

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390009

研究課題名(和文) ブロック共重合体の精密設計に基づく全身投与型 siRNA デリバリーシステムの創製

研究課題名(英文) Development of systemically injectable siRNA delivery systems by fine-tuning of block copolymers

研究代表者

西山 伸宏 (Nishiyama, Nobuhiro)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：10372385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000 円

研究成果の概要(和文)：siRNAは、標的mRNAを特異的かつ効率的にノックダウンできることから、疾患治療への応用が期待されている。しかしながら、siRNAのキャリアシステムの開発が大きな課題であった。そこで本研究では、ポリエチレングリコールとカチオン性ポリアミノ酸より構成されるブロック共重合体が1分子のsiRNAと十数ナノメートルの小会合を形成することに着目し、siRNAキャリアとしての開発を進めてきた。ブロック共重合体の化学構造と組成の最適化によって、siRNAの高い血中滞留性と固形がん集積性を達成した。さらに、固形がんや腎疾患の動物モデルに対する優れた治療効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：siRNA is expected to be used for the treatment of various diseases due to its capability to efficiently knockdown the target mRNA in a sequence-specific manner. However, the development of useful vehicles for siRNA is a critical issue. We have recently found that poly(ethylene glycol)-polycations block copolymers can form small-sized polyion complexes with single molecule siRNA, and in this study, we have studied the utility of small-sized polyion complexes named "PIC nanocarriers" as siRNA delivery systems. The optimized PIC nanocarriers exhibited prolonged circulation and enhanced tumor accumulation after the systemic administration. We have demonstrated the usefulness of PIC nanocarriers for the treatment of solid tumors and kidney diseases.

研究分野：バイオマテリアル、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：siRNA DDS ブロック共重合体 ポリエチレングリコール(PEG) ポリ(L-リジン)(PLL) がん 腎疾患

1. 研究開始当初の背景

siRNA (small interfering RNA: 30 塩基以下の二重鎖 RNA) は、標的 mRNA を特異的かつ効率的にノックダウンできることから、難治性疾患に対する治療への応用が期待されている。しかしながら、siRNA を疾患治療に応用するためには、siRNA の生体内安定性と血中滞留性を向上させ、標的組織に効果的に集積する一方で、標的細胞に対して効率的に siRNA を機能発現させることのできるキャリアの開発が必要不可欠である。そこでカチオン性脂質やカチオン性高分子を構成要素とする siRNA キャリアの開発が世界中で活発に行われているが (*J. Pharm. Sci.* 101, 4046-4066 (2012))、一部、肝臓に対して有効性に優れたキャリアが開発されてきているものの、それ以外の臓器・組織に対して siRNA を送達できるキャリアは未だ開発されていないのが現状である。また、これまでに開発されてきた siRNA キャリアは、複雑な化学構造や煩雑な製造プロセスを有するために、製造における品質管理が困難であることやコストが大きくなることが問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、ポリエチレングリコール (PEG) とカチオン性の poly(L-lysine) (PLL) から構成されるブロック共重合体が、siRNA とのポリイオンコンプレックス (PIC) 形成に基づいて、十数ナノメートルの安定な小会合体を形成することに着目し、PIC ナノキャリアと名付けて siRNA キャリアとしての開発を進めてきた。PIC ナノキャリアは、カチオン性脂質やカチオン性高分子を構成要素とする siRNA キャリアと比較して、明確な構造を有しており、煩雑な製造プロセスを必要としないことから製剤面で大きな利点を有している。さらに、PIC ナノキャリアは、ナノ粒子型のキャリアと比較して、小さいサイズを有することにより高い組織浸透性を示すものと考えられる。本研究では、この PIC ナノキャリアに関して、異なる組成やトポロジーを有する PEG-PLL と siRNA の会合特性ならびに安定性を検討し、PEG-PLL の構造の最適化を行った。最適化した PIC ナノキャリアに関しては、悪性腫瘍 (がん) や腎疾患の動物モデルの治療へと展開し、siRNA キャリアとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PIC ナノキャリアの形成

