

200712012A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

「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19年度 総括研究報告書

主任研究者 石田 竜弘

平成20（2008）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

----- 9

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

----- 15

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 19

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 20

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総括研究報告書

「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・准教授

**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。これまでの検討において細胞死を誘導する siRNA を獲得し、新生血管に親和性を有するデリバリーシステム（リポソーム）の開発を行ってきた。当該研究期間において、これらの有用性について in vivo 動物モデルを用いて検討をおこない、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が可能であるか評価した。

siRNA/キャリア複合体の in vivo 活性に関して、担がんモデル動物を用いて検討を行った。まず手始めとして、判定が簡便な腫瘍内直接投与方法によって in vivo 活性を評価した。検討の結果、顕著な腫瘍増殖抑制効果が得られ、Argonaute2 (Ago2) knockdown によって in vivo でも期待した効果が得られることが明らかとなった。そこで、静脈内投与によっても同様の抗腫瘍効果が得られるか検討したところ、腫瘍体積が小さい段階（繰り返し投与初期）では治療群において腫瘍増殖抑制効果が観察されたが、漸次その効果はなくなり繰り返し投与後期ではコントロール群との有意差は見られなくなった。これは腫瘍が小さい段階では血管新生を阻害する事が大きな意味を持つが、ある程度腫瘍が増殖すると成熟した血管が多くなり Ago2 knockdown の影響が現れにくくなったからであると考えられる。類似の現象が低分子化合物や抗体を用いた抗血管新生療法でも観察されており、抗がん剤との併用療法で高い抗腫瘍効果が得られる事が報告されている。したがって、本システムにおいても、抗がん剤との併用によって高い抗腫瘍効果が得られる可能性が考えられ、新規治療法となる可能性が極めて高いと考えられる。

#### 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（apoptosis）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、①Argonaute2 (Ago2)-knockdownによる細胞増殖抑制発現機構、②knockdown 効率の高い処方遺伝子 knockdown 機構、③in vivo での Ago2-knockdown による抗腫瘍効果、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(CL)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) および HUVEC を用いた。siRNA/CL 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(Lf2000) を用いた。

(2) Ago2-knockdown が miRNA システムに及ぼす影響

#### 【ゲル電気泳動】

血清存在下、PCL を用いて Ago2-siRNA を HUVEC に導入し、24、48 時間培養した。各時間において Total RNA を抽出した後、mirVana miRNA Isolation Kit を利用して small RNA を抽出した。small RNA を電気泳動によって分離後、Ethidium Bromide により染色し、各バンドの蛍光強度を測定して small RNA 量を評価した。

#### 【リアルタイム PCR】

Ago2-siRNA を HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に導入し、24、48 時間に miRNA の発現解析を行った。miRNA としては、多種の細胞で恒常的に発現することが知られている miR-16 を選択した。核内の RNA である U6 snRNA によって miR-16 の発現量を補正し、未処理の細胞に対する相対的な量として評価した。

(3) 細胞内動態解析

siRNA を FAM で蛍光標識した siRNA/CL 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、共焦点レーザー顕微鏡下観察した。

(4) Flow cytometry による細胞周期解析

HT-1080( $3 \times 10^4$ ) に Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した。導入後、72 時間で細胞を回収し、75% エタノールで固定した。細胞を再懸濁し、細胞周期解析用の Guava Cell Cycle Reagent を添加し遮光下で室温にて 30 分間反応させた。Guava EasyCyte Mini の Guava Cell Cycle assay プロトコールを用いて測定を行った。

(5) 細胞運動性の観察 (タイムラプス解析)

Ago2-knockdown による運動性の変化を検討するために、顕微鏡下タイムラプス解析を行った。Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した後、24 時間で細胞を回収し、glass base dish のガラス面に撒き直した。さらに 24 時間経過後に倒立顕微鏡 (Axiovert

200M, ZEISS) を使い、48 時間継続して撮影した。

(6) マイクロアレイによる Ago2-knockdown 後の細胞内遺伝子発現変化に関する検討

HT-1080 細胞( $5 \times 10^5$ ) に Ago2-siRNA を Lf2000 によって導入した。48 時間経過後、細胞を回収し、RNeasy Mini Kit with RNase-Free DNase Set によって RNA を抽出した。抽出した RNA を増幅し、Low RNA Fluorescent Amplification kit (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて蛍光ラベルした。その後、Human 1A ver.2 Oligo Microarray (Agilent Technologies, CA, USA) 上にラベル化した RNA を添加し反応させた後、Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies, CA, USA) でスキャンした。

(7) Phalloidin による細胞骨格 (アクチン) の染色

アクチン骨格を FITC-Phalloidin で免疫染色した。HT-1080( $2 \times 10^4$ ) を glass base dish に撒き、Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した。その後 48 時間、72 時間で培地を除去し、パラホルムアルデヒドで固定した。FITC-Phalloidin を添加し、遮光下反応させた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510, ZEISS) で観察した。

