

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative
Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of innovative nucleic acids delivery systems based on
polymer nanotechnology

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京工業大学 教授 西山伸宏
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Institute of Technology, Professor, Nobuhiro Nishiyama

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

siRNA 等の核酸医薬は、あらゆる疾患に対して遺伝子配列から容易に設計でき、高い特異性を有するために副作用が少なく、さらに化学合成によって製造が容易であることから次世代の医薬品として大きな可能性を秘めているが、これらを疾患治療へと展開するためには、核酸分子を標的組織に到達させ、かつ細胞内部へと送達することのできるデリバリーシステムの開発が必要不可欠である。これまでに、カチオン性脂質やカチオン性高分子を利用したキャリアが開発され、デリバリーが比較的容易な肝臓を標的とする一部のシステムは臨床試験へと進んでいるが、実用化にはまだ遠く、がん等の他の臓器・組織を標的にした場合には技術的課題が多く存在している。このような背景において、研究代表者らは実用化が可能な核酸医薬シーズ送達システムとは、必要な機能をなるべくシンプルな構造の中に創り込んだシステムであると考え、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 PIC 型キャリアの開発を行ってきた。そこで本研究課題では、ユニット PIC 型キャリアに、血中でのさらなる安定化、標的細胞による取り込みおよび細胞質内移行の促進、臨床応用に向けた安全性向上のための分子設計 (要素技術の開発) を行い、細胞・動物実験による機能検証を通じて、それぞれの要素技術の有効性の実証とこれらを統合したユニット PIC 型キャリアの構造最

適化を行うことを目指している。

平成 28 年度は、血中安定性の向上を目的として前年度までに最適化を進めてきたカチオン性セグメントを有するブロック共重合体から構築されるユニット PIC 型キャリアを疾患モデルの治療へと展開する研究を実施した。これまでに miRNA を搭載したユニット PIC の乳がん細胞の固形がんモデルに対する有効性を確認しており、現在、臨床を見据えた疾患モデルでの有効性を検証中である。

標的細胞による取り込みを高めるための設計としては、がん細胞で過剰発現するトランスポーターを標的とする新規リガンド分子を開発し、トランスポーター密度を認識することによって膵臓がん細胞に特異的に結合することを明らかにした。また、新規リガンド分子は、膵臓がんの皮下腫瘍モデルへの直接投与において長期にわたりがん組織内に滞留することを確認し、固形がんを標的化するためのリガンド分子としての可能性を示した。

キャリアの細胞質内移行を促進するための設計としては、がん組織内や細胞のエンドソーム内の酸性環境に応答して電荷的中性からカチオン性および親水性から疎水性に性質が変化する新規 pH 応答性ポリマーの開発を行っている。前者の電荷的中性からカチオン性に変化するポリマーに関しては、低 pH 環境に応答したがん細胞への細胞内移行と量子ドット表面に導入した際の PEG よりも優れた血中滞留性を確認した。後者に関しては、pH が 7.4 から 5.5 に変化することによってポリマーが不溶化する pH 応答性基の導入率を決定し、低 pH 環境に応答した細胞内取り込み量の増大を確認した。また、核酸分子を効率的に機能発現させるための設計として、細胞質内環境においてポリマーを選択的に脱離させるための新規リンカー分子を開発した。

臨床応用に向けた安全性の向上のためのキャリア設計としては、細胞内環境で選択的に分解する新規ポリマーの開発を行った。新規ポリマーは、従来技術と比較して、同等の機能を示す一方で、問題となっていた生体応答を回避しうることが示唆されている。この新規ポリマーに関しては、機能性タンパク質の化学修飾における有用性を検討中である。

以上のように、本研究では、平成 28 年度において、核酸送達システムの有効性と安全性を向上させるための要素技術の開発を行い、それぞれの機能を明らかにすることができた。これらの要素技術を組み込んだユニット PIC 型キャリアの開発に関しても着実に研究が進捗している。

英文

Nucleic acid medicines such as siRNA can be easily designed from genetic sequences for all diseases, have high specificity, and are easy to be manufactured by chemical synthesis, so that they have a great potential as a next generation pharmaceutical. However, to apply them for disease treatment, it is essential to develop a delivery system that allows nucleic acid molecules to reach target tissues and deliver them to the inside of cells. Various carriers utilizing cationic lipids and cationic polymers have been developed so far, and some systems targeting the liver, which are relatively easy to deliver, are progressing to clinical trials, but there are many technical problems when targeting other tissues such as cancer. Under these circumstances, we considered that the practical delivery system for nucleic acid should be created in the structure as simple as possible, so we have developed unit polyion complex (uPIC) type carriers consisting of single molecule of oligonucleic acid and PEG-block-cationomers. In this research project, we aim to develop elemental technologies for improving the stability of uPIC in the circulation, facilitating cellular uptake and cytoplasmic deliver, and ensuring the safety for clinical use, and then

integrate these technologies into the uPIC system. We will optimize the structure of uPIC type carriers through function verification by in vitro and in vivo experiments.

