

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31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 for vascular disease using multi-functional polymeric micellar gene vector
 研究代表者
 大庭 誠 (OBA MAKOTO)
 長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号
 研究者番号：20396716

研究成果の概要（和文）：親水性高分子であるポリエチレングリコールとカチオン性高分子からなるブロック共重合体がポリアニオンである pDNA と水中で自発的に会合して形成する高分子ミセルを用い、全身投与で血管疾患の治療を可能にする遺伝子デリバリーシステムの開発を行った。各種インテリジェント機能を付与した高分子ミセルを設計し、血中での安定性の向上、疾患部位の標的化、細胞内動態の制御、搭載遺伝子の効果的な放出を達成した。

研究成果の概要（英文）：I developed systemic gene delivery systems for vascular diseases using polymeric micelles, composed of poly(ethylene glycol)-polycation block copolymers and plasmid DNA. I designed polymeric micelles with various intelligent functions, and they achieved an enhancement of stability in blood stream, targeting to disease regions, controlling intracellular trafficking, and effective release of encapsulated gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
総計	19,000,000	5,700,000	24,700,000

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. 研究開始当初の背景

血管壁を標的とした遺伝子治療において様々な基礎・臨床研究が行われているが、臨床に応用できるような有効なシステムの開発は未だ達成されていない。血管壁への遺伝子導入では、血中の酵素や血清蛋白などにより容易に遺伝子が分解されてしまうこと、さらに血流にのった移動や拡散により標的部位における特定の細胞への取り込みが困難

であることから、その遺伝子導入効率は非常に低い。またこれまで遺伝子治療の中核を担ってきたウイルスベクターは、その高い遺伝子導入効率から汎用されてきたが、免疫反応の惹起などの安全性の問題や製剤的な観点から臨床への応用には懸念が抱かれている。このような背景より、高い遺伝子導入効率を達成しうる安全性と生産性を具備した非ウイルスベクター開発への期待が高まってい

る。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに高分子ミセル型非ウイルスベクターの研究開発を行ってきた。ここでいう高分子ミセルとは、親水性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)とカチオン性高分子からなるブロック共重合体が、ポリアニオンであるプラスミド DNA (pDNA) や siRNA と水中で自発的に会合して形成するコア-シェル型のナノ構造体である。本申請研究では、各種インテリジェント機能を高分子ミセルに付与することで、全身投与で血管疾患の治療を可能にする遺伝子デリバリーシステムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

全身投与による血管疾患部位特異的な遺伝子導入を可能にするインテリジェント機能として、(1)血中での安定性の向上、(2)疾患部位の標的化、(3)細胞内動態の制御、(4)搭載遺伝子の効果的な放出、を可能にする内核架橋やペプチドリガンド等を付与し、各機能の評価を行う。

(1)血中での安定性の向上：外殻を生体適合性の PEG で覆われた高分子ミセルは、裸の pDNA と比べて核酸分解酵素による分解を回避することができる。しかしながら、血中に投与され標的となる疾患部位に到達し十分な機能を発現するためには、その血液中的安定性は必ずしも満足いくものではない。そこで本研究では、還元環境に反応して開裂するジスルフィド架橋(SS 架橋)をミセル内核に施しミセルの更なる血中での安定性向上を図る。また、カチオン性高分子への疎水性基の導入についても併せて検討する。

(2)疾患部位の標的化：血管壁への遺伝子導入において、疾患部位を特異的に認識し、能動的かつ速やかに細胞内へ取り込まれることが重要である。本研究では、血管内膜肥厚部位の細胞に過剰発現している $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状型の RGD ペプチド(cRGD)をリガンドとしてミセル表層に付与し、血管疾患の標的化を行う。*In vitro* 実験として血管内皮細胞や平滑筋細胞に対して、*in vivo* 実験として内膜肥厚ラットモデルに対して、ミセルの取り込みおよび遺伝子導入効率について cRGD リガンドの評価を行う。また、簡便に評価可能な動物モデルとしてがん皮下移植マウスを使用し、評価を行う。

(3)細胞内動態の制御：高分子ミセルは 100nm 前後のサイズであり、エンドサイトーシスにより細胞内に移行し、エンドソームを経て最終的にリソソームに局在するものと考えら

