

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20240046
 研究課題名（和文） 全身投与による siRNA デリバリーを実現するためのマルチ機能化高分子ミセルの創製
 研究課題名（英文） Development of multifunctional polymeric micelles for systemic siRNA delivery
 研究代表者
 片岡 一則（KATAOKA KAZUNORI）
 東京大学・大学院工学系研究科・教授
 研究者番号：00130245

研究成果の概要（和文）：短い 2 本鎖リボ核酸 (siRNA) の全身投与によるがん治療を実現するために、siRNA を安全かつ効率良くがん細胞の細胞質までデリバリーする機能を有する高分子集合体 (ミセル) 型キャリアシステムの開発を行った。結果として、がん細胞および腫瘍血管内皮細胞を認識するペプチドリガンドを搭載し、2-イミノチオラン修飾ポリリシンによりミセルコアが安定化された siRNA キャリアは、皮下移植がんモデルに優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：For successful systemic siRNA delivery towards cancer treatments, this study was aimed to develop the multifunctional polymeric micelles to safely and efficiently deliver siRNA into the cytoplasm of cancerous cells. Eventually, the micelle carrier, which was equipped with a targeting peptide ligand on the surface and stabilized core by 2-iminothiolane-modified polylysine, has achieved the significant growth inhibition of the subcutaneous tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2009年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2010年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
年度			
年度			
総計	38,900,000	11,670,000	50,570,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー、高分子ミセル、siRNA、がん治療、機能性ポリマー

1. 研究開始当初の背景

siRNA (small interfering RNA: 30 塩基以下の二本鎖 RNA) は、標的 mRNA を特異的かつ効果的にノックダウンできることから、固形がんなどへの治療応用が強く期待されている。しかしながら、siRNA は生体内にて速やかに代謝・分解されることから、siRNA をがん治療応用するためには、(1) その生体内での安定性と血中滞留性を向上させ、固形がんに対して効果的に集積させ、かつ (2) 標的がん細胞に対して効率良く siRNA を機能発現させる

キャリアシステムの開発が必要不可欠と考えられる。これまでに、リポソームやポリカチオンを構成成分とする siRNA キャリアの開発が世界的に行われてきたが、望ましい体内動態と高い siRNA 活性を両立するキャリアはいまだ報告されていない。

その一方で報告者は、ポリエチレングリコール (PEG)-ポリカチオンのブロック共重合体と核酸分子の静電相互作用を利用して、コアに遺伝子 (プラスミド DNA) を内包した高分子ミセルを開発し、その in vivo 応用にお

ける有用性を実証してきた。よって、これまでに得られた遺伝子内包高分子ミセルキャリアの開発技術に基づき、siRNA デリバリー用にブロック共重合体およびミセル組成を的確に制御することで、日本発・世界初の siRNA 医薬が開発できるものと考え、本研究を推進した。

2. 研究の目的

PEG-ポリカチオンブロック共重合体の精密設計と分子修飾に基づく機能の創り込みによって、長期血中滞留性ならびに優れた腫瘍集積性を達成し、標的がん細胞内で効果的に siRNA を機能発現させることのできる高分子ミセルを構築する。具体的には、図 1 に示すように、(1)ミセル内核に構造安定化に向けた化学構造、例えば細胞内にて開裂するジスルフィド(SS)架橋を導入し、(2)ミセルの血中における非特異的相互作用を抑えるため(ステルス性)の PEG 外殻の組成最適化、例えば PEG の分子量を検討し、(3)特定の細胞表面を認識するためのペプチドリガンド分子をミセル表面に導入する。これらの技術に基づき、最適化された siRNA 内包高分子ミセルに関しては、血管新生に関与する遺伝子を標的とする治療用 siRNA を用いて、皮下移植がんに対する抗腫瘍効果を検討する。

