

平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励研究）一

遺伝子治療のためのアンチセンス核酸封入生分解性 高分子ナノキャリアの設計

山本 浩充

1. 緒言

ヒトゲノムの解析が完了したことを受けて、疾病の生理学的・生化学的な機構が急速に解明されるようになり、これまで困難とされてきた難治性疾患に対する治療に関しても道が開けて来つつある。特に、標的遺伝子の mRNA に相補的なオリゴヌクレオチド (OND) により当該遺伝子の発現のみを特異的に抑制するアンチセンス法や 21-23mer の二本鎖 RNA (siRNA) を導入することにより標的とする mRNA の分解を生じさせる RNAi 法が注目を集めている。しかしながら、核酸は強い負電荷を有し、細胞膜も負電荷を有しているため、細胞内への導入効率の低さが問題となる。リポソームやカチオン性物質とのコンプレックスを用いることによって、導入効率を向上させようとする試みが広くなされているが、エンドソーム小胞内での安定性や持続性、さらには強い毒性といった点で問題を抱えている。

薬物の有効利用を目的として、種々のドラッグデリバリーシステムが考案されている。我々はこれまでに、サブミクロンサイズの生分解性高分子から成る微粒子薬物担体 (ナノスフェア) の表面を種々の物質で修飾することによって、粘膜付着性などの機能性の付与することに成功している^{1,2)}。また、通常有機溶媒中では分散しないオリゴヌクレオチドが、カチオン性物質と複合体を形成させることにより、有機溶媒中に分散可能であることも見いだしている³⁾。これにより、高分子マトリックス中にヌクレオチドを高効率に封入可能になると同時に、放出制御による長期持続化が期待できる。本研究では、アンチセンス OND あるいは siRNA といったアンチセンス核酸の細胞内導入の効率化と薬物放出制御機能を有するナノスフェアの設計を企図した。

2. 実験

アンチセンス核酸封入ナノスフェアの調製 緩衝液中に分散しているアンチセンス核酸 (OND:XXmer,

siRNA:XXmer) 溶液中に、*N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-*N,N,N*-trimethyl ammonium chloride (DOTAP) 懸濁液を添加し混合する。この溶液を、ポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) をアセトンに溶解したポリマー溶液と混和したのち、400rpm で攪拌している PVA 水溶液中に滴下した。未封入のアンチセンス核酸を除去するため遠心分離、再懸濁し、アンチセンス核酸封入ナノスフェア懸濁液を得た。最終的にこれを凍結乾燥法により粉末化した。

封入率の測定 ナノスフェア粉末をアセトニトリルに溶解した後、0.1%の SDS を含む緩衝液を加えた。析出した PLGA を遠心分離 (15000rpm, 10min) し、上澄み中の核酸量を蛍光強度より定量した。

溶出試験 アンチセンス核酸を含有したナノスフェア凍結乾燥粉末 10mg をリン酸緩衝液 5mL 中に分散させ、37°C にてインキュベートした。経時的に 500 μ L ずつサンプリングし、遠心分離後、溶出してきた上澄み中の核酸量を定量した。

細胞内取り込み実験 A549 細胞を培養プレート上にて培養し、コンフルーエントに達したものを使用した。培養細胞層に PLGA ナノスフェア懸濁液を加え、4 時間インキュベートした。インキュベート後培養液を除去し、細胞表面上を注意深く洗浄した。細胞への粒子取込を、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察により定性的に、蛍光強度より定量的に評価した。

3. 結果・考察

PLGA ナノスフェアへのアンチセンス核酸の封入：アンチセンス核酸と DOTAP を様々な比率で複合体を形成させた後、PLGA ナノスフェアを調製し、核酸の塩基数とカチオン性物質の比率が封入率に及ぼす影響について検討した (Table 1)。カチオン性の DOTAP の割合が増加するほど、アンチセンス核酸のナノスフェア内への封入率は向上した。これは、DOTAP が分子内にオクタデシル基を 2 本有しているため複合体の脂溶性が増加し、外水相への

Table. 1 Effect of DOTAP/ASO ratio on characterization of PLGA NS

	DOTAP/ASO ratio	N/P ratio	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
ASO loaded PLGA NS	1	0.44	336.3	-35.1	33.8
	4	1.75	346.9	-35.2	58.1
	6	2.63	380.3	-34.0	65.1
	8	3.51	361.8	-35.8	85.7
	10	4.39	352.5	-34.0	83.4

