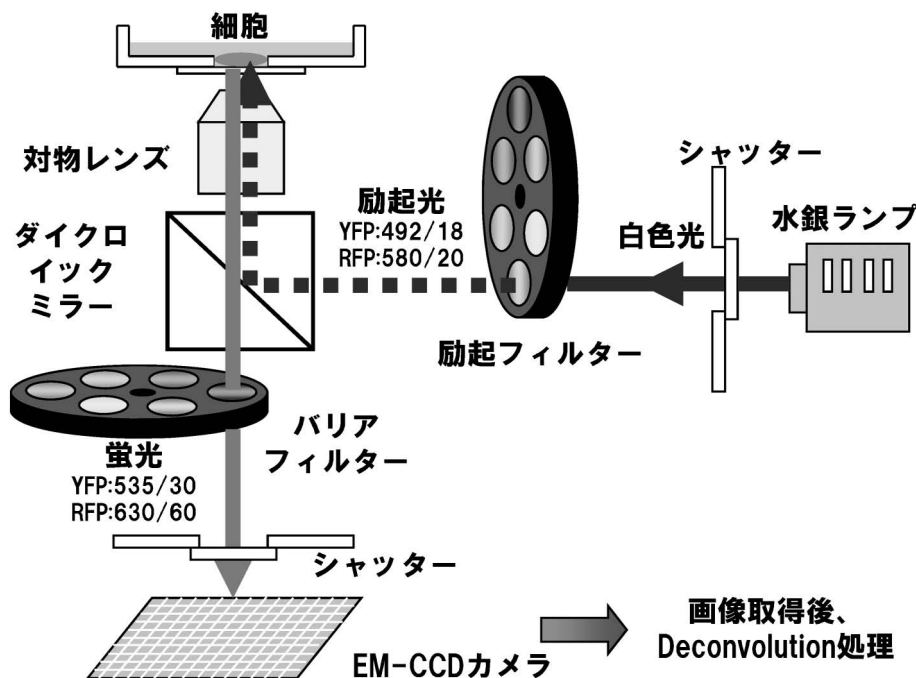


Fig. 3. Microscope Setting to Demonstrate the Multi-color Real-time Imaging

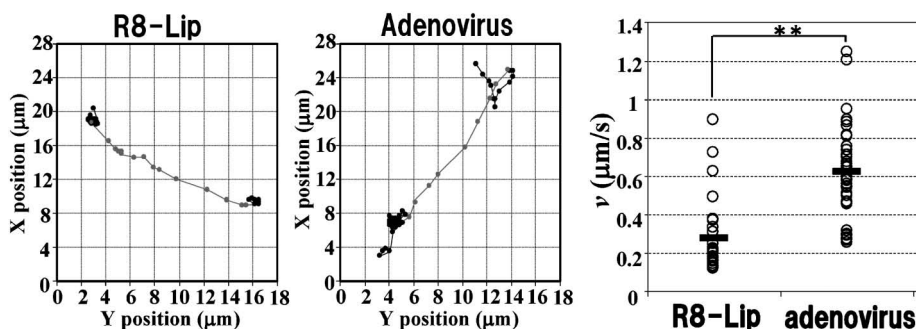


Fig. 4. Particle Tracking of R8-modified Liposome (R8-Lip) and Adenovirus

\*\* $p < 0.01$  = Mann-Whitney test.

も事実である。

細胞内における遺伝子の微小管輸送や、小胞輸送ネットワークに沿った輸送を追跡するためには、オルガネラとの多重染色に基づいて、リアルタイムにその動態を追跡することが必要である。われわれは、マルチカラーかつリアルタイムなイメージングシステムを構築し (Fig. 3), 人工ベクターの細胞質輸送機構に関してアデノウイルスと比較しながら解明を試みた.<sup>7)</sup> その結果, 人工ベクターにおいても, アデノウイルスと同様, 微小管に沿って直線的な動きをしていることが観察された。また, 直線的な動きに着目した際, 核周辺方向へ向かって移動するものや, 細胞質膜方向に移動したりするものが観察された。また, サイズ依存性も認められ, 活発な輸