(8) FRET による siRNA とキャリアの調製時における相互作用の検討

FAM ラベルした siRNA と構成脂質内に Rhodamine ラベルした PE を含むリポソームを混合し、複合体調製時の siRNA とリポソーム内脂質との相互作用様式について検討した。具体的には、蛍光物質同士が相互に近い環境に存在すれば、一方の蛍光物質から一方の蛍光物質にエネルギーが移行する FRET 現象を利用した。両蛍光物質の蛍光強度の変化を蛍光光度計を用いて評価した。

(9) In vivo イメージングによる siRNA 体内動態の解析

近赤外蛍光色素である Alexa750 で標識した siRNA を用いて、新生血管標的化 siRNA 搭載リポソームを調製した。あらかじめ Colon26 NL-17 細胞を皮下投与して作製した担がんマウスに、siRNA 量として 30ug となるよう、尾静脈内投与した。蛍光イメージングシステム IVIS を用いて投与直後より経時的に siRNA の体内動態を観察した。

(10) siRNA/キャリア複合体の抗腫瘍効果の検討

siRNA/キャリア複合体の in vivo 活性は、HT-1080 細胞移植ヌードマウスモデルを用い、腫瘍内への直接投与、あるいは静脈内への投与によって評価した。腫瘍内への直接投与の場合、細胞

移植後 8 日目から投与を開始し、18 日目まで 2 日毎に計 6 回(総量 240 $\mu$ g)投与を行った。静脈内投与に関しては、細胞移植後 4 日後から 18 日目まで 2 日毎に計 8 回(総量 200 $\mu$ g)投与を行った。抗腫瘍活性は腫瘍体積の変化および生存日数を指標に評価した。

#### ・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) siRNA/TFL-3複合体による細胞内siRNA導入機構の検討

以前の検討において、siRNAとカチオニックリポソームの複合体を形成させる際に、激しく攪拌(vortexing)することによって遺伝子knockdown効率が顕著に亢進される事を示した。このような活性向上効果が得られた機構の解明を試みた。

まず、細胞による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、個々の細胞による 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。

さらに両複合体の細胞内移行機構を検討したところ、攪拌を加えて形成させた複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれており、一方で従前の方法で形成させた複合体は膜融合によって取り込まれている事が分かった。

FRET を用いた解析の結果、従前の方法(ただ混合し、静置する)で調整した場合、siRNA(負に荷電)はカチオニックリポソームの正電荷脂質(強い正電荷を持つ)と静電的に結合し、複合体を形成していることが類推された。一方、攪拌を

加えた場合、siRNA の結合サイトが前述の強い正電荷を持つ正電荷脂質からリポソーム構成脂質の一つであって比較的弱い正電荷を有する dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) に変わっていることが示唆された。

#### (2) Ago2-knockdown がおよぼす細胞増殖と運動性への影響

Ago2-siRNA を導入した細胞(Ago2-knockdown)では、siRNA 導入後 48 時間までに細胞の輪郭が不明瞭になり、全体的に平坦な形態に変化した。また、細胞分裂回数をカウントしたところ、顕著な抑制が見られることが分かった。また、運動性も著しく抑制されていた。これらの理由を明らかにするために、cell motility, cell division, organelle movement, cell signaling, cell shape などに関与することが知られている actin stress fiber を評価したところ、顕著な発現の抑制が観察された。

さらに細胞周期を解析したところ、Ago2 を knockdown した細胞において、72 時間以降から G0/G1 期が有意に増加した。このことから、Ago2-knockdown によって特異的な細胞増殖抑制が生じることが確認された。

次いで Ago2-knockdown 後の細胞内遺伝子発現への影響に関して、マイクロアレイを用いて検討した。解析によって得られた全 mRNA の発現パターンから、Ago2-knockdown により約 24% の mRNA が 1.5 倍以上変化し、約 7% の mRNA が 2 倍以上変化することが分かった。これに対して、non-specific な siRNA で処置した細胞ではそれぞれ約 10%、約 2% であった。

Ago2-knockdown 細胞において、発現量が変化した mRNA のうち、アポトーシスに関連する遺伝子を抽出した。これらの中でも Bmf (*bcl-2-modifying factor*) 遺伝子は、Ago2-siRNA 導入細胞では約 5 倍発現が増加していた。また、この Bmf 遺伝子の増加に対するさらなる信頼性を確認するため、Bmf 遺伝子に対してリアルタイム PCR を行った。その結果、Ago2-knockdown 細胞では Bmf-mRNA の発現が約 5 倍増加していることが確認された。

