

700500717A

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「がん新生血管を標的とした All in one デバイスによる革新的 siRNA デリバリーシステムとがん治療法の開発」に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 石田 竜弘

平成 18 (2006) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告		
「がん新生血管を標的とした All in one デバイスによる革新的 siRNA デリバリーシステムとがん治療法の開発」に関する研究	-----	1
II. 分担研究報告		
1. Ago2-siRNA 導入による細胞死の誘導に関する検討 石田 竜弘	-----	6
2. siRNA 導入用キャリアの開発と血管内皮細胞への siRNA 導入に関する検討 浅井 知浩	-----	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

「がん新生血管を標的とした All in one デバイスによる革新的 siRNA デリバリーシステム
とがん治療法の開発」に関する研究

主任研究者 石田 竜弘 徳島大学大学院ヘルスケアサイエンス研究部・助教授

研究要旨 がん新生血管を構成する血管内皮細胞内に siRNA を選択的に導入し、細胞の恒常性の維持に深く関与している RISC(RNA-induced silencing complex)の発現を抑制させ、結果的に細胞死（アポトーシス）を誘導させることによりがん新生血管の破壊とそれに伴うがんの退縮を実現させうる革新的がん治療法の開発とそれを実現しうるデリバリーシステム（All in one デバイス）の開発を実現させる事が本研究の主たる目的である。本年度は、①RISC 構成成分の一つである Argonaute2 (Ago2)に対する siRNA を設計し、これを細胞内に導入することにより細胞死の誘導が生ずるかどう
か、②細胞内への siRNA 導入効率が高く、in vivo 応用が可能なキャリアの開発、③がん新生血管に対する選択的デリバリー戦略の構築、に関する検討を行った。RISC 構成分子である Ago2 に対する siRNA を細胞に導入したところ、顕著な細胞死が誘導されることが確認された。したがって、我々が本事業で提案した作業仮説が正しいことが実証された。また、siRNA デリバリーに適した新規カチオニックリポソームおよび新規 siRNA-カチオニックリポソーム複合体形成法を見出した。これらのリポソームは活性化状態のヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）においても高い Ago2 knockdown および細胞死を誘導した。さらに、細胞内動態を解析した結果、細胞質への siRNA の放出および細胞質内での複合体の解離過程を制御する事が、RNAi 効果の効率化をはかる上で重要であることが示唆された。同時平行的に新生血管に対する標的化プローブに関する研究も進めており、新生血管特異的ペプチド APRPG および抗 MT1-MMP 抗体の有用性が明らかとなってきた。このような機能性分子でカチオニックリポソームを修飾し、Ago2 に対する siRNA を新生血管内皮細胞に導入することにより、がん新生血管を標的とした All in one デバイスの創成へと繋がることが期待される。

A. 研究目的

がん新生血管を構成する血管内皮細胞内に siRNA を選択的に導入し、細胞の恒常性の維持に深く関与している RISC(RNA-induced silencing complex)の発現を抑制させ、結果的に細胞死（アポトーシス）を誘導させることによりがん新生血管の破壊とそれに伴うがんの退縮を実現させうる革新的がん治療法の開発とそれを実現しうるデリバリーシステム（All in one デバイス）の開発を実現させる事が本研究の主たる目的である。本年度は、①RISC 構成成分の一つである Argonaute2 (Ago2)に対する siRNA を設計し、これを細胞内に導入することにより細胞死の誘導が生ずるか
どうか、②細胞内への siRNA 導入効率が高く、in vivo 応用が可能なキャリアの開発、③がん新生血管に

に対する選択的デリバリー戦略の構築、に関する検討を行った。

B. 研究方法

(1) Knockdown 効率の評価

N/P 比を変化させて GFP あるいは luciferase に対する siRNA と複合体を形成させた。In vitro における導入用細胞として HT-1080 ヒト繊維芽肉腫細胞の wild type および GFP 安定発現株 (GFP/HT-1080 細胞)を用いた。リポソーム/siRNA 複合体を 10%血清存在下で 4 時間インキュベートし、siRNA を導入した。GFP タンパク質の蛍光あるいは luciferase 活性を測定し、knockdown による減少率を算出した。コントロールには in vitro で高い siRNA 導入効果を示す Lipofectamine2000 を用

いた。

(2) 細胞毒性試験

細胞毒性は MTT 法によって評価した。コントロールには Lipofectamine2000 を用いた。

(3) 細胞内動態解析

siRNA を FAM あるいはリポソームを DiD で蛍光標識した siRNA/リポソーム複合体を調製した。複合体を HT-1080 あるいは HUVEC 細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(4) Ago2 に対する siRNA の導入

Ago2 に対する siRNA を種々の処方を用いて HT-1080 あるいは HUVEC 細胞に導入した。Knockdown 効率は RT-PCR 法で評価した。コントロール siRNA としては GFP あるいは luciferase に対する siRNA を用いた。なお、コントロール実験として β -actin の RT-PCR を実施した。

(5) Ago2-siRNA 導入による Apoptosis の誘導

Caspase-3 活性の測定は市販のキットを用いて行った。Apoptosis 誘導状況に関しては flow cytometry (FCM) を用いて検討した。Propidium iodide (PI) で核を染色すると同時に、annexin V を用いて phosphatidylserine (PS) を染色する事により、Ago2-siRNA 導入後の経時的な apoptosis 誘導状況を調べた。Anexin V は early apoptosis の、PI は late apoptosis のそれぞれマーカーである。

(6) 血管内皮細胞への標的化

In vitro における新生血管のモデルとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC は bFGF, VEGF, IGF-1, EGF, 2% FBS を含む EGM-2 培地にて培養した。ポリカチオンリポソーム (PCL) または抗 MT1-MMP 抗体にて修飾した蛍光標識リポソームを調製し、細胞内に取り込まれたリポソームを蛍光強度を指標として定量評価した。

C. 研究結果

(1) RISC抑制によるアポトーシス誘導

(I) HT1080細胞を用いた検討

Ago2-siRNA を Lipofectamine2000 により HT1080 に導入したところ、顕著な mRNA 量の経時的な減少と強い細胞増殖抑制が観察された。検討の結果、この細胞増殖抑制は apoptosis を介して生じたものである事が明らかとなった。

(II) HUVEC細胞を用いた検討

Preliminary な結果ではあるが、HUVEC の方が HT1080 よりも ① siRNA/liposome 複合体による非特異的な影響を受けにくい、② Ago2-knockdown による apoptosis 誘導が強く見られる、ことが示された。

(2) siRNA/リポソーム処方検討

(I) TFL-3を用いた検討

TFL-3 は HeLa 細胞において 15nM 以上の luc-siRNA 量を導入した際に十分な luciferase gene knockdown 効果を示した。一方、GFP 安定発現 HT1080 細胞を用いた検討では、120nM 以上の GFP に対する siRNA を導入しなければ十分な knockdown 効果が得られなかった。

次いで、より高い RNAi 効果を獲得するために、処方改良を試みた。様々な検討を加えた結果、siRNA と TFL-3 を混合する際に vortexing を加えるだけで単位 siRNA 量あたりの RNAi 効果を数倍高めることができることを見出した。驚くべきことに、GFP 安定発現株において、以前の処方では全く RNAi 効果が得られなかった 30nM において、改良型の処方では高い RNAi 効果が得られた。したがって、本改良型処方は、少量の siRNA で高い RNAi 効果が得られる可能性が高いことから、in vivo への応用も可能な処方であると考えられる。

(II) ポリカチオンリポソーム(PCL)を用いた検討

様々な組成の PCL を N/P を 18~30 まで変化させて siRNA と混合し、PCL/siRNA 複合体を調製した。その結果、粒子径が 120~160 nm、ゼータ電位が +30~+50 mV の PCL/siRNA 複合体が形成された。調製した各 PCL/siRNA 複合体を以下の実験に用いた。

PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し、PCL/siRNA 複合体の N/P 比が 24 eq. の条件において最大の RNAi 効果が得られた。抑制効率は Lipofectamin2000 と同程度であった。PCL の基本脂質として DPPC とコレステロールを使用した場合にも knockdown が観察された。経時的に観察した結果、複合体導入後 48 時間で最も抑制される傾向が観察された。

(3) 細胞内動態解析

HT1080 および HUVEC において、TFL-3 を用い

た場合、細胞内移行後の siRNA の多くはエンドソームあるいはライソソームと考えられるオルガネラに蓄積する傾向が高いことが示唆された。また、PCL を用いた場合、導入 24 時間後において大部分の PCL/siRNA 複合体が細胞膜から細胞質への移行を終え、細胞質においては経時的に複合体が解離していく様子が観察された。

