

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06108

研究課題名（和文）細胞内ATP及び還元環境応答性siRNAデリバリーキャリアの創製

研究課題名（英文）Intracellular ATP- and redox potential-responsive siRNA delivery carrier

研究代表者

内藤 瑞（NAITO, MITSURU）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：50755329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞選択的にsiRNAを送達するために、細胞内環境応答性siRNAを調製した。高分子ミセル表面にはがん細胞表面を特異的に認識する環状ペプチドを導入した。高分子ミセル内部には環境応答機能を持ち、かつ、高分子ミセルを安定化させることのできる機能性分子として、フェニルボロン酸分子、および、チオール基を導入した。その結果、フェニルボロン酸の導入率が20%以上の範囲において、高分子ミセルの安定化が達成された。また、得られた高分子ミセルを細胞内環境を模倣した条件下においたところ、高分子ミセル内部からsiRNAの放出が確認され、環境応答性をもった高分子ミセルの調製が達成された。

研究成果の概要（英文）：To enhance an efficacy of cancer cell specific siRNA delivery, novel siRNA-loaded polyion complex micelles with intracellular-responsive siRNA releasability has been developed. A cyclic peptide which can selectively bind to cancer cell membrane proteins was introduced onto PIC micellar surface to enhance the targetability. A phenylboronic acid and thiol moiety were introduced into PIC micellar core to increase PIC micellar stability at extracellular condition and release siRNA into cytoplasm in response to intracellular condition. The newly prepared stimuli-responsive PIC micelles did release siRNA under intracellular mimic condition.

研究分野：DDS

キーワード：siRNA 環境応答性 高分子ミセル 還元環境 ATP

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疾患の治療に向けて核酸医薬に注目が集まっている。中でも、二本鎖の短いRNA (siRNA) を医薬品として用いる治療法では、siRNA は細胞内において、自身の配列と相同的な配列を持つ mRNA の分解を誘起し、また、遺伝子改変のリスクがないことなどから、がんを含めた種々の難治性疾患に対する治療効果が期待されている。一方で、siRNA の体内 (血中) への単独投与では、血中に存在する分解酵素による分解や、腎臓からの排泄を受けてしまい、標的とする組織・細胞内へと到達する前に血中から消失してしまう。このため、siRNA の医薬品応用に向けては siRNA を効率的に標的とする細胞内部へと送達することのできるデリバリーキャリアの開発が強く求められている。

デリバリーキャリアには、細胞外環境 (血中など) での高い安定性と細胞内環境での速やかな siRNA 放出という、相反する機能の両立が求められている。申請者らは、二律背反的な機能をもったデリバリーキャリアを構築するために、細胞内環境に応答して自律的に構造変化する機能性高分子を合成し、高分子ミセル型デリバリーキャリアとして独自に開発を行ってきた。具体的には、細胞内の還元環境や、細胞内の ATP 濃度に応答して siRNA を放出しうる siRNA 内包高分子ミセルの開発に成功している。

しかし、これまでの環境応答性高分子ミセルは、細胞内環境への自律的な応答能を示すものの、細胞外での安定性が未だ不十分であり、効果的な治療効果を得るには更なる血中での安定化が必要とされている。

2. 研究の目的

核酸医薬 (siRNA) を医薬品として利用するには標的とする細胞内部へと効率的に siRNA を送達する必要がある。siRNA を内包した高分子ミセルは非常に有望な siRNA 送達キャリアであるが、更なる改善が求められている。特に、細胞外 (血中) では安定に siRNA を内包する一方で、細胞内では一転して不安定化し、内包していた siRNA を放出する細胞内環境応答性が必要とされている。本研究では、これまで開発されてきた複数の細胞内環境応答性高分子ミセル技術を融合し、医薬品である siRNA を標的細胞へと、より効率的に送達することのできる環境応答性高分子ミセルの開発を行う。

3. 研究の方法

これまで申請者が独自に開発を進めてきた ATP 応答性高分子ミセルでは、cis-ジオールへの可逆的な応答能をもつ機能性分子であるフェニルボロン酸誘導体を、高分子ミセルを形成する高分子側鎖へと導入すること

