

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20831

研究課題名（和文）腫瘍原発巣および微小転移巣への革新的な核酸送達ナノシステムの創製

研究課題名（英文）Development of nucleic delivery system for targeting primary and metastatic tumor

研究代表者

佐藤 悠介（SATO, Yusuke）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10735624

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）：ナノ粒子によるがん組織への核酸送達においては、ナノ粒子ががん組織に到達後に組織深部まで浸透できずに標的のがん細胞へ到達できないというがん組織内動態の制約が大きな問題となっている。本研究では上記問題を解決するため、脂質ナノ粒子の粒子径を小さく高精度に制御するための新規脂質様材料の開発および粒子化手法の検討を行った。加えて、脂質ナノ粒子の小型化に伴って核酸導入効率が低下するという問題を解決するため、その原因の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：Limitation of diffusion of lipid nanoparticles (LNP) in tumor tissues is a severe problem for development of tumor-targeted short interfering RNA (siRNA) delivery system. In this research, to solve the problem, I developed a technology for controlling LNP size and elucidated the cause for a reduced efficiency of siRNA delivery, which is accompanied by downsizing of the siRNA-loaded LNPs.

研究分野：薬物送達学

キーワード：脂質ナノ粒子 核酸送達 粒子径 がん浸透性 動態制御

1. 研究開始当初の背景

がん新生血管には間隙が存在するため、血中を滞留する 100 nm 程度のナノ粒子はがん組織に蓄積する。この現象は EPR 効果として知られているが、これは増殖の著しいマウスがんモデルで検証された現象であり、成長が遅いヒト患者のがん組織ではナノ粒子の浸透がほとんど認められない事例が最近報告された。また、微小転移巣では原発巣と比べて血管透過性が低いことも指摘されている。さらに、がん組織に豊富に存在する間質が、ナノ粒子の組織内浸透性を物理的に妨げるケースが多く報告されている。最近、東大の片岡らは、抗がん剤搭載高分子ミセルの直径を 30 nm 程度に制御することで間質が豊富な膀胱がん組織におけるミセルの浸透性を著しく改善し、高い抗腫瘍効果を得た。すなわち、ナノ粒子の粒径制御はがん組織内動態に極めて大きな影響を与え、近年その重要性が再認識されている。また、siRNA が細胞質で機能することから、ナノ粒子はエンドソームから効率的に脱出する必要がある (図 1)。脂質型ナノ粒子 (lipid nanoparticle; LNP) は他のナノ粒子製剤と比べて優れた siRNA 導入効率を有するという利点を持つ。しかし、一般的に粒径が大きい (~100 nm) ため、ヒトがん患者のがん組織への均一的な siRNA 送達に難しいと考えられている。すなわち、本研究目的を達成するためには、下記の 2 つの技術の適切な融合が重要であるが、これら両方を十分に満たす DDS は未だに開発されていない。

1. がん組織深部まで浸透可能な極小粒径への制御技術 (体内・組織内動態制御技術)
2. 細胞質への効率的な核酸送達技術 (細胞内動態制御技術)

上記 2 つの技術が融合した DDS は薬物移行が致命的な制約となっているがん治療分野において強く切望されている技術であり、その開発の重要性は言うまでもない。

これまで申請者は、肝臓およびがん組織を標的とした LNP 型 siRNA 送達システムの開発を行ってきた。新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK13 を開発し、肝臓への siRNA 導入効率を従来技術と比べて 100 倍程度、世界最高レベル (ED₅₀ 0.01 mg/kg) にまで向上させた。また、LNP の体内動態を変化させることで、がん組織においても標的遺伝子発現の抑制に成功した。また、抑制効率が 60% 付近で飽和する現象が確認されたため、組織内動態解析を行った結果、標的がん細胞への取り込みが不均一であることが明らかとなった。しかし、小型化した LNP は核酸導入効率が非常に低いことが判明した。

