

12. Christie RJ, Matsumoto Y, Miyata K, Nomoto T, Fukushima S, Osada K, Halnaut J, Pittella F, Kim H-J, Nishiyama N, Kataoka K. Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 2012; 6: 5174-5189.
13. Suma T, Miyata K, Ishii T, Uchida S, Uchida H, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K. Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 2012; 33: 2770-2779.
14. Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Kunisawa Y, Ishii T, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K, Nakano N. Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J Control Release* 2012; 160: 542-551.
15. Uchida S, Itaka K, Chen Q, Osada K, Ishii T, Shibata MA, Harada-Shiba M, Kataoka K. PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol Ther* 2012; 20: 1196-1203.
16. Rafi M, Cabral H, Kano MR, Mi P, Iwata C, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J Control Release* 2012; 159: 189-196.
17. Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J. Control. Release* 2012; 157: 112-117.
18. Suma T, Miyata K, Ishii T, Uchida S, Uchida H, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K. Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 2012; 33: 2770-2779.
19. Kim HJ, Oba M, Pittella F, Nomoto T, Cabral H, Matsumoto Y, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J Drug Target* 2011; 20: 33-42.
20. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol* 2011; 6: 815-823.
21. Christie RJ, Miyata K, Matsumoto Y, Nomoto T, Menasco D, Lai TC, Pennisi M, Osada K, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasaki Y, Kataoka K. Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* 2011; 12: 3174-3185.
22. Pittella F, Zhang M, Lee Y, Kim HJ, Tockary T, Osada K, Ishii T, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. 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* 2011; 32: 3106-3114.

## 2. 学会発表

(国内学会)

1. 片岡一則. 超分子ナノマシンによるがんの標的治療への挑戦. JAPAN NANO 2014 第12回ナノテクノロジー総合シンポジウム, 江東区, 2014.1.31.
2. 片岡一則. ナノ・バイオによる診断・治療, TUSフォーラム2013 基礎科学と医療 -科学は技術を招き、技術は科学を深める-.千代田区, 2013.11.6.
3. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 第10回日本中性子捕捉療法学会学術集会, 岡山市, 2013.9.7.
4. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」がんのイメージング・標的治療への挑戦. In vivo イメージングフォーラム2013, 東京都, 2013.9.6.
5. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」:がんの標的治療への挑戦. イノベーションフォーラム in つくば【第一部】第13回開催 日経エデュケーションチャレンジ, 茨城県, 2013.8.20.
6. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」

- 丸」：がんの標的治療への挑戦。第2回国際先端生物学・医学・工学会議，名古屋市，2013.7.27.
7. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る魔法の弾丸～がんの標的治療への挑戦～. ナノ学会第11回大会，東京都，2013.6.7.
  8. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 第20回クロマトグラフィースンポジウム，神戸市，2013.6.6.
  9. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」～がんの標的治療への挑戦～. 日産化学工業 生物科学研究所講演会，埼玉県，2013.6.4.
  10. 片岡一則. 核酸医薬デリバリーのための超分子ナノデバイス～その現状と将来展望～. 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム，東京都，2013.5.11.
  11. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～スマートヘルスケアの実現を目指して～. BIOtech 2013 セミナー「国際戦略拠点キングスカイフロント発のライフイノベーション」，東京都，2013.5.8.
  12. 片岡一則. 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計. 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたストラテジーセミナー，東京都，2013.4.26.
  13. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. AKUA 学術集会特別講演，東京，2013.3.1.
  14. 片岡一則. 難治がんの標的治療を実現する最先端ナノ DDS 技術. NanoTech2013 第12回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議，東京，2013.1.30.
  15. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」：がんの標的医療への挑戦. 東京大学2012第63回駒場祭，東京，2012.11.25.
  16. 片岡一則. 高分子ミセルによる薬物・遺伝子デリバリー/ミセル製剤によるピンポイントデリバリーを中心に、がんや難病治療における DDS 製剤の現状およびバイオ医薬品の有効性・安全性を高める DDS 製剤への期待を含む内容. 第7回品質/科学技術特別研修 ナノメディシン (ナノ医薬品) による DDS の現状と展望，東京，2012.11.14.
  17. 片岡一則. 最先端ナノ DDS が拓く医療イノベーション～超分子なデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 東海メディカルプロダクツ創立30周年記念シンポジウム，名古屋，2012.9.1.
  18. 片岡一則. 医療イノベーションを先導するバイオマテリアル～高分子ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 日本技術士会化学部会2012年8月度例会，東京，2012.8.23.
  19. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 第19回愛媛オンコロジーフォーラム，松山，2012.8.10.
  20. 片岡一則. 高分子ミセルによるドラッグデリバリー～その現状と将来展望～. 第28回創薬セミナー，山梨，2012.7.26.
  21. 片岡一則. 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノデバイス設計. 第28回日本 DDS 学会学術集会，札幌，2012.7.4.
  22. 片岡一則. 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計. 情報機構セミナー「核酸医薬の開発戦略と今後の展望」，大井町，2012.5.24.
  23. 片岡一則. 高分子の機能と材料開発：ナノバイオテクノロジー分野への展開を中心に. 東レ第2回先端材料研究フォーラム，滋賀，2012.5.21.
  24. 片岡一則. 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノキャリア設計. 高分子学会12-1超分子研究会，東京，2012.5.15.
  25. 片岡一則. 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー. 第51回日本生体医工学会大会，福岡，2012.5.10.
  26. 片岡一則. 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー. BIOtech，東京，2012.4.27.
  27. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 特許庁 先端技術研修会，東京都，2011.12.22.
  28. 片岡一則. 学融合に基づく医療システムイノベーション. 東大病院先端医療開発部局合同シンポジウム「再生医療・細胞医療の早期実用化にむけた開発戦略」，東京都，2011.12.17.
  29. 片岡一則. 高分子ミセルによるドラッグデリバリー～その現状と将来展望～. 東京女子医科大学 櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム「医学・薬学・工学の融合を目指して」，東京都，2011.12.2.
  30. 片岡一則. 高分子ミセルによる抗がん剤のピンポイントデリバリー. 第33回日本バイオマテリアル学会，京都府，2011.11.22.
  31. 片岡一則. 高分子が先導するライフ・イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～. 東京工業大学 COE 特別授業，東京都，2011.11.10.
  32. 片岡一則. "ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリ

バリー〜". 第 16 回臨床 BRM 研究会, 名古屋市, 2011.10.27.

33. 片岡一則. 薬を患部に運ぶナノカプセル ～医真菌学領域への応用の展望～. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京都, 2011.10.21.
34. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～. 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会 特別企画「医工学と脳神経外科」, 神奈川県, 2011.10.14.
35. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～. 新学術領域研究「バイオアセンブラ」第 1 回シンポジウム, 東京都, 2011.10.12.
36. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～. 大阪大学羅針塾, 大阪府, 2011.9.3.
37. 片岡一則. 超分子ナノデバイスによる遺伝子・siRNA デリバリー. アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム, 吹田市, 2011.9.2.
38. 片岡一則. 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計. 千里ライフサイエンスセミナー「新しい先端医薬品としての核酸医薬品の戦略」, 大阪府, 2011.7.8.
39. 片岡一則. ナノバイオが先導する未来医療, 北海道大学大学院薬学研究院特別講演, 札幌, 2011.6.30.
40. 片岡一則. 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2011.6.9.
41. 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～. 第 38 回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「最先端医療の現状と展望」. 東京, 2011.6.1.