In 2016, we performed the therapeutic application of unit PIC type carriers constructed from block copolymers having cationic segments, that have been optimized for the purpose of improving blood stability in the previous year. We have confirmed the effectiveness of unit PIC carrying miRNA on the solid tumor model of breast cancer cells and are currently under investigation for the treatment of more clinically related disease models.

As a design for improving cellular uptake by targeted cells, we developed a novel ligand molecule that targets the transporters overexpressed in cancer cells, and demonstrated that it specifically bound to pancreatic cancer cells by recognizing the transporter density. In addition, we confirmed that the ligand molecule was retained in cancer tissues for a long time following direct administration to the subcutaneous tumor model of pancreatic cancer. Thus, we proved the possibility as a ligand molecule for targeting solid tumors.

As a design for facilitating the intracellular translocation of uPIC, we designed new polymers that change their electric charges from neutral to cationic and their water-solubility from hydrophilic to hydrophobic in response to an acidic environment within the cancer tissue or endosomes of the cell. With regard to the polymers that their electric charges from neutral to cationic, we demonstrated that the polymers showed intracellular translocation in response to low pH environment. Also, we confirmed that the polymer-modified quantum dots showed superior blood circulating property compared with PEG-modified ones. Regarding the latter, we optimized substitution ratio of the pH-responsive group in the polymers and the obtained polymers showed the solubility changes from hydrophilic to hydrophobic by changing the pH from 7.4 to 5.5. We confirmed that the obtained polymers showed an increase in cellular uptake in response to the low pH environment. In addition, as a design for achieving efficient expression of nucleic acid molecules, we developed a novel linker molecule which can be cleaved specifically in the cytoplasmic environment.

Furthermore, as a career design for ensuring the safety for clinical application, we have developed novel polymers that selectively degrades in the intracellular environment. We demonstrated that novel polymers avoided the biological responses that has been a problem in conventional polymers, while exhibiting comparable functions. Regarding this novel polymer, we are now examining its usefulness in chemical modification of functional proteins.

As described above, in this project, in 2016, we developed elemental technologies to improve the effectiveness and safety of nucleic acid delivery system and clarified their functions. Research on the development of unit PIC type carriers integrated with these element technologies has steadily progressed.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Naito M, Azuma R, Takemoto H, Hori M, Yoshinaga N, Osawa S, Kamegawa R, Kim HJ, Ishii T, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K. Multilayered polyion complexes with dissolvable silica layer covered by controlling densities of cRGD-conjugated PEG chains for cancer-targeted siRNA delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2017, 印刷中
2. Huang CH, Takemoto H, Nomoto T, Tomoda K, Matsui M, Nishiyama N. Utility of the 2-nitrobenzenesulfonamide group as a chemical linker for enhanced extracellular stability and cytosolic cleavage in siRNA-conjugated polymer systems. *ChemMedChem*, 2017, 12 (1) 19-22.
3. Che Harun NF, Takemoto H, Nomoto T, Tomoda K, Matsui M, Nishiyama N. Artificial control of gene silencing activity based on siRNA conjugation with polymeric molecule having coil-globule transition behavior. *Bioconjugate Chem.*, 2016, 27 (9) 1961-1964.
4. Hayashi K, Chaya H, Fukushima S, Watanabe S, Takemoto H, Osada K, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K. Influence of RNA strand rigidity on polyion complex formation with block cationomers. *Macromol. Rapid Commun.*, 2016, 37 (6), 486-493.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高分子ミセル型ナノマシンが拓く未来医療, 招待講演, 西山伸宏, 第 63 回日本実験動物学会総会, 2016/5/19, 国内
2. Programmed siRNA release based on α -oxohydrazone chemistry for polyion complex-based siRNA delivery system, ポスター, Wang C, Takemoto H, Nishiyama N, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016/5/27, 国内
3. Development of thermoresponsive polymer-siRNA conjugates for controlled RNAi activity, 口頭, Che Harun NFB, Takemoto H, Nomoto T, Nishiyama N, 2016/5/26, 国内
4. 高分子ミセル型ナノ医薬品の開発-アカデミアからの取り組み-, 口頭, 西山伸宏, 第 32 回日本 DDS 学会学術大会, 2016/7/1, 国内
5. 高分子ナノテクノロジーを基盤とする革新的がん診断・治療システムの創出, 招待講演, 西山伸宏, 第 51 回天然物化学談話会, 2016/7/6, 国内
6. Development of siRNA-conjugated polymer with coil-globule transition behavior for an artificially controlled gene silencing activity, 口頭, Che Harun NFB, Takemoto H, Nomoto T, Tomoda K, Matsui M, Nishiyama N, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/16, 国内
7. A novel design of polyion complex (PIC) with the pyruvate-reactive function toward enhanced cytosolic release of siRNA, 口頭, Wang C, Takemoto H, Nomoto T, Tomoda K, Matsui M, Nishiyama N, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/15, 国内
8. 高分子ミセルにおける内核構造の安定性の差異がもたらす 腫瘍集積性に関する考察, ポスター, キム ジュンヒョン, 武元 宏 泰, 野本 貴大, 松井 誠, 友田 敬士郎, 西山 伸宏, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/15, 国内

