

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710114

研究課題名（和文） 体内での核酸の送達・可視化・定量を目指した金ナノ粒子内包型デバイスの設計と創製

研究課題名（英文） Design and Preparation of a Nanodevice Containing Gold Nanoparticles for Delivery and Imaging of Nucleic Acids

研究代表者

大石 基（OISHI MOTOI）

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：90419242

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、体内で安定に siRNA（核酸医薬）をガン組織・細胞まで送達し、かつ可視化・定量できるナノデバイスを創製することである。具体的には、本申請者が独自に開発した金ナノ粒子を内包した PEG 化ナノゲル粒子と末端にチオール基を有する siRNA（SH-siRNA）との複合化することによりナノデバイスの構築を行った。さらに、このナノデバイスは 1 粒子あたりに金ナノ粒子を数十個有することで X 線 CT による造影効果が高いためガン組織への送達を可視化・定量するのに優れ、かつ細胞質および外部刺激で切断可能な Au-S 結合により siRNA をグルコアに内包しているため細胞質内で効率よく RNAi（遺伝子発現抑制）効果を導くことができるシステムであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A PEGylated nanogel containing gold nanoparticles and siRNAs (nanodevice) was designed and prepared for delivery of nucleic acids and imaging of cancer. The nanodevice shows efficient release of siRNAs in response to intracellular environments, because the thiol-Au interaction caused an exchange reaction between siRNA-SH/Au and thiol-containing glutathione molecules, allowing the efficient RNAi activity in cancer cells. Additionally, the nanodevice also serves as an X-ray CT contrast agent due to the large payload of gold nanoparticles in the core of nanogel. The PEGylated nanogel described here is suitable as a smart nanodevice for delivery of nucleic acids and imaging of cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ナノテクノロジー

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：金ナノ粒子、ナノデバイス、ナノゲル粒子、siRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、短い二本鎖 RNA（siRNA）を細胞内に

導入し、RNAi (2006年ノーベル医学生理学賞) を誘導して標的遺伝子の発現を特異的に抑制する方法は、効率が高く低濃度で効果が得られることから医薬品として活発に研究がなされている。しかし、siRNA を単独で血中に投与した場合、血中に存在する酵素による分解、腎臓からの排泄、非特異的な体内分布、および siRNA 自身の細胞膜透過性が低いことなどから、ガン組織・細胞内に到達することができず十分な薬効が得られていないのが現状である。これら siRNA を医薬品として用いるにあたって、技術面で鍵を握っているのが、安定に siRNA をガン組織・細胞まで送達し、かつ細部質内で効率よく薬効 (RNAi) を導くことができるナノデバイスの開発である。これまでのナノデバイスとしては、ポリアニオンである siRNA とカチオン性高分子やリポソームとの自己組織化により形成される複合体が国内外で注目を集め活発に研究がなされている。しかし、これらナノデバイスは、分子の弱い静電相互作用のみ形成されているが故に血中での安定性が十分でなく複合体の解離を起こし、さらにはナノデバイスとともにどの程度の siRNA がガン組織・細胞に送達されているかが把握できていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究のねらいは、体内で安定に siRNA (核酸医薬) をガン組織・細胞まで送達し、かつ可視化・定量できるナノデバイスを創製することである。この様なナノデバイスを創製するために、本申請者が独自に開発した金ナノ粒子を内包した PEG 化ナノゲル粒子と末端にチオール基を有する siRNA (SH-siRNA) との複合化を検討する。このナノデバイスは、1 粒子あたりに金ナノ粒子を数十個有することで X 線 CT による造影効果が高いためガン組織への送達を可視化・定量するのに優れ、かつ細胞質および外部刺激 (パルスレーザー) で切断可能な Au-S 結合により siRNA をゲルコアに内包しているため細胞質内で効率よく RNAi 効果を導くことができるシステムである (図 1)。

## 3. 研究の方法

本研究のような siRNA の送達・可視化・定量可能なナノデバイスを創製するうえで以下のように研究を進めた。

- (1) 金ナノ粒子の内包個数が異なる PEG 化ナノゲル粒子の調製
- (2) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒

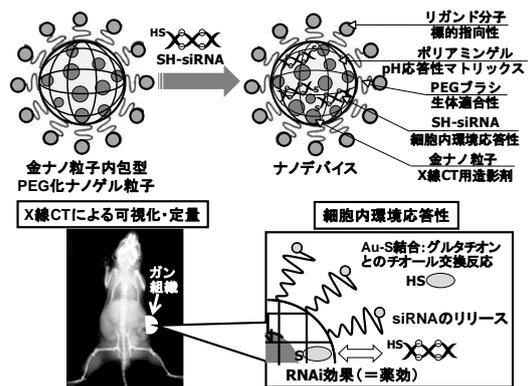


図 1. 金ナノ粒子内包型デバイスによる核酸の送達・可視化・定量の概念図

子の X 線造影効果の検討

- (3) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子への SH-siRNA の内包
- (4) 培養細胞の内在性遺伝子に対する RNAi (遺伝子発現抑制) 効果を検討