送をうけるものは, 小さな粒子に限定していることも明らかとなった。さらに, 細胞内における運動性を定量的に比較するために, Mean square displacement (MSD) を求め, 直線的な輸送に対する速度を算出した結果, アデノウイルスと比較して人工ベクターのほうが移動速度が遅いことが明らかとなった (Fig. 4)。この微小管輸送機構を明らかとするために小胞を染色し, 人工キャリアとのリアルタイムイメージングを行った結果, アデノウイルスにおいては, 小胞体から脱出した形で微小管輸送を受けているのに対し, 人工ベクターでは主に輸送小胞内に包まれた状態で, 微小管輸送をうけていることが明らかとなった。

## 5. 核移行後の発現効率差を生み出すメカニズムの解明

この情報をベクター開発にフィードバックするためには、「なぜ」このような違いが生じるのかを明らかにする必要がある。核移行後発現効率の差を生み出す要因としては、転写過程と翻訳過程が挙げられる。そこで、セントラルドグマの中間体である mRNA の発現量を測定することによって、核まで送達した遺伝子 1 コピーあたりの発現効率（以下、「核移行後発現効率」と記載）の差における、転写効率と翻訳効率の寄与を分離評価することを試みた。mRNA の発現量を遺伝子の核移行量で除した値は、転写効率を示すパラメーターであり、また、タンパク発現量を mRNA によって除した値は、翻訳効率を示すパラメーターである。実際に mRNA を RealTime RT-PCR によって求め、上記の値を求めた結果、3 桁の核移行後発現効率の違いのうち、1 桁分は転写、2 桁分は翻訳過程に寄与することが明らかとなった。<sup>8)</sup>

われわれは、まず、大きく分けて 2 つの仮説を立て、転写効率の違いを生み出すメカニズムの解明を試みた。1 つ目は、ウイルスゲノムにコードされている配列などが転写を促進しているという仮説である。もう 1 つは、遺伝子の核内様式が異なる可能性である。まず 1 つ目の可能性の検証として、GFP を発現するアデノウイルスから抽出したゲノム DNA とプラスミド DNA を核内マイクロインジェクションし、24 時間後の遺伝子発現効率を測定した。しかしながら、両者に大きな差は認められないことから、DNA の配列や構造の違いからでは、核内転写効率の差は説明できないことが明らかとなった。そこで、視点を変えて、遺伝子の核内存在様式の違いに着目して検証を行うため、核内における DNA を、*in situ* ハイブリダイゼーションによってイメージングした。その結果、人工ベクター (LFN) のほうが多くの遺伝子が核内に送達している条件にもかかわらず、核内でハイブリダイゼーションによって検出される遺伝子は明らかにアデノウイルスのほうが多いことが明らかとなった。本検出は、プローブとハイブリダイズできる DNA のみが特異的に検出される。したがって、本システムで検出しているシグナルは、ベクターより解離したものであると考えられる。これらの結果は総合すると、アデノ

ウイルスのほうが LFN より効率的に核内で脱凝縮していることを示唆するものである。さらに、核内存在部位について詳細に検討したところ、アデノウイルスでは、ユークロマチン領域に局在しているのに対し、プラスミド DNA では、ランダムに局在していたことから、核内における局在も重要であることが示唆された。<sup>8)</sup>

また、翻訳効率においては、mRNA とベクター間との静電的な相互作用が人工ベクターのほうで強いことが示唆されており、細胞質における翻訳を阻害する大きな要因であると考えられる。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって mRNA を検出し、本 mRNA にコードされる蛍光タンパクの発現とともに、個々の細胞で同時にイメージングする系を確立した。mRNA を高感度にするために、プローブを蛍光物質から量子ドットに変更している。その結果、両者の発現レベルの相関性は極めて悪いことが明らかとなった。<sup>9)</sup> 本結果も、人工ベクター開発において翻訳過程を制御することの重要性を示す 1 つの例と言えよう。

## 6. 核移行後発現効率の重要性を示すその他の例

これまで、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムの投与量と遺伝子発現の間には、正の非線形的な関係が存在することが知られてはいたが、そのメカニズムについて系統的な解析は行われていなかった。細胞内動態、及び核内動態の解析より、細胞への取り込みから核移行に至る過程は、投与量に依存した線形の変化を示したのに対して、核内移行量で遺伝子発現量を除することによって得られる核移行後発現効率は投与量に対して非線形性を有することが明らかになっている。このことから非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムにおける遺伝子発現の非線形性の原因は、遺伝子の核移行後にあることが示唆されている。<sup>10)</sup>

