

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」

平成 18 年度採択研究代表者

片岡 一則

(東京大学大学院工学系研究科 医学系研究科 教授)

「遺伝子治療実用化のための超分子ナノデバイス製造技術の創成」

## 1. 研究実施の概要

本研究では、遺伝子・核酸医薬の実用化を目指して、高度なベクター機能の創り込みを行った超分子ナノデバイスを構築する。具体的には、生体内の異物認識機構を巧みに回避するステルス機能、体内を移動して組織に浸透する組織浸透機能、標的細胞を認識してその表面に結合する標的認識機能、さらには、細胞内においてエンドソームから細胞質に移行するエンドソーム脱出機能、細胞質中を移動して核などのオルガネラに到達するオルガネラ・ターゲティング機能、細胞内で位置・時間特異的に効率的な遺伝子発現や薬理効果を発現させるエフェクター機能を搭載した超分子ナノデバイスを創製し、核酸化合物の全身さらには細胞レベルでの空間的ターゲティングを実現する。このように、繊細で高度な機能を有し、かつ、時間的・空間的に制約の多い環境である人間の体に優しく作用し、検出(センサー機能)→診断(プロセッサー機能)→治療(エフェクター機能)を一体として成し遂げる超分子ナノデバイスの創製とその高信頼性・高効率製造技術確立によって、安全で効果に優れた遺伝子・核酸医薬治療の実用化が可能となる。

遺伝子・核酸医薬を搭載した超分子ナノデバイスとしては、マルチ機能を創り込んだブロック共重合体の自己組織化により形成される高分子ミセル型と脂質二分子膜を主体とするエンベロープ型の二つのナノデバイスに関して、基盤技術構築グループと実用的製造技術開発グループが連携し、超分子ナノデバイスの創製とその高効率・高再現性製造技術の構築を行う一方で、臨床展開研究グループとの連携により医療分野での本格的実用化を目指した効率的なトランスレーショナル研究を遂行する体制を構築している。初年度は各研究機関の独自の研究項目を推進すると共に、基盤技術構築グループと臨床展開研究グループとの間で、基盤技術構築グループが提供する超分子ナノデバイスに搭載可能な機能と臨床展開研究グループが標的とする対象疾患や投与方法からの要請を検討し、対象疾患毎のナノデバイス機能の最適化の方向性を見出した。このような連携を重視した検討により、基盤技術構築グループでは超分子ナノデバイスを構成するエレメント設計へのフィードバックを得ることができ、臨床展開研究グループでは疾患モデル動物の構築や超分子ナノデバイス投与方法などを規定するなどの進捗を得た。今後、超分子ナノデバイスの基本設計は第3

年次での達成を目指し、実用的製造技術開発グループへ技術移転することを計画している。第5年次と最終年度となる第6年次には臨床試験における使用法を念頭においた非臨床評価用動物実験モデルによる治療実験を行い、研究終了時において前臨床開発に進む基盤を整備できるよう研究を進捗させる方針である。

## 2. 研究実施内容

本研究では、遺伝子・核酸医薬を搭載した超分子ナノデバイスとして、マルチ機能を創り込んだブロック共重合体の自己組織化により形成される高分子ミセル型と脂質二分子膜を主体とするエンベロープ型の二つのナノデバイスに関して、基盤技術構築グループと実用的製造技術開発グループが連携し、超分子ナノデバイスの創製とその高効率・高再現性製造技術の構築を行う一方で(下記①-④)、臨床展開研究グループとの連携により、医療分野での本格的実用化を目指した効率的なトランスレーショナル研究を遂行する(下記⑤-⑦)。以下に、平成18年度の研究実施内容の概要を記述する。

### ①分子ターゲティングのための生体適合型超分子ナノデバイスの創製と高信頼性製造技術の構築

ナノデバイスの体内動態の正確な制御を達成するためには、その血中滞留性の延長が必要不可欠である。そこで本研究項目では高分子ミセル型ナノデバイス表層の PEG 密度向上を図る設計として、分岐状 PEG (PEGasus) の合成並びにブロック化の検討を行った。この PEGasus ブロック共重合体は、MRI 用造影剤を内包するナノデバイスの全身投与において有効であるとの予備的知見を得た。また、効率的連鎖連結反応を利用した表面 PEG 末端への PEG 鎖の導入による PEG の重層化の戦略では、水中でのアジド基と末端アルキンによる環化付加反応 (Click Chemistry) の援用に着手し、両官能基を末端に導入したヘテロ二官能性 PEG の合成や PEG 鎖同士のカップリング反応への応用も可能であることを確認した。一方、多機能性エンベロープ型ナノデバイス (MEND) については、従来、サイズ分布が不均一であるため、実用的な製造並びに *in vivo* での適用に関して問題が残されていた。そこで平成18年度は、MEND の粒子径の均一化と脂質膜枚数の制御を中心に研究を進めた。ここでは MEND にプラスミド DNA を内包させる手法として、DNA を1分子の状態で凝縮させて均一な粒子を調製することが可能な高分子ミセル型ナノデバイス (PIC ミセル) を脂質膜でコートする技術を確認するとともに、MEND の脂質膜の枚数を制御してパッケージングする手法を確認した。