9. がんへの薬剤の集積状態をレポートするナノメディシンの開発, ポスター, 孫 小行, 武元 宏泰, 野本 貴大, 友田 敬士郎, 松井 誠, 西山 伸宏, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/16, 国内
10. 高分子ナノテクノロジーを基盤とした革新的ナノ診断・治療システムの開発, 招待講演, 西山伸宏, 日本薬物動態学会 第 31 回年会, 2016/10/15, 国内
11. 精密合成高分子材料を基盤するがん診断・治療ナノマシンの創製, 招待講演, 西山伸宏, 科研費新学術領域「分子ロボティクス」公開シンポジウム, 2016/10/25, 国内
12. シロキサンネットワークにて形成される siRNA 内包有機-無機ハイブリッドナノ粒子の開発, ポスター, 武元宏泰, 宮田完二郎, 林光太朗, 持田祐希, 片岡一則, 西山伸宏, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内
13. がん細胞内にて特異的に切断される Linker を利用した siRNA 送達キャリアの開発, ポスター, 越後真梨那, 武元宏泰, 林光太朗, 宮田完二郎, 金澤秀子, 片岡一則, 西山伸宏, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2016, 2016/11/22, 国内
14. Novel glutamine-based polymeric ligand for transporter-mediated tumor targeting, ポスター, Yamada N, Honda Y, Takemoto H, Nomoto T, Matsui M, Tomoda K, Nishiyama N, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016), 2016/11/28, 国内
15. Development of supramolecular nanodevices for cancer diagnostics and therapy, 招待講演, Nishiyama N, The Korean Academy of Science and Technology (KAST) Symposium for Young Scientists in Drug Delivery: Redirecting the Research Field, 2016/12/8, 国外
16. 2-Nitrobenzensulfonamide groups as a chemical linker with enhanced extracellular stability and redox-sensitive cleavability for siRNA-conjugated polymer system, 口頭, Huang C-H, Takemoto H., Nomoto T, Tomoda K, Matsui M, Nishiyama N, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 2016/12/14, 国内
17. Development of smart polymers and nanodevices for innovative medicine, 招待講演, Nishiyama N, International Symposium on Materials for Chemistry and Engineering (IMCE2017), 2017/2/3, 国内
18. Development of polymer-based nanodevices for innovative medicine, 口頭, Nishiyama N, Snowbird Symposium for Dr. Kopecek, 2017/2/17, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ナノテクノロジーが拓く未来医療 -体内病院の実現を目指して-, 西山伸宏, 第 11 回 四大学連合文化講演会, 2016/10/28, 国内
2. DDS による核酸医薬の有効性向上・毒性低減に向けて, 西山伸宏, 第 2 回神奈川県ヘルスケア・ニューフロティア講座 次世代医療に向けた医理工学融合研究とその産業応用, 2016/12/13, 国内
3. DDS による核酸医薬の有効性向上・毒性低減に向けて, 西山伸宏, 第 2 回革新的バイオ研究開発シンポジウム, 2017/1/20, 国内

(4) 特許出願

公開希望の特許出願なし