(4) 新生血管への標的化

MT1-MMP に標的化したリポソームは血管内皮細胞に高い親和性を持ち、細胞内に内在化されることを確認した。

D. 考察

RISC 構成分子である Ago2 に対する siRNA を細胞に導入し、Ago2 タンパクの発現を knockdown することで細胞死が誘導されることが確認された。この細胞死はインターフェロン反応や off target 効果によるものではなく、Ago2 の knockdown に特異的な現象であることが示唆された。このことから、本事業で提案した作業仮説を実証することができた。

また、siRNA デリバリーに適した新規カチオンリポソーム(FTL-3, PCL)および新規 siRNA-カチオンリポソーム複合体形成法を見出した。siRNA 細胞内導入に Lipofectamine2000 が用いられることが多いが、細胞毒性や添加物の存在により、in vivo 応用は不可能である。我々の新規カチオンリポソームは Lipofectamine2000 に匹敵する高い siRNA 導入効率を持つと同時に、細胞毒性が極めて低いことが確認された。また、新規複合体形成法の利用により、遺伝子 knockdown 効率を既存の方法と比べて約 5-10 倍高めることができた。in vivo に応用していくためには、低い毒性と高い導入効率が必須である。したがって、我々が見出した処方と方法を基盤として、in vivo 応用可能な All in one デバイス開発可能であると考えられる。

細胞内動態解析の結果、エンドソーム・ライソソームから細胞質への siRNA の放出過程、および細胞質内での複合体の解離過程が、RNAi 効果の効率化をはかる上で重要であることが示唆された。前者に関しては、ライソソーム内で siRNA の

放出性を高めるため、酵素依存的に切断されるペプチドスペーサーを含有した PEG リン脂質誘導体を調製し、検討する予定である。PEG による表面修飾はデバイスの血中滞留性を高めるために必須である。一方で、ライソソーム内での siRNA の放出にはマイナスに作用する可能性が高い。デバイスにこのペプチドスペーサー含有 PEG リン脂質誘導体を組み込むことで、律速段階をクリアできるものと期待される。

膜型マトリクスメタロプロテアーゼ 1 型 (MT1-MMP) に標的化したリポソームは血管内皮細胞に高い親和性を持ち、さらに細胞内に内在化されることを確認した。また、我々は既にファージディスプレイ法を用いた in vivo バイオパニングにより、新生血管に高い集積性を持つ数種のペプチド (Pro-Arg-Pro など) を得ている。先の新規カチオンリポソームをこれらのリガンドで修飾し、in vivo での集積性について検討を開始する予定である。

E. 結論

Ago2 タンパクの発現を knockdown することで細胞死が誘導されることが確認された。また、本年度の検討で「All in one デバイス」の基本骨格部分となる siRNA 導入用カチオンリポソームの優れた能力が明らかとなった。さらに、新生血管特異的ペプチド APRPG および抗 MT1-MMP 抗体の新生血管標的分子としての有用性も明らかとなってきている。このような機能性分子でカチオンリポソームを修飾し、Ago2 に対する siRNA を新生血管内皮細胞に導入することにより、がん新生血管を標的とした All in one デバイスの創成へと繋がるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Li, W., Ishida, T., Okada, Y., Oku, N., Kiwada, H., Increased gene expression by cationic liposomes (TFL-3) in lung metastases following intravenous injection. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 701-706 (2005)

- (2) Shimizu, K., Asai, T., Fuse, C., Sadzuka, Y., Sonobe, T., Ogino, K., Taki, T., Tanaka, T., Oku, N.: Applicability of anti-neovascular therapy to drug-resistant tumor: Suppression of drug-resistant P388 tumor growth with neovessel-targeted liposomal adriamycin. *Int. J. Pharm.*, **296**, 133-141 (2005)
- (3) Ichikawa, K., Hikita, T., Maeda, N., Yonezawa, S., Takeuchi, Y., Asai, T., Namba, Y., Oku, N.: Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim. Biophys. Acta*, **1669**, 69-74 (2005)
- (4) Shimizu, K., Asai, T. and Oku, N.: Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.*, **9**, 63-76 (2005)
- (5) Nguyen, L.T., Ishida, T., Kiwada, H., Gene expression in primary cultured mouse hepatocytes with a cationic liposomal vector, TFL-3: Comparison with rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1472-1475 (2005)
- (6) Ishida, T., Li, W., Liu, Z., Kiwada, H., Stimulatory effect of polyethylene glycol (PEG) on gene expression in mouse liver following hydrodynamics-based transfection. *J. Gene Med.*, **8**, 324-334 (2006)

2. 学会発表

- (1) 前田典之、宮沢壮一郎、清水広介、浅井知浩、北沢貞哉、難波幸弘、奥 直人：新生血管標的化血中滞留リポソームによる腫瘍新生血管傷害療法 日本薬学会第 125 年会（東京）、2005 年 3 月
- (2) 沢崎靖治、浅井知浩、奥 直人：時間薬理学に基づいた抗腫瘍新生血管療法 日本薬学会第 125 年会（東京）、2005 年 3 月
- (3) 宮澤壮一郎、前田典之、清水広介、浅井知浩、難波幸弘、周東 智、松田 彰、奥 直人：腫瘍新生血管標的化血中滞留性リポソームによるがん治療 第 21 回日本 DDS 学会（長崎）2005 年 7 月
- (4) 宮澤壮一郎、前田典之、清水広介、浅井知浩、塚田秀夫、難波幸弘、奥 直人：腫瘍新生血管標的化血中滞留性リポソームの体内動態 PET 解析及びがん治療 第 1 回放射薬学研究発表会（東京）2005 年 8 月
- (5) 嶋津史恵、跡部一孝、白髪恵美、石田竜弘、
際田弘志：Metronomic Chemotherapy における血管新生阻害に関する検討 第 44 回日本薬学会中四国支部大会（松山）2005 年 11 月
- (6) 白髪恵美、西村武広、石田竜弘、際田弘志：シクロフォスファミドを用いた Metronomic Chemotherapy におけるドキソルビシン封入りポソームの併用効果の検討 第 44 回日本薬学会中四国支部大会（松山）2005 年 11 月
- (7) 西村武広、小林友貴、石田竜弘、際田弘志：Studying the mechanism overcoming P-gp mediated MDR cells by doxorubicin-containing transferring-modified liposomes. 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（京都）2005 年 1 月
- (8) 沢崎靖治、浅井知浩、奥 直人：腫瘍新生血管傷害療法の時間薬理学的検討 日本薬学会東海支部例会（名古屋）2005 年 12 月
- (9) 田上辰秋、廣瀬聖実、バリケロ ジョゼマリオ、山崎尚志、石田竜弘、際田弘志：Argonaute2 を標的とした siRNA による apoptosis の誘導に関する検討、日本薬剤学会 21 年会（金沢）2006 年 3 月
- (10) バリケロ ジョゼマリオ、石田竜弘、Soares Luis A.L., 田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、菊池寛、際田弘志：Setting TFL-3 formulation parameters for siRNA use in functional genomics studies、日本薬剤学会 21 年会（金沢）2006 年 3 月
- (11) 菅直恵、金平実、石田竜弘、伊藤智佳、久保和弘、菊池寛、際田弘志：ドキソルビシン封入ペプチドスペーサー含有 PEG 修飾リポソームの有用性に関する検討、日本薬剤学会 21 年会（金沢）2006 年 3 月
- (12) 西村武広、菅直恵、石田竜弘、橋本浩一、菊池寛、際田弘志：肺転移性メラノーマ(B16BL6)への癌抑制遺伝子 PTEN 導入による doxorubicin の感受性増強に関する検討、日本薬学会第 126 年会（仙台）2006 年 3 月
- (13) 三原陽、田上辰秋、Jose M. Barichello、石田竜弘、橋本浩一、小林浩一、菊池寛、際田弘志：新規カチオニックリポソームによる遺伝子導入効率に関するスクリーニング的検討、日本薬学会第 126 年会（仙台）2006 年 3 月
- (14) 横田洵一、鈴木佑子、浅井知浩、石田竜弘、

際田弘志、出羽毅久、南後守、奥直人：ポリカチ
オンリポソームを用いた新規 siRNA デリバリー
システムの模索、日本薬学会第 126 年会（仙台）
2006年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ago2-siRNA 導入による細胞死の誘導に関する検討

