

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	pH応答性ポリベタイン修飾脂質ナノ粒子のマイクロ流体デバイスによる調製と分子量の最適化
Title(English)	
著者(和文)	本間啓太郎
Author(English)	Keitaro Homma
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12900号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:西山 伸宏,三浦 裕,小島 英理,小倉 俊一郎,藤枝 俊宣,柳田 保子
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12900号, Conferred date:2024/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

pH 応答性ポリベタイン修飾脂質ナノ粒子の
マイクロ流体デバイスによる調製と分子量の最適化

本間 啓太郎

謝辞

本研究は、国立研究開発法人化学技術振興機構(JST)が運営するセンター・オブ・イノベーション(COI)プログラム、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)が運営する先端的生物創薬等基盤技術開発事業(Science and Technology Platform Program for Advanced Biological Medicine)および日本学術振興会が運営する科学研究費助成事業(科研費)の資金的援助を受けて実施いたしました。

最初に、西山 伸宏教授と三浦 裕准教授に深く感謝を申し上げます。西山教授、三浦准教授には、本研究に携わる機会を与えて頂くとともに、その推進において数多くの有益なご助言を頂きました。また、私の社会人としての立場を尊重頂き、研究のみならず多方面にわたり真摯にご指導を頂いたことに関して心より感謝を申し上げます。

また、研究の推進にあたり、ディスカッションを通じて数々のご助言を頂きました西山・三浦研究室の全てのスタッフ、並びに学生の皆様に深く感謝を申し上げます。特に、武元 宏康准教授、野本 貴大准教授、本田 雄士助教に置かれましては、基礎的な手技を含む実験の指導から、その結果の学術的な解釈にわたるご指導を頂き、研究者としての在り方をご教授頂いた点に深く感謝を申し上げます。

また、学位取得へのご理解を頂いた、生化学工業株式会社の関係者の皆様に深く感謝を申し上げます。

最後に、博士課程での研究生活を応援して頂いた、両親と妻に深く感謝を申し上げます。

目次

第1章 序論	5
1.1 緒言	6
1.2 LNPに関する研究背景	6
1.2.1 RNAiおよびRNAi療法	6
1.2.2 LNPの概要	9
1.2.3 アミノ脂質	11
1.2.4 PEG修飾技術	12
1.2.5 LNPの調製法および構造	14
1.3 ポリペタインに関する研究背景	16
1.3.1 ポリペタインの物性と応用	16
1.3.2 ポリペタインを用いた遺伝子治療への応用研究	19
1.3.3 pH応答性高分子PGlu(DET-Car)に関する研究背景	20
1.4 本論文の概要	22
1.4.1 本研究の重要性	22
1.4.2 本論文の構成	23
第2章 異なる分子量を有するpH応答性ポリペタイン修飾LNPの調製	24
2.1 緒言	25
2.2 pH応答性ポリペタイン結合脂質の合成	27
2.2.1 PBLGの合成	27
2.2.2 DET-Car-tBuの合成	27
2.2.3 PGlu(DET-Car)の合成	28
2.2.4 DSPE-PGlu(DET-Car)の合成	29
2.3 ポリペタイン修飾LNPの調製と物性評価	30
2.3.1 方法	30
2.3.2 結果および考察	31
2.4 結論および考察	34
第3章 異なる分子量を有するpH応答性ポリペタイン修飾LNPの機能評価	35
3.1 緒言	36
3.2 方法	37
3.2.1 共焦点顕微鏡を用いた細胞取り込みの観察および定量評価	37
3.2.2 エンドソーム脱出能の測定	38
3.2.3 膜融合能の測定	38
3.2.4 遺伝子抑制能の測定	39

3.3 結果	40
3.3.1 共焦点顕微鏡を用いた細胞取り込みの観察および定量評価	40
3.3.2 エンドソーム脱出能の測定	42
3.3.3 膜融合能の測定	43
3.3.4 細胞生存率の測定	44
3.2.5 遺伝子抑制能の測定	45
3.3 考察	46
3.4 結論	47
第4章 総括	49
業績	53
使用試薬リスト	54
参考文献リスト	56

第 1 章 序論

1.1 緒言

siRNA を用いた RNAi 療法は標的分子を細胞内 mRNA としており、既存のモダリティでは対応できない疾患が克服できる可能性を持つ点で革新的である[1]。siRNA 自身は免疫原性を有するため、核酸塩基の化学修飾による免疫原性の低減が必要となる。また、siRNA を標的細胞の内部まで送達させる技術が必要であり、脂質ナノ粒子(LNP)は送達技術の一つのとして用いられ、現在では mRNA 製剤にも応用されている[2,3]。LNP は粒子安定化のため、粒子表面がポリエチレングリコール(PEG)によって被覆されており、血清タンパクや補体の付着により引き起こされる免疫系からの捕捉を防ぐ効果を有しているが、一方で薬効を下げてしまうジレンマを有している[4,5]。また、近年ポリエチレングリコール修飾されたタンパク質が複数回投与において迅速にクリアランスされてしまう ABC 現象[6,7]が報告されている。

他方、ポリベタインは PEG と同様に電荷的中性の分子であり、分子内の正電荷と負電荷の総量が同一な高分子である。PEG と比較して抗体産生量が極めて少なく、より高い防汚性を有しているため、PEG の代替材料として注目されている[8]。

本論文では PEG のジレンマを解決した siRNA 内包 LNP について、新たな設計指針を提供することを目的とし、ポリベタインで被覆された LNP の有用性について述べる。1.2 項では LNP に関する研究背景および PEG 修飾技術の現状について述べる、1.3 項ではポリベタインに関する研究背景および遺伝子治療への応用事例について述べる。1.4 項では pH 応答性ポリベタイン PGlu(DET-Car)の有用性と遺伝子治療への応用の可能性について述べる。

1.2 LNP に関する研究背景

1.2.1 RNAi および RNAi 療法

RNA 干渉(RNAi:RNA interference)は 1998 年に発見された現象であり、2006 年に A. Fire と C. Mello はその業績を称えられノーベル医学生理学賞を受賞している[9,10]。RNAi は 1 本鎖

の miRNA(micro RNA)や 2 本鎖の siRNA(small interfering RNA)といった引き起こされるものであり、20 塩基程度の大きさである[11,12]。miRNA は直接、siRNA は Dicer によって 1 本鎖になってから細胞内で Argonote と結合し RISC(RISC:RNA-induced silencing complex)を形成する。RISC は標的となる mRNA の鋳型として機能し、mRNA を分解することで遺伝子発現を抑制する[13]。Figure 1-1 に臨床試験段階(2020 年当時)にある siRNA 医薬品を示す。適用部位が多い順に、肝臓 22 例、がん 7 例、皮膚 5 例、目 4 例、血管 3 例、腎臓 1 例となっており、肝臓ターゲティングを狙ったものが半分以上を占めており、2024 年現在で上市された製品である Onpatro や Givlaari 等も肝疾患の治療を目的としたものである。

上市された製品の内、Onpatro には脂質ナノ粒子テクノロジーが用いられている。siRNA を大きさ 100~200 nm の脂質ナノ粒子中に内包し、その表面を PEG で修飾したものを静脈注射すると、使用された PEG 脂質はアルキル鎖が短く血中で乖離しやすい機構になっている。すると、血中で LNP 表面に ApoE タンパク質が吸着し、肝細胞表面の ApoE 結合受容体(LDLR)等を介して LNP はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。その後、LNP はエンドソーム内で膜融合し、内容した siRNA を細胞質中に放出し、siRNA は RISC と結合し標的の mRNA を分解するようになる(Figure 1-2)。一方、Givlaari には GalNAc テクノロジーが用いられており、siRNA に四分岐 GalNAc が結合しており、肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質レセプター(ASGPR)を介して細胞内に取り込まれ、その後 siRNA が mRNA を分解する機構となっている[1]。その他、がん細胞を標的にしたモダリティは、ナノ粒子の形状のものが多く EPR 効果によるがん組織への集積を狙ったものが多い(siRNA-EphA2-DOPC や siG12D-LOGGER)。また、近年は中枢神経系をターゲットにした siRNA 医薬品も臨床試験段階にあり、siRNA にヘキサデシル基(C16)が結合したものになっている。C16 修飾は、膜透過性の向上、細胞内デリバリーの改善、安定性の向上、細胞内分布の改善、および RISC ローディングの促進などの役割を果たしている[14]。

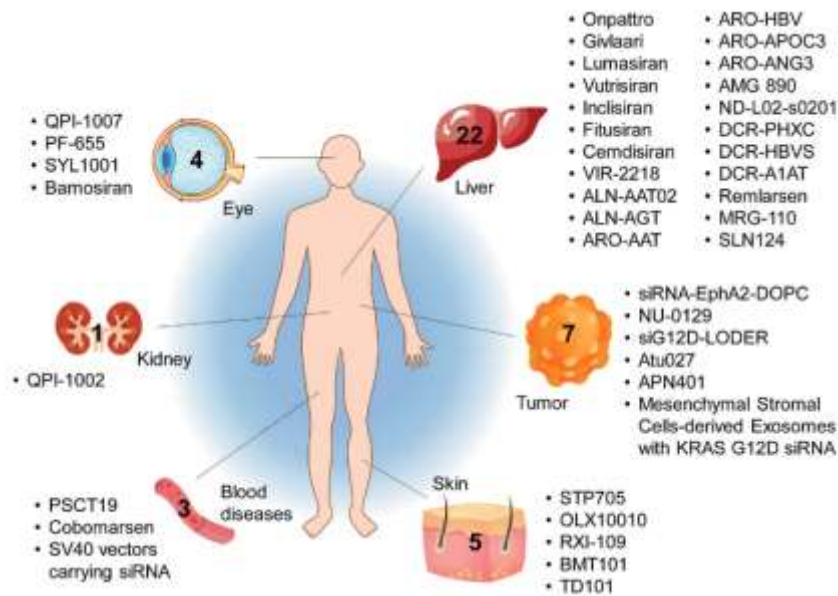


Figure 1-1 臨床試験段階にある siRNA 医薬品(論文[1]より引用)

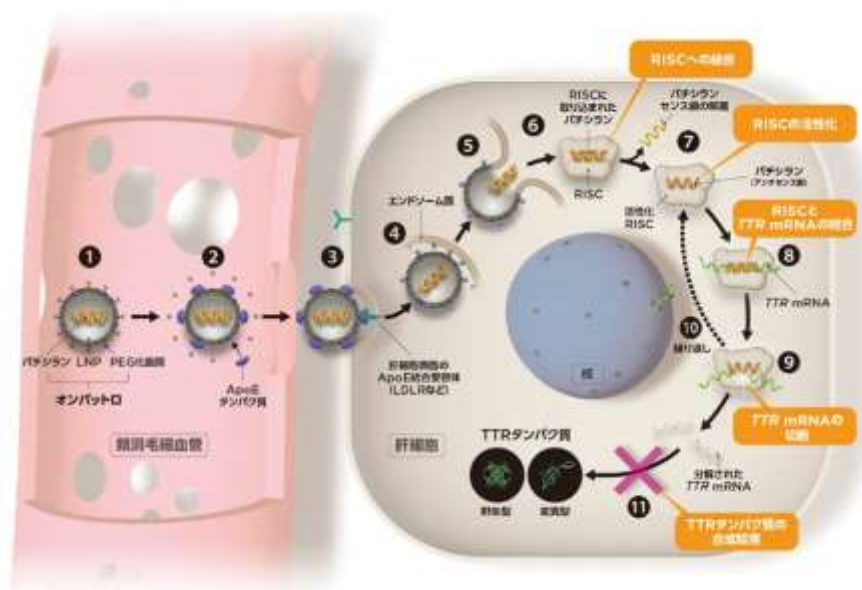


Figure 1-2 オンパットロの作用機序

(アルナイラム社 HP から引用: <https://onpatro.jp/product-profile/moa>)

siRNA が医薬品として用いられるためには、siRNA 自体を最適に設計する必要がある。現在使用されている siRNA は 19 から 29 ヌクレオチドの長さであり、短い siRNA は非特異的結合をしやすい一方で、19-25 ヌクレオチドの siRNA は遺伝子サイレンシングにおいて同様の効果を示

す。長い siRNA は炎症性の抗ウイルス免疫反応を引き起こす可能性があるため、短い siRNA の使用が推奨されるが、化学的修飾によりこれらの副作用を防ぐことができる。合成 RNA はエンドソームや細胞内の宿主パターン認識レセプター(例えば、Toll 様レセプター、レチノイン酸誘導性遺伝子 I レセプター、二本鎖 RNA 活性化プロテインキナーゼ)によってウイルス RNA と誤認され、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生を引き起こす。活性化されたプロテインキナーゼは mRNA の翻訳を阻害し、細胞死を招く。この免疫応答を防ぐためには、特定の配列パターンや高い U 含有量を避け、短い(24 ヌクレオチド未満)または化学修飾された siRNA を使用し、3'-オーバーハングを持つことで免疫感知を回避することが推奨される[11]。

また、siRNA を構成する塩基の化学修飾も良く用いられる。siRNA(小干渉 RNA)の 2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾と 2'-フルオロ(2'-F)修飾は、RNA の安定性や特異性を向上させるための重要な化学修飾である。2'-O-Me 修飾は、リボースの 2'位の水酸基にメチル基を付加するものである。この修飾により、RNA 分子はエキソヌクラーゼによる分解に対して耐性が増し、安定性が向上する。また、2'-O-Me 修飾は RNA 二次構造の形成を促進し、RNA 分子間の非特異的な相互作用を減少させる。一方、2'-F 修飾は、リボースの 2'位の水酸基をフルオロ基に置換するものである。フルオロ基は、強力な電気陰性基であり、RNA 分子の安定性を著しく向上させる。これにより、siRNA の特異的な遺伝子サイレンシング効果が向上し、オフターゲット効果(目的以外の遺伝子への影響)が減少し、ヌクラーゼによる分解に対する耐性が高まり、siRNA の半減期が延長される。これにより、細胞内での持続時間が長くなり、効果的な遺伝子サイレンシングが可能となる[15,16]。

1.2.2 LNP の概要

核酸と一概に言っても、pDNA や mRNA、オリゴヌクレオチドはタンパク質の発現、siRNA はタンパク質の発現抑制、アプタマーはタンパク質の機能阻害や活性化によって薬効を示す[17,18]。

いずれも細胞内で機能を示すものであり、核酸を細胞質内へ高効率に導入することが重要である。核酸は高分子電解質であるため、負電荷を示す細胞膜で覆われた細胞には取り込まれにくい上、血中では異物として認識されてしまい、クリアランスされる。そのため、高分子ミセルを始めとしたナノ粒子で被覆し、エンドサイトーシスによって取り込ませること、エンドソーム脱出によりトランスフェクション効率を上げ、有効性を向上させることに主眼が置かれてきた。

現在上市されている核酸試薬として成功しているもののうち、ナノ粒子製剤化技術を応用したものは LNP 製剤であり、代表例としてオンパットロとコミナティがあり、いずれも核酸、アミノ脂質、PEG 脂質、リン脂質、コレステロールで構成されている(Figure.1-1)[19]。アミノ脂質は pH 応答的にプロトン化する 3 級アミンを有している特徴があり、LNP の pKa を最適な値に調節し、エンドサイトーシス後の膜融合能を高めている。オンパットロは siRNA を内包した LNP 製剤であり、トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーを対象としている。コミナティは mRNA を内包した LNP 製剤であり、SARS-Cov2 による感染を予防するワクチンである[20,21]。

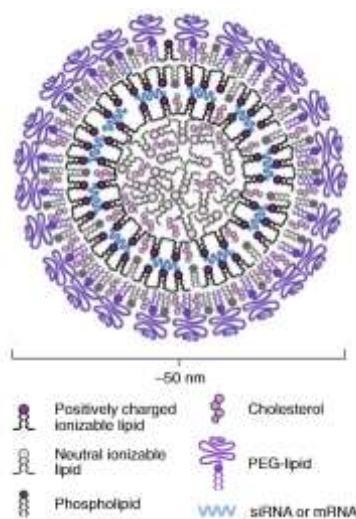


Figure.1-1 LNP および構成分子(論文[19])

LNP の内、リポソームは古くから生体適合性の高い DDS キャリアとして研究されており、特にがん治療においては EPR 効果による標的化と副作用低減を狙い、これまでにドキシソルビシン (Doxil®, Caelyx®, Lipodox®)、ビンクリスチン(Marqibo®)、イリノテカン(Onivyde®)、シスプラチン

ン(Lipoplatin™)を内包したリポソームが上市している[22,23]。また、現在は皮下注射、吸入、腫瘍内投与など様々な投与経路の抗ガン剤内包リポソーム製剤が臨床研究されている[24]。加えて、化学療法と免疫療法の組み合わせとなるように複数の薬剤を内包したリポソームも研究されており、例えばオキサリプラチン+NLG919[25]、ドキシソルビシン+IOX1[26]などの組み合わせがある。

他方、LNP は COVID-19 のワクチンであるコミナティに代表されるように、mRNA ワクチンとしての臨床研究が進み、RS ウイルスワクチンの様に既に上市されたものもある。モデルナ社では、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、ノロウイルス(3 価・5 価)、インフルエンザウイルスに対する mRNA ワクチンをパイプラインとして挙げている(<https://www.modernatx.com/ja-JP/press-release/2023/20231010>)。mRNA ワクチンは、対象とするウイルス抗原をコードする mRNA を内包した LNP を筋注投与することで、周囲の細胞に LNP が取り込まれ mRNA が翻訳されることで抗原が発現し、抗体産生を促すものである。その他、LNP を用いた遺伝子編集治療の研究も盛んであり、Cas9 mRNA あるいは Cas9 pDNA、Cas9 RNP 複合体と guide RNA の両方をデリバリー可能なキャリアとしての探索研究が行われている。例えば、2023 年にはイギリスで鎌状赤血球症を適用症とした遺伝子編集療法が承認されている[27]。

