

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19907

研究課題名(和文) 組織選択的に核酸送達可能な高分子-脂質ハイブリッドナノ粒子の戦略的創出

研究課題名(英文) Strategic creation of polymer-lipid hybrid nanoparticles for tissue-selective nucleic acid delivery

研究代表者

磯野 拓也 (Isono, Takuya)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70740075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、構造的・物理化学的に多様なアミノ化ポリエステル(APE)を合成し、それをベースとした高分子-脂質ハイブリッドナノ粒子(PLNP)のスクリーニングを通じて臓器選択的に核酸送達可能なキャリア創出を目指した。具体的には、アミノアルコールを開始剤に用いたカプロラクトン誘導体の開環重合によりAPEを得た。開始剤、モノマー、重合度を変数とし、合計100種類以上からなるライブラリを構築した。そのうち、いくつかのAPEを構成成分としたPLNPは肺や脾臓に対して選択性を示した。また、グリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合を検討し、新たなAPEライブラリの構築手法としての可能性を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狙った組織への選択的な核酸デリバリーの実現は、DDS分野における大きな課題である。各臓器・組織を狙い撃ちできる優れたキャリアをひとたび得ることが出来れば、内包する核酸の選択次第で従来治療が困難であった遺伝子疾患、がん、ウイルス感染症など多岐にわたる疾病に対する治療法確立に直結する。また、組織選択性を極限まで高めることは副作用を低減するだけでなく、高価な核酸の投与量を減らすことに繋がり、安全かつ安価な核酸医薬を患者へ提供できる。このように本研究で提案したキャリア創出の方法論は将来的に、核酸医薬の実用化と治療対象疾患の拡大に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, structurally and physicochemically diverse amino-functionalized polyesters (APEs) were precisely synthesized, aiming to create nanocarriers capable of selectively delivering nucleic acids to various major organs through screening of APE-based polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLNPs). Specifically, APEs were synthesized via ring-opening polymerization of caprolactone derivatives using aminoalcohols. A library comprising over 100 variants was constructed by varying initiators, monomers, and degrees of polymerization. Among them, several PLNPs incorporating APE components demonstrated selectivity towards the lungs and spleen. Additionally, the ring-opening alternating copolymerization of glycidylamine and cyclic anhydrides was explored as a method to construct a novel APE library.

研究分野：高分子化学

キーワード：核酸医薬 ドラッグデリバリーシステム 精密重合

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は、従来医薬品では狙えなかった疾患に対して治療の道を拓く第三の医薬品として注目されている。しかし、全身投与によって狙った組織(患部)へ選択的に核酸を送り届け、治療効果を発現できるナノキャリアの開発は立ち遅れており、核酸医薬の治療対象疾患の拡大を阻む最大の障壁となっている。

肝臓とがん以外の組織へ選択的に核酸送達可能なナノキャリアの論理的設計指針は現状において存在しないと言って過言ではない。そのため、「肝臓での蓄積を回避し、全身投与によって望みの組織選択的に核酸送達可能な理想的キャリア」を創出するには、膨大なキャリア候補ライブラリに対する *in vivo* スクリーニングが現状の方法論となる。実際、脂質様化合物のスクリーニングから、肺および脾臓選択的送達キャリアが最近見出されている (Siegwart ら *Nat. Nanotechnol.* 2020, 15, 313; Percec ら *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143, 12315 など)。しかし、多段階合成を要する脂質様化合物のライブラリを拡大するには途方もない労力が必要となる。それ故、様々な組織に対して選択性を示すキャリアは未だに空白地帯となっており、その未開領域を切り拓くには、幅広い物理化学的特性を簡便かつ効率的に網羅できる革新的なキャリア候補化合物ライブラリの構築がキーポイントと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者らが培ってきた核酸搭載高分子-脂質ハイブリッドナノ粒子(以後、PLNPと称する)に関する知見と精密重合法をもとに、核酸医薬開発における最大の難問に挑戦するものである。

