

令和元年6月25日現在

機関番号：82731

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13034

研究課題名(和文) 超分子金属錯体の特異性を駆使したsiRNAキャリアの構築と難治がん治療への展開

研究課題名(英文) Development of siRNA carriers by utilizing the specificity of supramolecular metal complexes for treating intractable cancers

研究代表者

持田 祐希 (Mochida, Yuki)

公益財団法人川崎市産業振興財団(ナノ医療イノベーションセンター)・ナノ医療イノベーションセンター・主任研究員

研究者番号：60739134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カチオン性高分子とsiRNAからなる超分子型siRNAキャリアを構築し、このキャリアを用いて、がん細胞内にsiRNAを効率的に導入することに成功した。血中滞留時間の長いキャリアを得るには至らなかったものの、がん組織の血管内皮細胞を標的とするリガンド分子をキャリアに結合させることによって、血中投与後短時間のうちにキャリアを腫瘍に集積させる方法を見出した。以上の成果は、がん組織集積性と細胞質内に対するsiRNA導入効率の優れたsiRNAキャリアの開発を大きく前進させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、核酸医薬の送達キャリアとして、核酸医薬とカチオン性高分子の超分子形成が利用できることを示す先駆的なものである。核酸医薬とカチオン性高分子からなる超分子の安定性や環境応答性は、カチオン性高分子鎖の側鎖構造を工夫することで任意に調節できるため、幅広い応用が期待できる。また、血中半減期の短いキャリアであってもリガンド分子の搭載により、がん組織への集積量を高められることが示され、がんを標的とするドラッグデリバリーシステムの新たな設計指針を提供することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in constructing supramolecular siRNA carriers consisting of a cationic polymer and siRNA. This carrier exhibited efficient introduction of siRNA into cancer cells. Although it was not possible to obtain a carrier with a long circulation property in the blood, we succeeded in sending the carrier to the tumor tissues within a short time after intravenous administration by installing ligand molecules that specifically target the vascular endothelial cells in the cancer tissue. These results will greatly advance the development of siRNA carriers that show both high accumulation in cancer tissues and efficient delivery of siRNA to the cytoplasm of cancer cells.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：siRNA ドラッグデリバリーシステム 高分子錯体 がんの標的治療 核酸医薬 ブロック共重合体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

低分子二本鎖 RNA (siRNA) は、塩基配列を適切に設計することで任意の遺伝子の発現を抑制することができる。難治がんは、遺伝子発現の異常によって様々な治療抵抗性を示すことが知られているため、siRNA による治療が有効であると期待されている。しかし、siRNA は血中半減期が著しく短いうえ、負電荷を持つことによる生体膜との静電反発により細胞への導入効率が低いため、医薬品としての臨床展開が制限されている。siRNA によるがん治療を実現するためには、がん組織に対する siRNA の集積効率を格段に高める機能と、がん細胞の細胞質内に siRNA を効率的に導入する機能を有するキャリアの開発が不可欠である。

研究代表者らのグループでは、本研究の開始当初において、ポリエチレングリコール (PEG) とカチオン性高分子を連結したブロック共重合体と負電荷をもつ siRNA の静電相互作用によって形成されるコア-シェル型の siRNA 内包ナノ粒子を用いることで、がん細胞内に siRNA を効率的に導入できることを示していた[1]。また、この siRNA 内包ナノ粒子を疎水性相互作用やジスルフィド結合で安定化することで、がん疾患モデルのがん細胞に siRNA を導入することに成功していた[2]。しかし、いずれの siRNA 内包ナノ粒子も血中安定性が十分でなく、がん集積量は 1%未満にとどまっていた。他の研究グループにおいても、カチオン性脂質やカチオン性高分子を利用して siRNA キャリアを構築する試みが活発に行われていたが、カチオン性高分子が集積することが知られる肝臓を除く臓器および組織に対して siRNA を効率的に送達できるキャリアは未だ開発されていない[3]。

