

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19030

研究課題名(和文) グライコベシクルを基盤とした核酸医薬産生・送達統合システムの構築

研究課題名(英文) Construction of Integrated Nucleic Acid Drug Production and Delivery System Based on Glycovesicles

研究代表者

西村 智貴 (Nishimura, Tomoki)

京都大学・工学研究科・特定助教

研究者番号：60648070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が独自に開発した分子透過性ポリマーベシクル(Maltopentaose-b-poly(propylene oxide)内で、次世代医薬として注目されている核酸医薬を酵素反応により合成した。また、本研究を遂行するなかで、25°C前後に下限臨界溶解温度を示すpoly(n-propyl oxazoline)と糖鎖からなるブロックポリマーが分子透過能を示すことを見出した。これによりLCSTを示すような水和能を持つポリマーが分子透過性を向上させることが明らかとなり、分子透過能を持つポリマーベシクルの設計指針を構築する上での足がかりとなると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、我々が独自に開発した分子透過を示す高分子ベシクルの性質を生かし、高分子ベシクル内での酵素反応により核酸医薬産生を行なった。これにより、従来の核酸送達キャリアが持つ封入率、毒性及び安定性に関する問題を克服する足がかりになると考えられる。また、水和能を有するpoly(n-propyl oxazoline)が、ポリマー二分子膜の分子透過性を向上させることが明らかとなり、分子透過能性高分子ベシクルの設計指針に結びつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized nucleic acid medicine, which is attracting attention as a next-generation drug, by a rolling circle amplification in molecular permeable polymer vesicles that we developed previously. In the course of conducting this study, we also found that amphiphilic block polymer composed of carbohydrate and poly(n-propyl oxazoline), which shows a lower critical solution temperature around room temperature, self-assembled into molecular permeable polymer vesicles. The introduction of hydrophobic polymers showing LCST-like behavior such as poly(n-propyl oxazoline)s as a hydrophobic segment represents a new approach to constructing permeable polymer vesicles. Our study thus opens up an avenue for designing and controlling the molecular permeability of polymer vesicles.

研究分野：自己組織化材料化学

キーワード：ポリマーベシクル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

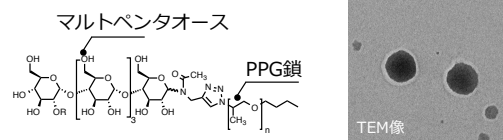
DNA や RNA からなる核酸医薬は、優れた薬効を示すものの、生体内で速やかに分解されるため、薬物送達キャリアが必要とされる。しかし、現在、主として用いられるカチオン性キャリアは、静電相互作用によって核酸とキャリアとを複合化させるため、生理条件下で不安定である。また、生体分子との相互作用による毒性も懸念される。一方で、リポソームなどの中空粒子などへの内包といった方法では内包効率が低いといった問題がある。さらに、核酸医薬は、非常に高価であり、生産量も極めて少ないことも課題である。

### 2. 研究の目的

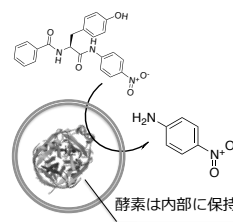
上記の背景の中で、我々は、ある種の両親媒性糖鎖ポリマーがベシクルを形成し、そのベシクルが分子透過性を示す事や酵素などの高分子は内水相に保持でき、基質を外部から添加するだけで酵素反応場として機能する事を見いだしている(図1)。

そこで、本研究では、この分子透過性グライコベシクルを基盤として、細胞親和性・薬物放出能の付与、さらにベシクル内酵素反応による核酸産生手法の確立を行うことを目的とした。これにより核酸医薬産生の場合と薬物送達キャリアの機能を合わせ持つ材料へと展開し、従来の核酸キャリアが持つ課題を一挙に克服した、新たな核酸送達システムを構築することを目指した。