分担研究者 石田 竜弘 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教授
Jose Mario Barichello 医療機器センター・流動研究員

研究要旨 当該研究期間において、RISC 構成成分の一つである Argonaute2 (Ago2) に対する siRNA を設計し、これを細胞内に導入することにより細胞死が誘導されるかどうか、さらには細胞内への siRNA 導入効率が高く in vivo 応用につながるキャリアの開発、また、細胞内導入後の siRNA の動態に関する検討を行った。まず、Ago2 に対する siRNA を細胞内に導入する事で Ago2 の mRNA が knockdown されるか RT-PCR 法で評価した。設計した siRNA の一つで顕著な knockdown 効果が観察された。次いで、Ago2 knockdown による細胞死について、MTT assay 法で確認したところ、強い細胞死が確認された。以上の結果から、本事業で提案した作業仮説を実証することができた。また、設計した新たなキャリアによる RNAi 効果を検討したところ、細胞毒性も低くかつ高い RNAi 効果を誘導することが示された。また、低濃度の siRNA を効果的に機能させる siRNA-カチオニックリポソーム複合体形成法をも見出した。これらは本研究を in vivo へと進める上で非常に重要な知見であると考えられる。今後、我々が見出した処方と方法を基盤として、in vivo 応用可能な All in one デバイスの開発を推進していく予定である。また、細胞内動態解析の結果、エンドソーム・ライソソームから細胞質への siRNA の放出過程が RNAi 効果の効率化をはかる上で律速過程であることが示された。今後、この律速段階をクリアし、効率よく細胞質に siRNA を放出するシステムを前述の処方に組み込み、All in one デバイスの開発を進めていく予定である。さらに、膜型マトリクスメタロプロテアーゼ 1 型(MT1-MMP)に標的化したリポソームは血管内皮細胞に高い親和性を持ち、細胞内に内在化されることを確認した。先の新規カチオニックリポソームをこれらのリガンドで修飾し、in vivo で新生血管に集積性を示すかどうか検討している。以上の結果から Ago2 の knockdown による細胞死と新生血管への選択的デリバリーシステムを融合させる事により、革新的がん治療法の開発が実現できるものと期待される。

A. 研究目的

RISC(RNA-induced silencing complex)は細胞の生存に深く関わっているとともに、普遍的に発現しているタンパク複合体である。RISCは、細胞内でsiRNAを取り込み、このsiRNAと相補的な配列を持つmRNAを酵素的に切断し、タンパクの発現を抑制する。しかし、RISCの存在量は限られており、①siRNAを細胞内に送達することでRISCを消費させる、②RISC構成タンパクに対するsiRNAを導入することによってRISCをknockdownする、ことにより細胞内RISC量を抑制し、細胞機能の破綻を導きアポトーシスを誘導できるのではないかと考えた。そこで、この仮説の実証を試みた。

また、カチオニック・リポソームは、細胞毒性

および免疫原性も低い事から、臨床応用可能な vector として期待され検討されている。しかし、siRNAのキャリアとしての検討は少ない。TFL-3 は第一製薬により開発された遺伝子導入用カチオニックリポソームであり、現在はin vitroでの遺伝子導入用vectorとして市販されているが、今後十分in vivoへの展開が可能である。そこで、本リポソームを「All in oneデバイス」の骨格と位置付け、様々な観点から処方検討を行った。

また、効率のよいデリバリーシステム開発を推進する上で、非常に重要であると考えられる細胞内移行後のsiRNAの動態に関して蛍光顕微鏡下基礎的な検討を開始した。さらに、がん新生血管への特異的なsiRNAデリバリーを実現すべく、がん

新生血管に特異的に発現している膜型マトリクスメタロプロテアーゼ1型(MT1-MMP)に対するモノクローナル抗体でキャリアを修飾し、その血管内皮細胞特異性に関してin vitroで検討した。

B. 研究方法

(1) Knockdown 効率の評価

N/P 比を変化させて GFP あるいは luciferase に対する siRNA と複合体を形成させた。In vitro における導入用細胞として HT-1080 ヒト繊維芽肉腫細胞の wild type および GFP 安定発現株 (GFP/HT-1080 細胞) を用いた。リポソーム/siRNA 複合体を 10% 血清存在下で 4 時間インキュベートし、siRNA を導入した。GFP タンパク質の蛍光あるいは luciferase 活性を測定し、knockdown による減少率を算出した。コントロールには in vitro で高い siRNA 導入効果を示す Lipofectamine2000 を用いた。

(2) 細胞毒性試験

細胞毒性は MTT 法によって評価した。コントロールには Lipofectamine2000 を用いた。

(3) 細胞内動態解析

siRNA を FAM で蛍光標識した siRNA/リポソーム複合体を調製した。複合体を HT-1080 あるいは HUVEC 細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(4) Ago2 に対する siRNA の導入

Ago2 に対する siRNA を種々の処方を用いて HT-1080 細胞に導入した。Knockdown 効率は RT-PCR 法で評価した。コントロール siRNA としては GFP あるいは luciferase に対する siRNA を用いた。なお、コントロール実験として β -actin の RT-PCR を実施した。

(5) Ago2-siRNA 導入による Apoptosis の誘導

Caspase-3 活性の測定は市販のキットを用いて行った。Apoptosis 誘導状況に関しては flow cytometry を用いて検討した。Propidium iodide で核を染色すると同時に、annexin V を用いて phosphatidylserine を染色する事により、Ago2-siRNA 導入後の経時的な apoptosis 誘導状況を調べた。Annexin V は early apoptosis の、PI は late apoptosis のそれぞれマーカーである。

(6) 血管内皮細胞への標的化

In vitro における新生血管のモデルとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC は bFGF, VEGF, IGF-1, EGF, 2% FBS を含む EGM-2 培地にて培養した。抗 MT1-MMP 抗体にて修飾した DiD リポソームを調製し、細胞内に取り込まれたリポソームを DiD の蛍光を指標として定量評価した。

C. 研究結果

(1) RISC抑制によるアポトーシス誘導

(I) HT1080細胞を用いた検討

Ago2-siRNA を Lipofectamine2000 により HT1080 に導入し、Ago2-mRNA 量を PCR 法で測定した。Control として用いた luciferase に対する siRNA では Ago2-mRNA 発現量に影響はなく、Ago2-siRNA を用いた際に顕著な mRNA 量の経時的な減少が確認された。このことから、我々が設計した siRNA は Ago2 遺伝子発現を選択的に knockdown することが確認された。

ついで、Ago2-siRNA が導入された際の細胞の増殖性の変化について検討した。まず、細胞増殖に影響を与える siRNA 濃度の検討を試みた。siRNA 量に依存した細胞増殖性の減少が観察された。しかし、unrelated-siRNA (luciferase) においても細胞増殖障害性が観察された。このことは、Ago2 knockdown による特異的な細胞増殖障害性を誘導するには、最適な量の siRNA を導入する事が重要であることを示唆するものである。このことから、上記の非特異的な細胞死を誘導しにくい 12.5 nM の siRNA を検討に用いる事とした。

さらに、細胞増殖性の経時的変化に関して検討した。先の検討と同様に unrelated-siRNA (luciferase) を用いた場合であっても、細胞増殖性に影響があることが示された。しかし、その一方で、Ago2-siRNA を導入した場合において、さらに強い細胞増殖抑制が観察された。

次いで、これらの細胞増殖抑制が apoptosis を介して生じたものであるか検討した。Apoptosis は様々な経路を経て生じる現象であるが、一般に caspase ファミリーに属する分子がその過程で重要な役割を果たす事が知られてもいる。そこで、Ago2-siRNA 導入後の細胞内 caspase-3 活性について検討した。結果、siRNA 導入後、Ago2-siRNA は

48時間後においてcontrolとして用いたunrelated siRNA(luciferase)と比較して高いcaspase-3活性を誘導する事が分かった。

さらに、flow cytometryを用いて、Ago2-siRNAによるapoptosis誘導状況を検討した。結果、測定したすべての時間において、Ago2-siRNAを導入した場合の方がunrelated-siRNA(luciferase)を導入した場合に比べて、apoptosis誘導が高い事が確認された。さらに、Ago2-siRNAの導入により、測定したすべての時間でearly apoptosisが誘導されていることが確認された。

