

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16331

研究課題名(和文) ナノ粒子の腫瘍組織での細胞取り込みを促進する新規シェル分子の開発

研究課題名(英文) Development of shell molecule for facilitated cellular internalization of the nanoparticle for tumor cells

研究代表者

武元 宏泰 (Takemoto, Hiroyasu)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：10709249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：制がん剤キャリアとして多用されるコア-シェル型ナノ粒子において、シェル分子の化学構造はその体内動態制御を司る。これに関し、既存のシェルの機能は正常臓器との相互作用抑制に限定されていた。そこで本研究では、がん組織内酸性pHに応答してがん細胞取り込み効率を向上するようにシェル分子の化学構造を設計した。結果として、制がん剤としてsiRNAを用いることで、がん組織内酸性pHにおける細胞取り込み促進および薬理効果増大を達成した。

研究成果の概要(英文)：The chemical structure of the shell molecule in core-shell type nanoparticle is important for regulating biodistribution of the nanoparticle. In this regard, the functionality of the conventional shell molecule is often restricted to stealth ability. Thus, in this study, a new type of shell molecule that facilitates cellular uptake of the nanoparticle in tumorous acidic condition was developed. Consequently, the nanoparticle loading siRNA as an anticancer reagent achieved enhanced cellular uptake efficacy in response to tumorous acidic condition, followed by the potent medicinal effect.

研究分野：生体高分子、バイオマテリアル

キーワード：生体高分子 バイオマテリアル 核酸医薬 高分子化学

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子型の制がん剤（低分子薬物や核酸分子）キャリアは制がん剤を担持するコアと体内動態を制御するシェルとから形成される。ここで、シェル分子（代表的にはポリエチレングリコール（PEG））は、コアと正常組織との相互作用を抑制する（ステルス性）ことで薬物の血中滞留性延長を可能とし、サイズに由来する腫瘍組織への浸透性と相まって腫瘍組織への集積を可能としている。しかし、がん組織においてはステルス性のがん細胞への取り込み阻害に働くため、効率的ながん治療にはがん組織でのナノ粒子の細胞取り込み効率を向上させる必要がある。

2. 研究の目的

がん組織内環境に応答して化学構造を変化させ、細胞取り込みを促進するようなシェル構造を開発する。得られたシェル分子は正常組織ではステルス性を発揮するため、がん細胞選択的な制がん剤取り込み効率向上を実現する。これに関し、申請者はがん組織における特異的な酸性 pH に着目した。がん組織は嫌気性代謝の亢進により乳酸等の酸性代謝物が組織内に多く存在し、結果として pH が ~6.5 まで低下している。そこで、正常組織における pH7.4 では応答しないが、pH~6.5 で応答するようにシェル分子の化学構造を設計することで、目的を達成する。

3. 研究の方法

本研究の目的は、ナノ粒子の腫瘍組織における細胞取り込みを促進するシェル分子の開発である。本研究は大きく(1)高分子の合成、(2)ナノ粒子へのコーティングおよび pH 応答評価、(3)新規シェル分子で被覆されたナノ粒子の生物学的評価、で構成される。(1)、(2)において、血液中及び正常組織内・腫瘍組織内 pH に応答したステルス性等を有しており、なおかつ、生体適合性に優れた高分子の化学構造を選出する。さらに、選出された高分子にてコーティングされたナノ粒子の細胞取り込みを(3)にて評価する。

