

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20240049

研究課題名（和文） ガン治療を目指した核酸ナノマシンの創出

研究課題名（英文） Nucleic acid-based nanomachine systems for tumor treatment

研究代表者

丸山 厚（MARUYAMA ATSUSHI）

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：40190566

研究成果の概要（和文）：

ガン組織で治療効果を発現する治療用核酸ナノマシンシステムを構成するガン組織集積機能と核酸シャペロン活性のある高分子材料の設計と評価を行い以下の成果を得た。1) 親水性側鎖をグラフトしたカチオン性くし型共重合体のガン集積性を担ガンマウスで評価し、高密度にグラフト鎖を有する共重合体が経時的にガンに集積することが見いだされた。2) 核酸の構造転移に与える共重合体の効果を評価した。共重合体は、ステムループ・2重鎖の転移や4重鎖核酸の形成速度を顕著に高め、機能性核酸の機能を制御し得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this research project, we studied polymer materials to construct therapeutic nanomachine systems for tumor treatment. Polymer materials that accumulates in tumor tissues and exhibits nucleic acid chaperoning activity were designed and evaluated. Cationic comb-type copolymers having hydrophilic graft chains were found to accumulate effectively in tumor tissue subcutaneously implanted in mice. The copolymer was also found to facilitate structural transition between stem-loop structure and duplex and assembly of quadruplex DNA. These results suggested that activity of functional nucleic acids could be regulated with the cationic copolymers at tumor sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2009年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2010年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：機能性核酸、核酸シャペロン、医薬送達システム、高分子電解質複合体、グラフトコポリマー、構造転移、ナノマシン

## 1. 研究開始当初の背景

侵襲性が低く生体に優しい治療システムの理想像として、マイクロ体内ロボットが提案され、カプセル型内視鏡を例に、実現の可能性が示されつつある。しかし、実際に治療能力のある体内ロボットの実現には、移動制御、センサおよびマニピュレータなどこれを構成する個々のデバイスのさらなる小型化と高機能化が不可欠であり、さらに生体適合性に関しても課題が残されている。一方、より生体に優しい治療システムとしては、生体高分子を主体とするソフトマテリアルから構成されるナノデバイスが優位と考えられる。

従来、核酸は遺伝情報を保持する物質としてタンパク質と比較し化学活性の低い物質として認識されてきた。一方、酵素活性を示すリボザイム、あるいは抗体のように特定の基質を分子認識するアプタマーにはじまり、受容体の機能、つまり分子認識とシグナル伝達を兼ね備えるリボスイッチも同定され、タンパク質に匹敵する化学活性を発現することが明らかになった。さらに、生体における遺伝子発現の制御に、RNA 干渉やマイクロRNA が新たに見つかるなど、核酸の生物学的・化学的機能にも新風が吹き、細胞生物学・分子生物学において昨今のパラダイムシフトの起爆剤となっている。このような背景から核酸の新たな化学的・生物学的機能の理解と新しいバイオテクノロジー、治療システムへの展開に関心が集まってきた。

## 2. 研究の目的

核酸はタンパク質に比べ、調製しやすく抗原性も低いなどの利点を持つ。また、試験管内進化法 (SELEX) による新たな機能性核酸の取得も可能である。さらに、核酸ナノマシン化により、活性の制御が可能となる。これらの特徴は、ナノ治療ソフトデバイスの機能性素材として核酸の可能性を強く示唆する。核酸機能の発現には、タンパク質と同様に適切な高次構造形成が不可欠である。さらに、核酸の機能を高めるためには、塩基配列選択性の向上と高次構造の安定化、さらにはその構造形成を動的に制御する必要がある。つまり、より精緻かつ安定な高次構造形成を促しつつ、その形成と解離を制御することで、より一層高い機能を核酸に付与できよう。

一方、治療システムとして機能させるには、核酸分子の体内動態、体内安定性を制御する必要がある。しかし、これに関しては、カチオン性高分子を基盤とした非ウイルス型遺伝子キャリアに関する多くの知見が、蓄積されている。さらに以下に示すように、申請者らは核酸の機能とその体内動態を制御し

る高分子材料の設計に成功している。本申請課題では、医用材料学、高分子材料科学の知見と手法を駆使しバイオマテリアルと核酸の機能的融合を計り、高度に生理的機能と生体内動態を制御された治療用核酸ナノマシンシステム基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)核酸シャペロン活性を有する高分子の合成と評価  
核酸とのイオン性相互作用に加え、水素結合性相互作用、疎水性相互作用を制御した種々高分子材料の合成を行った。さらに、これら材料と核酸との相互作用を詳細に検討した。高分子・核酸相互作用は、ゲル電気泳動法、一分子蛍光相関分光法により定性的に、また複合体形成に伴う蛍光消光を利用した蛍光測定法により定量的に解析を加えた。

