

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分

平成28年5月23日現在

研究課題名（和文）**脳内に核酸医薬を送達する高分子ミセルの創製  
と脳神経系難病の標的治療への展開**

研究課題名（英文）Development of Polymeric Micelles for Brain-Targeted Delivery of Nucleic Acid Drugs to Treat Intractable Neurological Disease

課題番号：25000006

研究代表者 片岡 一則 (Kataoka Kazunori)

公益財団法人川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーション・センター長



研究の概要：脳は高度に発達した生体バリアに守られているため薬剤の送達が極めて困難な部位である。本研究の目的は、このような強固な生体バリアを克服して脳神経系に遺伝子などの核酸医薬を送達するナノスケールのキャリアシステムを構築し、アルツハイマー病などの脳神経系難病治療の分子治療における有効性を実証することである。

研究分野：ナノバイオテクノロジー、高分子化学

キーワード：薬物送達システム、ナノバイオ材料、高分子ミセル、脳ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

患者数が20万人を超えて増加の一途を辿っている脳神経系疾患の中で、アルツハイマー病(AD)等の分子メカニズムが解明されている疾患に対しては、核酸医薬による分子治療が特に有効であると考えられている。しかし、この治療法の実現のためには、ニューロン等の標的細胞内へ核酸分子を導入し、機能発現させることのできる核酸キャリアが必要不可欠である。一方、標的となる細胞が存在する脳は、高度に発達した生体バリア(血液脳関門)に守られているため、薬剤の送達が極めて困難な部位であることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、強固な生体バリアを克服して脳神経系に核酸医薬を送達するナノサイズの核酸キャリアを構築すること、およびADなどの脳神経系疾患の分子治療に対する核酸キャリアの有効性を実証することである。具体的には、両親媒性ブロック共重合体の自己組織化により形成される高分子ミセルを基盤に、「生体適合性」「標的指向性」「環境応答性」を完備した多機能性核酸キャリアを開発する。

3. 研究の方法

研究代表者の統括のもと、分子設計グループ・機能評価グループ・展開研究グループを組織し、研究を推進する。分子設計Gは、血中滞留性と組織浸透性に優れた高分子ミセルの創製(生体適合性)、脳神経系細胞ターゲティング機能の創り込み(標的指向性)、細胞内バリアを克服して高い薬理活性を発

揮する機能の創り込み(環境応答性)に注力して研究を進める。機能評価Gは、分子設計Gより供給された高分子ミセルの培養細胞を用いた機能評価、実験動物を用いた血中滞留性や脳神経系への集積性評価などを行う。展開研究グループは、治療用核酸の構造最適化と脳神経系への導入、さらには疾患モデル動物に対する治療効果の検討と安全性試験を行う。以上の取り組みを通じて、脳神経系への核酸送達に必要なとされる分子機能および材料設計指針を明らかにし、脳神経系疾患の分子治療に向けた核酸送達技術を確立する。

4. これまでの成果

(1) ミセル内核径と表層を覆うポリエチレングリコール(PEG)密度が高分子ミセルの血中滞留性に与える影響を解明し、血液脳関門(BBB)突破実現に最適な粒径と血中滞留性に優れた核酸内包ミセルの構築に成功した。  
(2) 脳血管内皮細胞に最も多く局在するグルコーストランスポーター1(GLUT1)を認識するグルコース結合ミセル(Gluc/m)を構築し、さらに血糖値の精密制御を組み合わせることによって、既存DDSの約60倍という高効率な脳への集積を実現した。また、表面グルコース密度と粒径を最適化したミセルが、脳内神経細胞に取り込まれていることを確認するとともに(図1(a))、本研究で導入した2光子レーザー搭載共焦点顕微鏡を用いて、脳の深部に至るまで到達していることを実証した(図1(b))。  
(3) BBB通過用のグルコースに加えて、脳実質内での挙動を制御する第2のリガンドを搭載した高分子ミセルについても、同様に脳へ効率的に集積することが明らかとなった。(4)

核酸保持能に優れる機能性ブロック共重合体を用いて調製した核酸医薬(siRNA)封入高 [4. これまでの成果 (続き)]

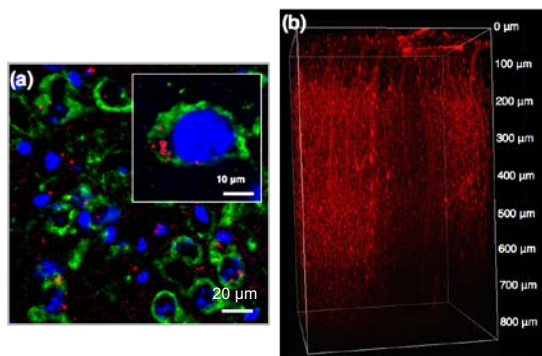


図1. (a) 神経細胞(緑)に到達したミセル(赤). (b) 脳の深部まで分布するミセル(赤).

