

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18392

研究課題名（和文）視神経回復を志向し最適化された疎水層を持つ核酸内包高分子ミセル型点眼剤の開発

研究課題名（英文）Nucleic acid-loaded polymeric micelle having a optimized hydrophobic layer toward optic nerve recovery via instillation

研究代表者

大澤 重仁（Shigehito, Osawa）

東京理科大学・理学部第一部応用化学科・助教

研究者番号：30780663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：失明の原因の大半を占める網膜疾患の新規治療法確立を志向した点眼剤の開発を行った。点眼剤としては、眼組織で治療用のタンパクが生成されるような核酸成分、涙による点眼後の迅速な排除を避けるため疎水性成分を持つナノ粒子を設計した。設計した粒子をマウスに点眼した結果、思った通りのタンパク生成生えられなかったが、眼内投与すると高いタンパク発現は得られた。点眼剤としての効果が高めるためには、眼内移行を高めるためによりナノ粒子の疎水性をあげる、またはナノ粒子と細胞表面間で他の相互作用を働かせる必要性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸は細胞に取り込まれた後、タンパク発現を制御するため医薬としての利用が注目されている。核酸の細胞内あるいは組織内移行量を高めて効果をあげる工夫として、ナノ粒子化、疎水性部位の導入が広く研究されている。しかし今回試行した点眼剤による眼組織への核酸導入においては、ナノ粒子としての形態を維持できる範囲での疎水性部導入では、期待通りのタンパク発現が得られなかった。眼は特にバリア性の高い組織で、核酸を眼内に移行させるキャリア設計には疎水性がもっと高くする（場合によってはナノ粒子としての形態にこだわらない）、あるいは他の相互作用も合わせて利用する必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop novel eye drop medicine for retinal diseases. Herein, nanoparticles were prepared to have a nucleic acid component that produces therapeutic proteins in eye tissue and a hydrophobic component to avoid rapid elimination by tears after instillation. As a result of instilling the prepared particles into eyes of mice, the expected protein production was not observed, but high protein expression was observed when administered intraocularly. In order to enhance the effect as an eye drop medicine, it would be required to increase the hydrophobicity of the nanoparticles or to utilize other interactions between the nanoparticles and cell surface to enhance the transfer of the therapeutic nucleic acids into the eye.

研究分野：生体関連材料、高分子化学

キーワード：温度応答性 核酸キャリア ポリオキサゾリン ポリイオン会合体 点眼 眼内投与

1. 研究開始当初の背景

失明は、国内統計ではその多くが緑内障、糖尿病性網膜症に起因し、世界的に見ても網膜疾患が主な理由である。これらの疾患治療に対しては、視神経の保護と回復機能があると提唱されている脳神経栄養因子(BDNF)や、また抗 VEGF 抗体(抗血管新生薬)が加齢黄斑変性なども含め網膜疾患の治療薬として知られているタンパクであるが、現在、これらの疾患の治療は視野・視力維持が主で、機能回復には至っていない。さらには、眼はバリア性の高い組織であるため、侵襲性の高い眼内注射を除いて、投与したタンパクはほとんど眼内に届かないため、治療効果を得るためにはこれらタンパクの継続的かつ複数回の眼内投与が必要である。より低侵襲に、眼内にこれら治療用タンパクを移行させる技術の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、低侵襲である点眼により核酸を眼組織そのものに導入し、眼組織から持続的にタンパクを発現させる、または眼組織のタンパク発現を制御して治療することを考えた。点眼による薬剤の眼内への移行は、ナノ粒子化および親水性/疎水性比率の制御により効率化することから[J. Controlled Release, 2011, 153, 278]着想を得て、疎水性部分をもつ核酸キャリアを点眼剤として開発することを目的とした。核酸キャリア形成時や点眼前に粒子がマイクロアグリゲーションとなることを避けるため核酸キャリアへの疎水部の導入は、室温～体温程度に下限臨界共用温度をもつ温度応答性高分子を組み込むことで行った。

3. 研究の方法

親水性であるポリエチルオキサゾリン (PEtOx)、温度応答性であるポリノルマルプロピルオキサゾリン (PnPrOx)、カチオン性であるポリリシン(PLys) からなるトリブロック共重合体 (PEtOx-*b*-PnPrOx-*b*-PLys) をリビングカチオン重合、NCA 重合、Click Chemistry を駆使して合成した。核酸と PEtOx-*b*-PnPrOx-*b*-PLys を電荷比が 1 となるように混合し、ポリイオンコンプレックス (PIC) とした。得られた PIC を 37 °C とし、PnPrOx を疎水化させた。また得られた PIC に、さらに PnPrOx のホモブロックを加えることで、PIC の疎水性を増すことを検討した。得られた PIC の物性については、光散乱測定による粒径の評価、核酸分解酵素からの分解に対する保護機能のを調べた。核酸キャリアとしての有効性を示すため、PIC の培養細胞に対する遺伝子発現試験、マウス、ラットに対して点眼した際の遺伝子発現性評価についても行った。遺伝子発現性試験は、ルシフェラーゼアッセイにより行った。

