

RNA 含有ナノ粒子の構造変化機構の検討

Study of structural change mechanism of RNA-containing nanoparticles

米持悦生¹, 古石誉之¹, 福澤薫¹

¹ 星薬科大学薬学部

〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Etsuo YONEMOCHI^{1,*}, Takayuki FURUISHI¹ and Kaori FUKUZAWA¹

¹School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Hoshi University,
2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

1 はじめに

リポソームは脂質やコレステロールからなる脂質二重層を持つ微粒子であり、粒子径を 100 nm 程度に制御することで、悪性腫瘍へと選択的に集積する性質を持たせることができる。siRNA (Small Interfering RNA) は 21-23 塩基対から成る短鎖二本鎖 RNA で、メッセンジャーRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉を行うことで抗がん作用を示す。この siRNA は負電荷をもつため、リポソームの構成成分である脂質を正電荷脂質とした正電荷のリポソームを静電的に結合させることで、siRNA の分解を抑えつつ細胞内に核酸分子を導入することができる。この siRNA と正電荷ベシクルの複合体(リポプレックス)は、選択性の高い治療法への利用が期待されている。リポプレックスを標的部へ送達させるためには、物性を制御する必要があるが、この物性は各構成成分の組成や調製過程に影響を受ける。しかしこれら要因の構造変化への影響の詳細は不明であり、粒子設計は試行錯誤により検討されている場合が多い。

本研究では中性あるいは正電荷脂質の組成・調製過程がリポプレックスの構造変化にもたらす影響を検討し、さらに計算化学手法を適用し、微細構造や生成機構の解明を試みた。

2 実験

本実験では、中性脂質 DSPC 及び正電荷脂質として TAP を使用し、種々の組成のリポソームを調製した。リポプレックス試料は、リポソーム溶液に、負電荷ポリマーの siRNA を最大荷電比(-/+)3.0 となる範囲で加え調製した。

リポプレックスの凝集や構造変化の確認には、透過型電子顕微鏡(Cryo-TEM)を用いた、さらに、動的光散乱測定装置(DLS)により粒子径およびゼータ電位を測定した。溶液 X 線小角散乱(SAXS)測定は、高エネルギー加速器研究機構の BL-10C にて行った。波長は 0.9~1.3 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。さらに、分子レベルの詳細な構造の可視化にはフラグメント軌道(FMO)法と散逸粒子動力学(DPD)法を連携した FMO-DPD 計算を用いた。[1]

3 結果および考察

3-1 siRNA を滴下した際の脂質ナノ粒子の変化

TAP/DSPC に siRNA を滴下し作成したリポプレックスのゼータ電位と粒子径の変化を図 1 に示す。青線がゼータ電位(mV)、赤線が粒子径(nm)を表す。この結果から荷電比 1.3 付近で粒子径が急激に上昇したことから、この時点で凝集が進んだことが示唆された。また、同様のタイミングでゼータ電位が減少していたことから、ゼータ電位の低下は粒子の凝集を引き起こしていることが確認された。また、ゼータ電位と粒子径の関係を検討した結果、ゼータ電位が 0 に近づくほど粒子径は上昇していた。さらに、負電荷の上昇に伴い粒子径が減少しており、ゼータ電位が粒子凝集性に影響を与えることが示された。

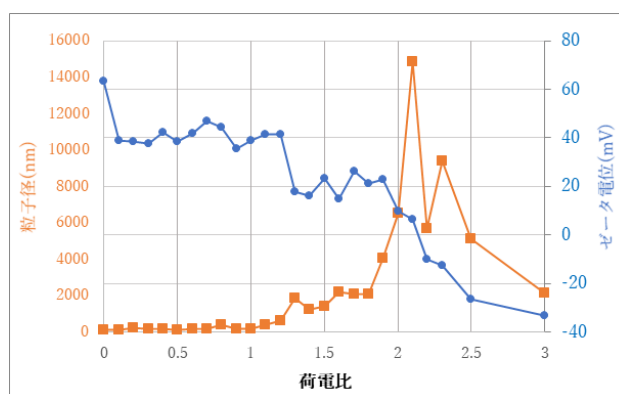


図 1 : siRNA を滴下し作製したリポプレックスの粒子径・ゼータ電位の変化

3-2 siRNA を滴下した際の脂質膜の変化

siRNA の滴下によるリポプレックスの SAXS プロファイル変化を図 2 に示す。荷電比 1.3 のリポプレックスでは $q=0.08 \text{ \AA}^{-1}$ 付近にピークが検出され、ピーク位置に相当する周期構造は 78.0 \AA だった。この

ピークは荷電比 0.3 より現れ、この時のゼータ 電位は 37.6mV で、粒子径は siRNA を滴下する前後で変化が見られなかった。続いて、荷電比 0.7 では $q=0.15 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に新たなピークが現れ、ピーク位置に相当する周期構造は 39.6 Å だった。このとき粒子径は siRNA 滴下前の 3.6 倍となり、凝集していることが確認された。さらに、荷電比 1.3 では $q=0.15 \text{ \AA}^{-1}$ 付近のピーク強度が荷電比 1.2 の時のおよそ 2 倍となった。粒子径は siRNA 滴下前の 16 倍となり、ゼータ電位は 17.9mV であった。

