

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22114009

研究課題名(和文) ナノDDSを用いた制がんベクトル変換技術の開発

研究課題名(英文) Development of cancer-controlling vector conversion techniques using nano-DDS

研究代表者

秋吉 一成(Akiyoshi, Kazunari)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90201285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 106,200,000円

研究成果の概要(和文)：種々のサイトカインやsiRNAなどの生理活性物質を目的の部位、かつ必要な時間に、送達、発現、あるいは徐放させることのできるドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発し、がん微小空間を制御する手法を開発することを目的とした。種々の多糖を基盤とする新規多糖ナノゲルキャリアを開発した。特にサイクロアミロース(CA)を基盤とする新規カチオン性CAナノゲルは、アジュバントとしてのCpG核酸やsiRNAのキャリアとして優れていることを見出し、これらナノゲルDDSを分子標的療法に用いることで腫瘍微小環境を改善できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project is to invent new technologies to fully control the delivery, expression, and sustained release of bioactive molecules, such as DNA, siRNA, and proteins, by further modifying existing nanogel DDSs. We newly developed polysaccharide-nanogels for nucleic acids (CpG, siRNA) delivery systems. We succeeded to control cancer microenvironments and to reduce the growth of cancers by using nanogel-siRNA delivery system.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ドラッグデリバリーシステム がん治療 ナノゲル ワクチン エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

感染がんの発症メカニズムを理解しそれらを制御するには、その発がんスパイラル場(がん微小環境)を自在に操作する技術が必要である。そのためには、種々のサイトカインや siRNA、miRNA などの生理活性物質を、目的の部位、かつ必要な時間に、送達、発現、あるいは徐放させることのできるドラッグデリバリーシステム(DDS)の進展が望まれる。この DDS 技術を利用することによって、宿主応答を「発がん促進」から「発がん阻止」に変換する制がんペクトル変換が可能となると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に展開しているナノゲル工学やシャペロン機能工学を駆使することにより種々の DDS を構築し、新規ワクチンの開発とサイトカイン等の時間的、空間的徐放制御を行い、ピロリ菌感染、肝炎ウイルス感染あるいは炎症などに引き起こされるがん微小環境の機能解明とそのがん微小環境を改変することによる発がんスパイラルの制御法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究開始時は、タンパク質のデリバリーに適したナノゲルキャリアは確立していたが、核酸を効率用デリバリーして機能を発揮しえるナノゲルの開発が十分でなかった。多糖の種類やその誘導体の探索により、種々の多糖を基盤とする新規多糖ナノゲルキャリアを開発した。特にサイクロアミロースを基盤とする新規カチオン性 CA ナノゲルは、アジュバントとしての CpG 核酸や siRNA のキャリアとして優れていることを見出し、この新規ナノゲル DDS を用いた研究を推進した。

### 4. 研究成果

1) siRNA の DDS による腫瘍微小環境の制御  
1-1) VEGF に対する siRNA の DDS によるがん治療

VEGF は新生血管を誘導して腫瘍微小環境の樹立に大きく寄与する。転移性腎細胞癌に対して、VEGF シグナルを抑制する分子標的治療が行われているが、高血圧等の有害事象が高頻度に見られる。分子標的薬を、生体内で任意の空間的、時間的分布をとらせることができれば、有害事象を起こさずに腫瘍微小環境を制御できる可能性がある。そこで、ナノゲルを用いて、VEGF-A 特異的な siRNA (siVEGF) を腎癌細胞に導入し、腫瘍細胞からの VEGF-A 産生の抑制が腫瘍微小環境の改変に結びつくか否かについて検討した結果、以下のことが明らかになった。