(国際学会)

1. Kataoka K. Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery, The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Japan, 2013.12.16.
2. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, CEMS International Symposium on Supramolecular Chemistry and Functional Materials 2013, Tokyo, 2013.12.15.
3. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines. Nanosystems Initiative Munich - Advisory Board Meeting and Workshop, München Germany, 2013.11.17.
4. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines. UCLA-USC-Caltech Nanotechnology & Nanomedicine Symposium, Nanotechnology Innovations in Cancer, Infectious Diseases, and Regenerative Medicine, California USA, 2013.10.17.
5. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymers. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013), Tokyo, 2013.10.8.
6. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymer, 12th International Conference "Polymers for Advanced Technologies" PAT 2013, Berlin Germany, 2013.10.1.
7. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for gene and drug delivery, The 5th Asian Arden Conference, Pharmaceutical Materials Science and Engineering - Characterization and Applications -, Aichi, 2013.8.6.
8. Kataoka K. Supramolecular nanodevices to treat cancers intractable by current chemotherapy. Gordon Research Conferences in 2013, Vermont, USA, 2013.7.15.
9. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. FRONTIERS2013 - Joint EPFL/University of Tokyo Symposium on "Frontiers in Nanomedicine and Imaging", Lausanne Switzerland, 2013.6.21.
10. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. Joint Symposium of the 5th Utah-Inha DDS & Advanced Therapeutics Research Center Symposium and the 7th International Symposium on Intelligent DDS (Dedicated to Prof. You Han Bae's 60th Birthday), Incheon Korea, 2013.5.23.
11. Kataoka K. Polymeric micellar nanocarriers for gene and oligonucleotide delivery. 16th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT), Salt Lake City Utah USA, 2013.5.15.
12. Kataoka K. Targeted chemo- and

- molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. Seminar at Free University of Berlin, Berlin Germany, 2013.4.12.
13. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. SFB (Center-of-Excellence) Seminar University of Bayreuth Bayern Germany, 2013.4.7.
  14. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. FZI-Seminar, Mainz Germany, 2013.4.3.
  15. Kataoka K. Successful developments of phospholipid polymer biomaterials designed with bioinspiration NIPAM-80 New Innovations in Polymers And (bio)Materials. A Symposium on the Future of Biomaterials to Celebrate Allan S. Hoffman's 80th Birthday , Maui, 2012.12.16.
  16. Kataoka K. Self-assembled nanostructures of block copolymers as smart vehicles for gene and drug delivery. 2012 USA-Japan Seminar on Polymer Synthesis – From Monomers to Polymers to Materials to Applications, Santa Barbara, 2012.12.3.
  17. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. From Nanotechnology Platform to Clinical Nanomedicine, Korea, 2012.11.22.
  18. Kataoka K. Smart supramolecular nanotheranostic to overcome resistances to the treatment of severe diseases. 10th France-Japan DDS Symposium In Memory of Gérard Déléris, Bordeaux, 2012.10.11.
  19. Kataoka K. Self-Assembled nanostructures of block copolymers as smart vehicles for gene and drug delivery. 2nd Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery (SIPCD 2012), Suzhou, 2012.9.12.
  20. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. The University of Texas MD Anderson Cancer Center & The University of Tokyo 1st Joint Symposium 2012 “Bridging Cancer Nanotechnology”, Houston, 2012.8.13.
  21. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), Virginia, 2012.6.25.
  22. Kataoka K. Medical innovation through polymer chemistry: Supramolecular structures of block copolymers as smart nanodevices for gene and drug delivery. IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), Virginia, 2012.6.24.
  23. Kataoka K. Supramolecular nanodevices from functionalized block copolymers for molecular therapy. CIMTEC 2012 (4th International Conference on Smart Materials, Structures and Systems), Italy, 2012.6.14.
  24. Kataoka K. Smart spramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, 2012.6.4.
  25. Kataoka K. Smart spramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery. Seminar at West China School of Pharmacy, Chengdu, 2012.6.2.
  26. Kataoka K. Block copolymer self-assemblies as smart nanocarriers in gene and drug delivery. High Polymer Research Group Conference 2012, Cheshire, 2012.5.2.
  27. Kataoka K. Spramolecular structures self-assembled from engineered block copolymers for theranostics nanodevice. MRS Spring Meeting, San Francisco, 2012.4.11.
  28. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for drug delivery. Seminar at Novartis Institute for BioMedical Research, Massachusetts, 2012.4.9.
  29. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for drug delivery. Seminar at Eisai Inc./Andover Site, Massachusetts, 2012.4.9.
  30. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Functionalized Block Copolymers for Molecular Therapy. "France-Japan Workshop “The Nanotech Revolution from Science to Society: a Time for Passion and a Time for Reason”, Cachan France, 2011.12.13.
  31. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smat Vehicles for Gene and Drug Delivery. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, Tokyo Japan, 2011.12.10.
  32. Kataoka K. Block Copolymer Micelles and Vesicles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Tokyo, Japan, 2011.12.2.
  33. Kataoka K. Block Copolymer Micelles for Targeted Cancer Therapy. EMA Webinar, Tokyo Japan, 2011.11.29.
  34. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery. The 12th Pacific Polymer Conference, Jeju-do Korea, 2011.11.15.

35. Kataoka K. Supramolecular Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery. Tateshina Conference on Organic Chemistry, Nagano Japan, 2011.11.13.
36. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery. 3rd Asian Biomaterials Congress, Busan Korea, 2011.9.16.
37. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery. Seminar at Friedrich Schiller University Jena, Jena Germany, 2011.9.14.
38. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Bayreuth Polymer Symposium 2011, Bayreuth Germany, 2011.9.11.
39. Kataoka K. Smart Polymeric Micelles from PEG-based Block Copolymers for Advanced Drug Delivery. 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Maryland USA, 2011.8.1.
40. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for siRNA Delivery. 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Maryland USA, 2011.7.30.
41. Kataoka K. Can We Manage Penetration Barriers in Tumor Tissue by Tuning the Size of Nanocarriers? 2011 Gordon Research Conference “Cancer Nanotechnology” , Waterville ME USA, 2011.7.17.
42. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery. 2011 Gordon Research Conference “Cancer Nanotechnology” , Waterville ME USA, 2011.7.17.
43. Kataoka K. Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy 23rd Pezcoller Symposium, Guilin China, 2011.6.17.
44. Kataoka K. Smart Supramolecular Structures from Block Copolymer as Nanocarriers in Gene and Drug Delivery. 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Biomaterials 2011, Guilin China, 2011.5.30.
45. Kataoka K. Self-assembled Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, Distinguished Lecture at Waterloo Institute for Nanotechnology. University of Waterloo, Waterloo, Canada, 2011.5.19.
46. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery. The 2nd FAPS Polymer Congress (FAPS-PC2011), Beijing China, 2011.5.9.
47. Kataoka K. Self-assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery. Seminar at Nankai University, Tianjin China, 2011.5.6.
48. Kataoka K. Polymer Chemistry in Nanomedicine: Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery. 2011 Spring Meeting, Korea, 2011.4.7.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

研究分担者 村上 正裕 大阪大谷大学薬学部薬剤学

### 研究要旨

肝臓を標的とする機能性核酸の有効で安全な経口送達法の開発を目的として、ビタミン E (VE) 結合機能核酸を用い、安定性及びカイロミクロン親和性、製剤処方改良に関する検討、並びに、マウス及びカニクイザル（霊長類）における評価検討を実施した。この結果、新規開発した高純度不飽和脂肪酸を含有する VE 結合核酸の均質なナノ脂質分散剤が、画期的な経腸的遺伝子治療システム開発における基本製剤として有効であることを実証した。

### A.研究目的

核酸医薬品を用いた難治性疾患の治療において新薬の開発がなされており、適用の拡大を可能とする新しいデリバリー技術の確立が期待されている。局所への注入や静脈注射による全身投与には、安全性、コストなど課題が多く、核酸医薬品の普及を強く制限している。

本研究の目的は、核酸医薬品の経腸デリバリー技術を確立することによって、患者の負担が少なく、自己投与が可能な、安全かつ簡便で、有効性の高い内服剤や坐剤などの経腸吸収剤の開発基盤を構築することである。

すなわち、新規開発した、内因性リポタンパク質と親和性の高いビタミン E (VE) 結合機能核酸を活用し、(1) VE 結合型合成核酸分子の安定性 (2) カイロミクロン親和性 (3) 製剤処方 (4) 小動物による *in vivo* 検討及びアニマルスケールアップに関する検討を行うことによって、内因性リポタンパク質（カイロミクロン）による脂質輸送系を利用して、核酸医薬品を消化管からリンパ系を介して特異的に肝臓へ送達する新規経腸デリバリー技術の確立を目指す。

### B.研究方法

#### 1. *in vitro* 安定性評価

マウスの腸管粘膜ホモジネート及び腸内インキュ

ベーション液（ribonuclease A 活性で標準化）を作製し、37℃でインキュベーション後、継時的にサンプルを採取し、ゲル電気泳動法によって分解性を評価した。

#### 2. カイロミクロンとの親和性の *ex vivo* 評価

マウスの腸管リンパより採取したリンパ液及び超遠心により分離したカイロミクロン分画と、VE 結合核酸を *in vitro* においてインキュベーションし、動的散乱分光法（DLS）により得られる粒度分布より、VE 結合核酸の分布する分画について評価した。

