

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：高分子ナノテクノロジーを基盤とした革新的核酸医薬シーズ送達システムの創出
3. 研究開発代表者：国立大学法人 東京工業大学 資源化学研究所 教授 西山 伸宏
4. 研究開発の成果

本研究では、siRNA 等の核酸医薬シーズの固形がんへの送達システムとして、オリゴ核酸 1 分子とブロック共重合体により形成されるユニットポリイオンコンプレックス(ユニット PIC)の高機能化に関する研究開発を実施している。ユニット PIC の機能と安全性を高めるための要素技術として、(a) ユニット PIC の血中安定性向上のためのカチオン性セグメントの設計、(b) 標的細胞による取り込み促進のためのリガンド分子導入ユニット PIC の構築、(c) 細胞質内移行性促進のための機能性ポリマーの設計とユニット PIC への導入、(d) 核酸医薬の効率的な機能発現のための環境応答性リンカーの設計、(e)高い安全性を実現するための生体適合性ポリマーの設計に関する研究開発を行い、必要な機能をユニット PIC に統合することによって、核酸医薬シーズの実用化促進のための革新的基盤技術を構築することを目指している。さらに、これらの研究開発におけるマイルストーンの着実な達成に向けて、(f)プロジェクトの総合的推進として、必要に応じて計画の見直しを行い及び合理化を図りながら、研究開発代表者が進捗管理を頻繁に行うことにより、効率的な研究推進を図っている。

研究開発項目 (a) では、前年度に有用性を確認したブロック共重合体 A の合成法を最適化し、がん細胞に対して有効性を示すマイクロ RNA(miRNA)を搭載するユニット PIC の調製条件の最適化を行った。マウスを用いた実験では、miRNA 搭載ユニット PIC は優れた血中滞留性(血中半減期 160 分)を示した。この結果に基づき、miRNA による抗腫瘍効果の評価に向けて、ブロック共重合体 A の大量合成を行った。以上のように、本項目では、ユニット PIC を「国内有望核酸医薬シーズへの展開」というマイルストーンを 100%達成することができた。

研究開発項目 (b) では、ポリアミノ酸 B の側鎖にペプチド C を導入したリガンド分子を構築し、siRNA とのコンジュゲート化を行った。リガンド-siRNA コンジュゲートは、ブロック共重合体 A との混合によってユニット PIC を形成し、10%血清中で優れた安定性を示した。一方、がん細胞に特異的でありかつ汎用性の高い新規リガンド分子としてポリアミノ酸 C の側鎖に化合物 D を導入したリガンド分子を構築した。化合物 D を導入した新規リガンド分子は、がん細胞に選択的かつ効率的に取り込まれ、エンドソーム/リソソームに移行することが確認された。腫瘍内投与において、新規リガンド分子は(類似の化学構造を有するが標的への親和性が低い)コントロールのリガンド分子と比較してより長期にわたり腫瘍内に滞留することが確認された。以上のように、本項目では、「新規リガンド分子の in vitro 機能実証」と「新規リガンド分子の in vivo 機能実証」というマイルストーンを 100%達成することができた。

研究開発項目 (c) では、低 pH 環境に応答して荷電状態が変化する機能性ポリマー E に関して、ヒト肺がん由来 A549 細胞による取り込みに関する実験を行い、pH7.4 では細胞への取り込みは非常に低い、pH が 6.5、5.5 に下がることによってがん細胞による取り込みが増大し、細胞全体に分布することが確認された。また、機能性ポリマー E を量子ドットに導入し、マウスへの静脈内投与後の血中滞留性を確認した。さらに、Click 反応を利用した機能性ポリマー E と siRNA のコンジュゲート体の合成を行った。以上のように、本項目では、「機能性ポリマー E のがん細胞に対する機能の実証」というマイルストーンを 100%達成することができた。一方、低 pH 環境に応答して溶解性が変化する機能性ポリマー F に関しては、前駆体であるポリマー G を合成し、溶解性に関する特性から化学構造を最適化した。このポリマー G に化合物 H を導入することによって機能性ポリマー F を合成し、低 pH

環境に応答した溶解性の観点からポリマー構造の最適化を行った。以上のように、本項目では、「機能性ポリマーFの前駆体の合成」、「機能性ポリマーFのpH応答機能の最適化」というマイルストーンを100%達成することができた。

研究開発項目(d)では、リンカー結合Iを有するPEG-siRNAコンジュゲートを合成し、HeLa-Luc細胞へのsiLucの導入によるノックダウン効率からリンカーの有効性を確認し、siRNAの化学修飾部位の最適化を行った。また、リンカーに関して、siRNAのコンジュゲートの作製に用いられる他のリンカー結合との比較を行い、リンカー結合Iの細胞内環境に特異的な切断反応を明らかにした。以上のように、本項目では、「リンカーの細胞内環境に特異的な切断反応の確認」というマイルストーンを100%達成することができた。次年度のマイルストーンである「リンカー導入PEG-siRNAコンジュゲートの機能の実証」も一部達成されている。

研究開発項目(e)では、ポリマーの安全性を評価するためのマウスの実験系を構築し、安全性の高いポリマーに求められる機能特性を明らかにした。また、ポリマーの安全性に関して、マウスの生体反応に関わる新たな評価系を構築した。これらの結果より、生体安全性に優れたポリマーの機能特性の絞り込みを行った。一方、上記の知見をもとに、生体適合性ポリマーjを合成し、その機能を高速液体クロマトグラフィーを用いた実験系により確認した。以上のように、本項目では、「ポリマーの安全性を評価するためのマウス実験系の構築とポリマーに求められる機能特性の解明」、「新規生体適合性ポリマーの合成と機能の確認」というマイルストーンを100%達成することができた。

研究開発項目(f)では、項目(a)–(e)の研究における目標の着実な達成に向けて、グループ内で得られた結果について討議し、研究開発の効率化を進めることによって、すべての項目においてマイルストーンを達成することができた。