以下「4. 研究成果」の項に上記項目に関する研究成果を記述する。

## 4. 研究成果

上述した「3. 研究の方法」に基づいた研究成果を示す。

- (1) 金ナノ粒子の内包個数が異なる PEG 化ナノゲル粒子の調製

ここでは、生体適合性が高い PEG の片末端に反応性官能基 (アルデヒド基およびカルボキシル基) およびもう片末端には重合性官能基 (ビニルベンジル基) を有する PEG マクロマーを用いた乳化重合により、従来と同様に PEG 化ナノゲル粒子 (平均粒径=70 nm) の合成を行った。また、PEG 化ナノゲル粒子をナノ空間の反応場として利用して、様々な条件下 (温度、金イオンとナノゲル粒子のアミノ基の比=N/Au 比) において金イオンの還元を行うことにより、金ナノ粒子の内包個数が異なる PEG 化ナノゲル粒子の調製を行った。その結果、PEG 化ナノゲル 1 粒子あたりの金ナノ粒子 (平均粒径=約 7 nm) の内包個数は、N (ナノゲル粒子のアミノ基のモル数) /Au (金イオンのモル数) 比が大きくなるにつれ減少し、かつ反応温度を高くするにともない増大することが明らかとなった (図 2)。すなわち、N/Au 比=1 かつ反応温度 60°C で調製した金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子は、ナノゲル粒子 1 つあたり約 20~30 個の金ナノ粒子を内包していることが明らかとなった。

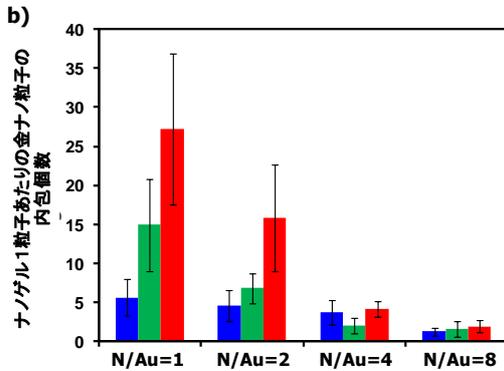
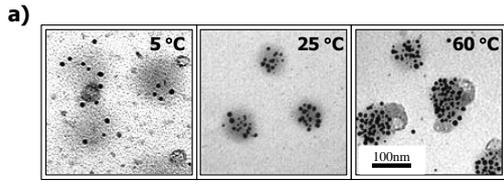


図2. a) N/Au=1 および種々の反応温度で調製した金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の TEM 画像。b) 種々の N/Au 比および反応温度 (5°C : 青、25°C : 緑、60°C : 赤) で金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子を調製したときのナノゲル 1 粒子あたりの金ナノ粒子の内包個数

### (2) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の X 線造影効果の検討

金原子は X 線を効率的に吸収する (臨床で用いられているヨウ素原子の 2 倍の吸収効率) ことが知られていることから、約 20~30 個の金ナノ粒子 (約 450,000 個の金原子) をコアに有する PEG 化ナノゲル粒子は X 線 CT において高い造影効果が期待できる。ここでは、N/Au 比=1 かつ反応温度 60°C で調製した金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子 (ナノゲル粒子 1 つあたり、約 20 個の金ナノ粒子を内包) の X 線造影能を X 線 CT により評価した。金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子は、ファントム実験から X 線造影能を評価したところ、非常に高い造影能を有していることが明らかとなった (図 3)。

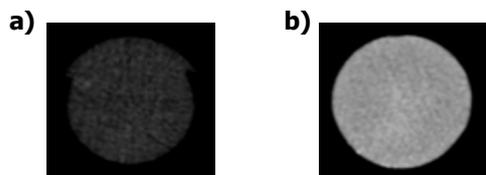


図3. a) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の非存在下 (バッファーのみ) および b) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の存在下での X 線 CT によるファントム画像

### (3) 金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子への SH-siRNA の内包

ここでは、ナノゲル 1 粒子あたりの金ナノ粒子の内包個数が異なる金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子への SH-siRNA の内包を検討した。用いた金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子は、N/Au 比=1 (ナノゲル 1 粒子あたり約 23 個の金ナノ粒子を内包)、N/Au 比=2 (ナノゲル 1 粒子あたり約 10 個の金ナノ粒子を内包)、N/Au 比=4 (ナノゲル 1 粒子あたり約 6 個の金ナノ粒子を内包) の条件で調製したものである。ナノゲル 1 粒子あたりの SH-siRNA の内包量は、N/Au 比=1 で約 75 ng、N/Au 比=2 で約 125 ng、N/Au 比=4 で約 223 ng であることが明らかとなった。すなわち、PEG 化ナノゲル 1 粒子あたりの金ナノ粒子の内包個数が増加するに伴い減少することが明らかとなった。