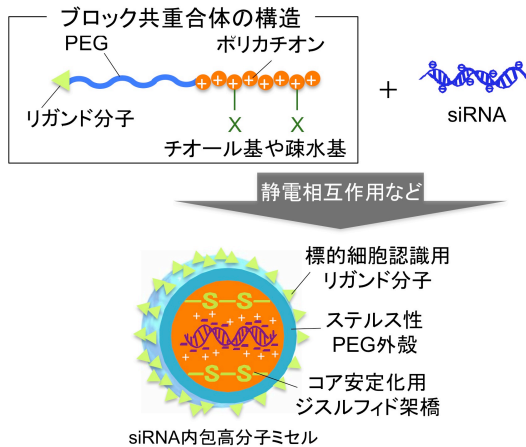


図1. 高分子ミセルの設計指針

3. 研究の方法

(1) ミセルコアの安定化に向けて

ミセルコアの安定化に向けては、PEG-ポリカチオンのポリカチオン部位に、SS 架橋および疎水性官能基を導入することで行った。疎水性官能基としては、コレステリル基、ステアロイル基、および 2-イミノチオラン N 置換体などである。

(2) ステルス性の向上に向けて

ステルス性の向上に向けては、分子量の異なる PEG(12kDa および 17-21kDa)の使用お

よびミセル調製後に分子量 5kDa の活性化 PEG を導入(Post-PEGylation)することで行った。

(3) 標的細胞の認識に向けて

標的細胞の認識に向けては、環状 RGD ペプチドリガンドを PEG の末端に導入することで、ミセル表面にリガンド分子が提示されるよう設計した。リガンド効果の有無に関する評価としては、環状 RGD に対する受容体として知られるインテグリンを過剰発現した子宮頸がん細胞(HeLa)を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ミセルコアの安定化に向けて

siRNA キャリアの安定性評価の手法として、本研究では蛍光相関分光法(FCS)を用いた評価法を考案した。FCS は溶液中の蛍光分子の拡散係数および粒子径を測定するが、これを利用することで、血清培地中などの高濃度のタンパク質共存環境におけるナノ粒子の粒子径測定が可能となる。実際に、蛍光標識 siRNA を用いて種々の siRNA キャリアを調製し、それらの安定性(粒子径)を FCS により評価した。また、実際の血流中での siRNA キャリア安定性に関しては、高速レゾナントスキャナを搭載した共焦点顕微鏡システムを用いて、血液中を流れる蛍光標識 siRNA キャリアをリアルタイム観察することで評価した。

結果として、ポリカチオン側鎖へのコレステリル基やステアロイル基の導入は、ミセルコアの安定性を有意に高めることが確認された。特に、ポリカチオン側鎖に対して約 20%の疎水性官能基導入が培養細胞への siRNA 導入に最適であることが確認された。しかしながら、その一方で、コレステリル基やステアロイル基などの疎水性官能基を導入した siRNA キャリアは、細胞毒性も増加させることが示唆された。

そこで、細胞傷害性の低い疎水性官能基の導入を検討するとともに、側鎖の一部にはチオール基を導入し、ミセルコアへの SS 架橋の導入を考案した。この疎水性官能基とチオール基を同時に導入する反応として、2-イミノチオランの反応を応用した。1 級アミンへと導入された 2-イミノチオランは、環状構造

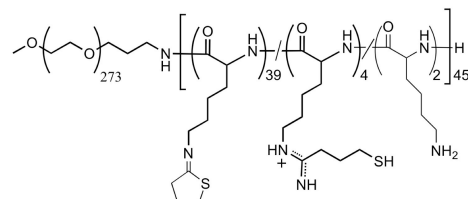


図2. 2-イミノチオランが導入されたブロック共重合体の構造式

と開環構造の平衡状態となることから、一部がチオール基となり、残りが疎水性構造となる(図 2)。得られたブロック共重合体より、siRNA キャリアを調製し、血流中での安定性および安全性を評価したところ、白血球数やAST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)値などの血中パラメーターを変化させることなく、siRNA キャリアの安定性が有意に上昇することが明らかとなった。

