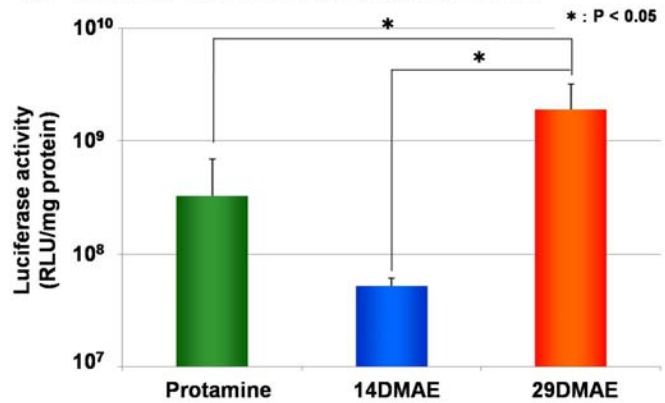


### 1.3 ポリロタキサンによる核内動態制御

ポリロタキサンとの統合は、細胞内の還元環境に応じて脱凝縮を人工的に促進するために有用なコンセプトである。はじめに、ポリロタキサン/核酸ナノ粒子を封入した R8-MEND の調製を試みた。ポリロタキサンは、低カチオンの 14DMAE および高カチオンの 29DMAE を用いた。粒子径およびゼータ電位測定を行いキャリア形成の確認を行い、キャリア形成の最適な条件を見出した。本検討より、核酸ナノ粒子を調製する際のバッファー、ポリロタキサンと核酸との混合比などがキャリア形成に重要である事が明らかとなった。構築したキャリアの遺伝子発現評価を行ったところ、内封するポリロタキサンの種類によって大きく値が変動する事が明らかとなった。

R8-MEND (PRX) の遺伝子発現活性評価

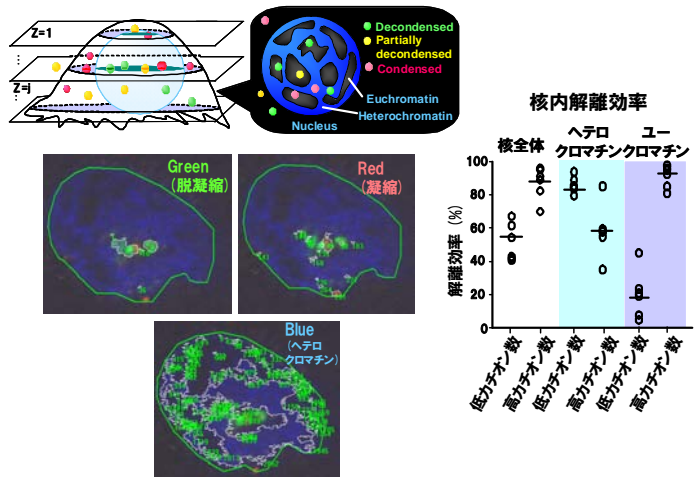


一方、実際に核内における遺伝子とポリロタキサンの凝集状態や核内挙動を明らかにする上では、新たなイメージングシステムが必要であった。

### 1.4 核内動態の可視化

我々は、プラスミド DNA を量子ドットにより、ポリロタキサンをローダミンにより各々ラベル化を行い、蛍光エネルギー移動を指標に凝縮・脱凝縮過程のイメージングを行った。核内における遺伝子の動態を解析し、本情報を遺伝子発現と結びつけるためには、細胞内動態が律速にならないキャリアを用いる必要がある。そこで、エンドソーム脱出と核輸送プロセスを段階的に突破するための戦略として、遺伝子とポリロタキサンコアをエンドソーム膜と核膜を段階的に膜融合により突破するベクター(多重型ナノ構造体:T-MEND)に封入した。これは、遺伝子とポリカチオンのコアを、2枚の核膜融合性脂質(caldiolipin (CL):DOPE = 1:1)と2枚の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高機能ベクターであり、本振興調整費で目指す統合型 DDS の基盤技術である。その結果、ポリロタキサンにより形成される遺伝子凝集体は核内において転写活性の低いヘテロクロマチン領域で多く脱凝縮してしまうことが明らかとなった。これは、遺伝子とポリロタキサンの凝集力を制御することの重要性を示すフィードバック情報である。

