

## 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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22700489

研究課題名（和文）機能性高分子-siRNA 結合体の創製と siRNA デリバリーへの応用

研究課題名（英文）Development of functional polymer-siRNA conjugates for siRNA delivery

研究代表者

宮田 完二郎 (MIYATA KANJIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50436523

研究成果の概要（和文）：本研究では、核酸医薬（siRNA）を細胞質へと効率良く導入するための方法論として、「siRNA」と「エンドソーム膜傷害性を有する高分子」が酸性環境に応答して開裂する結合で繋がれたコンジュゲート体を開発した。結果として、siRNA に優れた血中安定性を与えると共に、培養細胞に対する高効率な siRNA 送達（配列依存的な遺伝子発現の抑制）を達成した。

研究成果の概要（英文）：In this study, a smart siRNA-polymer conjugate was developed with an endosome-disrupting polymer via an acidic pH-responsive linkage. Ultimately, the conjugate provided siRNA with enhanced blood circulation property, and further achieved efficient gene silencing in cultured cells, probably due to facilitated endosomal escape of siRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合領域

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：siRNA デリバリー、バイオコンジュゲート材料

## 1. 研究開始当初の背景

21 塩基の短い 2 本鎖 RNA (siRNA) は、疾患に関連する遺伝子の発現を配列依存的に抑制することが可能であり、幅広い疾患の治療薬となり得ることから、その医療応用が期待されてきた。しかしながら、siRNA は生体内で代謝されやすく、また細胞に取り込まれにくいという問題があった。その問題を解決するために、siRNA を標的とする細胞質まで効率良く導入するための方法論の

確立が求められていた。

siRNA を細胞へ導入する技術の中で、負に帯電した siRNA とカチオン性高分子の間で形成されるポリイオンコンプレックス (PIC) が“siRNA キャリア”として注目を集めてきた。PIC 形成（電荷の中和）に伴い、siRNA が酵素分解から保護され、また細胞取り込みが増大するからである。一方で PIC は、電荷を帯びたタンパク質が豊富に存在する血液の中では、それら荷電性物質との相互作用により、不安定化（解離）することも知られてい

た。よって、静脈内投与を可能とする siRNA キャリアを開発するためには、いかにして生体内（血液中）で PIC を安定化するかが大きな課題となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、静脈内投与に展開可能な安定性を有する PIC 型核酸キャリアの構築を目的とした。また、さらなる機能化を目指し、エンドソーム膜傷害性を有するスマート高分子を組み込むことで、PIC のエンドソーム脱出機能（細胞質移行性）の改善を図った。

## 3. 研究の方法

安定な PIC を構築するための方法論として、新規 siRNA-機能性高分子コンジュゲートの開発を行った。具体的には、カチオン性高分子との間でより強い静電相互作用を生起させるために、アニオン性ポリアミノ酸の側鎖に、複数分子の siRNA を導入した siRNA グラフト共重合体を設計した。まず、シンプルなアニオン性ポリアミノ酸としてポリアスパラギン酸 (PAsp) を用いた siRNA グラフト共重合体を構築し、基本性能に関する評価を行った。続いて、エンドソーム膜傷害性を有するポリアミノ酸を用いて siRNA グラフト共重合体を開発し、そのエンドソーム脱出機能の検証を行った。

## 4. 研究成果

PAsp (約 100 量体) への siRNA の導入は、ジスルフィド結合 (-SS-) を介して行った (図 1)。SS 結合は、血液中のような非還元環境では比較的安定であるが、細胞質の還元環境では速やかに開裂することが知られており、これをリンカーとして用いることで、細胞外での PIC 安定化と細胞質での PIC 不安定化が制御できるのではないかと考えたからである。

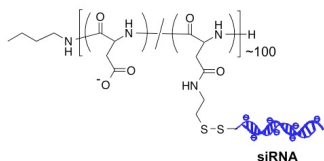


図 1. ポリアスパラギン酸を用いた siRNA コンジュゲート (PAsp(SS-siRNA)) の構造式 ( $\beta$  体等の一部構造は省略)

得られた siRNA グラフト共重合体 (PAsp(SS-siRNA)) については、サイズ排除クロマトグラフィーより解析し、コンジュゲート 1 分子当たり約 4 分子の siRNA が導入されていることを確認した。また、非還元環境と還元環境 (ジチオスレイトール濃度: 100mM) でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、還元環境においてのみ、単体の siRNA が放出されることを確認した。こ