(II) HUVEC細胞を用いた検討

がん新生血管に近い細胞でのAgo2-siRNA導入による効果(apoptosis誘導)発現の有無を確認するためHUVECを用いて検討を行った。

Preliminaryな結果ではあるが、Lipofecamine2000を用い、12.5mMのAgo2-siRNAを導入したところ、HUVECの方がHT1080よりも①siRNA/リポソーム複合体による非特異的な影響を受けにくい、②Ago2-knockdownによるapoptosis誘導が強く見られる、ことが示された。

(2) siRNA/リポソーム処方検討

Luciferase mRNAに対するsiRNA(luc-siRNA)によるluciferase発現knockdownを指標とし、処方検討を行った。本系の問題点として、事前にluciferaseのreporter geneを細胞に導入する事が必要であり、細胞にとってはreporter geneとsiRNAの2つを短時間に連続して導入されることとなり、得られた結果がartifactである可能性も考えられた。しかし、検討を開始した時点では他の系を持ち合わせていなかったため、やむなく本系を採用した。しかし、分担研究者の浅井によりGFP安定発現HT1080株が構築され供給されたため、一部の検討ではこの細胞株を用い並行して検討を行った。

TFL-3はHeLa細胞において15nM以上のluc-siRNA量を導入した際に十分なluciferase gene knockdown効果を示すことがわかった。一方、GFP安定発現HT1080細胞を用いた検討では、120nM以上のGFPに対するsiRNAを導入しなければ十分なknockdown効果が得られないことが分かった。

次いで、より高いRNAi効果を獲得するために、処方改良を試みた。様々な検討を加えた結果、siRNAとTFL-3を混合する際にvortexingを加える

だけで単位siRNA量あたりのRNAi効果を数倍高めることができることを見出した。驚くべきことに、GFP安定発現株において、以前の処方では全くRNAi効果が得られなかった30nMにおいて、改良型の処方では高いRNAi効果が得られた。したがって、本改良型処方は、少量のsiRNAで高いRNAi効果が得られる可能性が高いことから、in vivoへの応用も可能な処方であると考えられる。

(3) 細胞内動態解析

HT1080 および HUVEC において、細胞内移行後の siRNA の多くはエンドソームあるいはライソソームと考えられるオルガネラに蓄積する傾向が高いことが示唆された。

(4) 新生血管への標的化

MT1-MMPに標的化したリポソームは血管内皮細胞に高い親和性を持ち、細胞内に内在化されることを確認した。

D. 考察

以上の結果から、Ago2をknockdownすることで細胞の恒常性の破綻が導かれ、その結果としてapoptosisを介した強い細胞増殖抑制効果が得られることが明らかとなり、我々が提案した仮説が妥当である事が示された。今後、in vivoで有用な効果を得るために、siRNA/リポソーム複合体による非特異的な細胞増殖抑制効果を限りなく軽減し、Ago2-knockdownに起因した抑制効果のみを発揮しうるような処方を設計していく事が重要であると考えられる。

少ない量のsiRNAで高いRNAi効果が得られる処方調製法を得たことは、siRNAの投与量を減らせる可能性が高く、安全性の面でも経済性の面でも有利であると考えられる。また、新生血管へのターゲティングが実現できればin vivoでも高い効果が得られる可能性が高いと考えられ、今後の展開が期待される。

通常、治療の標的となるmRNAは細胞内で多寡の違いはあるものの一定量発現しておりタンパクのreplacementに寄与しているものと考えられる。したがって、外来遺伝子の一過性のタンパク発現の抑制を指標としてキャリアの能力を評価し改善を試みても、標的遺伝子の十分なknockdownにはいたらないことも予想される。したがって、

RNAi効果を治療に結び付けていくには、治療を目的とした組織から得られた細胞を用い実際の標的遺伝子に対するsiRNAを導入して効果発現の有無を検討するか、あるいは我々が用いたような外来遺伝子安定発現株を用いて検討すべきであると思われる。

一般に、カチオンリポソームとpDNAの複合体を形成させる際、pDNAはせん断力に極めて弱いためagitation禁忌とされてきた。しかし、siRNAの場合はむしろagitationすることで極めて少量で高いRNAi効果を導くことができることがわかった。したがって、これまでのpDNAキャリア開発時に得られたknow-howが必ずしもsiRNAキャリア開発時に適応できるわけではないと言える。今後、siRNAキャリアを開発していく上で、pDNAキャリア開発時の結果を踏まえつつも、先入観を捨てて取り組む必要があると思われる。

細胞内動態解析の結果、エンドソーム・ライゾソームから細胞質へのsiRNAの放出過程が、RNAi効果の効率化をはかる上で律速過程であることが示された。今後、この律速段階をクリアし、効率よく細胞質にsiRNAを放出するシステムを処方に組み込み、All in oneデバイスの開発へとつなげていく予定である。

E. 結論

本年度の検討から、①Ago2-siRNA 導入により apoptosis を介した細胞死が誘導されること、②毒性が低く低濃度の siRNA で高い RNAi 効果を発揮する処方と処方調整法を得ることができ、③新生血管内皮細胞への標的化が実現されることが示された。今後、Ago2 の knockdown による細胞死とがん新生血管への選択的デリバリーシステムとを融合させる事により、革新的がん治療法の開発へと進展できるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Li, W., Ishida, T., Okada, Y., Oku, N., Kiwada, H., Increased gene expression by cationic liposomes

(TFL-3) in lung metastases following intravenous injection. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 701-706 (2005)

(2) Nguyen, L.T., Ishida, T., Kiwada, H., Gene expression in primary cultured mouse hepatocytes with a cationic liposomal vector, TFL-3: Comparison with rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1472-1475 (2005)

(3) Ishida, T., Li, W., Liu, Z., Kiwada, H., Stimulatory effect of polyethylene glycol (PEG) on gene expression in mouse liver following hydrodynamics-based transfection. *J. Gene Med.*, **8**, 324-334 (2006)

2. 学会発表

(1) 嶋津史恵、跡部一孝、白髪恵美、石田竜弘、際田弘志: Metronomic Chemotherapy における血管新生阻害に関する検討 第44回日本薬学会中四国支部大会(松山) 2005年11月

(2) 白髪恵美、西村武広、石田竜弘、際田弘志: シクロフォスファミドを用いた Metronomic Chemotherapy におけるドキシソルビシン封入リポソームの併用効果の検討 第44回日本薬学会中四国支部大会(松山) 2005年11月

(3) 西村武広、小林友貴、石田竜弘、際田弘志: Studying the mechanism overcoming P-gp mediated MDR cells by doxorubicin-containing transferring-modified liposomes. 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(京都) 2005年11月

(4) 田上辰秋、廣瀬聖実、バリケロ ジョゼマリオ、山崎尚志、石田竜弘、際田弘志: Argonaute2 を標的とした siRNA による apoptosis の誘導に関する検討、日本薬剤学会21年会(金沢) 2006年3月

(5) バリケロ ジョゼマリオ、石田竜弘、Soares Luis A.L., 田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、菊池寛、際田弘志: Setting TFL-3 formulation parameters for siRNA use in functional genomics studies、日本薬剤学会21年会(金沢) 2006年3月

(6) 菅直恵、金平実、石田竜弘、伊藤智佳、久保和弘、菊池寛、際田弘志: ドキシソルビシン封入ペプチドスペーサー含有 PEG 修飾リポソームの有用性に関する検討、日本薬剤学会21年会(金沢) 2006年3月

(7) 西村武広、菅直恵、石田竜弘、橋本浩一、菊池寛、際田弘志: 肺転移性メラノーマ(B16BL6)

への癌抑制遺伝子 PTEN 導入による doxorubicin の感受性増強に関する検討、日本薬学会第126年会（仙台）2006年3月

(8) 三原陽、田上辰秋、Jose M. Barichello、石田竜弘、橋本浩一、小林浩一、菊池寛、際田弘志：新規カチオニックリポソームによる遺伝子導入効率に関するスクリーニング的検討、日本薬学会第126年会（仙台）2006年3月