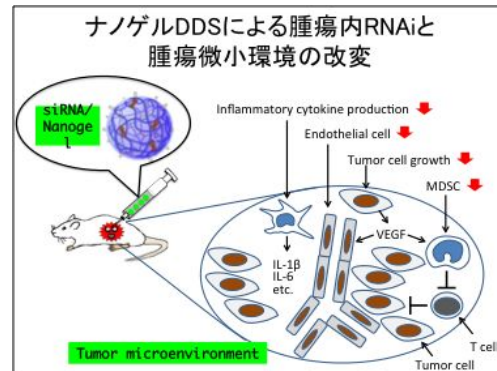
a) ナノゲル DDS を用いて siVEGF をマウスおよびヒトの細胞株に導入すると、VEGF ノックダウンを遺伝子およびタンパクレベルで認められた。

b) ナノゲル/siVEGF 複合体をマウス腎癌皮

下移植モデルの腫瘍組織内に投与すると、皮下腫瘍の増殖を有意に抑制した。このとき血管新生の抑制が認められた。

c) ナノゲル/siVEGF 複合体を腫瘍内に投与することにより、腫瘍が誘導する免疫抑制性細胞、Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) を、腫瘍組織内のみならず全身で、抑制できた。

これらの結果から、ナノゲル DDS を VEGF 分子標的療法に用いることで、腫瘍内血管新生抑制のみならず免疫抑制の解除を介して、腫瘍微小環境を改善できることが示された。



1-2) RNA ヘリカーゼに対する siRNA の DDS による腫瘍微小環境の制御

慢性炎症を惹起する主要な要因の1つに、細胞質内に存在する核酸センサー分子の活性化が示唆されているが、慢性炎症からがん化における細胞質内核酸センサーの役割については十分に理解されていない。そこで、細胞質内核酸センサーである RNA ヘリカーゼが炎症の惹起と癌の増殖に寄与するか否かを評価し、RNA ヘリカーゼの発現制御による炎症と癌増殖の抑制の可能性について検討した結果、以下のことが明らかになった。

a) RNA ヘリカーゼ特異的な siRNA を THP-1 細胞株に導入した。細胞内に polyIC または CpGDNA を導入し、あるいは培養中に Nigericin を添加すると、RNA ヘリカーゼをノックダウンした細胞では、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの遺伝子発現が有意に抑制された。

b) RNA ヘリカーゼ特異的な siRNA を種々のヒト腫瘍細胞株(大腸がん、腎がん、前立腺がん、子宮頸がん、骨肉腫)に導入したところ、有意な細胞増殖の低下が認められた。

c) マウス皮下に移植したヒト大腸がん、RNA ヘリカーゼ特異的な siRNA をナノゲル DDS にて導入したところ、有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

これらの結果から、RNA ヘリカーゼが炎症の惹起と腫瘍増殖に関与すること、ナノゲルを用いた RNA ヘリカーゼの発現制御により、腫瘍を抑制できる可能が示された。

2) ピロリ菌病原因子 CagA タンパク質の工

### エクソソームによる細胞間デリバリー

細胞から分泌されるナノベシクルであるエクソソームは新規な細胞間情報伝達因子として注目されている。我々は、ピロリ菌感染ヒト血清中のエクソソームに CagA タンパク質が存在することを明らかにした。さらに、CagA 発現胃上皮細胞から CagA 含有エクソソームを単離し、胃上皮細胞と相互作用させたところ、hummingbird 表現型と呼ばれる細胞の伸長が誘導され、エクソソームがキャリアとして CagA を他の細胞に輸送し、その細胞機能を改変しえることを初めて見出した。*H. pylori* 感染により胃上皮細胞内に注入された CagA が、エクソソームにより分泌され様々な疾患を引き起こす要因となる可能性が示唆された。(共同研究、東大畠山、神戸大東)

### 3) 多糖ナノゲルによる感染がんタンパク質免疫療法

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) では、HBZ 遺伝子が全ての ATL 症例で発現し、ATL 細胞の増殖に関与している。HBZ および Tax ウイルスタンパク質を多糖ナノゲルに封入したナノゲルワクチンを調製し、マウス皮下投与による免疫誘導実験を行った。Tax タンパク質ナノゲル系で高いキラー T 細胞の誘導が得られることが明らかになった。(共同研究、京大松岡)。

