

フォーカス 26 <第 10 回> : 成果事例クローズアップ (中部地区ナノテク総合支援: ナノ材料創生加工と先端機器分析)

遺伝子治療用ナノデバイス合成チップ[®]開発

北海道大学大学院薬学研究院 原島秀吉

名古屋大学大学院工学研究科 馬場嘉信



上左: 北海道大学大学院薬学研究院 原島秀吉
上右: 名古屋大学大学院工学研究科 馬場嘉信

1. はじめに

遺伝子治療の最終目標は臨床への応用であるが、今のところウイルスの性能を凌駕するような遺伝子ベクターは実現されていない。このような現状を打破するために、非ウイルス性ベクターである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 MEND (Multifunctional Envelope-type Nanodevice) の開発が進められている [1][2][3][4][5][6][7][8][9][10]。この MEND は、遺伝子治療に必要なとされる各種機能性素子の配置が自在に可能であり、ウイルス性ベクターの遺伝子導入効率を上回るような優れた性能を有していることから、ウイルス性ベクターに代わる安全かつ高効率な新しい非ウイルス性ベクターとして大きな期待を集めている。しかしながら、この MEND の作製には煩雑な実験操作と数日に及ぶ時間が必要であるため、臨床への応用にはより簡便かつ短時間で作製できるような手法の開発が望まれていた。そこで我々の研究グループでは、マイクロ・ナノ流体の特性を利用することで、MEND を簡便かつ短時間で作製できる遺伝子治療ナノデバイス合成チップの開発を行うこととした。具体的には、機能性核酸コアであるプラスミド DNA とポリカチオンの凝集体をリン脂質二重膜により内封するために、マイ

クロチャンネル内をあらかじめリン脂質でコーティングし、その中に機能性核酸コア溶液を流す方法を試した。その結果、これまでの煩雑な操作なく誰でも簡単に約 30 分で MEND の作製が可能となった。さらに従来法と比較して、試薬量を 1/10 以下にまで低減することが可能となった。

2. MEND 合成チップの開発戦略

2.1 リン脂質コーティングを利用した MEND の作製法

本研究ではマイクロ流体チップの特徴に着目し、従来法よりもテーラーメイド医療の現場の要求に合致するように、少量の MEND をより迅速かつ手作業をなるべく無くして自動的に作製することを目的として研究を行った。具体的には、マイクロ流体デバイスのガラス基板をリン脂質でコーティング [11][12][13] を施し、そこに機能性核酸コア溶液を流すことで MEND の合成を試みた。リン脂質コーティングは負電荷を帯びるように調製されており、正電荷を帯びている機能性核酸コアが静電的に結合することにより MEND が合成される。図 1 に MEND 作製の概略図を示した。

2.2 ソフトリソグラフィーによるマイクロ流体チップの作製

図 2 のようなマイクロ流体チップのデザインを採用した。中心から放射状に広がったチャンネルを使用することにより、MEND の作製を並行して行うことで作製時間の

*問い合わせ：
中部地区ナノテク総合支援: ナノ材料創生加工と先端機器分析
名古屋大学
〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町
電話: 052-789-4664
E-mail: babaymtt@apchem.nagoya-u.ac.jp

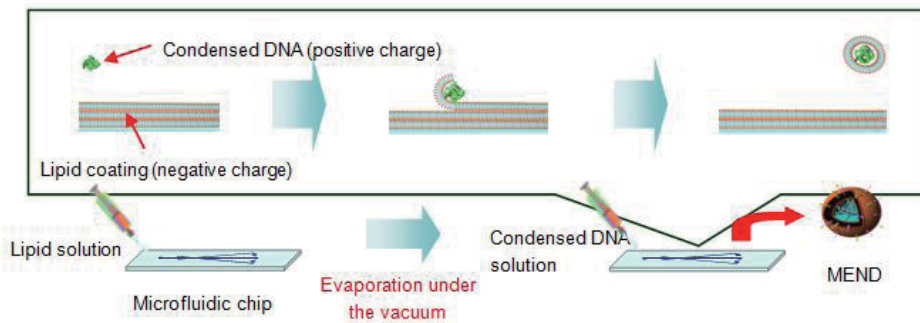


図1 マイクロ流体チップを用いた MEND の作製法の概略図.