ヘテロクロマチン・ユークロマチン領域における解離効率の分離評価



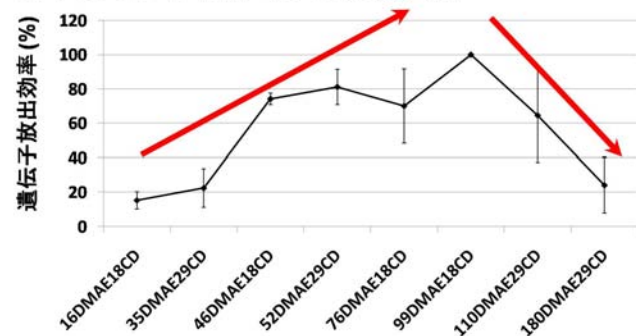
その結果、ポリロタキサンにより形成される遺伝子凝集体は核内において転写活性の低いヘテロクロマチン領域で多く脱凝縮してしまうことが明らかとなった。これは、遺伝子とポリロタキサンの凝集力を制御することの重要性を示すフィードバック情報である。

## 2. 統合型遺伝子送達システムの構築

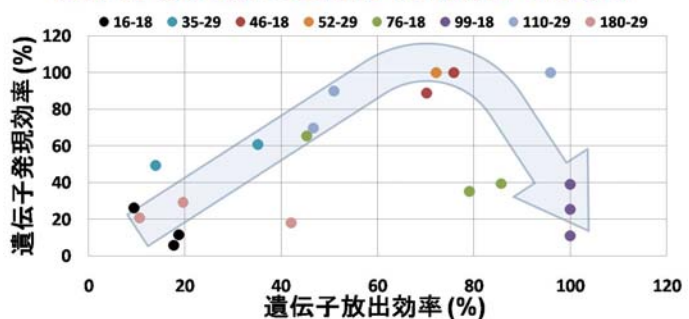
### 2.1 ポリロタキサンによる核内動態の最適化

イメージング解析の結果、ポリロタキサン分子中のカチオン数が多い方が遺伝子放出能が高く、高い遺伝子発現能を有する事が期待された。そのため、カチオン数の異なる様々なポリロタキサンを設計し、それらの遺伝子放出能と遺伝子発現能を評価した。はじめに、ポリロタキサン種の異なる核酸ナノ粒子を調製し、その遺伝子放出能を評価した。カチオン数の増加に伴い遺伝子放出能の効率が上昇したが、99DMAE を境にカチオン数の増加とともに遺伝子放出能の低下が確認された。次に、核酸ナノ粒子を内封した R8-MEND を調製し、その遺伝子発現活性を測定し遺伝子放出能とのプロット図を作成した。その結果、高い遺伝子発現活性を示す、最適な遺伝子放出能(最適なカチオン数)が存在する事を見出した。本 DDS は従来型 DDS を数十倍も凌駕する遺伝子発現能を示した。また、本改良型ポリロタキサンの核内挙動をイメージングにより解析した結果、改良型ポリロタキサンにより凝集化させることにより、核内で転写活性が比較的高いと考えられているユークロマチン領域で遺伝子の解離が優先的に行われていることが示された。

様々なPRXコア粒子の遺伝子放出能



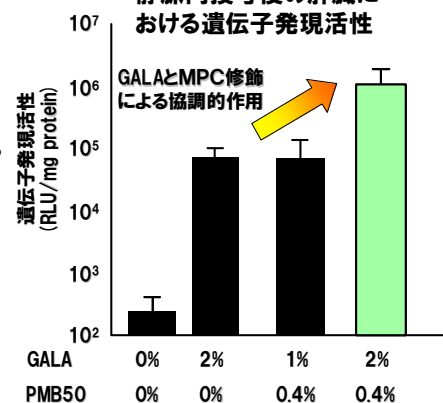
遺伝子放出能と遺伝子発現活性の関係



### 2.2 MPCによる肝臓を標的とする *in vivo* デリバリーシステムの創製

MPC 修飾型キャリアの細胞内動態イメージングにより、エンドソーム脱出が極めて悪くなることが示された。本フィードバック情報に基づき、MPC ポリマーを脂質エンベロープに修飾するための疎水性を下げ、MPC ポリマーとキャリア間の相互作用をコントロールした。さらに、エンドソーム脱出を促進するための素子として、pH 依存的に膜融合性を示す GALA ペプチドを修飾した。その結果、これらの修飾により尾静脈内投与後の肝臓における遺伝子発現が相乗的に向上し、現存する人工ベクターの中でもっとも高い遺伝子発現活性を得ることに成功した。