### ②治療効果の空間的フォーカシングのための超分子ナノデバイスの創製

本研究項目では、ナノデバイス表層に標的指向性リガンドを効率的に導入する基盤技術構築を目指している。平成18年度は、新生血管内皮細胞やがん細胞で過剰発現している  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンレセプターに特異的に結合する環状 RGD ペプチドを表層にリガンドとし

て装着した内核架橋導入高分子ミセル型ナノデバイスの標的指向性を細胞実験で評価し、ナノデバイスの細胞核周辺へのスムーズな集積と遺伝子発現効率の大幅な増大を確認した。MENDにおいても、がん局所で過剰発現が認められる matrix metalloprotease (MMP)の基質となるペプチドセグメントを介して PEG と脂質を連結したコンジュゲートを作成し、siRNA 封入 MEND 表面に装着することにより、in vitro MNP 発現細胞において遺伝子ノックダウン効果を示すことを明らかにした。膵臓がんは血管密度が疎らであり薬剤の送達が困難であるために難治性であることが知られているが、 $\beta$ 阻害剤と高分子ミセル型ナノデバイスとの併用により、膵臓がんモデルに対するナノデバイスの集積性の向上を確認し、制がん剤の治療効果や MRI 造影剤の造影効果が顕著に高まることを確認した。密着結合型の血管内皮を通過して標的組織への到達を実現するナノデバイスの構築に関しては、血管内皮標的化ペプチドを表面修飾した siRNA 搭載 MEND がカベオラ経路によって効率的に細胞に取り込まれ、RNAi 効果を発現することを明らかにした。遺伝子・核酸治療を臨床へ導入するには、標的とするがん種の選定と、前臨床における実験モデル構築が重要であるため、臨床展開研究グループにより新たにラット脳腫瘍モデルが構築された。

また、新しいナノデバイス創製戦略として、密着結合型の血管内皮を通過して標的組織への到達を実現するナノデバイス構築を行うため、細胞内輸送機構の解明とこれらの輸送系の積極的利用を図ることも目指した。具体的には、トランスサイトosisを促進する DNA アプタマーを表層に結合したナノデバイスと、個々のエンベロープ膜に、細胞膜や輸送小胞系等、多段階に細胞内オルガネラと融合できる機能を作り込んだ多段階膜融合型エンベロープ型ナノデバイスの二つのシステムについて研究開発を行うこととした。平成 18 年度は、モデルアプタマーとしてトロンビン DNA アプタマーを用い、金基板上に DNA アプタマー/PEG ハイブリッド界面を構築し、表面プラズモン共鳴装置による解析から、このハイブリッド界面が非特異吸着抑制能に優れ、DNA アプタマーの認識能を持つことを明らかにした。

### ③細胞内環境応答型超分子ナノデバイスの構築とその高効率製造技術の確立

ナノデバイスの効率的機能発現のためには、標的に到達するまでは高い構造安定性を示す一方で、標的細胞内で内包核酸分子を放出する機能が必要とされる。そこで、環状RGDペプチドを表層にリガンドとして装着した高分子ミセル型ナノデバイスの内核に細胞内還元環境下で選択的に開裂するジスルフィド(SS)架橋を導入したところ、遺伝子発現に対するリガンド分子の効果がSS架橋の導入によって顕著に高まることが確認された。一方、ポリエチレングリコール-ポリ( $\beta$ -ベンジルアスパルテート)(PEG-PBLA)ブロック共重合体の側鎖ベンジルエステルのアミノリシス反応により、側鎖にエチレンジアミン構造を有するブロック共重合体(PEG-PAsp(DET))が調製され、これまでに低毒性かつ効率的な遺伝子発現を示すことが確認されているが、平成 18 年度には、この連結部にジスルフィド(SS)結合が導入されたブロック共重合体PEG-SS-PAsp(DET)を設計した。HeLa、HuH7細胞を用いたSS結合の有無の比較検討では、SS結合導入ナノデバイスは非導入ナノデバイスに比べ、低いN/P

比(=ポリマー中のアミノ基/DNA中のリン酸残基)における遺伝子発現効率が10倍から1000倍に増大することが確認された。エンベロープ型ナノデバイスに関しては、①で構築した多段階膜融合型MEND (T-MEND) を用いて、細胞核移行後の遺伝子発現効率向上を実現した。全身投与による遺伝子デリバリーを目指したナノキャリアに関しては、PEG-PAsp(DET)-ポリリシン(PLL) ABC型三元ブロック共重合体を合成して三層高分子ミセルを構築し、TGF  $\beta$  阻害剤との併用により、腫瘍モデルにおいて遺伝子発現効率が高まるとの知見を得た。