#### ○ 両親媒性ポリマーによる分子透過性ベシクルの形成



#### ○ 酵素反応場として機能 基質の添加で酵素反応が進行



#### ○ 細胞内でプロドラッグ を活性化

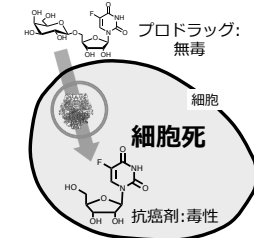


図1 申請者が開発したポリマーベシクルの特徴

### 3. 研究の方法

#### (1). 核酸医薬産生と薬物送達能を兼ね備えたグライコベシクルの創製

核酸医薬産生と薬物送達に向けたグライコベシクルの構築のため、以下の項目を実施する。

①. ベシクルへの細胞親和性と内包物の放出能を付与するため、膜透過ペプチドである TAT 修飾ポリマー及び pH 応答性ポリマーを合成する。

②. 上記で合成したポリマーと先行研究で開発した分子透過性糖鎖ポリマーを混合し、pH 応答性 TAT 提示グライコベシクルを作製し、TEM, DLS, 放射光 X 線小角散乱法により集合体の構造解析および pH 応答に伴う構造変化を把握する。

③. 上記ベシクルの細胞内取込み能、取込み経路および内包物放出能を調べ、基礎的な性質を明らかにする。

#### (2). ローリングサークル増幅(RCA)法による shRNA 合成と細胞内送達

上記で最適化された pH 応答性 TAT 提示ベシクルに T7RNA ポリメラーゼ、鋳型 DNA を内包させ、RCA 反応による RNA 生成を行なう。RNA 定量キット、ゲル電気泳動により合成を確認した後、マウス腎癌(Renca)細胞へのデリバリーを行う。以上より、ベシクル内核酸合成法の確立と細胞内デリバリーの送達能の評価を行なう事で、本システムの有用性を把握する

### 4. 研究成果

(1) 細胞膜透過型ペプチドである TAT をマレイミド修飾 poly(propylene oxide)に Thiol-ene 反応を用いて修飾したポリマーを合成した。先行研究で得られている糖鎖ポリマー (maltopentaose-block-poly(propylene oxide))との単純な混合により、TAT を提示したハイブリッドベシクルを作成可能であること明らかにした(図2)。得られたハイブリッドベシクルは、エク

ストルーダー処理や超音波処理を行なう事により、自在にサイズの制御が可能であり、放射光 X 線散乱測定から二分子膜構造を保持している事も判明した。また、このベシクルは、血清存在下でも安定であり、1 週間前後は粒子径に変化は見られなかった。

TAT を提示したハイブリッドベシクルの細胞への取り込み挙動をエンドソーム阻害剤を用いて調べた。その結果、EIPA や cytochalasin D といったマクロピノサイトーシス阻害剤の存在下で、細胞取り込みが阻害されたことから、TAT 提示ハイブリッドベシクルは、マクロピノサイトーシス経路で細胞内へと取り込まれることが明らかとなった。また、ベシクルの細胞内での局在を調べたところ、Lysotracker と共局在することから、マクロピノサイトーシス経路により取り込まれた後に、主に後期エンドソームやライソソームに移行することも明らかとなった。さらに、ハイブリッドベシクルにおいても、物質透過能は保持しており、また、酵素(HRP や chymotrypsin、 $\beta$ -galactosidase)などのタンパク質を安定に内包することができるため、基質を外部から供給しえる酵素反応場として機能することも確認している。