#### 3. マウスにおける肝への送達性の評価

16時間絶食した ICR マウス（6-8週齢）に、製剤投与前に脂肪乳を経口投与し、注腸剤投与の場合は、エーテル麻酔下、肛門部より薬剤投与し、クリップにて暫時肛門部を閉じる方法で、一日三回三日間薬剤投与を繰り返す方法で行った。ループ法による送達性評価は、生理食塩水で腸内容物を洗浄し、約 5cm の腸管ループを作製後、薬剤を小腸の場合は口側から、結腸の場合位は肛門側から注入して行った。一定時間後に全血を採血し、冷却した生理食塩水にて脱血還流を施した後、肝臓をはじめとする臓器を摘出し、評価に供した。

#### 4. サルにおける有効性の評価

霊長類を用いた実験は、東京医科歯科大学・横田グループとの共同で、VE-siRNA/CM によるカニクイザル及びマーモセットを用いた遺伝子治療実験計

画（承認番号；DS22-11）に基づいて、基盤研霊長類医科学研究センターにおいて実施した。当該施設にて繁殖・飼育された 2.4kg~2.9kg のカニクイザルを実験の前日午後に絶食し、翌朝投薬 3 時間前にミルク（20g/30ml、約 100kcal）を胃内投与する前処置を行った。VE 結合 siRNA（VE-siRNA）を不飽和脂肪酸を含有するナノ脂質分散製剤（注腸剤）とし、ケタミン・キシラジン筋注麻酔下で、30mg/3mL/head/回の用量で直腸内投与した。投与を隔日で二回繰り返し、各投与直前及び投与翌日に採血を行い、生化学検査に供した。

### 5. 共焦点顕微鏡法による送達性の評価

核酸分子の各臓器への送達は、4%パラホルムアルデヒド固定し、O.C.T 包埋した凍結ブロックを Cryostat にて薄切し、細胞核を TO-PRO-3 (Invitrogen, Carlsbad, CA、青)、細胞骨格を fluorescein (FITC) phalloidin (Invitrogen、緑) にて染色し、VE 結合核酸(Cy 3、赤)の臓器移行性と局在を、共焦点レーザー顕微鏡により観察評価した。(倫理面への配慮)

霊長類に係る全ての実験は、独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター内で、(社) 予防衛生協会 研究支援企画部の支援および管理下に行われ、同センターの規定および実験指針に基づき、動物愛護の精神に沿って行った。また、マウスを用いた小動物に係る実験は、動物愛護、および実験動物の適正管理、動物実験の適正化の観点から、大阪大谷大学動物実験委員会規定と動物実験指針に基づいて行った。

## C. 研究結果

### 1. VE 結合核酸の安定性

化学修飾した VE-siRNA は、腸管粘膜組織ホモジネート中でわずかに分解を受けるものの、10 時間後の段階でも VE-siRNA の 29bp 付近のバンドはほぼ不変で、高い安定性を示すことが明らかとなった。一方、2 時間目以降で、22bp、14bp、11 bp 付近にフラグメントが観察され、これらのフラグメントが経時的に増加する傾向が観察された。

### 2. カイロミクロンとの複合体形成

VE-siRNA をリンパ液及びカイロミクロン分画と *ex vivo* でインキュベーションすることにより、DLS のチャート上、15nm 付近にあった VE-siRNA の単一ピークは消失し、200nm-400nm にみられるリンパ液及びカイロミクロン分画のピークのみが観察された (図 1)。

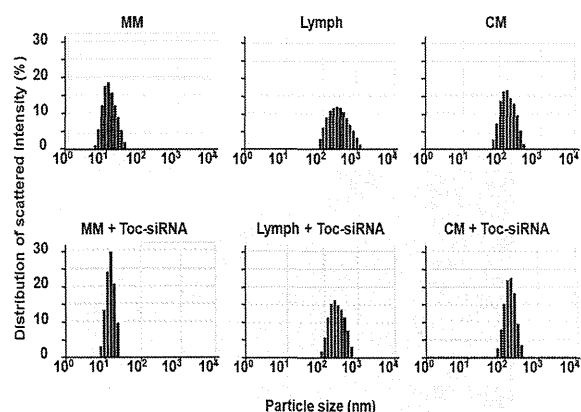
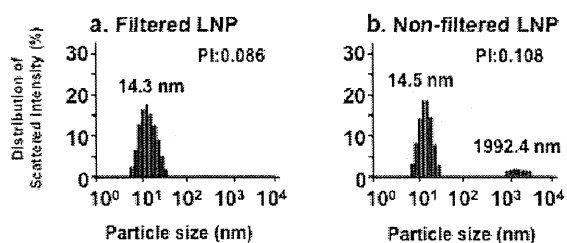


図 1. VE-siRNA を各液とインキュベーション後の粒度分布

(上段が混合前の各液の粒度分布、下段が混合後の粒度分布；MM, リノール酸混合ミセル；CM, カイロミクロン；Toc, VE)

### 3. 製剤処方による肝送達性の差

分散状態の異なる製剤では、均質なナノ分散状態の製剤とすることで、肝への送達性が改善されることが明らかとなった (図 2)。また、脂肪酸を中心とする各種吸収促進剤を比較検討した結果、ドコサヘキサエン酸などの不飽和脂肪酸にも効果が観察されたが、高純度リノール酸及びオレイン酸が最も肝送達性に優れることが示された (図 3)。



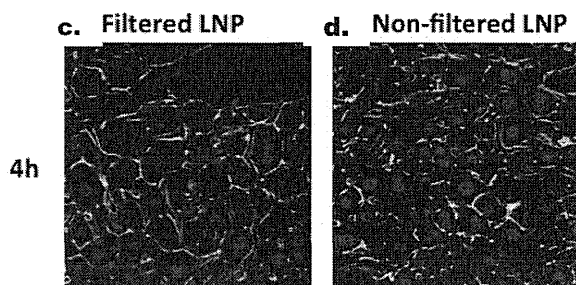


図2. リノール酸混合ミセルの均質ナノ粒子化による VE-siRNA の肝送達性の改善 (LNP, lipid nanoparticle)

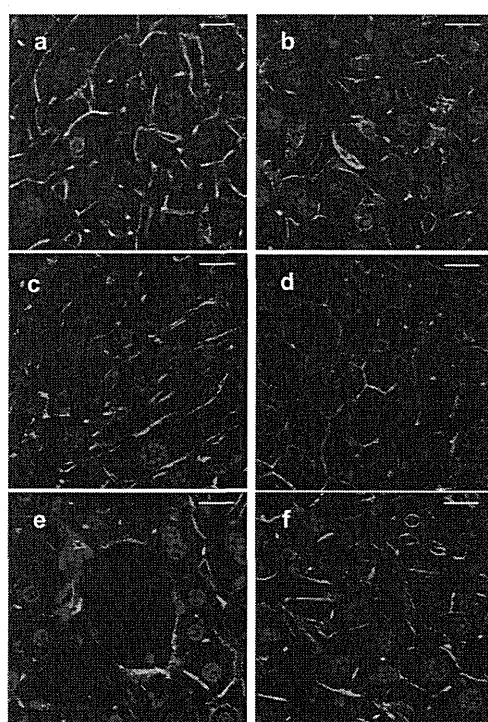


図3. VE-siRNA のマウス大腸投与後の肝移行性に及ぼす各種吸収促進剤の影響。

a. ドコサヘキサエン酸 b. エイコサペンタエン酸 c. カプリン酸ナトリウム d. クエン酸 e. ラウリルマルトシド f. ラブラゾール®

一方、腸管粘膜の組織学的検討及び血液の免疫学的及び生化学的検査から、VE-siRNA の注腸剤投与による副作用は認められなかった。さらに、VE 結合アンチセンスオリゴヌクレオチド (LNA) においても顕著な肝へのデリバリーが観察され、本技術の汎用性が示された。

#### 4. 霊長類における有効性

カニクイザルを用いて、VE-siRNA 含有脂質ナノ分散剤の注腸剤としての投与実験を行った結果、投与した VE-siRNA による標的遺伝子である肝組織中 ApoB 遺伝子発現の抑制効果に基づくと考えられる、血清中のトリグリセリド (TG)、LDL コレステロール (LDLC) の有意な減少、及び HDL コレステロール (HDLC) の上昇が観察された (図4)。