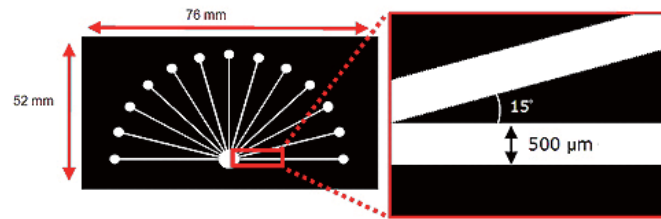


図2 マイクロ流体チップのデザイン

短縮を目指した。

まず、3インチのシリコンミラーウェハー（株式会社クリテック製）をアセトン（Wako）とイソプロパノール（Wako）でよく洗浄したのち、ホットプレート上で200℃、5分間加熱を行う。続いて、スピナー（SPINCOATER 1H-D7, ミカサ工業製）に固定し、SU-8 3050（化薬マイクロケム）を、Slope 5 s, 500 rpm 5 s, Slope 8 s, 3000 rpm 45 s の条件でコーティングを行った。コーティングが完了したシリコンミラーウェハーを再度95℃で10分間加熱を行い、チャンネル形状がプリントされているフィルム（名古屋大学生協印刷部）をおき、マスクライナー（Karl Suss MJB 3）を使用して15秒間、紫外線を照射させSU-8を硬化させた。硬化させたミラーウェハーを再びホットプレート上に置き、95℃で8分間加熱を行った。これをSU-8 Developer（化薬マイクロケム）の入ったシャーレに浸し現像を行ったのち、イソプロパノールで洗浄を行った。このマスターをTrichloro (1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyl) silane 97% (ALDRICH, 448931-10G) を用いて表面のシラン化を行った後、SILPOT 184 (Dow Corning TORAY) を重量比、溶剤：硬化剤 = 10 : 1 で混合したものを注ぎこみ、ホットプレート上で90℃、2時間加熱を行い硬化させた。硬化が確認された後、マスターから剥がし取り医療用メスで適当な形に切り分け、SH洗浄を行い表面が親水化された大型スライドガラス(76mm × 52mm, 松浪ガラス工業株式会社)上に接着させ、マイクロ流体チップを完成させた。

2.3 機能性核酸コア（プラスミド DNA/ プロタミン）溶液の作製

カチオン性ポリマーとプラスミド DNA を混合すると

静電的相互作用により凝集して複合体を形成する。今回の実験では、プラスミド DNA とカチオン性高分子としてプロタミンを混合し、機能性核酸コア溶液を調製した。今回の実験では、75μl の Protamin Sulfate Salmon Milt (CALBAIOCHEM) の 10mM pH 7.4 HEPES(DOJINDO) バッファー溶液 (0.10mg/ml) に、pCDNA-DEST53 Gateway ベクター (invitrogen) 溶液 (0.10mg/ml) をボルテックス中で滴下し、15分間室温でインキュベートした。

2.4 マイクロ流体チャンネル内のリン脂質コーティング

本研究では、表面が polyethylene glycol (PEG) 修飾された (DSPE-PEG) -MEND, cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) を添加した CHEMS-MEND, カルジオリピンを含む CL-MEND の三種類の MEND の作製を行った。(DSPE-PEG) -MEND は、Methanol (∞ Pure Wako), Chloroform (stabilizer : Ethanol 0.4 ~ 0.8 ∞ Pure Wako) 混合溶媒に、あらかじめ Chloroform に溶解させた、18:1 PE 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE, AVANTI Polar Lipids), 18:0 PEG2 PE 1,2-distearoyl -*sn*- glycerol -3- phosphoethanolamine -N-[methoxy (polyethylene glycol) -2000] (DSPE-PEG, ammonium salt, AVANTI Polar Lipids), Dihexadecyl Phosphate (DCP, ナカライテスク) を重量比が DOPE : DSPE-PEG : DCP = 5.2 : 2.4 : 0.4 となるように滴下し、よく混合した。最終的に Methanol 及び Chloroform の濃度は 1:1 とする。CHEMS-MEND は DOPE, および CHEMS (SIGMA) を重量比が DOPE : CHEMS=1 : 0.165 となるように調製した。同様に、Methanol 及び Chloroform の濃度は 1 : 1 とした。CL-MEND は、DOPE と Cardiolipin (CL, 5mg/mL in ethanol, ~ 98% (TLC),