#### (3) Ago2-knockdown が miRNA システムに及ぼす影響

##### 【ゲル電気泳動】

miRNA を含む small RNA の発現量をゲル電気泳動によって解析し、Ago2-knockdown による miRNA への影響を検討した結果、Ago2-siRNA 導入細胞では、導入 24 および 48 時間後において

miRNA が減少する傾向が見られた。

#### 【リアルタイム PCR】

未処理および EGFP に対する siRNA を導入した細胞と比較して Ago2-siRNA 導入細胞において、導入 24 時間後から有意に miR-16 の発現が減少し、導入 48 時間後には顕著に miR-16 の発現量が減少した。

#### (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

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、 $\zeta$  電位はほぼ中性であった。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 $\zeta$  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。

#### 【siRNA の安定性】

新生血管選択的 siRNA 導入デバイスに搭載した siRNA は、90%血清存在下において少なくとも 24 時間まで安定であることが明らかとなった。対照的に naked siRNA は血清と混和後速やかに分解され、バンドが確認できなかった。

#### 【Ago2 knockdown】

本年度に開発した新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスを用いて Ago2-siRNA を HUVEC に導入したところ、昨年度までに開発してきたベクターと比較して高い knockdown 効率が得られた。

#### 【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た。

#### (5) *In vivo* イメージングによる siRNA 体内動態の解析

投与 3 時間後までは siRNA が体内に広く分布している様子が観察され、投与 6 時間を過ぎたあたりから、siRNA ががんを選択的に集積している様子が観察された。特に投与 24 時間後においてはがんのみに siRNA が残存している様子が観察された。対照的に siRNA 単独で投与した場合には体内から速やかに代謝される様子が観察された。これらの結果より、新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスはがん組織に siRNA を効果的に送達できることが示唆された。

#### (6) 担がんモデル動物における抗腫瘍効果の検討

これまで観察された Ago2-knockdown による細胞増殖・運動抑制とこれに附随した apoptosis が *in vivo* においても再現され、このことが抗腫瘍効果につながるかどうか、担がんモデル動物を用いて検討した。

具体的には、HT-1080 細胞移植ヌードマウスモデルを用い、腫瘍内への siRNA/キャリア複合体の直接投与、あるいは静脈内投与によって評価した。腫瘍内への直接投与の場合、細胞移植後 8 日目から投与を開始し、18 日目まで 2 日毎に計 6 回(総量 240 $\mu$ g)投与を行った。静脈内投与に関しては、細胞移植後 4 日後から 18 日目まで 2 日毎に計 8 回(総量 200 $\mu$ g)投与を行った。抗腫瘍活性は腫瘍体積の変化および生存日数を指標に評価した。

まず、腫瘍内に直接投与する事により、*in vitro* で得られた細胞増殖抑制効果が *in vivo* で反映されるか検討した。その結果、有意に高い腫瘍増殖抑制効果とともに生存日数の延長も観察された。よって、Ago2 を knockdown することによって *in vivo* でも高い効果が得られることが分かった。そこで、当初の目的である systemic injection (静脈内投与) による効果検討を行った。しかし、期待に反して、十分な効果を得ることができなかった。

#### D. 考察

攪拌という簡便な処置を siRNA/キャリア複合体の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、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。よって複合体の均一化が knockdown 効果向上の一因であり、製剤化技術の確立も siRNA デリバリーシステムの開発に重要であることが示唆された。

さらに、細胞内に送達された siRNA 量は攪拌を加えて形成させた複合体の方が大きいことが分かった。また同時に、細胞内での siRNA の安定性も向上していることも分かった。これらの事は、攪拌によって siRNA の結合部位が強い正電荷を持つカチオン性脂質から比較的弱い正電荷を持つ DOPE に変化した事で、結果として細胞との静電的な相互作用が維持され、その上細胞内に取り込まれた後もリポソーム表面に siRNA が保持され安定性が向上したことを示唆しており、非常に興味深い。一方で、従前の方法では siRNA が結合することによって、キャリア表面の正電荷がマスクされて細胞との相互作用が弱くなる上、siRNA とキャリアとの結合も相対的に弱かったた

め、細胞内でRNaseなどによる分解を受けやすく、よって高いknockdown効果が得られなかったと考えることができる。

また、siRNAの作用部位である細胞質内にsiRNAを送達させる過程(細胞による取り込み(内在化))について検討したところ、従前の方法で調製した複合体は主として膜融合(フュージョン)によってsiRNAを細胞質内に送達していたのに対して、攪拌を加えて調製することによってクラスリン依存性のエンドサイトーシスに変化していることが明らかになった。この事は、攪拌を加えることによって細胞の取り込み機構が大きく変化し、この事が細胞質へのsiRNA送達効率の向上をもたらし、結果として高いknockdown効率につながった可能性を示している。

以上の結果から、複合体の物理化学的性質の変化が細胞内へのsiRNAの送達機構に影響を与え、結果として得られるknockdown効率が大きく左右される事が明らかとなった。今後はこのような特徴を十分に理解し、より効率の高いsiRNA・リボソーム複合体の調整を試みる予定である。

