

核酸医薬の送達を指向したフルオロアルキル修飾ミセルの開発

Fluoroalkyl-modified Nanoparticles as Stabilized Nanocarriers for Oligonucleotide Therapeutics

野呂美穂子*・内藤瑞**・原倫太郎***・横田隆徳***・宮田完二郎**

Mihoko Noro, Mitsuru Naito, Rintaro Hara,
Takanori Yokota, and Kanjiro Miyata

核酸医薬は、近年注目を集める創薬モダリティである。この分野の大きな課題の1つは薬物送達技術の向上であり、今後のさらなる実用化拡大に向けて、標的臓器や組織へ効率的に集積する薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム；DDS）の開発が必要とされている。

本研究では、上記の課題を解決するため、高分子材料を基盤とするDDSの開発を行った。具体的には、既存技術の1つとして知られるポリイオンコンプレックス（PIC）ミセル型DDSの安定性向上の手段として、多フッ素化合物（Rf化合物）が多数集まった際に生じる相互作用によるミセルコアの安定化を着想し、側鎖にRf基が導入されたカチオン性ポリマーを用いてPICミセルを調製した。合成したRf修飾ポリマーは、オリゴ核酸との間で期待どおりにミセル粒子を形成し、*in vivo* 血中安定性試験の結果、Rf基を持たないミセルと比較して、Rf修飾ミセルは高い血中安定性を示すことが明らかとなった。また、ポリマーだけでなくオリゴ核酸にもRf基を導入することで、より一層高い安定化効果が得られることがわかった。これらの結果から、Rf修飾ミセルが核酸医薬のための有望なDDSとなる可能性が示唆された。

Recently, the field of oligonucleotide therapeutics has made remarkable progress with the aid of the development of the drug delivery system (DDS). It has helped to overcome the undesired distribution of oligonucleotides in the body caused by their instability in the bloodstream and lack of targeting ability, which has been one of the essential problems in this field.

For oligonucleotide therapeutics, Polyion complex (PIC) micelles are promising nanomedicine, but their stability in the bloodstream needs to be improved for increased therapeutic efficacy. In this study, we developed the fluoroalkyl (Rf)-modified PIC micelle as a nanocarrier for effective nucleic acids delivery. The PIC micelles reported here were designed to stabilize a micelle core by the interaction between Rf groups in addition to the electrostatic interaction. Specifically, the Rf groups were introduced into the side chains of the cationic polymer component of PIC micelles. The Rf-modified polymers and oligonucleotides successfully formed PIC micelles. Additionally, blood circulation tests showed significantly higher stability of Rf-modified PIC micelles compared to those without Rf moieties in the bloodstream. We also found a synergistic stabilizing effect by introducing the Rf group into both cationic polymers and oligonucleotides. These results suggested that Rf-modified PIC micelles are potential oligonucleotide nanocarriers.

*AGC株式会社 技術本部 材料融合研究所 (mihoko.noro@agc.com)

**東京大学 大学院工学系研究科 (naito@bmw.tu-tokyo.ac.jp, miyata@bmw.tu-tokyo.ac.jp)

***東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野 (tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp, haranuro@tmd.ac.jp)

1. 緒言

核酸医薬は、DNAやRNA等の誘導体を基本骨格とする医薬品であり、低分子医薬品や抗体医薬品等の従来医薬品が標的とすることのできない、遺伝子発現の様々なプロセスに作用し、従来医薬品とは異なるメカニズムで効果を発現する。これにより、従来医薬品では治療困難とされてきた癌や遺伝性疾患等の種々の疾患への適用が強く期待される。

その一方で核酸医薬には、標的への送達の過程に課題がある。具体的には、血中安定性の向上、標的臓器・組織への送達、細胞内取り込みの効率化が必要であり、適切な送達技術（ドラッグデリバリーシステム；DDS）の開発が必要不可欠である¹。

2017年以前に承認された核酸医薬は、血中安定性（分解酵素耐性）向上を主な目的とする化学修飾を施したオリゴ核酸をそのまま投与するものであったが、2018年以降、従来の化学修飾と、DDS技術を組み合わせた核酸医薬が次々と実用化されている。2018年に承認されたPatisiranではオリゴ核酸を内包する脂質ナノ粒子製剤の技術が、2019年から2022年にかけて承認されたGivosiran、Lumasiran、Inclisiran、Vutrisiran²では標的指向性のある機能性分子をオリゴ核酸に結合したりリガンドコンジュゲート製剤の技術が採用されており、オリゴ核酸を標的組織に送達するためのDDS技術の実用化が加速している。