高分子材料・核酸間の相互作用に及ぼすイオン強度、温度、イオン種の影響を検討し、イオンの相互作用とその他の相互作用の寄与についても知見を得た。また、核酸の高次構造の安定性と構造転移の動的挙動に及ぼす高分子材料の効果を解析した。核酸高次構造の安定化は、UV-融解曲線測定、円二色性-融解曲線測定などにより行った。

(2)高分子材料の核酸安定化機能、体内動態解析

ナノマシンシステムの治療効果を有効に発現させるためには、ナノマシンシステムを患部に集積させる必要がある。そのためには、生体内でのシステムの安定化と患部への移行性の向上が必要となる。生体内での安定化には、①血液中酵素への耐性の獲得、②糸球体濾過からの回避、③異物認識機構からの回避が不可欠である。これらの生体内特性に関しては、これまで内外で千種期された高分子を利用した医薬送達担体に関する研究知見および核酸医薬に関する研究知見を、システム設計に取り入れた。

ナノマシンシステムの組織分布などの体内動態も詳細に検討した。酵素耐性などは *in vitro* 実験により評価し、血液滞留性、組織分布の解析には、マウスなどの小動物を利用した。具体的には、高分子材料および核酸を蛍光標識し、マウスに投与し経時的に *in vivo* 蛍光イメージャーで追跡した。さらに定量的解析には、各組織から高分子材料を抽出し、蛍光光度計などで解析した。

## 4. 研究成果

(1)核酸シャペロン活性を有する高分子の合成

ポリカチオンを主鎖、親水性高分子を側鎖に有する高分子材料として、既にポリリシンを主鎖、デキストランを側鎖に有するくし型共重合体 (PLL-g-Dex) が、核酸のハイブリッド形成を促進し、核酸シャペロン活性を発現することを見いだした。共重合体のカチオン基の効果を検討するために、PLL-g-Dex の一級アミノ基をメチル化した MPLL-g-Dex (図 1) を合成した。

MPLL-g-Dex は、PLL-g-Dex をジメチル硫酸で反応することで得た。NMR 解析より、定量的にメチル化され 4 級アンモニウム基を有する共重合体が見いだされた。また、GPC 解析より、メチル化前後で有意な分子量の変化は認められず、高分子鎖の切断や架橋などの副反応が生じていないことが示唆された。MPLL-g-Dex と DNA との相互作用を、DNA 二重鎖融解温度測定や蛍光相関スペクトル法で評価した結果、MPLL-g-Dex は PLL-g-Dex に比べ、塩基組成依存性が大きいことを見いだされた。

核酸シャペロン活性には、核酸やそれを取り巻く水との相互作用も影響することが考えられる。そこで、水素結合性基としてウレア基を導入した共重合体 (UPAA-g-Dex、図 1) の調製を行った。UPAA-g-Dex は、ポリアリルアミン-g-Dex (PLL-g-Dex) をシアン酸カリウムでカルバモイル化により得た。シアン酸カリウムの量を調節することで、種々のカルバモイル化率の UPAA-g-Dex を得た。UPAA-g-Dex と DNA との相互作用を二重鎖 DNA の融解温度に与える影響から評価した。その結果、カルバモイル化率がある閾値に達すると二重鎖安定化効果が消失することを見いだされた。ポリカチオン共重合体の二重鎖安定化効果が抑制されることを示し、シャペロン活性の向上するうえで有用な知見である。

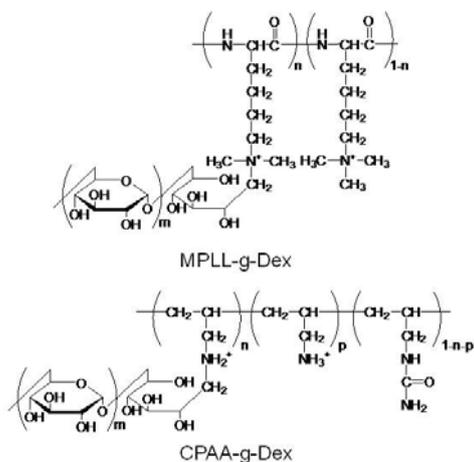


図 1 MPLL-g-Dex および CPAA-g-Dex の構造式

(2) 高分子材料の核酸安定化機能、体内動態

解析

血清中の核酸分解酵素に対するカチオン性くし型共重合体の核酸保護効果を検討した。90%血清中で 3 時間インキュベーション後も siRNA は共重合体と複合体を形成していた。共重合体と siRNA との複合体は凝集を伴わない可溶性の複合体であるが、高い保護効果を有することが見いだされた。

共重合体のガン組織移行性を検討した。4T1 細胞を皮下に移植した担ガンモデルマウスに蛍光ラベルを施した共重合体を尾静脈投与し、経時的にガン組織への集積を評価した。その結果、共重合体はそのグラフト率や分子量に依存して、ガン組織に集積することが見いだされた (図 2)。

