

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390010

研究課題名（和文） 静電的相互作用を基盤とした自己組織化ナノデバイスの開発と選択的薬物送達への応用

研究課題名（英文） The development of self-assembly nano-devices based on electrostatic interaction and the application to selective drug delivery

研究代表者 佐々木 均 (SASAKI HITOSHI)

長崎大学・病院・教授

研究者番号：00170689

## 研究成果の概要（和文）：

静電的相互作用を基盤とした自己組織化ナノデバイスの開発を行った。遺伝子をモデル薬物として、カチオン性高分子やアニオン性化合物の混合比率や調製手順を変えることで安定なナノデバイスを調製できた。健康食品や医薬品に用いられている  $\gamma$ -polyglutamic acid、N-lauroylsarcosine、グリチルリチンなどをアニオン性化合物として組み込んだナノデバイスは、細胞毒性や血液毒性を示さず、高い細胞内取り込みを達成できた。これらのナノデバイスをマウスに投与した結果、成分の違いにより各々脾臓、肺臓、肝臓等に選択的遺伝子発現を示した。さらに、ナノデバイスの大量生産が可能で凍結乾燥できることを確かめた。以上、本研究では安全な新規素材を用い、核酸医薬品を含めた高分子医薬品等を細胞内へ安全に効率よく導入できるナノデバイスを開発し、治療目的別の製剤を整理するとともに、対応する製剤技術を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed the self-assembly nano-devices based on electrostatic interaction. We could prepare the stable nano-devices by changing the blend ratio of gene, cationic compounds and anionic compounds and the preparation procedures. The nano-devices containing  $\gamma$ -polyglutamic acid, N-lauroylsarcosine, or glycyrrhizin achieved high intracellular uptake without showing cytotoxicity and blood toxicity. After intravenous administration of these nano-devices in mice, selective high gene expression was observed in the spleen, lung, or liver by the difference of each component. Furthermore, we could mass-produce and freeze-dry nano-devices. In conclusion, we successfully developed the secure and effective nano-devices and revealed the preparation technic responding to therapeutic purpose.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、遺伝子、癌、ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

アンチセンス医薬や siRNA などの核酸医薬品を含む高分子医薬品は次世代の医薬品として注目されている。しかしながら、これらの医薬品は安定性や膜透過性が低いため、利用効率が悪い。また、細胞内取り込みの高い正電荷微粒子は細胞毒性や血液毒性が高い欠点をもつ。このため、安全で精密な標的化ができるドラッグデリバリーシステムの開発が望まれてきた。本邦ではこうした DDS 製剤の開発が遅れており、臨床研究への橋渡しのデザインも考慮に入れた新たな DDS 製剤の研究・開発の必要性が提言されている。

申請者らは、安全なアニオン性の細菌関連性物質に着目し、核酸医薬品を選択的にがん細胞内へ導入できる候補物質を探索してきた。その結果、 $\gamma$ -polyglutamic acid をはじめとする数種のアニオン性高分子を発見することができた。この成分を用いて静電的に構成させた遺伝子製剤は、アニオン性を示し細胞と静電的に反発するにもかかわらず、がん細胞に取り込まれ高い遺伝子発現（市販の遺伝子ベクターであるリポフェクチンの 100 倍）を示した。本製剤を担癌マウスに投与した結果、腫瘍組織に蓄積し、選択的に高い遺伝子発現を示すことが確認できた。

## 2. 研究の目的

本研究では申請者が発見した安全な新規素材を各種用い、核酸医薬品を含めた高分子医薬品等を細胞内へ安全に効率よく導入できるナノデバイスを開発し、治療目的別の製剤を整理するとともに、対応する製剤技術を明らかにした。

## 3. 研究の方法

モデル pDNA として、ヒトサイトメガロウイルスプロモーターを有し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードした pCMV-Luc を用いた。導入効率の可視化には、蛍光蛋白質 GFP をコードした pEGFP-C1 を同様に用いた。静電的な結合を仲介するカチオン性高分子として polyethylenimine (PEI) や生体分解性の poly-L-lysine (PLL)、poly-L-arginine (PLA)、protamine などに加え、カチオン性リポソームとして市販の lipofectin などを遺伝子と結合させ、カチオン性の複合体を作製する。さらに  $\gamma$ -PGA をはじめとしたアニオン性高分子を静電的に結合させることで、アニオン性ナノデバイスを作製した。各種ナノデバイスの粒子径や電位などの物理化学的性質は Zetasizer Nano (Marvern 社製) を用いて測定し、安定性は電気泳動により確認した。

