

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82731

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07494

研究課題名(和文) 温度応答性セグメントを組み込んだ生分解性高分子ミセル型核酸キャリアの構築

研究課題名(英文) Construction of polymeric micelle with thermo-responsive poly(amino acid)s

研究代表者

林 光太郎 (Hayashi, Kotaro)

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)・ナノ医療イノベーションセンター・研究員

研究者番号：00780660

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)：アンチセンス核酸は、難治性疾患に過剰発現する遺伝子を選択的に抑制する次世代の分子標的薬として期待されているが、治療応用に向けて標的組織や細胞への送達効率を高める技術の確立が求められている。本研究では、送達技術の第一の課題である生体内での安定性の向上を狙い、温度応答性セグメントを組み込んだ熱安定化ミセル型ナノ粒子の調製を試みる。生分解性をもつポリアミノ酸ベースのポリマーの新しい構造を開発し、25度付近に相転移する温度応答性を示すことを明らかにした。このポリマーは、生体適合性の高く、更なる高機能なキャリア設計を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although antisense oligonucleotides, which selectively suppress genes overexpressed in intractable diseases, have been expected as next molecular targeting drugs, therapeutic use of them was limited due to poor accumulation into target tissues or cells. Delivery system of them has been researched to overcome the hurdle. Herein, I synthesized poly(amino acid) based thermo-responsive polymer for polymeric nanomicelles, directing to stabilization of nanoparticles by additional protective layer under intravital circumstance. Synthesized poly(amino acid) polymer exhibited phase transition around 25 degree. This polymer was expected as biocompatible materials for highly-functionalized delivery carrier design for effective accumulation into target tissues.

研究分野：科学

キーワード：バイオマテリアル 機能性高分子

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんを中心とした難治性疾患に対する新たな治療法として、短い核酸を治療薬として用いる核酸治療に大きな関心が寄せられている。なかでも、アンチセンスオリゴ核酸 (ASO) は、細胞内で遺伝子組み換えを引き起こす心配なく、標的である相補的な mRNA を選択的に効率よく抑制することから、次世代の分子標的薬として期待されてきた。特に、がんを惹起する異常遺伝子を効率抑制できることから、がんの効果的な治療法となることが期待されている。しかし、ASO を医薬として用いる際の一番の障害はがん細胞へ送達する手法が確立されていないことである。ASO は生体内において酵素による分解や排泄を受けやすく、また、負電荷をもつ核酸が負に帯電した細胞膜と反発して細胞に取り込まれにくいことが挙げられる。

ASO を送達する手法として、核酸の化学修飾など様々な手法が開発されているが、なかでも ASO を生体適合性が高いポリエチレングリコール (PEG) と正電荷を有する高分子からなるブロック共重合体と静電相互作用させてポリイオンコンプレックス (PIC) を形成させる手法が広く受け入れられている。とりわけ、PIC ミセルは、内核に ASO を封入し、外層に PEG を配し、親水性の保護層としたコアシェル構造を有することで、代謝を回避しつつ静電反発を緩和し、上記課題を解決することができる。加えて、ブロック共重合体の任意の位置に化学修飾を施すことで、様々な機能を付与することが可能であることから、ASO の医療応用に向けて高機能化 PIC ミセルは最も有力な手法であるといえる。しかし、ASO の PIC ミセルは研究段階では実績が得られているが、臨床応用の進展が限られていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ブロック共重合体に更なる化学修飾を施すことにより、ASO を腫瘍組織に送達し、治療効果を得ることを目標とする。ASO は短い核酸のため、ポリマーとの間で十分な相互作用が得られず、ミセルの安定性が不足していることが課題だと考え、近年発見された PIC 内核と親水的な外層の間に温度応答性セグメントの導入をし、調製時はミセル形成を妨げないようにしつつ、生体温度にて疎水的な保護層を形成することで、PIC ミセルが安定化する手法を適用することで解決できると考えた。しかし、このときの温度応答性ポリマーは、ミセル安定化には有効であるが、更なる化学修飾が難しく、腫瘍標的リガンドの導入などの高機能化が困難である問題があった。本研究では、ポリアミノ酸ベースの温度応答性ポリマーを組み込んだ送達用高分子を開発し、ASO を効率的に腫瘍組織に