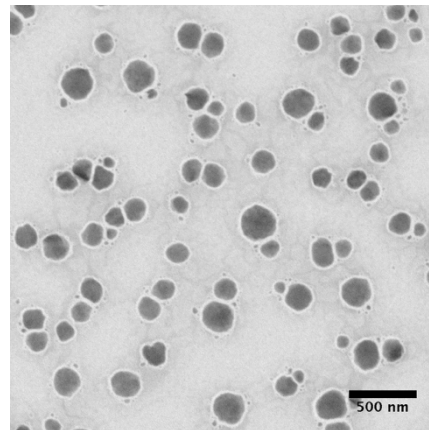


図 2 TAT 提示ハイブリッドベシクルの TEM 像

(2) まず、予備的な検討として、ローリングサークル増幅法による shRNA の増幅試験を行った。VEGF 発現抑制配列を持つ鋳型環状 DNA と NTP および T7 RNA polymerase 存在下で shRNA の合成を試みた。アガロースゲル電気泳動により、shRNA の生成を確認したところ、1000~2000 塩基の shRNA が生成していることが判明した。次いで、鋳型環状 DNA および T7 RNA polymerase を上記のベシクルに封入し、HPLC を用いて単離したのち、NTP を加えベシクル内でのローリングサークル増幅を行った。ベシクルを一度冷却し、崩壊させたのち、shRNA の生成をアガロースゲル電気泳動により確認したところ、少量ではあるものの shRNA の生成を確認した。得られた核酸内包ベシクルを Renca 細胞へ添加し、VEGF のノックダウンをリアルタイム PCR で評価したところ、コントロールの siRNA と大きな違いが見られなかった。この原因として、shRNA 生成量の低さが要因であることが考えられることから、二分子膜の分子構造を最適化することで、基質である NTP の透過速度の向上を試みており、これにより shRNA の生成量を増加させる。

また、本研究を遂行する過程で、25 °C 前後に下限臨界溶解温度を示す poly(*n*-propyl oxazoline) と糖鎖からなるブロックポリマーを新たに開発し、このポリマーが水溶液中でベシクル構造を形成し、さらにそのベシクルが分子透過能を示すことを見出した(図 3)。先行研究で用いた疎水性セグメントである poly(propylene oxide)は、LCST 以上であっても弱く水和しており、部分的に親水的な環境となっていたため、高い分子透過能を示したと推察している。poly(*n*-propyl

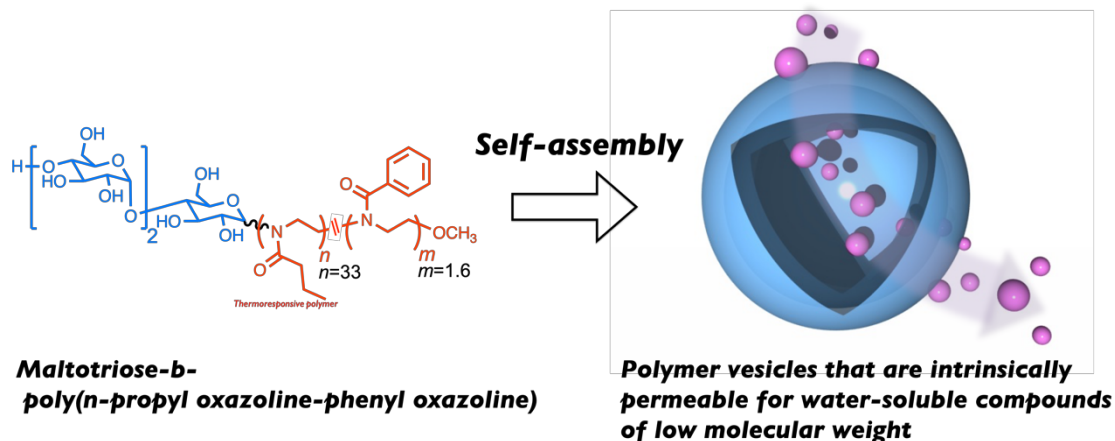


図 3 糖鎖-*b*-poly(2-oxazoline)の化学構造式と自己組織化による分子透過性ベシクル形成

oxazoline)においても、二分子膜中で同様に弱く水和していることが考えられ、本研究から、LCSTを示すような水和能を持つポリマーが分子透過性を向上させることが明らかとなった。これまでに分子透過能を持つポリマーベシクルの設計指針は明らかになっておらず、このような分子透過性ポリマーベシクルを構築する上での足がかりとなると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Tomoki Nishimura, Akina Yamada, Kaori, Umezaki, Shin-ichi Sawada, Sada-atsu Mukai, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari Akiyoshi, Self-assembled polypeptide nanogels with enzymatically transformable surface as a small interfering RNA delivery platform, *Biomacromolecules*, 2017, 18, 3913, DOI:10.1021/acs.biomac.7b00937
- ② Tomoki Nishimura, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari Akiyoshi, Biotransporting self-assembled nanofactories using polymer vesicles with molecular permeability for enzyme prodrug cancer therapy, *Advanced Materials*, 2017, 29, 1702406, DOI:10.1002/adma.201702406 **Inside front cover に選出**
- ③ Tomoki Nishimura, and Kazunari Akiyoshi, Biotransporting biocatalytic reactors toward therapeutic nanofactories, *Advanced Science*, 2018, 1800801, DOI:10.1002/advs.201800801 **Inside front cover に選出**
- ④ Tomoki Nishimura, Wei-Lun Toh, and Kazunari Akiyoshi, Synthesis and characterization of shell-cross-lined glycopolymer bilayer vesicles, *Macromolecular Rapid Communications*, 2018, 1800384, DOI:10.1002/marc.201800384 **Front cover に選出**
- ⑤ Tomoki Nishimura, Naoki Sumi, Yuta Koda, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari, Intrinsically permeable polymer vesicles based on carbohydrate-conjugated poly(2-oxazoline)s synthesized using a carbohydrate-based initiator system, *Polymer Chemistry*, 2019, 10, 691, DOI:10.1039/c8py01502c, **Back cover に選出**
- ⑥ Shigeo Takeda, Tomoki Nishimura, Kaori, Umezaki, Akiko Kubo, Michiyo Yanase, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari Akiyoshi, Synthesis and function of amphiphilic glucan dendrimers as nanocarriers for protein delivery, *Biomaterials Science*, 2019, 7, 1617, DOI: 10.1039/c8bm01627e