さらに、共重合体の腫瘍集積性は、肺転移性の腫瘍モデルにおいても確認された。

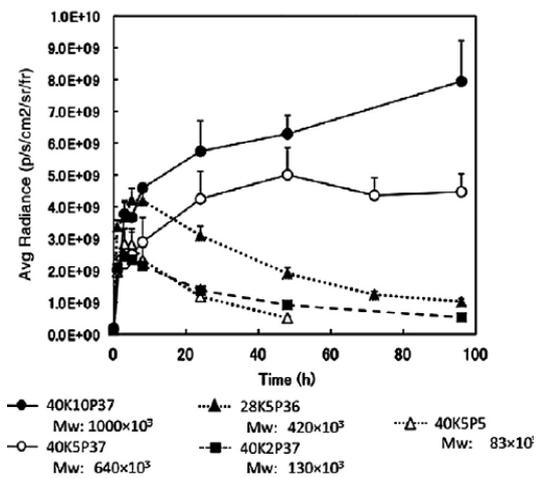


図 2 担ガンマウスにおける種々の共重合体の腫瘍集積性

(3) 共重合体による核酸構造転移の制御

アダプターやリボザイムなど多くの機能性核酸にステム-ループ構造やグアニン 4 重鎖構造が見受けられる。したがって、これらの構造を制御する手法は、機能性核酸の取得や活性の制御に利用できる。しかしながら、核酸の構造転移は、転移に伴うエネルギーバリアが大きく、通常転移は緩慢である。また、4 重鎖核酸もその形成速度が顕著に遅いことが課題となっている。そこで、くし型共重合体を利用した構造転移の迅速化を検討した。

自己相補的なステム-ループ DNA の二量体化に及ぼす種々のカチオンの効果を検討した。150 mM Na<sup>+</sup>では二量体の形成は僅かであった。50 mM Mg<sup>2+</sup>あるいは 500 μM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>を添加することで、二量体の形成が促進されるものの、定量的な転移には至らなかった。一方、PLL-g-Dex をカチオン濃度で 100 μM 添加した際には、ほぼ定量的に二量体が形成さ

れ、共重合体が二量体を効果的に安定化することがわかった。さらに、これらのカチオン種の速度論的效果を評価した結果、共重合体は速やかに二量体を形成させるのに対し  $Mg^{2+}$  または  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  ではきわめて緩慢であることが見いだされた。

分子間 4 重鎖形成に対するくし型共重合体の効果を検討した。DNA のみでは 4 重鎖形成に数日掛かる条件下、共重合体を添加することで、分オーダーで 4 重鎖が形成できることが見いだされた。図 3 には、4 重鎖形成速度に及ぼす共重合体の効果を示す。共重合体濃度 (N/P 比) 依存的に形成速度は増大し、3 桁形成速度を上げられることがわかった。

さらに共重合体は、4 重鎖とそれを構成する単鎖との鎖交換反応も顕著に促進することが見いだされた。4 重鎖核酸を含む鎖交換反応の例として、世界的にもはじめての例である。核酸構造転移を促す特異な機能をくし型共重合体が発現することを示す。

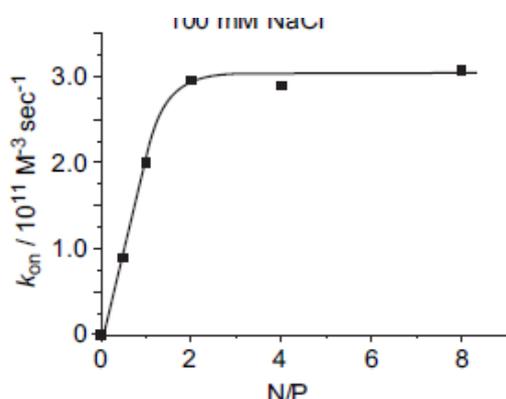


図 3 くし型共重合体の 4 重鎖 DNA 形成に対する促進効果

以上の成果は、共重合体により機能性核酸の活性をガン組織特異的に制御し得ることを示唆し、生体に優しいソフトナノマシンの基盤材料として共重合体が有用と考えられる。共重合体で見いだされた知見を取り込んだナノマシンシステムが新しいナノ治療手法として期待される。