アニオン性であるオリゴ核酸と、カチオン性の脂質やポリマーとの静電的相互作用により形成される複合体（ポリイオンコンプレックス；PIC）は、ナノ粒子型DDS製剤の一種であり、吸着性エンドサイトーシスを介して細胞内への移行を促進することが知られる³。さらに、脂質やポリマーの末端に予め機能性リガンドを導入することにより、生体親和性や標的組織指向性等の機能をPICミセルに付与することも可能である。

表層がポリエチレングリコールで覆われたPIC（PICミセル）の血中滞留性は、オリゴ核酸単体と比較すると高いことが知られるものの、全身投与で効率的にオリゴ核酸を標的組織や臓器に送達・蓄積するためにはさらなる改善が必要とされている。血流中でのPICミセルの不安定化の主な要因は、血中や血管内皮等に存在するアニオン性生体高分子が、PICの構成成分であるカチオン性成分との間で相互作用するためである。この相互作用によりPICミセルの解離が生じ、オリゴ核酸はPICミセルから放出されてしまう（カウンターアニオン交換反応）。このため、PICミセルの血中安定性向上には、静電的相互作用以外の相互作用により複合体を補強する仕組みの導入が望まれる⁴。

このような背景の下、著者らは多フッ素化合物（Rf化合物）が集合体となった際に互いに親和性を発現する性質に着目し、その相互作用によりミセルの安定性を向上させるという着想に至った。Rf基の相互作用を利用してミセルコアを安定化する試みは、2016年、2017年にYouら、2018年にChengらからも報告されている⁵。

次項以降で具体的な材料設計を詳述する。

2. 材料設計指針と合成・調整手順

2.1. 材料設計指針

Rf基の相互作用により安定性が強化されたPICミセルを構築するにあたり、以下のような、側鎖にRf基を有するカチオン性ポリマーを設計した（Fig. 1）。

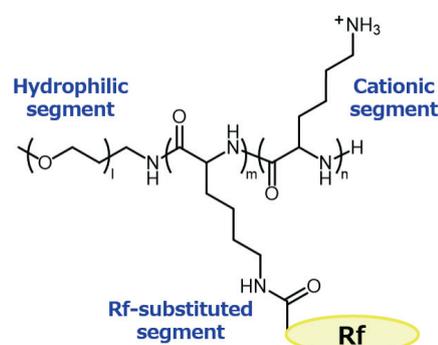


Fig. 1 Chemical structure of Rf-substituted cationic polymer.

それぞれのセグメントに期待する機能は以下のとおりである。

- 親水性セグメント

複合体表面を覆うことによる生体適合性の向上・複合体の安定化

- カチオン性セグメント

オリゴ核酸との静電的相互作用による薬剤担持

- Rf修飾セグメント

Rf基の相互作用による複合体の安定性向上

尚、図中ではカチオン性セグメントとRf修飾セグメントがそれぞれ連続したブロックを形成するような表記となっているが、実際には両セグメントがランダムに並んだポリマーとなっていることが予想される。

2.2. カチオン性ポリマーの合成

本研究で設計したカチオン性ポリマーである、Rf修飾ポリエチレングリコール-ポリ（L-リシン）ブロック共重合体の合成法について以下に記載する。

2.2.1. ポリエチレングリコール-ポリ（L-リシン）ブロック共重合体 [PEG-PLys] の合成

平均分子量12,000のPEG-NH₂ 300 mgと、チオ尿素456 mgを、*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）6 mLに溶解した。次いで、得られた溶液を ϵ -トリフルオロアセチル-L-リシンの*N*-カルボン酸無水物（Lys（TFA）-NCA）310 mgとチオ尿素456 mgを、DMF 6 mLに溶解した溶液に加え、25 °Cで3日間攪拌した。反応溶液をジエチルエーテル-メタノール（15 : 1, v/v）の混合溶媒200 mLに滴下し、白色沈殿を得た。さらに沈殿物をメタノールに溶解し、ジエチルエーテ