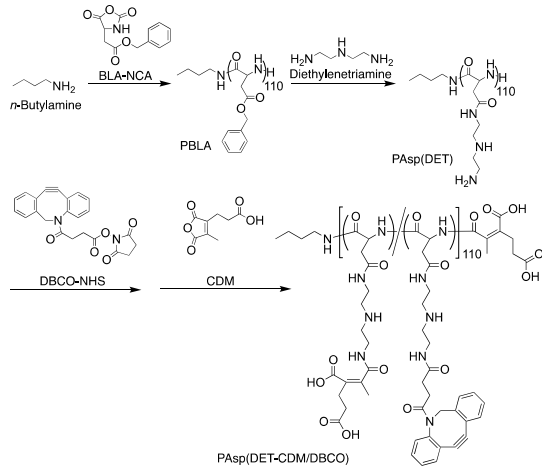
まず、制がん効果を有する薬物として siRNA (small interfering RNA) を選択し、それを内包するナノ粒子の表面をシェル分子にて被覆することにした。ここで、pH 応答性を有する化学構造としてマレイン酸アミド誘導体の応用を着想した。マレイン酸アミド誘導体は正常組織における pH7.4 では比較的安定だが、酸性 pH においては加水分解を介してアミノ基を露出する。つまり、がん組織に相当するような酸性環境においてはアミノ基を露出することでカチオン性となり、アニオン性の細胞膜との静電的な相互作用を介して取り込み促進が期待される。

4. 研究成果

(1)シェル分子の合成

ポリアスパラギン酸側鎖にエチレンジアミン構造を有する PAsp(DET) に対し、マレイン酸アミドの誘導体及びシクロオクチン基を導入した PAsp(DET-CDM/DBC) を合成した

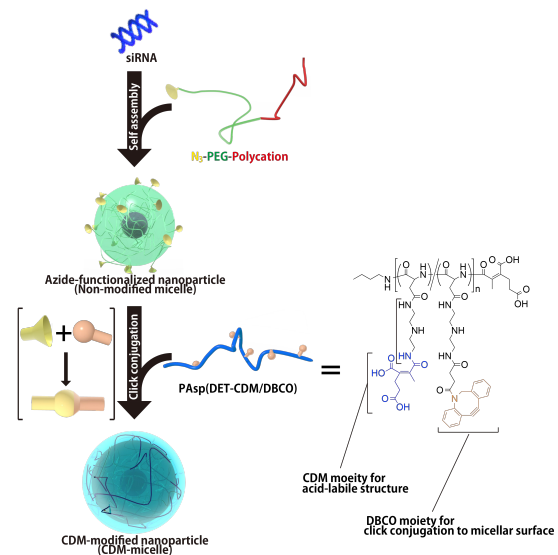
(図1) NCA法によりポリアスパラギン酸のベンジル保護体を合成し、アミノリシス反応にてエチレンジアミン構造を導入した。続けて、DBCO-NHS 及びマレイン酸無水物誘導体との反応により目的物を得た。重合度 110 のポリアスパラギン酸に対し、約 5 個の DBCO 基が側鎖に導入されたことが ¹H NMR にて確認された。



(図1 PAsp(DET-CDM/DBC)の合成スキーム)

(2)ナノ粒子の調製及びその物理化学的評価

末端にアジド基を有する PEG とポリカチオンとのブロック共重合体を調製し、アニオン性を有する核酸である siRNA を内包する粒子を調製した。得られた粒子は表面にアジド基が露出した構造を有することが期待される。得られた粒子と PAsp(DET-CDM/DBC) とを水中にて混合することで（クリック反応）結合し、目的物であるシェル分子でコーティングされたナノ粒子を調製した（図2）。



(図2 ナノ粒子の調製スキーム)

得られたナノ粒子を動的光散乱法にて解析すると、およそ 40nm の流体力学的直径を有していた。また、電位を測定すると、PAsp(DET-CDM/DBC) コーティング前後にお

いて+4mV から-3mV に変化したことから、シェル分子での被覆の成功を確認した。このことは、アジド基を表面に有する粒子に対してはシクロオクチン基を有する高分子にて簡便に表面修飾可能であることを示している。さらに、マレイン酸アミド誘導体の応答性を確認するために酸性 pH (6.7 及び 5.0) にてナノ粒子を処理したところ、電位の上昇が確認された。このことから、がん組織内のような酸性環境においてはナノ粒子最外殻のシェルが応答し、マレイン酸アミド誘導体の加水分解を介してアミノ基の露出及びカチオン性への変化することが示唆される。また、シェル分子を血清存在下にて処理してもその流体力学的直径に変化がなかったことから、たんぱく質の吸着等もなく、良好なステルス性を示すことが明らかとなっている。