#### 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 25 件)

1. P. L. T. Tran, R. Moriyama, A. Maruyama, B. Rayner, J. L. Mergny, A mirror-image tetramolecular DNA quadruplex, Chem. Commun., in press. Chem Commun., 査読有, 47, 5437-9 (2011).
2. Y. Ohya, S. Takeda, Y. Shibata, T. Ouchi, A. Kano, T. Iwata, S. Mochizuki, Y. Taniwaki, A. Maruyama, Evaluation of polyanion-coated biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles, J. Controlled Rel., 査読有, in press.
3. T. Ishihara, A. Kano, K. Obara, M. Saito, X. Chen, T. G. Park, T. Akaike, A. Maruyama, Nuclear localization and antisense effect of PNA internalized by ASGP-R-mediated endocytosis with protein/DNA conjugates, J. Controlled Rel., 査読有, in press.
4. N. Sonda, M. Hirano, N. Shimada, A. Kano, S. Kidoaki, A. Maruyama, Cationic comb-type copolymers do not cause collapse but shrinkage of DNA molecules, Chem. Lett, 査読有, 40, 250-251 (2011).
5. R. Moriyama, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, DNA assembly and reassembly activated by cationic comb-type copolymer, Biomaterials, 査読有, 32, 2351-2358 (2011).
6. A. Kano, K. Moriyama, T. Yamano, I. Nakamura, N. Shimada, A. Maruyama, Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA, J. Controlled Rel., 査読有, 149, 2-7 (2011).
7. N. Shimada, M. Yamamoto, A. Kano, A. Maruyama, Cationic graft copolymer as a DNA B-Z transition inducer: Effect of copolymer structure, Biomacromolecules, 査読有, 11, 3043-3048 (2010).
8. Y. Ohya, S. Takeda, Y. Shibata, T. Ouchi, A. Maruyama, Preparation of Biodegradable Polymer Micelle Exhibiting High Stability by Coating with Polyion Complex, Macromol. Biosci., 査読有, 211, 1750-1756 (2010).
9. N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, B-Z DNA transition triggered by a cationic comb-type copolymer, Adv. Funct. Mater., 査読有, 19, 3590-3595. (2009).
10. N. Morimoto, J. Tamada, S. Sawada, N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, K. Akiyoshi, Interaction of self-assembled cationic nanogels with oligo-DNA and function as artificial nucleic acid

chaperone, Chem. Lett., 査読有, 38, 496-497 (2009).

11. H. Torigoe, A. Maruyama, S. Obika, T. Imanishi, T. Katayama, Synergistic stabilization of nucleic acid assembly by 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid modification and additions of comb-type cationic copolymers, Biochemistry, 査読有, 48, 3545-3553 (2009).
12. S. Mochizuki, A. Kano, N. Shimada, A. Maruyama, Liver endothelial cell uptake of enzymatically digested hyaluronan in vivo and in vitro, J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 査読有, 20, 83-97 (2009).
13. C. Perrino, S. Lee, S. W. Choi, A. Maruyama, N. D. Spencer, A Biomimetic Alternative to PEG as an Antifouling Coating: Resistance to Non-Specific Protein Adsorption of Poly(L-lysine)-graft-Dextran, Langmuir, 査読有, 24, 8850-8856 (2008).
14. A. Maruyama, L. Wu, N. Shimada, A. Kano, Kinetic effect of cationic comb-type copolymers on DNA hybridization, Adv. Mater. Res., 査読有, 47-50, 1355-1358 (2008).
15. A. Kano, T. Yamano, S. W. Choi, A. Maruyama, Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long blood circulatory half-life, Adv. Mater. Res., 査読有, 47-50, 762-764 (2008)

[学会発表] (計 42 件)

1. A. Maruyama, Invited speaker, 2010 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2010 ISOMRM), Cationic comb-type copolymer to manipulate DNA hybridization and folding and its application to DNA nanobiotechnology, Zhunan, Taiwan, November 3-5, 2010
2. A. Maruyama, Invited speaker, 9th International Conference "Medical Applications of Novel Biomaterials and Nano-biotechnology", DNA diagnostics using new cationic polymers, Montecatini Terme, Italy, June 13-18, 2010
3. A. Maruyama, Invited speaker, International conference on materials for advanced technologies, "DNA Nanoscience and Biophysics", Cationic Comb-type Copolymers as DNA Chaperones, Singapore, June 28-July 3,

2009.

[図書] (計 3 件)

1. 丸山厚, 人工核酸シャペロンの設計とナノバイオテクノロジーへの展開、核酸医薬の最前線、和田猛監修、シーエムシー出版、pp. 26-37 (2009) (分担執筆)
2. 丸山厚, 生体材料と核酸技術、バイオマテリアル-生体材料-, 433-440 (2008) (分担執筆)
3. 丸山厚, くし型高分子ナノ材料、次世代医療のための高分子材料工学、秋吉一成、岸田晶夫編、シーエムシー出版、pp. 11-23 (2008) (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: pH及び塩濃度応答性材及びその用途  
発明者: 嶋田直彦、丸山厚  
権利者: 国立大学法人九州大学  
種類: 特許出願  
番号: 2010-066792  
出願年月日: 2010年3月23日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:

<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/wmaruyama/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

丸山 厚 (MARUYAMA ATSUSHI)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号: 40190566