#### ④分子診断機能を具備したシングルプラットフォーム型超分子ナノデバイスの創製

本研究項目では、1塩基の違いを識別してクロスリンク反応などを誘起する機能性核酸をナノデバイスに搭載し、対象疾患の治療へ展開するとともに、標的分子の認識により触媒活性が誘起される機構の創り込みによる新規遺伝子発現イメージング法の創出を目指している。平成18年度は、インテリジェント機能性核酸の開発とナノ医療デバイスへの展開を目的に、c-myc 癌遺伝子を標的にした人工核酸を合成するとともに、臨床展開研究グループとの連携により、家族性高コレステロール血症の治療に有効な、塩基変換を行う人工核酸の塩基配列を設計した。また、ナノデバイスに搭載する PEG-機能性核酸コンジュゲートの高効率合成法について、オレフィンメタセシス反応による固相合成法の検討を行った。同時に、既に開発したシトシンを標的とする機能性核酸の構造に基づき、グアニンを標的として反応する機能性核酸の反応性塩基部分を分子設計し、合成法を確立するとともに、この新規誘導体が標的に対して反応性を有することも確認した。また、2本鎖DNAを標的とするための設計として、機能性核酸を組み込んだ PNA(ペプチド核酸)の合成にも成功した。さらには、PEG化機能性核酸へのさらなる機能性付与(核酸医薬と抗がん剤の同時送達機能の付与)として、pH応答性PEG化ナノゲルとPEG-ポリアニオンブロック共重合体(PEG化機能性核酸のモデル)の複合化についても検討を行った。その結果、複合化後のナノゲルの表面電位は低下し、複合体形成に基づくPEG密度の増加が示唆されるとともに、複合体形成後もPEG化ナノゲルがpH応答性を維持していることを明らかにした。これらは次年度以降に、基盤技術構築グループ内の連携により、ナノデバイスへの搭載を検討する予定である。

#### ⑤超分子ナノデバイスを利用した難治がんの標的治療法の確立

本研究項目では、脳腫瘍や肝細胞がんなどの局所進展型の腫瘍を標的として、ナノデバイスの動脈投与によるがん治療を目指している。遺伝子・核酸治療を臨床へ導入するためには、前臨床における実験モデル構築が重要となるが、平成18年度は、ルシフェラーゼ発現グリオーマ細胞を同所移植したラット脳腫瘍モデルの構築に成功した。次年度には、がん細胞内におけるナノデバイスの機能発現をレポーター遺伝子の発現および発現抑制により評価するとともに、機能性核酸として c-myc 癌遺伝子を標的にした人工核酸を搭載した超分子ナノデバイスの単回もしくは反復投与による制がん活性評価を行う予定である。

一方、転移性がんを標的とする場合は、①-③で開発する全身投与型超分子ナノデバイスが有効であり、平成18年度はこの予備検討を行った。すなわち②で述べたように、環状RGDペプチドをリガンドに持つ高分子ミセル型ナノデバイスの開発を行い遺伝子発現効率の増大を確認すると共に、MMP-MENDにおいても細胞実験レベルで遺伝子ノックダウン効果を示すことを明らかにした。全身投与型デバイスについては、臨床展開研究グループとの連携研究を推進するためにも、次年度以降に体内動態評価とレポーター遺伝子を用いた *in vivo* 機能評価へ移行する予定である。また、難治性の固形がんに対する治療法として、TGF $\beta$ 阻害剤と高分子ミセル型ナノデバイスとの併用が有効であることも確認した。

#### ⑥超分子ナノデバイスを利用した循環器疾患の低侵襲的治療法の確立

本研究項目では、致死性の循環器疾患である特発性肺動脈性肺高血圧症および家族性高コレステロール血症治療を対象として、その遺伝子・核酸医薬搭載ナノデバイスによる低侵襲治療法の確立を目指している。前者については、第1-3年次にかけて、上記①-③において開発する高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による *in vivo* 遺伝子発現効率の向上ならびに発現期間の延長効果を検討する。平成18年度は、高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による効率の良い遺伝子導入条件、急性および慢性の毒性評価、肺動脈性肺高血圧症モデル動物を用いた治療実験について検討を行った。遺伝子導入条件の検討では、レポーター遺伝子と PEG-PAsp(DET)からなるナノデバイスをマウス気管内に投与する際の発現を生じる良好な投与条件を見出した。投与1週間後の肺組織には毒性の影響はみられず、本法が安全で低侵襲の治療法であることを示唆している。これに並行して、肺高血圧症モデル動物の構築にも成功したため、計画を前倒しして、肺高血圧症の治療遺伝子であるアドレノメデュリン発現ベクターを用いた治療効果の検証も行った。その結果、右室圧の低下とアドレノメデュリンの mRNA 増加という明確な治療効果が得られた。

#### ⑦超分子ナノデバイスを配置した骨形成誘導型インテリジェント・インプラントの開発

これまでに骨形成誘導因子発現プラスミドを内包した高分子ミセル型ナノデバイスを、ヒドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中に包含し、マウス頭頂骨の骨欠損モデルに対して適用したところ、骨形成が確認されており、本研究では、この基盤成果を実用化に結びつけるために、ナノデバイスを配置した骨形成誘導型インテリジェント・インプラントの創製を目指している。平成18年度は、インクジェット式積層による粉体 $\alpha$ -TCP造形法の基盤技術開発に成功し、噴射溶液の濃度、噴射量、 $\alpha$ -TCP粉体粒径の最適化を行い、圧縮強度10 Mpa以上、精度1 mm以下のベンチマークを達成した。同時に、骨軟骨分化誘導する生理活性物質の立体的配置法についても、バブルジェット式インクヘッドを改良して、FGF2を失活させることなくプリントすることに成功した。次年度以降は、材料特性の向上と機能化により、加重部へも適応可能な優れた再生骨を誘導できるインプラントの開発を目指す。

