高分子材料に立脚した 核酸医薬デリバリーシステムの開発

第7回 日本 DDS 学会奨励賞によせて

Development of Nucleic Acid Delivery System Based on Polymeric Materials

Kanjiro Miyata*

1. はじめに

第31回日本DDS学会学術集会にて、第7回日本DDS学会奨励賞を受賞致しました。授賞式では今井浩三理事長(当時)より賞状・賞牌を拝受し(写真1)、続いて受賞講演の機会が与えられ(写真2)、大変光栄に感じました。今回の受賞により、筆者がこれまでに行ってきた研究が認められたことを嬉しく思う一方で、「奨励」という言葉が示すとおり、今後のさらなる発展が期待されていることを考えると、身が引き締まる思いを感じています。

筆者は、学部4年生時より、一貫して合成高分子を基盤とする核酸デリバリーシステムの開発を行って参りました。学生時代は、遺伝子(プラスミドDNA、以下pDNA)デリバリーのためのポリイオンコンプレックス(以下PIC)ミセルの開発に取り組みました。特に、遺伝子内包PICミセルに“細胞内還元環境”や“エンドソーム内酸性環境”に応答する機能を賦与するために、インテ

リジェント高分子の設計に注力しました。その後、工学系研究科での特任助教を経て、医学系研究科に助教として異動してからは、pDNAよりもはるかに小さい核酸である small interfering RNA(以下 siRNA)デリバリーのための DDS 開発に取り組みました。これまでに、標的指向性を有するリガンド搭載 PIC ミセル、エンドソーム脱出機能を有する高分子とリン酸カルシウム(以下 CaP)ないしシリカ粒子から構築される有機-無機ハイブリッドミセル、インテリジェント高分子-siRNA コンジュゲート、さらには1分子の siRNA とブロック共重合体より構築されるユニットポリイオンコンプレックス(ユニット PIC)

写真1 授賞式(左:筆者、右:今井浩三理事長(当時))

* Center for Disease Biology and Integrative Medicine,
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター

写真2 受賞講演(筆者)

を創製してきました^{1,2)}。本稿では、今回の受賞につながった上記研究の一部を紹介させていただきます。

2. 研究の背景

pDNA や siRNA に代表される核酸は、その塩基配列に基づいてあらゆる遺伝子発現の調節を潜在的に可能とすることから、一種の万能薬としての作用が期待されている。しかしながら核酸自体は、負に帯電した高分子であることから細胞膜を透過できず、また酵素により容易に分解されてしまい、目的地である細胞質や核までの到達効率が非常に低く十分な活性を発揮できない。この低いバイオアベイラビリティを改善するために、核酸 DDS の開発が世界中で行われてきた。

siRNA の DDS に必要とされる主な機能として、局所投与の場合、①標的とする細胞に侵入する機能、②エンドサイトーシスにより細胞内に侵入した後、エンドソーム(もしくはリソソーム)から細胞質へと移行する機能、③細胞質にて核酸を放出する機能があげられる。全身投与の場合、①～③に加えて、④血流中を安定に循環する機能、⑤標的とする組織へと移行(血管外へと漏出)する機能があげられる。さらに安全性の面からは、⑥ DDS 自体が免疫原性や蓄積毒性などを示さず、速やかに代謝ないし排泄されることが求められ

る。

上述の機能を部分的に満たす代表的な DDS として、リガンド分子や機能性高分子と siRNA のコンジュゲート体、カチオン性脂質や高分子の自己組織化を利用した siRNA 封入会合体、siRNA を担持した金やシリカなどの無機ナノ粒子、さらにはそれらを組み合わせた方法論が検討されている。臨床試験における開発状況を見ると、脂質ナノ粒子(以下 LNP)が最も広く検討されているように思われる。これは、最適化された脂質分子により構成される LNP が、培養細胞や肝臓に対して優れた RNA 干渉(以下 RNAi)効果を惹起するためと推察される。一方、LNP の課題としては、調製に煩雑な手順を要することや、肝臓以外の標的組織に対する選択性の低さなどがあげられる。このような背景を鑑み、筆者らの研究グループは、構造を精密に制御した高分子材料を基盤とする DDS により、既存のシステムの抱えた問題を克服すべく、研究を進めてきた。