一方、われわれは同時期に、人工ベクターの問題点である、遺伝子発現レベルの細胞間における非均一性 (heterogeneity) の原因解明を行うべく、遺伝子の核移行と遺伝子発現をシングルセルで同時に検出する Dual imaging 法についても解析を進めてきた。その結果、蛍光ラベルした遺伝子は、ほぼすべての細胞に取り込まれることが明らかとなったが、そのうち、30%程度の細胞にしかプラスミド DNA の核移行が認められず、遺伝子の核移行過程が het-

erogeneity の要因になることが明らかとなった。さらにプラスミド DNA が核移行をしている細胞の中でも、遺伝子発現をしていない細胞が 30%程度認められた。このことは、人工ベクターにおける核輸送後の過程（転写・翻訳）の効率の悪さが、heterogeneity の一要因となることを示す結果である。<sup>11)</sup> 上記 5. に述べたように、mRNA の発現レベルとタンパク発現量の相関性が低いことも、本結論を裏づける結果であると考えられる。

### 7. 核移行後発現効率の促進を目指した DDS キャリア開発のアプローチ

上記のように、遺伝子ベクター開発を行う上で、細胞内の解離過程の促進が重要な課題であることが明らかとなった。われわれの所属する研究室においては、遺伝子とポリカチオンの凝縮化コア粒子を脂質膜（リポソーム）によりコーティングした多機能性エンベロープ型ナノ構造体（Multi-functional envelope-type nano-device; MEND）を基盤とし、遺伝子や核酸のデリバリーシステムを構築してきた。本構造は血中滞留性素子や細胞内動態制御素子といった、様々な性質・特性を示す機能性素子を、トポロジーを考慮して配置することを可能とする。<sup>12,13)</sup>

代表的な機能性素子の例としては、京都大学の二木教授により発見された膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン（R8）<sup>14)</sup>の脂質誘導体<sup>15)</sup>が挙げられる。細胞生物学や分子生物学、さらにはイメージング技術の発展により、クラスリン被覆小胞を介した取り込み経路以外にも多様な細胞内取り込み機構が存在することが分かってきた。<sup>16)</sup> Simian virus 40 (SV40)<sup>17,18)</sup>やコレラトキシン<sup>19)</sup>は、カベオラによって取り込まれることが示唆されている。また、HIV 由来 TAT タンパクに代表されるアルギニンに富むドメインペプチド融合タンパクは、クラスリン非依存的なマクロピノサイトーシスにより取り込まれることが示唆されている。<sup>20)</sup> R8 の脂質誘導体（ステアリル化オクタアルギニン；STR-R8）を MEND の脂質構成成分とすることで調製される R8 リポソームはユニークな特徴を有しており、低密度修飾の R8 リポソームは従来型のクラスリン被覆小胞により、また、高密度修飾の R8 リポソームはマクロピノサイトーシス経路で取り込まれることが明らかとなっている。さらに、リポソームの細胞内挙動を解析すると、低密度修飾の場合に比べて高密度

の場合、リソソーム分解系への移行を回避でき、細胞内に長い期間安定に存在することが明らかとなっている。<sup>21)</sup> このことは、低密度修飾の場合では、クラスリン被覆小胞によって取り込まれ、速やかにリソソームによって分解されるのに対し、高密度修飾時には、マクロピノサイトーシスによって取り込まれた後、分解経路から回避できることを示唆するものである。現に遺伝子を封入した MEND に対して R8 を表面修飾することにより、高い遺伝子発現活性を示すことが明らかとなっている。<sup>22)</sup>