1.2.3 アミノ脂質

最も古い 3 級アミンを有するアミノ脂質は DODAP である。1994 年、P.Cullis 教授のグループによって DODAP は pH に応答して融合するリポソームの研究のために開発され、pH を 4.0 から 7.4 へ変化させた際にリポソームの外側と内側が不均一になり、膜融合を起こすことが知られている[28]。その後、2001 年には DODAP をオリゴヌクレオチドのデリバリーに応用しており、4 級アンモニウムを含むアミノ脂質と比較して、血中滞留性が向上したことを報告している。この論文

において製剤調製時は酸性緩衝液を用いる方法を確立しており、また内包率は総脂質中のうち、DODAP が 30%以上の際に 80%を超過することを報告している[29]。2012 年には、siRNA を API として内包し、DODAP を使用した最初の論文が報告されており、ポリアルギニンペプチドや EGFR 抗体によって表面修飾した LNP の細胞取り込みおよび遺伝子抑制能を評価している。ただし、キャリアの場合、R12 や抗 FGFR 抗体なしにはほとんど細胞取り込みが起こっておらず、改善されるためにはアミノ脂質の改善が必要であった。同時期に、アミノ脂質の最適化研究が行われている。2005 年には、三級アミンを有するアミノ脂質の内、疎水基の飽和度を検討した所、飽和度 2 のリノレン酸を側鎖に持つ脂質である DLinDMA において、最も遺伝子抑制能が高く、また pKa は側鎖にステアリン酸を持つ脂質である DSDMA よりも低いという結果が得られた。これは、エンドソーム脱出の際に必要なラメラ相から逆ヘキサゴナル相への相転移温度が低く、膜融合が起こりにくく、エンドソーム脱出能が低くなったためと考察されている[30]。2010 年には DLinDMA をベースに更なる脂質構造の検討が行われた結果、アミノ脂質の pKa と ED₅₀ の間にベル型の相関が見いだされており、最終的にスペーサーや疎水基の最適化が行われ、オンパットロに使用されている DLin-MC3-DMA に至っている。

1.2.4 PEG 修飾技術

LNP は核酸およびアミノ脂質の他、PEG 脂質が安定性向上のために用いられる。PEG 脂質の発明の源流はリポソームの血中滞留性向上の研究に見ることが出来る。1980 年代にはリン脂質およびコレステロールから構成されたリポソームが血中では単核貪食細胞系(MPS、Mononuclear phagocyte system)によって除去されることが発見されており、血中滞留性を向上させることが課題となっていた[31,32]。リポソームは、イムノグロブリンや C 反応性タンパク質等の血清タンパク質と結合することで、MPS はリポソームを認識し、捕捉するようになる[33,34]。血中滞留性を向上させる初期の取り組みは、糖やポリマー修飾によって赤血球を模倣するものであ

る。糖修飾は、モノシアログングリオシド GM1 などのガングリオシドやシアル酸の誘導体でリポソーム表面を修飾するものであり、例えば GM1 誘導体脂質を 10mol%含有させることにより、MPS による取り込みを 90%低減させることに成功している[35]。糖修飾リポソームはコスト面に課題があるが、ステルス性の付与としての利用よりも、糖鎖受容体へのターゲティングとしての研究がその後進展している[36–38]。一方、ポリマー修飾の中で最終的に最も用いられるようになったのが PEG 修飾であった。PEG 修飾技術により高い生体適合性かつ低い免疫原性を付与できるため、幅広い用途で生命科学研究に用いられている[39]。また、GM1 修飾と比較して用途に応じて分子量が制御可能であり、容易かつ安価で脂質と結合させられることも特徴であった。リポソーム以外にも PEG 化技術はタンパク質の血中滞留性向上に用いられており、G-CSF やIL-2 などを PEG 化した製剤が既に上市している[40]。リポソームや LNP では、PEG-DSPE や PEG-DMG などの脂質誘導体が用いられ、脂質の構造が安定性に影響することが知られており、ジアルキル鎖が C14、C16、C18 の PEG 脂質で修飾された LNP の体内動態を調べた場合において、C14 では急速に肝細胞でトラップされているという報告や、カルバメート結合が保存安定性を高めるといった報告がある[41,42]。

PEG 脂質は LNP の安定性を向上させる一方で、*in vitro* や *in vivo* での薬効を下げてしまう性質(Figure.1-2)があり、PEG のジレンマと呼ばれている[4]。PEG 脂質の含有量を増加させる程、LNP の血中滞留性は向上するが、遺伝子発現が低下している。また、PEG 化アスパラギナーゼや PEG 化ウリカーゼなど、PEG 化されたタンパク質については複数回投与において迅速にクリアランスされてしまう現象が知られており、1 回目投与後に産生される抗 PEG 抗体による反応のためとされている[6]。

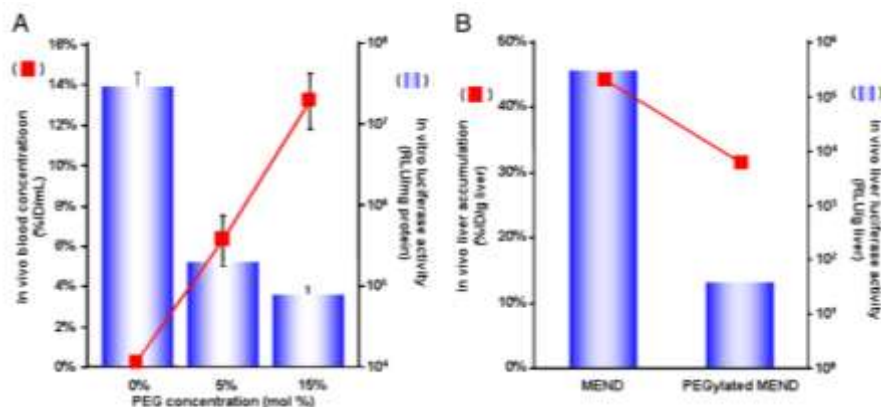


Figure 1-2. *In vitro* および *In vivo*における PEG のジレンマ(論文[4]より引用)

1.2.5 LNP の調製法および構造

LNP の調製法には、薄膜水和法、エタノール注入法、T チューブ法、マイクロ流体デバイス法等があるが、いずれの方法にも長所、短所がある[2]。まず、薄膜水和法は最も古くからリポソームの調製に用いられてきた方法であり、バンガム法とも呼ばれる[43,44]。エバポレーターなどで容器表面に脂質薄膜を形成し、水溶液を加えて攪拌させる方法であるため、特に特別な装置が不要である。しかし、形成される粒子は多層ラメラ構造かつ粒子径のばらつきも大きいいため、粒子径制御には超音波照射やエクストリュージョンが必要となる。そのため、大スケールでの調製には不向きである。エタノール注入法は、緩衝液を攪拌させつつ脂質エタノール溶液を注入する方法であり、この方法も特別な装置は不要である[45,46]。しかし、内包率が低く、高い内包率を得るためには初期濃度を高くする必要があり、また調製に時間を有する。T チューブ法は脂質溶液と緩衝液を T 字管の左右から流し、混合する方法である[47]。再現性良く、また内包率も高くなる点が利点であり、大スケール向きであるが、ラボスケールには不向きであること、比較的高い流量が必要であることが難点である。マイクロ流体デバイス法は高い再現性と粒子径の制御性、スケールラビリティを有しており、現在商用生産で多く用いられている方法の一つである(Figure.1-3)[2]。

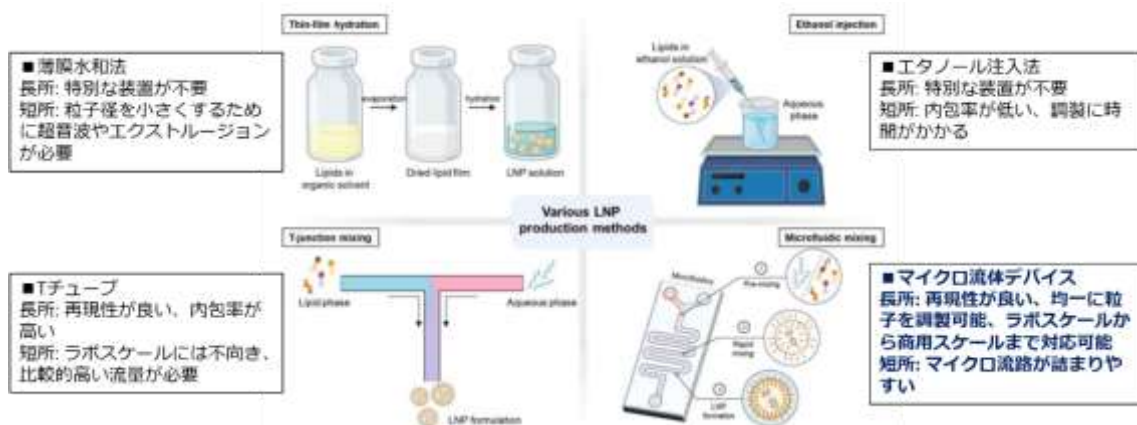


Figure.1-3 各種 LNP 製法の比較(論文[2]より引用、追記)

マイクロ流体デバイスを使用して LNP を調製する場合、核酸が溶解した低 pH 緩衝液と、混合脂質が溶解したエタノール溶液を混合する。pH4 では、siRNA とイオン化可能な脂質との間に形成された複合体が、密接に接近した単分子膜の間に siRNA が挟まれた密な二重層構造を形成する。その後、pH 7.4 の緩衝液を用いて透析を行い、エタノールを pH 7.4 ではアモルファス電子密度の高いコアを持つより大きな LNP 構造を形成する。アモルファス油相の主成分はカチオン性脂質であり、カチオン性脂質の含有量が増加するにつれてコア構造を採用する LNP の割合が増加するようになる(Figure.1-4)[48]。

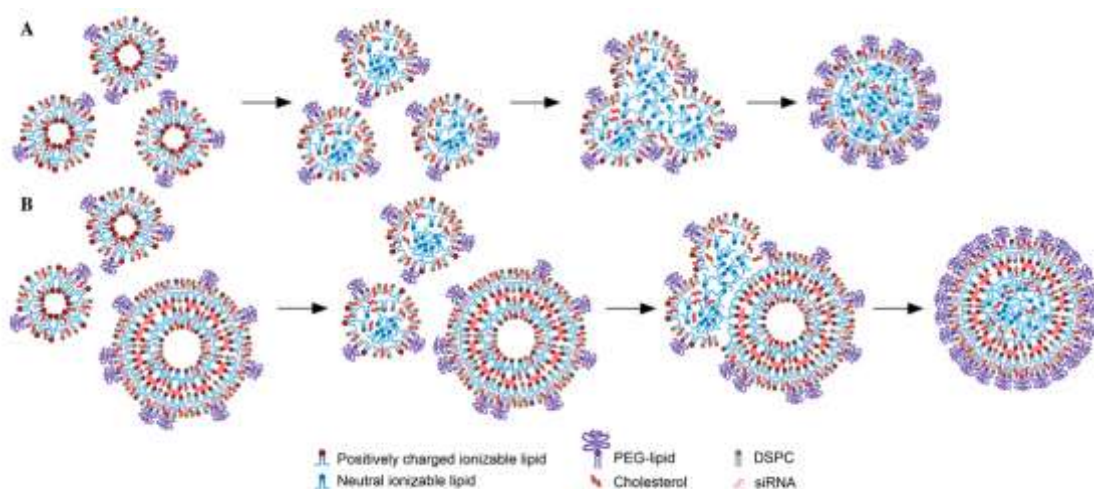


Figure.1-4 LNP の生成過程(論文[48]より引用)

図中の A は siRNA なしの場合、B は siRNA ありの場合を描いており、右へ行くほどエタノール濃度が低下し、pH は中性に近づく。

1.3 ポリベタインに関する研究背景

1.3.1 ポリベタインの物性と応用

分子内の正電荷と負電荷の総量が釣り合った物質をベタインと呼び、アニオンによってカルボキシベタインやスルホベタインなど呼び分けていることが多い[49]。また、ベタイン構造を持つ分子が重合したものをポリベタインと呼び、防汚性や生体適合性などの特性を有している(Figure.1-5)[8,49]。ポリカルボキシベタインの利用は、双性イオンのヘッドグループを持つリン脂質、特にホスファチジルコリンが豊富な哺乳類の細胞膜を模倣する応用研究から始まっている。1980 年頃、PC ヘッドグループが非血栓性であることが示された後、安定化された膜を作成するため、双性イオン性ホスファチジルコリン類似体を重合する研究が多く実施された[50,51]。

生体適合性はしばしば防汚性と混同されることがあるが、この 2 つの概念は異なるものである。生体適合性は、生体内での応用を意味しており、単純な非付着性よりも厳しい要件がある。血小板をしない、オプソニン化を受けない等、生物学的な機能性が要求される[52,53]。逆に言えば、生体適合性はあるが、防汚性がない材料もある。例えば、ポリウレタン、ポリエチレン、シロキサンポリマー、チタンなど、タンパク質が急速に吸着する多くの材料は、生体適合性があると分類されている[54–57]。

細胞膜を構成するリン脂質の一つであるホスファチジルコリンの頭部を模倣した MPC ポリマーは一例防汚性を有するポリマーの代表例であり、生体適合性の高さから人工血管や人工股関節、人工心臓に利用されている[58]。MPC ポリマーは比較的高価である点が課題であり、アニオン性官能基としてそれぞれカルボキシル基とスルホ基を有するカルボキシベタインやスルホベタインの応用研究も盛んである。ベタインの応用は、ベタイン単層の形成によるものか、ポリベタイン修飾によるものかに二分することが出来る。ベタイン単層修飾は、フィルムや金属界面、ナノ粒子を自己組織化単分子膜(SAM)により被覆して防汚性を持たせる方法が知られており、例えば、キャッピング剤としてイミダゾリウムスルホン酸末端チオールを用い、純水には溶解しないが、高塩濃度

の水溶液に安定して分散する金ナノ粒子を作製した事例がある[59]。ポリベタイン修飾による応用として、輸血用プラスチックバッグの内側に使用することで血小板の保存期間を延長させた事例[60]や、PEG-ウリカーゼでは発生する ABC 現象がポリカルボキシベタイン-ウリカーゼでは抑制された事例[61]等がある。

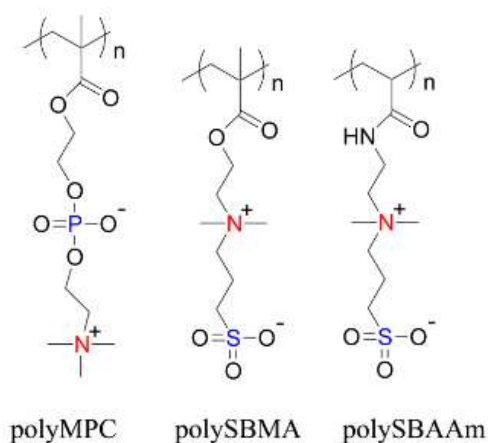


Figure.1-5 ポリベタインの一例(論文[49]より引用)

カルボキシベタインの場合、低 pH 領域ではカルボキシル基はプロトン化された状態となるため、ベタインではなくなる。そのため、使用可能な pH に制限がある。これに対して、スルホベタインやホスホベタインの場合、スルホン酸基およびリン酸基は、pH のほとんどの作動範囲にわたって完全に帯電したままであるため、使用可能な pH の範囲がより広い。ポリベタインは双性イオン同士の間で相互作用を起こすことが知られている。例えば、分子間イオンペアリングは、二重層細胞膜の外側のリーフレットを構成する高密度のリン脂質ヘッドグループの間で発生する[62]。イオンペアリングの強度が強い場合、カルボキシベタインであってもプロトン化がおこりにくくなるため、使用可能な pH の範囲が広がる。

ポリベタインは、表面に水を保持することによって防汚性を示している。例えば、分子動力学シミュレーションを用いた研究では、 $-N^+(CH_2)_2SO_3^-$ スルホベタインのスルホン酸基の周りに約 7 分子、第四級アンモニウム周りに約 19 分子の水が存在しているという[63]。スルホベタインの場

合には、水分子の水素結合の様式は水中と似ているが、第四級アンモニウムの場合には”乱された(perturbed)”状態になっている(Figure.1-6)。数オングストロームの相関の長さにわたって、対向する電荷の極性が固定されていること、つまり近接していることが、水分子の正しい配向に役立つ、防汚性を示すことに繋がるため、PEG よりもポリベタインの方が防汚性に優れているとする論文もある。PEG の場合には、ポリベタインと比較して水素結合や疎水性相互作用のような非イオン共役性相互作用が働き、防汚性を低下させる様である[49]。

新規のベタインとして、トリメチルアミン N-オキシド(TMAO)が注目されている。TMAO は両親媒性の分子であり、NO 結合の存在により強い双極子モーメントを持つ。そのため、TMAO は強い水素結合を介して 2~3 個の水分子と安定した複合体を形成する。このベタインは、単体でもタンパク質を尿素から保護する働きがあることで注目されている[64]。TMAO を高分子化したポリベタインは、優れた防汚性を有する。TMAO モノマーはジメチルアミンの過酸化水素による酸化によって簡単に得ることが出来るため、MPC ポリマーと比較して安価と考えられる。そして、PEG 修飾タンパク質と比較して ABC 現象を低減させることに成功している[65]。そして、TMAO ポリベタインは、ポリスルホベタインよりも海水の様な高塩濃度の溶液に対する耐性を有しているという。TMAO ポリベタインの場合、ポリスルホベタインよりもカチオン性官能基とアニオン性官能基の距離が近く、強い双極子モーメントを有している。そのため、水分子とより強く水素結合しているため、塩による水和の影響を受けにくいとされており、実際には和周波発生振動分光(SFG, sum frequency generation)とシミュレーションにより、TMAO ポリマーブラシとスルホベタインポリマーブラシの高塩濃度溶液中での動態が調査されている[66]。