### 2. 研究の目的

siRNA を用いた難治がんの治療の実現を目指して、がん組織に対する高い集積性を示し、がん細胞の細胞質に対して siRNA を効率的に導入できる全身投与型 siRNA 送達キャリアを構築する。

### 3. 研究の方法 [知財の関係で詳細は後日追記]

本研究では、siRNA キャリアの安定性を高めるための戦略として、カチオン性高分子を siRNA との超分子形成に利用して siRNA キャリアの構築に取り組んだ。

また、ナノ粒子の腫瘍集積性を高める戦略として、がん組織内の血管内皮細胞を標的とするリガンド分子を用いる方法が報告されている[4]。そこで、本研究では、がん組織で亢進している糖代謝に着目し、ナノ粒子の表面にグルコースをリガンド分子として搭載することで、ナノ粒子のがん集積性を高める方法の開発にも取り組んだ。

### 4. 研究成果 [知財の関係で詳細は後日追記]

(1) カチオン性高分子の合成と分解性の評価： 本研究では、siRNA キャリアの構築に用いるカチオン性高分子として、側鎖にエチレンジアミン構造を有する PEG-ポリアスパラギン酸誘導体 (PEG-PAsp(DET)) を用いた。具体的な合成方法としては、アミン末端を有する PEG (重量平均分子量: 12,000) をマクロ開始剤として  $\beta$ -ベンジルアスパラギン酸-N-カルボキシ無水物を重合することで PEG-ポリ( $\beta$ -ベンジルアスパラギン酸) (PEG-PBLA) を得た。続いて PEG-PBLA に対してジエチレントリアミン (DET) を反応させることで PEG-PAsp(DET) を得た。得られた PEG-PAsp(DET) は単峰性の GPC チャートを示し、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの積分比から PAsp(DET) 鎖の重合度は 39 であることが確認された。PEG-PAsp(DET) を 37°C の PBS 中でインキュベートし、GPC で分子量分布を経時的に追跡したところ、24 時間以内に PAsp(DET) 鎖の主鎖の開裂が進行し、30 日後には PEG と低分子化合物まで分解した。ポリカチオンは一般的に細胞障害性を示すことが知られるが、本研究で合成した PEG-PAsp(DET) は、24 時間以内にポリカチオン鎖の分解が十分に進行するため、細胞毒性が低いことが期待され、siRNA キャリアの材料として適していると考えられる。実際に、同様の条件で全く分解性を示さないことが知られるポリ(L-グルタミン酸)の側鎖に DET を縮合した高分子 (PGlu(DET)) と比べて、PAsp(DET) の細胞毒性は著しく低いことが示されている[5]。

(2) siRNA キャリアの調製： 10 mM HEPES 中で siRNA とカチオン性高分子の超分子形成を誘導し、siRNA キャリアを調製した。このとき、siRNA のホスホジエステル結合の数とカチオン性高分子の側鎖にある活性アミンの数の比などを変化させることで、粒径が 40 nm で多分散度が小さい siRNA キャリアが効率的に得られる条件を決定した。

(3) siRNA キャリアの環境応答性： siRNA キャリアのコアを構成する PAsp(DET) 鎖の側鎖は、生理的環境 (pH 7.4) で正電荷を 1 つ持つが、後期エンドソーム内環境 (pH 5.5) において、正電荷を 2 つ持つことが知られており、これが後期エンドソーム膜の不安定化を惹起することで siRNA が細胞質内に導入されると考えられる[6]。そこで、siRNA キャリアを 10 mM HEPES (pH 7.4) または 10 mM MES (pH 5.5) に溶かし、レーザードップラー電気泳動光散乱法で評価したところ、siRNA キャリアのゼータ電位は、pH 7.4 において -2 mV であったのに対し、pH 5.5 においては 26 mV と正電荷を持つことが示唆されたため、この siRNA キャリアは、後期エンドソーム内で不安定化し、細胞質内に移行する機能を有すると期待される。また、細胞質内に取り込まれた siRNA キャリアが、siRNA を放出することについては、蛍光相関分光法によって確認された。