新規ライブラリとしてアミノ化ポリエステルに焦点を当て、精密交互共重合により膨大な候補材料を迅速合成することを特徴とする研究計画を着想した。アミノ化ポリエステルは核酸の負電荷を安定化させる機能、エンドソーム脱出におけるプロトンスポンジ効果、組織選択性を司る標的化リガンド様の役割を一挙に担うものであり、申請者らが独自設計したキャリア構成材料である (Abd Elwakil, M. M et al. *Mater. Horizons* 2021, 8, 2251)。本研究では、構造的・物理化学的に多様なアミノ化ポリエステルをベースとした PLNP のスクリーニングを通じて各主要臓器へ選択的に核酸送達可能なキャリア創出を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ①アミノアルコールを開始剤としたカプロラクトン誘導体の開環重合によるライブラリ構築

アミノ化ポリエステルのライブラリ構築手法として、種々のアミノアルコールを開始剤としたカプロラクトン誘導体の開環重合を検討した。触媒に TBD を用い、無溶媒条件で各種モノマーをアミノアルコール開始剤存在下で開環重合することで目的のアミノ化ポリエステルを得た。

#### ②グリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合によるライブラリ構築

潜在的により構造的多様性を拡大可能なアミノ化ポリエステルライブラリの構築法として、2種類のモノマーからポリマー繰り返しユニットを構築する開環交互共重合系の応用を着想した。具体的には、アミノ基を繰り返しユニット中に導入するためのグリシジルアミンとエステル結合を主鎖に導入するための環状酸無水物の開環交互共重合を検討した。過去に様々なエポキシドと環状酸無水物の開環交互共重合が報告されているが、グリシジルアミン類をエポキシド成分とした例は知られていない。そこで、本研究ではグリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合法の開発を進めた。

### 4. 研究成果

#### ①カプロラクトン誘導体の開環重合によるアミノ化ポリエステルライブラリ

アミノ化ポリエステルは図 1 に示したスキームに従って合成した。グリシジルアミン類の重合には過去に申請者らが報告した手法を用いた。重合条件は選択するモノマーや開始剤によって適宜最適化した。また、重合度が 10 前後および 20 前後となるようにモノマーと開始剤のモル比を調節して重合を行った。各アミノ化ポリエステルは NMR およびサイズ排除クロマトグラフィーによりキャラクタリゼーションを行った。重合度は NMR から計算した。アミノ化ポリエステルは「X-Y-Z」のように表記し、X は開始剤の種類、Y はモノマーの種類、Z は狙いの重合度を意味する。

続いて、合成した各種アミノ化ポリエステルをベースとした mRNA 搭載脂質ナノ粒子 (PLNP) を調製した。脂質として、各アミノ化ポリエステル、コレステロール、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE) および 1,2-ジミリスチル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングルコール 2000 (DMG-PEG 2000)、核酸としてホタルルシフェラーゼ (Fluc)

mRNA を用いて PLNP を調製した。アミノ化ポリエステル、コレステロール、DOPE、DMG-PEG のモル比は 50/25/23.5/1.5 とし、10  $\mu\text{g}$  の mRNA に対して脂質総量を 500 nmol とした。全体的な傾向として、粒子径は 100~200 nm 程度で、多くは多分散度指数 (PDI) が 0.15 以下であった。X-G8-Z シリーズからなる PLNP は全体的に粒子系分布が広いことがわかった (PDI > 0.3)。

調製した PLNP を ICR マウスに対して尾静脈内注射し、5 時間経過後、標的とした臓器 (肝臓、脾臓、肺、腎臓および心臓) を摘出した。In vivo イメージングシステムにより各臓器中の Fluc による発光を数値化し、in vivo における遺伝子発現効率を調べた。以下、重合に用いた開始剤の種類ごとに分類して結果を説明する。

AA02-Y-Z シリーズの PLNP はモノマー構造と重合度に関係なく脾臓特異的な遺伝子発現が確認された。中でも、AA02-G4-20 LNP が最も高い脾臓での遺伝子発現を示した。AA04-Y-Z シリーズでも同様に脾臓特異的な遺伝子発現が確認され、中でも AA04-E6-20 が最も高い脾臓での遺伝子発現を示した。