4. 研究成果

PEtOx-*b*-PnPrOx-*b*-PLys を合成し、核酸と会合体を形成させたところ、mRNAを用いた場合は mRNA に対して多数のPEtOx-*b*-PnPrOx-*b*-PLys が会合した 60 nm程度の高分子ミセル型のPICとなり、siRNA を用いた場合はsiRNAとPEtOx-*b*-PnPrOx-*b*-PLys が1対1で会合する10 nm程度のユニマー型のPIC (uPIC)となった。

mRNA からなる高分子ミセルは、PnPrOx の温度応答疎水化により、特に核酸分解酵素に対する保護機能が向上した。さらに高分子ミセルに温度応答性鎖である PnPrOx の単一ブロック体を 4 °C で加え、その後 37 °C とすると、PnPrOx が高分子ミセル中の PnPrOx に吸着し、添加量に応じて高分子ミセルのコロイド安定性が下がること、すなわち疎水性が高くなることが光散乱測定より示唆された。疎水性層の増大に伴い、核酸分解酵素に対する mRNA の保護機能が向上も確認された (Figure 1a)。また、疎水性部の増大に伴い、培養細胞に対する遺伝子発現性も高くなることが確認された (Figure 1b)。これらの機能は、高分子ミセルの点眼で眼の組織で遺伝子発現を効率的に示すために重要な機能である。培養細胞に対する遺伝子発現性試験においても、PnPrOx を加えた高分子ミセルは、PnPrOx を加えていないものと比較して顕著に高い遺伝子発現性を示した。

核酸として siRNA を用いた uPIC 型の会合体は、培養細胞に添加すると、4 °C や室温では細胞との相互作用は低いが、37 °C、すなわち PnPrOx の下限臨界共用温度より高い温度である生体

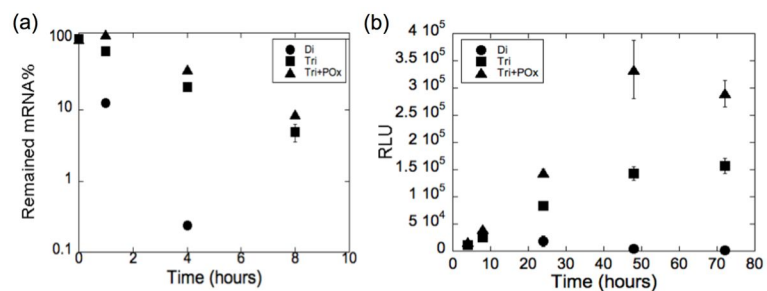


Figure 1 mRNA からなる高分子ミセルの (a) 10% 血清中で静置した場合の mRNA の残存率の時間変化と (b) 培養細胞に対する遺伝子発現性試験。Di: 親水性-カチオン性のジブロック共重合体からなる高分子ミセル。Tri: 親水性-温度応答性-カチオン性のトリブロック共重合体からなる高分子ミセル。Tri+POx: Tri に PnPrOx のホモブロックをさらに加えた高分子ミセル。

温度とすると、細胞との相互作用、細胞への取り込み、また標的遺伝子のノックダウン効率が向上した[B.-S. Kim, S. Osawa, et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2020, 31, 5, 1320-1326]。これはPnPrOxの温度応答による疎水化が、細胞との相互作用向上、核酸の細胞内移行効率向上に有用であることを示す結果であった。

mRNA からなる高分子ミセルについては、ラットに対して点眼を行い、mRNA にコードしておいたレポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発現の有無を評価したところ、発現は見られなかった。眼内への高分子ミセル移行促進を期待し、上述のように高分子ミセルにPnPrOxを添加したものも用いたが、点眼による有意な遺伝子発現は見られなかった (Figure 2a)。一方、同ミセルを眼内投与したところ、ルシフェラーゼの発現が見られた (Figure 2b)。これらの結果から、眼内に取り込まれれば、この高分子ミセル型の核酸キャリアは薬効を示すことが期待でき、また点眼で投与された高分子ミセルは細胞内または組織内に移行する前に、涙で洗い流されている可能性が示唆された。眼内への取り込み促進のため、細胞との相互作用を高めるさらなる作り込みの必要性が課題として見えてきた。

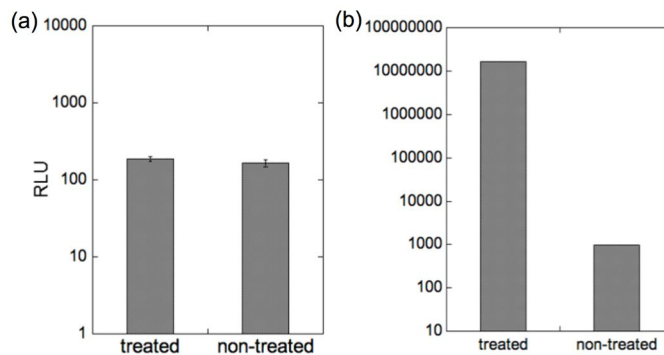


Figure 2 ラットの眼におけるルシフェラーゼタンパク発現量。高分子型 PIC を (a) 点眼により投与または (b) 眼内注射による投与。

これまで、静電相互作用で核酸との会合を想定していたが、新たに、亜鉛錯体との配位結合による会合に変更することを考えた。亜鉛錯体は細胞膜のリン酸とも相互作用するので、細胞表面との相互作用増大による細胞取り込み向上が期待され、点眼による投与された高分子ミセルの眼内への移行促進も期待される。現在、新たにジピコリルアミン亜鉛錯体を側鎖にもつポリマーを設計し、これと核酸との会合体は、核酸分解酵素に対する核酸の保護機能が十分に発揮され

