

ケイ酸カルシウムの非晶性が実現する革新的 siRNA 内包 ハイブリッドナノ粒子の創製と制がん剤への展開

東京工業大学 科学技術創成研究院化学生命化学研究所 武元宏泰

Development of Nanohybrid Materials for siRNA Delivery Based on
Calcium Silicate and Polymers

Hiroyasu Takemoto

Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo
Institute of Technology

生体適合性のシリカと siRNA とからなる有機-無機ハイブリッドを形成させることで siRNA 内包ナノ粒子型の制がん剤の開発を行った。siRNA、塩化カルシウム、ケイ酸ナトリウムを混合することで目的となるナノ粒子を調製した。得られた構造体は酸性 pH に応答して解離するため、細胞内選択的な siRNA 放出が期待される。得られたナノ粒子は 48 nm で球状であることが確認された。さらに、調製溶液内の 95% 以上の siRNA が粒子内に内包可能であった。培養がん細胞に対して配列特異的な遺伝子発現抑制能も有していることから、本研究にて開発された新規ナノ粒子の siRNA 送達キャリアとしての潜在性が示された。

We have developed a new organic-inorganic hybrid nanomaterial comprising silica and siRNA as an anticancer reagent. The nanomaterials were prepared by a simple mixing of siRNA, calcium chloride, and sodium silicate. Herein, the obtained nanomaterials can be dissociated in response to the acidic pH in endosome, leading to intracellular release of siRNA. The obtained nanomaterials had 48nm in size with low polydispersity and spherical shape. Furthermore, > 95% of PEG-siRNA in the preparation solution was encapsulated in the particles. Ultimately, gene silencing effect in a sequence-specific manner for cultured cells suggested the medicinal potential of the developed nanomaterials in this study.

1. はじめに

siRNA (small interfering RNA) の配列特異的な薬理活性は治療抵抗性を有するがんへの治療効果も期待されており、がんに対する特効薬としての展開が期待されている¹⁾。一方で、その制がん剤としての応用には siRNA を酵素分解から保護しつつ腫瘍組織へ送達・集積させるための siRNA 内包ナノ粒子の形成が必用である²⁾。これに関し、生体適合性に優れた無機イオンと siRNA とからなる有機-無機ハイブリッドの形成により siRNA 内包ナノ粒子を調製することが可能である³⁾。しかし、ハイブリッドナノ粒子として最も使用されているリン酸カルシウム由来の粒子は希釈条件下での崩壊がしばしば問題となるため、水熱処理や他の化合物の混合による安定性向上が試みられている⁴⁾。本研究では他の解決手法として、共有結合を主体とするシリカ材料の使用が安定な粒子形成を可能とする

のではと考えた。シリカ材料はシロキサン結合にて架橋された構造を有しており、主にイオン結合により形成されるリン酸カルシウム材料に比べて水溶液中で解離しづらく、安定なナノ粒子調製が期待出来る。

シリカナノ粒子に水中でのコロイド安定性を付与するために PEG (ポリエチレングリコール) が結合した siRNA (PEG-siRNA) を用いた。PEG-siRNA、塩化カルシウム、ケイ酸ナトリウムの混合により目的のナノ粒子を調製した。塩化カルシウムは siRNA とケイ酸とのアニオン同士の静電反発をカチオン性のカルシウムイオンにて緩和するために用いている。また、カルシウムと siRNA 内リン酸エステル及びケイ酸との結合は後期エンドソーム内の酸性 pH で解離するため、細胞内選択的な siRNA 放出へと繋がる。

2. 実験方法

2.1 PEG-siRNAの合成

122mg の PEG-NH₂ (分子量:12,000) と 22mg の DBCO-NHS とを 2mL の DMF に溶解し、室温で一晩攪拌した。純水に対する透析とフィルター濾過、凍結乾燥を経て、PEG-DBCO を得た (124 mg)。siRNA-azide とそれに対して 2 当量の PEG-DBCO とを 10mM HEPES (pH 7.3) にて混合し、凍結融解処理⁵⁾ 及び HPLC 精製を経て目的物となる PEG-siRNA を得た。

2.2 シリカナノ粒子の調製とサイズ評価

18 μ L の塩化カルシウム水溶液 (100 mM) と 12 μ L の PEG-siRNA (15 μ M) とを混合し、そこに 30 μ L のケイ酸ナトリウム水溶液を添加した。混合水溶液をピペッティングした後に 4 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。得られたシリカナノ粒子は ZetaSizer (Malvern 社) を用いて動的光散乱法にてサイズ測定を行った (3 μ M siRNA)。さらに、H-7000 電子顕微鏡 (日立社) を用いて形状観察を行った (酢酸ウラニル染色)。リン酸カルシウムのナノ粒子は既報の方法にて調製した⁶⁾。

