

## MERIT 長期海外派遣報告書

マテリアル工学専攻修士2年 町谷香織

2013年10月より3ヶ月間、オランダのエントレヒト大学薬学部長、Wim Hennink 教授のもとに滞在し、研究室メンバーの一員として研究を行った。本研究室は、2013年3月のMERIT 短期海外派遣の際にも訪れた研究室であり、近年がん等の難治性遺伝疾患の革新的治療法として注目を集める遺伝子治療の研究開発を行っている。遺伝子治療の臨床応用実現のためには、治療遺伝子をコードした核酸医薬の体内動態を的確に制御し、標的部位に送達する遺伝子キャリアの開発が不可欠である。遺伝子キャリアとしては、poly(ethylene glycol) (PEG)とポリカチオンのブロック共重合体が核酸と形成するポリイオンコンプレックスミセル (ポリプレックスミセル)にかけられる期待が大きいものの、そのカチオン性に起因した体内での毒性を低減することが大きな課題の一つとなっている。今回3ヶ月の滞在期間中この解決に向け、博士過程の学生である Luis Novo 氏の監督のもと、核酸医薬としてよく用いられる plasmid DNA (pDNA)および small interfering RNA (siRNA)が

p(HPMA-DMAE-co-PDTEMA)-*b*-PEG (pHDP-PEG,

Figure 1.)と形成するポリプレックスミセルの改良に取り組んだ。pHDP-PEG は Novo 氏が近年開発したポリマーであり、①核酸と PDTEMA の静電相互作用によるポリプレックスミセルの形成、②ジスルフィド架橋によるポリプレックスミセルの構造固定化、③加水分解によるカチオン鎖の切断に起因した脱カチオン化、という3つのプロセスにより、カチオン性を有さないポリプレックスミセルの形成を可能とする<sup>1</sup>。従ってこのシステムにおいては毒

性の低減が大きく期待される<sup>1</sup>。しかしながらその反面、静電相互作用を利用せずジスルフィド架橋のみによってポリプレックスミセル内に核酸を保持する要求は、その安定性を大きく低下させる。この問題は特に、短鎖長の核酸を使用する場合に顕著であり、核酸として pDNA (数千 bp)を使用する場合には大きな問題とはなっていないものの、siRNA (21~23 bp)を使用する場合にはポリプレックスミセルの構造安定化は困難を極めていた。

そこで今回、3ヶ月間の長期海外派遣期間内にこのシステムの改良に取り組み、その成果として siRNA をポリプレックスミセル内に安定に保持することの実現に至った。具体的にはまず、既に調製法が確立されていた pDNA 内包ポリプレックスミセルについて動的光散乱法等の解析を行い、ジスルフィド架橋が複数のポリプレックスミセル間にまたがって形

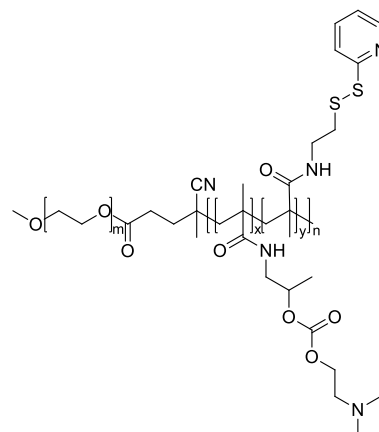


Figure 1. Chemical structure of the p(HPMA-DMAE-co-PDTEMA)-*b*-PEG

成されていることがその安定性を低下させるひとつの要因となっている可能性を見出した。次に、これまで使用されてきた架橋剤に替わる架橋剤を検討し、従来通りの機能を発揮しつつ単一のみセル内で安定な架橋構造を形成するものを見出した。この架橋剤を用いることで、ジスルフィド架橋による核酸の保持がより強固となり、siRNA の安定な内包が可能となるのではないか、との期待のもと siRNA 内包ポリプレックスミセルを調製したところ、実際に安定な siRNA 内包ポリプレックスミセルの形成が確認された。ここで開発したミセルは現在 Novo 氏により、*in vitro*, *in vivo* での治療遺伝子発現効率の評価が行われている。