In vitro における評価を行うために、各 pCMV-Luc 含有ナノデバイスをマウスメラノーマ細胞株 B16-F10 細胞やヒト肝癌由来細胞

株 HepG2 細胞など数種類の細胞に添加し、遺伝子発現量を測定した。細胞毒性は WST-1 assay によって評価した。また、細胞取り込みと遺伝子発現を可視化するために、pEGFP-C1 と Rhodamine 標識高分子を用いて作製したナノデバイスを細胞に添加し、蛍光顕微鏡で観察した。pCMV-Luc プラスミド自身は YOYO-1 を用いて蛍光標識し、ベクターは Rhodamine 標識高分子を用いナノデバイスを作成し、細胞に添加した。Hoechst 33324 を用いて核を染色し、経時的に細胞内における複合体の局在を測定した。細胞内取り込みメカニズムを明らかにするために、pCMV-Luc を含んだナノデバイスを各種エンドサイトーシス阻害剤やナノデバイスの被膜成分などと共に細胞に添加し、遺伝子発現量を測定した。

In vivo における評価を行うために、各 cMV-Luc 含有ナノデバイスを ddY 系雄性マウスへ尾静脈内投与後の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現量を測定した。また、大量投与後の急性毒性および臓器障害性についても評価を行った。

## 4. 研究成果

pDNA と PEI を用いて作成したカチオン性の pDNA/PEI 複合体と生体適合性のアニオン性高分子である  $\gamma$ -PGA を静電的に自己組織化することで、粒子径が 100 nm 以下で表面がアニオン性に帯電した pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体の構築に成功した。pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体は、pDNA/PEI 複合体で観察される赤血球凝集や細胞障害性を示さず、高い安全性が確認できた。さらに、pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体の細胞内取り込みおよび遺伝子発現効率を測定した結果、表面がアニオン性に帯電しているにもかかわらず、カチオン性の pDNA/PEI 複合体に匹敵する高い細胞内取り込みと遺伝子発現を示した。この遺伝子導入メカニズムについて調べた結果、 $\gamma$ -PGA に特異的な受容体を介して細胞と接着し、カベオラ介在性のエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることを見出した。次に、pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体の in vivo における有用性について検討した。pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体で大量に静脈内投与した結果、pDNA/PEI 複合体で観察された急性毒性や肝障害は認められなかった。また pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA 複合体は静脈内投与後に脾臓選択的に遺伝子発現することを見いだした。さらに、脾臓の中でも特に抗原提示細胞に富む辺縁体に多量に蓄積し、遺伝子発現していることを明らかにした。また、様々なアニオン性高分子を検討した結果、 $\gamma$ -PGA 以外にも、アニオン性の多糖である chondroitin sulfate などの有用なアニオン性分子を見出した。

このナノデバイスは脾臓への遺伝子発現に最適であり、既に感染症ワクチンへの有効性を確認し、その応用を始めている。

また、各成分の無菌的な大量生産が可能なことを確認し、無菌的な調製方法も確立した。さらに、安定な凍結乾燥品を作成することにも成功し、長期保存後も、保存前と同程度の活性を示した。

次に脾臓以外の臓器への選択性を付与できる構成成分の探索を行った。インフルエンザ等の呼吸器感染症の治療には、肺へ選択的に薬物を送達することのできる DDS が望まれている。そこで肺指向性遺伝子ベクターの開発を行った。既に予備実験で、経皮吸収促進薬として知られる *N-lauroylsarcosine* (LS) をカチオン性リポソームに加えることで肺指向性を付与できることを明らかにしている。各種調製条件を検討した結果、pDNA、PEI、LS 含有カチオン性リポソームを自己組織化させた安定なデバイスの構築に成功した。このナノボールをマウスへ静脈内投与した結果、肺における遺伝子発現は市販のベクターと比較して約 160 倍高かった。また、従来のベクターに比べ細胞毒性および血液毒性が大幅に軽減した。以上の結果から、我々が開発した新規肺指向性遺伝子ベクターは呼吸器感染症治療の DDS として期待できる。