### 3. 研究実施体制

(1) 「片岡・鄭」グループ (東京大学)

①研究分担グループ長：片岡 一則 (東京大学大学院 教授)

②研究項目

- ・分子ターゲティングのための生体適合型高分子ミセル型ナノデバイスの創製

平成18年度は高分子ミセル型ナノデバイス表層の PEG 密度向上を図る設計として、分岐状 PEG(PEGasus)の合成並びにブロック化の検討を行い、PEGasus 分岐点に導入された一級アミノ基から  $\beta$ -ベンジル L-アスパルテート N-カルボン酸無水物 (BLA-NCA)が重合でき、このブロック共重合体を用いて調製した MRI 用造影剤を内包するナノデバイスが全身投与におけるデリバリーに有効であるとの知見を得た。

リガンド分子をミセル表層に導入する際、有用と考えられるマレイミド基に着目し、PIC ミセル調製後のミセル表層へのマレイミド基導入法として、水中でのアジド基と末端アルキンによる環化付加反応 (Click Chemistry) の援用に着手した。平成18年度は両官能基(アジド基、プロパルギル基)を末端に導入したヘテロ二官能性 PEG の合成や PEG 鎖同士のカップリング反応への応用も可能であることを確認した。また、片末端 SH 基を持つ PEG を固定した金コロイド粒子に、他方の PEG 末端にリガンド分子としてラクトースを導入し、基板上に固定した認識タンパク質のレクチンとの相互作用を調べ、鎖長の短い(低分子量)リガンド非導入 PEG を適当な割合で加えることにより、レクチンに対する認識能が顕著に向上するとの知見を得た。

- ・治療効果の空間的フォーカシングのための高分子ミセル型ナノデバイス創製

平成18年度は、新生血管内皮細胞やがん細胞で過剰発現している  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンレセプターに特異的に結合する環状 RGD ペプチドを表層にリガンドとして装着した内核架橋導入高分子ミセル型ナノデバイスの標的指向性を評価したところ、細胞内取り込み過程よりも細胞内動態において大きな変化が見られ、リガンド装着系でナノデバイスの細胞核周辺へのスムーズな集積が観察された。その結果、遺伝子発現効率の大幅な増大に成功した。また、リガンド分子の認識能を高めるナノデバイスの設計に関する知見を得るために、片末端 SH 基を持つ PEG を固定した金コロイド粒子に、他方の PEG 末端にリガンド分子としてラクトースを導入し、基板上に固定した認識タンパク質のレクチンとの相互作用を評価したところ、鎖長の短い(低分子量)のリガンド非導入 PEG を適当な割合で加えることにより、レクチンに対する認識能が顕著に向上することが明らかとなった。

膵臓ガンやスキルス胃癌は、腫瘍血管密度が顕著に低いために、化学療法剤などの薬物療法に対して難治性であることが知られているが、平成18年度には、腫瘍血管構造を一過的に破壊させる TGF  $\beta$  阻害剤と高分子ミセル型ナノデバイスとを併用することにより、膵臓ガンモデルに対するナノデバイスの集積性の向上を確認し、制ガン剤の治療効果や MRI 造影剤の造影効果が顕著に高まることを確認した。

- ・細胞内環境応答型高分子ミセル型ナノデバイスの創製

エンドサイトーシス経路により細胞内へ導入された高分子ミセル型ナノデバイスを有効に機能させるためには、エンドソームから細胞質への移行効率を高める必要がある。これまでにポリエチレングリコール-ポリ( $\beta$ -ベンジルアスパルテート)(PEG-PBLA)ブロック共重合体および PBLA ホモポリマーの側鎖ベンジルエステルと種々のアミン化合物のアミノリシス反応により、主鎖の分子量分布が同一で側鎖のカチオン構造のみが異なる一連の PEG-ポリカチオンおよびカチオン性ホモポリマーの合成が可能となり、これらの網羅的解析により側鎖にエチレンジアミン構造を有するブロック共重合体(PEG-PAsp(DET))およびカチオン性ホモポリマー(PAsp(DET))が低毒性で高い遺伝子発現効率を与えることが確認された。平成18年度には、PEG-PAsp(DET)の精密重合法を確立し、ナノデバイスの機能発現メカニズムの解析を進める一方で、原島らと共同でプラスミド DNA(pDNA)と PAsp(DET)との複合体を MEND に内包させ、人工のポリカチオンとして初めてプロタミンを超える遺伝子発現効率を得た。