PEG 分子量と PLL 重合度が異なる PEG-PLL を PEG-NH₂ を開始剤とする Lys(Z) の N-カルボン酸無水物 (NCA) の開環重合により合成した。また、分岐型 PEG を有する PEGasus-PLL も同様にして合成した。PEG-PLL と siRNA を異なる比率で混合し、形成された会合体を電気泳動、蛍光相関分光 (FCS) 解析、超遠心分析によって解析した。

(2) PIC ナノキャリアの安定性評価

異なる組成の PEG-PLL から形成される PIC ナノキャリアのヘパリンに対する置き換わり耐性をゲル電気泳動によって評価した。siRNA の放出に要するヘパリン量を算出することにより PIC ナノキャリアの安定性を定量化した。

(3) PIC ナノキャリアの血中滞留性および固形がん集積性の評価

Cy5-siRNA と異なる組成の PEG-PLL から PIC ナノキャリアを構築した。この PIC ナノキャリアをマウスの尾静脈より投与し、投与 10 分後の血漿中の蛍光強度を測定することにより siRNA の血中滞留性を評価した。また、ヒト腎がん OS-RC2 細胞の皮下移植モデルに上記の PIC ナノキャリアを投与し、4 時間後のがん組織における蛍光強度を測定した。

(4) siVEGF および siPlk-1 を搭載した PIC ナノキャリアによる固形がんモデルの治療

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) と分裂期キナーゼ Polo-like kinase 1 (Plk-1) を標的とした siRNA を PEGasus-PLL (21k×2-20) と混合することにより PIC ナノキャリアを形成させ、その OS-RC2 細胞の皮下移植モデルに対する治療効果を検討した (1, 4, 7 日目に 25µg の siRNA を投与)。治療効果はがんの増殖曲線に加えて、マウスの生存率により評価した。

(5) PIC ナノキャリアによる腎疾患モデルの治療

デオキシコルチコステロン・アセテート (DOCA) / 食塩を投与することにより作製したラット腎疾患モデルに対して、チロシン水素化酵素 (TH) に対する siRNA を搭載した PIC ナノキャリア (siRNA: 10mmol) を 2 回 / 週の頻度で 6 回投与した。その後の治療効果を評価するために、TH 発現量、体重変化、血圧、尿蛋白量、組織学的変化を検討した。本実験では、腎糸球体局所でノルアドレナリン合成の抑制により腎局所の病変を改善するかどうかを解明することを目的とした。

4. 研究成果

(1) PIC ナノキャリアの形成

PEG 分子量と PLL 重合度が異なる PEG-PLL や分岐状 PEG (PEGasus) を有する PEGasus-PLL を合成し、siRNA との会合体形成を電気泳動、蛍光相関分光 (FCS) 解析、超遠心分析によって評価した。その結果、40 個のリン酸残基を有する siRNA に対して電荷がマッチングするように PEG-PLL および PEGasus-PLL が会合することが確認された (図 1)。すなわち、PLL の重合度が 20、40 および 80 の場合において、それぞれ 1 分子 siRNA と 2 分子の PEG-PLL、1 分子 siRNA と 1 分子の PEG-PLL および 2 分子 siRNA と 1 分子の PEG-PLL から構成される PIC ナノキャリアを形成した。

