

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500410

研究課題名 (和文) PEG をグラフトした直鎖状カチオン性高分子の腫瘍集積性と細胞膜透過性の解析

研究課題名 (英文) PEG-grafted linear cationic polymer for tumor accumulation and cell penetration

研究代表者

狩野 有宏 (KANO ARIHIRO)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：30403950

研究成果の概要 (和文)：

PLL-*g*-PEG は siRNA などの核酸と安定な複合体を形成し、優れた血中滞留性を示すことから腫瘍への選択的デリバリーが期待された。しかし、核酸との結合性、および腫瘍集積性に及ぼす PLL, PEG 鎖長、PEG グラフト率の影響ははっきりしていない。そこで様々な鎖長、グラフト率の PLL-*g*-PEG を系統だって合成し、種々検討した結果、PEG グラフト率が 30% を超えると腫瘍集積性が高まるとともに核酸との親和性がむしろ高まる事が明らかとなった。また、本共重合体は抗がん物質の選択的デリバリーにも有効である事が示された。

研究成果の概要 (英文)：

We previously showed that polyethyleneglycol-grafted poly-L-lysine (PLL-*g*-PEG) exerts long lifetime of nucleic acids medicine, such as siRNA, in blood circulation. It is conceivable that PLL-*g*-PEG is useful as a drug delivery carrier for tumor treatment. In this study, we examined the effects of PEG grafting ratio and the length of the PEG chain and PLL backbone on the stability of siRNA/PLL-*g*-PEG complex and the tumor accumulation. As the results, it was revealed that the higher PEG-grafted PLL, more than 30%, is efficiently accumulated in tumor tissues and even the affinity to the siRNA is augmented.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

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：薬物伝達システム、核酸医薬、カチオン性高分子、腫瘍集積性

1. 研究開始当初の背景

近年 siRNA などの核酸が新たな医薬材料として期待されている。しかし核酸医薬は分子量が大きく、生体内での安定性が低いこと

から、その実現のためには、薬理効果を劇的に高めるためのドラッグデリバリーシステムの開発が不可欠である。カチオン性ポリマーの一つであるポリ-L-リシン (PLL) は、

核酸とイオンコンプレックスを形成するポリペプチドとして核酸キャリアにしばしば利用される。このカチオン性高分子は生体成分であるアミノ酸の重合体であるポリペプチドであることから比較的生体適合性があると考えられる。しかしながら一方で、カチオン性高分子は非特異的な相互作用により生体内ではしばしば毒性を生じる。そこで非特異的相互作用の抑制に有効性が数多く報告されているポリエチレングリコール (PEG) をグラフト重合した。この PEG 鎖をグラフトした PLL (PLL-*g*-PEG、図 1) は siRNA との複合体形成能を失う事無く、生体内での非特異的相互作用を抑制する事が明らかとなった。このことは PLL-*g*-PEG によって siRNA の血中滞留性が劇的に向上することとして示された。またこの実験結果により、高い腫瘍集積性が発揮できる事が期待された。

2. 研究の目的

PLL 側鎖への PEG 修飾は siRNA との相互作用に影響を及ぼさないという知見が得られていたが、その詳細は不明であった。そこで本研究では、グラフト修飾する PEG 鎖の数および、PEG、PLL の長さの異なる種々の共重合体を系統だって合成し、siRNA との複合体形成性と腫瘍集積性に及ぼす影響を詳細に検討する事を目的とした。また、特に腫瘍集積性を念頭に最適な PLL-*g*-PEG 構造を決定し、研究後半では siRNA だけでなく抗がん物質との複合体形成性と腫瘍集積性を検討する事も目標とした。

3. 研究の方法

PLL-*g*-PEG 共重合体は還元アミノ化法によって合成した。この時 PEG 仕込み比を変える事によって異なるグラフト率のものを合成した。合成した PLL-*g*-PEG は光散乱による分子量決定と元素分析による組成分析により PEG 修飾率を決定した。合成した PLL-*g*-PEG に市販の活性エステル化蛍光基 (Alexa Fluor 647) を反応させ PLL アミノ基に蛍光基を導入した。luciferase 遺伝子を安定発現させたマウス乳癌細胞 4T1、あるいは大腸癌細胞 CT26wt 細胞を Balb/c マウスに移植して担癌マウスを作製した。蛍光修飾 PLL-*g*-PEG を担癌マウスに尾静脈投与し、*in vivo*カメラ (IVIS lumina) によって内蔵、および腫瘍部の蛍光を経時的に観察し、PLL-*g*-PEG の体内動態と腫瘍集積性を解析した。また、尾静脈投与 24 後に各臓器を摘出し lysis buffer により組織抽出液を作製した。各組織抽出液の蛍光強度を定量する事により PLL-*g*-PEG の組織集積性を解析した。siRNA と PLL-*g*-PEG の相互作用は蛍光標識 siRNA を用いて、蛍光分光相関法により各濃度の PLL-*g*-PEG 存在下