(2) ステルス性の向上に向けて

異なる分子量の PEG(12kDa と 17-21kDa) を有するブロック共重合体より siRNA 内包高分子ミセルを調製することで、ステルス性に対する PEG 分子量の効果を検証した。モデルとして行った遺伝子キャリアの系では、PEG 分子量 12kDa から 17kDa への増大に伴い、血中滞留性が向上することが確認された。同様に、siRNA キャリアに対しては PEG の分子量を 12kDa から 19kDa へと増加させたところ、初回通過効果による肝臓への集積もしくは腎排泄が大幅に抑制される傾向が見られ、血中滞留性の向上に寄与することが示唆された。さらに、siRNA をポリアスパラギン酸の側鎖に SS 結合を介してグラフト導入し、見かけ上の siRNA 分子量を増大させた系(siRNA グラフト共重合体)に対して分子量 21kDa の PEG を有するブロック共重合体を適用したところ、分子量 12kDa の PEG から調製された系と比べ、血中半減期は 4 倍近く上昇することが確認された。以上より、siRNA 内包高分子ミセルの血中滞留性の向上に関して、長鎖 PEG の使用が有効であることが明らかとなった。

重合度の異なる PEG の評価と並行して、Post-PEGylation によるステルス性の向上も検討した。分子量 12kDa の PEG を用いて siRNA 内包ミセルを調製した後に、分子量の低い PEG をミセルへと導入することで、12kDa から成る PEG ブラシの隙間に短い PEG が配置され、いわゆる埋め草効果により高密度 PEG 高分子ミセルが調製されるものと期待される。実際に、活性エステル末端を

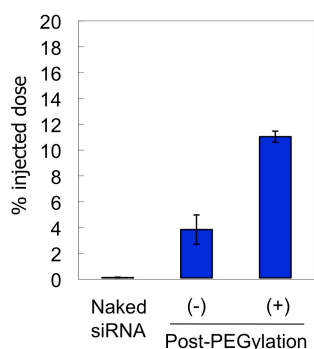


図3. Post-PEGylation前後での siRNA血中濃度

有する分子量 5kDa の PEG を用いて、疎水性官能基によりコアが安定化された siRNA キャリアに Post-PEGylation を行ったところ、静脈投与 2 時間後の siRNA 血中濃度が 3 倍近く上昇することが確認された(図 3)。以上より、Post-PEGylation についても siRNA キャリアの血中滞留性を有意に改善することが明らかとなった。

(3) 標的細胞特異的デリバリーに向けて

PEG 末端への環状 RGD ペプチドリガンドの導入は、alpha 末端にアセタール基を有する PEG を用いることで行った。具体的には、N 末にシステインを有する環状 RGD ペプチドとアセタール基を有するブロック共重合体を反応させることによってチアゾリジン環の形成を介して RGD-PEG-ポリカチオンが得られた。¹H NMR により PEG に対する環状 RGD 導入率を算出したところ、約 70% と算出された。

得られた RGD-PEG-ポリカチオンを用いて siRNA 内包高分子ミセルを調製し、培養 HeLa 細胞に対してリガンドの効果を検証した。まず、蛍光標識 siRNA を用いて、細胞内取り込み量をフローサイトメーターにて評価したところ、リガンド導入による有意な siRNA 取り込み量の増大が確認された。また、このリガンドによる取り込み量増大の効果は、ポリカチオン側鎖における疎水性官能基の導入率の増加に伴い、増強されることも確認された。さらに、共焦点顕微鏡により siRNA キャリアの細胞内動態を観察したところ、環状 RGD なしの siRNA キャリアは細胞膜周辺に長時間留まっている様子が観察されたのに対し、環状 RGD ありの siRNA キャリアは速やかに細胞質へと移行している様子が観察された。そして、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼを利用して、siRNA の遺伝子発現抑制効果を評価したところ、環状ありの siRNA キャリアのみ有意な遺伝子発現抑制効果を示すことが確認された。以上より、環状 RGD の siRNA キャリアへの導入は、siRNA の細胞内取り込みおよび細胞質への移行を促進し、結果として siRNA の遺伝子発現抑制効果を大きく上昇させることが明らかとなった。

(4) 担がんマウスに対する抗腫瘍効果

上述の評価を通じて、siRNA 内包高分子ミセルの有用性が確認されたことから、動物実験へと展開した。本実験では、細胞実験で用いた HeLa 細胞によりマウス皮下移植モデルを構築し、siRNA キャリアの性能評価を行った。環状 RGD ありとなしの siRNA キャリアをそれぞれ静脈投与し、24 時間後の皮下腫瘍への集積性を共焦点顕微鏡を用いて観察した。正常組織(耳介)では、環状 RGD ありとな

