

令和元年6月10日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19481

研究課題名（和文）高分子内電荷密度に由来する細胞質移行性の獲得と治療核酸誘導体への展開

研究課題名（英文）Facilitated intracellular delivery of oligonucleotide based on the controlled electrostatic behavior of the polymer

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、siRNAの細胞内デリバリーにおいて、高分子の電荷挙動を制御することで送達キャリアの性能向上を可能とした。とりわけ、ポリカチオン内のカチオン性電荷はsiRNAとのキャリア形成に必須であるが、それを細胞内代謝物を駆動力として低減することでキャリアからの細胞内選択的なsiRNA放出が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸は細胞質において薬効を発揮するため、その細胞内放出は送達キャリアにおいて必須の機能である。これに関し、本研究では高分子の電荷状態に着目した。とりわけ、新たな細胞内代謝物を利用する手法の開発に成功し、それは学術誌への発表を含む成果として結実している。開拓された方法論は核酸医薬だけでなく種々のバイオマテリアルにも応用可能であり、関連分野への発展に大いに寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：In the intracellular delivery of siRNA, it was possible to improve the performance of the delivery carrier by controlling the electrostatic behavior of the polymers. In particular, although the cationic charge in the polycation is essential for carrier formation with the siRNA, the reduction driven by the intracellular metabolites enables intracellular siRNA release from the carrier.

研究分野：生体材料学、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：生体高分子 核酸 バイオマテリアル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

siRNA 等の核酸医薬はその薬効メカニズムによりがん等の難治疾患への特效薬としての開発が進められている。一方で、siRNA が薬物として作用するには薬理活性部位である細胞質に到達する必要がある。しかし、siRNA 単体では細胞外から細胞質へと移行するのはその化学的物性的ため困難であり、送達キャリアの開発が重要である。これに関し、siRNA をキャリアに搭載することで細胞内に送達する手法の開発は広く行われているものの、細胞内選択的にキャリアが siRNA を放出する技術の開発は限定的であった。

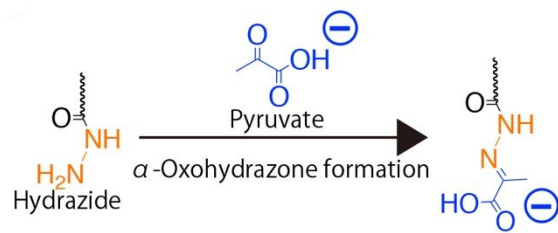
2. 研究の目的

細胞内においてキャリアが siRNA を放出するための新規分子設計指針の開発に取り組む。開発された分子構造を組み込んだキャリアは siRNA の細胞質移行を促進し、薬効の向上が期待される。