ル 200 mL中に滴下することを2回繰り返した。得られた白色沈殿をろ過して真空乾燥し、PEG-PLys (TFA) を得た。

得られたPEG-PLys (TFA) 200 mgをメタノール 18 mLに溶解し、1 M水酸化ナトリウム溶液2 mLを加えて35 °Cで24時間攪拌した。反応溶液を透析チューブ (分画分子量6,000-8,000 Da) に入れ、0.01 Mの水酸化ナトリウム溶液を外液として4回、純水を外液として3回透析を行い、透析膜内液を回収し、凍結乾燥し、PEG-PLysを白色粉体として得た。得られた化合物が目的物であることを¹H-NMRにより確認し、PLys重合度は40であった (Fig. 2)。

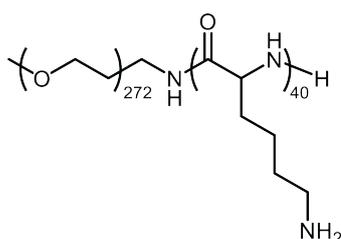


Fig. 2 Chemical structure of synthesized PEG-PLys.

2.2.2. Rf修飾ポリマーの合成

PEG-PLys 20 mgを、メタノール2 mLと、PEG-PLysの1級アミノ基に対して1.2当量のトリエチルアミンに溶解し、PEG-PLysの1級アミノ基に対して0.1、0.3、0.5当量のRf1カルボン酸メチルエステルまたはRf2カルボン酸メチルエステル (Fig. 3) をそれぞれ添加し、終夜攪拌した。

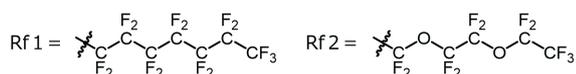


Fig. 3 Chemical structures of Rf1 and Rf2.

それぞれの反応溶液を透析チューブに入れ、外液としてメタノールで2回 (各12時間以上)、10 mMリン酸緩衝液 (pH7.4) で3回 (各2時間以上)、100 mMの塩化ナトリウム水溶液で3回 (各2時間以上)、純水で3回 (各2時間以上) それぞれ透析を行った後、凍結乾燥し、PEG-PLysの側鎖の一部末端にアミド結合を介してRf1またはRf2が結合したポリマー計6種を白色粉体として得た。

尚、生成物6種のうち、Rf1カルボン酸メチルエステルを0.5当量使用したものに関しては水系溶媒への溶解性が乏しかったことから、これを除く計5種のRf修飾ポリマーを次項のミセル形成予察検討に供した。

2.2.3. オリゴ核酸とのミセル形成予察検討

オリゴ核酸との複合体形成の予察検討として、前項で合成したRf修飾ポリマー5種と、マウスMALAT1 (metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1) を標的とした配列を有するsmall inter-

fering RNA (siRNA) との間での複合体形成を試みた。調製方法は2.4項に記載の方法と同じである。生成した複合体に対して、ミセル形成の有無を判断するため、静的光散乱測定を行った結果を下図に示す (Fig. 4, a)。横軸はN/P比、縦軸は散乱光強度を表す。N/P比とは、核酸のリン酸部位の数に対するポリマーの1級アミンの数の比率であり、すなわちアニオンの総数に対するカチオンの総数の比率を表す。また、5種のRf修飾ポリマーを、図中ではそれぞれ「Rf1-n」または「Rf2-n」(nは使用したRfカルボン酸メチルエステルの当量) と呼称する。

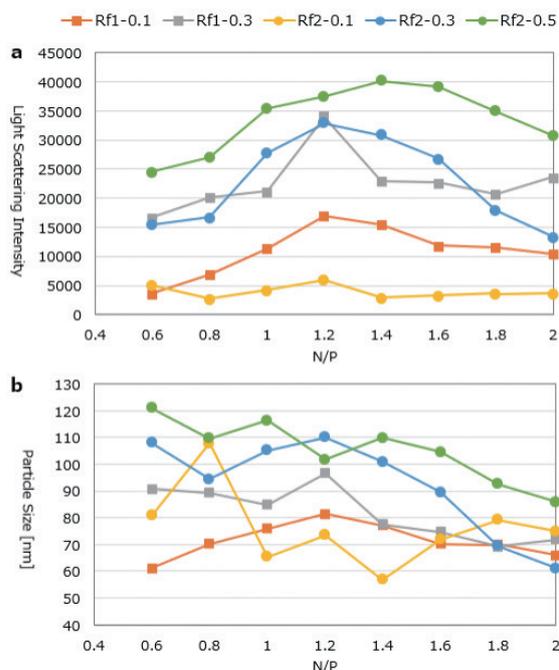


Fig. 4 Light scattering characteristics of siRNA x Rf-substituted polymer complexes.

a) Static light scattering, b) Dynamic light scattering.

