

自己分解性脂質様物質からなる核酸内封ナノキャリアの構造解析 Structural analysis of nucleic acid-encapsulated nanocarriers composed of self-degrading lipid-like substances

米持悦生^{1,*}, 古石誉之¹, 田中浩揮², 秋田英万²

¹星薬科大学, 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

²千葉大学, 〒260-0856 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

Etsuo YONEMOCHI^{1,*}, Takayuki FURUISHI¹, Hiroki TANAKA² and Hidetaka AKITA²

¹Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8510, Japan

²Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-0856, Japan

1 はじめに

核酸 (DNA や messenger RNA (以下 mRNA)) は遺伝情報の運び手であり、これらを臓器や細胞に人工的に導入することで産生されるタンパク質を利用して遺伝性疾患などを治療する『遺伝子治療』の実現が期待されている。核酸は細胞外において極めて脆弱な分子であるため、効率的に細胞内へ送達するためには、脂質やポリマーから形成されるナノ粒子内へ内封し、安定化しなければならない。一方、これら核酸キャリアと核酸の相互作用が過剰に大きい場合、細胞内における核酸の放出が阻害され、タンパク質導入効率は減少する。このことから、遺伝子治療の実現には、細胞外における頑健性と細胞内における柔軟性を兼ね備えた素材の開発が必要となる。

細胞内は細胞外に比べてグルタチオン (glutathione) 濃度が 1000 倍以上高い還元環境である。本研究グループでは現在までに、還元感受性のジスルフィド結合を分子構造内に有する SS-cleavable and pH-activated lipid-like material (ssPalm) の開発を進めてきた (図 1 a)。ssPalm はジスルフィド結合に加えて第三級アミンを構造内に有し、エンドソーム酸性化に伴う膜突破能と細胞質選択的な粒子崩壊能を兼ね備えている。

本研究では、ナノ粒子内でのみ特異的に誘起される Hydrolysis accelerated by intra-Particle Enrichment of Reactant (HyPER) の原理により、細胞内で自発的に自己分解する ssPalmO-Phe を開発した (図 1 b)。

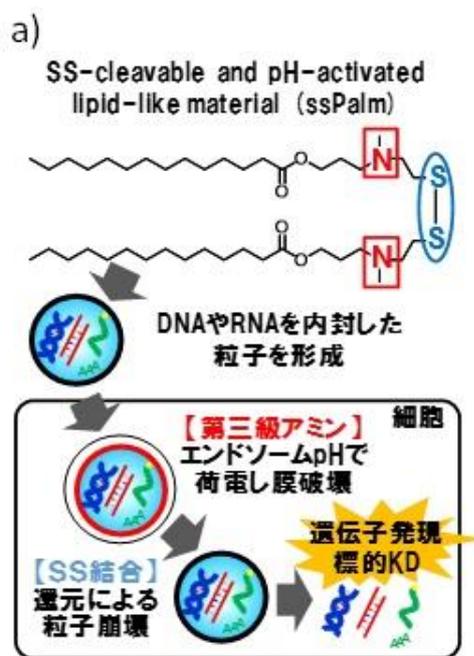


図 1 a : 環境感受性脂質 ssPalm の設計コンセプト

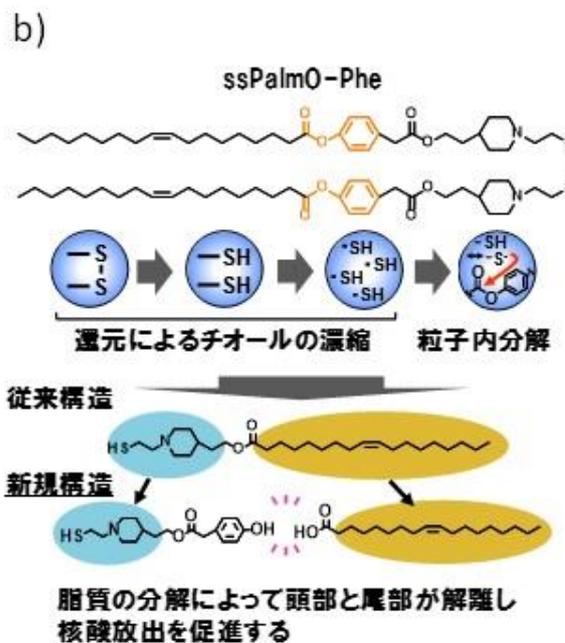


図 1 b : 本研究で開発した ssPalmO-Phe と粒子内分解反応の概略図

2 実験

ナノ粒子の調製

細胞内で自発的に自己分解するオリジナルの ssPalm、骨格を改変した ssPalmO-Phe、さらに、非自己分解型誘導体である ssPalmO-Ben を使用し、ナノキャリア粒子を調製した (図 2 a)。