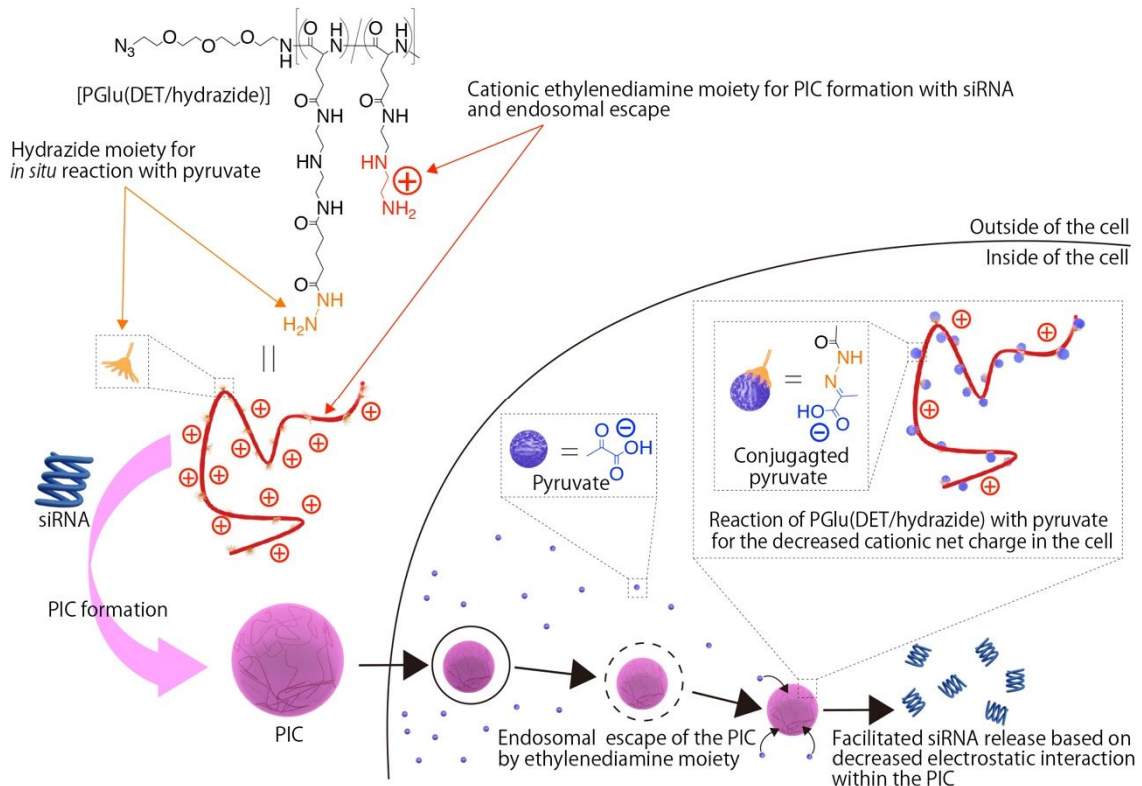
3. 研究の方法

siRNA は負電荷を有する高分子であるため、正電荷を帯びる高分子 (ポリカチオン) とは静電相互作用に基づいて会合体を形成する。得られた会合体は siRNA の細胞内取り込み促進や酵素分解阻害へと寄与するため、送達キャリアとして展開されてきた。これに関し、会合体は細胞外では安定に存在することで siRNA の細胞内への取り込みを促進する必要があるが、細胞内では siRNA を放出して薬効を誘導するように設計しなければならない。本研究では、ポリカチオンが細胞内選択的に正電荷を減少させることが出来れば、siRNA との静電相互作用が縮小し、細胞質への siRNA 送達へと繋がるのではないかと考えた。

上述の発想を実現するために、本研究ではピルビン酸に着目した。ピルビン酸はケト酸構造を有する代謝物であり、細胞内においてその濃度は細胞外の数十倍に達するため、ピルビン酸が関連する反応は細胞内選択的に誘起される。ここで、ケト酸構造はヒドラジド基と反応することでオキソヒドラゾン構造を形成し、その反応は生理条件下においても容易に進行する。そして1つの負電荷を有するピルビン酸と反応することで、ヒドラジド構造は1つの負電荷を獲得することになり (図1)、ポリカチオンにヒドラジド基を導入することで細胞内選択的なピルビン酸との反応及び負電荷の獲得 (つまりはポリカチオンが有する正電荷の相殺) へと繋がる。ヒドラジド基が導入されたポリカチオンは細胞外では siRNA と安定に会合体を形成するが、細胞内ではピルビン酸と反応することで静電相互作用が低減するため siRNA 放出が加速され、効率的な薬効発現が期待される (図2)。



(図1 ヒドラジド基とピルビン酸の反応)

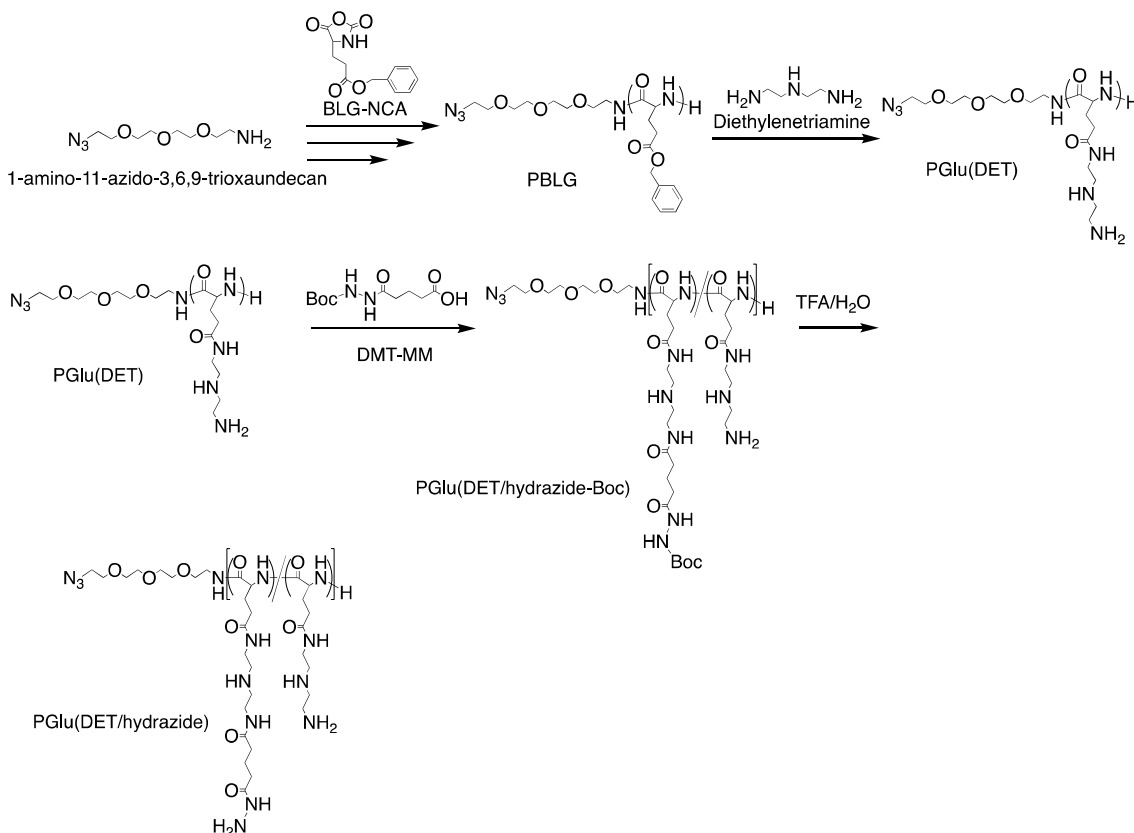


(図2 本研究で開発された分子設計とそのイメージ)

4. 研究成果

(1) 高分子合成

ヒドラジド基を有するポリカチオン (PGlu(DET/hydrazide)) は NCA 重合法に基づくポリアミノ酸合成及びその側鎖改変により獲得した (図 3)。¹H NMR にて解析したところ、平均重合度 100 のポリグルタミン酸側鎖に対して、26 個のヒドラジド基が導入されていた。得られた PGlu(DET/hydrazide) とピルビン酸とを混合し、pH 7.4、37 度という生理条件下においてインキュベートしたところ、オキソヒドラゾン構造に由来する紫外吸収 (250 nm) の増大が観察された。一方で、ヒドラジド構造を有さないポリカチオンは同様の紫外吸収が観測されなかったことから、PGlu(DET/hydrazide) 内のヒドラジド基は高分子構造に担持された状態にも関わらずピルビン酸と生理条件下で反応することが確認された。



(図 3 高分子の合成スキーム)

(2) キャリア調製とそのピルビン酸応答性評価

siRNA と PGlu(DET/hydrazide) とを混合し、そのサイズを蛍光相関分光法により解析した。すると、siRNA 単体だと 4.8 nm であったが、PGlu(DET/hydrazide) 存在下では約 50 nm に増大し、会合体形成が確認された。そしてそれを細胞内ピルビン酸濃度下でインキュベートしたところ、時間に依存してサイズが減少し、24 時間後には 7.3 nm となった。このことから、siRNA と PGlu(DET/hydrazide) 由来の会合体は細胞内ピルビン酸濃度下において崩壊し、siRNA を放出することが期待される。さらに、ケト酸構造を有さない乳酸存在下においては同様のサイズ減少が確認されなかったことから、ピルビン酸の有するケト酸構造が PGlu(DET/hydrazide) との反応に重要であることを裏打ちしている。

