

平成 21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750088
 研究課題名（和文）：表面と内核が高度に構造制御された遺伝子治療用
 高分子ミセル型ナノデバイス開発
 研究課題名（英文）：Design of polymeric micelle based nanodevice with highly modified
 surfaced and core for gene delivery
 研究代表者
 宮田 完二郎(MIYATA KANJIRO)
 東京大学・大学院工学系研究科・特任助教
 研究者番号：50436523

研究成果の概要：本研究では、生体内で低毒性かつ安定な遺伝子デリバリーを可能とする新規高分子ミセル型遺伝子キャリアシステムの構築を目指した。ポリエチレングリコール(PEG)とカチオン性高分子のブロック共重合体は、水溶液中で遺伝子(plasmid DNA)と自発的に会合し、DNA内包コアをPEG外殻が覆うミセル構造体を形成する。これを利用しつつ、さらなる血中滞留性の向上とそれに伴うin vivo遺伝子導入効率増加のために、ブロック共重合体(PEG-ポリリシン)への化学修飾を施した。具体的には、カチオン性高分子部分にチオール(SH)基を導入し、ミセルのコアへ(細胞内で開裂する)ジスルフィド(SS)架橋を形成させた。さらに、生体内タンパク質や細胞表面との非特異的相互作用を抑制するために、ミセル表面にも改良を加えた。こちらは、DNA内包コアと生体成分との相互作用をシールドするPEGの効果をもより高めるために、反応性PEGを用いて調製されたミセルのさらなるPEG化(PEGの重層化)を試みた。

これまでの検討から、内核にSS架橋を有し、表面においてPEGが重層化された遺伝子内包高分子ミセルは、SS架橋と重層化PEG処理を施されていないサンプルと比べ、50倍近く血中滞留性が向上することが確認された。一方、実際に治療用遺伝子として血管増殖因子(VEGF)の可溶性受容体であるsFlt-1を選択し、皮下移植腫瘍がんモデルマウスを用いて治療実験を試みたところ、遺伝子投与なし、またはレポーター遺伝子を内包させたミセルなどのコントロール群と比べ、統計的に有意ながん増殖抑制効果が得られた。さらにその効果を高めるために、PEGの分子量を12000から17000へと増加させ、かつPEGの末端に血管内皮細胞に特異的に認識されるペプチド(環状RGD)を導入した。結果として、環状RGDあり、PEGの分子量17000、SS架橋導入率10%前後の高分子ミセル型遺伝子キャリアは、皮下移植腫瘍がんモデルに対して、最も効果的な抗腫瘍効果を示すことが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：遺伝子治療・ドラッグデリバリー・高分子ミセル・架橋

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療は、遺伝子(DNA)の塩基配列特異的な治療効果をもたらすことから、非常に幅広い疾患への応用が期待されている。しかしながら、生体内に安全かつ効率よく遺伝子を導入する方法は確立されておらず、本格的な臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

本申請では、生体への"安全かつ効率よい"遺伝子導入を目指し、合成高分子を用いた遺伝子キャリアシステムを構築し、機能の評価を行った。

3. 研究の方法

遺伝子キャリアを調製する際に、最も重要な性質は生体内での安定性であると考えられる。具体的には、血液中で生体由来のたんぱく質と非特異的な相互作用をせず、かつ凝集や解離をしないことである。これらの性質を賦与するために、本申請では、ポリエチレングリコールとポリリシンのブロック共重合体(PEG-PLys)のPLysの側鎖(アミノ基)にチオール基を導入した。チオール化PEG-PLysとプラスミドDNAを水溶液中で混合して遺伝子内包高分子ミセルを調製し、なおかつ酸化反応を行うことで、ミセル内核にジスルフィド架橋を導入した。さらに、活性エステル化PEGを添加し、余剰のアミノ基にPEG化を施すことで、ミセル電荷の中和及び、高密度PEG表面を構築した。

4. 研究成果

内核にジスルフィド架橋、表面に高密度PEGを有する遺伝子内包高分子ミセルが、生体内で安定かどうかを確認するために、血中滞留性評価を行った。静脈投与1時間後の血中濃度を比較したところ、未修飾のミセルと比べ、化学修飾済みのミセルは50倍近く血中濃度を示した。さらに、皮下移植腫瘍モデルマウスを構築し、治療用遺伝子としてsFlt-1遺伝子(血管増殖因子の可溶性受容体)を選択し、治療効果の有無を評価した。結果として、PEGの分子量が17000、PLysの重合度が70前後、架橋率10%前後、表面に血管内皮細胞を認識するペプチド(環状RGD)を導入した高分子ミセルは、最も高い抗腫瘍効果を示すことが確認された。

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 8件)

1) M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y.

Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Mol. Pharm. 5, 1080-1092 (2008)

2) K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, J. Am. Chem. Soc. 130, 16287-16294 (2008)

3) K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pharm. Res. 25, 2924-2936 (2008)

4) Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Angew. Chem. Int. Ed. 47, 5163-5166 (2008)

5) S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, J. Am. Chem. Soc. 130, 6001-6009 (2008)

6) K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, J. Control. Release 122, 252-260 (2007)

7) M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, J. Control. Release 121, 38-48 (2007)

8) K. Itaka, S. Ohba, K. Miyata, H. Kawaguchi, K. Nakamura, T. Takato, U. -I. Chung, K. Kataoka, Mol Ther. 15, 1655-1662 (2007)

〔学会発表〕(計 12件)

1) K. Miyata et al, 分子情報生命化学 国際シンポジウムプログラム、神戸、2008年12月10-11日

2) K. Miyata et al, NanoBio Seoul 2008, 韓国(ソウル)、2008年10月30-11月1日

3) 宮田完二郎 et al, 第57回高分子討論会、大阪、2008年9月24-26日

4) 宮田完二郎 et al, 第37回医用高分子シンポジウム、東京、2008年7月28-29日

5) K. Miyata et al, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, USA(New York), 2008年7月12-16日

6) 宮田完二郎 et al, 第57回高分子年次大会、横浜、2008年5月28-30日

7) 宮田完二郎 et al, 遺伝子・デリバリー研究会、大阪、2008年5月9日

8) 宮田完二郎 et al, 第2回バイオ・ナノテクノロジーフォーラム シンポジウム、東京、2008年3月1日

9) K. Miyata et al, CNSI/UCLA-CNBI/UT Symposium, USA (ロサンゼルス)、2007年10月31日-11月2日

10) 宮田完二郎 et al, 第56回高分子討論会、名古屋、2007年9月19-21日

- 11) 宮田完二郎 et al, 第56回高分子年次大会、京都、2007年5月29-31日
- 12) 宮田完二郎 et al, 遺伝子・デリバリー研究会、東京、2007年5月18日

〔図書〕(計 1件)

- 1) 宮田完二郎 et al, 分子細胞治療, 7, 26-33 (2008)

〔その他〕

- 1) NanoBio Seoul 2008 にてベストポスター賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 完二郎

東京大学・大学院工学系研究科・特任助教

研究者番号：50436523