溶液 X 線小角散乱測定(SAXS)測定

測定は高エネルギー加速器研究機構の BL10C にて行った。波長は 1.3 Å、カメラ長は 0.5m~3m で、2 mL チューブに入れた試料をペリスタポンプで 40μL の平板セルに充填、実験ハッチ内のセルホルダーにセットし測定した。データ解析には ATSAS, SAngler を用いた。

3 結果および考察

HyPER では脂質ナノ粒子の還元により産生されたチオール分子が、粒子内のナノ空間に高度に濃縮されることで、チオールによるフェニルエステルへの求核攻撃が促進される。本素材を用いて細胞に対しレポーター遺伝子を導入したところ、従来技術と比較し有意に高い遺伝子導入活性が得られた。また、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス肝臓の直接遺伝子編集技術へも応用可能であり、トランスサイレチン遺伝子の破壊により血液中のトランスサイレチン濃度が 95%以上低下した。

本ナノ粒子のクライオ電子顕微鏡像は、明確な内部構造を示さなかった (図 2 b)。しかし、Yanez Arteta, M.らは類似構造体を X 線散乱や中性子散乱により解析し、粒子内部で柔軟なヒモ状の逆ヘキサゴナル型構造が絡みあうモデルを提唱している[Yanez Arteta M. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2018]。そこで本研究では、X 線小角散乱を用いて ssPalmO-Phe からなるナノ粒子を観察した。

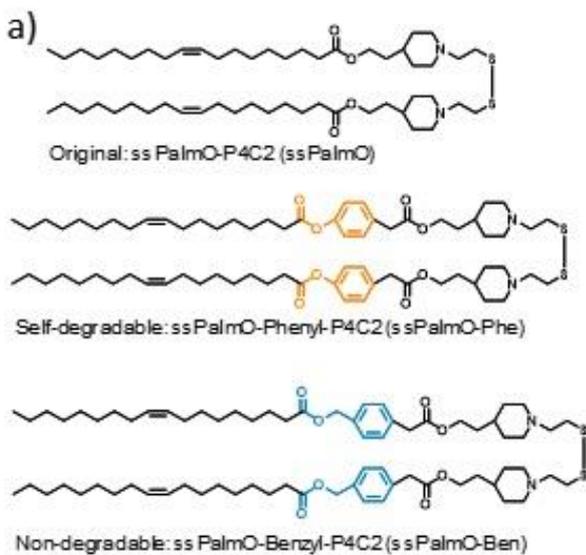


図 2 a : コントロール化合物の化学構造式

その結果、ssPalmO-Phe に加え、骨格改変前の親化合物である ssPalmO、ならびに非自己分解型誘導体 ssPalmO-Ben で、内部構造に由来する明瞭な散乱ピークが観察された (図 2c)。

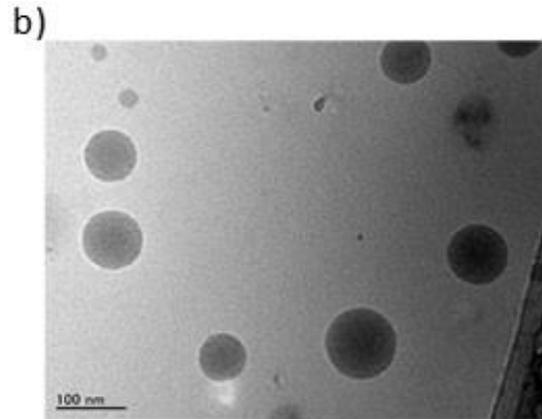


図 2 b : ssPalmO-Phe からなる脂質ナノ粒子のクライオ電子顕微鏡画像

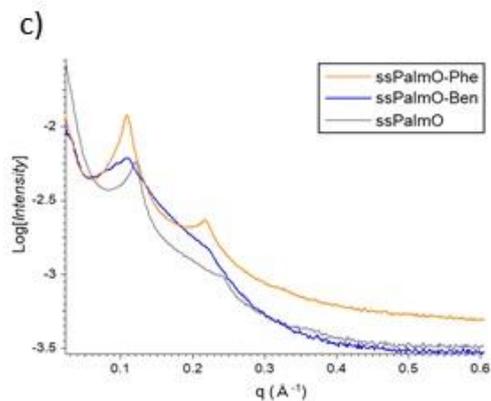


図 2 c : 各 ssPalm からなる脂質ナノ粒子の X 線小角散乱データ

4 まとめ

ピークから推定される繰り返し構造の距離は既報と同様に約 6 nm であるため、ssPalm も同様な逆ヘキサゴナルを形成する可能性が示唆された。本結果は、ssPalm からなる粒子も内部に規則構造を有することを示すため、今後はナノ粒子の内部構造と核酸導入効率との関係性を解析する。

参考文献

[1] H. Tanaka *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* (DOI: 10.1002/adfm.201910575).

成果

1. ニュースリリース http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2020/20200624n_anocapsule.pdf

* e-yonemochi@hoshi.ac.jp