れる。リソソーム内で核酸は容易に酵素加水分解を受けてしまうため、遺伝子ベクターにとってリソソームへの局在を回避することは非常に重要である。一方、cRGD ペプチドをミセル表層へ付与すると細胞内での分布が変化し、リソソームへの局在を回避する可能性を見いだしていた。本研究では cRGD ミセルの細胞内動態について、蛍光標識したミセルを調製し、細胞内オルガネラマーカを用いてどのような場所にミセルが局在しているのか、どのような経路を辿って細胞内を移動しているのかを、共焦点顕微鏡により定性的かつ定量的に解析する。

(4)搭載遺伝子の効果的な放出：高分子ミセルに内包された pDNA は、血中などの細胞外では強固に保護される一方で、細胞内の適切な場所で放出される必要がある。本研究では pDNA 放出の on-off 制御のために還元環境に反応して可逆的に開裂する SS 結合を利用し、内包 pDNA の放出挙動について評価する。

4. 研究成果

(1)血中での安定性の向上

①SS 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(図 1)。治療遺伝子として血管新生を阻害する可溶性 VEGF レセプター-1(sFlt-1)を発現する pDNA を、モデルとして腫瘍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。

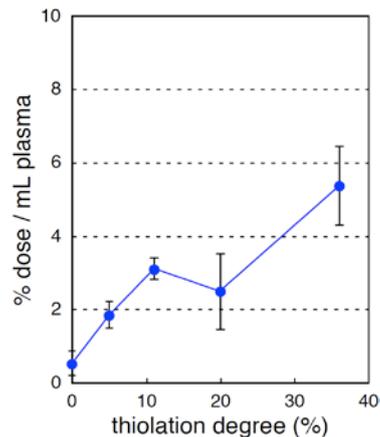


図 1 SS 内核架橋率と血中滞留性

②カチオン性高分子への修飾：申請者らは以前に、非常に低毒性で生分解性機能を有し、高い遺伝子導入効率を達成できる PAsp(DET) ポリカチオンを報告していた。しかしながら、DNA や RNA などのポリアニオンとの会合力が弱く、全身投与には不向きであるという欠点を有していた。そこで PAsp(DET) の会合力の

向上をねらい、ステアロイルやコレステロールなどの疎水性基を PAsp(DET)へと修飾した(図2)。疎水性基を修飾したブロック共重合体は pDNA や siRNA との会合力が増加し、著しい毒性を惹起することなく高い遺伝子導入効率ならびに遺伝子抑制効率を示した。またマウス全身投与後の血中滞留性が向上し、治療遺伝子を搭載した担がんマウスの治療評価では、全身投与することで有意に高いがんの増殖抑制効果を示した。

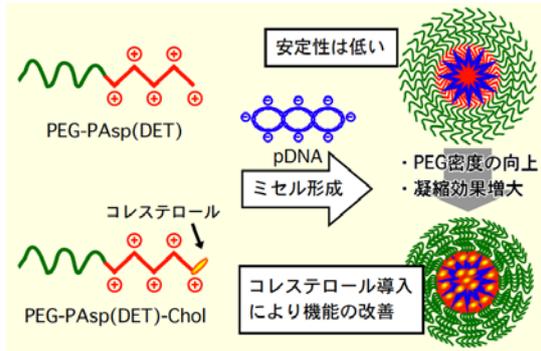


図2 コレステロール修飾ミセル

(2) 疾患部位の標的化

①cRGD-SS架橋ミセル：SS架橋ミセルの表層に環状型RGDペプチドリガンドを付与することに成功した。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプター発現細胞に対する遺伝子導入実験では、その遺伝子導入効率は著しく上昇した(図3)。また共焦点顕微鏡を用いたミセルの細胞内動態観察により、遺伝子導入効率の上昇は、取り込み量の増加ではなく細胞内動態の変化に起因することが明らかになった。膝がんを皮下に移植したマウスに全身投与したところ、がん周辺の新生血管($\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを過剰発現している)への集積量が上昇していた。