静脈内投与後の肝臓における遺伝子発現活性



### 3. 実用化への展開

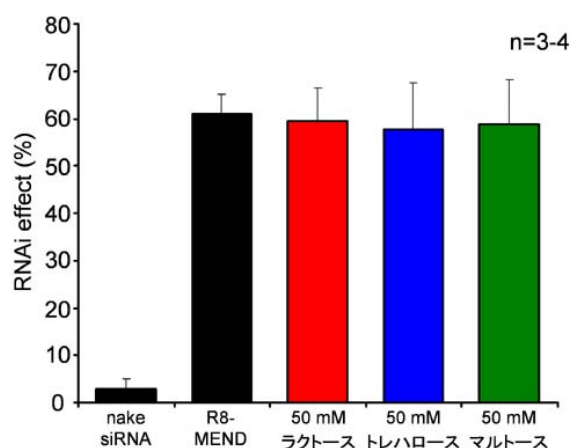
#### 3.1 MEND の凍結乾燥

n=4-5

MEND の製剤化を目指し、MEND の凍結乾燥法の確立を行った。実験方法として、ルシフェラー

サンプル	粒子径(nm)	PDI	Z電位 (mV)
R8-MEND	161.8±8.5	0.268±0.03	59.7±1.8
50mM ラクトース 凍結乾燥	171.3±5.9	0.253±0.03	56.5±3.9
50mM トレハロース 凍結乾燥	170.3±16.1	0.278±0.05	56.4±3.1
50mM マルトース 凍結乾燥	168.8±11.2	0.264±0.03	60.0±7.5

ゼに対する siRNA を封入した R8-MEND を調製後、添加剤として糖を適当な濃度になるように添加し、凍結乾燥した。糖の種類や濃度を変えて調製した各凍結乾燥 R8-MEND の再水和時の溶解性、粒子径・PDI（多分散度指数）・Z 電位、RNAi 活性を凍結乾燥前の R8-MEND と比較した。その結果、ラクトース、トレハロース、マルトースを 50 mM になるように添加して調製した凍結乾燥 R8-MEND は、非常に良好な凍結乾燥品になり、再水和時においても、速やかに溶解した。また物性を評価した結果、凍結乾燥前の R8-MEND とほぼ同等の粒子径、PDI、Z 電位を示した（表）。さらに機能評価として、ルシフェラーゼを安定発現する HeLa 細胞にトランスフェクションを行い、ノックダウン効果を比較した結果、凍結乾燥前の R8-MEND（黒）と同等のノックダウン効果を示した（右図）。以上のことから、R8-MEND の凍結乾燥法を確立したと考えられる。今後は、長期間の安定性および他の MEND の凍結乾燥法の確立を行う。



#### 3.2 MEND の安全性評価

本研究では、MPC-MEND 投与によりマウスの個体レベルで与える影響、及び投与後の炎症性サイトカイン産生量を、市販の肝臓 in vivo 導入試薬である in vivo jetPEI と比較した。その結果、in vivo jetPEI 投与により 12 匹中 3 匹（25%）が 2 時間以内に死亡が観察されたが、MPC-MEND 投与では死亡例は皆無であった。そして in vivo jetPEI 投与 6 時間後の肝臓では、白く濁るという外見的所見が観察された（右図参照）。従って、MPC-MEND は致死性のない安全なベクターであることが示唆された。しかしながら、炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ）量を測定したところ、MPC-MEND では in vivo jetPEI よりも高い産生量が認められた。この原因を DNA マイクロアレイにより調べたところ、肝臓よりも脾臓の寄与が大きいことが明らかとなった。従って、より安全なベクターを構築するためには、脾臓の遺伝子導入量を減らすなど免疫反応を引き起こさない工夫をする必要性を明らかとした。