AA06-Y-Z シリーズの PLNP は脾臓と肺で遺伝子発現が確認され、モノマーの構造によって脾臓/肺での発現効率に違いが見られた。すなわち、AA06-G4-10 は肺で優先的に遺伝子発現が見られるのに対し、その他では脾臓において優先的に遺伝子発現が見られた。また、今回検討した範囲においては、重合度は臓器特異性や発現効率にそれほど影響を与えないことが判明した。

AA09-Y-Z シリーズの PLNP においては脾臓と肺で同程度の遺伝子発現が確認された。AA11-Y-Z でも両臓器での遺伝子発現がみられたが、両臓器間で大きな発現効率の差は見られなかった。

以上のように、開始剤とモノマーの構造はともに臓器特異性と発現効率に影響し、重合度はあまり影響を与えないことが明らかになった。特に、窒素の数が多き開始剤構造を有するアミノポリエステルほど発現効率が高くなる傾向が確認できた。また、X-A4-Z シリーズは全体的に高い発現効率を示す傾向が見られた。

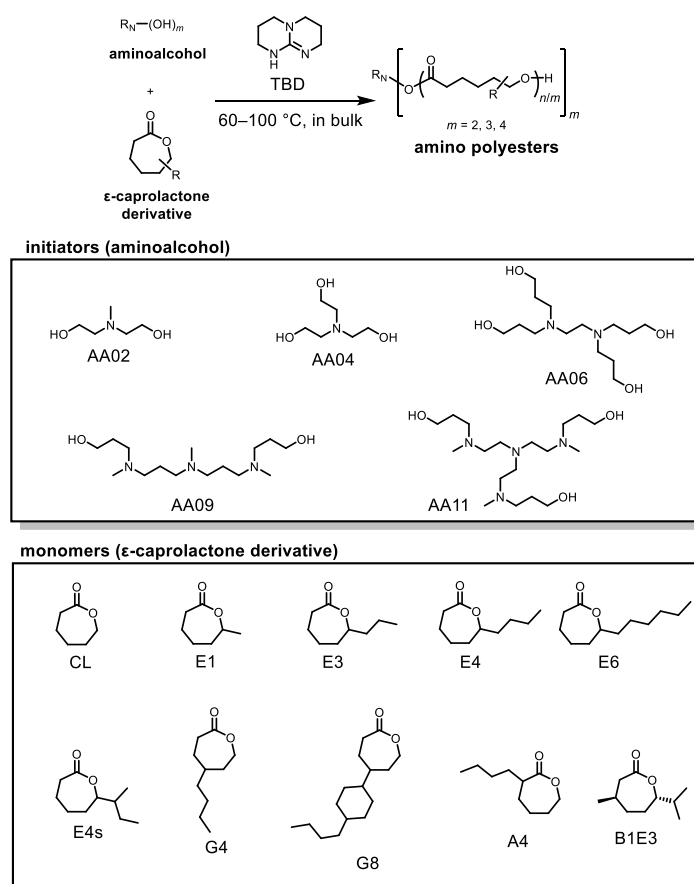


図1 カプロラクトン誘導体の開環重合によるアミノ化ポリエステルライブラリの構築

## ②グリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合によるアミノ化ポリエステルライブラリ構築の試み

過去に様々なエポキシドと環状酸無水物の開環交互共重合が報告されているが、グリシジルアミン類をエポキシド成分とした例は知られていない。そこで、本研究ではグリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合法の開発を進めた (図2)。