のコンジュゲート体を蛍光 (Cy3) 標識し、側鎖にアミノエチレンの繰り返し構造を有するカチオン性ポリアミノ酸との間で PIC を調製し、蛍光相関分光法 (FCS) により安定性評価を行った。結果として、通常の単体 siRNA を用いて PIC を調製した場合は、血清培地中にて解離してしまう (すなわち単体 siRNA が放出される) が、コンジュゲート体の PIC は安定であることが確認された。次に、培養細胞を用いて、siRNA の細胞内取り込み量をフローサイトメーターにより評価したところ、単体 siRNA の PIC と比して、コンジュゲート体の PIC は取り込み量を 5 倍以上増加させることが明らかになった。さらに、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を用いて PIC を調製し、マウス尾静脈投与後の血中滞留性を評価したところ、単体 siRNA の PIC の血中半減期が 10 分以下であったのに対し、コンジュゲート体を用いることで 50 分以上にまで改善されることも明らかになった。

PAsp(SS-siRNA) の評価を通じて、PIC 安定性の向上と細胞への siRNA 取り込み量の大幅な増加が確認されたことから、コンジュゲート体のさらなる機能化を試みた。具体的には、主鎖のアニオン性ポリアミノ酸として、エンドソーム膜傷害性を有するポリアスパラギン誘導体 PAsp(DET-CDM) を合成し、siRNA とのコンジュゲート体 PAsp(DET-CDM-siRNA) を開発した (図 2)。

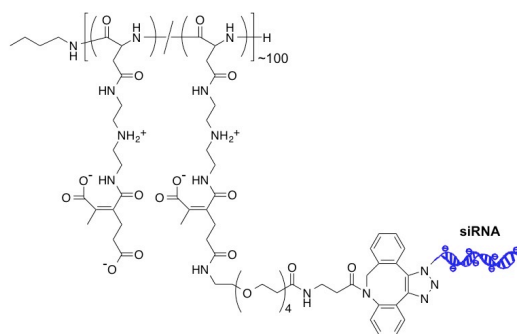


図 2. ポリアスパラギン誘導体 PAsp(DET-CDM) を用いたエンドソーム膜傷害性を有する siRNA コンジュゲート (PAsp(DET-CDM-siRNA)) の構造式 ( $\beta$  体等の一部構造は省略)

このコンジュゲート体は、中性環境ではポリアニオンとして振る舞うが、エンドソームのような酸性環境ではマレイン酸アミドが開裂し、siRNA を放出すると同時に、カチオン性のポリアミノ酸に変換され、エンドソーム膜を傷害する (siRNA の細胞質移行を促進する) 設計である。PAsp(DET-CDM-siRNA) の同定に関しては、PAsp(SS-siRNA) と同様に、サイズ排除クロマトグラフィーおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。

結果として、コンジュゲート1分子当たり平均して4分子の siRNA の導入、さらに酸性環境 (pH 5) での単体 siRNA の放出が確認された。

次に、コンジュゲート中の siRNA を蛍光 (Cy3) で標識し、カチオン性ポリアミノ酸との間で PIC を形成し、培養細胞 (卵巣がん細胞: SKOV3) 中での動態を共焦点蛍光顕微鏡により観察した。この際、酸性オルガネラであるエンドソーム/リソソームを LysoSensor Green で標識した。そして、コンジュゲート PIC (Cy3) とエンドソーム/リソソーム (LysoSensor Green) の共局在率を算出したところ、通常の単体 siRNA から調製された PIC に比べ、コンジュゲート PIC は共局在率が大きく低下していることが明らかになった。すなわち、コンジュゲート PIC は、エンドソーム/リソソームから細胞質へと効率良く移行していることが示唆された。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現している SKOV3 細胞を用いて、siRNA の活性 (ルシフェラーゼ遺伝子の発現に対する抑制効果) を定量的に評価した。コンジュゲート PIC の遺伝子抑制効果は、単体 siRNA の PIC と比べ、有意に高いことが確認され、細胞内動態観察の結果 (コンジュゲート体によるエンドソーム脱出の促進) と矛盾しないものとなった。一方、非標的配列の siRNA から調製されたコンジュゲート PIC は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を全く抑えなかったことから、siRNA の配列依存的な遺伝子抑制効果であることが確認された。

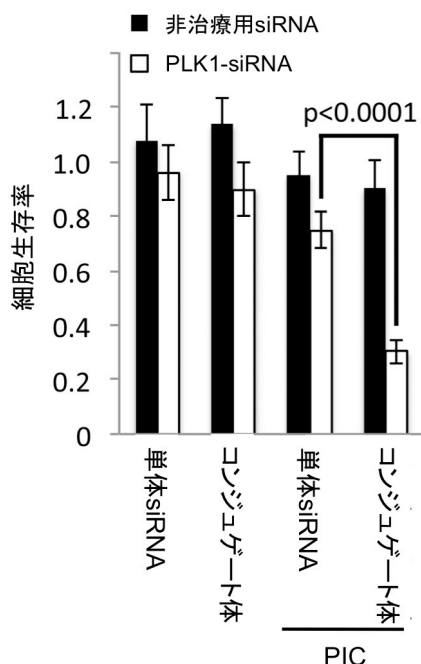


図 3. PLK1 に対する siRNA とそのコンジュゲート体 (PAsp(DET-CDM-siRNA)) から調製された PIC の培養肺がん細胞 (A549) に対する増殖抑制効果