一方、血清中の核酸製剤投与前後に採取した血液サンプルの免疫学的及び生化学的検査から、VE-siRNA 注腸剤投与による顕著な副作用は検出されなかった。

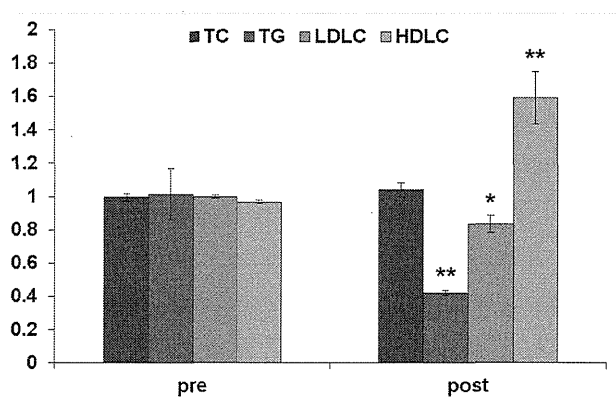


図4 カニクイザルにおける VE-siRNA 脂質ナノ分散剤投与の血清脂質濃度に及ぼす効果. 各個体の投与 1W 前の値を基準として、一回目の核酸投与前のミルク投与直後 (pre) と、二回目の核酸投与一日後 (post) で採血した値を相対値として、pre と post で比較した. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

#### D. 考察

核酸医薬品開発において核酸分子の安定性は重要な課題の一つである。とくに、開発を目指す経腸デリバリーシステムにおいては、核酸分子の血中での安定に加えて、とくに消化管粘膜吸収過程における安定性は、そのデリバリー効率に影響する重要な因子となる。本研究に用いたモデル siRNA は、合成二本鎖核酸分子であり、ホスホロチオエート及び 2'O メチル化により RNase に対して高耐性化修飾されている。しかしながら、消化管における高活性化



RNase に対して安定であるかは不明であった。検討の結果、VE-siRNA は腸粘膜ホモジネート中においても数時間に渡り安定であることが示され、通常吸収に必要と考えられる時間、安定性を保持できることが示唆された。

一方、DLS による詳細な検討の結果、脂肪酸混合ミセル、リンパ液及びカイロミクロン分画とのインキュベーションによって VE 結合核酸分子の会合ミセルに基づく 15nm 付近のピークが消失したことから、VE 結合核酸は、注腸液中では脂肪酸混合ミセルとナノエマルジョン複合体を形成し、また、リンパ中ではリンパ液中のとくにカイロミクロン分画と強く親和して存在することが示唆された。これはマウスの *in vivo* 投与実験において、腸管リンパ管から採取したリンパ液の蛍光相関分光法 (FCS) による評価 (横田及び片岡グループとの共同) において、VE-siRNA がカイロミクロンの拡散速度に相当する粒子分画に存在することを示す結果が得られており、これを支持する結果である。なお、これら VE 結合核酸のリンパ液及びカイロミクロン分画との *ex vivo* インキュベーション液をマウスに静脈投与することによって、著しい肝への選択的集積が認められることを確認している。

開発中の本経腸経リンパ管デリバリーシステムにおいて、リノール酸が検討した吸収促進剤の中で最も優れることが明らかとなった。一方、オレイン酸も高純度品 (日本油脂提供) ではリノール酸に匹敵する効果が得られ、ApoB 遺伝子を標的とする場合は、 $\omega$ -6 系のリノール酸よりも臨床上望ましい選択であると考えられる。これらの脂肪酸含有混合ミセルは、ビタミン E 修飾核酸と会合して LNP を形成するが、本研究により、その粒径が DDS 効率を左右する重要な因子となっていることが明らかとなった。消化管粘膜表層は、粘液層に被覆されており、これらはムコ多糖のような高分子により網目構造なし拡散層を形成している。このため  $\mu$ m オーダーの粒子では腸管上皮細胞層へ至るまでの拡散過程が律速を与えるため、結果に示したように、注腸剤の分散粒子からマイクロサイズの粒子を排除してナノ

粒子として均質化することによって、肝送達性が顕著に改善したものと推察される。ナノ均質化された製剤は、粒子間同士の会合や合一を生じにくく、製剤としての安定性も向上することから、製剤 (調製) 間や投与のタイミングによる変動も抑制されるため、好ましいものと考えられる。一方、製剤の保存温度及び保管期間は粒度分布を変化させるため、効果に影響することも明らかとなった。脂肪酸混合ミセル液の保管温度では、冷蔵保存と比較すると窒素置換後室温保存の方が安定であることが示唆された。

これらの基礎検討結果を踏まえ、臨床への応用を目指して、マウスから霊長類へのアニマルスケールアップを行った。カニクイザルにおける遺伝子治療効果の検討に用いた 30mg/head/回という用量は、マウスの実験において有効であった 10mg/kg/回という用量にほぼ匹敵する用量である。マウスでは、1日3回三日間連続投与で有効性を実証したが、カニクイザルでは、隔日二回という投与スケジュールであったにもかかわらず、血清の中性脂肪の著大な減少、有意な LDLC の減少及び HDLC の増加が認められた。このように、標的遺伝子の抑制に基づくと考えられる有意な薬理効果が霊長類においても実証できたことは、肝臓を標的とする経腸デリバリーシステムとしての本製剤の有用性を強く示唆する結果と考える。

## E. 結論

ビタミン E 結合型核酸の脂質ナノ分散製剤が、肝臓を標的とする核酸分子の画期的な経腸送達治療システムの基盤として有用であることを霊長類において示すことができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし (投稿準備中)。

## 2.学会発表

(国内学会)

1. 車戸祐, 高間雅志, 堀切勇児, 村上正裕. 新規ポーラスマイクロスフィア調製法: 調製条件及び比表面積評価. 日本薬学会近畿支部総会, 京都府, 2013.10.12.
2. 田中規恵, 村上正裕, 仁科一隆, 渡辺知恵, 横田隆徳. 直腸投与による siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012.7.4

(国際学会)

1. Murakami M, Watanabe C, Shimoda H, Matsumoto Y, Miyata K, Kataoka K, Yoshida K, Nishina K, Yokota T. Liver-specific delivery of siRNA achieved by a lipoprotein-mediated transport via the intestinal lymphatic route. Asian Federation for Pharmaceutical Science Conference 2013, Jeju Republic of Korea, 2013.11.22.
2. Murakami M, Watanabe C, Murakami K, Matsumoto Y, Miyata K, Kataoka K, Nishiyama N, Yoshida-Tanaka K, Nishina K, Yokota T. An enteral delivery technique of siRNA for hepatic gene silencing via the lymphatic route. 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Lahaina Hawaii, 2013.12.18.
3. Murakami M, Yokota T. New strategy for enteral oligonucleotide delivery to liver via the lymphatic route and gene silencing. International Symposium on Drug Discovery and Pharmaceutical Sciences, Suzhou, 2012.5.26

出 願 人 : 東京医科歯科大学

発 明 人 : 横田隆徳, 村上正裕, 仁科一隆.

米国出願番号 : 13/817,172 (移行日 : 2013.2.15)

EP 出願番号 : 11817940.7 (移行日 : 2013.3.15)

国際出願番号 : PCT/JP2011/004642

出 願 日 : 2011.8.19

## 2.実用新案登録

なし

## 3.その他

邦文単行本

1. ビタミン E 結合型 siRNA の経腸デリバリーによる肝遺伝子発現の抑制. 村上正裕, 横田隆徳. ドラッグデリバリーシステムの展開 II. シーエムシー出版. 2012; 78-85.