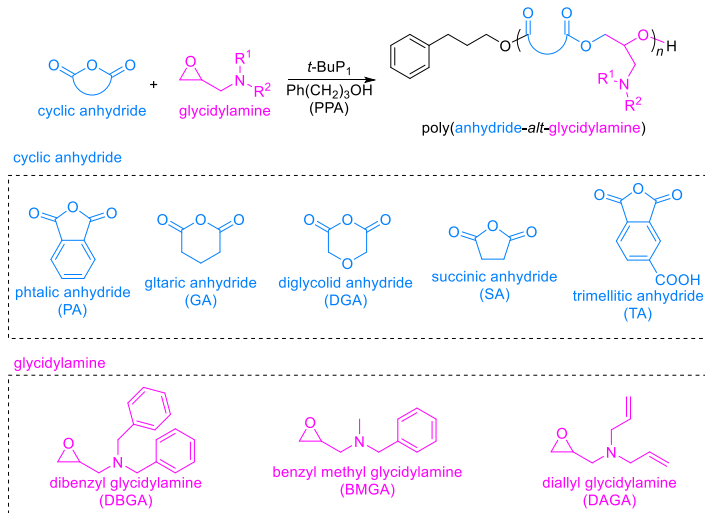


図2 グリシジルアミンと環状酸無水物の開環交互共重合

まず、重合条件の探索を目的とし、グリシジルアミンとして *N,N*-ジベンジルグリシジルアミン (DBGA)、環状酸無水物としてフタル酸無水物 (PA) をモノマー、3-フェニル-1-プロパノール (PPA) を開始剤として用い、種々の塩基触媒による重合を試みた。無溶媒、80 °C、 $[\text{DBGA}]_0/[\text{PA}]_0/[\text{PPA}]_0/[\text{cat.}] = 75/25/1/1$  の条件で重合を行った結果、アルカリ金属カルボン酸塩やフォスファゼン塩基を触媒に用いることで予想通りの開環交互共重合の進行が確認された。また、興味深いことに本重合は無触媒でも進行することが明らかになった。これはグリシジルアミンの3級アミンが塩基触媒として働いたためである。検討した触媒の中で最も分子量分散度の狭い生成物を与えた *t*-BuP<sub>1</sub> を最適触媒とした。