さらに、コンジュゲート PIC のがん治療への潜在的有効性を確認するために、がん細胞にアポトーシスを誘導する polo-like kinase 1 (PLK1) に対する siRNA からコンジュゲート体を調製し、培養肺がん細胞 (A549) への siRNA 導入実験を行った。図 3 に示すように、PLK1-siRNA コンジュゲートの PIC は、siRNA の配列依存的に、がん細胞の増殖を大きく抑制することに成功した。以上より、siRNA と機能性高分子からコンジュゲート体を構築することで、PIC の安定性、細胞への導入効率、エンドソーム脱出能が高まり、結果として siRNA 配列に基づく優れた薬理作用が得られることが明らかになった。

今後は、siRNA コンジュゲート (とその PIC) を用いて、本格的な動物実験、特に皮下移植腫瘍モデルに対する治療実験を行い、核酸医薬の実用化に向けた研究を推進する予定である。

## 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 16 件)

- ① H. Takemoto, K. Miyata, et al (8 人中 2 番目), Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN $\alpha$ -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有, in press (DOI: 10.1002/anie.201300178).
- ② N. Gouda, K. Miyata, et al (10 人中 2 番目), Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials* 査読有, 34, 562-570 (2013) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.077).
- ③ M. Naito, K. Miyata, et al (6 人中 4 番目), A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATP-triggered release of siRNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有 51, 10751-10755 (2012) (DOI: 10.1002/anie.201203360).
- ④ T. Suma, K. Miyata, et al (11 人中 2 番目), Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 査読有, 6, 6693-6705 (2012) (DOI: 10.1021/nl301164a).
- ⑤ H. Takemoto, K. Miyata, et al (7 人中 2 番目), Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate Chem.* 査読有, 23, 1503-1506 (2012) (DOI: 10.1021/bc200116a).

- 10.1021/bc300182y).
- ⑥ F. Pittella, **K. Miyata**, et al (10人中2番目), Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 査読有, 161, 868-874 (2012) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.005).
- ⑦ R. J. Christie, **K. Miyata**, et al (11人中3番目), Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 査読有, 6, 5174-5189 (2012) (DOI: 10.1021/nn300942b).
- ⑧ T. Suma, **K. Miyata**, et al (8人中2番目), Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 査読有, 33, 2770-2779 (2012) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.022).
- ⑨ H. -J. Kim, **K. Miyata**, et al (9人中7番目), PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J. Drug Target.* 査読有, 20, 33-42 (2012) (DOI:10.3109/1061186X.2011.632010).
- ⑩ **K. Miyata**, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem. Soc. Rev.* 査読有, 41, 2562-2574 (2012) (DOI: 10.1039/C1CS15258K).
- ⑪ H. Uchida, **K. Miyata**, et al (8人中2番目), Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of N-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles. *J. Am. Chem. Soc.* 査読有, 133, 15524-15532 (2011) (DOI: 10.1021/ja204466y).
- ⑫ R. J. Christie, **K. Miyata**, et al (12人中2番目), Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* 査読有, 12, 3174-3185 (2011) (DOI: 10.1021/bm2006714).
- ⑬ F. Pittella, **K. Miyata**, et al (10人中8番目), Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 査読有, 32, 3106-3114 (2011) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.057).
- ⑭ **K. Miyata**, R. J. Christie, K. Kataoka, Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *React. Funct. Polym.* 71, 227-234 (2011) (DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.009).
- ⑮ H. Takemoto, **K. Miyata**, et al (9人中3番目), Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system. *Biomaterials* 査読有, 31, 8097-8105 (2010) (DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.07.015).
- ⑯ H. -J. Kim, **K. Miyata**, et al (8人中3番目), 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, 141-148 (2010) (DOI:10.1016/j.jconrel.2010.03.019).
- [学会発表] (計 18 件)
- ① H. Takemoto, **K. Miyata**, et al, siRNA-conjugated charge-conversional polymer as a smart material for siRNA delivery. *16th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems*, 2013年2月3-6日, シェラトンソルトレイクシティ (ユタ, 米国)
- ② H. Takemoto, **K. Miyata**, et al, Enhanced siRNA-polymer click conjugation after gradual freeze-thawing. *The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012)*, 2012年12月11-14日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ **宮田完二郎**, 微小な化学構造の違いに基づいて低毒性/高効率核酸送達を実現する高分子ナノ材料設計. *2012年度日本バイオマテリアル学会*, 2012年11月26日, 仙台国際センター (宮城県)
- ④ **K. Miyata**, et al, Fine-tuning of polycationic nanomaterials for enhanced nucleic acid delivery. *6th Annual Symposium on Nanobiotechnology Kyoto Cell-Material Integration*, 2012年11月7日, 京都大学芝蘭会館 (京都府)
- ⑤ **K. Miyata**, et al, Design of functional polymeric nanomaterials for nucleic acid delivery. *Oligonucleotide Delivery*, 2012年10月9日, ヘルンシュタイン城 (ヘルンシュタイン, オーストリア)
- ⑥ **K. Miyata**, et al, Smart multilayered polymer/silica assemblies for enhanced siRNA delivery. *IUMRS-ICEM2012*, 2012年9月26日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

