

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82731

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18391

研究課題名(和文) 生分解性ブロック共重合体を用いたミセル型高分子核酸キャリアの構築と機能評価

研究課題名(英文) Construction of nucleic acid delivery carrier using biodegradable block copolymers

研究代表者

林 光太郎 (Hayashi, Kotaro)

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・研究員

研究者番号：00780660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンス核酸の送達技術の第一の課題である生体内での安定性の向上を狙い、温度応答性セグメントを組み込んだミセル型ナノ粒子の開発を試みた。生分解性をもつポリアミノ酸ベースの構造を開発し、その化学構造を有するポリマーは31度付近に相転移する温度応答性を示すことを明らかにした。加えて、中性付近のpHに反応して鋭く相転移することも見いだした。ナノミセル化を指向して、この二重環境応答ポリマーを組み込んだ三元系高分子の合成に成功している。このポリマーは、生体適合性の高く、更なる高機能なキャリア設計を可能にすると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチセンス核酸は難治性疾患に対して、疾病の原因遺伝子のmRNAを選択的に効率よく抑制、また、病因を引き起こすスプライシング異常を改善することから、次世代の分子標的薬として期待されているが、治療応用を加速していくために標的組織や細胞への送達効率を高める技術の確立が求められている。本研究では、送達技術の第一の課題である生体内での安定性の向上を狙い、疎水層として温度応答性セグメントを組み込んだ二重保護化ミセル型ナノ粒子の開発を目的としている。また、温度応答性セグメントとカチオンにポリアミノ酸ベースの高分子を用いることで、生体内で分解性を付与し、より臨床応用を指向したデザインとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Delivery systems of antisense oligonucleotides (ASOs) are expected to expand the therapeutic application of ASO medicines. To overcome the first hurdle of delivery, that is the high stability under biological environment, triblock-copolymer for ASO micelle was designed to incorporate two protective layers, hydrophilic layer and hydrophobic layer. I developed a novel poly(amino acid) based thermo-responsive polymer. Synthesized poly(amino acid) polymer exhibited a phase transition around 31 degree and a sharp transition in response to pH around neutral. I have succeeded in synthesizing ternary polymers incorporating this dual-environment-responsive polymer toward nanomicelles formation. This polymer was expected as biocompatible materials for highly-functionalized delivery carrier design for effective accumulation into target tissues.

研究分野：核酸医薬

キーワード：バイオマテリアル 機能性高分子 核酸デリバリー

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疾患に対する新たな治療法として、短い核酸を治療薬として用いる核酸治療に大きな関心が寄せられている。なかでも、アンチセンスオリゴ核酸 (ASO) は、細胞内で遺伝子組み換えを引き起こす心配なく、標的である相補的な mRNA を選択的に効率よく抑制することや、病因を引き起こすスプライシング異常を改善することから、次世代の分子標的薬として期待されている。しかし、ASO を医薬として用いる際の一番の障害は標的組織へ送達する手法が確立されていないことである。ASO は生体内において酵素による分解や排泄を受けやすく、また、負電荷をもつ核酸が負に帯電した細胞膜と反発して細胞に取り込まれにくいことが挙げられる。

ASO を送達する手法として、核酸の化学修飾など様々な手法が開発されているが、なかでも ASO を生体適合性が高いポリエチレングリコール (PEG) と正電荷を有する高分子からなるブロック共重合体と静電相互作用させてポリイオンコンプレックス (PIC) を形成させる手法が広く受け入れられている。とりわけ、PIC ミセルは、内核に ASO を封入し、外層に PEG を配し、親水性の保護層としたコアシェル構造を有することで、代謝を回避しつつ静電反発を緩和し、上記課題を解決することができる。加えて、ブロック共重合体の任意の位置に化学修飾を施すことで、様々な機能を付与することが可能であることから、ASO の医療応用を進展させていくためには高機能化 PIC ミセルが非常に有力な手法であるといえる。しかし、ASO の PIC ミセルは研究段階では実績が得られているが、臨床応用の進展が限られていた。