2. 研究の目的

LNP のがん組織浸透性を大幅に向上させるため、LNP を極小 (直径 30 nm 以下) に制御可能な新規両親媒性素材および粒子製造方法の開発を行い、小型化によるがん細胞

標的化能の向上について検証を行う。また、LNP の小型化に伴う核酸導入効率低下の原因を解明することで、体内/組織内/細胞内動態を両立可能な次世代核酸送達システムの開発に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 両親媒性素材の設計による *in vivo* で安定な超極小粒子の開発

疎水性アンカーと親水性高分子から構成される両親媒性素材を複数合成した。マイクロミキサー内蔵マイクロ流路を用いた粒子製造を行った。動的光散乱法および蛍光相関分光法により平均粒径を測定した。分画分子量の異なる限外濾過膜に対する透過性を評価した。血中における安定性を評価するため、粒子を脂質マーカーである DiI で標識した。また、マウスへ静脈内投与後のナノ粒子血中濃度推移を測定した。疎水性コア成分であるトリオレインを適当な比で混合することで粒径制御を行った。平均粒径 10 nm および 50 nm の粒子のヒト結腸がん細胞皮下移植モデルにおけるがん組織内浸透性を蛍光顕微鏡観察により比較した。

(2) LNP の小型化に伴う siRNA 導入効率低下の原因解明

マイクロミキサー内蔵マクロ流路により LNP を製造することで、再現性の高い粒径制御を行った。用いる PEG-DMG 量を 1 および 3 mol% とすることで、平均粒径でそれぞれ 65 および 35 nm の LNP を製造した (以下、それぞれ 1%PEG-LNP および 3%PEG-LNP と表記する)。 *In vitro* 培養細胞において血清存在下および非存在下における各粒径の LNP の siRNA 導入活性を比較することで血清の影響を検討した。細胞内取り込みおよび蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した LNP の血清存在下における siRNA 漏出性を評価した。蛍光色素である *p*-Toluenesulfonic acid (TNS) および Laurdan により、1%PEG-LNP と 3%PEG-LNP のそれぞれ相対的な総表面積および脂質膜表面付近の水和度を求めることで、粒径が脂質パッキングへ及ぼす影響について検討した。さらに、LNP を静脈内投与してから siRNA を細胞質へ送達する一連のプロセスを模倣した *in vitro* 評価系により、LNP の粒径がエンドソーム脱出能に与える影響を評価した。siRNA のエンドソームからの脱出を蛍光顕微鏡により観察した。最後に、LNP の小型化に伴う活性低下の克服を目指した複数の新規 pH 感受性カチオン性脂質の分子設計および化学合成を行い、*in vitro* 培養細胞系における siRNA 導入活性を検討した。

(3) 血中滞留性極小 LNP の構築とがん細胞標的化能の検討

マイクロ流路により製造した直径 35 nm

の極小LNPをPEG修飾することで血中滞留化させた。siRNAおよび脂質をそれぞれ異なる蛍光色素で標識することで、それぞれの血中濃度推移の測定および血中でのsiRNA保持能の評価を行った。ヒト結腸がん由来Huh7細胞皮下移植モデルにおいて、LNPのがん細胞標的化能をフローサイトメトリーにより評価した。互いに同等の血中滞留性を示す直径55 nmおよび35 nmのLNP(以降、それぞれLarge LNPおよびSmall LNPと表記する)を蛍光標識し、坦がんマウスに静脈内投与してから24時間後のがん組織を回収し、抗体染色後、LNPの取り込み量およびその均一性についてフローサイトメーターにより解析した。