MEND は、ガラス管に加えた脂質溶液から溶媒除去を行うことによって作製した脂質フィルムに対し、遺伝子とポリカチオンからなるコア粒子を加え、超音波処理をすることで調製される（単純水合法）。この調製法で形成される粒子は、脂質膜の枚数が複数であることや、また、粒子によって枚数が大きく異なることが明らかとなっている。<sup>23)</sup> われわれは、偶然にも、脂質膜構成成分中に、短鎖ポリエチレングリコール（テトラエチレングリコール；TEG）の脂質（コレステロール）誘導体を入れておくだけで、粒子が小さくかつより均一なナノ粒子が創製可能であることを見出した。<sup>24)</sup> 電子顕微鏡写真から、膜の枚数が制御されており、究極的には 1 枚の膜によりコーティングされている粒子も観察されている（Fig. 5）。本粒子を用いてトランスフェクションした結果、TEG 脂質を含む MEND のほうが、含まないものと比較して 100 倍以上遺伝子発現が向上することが示された。また、本 TEG 修飾 MEND の遺伝子発現上昇機構を解析した結果、細胞内取り込み効率や転写効率が向上していることが明らかとなった。プラスミド DNA 及び MEND の脂質膜を別々の蛍光色素によりラベルを行い、共焦点レーザー顕微鏡による解析を行った結果、従来構造の MEND では、プラスミド DNA の多くが細胞内で MEND の脂質膜と共局在しているのに対し、TEG 修飾 MEND においては遺伝子が脂質膜から独立にみえることから、TEG 修飾 MEND においては脂質膜枚数が少なく制御されているがゆえに、細胞内における脱被覆が効率的に行われ、この結果、転写効率が促進したものと考えられる。このように、内封した核酸の細胞質内における放出促進が、核移行後の転写効率を促進する上で有用な戦略であることが明らかとなった。<sup>24)</sup>

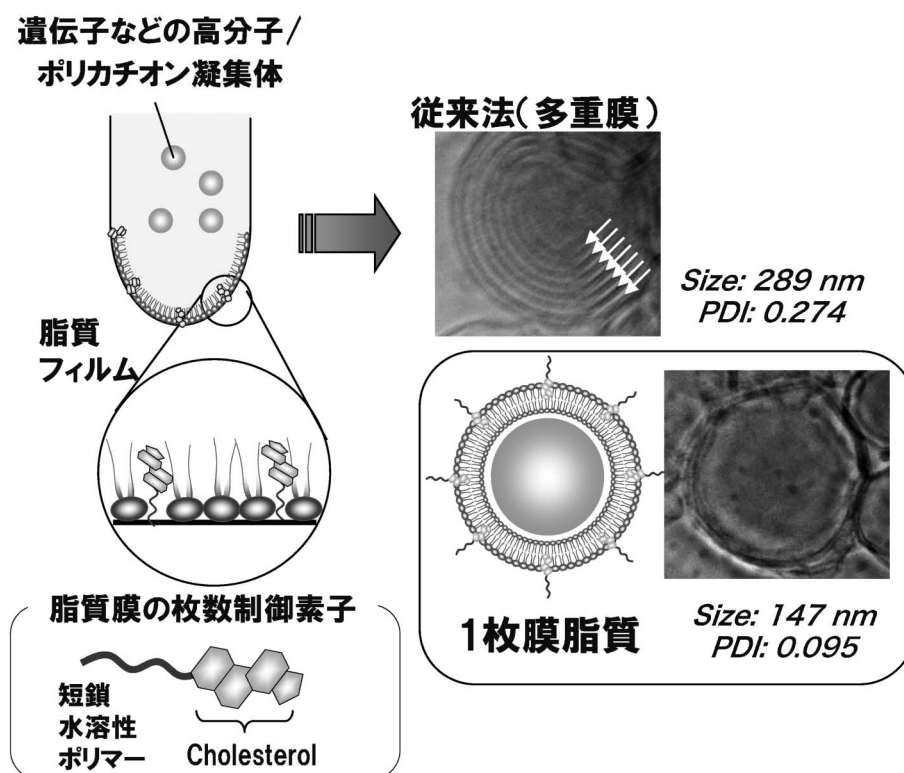


Fig. 5. Formation of Envelope Number-controlled Nano-particle by Incorporation of Tetraethyleneglycol-modified Cholesterol (TEG-chol)

#### 8. エンドソーム脱出及び MEND 脂質膜枚数制御による siRNA の細胞内放出促進

short interference RNA (siRNA) は、短鎖 RNA が相補的に結合した 2 本鎖 RNA 分子であり、細胞中に存在する siRNA-タンパク複合体 (RISC; RNA-induced silencing complex) に片方の RNA 鎖のみ取り込まれ、配列特異的に特定の mRNA を切断、分解することで遺伝子発現を抑制する。本 siRNA を効率的に機能させるためには、細胞内に効率よく取り込まれ、その後、エンドソームを脱出し、細胞質にデリバリーするためのキャリアが必要となる。