しの間で大きな差は見られなかった。一方、腫瘍組織周辺を観察すると、環状 RGD ありの siRNA キャリアは、腫瘍血管壁およびがん細胞に積極的に集積している様子が観察された。そこで、がん組織を摘出し、IVIS イメージングシステムにてがん組織全体の蛍光強度を定量したところ、環状 RGD の導入により siRNA のがん組織への集積が 2~3 倍ほど増加することが確認された。

次いで、血管新生を阻害する治療用 siRNA を高分子ミセルに封入し、血管新生阻害療法に基づくがん治療を行った。結果として、治療用 siRNA+環状 RGD なしのミセルおよび非治療用 siRNA+環状 RGD ありのミセルは有意な抗腫瘍効果を示さなかった一方で、治療用 siRNA+環状 RGD ありのミセルは強力な抗腫瘍効果を示した(図 4)。



図4. 皮下移植がん組織の大きさ

以上より、コアが安定化され、かつ表層にリガンド分子が搭載された高分子ミセル型キャリアを構築することで、siRNA の全身投与を介して優れた抗腫瘍効果を得ることに成功した。

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 18 件)

- ① F. Pittella, K. Kataoka, et al (10 人中 10 番目), Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 32, 2011, pp. 3106-3114.
- ② Y. Vachutinsky, K. Kataoka, et al (9 人中 9 番目), Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release*, 査読有, Vol. 149, 2011, pp. 51-57.
- ③ K. Oba, K. Kataoka, et al (12 人中 12 番目), Polyplex micelles prepared from omega-cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 32, 2011, pp.

652-663.

- ④ K. Osada, K. Kataoka, et al (7 人中 7 番目), Quantized folding of plasmid DNA condensed with block cationer into characteristic rod structures promoting transgene efficacy. *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 132, 2010, pp. 12343-12348.
- ⑤ H. Takemoto, K. Kataoka, et al (9 人中 9 番目), Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 31, 2010, pp. 8097-8105.
- ⑥ M. Sanjoh, K. Kataoka, et al (7 人中 7 番目), pDNA/poly(L-lysine) polyplexes functionalized with a pH-sensitive charge-conversional poly(aspartamide) derivative for controlled gene delivery to human umbilical vein endothelial cells. *Macromol. Rapid Commun.*, 査読有, Vol. 31, 2010, pp. 1181-1186.
- ⑦ H.-J. Kim, K. Kataoka, et al (8 人中 8 番目), Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. *J. Control. Release*, 査読有, Vol. 145, 2010, pp. 141-148.
- ⑧ W. Kim, K. Kataoka, et al (4 人中 4 番目), Thermodynamics of DNA condensation induced by poly(ethylene glycol)-block-polylysine through polyion complex micelle formation. *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 11, 2010, pp. 1180-1186.
- ⑨ K. Miyata, K. Kataoka, et al (10 人中 10 番目), Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 31, 2010, pp. 4764-4770.
- ⑩ K. Itaka, K. Kataoka, et al (4 人中 4 番目), Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 31, 2010, pp. 3707-3714.
- ⑪ M. Oba, K. Kataoka, et al (10 人中 10 番目), Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 査読有, Vol. 7, 2010, pp. 501-509.
- ⑫ K. Itaka, K. Kataoka, et al (6 人中 6 番目), Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J. Control. Release*, 査読有, Vol. 143, 2010, pp. 112-119.
- ⑬ H. Shimizu, K. Kataoka, et al (11 人中 10 番目), siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 査読有, Vol. 21, 2010, pp. 622-633.
- ⑭ M. Zhang, K. Kataoka, et al (7 人中 7 番目), PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA

delivery. *Adv. Mater.*, 査読有, Vol. 21, 2009, pp. 3520-3525.

⑮ M. Han, K. Kataoka, et al (6人中6番目), Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.*, 査読有, Vol. 17, 2009, pp. 1404-1410.

⑯ M. Harada-Shiba, K. Kataoka, et al (12人中12番目), Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Mol. Ther.*, 査読有, Vol. 17, 2009, pp. 1180-1186.