2. 研究の目的

本研究では、ブロック共重合体に更なる化学修飾を施すことにより、ASO を難治性腫瘍組織に送達し、治療効果を得ることを目標とする。ASO は短い核酸のため、ポリマーとの間で十分な相互作用が得られず、ミセルの安定性が不足していることが課題だと考えた。それを解決するため、近年発見された PIC 内核と親水的な外層の間に温度応答性セグメントの導入をすることにより、調製する低温時はミセル形成を妨げないようにしつつ、使用する生体温度には疎水的な保護層となるよう設計することで、PIC ミセルを安定化させる手法を適用することで解決できる。しかし、このときの温度応答性ポリマーは、ミセル安定化には有効であるが、更なる化学修飾が難しく、腫瘍標的リガンドの導入などの高機能化が困難である問題があった。本研究では、ポリアミノ酸ベースの温度応答性ポリマーを組み込んだ送達用高分子を開発し、ASO を効率的に腫瘍組織に送達するシステムの創出を目的とした。特に、新たな高分子材料を開発することにより、報告の安定化機能を維持しつつ、将来的なりリガンド導入や、還元環境や酵素環境に応答する機能を付与することを視野に入れている。また、温度応答性セグメントとポリカチオンとして、ポリアミノ酸ベースの高分子を用いることで、生体内での分解性を付与し、より臨床応用を指向したデザインとする。

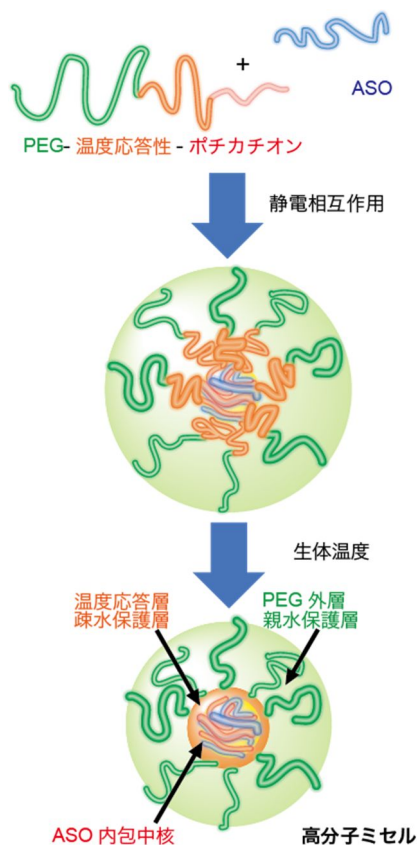


図 1. 温度応答性セグメントを組み込んだ高分子ミセルの概念図

3. 研究の方法

ASO ミセルの調製のため、PEG セグメント、温度応答性セグメント、カチオン性セグメントからなる三元系ブロック共重合体の合成を行う (図 1)。ポリアミノ酸ベースの温度応答性セグメントとして、温度と pH の両方に応答性を有する誘導体として開発した、ジアルキルアミノ基導入したポリアスパラギン誘導体を使用することとした。この温度応答性セグメントを含んだブロック共重合体の合成を行い、その温度による物性の変化を観察し、核酸医薬の送達技術への応用展開について考察した。

4. 研究成果

まずは、温度応答セグメントのみからなるポリマー単体を合成し、その温度による物性の変化を検証した。主にジ-n-ブチルアミノ基を導入したポリアスパラギン誘導体を、ジブチルアミノ基とポリアスパラミド主鎖の間のスペーサーをエチレン (DnBen) とプロピレン (DnBpro) とした 2 種類のポリマーを比較しつつ、物性検討を行った。それらのポリマーは側鎖に疎水的なブチル基を持つものの、どちらも室温において水溶性であった。その相転移温度について、示差走査熱量測定 (DSC) を用いて詳細に測定した。昇温とともに発熱性の固体化シグナルが見られ、その温度は生理条件において、DnBen ポリマーが 31 °C、DnBpro ポリマーが 50 °C であった。この相転

移挙動は、温度サイクルの繰り返し変化でも一定であり、可逆的であることが示された。これらのことから、この相転移による固体化は、ポリマーの水の溶媒和が不利になった、つまり、温度によりポリマーの疎水性が高まったためであると考えられる。DnBen ポリマーの固体化転移温度は 31°C と、ポリイソプロピルアクリルアミドの下限臨界溶液温度と同等であり、生体内に適用した際に設計の性質変化が得られる期待が高まった。

また、リンカーの一炭素の違いで、相転移する温度が 19°C 変化し、かつ、炭素鎖の数が少ない方が低い温度で疎水性に変化するという結果は、炭素鎖数が多いほど疎水性が高まるという推論と矛盾しているように見える。この理由として、ジブチルアミノ基へのリンカーを介したプロトン供与の強弱による可能性が考えられた。アミノ基同士の場合、エチレンをリンカーとすると、隣接アミノ基の状態がアミン自体のプロトン化率に影響するが、プロピレンをリンカーとするとその影響が弱まることが知られている。この仮説を検証するため、37°C において pH を変化させて、ポリマーの溶解性を濁度により検証した。その結果、DnBen ポリマーは pH 6.8 付近、DnBpro ポリマーは pH 7.5 付近で濁度が急激に変化し、相転移反応がみられた(図 2)。この結果は、相転移に関してジ-n-ブチルアミノ基のプロトン化、脱プロトン化が関与している可能性を示唆している。加えて、pH の変化量が中性から pH 6.5 の弱酸性への小さな変化に対して、相転移という物性を大きな変化を誘起可能であることから、DnBen ポリマーの有用性が期待された。