また、SH-siRNA を内包した金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子は、生理条件下において SH-siRNA をリリースすることなく安定に内包していることが明らかとなった。一方、細胞質内環境であるグルタチオン濃度 (10 mM) においては、Au-S 結合の切断に伴い SH-siRNA が 20%ほどリリースすることが確認された。

### (4) 養細胞の内在性遺伝子に対する RNAi (遺伝子発現抑制) 効果を検討

SH-siRNA を内包した各金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の RNAi (遺伝子発現抑制) 効果の評価として、HuH-7 細胞に発現している抗アポトーシスタンパク質サバイビン (内在性遺伝子) に対してサイレンシング実験を行った (図 4)。その結果、siRNA 単独では全く RNAi 効果が確認されなかったが、SH-siRNA を内包した各金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子については RNAi 効果が確認された。また、SH-siRNA を内包した各金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子の RNAi 効果は、N/Au

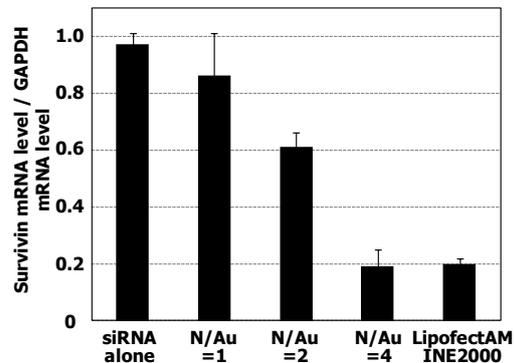


図4. HuH7 細胞のサバイビン (内在性遺伝子) に対する金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子およびリポフェクタミン 2000 の RNAi 効果 ([siRNA]=100 nM)

比が大きくなるにつれ高くなることが明らかとなった。さらに、N/Au=4 で調製した SH-siRNA を内包した各金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子は、市販品の siRNA 導入試薬とほぼ同等の RNAi 効果を示すことが明らかとなった。

以上の成果から、この金ナノ粒子を内包した PEG 化ナノゲル粒子は、siRNA をガン組織・細胞まで送達し、かつ可視化・定量できるナノデバイスとして有用であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Y. Shinohara, G. Tamura, A. Tamura, Y. Sanada, M. Oishi, I. Akiba, Y. Nagasaki, K. Sakurai, and Y. Amemiya “Dependence of Swelling Behavior of pH-responsive PEG-modified Nanogel on Cross-link Density” *Polym. J.* (2012), 44, 240-244. 査読有り  
DOI: 10.1038/pj.2011.123
- ② H. Hatakeyama, H. Akita, E. Itho, Y. Hayashi, M. Oishi, Y. Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Y. Baba, and H. Harashima “Systemic Delivery of siRNA to Tumors Using a Lipid Nanoparticle Containing a Tumor Specific Cleavable PEG-lipid” *Biomaterials* (2011), 32, 4306-4316. 査読有り  
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.02.045
- ③ M. Oishi, and Y. Nagasaki “Stimuli-Responsive Smart Nanogels for Cancer Diagnostics and Therapy” *Nanomedicine* (2010), 5, 451-468. 査読有り  
DOI: 10.2217/nnm.10.18

[学会発表] (計 3 件)

- ① M. Oishi, et.al., “Design of PEGylated Polyamine Gold Nanoparticles as Nucleic Acid Drug Carriers for Systemic Cancer Gene Therapy” 第 60 回高分子学会年次会, 大阪国際会議場(大阪), 2011 年 5 月 26 日
- ② M. Oishi, et. al., “Boron Neutron Capture Therapy Assisted by Nanoparticles: Enhanced Tumor Accumulation by Core-Polymerization with Boron-Containing Monomer” 第 60 回高分子学会年次会, 大阪国際会議場(大阪), 2011 年 5 月 26 日

- ③ 大石 基 “ピンポイント治療および診断を目指した刺激応答性 PEG 化ナノゲル粒子の創製” 第 59 回高分子学会年次会, パシフィコ横浜 (神奈川), 2010 年 5 月 26 日

[図書] (計 1 件)

- ① M. Oishi and Y. Nagasaki “Stimuli-Responsive PEGylated Nanogels for Smart Nanomedicines” Chapter 5 in the book entitled “Biomedical Applications of Hydrogels Handbook” Published by Springer Inc. New York, 87-105 (2010)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 基 (OISHI MOTOI)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号: 90419242