エンドソーム脱出を促進するための戦略の 1 つとして、エンドソーム膜と融合性の高い脂質の利用が挙げられる。従来から、Dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) が遺伝子導入のヘルパー脂質としてよく用いられてきた。本脂質と pH 環境に応じて荷電状態が変化するコレステロールコハク酸 (CHEMS) を組み合わせることで、pH 7 では安定な膜構造を保つものの、エンドソーム内の酸性環境下においては、ヘキサゴナル II 相構造をとり、エンドソーム膜と融合することが知られている。<sup>25)</sup> 一

方、最近、われわれは、「低い pH 環境下で細胞膜と融合性の高い脂質がエンドソーム融合性を促進するためのエンベロープ膜組成として有用である」という仮説の下、培養細胞と低 pH 環境下で高い融合性を示す脂質組成をスクリーニングした。スクリーニングにおいては、ドナー及びアクセプターとなる蛍光物質によりラベル化することで、蛍光エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET) を誘起した種々の組成のリポソームを調製し、酸性条件下で細胞とインキュベートした際の FRET の解消度合いを指標に用いている。その結果、DOPE と phosphatidic acid (PA) からなる脂質が DOPE/CHMES と同等あるいはそれ以上の融合性を示すことを見出している。<sup>23)</sup> 本膜融合性脂質 (DOPE/PA) からなる R8-MEND を用いた際には、通常の実験で用いられる投与量において、80% 以上もの RNAi 効果を示し、また持続性の面においても非常に優れているものであった。<sup>26)</sup> しかしながら、*in vivo* への展開を考える上では、少ない投与量で高いノックダウンを示すベクターの構築が重要な課題となる。

エンドソーム脱出を促進するためのもう 1 つの戦



略として、pH感受性膜融合性ペプチドの利用が挙げられる。インフルエンザウイルスは、エンベロープ型ウイルスの1つであるが、エンベロープ上に存在するhemagglutinin (HA) 2タンパクがエンドソーム内の弱酸性条件下で非可逆的な $\alpha$ ヘリックス構造をとり、疎水部がエンドソームと相互作用した後に膜融合を誘導する。<sup>27)</sup>このようなウイルスのエンドソーム脱出機構に啓発され、酸性条件下で $\alpha$ ヘリックスへの構造変化を起こす人工的ペプチドが、エンドソーム脱出促進の素子として開発されてきた。その1つとして、GALA (WEAALAEA-LAEALAEHLAEALAEALAA)が挙げられる。GALAは、その名の通り、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、アラニンの繰り返し配列を有するペプチドであり、pH 7.4ではランダムコイル型であるが、酸性条件下でグルタミン酸の電荷が中和され、 $\alpha$ ヘリックス構造をとる。その結果、生体膜中で8-12個からなるポアを形成することが知られている。<sup>28,29)</sup>本ペプチドのコレステロール誘導体を作製し、リガンド分子であるトランスフェリンとともにリポソーム表面に修飾することにより、リポソーム内封物を細胞質内に効率的に放出することが可能となっている。<sup>30)</sup>そこで、われわれは、更なるノックダウン効率の促進を狙い、GALAのコレステロール誘導体をMENDの脂質組成として添加した。しかしながら、標的遺伝子発現の抑制効果は若干は認められるものの、その効果は不十分なものであった。

上記7.において、プラスミドDNAの細胞内脱被覆化効率の促進は、その機能(遺伝子発現効率)を大きく促進することを紹介したが、この考え方はsiRNAのデリバリーにおいても適応できる。折りしも、小暮先生(現;京都薬科大学薬学部教授)らにより、MENDの脂質膜枚数を制御可能なSUV膜融合法が開発されており、本方法を用いることにより、サイズも小さく、均一性も高い粒子が形成することが明らかとされてきた。本粒子による遺伝子ノックダウン効率の評価を行った結果、従来の方法により調製したMENDと比較しても劇的に遺伝子ノックダウン効果の上昇が認められ、低投与量(1/10量)においても高い遺伝子ノックダウン効果が得られることが明らかとなった。<sup>31)</sup>これらMENDの細胞内における脱被覆化過程をイメージングにより評価した結果、細胞内ではほぼすべて(89.4%)

のクラスターが脂質膜から解離した形で検出され、さらに、細胞間の解離効率のばらつきも極めて小さいことが明らかとなった。したがって、SUV膜融合法により調製されたMENDは、内封siRNAを効率的にエンベロープ膜から細胞質内に放出していることが示唆された。このことは、内封siRNA機能発現における細胞内脱被覆化過程促進の重要性を示す結果である。

