

科学技術振興調整費 「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」  
 平成 18～20 年度実施「1 遺伝子可視化法による遺伝子ベクター創製」成果の概要

研究代表者 北海道大学 教授 原島 秀吉

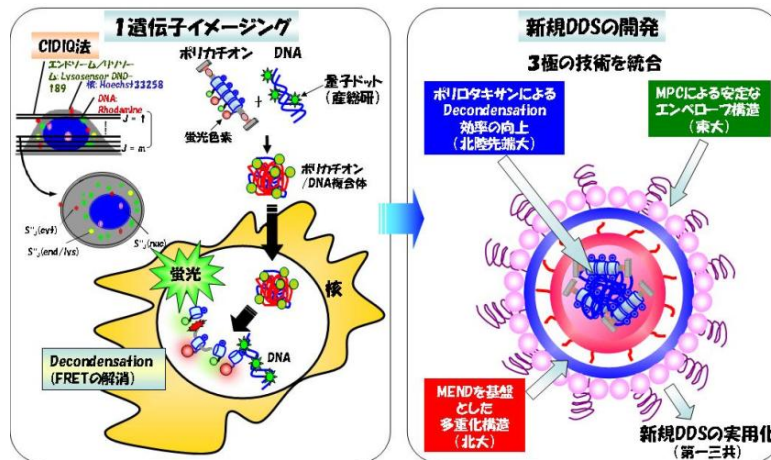
1) 研究目的

本研究は、遺伝子の細胞内動態を 1 分子の素過程のレベルで定量的に解明し、ウイルスベクターを凌駕する革新的なデリバリーシステムを創製することを目的とする。本研究の中核をなす新しい可視化システムの開発においては核内に送達した遺伝子の decondensation 過程に目標を設定し、産総研と共同で量子ドットを可視化システムに組み込み、解析能力を飛躍的に促進した可視化システムを開発する。

さらに、第二の柱として、北大、北陸先端大、東大の 3 極がこれまでに独自で開発を進めてきた DDS を、1 遺伝子の細胞内動態解析システムを用いて評価し、各システムへフィードバックを行い、それぞれのシステムの最適化を図ることで、より強力かつ安全な遺伝子デリバリーシステムへと発展させる。

最終的には、第一三共株式会社が中心となり、本プロジェクトで創製された新規 DDS を実用化に繋げる。

研究目的 1 遺伝子の細胞内動態を定量的に評価する系を確立し、ウイルスベクターを凌駕する有効かつ安全な人工遺伝子デリバリーシステムを創製する。



2) 研究成果の概要

イメージングの観点からは、共焦点レーザー顕微鏡による画像解析法に量子ドットと FRET 法を応用することにより、核内へ送達した遺伝子が decondense する過程を定量的に評価する系を確立し、特に核内サブドメインにおける decondense の過程を可視化し、かつ、定量的に評価することに世界で初めて成功した。

また、新規人工遺伝子デリバリーシステムの開発においては、各機関がこれまでに独自に開発したデリバリーシステムの細胞内動態を可視化し、定量的に解析を行うことにより律速段階を解明した。本解析により得られた情報を新規 DDS 開発へとフィードバックすることにより各システムを最適化し、in vivo で高い機能を発揮する革新的人工遺伝子デリバリーシステムの開発に成功した。

## 具体的な研究成果

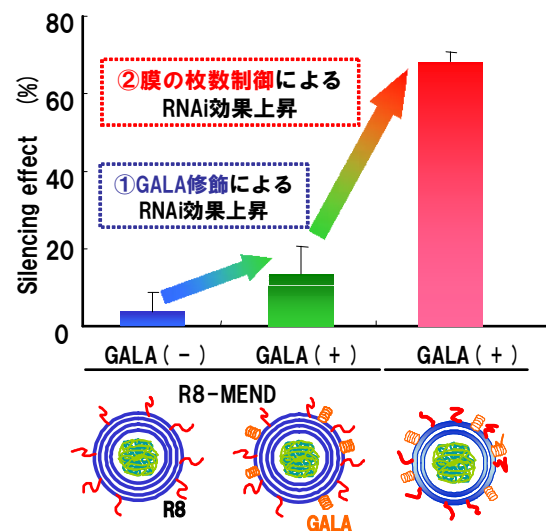
### 1. 細胞内・核内における遺伝子動態可視化によるキャリア開発へのフィードバック