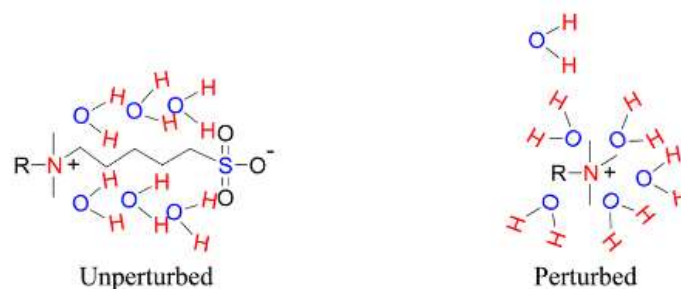


Figure.1-6 スルホベタインと第四級アンモニウムイオンの比較(論文[49]より引用)

1.3.2 ポリベタインを用いた遺伝子治療への応用研究

ポリベタイン修飾 siRNA 内包 LNPs の研究事例が報告されており、DSPE を末端に導入したポリカルボキシベタインを用いている。ポリカルボキシベタインの末端のカルボキシル基に pH 応答性があるため、エンドサイトーシス後にプロトン付与されることでポリマー全体としてはカチオン性となり、エンドソーム脱出が促進されたとのことであった[67]。別の事例では、siRNA を内包した高分子ミセルを比較した際に、シェルが PMPC の場合は PEG と比較して塩やヘパリンの存在下でも安定であり、より高い血中滞留性を有するため、腫瘍細胞への取り込みや遺伝子抑制能が大幅に向上したという報告がある[68]。ポリベタインと他の機能性高分子を組み合わせた例としては、脂溶性基、ポリベタインまたはポリスルホベタイン、ポリアミンを有するトリブロックコポリマーを合成し、siRNA の送達による遺伝子抑制効率を評価した事例がある[69]。また、分子集合による LNP 表面のポリベタイン化を狙った研究もあり、3 級アミンとリン酸基を有する 3 本足脂質を合成し、pH に応答してラメラ層から逆ヘキサゴナル相へ相転移して LNP を不安定化させる研究もあり、3 級アミンと脂溶性基のスクリーニングを行った後、mRNA の送達や遺伝子編集への応用を示している(Figure.1-7)[70]。

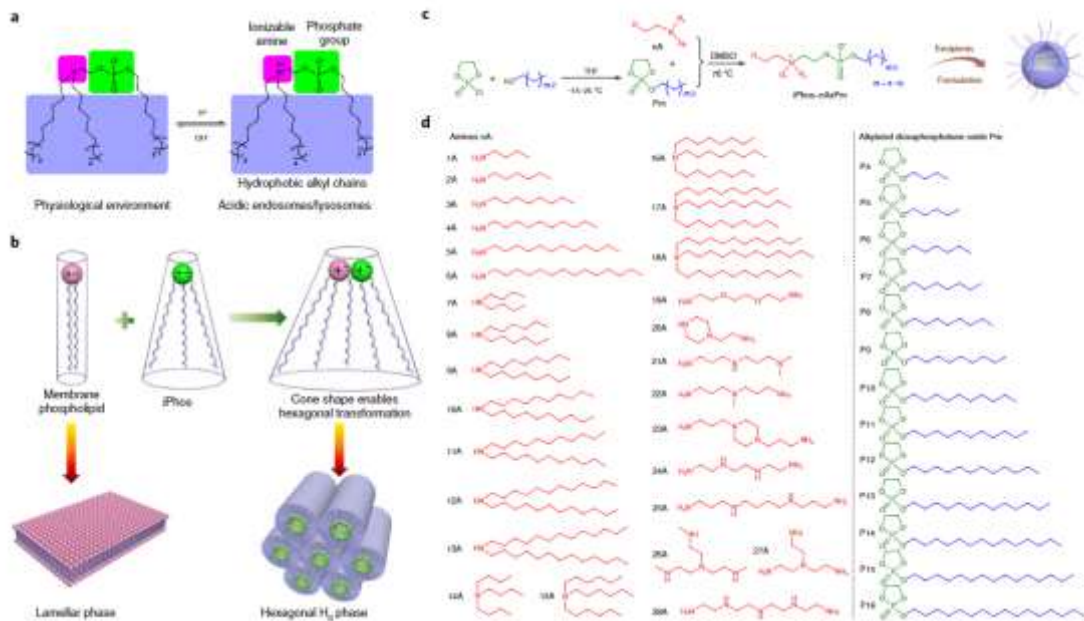


Figure.1-7 イオン化リン脂質を用いた脂質ナノ粒子のスクリーニング(論文[70]より引用)

1.3.3 pH 応答性高分子 PGLu(DET-Car)に関する研究背景

PEG-b-ポリ(β-ベンジル L-アスパラギン酸)(PBLA)の側鎖ベンジルエステル基は、様々なアミン化合物と定量的にアミノ分解反応を起こすため、カチオン性側鎖を有する N-置換ポリ(アスパラギン酸)誘導体ライブラリーの作成が可能である。このライブラリーから、側鎖にジアミノエタンが結合した誘導体である PAsp(DET)が見いだされ、高い遺伝子導入効率と低い細胞毒性を両立することが分かった。似た構造を持つ PAsp(DPT)が中性の pH 7.4 でも 88%以上がプロトン化された状態であるのに対して、pH 7.4 における PAsp(DET)のプロトン化は 60%以下であり、pH5.5 では 80%程度となる。そのため、pH 応答的にプロトン化することで、細胞取り込み後に低 pH を示す後期エンドソームからの脱出が効率化されると考えられている[71]。近年では、シクロヘキシル基を導入した PAsp(DET/CHE)が更に高い遺伝子導入率を示し、mRNA の送達に利用可能であることが見いだされている[72]。

PGLu(DET-Car)はポリグルタミン酸の側鎖にエチレンジアミン構造とカルボキシル基を導入した

高分子であり、血中などの中性 pH 条件下(pH 7.4)ではエチレンジアミン構造がゴーシュ構造となり 1 価の正電荷を示し、カルボキシル基が 1 価の負電荷を示すため、ポリマー全体としてはポリベタインとなり、中性電荷を示す。そのため、血中では高い防汚性と血中滞留性を示す。一方、腫瘍環境などの酸性 pH 条件下(pH 6.5)ではエチレンジアミン構造は 2 価の正電荷を有するようになるため、全体としてはカチオン性を示すポリマーとなり、腫瘍細胞に効率的に取り込まれる特性を有している(Figure.1-8)。最初の研究では、PGlu(DET-Car)のポリマー単体あるいは量子ドットを被覆した場合を対象として、物性評価、*in vitro* 機能評価、*in vivo* 機能評価が行われている[73]。まず、ポリマー単体の場合における pH に応答した防汚性を検証しており、その過程で pKa を算出している。pH に応答しないカチオン性ポリマーPGlu(DPT-Car)の場合には、どの pH でも防汚性は見られず、細胞取り込みは pH に関わらず発生する。また、pH に応答しないベタインポリマーPGlu(EDA-Car)の場合には、その逆であり、どの pH でも防汚性が見られ、細胞取り込みは pH に関わらず起こらない。これに対して、PGlu(DET-Car)は酸性 pH(pH 6.5)では細胞に取り込まれ、防汚性が見られないが、中性 pH(pH 7.4)では細胞に取り込まれなくなっている。その後、ポリマー被覆量子ドットを腫瘍担持マウスに対して静脈投与し、がん特異的に集積することを確認している。金ナノ粒子[74]、siRNA 内包脂質ナノ粒子[75]、高分子ミセル[76]と様々なキャリアに応用されており、いずれの場合も高い血中滞留性と組織集積性が確認されている。

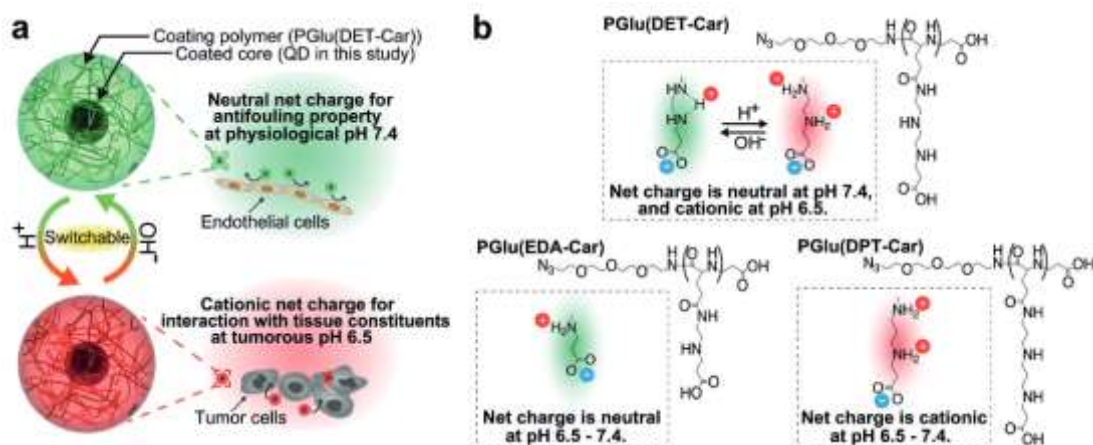


Figure. 1-8 PGlu(DET-Car)の性質と構造(論文[73]より引用)

1.4 本論文の概要

1.4.1 本研究の重要性

siRNA を用いた RNA 干渉療法は、がんなどの治療に於いてその有効性が大いに期待されている。しかし、siRNA は血中で極めて不安定であるため、それらの全身投与に至っては siRNA をポリエチレングリコール等で被覆した LNP へ内包する手法が検討されてきた。ポリエチレングリコールによる修飾は、血中タンパクや免疫細胞による捕捉を防ぐ機能がある一方で、LNP の細胞取り込みを抑制するため、薬効を低下させるジレンマがある。本研究では、腫瘍組織などの弱酸環境下に応答して正電荷を示し、積極的に細胞へ取り込まれる pH 応答性ポリベタイン PGlu(DET-Car)で修飾された LNP を用いることで上記課題の解決に取り組んだ。PGlu(DET-Car)修飾 LNPs については、論文[75]で検討されてはいるものの、*tert*-ブチルアルコールに溶解させた脂質を緩衝液中で攪拌させて粒子を形成させる方法を採用しており、改善する余地がある。また、これまで PGlu(DET-Car)修飾ナノキャリアーの検討ではそれぞれの論文において単一の分子量でしか評価を行っていない。PGlu(DET-Car)は PEG の様に中性高分子として防汚性を有する側面と、PEI の様にカチオン性高分子として細胞内への核酸導入を補助する側面の二つを有しているが、PEG や PEI どちらにおいても、分子量は機能制御に重要である[77,78]。上記の課題に対応するため、本研究ではマイクロ流体デバイスを用いた PGlu(DET-Car)修飾 LNPs の調製法の確立と、物性評価および *in vitro* での機能評価に基づく分子量の最適化に取り組むこととした。マイクロ流体デバイスによる調製法の確立で得られた知見は、PGlu(DET-Car)修飾 LNPs の実用化に向けたスケールアップを行う際の基礎となり得る。また、分子量に基づく最適化は PGlu(DET-Car)修飾ナノキャリアーの設計に新たな指針を提供し、当該研究分野の更なる発展に貢献しうる知見となり得る。

1.4.2 本論文の構成

本論文は全4章から構成される。そのうち、第1章は序章、第4章は総括である。

第2章では、脂質結合型ポリペタインの合成およびpH応答性ポリペタイン修飾LNPの調製および物性評価を行った。実験としては、PGlu(DET-Car)に対して、DBCO-DSPEをクリック反応により導入し、脂質結合型pH応答性ポリペタインDSPE-PGlu(DET-Car)を得た。LNPはマイクロ流体デバイスを用いて調製を行い、その後物性評価を行い、結果を考察した。

第3章では、pH応答性ポリペタイン修飾LNPの機能評価を行った。実験としては、共焦点顕微鏡を用いた細胞取り込みの定量および細胞取り込み経路の観測、エンドソーム脱出アッセイ、膜融合アッセイ、遺伝子抑制アッセイを行い、結果を考察した。

第 2 章 異なる分子量を有する pH 応答性ポリベタイン 修飾 LNP の調製

要旨

クリック反応によりアジド基を末端に有する PGLu(DET-Car)に対して DBCO-DSPE を導入し、脂質結合型である DSPE-PGLu(DET-Car)を得た。次いで、PGLu(DET-Car)修飾 LNPについてマイクロ流体デバイスによる調製法(Figure.2-1)を確立し、それぞれ重合度が 20、70、110(それぞれ分子量は約 7,000、21,000、32,000)の PGLu(DET-Car)を用いて、CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPsを調製した。その結果、CB-LNPs の粒子径は 110~130nm、内包率は 67~94%であった。また、どの CB-LNPs においても PEG-LNP よりも優れた pH 応答性が、電位に見られ、PGLu(DET-Car)修飾に由来する物性が確認された。

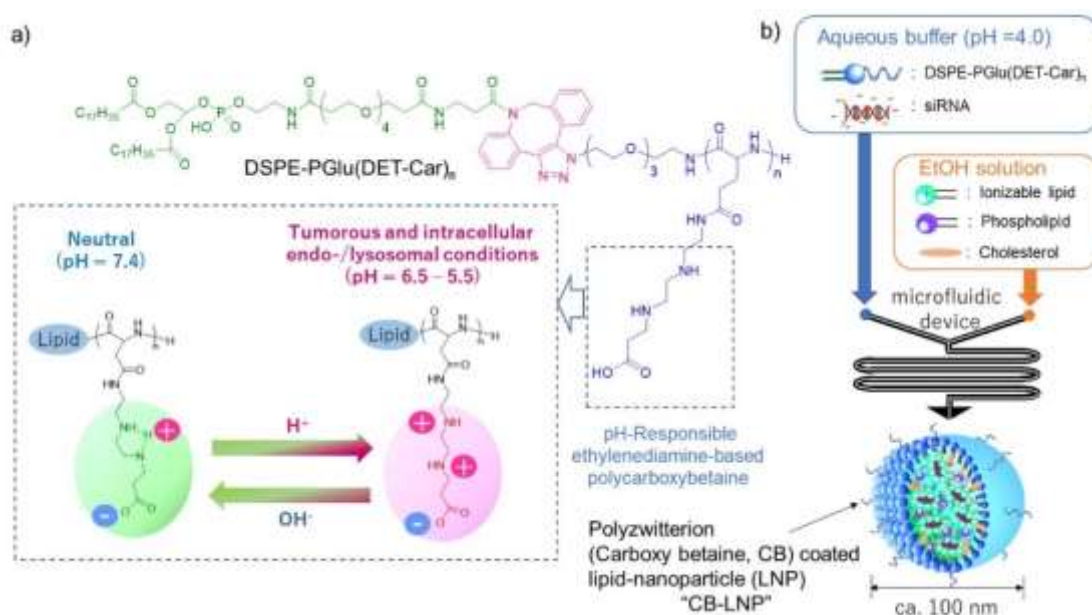


Figure.2-1 LNP 調製の概略図

2.1 緒言

PGLu(DET-Car)修飾ナノキャリアーの調製においては、これまでクリック反応が多く用いられてきた(Figure.2-2)。金ナノ粒子の場合には表面にチオール基を介して DBCO 基を固定した後、クリック反応により PGLu(DET-Car)を導入している。また、pDNA 内包高分子ミセルの場合には

DBCO を末端に有する bPEI を合成後、クリック反応により PGlu(DET-Car)を導入したのち、pDNA と混合することで高分子ミセルを調製している。本研究においても、DBCO とのクリック反応を用いることとした(Figure.2-3)。DSPE-PGlu(DET-Car)の合成は全 4 ステップであり、それぞれ「1. NCA 重合による PBLG の合成」、「2. マイケル付加官能によるベタイン側鎖(DET-Car-tBu)の合成」、「3. アミノリシス反応による PBLG へのベタインの導入」、「4. クリック反応による PGlu(DET-Car)への DSPE の導入」である。

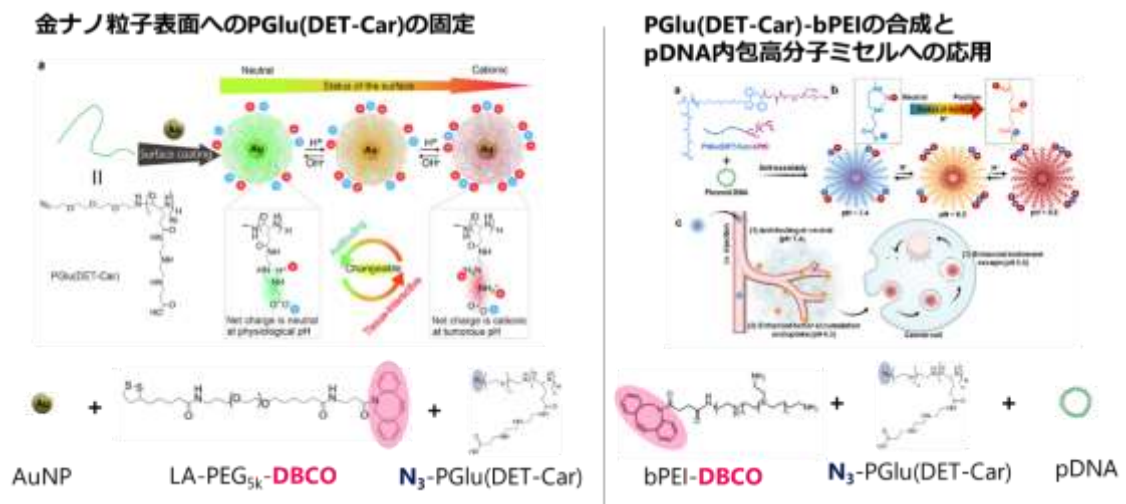


Figure.2-2 PGlu(DET-Car)修飾ナノキャリアーの調製法(論文[74,76]より引用、追記)