今回行った経時的な細胞周期解析から細胞周期停止、アポトーシスの誘導ともにsiRNA導入後72時間以降で顕著に生じることがわかった。これは細胞生存率の低下がsiRNA導入後48時間以後に生じるという以前の結果に一致する。以上のことから、Ago2-knockdownでは、まず細胞周期非特異的なアポトーシスが誘導され、それに加えてG1期停止による細胞増殖抑制、さらにはG1期停止の延長としてのアポトーシスが生じるため、結果としてより顕著なアポトーシスが観察されたものと考えられる。

Bmfは、Bcl-2ファミリーの一つであるアポトーシスを促進するBH-3-onlyタンパクメンバーの一つである。Bmfは、Bcl-2メンバーのうち、Bcl-2タンパクに結合し相互作用することでアポトーシスを引き起こしており、BH-3-onlyタンパクの中でも特にアクチン細胞骨格に関連するBH-3 onlyタンパクとして同定されている。なぜならBmfは多数あるapoptosis誘導シグナルのうち、細胞骨格に影響を与える細胞と細胞外マトリクス間の結合やインテグリンのシグナルが喪失したことが引き金となるapoptosisに関与しているからである。このような経路を介するapoptosisはアノキスと呼ばれている。よって、Ago2遺伝子knockdownによって生じたapoptosisは、Bmf発現

増加に伴うアノキスの誘導によるものである可能性が考えられる。

さらに、Ago2-knockdownによる細胞骨格に対する影響を検討したところ、actin stress fiberが影響を受け、結果として細胞の形態や運動性が変化している可能性が強く示唆された。さらに、運動性も著しく抑制されていたことから、Ago2遺伝子をknockdownすることで、細胞増殖抑制効果のみならず、がん細胞の浸潤・転移抑制効果も得られる可能性があることが示唆された。

また、Ago2-knockdownがmiRNAシステムに及ぼす影響について検討した。他のRISC構成成分Dicerについては既に血管新生への関与が知られているが、切断酵素活性を有するAgo2についてはまったく知られていない。本年度の検討の結果、Ago2-knockdownによって細胞内miRNAが減少することが示唆された。Ago2-knockdownによってmiRNAシステムによる遺伝子発現制御機構が影響を受けていることが明らかとなり、この現象が先に示した細胞増殖抑制効果やapoptosisの誘導、さらには前年度に観察された血管新生抑制効果に繋がった可能性が考えられた。

またAgo2-knockdown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。新規ポリカチオン脂質DCP-DETAを構成成分とする新規PCLを開発し、昨年度までに開発したデバイスと比較して高いsiRNA導入効果を得た。本年度に新たに開発した新生血管選択的siRNA導入デバイスにsiRNAを搭載することにより、高いノックダウン効果と血清中における高いsiRNA保護効果が得られた。さらに*in vivo*における検討では、Alexa750で標識したsiRNAを用い、新生血管選択的siRNA導入デバイスの体内動態を非侵襲的に解析した。本年度開発した新生血管選択的siRNA導入用デバイスを用いることにより、siRNAを選択的にがんへ送達可能なことが示唆された。

Ago2-knockdownによって細胞増殖抑制およびapoptosisが誘導されたことから、このAgo2に対するsiRNAをがん新生血管に標的化したリボソームに搭載させ、*in vivo*での抗腫瘍効果が得られるか検討した。その結果、大変残念ながらsystemic injectionでは期待したほどの効果を得ることができなかった。これは、①静脈内投与では直接投与ほど多量のsiRNAを送達することができない、②

マウスモデルにおける腫瘍内新生血管はマウス由来であり、ヒト Ago2 に対してデザインした siRNA が十分に機能しない、③他の新生血管阻害薬でも見られるように、血管新生抑制効果のみでは腫瘍体積の減少にはつながらない、④我々の別の検討から、ポリエチレングリコール(PEG)で表面を修飾したリポソームを繰り返し投与すると抗 PEG-IgM が誘導されることを報告しており、誘導された IgM によって次回以降に投与した複合体が排除された、などの理由によるものではないかと考えている。