で、高分子ミセルの安定性と ATP 応答性が達成されている。つまり、高分子側鎖へと導入したフェニルボロン酸誘導体は cis-ジオール構造をもつ siRNA と高分子ミセル内部で結合し、高分子ミセルの安定性が向上する。その一方、siRNA 同様に cis-ジオール構造をもつ ATP が豊富に存在する細胞内環境では、siRNA とフェニルボロン酸誘導体の結合が ATP とフェニルボロン酸誘導体の結合に置き換わることで高分子ミセルが不安定化し、細胞内 ATP 濃度域で siRNA の放出が達成される。この時、フェニルボロン酸誘導体の導入率を増加させることで高分子ミセルの十分な安定化が達成されていたが、高分子ミセルの安定化と同時に、細胞内 ATP に対する応答性が低下し、細胞内での siRNA の放出性が鈍くなっていた。そこでまず、フェニルボロン酸誘導体の高分子ミセルへの導入率を制御し、細胞内 ATP 濃度域で応答し、siRNA を放出しうるフェニルボロン酸誘導体の導入率域を選定した。この時、ATP 応答性高分子ミセルの安定性は血中を安定に循環するのに不十分であることが考えられる。そこで、当該 ATP 応答性高分子ミセルに対し、細胞内の還元環境に応答する高分子ミセルの技術をさらに導入することで、細胞内の ATP および還元環境に応答し、かつ、高度に安定化された siRNA 内包環境応答性高分子ミセルの開発を行った。

細胞内は、タンパク質内のジスルフィド結合を、チオール基へと還元する機能を持つ、分子 (グルタチオン) が細胞外に比べ、100倍以上の濃度で存在している。この分子の機能を活用し、還元環境応答性高分子ミセルは細胞内で siRNA を放出することが可能となる。つまり、高分子ミセルを形成するポリマー側鎖にチオール基を導入し、高分子ミセル内の高分子間でジスルフィド結合による架橋構造を形成させ、この架橋構造によって、細胞外では高分子ミセルは安定化される。また、細胞内部では、豊富に存在するグルタチオンの作用によって還元され、ジスルフィド基はチオール基へと変換され、高分子ミセルは不安定化し、細胞内へと siRNA を放出することが可能となる。このような技術を ATP 応答性高分子ミセルへと融合することで、細胞内の ATP や還元環境への応答性を持ち、siRNA を細胞内へと効率的に放出可能な機能を持ちつつ、細胞外環境下では高度に安定化された環境応答性高分子ミセルの開発を行った。

期待される効果として、従来の ATP 応答性高分子ミセルでは高分子と siRNA とが結合することで安定化が達成されていたが、そこへ高分子間で結合可能なチオール基による架橋を導入することで、高分子間での結合も生じ、高分子ミセルを形成する分子全体 (高分子・siRNA) がお互いに架橋し合ったナノゲル様の構造を取ることによって高度な安定化が期待される。また、従来の環境応答性高

子ミセルでは、細胞外に僅かに存在する ATP 分子やグルタチオンの作用によって遅いながらも徐々に架橋構造が切断され、siRNA が除去されてしまっていたが、二つの技術を融合することで、細胞内 ATP 濃度と還元環境の双方の条件がそろった細胞内でのみ、より鋭敏な siRNA 放出が達成可能であると期待される。

4. 研究成果

< 高分子合成 >

一級アミンを片末端に有する PEG を従来よりも簡便に合成するために、一級アミノ基の保護体を開始剤とした EO 重合の検討を行った。その結果、保護基 A (特許出願中により非開示) で保護した一級アミンを開始剤として用いた場合、EO 重合が定量的に進行し、従来法よりも簡便に単分散な PEG-NH₂ の合成が可能であることが示唆された。また、EO 重合後、反応液へと直接脱保護剤を添加することで、One-pot で一級アミノ基を片末端に有する PEG-NH₂ が高収率で合成可能であることが確かめられた。

次いで、一級アミノ基およびアセタール基を両末端に有する Ace-PEG-NH₂ を開始剤として、ポリカチオン鎖となるポリリシン (PLys) の前駆体である PLys(TFA) を重合した。その結果、PLys(TFA)の重合度が 40、70 となる高分子の合成に成功した。次いで、PLys(TFA) 側鎖を脱保護することで PEG-PLys₄₀ および Ace-PEG-PLys₇₀ を得た。Ace-PEG-PLys のアセタール基を pH 1 ~ 2 の塩酸で加水分解し、 $v_{3/5}$ に特異的に結合する環状 RGD ペプチド (cRGD) を反応させ、cRGD-PEG-PLys を得た。cRGD は PEG-PLys に対して定量的に反応し、導入率は 90 % 以上であった。次いで、4-carboxy-3-fluoro-phenylboronic acid (FPBA) の活性エステル体 (FPBA-NHS) を添加し、PLys 側鎖の一級アミンへと FPBA を導入した。その結果、側鎖の 10 ~ 40 % に FPBA が導入された高分子 cRGD-PEG-PLys(FPBA) を得た。