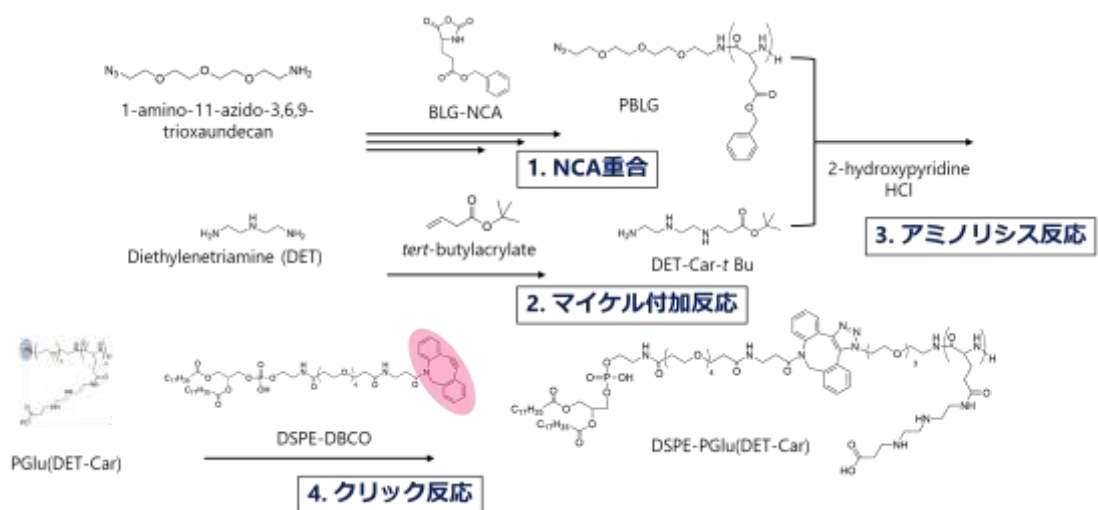


Figure.2-3 DSPE-PGlu(DET-Car)の合成フロー

2.2 pH 応答性ポリベタイン結合脂質の合成

2.2.1 PBLG の合成

ポリ(γ -ベンジル-L-グルタミン酸)(PBLG)は、11-アジド-3, 6, 9-トリオキサウンデカン-1-アミンを開始剤とする γ -ベンジル-L-グルタミン酸 N-カルボキシ無水物(BLG-NCA)の開環重合により合成した。BLG-NCA(1.0g、3.73mmol)を、アルゴン雰囲気下で DMF と DCM の混合溶媒(1/4、v/v)20mL に溶解した。次に、開始剤 11.6 mg (0.053 mmol)を加え、室温で 2 日間攪拌した。反応液を過剰量のジエチルエーテル(200 mL)に加え、析出物を真空乾燥し、白色粉末(0.63 g、0.047 mmol、80%収率)を得た。PBLG は ^1H NMR でピークの帰属処理を実施した(Figure.2-4)。 ^1H NMR (DMSO-*d*6): δ (ppm) = 8.08-8.62 (br, 42H、NH-(COCHNH)-H)、7.07-7.49 (br, 525H、-CH₂C₆H₅)、4.90-5.18 (br, 187H、-CH₂C₆H₅)、3.70-4.26 (br, 86H、-NH-(COHNH)-H)、3.39-3.60 (m, 16H、N₃CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)₃-NH-)、1.78-2.32 (br, 142H、-CHCH₂CH₂COO)。

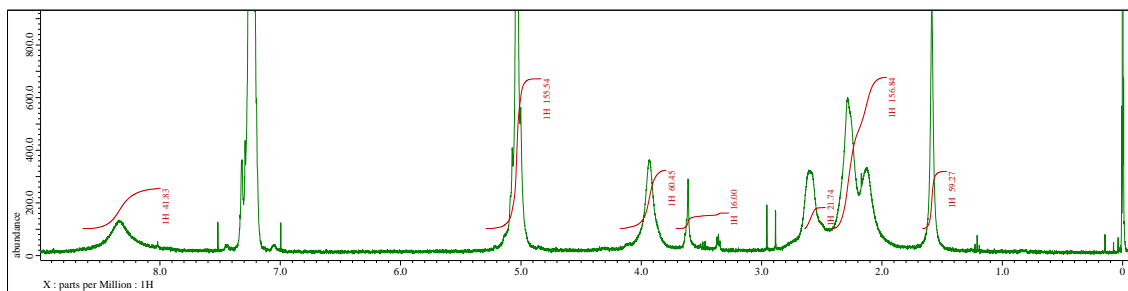


Figure.2-4 PBLG の ^1H NMR チャート

2.2.2 DET-Car-tBu の合成

DET-Car-tBu は、tert-ブチルアクリレートとジエチレントリアミンとのマイケル反応を用いて合成した。tert-ブチルアクリレート(23g、162mmol)を過剰のジエチレントリアミン(100g、971mmol)に加え、室温で 2 時間攪拌した。DCM 溶液を飽和塩化ナトリウム水溶液(300mL×2)で洗浄した。そ

の後、DCM をロータリーエバポレーターで除去した。残ったオイル状物質にメタノール(100 mL)と 1M 塩酸を加え、生成物をイオン化した。ジエチルエーテル(10 mL)を用いて-20°Cで再結晶し、白色結晶を得た。その後、白色結晶を真空下で乾燥して白色粉末を得た(19.5 g、84 mmol、収率 52%)。DET-Car-tBu は ^1H NMR でピークの帰属処理を実施した(**Figure.2-5**)。 ^1H -NMR (D_2O): δ (ppm) = 3.31-3.64 (m, 10H、 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2$)、2.77-2.85 (t, 2H、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$)、1.44-1.52 (s, 9H、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)。

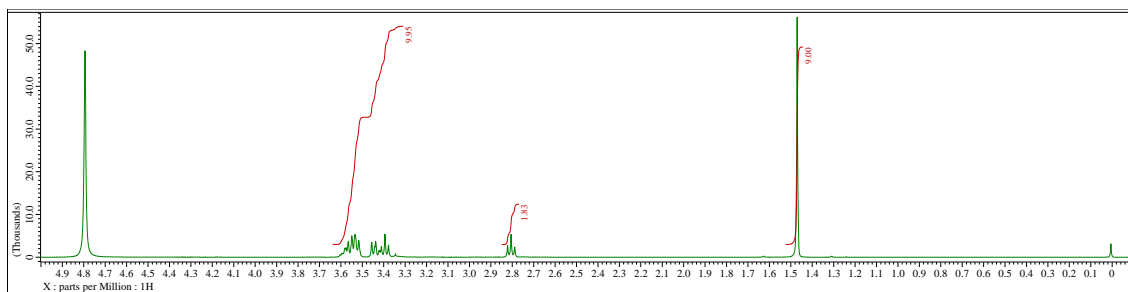


Figure.2-5 DET-Car-tBu の ^1H NMR チャート

2.2.3 PGlu(DET-Car)の合成

PGlu(DET-Car)は、PBLG と DET-Car-tBu のアミノリシス反応により合成した。反応前に、DET-Car-tBu を 1M 水酸化ナトリウム水溶液で中和した。PBLG(100mg、7.48 μmol 、ベンジル基 0.449mmol 相当)および 2-ヒドロキシピリジン(215mg、2.25mmol、PBLG 中のベンジル基に対して 5eq 相当)を THF 5mL に溶解し、続いて DET-Car-tBu を加えた(2.29g、6.74mmol、PBLG 中のベンジル基に対して 5eq 相当)。混合物を室温で 2 日間攪拌した後、HCl(反応するアミン基の 1 eq)に対して透析(分子量カットオフ:3.5k Da)を行い、さらに水に対して 2 回の透析を行った。次に、tBu 基を脱保護するために 1M 塩酸(5mL)を加え、40°Cで 2 日間攪拌した。脱イオン水(500 mL \times 3)に対して透析した後、最終溶液を凍結乾燥して白色粉末を得た(97.5 mg、5.61 μmol 、収率 75%)。PGlu(DET-Car)は ^1H NMR でピークの帰属処理を実施した(**Figure.2-6**)。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm}) = 4.26\text{-}4.49$ (br, 1H, $\text{NH}(\text{COCH}_2\text{NH})\text{-H}$)、 $3.67\text{-}3.75$ (m, $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)-NH}$)、 $3.27\text{-}3.66$ (m, 10H, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NHCH}_2$)、 $2.86\text{-}2.95$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)、 $2.32\text{-}2.56$ (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)、 $1.91\text{-}2.25$ (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)。

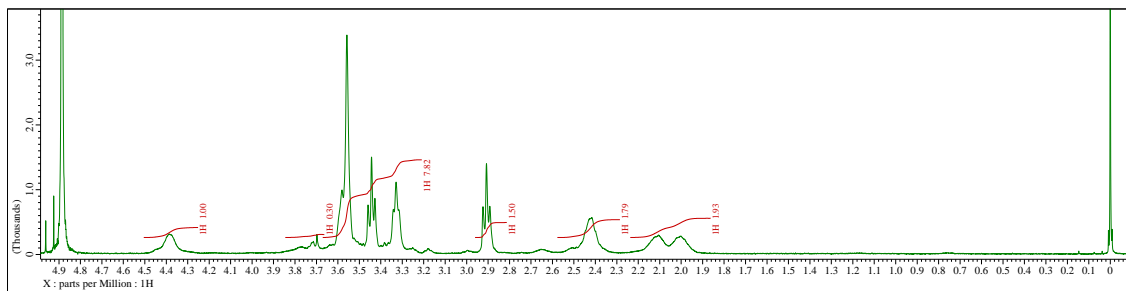


Figure.2-6 PGLu(DET-Car)の ^1H NMR チャート

2.2.4 DSPE-PGLu(DET-Car)の合成

PGLu(DET-Car)と DSPE-PEG4-DBCO のクリック反応により DSPE-PGLu(DET-Car)を合成した。PGLu(DET-Car)(30mg、 $1.73\mu\text{mol}$)を脱イオン水(1.5mL)に溶解し、DSPE-PEG4-DBCO(5mg、 $3.90\mu\text{mol}$ 、2.3eq)を DCM(1.5mL)に溶解し、溶液を混合した。混合物を室温で2日間攪拌した。反応液を過剰量のアセトニトリル(60 mL)に加え、室温で2日間攪拌した。回収した沈殿物を脱イオン水に溶解し、凍結乾燥して白色粉末を得た(25 mg、 $1.34\mu\text{mol}$ 、収率 75%)。DSPE-PGLu(DET-Car)は ^1H NMR でピークの帰属処理を実施した(Figure.2-7)。 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm}) = 4.16\text{-}4.49$ (br, 1H, $\text{NH}(\text{COCH}_2\text{NH})\text{-H}$)、 $3.68\text{-}3.86$ (m, $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)-NH}$)、 $3.00\text{-}3.66$ (m, 10H, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NHCH}_2$)、 $2.53\text{-}2.69$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)、 $2.26\text{-}2.49$ (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)、 $1.91\text{-}2.23$ (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$)、 $1.14\text{-}1.39$ (m, $\text{-CH}_2\text{-}$)、 $0.68\text{-}0.95$ (m, -CH_3)。

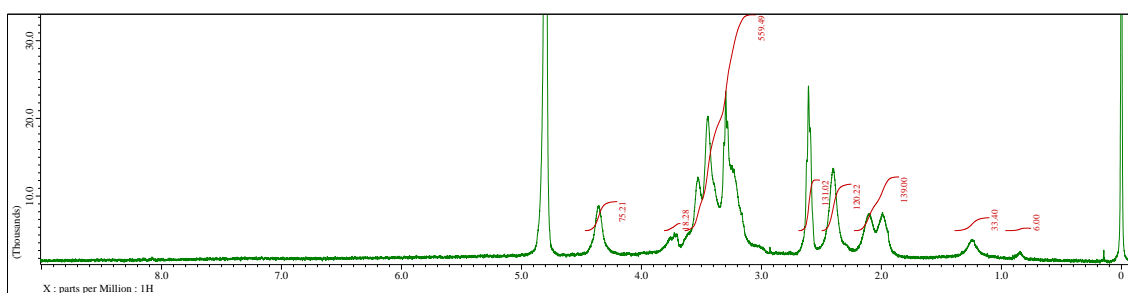


Figure.2-7 PGLu(DET-Car)の¹H NMR チャート

2.3 ポリベタイン修飾 LNP の調製と物性評価

2.3.1 方法

本研究では、pH 応答性ポリカルボキシベタイン修飾 LNP を調製するために、マイクロ流体デバイスで siRNA/DSPE-PGLu(DET-Car)溶液と脂質エタノール溶液を混合した。siRNA 水溶液と脂質エタノール溶液をマイクロ流体デバイス中で混合すると、約 200 μm の流路にヘリングボーンと呼ばれる溝が複数あり、繰り返し溝の中を通ることにより二液が均一に混合される[79]。一般的には二液の流量の和である総流量(Total Flow Rate)が大きいほど、PDI が小さくなる(Figure.2-8)。CB-DSPE/siRNA solution (5.3 μM siRNA、25 mM acetate buffer、pH 4.0) を、NanoAssembler Ignite™(Precision NanoSystems) を通して ethanol lipid solution(DODAP/DOPE/コレステロール = 50/10/40 モル比)と混合した。また、水溶液とエタノール溶液は 3/1 の比率で混合した。得られた LNP のサイズと ζ 電位は、Zetasizer Nano ZS Instrument(Malvern Instruments Ltd)で測定した。コントロールとしての PEG-LNP には、PEG-DSPE を含む脂質エタノール溶液を代用として用いた。siRNA 濃度は RiboGreen 蛍光アッセイで測定し、マイクロプレートリーダー(Spark、Tecan Group Ltd.)で測定した(Ex:487 nm/Em: 537 nm)。また、内包率(Encapsulation ratio)は以下の式で計算した。

$$\text{Encapsulation ratio} = \frac{C_{\text{Triton}} - C_0}{C_{\text{Triton}}}$$

C_{Triton} は Triton™ X-100 を含むサンプルの siRNA 濃度、 C_0 は Triton™ X-100 を含まないサンプルの siRNA 濃度を意味する。

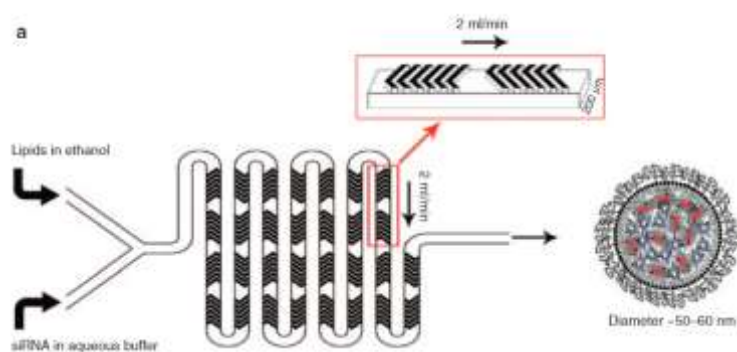


Figure.2-8 ヘリングボーン構造(論文[80]より引用)

2.3.2 結果および考察

LNPs 調製はマイクロ流体デバイスで実施した(Figure.2-9)。まず、初期検討として、脂質濃度や溶媒、組成比を検討した。まず、CB20-DSPE が通常 LNP が他の脂質と同様にエタノールに溶解するかを検討した(No.1~3)。その結果、エタノールには溶解せず、エタノール/水=1/1の溶液または水に溶解したため、CB20-DSPE はエタノール溶液ではなく緩衝液中に溶解させることとした。また、No.1~No.3 ではアミノ脂質として DOTAP を使用していたが、LNP の PEG 修飾で良く用いられる濃度である 1.5 mol%より高い 5 mol%の CB20-DSPE を使用しても pH 7.4 で中性電荷を示さず、10 mol%を添加することで中性電荷を示すようになった。アミン脂質を用いない組成 No.4 では pH 7.4 で負電荷を示したが、内包率が 20%に低下した。そのため、アミノ脂質として DODAP を使用し、まず CB20-DSPE を 10 mol%添加した場合に pH 7.4 で負電荷を示すことを確認した一方、内包率は 43%と低値を示した。最終的に、CB20-DSPE を 1 mol%添加した場合、pH 7.4 でも中性電荷を示し、かつ内包率が 74%と高くなることを見出し、No.6 に最適化された。

No.	Lipid composition	N/P	Solution A	Solution B
1	DOTAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE= 50/10/40/5	12	3.1 μM siRNA, pH 7.4	Lipid, EtOH
2	DOTAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE= 50/10/40/5	12	3.1 μM siRNA, pH 7.4	Lipid, EtOH/DW = 1/1
3	DOTAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE= 50/10/40/ 10	12	1.0 μM siRNA, CB20-DSPE , pH 7.4	Other lipids, EtOH
4	DOPE /Chol/CB20-lipid= 60 /40/10	12	1.0 μM siRNA, CB20-DSPE, pH 4.0	Other lipids, EtOH
5	DODAP /DOPE/Chol/CB20-DSPE= 50/10/40/10	12	1.0 μM siRNA, CB20-DSPE, pH 4.0	Other lipids, EtOH
6	DODAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE= 50/10/40/ 1	6	5.0 μM siRNA, CB20-DSPE, pH 4.0	Other lipids, EtOH

Result	No.	Size (nm)	ζ potential (mV) acidic*	ζ potential (mV) neutral**	Encapsulation rate (%)	その他の条件 Flow rate A/B = 3/1 Total Flow Rate = 0.5 mL/min Temperature: 25°C N/P NはDODAP由来、PはsiRNA由来 * No.1-5: pH4.0 No.6: pH 5.5 ** No.1-6: pH 7.4	
	1	CB20-DSPEがエタノールに溶解せず沈殿。					
	2	120±3	+39.3±1.7	+24.9±0.1	98		
	3	130±1	+34.5±2.1	+9.9±0.7	90		
	4	170±1	+25.6±1.2	-11.0±0.9	20		
	5	150±2	+35.5±0.2	-4.3±0.5	43		
	6	180±3	+32.9±1.7	-9.1±0.6	74		

Figure.2-9 LNP 調製法の初期検討

次に、総流量の値を 0.5 mL/min として N/P 比(N は DODAP 由来の N 原子、P は siRNA 由来の P 原子でモル比を表す)についても最適化を行い、N/P = 6 において CB20-LNPs で最も高い内包率が得られたため、以降の実験での採用条件とした(Figure.2-10)。更に、Total flow rate(TFR)について、最適化を行った。その結果、TFR が 3~5 mL/min の際に粒子径(Size)が 120nm で最も小さくなり、内包率(Encapsulation rate)は 90%以上であった。中でも、3 mL/min において多分散度(PDI)が最も低かったことから、以降の実験では TFR を 3 mL/min に固定した(Figure.2-11)。

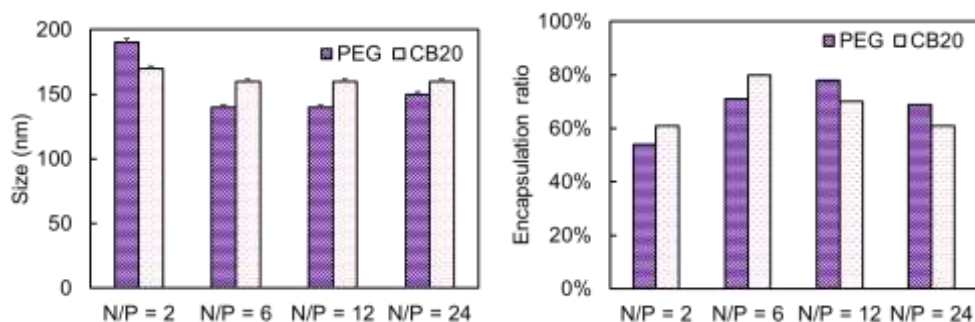


Figure.2-10 N/P 比と粒子径および内包率の関係 (n = 3).