⑰ W. Wang, K. Kataoka, et al (7人中7番目), 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 査読有, Vol. 30, 2009, pp. 2705-2715.

⑱ S. Matsumoto, K. Kataoka, et al (9人中9番目), *Biomacromolecules*, 査読有, Vol. 10, 2009, pp. 119-127.

他27報、計45報の原著論文(査読有)を発表

計12報の英文総説(査読有)、および計12報の和文総説(査読無)を発表

[学会発表] (計12件)

① 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション、第32回日本バイオマテリアル学会大会、2010年11月29日、グランドプリンスホテル広島(広島県)

② K. Kataoka, Smart micelles and vesicles from PEG-polypeptide block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery. 43rd IUPAC World Polymer Congress, 2010年7月15日、Grasgow Science Centre (イギリス、グラスゴー)

③ 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けた超分子ナノデバイスの創製、遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム、2010年6月2日、北海道大学学術交流会館(北海道)

④ K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery, 3rd European Conference for clinical nanomedicine, 2010年5月10日、Messe Schweiz, Hall L'Entree (スイス、バーゼル)

⑤ 西山伸宏、片岡一則、全身投与による遺伝子デリバリーのための高分子ナノキャリア設計、JST 新技術説明会、2009年11月20日、JST 東京本部(東京都)

⑥ 片岡一則、ポリペプチドを用いた新規高分子材料開発～医療、膜、繊維への展開～、NEDO 第一回環境化学セミナー、2009年10

月29日、NEDO 日比谷オフィス(東京都)

⑦ K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery, Invited Lecture in Department of Polymer Science, Zhejiang University, 2009年5月5日、Hangzhou (中国)

⑧ 西山伸宏、片岡一則、がん標的治療のための高分子ミセル型 DDS の開発、岡山肝癌研究会、2009年4月25日、岡山コンベンションセンター(岡山県)

⑨ 片岡一則、がん治療における高分子ミセル製剤の基礎、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋国際会議場(愛知県)

⑩ K. Kataoka, Supramolecular assemblies from smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, 8th France-Japan Drug Delivery Symposium, 2008年10月7日、Cannes (France)

⑪ K. Kataoka, Supramolecular nanodevices for gene and drug delivery -Challenge to smart molecular therapy-, 236th ACS National Meeting & Exposition, 2008年8月18日、フィラデルフィア (米国)

⑫ 片岡一則、超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション、第24回日本 DDS 学会学術集会、2008年6月29日、六本木アカデミーヒルズ(東京都)

[図書] (計2件)

① H. Cabral, K. Kataoka, Smart nanoassemblies of block copolymers for drug and gene delivery, in *Advanced nanomaterials*, Eds., Ku. E. Geckeler, H. Nishide, Germany, 2009, 91-110.

② 岸村顕広、片岡一則：ナノバイオマテリアルと医療応用、超分子サイエンス&テクノロジー-基礎からイノベーションまで-、国武豊喜監修、株式会社エヌ・ティー・エス、2009, 1168-1179.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①
名称：Anionic polymer useful in pharmaceutical composition comprises principal chain formed repeating unit of carboxyl group and side chain bonded with one portion of carboxyl group of principa chain

発明者：片岡一則(他6名)

権利者：東京大学

番号：W02011010714-A1

出願年月日：2010年6月23日

国内外の別：PCT 出願

②
名称：カチオン性ポリ(アミノ酸)およびその使用

発明者：片岡一則(他5名)

権利者：東京大学
番号：特願 2009-31799
出願年月日：2009 年 2 月 12 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 一則 (KATAOKA KAZUNORI)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：00130245

(2) 研究分担者

西山 伸宏 (NISHIYAMA NOBUHIRO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10372385

位高 啓史 (ITAKA KEIJI)
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：60292926

石井 武彦 (ISHII TAKEHIKO)
東京大学・大学院工学系研究科・特任助教
研究者番号：20396716

宮田 完二郎 (MIYATA KANJIRO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50436523

長田 健介 (OSADA KENSUKE)
東京大学・大学院工学系研究科・特任講師
研究者番号：10396947

山崎 裕一 (YAMASAKI YUICHI)
東京大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：00322678