SIGMA) を重量比が DOPE:CL=4:8.25 となるように調製した。Methanol 及び Chloroform の濃度は 1:10 となるようにした。これらの溶液をマイクロ流体チップの導入口よりガスタイトシリンジ (HAMILTON) を使用して導入する。これを遮光しながら一晩真空中でよく乾燥させ、コーティングを行った。

2.5 MEND の合成

コーティングが完了したマイクロ流体デバイスに、ラボランシリコンチューブ (アズワン) を接続する。このシリコンチューブに、機能性核酸コア溶液を満たしたガスタイトシリンジを接続し、マイクロシリンジポンプ (アズワン) を使用して溶液を流した。得られた溶出液を回収し、褐色ビンに窒素ガスを封入し冷蔵庫にて保管を行った。

3. マイクロ流体チップによる MEND 合成結果

3.1 リン脂質コーティングの表面構造解析

ガラス基板上で、リン脂質コーティングがどのように形成されているか AFM を用いることによって確認を行った。それぞれ、重量比が DOPE:DSPE-PEG:DCP = 5.2:2.4:0.4 ((DSPE-PEG)-MEND)、モル比が DOPE:CHEMS = 9:2 (CHEMS-MEND) と DOPE:CL = 1:1 (CL-MEND) となるようにリン脂質溶液を調製し、これを用いてピラニア洗浄した超平滑ガラスに滴下して乾燥させ、AFM を用いてタッピングモードで解析を行った。得られた画像を図 3~5 として、以下に示した。

(DSPE-PEG)-MEND では、均一な高さの領域がいくつも重なったような構造の画像を得ることができた。CHEMS-MEND では、縞状の構造が確認された。また、CL-MEND では非常に薄い高さの膜が観察された。以上から、リン脂質溶液に含まれる成分を変化させることにより、容易にリン脂質コーティングの構造を変化させることができることがわかった。これらの膜状の構造が機能性核酸コアと結合し、はがれ取れることにより MEND が合成される。

3.2 リン脂質コーティングの流動性解析

MEND が適度なサイズで合成されるには、リン脂質コーティングが適度な流動性を有している必要がある。その流動性の解析のために、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 解析を行った。FRAP 解析は、もともとは細胞膜上に存在する分子の流動性解析のために開発された実験手法である。細胞膜をあらかじめ蛍光色素で染色し、局所的に強いレーザー光を照射して蛍光色素を消光させ、蛍光の回復速度から分子の挙動解析を行う