での siRNA の分子運動を評価する事により解析した。また複合体の形成は電気泳動にて評価した。

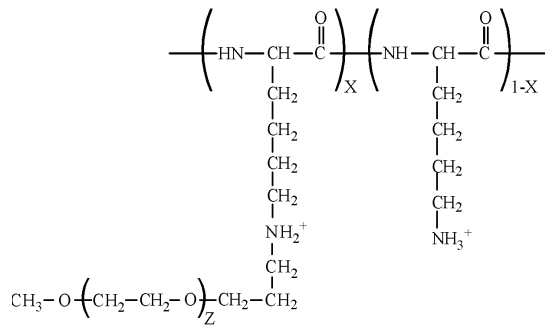


図 1. PLL-*g*-PEG

4. 研究成果

PLL-*g*-PEG と siRNA の親和性

siRNA と PLL との相互作用に及ぼすグラフト PEG の影響を検討するために PLL 分子量 7,000、PEG 分子量 5,000 を用いて PLL-*g*-PEG を合成した。PEG グラフト率は元素分析からそれぞれ 6、8、19、34%と見積もられた。蛍光標識した siRNA と各 PLL-*g*-PEG を水溶液中で混合し、オリンパス MF20 により siRNA の

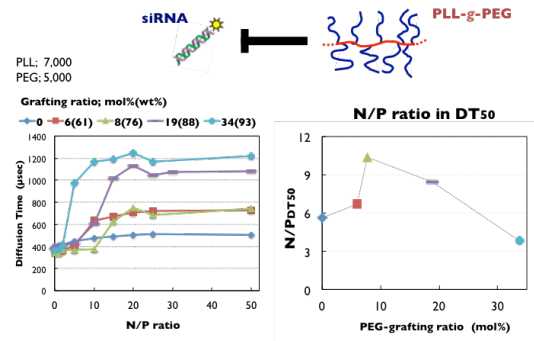


図 2. 蛍光分光相関法による PLL-*g*-PEG と siRNA の親和性解析

核酸速度を測定した (図 2)。

図 2 左では蛍光標識された siRNA に PLL-*g*-PEG を添加するにしたがって観察される拡散時間が長くなる (拡散速度が遅くなる) 様子が見て取れる。横軸は PLL-*g*-PEG の ε-アミノ基 (N) と siRNA のリン酸基 (P) の比、つまり混合比を示している。この時グラフト率が高い共重合体ほど拡散時間の最大値が大きくなる。これはより大きなものと結合すると分子運動はより強く規制されることを意味している。そしてこの最大値に達するための共重合体添加量が少ないほど siRNA との結合力が強いということになる。そこで図 4 右図では、最大値の半分に達するのに必要な混合比 (N/PDT50) に対し、PEG グラフト率をプロットした。N/PDT50 が小さいほど siRNA との結合力が高いことを意味する。

その結果、PEG グラフト率が 8% までは PEG 未修飾の PLL よりも徐々に結合力が弱くなるのであるが、それを超えると今度は徐々に結合力が高くなることが示された。そして興味深いことにグラフト率 34% の共重合体ではむしろ未修飾 PLL よりも結合力が高いという結果となった。

PLL-g-PEG の腫瘍集積性

腫瘍集積性に及ぼす PLL-g-PEG 構造の影響を検証するために、PLL 分子量 28,000 または 40,000、PEG 分子量 2,000、5,000、100,000 を使い、グラフト率の異なる PLL-g-PEG を合成した。光散乱による分子量の決定と元素分析によって PEG グラフト率を決定した。その結果、グラフト率 5 から 72 mol% までの異なる共重合体を得られた (Table 1)。得られた共重合体に蛍光基を修飾し、4T1 細胞を背部皮下に移植した担癌マウスに尾静脈投与し、経時的に腫瘍部における蛍光を経時的に観察

Table 1. Preparation and characterization of PLL-g-PEG

Name	PLL	PEG	Molecular Weight		Grafting Ratio (mole %) ^b	PEG Content (wt %) ^b
	M _w	M _w	M _w ² /10 ³	M _w ² /Mn ²		
28K2P72(91)	28,000	2,000	602	2.0	72	91
28K5P5(67)	28,000	5,000	174	1.8	5	67
28K5P36(93)	28,000	5,000	420	2.5	36	93
40K2P37(84)	40,000	2,000	130	1.5	37	84
40K5P5(67)	40,000	5,000	83	1.6	5	67
40K5P37(94)	40,000	5,000	640	1.7	37	94
40K10P37(97)	40,000	10,000	1000	1.5	37	97

^aMn = the number-average molecular weight, Mw = the weight-average molecular weight. Mn and Mw were determined by MALLS. ^bDetermined by ¹H NMR.