(Figure 3a)、また問題なく遺伝子発現を示す会合体であることを見出している (Figure 3b)。今後の検討において、上述トリブロック共重合体のカチオン部分をこの新たに設計した高分子鎖とすることで、点眼による眼組織への核酸の移行効率が向上し、眼でのタンパク発現が向上することを期待する。

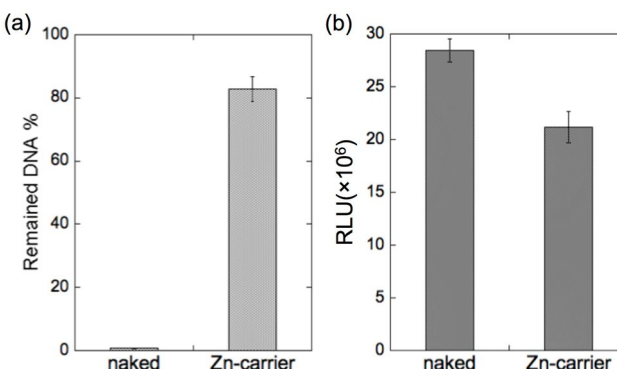


Figure 3 新規に考案した亜鉛錯体が側鎖に含まれる高分子鎖と核酸との会合体の評価。(a) 核酸分解酵素と静置した場合の核酸残存量 (b) 試験管内での遺伝子発現性試験。

この新たに設計した高分子鎖とすることで、点眼による眼組織への核酸の移行効率が向上し、眼でのタンパク発現が向上することを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Beob Soo, Osawa Shigehito, Yum Jongmin, Naito Mitsuru, Miyata Kanjiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Installation of a Thermoswitchable Hydrophobic Domain into a Unimer Polyion Complex for Enhanced Cellular Uptake of siRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00238	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 -

1. 著者名 Osawa Shigehito, Takahashi Riichi, Watanabe Remi, Kubo Sayaka, Otsuka Hidenori	4. 巻 9
2. 論文標題 Increase in the apparent intercalation ability of a platinum complex via multivalency by installation into the sidechain of a graft copolymer and observation of structural changes in the intercalated DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 26429 ~ 26434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9RA03485D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Shohei, Matsukuma Daisuke, Iijima Kazutoshi, Iijima Michihiro, Osawa Shigehito, Otsuka Hidenori	4. 巻 5
2. 論文標題 N-Hydroxysuccinimide Bifunctionalized Triblock Cross-Linker Having Hydrolysis Property for a Biodegradable and Injectable Hydrogel System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 5759 ~ 5769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.9b00218	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大澤重仁、大塚英典
2. 発表標題 金属錯体を含むグラフトコポリマーの合成とバイオマテリアルへの展開
3. 学会等名 第69回高分子年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayaka Kubo, Shigehito Osawa, and Hidenori Otsuka
2. 発表標題 Random copolymer grafting oligo (ethylene glycol)s and zinc complexes with dipicolylamine to design polyplex loading plasmid DNA toward gene delivery
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保明香、黒川颯介、大澤重仁、大塚英典
2. 発表標題 ジピコリルアミン亜鉛錯体とオリゴエチレングリコールをグラフトした高分子鎖の合成と遺伝子キャリアとしての機能評価
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保明香、黒川颯介、大澤重仁、大塚英典
2. 発表標題 ジピコリルアミン亜鉛錯体とOEGユニットを含むメタクリル酸ベースのランダム共重合体の合成と遺伝子キャリアとしての機能評価
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigehito Osawa, Kensuke Osada, and Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Messenger RNA loaded polyplex micelles having hydrophobic core protective layer composed of thermo-switchable poly(oxazoline) for promoted gene expression
3. 学会等名 ACS Spring 2019 National Meeting & Exposition
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sosuke Kurokawa, Shigehito Osawa, Hidenori Otsuka
2. 発表標題 Accelerated polymerization of dipicolylamine acrylate monomer via pre-formation of the monomer metal complex
3. 学会等名 1st G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigehito Osawa, Riichi Takahashi, Hidenori Otsuka
2. 発表標題 Increased apparent DNA intercalation property of platinum metal complex by constructing comb-type polymer
3. 学会等名 1st G'L'owing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤重仁、長田健介、大塚英典、片岡一則
2. 発表標題 温度応答性ポリオキサゾリン鎖からなる疎水性保護層を有する核酸内包高分子ミセル
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高分子金属錯体及びその製造方法	発明者 大澤重仁、黒川颯介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-230395	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----