2.3 siRNA内包率評価

シリカナノ粒子及びリン酸カルシウムナノ粒子の調製溶液は 4 $^{\circ}$ C で 1 時間延伸処理を行い (15,000rpm)、上澄みの siRNA 由来の UV 吸収 (260nm) を測定することで PEG-siRNA 内包率を算出した。

2.4 pH応答性評価

シリカナノ粒子を Cy3 標識した PEG-siRNA を用いて調製し、pH 7.4 あるいは 5.5 となるように 10% FBS 入りの緩衝液にて希釈した。25 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした後に、蛍光相関分光法 (LSM510、Carl Zeiss 社) にてサイズ測定を行った。

2.5. 培養細胞での遺伝子発現抑制評価

A549 細胞 (ヒト由来肺がん細胞) を 5,000 cells/well となるように 48-well プレートに播種し、24 時間後にシリカナノ粒子あるいはリン酸カルシウムナノ粒子をまいた (200 nM siRNA)。48 時間後、細胞内の mRNA 量を RT-PCR にて解析した (ABI 7500 Fast Real-time RT-PCR system、Applied Biosystems 社)。

3. 結果と考察

得られた PEG-siRNA を用いてケイ酸ナトリウム濃度を変更することで、粒子調製条件の最適化を行った。まず、調製溶液を遠心処理後の上澄み内の siRNA を定量することで、siRNA 内包率を評価した(図 1)。すると、3 μ M の PEG-siRNA を 30mM の塩化カルシウムで処理した系に対して、ケイ酸ナトリウム濃度 5mM の場合は調製後 1 時間では 40% だった内包率が時間とともに上昇し、72 時間後には 90% となった。一方で、ケイ酸ナトリウム濃度が 10mM 以上であると調製後 1 時間以内に系内の 95% 以上の siRNA が粒子に内包されることがわかった。一方で、カルシウムで処理していない PEG-siRNA と 10mM のケイ酸ナトリウムとを混合しても siRNA 内包率は 58.5% となった。このことから、Ca と Si とを組み合わせることで粒子内に siRNA を内包可能であり、とりわけケイ酸ナトリウム濃度が 10mM 以上において効率的に siRNA を内包出来ることがわかった。系内のシリカ存在量を多くすることで siRNA 内包コアの成長を促進し、迅速な siRNA 内包が可能となったことが示唆された。次に、内包率が 95% 以上であった調製条件において、粒子形成挙動を動的光散乱法にて評価した(図 2)。すると、いずれの条件でも混合して 1 時間程度で数十ナノメートルの粒子が形成されることが確認され、また、ケイ酸ナトリウム濃度が増大するに従って粒子サイズは大きく成長した。過剰なシリカ量はコアの持続的な成長を促し、サイズ制御を難しくすることが示唆された。これに関し、ケイ酸ナトリウム濃度を 10mM にすることで、粒子サイズは約 48 nm で一定となり、PDI (polydispersity index) も 0.1 程度と低く保たれていたことから、系全体が均一な球状の粒子であることがわかった。これらの事実から、3 μ M の PEG-siRNA 溶液での粒子調製における最適なケイ酸ナトリウム濃度を 10mM とした。調製された粒子を TEM 観察したところ、平均粒径が約 34