(9) 横田洵一、鈴木佑子、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後守、奥直人：ポリカチオンリポソームを用いた新規 siRNA デリバリーシステムの模索、日本薬学会第126年会（仙台）2006年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

siRNA 導入用キャリアの開発と血管内皮細胞への siRNA 導入に関する検討

分担研究者 浅井 知浩 静岡県立大学大学院薬学研究科講師

研究要旨 今回、がん新生血管を標的とした All in one デバイスのベースとなる siRNA 導入キャリアの開発を目的とし、cetyl-polyethylenimine (cetyl-PEI) を付加したポリカチオンリポソーム (PCL) を調製した。最初に PCL の脂質組成および PCL/siRNA 複合体の最適 Nitrogen/Phosphate (N/P) 比を検討した。PCL による siRNA 導入効果は、HT-1080 ヒト繊維芽肉腫細胞の GFP 安定発現株に GFP に対する siRNA を導入し、GFP タンパク質の減少率を指標にして抑制効果を評価した。その結果、PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し、Nitrogen/Phosphate (N/P) 比を 24eq. とした粒子径約 150 nm の PCL/siRNA 複合体において最大の RNAi 効果が得られた。この際、細胞傷害性は観察されなかった。PCL/siRNA 複合体を HT-1080 細胞に導入して細胞内動態を解析した結果、24 時間後には大部分の複合体が細胞膜から細胞質に移行し、細胞質においては経時的に複合体が解離していく様子が観察された。最適化した条件下、本研究の候補標的分子である RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) 構成タンパク質 Argonaute2 に対する siRNA を PCL によって HT-1080 細胞に導入した。その結果、配列設計した複数の siRNA のひとつに効率的なノックダウンが確認され、Argonaute2 に対する siRNA の配列決定に至った。次に新生血管の内皮細胞のインビトロモデルとして活性化状態のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、PCL による siRNA 導入効率を評価した。Argonaute2 に関する検討に先立って GAPDH に対する siRNA を PCL によって導入したところ、GAPDH の効率的なノックダウンが確認された。本年度の検討で「All in one デバイス」の基本骨格部分となる siRNA 導入用 PCL の優れた導入効率が明らかとなった。同時平行的に新生血管に対する標的化プローブに関する研究も進めており、新生血管特異的ペプチド APRPG および抗 MT1-MMP 抗体の有用性が明らかとなってきている。このような機能性分子で PCL を修飾し、Argonaute2 に対する siRNA を新生血管内皮細胞に導入することにより、がん新生血管を標的とした All in one デバイスの創成へと繋がるのが期待できる。

A. 研究目的

RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に対する siRNA を搭載したがん新生血管特異的デバイスを開発し、miRNA 調節機構の破綻を介したがん新生血管選択的な破壊、がんの退縮、及び血行性転移の抑制効果等を明らかにする。初年度は、まず siRNA の導入に最適化したポリカチオンリポソーム (PCL) の開発から着手した。はじめに「がん新生血管を標的とした All in one デバイス」の基本骨格部分となる siRNA 導入用 PCL を開発し、後に生体内において効率的な siRNA 導入を実現するための PEG 修飾や新生血管への特異性を付

与するためのリガンド修飾等を実施していく計画である。本研究で用いた cetyl-polyethylenimine (cetyl-PEI) を付加した PCL は、プラスミド DNA の導入キャリアとして、*in vitro* 及び *in vivo* における優れた導入効果が明らかとなっている。そこで、初年度はまず PCL が siRNA の導入に応用可能であるとの仮説を立て、レポーター遺伝子のノックダウン効率や細胞毒性を指標とした検討を実施し、PCL の脂質組成および PCL/siRNA 複合体の N/P 比を最適化した。さらには導入機構を可視的に明らかにすることを目的とし、PCL および siRNA の細胞内動態について検討した。一方で、

本研究の候補標的分子である RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) 構成タンパク質 Argonaute2 に対する siRNA の配列を決定するため、候補 siRNA のノックダウン効率を評価した。さらに本研究の標的細胞である新生血管内皮細胞への siRNA 導入を評価するため、まずインビトロモデルとして HUVEC を用い、PCL を用いた際の siRNA 導入効率を検討した。

B. 研究方法

(1) PCL/siRNA 複合体の調製

cetyl-PEI および脂質 (DOPE 等) を混合、凍結乾燥し、TE にて水和した。PCL の基本脂質としては DOPE または DPPC を用い、さらにコレステロールを含むものと含まないものを調製した。PCL の粒子径はエクストルージョン法によって調整した。PCL の粒子径および ζ-電位をゼータサイザー (MALVERN) を用いて測定した。cetyl-PEI の Nitrogen および siRNA の Phosphate の比 (N/P) を指標に PCL と siRNA を混合し、PCL/siRNA 複合体を調製した。

(2) ノックダウン効率の評価

組成の異なる各 PCL を調製後、N/P 比を変化させて GFP に対する siRNA と複合体を形成させた。インビトロにおける導入用細胞として HT-1080 ヒト繊維芽肉腫細胞の GFP 安定発現株 (GFP/HT-1080 細胞) を用い、PCL/siRNA 複合体を 10% 血清存在下で 4 時間インキュベートし、siRNA を導入した。各 PCL/siRNA 複合体において経時的に GFP タンパク質の蛍光を測定し、ノックダウンによる減少率を算出した。この減少率を指標として RNAi 効果を判定し、最適条件を決定した。コントロールにはインビトロにおいて高い siRNA 導入効果を示す Lipofectamine2000 を用いた。

(3) 細胞毒性試験

ノックダウン効率を評価した各条件における PCL/siRNA 複合体の細胞毒性について、TetraColor One™ を用いた MTT 改変法によって評価した。コントロールには Lipofectamine2000 を用いた。

(4) 細胞内動態解析

PCL を DiD, siRNA を FAM で 2 重蛍光標識した PCL/siRNA 複合体を調製した。複合体を HT-1080

細胞に導入し、共焦点レーザースキャン顕微鏡下で各々の細胞内動態を解析した。核は DAPI にて対比染色し、核、細胞質、または細胞膜に局在する PCL および siRNA をそれぞれ計測した。

(5) Argonaute2 に対する siRNA の導入
最適化した PCL による siRNA 導入条件において Argonaute2 に対する siRNA を HT-1080 細胞に導入した。候補 siRNA を 6 種類用意し、ノックダウン効率を比較した。導入 8, 16, 24 時間後にサンプルを調製し、ノックダウン効率を RT-PCR 法によって評価した。コントロール siRNA としては GFP に対する siRNA を用いた。なお、コントロール実験として β-actin の RT-PCR を実施した。

(6) 血管内皮細胞への siRNA 導入
インビトロにおける新生血管のモデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC は bFGF, VEGF, IGF-1, EGF, 2% FBS を含む EGM-2 培地にて培養した。最適化した PCL による siRNA 導入条件において GAPDH に対する siRNA を導入し、導入 24, 48 時間後、ノックダウン効率をウエスタンブロッティング法によって評価した。コントロール siRNA としては GFP に対する siRNA を用いた。

C. 研究結果

(1) PCL/siRNA 複合体

様々な組成の PCL を N/P を 18~30 まで変化させて siRNA と混合し、PCL/siRNA 複合体を調製した。その結果、粒子径が 120~160 nm, ゼータ電位が +30~+50 mV の PCL/siRNA 複合体が形成された。調製した各 PCL/siRNA 複合体を以下の実験に用いた。

(2) ノックダウン効率の評価

PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し、PCL/siRNA 複合体の N/P 比が 24 eq. の条件において最大の RNAi 効果が得られた。抑制効率は Lipofectamine2000 と同程度であった。PCL の基本脂質として DPPC とコレステロールを使用した場合にもノックダウンが観察された。経時的に観察した結果、複合体導入後 48 時間で最も抑制される傾向が観察された。

(3) 細胞毒性試験

PCL はコントロールとして用いた

Lipofectamin2000 と比較して細胞傷害性が低いことが明らかとなった。なお、最も高い効果を示した PCL/siRNA 複合体において細胞傷害性は観察されなかった。

(4) 細胞内動態解析

細胞内動態の解析は、最適条件（PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し、PCL/siRNA 複合体の N/P 比が 24 eq. の条件）において実施した。導入 24 時間後において大部分の PCL/siRNA 複合体が細胞膜から細胞質への移行を終え、細胞質においては経時的に複合体が解離していく様子が観察された。

(5) Argonaute2 に対する siRNA の導入

RT-PCR 法によって評価したところ、候補 siRNA のひとつにノックダウンが確認された。β-actin のバンドに差はなかった。さらに GFP に対する siRNA では影響を受けなかったことから、Argonaute2 のノックダウンは特異的であることが明らかとなった。

(6) 血管内皮細胞への siRNA 導入

ウエスタンブロッティング法によって評価したところ、GAPDH の特異的なノックダウンが確認された。GFP に対する siRNA を用いた場合にはノックダウンは起こらなかった。β-actin のバンドにはいずれも差がなかった。