(4) siRNA キャリアの in vitro RNA 干渉活性： siRNA キャリアの RNA 干渉活性を評価するために、ルシフェラーゼ (Luc) の発現を抑制する siRNA を搭載した siRNA キャリアを、Luc を発現するヒト卵巣がん細胞 (SKOV-3-Luc) 細胞に作用させ、48 時間後および 72 時間後の Luc 活性を評価したところ、siRNA キャリアは siRNA 単体と比べて高い Luc 抑制活性を示した。このことから、本研究で調製した siRNA キャリアは、siRNA をがん細胞の細胞質に移行させ、RNA 干渉を引き起こすことが確認された。

(5) siRNA キャリアの血中滞留性： BALB/c マウスに対して、Cy5 で蛍光標識した siRNA を内包するキャリアを尾部静脈から投与し、血中蛍光強度の推移を生体内顕微鏡で観察したところ、siRNA キャリアと siRNA の血中滞留性はほぼ同等であることがわかった。ナノ粒子の腫瘍集積メカニズムとして広く知られている enhanced permeability and retention (EPR) 効果を期待するには血中滞留時間が短すぎるため[7]、キャリアの更なる改良が必要となった。そこで、具体的な改良方法として 5 つの戦略を挙げたが、(i) 本研究では、熱処理によってキャリアの安定性を高める方法と、(ii) キャリアにリガンド分子を搭載することで腫瘍に迅速に集積させる方法の 2 つを検証した。(i)については、熱処理によってキャリアの安定性を大幅に調節できることが示され、4 件の学会発表に結びついている。以下には、(ii)の方法によってキャリアの腫瘍集積性を高める方法を検証した結果を記す。

(6) siRNA キャリアの腫瘍集積性を高める方法の開発： ナノ粒子の腫瘍集積性を高める方法としてグルコースをキャリアに搭載するリガンド分子として用いることの有用性を検証するために、モデルナノ粒子として、既に詳細な構造と機能および血中動態が明らかになっている制がん剤シスプラチンを内包する高分子ミセルを用いた[8]。PEG-ポリ(L-グルタミン酸)(PEG-PGlu)と $\alpha$ 末端にグルコースを結合した PEG-PGlu の混合物と白金制がん剤シスプラチンの錯形成反応によって、様々な密度でグルコースを結合したシスプラチン内包高分子ミセルを調製し、治療抵抗性を示す扁平上皮がんモデルおよび脳腫瘍モデルに対して尾部静脈から投与したところ、グルコースの修飾密度が 25% の高分子ミセルの場合に、投与後 30 分から 1 時間にかけて 5~8% ID/g tissue もの高分子ミセルががん組織に集積することがわかった (図 1)。この結果は、血中滞留性が優れないキャリアであっても表面にグルコースを修飾することでがん組織に対する集積性を格段に高められることを示唆する結果である。また、siRNA とポリカチオンの静電相互作用を利用して得られたナノ粒子についても、グルコース分子をリガンド分子として用いることで、腫瘍集積性を高めることに成功している。これらの研究成果は 2 報の学術論文にまとめられた。以上の結果から、本研究で構築を試みた siRNA キャリアにグルコースを搭載することで、腫瘍集積性を高めることができると期待される。今後は、上述の siRNA キャリアの安定化方法の有効性を検証しつつ、キャリアの表面にグルコース分子を修飾する戦略を組み合わせることで、より効果的にがんを標的できる siRNA キャリアの開発に取り組む予定である。