この結果、Rf2-0.1では散乱光強度の増加はほとんど観測されなかった一方で、Rf1-0.1、Rf1-0.3、Rf2-0.3、Rf2-0.5では、PEG-PLysへのRf基導入時に使用したRfカルボン酸メチルエステルの当量の増加に伴う散乱光強度の増加が観測された。このことから、Rf基の導入率の増加に伴い、核酸とポリマーとの間の多分子会合 (ミセル形成) が促進することが示唆された。また、これら複合体の流体力学直径を動的な光散乱により測定したところ、ミセル形成が示唆された複合体はいずれも100 nm前後であることがわかった (Fig. 4, b)。これはミセル粒子として妥当なサイズである。

これら4種のうち、Rf1含有ポリマーとしてRf1-0.3を、Rf2含有ポリマーとしてRf2-0.5を選定し、生物試験に使用した。これら2種のRf修飾ポリマーをそれぞれ「PEG-PLys w/Rf1」、「PEG-PLys w/Rf2」とする。

2.3. 核酸の準備

生物試験に使用する核酸として、一本鎖のアンチセ

ンスオリゴ核酸 (ASO) および、ASOとそれに相補的な配列のRNA (cRNA) から成るヘテロ二本鎖核酸 (HDO)⁶を使用した。ASOとHDOの配列には、いずれもマウスMALAT1を標的とした配列を選択した。以下にそれぞれの具体的な配列を記載する。ASOの5'末端には色素標識としてAlexa Fluor 647を導入した (Fig. 5)。

[ASO]

5(L)^A(T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)

[HDO]

ASO:

5(L)^A(T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)

cRNA:

G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)

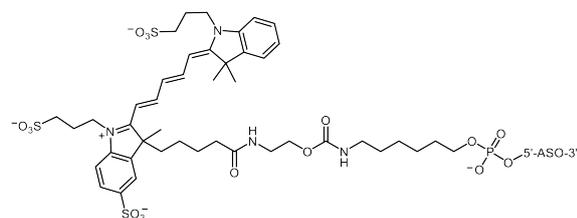


Fig. 5 Chemical structure of ASO with Alexa Fluor 647 at the 5' end.

上記配列中の、小文字のアルファベットはDNA、大文字のアルファベットはRNAを表し、「X (L)」は架橋型核酸 (LNA) を表す。LNAは、シトシンのみ5-メチル置換体を使用し、これを「5 (L)」と表す。「X (M)」は2'-O-メチルRNAを示し、「^」はPS修飾を表す (Fig. 6)。

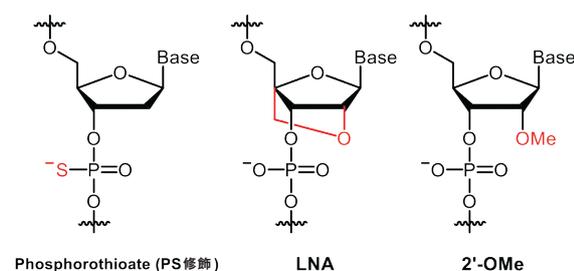


Fig. 6 Chemical structures of modified nucleic acids.

また、HDO のcRNAの5'末端にRf1を導入した「Rf1-HDO」の合成も併せて行った (Fig. 7)。

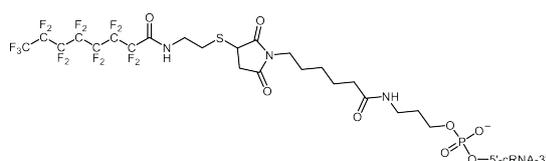


Fig. 7 Chemical structure of Rf1-HDO.