4. 研究成果

(1) 超極小粒子の開発

両親媒性素材をマイクロミキサー内蔵マイクロ流路により粒子化することで、最小で直径約9 nmの超極小粒子を製造することに成功した(図1A)。腎排泄の分子量下限値である分画分子量50 kDaの限外濾過膜は透過しない一方で、分画分子量100 kDaの限外濾過膜透過性は非常に高いことが明らかとなった(図1B)。また、本ナノ粒子はマウスに静脈内投与した際に高い血中滞留性を示すことが明らかとなった(図1C)。即ち、血中における安定性が高く、かつ腎排泄を受けない最小粒子径の超極小粒子の製造に成功したと言える。また、ナノ粒子の構成物質として様々な割合で疎水性脂質であるトリオレインを混合することで、ナノ粒子の粒子径を61 nmまで任意に調節することに成功した(図1A,C)。がん組織でのナノ粒子浸透性における粒子径の影響を評価するため、直径10 nmおよび50 nmのナノ粒子をそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、ヒト結腸がん細胞Huh7皮下移植モデルマウスに静脈内投与した際のナノ粒子のがん組織内分布を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、直径約50 nmのナノ粒子は血管およびそのごく近傍にのみ局在していた一方で、直径約10 nmのナノ粒子は血管から数百 μm 離れた深部まで効率的に浸透可能であることが明らかとなった(図1D)。

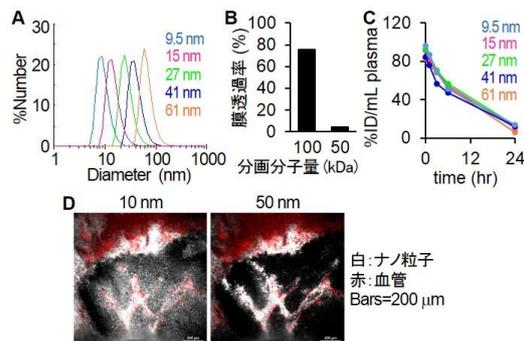


図1 超極小粒子の製造と血中滞留性およびがん組織浸透性評価

以上より、血中安定性およびがん組織浸透性に優れた超極小粒子の製造に成功した。本ナノ粒子はその特徴から疎水性薬物を搭載可能であるため、疎水性抗がん剤キャリアとしての有用性を示すとともに、siRNAなどの核酸キャリアとしての高機能化を検討中である。

(2) LNPの小型化に伴うsiRNA導入効率低下の原因解明

1%PEGおよび3%PEG-LNPの*in vitro*培養細胞における遺伝子ノックダウン活性を評価した。その結果、血清非存在下では同等の活性を示した(図2A)一方で、血清存在下では3%PEG-LNPの活性は著しく低下した(図2B)ことから、3%PEG-LNPは血清の影響を強く受けることが明らかとなった。

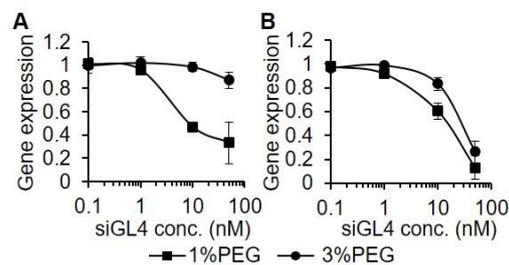


図2 *In vitro*培養細胞における遺伝子ノックダウン活性評価

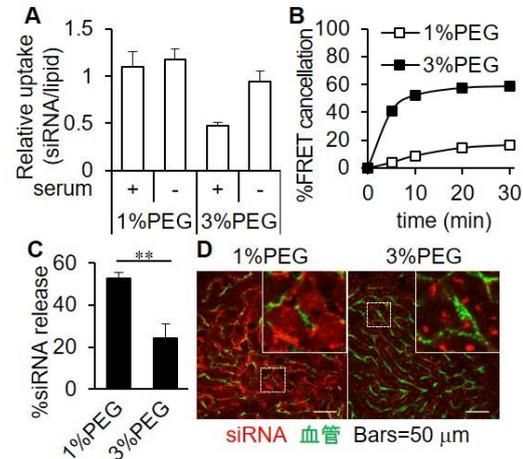


図3 siRNA漏出性およびエンドソーム脱出能評価

活性低下の原因を明らかにするため、まずは血清中でのLNPの安定性に着目した。細胞内取り込みを測定した結果、血清存在下で3%PEG-LNPによるsiRNA導入量は顕著に低下した(図3A)。また、FRETペア(Cy3およびCy5)で蛍光標識したsiRNAを用いて血清中におけるLNPからのsiRNA漏出性を評価した結果、3%PEG-LNPは高いsiRNA漏出性を示した(図3B)。続いて、エンドソーム脱出過程に着目した。エンドソーム内(弱酸性および血清存在)を模倣した環境下、エンドソーム膜を模倣した負電荷リポソームを作用した際のsiRNA放出率を測定した結果、3%PEG-LNPからのsiRNA放出は