## H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許出願状況

発 明 の 名 称 : 経大腸吸収用医薬組成物

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

研究分担者 和田 猛 東京理科大学薬学部生命創薬科学科

### 研究要旨

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸に選択的に結合し、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性分子として、オリゴジアミノ糖誘導体とカチオン性人工ペプチドをデザイン、合成し、RNA 二重鎖の熱力学的安定化能、ヌクレアーゼ耐性、RNAi 活性に及ぼす影響を評価した。さらに、オリゴジアミノ糖誘導体にビタミン E およびそのアナログを結合した分子を合成し、siRNA と複合体を形成させ、肝細胞特異的なデリバリーを可能にする新規キャリア分子の開発をおこなった。

### A. 研究目的

核酸医薬の経口治療薬の開発を目指し、二本鎖核酸に強く結合し、生体内でその高次構造を安定化し、様々な分解酵素による分解を阻害する人工分子の合成をおこなう。さらに、その分子にビタミン E を結合させ、核酸医薬と複合体を形成させることにより、ビタミン E の代謝経路を利用した肝細胞特異的なデリバリーを可能にする新規 DDS の開発をおこなう。

### B. 研究方法

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループの幅に合致し、核酸のリン酸ジエステル部位の負電荷と効果的に相互作用可能な正電荷を有する分子として、種々の骨格を有するオリゴジアミノ糖誘導体およびカチオン性人工ペプチドを合成し、その物性と機能を評価する。

(倫理面への配慮)

現時点では特に倫理面への配慮は必要ない。

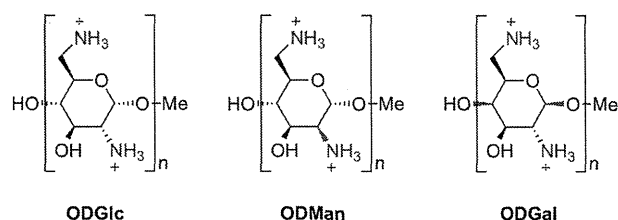
### C. 研究結果

#### 1. オリゴジアミノ糖

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループに結合可能な湾曲した構造を有するオリゴジアミノ糖として、オリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\alpha$ -D-グルコース (ODGlc)、オリゴジアミノ

マンノース (ODMan) およびオリゴジアミノガラクトース (ODGal) の合成を達成した (Fig. 1)。

Fig. 1 湾曲した構造を有するオリゴジアミノ糖



RNA 二重鎖とオリゴジアミノ糖の相互作用を解析するために、自己相補的な塩基配列を有する RNA 二重鎖、r(CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> とオリゴジアミノ糖の複合体を形成させ、*T<sub>m</sub>* 値を測定したところ、オリゴジアミノ糖誘導体の中ではガラクトース骨格を有する ODGal の二重鎖の安定化効果が最も高かった ( $\Delta T_m=11.6^\circ\text{C}$ )。また、CD スペクトルの測定から、これらのオリゴジアミノ糖は RNA 二重鎖が A 型らせん構造を維持したまま結合することがわかった。

次に、同様の塩基配列を有する RNA オリゴマーの 5'-末端に蛍光基としてフルオレセインを導入し、蛍光異方性測定により、カチオン性ペプチドと RNA 二重鎖の解離定数 (*K<sub>d</sub>* 値) を測定した。*T<sub>m</sub>* で最も二重鎖の安定化効果が高かったガラクトース骨格を有する ODGal の *K<sub>d</sub>* 値は  $0.01\ \mu\text{M}$  以下であり、RNA

二重鎖に対して極めて強く結合することが示された。Table 1 に  $\Delta T_m$  と  $K_d$  値をまとめて示す。

Table 1 オリゴジアミノ糖と

(rCGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> の相互作用 ( $T_m$  測定は 3 当量のオリゴジアミノ糖を使用)

Diamino sugar	$\Delta T_m$ (°C)	$K_d$ (x 10 <sup>-6</sup> M)
ODGlc (4mer)	7.0	0.011
ODMan (4mer)	4.3	0.15
ODGal (4mer)	11.6	< 0.01
Neomycin B	4.9	0.091

次に、RNA 二重鎖、r(CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> と 3 量体または 4 量体の ODGal (1 当量) の複合体を形成させ、二本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼである RNase A で処理した後に、逆相 HPLC によって加水分解生成物を解析した。その結果、dsRNA 単独では完全に分解される条件で、ODGal 3 量体は dsRNA の分解をほとんど抑制できなかったが、ODGal 4 量体は顕著に dsRNA の分解を抑制した。

siRNA の肝細胞特異的なデリバリーを目指し、オリゴジアミノグルコースと同様な湾曲した構造を有し、A 型核酸二重鎖との高い結合親和性が期待できる 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシガラクトースが  $\beta$  グリコシド結合により連結したオリゴマー (3 糖) にビタミン E アナログが共有結合した分子の合成を検討した (Fig.2)。

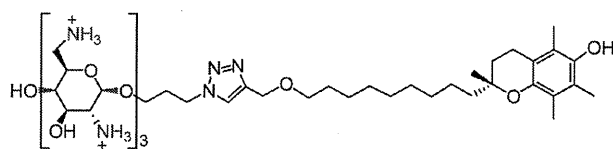


Fig. 2 ビタミン E アナログが結合した ODGal 誘導体

保護基の検討や反応条件の最適化をおこなうことにより、目的とするビタミン E が結合したオリゴジアミノガラクトース誘導体の合成を達成した。これ

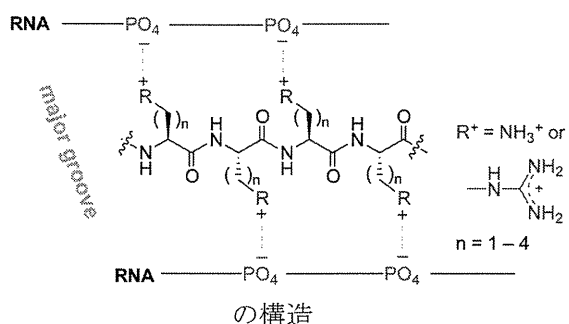
らの誘導体は、オリゴジアミノグルコース誘導体と同様に、RNA 二重鎖に結合し、それらを安定化する効果を有することが確認できた。

## 2. カチオン性オリゴペプチド

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループに結合可能なカチオン性分子として、Fig 3 に示す、アミノ基またはグアニジノ基を有し、側鎖メチレン長が 1~4 のオリゴペプチド (カチオン性残基数=8) の合成を達成した。

RNA 二重鎖とカチオン性オリゴペプチドの相互作用を解析するために、自己相補的な塩基配列を有する RNA 二重鎖、r(CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> とカチオン性ペプチドの複合体を形成させ、 $T_m$  値を測定したところ、アミノ基を有するオリゴペプチドの中では L-2,4-ジアミノブタン酸オリゴマー (Dab<sub>8</sub>) が  $\Delta T_m=14.0$  °C、グアニジノ基を有するものでは 2-アミノ-4-グアニジノブタン酸オリゴマー (Agb<sub>8</sub>) が  $\Delta T_m=16.2$  °C と二重鎖の安定化効果が最も高かった。先行研究で我々が開発したオリゴジアミノガラクトース (ODGal) は、同様の条件下で 11.6 °C の  $T_m$  値の上昇であったことから、カチオン性ペプチドの RNA 二重鎖に対する安定化の効果が大きいことが確認された。また、CD スペクトルの測定から、これらのカチオン性ペプチドは A 型 RNA 二重鎖の高次構造に変化を与えないこともわかった。

Fig. 3 RNA 二重鎖に結合するカチオン性ペプチド



次に、同様の塩基配列を有する RNA オリゴマーの 5' 末端に蛍光基としてフルオレセインを導入し、蛍光異方性測定により、カチオン性ペプチドと RNA

二重鎖の解離定数 ( $K_d$  値) を測定したところ、Dab<sub>8</sub>、Agp<sub>8</sub>それぞれの  $K_d$  値は  $0.071 \mu\text{M}$ 、 $0.046 \mu\text{M}$  であり、既知の RNA 結合性タンパク質と同等の値を示し、RNA 二重鎖に対して強く結合することが示された。

次に、ApoB1 を標的とする siRNA (21 量体) に対し、1、3、5 当量のカチオン性ペプチドを添加して複合体を形成させ、二本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼである RNase A で処理した後に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって残存する siRNA をエチジウムブロミド染色によって検出した。siRNA 単独では完全に分解される条件でも Dab<sub>8</sub>、Agp<sub>8</sub>が存在する場合には当量依存的に siRNA の分解が抑制されることが確認できた。

最後に、カチオン性ペプチドが RNAi 活性に及ぼす影響について調べた。ApoB1 を標的とする siRNA を用い、1、3、5 当量のカチオン性ペプチドを添加して複合体を形成させ、ラット肝がん細胞 McA-RH7777 にリポフェクタミンを用いて siRNA-ペプチド複合体を導入し、RNAi 活性を測定した。Dab<sub>8</sub>は 1 当量から 3 当量まで添加してもカチオン性ペプチド非存在下の活性と同等であったのに対し、Agp<sub>8</sub>では当量依存的に RNAi 活性の低下が観測された (Fig. 4)。Agp<sub>8</sub>は siRNA により強く結合するため、RNAi の活性が阻害されたと考えられる。