さらに、還元環境応答性を有する高分子ミセルの調製に向け、cRGD-PEG-PLys(FPBA) 内の残りの PLys 一級アミンに対し、チオール基をアミジン結合で導入可能である DTBP を添加することで、ATP 応答性分子である FPBA、および還元環境応答性分子であるチオール基を有した DTBP それぞれを側鎖に有する cRGD-PEG-PLys(FPBA/DTBP) の合成に成功した。

< cRGD-PEG-PLys(FPBA) ミセルの機能評価 >

まず、FPBA のみを側鎖に有する cRGD-PEG-PLys(FPBA) と siRNA を任意の混合比で混合し、ボルテックスで 10 ~ 20 秒撹拌することで、高分子ミセルの調製を行っ

た。得られた高分子ミセルは静的光散乱 (SLS) および 動的光散乱 (DLS) 測定を行い、高分子ミセルの形成の有無、および粒子径などの測定を行った。その結果、FPBA が導入されていない cRGD-PEG-PLys と siRNA との混合では高分子ミセルが確認されなかったのに対し、FPBA を側鎖に有する cRGD-PEG-PLys(FPBA) と siRNA からは、siRNA との電荷中和点近傍での高分子ミセルの形成が確認された。

得られた高分子ミセルに対して、高分子ミセルを壊す機能のあるポリアニオン (デキストラン硫酸) を添加し、高分子ミセルの安定性を評価した。高分子ミセル内部から漏出される siRNA を定量した結果、FPBA をより多く修飾した cRGD-PEG-PLys(FPBA) からなる siRNA 内包高分子ミセルが、より高い安定性を示すことが確認された。

次いで、高分子ミセル溶液に対し、生体内分子であるグルコースおよび細胞内での siRNA 放出のトリガーとして期待している ATP を添加し、高分子ミセルの崩壊を評価したところ、FPBA 導入率が 20 % 以上の cRGD-PEG-PLys(FPBA) から調製された高分子ミセルからは ATP の濃度に応じた siRNA の放出が確認された。

よって、20 % 以上の FPBA 導入率を有する cRGD-PEG-PLys(FPBA) からなる siRNA 内包高分子ミセルは、安定性および細胞内 ATP に応答した siRNA 放出が達成可能であることが示唆された。

< cRGD-PEG-PLys(FPBA/DTBP) ミセルの機能評価 >

cRGD-PEG-PLys(FPBA) と同様の方法で、cRGD-PEG-PLys(FPBA/DTBP) と siRNA を混合し、高分子ミセルの調整を行い、高分子ミセルの形成の有無および物性を解析した。その結果、siRNA との電荷中和点近傍での混合比において高分子ミセルの形成が確認され、チオール基を導入した cRGD-PEG-PLys(FPBA/DTBP) と siRNA から高分子ミセルが調整可能であることが確かめられた。

得られた高分子ミセルに対し、デキストラン硫酸を添加し、siRNA の漏出量を評価したところ、デキストラン硫酸の添加に対しては顕著な siRNA の放出は確認されず、細胞外環境では安定であることが示唆された。一方で、細胞内環境を模倣した、ATP およびジチオトレイトール (DTT) を添加した後にデキストラン硫酸を加えたところ、siRNA の漏出が確認され、細胞内環境下では高分子ミセルが不安定化し、siRNA が放出されることが確認された。

次いで、得られた高分子ミセルをヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) に添加し、siRNA による遺伝子発現抑制効果を評価した。その結果、siRNA 内包高分子ミセルは細胞に対しては顕著な毒性を示さなかったが、標的とし

た配列の mRNA を特異的に、かつ、有意に抑制可能であることが確認された。この結果から、新規に開発した細胞内環境に反応して siRNA を放出可能な高分子ミセルは、細胞外では安定に siRNA を内包する一方、細胞内では siRNA を放出し、遺伝子発現抑制効果を誘起可能な高機能性 siRNA デリバリーキャリアであることが確認された。

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 1 件)

M. Naito, R. Azuma, H. Takemoto, M. Hori, N. Yoshinaga, S. Osawa, R. Kamegawa, H.-J. Kim, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multilayered polyion complexes with dissolvable silica layer covered by controlling densities of cRGD-conjugated PEG chains for cancer-targeted siRNA delivery. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, in press.