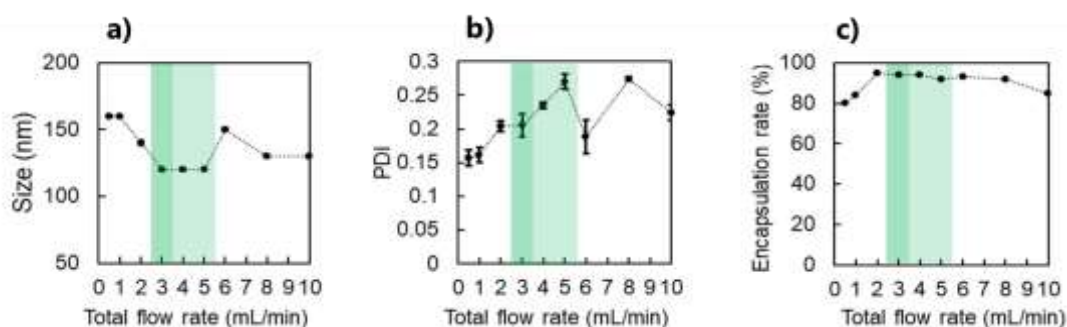


Figure-2-11 Total flow rate と粒子径、PDI、内包率の関係(n=3)

同じ条件で様々な LNP を調製し、それらの物性を評価し、Table 2-1 にまとめた。また、電子顕微鏡で各 LNP を観測したところ球形の粒子であることが確認された(Figure.2-12)。CB-LNP の ζ 電位を pH5.5~7.4 の範囲で測定したところ、PEG-LNPs や DODAP-LNPs よりも大きく pH 依存性的な ζ 電位の変化が確認された(Figure.2-13)。PEG-LNPs においても pH 依存性的な ζ 電位変化が見られているが、これは pH 応答性の 3 級アミンを有する DODAP に由来するものであり、DODAP の pKa は 6.5 であるため、pH5.5、pH 6.5 では正電荷を示している。一方、CB-LNPs の ζ 電位の変化は DODAP よりも大きいですが、これは PGLu(DET-Car)修飾による pH 応答性の増強を示唆していると考えられた。

Table 2-1. LNP の脂質構成および物性評価.

LNPs	Lipid Composition (mol%)	Size (nm) ^a	PDI ^a	Encapsulation Rate ^b
DODAP-LNPs	DODAP/DOPE/Chol =50/10/40	100±1	0.20±0.01	100%
PEG-LNPs	DODAP/DOPE/Chol/PEG-DSPE=50/10/40/1	90±1	0.19±0.01	87%
CB20-LNPs	DODAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE=50/10/40/1	130±1	0.20±0.01	94%
CB70-LNPs	DODAP/DOPE/Chol/CB20-DSPE=50/10/40/1	110±1	0.20±0.01	60%
CB110-LNPs	DODAP/DOPE/Chol/CB110-DSPE=50/10/40/1	130±1	0.17±0.01	77%

^a 動的光散乱法による測定 (25°C、n = 3). ^b リボグリーンアッセイによる測定

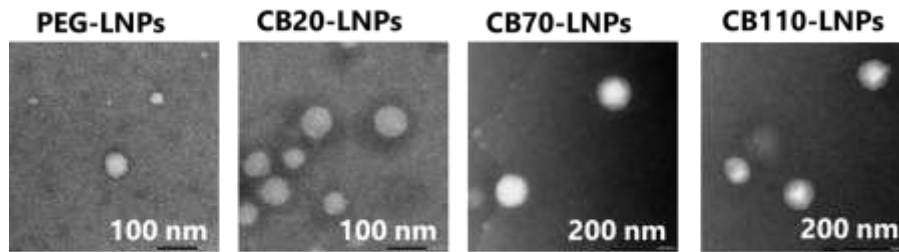


Figure.2-12 透過型電子顕微鏡での撮画像

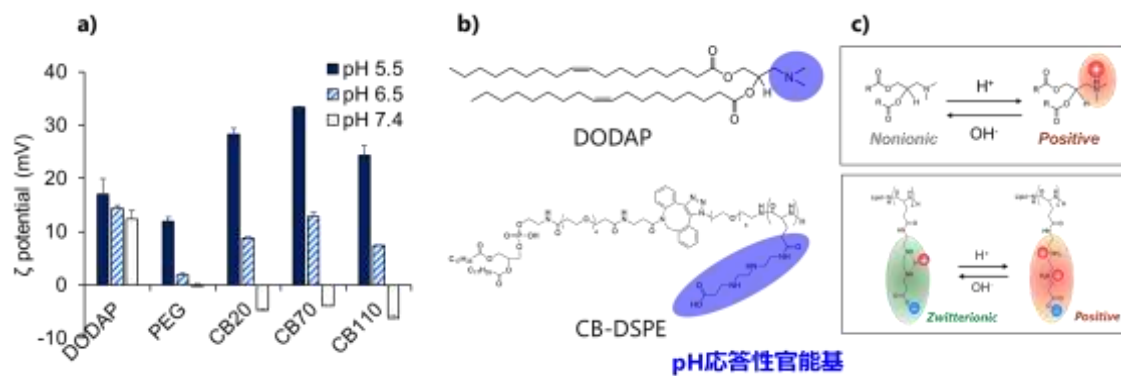


Figure.2-13. ζ 電位の測定結果および pH 応答性官能基の説明

a) ζ 電位測定結果(n=3)、b)pH 応答性官能基の所在、c)pH 応答性官能基

2.4 結論および考察

本章では、クリック反応を含む 4 ステップで DSPE-PGlu(DET-Car)を合成した上で、マイクロ流体デバイスによる pH 応答性ポリベタイン修飾 LNPs の調製法を確立し、各種物性評価を行った。その結果、CB-LNPs はどの分子量においても増強された pH 応答性を有しており、粒子径は 110~130 nm、内包率は 67~94%であった。

LNP 形成メカニズムは以下の様に考察する。まず、ナノアSEMBラーでの混合前は、siRNA とポリベタイン結合脂質は酸性緩衝液に溶解した状態にあり、200 nm 程度の粒子を形成する。その後、DODAP を含むエタノール溶液とナノアSEMBラーで混合されることにより、siRNA はポリベタインの正電荷よりも DODAP の正電荷と強く静電相互作用を起こし、LNP 中に内包される。中性緩衝液での透析後、siRNA の多くは DODAP と相互作用した状態で LNP 内部に残存する。

第 3 章 異なる分子量を有する pH 応答性ポリベタイン 修飾 LNP の機能評価

要旨

LNPs の機能評価として、細胞取り込み量、細胞取り込み経路、エンドソーム脱出能、膜融合能、および遺伝子抑制能の評価を行った。蛍光色素 Alexa Fluor647 結合 siGL3 を内包した LNPs をヒト卵巣腫瘍細胞 SK-OV-3-luc に対して投与したところ、LNPs はエンドサイトーシスによって取り込まれていた。また、pH 7.4 の場合と比較して、CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs は pH 6.5 において PEG-LNPs よりも高い細胞取り込み量を示した。pH 6.5 において、カルセイインを使用してエンドソーム脱出能を評価したところ、CB20-LNPs では PEG-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs よりも高いエンドソーム脱出能が得られた。各 LNPs の膜融合能を測定したところ、CB20-LNPs の pH 応答性は CB70-LNPs および CB110-LNPs よりも高く、低 pH 領域において強い膜融合能を示した。遺伝子抑制能評価のため、SK-OV-3-luc に対して各 LNPs を投与後、ルシフェラーゼの発光強度を測定したところ、pH 6.5 において CB20-LNPs は CB70-LNPs よりも高い遺伝子抑制能を示し、一方 CB110-LNPs は PEG-LNPs と同様にほとんど遺伝子抑制を示さなかった。

以上より、CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs はいずれも細胞取り込みにおいて pH 応答性を示し、pH 6.5 において PEG-LNPs よりも高い細胞取り込みを示すが、その中でも CB20-LNPs は比較的高い膜融合能を有しているため、高いエンドソーム脱出能および遺伝子抑制能を有すると推察された。

3.1 緒言

脂質ナノ粒子の細胞取り込み経路には、エンドサイトーシスや膜融合があり、さらに膜融合には細胞膜と直接膜融合するものと、エンドサイトーシス後にエンドソーム膜と膜融合して内包物を放出するものがある[81]。いずれの場合においても LNP の膜融合能が高い程サイトゾル内への

核酸の放出が起こるため、薬効が高くなるため、膜融合能は遺伝子抑制能と深い関連がある。本章では LNP の細胞取り込み量、細胞取り込み経路、エンドソーム脱出能、遺伝子導入抑制効率および膜融合能について総合的に評価し、pH 応答性ポリペタインの分子量を最適化した。

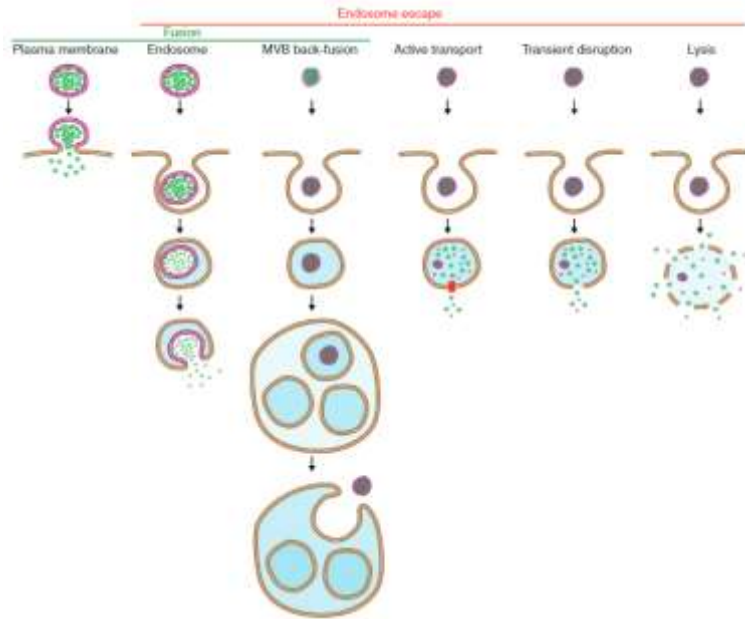


Figure.3-1 細胞取り込み経路(論文より[81]引用)

3.2 方法

3.2.1 共焦点顕微鏡を用いた細胞取り込みの観察および定量評価

SK-OV-3-luc 細胞を 35 mm ガラスベースディッシュに播種し(1.0×10^5 cells/well)、10%ウシ胎児血清(FBS)を含む McCoy's 5A modified 培地で培養した。その後、細胞培地を Alexa Flour 647-siGL3 内包 LNP を含む新しい Optimem に交換した。72 時間培養後、核とリソソームをそれぞれ Hoechst 33342 と LysoTracker Red DND-99 で染色した。各共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) の測定には、Plan-Apochromat 40×油浸対物レンズ(口径: 1.4)を装着した LSM710(Carl Zeiss、Oberkochen、Germany)を用いた。励起波長は、Hoechst 33342 は 405 nm、LysoTracker Red DND-99 は 488 nm、Alexa Flour 647-siGL3 は 633 nm であった。また、

撮影した細胞を ROI で囲み、633nm の蛍光強度を測定することで、細胞取り込みを定量化した。

3.2.2 エンドソーム脱出能の測定

水溶性蛍光色素であるカルセインを使用し、エンドソーム脱出能を測定可能である。カルセインを含有する培地中で細胞を培養すると、エンドサイトーシスと同時にエンドソーム内にカルセインが取り込まれ、エンドソーム脱出が起こった際にはエンドソームから細胞質中にカルセインが放出される。そのため、エンドソーム脱出が効率よく起こった細胞は全体からカルセインの蛍光が検出できる。反対にエンドソーム脱出が起こっていない場合には、エンドソーム顆粒状に蛍光が見られるようになる[82,83]。

SK-OV-3-luc 細胞を 24 ウェルプレート(5.0×10^4 cells/well)に播種し、10%ウシ胎児血清(FBS)を含む McCoy's 5A modified 培地で培養した。その後、細胞培地を 250 μ M のカルセインと siLuc-LNP を含む新しい Optimem に交換した。2 時間インキュベート後、核を Hoechst 33342 で染色した。各蛍光顕微鏡測定には BZ-X800 を用いた。励起波長は、Hoechst 33342 は 405 nm、カルセインは 488 nm であった。エンドソームからのカルセイン放出の定量分析には、カルセインの蛍光チャンネル上で、細胞全体に蛍光を示す細胞の割合、または細胞がエンドソーム様粒子を含む割合を用いた。

3.2.3 膜融合能の測定

エンドソーム膜を模倣した蛍光脂質含有リポソームを用いた膜融合アッセイにより、エンドソーム膜と LNP の膜融合能を評価することが可能である[84,85]。蛍光分子はリポソーム中にある場合は局所濃度が高く消光した状態にあるが、LNPs と接触し膜融合が発生すると蛍光脂質の一部が LNP へ移行し、側方拡散することにより蛍光が回復するため、膜融合能の指標として利用できる(Figure.3-3a)。

ローダミン-PE を含む生体膜模倣組成の脂質(脂質組成; DOPC/DOPE/DOPS/Chol/ローダミン-PE = 45/15/15/20/10)をクロロホルムに溶解した。ロータリーエバポレーターを用いて脂質膜を形成し、10 mM HEPES 緩衝液で水和してローダミン標識リポソームを調製した。各 LNP とローダミン標識リポソームを 10:1 のモル比で混合し(37°C、1 時間)、異なる pH レベルの緩衝液中でインキュベートした(pH 5.5、6.0、6.5 は 10 mM MES、150 mM NaCl、pH 7.0、7.5 は HEPES、150 mM NaCl、pH 8.0、8.5 は 10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl の緩衝液をそれぞれ用いた)。LNP 調製の 1 時間後、蛍光強度(I)をマイクロプレートリーダー(Spark、Tecan Group Ltd、励起: 520 nm、発光: 590 nm)を用いて測定した。0.1% Triton™ X-100 で希釈したローダミン標識リポソームの蛍光強度を最大膜融合ポテンシャルと定義した。膜融合電位は以下の式で算出した。

$$\text{Membrane fusion potential} = \frac{I_{\text{Liposomes+LNPs}} - I_{\text{Liposomes}}}{I_{\text{Liposomes+Triton}} - I_{\text{Liposomes}}}$$

$I_{\text{Liposomes + LNPs}}$ は LNPs 添加後のリポソームの蛍光強度を示す。 $I_{\text{Liposomes}}$ は、異なる pH の緩衝液で希釈したリポソームの蛍光強度を示す。 $I_{\text{Liposomes+Triton}}$ は、0.1% Triton™ X-100 で希釈したリポソームの蛍光強度を示す。

3.2.4 遺伝子抑制能の測定

SK-OV-3-luc 細胞を 96 ウェルプレートに 5.0×10^3 cells/well の濃度で播種し、10% FBS を含む McCoy's 5A (Modified) 培地で培養した。72 時間培養後、LNP を除去し、すべてのウェルプレートを PBS で洗浄した。その後、CCK-8 測定試薬を含む Optimem を分析に用いた。細胞生存率(Viability)は以下の式で計算した。

$$\text{Viability} = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank}}}$$

A_{Sample} はサンプル処理した細胞のウェルの吸光度を示す。 A_{Control} は、未処理の細胞のウェルの吸光度を示す。 A_{Blank} は、細胞を含まない培地のウェルの吸光度を示す。

続いて、溶解バッファー(50 µL)、細胞溶解液(20 µL)、ルシフェリン基質(100 µL)を各ウェルに添加した。ルシフェラーゼアッセイシステムキット(プロメガ社製)と GloMax 96 マイクロプレートルミノメーター(プロメガ社製)を用いて、*in vitro* での遺伝子活性の程度を測定した。相対発光強度(Relative luminescent intensity)は以下の式で算出した:

$$\text{Relative luminescent intensity} = \frac{I_{\text{Sample}}/V_{\text{Sample}}}{I_{\text{Control}}/V_{\text{Control}}}$$

I_{Sample} と V_{Sample} はそれぞれ、サンプルの発光強度と生存率を示す。 I_{Control} と V_{Control} はそれぞれ、陽性対象の発光強度と生存率を示す。

3.3 結果

3.3.1 共焦点顕微鏡を用いた細胞取り込みの観察および定量評価

PGlu(DET-Car)の DP 値の影響を *in vitro* で評価するために、siRNA-Alexa Flour 647 コンジュゲートで蛍光標識した CB-LNP を調製し、ヒト卵巣がん SK-OV-3-luc に対する細胞取り込み能力を調べた。CB110-LNPs は、CB20-LNPs よりも SK-OV-3-luc 細胞に対して pH 7.4 と 6.5 でより良好な細胞内取り込みを示した。また、CB70-LNP と CB20-LNP は、pH 7.4 と 6.5 の両方で同程度の細胞内取り込みを示した。なお、PEG-LNP は、この実験条件下でわずかな細胞取り込みを示した(Figure 3-1b)。さらに、CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs からの蛍光シグナル(赤)は、pH 6.5 でリソソーム(緑)と共局在しており(Figure 3-1a)、エンドサイトーシスを介した細胞取り込みが示唆された。

PEG-LNPs と比較して、pH 応答性 CB20-LNPs の蛍光強度は pH 6.5 で有意に高く、この傾向は CB70-および CB110-LNPs でさらに増強されたことから、PGlu(DET-Car)の pH 応答性とポリペプチドの分子量が CB-LNPs の細胞内取り込みに重要であることが示された(Figure 3-1b)。

また、PEG-LNP および CB20-LNP の細胞取り込みについて、時間依存性及び濃度依存性を調べた。その結果、PEG-LNP、CB20-LNP はどちらも時間依存的、濃度依存的に細胞取り込み量が増加し、いずれのタイミングにおいても pH 6.5 での CB20-LNP の細胞取り込み量が最も高かった(Figure.3-2)。

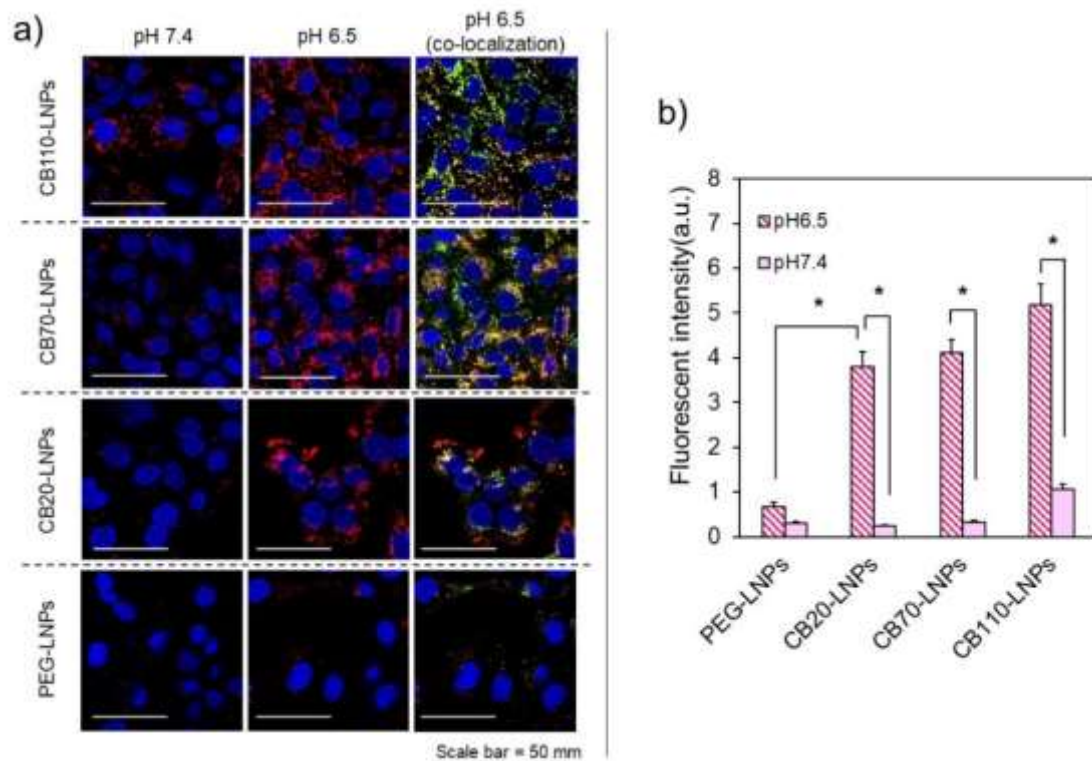


Figure 3-1. pH 依存的な細胞取り込みの共焦点顕微鏡による観察

a) SK-OV-3-luc 細胞を Alexa Flour 647-siRNA 結合脂質ナノ粒子(LNP)(赤)と 72 時間インキュベートし、初期エンドソーム(緑)と核(青)を染色した。共局在を黄色で示す。スケールバー=50μm

b) 細胞への取り込みの定量的解析。統計的有意性は Student t-test を用いて評価した(n = 30)。

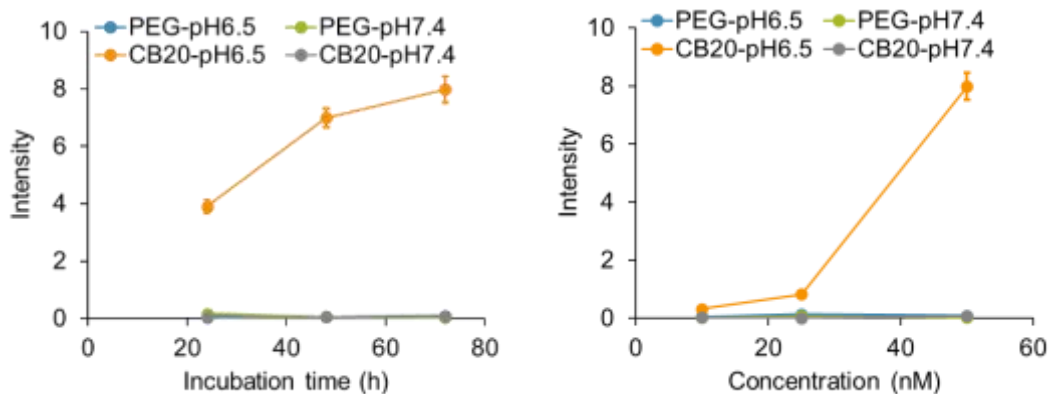


Figure.3-2 インキュベーション時間および濃度の細胞取り込み量への影響(n = 30).

3.3.2 エンドソーム脱出能の測定

核酸医薬にとって、エンドソームからの核酸の放出は、転写やサイレンシングを機能させるために不可欠である[86,87]。エンドソームの脱出では、エンドソーム膜が孔を作り、内部の分子が細胞質に漏出する。カルセイン色素は膜不透過性であり、DDS キャリアと共培養するエンドソーム脱出のマーカーとして用いることができる[82,88]。細胞はエンドサイトーシスの過程でカルセインを取り込み、エンドソームの場所で部分的に蛍光を示す。エンドソームから脱出した場合、カルセインは細胞質に拡散し、蛍光は細胞全体に観察される。ここでは、LNP を pH 6.5 でカルセインと共培養し、エンドソーム脱出の割合を計算した。CB20-LNPs は、他の LNPs よりもエンドソーム脱出率が高かった(Figure,3-3)。PEG-LNP はエンドソームからの脱出が非常に少なく、PEG がエンドソームからの脱出を阻止し、サイレンシング効率を低下させることが示唆された。さらに、CB70-および CB110-LNP は、細胞内への取り込みの結果とは逆に、エンドソームからの脱出が少なく、ポリペタインの DP 値がエンドソームからの脱出効率に影響することが示された。

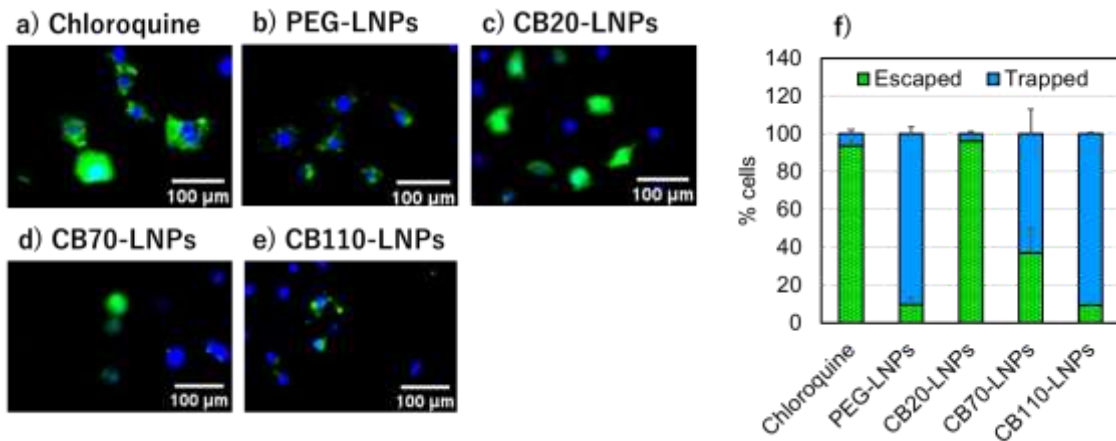


Figure.3-3 エンドソーム脱出能の評価

a)~e)蛍光顕微鏡像、f)定量結果

a)クロロキン塩酸塩、b)PEG-LNPs、c)CB20-LNPs、d)CB70-LNPs、e)CB110-LNPs

3.3.3 膜融合能の測定

CB-LNP を 10% のローダミン-PE を含むリポソームと 1 時間インキュベートした後、蛍光強度を測定し、膜癒合ポテンシャルを算出した。CB20-LNP は明らかな pH 応答性を示し、他の LNP と比較して最も高い膜融合能を示した(Figure 3-4b)。PEG-LNP は pH 範囲にわたって低い電位を示し、PEG ジレンマで見られるような低吸着性を再現することが出来た。優れた細胞取り込み性能(Figure 3-4a)を示した CB70-LNPs と CB110-LNPs は、DODAP-LNPs と CB20-LNP よりも低い膜融合ポテンシャルを示した。

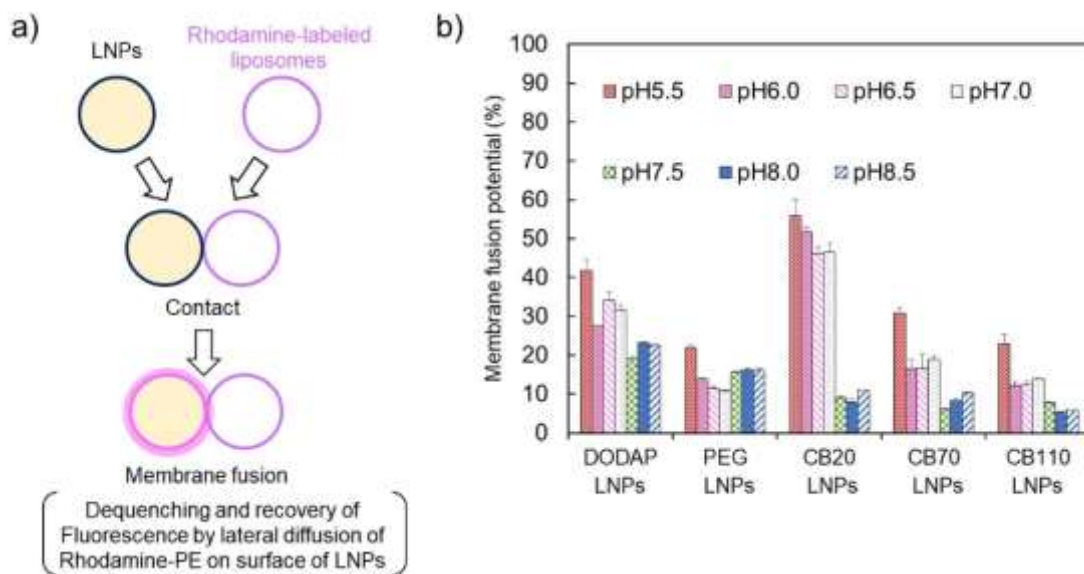


Figure 3-4. 膜融合アッセイ. a) 膜融合アッセイにおけるプロセスの模式図 b) pH に依存する膜融合のポテンシャル(n = 3)。

3.3.4 細胞生存率の測定

siLuc 内包 LNP を SK-OV-3-luc 細胞と 72 時間インキュベートした。その結果、viability は 87 ~116%であり、LNP 間での差は確認されなかった(Figure.3-5)。

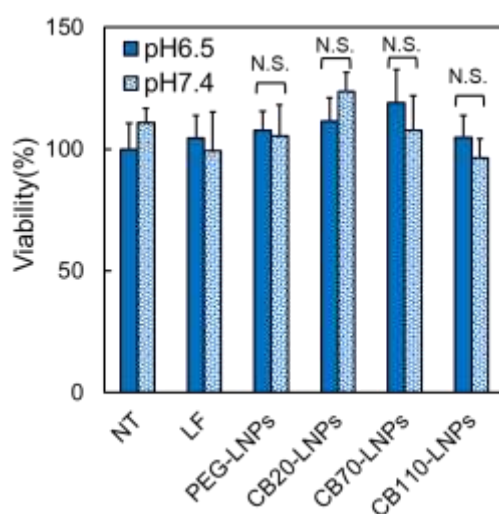


Figure 3-5.細胞生存率. NT: Non-treatment、LF: Lipofectamine RNAi MAX. (n = 3–6). 統計的有意性は Student t-test を用いて評価した。

3.2.5 遺伝子抑制能の測定

siLuc 内包 LNP を SK-OV-3-luc 細胞と 72 時間インキュベートした。その結果、CB20-LNP は pH 応答性の遺伝子抑制を誘導し、その効率は pH 応答性を示さないリポフェクタミンと同等であった(**Figure.3-6**)。CB70-LNP も中程度の遺伝子抑制能を示したが、pH 応答性の程度は CB20-LNP よりも比較的弱かった。一方、PEG-LNP と CB110-LNP は、いずれの pH 条件でも遺伝子抑制効果をほとんど示さなかった。これらの結果は、より短い PGLu(DET-Car)が LNP の特性として有用であることを示しており、pH 応答性薬物送達の効果을最大化するためには、PGLu(DET-Car)の分子量を正確に調整することが重要であることを示している。また、CB20-LNPs に関して pH 6.5 における IC₅₀ を測定したところ、25 nM であった(**Figure.3-7**)。

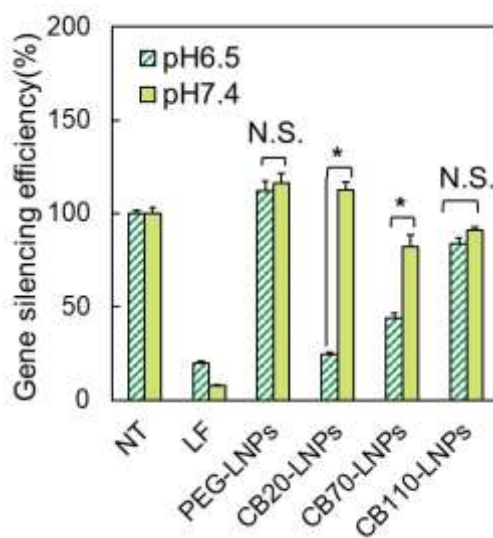


Figure 3-6. SK-OV-3-luc 細胞に対する PGLu(DET-Car)コート脂質ナノ粒子(LNPs)による遺伝子サイレンシングに対する pH の影響。NT: 非処理、LF: Lipofectamine RNAi MAX。(n = 3-6). 統計的有意性は Student t-test を用いて評価した。

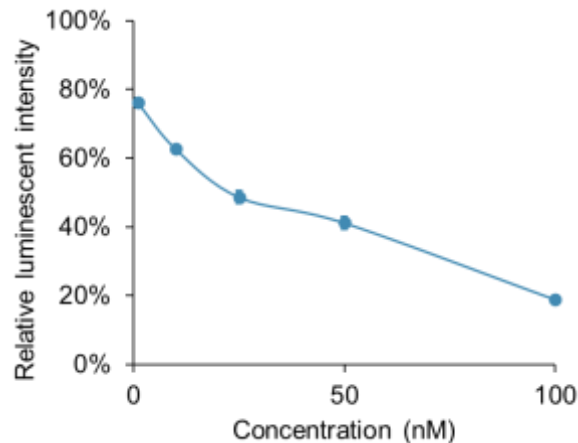


Figure 3-7. pH 6.5 における SK-OV-3-luc 細胞の相対発光強度に及ぼす CB20-LNP 中の siRNA 濃度の影響 (n=6).

3.3 考察

CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs はいずれも pH 6.5 において pH 7.4 よりも高い細胞取り込みを示しており、表面電荷の pH 応答性に起因していると考えられた。CB110-LNPs は最も高い細胞取り込みを示していたものの、PEG-LNPs と同程度に低い膜融合ポテンシャルを示しており、pH 応答性も CB20-LNPs より程度であった。この結果は遺伝子抑制試験およびエンドソーム脱出能評価試験と一致しており、CB70-LNPs と CB110-LNPs の pH 6.5 における遺伝子抑制能、エンドソーム脱出能は CB20-LNPs より低かった。

今回の例のように、細胞取り込み量と遺伝子抑制効率の結果が一致しない例が知られている。例えば、Heyes らの報告では、相転移温度が高い脂質を含む LNP は、細胞取り込み量が高いが、膜融合能が低く、遺伝子抑制効率が低い。一方で、相転移温度が低い脂質の場合は、細胞取り込み量は低下したものの、遺伝子抑制効率は高くなった[30]。このことから、一定以上の細胞取り込み量よりも、膜融合ポテンシャルが遺伝子抑制効率の重要因子になると考えられる。

また、CB70-LNPs や CB110-LNP の正味電荷はカチオン性が高く、アニオン性のリポソーム膜と強く静電相互作用を引き起こし、膜融合プロセスが阻害された可能性も考えられる。ポリアミン脂

質を用いた脂質ナノ粒子の場合に、強い静電相互作用によりトランスフェクション効率が低下した事例が知られている[78]。

同様の傾向は、リポソームの表面を膜融合タンパク質で高度に修飾した場合にも観察され、膜融合プロセスはその表面密度に対応して徐々に抑制されていた[89]。この論文では、それぞれ膜融合タンパク質の含有量が異なるジャイアントリポソームを調製し、タンパク質を含まないリポソームとの膜融合の発生効率を評価しており、膜融合により生じる粒子径の大きなリポソームの数を数えている。膜融合タンパク質の含有量、つまり脂質二重膜中での密度が高い程、膜融合が発生しにくいという(Figure.3-8)。この論文を踏まえると CB70-LNPs や CB110-LNPs では、立体障害によって膜融合が阻害された可能性も考えられる。つまり、膜融合の阻害によりラメラ相から逆へキサゴナル相への相転移が阻害された結果、siRNA のエンドソーム脱出が阻害され、遺伝子抑制能が低下したと考察される。

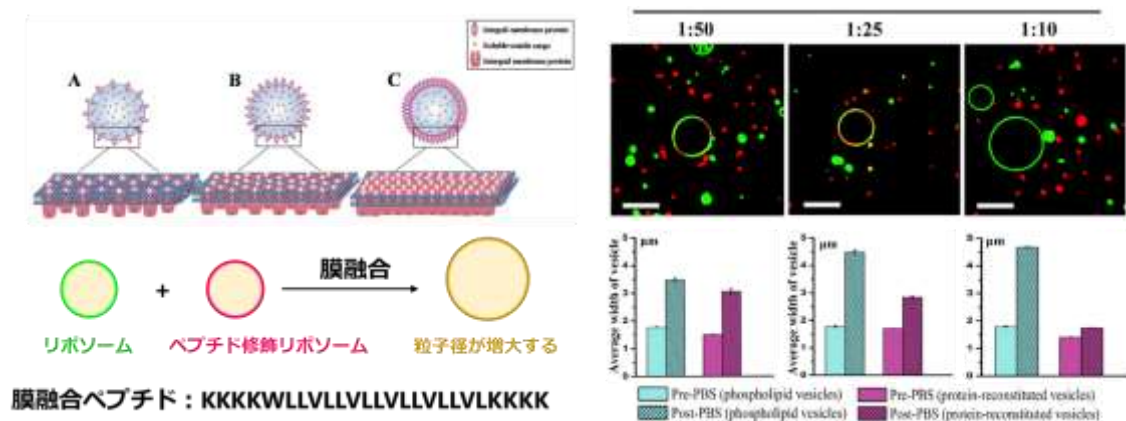


Figure.3-8 膜融合ペプチドの含有量と膜融合の発生効率(論文[89]より引用、加筆)

3.4 結論

全ての CB-LNPs は PEG-LNPs と比較して、pH に依存してより多く pH 6.5 において取り込まれており、pH 応答性ポリペプチン修飾によるものと推定された。CB-LNPs 中の siRNA は部分的にエンドソーム/リソソームと蛍光が共局在しており、エンドソームによる取り込みが示唆された。

遺伝子抑制アッセイの結果、CB20-LNPs では pH 依存的な遺伝子抑制が確認されたが、CB70-LNPs や CB110-LNPs ではあまり遺伝子抑制が見られなかった。膜融合アッセイの結果、CB20-LNPs では pH 応答性が增強されていたが、CB70-LNPs や CB110-LNPs の膜融合は PEG-LNPs と同等であった。

LNPs は一定以上取り込まれていたものの、ポリペタインの静電相互作用あるいは立体障害により膜融合に必要なラメラ相から逆ヘキサゴナル相への相転移が阻害され、サイトゾル中への siRNA の放出が抑制された結果、CB70-LNPs や CB110-LNPs では遺伝子抑制効率が低下したと考えられる。

第 4 章 総括

総括

siRNA による RNA 干渉療法は、細胞内の mRNA を標的とするため、既存のモダリティでは対応できない疾患が克服できる可能性がある点で革新的であり、がんなどの治療に於いてその有効性が大いに期待されている。しかし、siRNA は免疫原性を有しており、また血中で極めて不安定であるため、全身投与を行う場合は siRNA をポリエチレングリコール等で被覆した LNP へ内包する手法等が検討されてきた。ポリエチレングリコールによる修飾は、血中タンパクや免疫細胞による捕捉を防ぐ機能がある一方で、LNP の細胞取り込みを抑制するため、薬効を低下させてしまう欠点を有する。本研究では、腫瘍組織などの弱酸環境下に応答して正電荷を示し、積極的に細胞へ取り込まれる pH 応答性ポリペタインで修飾された LNP を用いることで上記課題を解決するため、マイクロ流体デバイスによる調製法の確立、物性評価および *in vitro* での機能評価による分子量の最適化に取り組んだ。

第 2 章では、脂質結合型ポリペタインの合成および pH 応答性ポリペタイン修飾 LNP の調製および物性評価を行った。ポリペタインは、末端にアジド基を有するポリグルタミン酸に対して、側鎖にアミド結合を介してエチレンジアミン構造およびカルボキシル基を導入した PGlu(DET-Car)を用いた。PGlu(DET-Car)は、酸性 pH 条件下においてはエチレンジアミン構造が 2 価の正電荷、カルボキシル基が 1 価の負電荷を有するため、ポリマー全体としてはカチオン性となる一方、中性 pH 条件下においてはエチレンジアミン構造がゴーシュ構造を示し 1 価の正電荷を示す状態となるため、ポリマー全体として中性となる pH 応答性を有する。PGlu(DET-Car)に対して、DBCO-DSPE をクリック反応により導入し、脂質結合型 pH 応答性ポリペタイン DSPE-PGlu(DET-Car)を得た。LNP はマイクロ流体デバイスを用いて調製を行った。LNP の調製法には薄膜水和法、エタノール注入法、T チューブ法等があるが、マイクロ流体デバイスによる調製法は、高い再現性と粒子径の制御性、スケーラビリティを有しており、現在 LNP の調製法で広く取り入れられている方法である。マイクロ流体デバイスの流速などの機械パラメータ、LNP の脂質組成や siRNA 濃度等を検討し、マイクロ流体デバイスによる調製法を確立した。CB-LNPs の粒子径は 110～

130nm、内包率は 67～94%であった。また、どの CB-LNPs においても PEG-LNP よりも優れた pH 応答性が ζ 電位に見られ、pH 6.5 以下では正電荷を示しており、PGlu(DET-Car)修飾に由来する物性が確認された。

第 3 章では、*in vitro* における CB-LNPs の機能評価を行った。まず、ヒト卵巣腫瘍細胞 SK-OV-3-luc に対して、蛍光色素 Alexa Fluor647 結合 siGL3 を内包した LNPs を投与し、pH 6.5 と pH 7.4 における siRNA の細胞内動態および細胞取り込み量について検証したところ、LNPs はエンドサイトーシスによって取り込まれていた。また、すべての CB-LNPs において、PEG-LNPs と比較して pH 6.5 において細胞取り込み量が増加していることを確認した。エンドソーム脱出能の評価のため、カルセイン存在下で LNP を投与した際の細胞再挙動を観察したところ、CB20-LNPs では CB70-LNPs、CB110-LNPs よりも細胞全体が光っている細胞が多く、より効率的にエンドソーム脱出が発生していることが確認された。遺伝子抑制能評価のため、SK-OV-3-luc に対して各 LNPs を投与後、ルシフェラーゼの発光強度を測定したところ、pH 6.5 において CB20-LNPs は CB70-LNPs よりも高い遺伝子抑制能を示し、一方 CB110-LNPs は PEG-LNPs と同様にほとんど遺伝子抑制を示さなかった。また、各 LNPs の膜融合能を測定したところ、CB20-LNPs の pH 応答性は CB70-LNPs および CB110-LNPs よりも高く、低 pH 領域において強い膜融合能を示した。以上より、*in vitro* の機能評価により、pH 応答性ポリベタイン修飾 LNPs が CB20-LNPs に最適化された。

第 2 章では異なる分子量を有する pH 応答性ポリベタインで修飾された LNPs のマイクロ流体デバイスによる調製法の確立に成功した。本知見は、同様の物性を有する機能性高分子修飾 LNP のスケールアップにおける基礎となり得るため、有用である。

第 3 章では、pH 応答性ポリベタインの分子量に応じて LNP の機能に違いが見られている。まず、細胞取り込みにおける pH 応答性に関して、どの CB-LNPs においても pH 6.5 の方が pH 7.4 によりも高い細胞取り込み量を示しており、これは pH 6.5 において CB-LNPs が正電荷を表面に有している結果が反映されたものである。中でも、CB110-LNPs が最も高い細胞取り込み量

を示したが、CB110-LNPs は PEG-LNPs と同程度に低いエンドソーム脱出能、膜融合ポテンシャルを示しており、遺伝子抑制はほとんど起こらなかった。この結果は、CB110-LNPs の膜融合が立体障害あるいはエンドソーム膜との静電相互作用によって阻害された可能性を示しており、本研究によりポリベタイン分子量の制御が LNPs の設計について重要な指針を与えるものとなった。

総じて、本研究で明らかになったポリベタインの分子量と細胞取り込み量、膜融合能、遺伝子抑制能の関係を以下の通り考察する。まず、分子量が高い程、ポリベタインと細胞膜の静電相互作用が強くなり、接触機会が増え、エンドサイトーシスの確率が高くなるため、細胞取り込み量が上昇する。次に、分子量が低いほど LNP とエンドソーム膜との距離は短くなるため、脂質同士が接近しやすくなる。その結果、膜融合を起こす確率が高くなり、siRNA がサイトゾル中に脱出しやすくなる。そのため、サイトゾル中の siRNA 量が多くなり、RISC 複合体量が多くなるため、標的 mRNA の分解が促進され、遺伝子抑制能が高くなる(Figure.4)。

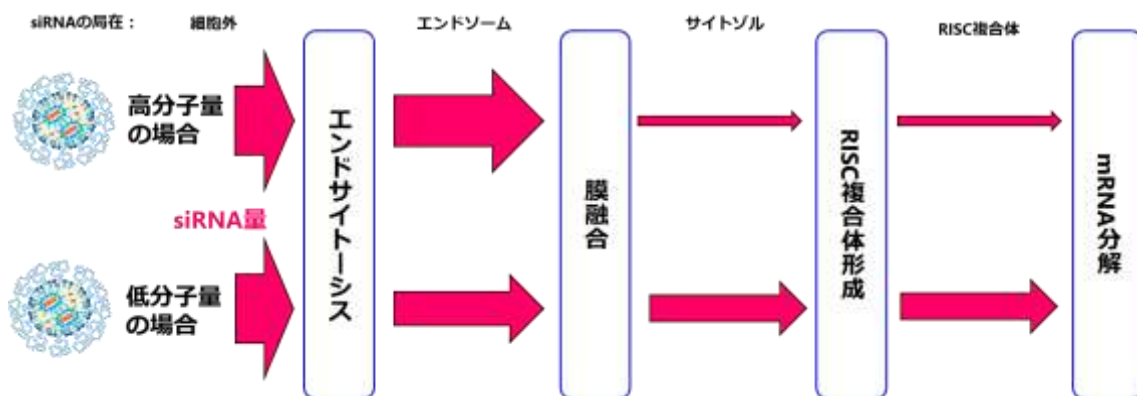


Figure.4 ポリベタインの分子量と細胞取り込み量、膜融合能、遺伝子抑制能の関係
修飾ポリベタインが低分子量の場合、エンドサイトーシスされる確率は比較的に低い
が、膜融合する確率は比較的に高いため、結果的に mRNA 分解がより起こりやすくなる。

業績

- 査読論文(1 件)

Keitaro Homma, Yutaka Miura*, Motoaki Kobayashi, Wanphiwat Chintrakulchai, Masahiro Toyoda, Koichi Ogi, Junya Michinishi, Tomoyuki Ohtake, Yuto Honda, Takahiro Nomoto, Hiroyasu Takemoto, Nobuhiro Nishiyama*, Fine tuning of the net charge alternation of polyzwitterion surfaced lipid nanoparticles to enhance cellular uptake and membrane fusion potential, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 25 (2024) 2338785

使用試薬リスト

N, N-dimethylformamide (DMF)、dichloromethane (DCM)、diethyl ether、5 M HCl、diethyl ether、methanol、ethanol、tetrahydrofuran (THF)、acetonitrile、sodium chloride、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、2-morpholinoethanesulfonic acid (MES)、and tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride salt (Tris-HCl) は富士フイルム和光純薬工業株式会社から購入した。Diethylenetriamine、tert-butylacrylate、2-hydroxypridine、and sodium acetate は東京化成工業株式会社から購入した。Cholesterol and Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline はナカライテスク株式会社から購入した。Acetic acid は関東化学株式会社から購入した。γ-benzyl-L-glutamate N-carboxy anhydride (BLG-NCA) は中央化成品株式会社から購入した。1, 2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane (DODAP)、1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt) (DOPS)、and 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rhodamine-PE) は Avanti Polar Lipids、Inc から購入した。Polyethyleneglycol-1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (PEG5k-DSPE) and 1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) は日油株式会社から購入した。1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-tetra(polyethylene glycol)-dibenzocyclooctyne (DSPE-PEG4-DBCO) は Broadpharm から購入した。1-amino-11-azido-3, 6, 9-trioxaundecane、Triton™ X-100、penicillin/streptomycin、trypsin/ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA)、Quant-it™ RiboGreen RNA Assay Kit、RiboGreen RNA Reagent、McCoy's 5A (modified) medium、Optimem®、LysoTracker™ Red DND-99、Hoechst® 33342、and Trypan blue は Sigma Aldrich から購入した。Small interfering RNA (siRNA) against luciferase (siLuc、sense: 5'-GAU UAU GuC CGG uuA uGu AUU AdTdT-3'; antisense: 5'-UAC AuA ACC GGA CAu AAU CUU GdTdT-3'、2'-Ome-modified nucleotides are in lowercase.) は北海道システムサイエン

ス株式会社から購入した。Alexa 647-labeled siRNA (Alexa 647-siGL3、sense: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT-3'; antisense: 5'-Alexa 647-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT-3') はジーンデザイン株式会社から購入した。

参考文献リスト

- [1] B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao, X.-J. Liang, Therapeutic siRNA: state of the art, *Signal Transduct Target Ther* 5 (2020) 101.
- [2] H.N. Jung, S.-Y. Lee, S. Lee, H. Youn, H.-J. Im, Lipid nanoparticles for delivery of RNA therapeutics: Current status and the role of in vivo imaging, *Theranostics* 12 (2022) 7509–7531.
- [3] Y. Li, M. Wang, X. Peng, Y. Yang, Q. Chen, J. Liu, Q. She, J. Tan, C. Lou, Z. Liao, X. Li, mRNA vaccine in cancer therapy: Current advance and future outlook, *Clin. Transl. Med.* 13 (2023) e1384.
- [4] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 152–160.
- [5] S. Zalba, T.L.M. Ten Hagen, C. Burgui, M.J. Garrido, Stealth nanoparticles in oncology: Facing the PEG dilemma, *J. Control. Release* 351 (2022) 22–36.
- [6] S.E. Emam, N.E. Elsadek, A.S. Abu Lila, H. Takata, Y. Kawaguchi, T. Shimizu, H. Ando, Y. Ishima, T. Ishida, Anti-PEG IgM production and accelerated blood clearance phenomenon after the administration of PEGylated exosomes in mice, *J. Control. Release* 334 (2021) 327–334.
- [7] G.T. Kozma, T. Shimizu, T. Ishida, J. Szebeni, Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154–155 (2020) 163–175.
- [8] Z.G. Estephan, P.S. Schlenoff, J.B. Schlenoff, Zwitteration as an alternative to PEGylation, *Langmuir* 27 (2011) 6794–6800.
- [9] B. Hu, Y. Weng, X.-H. Xia, X.-J. Liang, Y. Huang, Clinical advances of siRNA therapeutics, *J. Gene Med.* 21 (2019) e3097.
- [10] N. Agrawal, P.V.N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K. Mukherjee, RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 657–685.
- [11] M. Friedrich, A. Aigner, Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives, *BioDrugs* 36 (2022) 549–571.
- [12] L. Chen, L. Heikkinen, C. Wang, Y. Yang, H. Sun, G. Wong, Trends in the development of miRNA bioinformatics tools, *Brief. Bioinform.* 20 (2019) 1836–1852.
- [13] H.-O. Iwakawa, Y. Tomari, Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex, *Mol. Cell* 82 (2022) 30–43.
- [14] K.M. Brown, J.K. Nair, M.M. Janas, Y.I. Anglero-Rodriguez, L.T.H. Dang, H. Peng, C.S.