分子ミセル表面にグルコースリガンドを導入することで(Gluc/m)、全身投与を介して siRNA が脳の神経細胞へと効率よく集積し、リガンド非搭載の高分子ミセル(Null/m)と比べて有意な遺伝子発現抑制効果を示すことを実証した(図2)。

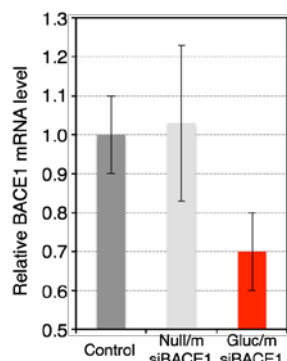


図2. 脳内での siRNA 活性

(5) 細胞質内に効率良くメッセンジャーRNA (mRNA)を送達出来るポリカチオン構造の特定を行い、さらに、この構造を組み込んだミセルを用いることによって、マウス脳内において AD の原因物質であるアミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )を分解する酵素であるネプリライシンを発現させることに成功した。

(6) A $\beta$ オリゴマーに対して選択的に結合する抗体断片(scFv)を特定し、ADモデルマウス脳室内に scFv 発現 mRNA 内包高分子ミセルを投与することによって、脳内 A $\beta$ 量を有意に低下させることに成功した。

## 5. 今後の計画

(1) 生体適合性と細胞内環境応答性を備えたミセルの構築と機能評価:引き続き構造の最適化を図っていくと共に、内包核酸に関して、柔軟な骨格を有する1本鎖のアンチセンス核酸へと対象を広げ、より普遍的な核酸キャリアとしての展開を進める。特定の脳神経系細胞を標的とする第2リガンド搭載ミセルについては、その機能を脳の培養切片を用いて評価し、特に高い選択性を示したシステムに対しては、in vivo 共焦点顕微鏡を用いた全身投与による評価を進める。

(2) 実験動物を用いた治療効果の確認:

mRNA ミセルに関しては、脳室内投与から、さらに全身投与系へと研究を進める。また、プラスミド DNA (pDNA)ミセルについては、非分裂性の神経細胞における発現実験を進めると共に、BBBを越えた脳内到達を検討する。siRNAなどの低分子核酸ミセルについては、ADモデルマウス(APP/PS1マウス)を用いて、詳細な疾患治療効果を検証する。

上記の検討を通じて、強固な生体バリアを克服して脳神経系に核酸医薬を送達するシステムの構築を完成させる。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) 発表論文

(1) H. Uchida, K. Itaka, S. Uchida, T. Ishii, T. Suma, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Synthetic polyamines to regulate mRNA translation through the preservative binding of eukaryotic initiation factor 4E to the cap structure. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 1478-1481 (2016)

(2) T. Ishii, K. Miyata, Y. Anraku, M. Naito, Y. Yi, T. Jinbo, S. Takae, Y. Fukusato, M. Hori, K. Osada, K. Kataoka, Enhanced target recognition of nanoparticles by cocktail PEGylation with chains of varying lengths. *Chem. Commun.* 52, 1517-1519 (2016)

(3) S. Osawa, K. Osada, S. Hiki, A. Dirisala, T. Ishii, K. Kataoka, Polyplex micelles with double-protective compartments of hydrophilic shell and thermo-switchable palisade of poly(oxazoline)-based block copolymers for promoted gene transfection. *Biomacromolecules* 17, 354-361 (2016)

(4) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8, 8979-8991 (2014)

(5) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12396-12405 (2014)

## 受賞

(1) K. Kataoka, Gutenberg Research Award (*Angew. Chem. Int'l. Ed.* 54, 10711 (2015)参照)

ホームページ等

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

[http://iconm.kawasaki-net.ne.jp/laboratory\\_kataoka.html](http://iconm.kawasaki-net.ne.jp/laboratory_kataoka.html)