図3 cRGD-SS架橋ミセルの *in vitro* 評価

② cRGD-PEG-PAsp(DET) ミセル：PEG-PAsp(DET)ブロック共重合体に cRGD を導入した cRGD-PEG-PAsp(DET) を合成した。ラット頸動脈内膜肥厚モデルに対して局所投与して評価を行ったところ、cRGD リガンドを導入することにより患部での遺伝子発現が持続することが確認できた。また蛍光標識 pDNA を用いた患部への集積評価では、cRGD ミセルが有意に高い集積性を示した。cRGD リガンドの高分子ミセル型遺伝子ベクターへの導入が、血管疾患を標的とするうえで有効であることを明らかにした。

(3) 細胞内動態の制御：

①cRGD-SS 架橋ミセル：cRGD-SS 架橋ミセルについて、蛍光顕微鏡・共焦点顕微鏡を用いて細胞内での挙動をリアルタイムで評価した。PEG の分子量が 12,000 のミセルでは cRGD の有無による細胞内での挙動の違いが見られなかったが、PEG の分子量が 17,000 のミセルでは cRGD の付与により顕著に早い細胞内取り込みとスムーズに核周辺へ移行することが確認できた。高分子ミセル型遺伝子ベクターを開発するうえで、患部の標的化のためには 17,000 前後の分子量の PEG を利用し、リガンドを導入することが有効であることを明らかにした。

②PEG-PAsp(DET)/PAsp(DET)ハイブリッドミセル：高分子ミセル型遺伝子ベクターは、表層の PEG が生体成分との非特異的相互作用を抑制して毒性の低下に寄与する一方で、エンドソーム脱出機能を阻害して遺伝子導入効率を低下させてしまうというジレンマを抱えていた。そこで PEG-PAsp(DET) と PAsp(DET) を混合して作製したハイブリッドミセルについて検討した。最適な割合で混合したミセルについては、PEG-PAsp(DET) ミセルと同程度の毒性を維持しつつ、PAsp(DET) ポリプレックスと同レベルの高いエンドソーム脱出効率・遺伝子導入効率を示した。

(4) 搭載遺伝子の効果的な放出

①cRGD-SS 架橋ミセル：(1) 血中での安定性の向上のところで示したように、SS 架橋ミセルは培地中での安定性ならびに血中滞留性の向上を示すとともに、細胞内還元環境にตอบสนองした内包 pDNA の放出挙動を示した。

②PEG-SS-PAsp(DET) ミセル(図4)：PEG と PAsp(DET) の間を SS 結合で連結した PEG-SS-PAsp(DET) を合成することに成功した。ミセル表層の PEG は細胞外ではミセルの分散安定性の向上および毒性の低下に寄与する一方で、細胞内還元環境にตอบสนองして開裂することで、効率のよいエンドソーム脱出、内包遺伝子の pDNA の効果的な放出を達成した。

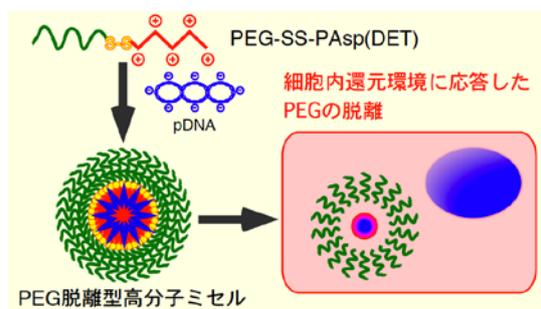


図4 PEG-SS-PAsp(DET) ミセル

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 13 件)