本システムは、樹状細胞においても効率的にsiRNAを導入することが可能であることが示されており、樹状細胞における免疫応用のネガティブフィードバックに係わる分子であるsuppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)などをノックダウンすることで、免疫応答を促進できることが現在までに明らかとなってきている。本siRNAデリバリーシステムは樹状細胞の機能を操作し、ワクチン効果を高めるための基盤技術として有用であろう。<sup>31)</sup>

## 9. 膜枚数制御法を応用した段階的な生体膜突破システムの構築

核膜は2枚の脂質2重層から形成されており、細胞質と核内の物質輸送を厳密に制御している。遺伝子の核膜突破の重要性を最も明確に示す報告としては、Pollardによって行われた、遺伝子のマイクロインジェクションが挙げられる。<sup>32)</sup>LacZをコードする遺伝子を細胞質と核内にマイクロインジェクションし、インジェクションした全細胞数のうちの遺伝子発現を示した細胞数の割合を評価した結果、核内インジェクションした方が非常に高い遺伝子発現効率を示すことが示されている。さらに、遺伝子を細胞質にマイクロインジェクションする場合、核内にマイクロインジェクションしたときと同程度の遺伝子発現効率を示すためには100-1000倍多くの遺伝子コピー数が必要があることが示されている。このことは、細胞質にインジェクションしたうちの1%以下しか、核に移行しないことを明確に示したデータである。また、様々なベクターにおいて、核膜の消失する細胞分裂時に遺伝子発現が亢進するという報告があることから、核膜が大きなバリアであることが窺える。<sup>33-35)</sup>われわれは、DNAワクチンの実現に重要な、樹状細胞への遺伝子導入法の開発を長年にわたり試みてきたが、本細胞への遺伝子導入は極めて困難であった。現に、HeLa細胞などの分裂細胞において高い遺伝子発現を示すR8-

MEND においても、樹状細胞への遺伝子発現はほとんど認められないことが示された。

われわれは、遺伝子デリバリーの障害となるエンドソームや核膜などの生体膜を段階的に突破するための戦略として、これらの生体膜バリアを段階的な膜融合によって突破する方法を考案した。<sup>23)</sup> 本ベクターは、前章 8. で紹介した SUV による膜融合法を応用したものであり、遺伝子とポリカチオンからなる凝縮化コアを核膜融合性脂質並びにエンドソーム膜融合性脂質により段階的にコーティングした構造を有している。核膜との高い融合性を示す脂質組成のスクリーニングは、上記のエンドソーム膜融合性脂質のスクリーニングと同様の方法を用いて行った。すなわち、ドナー及びアクセプターによってラベル化することで FRET を誘起した種々の種類のリポソームを単離核とインキュベーションし、その際に誘起される FRET の解消率を核膜融合性の指標としている。その結果、DOPE 及びカルジオリピンからなるリポソームが核膜高融合性脂質として同定された。エンドソーム脱出並びに核膜融合性脂質で 2 枚ずつ封入した脂質多重コーティング型ナノ構造体 (Tetra-lamellar MEND; T-MEND) を構築することで、樹状細胞において従来型ベクターの遺伝子発現レベルを 500 倍以上、劇的に促進することを可能にしている (Fig. 6)。また、細胞への取り込み量と核移行量を RealTime PCR によって測定することで、取り込まれた遺伝子コピー数を 100% としたときの核への送達効率を求めることができるが、この値は T-MEND において優位に高いことが示された。<sup>23)</sup> また、遺伝子発現活性を核移行量で除することで計算される核移行後発現効率は T-

MEND において、R8-MEND と比較して 40 倍高いことが示され、T-MEND における高い活性を生み出す大きな要因であることが明らかとなった。このような高い転写活性を生み出す要因として、両者のベクター構造の違いが挙げられる。従来の R8-MEND においては、膜の枚数や核膜融合性が最適化されておらず、核膜の 2 枚膜構造の間隙にトラップされる、あるいは、核内に導入されても、そこから脂質膜からの脱被覆が律速となっている可能性がある。一方、T-MEND においては、核膜の枚数と同じ 2 枚の核膜融合性脂質によりコーティングされており、膜融合による核膜突破とともに、効率的な脱被覆が実現できると考えられる。このように生体膜と融合性を有する脂質膜により多重にかつ枚数を制御してコーティングする技術は、効率的な核輸送を達成するだけでなく、効率的な脱被覆を介した転写効率の向上を可能とする点で有用である。