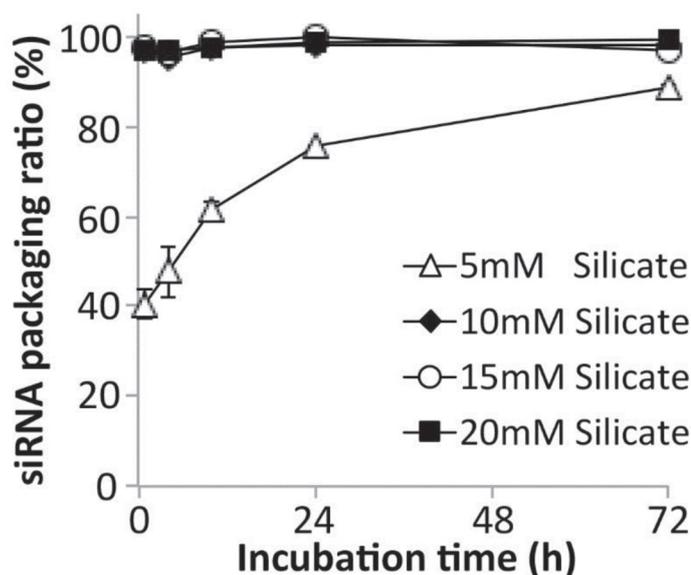


図 1 siRNA 内包率

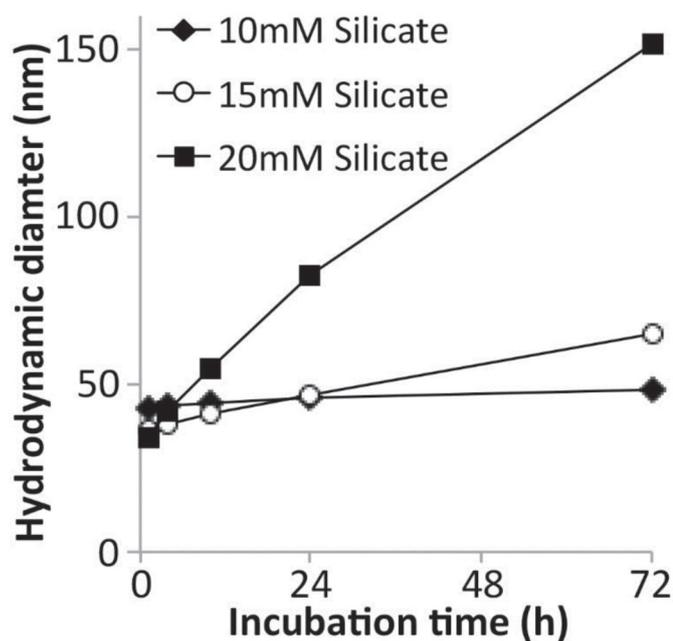


図 2 シリカナノ粒子のサイズ(動的光散乱法)

nm の球状の粒子が確認された(図3)。TEM において PEG は観察されないことを考慮すると、動的光散乱法で得られたサイズ 48 nm との差である 14 nm が PEG 由来のシェルの厚みであり、それは分子量 12,000 Da の PEG の流体力学的半径とよく一致する。このことは、PEGsiRNA において siRNA 部分が選択的にコア形成に関与し、その周囲を PEG が被覆した構造であることを示している。

希釈条件下でのシリカナノ粒子の安定性を調べるために、PEG-Cy3-siRNA を用いて蛍光相関分光法によりサイズを分析した(図4)。200 nM の siRNA 濃度でのシリカナノ粒子の流体力学的直径は 45.7 nm であり、それは 10 nM siRNA まで維持された。

注目すべきことに、得られた値は動的光散乱法での分析値(約 48 nm、3 μ M の PEG-siRNA)とよく一致しており、これはシリカナノ粒子が 300 倍希釈後でさえその構造を維持できることを示唆する。これとは対照的に、リン酸カルシウムナノ粒子溶液のサイズは、3 μ M の PEG-siRNA 濃度での 80.1 nm (動的光散乱法分析)から 7.9 nm まで減少した(100 nM の PEG-Cy3-siRNA、蛍光相関分光法解析)。この結果は、リン酸カルシウムナノ粒子が希釈に応じて乖離しやすいことを示している。

次に、シリカナノ粒子が後期エンドソーム/リソソーム内 pH 等の酸性条件に反応して PEG-siRNA を放出するかどうかを検証した(図5)。siRNA 由来の遺伝子発現抑制を誘導するために、siRNA 送達キャリアは細胞に入った後に siRNA を放出しなければならない。これに関して、カルシウムのリン酸またはケイ酸との結合は、酸性条件下においてカルシウムイオンの溶出に伴って乖離すると予想される。蛍光相関分光

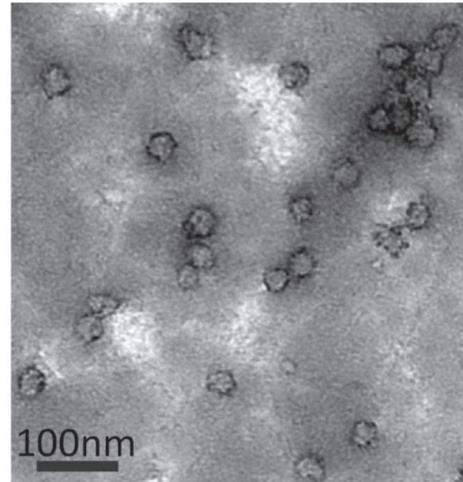


図3 シリカナノ粒子のサイズ(TEM)