#### E. 結論

当該研究期間において、Ago2-knockdown によって in vivo でも細胞増殖抑制効果が得られること、さらに knockdown 効率の高い処方調整法とそれともとなる機構、新生血管に親和性を持つリポソームの開発と systemic injection では残念ながら予想した効果が得られないこと、などを明らかにすることができた。当初の計画に反して、静脈内投与では有意な効果を得ることができなかったが、このような現象は低分子や抗体などを用いた抗新生血管療法でも見られていることでもある。今後これらの薬剤の使用法にならば、我々の siRNA/リポソーム複合体も抗がん剤と併用時の抗腫瘍効果などを検討すべきであると考えている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Shiraga, E., Barichello, J.M., Ishida, T., Kiwada, H., A metronomic schedule of cyclophosphamide combined with PEGylated liposomal doxorubicin has a highly antitumor effect in an experimental pulmonary metastatic mouse model. *Int. J. Pharm.*, **353**, 65-73 (2008)
- (2) Hatakeyama, H., Akita, H., Ishida, E., Hashimoto, K., Kobayashi, H., Aoki, T., Yasuda, J., Obata, K., Kikuchi, K., Ishida, T., Kiwada, H., Harashima, H., Tumor targeting of doxorubicin by anti MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int. J. Pharm.*, **342**, 194-200 (2007)
- (3) Atobe K., Ishida T., Ishida, E., Hashimoto K., Kobayashi H., Yasuda J., Aoki, T., Obata K,

Kikuchi H., Akita, H., Asai, T., Harashima, H., Oku, N., Kiwada, H., In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 972-978 (2007)

- (4) Ishida, T., Wang X.Y., Shimizu, T., Nawata, K., Kiwada, H., PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T-cells independent manner. *J. Control. Release*, **122**, 349-355 (2007)
- (5) Asai, T., Miyazawa, S., Maeda, N., Hatanaka, K., Katanasaka, Y., Shimizu, K., Shuto, S., Oku, N., Antineovascular therapy with angiogenic vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC. *Cancer Sci.*, **in press**
- (6) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, M., Oku, N., Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243-248 (2008)
- (7) Shimizu, K., Sawazaki, Y., Tanaka, T., Asai, T., Oku, N., Chronopharmacologic cancer treatment with an angiogenic vessel-targeted liposomal drug. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 95-98 (2008)
- (8) Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N., Oku, N., Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2300-2307 (2007)

##### 2. 学会発表

・招待講演・発表

- (1) 石田竜弘、際田弘志、ポリエチレングリコール修飾リポソーム投与時に生ずる accelerated blood clearance (ABC)現象、シンポジウム S6、日本薬学会第 127 年回(富山) 2007 年 3 月
- (2) 石田竜弘、ポリマー修飾ナノ微粒子の組織・細胞反応性とバイオ応用に関する研究、花王芸術・科学財団第 9 回助成研究発表会(東京) 2007 年 5 月
- (3) 石田竜弘、PEG 修飾リポソーム投与時に者忌諱される免疫反応に関する研究、奨励賞受賞講演、日本薬剤学会第 22 年会(大宮) 2007 年 5 月
- (4) 石田竜弘、リポソーム DDS による体内動態制御に基づく創薬・育薬の試み、Bio Japan2007,

World Business Forum, (横浜) 2007年9月

- (5) 石田竜弘、抗がん剤含有新生血管標的ナノキャリアの開発とその腫瘍休眠療法への展開、とくしま健康・医療クラスター創成フォーラム2008 (徳島) 2008年1月
  - (6) 石田竜弘、リポソームを基盤としたDDSの開発研究～効果増強と安全性の観点から～、第三回DDS熊本シンポジウム (熊本) 2008年2月
- ・一般講演
- (1) 田上辰秋、廣瀬聖実、Barichello, J.M., 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
  - (2) 米澤 正、鈴木佑子、浅井知浩、石田竜弘、際田浩志、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127年会 (富山) 2007年3月
  - (3) 松下小緒里、鈴木佑子、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、前田典之、奥 直人：腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2-siRNA による抗血管新生効果、第7回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム (東京) 2007年5月
  - (4) Ishida, T., Tagami, T., Barichello, J.M., Hirose, K., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., Kiwada, H., Argonaute2 (Ago2) gene silencing by liposomal transfection with siRNA for Ago2 induces apoptosis on HT1080 cells and HUVECs. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
  - (5) Barichello, J.M., Ishida, T., Soares, L.A.L., Kizuki, S., Tagami, T., Hirose, K., Kobayashi, H., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Kiwada, H., Agitation during siRNA-cationic liposomes (CL) complex formation is a key step to improve in vitro RNA interference by lipofection. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
  - (6) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yokota, J., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., Development of Antineovascular RNAi Cancer Therapy Targeting to Argonaute2. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
  - (7) 廣瀬聖実、田上辰秋、鈴木卓也、Barichello, J.M., 山崎尚志、浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、Argonaute2 (Ago2)標的 siRNA 細胞内導入による細胞増殖抑制に関する検討、日本薬剤学会第22年会 (大宮) 2007年5月
  - (8) 城慎二、Barichello, J.M., 田上辰秋、跡部一孝、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、石田竜弘、際田弘志、siRNA リポプレックス(LP)の新規調製法がもたらすノックダウン効率向上のメカニズムに関する検討、第23回日本DDS学会 (熊本) 2007年6月
  - (9) 鈴木卓也、跡部一孝、嶋津史恵、田上辰秋、Barichello J. M., 浅井知浩、奥直人、石田竜弘、際田弘志、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23回日本DDS学会 (熊本) 2007年6月
  - (10) Miyauchi, H., Ichikawa, K., Urakami, T., Yonezawa, S., Shimizu, K., Ishida, T., Kiwada, H., Asai, T., Oku, N., Antigen-conjugated liposomes enhanced hyposensitization immune therapy with extra-low doses. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CA, USA) 2007年7月
  - (11) Barichello, J.M., 城慎二、田上辰秋、菊池寛、石田竜弘、際田弘志、Dose the application of vortex-mixing during complex formation minimize the electrostatic association of cationic liposomes and siRNA? 第16回DDSカンファレンス (静岡) 2007年7月
  - (12) Barichello, J.M., 石田竜弘、城慎二、田上辰秋、廣瀬聖実、菊池寛、際田弘志、siRNA リポプレックス調製時における攪拌操作による遺伝子抑制効果促進メカニズムの検討：フローサイトメトリーによるリポプレックス-細胞相互作用およびリポプレックスの内在化に関する研究、第29回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (仙台) 2007年11月
  - (13) 中村和也、鈴木卓也、嶋津史恵、田上辰秋、Barichello, J.M., 石田竜弘、際田弘志、siRNA カチオニックリポソーム複合体の体内動態と新生血管親和性との相関に関する検討、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (高知) 20