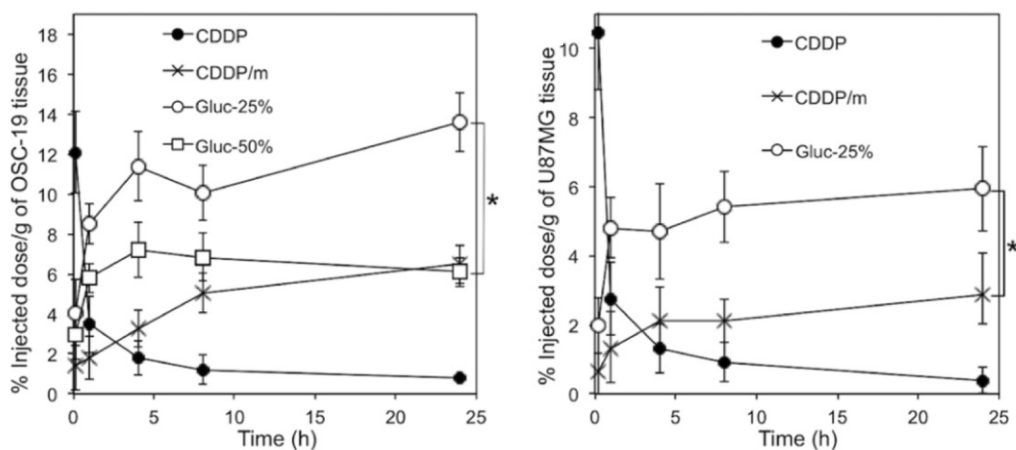


図 1. グルコース結合ナノ粒子の扁平上皮がん集積性 (左) と脳腫瘍集積性 (右)

<参考文献>

- [1] Suma et al., *Biomaterials* 2012, 33, 2770
- [2] Miyata et al., *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2562
- [3] Ozcan et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 87, 108
- [4] Peppas et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, 64, 206
- [5] Itaka et al., *Biomaterials* 2010, 31, 3707
- [6] Miyata et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16287
- [7] Matsumura et al., *Cancer Res.* 1986, 46, 6387
- [8] Mochida et al., *ACS Nano* 2014, 8, 6724

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kazumi Suzuki, Yutaka Miura, Yuki Mochida, Takuya Miyazaki, Kazuko Toh, Yasutaka Anraku, Vinicio Melo, Xueying Liu, Takehiko Ishii, Osamu Nagano, Hideyuki Saya, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka, Glucose transporter 1-mediated vascular translocation of nanomedicines enhances accumulation and efficacy in solid tumors. *J. Control. Release* 301, 28-41 (2019) 査読有  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.02.021
- ② Yu Yi, Hyun Jin Kim, Meng Zheng, Peng Mi, Mitsuru Naito, Beob Soo Kim, Hyun Su Min, Kotaro Hayashi, Federico Perche, Kazuko Toh, Xueying Liu, Yuki Mochida, Hiroaki Kinoh, Horacio Cabral, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka, Glucose-linked sub-50-nm unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles for targeted siRNA delivery to glucose transporter 1-overexpressing breast cancer stem-like cells. *J. Control. Release* 295, 268-277 (2019) 査読有  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.01.006
- ③ Abdul - Hackam Ranneh, Hiroyasu Takemoto, Shunya Sakuma, Aziz Awaad, Takahiro Nomoto, Yuki Mochida, Makoto Matsui, Keishiro Tomoda, Mitsuru Naito, Nobuhiro Nishiyama, An Ethylenediamine - based Switch to Render the Polyzwitterion Cationic at Tumorous pH for Effective Tumor Accumulation of Coated Nanomaterials. *Ang. Chem. Int. Ed.* 57 (18) 5057-5061 (2018) 査読有  
DOI: 10.1002/anie.201801641
- ④ Yuki Mochida, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka, Polymeric micelles for targeted tumor therapy of platinum anticancer drugs, *Exp. Opin. Drug Deliv.* 14 (12) 1423-1438 (2017) 査読有  
DOI: 10.1080/17425247.2017.1307338
- ⑤ Kazuki Miyano, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Yu Matsumoto, Yuki Mochida, Hiroaki Kinoh, Caname Iwata, Osamu Nagano, Hideyuki Saya, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Tatsuya Yamasoba, cRGD peptide installation on cisplatin-loaded nanomedicines enhances efficacy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma bearing cancer stem-like cells. *J. Control. Release* 261, 275-286 (2017) 査読有  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.06.021

[学会発表] (計 17 件)