- ① M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery, *Biomaterials*, 査読有, 32(2), 652-663 (2011).
 - ② Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles, *J. Control. Release*, 査読有, 149(1), 51-57 (2011).
 - ③ F. M. König, Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, C. Bräuchle, N. Ruthardt, Effect of integrin targeting and PEG shielding on polyplex micelle internalization studied by live-cell imaging, *J. Control. Release*, 査読有, 156(3), 364-373 (2011).
 - ④ H. Takemoto, A. Ishii, K. Miyata, M. Nakanishi, M. Oba, T. Ishii, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system, *Biomaterials*, 査読有, 31(31), 8097-8105 (2010).
 - ⑤ H. J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown, *J. Control. Release*, 査読有, 145(2), 141-148 (2010).
 - ⑥ M. Sanjoh, S. Hiki, Y. Lee, M. Oba, K. Miyata, T. Ishii, K. Kataoka, pDNA/poly(L-lysine) polyplexes functionalized with a pH-sensitive charge-conversional poly(aspartamide) derivative for controlled gene delivery to human umbilical vein endothelial cells, *Macromol. Rapid Comm.*, 査読有, 31(13), 1181-1186 (2010).
 - ⑦ M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1, *Mol. Pharmaceutics*, 査読有, 7(2), 501-509 (2010).
 - ⑧ K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA, *Biomaterials*, 査読有, 31(17), 4764-4770 (2010).
 - ⑨ M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M. R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles, *Mol. Ther.*, 査読有, 17(8), 1404-1410 (2009).
 - ⑩ S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environmental-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery, *Biomacromolecules*, 査読有, 10(1), 119-127 (2009).
 - ⑪ K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. 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.*, 査読有, 130(48), 16287-16294 (2008).
 - ⑫ K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue, *Pharm. Res.*, 査読有, 25(12), 2924-2936 (2008).
 - ⑬ M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinks directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking, *Mol. Pharmaceutics*, 査読有, 5(6), 1080-1092 (2008).
- [学会発表] (計 14 件)
- ① H. J. Kim, M. Oba, F. Pittella, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyaspartamide derivative block copolymer bearing stearyl moieties for in vivo siRNA delivery, 第 60 回高分子討論会 (岡山, 2011 年 9 月 28-30 日).
 - ② 大庭 誠, 平田陽子, 加藤和也, 田中正一, DDS 素材としての可能性を秘めた非天然型アミノ酸含有ペプチドに関する基礎的

- 研究, 第27回日本DDS学会学術集会 (東京, 2011年6月9-10日).
- ③ Q. Chen, M. Oba, T. Ishii, K. Osada, K. Kataoka, Enhanced transfection by binary polyion complex from block- and homo-polycations towards systemic gene therapy, 第60回高分子年次大会 (大阪, 2011年5月25-27日).
- ④ M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of subcutaneous pancreatic tumor by systemic injection of polyplex micelles loading sFlt-1 plasmid DNA, PACIFICHEM 2010 (Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2010).
- ⑤ 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 (札幌, 2010年6月2-3日).
- ⑥ M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, S. Ikeda, N. Nishiyama, H. Koyama, K. 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 (Maui, December 16-20, 2009).
- ⑦ 大庭 誠, Y. Vachutinsky, 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大会 (京都, 2009年11月16-17日).
- ⑧ 大庭 誠, Y. Vachutinsky, 宮田完二郎, 狩野光伸, 宮園浩平, 西山伸宏, 位高啓史, 小山博之, 片岡一則, 膵臓がんの遺伝子治療を目指した高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発, 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム (大阪, 2009年7月3-4日).
- ⑨ M. Oba, Anti-angiogenic gene therapy for pancreatic cancer by systemic administration of polyplex micelles, CMSI-GCOE Students Workshop: Frontiers in Nanomedicine (Tokyo, November 19, 2008).
- ⑩ 大庭 誠, 宮田完二郎, 福島重人, 位高啓史, 西山伸宏, 小山博之, 片岡一則, 疎水性相互作用を利用した高分子ミセル型遺伝子キャリアの開発, 第37回医用高分子シンポジウム (東京, 2008年7月28-29日).
- ⑪ M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Functional assessment of polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinked core, 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (New York, July 12-16, 2008).
- ⑫ 大庭 誠, 宮田完二郎, 福島重人, 長田健介, 位高啓史, 西山伸宏, 小山博之, 片岡一則, 疎水性相互作用を利用した高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発, 第24回日本DDS学会 (東京, 2008年6月29-30日).
- ⑬ M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, K. Itaka, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from plasmid DNA and PEG-based block copolymer with environmental-responsive crosslinks and targetable ligands, 第14回日本遺伝子治療学会総会 (Sapporo, June 12-14, 2008).
- ⑭ 大庭 誠, 宮田完二郎, 福島重人, 長田健介, 位高啓史, 西山伸宏, 小山博之, 片岡一則, 疎水性相互作用により安定化されたポリプレックスミセル型遺伝子ベクター, 遺伝子・デリバリー研究会第8回シンポジウム (大阪, 2008年5月9日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 誠 (OBA MAKOTO)

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 20396716