[学会発表] (計 11 件)

- ① 西村 智貴、佐々木 善浩、秋吉 一成：機能性グライコポリマーベシクルの設計と DDS ナノファクトリーへの応用, 第 27 回バイオ・高分子シンポジウム (東京), 講演番号 7, 2017.7. (若手研究者奨励講演賞)
- ② 角 尚紀、西村 智貴、甲田 優太、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成：糖鎖末端ポリオキサゾリンの合成と温度応答性ポリマーベシクル形成挙動, 第 66 回高分子討論年会(愛媛), 講演番号 2017, 2017.9.
- ③ 西村 智貴、佐々木 善浩、秋吉 一成：機能性グライコポリマーベシクルの設計と DDS 応用, 第 66 回高分子討論会 (愛媛), 講演番号 2N10, 2017.9.
- ④ 廣瀬 慎、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成：両親媒性オリゴアス

パラギン酸ポリマーの設計と機能評価, 第 66 回高分子討論会(愛媛), 講演番号 3Pc099, 2017.9.

- ⑤ 廣瀬 慎、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成：選択的分子透過能を示すペプチドポリマーベシクルの設計と機能, 第 67 回高分子討論会(北海道), 講演番号 2PF118, 2018.9.
- ⑥ 中村 侑介、西村 智貴、澤田 晋一、佐々木 善浩、秋吉 一成：両親媒性糖鎖ポリマーからなる自己組織化フィルムの構築, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 講演番号 2P-048, 2018.11. (優秀研究ポスター賞)
- ⑦ 西村 智貴：機能性糖鎖ハイブリッドナノ材料の創製とバイオ応用, 第 64 回高分子研究発表会(神戸), 公演番号 AYS-1 (ヤングサイエンティスト講演賞), 2018.7.
- ⑧ 西村 智貴、申 思詩、佐々木 善浩、秋吉 一成：糖鎖フォルダマーの設計とタンパク質バイオインスパイアドナノ粒子の創製, 第 28 回バイオ・高分子シンポジウム(東京), 講演番号 27, 2018.7.
- ⑨ 西村 智貴、申 思詩、佐々木 善浩、秋吉 一成：糖鎖フォルダマーによる自己組織化体形成と構造記憶特性, 第 67 回高分子学討論会(北海道), 講演番号 3F02, 2018.9.
- ⑩ 西村 智貴、向井 貞篤、佐々木 善浩、秋吉 一成：両親媒性グラフトポリマーからなる糖鎖フォルダマーの設計とその機能, 平成 30 年度医用生体工学研究部門研究発表交流会, 2019.1.
- ⑪ Tomoki Nishimura, Naoki Sumi, Yuta Koda, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi: Synthesis and self-assembly of carbohydrate-conjugated poly(2-oxazoline)s: Polymer vesicles with molecular permeability towards therapeutic nanofactories, ACS Spring Meeting (Orlando), Poly149, 2019.3.

[図書] (計 1 件)

- ① 西村 智貴、秋吉 一成、化学同人, 生命機能に迫る分子化学, 6 章分子シャペロン機能をもつ人工分子システム：シャペロン機能工学

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。