した (図 3)。その結果、28K5P36 と 40K5P37 はほぼ同等の集積性を示すものの、その動態は大きく異なることが判明した。すなわち 28K5P36 はより速く腫瘍部位に集積しより速く排除されるのに対し、40K5P37 は比較的ゆっくり集積するものの腫瘍部位への残留時間も長いというものである (図 3B)。共重合体としての全体の分子量の違い (それぞれ約 40 万と約 60 万) の影響とともに、主鎖 PLL 鎖の長さの違いが特に腫瘍部位への残留性に影響しているものと考えている。またこの実験では、最も分子量の大きい 40K10P37 で最大の集積性が観察されている。続いて同じ癌細胞を静脈することで肺転移モデルマウスを作成し、同様に集積性を検討した。共重合体は 40K5P37 を使用した。図 4 の写真: Luminescence はあらかじめ癌細胞に導入した luciferase 遺伝子の肺での発現を基質である luciferin の投与によって可視化したものである。つまり胚における移植癌の生着度を示している。このマウスに蛍光標識した 40K5P37 を投与し 24 時間後に摘出した胚の蛍光を観察した結果が、図 7: Fluorescence である。その下が蛍光を定量した結果であるが、移植癌の生着度に応じて蛍光強度も強いこ

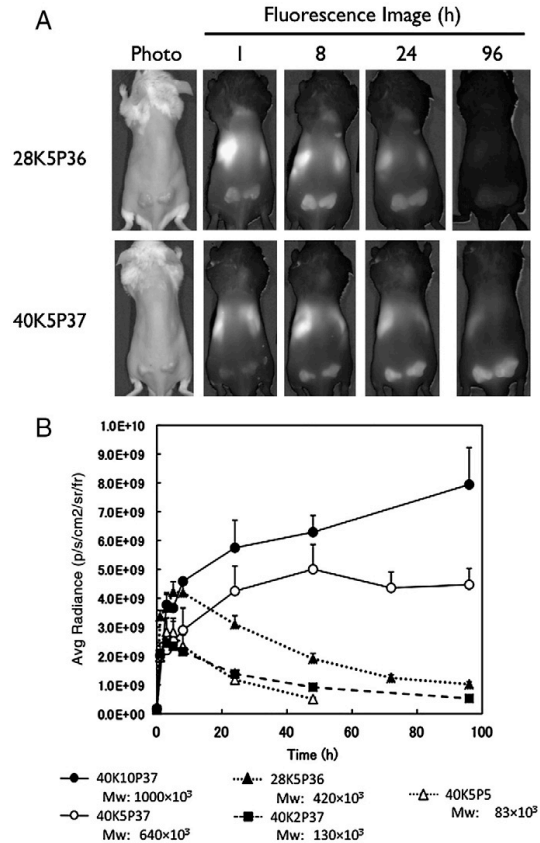


図 3. PLL-g-PEG の腫瘍集積

とが分かる。この結果は PLL-g-PEG は転位性の癌にも集積性を持つことを示唆している。以上の担癌マウスを使った *in vivo* の結果は大腸癌細胞 CT26wt を使っても同様に得られている。

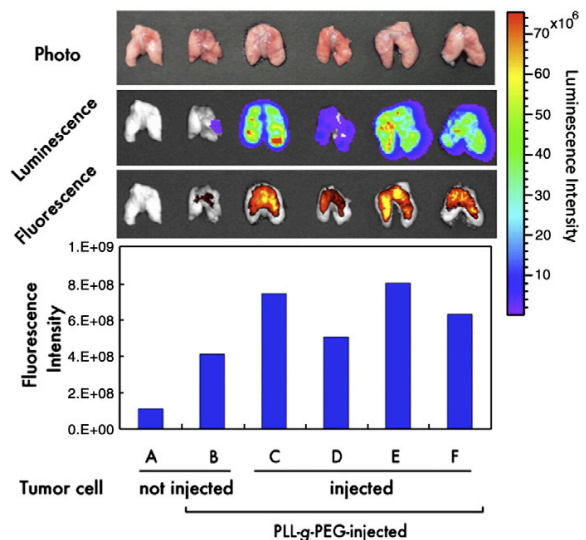
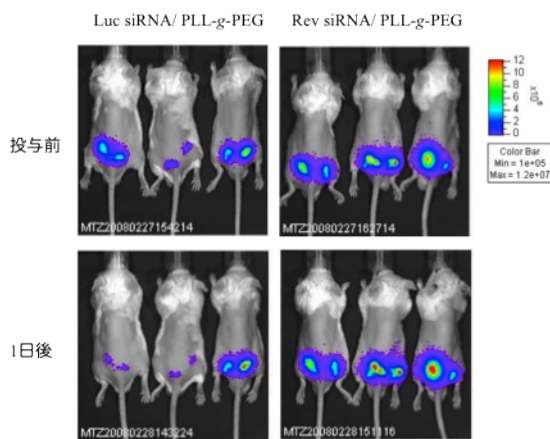