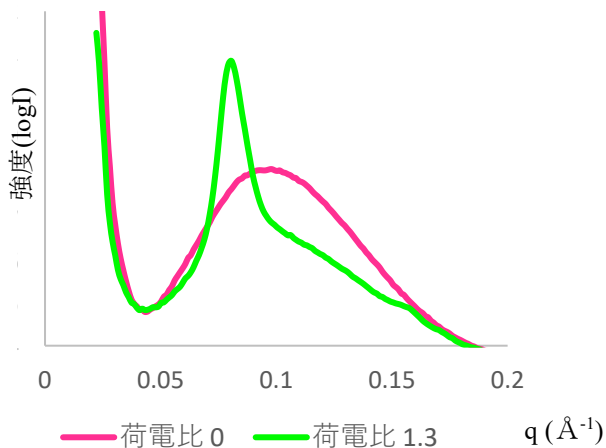
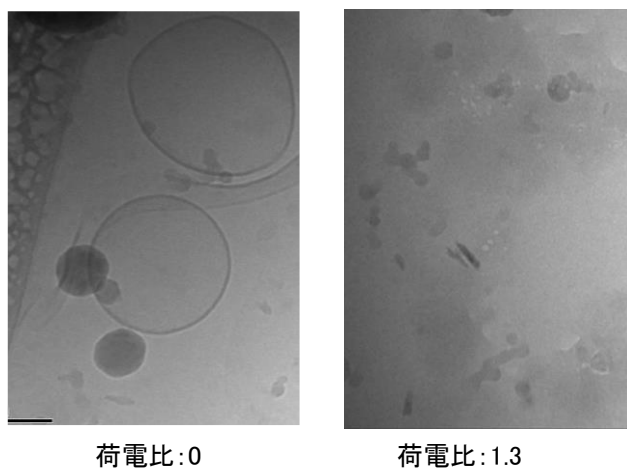


図 2 : SAXS プロファイルに及ぼす荷電比の影響

さらに、荷電比 2.5 では $q=0.08 \text{ \AA}^{-1}$ 付近のピーク強度が低下した。ゼータ電位は -26.4mV であり、粒子径は最高値のおよそ 3 分の 1 だった。これはゼータ電位がマイナスになったことで リポプレックス 同士が再び反発し 再分散したためと考えられた。続いて、各荷電比における Cryo-TEM 画像を図 3 に示す。siRNA 添加前の荷電比 0 では、ベシクルとして存在していた粒子が、siRNA の添加(荷電比 1.3)により、凝集・膜融合が進行している様子が観察された。



荷電比:0 荷電比:1.3
図 3 : 各荷電比における Cryo-TEM 画像

3-3 FMO-DPD シミュレーションによる脂質粒子の可視化

FMO-DPD 法により可視化された脂質粒子の構造を図 4 に示す。siRNA が粒子表面に付着し始める荷電比 0.3 では、内膜に存在する親水部の一部が外側へ移動していた。さらに、荷電比 1.3 では、siRNA が粒子表面を覆っており内膜の親水部のさらなる移動により、内水相が複数に分裂していた。

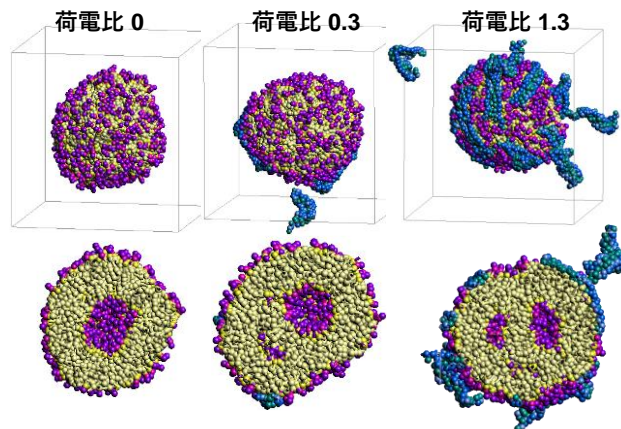


図 4 : 各荷電比における脂質粒子構造のシミュレーション結果

この状態における膜中の各成分の分布を確認したところ、siRNA の過剰存在下では、DSPC が外側、TAP が内側へ移動し、各脂質成分の相分離が進行、すなわち膜の不均一性が増加していることが確認された。これは脂質膜の流動性の増加を示唆しており、相転移による膜の不安定化が引き起される要因であることが示唆された。

4 まとめ

FMO-DPD シミュレーションを用いることで、荷電比の違いによる siRNA リポプレックスの構造変化を可視化することができた。これらの結果から、実験と計算科学的手法を組み合わせることで、RNA 含有ナノ粒子の詳細な物性解析が可能となり、将来的には効率的なナノ粒子の製剤設計に役立つことが期待される。

参考文献

[1] K. Okkuwaki *et al.*, J. Comput. Chem. Jpn, 17, 102 (2018); K. Okuwaki *et al.*, Applied Physics Express, 13, 017002 (2020).

成果

1. 散逸動力学法を用いた RNA 含有リポプレックス構造変化の可視化による検討, 第 37 回日本 DDS 学会学術集会プログラム予稿集, 132 (2021).

* e-yonemochi@hoshi.ac.jp