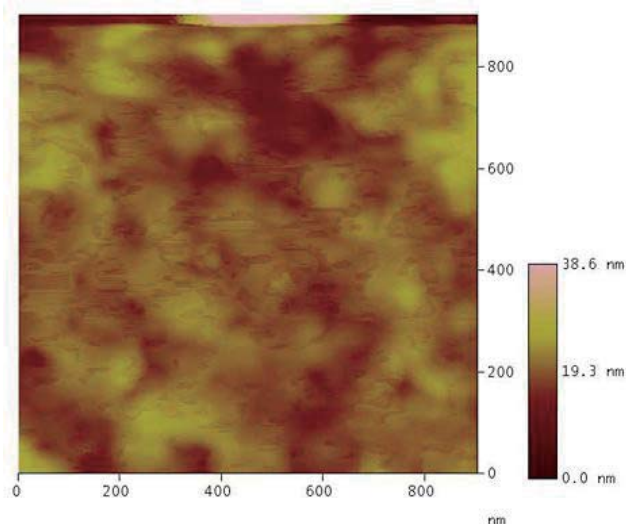


図 3 リン脂質コーティング (DSPE-PEG) の AFM 画像

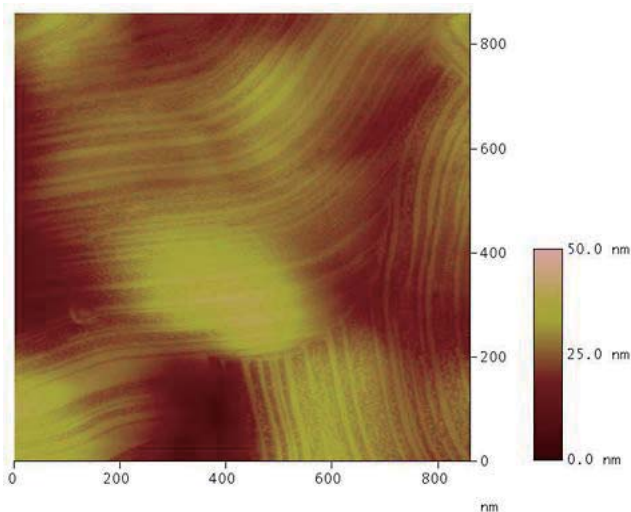


図 4 リン脂質コーティング (CHEMS) の AFM 画像

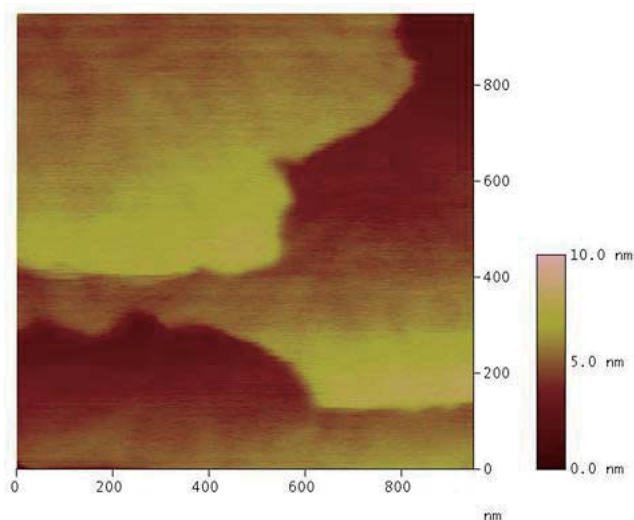


図 5 リン脂質コーティング (CL) の AFM 画像

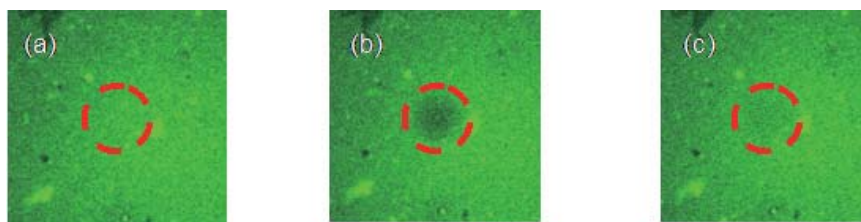


図6 リン脂質コーティングの蛍光回復過程
(a) 消光前 (b) (c) 消光後

というものである [14][15][16][17][18]. 最近では、細胞の解析だけでなく、基板上に展開させた脂質二重膜の挙動解析などにも広く利用されている [19][20][21][22]. ストレートチャンネルのPDMSチップを(DSPE-PEG)-MENDコーティングを行った後、30℃、倍率100倍、ブリーチ直径5μmの条件でFRAP解析を行ったのが以下の図6である。図の結果からわかる通り、消光したリン脂質コーティングの領域の蛍光が回復していく様子が観察することができた。レーザーによって消光されたリン脂質コーティングの蛍光が約7秒で回復することがわかった。これらの結果から、リン脂質コーティングは適度な流動性を有しており、機能性核酸コアに結合しMENDを作製する条件を満たしていることがわかった。