07年11月

- (14) Koide, H., Hatanaka, K., Tsuruta, A., Asai, T., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., T cell-independent B cell response induces accelerated blood clearance phenomenon caused by a repeated injection of PEGylated liposomes. International Liposome Society 2007 Annual Meeting (London, UK) 2007年12月
- (15) 田上辰秋、廣瀬聖実、Barichello J.M., 石田竜弘、際田弘志、siRNA のリポフェクションが細胞内遺伝子発現および遺伝子サイレンシングに与える影響、日本薬学会第128年会(横浜) 2008年3月
- (16) 廣瀬聖実、田上辰秋、Barichello J.M., 山崎尚志、浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、Argonaute2(Ago2)標的 siRNA 細胞内導入による細胞生存抑制効果に関わる遺伝子発現変化に関する検討、日本薬学会第128年会(横浜) 2008年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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オサイエンス研究部・准教授

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。当該研究年度では、①Argonaute2 (Ago2)-knockdown による細胞増殖抑制発現機構、②knockdown 効率の高い処方<sup>1</sup>の遺伝子 knockdown 機構、③in vivo での Ago2-knockdown による抗腫瘍効果、に関する検討を行った。

Ago2-knockdown による細胞増殖抑制機構に関して検討したところ、細胞周期アレストとこれに端を発するアポトーシスによるものであることが確認された。また、タイム・ラプス解析の結果、Ago2 knockdown により細胞増殖や運動性にも影響が生じることが明らかになった。さらに、前年度得られた knockdown 効率の高い新処方<sup>1</sup>に関して検討を行ったところ、siRNA とキャリアが相互作用する際の結合様式、および細胞内移行機構が変化することによって、より高い knockdown 効率<sup>2</sup>が得られることが分かった。次いで、得られた siRNA/キャリア複合体の in vivo 活性を担がんモデル動物で検討したところ、静脈内投与では十分な効果が得られなかったが、腫瘍内直接投与では顕著な腫瘍増殖抑制効果が得られた。この結果は、現状のキャリアを静脈内投与したのでは、効果を得るのに十分な siRNA を腫瘍新生血管に送達できないことを示唆しており、更なる改善が必要であることを示唆するものである。しかしながら、その一方で直接投与では高い抗腫瘍効果（腫瘍増殖抑制効果）が得られており、我々が当初提案した Ago2-knockdown による新規がん治療法の確立が十分可能であることが確認された。

#### 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。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、①Argonaute2 (Ago2)-knockdown による細胞増殖抑制発現機構および miRNA 制御システムに及ぼす影響、②knockdown 効率の高い処方<sup>1</sup>の遺伝子 knockdown 機構、③新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの開発、④ in vivo での Ago2-knockdown による抗腫瘍効果、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(CL)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/CL 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(Lf2000)を用いた。

#### (2)細胞内動態解析

siRNA を FAM で蛍光標識した siRNA/CL 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。

#### (3) Flow cytometry による細胞周期解析

HT-1080( $3 \times 10^4$ )に Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した。導入後、72 時間で細胞を回収し、75%エタノールで固定した。細胞を再懸濁し、細胞周期解析用の Guava Cell Cycle Reagent を添加し遮光下で室温にて 30 分間反応させた。Guava EasyCyte Mini の Guava Cell Cycle assay プロトコールを用いて測定を行った。