2.4. 核酸-ポリマー複合体の調製

2.2.および2.3.で合成したポリマーおよび核酸から、

複合体の調製を行った。

まず、ASO、HDOおよびRf1-HDOを、それぞれ80 μ M、40 μ Mの濃度となるように10 mM HEPES (pH7.3) を用いて調整した。次いで、PEG-PLys w/Rf1、PEG-PLys w/Rf2、およびRf基を持たないPEG-PLysを、1 mg/mLの濃度となるように10 mM HEPES (pH7.3) を用いて調整した。各溶液を以下の体積比にて混合し、ボルテックスにて1分間攪拌して粒子調製を行った。

- PEG-PLysと核酸の複合体

核酸 / PEG-PLys / HEPES = 60/47/133

- PEG-PLys w/Rf1と核酸の複合体

核酸 / PEG-PLys w/Rf1 / HEPES = 60/71/109

- PEG-PLys w/Rf2と核酸の複合体

核酸 / PEG-PLys w/Rf2 / HEPES = 60/123/57

3. 血中安定性の評価

3.1. 動物試験による血中安定性の評価手法

試験動物としては、BALB/cマウス (雌、6週齢) を使用した。前項に記載の各粒子を、マウスの尾静脈よりそれぞれ200 μ L投与し、投与から10分後、30分後、60分後、180分後に尾静脈から採血を行った。血液中の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー (Tecan製、Spark) で測定を行い、血中濃度 (Dose%/mL) を定量した。

3.2. ASO-Rf修飾ポリマー複合体の評価

ASOとRf修飾ポリマーPEG-PLys w/Rf1、PEG-PLys w/Rf2との複合体の血中濃度の経時変化を、ASOとPEG-PLysとの複合体および標識化ASO単体 (Naked ASO) を対照剤として観測した結果をFig. 8に示す。横軸は投与後の経過時間を示し、縦軸は標識色素の血中濃度 (Dose%/mL) を示す。

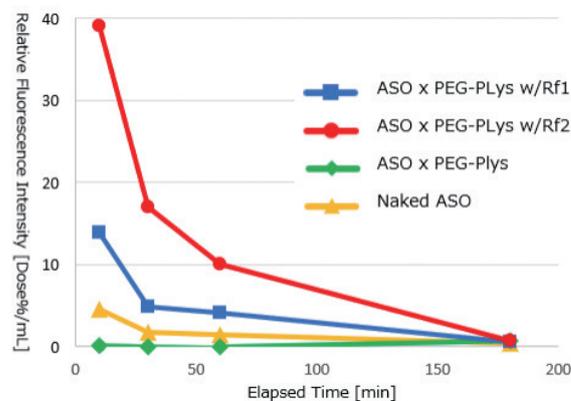


Fig. 8 Evaluation of stability of ASO x PEG-PLys w/Rf1 or w/Rf2 in blood.

この結果から、Naked ASOや、Rf基を持たないポリマーとASOとの複合体ASO x PEG-PLysと比較して、Rf修飾ポリマーとASOとの複合体の血中安定性が

高いことがわかった。また、Rf修飾複合体2種の比較では、Rf2を有する複合体の方が、Rf1を有する複合体よりも大幅に高い血中安定性を示す結果が得られた。

3.3. HDO-Rf修飾ポリマー複合体の評価

HDOとRf修飾ポリマーPEG-PLys w/Rf1、PEG-PLys w/Rf2との複合体の血中残存量の経時変化を、HDOとPEG-PLysとの複合体および標識化HDO単体(Naked HDO)を対照剤として観測した。さらに上記に加え、2.3で合成したRf1-HDOとRf修飾ポリマーとの複合体もあわせて供試した。これは、核酸にもRf基を導入することにより、ポリマー側鎖間だけでなく、ポリマーと核酸との間にもRf基の相互作用を働かせることで、より一層安定な複合体形成の実現を期待したものである。結果をFig. 9に示す。

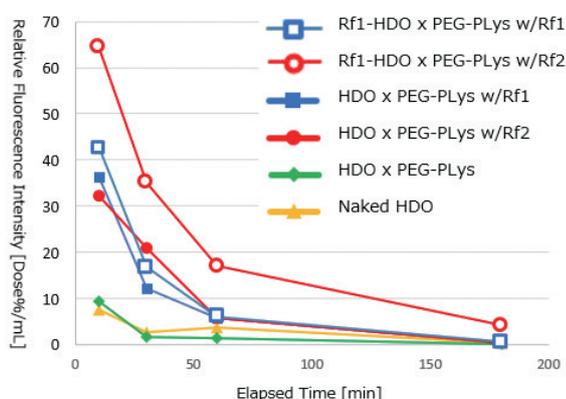


Fig. 9 Evaluation of stability of HDO x PEG-PLys w/Rf1 or w/Rf2 in blood.