送達するシステムの創出を目的とした。特に、新たな高分子材料を開発することにより、報告の安定化機能を維持しつつ、将来的なりガンド導入や、還元環境や酵素環境に応答する機能を付与することを視野に入れている。また、温度応答性セグメントとポリカチオンとして、ポリアミノ酸ベースの高分子を用いることで、生体内での分解性を付与し、より臨床応用を指向したデザインとする。

### 3. 研究の方法

ASO ミセルの調製のため、PEG セグメント、温度応答性セグメント、カチオン性セグメントからなる三元系ブロック共重合体の合成を行う (図 1)。ポリアミノ酸ベースの温度応答性セグメントとして、ポリアスパラギン酸の側鎖にアミド結合を介して化学修飾を加えることにより、温度応答性を付与する。側鎖修飾は、過去に温度応答性が知られているアミノアルコールを中心に、他のポリマー骨格で温度応答性ポリマーとして知られている部分構造であるジアルキルアミノ基を合成し、検討した。また、この温度応答性セグメントを含んだブロック共重合体の合成を行い、その温度による物性の変化を観察し、核酸医薬の送達技術への応用展開について考察した。

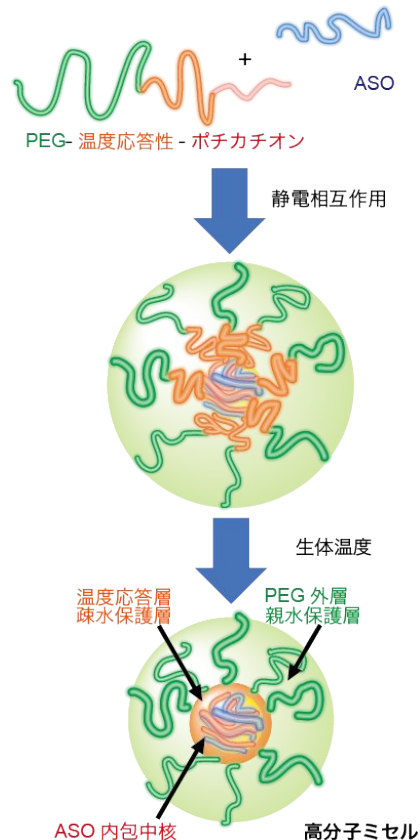


図 1. 温度応答性セグメントを組み込んだ高分子ミセルの概念図

### 4. 研究成果

まずは、温度応答セグメント単体を合成

し、その温度による物性の変化を検証することとした。側鎖をベンジル保護したポリアスパラギン酸に各種のアミンを反応させることにより、ポリアスパラギン誘導体を合成した。過去に報告のあったアミノアルコールの合成検討を行ったところ、ポリアスパラギン主鎖の分解が見られた。条件の違いは、出発物質がベンジル保護したポリアスパラギン酸かポリスクシンイミドの違いであるが、反応機構は同じであるため、反応性の違いか細かい条件の違いであると考えられる。ポリスクシンイミドを経由するのは、更なるブロックの付加など化学修飾による高機能化に適さないと考え、この手法を採用するのは難しいと結論づけた。

そこで、温度応答性を持つと予想される側鎖修飾として、ジアルキルアミノ基を選択し、ベンジル保護したポリアスパラギン酸からの合成検討を行った。こちらでは、側鎖修飾の定量的な進行が NMR のピーク解析により確認された。

本研究では、主にジブチルアミノ基を導入したポリアスパラギン誘導体を、ジブチルアミノ基とポリアスパラミド主鎖の間のスペーサーをエチレン (DBen) とプロピレン (DBpro) とした 2 種類のポリマーを比較しつつ、物性検討を行った。それらのポリマーは側鎖に疎水的なブチル基を持つものの、どちらも室温において水溶性であった。それらの 0.1 wt% の水溶液 (pH 7.4) を用意し、温度を 10 °C から 60 °C まで変化させて、光散乱強度の変化を測定した。DBen のポリアスパラミド誘導体は 25 °C 付近で相転移を起こし 10 °C の間に散乱光強度が二桁上昇した。これは、温度上昇により溶液中に分散しているポリマーの凝集が開始し、その結果、散乱強度の大きい凝集の割合が増えたためと説明できる。この凝集は、ポリマーの水の溶媒和が不利になったためであると考えられるが、それは、温度によりポリマーの疎水性が高まったためであるといえる。このことは、デザインしたポリマーが PNIPAM のような、低温では親水的であるが温度を上昇すると疎水的に変化する温度応答性を有するという仮説と矛盾しない。また、DBpro のポリアスパラミド誘導体は 45 °C 付近で相転移を起こし 10 °C の間に散乱光強度が三桁上昇した。リンカーが違っていても同様に、低温では親水的であるが温度を上昇すると疎水的に変化する温度応答性を有すると考えられる。