#### (4) 細胞運動性の観察 (タイムラプス解析)

Ago2-knockdown による運動性の変化を検討するために、顕微鏡下タイムラプス解析を行った。Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した後、24 時間で細胞を回収し、glass base dish のガラス面に撒き直した。さらに 24 時間経過後に倒立顕微鏡 (Axiovert 200M, ZEISS) を用い、48 時間継続して撮影した。

#### (5) マイクロアレイによる Ago2-knockdown 後の細胞内遺伝子発現変化に関する検討

HT-1080 細胞( $5 \times 10^5$ )に Ago2-siRNA を Lf2000 によって導入した。48 時間経過後、細胞を回収し、RNeasy Mini Kit with RNase-Free DNase Set によって RNA を抽出した。抽出した RNA を増幅し、Low RNA Fluorescent Amplification kit (Agilent Technologies, CA, USA)を用いて蛍光ラベルした。その後、Human 1A ver.2 Oligo Microarray (Agilent Technologies, CA, USA)上にラベル化した RNA を添加し反応させた後、Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies, CA, USA)でスキャンした。

#### (6) Phalloidin による細胞骨格 (アクチン) の染色

アクチン骨格を FITC-Phalloidin で免疫染色した。HT-1080( $2 \times 10^4$ )を glass base dish に撒き、Ago2-siRNA を Lf2000 で導入した。その後 48 時間、72 時間で培地を除去し、パラホルムアルデヒドで固定した。FITC-Phalloidin を添加し、

遮光下反応させた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510, ZEISS) で観察した。

#### (7) FRET による siRNA とキャリアの調製時における相互作用の検討

FAM ラベルした siRNA と構成脂質内に Rhodamine ラベルした PE を含むリポソームを混合し、複合体調製時の siRNA とリポソーム内脂質との相互作用様式について検討した。具体的には、蛍光物質同士が相互に近い環境に存在すれば、一方の蛍光物質から一方の蛍光物質にエネルギーが移行する FRET 現象を利用した。両蛍光物質の蛍光強度の変化を蛍光光度計を用いて評価した。

#### (8) siRNA・キャリア複合体の抗腫瘍効果の検討

siRNA/キャリア複合体の *in vivo* 活性は、HT-1080 細胞移植ヌードマウスモデルを用い、腫瘍内への直接投与、あるいは静脈内への投与によって評価した。腫瘍内への直接投与の場合、細胞移植後 8 日目から投与を開始し、18 日目まで 2 日毎に計 6 回 (総量 240  $\mu$ g) 投与を行った。静脈内投与に関しては、細胞移植後 4 日後から 18 日目まで 2 日毎に計 8 回 (総量 200  $\mu$ g) 投与を行った。抗腫瘍活性は腫瘍体積の変化および生存日数を指標に評価した。

#### ・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選択し、用いた。

#### C. 研究結果

##### (1) siRNA/TFL-3 複合体による細胞内 siRNA 導入機構の検討

以前の検討において、siRNA とカチオニックリポソームの複合体を形成させる際に、激しく攪拌 (vortexing) することによって遺伝子 knockdown 効率が顕著に亢進される事を示した。このような活性向上効果が得られた機構の解明を試みた。

まず、細胞による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、個々の細胞による 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。

さらに両複合体の細胞内移行機構を検討したところ、攪拌を加えて形成させた複合体はエンドサイトーシスによって取り込まれており、一方で従前の方法で形成させた複合体は膜融合によって取り込まれている事が分かった。

FRET を用いた解析の結果、従前の方法（ただ混合し、静置する）で調整した場合、siRNA（負に荷電）はカチオニックリポソームの正電荷脂質（強い正電荷を持つ）と静電的に結合し、複合体を形成していることが類推された。一方、攪拌を加えた場合、siRNA の結合サイトが前述の強い正電荷を持つ正電荷脂質からリポソーム構成脂質の一つであって比較的弱い正電荷を有する dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) に変わっていることが示唆された。

(2) Ago2-knockdown がおよぼす細胞増殖と運動性への影響

Ago2-siRNA を導入した細胞(Ago2-knockdown)では、siRNA 導入後 48 時間までに細胞の輪郭が不明瞭になり、全体的に平坦な形態に変化した。また、細胞分裂回数をカウントしたところ、顕著な抑制が見られることが分かった。また、運動性も著しく抑制されていた。これらの理由を明らかにするために、cell motility, cell division, organelle movement, cell signaling, cell shape などに関与することが知られている actin stress fiber を評価したところ、顕著な発現の抑制が観察された。

さらに細胞周期を解析したところ、Ago2 を knockdown した細胞において、72 時間以降から G0/G1 期が有意に増加した。このことから、Ago2-knockdown によって特異的な細胞増殖抑制が生じることが確認された。