高分子ミセル型ナノデバイスの有効な機能発現には、標的細胞に到達するまでの構造安定性と標的細胞内環境に応答して核酸を放出する機能を併せ持つ材料設計が重要となる。平成18年度には、内核へのジスルフィド架橋導入により安定化された高分子ミセル型ナノデバイスについて *in vitro* と *in vivo* での評価を行い、最適架橋導入率が 5-11%程度であることを確認し、良好な血中滞留性を示す予備的知見を得た。さらに、平成18年度は、上述の PEG-PAsp(DET)の連結部にジスルフィド(SS)結合が導入されたブロック共重合体 PEG-SS-PAsp(DET)を設計し、粒径やゼータ電位などの物性評価を行うとともに、生細胞環境を模した実験系にて SS 結合の開裂がナノデバイスの構造不安定化を誘起し、pDNA の放出が容易になったことを示唆する結果を得た。HeLa、HuH7 細胞を用いた SS 結合の有無の比較検討では、SS 結合導入ナノデバイスは非導入ナノデバイスに比べ、低い N/P 比(=ポリマー中のアミノ基/DNA 中のリン酸残基)における遺伝子発現効率が 10 倍から 1000 倍に増大することが確認された。

全身投与による遺伝子デリバリーを目指したナノキャリアに関しては、平成18年度に、PEG-PAsp(DET)-ポリリシン(PLL) ABC 型三元ブロック共重合体を合成し、DNA/PLL 複合体内核がバッファー能を有する PAsp(DET)中間層と生体適合性の PEG 外殻で覆われた三層高分子ミセルを開発し、前述の TGF $\beta$  阻害剤との併用により、膵ガンモデルにおける遺伝子発現効率が高まるとの知見を得た。

- ・インテリジェント型インプラントシステムの開発に向けた外部形状と内部構造を制御し、物質を立体的に配置できる三次元造形法の開発

平成18年度は、インクジェット式積層による粉体  $\alpha$ -TCP 造形法の基盤技術開発に成功し、コンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液の濃度・噴射量、 $\alpha$ -TCP 粉体粒径

の最適化を行い、圧縮強度 10 MPa 以上、精度 1 mm 以下のベンチマークを達成した。このような材料特性は、非荷重部に対する臨床応用には十分であると考えられるが、荷重部への応用に対してはおよそ 100MPa 以上の圧縮強度が必要と考えられ改善が必要である。また、生理活性物質の立体的配置法についても、バブルジェット式インクヘッドを改良して、FGF2 を失活させることなくプリントすることに成功した。

## (2) 「原島」グループ (北海道大学)

①研究分担グループ長：原島 秀吉 (北海道大学大学院 教授)

### ②研究項目

- ・凝縮遺伝子一分子をナノデバイスに内包するための新たな構築法の開発  
多機能性エンベロープ型ナノデバイス (MEND) の実用的な製造並びに *in vivo* での適用を目的とし、粒子径の均一化、脂質膜枚数を中心に研究を進めた。均一な粒子であることが確認されている片岡らの高分子ミセル型ナノデバイス (PIC ミセル) を脂質膜でコートする技術、脂質膜枚数の制御が可能なパッケージング法を確立した。また、プラスミド DNA と PAsp(DET) との複合体を MEND に内包させた系では、人工のポリカチオンとして初めてプロタミンを超える遺伝子発現効率を得た。
- ・*in vivo* で組織選択的に遺伝子を送達するシステムの開発  
血管内皮標的化ペプチドを表面修飾した siRNA 搭載 MEND はカベオラ経路によって効率的に細胞に取り込まれ、効率的に RNAi 効果を発揮することができることを明らかにした。
- ・血管内皮細胞層の透過を目指した多段階膜融合型 MEND (T-MEND) の構築  
T-MEND によるトランスフェクションを行った後の核移行量を測定した結果、従来の MEND と比較して優位に高い核移行後発現効率を示すことが明らかとなった。これは、2 枚膜の核膜を融合によって多段階的に突破する際に、効率的に MEND エンベロープから DNA が解離するからであると考えられる。また、PIC ミセル封入 MEND の脂質膜に NLS を修飾することで、遺伝子発現効率を促進できることを示した。
- ・MMP-MEND の最適化  
がん局所で過剰発現が認められる matrix metalloprotease (MMP) の基質となるペプチドセグメントを介して PEG と脂質を連結したコンジュゲートを作成した。これを siRNA 封入 MEND 表面に装着することによって、効果的に *in vitro* MNP 発現細胞において遺伝子ノックダウン効果を示すことが明らかとなった。

## (3) 「長崎」グループ (筑波大学)

①研究分担グループ長：長崎 幸夫 (筑波大学大学院 教授)



## ②研究項目

- ・インテリジェント界面を創り込んだ新規ナノデバイスの創出

本研究項目では、様々な疾患への適用が期待されるリガンドである DNA アプタマーを中心に DNA アプタマー/PEG ハイブリッド界面の創製することを目的としている。平成18年度は、アミン鎖長の分子量を精密に制御した PEG-ポリアミンブロック共重合体の合成法を確立した（アミン鎖長：3, 6, 25, 40 量体など）。また、この PEG-ポリアミンブロック共重合体（PEG 分子量：2500, アミン鎖長：25 量体）と高い認識能を示すことが知られているトロンビン DNA アプタマー（モデルアプタマー）を用い、金基板上に DNA アプタマー/PEG ハイブリッド界面を構築し、その認識能を SPR（表面プラズモン共鳴装置）により評価を行った。その結果、構築した DNA アプタマー/PEG ハイブリッド界面は、非特異吸着の抑制能を有しかつ DNA アプタマーの認識能を有していることが明らかとなった。

- ・PEG 化機能性核酸・脂質の実用的製造技術への展開

これまで、佐々木らと共同により PEG 化機能性核酸が細胞内で効果的に機能すること、および原島らと共同により PEG 化脂質が *in vivo* において高い遺伝子発現を示すことをそれぞれ見出している。本研究項目では、これら PEG 化機能性核酸・脂質の最適化や更なる機能の付与を目的としている。平成18年度は、PEG 化機能性核酸の更なる機能の付与（核酸医薬と抗ガン剤の同時送達機能の付与）として、pH 応答性 PEG 化ナノゲルと PEG-ポリアニオンブロック共重合体（PEG 化機能性核酸のモデル）の複合化を検討した。その結果、複合化後のナノゲルの表面電位は低下し、複合体形成に基づく PEG 密度の増加が示唆された。さらに、複合体形成後においても PEG 化ナノゲルは、pH 応答性を維持していることが明らかとなった。

### （4-1）「佐々木」グループ（九州大学）

- ①研究分担グループ長：佐々木 茂貴（九州大学大学院 教授）

#### ②研究項目

- ・機能性核酸を搭載したナノデバイスの機能検証

平成18年度は、機能性核酸をナノ医療デバイスへ展開する上での標的を臨床展開研究グループとの連携により *c-myc* 癌遺伝子に定め、これを標的とする人工核酸の分子設計と行うと共に合成法を確立した。また、同様に家族性高コレステロール血症治療を目的に塩基変換を行う人工核酸の塩基配列についても分子設計を行った。

- ・PEG 化機能性核酸の大量合成法の検討

機能性核酸と PEG とのコンジュゲートの構築は、機能性核酸のナノデバイスへの搭載には不可欠であり、これまでに基盤技術構築グループ内の連携により PEG 化機能性核酸が合成可能であることを見出していた。平成18年度は今後の実用的製造技術開発グループへの技術移転を念頭に置き、オレフィンメタセシス反応を用いる

固相担体上の PEG-人工核酸コンジュゲートの大量合成法の検討に着手した。

・新規機能性核酸の分子設計理論の確立

平成18年度は、遺伝子の標的部位を認識し、特定塩基の標識および触媒能の活性化を誘起する機能性核酸の分子設計理論を確立することを目指し、複体内で効果的に官能基を標的塩基に転移させる官能基転移性人工核酸設計を開発した。また、標的配列の高感度センシングを目的にした新規金属触媒を開発した。

(4-2)「永次」グループ(東北大学)

①研究分担グループ長：永次 史(東北大学 教授)

②研究項目

・機能性核酸を組み込んだ PNA(ペプチド核酸)の合成及び機能評価

PNA は2本鎖 DNA に対してインベージョンすることが知られている。これまで開発してきた架橋形成ならびに塩基構造変換機能を持つ人工機能核酸を PNA に組み込むことで2本鎖 DNA を標的化できると考えられる。平成18年度は機能性核酸を組み込んだ PNA(ペプチド核酸)の合成を目指し、機能性核酸の PNA モノマーの合成に成功した。

・新規機能性核酸の分子設計

既に我々はシトシンを標的とする機能性核酸を開発している。この構造に基づき、新たにグアニンを標的として反応する機能性核酸の開発に着手し、平成18年度はこの合成法について検討し、反応性塩基部分の合成法を確立し、この誘導体が標的に対して反応性を有することを確認した。

(5)「松村」グループ(国立がんセンター東病院)

①研究分担グループ長：松村 保広(国立がんセンター東病院 部長)

②研究項目

・超分子ナノデバイスを利用した難治がんの革新的治療法の確立

遺伝子・核酸治療を臨床へ導入するためには、標的とするがん種の選定と、前臨床における実験モデル構築が重要である。そこで本研究では、局所進展性がんである脳腫瘍に対するナノデバイスの動脈投与による治療の有効性を検証することを目指した。実験モデル構築にあたり、ヒトグリオーマ細胞株である U251MG およびラットグリオーマ細胞株 C6 にルシフェラーゼ遺伝子プラスミドを導入し、定位脳手術によりヌードラット大脳にルシフェラーゼ発現 U251MG 細胞および C6 細胞を  $1 \times 10^5$  個移植した。3日後にラットの腹腔内にルシフェリンを 150mg/kg 投与し、バイオイメージアナライザーにて腫瘍の生着を定性的かつ定量的に確認した。ルシフェラーゼに対する siRNA を作製し、カチオニックリポソームに搭載し外頸動脈より動注したところ、非特異的 siRNA の同リポソームの動注に比べ、有意にルシフェラーゼ発

現が抑制された。上記の通り、平成18年度は、ルシフェラーゼ発現グリオーマ細胞を同所移植したラット脳腫瘍モデルの構築に成功した。

(6) 「斯波」グループ (国立循環器病センター)

①研究分担グループ長：斯波 真理子 (国立循環器病センター 室長)