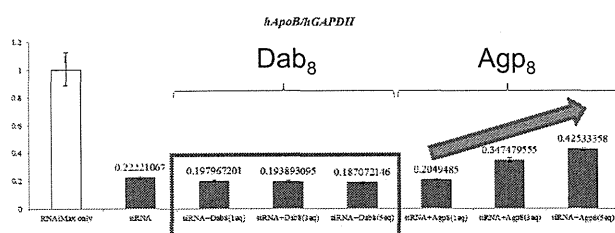


Fig. 4 ペプチド複合体 (1, 3, 5 当量) の RNAi 活性

#### D. 考察

合成したオリゴジアミノ糖誘導体の中で、ガラクトース骨格を有する ODGal が最も強く二本鎖 RNA に結合し、その熱力学的安定性を向上させることがわかった。特に、ODGal 4 量体は顕著に RNase A による dsRNA の分解を抑制した。

一方、本研究で合成したカチオン性ペプチド、

Dab<sub>8</sub> と Agp<sub>8</sub> は、二本鎖 RNA の熱安定性を顕著に向上させることがわかった。これらのペプチドが二本鎖 RNA に結合することにより RNase A 耐性が獲得されるが、特に Dab<sub>8</sub> の場合、RNAi 活性は阻害しないことが示された。Dab<sub>8</sub> は二本鎖 RNA 結合性タンパク質と同等の結合親和性を有するため、RNase の結合を阻害するが、RISC 形成は阻害しないと考えられる。一方、siRNA に対してより強い結合親和性を有する Agp<sub>8</sub> は、過剰量用いた場合に RISC 形成を阻害するために、RNAi 活性が低下したと考えられる。

#### E. 結論

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸に選択的に結合し、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性分子として、オリゴ糖誘導体としては、ガラクトース骨格を有する誘導体 (ODGal) が、オリゴペプチド誘導体としては、ジアミノブタン酸骨格を有する誘導体 (Dab) が最も優れた性質を有することが示された。今後、これら誘導体を用いた siRNA 経口治療薬の開発が大いに期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究で合成したオリゴ糖誘導体、オリゴペプチド誘導体やビタミン E 誘導体は極めて生体適合性の高い分子であると考えられるが、新規化合物であり、今後細胞毒性や安全性に関する試験を適宜おこなう必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Uehara S, Hiura S, Higashida R, Oka N, Wada T. Solid-phase synthesis of p-boronated oligonucleotides by the h-boranophosphate method. *J Org Chem* 2014; 79: 3465-3472.
2. Saito K, Wada T. 3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) as a condensing reagent

- for solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 1991-1993.
3. Iwata R, Nishina K, Yokota T, Wada T. Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 1394–1403.
  4. Noro M, Fujita S, Wada T. Stereoselective Synthesis of P- Modified  $\alpha$ - Glycosyl Phosphates by the Oxazaphospholidine Approach. *Org Lett* 2013; 15: 5948–5951.
  5. Ohmuro-Matsuyama Y, Nakano K, Kimura A, Ayabe K, Ihara M, Wada T, Ueda H. A protein-protein interaction assay based on the functional complementation of mutant firefly luciferases. *Anal Chem* 2013; 85: 7935-7940.
  6. Oka N, Tatsumi S, Matsumura F, Wada T. Glycosylation of alcohols using glycosyl boranophosphates as glycosyl donors. *Tetrahedron Lett* 2013; 54: 3731-3734.
  7. Oka N, Murakami R, Kondo T, Wada T. Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluorous tag. *J Fluor Chem* 2013; 150: 85-91.
  8. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis of novel oligo cationic peptides binding to RNA duplexes. *Peptide Science* 2013; 2012, 23-24.
  9. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis and properties of cationic oligopeptides with different side chain lengths that bind to RNA duplexes. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 1717–1723.
  10. Nukaga Y, Yamada K, Ogata T, Oka N, Wada T. Stereocontrolled solid-phase synthesis of phosphorothioate oligoribonucleotides using 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)- nucleoside 3'-O-oxazaphospholidine monomers. *J Org Chem* 2012; 77: 7913–7922.
  11. Iwamoto N, Oka N, Wada T. Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribo- nucleoside boranophosphates by an oxazaphospholidine approach using acid-labile N-protecting groups. *Tetrahedron Lett* 2012; 53: 4361–4364.
  12. Oka N, Takayama Y, Ando K, Wada T. Synthesis of nucleoside 5'-borano-phosphorothioate derivatives using an H-boranophosphonate monoester as a precursor. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 4571–4574.
  13. Oka N, Sato K, Wada T. Recent progress in the synthesis of glycosyl phosphate derivatives. *Trends in Glycosci Glycotechnol* 2012; 24: 152-168.
  14. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis of novel oligocationic peptides which bind to A-type nucleic acid duplexes. *Peptide science* 2011 2012; 231-232 .
  15. Iwata R, Sudo M, Nagafuji K, Wada T. Synthesis of Oligodiaminosaccharides Having  $\alpha$ -Glycoside Bonds and Their Interactions with Oligonucleotide Duplexes. *J Org Chem* 2011; 76: 5895–5906.
  16. Arai K, Uchiyama N, Wada T. Synthesis and properties of novel 2'-O-alkoxymethyl-modified nucleic acids. *Bioorg. Med Chem Lett* 2011; 21: 6285-6287.
  17. Uchiyama N, Ogata T, Oka N, Wada T. Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate-promoted Reductive 2'-O-arylmethylation of Ribonucleoside Derivatives. *Nucleos. Nucleot Nucl Acids* 2011; 30: 446-456.
  18. Oka N, Wada T. Stereocontrolled synthesis

of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. Chem Soc Rev 2011; 40: 5829-5843.

## 2.学会発表

(国内学会)

1. 和田猛, 伊藤弘暁, 首藤智仁, 植原渉.  
2'-O-CEM 保護 H-ボラノホスホネート法によるボラン修飾型 RNA 類縁体の固相合成. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.30.
2. 前田雄介, 岩田倫太朗, 和田猛. 核酸医薬を標的とした新規カチオン性人工ペプチドの合成. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.30.
3. 濱村友香, 額賀陽平, 和田猛. リン原子修飾型核酸の立体選択的合成のための新規保護基の開発. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
4. 岩田倫太朗, 和田猛. A 型二重鎖核酸結合性オリゴジアミノガラクトースの合成とその性質. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
5. 齋藤敬太, 和田猛. ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いたペプチド固相合成法の開発. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
6. 和田猛. 核酸医薬への合成化学的アプローチ. 第 25 回歯工学連携講演会, 福岡県, 2014.1.22.
7. 影山雅幸, 新井浩一郎, 内山直樹, 和田猛. 新規 2'-O-ハロエトキシメチル RNA の合成と性質. 第 23 回アンチセンスシンポジウム, 徳島県, 2013.11.28.
8. 植原渉, 日浦進吾, 東田廉平, 岡夏央, 和田猛. Synthesis of Boron-Containing Antisense Molecules by the H-Boranophosphonate Method. 第 40 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2013 The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013, 神奈川, 2013.11.13.
9. 藤巻春奈, 前田雄介, 和田猛. Synthesis of Novel Cationic  $\beta$ -Hairpin Peptides which Bind to Nucleic Acid Duplexes. 第 50 回ペプチド討論会及び 4th Asia-Pacific international Peptide Symposium, 大阪, 2013.11.7.
10. 前田雄介, 岩田倫太朗, 和田猛. Synthesis and Properties of Novel Oligocationic Peptides which Bind to A-type Nucleic Acid Duplexes. 第 50 回ペプチド討論会及び 4th Asia-Pacific international Peptide Symposium, 大阪, 2013.11.7.
11. 野呂美穂子, 藤田正一, 和田猛. リン原子修飾糖 1-リン酸誘導体の立体選択的合成. 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪, 2013.8.7.
12. 和田猛. New synthetic strategies for RNA drugs. 第 15 回 RNA ミーティング, 愛媛県, 2013.7.25.
13. 和田猛. リン原子修飾核酸医薬の立体制御. Symposium on Innovative Research at KUT Part 1, 高知県, 2013.7.19.
14. 和田猛. 有機合成で創り出す核酸医薬への新しいアプローチ. 第 23 回万有福岡シンポジウム, 福岡県, 2013.6.1.
15. 和田猛. リン原子修飾核酸医薬の立体制御. 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けた Strategy, 品川, 2013.4.26.
16. 土井明子, 岩田倫太朗, 和田猛. 核酸二重鎖結合性オリゴジアミノマンノースの合成とその性質. 日本化学会第 93 春季年会, 草津, 2013.3.23.
17. 前田雄介, 岩田倫太朗, 和田猛. RNA 二重鎖を認識する新規カチオン性人工ペプチドの合成. 日本化学会第 93 春季年会, 草津, 2013.3.23.
18. 額賀陽平, 竹下文隆, 落谷孝広, 和田猛. 2'-O-CEM 基を有するオキサザホスホリジンモノマーを用いた PO/PS キメラオリゴリボヌクレオチドの立体選択的合成. 日本化学会第 93 春季年会, 草津, 2013.3.24.
19. 前田雄介, 岩田倫太朗, 和田猛. Synthesis of novel oligocationic peptides which bind to RNA duplexes. 第 39 回国際核酸化学シンポ