### 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 24 件)

1. Y. Tahara, J. Yasuoka, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Effective CpG DNA delivery using amphiphilic cycloamylose nanogels, *Biomaterials Science*, 3, 256-264(2015) Cover picture
2. Y. Sasaki, Y. Tsuchido, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Protein nanogelation with vitamin B6-bearing pullulan as a bio-crosslinker, *Polymer J.* 47, 201-205(2015)
3. Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Nanogel tectonic porous gel loading biologics, nanocarriers, and cells for advanced scaffold, *Biomaterials*, 37, 107-115(2015) (査読有)
4. H. Fujii, M. Shin-Ya, S. Takeda, Y. Hashimoto, S. Mukai, S. Sawada, T. Adachi, K. Akiyoshi\*, T. Miki, O. Mazda.\* Cycloamylose-nanogel drug delivery system-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment. *Cancer Sci.*, 105(12), 1616-25 (2014). (査読有)
5. Y. Sekine, K. Okazaki, T. Ikeda-Fukazawa, M. Ichikawa, K. Yoshikawa, S. Mukai, K. Akiyoshi\*, Microrheology of nanogel-integrated system, *Colloid Polym. Sci.*, 292, 325-331 (2014)
6. D. Muraoka, N. Harada\*, T. Hayashi, Y. Tahara, F. Momose, S. Sawada, S. Mukai, K. Akiyoshi, H. Shiku\*, A Nanogel-based Immunologically Stealth Vaccine Targets Macrophages in the Medulla of Lymph Node and Induces Potent Anti-Tumor Immunity, *ACS Nano*, 8, 9209-9218 (2014) (査読有)
7. K. Katagiri\*, K. Ohta, K. Sako, K. Inumaru, K. Hayashi, Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Development and Potential Theranostic Applications of a Self-assembled Hybrid of Magnetic Nanoparticle Clusters with Polysaccharide Nanogels, *ChemPlusChem*, 79, 1631 - 1637(2014)
8. H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Cationic amphiphilic polysaccharide nanoballs: protein stabilization and intracellular delivery by nanoencapsulation, *Biomaterials Science*, 1, 842-849 (2013) (査読有)
9. N. Morimoto, M. Yamazaki, J. Tamada, K. Akiyoshi\*, Polysaccharide-hair cationic polypeptide nanogels: Self-assembly and enzymatic polymerization of amylose primer modified cholesteryl poly(L-lysine), *Langmuir*, 29, 7509-7514 (2013) (査読有)
10. Y. Tahara, S. Kosuge, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Nanogel bottom-up gel biomaterials for protein delivery: photopolymerization of an acryloyl-modified polysaccharide nanogel macromonomer, *Reactive and Functional Polymers*, 73, 958-964 (2013) (査読有)
11. N. Morimoto, S. Hirano, H. Takahashi, S. Loethen, D. H. Thompson, K. Akiyoshi\*, Self-assembled pH sensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle *Biomacromolecules*, 14, 56-63 (2013) (査読有)
12. S. Takeda, H. Takahashi, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Amphiphilic nanogel of enzymatically synthesized glycogen as an artificial molecular chaperone for effective protein

- refolding, RSC Advances, 3, 25716-25718 (2013) (査読有)
13. A. Shimoda, S. Sawada, A. Kano, A. Maruyama, A. Moquin, F. M. Winnik, K. Akiyoshi\*, Dual crosslinked hydrogel nanoparticles by nanogel bottom-up method for sustained-release delivery, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 99, 38-44 (2012) (査読有)
  14. A. Shimoda, Y. Yamamoto, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Biodegradable Nanogel-integrated Hydrogels for Sustained Protein Delivery, Macromolecular Research, 20, 266-270 (2012) (査読有)
  15. Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Self-assembled Nanogel Engineering for Advanced Biomedical Technology, Chem. Lett. 41, 202-208 (2012) (査読有)
  16. H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Amphiphilic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperone, ACS Nano. 5, 337-345 (2011) (査読有)
  17. Y. Sasaki, T. Hirakura, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Metal coordinative-crosslinked polysaccharide nanogels with redox sensitivity, Chem. Lett., 40, 182-183(2011) (査読有)
  18. S. Sawada, Y. Sasaki, Y. Nomura, K. Akiyoshi\*, Cyclodextrin-responsive nanogel as an artificial chaperone for horseradish peroxidase, Colloid Polym. Sci., 289, 685-691(2011) (査読有)
  19. Y. Sasaki, W. Asayama, T. Niwa, S. Sawada, T. Ueda, H. Taguchi, K. Akiyoshi\*, Amphiphilic Polysaccharide Nanogels as an Artificial Chaperone in Cell-Free Protein Synthesis, Macromol. Bioscience, 11, 814-820 (2011) (査読有)
  20. Y. Sasaki, Y. Tsuchido, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Construction of protein-crosslinked nanogels with vitamin B6 bearing polysaccharide, Polym. Chem., 2, 1267-1270 (2011) (査読有)
  21. A. Shimoda, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Cell specific peptide-conjugated polysaccharide nanogels for protein delivery, Macromol. Bioscience, 11, 882-888 (2011) (査読有)
  22. S. Toita, S. Sawada, K. Akiyoshi\*, Polysaccharide nanogel gene delivery