確立した重合系を用いて、様々なグリシジルアミンと環状酸無水物の組み合わせの重合を検討した。グリシジルアミンとして DBGA の他、*N,N*-ベンジルメチルグリシジルアミンと *N,N*-ジアリルグリシジルアミン、環状酸無水物として PA の他にグルタル酸無水物、ジグリコール酸無水物、無水コハク酸を用い、合計6つの組み合わせについて重合を試みたところ、いずれも目的のアミノ化ポリエステルを与えた。また、潜在的 AB<sub>2</sub> 型モノマーであるトリメリット酸無水物を酸無水物モノマーとして用いることで、ハイパーブランチ型のアミノポリエステルが得られた。このことから、構造的に多様なアミノ化ポリエステルライブラリ構築の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abd Elwakil Mahmoud M., Suzuki Ryota, Khalifa Alaa M., Elshami Rania M., Isono Takuya, Elewa Yaser H.A., Sato Yusuke, Nakamura Takashi, Satoh Toshifumi, Harashima Hideyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Harnessing Topology and Stereochemistry of Glycidylamine Derived Lipid Nanoparticles for in Vivo mRNA Delivery to Immune Cells in Spleen and Their Application for Cancer Vaccination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2303795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202303795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gao Tianle, Li Feng, Suzuki Ryota, Li Huan, Yamamoto Takuya, Xia Xiaochao, Isono Takuya, Satoh Toshifumi	4. 巻 56
2. 論文標題 One-Step Synthesis of Poly(amide ester)-Based Block Copolymers with Defined Phase Separation Behavior	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 8333 ~ 8343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.3c01305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Feng, Suzuki Ryota, Gao Tianle, Xia Xiaochao, Isono Takuya, Satoh Toshifumi	4. 巻 96
2. 論文標題 Alkali Metal Carboxylates: Simple, Efficient, and Industrial Relevant Catalysts for Controlled Polymer Synthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20230149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gao Tianle, Xia Xiaochao, Tajima Kenji, Yamamoto Takuya, Isono Takuya, Satoh Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Polyether/Polythioether Synthesis via Ring-Opening Polymerization of Epoxides and Episulfides Catalyzed by Alkali Metal Carboxylates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 9373 ~ 9383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.2c00656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Ryota, Xia Xiaochao, Gao Tianle, Yamamoto Takuya, Tajima Kenji, Isono Takuya, Satoh Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Synthesis of hyperbranched polyesters via the ring-opening alternating copolymerisation of epoxides with a cyclic anhydride having a carboxyl group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 5469 ~ 5477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2PY00571A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鈴木涼太、夏小超、高添楽、山本拓矢、田島健次、Li Feng、磯野拓也、佐藤敏文
2. 発表標題 カルボキシ基含有環状酸無水物とエポキシドの開環交互共重合による多分岐ポリエステル合成
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田伊代香、鈴木涼太、夏小超、高添楽、Li Feng、磯野拓也、佐藤敏文
2. 発表標題 有機触媒を用いた環状酸無水物とオキサンの開環交互共重合によるポリエステル合成
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田伊代香、鈴木涼太、Gao Tianle, Xia Xiaochao, Li Feng、磯野拓也、佐藤敏文
2. 発表標題 有機塩基触媒を用いた環状酸無水物とオキサンの開環交互共重合系の確立
3. 学会等名 2023年度 北海道高分子若手研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Suzuki, Xiaochao Xia, Tianle Gao, Takuya Yamamoto, Kenji Tajima, Feng Li, Takuya Isono, Toshifumi Satoh
2. 発表標題 Hyperbranched Polyester Synthesis by Ring-opening Alternating Copolymerization of Trimellitic Anhydride with Epoxides
3. 学会等名 IPC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tianle Gao, Xiaochao Xia, Feng Li, Takuya Isono, Toshifumi Satoh
2. 発表標題 Switchable Polymerization: from Complex Monomer Mixtures to Poly(ester amide)-based block copolymers
3. 学会等名 IPC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Gao Tianle、Li Feng、磯野 拓也、山本 拓矢、田島 健次、佐藤 敏文
2. 発表標題 二元系有機触媒を用いた環状エーテル、アジリジン、環状酸無水物の開環共重合における配列制御
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田伊代香、鈴木涼太、Gao Tianle、Xia Xiaochao、Li Feng、磯野拓也、佐藤敏文
2. 発表標題 オキセタンと環状酸無水物の開環交互共重合を駆使したセルフスイッチ重合
3. 学会等名 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水上湧太、Mahmoud M. Abd Elwakil、佐藤悠介、磯野拓也、山本拓矢、田島健次、原島秀吉、佐藤敏文
2. 発表標題 アミノ化ポリ( -カプロラクトン)誘導体をベースとした脂質ナノ粒子による肺・脾臓選択的 mRNA デリバリー
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水上湧太、Mahmoud M. Abd Elwakil、佐藤悠介、磯野拓也、山本拓矢、田島健次、原島秀吉、佐藤敏文
2. 発表標題 側鎖の構造や置換位置の異なるポリ( -カプロラクトン) 誘導体の合成と核酸デリバリー材料への応用
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水上湧太、Mahmoud M. Abd Elwakil、佐藤悠介、磯野拓也、山本拓矢、田島健次、原島秀吉、佐藤敏文
2. 発表標題 ポリ( -カプロラクトン) 誘導体を構成成分とする mRNA 搭載脂質ナノ粒子の in vivo デリバリー
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水上湧太、Mahmoud M. Abd Elwakil、佐藤悠介、磯野拓也、山本拓矢、田島健次、原島秀吉、佐藤敏文
2. 発表標題 ポリ( -カプロラクトン) 誘導体を構成成分とする脂質ナノ粒子による肺・脾臓選択的mRNAデリバリー
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2022年夏季研究発表会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 水上湧太、Mahmoud M. Abd Elwakil、佐藤悠介、磯野拓也、山本拓矢、田島健次、原島秀吉、佐藤敏文
2. 発表標題 種々の側鎖構造を有するアミノ化ポリ(ε-カプロラクトン) 誘導体の合成と核酸デリバリー材料への応用
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2022年夏季研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>高分子化学研究室  <a href="http://poly-ac.eng.hokudai.ac.jp/">http://poly-ac.eng.hokudai.ac.jp/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原島 秀吉  (Harashima Hideyoshi)  (00183567)	北海道大学・薬学研究院・教授   (10101)	
研究分担者	佐藤 悠介  (Sato Yusuke)  (10735624)	北海道大学・薬学研究院・助教   (10101)	
研究分担者	佐藤 敏文  (Satoh Toshifumi)  (80291235)	北海道大学・工学研究院・教授   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------