D. 考察

以上の結果より、siRNA の導入に最適化した PCL は、高効率かつ低毒性という優れた特徴を有することが証明された。インビトロにおいては、PCL のヘルパー脂質として DOPE とコレステロールを使用し、PCL/siRNA 複合体の N/P 比が 24 eq. で最大の RNAi 効果が得られることが明らかとなった。DPPC とコレステロールを基本脂質とした PCL においても RNAi 効果が得られていることから、インビボへの応用の際にはより安定な PCL を選択することも可能であると考えられる。2 重蛍光標識した PCL/siRNA 複合体の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡にて解析したところ、細胞質において複合体が解離していく様子を可視的に捉えることができた。高い RNAi 効果を得るためには、細胞質に siRNA を効率的にデリバリーし、RISC の形成を促す必要があるため、この評

価系は今後の製剤設計にも有用であると考えられる。「siRNA を搭載したがん新生血管特異的デバイス」の基本骨格部分となる siRNA 導入用 PCL の開発に成功した。そこで次の検討課題としては、1) Argonaute2 ノックダウン効果の検討および 2) siRNA 搭載キャリアへの新生血管特異性の付与が挙げられる。そこで、Argonaute2 ノックダウン効果の検討を実施するに先立ち、今後実験に用いていく siRNA の配列の決定を実施した。そして PCL を用いて siRNA を導入した結果、候補配列のひとつに特異的なノックダウンが確認された。今後は実際に Argonaute2 ノックダウンの効果について、細胞増殖試験および TUNEL 法によるアポトーシス検出等の検討を進めていき、miRNA 調節機構の破綻を介したアポトーシスという概念を証明したいと考えている。次に siRNA 搭載キャリアへの新生血管特異性の付与に関してはまず内皮細胞への導入が可能であるか否かについて検討するところから開始した。今回は、新生血管内皮細胞のモデルとして各種増殖因子を用いて活性化した HUVEC を用いた。PCL によって GAPDH に対する siRNA を導入した結果、ノックダウンが確認された。本来正常細胞である内皮細胞とがん細胞では siRNA 導入の難易度が異なることが推察されたが、PCL によってノックダウンが可能であることが明らかとなった。今後は同時平行的に研究を遂行してきた新生血管特異的ペプチド APRPG および抗 MT1-MMP 抗体を結合した PCL の開発を進め、PCL に腫瘍新生血管特異性を付与していく予定である。

E. 結論

本年度の検討で「All in one デバイス」の基本骨格部分となる siRNA 導入用 PCL の優れた導入効率が明らかとなった。PCL を用いることで内皮細胞への導入が可能であることが明らかとなり、さらには Argonaute2 に対する siRNA の配列が決定した。一方で、新生血管特異的ペプチド APRPG および抗 MT1-MMP 抗体の有用性が明らかとなってきている。このような機能性分子で PCL を修飾し、Argonaute2 に対する siRNA を新生血管内皮細胞に導入することにより、がん新生血管を標的とした

All in one デバイスの創成へと繋がることを期待できる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Shimizu, K., Asai, T., Fuse, C., Sadzuka, Y., Sonobe, T., Ogino, K., Taki, T., Tanaka, T., Oku, N.: Applicability of anti-neovascular therapy to drug-resistant tumor: Suppression of drug-resistant P388 tumor growth with neovessel-targeted liposomal adriamycin. *Int. J. Pharm.*, **296**, 133-141 (2005)

(2) Ichikawa, K., Hikita, T., Maeda, N., Yonezawa, S., Takeuchi, Y., Asai, T., Namba, Y., Oku, N.: Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim. Biophys. Acta*, **1669**, 69-74 (2005)

(3) Shimizu, K., Asai, T. and Oku, N.: Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.*, **9**, 63-76 (2005)

2. 学会発表

(1) 前田典之、宮澤壮一郎、清水広介、浅井知浩、北沢貞哉、難波幸弘、奥 直人：新生血管標的化血中滞留リポソームによる腫瘍新生血管傷害療法 日本薬学会第 125 年会（東京）、講演要旨集 2、p.149、2005 年 3 月 29 日

(2) 沢崎靖治、浅井知浩、奥 直人：時間薬理学に基づいた抗腫瘍新生血管療法 日本薬学会第 125 年会（東京）、講演要旨集 2、p.91、2005 年 3 月 29 日

(3) 宮澤壮一郎、前田典之、清水広介、浅井知浩、難波幸弘、周東 智、松田 彰、奥 直人：腫瘍新生血管標的化血中滞留性リポソームによるがん治療 第 21 回日本 DDS 学会（長崎）プログラム予稿集、p.304 2005 年 7 月 22 日

(4) 宮澤壮一郎、前田典之、清水広介、浅井知浩、塚田秀夫、難波幸弘、奥 直人：腫瘍新生血管標的化血中滞留性リポソームの体内動態 PET 解析及びがん治療 第 1 回放射薬学研究発表会（東京）要旨集、p.12、2005 年 8 月 4 日

(5) 沢崎靖治、浅井知浩、奥 直人：腫瘍新生血管傷害療法の時間薬理学的検討 日本薬学会東海

支部例会（名古屋）2005 年 12 月 3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石田 竜弘 際田 弘志	長期血中滞留性リポソーム	秋吉一成/ 辻井薫	リポソーム応用の新展開	NTS	東京	2005	510-514
石田 竜弘 際田 弘志	リポソームと細胞の相互作用	秋吉一成/ 辻井薫	リポソーム応用の新展開	NTS	東京	2005	528-538
Asai, T. and Oku, N.	Liposomalized oligopeptides in cancer therapy.	Nejat Duzgunes	Methods Enzymol.	ELSEVIER	USA	2005	163-176
浅井 知浩 奥 直人	リポソーム内への物質の封入 (分子, 高分子)	秋吉一成/ 辻井薫	リポソーム応用の新展開	NTS	東京	2005	176-189
浅井 知浩	アクティブターゲティング 1.ペプチド	秋吉一成/ 辻井薫	リポソーム応用の新展開	NTS	東京	2005	539-546

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li, W., <u>Ishida, T.</u> , Okada, Y., Oku, N., Kiwada, H.	Increased gene expression by cationic liposomes (TFL-3) in lung metastases following intravenous injection.	Biol. Pharm. Bull.	21	701-706	2005
Nguyen, L.T., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	Gene expression in primary cultured mouse hepatocytes with a cationic liposomal vector, TFL-3: Comparison with rat hepatocytes.	Biol. Pharm. Bull.	28	1472-1475	2005
<u>Ishida, T.</u> , Li, W., Liu, Z., Kiwada, H.	Stimulatory effect of polyethylene glycol (PEG) on gene expression in mouse liver following hydrodynamics-based transfection.	J. Gene Med.	8	324-334	2005
Shimizu, K., <u>Asai, T.</u> , Fuse, C., Sadzuka, Y., Sonobe, T., Ogino, K., Taki, T., Tanaka, T., Oku, N.	Applicability of anti-neovascular therapy to drug-resistant tumor: Suppression of drug-resistant P388 tumor growth with neovessel-targeted liposomal adriamycin.	Int. J. Pharm.	296	133-141	2005
Ichikawa, K., Hikita, T., Maeda, N., Yonezawa, S., Takeuchi, Y., <u>Asai, T.</u> , Namba, Y., Oku, N.	Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels.	Biochim. Biophys. Acta	1669	69-74	2005
Shimizu, K., <u>Asai, T.</u> , Oku, N.	Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic therapy.	Expert Opin. Ther. Targets.	9	63-76	2005
浅井知浩	腫瘍新生血管標的化リポソームの新展開.	薬剤学	65	169-174	2005

Increased Gene Expression by Cationic Liposomes (TFL-3) in Lung Metastases Following Intravenous Injection

Wenhao LI,^a Tatsuhiro ISHIDA,^a Yurie OKADA,^a Naoto OKU,^b and Hiroshi KIWADA^{*,a}

^aDepartment of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima; 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan; and ^bDepartment of Medical Biochemistry and COE program in the 21st Century, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences; 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan. Received November 22, 2004; accepted January 13, 2005