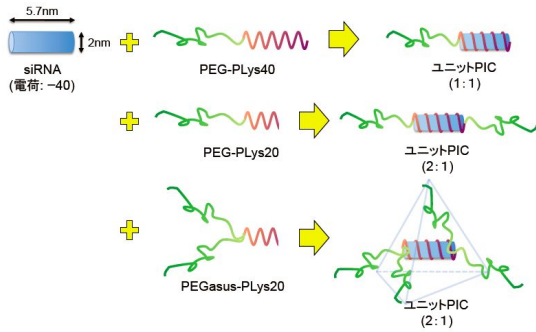


図 1. PIC ナノキャリアの形成

(2) PIC ナノキャリアの安定性評価

異なる PEG 分子量と PLL 鎖長を有する PEG-PLL から形成される一分子 siRNA キャリアのポリアニオン(ヘパリン)との置き換え反応に対する安定性を評価した。その結果、PEG 分子量が大きく(分子量 42,000)、PLL の重合度が最も小さい(20 量体)siRNA キャリアが最も高い安定性を示すことが明らかになった(図 2(A))。また、PIC ナノキャリア中の PEG の重量分率とヘパリンによる置き換え耐性にも相関が見られ、PEG の重量分率が増えることにより PIC の安定性が向上した(図 2(B))。この結果は、荷電性高分子の分子量が大きくなるほどより安定となる通常のポリオンコンプレックスでは見られない現象であり、PLL が短いほど PEG の密度が増大する PIC ナノキャリアに特徴的なものであると考えられる。

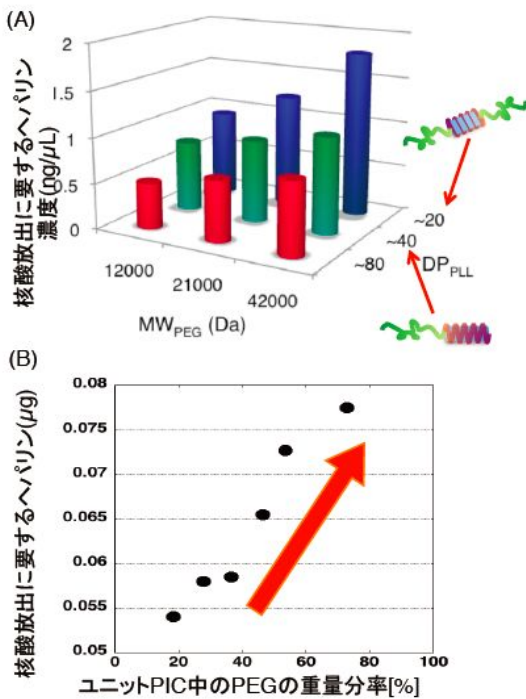


図 2. PIC ナノキャリアのヘパリンに対する置き換え耐性

(3) PIC ナノキャリアの血中滞留性および固形がん集積性の評価

異なる組成の PEG-PLL および分岐型

PEG(PEGasus)を有する PEGasus-PLL と蛍光 (Cy5)標識 siRNA を混合することによって PIC ナノキャリアを構築し、マウスに尾静脈投与を行った。その 10 分後に、血漿を採取し、蛍光強度から血中の Cy5-siRNA の濃度 (%dose)を算出した。その結果、PLL の重合度が 20 で分岐型 PEG(PEGasus)(10k×2 および 21k×2)を有する場合に、高い血中 Cy5-siRNA 濃度が達成された (図 3)。

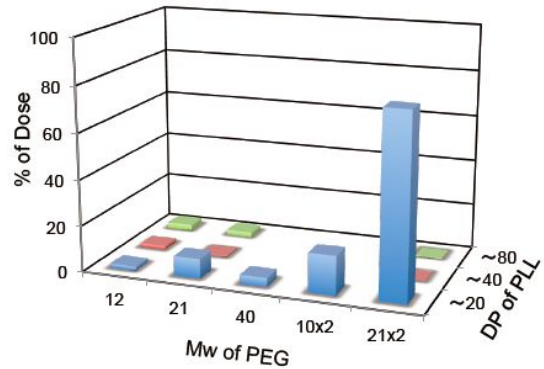


図 3. PIC ナノキャリアの静脈内投与 10 分後の血中 Cy5-siRNA の濃度

PEG-PLL(12k-21 および 21k-21)、PEGasus-PLL(10k×2-21 および 21k×2-20)から形成される PIC ナノキャリアをマウスに尾静脈投与し、投与 4 時間後のヒト腎がん (OS-RC2)細胞への Cy5-siRNA の集積量を評価した(図 4)。その結果、PEG 分子量が大きく、さらに PEG が分岐型になることによって、より高いがん集積性が達成された。