[学会発表](計 11 件)

1. 内藤 瑞, 吉永 直人, 石井 武彦, 松元 亮, 宮原 裕二, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「細胞内 ATP 応答性ポリオンコンプレックスミセル型 siRNA デリバリーキャリアの設計と機能評価」日本核酸医薬学会 第 1 回年会. (2015.11. 京都)
2. 内藤 瑞, 石井 武彦, 松元 亮, 宮田 完二郎, 宮原 裕二, 片岡 一則. 「細胞内 ATP 濃度に自律的に反応して siRNA を放出する高分子ミセルの開発」第 25 回日本 MRS 年次大会. (2015.12. 横浜)
3. Mitsuru Naito, Naoto Yoshinaga, Takehiko Ishii, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka. “Intracellular ATP-responsive Release of siRNA from Polyion Complex Micelles” The 13th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. (2015.12. アメリカ)
4. 内藤 瑞, 東 亮太, 武元 宏泰, 堀 真緒, 大澤 重仁, Kim Hyun-Jin, 石井 武彦, 西山 伸宏, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「PEG 及びリガンド密度を制御可能な多層型 siRNA デリバリーキャリアの開発」遺伝子・デリバリー研究会 第 16 回シンポジウム. (2016.5. 川崎)
5. 内藤 瑞, 石井 武彦, 宮田 完二郎, 安楽 泰孝, Yi Yu, 神保 琢夫, 高江 誓詞, 福里 優, 堀 真緒, 長田 健介, 片岡 一則. 「リガンド導入 PEG 化金ナノ粒子のリガンド認識能向上を目指した表面設計」第 65 回高分子学会年次大会. (2016.5.

神戸)

6. 内藤 瑞, 東 亮太, 武元 宏泰, 堀 真緒, 大澤 重仁, Kim Hyun-Jin, 石井 武彦, 西山 伸宏, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「リガンド密度を制御可能な有機・無機ハイブリッド多層型 siRNA デリバリーキャリアの開発」第 32 回日本 DDS 学会学術集会. (2016.6. 静岡)
7. 内藤 瑞, 武元 宏泰, Kim Hyun-Jin, 堀 真緒, 大澤 重仁, 西山 伸宏, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「PEG 及びリガンド密度のコントロールが可能な有機無機ハイブリッドナノ粒子の機能評価」第 65 回高分子討論会. (2016.9. 横浜)
8. 内藤 瑞, 武元 宏泰, Kim Hyun-Jin, 堀 真緒, 大澤 重仁, 西山 伸宏, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「リガンド密度をコントロールが可能な有機・無機ハイブリッド多層型ナノ粒子の設計と機能評価」日本核酸医薬学会 第 2 回年会. (2016.11. 東京)
9. 内藤 瑞, 武元 宏泰, Kim Hyun-Jin, 堀 真緒, 大澤 重仁, 西山 伸宏, 宮田 完二郎, 片岡 一則. 「リガンド密度をコントロール可能な有機・無機ハイブリッド型 siRNA 内包ナノ粒子の設計と機能評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム. (2016.11. 福岡)
10. Mitsuru Naito, Naoto Yoshinaga, Takehiko Ishii, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka. “ATP-responsive Polyion Complex Micelles for Intracellular Delivery of siRNA” 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016). (2016.11. Tokyo)
11. Mitsuru Naito, Hiroyasu Takemoto, Hyun-Jin Kim, Mao Hori, Shigehito Osawa, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka. “Multi-layered polyion complexes with controlled densities of PEG and ligands for siRNA delivery” 第 26 回 日本 MRS 年次大会 (2016.12. 横浜)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 重合体および重合体の製造方法
発明者: 内藤瑞, 大澤重仁, 片岡一則
権利者: 公益財団法人川崎市産業振興財団
種類:
番号: P16528-010 (特願 2017-092988)
出願年月日: 2017 年 5 月 9 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 瑞 (NAITO, Mitsuru)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：50755329

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()