We recently showed that size, not surface charge, is a major determinant of the *in vitro* lipofection efficiency of pDNA/TFL-3 complex (lipoplex), even in the presence of serum. In this study, the effect of lipoplex size as a result of interaction with serum proteins on *in vitro* lipofection and the relationship of this with *in vivo* lipofection was examined in a murine lung metastasis model. As previously described, the pDNA to lipid ratio (P/L ratio) affected both the size and zeta potential of the lipoplex. *In vitro* studies also indicated that transgene expression in B16BL6 cells was largely dependent on the size of the lipoplex, both in the absence or presence (50% (v/v)) of serum. An *in vivo* lipofection experiment showed that predominant gene expression in lungs occurred only in tumor-bearing mice, not in normal mice. Based on the *in vitro* study, this tumor-related gene expression was not related to lipoplex size in the presence of serum (50% (v/v)), suggesting that the size alteration, as the result of interactions with serum proteins in the blood stream may not play an important role in the case of systemic injections. In addition, the efficient gene expression in tumor-bearing lung was not related to the progression of lung metastases. The area-specific gene expression in tumor-bearing lungs, which was largely dependent on the P/L ratio of the lipoplexes, was observed by fluorescent microscopy. Although the underlying mechanism for the area-specific transgene expression is not clear, it may be related to the interaction of lipoplexes with tumor cells, vascular endothelial cells under angiogenesis and normal cells in the lungs. The possibility that TFL-3 is a useful utility to the targeted delivery of pDNA to lungs and tumor-related lipofection is demonstrated. This result suggests that area-specific gene expression in lung metastases may be achieved by controlling the physicochemical properties of the lipoplex, *i.e.* the P/L ratio.

Key words gene delivery; lipofection; lung metastasis; cationic liposome

Gene therapy, a promising medical technology against many diseases, has some potential for the treatment of certain types of serious cancer such as lung cancer.¹⁾ During the past 15 years, more than 400 clinical studies in gene therapy have been evaluated and almost 70% of these studies were in the area of cancer gene therapy.^{2,3)} However, even though much clinical research has been carried, the validity of this treatment has not been confirmed.⁴⁾

The key for successful gene therapy in the treatment of cancer is the technology used for gene delivery, in which targeted gene delivery to a tumor is achieved. For this purpose, many studies have been directed toward the development of a useful vector system. Vectors for gene therapy can be categorized into two groups: viral and non-viral vectors. The viral vectors mimic the properties of viruses that naturally infect cells and transfer their genetic materials, resulting in a highly efficient gene transfer. They have, however, some limitations which include difficulty for production and toxicity (in particular immunogenicity).⁵⁾ Non-viral vectors based on (poly)cationic lipids, liposomes, and polymers form negatively charged natural and synthetic DNA. It is generally believed that the positive charge on the vector/DNA complex ensures its binding to the cell membrane because of the negative charge on the cell membrane and it then enters the target cells. Although the gene transfer efficiency of non-viral vectors is less than that of their viral counterparts and is also transient in nature, these systems are likely to present several advantages including low-cost and large-scale production, safety, lower immunogenicity, and the capacity to deliver large gene fragments.

A cationic liposome, TFL-3, composed of a cationic lipid,

DC-6-14, with helper lipids dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and cholesterol (CHOL), showed a higher lipofection efficiency in dividing or non-dividing cells *in vitro*, even in the presence of serum^{6–8)} and *in vivo*.⁹⁾ Generally, gene fragments in complexes formed with non-viral vectors are easily and quickly degraded in the presence of serum.¹⁰⁾ An electron microscopic study showed that gene fragments/TFL-3 complexes (lipoplexes) retained their morphology in the presence of serum.⁶⁾ This may account for the high gene transfer activity in serum-containing media and *in vivo*. Based on the above discussion, TFL-3 would be expected to be a superior non-viral vector that could be systemically injected.

In vivo lipofection, the transgene expression would occur as a function of the distribution of the lipoplexes. In addition to the physicochemical properties of the component lipids, the colloidal properties of lipoplexes such as their stability in plasma, pharmacokinetics and biodistribution are major determinant factors achieving the highest transgene and tissue specific expressions.^{11–14)} Organ distribution can be modulated by varying the lipid-to-pDNA ratio or the size of the lipoplexes.¹⁵⁾

With the aging of society in the 21st century, the incidence of cancer is expected to increase. The morbidity rate of lung cancer has been rising particularly rapidly, and a pressing countermeasure is necessary.¹⁶⁾ Lipoplexes usually accumulate largely in the lung, although the distribution changes with time: lipoplexes are found in the lung shortly after intravenous injection but eventually accumulate in the liver after 24 or 48 h.^{17,18)} This is because the lipoplex form aggregates in the blood stream, and is captured in the first capillary en-

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: hkiwada@tokushima-u.ac.jp

countered. If the pDNA could be quickly transferred from lipoplexes to pulmonary endothelial cells after being captured in a capillary of the lung, an enhanced transgene expression might be obtained. In a lung with a tumor, a more extensive gene expression would be observed because of the angiogenesis of vessels and the proliferation of cells in the tumor area.

The focus of this study, therefore, was on the *in vitro* characterization of lipoplexes (pDNA/TFL-3 complex) and the relationship between their characteristics and *in vitro* or *in vivo* transgene expression. For this purpose, we employed a line of highly lung-metastatic melanoma cells, B16BL6, to study *in vitro* transgene expression efficiency and a murine lung metastasis model to examine *in vivo* efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Materials TFL-3 composed of *O,O'*-ditetradecanoyl-*N*-(α -trimethylammonioacetyl) diethanolamine chloride/DOPE/CHOL (1/0.75/0.75, mol/mol) was a generous gift from the Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan). The luciferase assay kit and cell culture lysis reagent (CCLR) were purchased from Promega (WI, U.S.A.). Plasmid DNA (pDNA) pCAG-Luc3 encoding the firefly luciferase, was purchased from Nippon Gene (Toyama, Japan). A pDNA encoding the green fluorescence protein (GFP) gene, gWIZ-GFP was obtained from Gene Therapy Systems, Inc (CA, U.S.A.). pDNA was amplified in *E. Coli* JM 109 and purified by means of a QIAfilter Plasmid Mega Kit from Qiagen (Hilden, Germany). LipofectAMINE was purchased from Invitrogen (CA, U.S.A.). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from GIBCO BRL (NY, U.S.A.). Opti-MEM I medium was purchased from Life Technologies (MD, U.S.A.). Other cell culture reagents were obtained from Nissui Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan). All other reagents were of analytical grade.

Cell Line and Animal B16BL6, a murine melanoma cell line, was cultured in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin in a 5% CO₂ air incubator at 37 °C. Six-week-old male C57BL6 mice, 20–22 g in weight, were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). They had free access to water and rat chow, and were housed under controlled environmental conditions (constant temperature, humidity, and a 12 h dark–light cycle). All animal experiments were evaluated and approved by the Animal and Ethics Review Committee of Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima.

Preparation of pDNA/TFL-3 Complex (Lipoplex) Lipoplex was prepared by gently mixing the appropriate amount of pDNA into TFL-3 with different lipid concentrations (2.5 μ M or 25 μ M) to obtain the desired pDNA to lipid ratio. The pDNA to lipid (P/L) ratio was varied from 0 to 150 g pDNA per total lipid (mol) in liposomes, corresponding to a mol ratio of 0– 2.8×10^{-5} . The lower lipid concentration was for *in vitro* use and the higher concentration was for *in vivo* use.

Characterization of the Lipoplex The particle size and zeta-potential of the resulting lipoplex in 9% sucrose solution with or without 50% (v/v) serum were determined using a laser particle analyzer and a laser electrophoresis zeta poten-

tial analyzer device, NICOMP 380 (Particle sizing system, CA, U.S.A.).

***In Vitro* Transfection** B16BL6 cells were plated in 12-well plates at a density of 1.5×10^5 cells/well. After an overnight pre-culture, the first 200 μ l of Opti MEM or serum was added to a well of a 12-well plate, then 200 μ l of lipoplex (2.5 μ g pDNA/ml) was immediately added. After 1 h of lipofection, the lipoplex was removed and the wells were washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Appropriate medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS was then added and the cells were cultured for a further 23 h. For the luciferase assay, after removal of the medium, the cells were lysed by the addition of 400 μ l of CCLR. The cell lysate was collected and centrifuged (2 min, 20000 \times g, 4 °C) to give a clear supernatant for the assay. The luciferase assay was carried out according to the manufacturer's recommended protocol (Promega, WI, U.S.A.). The protein content in the clear supernatant was determined with a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, CA, U.S.A.). The data are expressed as light counts/min/mg of protein.