図 4. 肺転移モデルでの腫瘍集積性

PLL-g-PEG による siRNA の腫瘍デリバリー
腫瘍部位における RNAi 活性を検証するために luciferase 遺伝子に対する siRNA を使用して実験を行った。図 5 左上段は先ほどと

同様に luciferin の投与により移植した癌が発現する luciferase 活性をみたものである。その下段はそれぞれ左：正常型の siRNA、右：逆配列の siRNA を PLL-g-PEG とともに尾静脈投与し翌日に同様に観察した結果を示している。そして右にはそれらを定量した結果を図示している。個体差によるばらつきが非常に大きい、ネガティブコントロールである逆配列と比べると RNAi の特異性が発揮できていることが示された。



Luciferase 発現 CT26wt を背部皮下に移植
33 μg siRNA, 40K5P37, N/P = 4

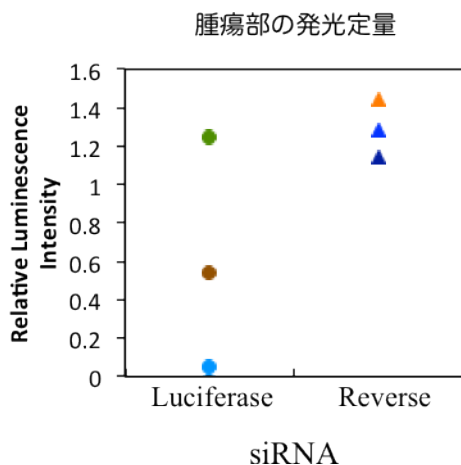


図 5. 上：マウスに移植した癌の luciferin 発光、右：siRNA 投与後の発光強度

PLL-g-PEG による抗癌剤のデリバリー

フォトフィマーはガン治療の一つである光線力学療法に現在臨床で使用されている薬剤である。ヘマトポルフィリンノ重合体であるフォトフィマーと PLL-g-PEG は極めて安定な複合体を形成する事が実験の結果明らかとなった。現在癌細胞障害効果、腫瘍集積性について引き続き検討を進めている。

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 2 件)

1. Kano, A., Moriyama, K., Yamano, T., Nakamura, I., Shimada, N., and Maruyama, A., Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA. J Control Release, 2011. 149(1): 2-7. 査読有
2. Kano, A., Yamano, T., Choi, S.W., and Maruyama, A., Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long blood circulatory half-life. Adv. Mater. Res. (Zuerich, Switz.) FIELD Full Journal Title: Advanced Materials Research (Zuerich, Switzerland), 2008. 47-50 (Pt. 1, Multi-Functional Materials and Structures): p. 762-764. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. Arihiro Kano, Yuuki Taniwaki, Takeshi Yamano, Izumi Nakamura, Naohiko Shimada, Atsushi Maruyama, Complex Formation and Tumor Accumulation of Porfimer Sodium with PLL-g-PEG Copolymer for Photodynamic Therapy, 2010 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 2010 年 11 月 5 日, Zhunan, Taiwan
2. 狩野有宏、水溶性グラフト高分子の腫瘍集積性とドラッグデリバリー、九州地区高分子若手研究会・夏の講演会、2010 年 7 月 9 日、北九州
3. 狩野有宏、山野剛、丸山厚、PLL-g-PEG 共重合体の腫瘍集積性の解析と siRNA デリバリーへの応用、第 24 回日本 DDS 学会、2008 年 6 月 29 日、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/wmaruyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 有宏 (KANO ARIHIRO)

九州大学・先端物質化学研究所・准教授
研究者番号：30403950

(3) 連携研究者

丸山 厚 (MARUYAMA ATSUSHI)

九州大学・先端物質化学研究所・教授
研究者番号：40190566