- ① Yuki Mochida, Uniform assembly and improved tumor-targeting ability of polymeric micelles loading hydrophobic platform anticancer drugs by helix formation, 2019 International Symposium on Nanobiotechnology, 2019 (招待講演)
- ② 持田祐希, 臨床応用を指向した高分子錯体型薬物送達システムの開発、COI リトリート、2018
- ③ 持田祐希, 制がん剤を内包する高分子ミセル型薬物送達システムの構造と機能の関係、第 1 回 COI 学会、2018
- ④ 持田祐希, Cabral Horacio、片岡一則、熱コントロールによる白金制がん剤内包高分子ミセルの大幅な安定化と機能制御、第 67 回高分子討論会、2018
- ⑤ Yuki Mochida, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Helical polymer structure provides platinum-loaded polymeric micelles with favorable size and stability for effective tumor-targeting, 256th ACS National Meeting and Exhibition, 2018
- ⑥ 持田祐希, Cabral Horacio、片岡一則、熱コントロールによる白金制がん剤内包高分子ミセルの大幅安定化と機能制御、第 34 回日本 DDS 学会学術集会、2018
- ⑦ 持田祐希, Cabral Horacio、三浦裕、長田健介、西山伸宏、片岡一則、白金制がん剤内包高分子ミセルの構造および機能を決定するヘリックス形成の重要性、2018

- ⑧ Kazuki Miyano, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Yu Matsumoto, Yuki Mochida, Hiroaki Kinoh, Nobuhiro Nishiyama, Tatsuya Yamasoba, Kazunori Kataoka, An active targeting strategy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma harboring cancer stem-like cells via cRGD peptide-installed cisplatin-loaded nanomedicines, The 14th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference, 2017
- ⑨ 持田祐希、難治がんの防御機構を突破する高分子ミセル型薬物送達キャリアの開発、理研シンポジウム 理研/iCONM/物材機構医工学ネットワーク、2018 (招待講演)
- ⑩ 持田祐希、Horacio Cabral、三浦裕、長田健介、西山伸宏、片岡一則、PEG-ポリグルタミン酸の立体構造に着目した白金錯体超分子ミセルの粒径及び腫瘍標的性の制御、第66回高分子討論会、2017
- ⑪ 持田祐希、Horacio Cabral、三浦裕、長田健介、西山伸宏、片岡一則、高分子ミセル型 DDS の構造と機能に及ぼす内核構造の影響、第33回日本 DDS 学会学術集会、2017
- ⑫ 持田祐希、Horacio Cabral、片岡一則、白金錯体制がん剤を内包する高分子ミセルの熱処理による安定化と機能評価、第66回高分子学会年次大会、2017

[図書] (計1件)

- ① 持田祐希、山崎裕一、片岡一則 (公益社団法人 日本化学会編)、丸善出版、第4版 現代コロイド化学の基礎 4.5.1 高分子ミセル、2018、204-206

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

- ① 名称： ブロックコポリマー、ミセル組成物、及び医薬組成物  
 発明者： カブラル オラシオ、片岡一則、持田祐希、他  
 権利者： 公益財団法人川崎市産業振興財団  
 種類： 特許  
 番号： PCT/JP2019/001089  
 出願年： 平成31年  
 国内外の別： 国外
- ② 名称： ブロックコポリマー、ミセル組成物、及び医薬組成物  
 発明者： カブラル オラシオ、片岡一則、持田祐希、他  
 権利者： 公益財団法人川崎市産業振興財団  
 種類： 特許  
 番号： 特願2018-5217  
 出願年： 平成30年  
 国内外の別： 国内
- ③ 名称： 金属とブロック共重合体との錯体を含むミセルを安定化させる方法および安定化されたミセル、並びにミセルからの金属の放出制御法  
 発明者： 持田祐希、カブラル オラシオ、片岡一則  
 権利者： 公益財団法人川崎市産業振興財団  
 種類： 特許  
 番号： PCT/JP2017/030461  
 出願年： 平成29年  
 国内外の別： 国外

[その他]

ホームページ等

<http://iconm.kawasaki-net.ne.jp/kklab/index.html>

## 6. 研究組織

本研究は研究代表者が実施した。