(3) ナノ粒子の生物学的評価

シェルでコーティングされたナノ粒子に関し、培養がん細胞を用いて酸性 pH 依存的な細胞取り込みを評価した。がん組織内環境に相当する pH6.7 にて細胞取り込み試験を行った結果、正常組織に相当する pH7.4 に比べて有意に多くの siRNA を細胞内に送達できた。一方で、pH 応答性を有さないシェル (PAsp(DET-Suc/DBCO)) にてコーティングしたナノ粒子に関しては、pH に応答した細胞取り込み量の変化は見られなかった。このことから、マレイン酸アミド誘導体をシェルとして応用することで、がん組織に相当するような酸性 pH 選択的に細胞取り込みを向上するナノ粒子の調製が可能であることが明らかとなった。さらに、siRNA として polo-like kinase 1 (PLK1) を標的とするものを用いて遺伝子発現抑制試験を行った。PLK1 の遺伝子発現抑制は細胞分裂の阻害を介してがん細胞を殺傷することが出来るため、制がん剤としての応用が期待されている。結果として、PAsp(DET-CDM/DBCO) にてコーティングしたナノ粒子は酸性 pH6.7 においてより強力な遺伝子発現抑制を誘導可能であった。

(4) 考察

本研究を介して、がん組織内環境選択的にカチオン性へと変化するシェルを設計することで、がん細胞への効率的な取り込みを誘導可能であることが明らかとなった。また、正常組織との pH の差異は小さいため (正常組織内 pH は 7.4 でがん組織内 pH は 6.7) この差異を鋭敏に認識する化学構造が重要であるが、マレイン酸アミド誘導体の有用性がここで実証され、かつ、そのナノ粒子へのコーティング技術の確立にも成功した。

ナノ粒子のシェルとして PEG の有用性が見出されて 20 年以上が経過するが、いまだにその体内動態制御能を超越するシェル分子は見出されておらず、新規材料の開発が要求されている。これに関し、今回開発したシェル分子はステルス性のみでなくがん細胞への取り込み能という機能を付与したものであり、ステルス性に特化した PEG とは異なる

分子設計概念となっている。がん細胞への取り込み能促進だけでなく、たんぱく質の吸着等も認められなかったことから良好なステルス性をも兼備していると期待される本素材の設計指針は、今後の制がん剤およびそのキャリア開発において大きな影響を与えると予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Chih-Hao Huang, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, and Nobuhiro Nishiyama “Utility of 2-Nitrobenzenesulfonamide Group as a Chemical Linker for Enhanced Extracellular Stability and Cytosolic Cleavage in siRNA-conjugated Polymer System” *ChemMedChem*, 12 (2017) 19-22, 査読あり, DOI: 10.1002/cmdc.201600488.

(2) Noor Faizah Che Harun, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, and Nobuhiro Nishiyama “Artificial Control of Gene Silencing Activity Based on siRNA Conjugation with Polymeric Molecule Having Coil-Globule Transition Behavior” *Bioconjugate Chemistry*, 27 (2016) 1961-1964, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00322.

(3) Montira Tangsangasakri, Hiroyasu Takemoto, Mitsuru Naito, Yoshinori Maeda, Daiki Sueyoshi, Hyun Jin Kim, Yutaka Miura, Jooyeon Ahn, Ryota Azuma, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka “siRNA-loaded polyion complex micelle decorated with charge-conversional polymer tuned to undergo stepwise response to intra-tumoral and intra-endosomal pHs for exerting enhanced RNAi efficacy” *Biomacromolecules*, 17 (2016) 246-255, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01334.