- ジウム, 名古屋, 2012.11.15.
20. 植原渉, 日浦信吾, 東田廉平, 岡夏央, 和田猛. Solid-phase synthesis of boron-containing DNA analogues by the H-boranophosphonate method. 第39回国際核酸化学シンポジウム, 名古屋, 2012.11.15.
  21. 和田猛, 影山雅幸, 新井浩一郎, 内山直樹. Synthesis and properties of 2'-O-haloethoxymethyl RNA. 第39回国際核酸化学シンポジウム, 名古屋, 2012.11.15.
  22. 和田猛. 医薬品を志向した機能性キラル核酸の創成. 第40回バイオインターフェース, 東京, 2012.11.12.
  23. 前田雄介, 岩田倫太郎, 和田猛. Synthesis of novel oligocationic peptides binding to RNA duplexes. 第49回ペプチド討論会, 鹿児島, 2012.11.7.
  24. 岩田倫太郎, 和田猛. ビタミンE修飾型RNA二重鎖結合性オリゴジアミノ糖の合成と性質. 日本化学会第92春季年会, 横浜, 2012.3.25.
  25. 中山太, 岩田倫太郎, 和田猛. siRNAの肝細胞特異的デリバリーを指向したビタミンE結合型ネオマイシン誘導体の合成. 日本化学会第92春季年会, 横浜, 2012.3.25.

(国際学会)

1. Wada T. Stereocontrolled synthesis and properties of P-chiral oligonucleotides. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society 2012, Boston, 2012.10.29.
2. Iwata R, Hirochi S, Kuwahara H, Nishina K, Yokota T, Wada T. Construction of covalent and noncovalent  $\alpha$ -tocopherol-siRNA conjugates toward liver delivery of RNAi drugs. 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011, Hokkaido, 2011.11.9.

3. Wada T. Synthesis of oligodiaminosaccharides binding to A-RNA duplexes. Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids 2011, China, 2011.10.15.

#### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許出願

発明の名称:  $\beta$ -Hairpin Peptides Which Bind to Nucleic Acid Duplexes.

出願人: 東京医科歯科大学, 東京理科大学

発明人: 和田猛, 前田雄介, 横田隆徳, 仁科一隆.

米国出願番号: US 61/888,200.

出願日: 2013.10.8.

発明の名称: ボラノホスフェート化合物、及び核酸オリゴマー.

出願人: 東京理科大学

発明人: 和田猛, 植原渉.

出願番号: 特願 2013-234384

出願日: 2013.11.12.

発明の名称: 二重鎖核酸結合剤、当該結合剤-二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法.

出願人: 東京医科歯科大学, 東京理科大学.

発明人: 和田猛, 前田雄介, 横田隆徳, 仁科一隆.

国際出願番号: PCT/JP2014/5785

出願日: 2014.3.20

発明の名称: 二重鎖核酸結合剤、当該結合剤-二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法.

出願人: 東京医科歯科大学

発明人: 横田隆徳, 仁科一隆, 和田猛,



前田雄介.

出願番号：2013-057521

出願日：2013.3.21

和田猛, 額賀陽平. 中性条件下除去可能な 2' -水酸基保護基を用いる RNA の製造法.

US61/600,095 東京大学, 2.19, 2012

#### 1.特許出願

1) 和田猛, 額賀陽平. 中性条件下除去可能な 2' -水酸基保護基を用いる RNA の製造法.

US61/600,095 東京大学, 2.19, 2012

2) 横田隆徳、仁科一隆、和田猛、前田雄介、二重鎖核酸結合剤、当該結合剤-二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法. 特願 2013-057521、東京医科歯科大学、2013年3月21日出願

3) 和田猛, 前田雄介, 横田隆徳, 仁科一隆.  $\beta$ -Hairpin Peptides Which Bind to Nucleic Acid Duplexes. US 61/888,200, 東京医科歯科大学, 東京理科大学, 10.8, 2013

4) 和田猛, 植原渉. ボラノホスフェート化合物、及び核酸オリゴマー. 特願 2013-234384, 東京理科大学, 11.12, 2013

5) 和田猛, 前田雄介, 横田隆徳, 仁科一隆. 二重鎖核酸結合剤、当該結合剤-二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法. PCT/JP2014/5785, 東京医科歯科大学, 東京理科大学, 3.20, 2014

#### 2.実用新案登録

#### 3.その他

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

研究分担者 小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科

### 研究要旨

本研究グループでは核酸医薬の経口投与を可能とする基盤技術の開発を目指し、1) 核酸医薬の薬物動態を評価するための技術構築を進め、ELISA 法を応用した *in vivo* 系でのアンチセンス核酸 (ASO) 定量法を構築した。また、2) ASO に脂質を結合することによる有効な核酸デリバリー技術の開発を検討し、通常一本鎖である ASO に相補鎖核酸 (cRNA) をハイブリダイズさせた新規の二本鎖 ASO (dsASO) の開発に成功した。さらに、3) 腸管環境をミミックした核酸のヌクレアーゼ耐性評価系を利用し、化学修飾型 cRNA 及び ASO の安定性を評価した。これらの研究は、横田グループ (東京医科歯科大学)、村上グループ (大阪大谷大学) との密な連携のもと遂行し、新たな核酸創薬手法の構築につながった。

### A. 研究目的

核酸医薬は、難病や稀少疾患にも応用可能な創薬技術として期待されており、精力的に研究が進められてきた。核酸は他のバイオ医薬とは異なり、幅広い有機合成化学の技術が利用できる点で、核酸自身の構造を有機化学的に様々に改変することや、多様な機能を有する化合物をコンジュゲートすることが容易で、アンチセンス核酸 (ASO) を“高機能化”することが可能である。我々は、これまでに数多くの化学修飾型人工核酸を開発し、優れた機能性を発揮する架橋型人工核酸 (2',4'-BNA/LNA、以下 LNA) を見いだすことに成功している。

核酸医薬の薬効をコントロールし、機能のさらなる補完のためには、薬物動態に関する情報を収集することが非常に重要である。しかしながら、これまで核酸の体内動態に関する情報やそれを評価する手段は殆どなかった。そこで我々は、ASO の体内動態を正確に評価するための評価技術の構築を目指した。従来の ASO の体内動態評価には非常に大掛かりな装置・設備が必要であり、高度な専門知識も要求される。それにも関わらず、評価限界は決して高いとは言えない。そこで本研究では、まず簡便にかつ広

い測定範囲の定量が可能な ELISA 法に注目し、本法を応用した測定系の構築を試みた。

一方、過去に行われてきた siRNA の研究において、ビタミン E を初めとした脂質を核酸に結合させることで肝への顕著な集積性が獲得され、肝特異的なデリバリーが可能となることが報告されている。それにより必要投与量が減少し、より効果的かつ安全な siRNA の全身投与を可能となる。この方法を ASO に応用すべく、我々は ASO の 3'末端に脂質を結合したが、その脂質がアンチセンス効果を直接阻害して有効性が得られなかった。そこで通常一本鎖核酸である ASO に相補鎖 RNA (cRNA) を結合させた dsASO を着想した。この方法は、相補鎖に脂質結合等の様々な誘導分子を結合させることで臓器特異的な送達を可能にするものと期待される。この dsASO の有効性を確認して最適化すること、dsASO の特にデリバリーに関するメカニズムを解明することを目標に横田グループ (東京医科歯科大学) と共同で検討を進めた。

その結果、この dsASO は、通常的一本鎖 ASO に比べ極めて高い有効性が認められたが、その薬効のさらなる向上、さらに本法の経口遺伝子治療への応

用のためには、ASO 鎖のみならず cRNA 鎖についても生体内における安定性の付与が必要不可欠となる。とりわけ、経口投与において注意しなくてはならないのが、腸管にて RNA 分解に関わるとされている RNase A と呼ばれるヌクレアーゼである。そこで横田グループ（東京医科歯科大学）、村上グループ（大阪大谷大学）との共同研究のもと、村上グループにて開発された腸管環境をミミックした核酸のヌクレアーゼ耐性評価系を利用し、数種の化学修飾型 cRNA の安定性評価を実施した。