3.3 リン脂質コーティングのゼータ電位測定

動的光散乱光度計を用いて、リン脂質コーティングの表面ゼータ電位の測定を行った。機能性核酸コアとリン脂質コーティングが結合しMENDが形成されるためには静電的相互作用による結合が重要であり、機能性核酸コアは正に帯電するように調製されているため、静電的相互作用を起こすためにはリン脂質コーティングが負に帯電している必要がある。ガラス基板にそれぞれのMENDを作製するためのリン脂質コーティングを行った後、表面ゼータ電位測定を行った。その結果、ピラニア洗浄直後のガラス基板においては-55mV、DSPE-PEGコーティングでは-20mV、CHEMSコーティングでは-40mV、CLコーティングでは-70mVの表面ゼータ電位を示すことがわかった。これらのゼータ電位は、SUV (Single Unilamellar Vesicles) のゼータ電位とほぼ同じくらいであり、ガラス基板表面が均一にリン脂質でコーティングされていることがわかった。これらから、機能性核酸コアはこの条件下で静電的相互作用によりリン脂質と結合する。

3.4 MENDの粒度分布解析

機能性素子として、ポリエチレングリコールをベクターに付加すると血中滞留性が向上し、サイズを100-200nmに制御することによりがん組織に蓄積することが知られている。溶液の送液速度、コーティングの種類を検討す

ることにより、従来法よりもがんのターゲティングに適したサイズ制御を目指した。実際に作製したMENDの粒度分布の解析を動的光散乱光度計を用いて行った。リン脂質コーティングが完了したマイクロ流体チップに機能性核酸コア溶液をそれぞれ1チャンネルあたり1, 5, 10μl/minの流量で送液を行い、それぞれ得られたMEND溶液の測定を行った(表1~3)。平均粒子径に多少の差はあるものの、いずれのMENDにおいても5μl/minにおいて最も平均粒子径の大きいサイズを得ることができた。これは、流速が遅い場合は水和によって自発的にリポソームが生成される条件が支配的になり、そのことにより、大きいサイズの粒子径が得られると考えられる。流速が早くなってくると、液と界面との間にせん断力が働きリン脂質コーティングがはがし取られMENDが形成されると考える。このせん断力が大きくなりすぎると、リン脂質コーティングが大きくはがし取られ大きなサイズのMENDが形成されてしまう。リポソームの自発的生成とせん断力のバランスが最もうまく取れたときに、最も小さいサイズのMENDが形成されたと考えられる。これらの最適条件と従来法であるSUV-fusion法と脂質膜水和法と作製されたMENDとの粒度分布を従来法と比較すると、いずれの種類もMENDにおいても狭い分布、および小さ

表1 (DSPE-PEG)-MENDの平均粒子径およびCV値

流量 (μl/min)	1	5	10
平均粒子径 (nm)	209.4	138.0	168.6
CV値 (%)	44.1	44.1	45.6

表2 CHEMS-MENDの平均粒子径およびCV値

流量 (μl/min)	1	5	10
平均粒子径 (nm)	196.5	185.5	189.1
CV値 (%)	40.4	43.3	42.8

表3 CL-MENDの平均粒子径およびCV値

流量 (μl/min)	1	5	10
平均粒子径 (nm)	211.6	198.9	220.9
CV値 (%)	45.3	45.4	43.3

い平均粒子径で作製することに成功し、よりがん治療に適したものを作製できたといえる。また、SUV-fusion法では二日かかった作製時間をこのコーティング法を使用すれば機能性核酸コア溶液を流すだけで作製できるため、わずか30分ほどで作製を完了することができる。

4. 結論

本研究ではマイクロ流体チップを使用して、より簡便にMENDを作製できる方法を考案した。流量の最適化後のMENDと従来法で作製したMENDの粒度分布を比較した結果、従来法では平均粒子径119.1nm, CV値45.2%, 新規法では平均粒子径138.0nm, CV値44.1%となり同程度のサイズのMENDの合成に成功することができた。また、合成時間もマイクロ流体チップを用いない従来法では、約3時間かかるところを約30分にまで短縮することに成功し、試薬量も1/10に低減した。さらにリン脂質でコーティングされたマイクロ流体デバイスは不活性ガス封入下の冷暗所で保存することが可能であり、医療現場では封入すべきプラスミドDNAとプロタミンをコンパクションさせ機能性核酸コア溶液を作製し、デバイスに流すだけでMENDの合成をする事ができ、手作業を極力抑えることができた。

