

自己評価報告書

平成23年3月16日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20689024

研究課題名（和文） 多機能高分子ナノミセル型遺伝子ベクターを用いた血管疾患の
遺伝子治療法の開発研究課題名（英文） Development of gene therapy against vascular diseases using
polymeric micellar gene vector with versatile functions

研究代表者

大庭 誠 (OBA MAKOTO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20396716

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学、遺伝子治療、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究計画の概要

本研究では、全身投与で患部の標的化が可能な遺伝子ベクターの開発を目的とする。ベクターを投与してから効果を発揮するまでの各過程、すなわち、血液中における安定性、血管疾患部位への特異的な取り込み、細胞内に取り込まれた後の核に到達するまでの細胞内動態、ミセルに内包しているプラスミドの放出に関して、*in vitro* および *in vivo* で詳細に検討を行い、各機能の最適条件を探る。最終的には最適条件の各機能を兼ね備えた高分子ミセルを作製して評価を行うとともに、治療遺伝子を搭載したミセルを用い血管疾患モデルに対する治療の評価を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) 新規機能性ブロック共重合体の設計

表面を PEG で覆われた高分子ミセルは、培地中での分散安定性の向上、血清タンパクや細胞表面との非特異的相互作用の抑制、毒性の軽減などに寄与する一方で、遺伝子導入効率が低下してしまうというジレンマを抱えていた。解決策として PEG とポリカチオンの間を細胞内の還元環境に応答して開裂するジスルフィド(SS)結合で連結し、PEG 化ミセルと同レベルの毒性を維持しつつ、PEG の無いポリプレックスと同程度遺伝子発現させることに成功した。

(2) ジスルフィド(SS)架橋ミセル

ミセル内核に SS 架橋を施すことで、培養細胞に対する遺伝子導入効率が上昇することを確認した。また、既存の遺伝子ベクターと比べて血中滞留性を向上させることに成功した。治療遺伝子として血管新生を阻害するタンパク質発現プラスミドを、モデルとして睨がんを皮下に移植したマウスを使用し、

ミセルを尾静脈より全身投与したところ最適な架橋率のミセルにおいて有意にがんの増殖を抑制することができた。

(3) 環状 RGD ペプチドリガンドミセル

前述の SS 架橋ミセルに、増殖性の血管内皮細胞/平滑筋細胞で過剰に発現している $\alpha v \beta 3$ インテグリンを特異的に認識する環状型 RGD ペプチド(cRGD)を導入することに成功した。*In vitro* 評価では、インテグリン発現細胞に対する遺伝子導入効率を大幅に上昇させ、その要因が細胞内動態の変化によることを明らかにした。また *in vivo* 評価では、全身投与後のがん周辺の血管内皮細胞への集積性が向上した。

(4) cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセル

効果的なエンドソーム脱出を可能にする PAsp(DET)ポリカチオンを持った cRGD-PEG-PAsp(DET)ミセルについて、ラット頸動脈内膜肥厚モデルに対して局所投与し、その機能評価を行った。cRGD を導入することで患部への集積性が向上し、患部における遺伝子発現が持続することが確認できた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

血中での安定性の向上、疾患部位への標的化、細胞内動態の制御、搭載遺伝子の効果的な放出等の各種インテリジェント機能を搭載した高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発に成功し、それらの成果について一部は当初の研究計画を前倒しして発表することができた。また、ラット血管内膜肥厚モデルを用い、cRGD ミセルによる効率の良い遺伝子導入にも成功している。

4. 今後の研究の推進方策

研究代表者が所属機関を異動したために大動物を用いた評価は困難になってしまったが、引き続きマウス等の小動物を用いた評価を継続するとともに、細胞を用いた in vitro 評価、すなわち高分子ミセル型遺伝子ベクターの細胞内での挙動並びに、更なる高機能化高分子ミセルの設計に力を入れ研究を推進する。

5. 代表的な研究成果

(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 12 件)

- ① Makoto Oba, Kazuhiro Aoyagai, Kanjiro Miyata, Yu Matsumoto, Keiji Itaka, Nobuhiro Nishiyama, Yuichi Yamasaki, Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinks directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharmaceutics*, 5(6), 1080-1092 (2008), 査読有り.
- ② Kanjiro Miyata, Makoto Oba, Masataka Nakanishi, Shigetou Fukushima, Yuichi Yamasaki, Hiroyuki Koyama, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(48), 16287-16294 (2008), 査読有り.
- ③ Muri Han, Makoto Oba, Nobuhiro Nishiyama, Mitsunobu R. Kano, Shinae Kizaka-Kondoh, Kazunori Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.*, 17(8), 1404-1410 (2009), 査読有り.
- ④ Kanjiro Miyata, Noha Gouda, Hiroyasu Takemoto, Makoto Oba, Yan Lee, Hiroyuki Koyama, Yuichi Yamasaki, Keiji Itaka, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials*, 31(17), 4764-4770 (2010), 査読有り.
- ⑤ Makoto Oba, Yelena Vachutinsky, Kanjiro Miyata, Mitsunobu R. Kano, Sorato Ikeda, Nobuhiro Nishiyama, Keiji Itaka, Kohei Miyazono, Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharmaceutics*, 7(2),

501-509 (2010), 査読有り.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Makoto Oba, Kazuhiro Aoyagai, Kanjiro Miyata, Nobuhiro Nishiyama, Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Functional assessment of polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinked core. 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 12-16th, 2008, New York.
- ② 大庭 誠, Vachutinsky Yelena, 宮田完二郎, 狩野光伸, 宮園浩平, 西山伸宏, 小山博之, 片岡一則, 高分子ミセル型遺伝子ベクターを用いた膵臓がんの遺伝子治療法の開発. 第 31 回日本バイオマテリアル学会, 2009 年 11 月 16 日~17 日, 京都.
- ③ Makoto Oba, Yelena Vachutinsky, Kanjiro Miyata, Sorato Ikeda, Nobuhiro Nishiyama, Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Anti-angiogenic gene therapy of pancreatic adenocarcinoma using polyplex micelles with plasmid DNA encoding soluble form of Flt-1. The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery System, December 16-20th, 2009, Maui.
- ④ 大庭 誠, 宮田完二郎, 長田健介, 福島重人, 西山伸宏, 小山博之, 片岡一則, 化学量論的な電荷比を超えて会合する高分子ミセル型遺伝子ベクターの設計とその機能評価. 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム, 2010 年 6 月 2 日~3 日, 札幌.
- ⑤ Makoto Oba, Yelena Vachutinsky, Kanjiro Miyata, Nobuhiro Nishiyama, Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of subcutaneous pancreatic tumor by systemic injection of polyplex micelles loading sFlt-1 plasmid DNA. PACIFICHEM 2010, December 15-20th, 2010, Honolulu.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 電荷変換型三元系ポリプレックス
発明者: 片岡一則, 宮田完二郎, Lee Yan, 大庭 誠, 西山伸宏, 比木茂寛, 三條 舞, Kim Hyn Jin

権利者: 同上

種類: 特許

番号: WO2009-133968

出願年月日: 2009 年 4 月 30 日

国内外の別: 国外