3. 標的指向性を有するリガンド搭載 PIC ミセル

上述のように、全身投与を介して腫瘍組織へと siRNA をデリバリーするためには、血流中を安定に循環し、腫瘍組織へと集積する機能が DDS に求められる。腫瘍集積性に関しては、10～100nm 径のナノ粒子が透過性の亢進した血管壁を通じて固形がん集まる作用、いわゆる Enhanced Permeability and Retention(EPR)効果が知られている。よって、安定かつ数十 nm 径の DDS を設計すればよいと考えられるが、核酸 DDS の場合、さらにがん細胞の中にまで侵入する機能が求められる。筆者らはこの機能を満たすために、siRNA 封入 PIC ミセルの表層に、がん細胞および腫瘍血管内皮細胞表面に過剰発現した $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン受容体と特異的に結合する環状 RGD ペプチド(以下 cRGD)を導入した³⁾。すなわち、cRGD リガンドが導入されたポリエチレングリコール(PEG)-カチオン性ポリアミノ酸ブロック共重合体を合成し、これと siRNA の間で PIC ミセルを調製した(図 1a)。得られた cRGD 搭載 PIC ミセルは、粒径約 45nm

であることが動的光散乱測定により確認され(図1b)、インテグリン受容体を過剰発現することで知られる培養子宮頸がん細胞(以下 HeLa)への迅速かつ効率のよい siRNA デリバリーを可能とした。さらに、cRGD 搭載 PIC ミセルは、リガンドを導入していないものと比較して、皮下移植 HeLa モデルに対して効率のよい腫瘍集積性および RNAi 活性を示した。結果として、血管内皮増殖因子(VEGF)とその2型受容体(VEGFR2)に対する2種類の siRNA (siVEGF、siVEGFR2) デリバリーを通じて、皮下移植 HeLa モデルに対する有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した(図1c)³⁾。

この cRGD 搭載 PIC ミセルを用いた実験より得られた知見として、以下のことを特に強調しておきたい。培養がん細胞や腫瘍組織に対する PIC ミセルの RNAi 活性は cRGD リガンド依存的で

あり、リガンドなしのミセルでは有意な効果は見られなかった³⁾。また、cRGD が導入されたブロック共重合体と cRGD が導入されていないブロック共重合体をモル比 1:1 で混合して PIC ミセルを調製したところ、cRGD が導入されたブロック共重合体のみから調製された PIC ミセルと比べ、RNAi 活性は有意に低下した³⁾。よって、優れた RNAi 活性を得るためには、ある一定以上の cRGD リガンド密度が必要であることが示唆された。また、cRGD 搭載 PIC ミセルの腫瘍集積性は、PIC ミセルの安定性(もしくは血中滞留性)の増加を通じて、大幅に改善されることも明らかになっている⁴⁾。さらに、同様の cRGD 搭載 PIC ミセルを用いることで、皮下移植 HeLa モデルのみならず、皮下移植肺がん(A549)モデルへの polo-like kinase 1 に対する siRNA (siPLK1) デリバリーにおいても有意な抗腫瘍効果が得られている⁵⁾。

図1 腫瘍組織のアクティブターゲティング向けリガンド搭載 PIC ミセルの構築

(a) 環状 RGD ペプチド導入ブロック共重合体と siRNA により形成されるリガンド搭載 PIC ミセル

(b) 動的光散乱測定より得られたリガンド搭載 PIC ミセルの粒径分布

(c) 皮下移植 HeLa モデルに対する siRNA 内包 PIC ミセルの抗腫瘍効果

4. エンドソーム脱出機能を搭載した ハイブリッドミセル

リガンド分子を用いたデリバリー戦略は、その優れた標的特異性が魅力である一方で、リガンド分子が安価でない場合や、標的とする細胞が特徴的な受容体を有していない場合などは適用が難しくなる。そこで筆者らは、リガンド分子を適用しない系として、エンドソーム脱出機能に特化した核酸 DDS の開発にも取り組んできた。

エンドソーム脱出機能を示す高分子としては、アミノエチレンユニット(-NHCH₂CH₂-)の繰り返しであるポリエチレンイミン(PEI)が最も有名であり、そのメカニズムとしては、エンドソーム酸性環境におけるアミンのプロトン化とそれにと