(4) Kotaro Hayashi, Hiroyuki Chaya, Shigeto Fukushima, Sumiyo Watanabe, Hiroyasu Takemoto, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka “Influence of RNA strand rigidity on polyion complex formation with block cationers” *Macromolecular Rapid Communication*, 37 (2016) 486-493, 査読あり, DOI: 10.1002/marc.201500661.

(5) Hui Gao, Hiroyasu Takemoto, Qixian Chen, Mitsuru Naito, Hirokuni Uchida, Xueying Liu, Kanjiro Miyata and Kazunori Kataoka “Regulated protonation of polyaspartamide derivatives bearing repeated aminoethylene side chains for efficient intracellular siRNA delivery

with minimal cytotoxicity” *Chemical Communications*, 51 (2015) 3158-3161, 査読あり, DOI: 10.1039/C4CC09859E.

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) Hiroyasu Takemoto, Huang Chih-Hao, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, Nobuhiro Nishiyama “2-Nitrobenzenesulfonamide group as a chemical linker with highly selective cleavability in response to intracellular redox system for a construction of siRNA-polymer conjugate.” 253rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, San Francisco, CA, USA, 4/2/2017-4/6/2017.

(2) Abdul-Hackam Ranneh, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Makoto Matsui, Keishiro Tomoda, Nobuhiro Nishiyama “Development of stealth shell based on polycarboxybetaine structure tuned to selectively interact with cells in tumor extracellular acidic pH” 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 3/24/2017-3/27/2017.

(3) Noor Faizah Che Harun, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, Nobuhiro Nishiyama “Artificial control of siRNA bioactivity based on the phase transition behavior of the conjugated polymeric molecule” The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 福岡, 12/13/2016-12/16/2017.

(4) Huang Chih-Hao, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, Nobuhiro Nishiyama “2-nitrobenzenesulfonamide groups as a chemical linker with enhanced extracellular stability and redox-sensitive cleavability for siRNA-conjugated polymer system” The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 福岡, 12/13/2016-12/16/2017.

(5) Noor Faizah Che Harun, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, Nobuhiro Nishiyama “Development of siRNA-conjugated polymer with coil-globule transition behavior for an artificially controlled gene silencing activity” 第 65 回高分子学会討論会, 横浜, 9/14/2016-9/16/2016.

(6) Noor Faizah Che Harun, Hiroyasu Takemoto, Takahiro Nomoto, Keishiro Tomoda, Makoto Matsui, Nobuhiro Nishiyama “Development of thermoresponsive polymer-siRNA conjugates for controlled RNAi activity” 第 65 回高分子学会年次大会, 神戸, 5/25/2016-5/27/2016.

(7) Hiroyasu Takemoto, Kanjiro Miyata, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka

“Accelerated Polymer-siRNA Conjugation Based on Freezing-Thawing Treatment” The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), 横浜, 10/18/2015-10/22/2015.

(8) 武元 宏泰, Gao Hui, 宮田 完二郎, 西山 伸宏, 片岡 一則 “PIC型siRNAデリバリーに向けたポリカチオン側鎖構造の改変と細胞内胴体制御への展開” 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 7/2/2015-7/3/2015.

(9) 武元 宏泰, 宮田 完二郎, タンサガサクスリ モンティラ, 内藤 瑞, 前田 芳周, キム ヒュンジン, 西山 伸宏, 片岡 一則 “酸性 pH 応答性高分子を表層に搭載した高分子ミセルの構築と siRNA デリバリーへの応用” 第 64 回高分子学会年次大会, 札幌, 5/27/2017-5/29/2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: pH 応答性ポリマー及び薬物送達システム

発明者: 武元 宏泰, 西山 伸宏, ラネー アブドゥル ハカム, 友田 敬土郎, 野本 貴大, 松井 誠

権利者: 東京工業大学

種類: 特許

番号: 2016-243749

出願年月日: 12/15/2016

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武元 宏泰 (TAKEMOTO, Hiroyasu)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号: 10709249

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし