

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 石田 竜弘

平成19（2007）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. Argonaute2(Ago2) knockdown による細胞死の機構解明と新生血管選択的デリバリーシステム
の開発に関する検討

石田 竜弘 ----- 7

2. がん新生血管を標的とした siRNA キャリアの開発と Argonaute2(Ago2) knockdown
による抗血管新生効果の検討

浅井 知浩 ----- 1 2

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 1 6

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 1 7

「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バイオサイエンス研究部・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目的である。当該研究期間において、昨年度に得られた結果に基づき、①RISC 構成成分の一つである Argonaute2(Ago2) knockdown による HUVEC における細胞死とその機構解明、②siRNA 導入効率が高い複合体の開発とその機構解明、③がん新生血管を標的とした siRNA 導入用デバイスの開発、またこれと並行して④ in vivo における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。その結果、Ago2 knockdown による HUVEC 細胞死は、アポトーシスを介したものであることを確認し、さらに、細胞増殖抑制がもたらされること、血管類似構造体の形成が阻害される事を明らかとした。以上の結果から、Ago2 が血管新生抑制を目的とした治療の標的分子となる可能性が示唆された。また、siRNA デリバリーに適した新規 siRNA/カチオニックリポソーム(TFL-3)複合体は、複合体中で siRNA の構造を維持させるとともに、細胞内導入後においても siRNA 活性を維持させることによって高い knockdown 効果を示すことを明らかにした。さらに、全身投与時に siRNA を効果的に新生血管へと送達できるデバイスの開発を目指し、検討を行った。Polycation liposome (PCL)に血中滞留性を向上させるための polyethylene glycol (PEG)、新生血管に集積性の高いペプチドである Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) を膜修飾した APRPG-PEG 修飾 PCL を調製し検討したところ、HUVEC(in vitro)に対してリガンド選択的な siRNA の導入や遺伝子 knockdown が可能であることが明らかとなった。また、siRNA/TFL-3 複合体は、PEG 修飾を施したものに関して siRNA を搭載していても高い新生血管親和性を示す事をマウス背部皮下に誘導した新生血管モデルを用いて確認した。以上の結果から、Ago2 knockdown による細胞死と我々が開発した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同時に、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。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目的である。

当該研究期間において、前年度に得られた結果に基づき、① RISC 構成成分の一つである Argonaute2(Ago2) knockdown による細胞死の機構、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と siRNA 複合体調製法の開発、およびその効率の高い遺伝子 knockdown 機構の解明、③がん新生血管に対する選択的デリ

バリーシステムの開発、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 に対する siRNA とカチオンリポソーム(TFL-3)の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。siRNA/TFL-3 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 タンパク質由来の蛍光を測定し、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 (細胞内酵素活性を指標) および LDH 法 (細胞膜損傷により細胞内酵素が遊離することを利用) によって評価した。

(3) 細胞増殖試験

HUVEC は bFGF、VEGF、IGF-1、EGF、2% FBS を含む EGM-2 培地にて培養し、血清存在下、ポリカチオンリポソーム (PCL) を用いて Ago2-siRNA (40 nM) を導入した。対照としては EGFP に対する siRNA (siEGFP) を用いた。siRNA 添加 4、24、48 時間後に TetraColor ONE を用いて細胞数を比色定量した。

(4) 細胞内動態解析

siRNA を FAM で蛍光標識した siRNA/TFL-3 複合体、あるいはリポソーム(TFL-3)を DiI で蛍光標識した siRNA/TFL-3 複合体を調製した。これら複合体を HUVEC 細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡下観察した。

(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 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。さらに、ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit によってアポトーシス細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META) を用いて TUNEL 陽性細胞を観察した。

(6) 血管内皮細胞への標的化

DiD で修飾した TFL-3 を調製し、HUVEC 内に

取り込まれたリポソーム(TFL-3)を DiD の蛍光を指標として評価した。siRNA を搭載した PCL (リポプレックス) に DSPE-MPEG(2000)あるいは DSPE-PEG-APRPG 溶液を添加し、60℃で 10 分間インキュベートし調製し、HUVEC に対する親和性を評価した。siRNA 導入量は、FAM 蛍光標識 siRNA の蛍光量を指標に評価した。

(7) 血管内皮細胞への Ago2 knockdown の影響

HUVEC をモデルとし、Ago2 knockdown による tube formation (血管類似構造体形成) への影響について検討した。具体的には、Ago2-siRNA を HUVEC に導入し、一定時間後にアポトーシス細胞を除去した後、細胞をマトリゲル上に播種した。6 時間インキュベートし、顕微鏡で血管類似構造体形成を観察した。さらに Image J を用いて血管類似構造体形成の長さを測定し、その合計を field あたりに換算して評価した。

(8) キャリアの新生血管集積性の検討

静脈内投与後の siRNA およびキャリアの動態は、蛍光(FAM)ラベル siRNA、および DiI ラベルのリポソームを蛍光顕微鏡下で観察することで評価した。具体的には、dorsal air sac 法により人為的にマウス背部皮下に新生血管を誘導させ、これに蛍光ラベル siRNA あるいは蛍光ラベルリポソームを静脈内投与し、一定時間経過後動物を犠牲死させ、皮膚を採取し、皮内新生血管への集積を蛍光顕微鏡で評価した。さらに、腫瘍内分布に関しては、マウスがん移植モデルに前述の蛍光修飾 siRNA あるいはリポソームを静脈内投与し、同じく一定時間経過後犠牲死させ、腫瘍を摘出し、凍結切片を作成した後、蛍光顕微鏡で観察した。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、全ての動物実験プロトコールは所属機関における動物実験委員会による審査・承認を受けている。また、動物愛護の精神に乗っ取り、実験により派生する恐怖・苦痛をできるかぎり軽減できる方法を選択し、用いた。

C. 研究結果

(1) HUVECにおけるAgo2 knockdownの影響

(I) mRNA量と細胞増殖への影響

Ago2-siRNAをLipofectamine2000によりHUVEC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HUVECにおいても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。導入したsiRNA量に依存した細胞増殖の抑制が観察された。また、Ago2 knockdownに対する感受性は、HUVECの方がHT1080細胞よりも高いことが分かった。

PCL によって Ago2-siRNA を導入したHUVECにおいても未処理およびsiEGFP導入細胞と比較して、導入 24 時間後から有意に細胞増殖が抑制された。血管新生に必須である内皮細胞の増殖が siAgo2-siRNA の導入によって抑制されることが明らかとなった。

(II)細胞死のメカニズム

次いで、このような細胞増殖抑制がHT1080細胞で観察されたものと同様にapoptosisを介して生じたものであるか検討した。Lipofectamine2000を用いてAgo2-siRNAを導入した場合、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。

次いでPCLを用いてAgo2-siRNAを導入した場合の影響に関してTUNEL染色法により検討した。アポトーシス細胞を検出した結果、siAgo2 導入HUVECでは未処理およびsiEGFP導入細胞と比較してアポトーシス細胞の増加が観察された。またAgo2 knockdown によって持続的にアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。これによりAgo2による細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導を介した機構であることが示唆された。

(III)血管類似構造体形成能への影響

次に血管類似構造体形成能力への影響について検討した。Ago2-siRNA で処置した細胞が有意に構造形成能力を失っている事が明らかになった。顕微鏡による観察においてAgo2-siRNA 導入細胞では血管類似構造体形成の

抑制が見られた。血管類似構造体の長さを測定した結果、Ago2-siRNA 導入 24 時間後から血管類似構造体形成抑制傾向が見られ、導入 48 時間後には有意に血管類似構造体形成が抑制されることが明らかとなった。Ago2-siRNA 導入によってアポトーシスまで至らなかった細胞群において、その血管類似構造体形成能が消失していることが明らかとなった。

(2) siRNA/TFL-3複合体による細胞内siRNA導入機構の検討

前年度の検討でsiRNA/TFL-3複合体形成時にエネルギー（攪拌、超音波など）を加える事で、高い遺伝子knockdown効果が得られることを示した。この機構解明に取り組んだ。

まず、新規方法で調製した複合体の物理化学的性質を検討した。しかし、粒子径、表面電荷、siRNA結合量のいずれにおいても、既存の方法で調製したものと有意な差は見られなかった。次いで、circular dichroism (CD) spectraを測定した。結果、攪拌作業を加えた複合体の方が、有意にsiRNAのA-form helixを維持する事が分かった。さらに、細胞による取り込みについて解析した。その結果、各細胞が比較的同量のsiRNAを取り込んでいることが明らかになった。次いで、細胞に取り込まれてから後の複合体の動態について共焦点レーザー顕微鏡で検討した。その結果、均一な強い蛍光を発するドットとして細胞に取り込まれ、24時間経過後においてもsiRNAが分解を免れている事が分かった。

(3) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの調製 (PCL を基本として)

血中滞留性を向上させるためにPEGを修飾し、腫瘍新生血管に親和性を持たせるためにAPRPGを修飾したAPRPG-PEG修飾PCLを調製した。siRNAを搭載したこの新生血管選択的siRNA導入デバイスの粒子径は、直径約120 nm前後であり、電位はPEGの修飾量に依存して低下した。デバイス静脈内投与時に重要な因子となる粒子径および電位において、調製したデバイスは体内動態制御に適した範囲に入っていた。

(4) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスのキャラクタリゼーション (PCL を基本として)

【安定性】

PEG修飾を施していないPCLでは血清の存在によって凝集が観察された。一方、PEGまたはAPRPG-PEG修飾PCLでは凝集が観察されなかった。この結果を反映し、PEGまたはAPRPG-PEG

修飾 PCL では血清存在下においても粒子径が変化しなかった。

【細胞毒性】

PEG あるいは APRPG-PEG を修飾することで PCL の細胞毒性が軽減された。

【siRNA 導入】

PCL は静電的な相互作用による非特異的な取り込みによって高い siRNA 送達能を示した。しかし、PEG 修飾により静電的な相互作用が減少し、送達能が顕著に減少した。一方で、APRPG を修飾することで、PEG 修飾によって減少した siRNA 送達能が回復し、リガンド選択的な siRNA の送達が観察された。

【Ago2 knockdown】

PCL で遺伝子 knockdown が得られた際と同様の導入条件で比較した場合、PEG 修飾 PCL では Ago2 knockdown が生じなかった。しかし、APRPG-PEG 修飾 PCL では Ago2 knockdown が観察された。

(5) 新生血管への標的化(in vivo)

がん新生血管への集積を検討するには、がん移植モデルを作成する必要がある。しかし、確立に長時間を要し、多くの処方を短期間で検討できない。そこで、dorsal air sac model を用い検討を行った。実際に PEG 修飾した TFL-3 を投与すると、マウス背部皮下に形成された新生血管部分から皮下組織にむけて TFL-3 が漏出していることが確認された。次いで、PEG 修飾 TFL-3 に siRNA を結合させ、siRNA 搭載時の新生血管への移行性について検討した。非常に興味深いことに、siRNA を結合させたものの方が新生血管に結合しており、新生血管に選択的なデリバリーが実現されることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の検討の結果、血管内皮細胞モデルとして汎用されている HUVEC においても 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、および apoptosis にはいたらないまでも血管類似構造体の形成抑制が生じることが分かった。さらに、HUVEC は、昨年度我々がモデルとして用いた HT1080 細胞よりも低濃度の siRNA で細胞死が誘導されることも明らかとなった。これらの結果は、血管内皮細胞が比較的 Ago2 knockdown に対して感受性が高いことを示唆しており、Ago2 knockdown によるがん新生血管障害療

法を指向する我々にとって有利な情報といえる。

攪拌という簡便な処置を調製過程に加えることで、少ない量の siRNA で高い RNAi 効果が得られる処方を得ることができた。このことは、in vivo 応用時に siRNA 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。今後、さらに精査を続け、同様の性質を持つ複合体のより簡便かつ合理的な大量調製法の開発に繋げたい。

さらに、Ago2 ノックダウンを新生血管内皮細胞において選択的に引き起こすためのデバイス開発を行った。初年度に最適化した PCL を PEG 修飾することによって全身投与を可能にし、APRPG を修飾することによって siRNA が腫瘍新生血管に集積するようにデバイスを設計した。その結果、新生血管選択的 siRNA 導入デバイス (APRPG-PEG 修飾 PCL) は、基本的な物性である粒子径および電位は体内動態制御に適した範囲にあり、血清中での安定性が高く、細胞毒性が低いことが明らかとなった。さらに、リガンド選択的な siRNA の導入や遺伝子ノックダウンが観察された。

TFL-3 を PEG 化することにより、マウス背部皮下モデルにおいて、新生血管からの漏出が認められるようになった。これは、PEG 化により血中滞留性が亢進されたことによるものと考えられる。さらに、この PEG-TFL-3 に siRNA を搭載すると、むしろ新生血管へ移行することが観察された。カチオニックリポソームは、正常血管内皮細胞との相互作用は弱い、がん新生血管内皮細胞には比較的親和性が高いことが知られている。詳細な機構は明らかではないが、新生血管内皮細胞はその表面に発現している特徴的なプロテオグリカンなどにより比較的高い負電荷を持っているため、この静電的相互作用がドライビングフォースになっているものと考えられている。しかし、siRNA が結合するとリポソームの表面電荷はむしろ下がり、静電的な相互作用は弱まると推測される。ゆえに、siRNA に特徴的な結合機構が存在する可能性も考えられる。本現象に関する機構は現時点では明らかではないが、今後詳細に検討していくことにより、より新生血管に選択性の高い siRNA デリバリーシステムの構築が可能になるものと期待される。

E. 結論

本年度の検討から、①Ago2-siRNA 導入により HUVEC においても細胞増殖抑制および apoptosis を介した細胞死が誘導されること、②低濃度の siRNA で高い RNAi 効果が得られた理由は、均一な粒子が形成された結果、複合体内および細胞内移行後における siRNA の安定性の維持がはかられた結果であること、③PEG 修飾を施し、siRNA を搭載した処方により、新生血管内皮細胞への標的化が実現されうること、さらにはリガンドを付与することによりさらに新生血管への親和性が高まること、が示された。

以上の結果から、Ago2 の knockdown による細胞死と我々が開発した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。次年度は in vivo において実際にがん新生血管を標的とすることで、我々が開発する All in one デバイスの有用性を明らかにしていく計画である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isakari, Y., Harada, Y., Ishikawa, D., Matsumura-Takeda, K., Sogo, S., Ishida, T., Taki, T., Kiwada, H., Efficient gene expression in Megakaryocytic cell line using Nucleofection. *Int. J. Pharm.*, **in press**.
- (2) Nguyen, L.T., Atobe, K., Barichello, J.M., Ishida, T., Kiwada, H., Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 751-757 (2007)
- (3) Tagami, T., Barichello, J.M., Kikuchi, H., Ishida, T., Kiwada, H., The gene-silencing effect of siRNA in cationic lipoplexes is enhanced by incorporating pDNA in the complex. *Int. J. Pharm.*, **333**, 62-69 (2007)
- (4) Yonezawa, S., Asai, T., Oku, N., Effective tumor regression by anti-neovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model. *J. Control. Release*, **118**, 303-309. (2007)
- (5) Akita, N., Maruta, F., Seymour, L.W., Kerr, D.J., Parker, A.L., Asai, T., Oku, N., Nakayama, J., and Miyagawa, S., Identification of oligopeptides binding to peritoneal tumors of gastric cancer. *Cancer Sci.*, **97**, 1075-1081 (2006)

(6) Maeda, N., Miyazawa, S., Shimizu, K., Asai, T., Yonezawa, S., Kitazawa, S., Namba, Y., Tsukada, H., and Oku, N., Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1936-1940 (2006)

2. 学会発表

・招待講演・発表

- (1) 浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、がん新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2 ノックダウンによる治療効果の検討、第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（静岡）2006 年 11 月
- (2) 石田竜弘、リポソーム DDS による薬物動態制御ー効果増強と安全性の観点からー、学長表彰受賞記念講演会（徳島大学）2006 年 12 月
- (3) 石田竜弘、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、総合科学技術会議・科学技術連携施策群・ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会「超早期診断と低侵襲医療の実現と一体化、生活の安全・安心を目指して」（東京）2006 年 12 月

・一般講演

- (1) 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構築、第 126 年会 日本薬学会（仙台）2006 年 3 月
- (2) Barichello, J.M., Ishida, T., Tagami, T., Hirose, K., Soares, L., Kobayashi, H., Kikuchi, H., Kiwada, H., Selective and efficient delivery of siRNA in vitro by means of TFL-3 liposomes. 10th Liposome Research Days Conference, Chapel Hill (NC), USA, 2006 年 5 月
- (3) Tagami, T., Barichello, J., Hirose, K., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., Kiwada, H., Ishida, T., Liposomal transfection of siRNA targeting for Argonautes induces apoptosis on HT1080 and HUVEC cells. 10th Liposome Research Days Conference, Chapel Hill (NC), USA, 2006 年 5 月
- (4) Suzuki, Y., Yokota, J., Asai, T., Ishida, T., Kiwada, H., Dewa, T., Nango, M., Oku, N., Investigation of Polycation Liposomes for Short Interfering RNA Delivery. 10th Liposome Research Days Conference,

Chapel Hill (NC), USA, 2006年5月

(5) 鈴木佑子、横田洵一、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人、腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーシステムとがん治療法の開発、第22回日本DDS学会(東京) 2006年7月

(6) Asai, T., Angiogenic Vessels-Targeted Liposomal DDS For Cancer Treatment. Drug Delivery & Licensing (Orchard, Singapore) 2006年7月

(7) Suzuki, Y., Yokota, J., Asai, T., Ishida, T., Kiwada, T., Dewa, T., Nango, M., Oku, N., development of Polycation Liposomes for Delivering Short Interfering RNA. 33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Vienna) 2006年7月

(8) Jose Mario Barichello, 石田竜弘、田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、Effective exogenous and GFP stably expressed genes silencing in vitro using agitation during siRNA-liposome complex formation、第7回 長井長義記念シンポジウム(徳島)、2006年9月

(9) 廣瀬聖実、田上辰秋、Barichello, J.M.、山崎尚志、石田竜弘、際田弘志、Anti-angiogenic therapy を目指した Argonaute 2(Ago2)標的 siRNA による細胞死誘導に関する検討、第44回日本癌治療学会(東京) 2006年10月

(10) 城慎二、Jose Mario Barichello、田上辰秋、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、石田竜弘、siRNA リポプレックス調製時における vortexing と knockdown 効率との相関に関する研究: 物性面からの検討、第45回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(広島) 2006年10月

(11) 鈴木卓也、跡部一孝、嶋津史恵、田上辰秋、Jose Mario Barichello、際田弘志、石田竜弘、マウス皮下新生血管誘導モデルを用いたカチオニックリポソームの新生血管親和性の検討、第45回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(広島) 2006年10月

(12) 鈴木佑子、横田洵一、松下小緒里、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人、Argonaute2 を標的とした RNAi による腫瘍新生血管障害療法の開発、第16回アンチセンスシンポジウム(京都) 2006年11月

(13) Jose Mario Barichello, 石田竜弘、城慎二、田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、The mechanism of gene silencing of

agitation during siRNA-liposome complex formation: physicochemical and in vitro cell uptake study. 第28回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(静岡) 2006年11月

(14) 米澤正、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、標的化ポリカチオンリポソームによる siRNA の導入: がん治療を目的として、日本薬学会第127年回(富山) 2007年3月

(15) 田上辰秋、廣瀬聖実、Jose Mario Barichello、山崎尚志、浅井知浩、奥直人、石田竜弘、際田弘志、Argonaute2 の遺伝子サイレンシングがヒト血管内皮細胞(HUVEC)のチューブ形成能力に与える影響に関する検討、日本薬学会第127年会(富山) 2007年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

石田竜弘、際田弘志、細胞死を誘導する2本鎖RNA 特願 2006-023224

Argonaute2(Ago2) knockdown による細胞死の機構解明と新生血管選択的デリバリーシステムの
開発に関する検討

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 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目的である。当該研究期間において、昨年度に得られた結果に基づき、①RISC 構成成分の一つである Argonaute2(Ago2) knockdown による HUVEC における細胞死とその機構解明、②siRNA 導入効率が高い複合体の開発とその機構解明、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。その結果、Ago2 knockdown による HUVEC 細胞死は、アポトーシスを介したものであることを確認した。さらに、HUVEC による tube formation assay において、血管類似構造体の形成が阻害される事も確認した。また、siRNA デリバリーに適した新規 siRNA-カチオニックリポソーム複合体は、複合体中で siRNA 構造を保護するとともに、細胞内導入後においても siRNA 活性を維持することによって高い knockdown 効果を示すことを明らかにした。さらに、マウス背部皮下に誘導した新生血管へのこれらの複合体の移行性を検討したところ、PEG 修飾を施したものに関して siRNA を搭載していても高い親和性を示す事を確認した。以上の結果から、Ago2 の knockdown による細胞死と我々が開発した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同時に、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。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目的である。

当該研究期間において、前年度に得られた結果に基づき、① RISC 構成成分の一つである Argonaute2(Ago2) knockdown による細胞死の機構、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と siRNA 複合体調製法の開発およびその効率の高い遺伝子 knockdown 機構の解明、③がん新生血管に対する選択的デリバリーシステムの開発、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 に対する siRNA とカチオニックリポソーム(TFL-3)の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。siRNA/TFL-3 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 タンパク質由来の蛍光を測定し、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（細胞内酵素活性を指標）および LDH 法（細胞膜損傷により細胞内酵素が遊離することを利用）によって評価した。

(3) 細胞内動態解析

siRNA を FAM で蛍光標識した siRNA/TFL-3 複合体、あるいはリポソームを DiI で蛍光標識した siRNA/TFL-3 複合体を調製した。これら複合体を HUVEC 細胞に導入し、共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡下観察した。

(4) 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 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。DiI で修飾した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 DiI の蛍光を指標として評価した。

(7) 血管内皮細胞への Ago2 knockdown の影響

HUVEC をモデルとし、Ago2 knockdown による生存への影響、tube formation（血管類似構造体形成）への影響についてそれぞれ検討した。

(8) キャリアの新生血管集積性の検討

静脈内投与後の siRNA およびキャリアの動態は、蛍光(FAM)ラベル siRNA、および DiI ラベルのリポソームを蛍光顕微鏡下で観察することで評価した。具体的には、dorsal air sac 法により人為的にマウス背部皮下に新生血管を誘導させ、これに蛍光ラベル siRNA あるいは蛍光ラベルリポソームを静脈内投与し、一定時間経過後動物を犠牲死させ、皮膚を採取し、皮内新生血管への集積を蛍光顕微鏡で評価した。さらに、腫瘍内分布に関しては、マウスがん移植モデルに前述の蛍光修飾 siRNA あるいはリポソームを静脈内投与し、同じく一定時間経過後犠牲死させ、腫瘍を摘出し、凍結切片を作成した後、蛍光顕微鏡で観察した。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、全ての動物実験プロトコールは所属機関における動物実験委員会による審査・承認を受けている。また、動物愛護の精神に乗っ取り、実験により派生する恐怖・苦痛をできるかぎり軽減できる方法を選択し、用いた。

C. 研究結果

(1) HUVECにおけるAgo2 knockdownによるアポトーシス誘導と機能障害誘導

Ago2-siRNAをLipofectamine2000によりHUVEC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HUVECにおいても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。導入したsiRNA量に依存した細胞増殖の抑制が観察された。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している。そこで、上記の非特異的な細胞死を誘導しにくい3.25 nMのsiRNAを以後の検討に用いる事とした。また、Ago2 knockdownに対する感受性は、HUVECの方がHT1080細胞よりも高いことが分かった。

次いで、このような細胞増殖抑制がHT1080細胞で観察されたものと同様に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。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。

次に血管類似構造体形成能力への影響について検討した。その結果、Ago2-siRNA で処置した細胞が有意に血管類似構造形成能力を失う事が分かった。

(2) siRNA/TFL-3複合体による細胞内siRNA導入機構の検討

前年度の検討でsiRNA/TFL-3複合体形成時にエネルギー（攪拌、超音波など）を加える事で、一般的な方法（混合した後静置する）で調製した複合体よりも、少ない量の siRNA で高い遺伝子 knockdown 効果が得られることを示した。本年度、この機構解明に取り組んだ。

まず、新規方法で調製した複合体の物理化学的性質が、既存の方法で調製した複合体とどのように異なるか検討した。電気泳動の結果、いずれの調製法でも、十分量の siRNA がリポソームに結合していた。次いで、複合体の粒子径を検討した。調製時に用いる溶液が Opti-MEM または Sucrose を用いた場合のいずれでも、低 siRNA 濃度のところでは、攪拌操作を加えた複合体のほうが通常の方法で調製した複合体と同程度かむしろ小さかった。さらに、表面電荷について検討したところ、低 siRNA 濃度の範囲では、両複合体間で顕著な差異はなかった。次いで、両複合体に関して circular dichroism (CD) spectra を測定した。結果、攪拌作業を加えた複合体の方が、有意に siRNA の A-form helix を維持する事が分かった。

さらに、細胞による両複合体の取り込みについて、flow cytometry で解析した。ただ混合して形成した複合体では、細胞による siRNA 取り込み量に大きなばらつきがあった。一方、攪拌作業を加えた複合体では、各細胞が比較的同量の siRNA を取り込んでいることが分かった。

次いで、細胞に取り込まれてから後の siRNA/TFL-3複合体の動態について共焦点レーザー顕微鏡で検討した。ただ混合して調製した複合体では、細胞に取り込まれた siRNA が24時間経過後にはほとんど分解されていたのに対し、攪拌作業を加えて調製した複合体では均一な強い蛍光を発するドットとして細胞に取り込まれ、24時間経過後においても分解を免れている事が明らかになった。

(3) 新生血管への標的化

がん新生血管への集積を検討するには、がん移植モデルを作成する必要がある。しかし、確立に長時間を要し、多くの処方を短期間で検討できな

い。そこで、dorsal air sac model を用い検討を行った。一般のカチオニックリポソームは、生体内投与後血球成分や血清タンパクと凝集塊を形成し、肝臓などの単核食細胞系に貪食されたり、肺などの毛細血管を塞栓したりすることで速やかに血中から消失する。このような体内動態特性を改善するため、その表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾した。一般に、PEG でリポソームの表面を修飾することで、PEG によって形成される水和相とそれ自体による立体障害によって血清タンパクや血球成分との相互作用が抑制されるとともに、単核食細胞系による異物認識も抑制される。実際に PEG 修飾した TFL-3 を投与すると、マウス背部皮下に形成された新生血管部分から皮下組織にむけて TFL-3 が漏出していることが確認された。

次いで、PEG 修飾 TFL-3 に siRNA を結合させ、siRNA 搭載時の新生血管への移行性について検討した。非常に興味深いことに、siRNA を結合させたものの方が新生血管に結合しており、新生血管に選択的なデリバリーが実現されることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の検討の結果、血管内皮細胞モデルとして汎用されている HUVEC においても 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分かった。さらに、昨年度我々がモデルとして用いた HT1080 細胞よりも低濃度の siRNA で細胞死が誘導されることも明らかとなった。これらの結果は、血管内皮細胞が比較的 Ago2 knockdown に対して感受性が高いことを示唆しており、Ago2 knockdown によるがん新生血管障害療法を指向する我々にとって有利な情報といえる。

攪拌という簡便な処置を調製過程に加えることで、少ない量の siRNA で高い RNAi 効果が得られる処方を得ることができた。このことは、in vivo 応用時に siRNA 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。今回の検討から、攪拌操作により A-form helix を維持した siRNA が結合した物理化学的に等価の粒子が形成され、この事が細胞との均一な相互作用を実現させ、最終的に全ての細胞に適量の siRNA を導入できたため、少ない量で高い knockdown 効果が得られた事が明らかとなった。

さらに、攪拌によって細胞内での siRNA の安定性をも向上するような粒子が調製されている可能性が示唆された。今後、さらに精査を続け、同様の性質を持つ複合体のより簡便かつ合理的な大量調製法の開発に繋げたい。

カチオニックリポソームは、正常血管内皮細胞との相互作用は弱い、がん新生血管内皮細胞には比較的親和性が高い事が知られている。詳細な機構は明らかではないが、新生血管内皮細胞表面に発現した特徴的なプロテオグリカンなどにより比較的高い負電荷をもっており、これが理由の一つではないかと考えられている。我々もこの性質を利用し、がん新生血管に特異性を持つキャリアの開発を試みた。TFL-3 を PEG 化することにより、マウス背部皮下モデルにおいて、新生血管からの漏出が認められるようになった。これは、PEG 化により血中滞留性が亢進されたことによるものと考えられる。一方、極めて不思議な現象であるが、その漏出の程度は TFL-3 の投与後時間に依存しており、必ずしも血中濃度に依存するわけではなかった。一般に、微粒子の新生血管からの漏出は、新生血管を形成する血管内皮細胞が幼弱なために内皮細胞間の接着が密でなく、200-800nm の隙間が開いていることによると考えられている。しかし、今回観察されたような、血中濃度推移に関係なく投与後の時間に依存して漏出度が亢進すると言う現象はこれまで報告されておらず、新たな興味深い現象を見出した可能性が高い。

siRNA はポリアニオン性な高分子である。これが TFL-3 に結合すると PEG で表面が覆われているとはいえども、TFL-3 の異物性を向上させ、結果として背部皮下新生血管への移行を抑制するものと予想された。しかし、予想に反してむしろ高い親和性を持つことが示唆された。カチオニックリポソームは、正常血管内皮細胞との相互作用は弱い、がん新生血管内皮細胞には比較的親和性が高いことが知られている。詳細な機構は明らかではないが、新生血管内皮細胞はその表面に発現している特徴的なプロテオグリカンなどにより比較的高い負電荷を持っているため、この静電的相互作用がドライビングフォースになっているものと考えられている。しかし、siRNA が結合するとリポソームの表面電荷はむしろ下がり、静電的な相互作用は弱まると推測される。ゆえに、siRNA に特徴的な結合機構が存在する可能性も考えられる。本現象に関する機構は現時点では明らかではないが、今

後詳細に検討していくことにより、より新生血管に選択性の高い siRNA デリバリーシステムの構築が可能になるものと期待される。

E. 結論

本年度の検討から、①Ago2-siRNA 導入により HUVEC においても apoptosis を介した細胞死が誘導されること、②低濃度の siRNA で高い RNAi 効果が得られた理由は、均一な粒子が形成された結果、複体内および細胞内移行後における siRNA の安定性の維持がはかられた結果であること、③PEG 修飾を施し、siRNA を搭載した処方により、新生血管内皮細胞への標的化が実現されうること、が示された。

以上の結果から、Ago2 の knockdown による細胞死と我々が開発した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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isakari, Y., Harada, Y., Ishikawa, D., Matsumura-Takeda, K., Sogo, S., Ishida, T., Taki, T., Kiwada, H., Efficient gene expression in Megakaryocytic cell line using Nucleofection. *Int. J. Pharm.*, in press.
- (2) Nguyen, L.T., Atobe, K., Barichello, J.M., Ishida, T., Kiwada, H., Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 751-757 (2007)
- (3) Tagami, T., Barichello, J.M., Kikuchi, H., Ishida, T., Kiwada, H., The gene-silencing effect of siRNA in cationic lipoplexes is enhanced by incorporating pDNA in the complex. *Int. J. Pharm.*, **333**, 62-69 (2007)

2. 学会発表

・招待講演・発表

- (1) 石田竜弘、リポソーム DDS による薬物動態制御ー効果増強と安全性の観点からー、学長表彰受賞記念講演会（徳島大学）、2006年12月
- (2) 浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、がん新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2 ノックダウンによる治療効果の検討、第28回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（静岡）2006年11月
- (3) 石田竜弘、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、総合科学技術会議・科学技術連携施策群・ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会「超早期診断と低侵襲医療の実現と一体化、生活の安全・安心を目指して」(東京) 2006年12月

・一般講演

(1) Barichello, J.M., Ishida, T., Tagami, T., Hirose, K., Soares, L., Kobayashi, H., Kikuchi, H., Kiwada, H., Selective and efficient delivery of siRNA in vitro by means of TFL-3 liposomes. 10th Liposome Research Days Conference, Chapel Hill (NC), USA, 2006年5月

(2) Tagami, T., Barichello, J., Hirose, K., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., Kiwada, H., Ishida, T., Liposomal transfection of siRNA targeting for Argonautes induces apoptosis on HT1080 and HUVEC cells. 10th Liposome Research Days Conference, Chapel Hill (NC), USA, 2006年5月

(3) 鈴木佑子、横田洵一、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人：腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーシステムとがん治療法の開発、第22回日本DDS学会(東京)、2006年7月

(4) Jose Mario Barichello, 石田竜弘、田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、Effective exogenous and GFP stably expressed genes silencing in vitro using agitation during siRNA-liposome complex formation、第7回 長井長義記念シンポジウム(徳島)、2006年9月

(5) 廣瀬聖実、田上辰秋、Barichello, J.M., 山崎尚志、石田竜弘、際田弘志、Anti-angiogenic therapy を目指した Argonaute 2(Ago2)標的 siRNA による細胞死誘導に関する検討、第44回日本癌治療学会(東京) 2006年10月

(6) 城慎二、Jose Mario Barichello、田上辰秋、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、石田竜弘、siRNA リポプレックス調製時における vortexing と knockdown 効率との相関に関する研究：物性面からの検討、第45回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(広島) 2006年10月

(7) 鈴木卓也、跡部一孝、嶋津史恵、田上辰秋、Jose Mario Barichello、際田弘志、石田竜弘、マウス皮下新生血管誘導モデルを用いたカチオニッ

クリポソームの新生血管親和性の検討、第45回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会(広島) 2006年10月

(8) 鈴木佑子、横田洵一、松下小緒里、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人：Argonaute2 を標的とした RNAi による腫瘍新生血管障害療法の開発、第16回アンチセンスシンポジウム(京都) 2006年11月

(9) Jose Mario Barichello, 石田竜弘、城慎二、田上辰秋、廣瀬聖実、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、際田弘志、The mechanism of gene silencing of agitation during siRNA-liposome complex formation: physicochemical and in vitro cell uptake study. 第28回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(静岡) 2006年11月

(10) 米澤正、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、標的化ポリカチオンリポソームによる siRNA の導入：がん治療を目的として、日本薬学会第127年回(富山) 2007年3月

(11) 田上辰秋、廣瀬聖実、Jose Mario Barichello、山崎尚志、浅井知浩、奥直人、石田竜弘、際田弘志、Argonaute2 の遺伝子サイレンシングがヒト血管内皮細胞(HUVEC)のチューブ形成能力に与える影響に関する検討、日本薬学会第127年会(富山) 2007年3月

G. 知的財産権の出願・登録状況

石田竜弘、際田弘志、細胞死を誘導する2本鎖RNA 特願 2006-023224

がん新生血管を標的とした siRNA キャリアの開発と Argonaute2(Ago2) knockdown
による抗血管新生効果の検討

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 本年度は、Argonaute2 (Ago2) ノックダウンによる血管新生抑制効果の検討ならびにがん新生血管を標的とした siRNA 導入用デバイスの開発を実施した。初年度に siRNA 導入用に開発した Polycation liposome (PCL) を用い、血管新生促進因子で刺激したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に Ago2 に対する siRNA (siAgo2) を導入した。その結果、Ago2 ノックダウンによって HUVEC のアポトーシスが誘導されること、細胞増殖が抑制されること、管腔形成が阻害されることが明らかとなった。以上の結果から、Ago2 が血管新生抑制を目的とした治療の標的分子となる可能性が示唆された。一方、全身投与時に siRNA を効果的に新生血管へと送達できるデバイスの開発を目指し、検討を行った。PCL に血中滞留性を向上させるための polyethylene glycol (PEG)、新生血管に集積性の高いペプチドである Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) を膜修飾した APRPG-PEG 修飾 PCL を調製し、そのキャラクターゼーションを行った。APRPG-PEG 修飾 PCL は、全身投与に適した粒子径および電位を示し、また血清に対する安定性が高く、細胞毒性が低いことが明らかとなった。さらに APRPG-PEG 修飾 PCL を用いることにより、血管新生促進因子で刺激した HUVEC に対してリガンド選択的な siRNA の導入や遺伝子ノックダウンが可能であることが明らかとなった。以上のように、本年度は Ago2 ノックダウンによる抗血管新生効果の証明ならびに新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの開発を行った。次年度にインビボにおいてがん新生血管を標的とした All in one デバイスの有用性を明らかにし、新規がん治療法の開発へと繋げていく予定である。

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。本年度は、1) RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) 構成タンパク質 Argonaute2 (Ago2) ノックダウンによる抗血管新生効果の証明、ならびに 2) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの開発を目的として検討を実施した。初年度に配列決定した Ago2 に対する siRNA (siAgo2)、siRNA 導入キャリアとして開発した cetyl-polyethylenimine (cetyl-PEI) を付加した polycation liposome (PCL) を検討に用いた。Ago2 ノックダウンの血管新生抑制効果は、血管新生促進因子で刺激したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いたインビトロモデルにおいて評価した。一方で、キャリアに新生血管選択性を付与することを目的とし、PCL に新生血管特異的ペプチドである Ala-Pro-Arg-Pro-Gly

(APRPG) を付加したポリエチレングリコール (PEG) 脂質誘導体を膜修飾し、新生血管選択的 PCL の開発を試みた。

B. 研究方法

(1) 細胞増殖試験

HUVEC は bFGF、VEGF、IGF-1、EGF、2% FBS を含む EGM-2 培地にて培養し、血清存在下、PCL を用いて siAgo2 (40 nM) を HUVEC に導入した。対照としては EGFP に対する siRNA (siEGFP) を用いた。siRNA 添加 4、24、48 時間後に TetraColor ONE™ を用いて細胞数を比色定量した。

(2) アポトーシス細胞の検出

血清存在下、PCL を用いて siAgo2 を HUVEC に導入し、24、48、72 時間後に培地を除去して 1 w/v% パラホルムアルデヒド溶液によって固定した。ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit によってアポトーシス細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META) を用

いて TUNEL 陽性細胞を観察した。

(3) 管腔形成試験

上述と同様に siAgo2 を HUVEC に導入し、24, 48 時間後に細胞を回収した。アポトーシス細胞を除去後、細胞をマトリゲル上に播種した。6 時間インキュベートし、顕微鏡で管腔形成を観察した。さらに Image J を用いて管腔の長さを測定し、その合計を field あたりに換算して評価した。

(4) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの調製

siRNA を搭載した PCL (リポプレックス) に DSPE-MPEG (2000)あるいは DSPE-PEG-APRPG 溶液を添加し、60℃で 10 分間インキュベートし調製した。DSPE-MPEG あるいは DSPE-PEG-APRPG を修飾した各リポプレックスの粒子径および電位を Zetasizer Nano ZS を用いて計測した。

(5) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスのキャラクタリゼーション

【安定性】

siRNA を搭載した APRPG-PEG 修飾 PCL を 50% 未非動化血清存在下において 37℃で 1 時間インキュベーションし、濁度を測定した。

【細胞毒性】

siEGFP を APRPG-PEG 修飾 PCL により導入し、24 時間培養した。その後、TetraColor ONE™ を添加し、細胞数を比色定量した。

【siRNA 導入量】

FAM 蛍光標識 siRNA を APRPG-PEG 修飾 PCL により導入し、4 時間培養した。protease inhibitor を含む 1w/v% Triton-X により可溶化し、FAM の蛍光強度を測定した。BCA protein assay kit を使用したタンパク質定量の結果に基づいて蛍光強度を補正し、siRNA の取り込み量を評価した。

【Ago2 ノックダウン】

siRNA 導入用デバイスによって siAgo2 を導入し、24, 48 時間後にウエスタンブロッティング法によって Ago2 ノックダウンを評価した。

・倫理面への配慮

当該研究に関して、全ての動物実験プロトコールは所属機関における動物実験委員会による審査・承認を受けている。また、動物愛護の精神に乗っ取り、実験により派生する恐怖・苦痛をできるかぎり軽減できる方法を用いた。

C. 研究結果

(1) 細胞増殖試験

PCL によって siAgo2 を導入した HUVEC において未処理および siEGFP 導入細胞と比較して、導入 24 時間後から有意に細胞増殖が抑制された。血管新生に必須である内皮細胞の増殖が siAgo2 の導入によって抑制されることが明らかとなった。

(2) アポトーシス細胞の検出

TUNEL 染色法によりアポトーシス細胞を検出した結果、siAgo2 導入 HUVEC では未処理および siEGFP 導入細胞と比較してアポトーシス細胞の増加が観察された。また Ago2 ノックダウンによって持続的にアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。これにより Ago2 ノックダウンによる細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導を介した機構であることが示唆された。

(3) 管腔形成試験

顕微鏡による観察において siAgo2 導入細胞では管腔形成の抑制が見られた。管腔の長さを定量した結果、siAgo2 導入 24 時間後から管腔形成抑制傾向が見られ、導入 48 時間後には有意に管腔形成が抑制されることが明らかとなった。siAgo2 導入によってアポトーシスまで至らなかった細胞群において、その管腔形成能が消失していることが明らかとなった。

(4) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの調製

血中滞留性を向上させるために PEG を修飾し、腫瘍新生血管に siRNA を集積させるために APRPG を修飾した、APRPG-PEG 修飾 PCL を調製した。siRNA を搭載したこの新生血管選択的 siRNA 導入デバイスの粒子径は、直径約 120 nm 前後であり、電位は PEG の修飾量に依存して低下した。デバイス静脈内投与時に重要な因子となる粒子径および電位において、調製したデバイスは体内動態制御に適した範囲に入っていることが示された。

(5) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスのキャラクタリゼーション

【安定性】

PEG 修飾を施していない PCL では血清の存在によって凝集が観察された一方で、PEG または APRPG-PEG 修飾 PCL では凝集性が観察されなかった。この結果を反映し、PEG または APRPG-PEG 修飾 PCL では血清存在下においても粒子径が変化しなかった。

【細胞毒性】

PEG あるいは APRPG-PEG を修飾することによって PCL の細胞毒性が軽減されることが明らかとなった。

【siRNA 導入量】

PCL は静電的な相互作用による非特異的な取り込みによって高い siRNA 取り込み量を示したが、PEG 修飾を施すと静電的な相互作用が減少し、取り込み量が顕著に減少した。一方で、APRPG を修飾することによって、PEG 修飾によって減少した siRNA 取り込み量が回復し、リガンド選択的な siRNA の取り込みが観察された。

【Ago2 ノックダウン】

PCL で遺伝子ノックダウンが得られた際と同様の導入条件で比較した場合、PEG 修飾 PCL では Ago2 ノックダウンが生じなかったが、APRPG-PEG 修飾 PCL では Ago2 ノックダウンが観察された。取り込み実験の結果を反映し、新生血管に対するリガンド選択的なノックダウンが観察された。

D. 考察

本年度の検討結果より、血管新生に必須である血管内皮細胞の増殖および管腔形成が Ago2 ノックダウンによって抑制されることが明らかとなった。さらに TUNEL 染色の結果から、Ago2 ノックダウンによってアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。Ago2 ノックダウンによるアポトーシス誘導という本研究の作業仮説を立証するに至り、さらにはアポトーシスまで至らなかった細胞群においても管腔形成能が消失していることが明らかとなった。このことから、Ago2 をノックダウンすることによって血管新生抑制によるがん治療法に繋がる可能性が示唆された。

また本年度は Ago2 ノックダウンを新生血管内皮細胞において選択的に引き起こすためのデバイス開発を行った。初年度に最適化した PCL を、PEG 修飾することによって全身投与を可能にし、APRPG を修飾することによって siRNA が腫瘍新生血管に集積するようにデバイスを設計した。その結果、新生血管選択的 siRNA 導入デバイス (APRPG-PEG 修飾 PCL) は、基本的な物性である粒子径および電位は体内動態制御に適した範囲にあり、血清中での安定性が高く、細胞毒性が低いことが明らかとなった。さらに新生血管選択的 siRNA 導入デバイスにおいてリガンド選択的な siRNA の導入や遺伝子ノックダウンが観察された。以上の結果より、本年度に開発したデバ

イスは、がん新生血管選択的な siRNA デリバリーに有用である可能性が示唆された。

E. 結論

本年度は、Ago2 ノックダウンによる抗血管新生効果の証明ならびに新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの開発を行った。siAgo2 と新生血管特異的 PCL を組み合わせることにより、がん新生血管を標的とした選択的ながん治療法の開発に繋がることが示唆された。次年度はインビボにおいてがん新生血管を標的とした All in one デバイスの有用性を明らかにしていく計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yonezawa, S., Asai, T., Oku, N., Effective tumor regression by anti-neovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model., *J. Control. Release*, **118**, 303-309. (2007)
- 2) Akita, N., Maruta, F., Seymour, L.W., Kerr, D.J., Parker, A.L., Asai, T., Oku, N., Nakayama, J., and Miyagawa, S., Identification of oligopeptides binding to peritoneal tumors of gastric cancer., *Cancer Sci.*, **97**, 1075-1081 (2006)
- 3) Maeda, N., Miyazawa, S., Shimizu, K., Asai, T., Yonezawa, S., Kitazawa, S., Namba, Y., Tsukada, H., and Oku, N., Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs., *Biol Pharm Bull.*, **29**, 1936-1940 (2006)

2. 学会発表

・招待講演

- (1) 浅井知浩、石田竜弘、奥 直人、際田弘志、がん新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2 ノックダウンによる治療効果の検討、第 28 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (静岡) 2006 年 11 月

・一般講演

- (1) 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構築、第 126 年会 日本薬学会 (仙台) 2006 年 3 月
- (2) Yuko Suzuki, Junichi Yokota, Tomohiro Asai, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Takehisa Dewa, Mamoru Nango, Naoto Oku, Investigation of

Polycation Liposomes for Short Interfering RNA Delivery. 1st Chapel Hill Drug Conference & 10th Liposome Research Days Conference (Chapel Hill NC, USA) 2006 年 5 月

(3) 鈴木佑子、横田洵一、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人、腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーシステムとがん治療法の開発、第 22 回日本 DDS 学会(東京) 2006 年 7 月

(4) Tomohiro Asai, Angiogenic Vessels-Targeted Liposomal DDS For Cancer Treatment. Drug Delivery & Licensing (Orchard, Singapore) 2006 年 7 月

(5) Yuko Suzuki, Junichi Yokota, Tomohiro Asai, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Takehisa Dewa, Mamoru Nango, Naoto Oku, development of Polycation Liposomes for Delivering Short Interfering RNA. 33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Vienna) 2006 年 7 月

(6) 鈴木佑子、横田洵一、松下小緒里、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、出羽毅久、南後 守、奥 直人、Argonaute2 を標的とした RNAi による腫瘍新生血管障害療法の開発、第 16 回アンチセンスシンポジウム(京都) 2006 年 11 月

G. 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

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
Isakari, Y., Harada, Y., Ishikawa, D., Matsumura-Takeda, K., Sogo, S., <u>Ishida, T.</u> , Taki, T., Kiwada, H.	Efficient gene expression in Megakaryocytic cell line using Nucleofection.	<i>Int. J. Pharm.</i>		In press	2007
Nguyen, L.T., Atobe, K., Barichello, J.M., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	30	751-757	2007
Tagami, T., Barichello, J.M., Kikuchi, H., <u>Ishida, T.</u> , Kiwada, H.	The gene-silencing effect of siRNA in cationic lipoplexes is enhanced by incorporating pDNA in the complex.	<i>Int. J. Pharm.</i>	333	62-69	2007
Maeda, N., Miyazawa, S., Shimizu, K., <u>Asai, T.</u> , Yonezawa, S., Kitazawa, S., Namba, Y., Tsukada, H., and Oku, N.	Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs.	<i>Biol Pharm Bull.</i>	29	1936- 1940	2006
Akita, N., Maruta, F., Seymour, L.W., Kerr, D.J., Parker, A.L., <u>Asai, T.</u> , Oku, N., Nakayama, J., and Miyagawa, S.	Identification of oligopeptides binding to peritoneal tumors of gastric cancer.	<i>Cancer Sci.</i>	97	1075- 1081	2006
Yonezawa, S., <u>Asai, T.</u> , Oku, N.	Effective tumor regression by anti-neovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model.	<i>J. Control. Release</i>	118	303-309	2006



Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection

Yoshimasa Isakari^{a,b,*}, Yasuo Harada^b, Dai Ishikawa^b, Kuniko Matsumura-Takeda^{a,b},
Shinji Sogo^b, Tatsuhiro Ishida^a, Takao Taki^b, Hiroshi Kiwada^a

^a Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Subdivision of Biopharmaceutical Sciences, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima, 1-78-1, Shō-machi, Tokushima 770-8505, Japan

^b Molecular Medical Science Institute, Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., 463-10, Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0192, Japan

Received 22 September 2006; received in revised form 9 January 2007; accepted 28 January 2007

Abstract

To clarify the mechanism of platelet production from megakaryocytes, expression of target proteins by gene transfection was examined using various gene delivery techniques. Transfection into hematopoietic cells, including megakaryocytes, by conventional gene delivery techniques such as electroporation and lipofection are known to be difficult. In this study, in addition to electroporation and lipofection, we tested other gene-transfer methods (nucleofection, transfection using inactivated virus envelope, and transferrin-linked cationic polymer) with the green fluorescent protein (GFP) gene into the human megakaryocytic cell line MEG-01. We found that nucleofection, which uses a combination of special electrical parameters and specific solutions, was the best, judging from the expression ratio of GFP-positive cells (approximately 70% of cells) and low toxicity. The efficiency of GFP expression was not related to the amount of pDNA delivered into the MEG-01 cells. To verify the utility of nucleofection, the thrombopoietin (TPO) receptor c-mpl was transfected into MEG-01 cells. Transfected cells showed a higher responsiveness to TPO than mock-transfected MEG-01 cells. We propose that nucleofection is a useful method for transfecting target genes to megakaryocytic cells when addressing the mechanism of platelet production.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Transfection; Megakaryocytes; MEG-01; Nucleofection

1. Introduction

Megakaryocytes, which are estimated to constitute approximately 0.4% of the total bone marrow cells (Levine, 1980), are differentiated from hematopoietic stem cells into platelets via many stages. Since various hemorrhagic and thrombotic disorders are strongly attributed to abnormalities in platelet number or function, understanding the mechanism of platelet production is important for establishing new pharmacologic strategies to regulate disordered or inappropriate platelet production. To clarify the molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation and platelet production, approaches using gene expression analysis such as cDNA microarray, serial analysis of gene expression, differential display, and cDNA subtraction are available. On the

basis of these analyses, candidate genes involved in the regulation of cellular differentiation have been identified. Knockout or transgenic technology is a powerful tool for validating the functions of candidate genes. Indeed, knockout mice have been established for several genes. Mice deficient in thrombopoietin (TPO) (Bartley et al., 1994), c-mpl (TPO receptor) (Carver-Moore et al., 1996), GATA-1 (Shivdasani et al., 1997), or nuclear factor erythrocyte 2 (Shivdasani et al., 1995) have been shown to have decreased numbers of platelets in the blood, suggesting that these proteins participate in platelet production. However, establishing transgenic or knockout mice generally takes a long time, and the number of candidate genes is sometimes too large to knockout all of them at once. Therefore, a simple gene validation system is required to clarify the mechanism of platelet production.

One powerful method is transfection of target genes relating to the target proteins into megakaryocytes. However, transfection into megakaryocyte and megakaryocytic cell lines by conventional methods is notoriously difficult and the efficiency is very low (less than 5%) (Wang et al., 1999). To overcome the

* Corresponding author at: Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Subdivision of Biopharmaceutical Sciences, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78-1, Shō-machi, Tokushima 770-8505, Japan.

E-mail address: y_isakari@research.otsuka.co.jp (Y. Isakari).

low transfection efficiency, transgene-expressing cells have to be enriched to validate the function of the transgenes, and this is a time- and labor-consuming process. To overcome this problem, Burstein et al. (1999) used a retrovirus vector and showed that 41–82% of megakaryocytes were positive. In addition, Gillitzer et al. (2005) showed successful gene-transfer into CD34⁺ stem cells using a retrovirus vector, and that the transfected cells differentiated into megakaryocytes in response to stimulation by TPO. However, the utility of viral vectors is limited by the time required, facilities, the overall expense, and safety considerations. A simple method of transfecting genes to megakaryocytes should be a great advantage.

In studies of megakaryocyte differentiation, K562 cells are among those most commonly used (Drexler et al., 2004). However, this cell line has both pro-erythroidic and megakaryocytic properties. In contrast, MEG-01 cells (a human megakaryocytic leukemia cell line) (Ogura et al., 1985) are committed to the megakaryocytic lineage and can produce platelet-like particles (Takeuchi et al., 1998). In addition, this cell line is frequently used in megakaryocyte differentiation studies and in gene function validation studies in megakaryocytopoiesis, platelet-like particle production, ploidy, and in vivo tumorigenesis (Zunino et al., 2001). In this study, we examined various gene-transfer methods with MEG-01 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell line

MEG-01 cells were purchased from American Type Culture Collection (VA, USA) and cultured in RPMI-1640 medium (Sigma, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (JRH, KS, USA), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, CA, USA) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.2. Plasmid DNA (pDNA)

pEGFP-C1, encoding green fluorescent protein (GFP), was purchased from Clontech (CA, USA). pGL3-Control, encoding luciferase, was purchased from Promega (WI, USA). pCMV-Script, a negative control plasmid, was purchased from Stratagene (CA, USA). pcDNA3 was purchased from Invitrogen. All plasmids were purified using an EndoFree Plasmid DNA Purification Kit (QIAGEN, CA, USA). A TPO receptor (c-mpl)-expressing plasmid was constructed as follows. Briefly, human c-mpl cDNA was amplified by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), KOD-plus DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), and a specific primer set (sense, 5'-CG-CCACCATGCCCTCCTGGGCCCTCTTCAT-3'; antisense, 5'-TCAAGGCTGCTGCCAATAGCTTAGTGGTAG-3'). In the sense primer, the kozak consensus sequence (underlined) was included as the start codon. Full-length cDNA was subcloned into a pCR-Blunt vector (Invitrogen) and it was cloned into the EcoRI site of the expression vector pcDNA3. The orientation of the insert was determined by restriction mapping. The sequence

of c-mpl was confirmed as accession number NM_005373 using a CEQ2000 DNA sequencer (Beckman Coulter, CA, USA).

2.3. Transfection

2.3.1. Electroporation

Electroporation was performed with an Electro Square Porator T820 electroporation system (BTX Inc., CA, USA) according to the manufacturer's recommended method. In brief, 1×10^6 cells suspended in 0.1 ml Dulbecco phosphate-buffered saline (PBS) were mixed with 15 µg of pGL3-Control plasmid. The mixture was transferred into a 2 mm gap electroporation cuvette and incubated on ice for 10 min. Then, electroporation was performed with various field strengths, pulse lengths, and pulse numbers. After electroporation, the cells were incubated on ice for 10 min and transferred into RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. Ten minute or 24 h after electroporation, cell viability was determined by trypan blue dye exclusion assay. Twenty-four hour after electroporation, expression was determined by luciferase assay.

2.3.2. Hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) vector

HVJ-E vector is an unique transfection tool that employs the cell fusion ability of the envelope of Sendai virus (HVJ) originally described by Kaneda (2003) (see review). Transfection with HVJ-E was performed according to the manufacturer's recommendations. Briefly, HVJ-E vector (25 µl) (GenomONE or GenomONE-Neo; Ishihara Sangyo, Osaka, Japan) was mixed with DNA (5 µg) and reagent B supplied in the kit (1 µl). The mixture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. The pellet was suspended with the buffer supplied in the kit (30 µl). Then, the supplied reagent C (5 µl) was added. An aliquot of the mixture (1–4 µl) was added to cells (2.5×10^5 cells/0.5 ml) in a microcentrifuge tube, and the cells were centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 35 °C. The cell pellet was re-suspended with RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and cultured in a 24-well plate. Twenty-four hour after transfection, GFP expression was determined using a flowcytometer as described below.

2.3.3. Lipid or cationic polymer

MEG-01 cells were transfected using Lipofectamine2000 (LFA2000; Invitrogen), FuGENE6 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), GenePORTER2 (Gene Therapy Systems, CA, USA), Effectene (Qiagen), SuperFect (Qiagen), jetPEI (Q-Biogene, CA, USA), or TransFast (Promega). All transfections were performed according to the manufacturers' guidelines. Representative conditions for each reagent are shown in Table 1. Briefly, the reagents and pDNA were mixed to form the DNA–reagent complex. Then, the mixture was added to the cell suspension in the culture plate and cultured for 24 h. According to the manufacturers' recommendations, for all reagents, withdrawal of the transfection reagents from the culture was not necessary. Twenty-four hour after transfection, GFP expression was determined using a flowcytometer as described below.