## 10. おわりに

以上、筆者らは、人工ベクターによって導入されたプラスミド遺伝子の細胞内動態をアデノウイルスと比較した結果、その律速段階は細胞内動態よりむしろ、遺伝子の核移行後の過程にあることを明らかとし、その開発をする上で解決すべき問題であることを明らかとしてきた。核内は大きく分けてヘテロクロマチンとユークロマチンの領域に大きく分けて分類される。細胞内において様々な細胞内小器官が存在するのと同様に、核内も転写調節などに係わる様々な構造体が存在していることが多くの研究により明らかとなっている。今後、人工ベクター開発を行う上で、遺伝子を脱凝縮を促進する効率だけでなく、脱凝縮を起こすべき場所についても制御が重要

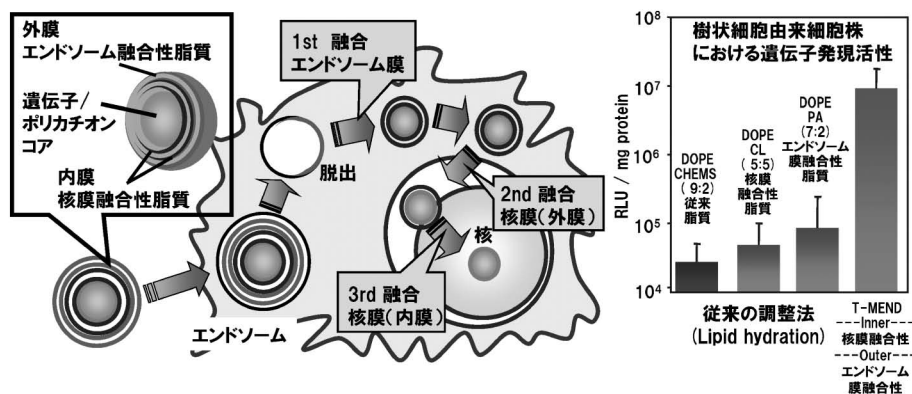


Fig. 6. Schematic Diagram Illustrating a Nuclear Delivery of pDNA via Step-wise Membrane Fusion by T-MEND

な課題となろう。折りしも、われわれは、遺伝子にラベルされた量子ドットと、ポリカチオンにラベル化されたアクセプター間で誘起される FRET をイメージングすることにより、遺伝子の凝縮度や、凝縮・脱凝縮が行われる場所の情報を得る技術を確立している。<sup>36)</sup> 細胞内から核内という、更なるマイクロの世界における遺伝子局在とベクターからの解離能を制御することにより、より効率的な遺伝子ベクターが開発できると信じてやまない。

**謝辞** 本研究は、北海道大学大学院薬学研究院、薬剤分子設計学研究室において、多くの研究協力を得て行われました。DDS 研究に関して素人同然で北大に赴任してきた私に対し、DDS の基礎を教えて頂き、また、イメージング研究に係わるきっかけを与えて頂きました原島秀吉教授に心より感謝申し上げます。また、終始温かい御指導を頂きました紙谷浩之先生（現愛媛大学教授）や、遺伝子のパッケージングに関しまして技術を御供与頂きました小暮健太郎先生（現京都薬科大学教授）に心より感謝申し上げます。また、細胞内動態解析においては、濱 進先生（現京都薬科大学助教）や伊藤理恵さん、榎戸 薫さん、siRNA デリバリー技術に関しては、中村宜夫君、東 智子さん、核輸送に関しては、増田智也博士、工藤亜沙子さん、モハメド・シャヒーン博士を始めとする、多くの研究生・卒業生の惜しめない努力の賜物であるにほかなりません。本誌面を通じ、厚く御礼申し上げます。なお、本研究は、独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 CREST、日本学術振興会若手研究 (A・B)、文部科学省科学研究費補助金特定領域「ライフサーバイヤ」、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 若手研究グラント、並びにコニカ・ミノルタ科学技術振興財団「画像科学奨励賞」の補助により行われたものです。