#### 1.1 D-MEND による siRNA デリバリー最適化

siRNA の効率的なデリバリーシステムを構築する上で、細胞質への輸送システムの構築が非常に重要である。これまで我々は、遺伝子のエンドソームや核などへのオルガネラ分布を Z 軸方向に断続的に取得した共焦点レーザー顕微鏡画像を元に定量化する confocal image-assisted three-dimensionally integrated quantification (CIDIQ) 法を確立してきた。本方法を siRNA に応用し、細胞内動態素過程の定量的評価系を確立し、本定量情報をもとに、効率化をおこなった。多機能性エンベロープ型ナノ構造体はプラスミド DNA のみでなく、ポリカチオンの一つであるステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) によって複合体を形成させることで効率的に封入可能であることが示されている。脂質組成としては、エンドソーム脱出効率の高い phosphatidic acid (PA) と dioleoylphosphoethanolamine (DOPE) (2:7) の組成を用いて単純水和法を用いて調製を行った結果、本 R8-MEND は、通常トランスフェクションで使用される dose 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。しかしながら、Dose を減らすと、siRNA 効果の減弱が認められ、1/10 にした場合にはほとんど RNAi 効果が得られなかった。In vivo への応用を達成するには、siRNA 位コピーあたりの遺伝子ノックダウン効率を最大にし、低 dose で高い効率を示すキャリアの構築が必須である。そこで、本プロトタイプタイプの MEND の細胞内律速段階を同定すべく、CIDIQ 法を用いた siRNA の細胞内動態

評価を行った。その結果、siRNA はエンドソーム脱出を効率的に脱出していることが明らかとなった。しかしながら、細胞内における脱被覆化効率をイメージングにより定量化するために、蛍光ラベルした siRNA を別の蛍光によりラベルした脂質エンベロープに封入した二重ラベル化 MEND を調製し、HeLa 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、共焦点レーザー顕微鏡により Z 軸方向に断続的に画像取得を行った。脱被覆化効率は約 55% であることが示され、律速段階の一つであることが示された。本定

量結果に基づき脱凝縮過程を上昇させるために、MEND の脂質膜枚数を制御可能な SUV 膜融合法を開発した。本方法は、遺伝子とポリカチオン (STR-R8) 複合体を SUV (Single unilamellar vesicle) とインキュベーションするものであり、正電荷を有するコアの周辺に負電荷を有する SUV が静電的に集まる結果、互いに隣接する SUV 間で膜融合が起こり 2 枚膜の MEND の形成が可能となる。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のクラスターが赤色で



検出されたことからきわめて効率的に脱被覆化が行われていることが示唆された。本データを CIDIQ 法によって定量的に解析した結果、脱被覆化効率は平均 89.4% という結果が得られ、極めて効率的であることが示された。本過程の細胞間のばらつきに関しても、従来の構造の MEND と比較してきわめて小さいことが示唆された。最後に、遺伝子ノックダウン効率の評価を行った。SUV による膜融合法を用いることにより、従来の方法により調製した MEND 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、低い投与量 (1/10 量) において高い遺伝子ノックダウン効果の得られることが明らかとなった。

## 1.2 MPC の細胞内動態特性の解析

統合型ナノキャリアを構築する上でも、細胞内動態情報に基づくフィードバック情報は極めて有用である。東京大学において開発した MPC ポリマーは、キャリア表面への修飾により体内の免疫担当細胞による貪食を効率的に回避

することが可能である。はじめに、キャリア表面に MPC を修飾する技術の確立を目指し、リポソームを用いた検討を行った。MPC は、MPC homopolymer (MPCH) と疎水性基であるステアリル基が修飾された Stearyl MPC polymer (SMPC) を用いた。粒子径測定の結果、いずれの MPC を用いた場合にも著しい粒子径の変化はみられなかった。次に、MPC でコートされたキャリアの表面電荷 (ゼータ電位) を測定したところ、SMPC はキャリアの表面電荷を著しく減少させており、キャリア表面を効率よくコートする事が

示された。この結果を基に、オクタアルギニン (R8) 修飾 MEND の表面を、SMPC を用いて MPC コーティングを行なった。ゼータ電位測定の結果、表面電荷が中性付近に減少したことから、R8-MEND が SMPC によってコートされた事が示唆された。また、共焦点レーザースキ

ャン顕微鏡を用いた細胞内動態観察を行ったところ、MPC コートをした R8-MEND は、未修飾体と比較して非常に細かな点として観察された。この結果は、MPC コート R8-MEND の分散性が高く、MEND 一つずつが取り込まれた可能性を示唆している。しかしながら、本 MPC を修飾すると、逆に遺伝子発現が劇的に落ちてしまうという問題が生じ、この要因を細胞内イメージングにより可視化した結果、エンドソームからの脱出が阻害されていることを明らかとした。本情報は、後述のような MPC 修飾による静脈内投与型の肝臓への遺伝子導入システムを構築する上で極めて有用な情報となった。