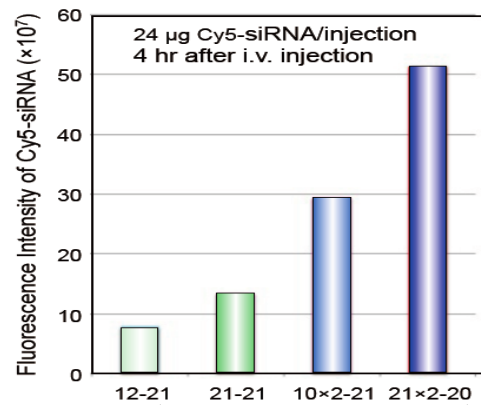


図 4. ヒト腎がん (OS-RC2)細胞の固形がんモデルに対する Cy5 標識 siRNA の集積

(4) siVEGF および siPIk-1 を搭載した PIC ナノキャリアによる固形がんモデルの治療

VEGF と PIk-1 を標的とした siRNA を PEGasus-PLL(21k×2-20)と混合することにより PIC ナノキャリアを形成させ、その OS-RC2 細胞の皮下移植モデルに対する治療効果を検討した。その結果、siVEGF および siPIk-1 を搭載した PIC ナノキャリアを投与することによって有意な腫瘍増殖抑制効果とマウスの生存期間の延長が確認された (P<0.05)(図 5)。

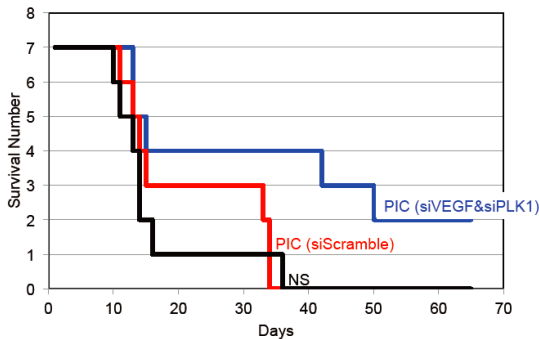


図5. OS-RC2細胞の固形がんモデルマウスのPICナノキャリア投与後の生存曲線

(5) PIC ナノキャリアによる腎疾患モデルの治療

腎障害合併高血圧モデルに対して、チロシン水素化酵素(TH)標的のsiRNAをPICナノキャリアに搭載し投与した結果、メサンギウム領域のTH発現が有意に減少し(図6)、糸球体病変の改善と尿蛋白、尿アルブミンの抑制(図7)が確認された。これらの効果は、scramble siRNAによる治療群では確認されなかった。以上の結果より、腎障害合併高血圧モデルにおいてPICナノキャリアを利用してTHを標的とするsiRNAを腎メサンギウム細胞に送達することによって、腎糸球体局所でノルアドレナリンの合成が抑制され、腎局所の病変が改善されることを確認することができた。

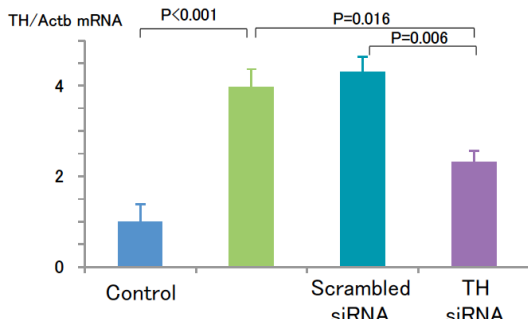


図6. 糸球体分画におけるTH発現量の評価(RT-PCR)