また、ウイルス性肝炎などの肝臓疾患の治療には、肝臓に選択的に薬物を送達することのできる DDS が望まれている。そこで肝指向性遺伝子ベクターの開発を試みた。様々な被膜成分の探索を行った結果、グリチルリチンを見出した。グリチルリチンは肝保護作用のある医薬品として臨床使用され、肝細胞に特異的な結合で取り込まれることが知られている。最適化した混合比で pDNA、PEI、グリチルリチン(GL) を静電的に自己組織化させることでナノサイズの pDNA/PEI/GL 複合体の構築に成功した。In vitro において、GL 複合体は細胞障害性を示さず、pDNA/PEI 複合体に匹敵する高い遺伝子発現を示した。さらに、GL 複合体は細胞障害性や赤血球凝集を示さなかった。GL 複合体をマウスに静脈内投与した結果、PEI 複合体と比較して肝臓で有意に高い遺伝子発現を示した。さらにインスリン発現 pDNA (pCMV-Ins) を用いた GL 複合体をマウスに尾静脈内投与した結果、血糖値の低下が認められた。以上の結果より、GL を静電的に自己組織化することによって、安全かつ効果的な肝臓指向性遺伝子ベクターの開発に成功した。

さらに、pDNA と polyethylenimine (PEI) からなるカチオン性複合体(pDNA/PEI:PEI 複合体)と葉酸(FA)を静電的に自己組織化させた

新規遺伝子ベクター(pDNA/PEI/FA:FA 複合体)の構築を試みた。各成分の混合比を最適化することで、ナノサイズの安定な FA 複合体を構築することに成功した。FA 複合体は細胞障害性を示さず、PEI 複合体に匹敵する高い遺伝子発現効果を示した。また、in vivo においても赤血球凝集を示さず、高い安全性が確認できた。さらに、FA 複合体をマウスに尾静脈内投与した結果、PEI 複合体と比較して肝臓、脾臓、肺で有意に高い遺伝子発現を示した。したがって、FA を被膜することで、安全で効果的な遺伝子ベクターの開発に成功した。癌細胞には葉酸受容体が過剰に発現していることが報告されているため、FA 被膜型の遺伝子ベクターは癌選択的デリバリーが期待できる。

以上のように、我々は安全性を劇的に向上させながら、高い細胞内取り込みを示すナノデバイスの開発に成功した。構成するアニオン性高分子の種類により様々な臓器指向性や癌指向性を付与できることを見出した。これらの製剤は、安全性の高い成分を用い、無菌的調製がかのうなことから、トランスレショナルリサーチへも応用可能である。これらのナノデバイスは明確な特徴を持ち、医薬品の種類や治療目的別に使い分けができる。また、各ナノデバイスにおける最適の調製技術を整理することができた。

#### 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 9 件)

1. Cherif MS, Shuaibu MN, Kurosaki T, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, Tsuboi T, Sasaki H, Hirayama K.: Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. *Vaccine*. 29(48): 9038-9050 (2011) 査読有
2. Kurosaki T, Yamashita Y, Aki K, Harasawa H, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Secure and effective gene vector of polyamidoamine dendrimer pharmaceutically modified with anionic polymer. *J Pharm Sci*. 100(11): 4855-4863 (2011) 査読有
3. Kurosaki T, Morishita T, Kodama Y, Sato K, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Hamamoto T, Sasaki H, Kitahara T: Nanoparticles electrostatically coated with folic acid for effective gene therapy. *Mol Pharm*. 8(3): 913-919 (2011) 査読有
4. Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida

- K, Yamamoto K, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Chondroitin sulfate capsule system for efficient and secure gene delivery. *J Pharm Pharm Sci.* 13(3): 351-361 (2010) 査読有
5. Kurosaki T, Kitahara T, Kawakami S, Higuchi Y, Yamaguchi A, Nakagawa H, Kodama Y, Hamamoto T, Hashida M, Sasaki H: Gamma-polyglutamic acid-coated vectors for effective and safe gene therapy. *J Control Release.* 142(3): 404-410 (2010) 査読有
6. Kurosaki T, Kitahara T, Kawakami S, Nishida K, Nakamura J, Teshima M, Nakagawa H, Kodama Y, To H, Sasaki H: The development of a gene vector electrostatically assembled with a polysaccharide capsule. *Biomaterials.* 30(26): 4427-4434 (2009) 査読有
7. Yoshioka T, Yoshida S, Kurosaki T, Teshima M, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M, To H, Kitahara T, Sasaki H: Cationic liposomes-mediated plasmid DNA delivery in murine hepatitis induced by carbon tetrachloride. *J Liposome Res.* 19(2): 141-147 (2009) 査読有
8. Kurosaki T, Kishikawa R, Matsumoto M, Kodama Y, Hamamoto T, To H, Niidome T, Takayama K, Kitahara T, Sasaki H: Pulmonary gene delivery of hybrid vector, lipopolyplex containing N-lauroylsarcosine, via the systemic route. *J Control Release.* 136(3): 213-219 (2009) 査読有
9. Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Niidome T, Kodama Y, Nakagawa H, To H, Sasaki H: Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials.* 30(14): 2846-2853 (2009) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 川鍋早紀、黒崎友亮、兒玉幸修、北原隆志、佐々木均：グリチルリチン被膜型肝指向性遺伝子ベクターの開発、第 28 回日本薬学会九州支部大会、福岡、2011 年 12 月 10 日
2. 今村政信、黒崎友亮、兒玉幸修、北原隆志、佐々木均：三重複合体による新規遺伝子ベクターの開発：コンドロイチン硫酸被膜型デンドリプレックス、第 27 回日

- 本DDS学会、東京、2011 年 6 月 9 日
3. 黒崎友亮、川上茂、橋田充、佐々木均：三重構造を有した生体分解型遺伝子ベクターの構築、第 27 回日本DDS学会、東京、2011 年 6 月 9 日
4. 黒崎友亮、川上茂、橋田充、佐々木均：静電的相互作用を利用した葉酸修飾型遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 26 年会、東京、2011 年 5 月 29 日
5. 山下祐未、黒崎友亮、森下圭美、兒玉幸修、北原隆志、佐々木均：Dendrimerを用いた三次元型遺伝子ベクターの開発、第 27 回日本薬学会九州支部大会、長崎、2010 年 12 月 11 日
6. 黒崎友亮、北原隆志、兒玉幸修、藤秀人、濱本知之、佐々木均： $\gamma$ -Polyglutamic acid 被膜型遺伝子ベクターの開発、第 26 回日本DDS学会、大阪、2010 年 6 月 17 日
7. 黒崎友亮、北原隆志、兒玉幸修、西田孝洋、麓伸太郎、佐々木均：脾臓標的化遺伝子ベクターの開発とDNAワクチンベクターへの応用、日本薬剤学会第 25 年会、徳島、2010 年 5 月 13 日
8. Masato Nakai, Tomoaki Kurosaki, Yukinobu Kodama, Takashi Kitahara, Hitoshi Sasaki: COMPLEX OF PLASMID DNA WITH N-LAUROYLSARCOSINE LIPOSOMES THROUGH CALCIUM BRIDGING FOR EFFECTIVE AND SECURE GENE DELIVERY、Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009、福岡、2009 年 10 月 17 日
9. 黒崎友亮、高山幸三、北原隆志、麓伸太郎、西田孝洋、濱本知之、佐々木均：肺指向性を持つ全身投与型遺伝子ベクターの開発と解析、第 25 回日本DDS学会、東京、2009 年 7 月 3 日
10. 佐々木均、黒崎友亮、濱本知之、麓伸太郎、西田孝洋、北原隆志： $\gamma$ -Polyglutamic acid被膜型遺伝子ベクターの開発とメカニズムの解明、日本薬剤学会第 24 年会、静岡、2009 年 5 月 23 日
11. 黒崎友亮、北原隆志、麓伸太郎、西田孝洋、中村純三、藤秀人、佐々木均：負電荷高分子を用いた被膜型遺伝子導入ベクターの開発、日本薬剤学会第 24 年会、静岡、2009 年 5 月 21 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規ナノボールの創製  
 発明者：佐々木均、黒崎友亮、北原隆志、他  
 権利者：国立大学法人長崎大学  
 種類：特許

番号：特願 2010-43186  
出願年月日：2010年2月26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  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 佐々木均  
(Sasaki Hitoshi)  
研究者番号：00170689

(2)研究分担者 藤秀人  
(To Hideto)  
研究者番号：90346809

研究分担者 川上茂  
(Kawakami Shigeru)  
研究者番号：20322307

研究分担者 黒崎友亮  
(Kurosaki Tomoaki)  
研究者番号：00582016

研究分担者 北原隆志  
(Kitahara Takashi)  
研究者番号：30380934

研究分担者 兒玉幸修  
(Kodama Yukinobu)  
研究者番号：50448510

(3)連携研究者  
なし