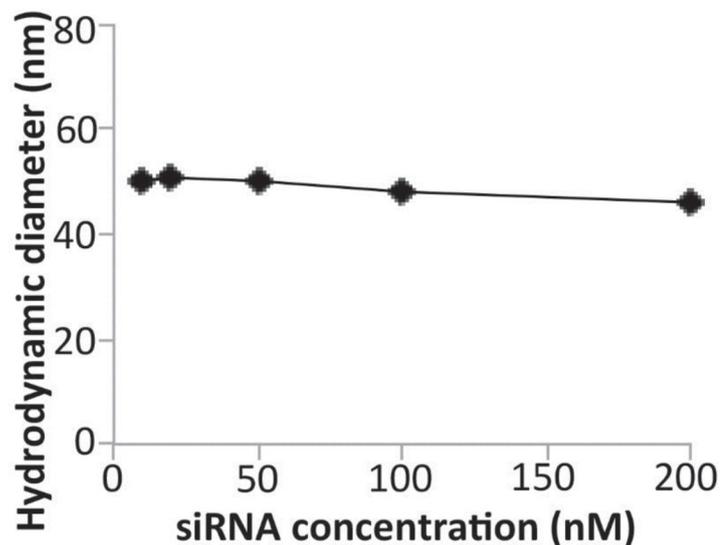


図4 シリカナノ粒子の希釈耐性

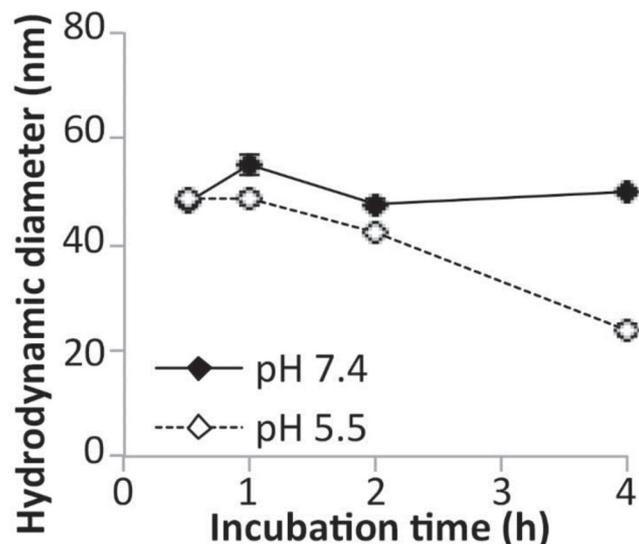


図5 シリカナノ粒子の pH 応答性

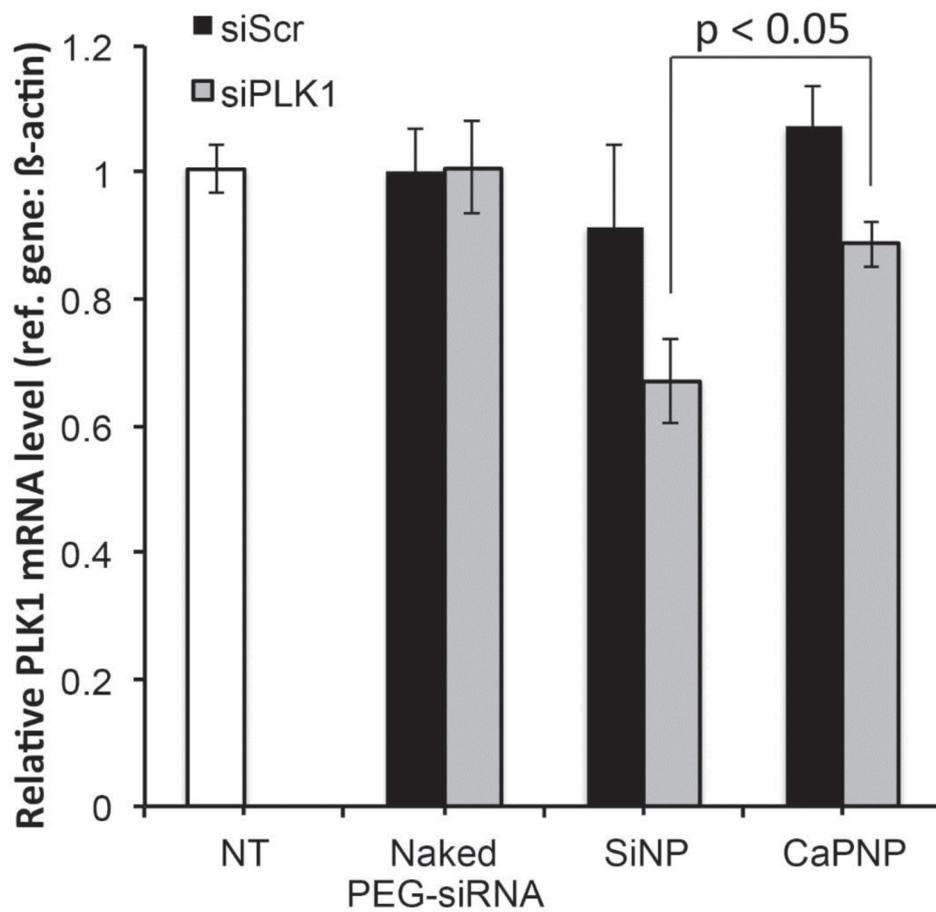


図6 遺伝子発現抑制試験の結果。SiNP: シリカナノ粒子、CaPNP: リン酸カルシウムナノ粒子。

法解析において、pH 7.4でのインキュベーションは、シリカナノ粒子のサイズ変化を誘導せず、そして得られた値(49.9nm)は動的光散乱法での結果(約48nm)と同等であった。これは、シリカナノ粒子が構造を維持し、そして生理学的pH 7.4でsiRNAを安定に内包することを主張する。一方で、pH 5.5(後期エンドソームに相当するpH)での4時間のインキュベーションは、明らかなサイズ減少(23.7nm)をもたらした。このサイズ減少は、PEG-siRNA放出及びシリカナノ粒子の崩壊を示唆している。これらの結果は、シリカナノ粒子が酸性環境で不安定化され、細胞内で遺伝子発現抑制を誘導しうることを示している。

標的遺伝子がPolo like kinase 1 (PLK1)であるsiRNAを用いて、培養ヒト肺がん細胞(A549)に対する遺伝子発現抑制試験を行った(図6)。PLK1は細胞周期を調節するためのタンパク質であり、したがって抗がん療法の治療標的である⁷⁾。配列特異的な遺伝子発現抑制を確認するために、スクランブル配列のsiRNA (siScr)、ならびにPLK1標的siRNA (siPLK1)を利用した。結果として、PEG-siPLK1を内包するシリカナノ粒子は48時間で約35%のmPLK1発現を抑制したが、既存のリン酸カルシウムナノ粒子は約10%抑制にとどまり、シリカナノ粒子の方が効果的な遺伝子発現抑制を有することを示した。これは、細胞外の希釈状態でのシリカナノ粒子はリン酸カルシウムナノ粒子よりも安定であるからだと思われる。

4. 結論