②研究項目

- ・高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による効率の良い遺伝子導入条件の確立  
循環器疾患の中でも難病である肺動脈性肺高血圧症に対して、高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺投与による遺伝子治療法を確立するため、片岡グループとの共同研究で、*in vivo* での導入効率の良い条件を探った。ポリエチレングリコールと poly(2-[(2-aminoethyl)amino]ethyl aspartamide) とのブロック共重合体の PEG-PAsp(DET)を用い、リポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、あるいは YFP を用いて複合体を作製し、高分子ミセル型ナノデバイスとした。マウスに対して気管切開後、気管内投与器具を用いて気管内投与を行い、*in vivo* 遺伝子導入を行った。PEG の分子量を 12,000、ポリマーの重合度を 68、ポリマーと DNA との N/P 比を 40 として気管内投与を行い、1 日後の肺をホモゲナイズしてルシフェラーゼ活性を測定すると、従来のポリマー (ポリエチレンジイミン) に比べ、約 100 倍の活性を示した。YFP を用いた複合体では、気管支に沿って、強い蛍光活性を認めた。
- ・高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による急性および慢性の毒性評価  
循環器疾患に対する、副作用のない安全で非侵襲的な治療法確立のため、高分子ミセル型ナノデバイスの *in vivo* 投与後の毒性検査を行う目的で、経肺投与 1 週間後の肺の、組織学的検査および遺伝子発現検査を行った。高分子ミセル型ナノデバイスは、PEG-PAsp(DET)とルシフェラーゼ遺伝子との複合体を用いた。経肺投与 7 日後の肺の組織は、2 型肺胞細胞の軽度増殖以外、特に変化を認めなかった。一方、従来のポリマーであるポリエチレンジイミン投与後の肺は、炎症性細胞の浸潤、浸出液を著明に認め、ARDS (成人型呼吸促迫症候群) の所見であったのと対照的であった。高分子ミセル型ナノデバイス経肺投与 7 日後の肺をホモゲナイズして、TNF- $\alpha$  の mRNA をリアルタイム RT-PCR を用いて測定すると、コントロール群と同様であり、ポリエチレンジイミン投与後の肺で有意に高値であったのと、対照的であった。
- ・肺動脈性肺高血圧症モデル動物を用いた治療実験  
肺動脈性肺高血圧症モデル動物は、Wister ラットにモノクロタリンを皮下注射して、4 週間放置して作製した。肺高血圧症の重症度は、右頸静脈よりカテーテルを挿入し、血行動態測定装置により、右室圧を測定することにより評価した。治療遺伝子としてはアドレノメデュリンを用い、CAG プロモーターに結合させて発現ベクターとした。PEG-PAsp(DET)とアドレノメデュリン(AM)発現ベクターを用いて高分子ミセル型ナノデバイスを作製した。モノクロタリン投与 4 週間後の右室圧は、84.5 mmHg

±4.4 mmHg であり、肺高血圧症のモデル作製に成功した。気管内投与器具を用いて AM およびコントロールベクターを投与した。生理食塩液に AM 発現ベクターを溶解して投与した群、ポリエチレンイミンを用いて AM を投与した群、高分子ミセル型ナノデバイスを用いてルシフェラーゼ遺伝子を投与した群は、3 日後の右室圧に変化を認めなかったが、高分子ミセル型ナノデバイスを用いて AM を投与した群のみ、有意に右室圧の低下を認めた。また、高分子ミセル型ナノデバイスを用いて AM を投与した肺にのみ、AM の mRNA 増加を認めた。

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- N. Nishiyama, W. -D. Jang, K. Kataoka, Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery. *New J. Chem.* in press (2007)
- D. Akagi, M. Oba, H. Koyama, N. Nishiyama, S. Fukushima, T. Miyata, H. Nagawa, K. Kataoka, Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Therapy* in press (2007)
- M. Kumagai, Y. Imai, T. Nakamura, Y. Yamasaki, M. Sekino, S. Ueno, K. Hanaoka, K. Kikuchi, T. Nagano, E. Kaneko, K. Shimokado, K. Kataoka, Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces* in press (2007)
- M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kamiishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 104 (9) 3460-3465 (2007)
- J. -S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Preparation and characterization of polyion complex micelles with a novel thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) shell via the complexation of oppositely charged block ionomers. *Langmuir* 23 (1) 138-146 (2007)
- W. -D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, Preparation of naphthalocyanine dendrimer loaded polyion complex micelle for photodynamic therapy. *Key Eng. Mater.* 342-343 (Advanced Biomaterials VII) 465-468 (2007)
- Arnida, N. Nishiyama, N. Kanayama, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated gene nanocarriers based on block cationomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection. *J. Control. Rel.* 115 (2) 208-215 (2006)
- Ikeda T, Saito T, Ushita M, Yano F, Kan A, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung U. Identification and characterization of the human SOX6 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (2007).

- Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. S100A1 and B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep.* in press (2007)
- Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler A. C., Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung U. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J.* in press (2007)
- Kosaki N, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, Amizuka N, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H, Toyama Y, D'Armiento J, Takaishi H. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (2007).
- Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung U, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J. Artif. Organ* 9: 234-240 (2006).
- Bounoutas G. S., Tawfeek H., Fröhlich L. F., Chung U, Abou-Samra A. B. Impact of impaired receptor internalization on calcium homeostasis in knock-in mice expressing a phosphorylation-deficient parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 147: 4674-4679 (2006).
- H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi and H. Harashima. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Therapy* 14, 68-77 (2007).
- I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, K. Kataoka, and H. Harashima. Octaarginine-modified envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Therapy* in press (2007)
- S. Hama, H. Akita, S. Iida, H. Mizuguchi, and H. Harashima. Quantitative and mechanism-based investigation of differences in post nuclear delivery events between viral and non-viral vectors. *Nucleic Acid Res.* in press (2007)
- H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ishida, K. Hashimoto, H. Kobayashi, T. Aoki, J. Yasuda, K. Obata, H. Kikuchi, T. Ishida, H. Kiwada, H. Harashima. Tumor targeting of doxorubicin by anti MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int. J. Pharm.* in press (2007)
- M. Oishi, H. Hayashi, K. Itaka, K. Kataoka, Y. Nagasaki “pH-Responsive PEGylated nanogels as targetable the enhanced transfection efficiency of nonviral gene vectors” *Colloid & Polymer Sci.* in press (2007)
- Y. Nagasaki, H. Kobayashi, Y. Katsuyama, T. Jomura, T. Sakura “Enhanced immuno-response of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface, -Construction of high-performance immuno-magnetic ELISA system-“ *J. Colloid & Interface Sci.* in press (2007)
- M. Oishi, S. Ieko, Y. Nagasaki “Lipase-catalyzed selective synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymer possessing a carboxylic acid group at

the PEG chain end" *Polymer J.* 39(3), 239-244 (2007).

- Y. Nagasaki, K. Yoshinaga, K. Kurosawa, M. Iijima "Thermal and dispersion stable lipase-installed gold colloid -PEGylation of enzyme-installed gold colloid-" *Colloid & Polymer Sci.* 285(5), 563-567 (2007)
- W. Lu, Y. Tokuhiko, I. Umezumi, A. Sugimura, Y. Nagasaki "Resonance energy transfer based on shallow and deep energy levels of biotin-polyethylene glycol/polyamine stabilized CdS quantum dots" *Appl. Phys. Lett.* 89(14), 143901 (2006).
- Nakagawa O., Ono S., Li Z., Tsujimoto A., Sasaki S., Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
- Tsujita S., Tanada M., Kataoka T., Sasaki S., Equilibrium shift by target DNA substrates for determination of DNA binding ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 68-72 (2007).
- Nakayama S., Nagatsugi F., Sasaki S., Novel drug releasing system triggered by hybridization with target sequence, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 143-144 (2006).
- Kataoka T., Tanada M., Onishi I., Sasaki S., Recognition of DNA with assembly of minor groove binders mediated by metal complexation, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 161-162 (2006).
- Aoki E., Taniguchi Y., Togo M., Sasaki S., Effects of the modified aromatic ring of WNA on stability of triplex DNA, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 185-186 (2006).
- Nakagawa O., Ono S., Tsujimoto A., Li Z., Sasaki S., Fluorescence detection of 8-oxoguanosine by G-clamp derivatives, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 50, 21-22 (2006).
- Tanada M., Tsujita S., Kataoka T., Sasaki S., Cu<sup>2+</sup>-Mediated Assembly of the Minor Groove Binders on the DNA Template with Sequence Selectivity, *Organic Lett.*, 8, 2475-2478 (2006).
- Ali M. M., Oishi M., Nagatsugi F., Mori K., Nagasaki Y., Kataoka K., Sasaki S., Intracellular Ability of an Inducible Alkylation System to Exhibit Antisense Effects with Greater Potency and Selectivity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 3136-3140 (2006).
- Taniguchi Y., Nakamura A., Senko Y., Nagatsugi F., Sasaki S., Effects of Halogenated WNA Derivatives on Sequence Dependency for Expansion of Recognition Sequences in the Non-Natural Type Triplexes, *J. Org. Chem.*, 71, 2115-2122 (2006).
- Ali M. M., Nagatsugi F., Sasaki S., Nakahara R., Maeda M., Application of 2-Amino-6-Vinylpurine as an Efficient Agent for Conjugation of Oligonucleotides, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 25, 159-169 (2006).
- Tanada M., Tsujita S., Sasaki S., Design of New Bidentate Ligands Constructed of Two Hoechst 33258 Units for Discrimination of the Length of Two A3T3 Binding Motifs, *J. Org. Chem.*, 71, 125-134 (2006).
- J. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahata, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, Y. Tabata, Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue*

*Engineering*, in press (2007)

- I. Ichi, K. Nakahara, Y. Miyashita, A. Hidaka, S. Kutsukake, K. Inoue, T. Maruyama, Y. Miwa, M. Harada-Shiba, M. Tsushima, S. Kojo and Kisei Cohort Study Group, Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids* 41(9): 859-863 (2006)
- A. Yamamoto, M. Harada-Shiba, M. Endo, N. Kusakabe, T. Tanioka, H. Kato, and T. Shoji, The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familialhypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis* 186(1): 126-131 (2006)

**(2) 特許出願**

平成 18年度特許出願:7 件 (CREST 研究期間累積件数:7 件)