もなう浸透圧の上昇や膜傷害が提唱されている。一方、PEI のプロトン化率の変化($\Delta\alpha$ 、ここでは細胞外 pH7.4 と後期エンドソーム内 pH5.5 の間でのプロトン化率の変化として定義)は実際にはそれほど大きくないことも知られている($\Delta\alpha \approx 0.1$)。そこで、より大きな $\Delta\alpha$ を有する高分子を設計すべくアミノエチレンユニットの繰り返し数に注目したところ、繰り返し数と $\Delta\alpha$ の間には偶奇性があり、かつ徐々に PEI の値に収束していくことを見出した(図 2a)⁶⁾。つまり、アミノエチレンユニットの繰り返し数が偶数かつ小さいとき、 $\Delta\alpha$ は大きくなることがわかった。この知見を生かすために、アミノエチレンユニットの繰り返し数が2となるようにポリアスパルタミド誘導体(以下 PAsp(DET))を合成したとこ

図2 エンドソーム脱出機能を有する CaP ミセルの構築

- (a) アミノエチレンユニットの繰り返し数とプロトン化率変化($\Delta\alpha$)の関係
- (b) PAsp(DET)の構造式
- (c) PAsp(DET-ACO)の構造式
- (d) PEG-PAsp(DET-ACO)、siRNA、カルシウムイオン、およびリン酸イオンにより形成される CaP ミセル

図3 ユニット PIC を用いた核酸 DDS の構築

(a) siRNA と PEG-PLys1 分子ずつにより形成されるユニット PIC と金ナノ粒子の間で形成される unit PIC-AuN

(b) unit PIC-AuN の透過型電子顕微鏡像

(c) ルシフェラーゼ (Luc) 発現 HeLa の皮下移植組織における RNAi 活性 (ルシフェラーゼ遺伝子に対する遺伝子発現抑制効果)

ろ、予想通り PEI を大きく上回る $\Delta\alpha$ が得られた (図 2b)⁷⁾。実際に、PAsp(DET) を用いて pDNA との間で PIC を調製し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内動態を観察したところ、蛍光標識核酸がエンドソームから細胞質へと移行する様子が観察された^{7,8)}。

PAsp(DET) は、pDNA との間で安定な PIC ミセルを形成する一方で、分子あたりの負電荷数が 1/100 以下である siRNA との間では安定な PIC ミセルを形成しなかった。そこで、PAsp(DET) を用いて安定な PIC ミセルを得るべく、さまざまな分子設計を検討してきた。具体的には、疎水性相互作用によりミセルコアを安定化するための PAsp(DET) への疎水性官能基の導入^{9,10)}、見かけの負電荷数を増やすためのポリアニオン-siRNA

コンジュゲートの合成^{11,12)}、PIC 表層のシリカ被覆¹³⁾、CaP ミセルへの展開^{14~17)}、などである。ここでは、腫瘍モデルに対して有意な抗腫瘍効果を示した CaP ミセルを以下に紹介する。

CaP ミセルへと PEG-PAsp(DET) を組み込むために、PAsp(DET) にマレイン酸アミド結合を介してカルボン酸 (例えばアコニット酸) を導入した (PAsp(DET-ACO)、図 2c)¹⁸⁾。これにより、得られる PEG-PAsp(DET-ACO) はアニオン性高分子となり、CaP 粒子への吸着が可能になる。この高分子設計で重要な点は、マレイン酸アミドがエンドソーム酸性環境で切断されることである。よって、PEG-PAsp(DET-ACO) は、細胞外では CaP コアを覆うことで分散安定性 (もしくは生体適合性) の向上に寄与する一方で (図 2d)、

エンドソーム内に入ると元の PAsp (DET) へと変換され、CaP ミセルのエンドソーム脱出を促進するものと期待される。実際に、培養細胞を用いた細胞内動態試験において、迅速なエンドソーム脱出とそれにとまなう強力な RNAi 活性が観察された¹⁴⁾。そこで、siVEGF を CaP ミセルへと封入し、皮下移植膀胱がん (BxPC3) モデルに対して適用したところ、有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した¹⁵⁾。さらに、ルシフェラーゼを組み込んだ自然発生膀胱がんへも、有意な siRNA デリバリーおよび RNAi 活性を誘導できることが明らかになった¹⁶⁾。

5. ユニット PIC の核酸 DDS への展開

最後に、PIC ミセルや CaP ミセルに続く新たな核酸 DDS として、構造 (会合数) が厳密に規定されたユニット PIC を簡単に紹介する。図 1a に示すように、カチオン性ブロック共重合体と siRNA の多分子会合を通じて PIC ミセルが形成されるが、最近の研究により、カチオン性ポリアミノ酸部位の構造と鎖長を調節することで、多分子会合 (ミセル形成) を抑制できることが明らかになった¹⁹⁾。すなわち、カチオン性ブロック共重合体と siRNA の間で最小会合数の PIC (ユニッ