リンカーの一炭素の違いで、相転移する温度が 10 °C 変化し、かつ、炭素鎖の数が少ない方が低い温度で疎水性に変化するという結果は、炭素鎖数が多いほど疎水性が高まるという事前の推測と矛盾しているように見える。この理由として、ジブチルアミノ基へのリンカーを介したプロト

ン供与の強弱による可能性が考えられた。アミノ基同士の場合、エチレンをリンカーとすると、隣接アミノ基の状態がアミン自体のプロトン化率に影響するが、プロピレンをリンカーとするとその影響が弱まるということが知られている。この仮説を検証するため、pH を 6.5 と 8.1 と、わずかに変化させて、同じく 0.1 wt% の水溶液の散乱強度の測定を温度を変えて行った。そうすると、pH 6.5 では、どちらのリンカーのポリマーも 60 °C まで散乱強度の変化は見られなかった。これは、どちらのポリマーも親水性を保ったことを示唆しており、ジブチルアミノ基のプロトン化による水和性が上昇したと考えて矛盾しない。一方、pH 8.1 において、DBen ポリマーは 10 °C においても沈殿物が見られ、ポリマーの疎水化が起きていると考えられる。DBpro ポリマーは pH 7.4 のときと同様、温度による散乱強度の変化が見られた。こちらは、35 °C 付近で相転移が見られ、散乱強度の三桁程度の変化が見られた。pH の上昇により、アミノ基のプロトン化率が低下し、ポリマーの水和が弱まったという考えと矛盾しない。

開発したポリアミノ酸ベースの温度応答性セグメントを組み込んだ送達システムに向けたブロック共重合体の検討を行った。まずは、PEG と DBen ポリマーのブロック共重合体の合成を行った。ブロック共重合体でも、ポリアミノ酸主鎖の分解は見られず、定量的な側鎖修飾が可能であった。合成したブロック共重合体の 0.1 wt% 水溶液 (pH 7.4) を調製し、同じく温度を変えて散乱強度の変化を観察した。ブロック共重合体においても、25 °C 付近で相転移が見られ、散乱強度の上昇が見られた。親水セグメントの付与を行っても、温度応答性は維持していると考えられる。

本研究では、新規温度応答性ポリアミノ酸誘導体のデザイン・合成とその温度による物性の変化を検討した。温度応答性ポリアミノ酸誘導体の合成に成功し、更なる機能化の目処が立った。また、誘導体の温度による変化に関して、ポリマー側鎖の電離度が効いていることが示唆された。より詳細な相転移の機構研究と、実用応用に向けたキャリアの作り込みが今後の課題であるといえる。

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

林光太郎、福島重人、長田健介、西山伸宏、宮田完二郎、片岡一則、RNA 鎖と重合度の異なるカチオン性ブロック共重合体の会合挙動の解析、第 66 回高分子学会

年次大会、2017/5/29-31、幕張メッセ

Kotaro Hayashi, Shigeto Fukushima, Hiroyasu Takemoto, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka, Effect of ionomer rigidity on the complex formation with block-cationer and RNAs, 253rd ACS National meeting & Exposition, 2017/4/2-6, Moscone Center

Kotaro Hayashi, Hiroyuki Chaya, Shigeto Fukushima, Sumiyo Watanabe, Hiroyasu Takemoto, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka, Control of nanoparticle assembly between nucleic acid and block-cationer, 2016/11/28-30, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo, The University of Tokyo

林光太郎、茶谷洋行、福島重人、渡邊秀美代、武元宏泰、長田健介、西山伸宏、宮田完二郎、片岡一則、siRNA とブロック共重合体における会合数の制御、第 65 回高分子討論会、2016/9/14-16、神奈川大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：刺激応答性ポリマー  
発明者：林光太郎、片岡一則  
権利者：川崎市産業振興財団  
種類：特許  
番号：特願 2018-040827  
出願年月日：平成 30 年 3 月 7 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 林光太郎  
(Kotaro Hayashi)  
川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター 研究員  
研究者番号：00780660