1%PEG-LNP の半分程度の低い値であった (図 3C)。マウス肝臓における細胞質への siRNA 送達を観察した結果、1%PEG-LNP では siRNA が細胞質中に拡散した様子が確認された一方で、3%PEG-LNP ではエンドソーム内に留まっていることを示すドット状に観察された (図 3D)。

LNP の総表面積を TNS により測定した結果、3%PEG-LNP の総表面積は粒子径から計算される理論値よりも高い値であった (図 4A,B)。また、Laurdan を用いた解析から、3%PEG-LNP の脂質膜表面の水和度が高いことが明らかとなった (図 4C)。

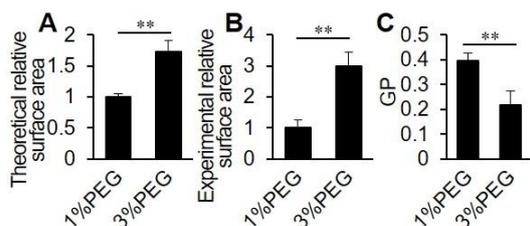


図 4 蛍光法による総表面積および脂質膜表面付近の水和度評価

以上より、粒子径の低下によって脂質パッキングが低下することで不安定化し、siRNA 漏出性が上昇すること、および、表面積の増大による血清成分による影響を強く受けやすくなるのが siRNA 導入活性の低下に起因していることが示唆された (Sato Y et al., *J Control Release*, 2016)。現在、以上の解析結果を受け、30 nm 程度の小さな粒子径においても安定な LNP を構築可能な新規 pH 感受性カチオン性脂質を開発しており、今後はその構造及び脂質組成等の最適化を進める。

(3) 血中滞留性極小 LNP の構築とがん細胞標的化能の検討

上記(2)の 3%PEG-LNP に血中においても脱離しにくい PEG 脂質 (PEG-DSG) を後修飾した結果、LNP の血中滞留化が認められ (図 5A)、また、内封 siRNA の漏出も軽度であった (図 5B)。血中滞留性極小 LNP のがん細胞標的化能を評価するため、ヒト結腸がん由来 Huh7 細胞皮下移植モデルにおける Large LNP と Small LNP (3(3)項を参照)

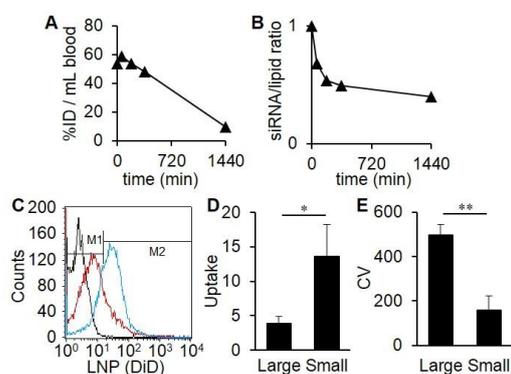


図 5 Small LNP の血中滞留性およびがん細胞標的化能評価

のがん細胞への取り込みをフローサイトメーターで解析した。その結果、Small LNP の標的がん細胞への取り込み量は Large LNP の 3.5 倍も上昇し (図 5C,D)、また、その均一性を示す CV (Coefficient of Variation) 値も有意に低い値であった (図 5E)。

以上より、LNP の粒子径を 35 nm 程度に小さく制御することで効率的かつ均一的にがん細胞を標的化できることが示された。今後は標的遺伝子ノックダウン効率評価および抗腫瘍効果について検討を進める。