そこで、DnBen ポリマーのブチル基を、他のアルキル基へ変化させて相転移温度を推定した。一般に試薬会社より販売されている、炭素数の異なるジアルキルアミノ基、すなわち、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基を有する一級アミンの四種類に関して、温度応答能を示すかを検討した。四種類のアミンは全て、定量的にポリアミノ酸の側鎖に導入することに成功した。温度を変化させて、その凝集体の様子を動的光散乱により観察したところ、生理的条件下ではジブチルアミノ基を有するポリマーのみが温度応答能を示した。これらの内容を踏まえて、DnBen ポリマーに関して国際特許出願を行なった。

以上の結果を踏まえて、DnBen ポリマーを含んだ三元系ブロック共重合体の合成を検討した。しかし、DnBen の導入段階において、温度応答性セグメントのみポリマーの合成として用いている合成条件では三元系ブロック共重合体の合成において当該セグメントが一部分解していることが判明した。そのため、DnBen の導入段階に関して、三元系ブロック共重合体の合成に適用できる合成条件の検討を行った。その結果、温度や溶媒を変化させることにより、分解を防ぐ反応条件の開発に成功し、三元系ブロック共重合体の合成を行った。サイズ排除クロマトグラフィーにより、ポリカチオン性ポリアミノ酸セグメントの合成の際に不純物の混入が確認されたが、PEG-温度応答性セグメント二元系高分子よりも高分子量側に存在するピークを有する三元系ブロック共重合体の合成を確認している。精製面や反応条件の検討に改善の余地があるが、設計通りの高分子の合成に成功した。

本研究において、生理条件で pH や温度によってその溶解状態を変化させる新規環境応答性ポリマーの開発に成功した。温度に関しては、既存であるポリイソプロピルアクリルアミドの下限臨界溶液温度と同等であり、生体内に適用した際にも設計通りの応答性をもたらすことが期待される。この新規応答性高分子を組み込んだ三元系ブロック共重合体の合成にまで成功している。さらなる研究や検討を通じて、ASO 封入高機能化 PIC ミセルの開発が見込まれる。今後、実用応用に向けたキャリアの作り込みが今後の課題であるといえる。

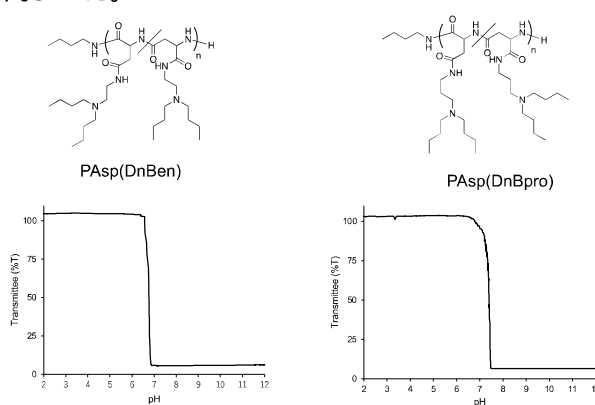


図 2. 環境応答セグメントの pH による相転移挙動。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Beob Soo Kim, Hyun Jin Kim, Shigeto Osawa, Kotaro Hayashi, Kazuko Toh, Mitsuru Naito, Hyun Su Min, Yu Yi, Ick Chan Kwon, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata	4. 巻 5
2. 論文標題 Dually stabilized triblock copolymer micelles with hydrophilic shell and hydrophobic interlayer for systemic antisense oligonucleotide delivery to solid tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 5770-5780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbomaterials.9b00384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林光太郎・福島重人・西山伸宏・宮田完二郎・片岡一則
2. 発表標題 siRNA 送達に向けたカチオン性ポリアミノ酸の検討
3. 学会等名 第67回高分子学会討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林光太郎・片岡一則
2. 発表標題 ポリアミノ酸骨格を有する温度応答性ポリマーの合成と機能評価
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 刺激応答性ポリマー	発明者 林光太郎、片岡一則	権利者 川崎市産業振興財団
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/009037	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------