## REFERENCES

- 1) Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., *J. Gene Med.*, **9**, 833–842 (2007).
- 2) Akita H., Ito R., Khalil I. A., Futaki S., Harashima H., *Mol. Ther.*, **9**, 443–451 (2004).
- 3) Kamiya H., Fujimura Y., Matsuoka I., Harashima H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 591–597 (2002).
- 4) Hama S., Akita H., Ito R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Harashima H., *Mol. Ther.*, **13**, 786–794 (2006).
- 5) Dauty E., Verkman A. S., *J. Biol. Chem.*, **280**, 7823–7828 (2005).
- 6) Lukacs G. L., Haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N., Verkman A. S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 1625–1629 (2000).
- 7) Akita H., Enoto K., Masuda T., Mizuguchi H., Tani T., Harashima H., *Mol. Ther.*, **18**, 955–964 (2010).
- 8) Hama S., Akita H., Iida S., Mizuguchi H., Harashima H., *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1533–1543 (2007).
- 9) Akita H., Umetsu Y., Kurihara D., Harashima H., *Int. J. Pharm.*, **415**, 218–220 (2011).
- 10) Moriguchi R., Kogure K., Iwasa A., Akita H., Harashima H., *J. Control. Release*, **110**, 605–609 (2006).
- 11) Akita H., Ito R., Kamiya H., Kogure K., Harashima H., *J. Gene Med.*, **9**, 197–207 (2007).
- 12) Kogure K., Akita H., Harashima H., *J. Control. Release*, **122**, 246–251 (2007).
- 13) Kogure K., Akita H., Yamada Y., Harashima H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 559–571 (2008).
- 14) Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 2437–2443 (2002).
- 15) Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 1005–1011 (2001).
- 16) Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45 (2006).
- 17) Norkin L. C., Kuksin D., *Virology*, **2**, 38 (2005).
- 18) Pelkmans L., Kartenbeck J., Helenius A., *Nat. Cell Biol.*, **3**, 473–483 (2001).
- 19) Orlandi P. A., Fishman P. H., *J. Cell Biol.*, **141**, 905–915 (1998).
- 20) Wadia J. S., Stan R. V., Dowdy S. F., *Nat. Med.*, **10**, 310–315 (2004).
- 21) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3551 (2006).
- 22) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Hama S., Akita H., Ueno M., Kishida H., Kudoh M., Mishina Y., Kataoka K., Yamada M., Hara-

- shima H., *Gene Ther.*, **14**, 682–689 (2007).
- 23) Akita H., Kudo A., Minoura A., Yamaguti M., Khalil I. A., Moriguchi R., Masuda T., Danev R., Nagayama K., Kogure K., Harashima H., *Biomaterials*, **30**, 2940–2949 (2009).
- 24) Masuda T., Akita H., Niikura K., Nishio T., Ukawa M., Enoto K., Danev R., Nagayama K., Ijio K., Harashima H., *Biomaterials*, **30**, 4806–4814 (2009).
- 25) Xu Y., Szoka F. C. Jr., *Biochemistry* **35**, 5616–5623 (1996).
- 26) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **119**, 360–367 (2007).
- 27) Dutch R. E., Jardetzky T. S., Lamb R. A., *Biosci. Rep.*, **20**, 597–612 (2000).
- 28) Li W., Nicol F., Szoka F. C. Jr., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 967–985 (2004).
- 29) Parente R. A., Nir S., Szoka F. C. Jr., *Biochemistry*, **29**, 8720–8728 (1990).
- 30) Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H., *Biochemistry*, **43**, 5618–5628 (2004).
- 31) Akita H., Kogure K., Moriguchi R., Nakamura Y., Higashi T., Nakamura T., Serada S., Fujimoto M., Naka T., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **143**, 311–317 (2010).
- 32) Pollard H., Remy J. S., Loussouarn G., Demolombe S., Behr J. P., Escande D., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7507–7511 (1998).
- 33) Escriou V., Carriere M., Bussone F., Wils P., Scherman D., *J. Gene Med.*, **3**, 179–187 (2001).
- 34) Mortimer I., Tam P., MacLachlan I., Graham R. W., Saravolac E. G., Joshi P. B., *Gene Ther.*, **6**, 403–411 (1999).
- 35) Tseng W. C., Haselton F. R., Giorgio T. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 53–64 (1999).
- 36) Shaheen S. M., Akita H., Yamashita A., Katoono R., Yui N., Biju V., Ishikawa M., Harashima H., *Nucleic Acids Res.*, **39**, e48 (2011).