(3) キャリアの生物学的評価

PGlu(DET/hydrazide) と siRNA との会合体を培養がん細胞に対して処理すると、ヒドラジド基を有さないポリカチオンにて調製された siRNA との会合体と同等の細胞取り込み効率を示した。一方で、siRNA 由来の薬効は前者の方が優れており、それは複数のがん細胞において再現された。このことは、ヒドラジド基を有する PGlu(DET/hydrazide) の系は細胞内において siRNA をより効率的に放出し、薬効を速やかに誘導したからだと考えられる。実際に、細胞内における会合体の解離を FRET により評価したところ、前者においてのみ明らかな解離に由来する FRET 挙動が観察されており、本研究で立ち上げた方法論の確からしさを強く支持している。また、今回開発された分子設計は細胞内代謝物との反応を利用するものであるが、目立った細胞毒性は観測されておらず、高い安全性が伺える。

(4) 考察

ポリカチオンと siRNA との間の静電的相互作用は、会合体の安定性に不可欠である。したがって、細胞内環境に応じて会体内の静電相互作用の減少を誘起する分子設計は、細胞内選択的な siRNA 放出を促進する。これに関し、エンドソーム/リソソームの pH 及び酵素に応答する化

学構造、ならびに細胞内に高い濃度を有する物質（例えば、グルタチオンおよびATP）が着目されてきた。本研究では、新たに細胞内代謝物であるピルビン酸の有用性を見出した。ポリマー側鎖のヒドラジド基とピルビン酸とのオキソヒドラゾン形成は、通常の生理学的条件下でさえも進行し、会合体の細胞内不安定化及び効果的な薬効誘導へと繋がる。細胞内にはピルビン酸だけでなく、同様のケト酸構造を含む代謝物（例えばケトグルタル酸）も高い濃度で存在しており、それらもまた siRNA の細胞内放出に関与しているだろう。本研究では siRNA 送達キャリアに焦点を当てているが、開発された分子設計指針は様々な種類のバイオマテリアルに有用だと考えられ、関連分野へ大きな影響を与えると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Hiroyasu Takemoto, Chih Ling Wang, Takahiro Nomoto, Makoto Matsui, Keishiro Tomoda, Nobuhiro Nishiyama “Pyruvate responsiveness based on α -oxohydrazone formation for intracellular siRNA release from polyion complex (PIC)-based carriers” *Biomacromolecules*, in press (2019), 査読あり, DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00261.

(2) Hiroyasu Takemoto, Kanjiro Miyata, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka “Size-regulated siRNA carriers from small complex loading single siRNA molecule for systemic delivery to tumor tissue” *Cancer Science*, 109, 353 (2018), 査読あり, DOI: 10.1111/cas.13904.

(3) Abdul-Hackam Ranneh, Hiroyasu Takemoto, Shunya Sakuma, Aziz Awaad, Takahiro Nomoto, Yuki Mochida, Makoto Matsui, Keishiro Tomoda, Mitsuru Naito, and Nobuhiro Nishiyama “An Ethylenediamine based Switch to Render the Polyzwitterion Cationic at Tumorous pH for Effective Tumor Accumulation of Coated Nanomaterials” *Angewandte Chemie International Edition*, 57, 5057-5061 (2018), 査読あり, DOI: 10.1002/anie.201801641.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Hiroyasu Takemoto, Kanjiro Miyata, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka “Size-regulated siRNA carriers from small complex loading single siRNA molecule for systemic delivery to tumor tissue” 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/27/2018-9/29/2018.

(2) Hiroyasu Takemoto, Nobuhiro Nishiyama “Construction of siRNA-polymer conjugate and its biological application” IUMRS-ICA2017, Taipei, 11/5/2017-11/9/2017.

(3) 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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

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:

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) 研究分担者

該当なし

(2)研究協力者
該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。