本研究では新規 siRNA 内包シリカナノ粒子の調製に成功した。開発されたシリカナノ粒子の調製は簡便であり、カチオン性物質由来の siRNA 内包ナノ粒子に代表されるような煩雑なプロセスは必要ない。さらに、シリカナノ粒子は従来のリン酸カルシウムナノ粒子と比較して、特に希釈条件下で siRNA をより安定して内包することが出来た。一方で、シリカナノ粒子は後期エンドソーム / リソソーム pH などの酸性条件で乖離するため、細胞内選択的な siRNA の放出及び遺伝子発現抑制の効率的な誘導を達成する。本研究で開発されたシリカナノ粒子は、siRNA だけでなく種々の他の核酸も内包可能なことから、核酸創薬のプラットフォーム技術として期待される。

5. 謝辞

本研究は、平成 28 年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝する。

6. 参考文献

- 1) Kole, R., Krainer, A. R., Altman, S., *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 125-140 (2012).
- 2) Takemoto, H., Nishiyama, N., *J. Control. Release*, 267, 90-99 (2017).
- 3) Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A., & Anderson, D. *Nat. Mater.*, 12, 967-977 (2013).
- 4) Nomoto, T., Fukushima, S., Kumagai, M., et al., *Biomater. Sci.*, 4, 826-838 (2016).
- 5) Takemoto, H., Miyata, K., Ishii, T., et al., *Bioconjugate Chem.*, 23, 1503-1506 (2012).
- 6) Maeda, Y., Pittela, F., Nomoto, T., et al., *Macromol. Rapid Commun.*, 35, 1211-1215 (2014).
- 7) Strebhardt, K., Ullrich, A., *Nat. Rev. Cancer*, 6, 321-320 (2006).