- 県)
- ⑦ **K. Miyata**, et al, Self-assembled nanostructures of block copolymers as smart vehicles for gene and siRNA delivery. *ISACS9*, 2012年9月3日, アモイ大学(アモイ、中国)
- ⑧ **K. Miyata**, et al, Smart multilayered polymer/silica assemblies for siRNA delivery. *NanoBio Seattle*, 2012年7月24日, ベルハーバーインターナショナルコンベンションセンター(ワシントン州、米国)
- ⑨ **宮田完二郎** 他, 核酸デリバリーを指向したカチオン性ポリアミノ酸構造の精密設計. 第28回日本DDS学会学術集会, 2012年7月4日, 札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑩ **宮田完二郎** 他, siRNA デリバリー用カチオン性ポリアミノ酸設計. 第61回高分子年次大会, 2012年5月29日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑪ **K. Miyata**, et al, Development of cationic poly(amino acid)s for preparation of polyion complexes with nucleic acids for efficient gene and siRNA delivery. *ACS Spring 2012 National Meeting & Exposition*, 2012年3月25日, サンディエゴコンベンションセンター(カリフォルニア州、米国)
- ⑫ **宮田完二郎** 他, 安全かつ高効率な核酸デリバリーに向けたカチオン性ポリアミノ酸設計. 第21回日本MRS学術シンポジウム, 2011年12月20日, 横浜情報文化センター(神奈川県)
- ⑬ **K. Miyata**, et al, Design of polymeric nanocarrier for siRNA delivery. *France-Japan Workshop-The Nanotech Revolution from Science to Society: A Time for Passion and A Time for Reason*, 2011年12月15日, ENS Cachan(パリ、仏国)
- ⑭ **宮田完二郎** 他, ポリイオンコンプレックス型核酸デリバリーシステム構築に向けたカチオン性ポリアミノ酸構造の検討. 第60回高分子討論会, 2011年9月28日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県)
- ⑮ **宮田完二郎** 他, シリカ被覆型核酸デリバリーキャリアの開発. 第27回日本DDS学会学術集会, 2011年6月10日, 東大本郷キャンパス(東京都)
- ⑯ **宮田完二郎** 他, 有機無機ハイブリッド型核酸デリバリーキャリアの開発. 第19回ポリマー材料フォーラム, 2010年12月3日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑰ **宮田完二郎** 他, 高分子を基盤とする遺伝子キャリアのシリカコーティング

とその機能評価. 第26回日本DDS学会学術集会, 2010年6月17日, 大阪国際交流センター(大阪府)

- ⑱ **宮田完二郎** 他, 低毒性かつ高効率な遺伝子導入を可能とする高分子キャリアシステムの設計. 第59回高分子年次大会, 2010年5月27日, パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計1件)

- ① 武元宏泰, **宮田完二郎**, 生体内還元環境とそれに応答する薬剤キャリア設計. 遺伝子医学 *MOOK* 別冊「ここまで広がる徐放技術の最前線-古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)-」, 編集: 田畑泰彦, 出版: メディカルドゥ(2013年)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: アニオン性ポリマー, 該アニオン性ポリマーを用いたポリイオンコンプレックスおよび三元系ポリマー複合体, ならびに薬学組成物

発明者: 片岡一則, 石井篤史, 武元宏泰, 中西政崇, 西山伸宏, **宮田完二郎**

権利者: 東京大学

番号: PCT/JP2010/062400

出願年月日: 2010年7月23日

国内外の別: PCT 出願

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

<http://www.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/research/04.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 完二郎 (MIYATA KANJIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50436523