この結果から、Naked HDOや、Rf基を持たないポリマーとHDOとの複合体HDO x PEG-PLysと比較して、Rf修飾ポリマーとHDOとの複合体の血中安定性が高いことがわかった。さらに、核酸とポリマーのいずれにもRf基を導入した複合体もまた高い安定性を示し、特にポリマーにRf2を導入したPEG-PLys w/Rf2を使用した場合に、著しく安定性が向上する結果となった。

4. 総括

本研究では、核酸医薬を血中で安定に循環させ、標的とする臓器や組織へと効率的に送達するための技術として、高分子材料を基盤とするDDSの開発を行った。具体的には、既存DDS技術の1つとして知られるPICミセル型のナノDDSの安定性向上の手段として、Rf化合物が多数集まった際に生じる相互作用に着目し、PICの構成成分であるカチオン性ポリマーの側鎖にRf基を有するミセルを作製した。作製したRf修飾ポリマーとASOおよびHDOとの複合体はいずれもミセル粒子を形成し、いずれもRf基を持たないポリマーを使用した場合と比較して血中安定性が向上した。この結果から、ポリマー側鎖に導入したRf基同士が

期待どおりミセル内で相互作用をすることにより、ミセルコアを安定化させる効果を発揮したことが示唆される。また、ポリマーだけでなく核酸にもRf基を導入したPICミセルに関しては、血中安定性がより一層向上したことから、ポリマー側鎖間だけでなく、ポリマーと核酸との間にもRf基の相互作用が働くことによってミセルをさらに安定化している可能性が考えられる。

今後の展望としては、Rf基の構造やミセル調製条件の最適化による血中安定性のさらなる向上や、特定の標的組織（がんや脳など）に高い親和性を有するリガンド分子をミセル表層に搭載することによる標的指向性の付与が期待できる。これにより、核酸医薬分野の大きな課題の1つである、標的部位への効率的な送達の実現が期待される。

—参考文献—

- (1) “核酸医薬 本領を発揮する創薬モダリティ”, 実験医学 2021, Vol. 39, No. 17, 羊土社, 横田隆徳編, 第3章 “DDS”, p.88.
- (2) <https://investors.alnylam.com/press-release?id=26776>
- (3) Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K. *Chem. Rev.* 2018, 118, 6844–6892.
- (4) a) Christie, R. J.; Miyata, K.; Matsumoto, Y.; Nomoto, T.; Menasco, D.; Lai, T. C.; Pennisi, M.; Osada, K.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* 2011, 12, 3174–3185. b) Gouda, N.; Miyata, K.; Christie, J.; Suma, T.; Kishimura, A.; Fukushima, S.; Nomoto, T.; Liu, X.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Biomaterials* 2013, 34, 562–570.
- (5) a) Wang, L.; Wu, D.; Xu, H.; You, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 755–759. b) Wu, T.; Wang, L.; Ding, S.; You, Y. *Macromol. Biosci.* 2017, 17, 1700114. c) Tan, E.; Lv, J.; Hu, J.; Shen, W.; Wang, H.; Cheng, Y. *J. Mater. Chem. B* 2018, 6, 7230–7238.
- (6) Nishina, K.; Piao, W.; Yoshida-Tanaka, K.; Sujino, Y.; Nishina, T.; Yamamoto, T.; Nitta, K.; Yoshioka, K.; Kuwahara, H.; Yasuhara, H.; Baba, T.; Ono, F.; Miyata, K.; Miyake, K.; Seth, P. P.; Low, A.; Yoshida, M.; Bennett, C. F.; Kataoka, K.; Mizusawa, H.; Obika, S.; Yokota, T. *Nat. Commun.* 2015, 6, 1–13.