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 4 件)

- ① Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Innovative technologies in Nanomedicines: from passive targeting to active targeting/from controlled pharmacokinetics to controlled intracellular pharmacokinetics. *Macromol Biosci*, 査読有, 17: 1600179 (2017). DOI:10.1002/mabi.201600179.
- ② Sato Y, Note Y, Maeki M, Kaji N, Baba Y, Tokeshi M, Harashima H. Elucidation of the physicochemical properties and potency of siRNA-loaded small-sized lipid nanoparticles for siRNA delivery, *J Control Release*, 査読有, 229 (2016) 48-57. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.03.019.
- ③ Sato Y, Hatakeyama H, Mamoru M, Harashima H. Relationship between physicochemical properties of lipid nanoparticles and the quality of siRNA delivery to liver cells, *Mol Ther*, 査読有, 24 (2016) 788-795. DOI:10.1038/mt.2015.222.
- ④ Sato Y, Nakamura T, Yamada Y, Harashima H. Development of a multifunctional envelope-type nano device and its application to nanomedicine, *J Control Release*, 査読有, 244 (2016) 194-204. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.06.042.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 佐藤里咲, 佐藤悠介, 松井秀樹, 原島秀吉. “肝臓標的型 siRNA 送達システムの安全性向上に関する検討.” 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台

国際センター（宮城県仙台市）。

- ② 佐藤悠介, 松井秀樹, 佐藤里咲, 原島秀吉. “メカニズムに基づいた安全性の高い siRNA 搭載脂質ナノ粒子の開発と B 型肝炎治療への応用.” 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター（宮城県仙台市）。
- ③ 佐藤悠介, 野手雄介, ショバキ ヌレ, 原島秀吉. “肝臓を標的とした siRNA 搭載脂質ナノ粒子の物理化学的性質が siRNA 導入効率に及ぼす影響の評価.” 第 2 回日本核酸医薬学会, 2016 年 11 月 15-17 日, 東京理科大学(東京都葛飾区).
- ④ Shobaki N, Sato Y, Harashima H. “Optimizing siRNA delivery using specific multifunctional envelope-type nanodevice for liver sinusoidal endothelial cells. Asian conference on nanoscience and nanotechnology” AsiaNANO 2016: Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology, Oct 10-13, 2016, Sapporo Convention Center (Sapporo, Hokkaido).
- ⑤ Sato Y, Hatakeyama H, Hyodo M, Yamamoto N, Kohara M, Harashima H. “Development of siRNA delivery system for the treatment of hepatitis B viral infection” The 18th Hokkaido University – Seoul National University Joint Symposium, 27th Nov, 2015, Seoul (Korea).
- ⑥ Note Y, Sato Y, Maeki M, Tokeshi M, Harashima H. “Elucidation of the physicochemical properties and potency for siRNA delivery of the siRNA-loaded small-sized nanoparticles” The 18th Hokkaido University – Seoul National University Joint Symposium, 27th Nov, 2015, Seoul (Korea).
- ⑦ 佐藤悠介, 畠山浩人, 兵藤守, 山本直樹, 小原道法, 原島秀吉. “pH 応答性脂質ナノ粒子による肝実質細胞選択的な siRNA 導入と B 型肝炎治療.” 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2015 年 11 月 20 日, 熊本大学（熊本県熊本市）。

[図書] (計 2 件)

- ① 真栄城正寿, 佐藤悠介, 原島秀吉, 渡慶次学. マイクロ流体デバイスによる脂質ナノ粒子作製と DDS への応用. **機能材料**. 36(7):15-21, 2016.

- ② 佐藤悠介, 原島秀吉. pH 感受性脂質を基盤とした脂質ナノ粒子の開発と核酸ナノメディシンへの応用. **化学工業**. 67(11):21-27, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
佐藤 悠介 (SATO, Yusuke)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：10735624

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし