

令和 3 年 4 月 10 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960372

氏名

吉永直人

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: ニューヨーク州 (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

非ウイルスキャリアを用いたヒト成体細胞からの人工神経細胞作製およびその最適化3. 派遣期間: 平成 30 年 5 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 11 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Columbia University部局名: Department of Biomedical Engineering5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 【背景・目的】

神経細胞補充療法は、有効な治療法がほとんどないアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患に対して有望な治療法として、近年注目を集めている。しかしながら、治療のために十分量の神経細胞を確保することは困難であり、神経細胞の供給が治療実現に向けて大きな障壁となっている。これまで、神経細胞供給に向けて胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の利用が検討されてきたが、ES 細胞や iPS 細胞はがん化のリスクを抱えており、これらの細胞を利用することなく神経細胞を作製する方法の開発が求められている。人工神経細胞(iN 細胞: induced neuronal cells)<sup>1</sup>の利用は上記の懸念なく多くの神経細胞を供給可能とする優れた手法である。iN 細胞とは、線維芽細胞などの成体細胞に *Brn2*・*Acs12*・*Myt1l* といった因子(BAM 因子)を導入することで分化転換によって作製される神経細胞を指す。従来の iN 細胞作製にはウイルスキャリアを用いて BAM 因子が導入されていたが、ウイルスキャリアの利用は、ウイルス由来の病原性が危惧されるため、iN 細胞の治療応用を非常に制限している。本研究では、非ウイルスキャリアを用いて BAM 因子をヒト成体細胞へ導入し、iN 細胞の作製を目指した。また、その過程において、投与間隔やキャリア形態、培養条件といった遺伝子導入効率に影響する各要素についても精査し、ニューロン分化転換に向けた遺伝子導入効率の最適化を目指すとともに、そこで得られる知見を今後のニューロン分化転換の効率化手法の開発に活用することも試みた。

## 【研究成果】

## 1. 高分子合成

優れた BAM 因子の発現を得るため、Figure 1 に示す 4 種類の高分子を合成した。これらの高分子の内、Poly(*N,N'*-cystaminebisacrylamide-4-aminobutanol) (p(CBA-ABOL)), Poly{*N*-[*N'*-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp(DET))及び Chitosan-PEI は既報に従い合成した[2-4]。

Chitosan-PEI にフェニルボロン酸(PBA)を修飾した Chitosan-PEI(PBA)は、PEI に PBA を縮合付加した後にキトサンに導入することで新規に合成された。p(CBA-ABOL)からなるポリプレックスは、主鎖に含まれるジスルフィド結合(S-S 結合)が細胞内還元環境に応答して切断されるため、細胞内において内包 pDNA を放出可能であり、優れた遺伝子導入キャリアとして報告されている[2]。PAps(DET)は、低毒性と高エンドソーム脱出能を併せ持つカチオン性高分子であり、有望な遺伝子導入キャリアの一つである[3]。また、キトサンは遺伝子送達キャリアとして広く利用されている天然のカチオン性高分子であり、生分解性と低毒性を有することから有望なキャリアとして注目を集めている。キトサン-核酸間の静電相互作用を強化するためにポリエチレンイミン(PEI)をキトサン側鎖に修飾した Chitosan-PEI は、所属研究室で開発されたブロック共重合体であり、高効率な遺伝子発現能を示している[4]。Chitosan-PEI を基盤として、ポリプレックスのエンドソーム脱出を促進し、細胞内 ATP 応答性を付与する PBA[5]を修飾した Chitosan-PEI(PBA)を新規に合成した。合成した各高分子の構造は  $^1\text{H-NMR}$  により評価した。p(CBA-ABOL)、PAsp(DET)、Chitosan-PEI に関しては、既報で最も高い遺伝子発現効率を示した重合度を採用した。Chitosan-PEI(PBA)は新規合成高分子であるため、キトサン側鎖に対する PEI 導入率及び PBA 修飾率を変化させて合計で 9 種類のブロック共重合体を合成した。溶媒や温度、反応時間等の最適化により、構造を制御して Chitosan-PEI(PBA)を合成することに成功した。Chitosan-PEI(PBA)について、PEI 導入率と PBA 修飾率(それぞれ High, Medium, Low)に基づいて、例えば Chitosan-PEI<sub>High</sub>(PBA<sub>Medium</sub>)のように表記し、Chitosan-PEI<sub>High</sub>(PBA<sub>Medium</sub>)からなるポリプレックスは P(H/M)と表記する。

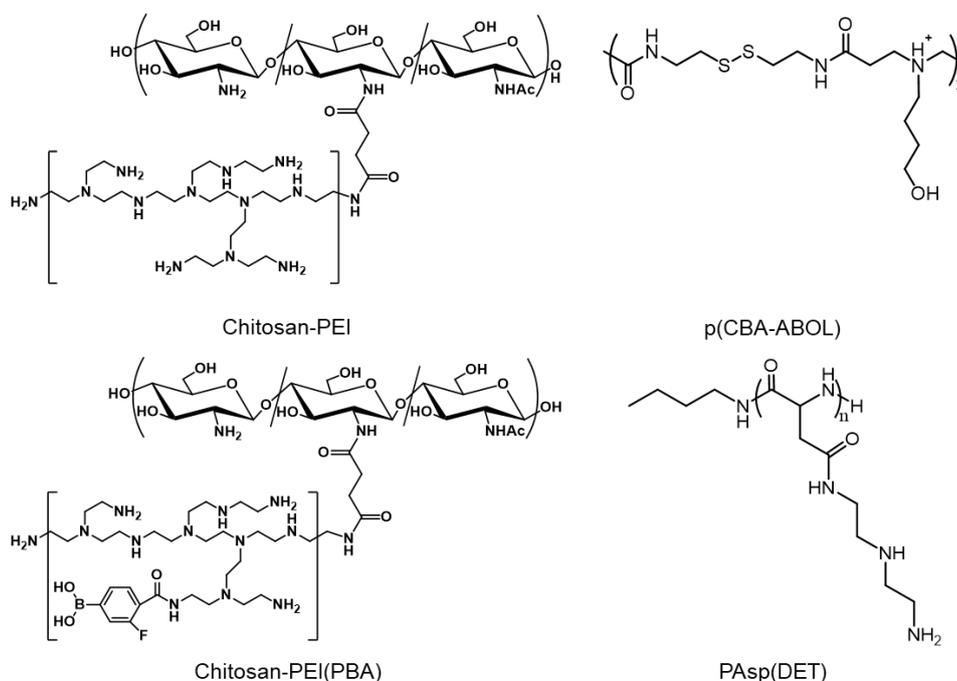


Figure 1. Chemical structures of synthesized polymers

## 2. ポリプレックスの調製及び遺伝子発現試験

合成したブロック共重合体と GFP をコードしたレポーター-pDNA からポリプレックスを調製した。調製したポリプレックスは動的光散乱(DLS)測定により評価した。DLS 測定結果を Table 1 に示す。いずれの高分子を用いても 108~195nm の粒子形成が確認された。

調製したポリプレックスを利用して遺伝子発現試験を行った。GFP をコードした pDNA 内包ポリプレックスを hMSC 細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリー分析により GFP 発現

Table 1. Size and polydispersity index (PDI) of polyplexes evaluated by DLS measurement.

	Size (nm)/ PDI		
	PEI <sub>Low</sub>	PEI <sub>Medium</sub>	PEI <sub>High</sub>
PBAなし	—	188/ 0.23	—
PBA <sub>Low</sub>	185/ 0.15	182/ 0.15	195/ 0.14
PBA <sub>Medium</sub>	169/ 0.16	131/ 0.19	136/ 0.24
PBA <sub>High</sub>	116/ 0.18	108/ 0.14	114/ 0.17

p(CBA-ABOL)ポリプレックス…103nm/ 0.19

PAsp(DET)ポリプレックス…122nm/ 0.20

細胞を定量評価したところ、p(CBA-ABOL)からなるポリプレックス及び Chitosa-PEI(PBA)からなるポリプレックスの内 P(M/H)、P(H/H)において高いトランスフェクション効率が得られた(Figure 2)。コントロールとして市販されている脂質性遺伝子導入試薬である Lipofectamine 3000 と比較しても優位に高い発現が得られ、これら2種類のポリプレックスの有用性が示唆された。その要因として、エンドソーム脱出能と細胞内環境に反応した内包 pDNA 放出能を兼ね備えていることが考えられる。ここでは新規に合成された Chitosan-PEI(PBA)からなるポリプレックスに関して、ATP に反応した内包 pDNA 放出能を評価した。ゲル電気泳動図に示すように、ATP 非存在下では内包 pDNA 放出が確認されなかった一方で、細胞内 ATP 濃度環境下では内包 pDNA の放出が確認された(Figure 3)。これらの結果から、Chitosan-PEI(PBA)からなるポリプレックスは細胞内 ATP 濃度応答性を有していることが示唆され、この細胞内 ATP 濃度応答性が高い遺伝子発現効率に寄与したと考える矛盾しない。

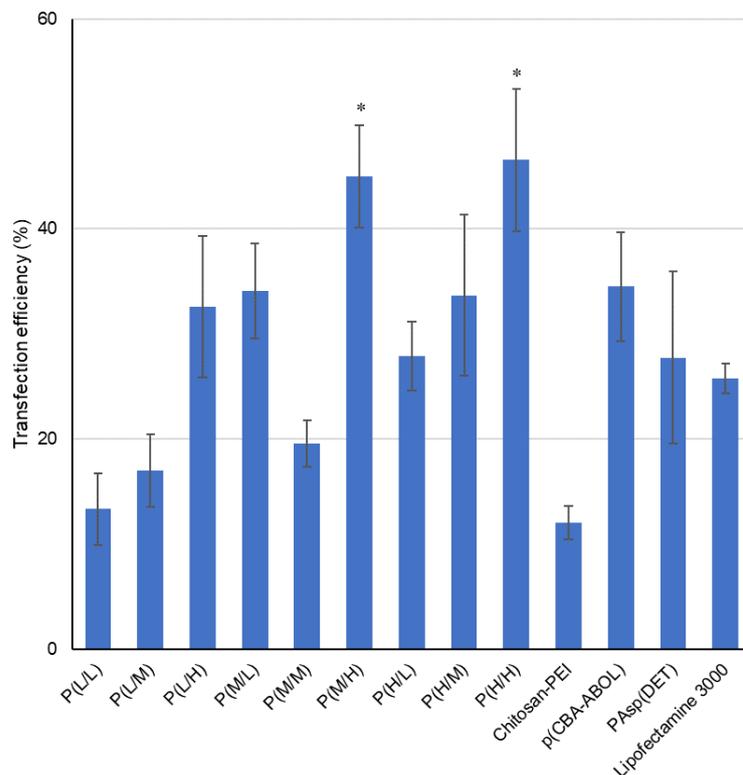


Figure 2. Transfection efficiency of polyplexes into hMSC cell lines. \*  $p < 0.05$

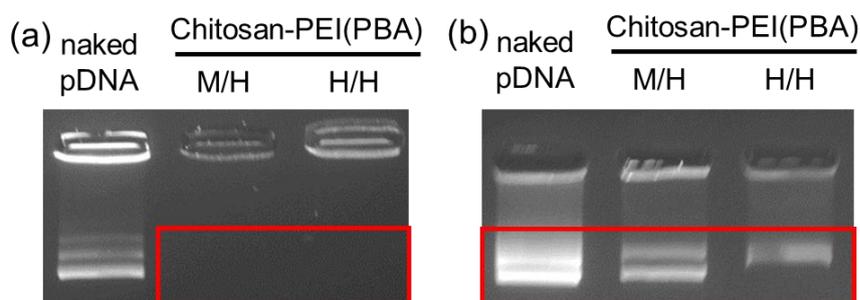


Figure 3. Electrophoresis of Chitosan-PEI(PBA) polyplexes incubated (a) without or (b) with ATP

### 3. ポリプレックスの細胞内動態観察

優れた遺伝子発現効率を示した Chitosan-PEI(PBA)からなるポリプレックスに関して、細胞内動態を評価した。まず、共焦点顕微鏡観察を用いてエンドソーム脱出効率を評価したところ、PBA 基を導入することでエンドソーム脱出効率が向上することが確認された(Figure 4)。これは後期エンドソーム pH に反応して疎水化した PBA 基がエンドソーム膜を傷害し、エンドソーム脱出を促進させたためであると考えられる。さらに、2種類の蛍光分子 Cy3 と Cy5 で二重蛍光標識化した pDNA を内包するポリプレックスを用いて、細胞内での pDNA 放出を観察した。二重蛍光標識化された pDNA はポリプレックスに内包されると、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって、ドナー分子の励起によってアクセプター分子の蛍光を確認することができる。この FRET シグナルを培養細胞内で確認したところ、PBA 基をもつポリプレックスでは PBA 基を持たないものと比較して、速やかな FRET

シグナルの減少を示した。この結果は、PBA 基を持つポリプレックスは細胞内 ATP に応答して内包する pDNA を実際に放出していることを示唆しており、この結果は Figure 3 で得られた ATP 応答性試験と一致する。

#### 4. iN 細胞の作製

PBA 基をもつポリプレックス(P(H/H))を利用して、iN 細胞の作製を試みた。3 種類の BAM 因子をそれぞれコードする pDNA を用意し、それらを内包するポリプレックスを利用した。ポリプレックス投与から 10 日後に神経細胞マーカーである Tuj1 を染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。Figure 5 に示すように、いくつかの細胞で Tuj1 発現が確認され、神経細胞に分化したことが示唆された。しかしながら、その分化効率は~1%程度であり、pDNA 投与量やトランスフェクション条件の最適化など、今後更なる効率化が求められる。

#### 参考文献

- [1] T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Südhof and M. Werning, "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors.", *Nature* 463, 1035-1041 (2010).
- [2] C. Lin, Z. Zhong, M. C. Lok, X. Jiang, W. E. Hennink, J. Feijen, J. F. Engbersen, "Novel Bio-reducible Poly(amido amine)s for Highly Efficient Gene Delivery.", *Bioconjugate Chem.* 18 (1), 138-145 (2007)
- [3] 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 (48), 16287-16294 (2008).
- [4] P.-Y. Lin, Y.-L. Chiu, J.-H. Huang, E.-Y. Chuang, F.-L. Mi, K.-J. Lin, J.-H. Juang, H.-W. Sung and K. W. Leong, "Oral Nonviral Gene Delivery for Chronic Protein Replacement Therapy", *Adv. Sci.* 5, 1701079 (2018).
- [5] N. Yoshinaga, T. Ishii, M. Naito, T. Endo, S. Uchida, H. Cabral, K. Osada, and K. Kataoka, "Polyplex micelles with phenylboronate/gluconamide crosslinking in the core exerting promoted gene transfection through spatiotemporal responsiveness to intracellular pH and ATP concentration." *J. Am. Chem. Soc.* 139 (51), 18567-18575 (2017)
- [6] Z. Liu, O. Chen, B. J. Wall, M. Zheng, Y. Zhou, L. Wang, H. R. Vaseghi, L. Qian, and J. Liu, "Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector", *Sci. Rep.* 7, 2193 (2017).

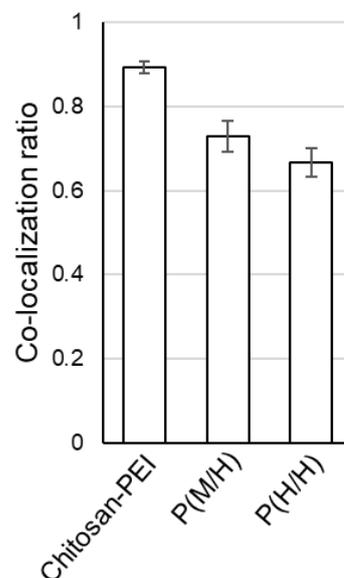


Figure 4. Co-localization ratio of polyplexes with late endosomes/lysosomes

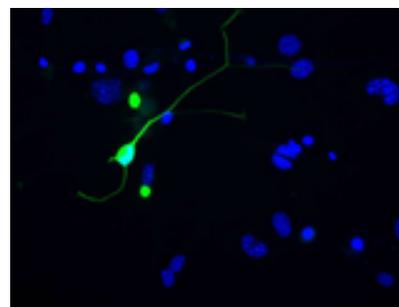


Figure 5. Fluorescence microscopy observation of Tuj1<sup>+</sup> cells. Green: Tuj1<sup>+</sup>, and Blue: cell nuclei