- system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A2, J. Controlled Release, 155, 54-59 (2011) (査読有)
23. S. Toita, N. Morimoto, K. Akiyoshi\*, Functional cyclodextrin-based biomaterial: application in a gene delivery system, Biomacromolecules, 11, 397-401(2010) (査読有)
  24. Y. Sasaki, K. Akiyoshi\*, Development of an Artificial Chaperone System Based on Cyclodextrin, Current Pharmaceutical Biotechnology, 11, 300-305 (2010) (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 秋吉一成. 多糖ナノゲル工学による新規 DDS 設計. 第 27 回日本 DDS 学会 企業セミナー. 2011 年 6 月 9 日. 東京大学(東京都・文京区)
2. 秋吉一成. プロテオリポソーム工学による新規バイオマテリアルの創製. 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・札幌市)
3. 秋吉一成. ナノゲル DDS による発がんスパイラル制御. 平成 24 年度 文部科学省新学術領域研究(研究代表者 今井浩三)「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム 2013 年 1 月 29 日. 学術総合センター一橋記念講堂(東京都・千代田区)
4. 秋吉一成. ナノゲルテクトニクスによる新規ソフトマテリアル創製とバイオ応用. 第 81 回高分子若手研究会[関西] 主題 高分子材料が拓くソフトマテリアル化学 2013 年 11 月 16 日 大阪工業大学(大阪府・大阪市)
5. 秋吉一成. ナノゲル基盤マテリアルによる新規タンパク質 DDS の開発. APSTJ2025 シンポジウム「バイオとナノが拓く医療イノベーション」 2013 年 12 月 13 日 UDX Gallery NEXT(東京都・千代田区)
6. 秋吉一成. ナノゲル工学による新規 DDS の開発. “新適塾”「未来創薬への誘い」第 26 回 2014 年 4 月 10 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)
7. 秋吉一成. ナノゲル工学による新規 DDS の開発. BIO tech 2014 (第 13 回国際バイオテクノロジー展/技術会議) 2014 年 5 月 15 日 東京ビッグサイト(東京都・江東区)
8. 秋吉一成. ナノゲル工学の提唱と新規 DDS の開発. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会 第 14 回日本 DDS 学会永井賞受賞講演 2014 年 7 月 31 日 慶応義塾大学(東京都・港区)
9. 秋吉一成. バイオインスパイアード ナノゲルの設計と医療応用. 一般社団法人

未踏科学技術協会 平成 26 年度未踏科学サ  
マー道場 2014 年 8 月 30 日 湘南国際村  
センター (神奈川県・三浦郡)

10. 秋吉一成 分子シャペロンインス  
パイアード 材料の開発と医療応用. 第 9 回  
臨床ストレス応答学会 2014 年 11 月 1 日  
岡山大学 (岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 1 件)

秋吉一成、石原一彦、山岡哲二監修 先端バ  
イオマテリアルハンドブック, NTS, (2012)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

研究室ホームページ  
<http://www.akiyoshi-lab.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋吉一成 (AKIYOSHI, Kazunari)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：90201285

### (2) 研究分担者

新屋政春 (SHINYA, Masaharu)  
京都府立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：10405277

### (3) 研究分担者

松田 修 (MATSUDA, Osamu)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00271164