本テーマは私の東京大学での研究と類似の着眼点を持っていたことから、新たな実験操作を多く学びつつも主体的に実験を進め、研究室のメンバーと闊達に議論しながら研究を進めることが出来た点は有意義であった。その中で、滞在先研究室のメンバーに尊敬の念を抱くと同時に、これまで抱いていた「海外の学生」に対する漠然とした恐怖感は薄れてゆき、ヨーロッパの学生もまた東京で研究をする自分と同様に悩みながら地道に研究を進める仲間であると認識するに至ったのは、上記の研究成果を得たこと以上に、私が今回の長期海外派遣で大きく成長した点であったのではないかと感じている。

さらに、国際学会への参加等での一時的な交流では得られない、研究の枠を超えた知識の交流も、本長期海外派遣プログラムの醍醐味ではないかと感じた。その一番の機会となったのは毎日の昼食時、一時間程度の雑談である。オランダ人、スペイン人、ポルトガル人、イラン人、インドネシア人、中国人の博士研究員や学生と私が集って昼食を取るのが常であったが、その中では研究の話題やくだらない話題以上に、政治・経済・歴史・文化・人脈・将来のビジョン等について語り合うことが多かった。特に人脈や将来のビジョンについては我々日本人学生より遥かに重要視しており、これまでの自分の無関心さに危機感を感じた。また、ヨーロッパ各国の国民性や文化を話題に取り上げ、その中でそれぞれどのようにビジネスを進めてゆくのが最適か、などと談義したのは視野を広げた。

以上のように本長期海外派遣は、将来的に産官学のいずれかに携わるにあたって、あるいはその複数にまたがって携わるのにあたって持つべき国際的視野を身につけるための大きな助けとなった。今後この経験と芽生えた興味関心とを生かし、幅広く国際的な視野と鋭い洞察力を持った研究者となるべく邁進してゆきたい。

## 謝辞

今回このような機会を提供して下さったMERITプログラム、およびHennink教授をはじめとする受け入れ先研究室の皆様深く感謝致します。今後一層研究活動に力を入れるとともに、残り3年間のMERITプログラムを通じていっそうの成長を目指して参ります。

## Long-term overseas dispatch program in Utrecht University

Kaori Machitani

I have done long-term overseas dispatch program to take part in research activities in Utrecht University for three months, from October 2013. Professor Wim Hennink, who is a head of pharmaceuticals department, accepted me kindly to join his group. I had been interested in his group because their main focus is on gene therapy, which coincides with my research topic in the University of Tokyo. Moreover, I had once visited his laboratory in March 2013 as short-term overseas training by MERIT, and given an offer from him for short stay. Indeed, I was eager to learn from him, so it was a great opportunity to find this program as a chance to actualize it.

To demonstrate gene therapy, gene delivery system, sending therapeutic genes and promoting protein expression at the target sites, is inevitable. On this point, polymeric micelle, which is formed by polyion complexation between nucleic acid and block copolymer of poly(ethylene glycol)-*b*-polycation (polyplex micelle), is an attractive system. However, cytotoxicity due to cationy of the polyplex micelle still remains as a big problem.

Concerning this, I carried out a study with help of Luis Novo, a doctoral course student there, on establishing feasible low-cytotoxic gene delivery system with polyplex micelle formed between p(HPMA-DMAE-*co*-PDTEMA)-*b*-PEG (pHDP-PEG, Figure 1.) and plasmid DNA (pDNA) or small interfering RNA (siRNA); both are often used nucleic acids to code therapeutic genes in gene therapy. pHDP-PEG was recently synthesized polymer by Luis, and it had enabled formation of polyplex micelle without cationic chain by 3 step process<sup>1</sup>; ①Formation of polyplex micelle driven by charge neutralization between nucleic acid and pHDP-PEG, ②Stabilization of polyplex micelle structure by formation of disulfide crosslinking, ③Decationization of polyplex micelle by cutting off cationic chain by hydrolysis reaction<sup>1</sup>. Indeed in this system, cytotoxicity was confirmed to be low by *in vitro* experiment<sup>1</sup>. However, the decationization simultaneously causes destabilization of polyplex micelle, because it requires entrapment of nucleic acid inside polyplex micelle stably, without electrostatic interaction, but only with disulfide crosslinking. As this problem is more significant for shorter nucleic acids, it seemed almost impossible to apply this system on siRNA (21 ~ 23 bp), although pDNA could be nicely entrapped inside polyplex micelle only with disulfide crosslinking.

However, as a result of my three months research, I managed to modify the system and

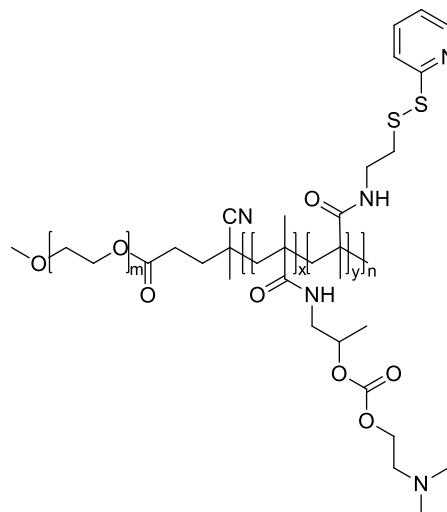


Figure 1. Chemical structure of the p(HPMA-DMAE-*co*-PDTEMA)-*b*-PEG

achieved to make it applicable for siRNA. First of all, I analyzed pDNA polyplex micelle prepared with previous method, and brought up a hypothesis that formation of crosslinking between several polyplex micelles may be contributing on destabilization. Then, I sought a substitutional crosslinking reagent, and found out one which enables formation of disulfide bond only inside single polyplex micelle, without degrading its bio-functionality as a gene carrier. With an expectation that this crosslinking reagent may enable tighter entrapment of nucleic acid inside polyplex micelle, siRNA polyplex micelle was prepared. As a result, indeed it was confirmed that siRNA was stably entrapped inside decationized pHDP-PEG polyplex micelle. This polyplex micelle is now under investigation on its bio-functionality, with *in vitro* and *in vivo* experiments by Luis.

Through the research activities, I admired the lab members that they process research very efficiently with less waste of time. Not only that, thorough many of fruitful discussions with lab members, I could also feel “foreign students” are same to me on the point that they are also struggling everyday and trying to solve problems step by step as I do in Japan. Indeed, I thought it was a good change of me that I could feel them as not superhuman beings but my colleagues.

In addition, I thought another relish of this program was to discuss things besides science, which maybe difficult to experience in such short meeting as conferences. In my case, lunchtime was the best chance to have conversation with many people. Most of the day, Dutch, Spanish, Portuguese, Iranian, Indonesian, Chinese and I had lunch together and had many talks about politics, economies, histories, cultures, personal connections or future visions, and so on. I was impressed that they regard personal connections as a very important issue and handling it nicely. Also, it helped me a lot to broaden my vision to pick up cultural difference between each country and discuss about what is the most suitable way in business for each of them.

Thus, the long-term overseas dispatch program by MERIT gave me a great opportunity to perceive international visions, in order for me to contribute in any field of industry, government and academia, or even several of them. I will keep on striving to become a great researcher, based on this precious experience I had in this three months.

### Acknowledgment

I would like to express my deepest gratitude to MERIT program that provided me such a great chance. I am also indebted to lab members who gave me enormous helps, especially Prof. Hennink and Luis Novo.