## B. 研究方法

### 1) 核酸医薬の薬物動態評価に関する研究

#### 1-1) ELISA 法における検量線の作成

材料：2',4'-BNA/LNA搭載型ASOと、それに相補的な3'位ビオチン化したDNA（5'-gaatagcgaggataatgtgctatgagccc-3'）をtemplate DNA、5'位及び3'位をそれぞれリン酸化及びジゴキシゲニン化したDNA（5'-tcgctattc-3'）をprobe DNAとした（表1）。これらの修飾DNAは日本バイオサービスから購入した。

表 1 使用配列

Sequence ID	Sequence
antisense oligonucleotide	5'-GsgsgsCsTsCsastsasgscsas CsasTsTsasTsCsc-3'
template DNA	5'-qaatagcggaggataatgtgctatgagccc-3'
probe DNA	5'-tcgctattc-3'

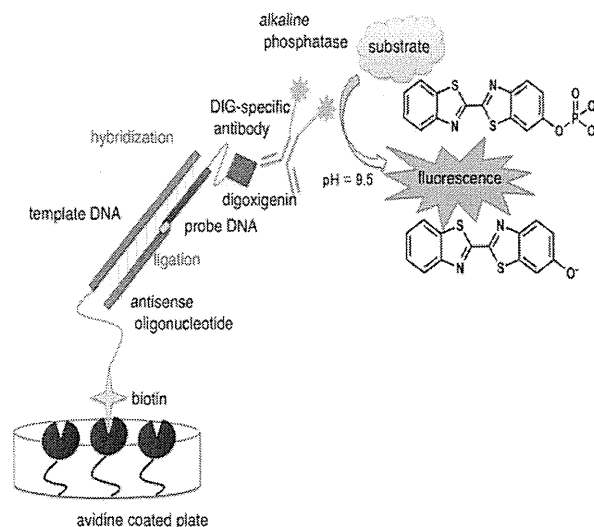
大文字：2',4' BNA/LNA 小文字：DNA  
s: ホスホロチオアート

Reacti-Bind NeutrAvidincoated polystyrene strip plates (Thermo Fisher Scientific, Cat#436015) をサーモフィッシャーより購入した。TemplateDNA をバッファー（60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 0.9 M NaCl, and 0.24% Tween 20) に溶解し、100nMとした。LigationProbeと1.5 units/wellのT4 DNA ligase (TaKaRa, Cat#2011A)をバッファー（66mM Tris-HCl (pH7.6), 6.6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.1mM ATP) に溶解し、200nMに調製した。洗浄

バッファー（25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.15 M, NaCl, 0.1% Tween 20) を準備した。抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ抗体 (Roche, Cat#1093274) を1:2000の割合でSuperBlock blocking buffer (Pierce, Cat#37515) を用いて希釈した。アルカリフォスファターゼの基質として250 μMのCDP-Star (Roche, Cat#1685627) を使用した。

方法：2mLチューブに凍結肝臓切片、1mLのPBS及びビーズ（φ = 5 mm, Irie）を添加し、TissueLyserIIを用いて2分間破碎した。総タンパク質量をBIO RAD DC Protein Assayを用いて定量し、一定量加えて検量線を128 pM から400 nMの範囲内で10点とった。

図 1 ELISA 系の原理の概略



次に templateDNA 溶液（100μL）及び10μLの検量線サンプル及び肝臓抽出液を96wellのマイクロプレートに加え、37°Cで1時間インキュベーションした。その後、200μLの洗浄バッファーで3回洗浄した。続いてLigationProbeを100μL加え、15°Cで3時間インキュベーションした。その後、200μLの洗浄バッファーで3回洗浄した。2さらに100μLの抗体ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ抗体を加え37°Cで1時間インキュベーションした。3回洗浄した後、100μLのCDP-Star溶液を加え、1秒後にCentro XS3 luminometer (Berthold)を用いて発光強度を測定した（図1）。

## 1-2) ELISA 法の同時再現性の検証

ASO 未処置の C57BL/6J マウスより摘出した肝臓の凍結切片を先と同様に破碎し、タンパク質濃度を測定した。段階希釈した濃度既知の ASO (0.128 ~ 400 nM) を一定量のマウス肝臓ホモジネートに加え、本 ELISA 法を用いて、蛍光強度を測定した。各濃度のサンプルを複数 (n=8) 用いて測定を行い、その結果から真度と精度を求めた。

## 1-3) 投与量及び組織蓄積量の検討

被験動物として6週齢のマウスC57BL/6J (♂:日本クレア) を各投与群で例数5匹となるように準備した。負荷の後、0日目に採血して、ASOを静脈内より単回投与した (5-70mg/kg/回)。その後72時間後に絶食下に於いて尾静脈より採血を行なった。マウスを麻酔後、PBSで下大静脈より灌流し、肝臓を採取、PBSで洗浄した後、細切し、液体窒素で瞬間凍結した後、-80℃にて保存した。凍結した肝臓の切片を1mLのTRIzol Regent (Invitrogen, Cat#15596018) 内でホモジナイズし、クロロホルム200µLを加えた後、13,200rpm、4℃にて15分間遠心した。上清220µLをイソプロパノール400µLに添加して転倒混和し、13,200rpm、4℃にて15分間遠心した後、イソプロパノールを除去した。次いで、75%エタノール800µLを加えた後、13,200rpm、4℃にて5分間遠心した。Total RNAを含む沈殿をRNAフリー水 (Water, DEPC treated, RNase tested; ナカライテスク) 80µLに溶解した。抽出したTotal RNAを分光光度計で定量し、RNAの存在を1%アガロースゲル電気泳動で確認した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いてTotal RNA10µgからcDNAを作製した。得られたcDNAをTaqMan® Gene Expression Master Mixを用いてリアルタイムPCRを行い、標的のmRNA量を定量した。

## 2) dsASO の開発研究

### 2-1) dsASO の作成

マウスアポリポ蛋白 B (apoB) を標的とした LNA-DNA gapmer 型の 13 塩基からなる一本鎖 ASO (ssASO) と、それと相補の配列を持つ 5' 末端に

ビタミン E を結合させた cRNA (VE-cRNA) を合成した。下に配列及びその核酸化学修飾を示す。

ASO: 5'-GsCsaststsgsgstastsTsCsA-3'

(大文字: LNA、小文字: DNA、s: 核酸間 S 化)

Toc-cRNA: 5'-Toc-usgsasAUACCAAUsgsc-3'

(大文字: RNA、小文字: 2'-OMe RNA、s: 核酸間 S 化)

上記を 95℃ で 5 分、その後 37℃ で 1 時間静置し、両者をハイブリダイズさせてビタミン E 結合 dsASO (VE-dsASO) を作成した。また ssASO の 5' 末端にビタミン E を直接結合させた VE-ssASO も合成した。

## 2-2) マウスにおける VE-dsASO の標的遺伝子発現抑制効果の評価

実験には、6~8 週令の ICR マウスを使用した。尾静脈から核酸を静注投与し、3 日後に採血した。その後冷却した生理食塩水にて脱血還流を施し、臓器を摘出した。組織及び血液サンプルを用いて、定量的 RT-PCR、血液検査等の各評価に供した。

## 2-3) 生体内での VE-dsASO の分布

蛍光標識した ssASO と VE-dsASO を同様に投与し、生体イメージングシステム IVIS imaging system (Xenogen Corp., Hopkinton, MA) を用いて生体内での VE-dsASO の分布を観察した。

## 3) 生体内安定性を高めた cRNA の創成研究

### 3-1) RNaseA 耐性を付与した cRNA の設計

RNaseA は通常一本鎖の RNA をピリミジンの 3' 末端にて切断することが知られている。そこで、cRNA 鎖に含まれるピリミジン鎖に対する化学修飾を種々検討することとした。通常、核酸の酵素耐性能を高めるためには、リン酸ジエステル結合をホスホロチオアート化する事が定法とされている。また、このホスホロチオアート化核酸については、すでに臨床応用もされており、一定の安全性が知られている。このホスホロチオアート化に加え、ヌクレオシドの 2' 位修飾をあわせて検討した。すなわち、これまでにアプタマー医薬の素子としても利用されている 2'-F 体及び 2'-OMe 体を配列に導入することとした。マウスアポリポ蛋白 B (apoB) を標的とした