漏出が抑制できたためと考えられる。また、得られたナノスフェアの粒子径及びゼータ電位は、比率によらずそれぞれ約 350nm、-35mV であった。しかしながら、DOTAP の比率が高くなるほど、調製時における攪拌羽根への付着や遠心分離時に粒子同士の凝集が生じ、ナノスフェアの回収率が低下した。このような傾向は、アンチセンス DNA、siRNA いずれにおいても認められた。また、ナノスフェアの基剤として PLGA の乳酸比が高くなるほど、即ち、疎水性が強くなるほど封入率は向上した。

粘膜及び細胞への付着性を賦与することのできるキトサンでナノスフェア表面を修飾することで、封入率は向上した。これは、アニオン性の PLGA ナノスフェア表面に吸着したカチオン性多糖であるキトサンが、同じくアニオン性の核酸とナノスフェア界面で相互作用し、漏出を抑制することができたためと考えられる。

PLGA ナノスフェアからのアンチセンス核酸の溶出：
ナノスフェアからのリン酸緩衝液中における核酸の溶出挙動を調べた (Fig.1)。キトサンで表面修飾していないナノスフェアでは、70%の siRNA が初期バーストにより放出された後、5 日以上に渡り徐々に放出された。一方、キトサンで表面修飾したナノスフェアでは、初期バーストの割合が抑制された。これは、粒子表面にキトサンのコーティング層が形成されることにより拡散速度が低下すること、並びにキトサンと siRNA が相互作用したためと考えられる。

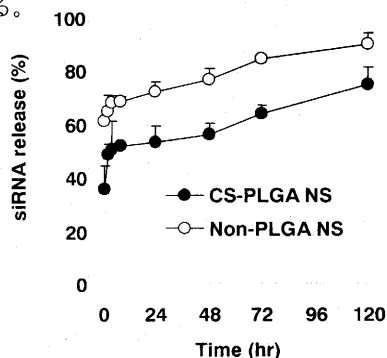


Fig.1 Release profiles of siRNA from PLGA NS

ナノスフェアの細胞内取込： siRNA を封入したナノスフェア取込実験を行った細胞の CLSM 写真を Fig.2 に、siRNA の取込割合を Fig.3 に示す。

未封入の siRNA に比べ、ナノスフェアに siRNA を封入することで、細胞への siRNA の取込量は増加した。これ

は、siRNA が強く負に帯電しており、同じく負に帯電している細胞膜と電気的な反発が生じるため取込量は少なくなったと考えられる。一方、ナノスフェアは、細胞内に貪食されることにより細胞内に取り込まれ、siRNA を細胞内へ送達することができたと考えられる。細胞表面と相互作用するキトサンで表面修飾したナノスフェアでは、さらに siRNA の細胞内取込量が增加した。キトサンで修飾することで、ナノスフェアの細胞内取込量が增加していることから、キトサンが細胞表面と相互作用することによって多量のナノスフェアが細胞表面に吸着し、ファゴサイトーシスによる細胞内への粒子取込量が增加したためと考えられる。現在、細胞内へ送達した siRNA による細胞増殖抑制効果について検討を進めている。

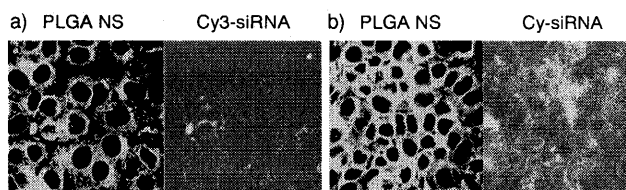


Fig.2 CLSM image of A549 incubated with a) siRNA loaded PLGA NS, b) siRNA loaded Chitosan-coated PLGA NS (x1000)

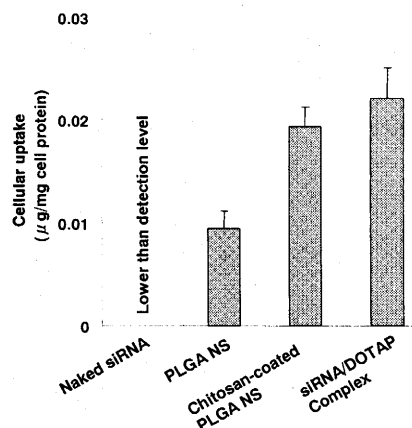


Fig.3 Cellular uptake of the different siRNA preparations on A549 cells (siRNA conc:50nM)

4. 引用文献

- 1) Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Kuno Y, Pharm Dev Technol. 5, 77-85 (2000).
- 2) Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y., J Control Release. 102, 373-381 (2005).
- 3) 坂井剛志等, 日本薬剤学会創立 20 周年記念大会講演要旨集, pp94 (2005)