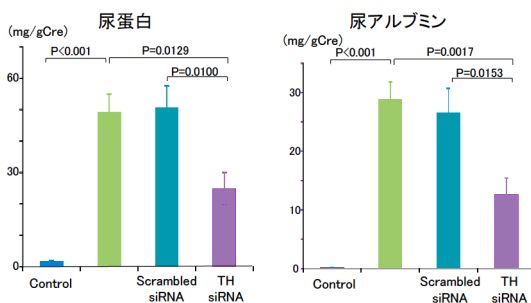


図7. TH siRNAのデリバリーによる尿蛋白、尿アルブミンの変化

以上のように、本研究では、1分子のsiRNAを搭載した新規PICナノキャリアを構築し、がんと腎疾患の動物モデルの治療における

有用性を実証し、当初目標をほぼ達成することができた。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計17件)

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 (9) 8979-8991 (2014) 査読有 DOI: 10.1021/nn502125h

Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35(27) 7887-7895 (2014) 査読有

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.041

Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 (13) 1211-1215 (2014) 査読有

DOI: 10.1002/marc.201400049

H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014) 査読有

DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.02.016

T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nature Commun.* 5 3545 (2014) 査読有 DOI: 10.1038/ncomms4545

H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R.

J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014) 査読有
DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.02.016

F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.01.008

H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* 4 (1) 50-60 (2014) 査読有
DOI: 10.1007/s13346-013-0175-6

H. Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (24) 6218-6221 (2013) 査読有
DOI: 10.1002/anie.201300178

T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6 (8) 6693-6705 (2012) 査読有
DOI: 10.1021/nn301164a

F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874

(2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.005

H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate. Chem.* 23 (8) 1503-1506 (2012) 査読有
DOI: 10.1021/bc300182y

R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012) 査読有
DOI: 10.1021/nn300942b

T. Suma, K. Miyata, T. Ishii, S. Uchida, H. Uchida, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, 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* 33 (9) 2770-2779 (2012) 査読有
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.12.022

〔学会発表〕(計 27 件)

西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 第12回技術講演会, 京都国際会館, 京都 2014年7月16日 (招待講演)

西山伸宏, 高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発, 第10回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014年6月20日(招待講演)

N. Nishiyama, Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy, Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Daejeon, Korea, May 23, 2014 (招待講演)

西山伸宏, がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発, 製剤機械技術学会 第23回大会 (2013年10月10日-11日), ニッショーホール, 東京 2013年10月10日(特別講演)

N. Nishiyama, Development of polymeric micellar nanocarriers for cancer diagnosis and therapy, The 4th Asian Biomaterials Congress (26-29 June), The Hong Kong University of Science and Technology, Kowloon, Hong Kong, June 29, 2013 (招待講演)

西山伸宏, 核酸医薬のデリバリーのための高分子ナノキャリアの設計, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会 (2013 年 7 月 4-5 日、京都テルサ), シンポジウム 3 核酸医薬の基礎と臨床における新展, 京都テルサ, 京都 2013 年 7 月 5 日(招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 核酸デリバリー用ユニット構造体
発明者: 西山伸宏、宮田完二郎、片岡一則、渡邊秀美代、福島重人、茶谷洋行、武元宏泰、長田健介、加藤泰己
権利者: 東京大学、ナノキャリア(株)
種類: 特許
番号: 特願 2012-102841
(PCT/JP2013/062531)
出願年月日: 2012 年 4 月 27 日
国内外の別: PCT 出願(国外)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bmw.res.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro)
東京工業大学・資源化学研究所・教授
研究者番号: 1 0 3 7 2 3 8 5

(2) 研究分担者

宮田 完二郎 (MIYATA, Kanjiro)
東京大学・大学院医学系研究所・准教授
研究者番号: 5 0 4 3 6 5 2 3

(3) 連携研究者

なし