ト PIC と命名) を選択的に創出できることを見出した。具体的には、siRNA1 分子あたりの負電荷数が 40 であることから、分子量 2,000 の PEG と正電荷数が約 40 となるポリリシンを含むブロック共重合体 (以下 PEG-PLys) を用いることで、siRNA と PEG-PLys の会合数が 1:1 となるユニット PIC が調製された。このユニット PIC を金ナノ粒子 (以下 AuN) の表層に担持したところ、非常に粒子径分布の狭い約 38nm の unit PIC-AuN が構築された (図 3a,b)¹⁹⁾。この unit PIC-AuN は、皮下移植 HeLa 組織への効率のよい集積、さらには腫瘍組織での有意な RNAi 活性を示すことが確認されている (図 3c)。

6. おわりに

本稿では、筆者らのグループが開発してきた siRNA デリバリーシステムを紹介させていただいた。siRNA の発見当初からは少し時間を要したかもしれないが、核酸 DDS の技術は着実に進歩しているように感じられる。その一方で、核酸治療を実現するためには、効果の高い核酸医薬を DDS へ搭載することも必須と思われる。筆者らは、現在、*in vivo* 実験で有効性を示した DDS と有望な核酸医薬シーズのカップリングを推進し

写真 3 東京大学大学院工学系 / 医学系研究科・片岡研究室 siRNA グループ

ており、この取り組みを通じて本邦発の核酸治療が実現されるのではないかと期待している。

謝辞

ここで紹介させていただいた研究は、東京大学大学院工学系/医学系研究科・片岡研究室で行われたものです。筆者がこれまでに充実した研究生生活を送ることができたのは、素晴らしい縁に恵まれたためであると感謝しております。特に、指導教員であり、現在の主任教授でもある片岡一則先生には、学部4年生時より15年にわたりご指導いただいておりますが、その力強い研究スタイルには研究者

のお手本として日々勉強させていただいております。感謝してもしきれませんが、この場を借りて改めて御礼申し上げます。また、本稿で紹介させていただいた研究成果の大部分は、片岡研究室 siRNA グループメンバーの日々の努力の賜物です(写真3)。過去および現在の siRNA グループメンバーに心より御礼申し上げます。また、研究室での日々の生活でお世話になっている片岡研究室スタッフおよび学生の皆様にも御礼申し上げます。最後に、好き勝手に行動している筆者をいつも暖かく見守ってくれている家族に心より感謝します。

文献

- 1) K. Miyata, R. J. Christie, K. Kataoka, Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *React. Funct. Polym.* 71, 227-234 (2011).
- 2) K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2562-2574 (2012).
- 3) R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6, 5174-5189 (2012).
- 4) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35, 7887-7895 (2014).
- 5) H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* 4, 50-60 (2014).
- 6) K. Miyata, R. J. Christie, T. Suma, H. Takemoto, H. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Fine-tuning of repeating aminoethylene units in poly(aspartamide) side chains for enhanced siRNA delivery, in *Tailored Polymer Architectures for Pharmaceutical and Biomedical Applications* (ACS Symposium Series, Vol. 1135), Eds., C. Scholz, J. Kressler, American Chemical Society, Washington, D.C., USA, 2013, Chapter 11, 189-196.
- 7) K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16287-16294 (2008).
- 8) H. Uchida, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, T. Suma, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Odd-even effect of repeating aminoethylene units in the side chain of N-substituted polyaspartamides on gene transfection profiles. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 15524-15532 (2011).
- 9) H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, 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* 145, 141-148 (2010).
- 10) H. -J. Kim, M. Oba, F. Pittella, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J. Drug Target.* 20, 33-42 (2012).
- 11) H. Takemoto, A. Ishii, K. Miyata, M. Nakanishi, M. Oba, T. Ishii, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system. *Biomaterials* 31, 8097-8105 (2010).
- 12) H. Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 6218-6221 (2013).
- 13) T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6, 6693-6705 (2012).
- 14) F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, 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* 32, 3106–3114 (2011).
- 15) F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161, 868–874 (2012).
 - 16) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18–24 (2014).
 - 17) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35, 1211–1215 (2014).
 - 18) Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 5163–5166 (2008).
 - 19) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8, 8979–8991 (2014).