***In Vivo* Transfection** To induce pulmonary metastases, murine B16BL6 melanoma cells (5×10^4 cells/mouse) were intravenously injected with 0.2 ml of PBS(–) *via* the tail vein of a C57BL/6 mouse. At the indicated day after the inoculation, lipoplex was intravenously injected *via* the tail vein. The dose of pDNA for injection was fixed at 30 μ g. At 24 h after the injection, the lungs were removed from the mouse. To dissect, the lung was homogenized followed by three freeze-thaw cycles in 1 ml of CCLR. The resulting tissue homogenate was then centrifuged (10 min, 20000 \times g, 4 °C). The clear supernatant was subjected to the luciferase assay as described above.

Fluorescent Microscopic Study Lipoplex containing pDNA encoding the green fluorescence protein (GFP) gene, gWIZ-GFP (30 μ g pDNA/mouse), was intravenously injected into a B16BL6-bearing mouse *via* the tail vein. At 24 h after *in vivo* lipofection, the lungs were removed from the mice, immediately embedded in 4% CMC embedding compound (FINETEC Co., Ltd., Tokyo, Japan), frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C. Frozen lung sections (100 μ m thick) were made using a cryostat by the routine procedure. The sections were directly examined using a Zeiss LSM5 inverted confocal laser scan microscope (Carl Zeiss, Germany) without any fixation. GFP was imaged using 488 nm for excitation and 510–530 nm for emission.

Statistics All mean values are expressed as the mean \pm S.D. Statistical analyses were performed using GraphPad InStat software (GraphPad Software, CA, U.S.A.). The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of P/L Ratio on Size, Zeta Potential and Transfection Efficiency of the Lipoplex The size of the lipoplex was examined for varying ratios of pDNA to lipid of TFL-3 liposomes (P/L ratio) in the absence of serum (Fig. 1A). The mean size of the original TFL-3 before preparation of the lipoplex was approximately 150 nm. Complexing of liposomes with an increasing amount of pDNA, up to 80 P/L ratio, resulted in a dramatic increase in the size of lipoplex. At a P/L ratio of 80, the largest size lipoplex was obtained.

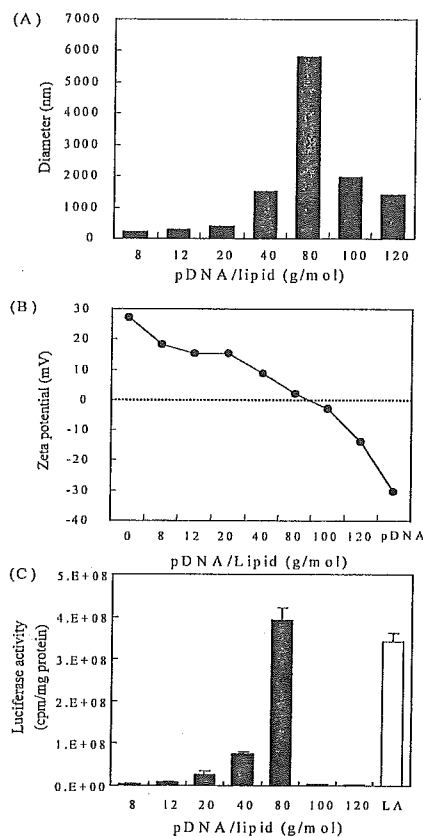


Fig. 1. Effect of P/L Ratio on Size, Zeta Potential and Transfection Efficiency of the Lipoplex

pDNA/TFL-3 complexes (lipoplexes) were prepared, as described method in Materials and Methods. The average size (A) and zeta-potential (B) of the resulting lipoplex were determined. Luciferase activity (C) in B16BL6 cells following lipofection ($1 \mu\text{g}$ of pDNA) was determined, as described in Materials and Methods. Filled column, pDNA/TFL-3 complex; open column, pDNA/LipofectAMINE (LA) complex. Data represent mean \pm S.D. ($n=3$).

This can be attributed to extensive, uncontrolled aggregation and fusion between lipoplexes due to their loss of surface charge. Conversely, the complexing of greater amounts of pDNA with liposomes resulted in a decrease in size.

Complexing of an increasing amount of pDNA with cationic liposomes led to a decrease in the initial zeta potential value of the liposome (approximately $+28 \text{ mV}$) (Fig. 1B). Lipoplex with a 80 P/L ratio, which has a neutral calculated charge, had almost a neutral in a zeta potential measurement (approximately $+2 \text{ mV}$). A further increase in the amount of pDNA in the lipoplex resulted in net negative zeta potentials.

B16BL6 cells were transfected using lipoplexes prepared with different P/L ratios. The transgene efficiency of the lipoplex changed dramatically with a change in P/L ratio (Fig. 1C). A lipoplex, at 80 P/L ratio, showed the highest efficiency, almost same as that of LipofectAMINE, which was used as positive control. At this ratio, the size of the lipoplex was at a maximum, but had almost a neutral charge. The lower lipofection efficiencies of all other lipoplexes were not due to cytotoxicity toward the treated cells, since all the lipoplexes tested showed no detectable cytotoxicity, as evidenced by the trypan blue exclusion test (data not shown).

Effect of P/L Ratio on Lipoplex Size and Transfection Efficiency in the Presence of Serum It is well known that

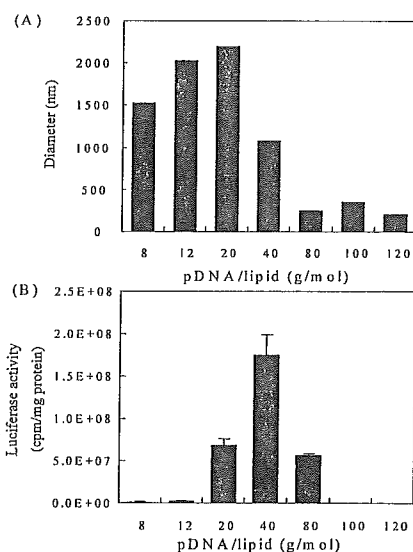


Fig. 2. Effect of P/L Ratio on Size and Transfection Efficiency of the Lipoplex in the Presence of Serum

pDNA/TFL-3 complexes (lipoplexes) were prepared, as described in Materials and Methods. The average size (A) of resulting lipoplex were determined after incubation in the presence of 50% (v/v) serum for 15 min at 37°C . Luciferase activity (B) in B16BL6 cells following lipofection ($1 \mu\text{g}$ of pDNA) was determined in the presence of 50% (v/v) serum according to the method described in the Materials and Methods. Data represent mean \pm S.D. ($n=3$).

serum has an inhibitory effect on lipofection efficiency. After its systemic administration, the lipoplex immediately encounters serum proteins in the blood stream. Hence, a study in the presence of serum is thought to be very important for the prediction of lipofection efficiency *in vivo*. Here, the effect of serum was investigated on lipoplex size and lipofection efficiency. For all experiments, the concentration of serum was fixed at 50% (v/v) in the incubation medium.

As expected, the presence of serum resulted in a dramatic alteration in lipoplex size compared to the absence of serum (Fig. 2A). The P/L ratio needed to give the largest lipoplex size was shifted from 80 to 20 in the presence of serum, compared with the absence of serum. Up to a P/L ratio of 40, the size was increased 6 to 7-fold, relative to the absence of serum. Increasing the P/L ratio to over 40 led to a significant decrease in lipoplex size, 7 to 25-fold. In the presence of serum, the lipofection efficacy of the lipoplex on B16BL6 cells was also changed dramatically with a change in P/L ratio (Fig. 2B) and the P/L ratio for the maximum transgene expression was shifted from 80 to 40 P/L. The level of gene expression was relatively lower than those in the absence of serum, except for P/L ratios of 20 and 40 (Fig. 2B). At P/L ratios of 20 and 40, transgene expression was increased by approximately 2-fold. LipofectAMINE lost its efficient gene transfer activity in the presence of serum (data not shown). Comparing the changes in lipoplex size and lipofection efficiency, a relationship still partly exists between lipoplex size and lipofection efficiency in the presence of serum.

In Vivo Transfection Study The *in vivo* efficacy of lipoplex was examined in B16BL6-bearing mice, following an intravenous injection. The assay was carried out 14 d after the inoculation of B16BL6 cells or an injection of saline. In normal mice, a relatively lower gene expression in all organs including the lungs (Fig. 3, open column) examined were detected at all P/L ratios tested (data not shown). Surprisingly,