- Theile, E. Castellanos-Rizaldos, C. Brown, D. Foster, J. Kurz, J. Allen, R. Maganti, J. Li, S. Matsuda, M. Stricos, T. Chickering, M. Jung, K. Wassarman, J. Rollins, L. Woods, A. Kelin, D.C. Guenther, M.W. Mobley, J. Petrulis, R. McDougall, T. Racie, J. Bombardier, D. Cha, S. Agarwal, L. Johnson, Y. Jiang, S. Lentini, J. Gilbert, T. Nguyen, S. Chigas, S. LeBlanc, U. Poreci, A. Kasper, A.B. Rogers, S. Chong, W. Davis, J.E. Sutherland, A. Castoreno, S. Milstein, M.K. Schlegel, I. Zlatev, K. Charisse, M. Keating, M. Manoharan, K. Fitzgerald, J.-T. Wu, M.A. Maier, V. Jadhav, Expanding RNAi therapeutics to extrahepatic tissues with lipophilic conjugates, *Nat. Biotechnol.* 40 (2022) 1500–1508.
- [15] X. Shen, D.R. Corey, Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 1584–1600.
- [16] T. Dowler, D. Bergeron, A.-L. Tedeschi, L. Paquet, N. Ferrari, M.J. Damha, Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA), *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1669–1675.
- [17] K.A. High, M.G. Roncarolo, Gene Therapy, *N. Engl. J. Med.* 381 (2019) 455–464.
- [18] R. Tang, Z. Xu, Gene therapy: a double-edged sword with great powers, *Mol. Cell. Biochem.* 474 (2020) 73–81.
- [19] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, S.B. Thomson, S. Chen, B.R. Leavitt, P.R. Cullis, R. van der Meel, The current landscape of nucleic acid therapeutics, *Nat. Nanotechnol.* 16 (2021) 630–643.
- [20] I. Urits, D. Swanson, M.C. Swett, A. Patel, K. Berardino, A. Amgalan, A.A. Berger, H. Kassem, A.D. Kaye, O. Viswanath, A Review of Patisiran (ONPATTRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis, *Neurology and Therapy* 9 (2020) 301–315.
- [21] X. Wang, Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine, *N. Engl. J. Med.* 384 (2021) 1577–1578.
- [22] S. Shah, V. Dhawan, R. Holm, M.S. Nagarsenker, Y. Perrie, Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154–155 (2020) 102–122.
- [23] M.R. Ranson, S. Cheeseman, S. White, J. Margison, Caelyx (stealth liposomal doxorubicin) in the treatment of advanced breast cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 37 (2001) 115–120.
- [24] R.A. Paun, S. Jurchuk, M. Tabrizian, A landscape of recent advances in lipid nanoparticles and their translational potential for the treatment of solid tumors, *Bioeng Transl Med* 9 (2024) e10601.
- [25] F. Shen, L. Feng, Y. Zhu, D. Tao, J. Xu, R. Peng, Z. Liu, Oxaliplatin-/NLG919 prodrugs-

- constructed liposomes for effective chemo-immunotherapy of colorectal cancer, *Biomaterials* 255 (2020) 120190.
- [26] J. Liu, Z. Zhao, N. Qiu, Q. Zhou, G. Wang, H. Jiang, Y. Piao, Z. Zhou, J. Tang, Y. Shen, Co-delivery of IOX1 and doxorubicin for antibody-independent cancer chemo-immunotherapy, *Nat. Commun.* 12 (2021) 2425.
- [27] S. Wang, Y. Zhu, S. Du, Y. Zheng, Preclinical Advances in LNP-CRISPR Therapeutics for Solid Tumor Treatment, *Cells* 13 (2024). <https://doi.org/10.3390/cells13070568>.
- [28] A.L. Bailey, P.R. Cullis, Modulation of Membrane Fusion by Asymmetric Transbilayer Distributions of Amino Lipids, *Biochemistry* 33 (1994) 12573–12580.
- [29] S.C. Semple, S.K. Klimuk, T.O. Harasym, N. Dos Santos, S.M. Ansell, K.F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P.R. Cullis, M.J. Hope, P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids : formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochim. Biophys. Acta* 1510 (2001) 152–166.
- [30] J. Heyes, L. Palmer, K. Bremner, I. MacLachlan, Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Control. Release* 107 (2005) 276–287.
- [31] G.L. Scherphof, J. Dijkstra, H.H. Spanjer, J.T. Derksen, F.H. Roerdink, Uptake and intracellular processing of targeted and nontargeted liposomes by rat Kupffer cells in vivo and in vitro, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446 (1985) 368–384.
- [32] C.R. Alving, E.A. Steck, W.L. Chapman Jr, V.B. Waits, L.D. Hendricks, G.M. Swartz Jr, W.L. Hanson, Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 2959–2963.
- [33] H.M. Patel, Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9 (1992) 39–90.
- [34] J.E. Volanakis, A.J. Narkates, Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement, *J. Immunol.* 126 (1981) 1820–1825.
- [35] H. Yamauchi, T. Yano, T. Kato, I. Tanaka, S. Nakabayashi, K. Higashi, S. Miyoshi, H. Yamada, Effects of sialic acid derivative on long circulation time and tumor concentration of liposomes, *Int. J. Pharm.* 113 (1995) 141–148.
- [36] M. Mora, M.-L. Sagristá, D. Trombetta, F.P. Bonina, A. De Pasquale, A. Saija, Design and characterization of liposomes containing long-chain N-acylPEs for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1430–1438.
- [37] W. Shen, C. Wang, J. Jiang, Y. He, Q. Liang, K. Hu, Targeted delivery of herpes simplex virus glycoprotein D to CD169+ macrophages using ganglioside liposomes

- alleviates herpes simplex keratitis in mice, *J. Control. Release* 365 (2023) 208–218.
- [38] C. Zhang, W. Feng, E. Vodovozova, D. Tretiakova, I. Boldyrevd, Y. Li, J. Kürths, T. Yu, O. Semyachkina-Glushkovskaya, D. Zhu, Photodynamic opening of the blood-brain barrier to high weight molecules and liposomes through an optical clearing skull window, *Biomed. Opt. Express* 9 (2018) 4850–4862.
- [39] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L.M. Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 28–51.
- [40] Y. Gao, M. Joshi, Z. Zhao, S. Mitragotri, PEGylated therapeutics in the clinic, *Bioeng Transl Med* 9 (2024) e10600.
- [41] B.L. Mui, Y.K. Tam, M. Jayaraman, S.M. Ansell, X. Du, Y.Y.C. Tam, P.J. Lin, S. Chen, J.K. Narayanannair, K.G. Rajeev, M. Manoharan, A. Akinc, M.A. Maier, P. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Influence of polyethylene glycol lipid desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2 (2013) e139.
- [42] J. Heyes, K. Hall, V. Taylor, R. Lenz, I. MacLachlan, Synthesis and characterization of novel poly(ethylene glycol)-lipid conjugates suitable for use in drug delivery, *J. Control. Release* 112 (2006) 280–290.
- [43] A.D. Bangham, Liposomes and the physico-chemical basis of unconsciousness, *FASEB J.* 19 (2005) 1766–1768.
- [44] H. Zhang, Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation, *Methods Mol. Biol.* 2622 (2023) 57–63.
- [45] P. Gentine, L. Bourel-Bonnet, B. Frisch, Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process, *J. Liposome Res.* 23 (2013) 11–19.
- [46] C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari, H. Fessi, Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation, *J. Liposome Res.* 20 (2010) 228–243.
- [47] T. Kurakazu, S. Takeuchi, Generation of lipid vesicles using microfluidic T-junctions with pneumatic valves, in: 2010 IEEE 23rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), IEEE, 2010. <https://doi.org/10.1109/memsys.2010.5442406>.
- [48] J.A. Kulkarni, M.M. Darjuan, J.E. Mercer, S. Chen, R. van der Meel, J.L. Thewalt, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA, *ACS Nano* 12 (2018) 4787–4795.
- [49] J.B. Schlenoff, Zwitteration: coating surfaces with zwitterionic functionality to reduce nonspecific adsorption, *Langmuir* 30 (2014) 9625–9636.
- [50] S.L. Regen, Polymerized phosphatidylcholine vesicles as drug carriers, *Ann. N. Y.*

- Acad. Sci. 446 (1985) 296–307.
- [51] S. Nakai, T. Nakaya, M. Imoto, Polymeric phospholipid analogs, 11. Synthesis and polymerization of 2 - aminoethyl 2 - (*p* - methacryloyloxybenzoyloxy)ethyl hydrogen phosphate, *Makromol. Chem.* 179 (1978) 2349–2353.
- [52] J.A. Hayward, D. Chapman, Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility, *Biomaterials* 5 (1984) 135–142.
- [53] I. Firkowska-Boden, X. Zhang, K.D. Jandt, Biocompatibility: Controlling protein adsorption through nanostructured polymeric surfaces (*adv. Healthcare mater.* 1/2018), *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) 1870001.
- [54] B.H. Soudmand, R. Mohsenzadeh, Mechanical, morphological, and numerical evaluation of biocompatible ultra - high molecular weight polyethylene/nano - zeolite nanocomposites, *Polym. Compos.* 45 (2024) 3666–3682.
- [55] N. Arshad, M.A. Javaid, K.M. Zia, M.T. Hussain, M.M. Arshad, U. Tahir, Development of biocompatible aqueous polyurethane dispersions using chitosan and curcumin to improve physicochemical properties of textile surfaces, *Int. J. Biol. Macromol.* 251 (2023) 126196.
- [56] H.E. Lee, D. Lee, T.-I. Lee, J. Jang, J. Jang, Y.-W. Lim, J.H. Shin, S.-M. Kang, G.-M. Choi, D.J. Joe, J.H. Kim, S.H. Lee, S.H. Park, C.B. Park, T.-S. Kim, K.J. Lee, B.-S. Bae, Siloxane hybrid material-encapsulated highly robust flexible μ LEDs for biocompatible lighting applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14 (2022) 28258–28269.
- [57] G. Marković, V. Manojlović, J. Ružić, M. Sokić, Predicting low-modulus biocompatible titanium alloys using machine learning, *Materials (Basel)* 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/ma16196355>.
- [58] S. Seetasang, Y. Xu, Recent progress and perspectives in applications of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers in biodevices at small scales, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 10 (2022) 2323–2337.
- [59] R. Tatum, H. Fujihara, Remarkably stable gold nanoparticles functionalized with a zwitterionic liquid based on imidazolium sulfonate in a high concentration of aqueous electrolyte and ionic liquid, *Chem. Commun. (Camb.)* (2005) 83–85.
- [60] X. Lin, M.O. Boit, K. Wu, P. Jain, E.J. Liu, Y.-F. Hsieh, Q. Zhou, B. Li, H.-C. Hung, S. Jiang, Zwitterionic carboxybetaine polymers extend the shelf-life of human platelets, *Acta Biomater.* 109 (2020) 51–60.
- [61] P. Zhang, F. Sun, C. Tsao, S. Liu, P. Jain, A. Sinclair, H.-C. Hung, T. Bai, K. Wu, S. Jiang, Zwitterionic gel encapsulation promotes protein stability, enhances pharmacokinetics, and reduces immunogenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 12046–12051.

- [62] H. Hauser, I. Pascher, R.H. Pearson, S. Sundell, Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1981) 21–51.
- [63] Q. Shao, Y. He, A.D. White, S. Jiang, Difference in hydration between carboxybetaine and sulfobetaine, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 16625–16631.
- [64] P. Ganguly, J. Polák, N.F.A. van der Vegt, J. Heyda, J.-E. Shea, Protein Stability in TMAO and Mixed Urea–TMAO Solutions, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 6181–6197.
- [65] B. Li, P. Jain, J. Ma, J.K. Smith, Z. Yuan, H.-C. Hung, Y. He, X. Lin, K. Wu, J. Pfaendtner, S. Jiang, Trimethylamine *N*-oxide–derived zwitterionic polymers: A new class of ultralow fouling bioinspired materials, *Science Advances* 5 (2019) eaaw9562.
- [66] H. Huang, C. Zhang, R. Crisci, T. Lu, H.-C. Hung, M.S.J. Sajib, P. Sarker, J. Ma, T. Wei, S. Jiang, Z. Chen, Strong Surface Hydration and Salt Resistant Mechanism of a New Nonfouling Zwitterionic Polymer Based on Protein Stabilizer TMAO, *J. Am. Chem. Soc.* 143 (2021) 16786–16795.
- [67] Y. Li, Q. Cheng, Q. Jiang, Y. Huang, H. Liu, Y. Zhao, W. Cao, G. Ma, F. Dai, X. Liang, Z. Liang, X. Zhang, Enhanced endosomal/lysosomal escape by distearoyl phosphoethanolamine-polycarboxybetaine lipid for systemic delivery of siRNA, *J. Control. Release* 176 (2014) 104–114.
- [68] M.A. Jackson, T.A. Werfel, E.J. Curvino, F. Yu, T.E. Kavanaugh, S.M. Sarett, M.D. Dockery, K.V. Kilchrist, A.N. Jackson, T.D. Giorgio, C.L. Duvall, Zwitterionic Nanocarrier Surface Chemistry Improves siRNA Tumor Delivery and Silencing Activity Relative to Polyethylene Glycol, *ACS Nano* 11 (2017) 5680–5696.
- [69] F. Liu, H. Su, M. Li, W. Xie, Y. Yan, Q. Shuai, Zwitterionic Modification of Polyethyleneimine for Efficient In Vitro siRNA Delivery, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23095014>.
- [70] S. Liu, Q. Cheng, T. Wei, X. Yu, L.T. Johnson, L. Farbiak, D.J. Siegwart, Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing, *Nat. Mater.* 20 (2021) 701–710.
- [71] K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 16287–16294.
- [72] H.J. Kim, S. Ogura, T. Otabe, R. Kamegawa, M. Sato, K. Kataoka, K. Miyata, Fine-Tuning of Hydrophobicity in Amphiphilic Polyaspartamide Derivatives for Rapid and Transient Expression of Messenger RNA Directed Toward Genome Engineering in Brain, *ACS Cent Sci* 5 (2019) 1866–1875.

- [73] A.-H. Ranneh, H. Takemoto, S. Sakuma, A. Awaad, T. Nomoto, Y. Mochida, M. Matsui, K. Tomoda, M. Naito, N. Nishiyama, An Ethylenediamine-based Switch to Render the Polyzwitterion Cationic at Tumorous pH for Effective Tumor Accumulation of Coated Nanomaterials, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 57 (2018) 5057–5061.
- [74] A. Awaad, H. Takemoto, M. Iizuka, K. Ogi, Y. Mochida, A.-H. Ranneh, M. Toyoda, M. Matsui, T. Nomoto, Y. Honda, K. Hayashi, K. Tomoda, T. Ohtake, Y. Miura, N. Nishiyama, Changeable net charge on nanoparticles facilitates intratumor accumulation and penetration, *J. Control. Release* 346 (2022) 392–404.
- [75] Y.-J. Sung, H. Guo, A. Ghasemizadeh, X. Shen, W. Chintrakulchai, M. Kobayashi, M. Toyoda, K. Ogi, J. Michinishi, T. Ohtake, M. Matsui, Y. Honda, T. Nomoto, H. Takemoto, Y. Miura, N. Nishiyama, Cancerous pH-responsive polycarboxybetaine-coated lipid nanoparticle for smart delivery of siRNA against subcutaneous tumor model in mice, *Cancer Sci.* (2022). <https://doi.org/10.1111/cas.15554>.
- [76] X. Shen, A. Dirisala, M. Toyoda, Y. Xiao, H. Guo, Y. Honda, T. Nomoto, H. Takemoto, Y. Miura, N. Nishiyama, pH-responsive polyzwitterion covered nanocarriers for DNA delivery, *J. Control. Release* 360 (2023) 928–939.
- [77] Q. Yang, S.W. Jones, C.L. Parker, W.C. Zamboni, J.E. Bear, S.K. Lai, Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1250–1258.
- [78] T. Dewa, T. Asai, Y. Tsunoda, K. Kato, D. Baba, M. Uchida, A. Sumino, K. Niwata, T. Umemoto, K. Iida, N. Oku, M. Nango, Liposomal polyamine-dialkyl phosphate conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity, *Bioconjug. Chem.* 21 (2010) 844–852.
- [79] M. Maeki, N. Kimura, Y. Sato, H. Harashima, M. Tokeshi, Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 128 (2018) 84–100.
- [80] R.L. Rungta, H.B. Choi, P.J. Lin, R.W. Ko, D. Ashby, J. Nair, M. Manoharan, P.R. Cullis, B.A. Macvicar, Lipid nanoparticle delivery of siRNA to silence neuronal gene expression in the brain, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2 (2013) e136.
- [81] M.P. Stewart, A. Lorenz, J. Dahlman, G. Sahay, Challenges in carrier-mediated intracellular delivery: moving beyond endosomal barriers, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 8 (2016) 465–478.
- [82] F. Hausig-Punke, F. Richter, M. Hoernke, J.C. Brendel, A. Traeger, Tracking the endosomal escape: A closer look at calcein and related reporters, *Macromol. Biosci.* 22 (2022) e2200167.
- [83] A.S.M. Wong, S.K. Mann, E. Czuba, A. Sahut, H. Liu, T.C. Suekama, T. Bickerton,

- A.P.R. Johnston, G.K. Such, Self-assembling dual component nanoparticles with endosomal escape capability, *Soft Matter* 11 (2015) 2993–3002.
- [84] P. Pires, S. Simões, S. Nir, R. Gaspar, N. Düzgünes, M.C. Pedroso de Lima, Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1418 (1999) 71–84.
- [85] Y. Obata, D. Suzuki, S. Takeoka, Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 1055–1063.
- [86] S.A. Smith, L.I. Selby, A.P.R. Johnston, G.K. Such, The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 263–272.
- [87] A.K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H.J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals, *J. Control. Release* 151 (2011) 220–228.
- [88] Y. Liu, J. Liu, Leakage and Rupture of Lipid Membranes by Charged Polymers and Nanoparticles, *Langmuir* 36 (2020) 810–818.
- [89] H. Xu, M. Cai, J. Gao, Y. Shi, J. Chen, Q. Wu, J. Zhang, J. Jiang, H. Wang, Membrane protein density determining membrane fusion revealed by dynamic fluorescence imaging, *Talanta* 226 (2021) 122091.