これらの結果から、本手法の自動化をさらに進めることにより、MENDの臨床への応用が実現可能であると考えている。今後は、粒子径の制御のみならずDNAの保持効率などについても検討を行い、臨床での使用に向けて*in vivo*での実験を進めていかなければならない。

5. 謝辞

本研究の一部は文部科学省「先端研究施設共用イノベーション創出事業」に参画する「名古屋大学中部地区ナノテク総合支援：ナノ材料創製加工と先端機器分析」の研究支援を受けて実施しました。

参考文献

[1] K. Kogure, R. Moriguchi, K. Sasaki, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima, *J. Control. Release* 98, 317-323, 2004
[2] K. Sasaki, K. Kogure, S. Chaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Harashima, *Int. J. Pharm* 296 (1-2), 142-150, 2005
[3] R. Moriguchi, K. Kogure, H. Akita, S. Futaki, M. Miyagishi, K. Taira, H. Harashima, *Int J Pharm* 301(1-2), 277-285, 2005
[4] T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, A. Minoura, T.

Masuda, H. Akita, K. Kato, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima, *Biol. Pharm. Bull.* 29(6), 1290-1293, 2006
[5] Y. Nakamura, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J. Control. Release* 119(3), 360-367, 2007
[6] I.A. Khali, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, M. Ueno, H. Kishia, M. Kudoh, Y. Mishina, K. Kataoka, M. Yamada, H. Harashima, *Gene Ther* 14(8), 682-689, 2007
[7] K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, *J. Control. Release* 122, 246-251, 2007
[8] K. Kogure, H. Akita, Y. Yamada, H. Harashima, *Adv Drug Deliv Rev.* 2007
[9] K. Sasaki, K. Kogure, S. Chaki, Y. Nakamura, R. Moriguchi, H. Hamada, R. Danev, K. Nagayama, S. Futaki, H. Harashima, *Anal Bioanal Chem* 391(8), 2717-2727, 2008
[10] H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguti, I.A. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure, H. Harashima, *Biomaterials* 30, 2940-2949, 2009
[11] K. Kuribayashi, G. Tresset, P. Coquet, H. Fujita, S. Takeushi, *Meas. Sci. Technol.* 17, 3121-2126, 2006
[12] M.I. Angelova, S. Soleau, P. Meleard, J.F. F Faucon, P. Bothorel, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89, 127-131, 1992
[13] M.L. Berre, A. Yamada, L. Reck, Y. Chen, D. Baigl, *Langmuir* 24, 2643-2649, 2008
[14] 原口徳子, 木村宏, 平岡泰, 講義と実習 生細胞蛍光イメージング—阪大・北大 顕微鏡コースブッカー: 共立出版, 2007
[15] B.L. Sprague, R.L. Pego, D.A. Stareva, J.G. McNally, *Biophys. J.* 46, 3473-3495, 2004
[16] K. Jakobson, E. Wu, G. Poste, *Biochimica et Biophysica Acta* 433, 215-222, 1976
[17] D.E. Koppel, *Biophys. J.* 28, 281-292, 1979
[18] D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W.W. Webb, *Biophys. J.* 16, 1055-1069, 1976
[19] K.S. Phillips, Q. Cheng, *Anal. Chem.* 77, 327-334, 2005
[20] J.S. Hovis, S.G. Boxer, *Langmuir* 17, 3400-3405, 2001
[21] K.S. Phillips, Y. Dong, D. Carter, Q. Cheng, *Anal. Chem.* 77, 2960-2965, 2005
[22] Y. Dong, K.S. Phillips, Q. Cheng, *Lab Chip* 6, 675-681, 2006

(名古屋大学大学院工学研究科 馬場嘉信)