次いで Ago2-knockdown 後の細胞内遺伝子発現への影響に関して、マイクロアレイを用いて検討した。解析によって得られた全 mRNA の発現パターンから、Ago2-knockdown により約 24% の mRNA が 1.5 倍以上変化し、約 7% の mRNA が 2 倍以上変化することが分かった。これに対して、

non-specific な siRNA で処置した細胞ではそれぞれ約 10%、約 2% であった。

Ago2-knockdown 細胞において、発現量が変化した mRNA のうち、アポトーシスに関連する遺伝子を抽出した。これらの中でも Bmf (*bcl-2-modifying factor*) 遺伝子は、Ago2-siRNA 導入細胞では約 5 倍発現が増加していた。また、この Bmf 遺伝子の増加に対するさらなる信頼性を確認するため、Bmf 遺伝子に対してリアルタイム PCR を行った。その結果、Ago2-knockdown 細胞では Bmf-mRNA の発現が約 5 倍増加していることが確認された。

(3) 担がんモデル動物における抗腫瘍効果の検討

これまで観察された Ago2-knockdown による細胞増殖・運動抑制とこれに附随した apoptosis が *in vivo* においても再現され、このことが抗腫瘍効果につながるかどうか、担がんモデル動物を用いて検討した。

具体的には、HT-1080 細胞移植ヌードマウスモデルを用い、腫瘍内への siRNA/キャリア（リポソーム）複合体の直接投与、あるいは静脈内投与によって評価した。腫瘍内への直接投与の場合、細胞移植後 8 日目から投与を開始し、18 日目まで 2 日毎に計 6 回(総量 240 $\mu$ g)投与を行った。静脈内投与に関しては、細胞移植後 4 日後から 18 日目まで 2 日毎に計 8 回(総量 200 $\mu$ g)投与を行った。抗腫瘍活性は腫瘍体積の変化および生存日数を指標に評価した。

まず、腫瘍内に直接投与する事により、*in vitro* で得られた細胞増殖抑制効果が *in vivo* で反映されるか検討した。その結果、有意に高い腫瘍増殖抑制効果とともに生存日数の延長も観察された。よって、Ago2 を knockdown することによって *in vivo* でも高い効果が得られることが分かった。そこで、当初の目的である systemic injection（静脈内投与）による効果検討を行った。しかし、期待に反して、十分な効果を得ることができなかった。

#### D. 考察

攪拌という簡便な処置を siRNA/キャリア複合体の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、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。よって複合体の均一化が knockdown 効果向上の一因であり、製剤化技術の確立も siRNA デリバリーシステムの開発に重要であることが示唆された。

さらに、細胞内に送達された siRNA 量は攪拌を加えて形成させた複合体の方が大きいことが分かった。また同時に、細胞内での siRNA の安定性も向上していることも分かった。これらの事は、攪拌によって siRNA の結合部位が強い正電荷を持つカチオン性脂質から比較的弱い正電荷を持つ DOPE に変化した事で、結果として細胞との静電的な相互作用が維持され、その上細胞内に取り込まれた後リポソーム表面に siRNA が保持され安定性が向上したことを示唆しており、非常に興味深い。一方で、従前の方法では siRNA が結合することによって、キャリア表面の正電荷がマスクされて細胞との相互作用が弱くなる上、siRNA とキャリアとの結合も相対的に弱かったため、細胞内で RNase などによる分解を受けやすく、よって高い knockdown 効果が得られなかったと考えることができる。

また、siRNA の作用部位である細胞質内に siRNA を送達させる過程(細胞による取り込み(内在化))について検討したところ、従前の方法で調製した複合体は主として膜融合(フュージョン)によって siRNA を細胞質内に送達していたのに対して、攪拌を加えて調製することによってクラスリン依存性のエンドサイトーシスに変化していることが明らかになった。この事は、攪拌を加えることによって細胞の取り込み機構が大きく変化し、この事が細胞質への siRNA 送達効率の向上をもたらし、結果として高い knockdown 効率につながった可能性を示している。

以上の結果から、複合体の物理化学的性質の変化が細胞内への siRNA の送達機構に影響を与え、結果として得られる knockdown 効率が大きく左右される事が明らかとなった。今後はこのような特徴を十分に理解し、より効率の高い siRNA・リポソーム複合体の調整を試みる予定である。

今回行った経時的な細胞周期解析から細胞周期停止、アポトーシスの誘導ともに siRNA 導入後 72 時間以降で顕著に生じることがわかった。これは細胞生存率の低下が siRNA 導入後 48 時間以後

に生じるという以前の結果に一致する。以上のことから、Ago2-knockdown では、まず細胞周期非特異的なアポトーシスが誘導され、それに加えて G1 期停止による細胞増殖抑制、さらには G1 期停止の延長としてのアポトーシスが生じるため、結果としてより顕著なアポトーシスが観察されたものと考えられる。

Bmf は、Bcl-2 ファミリーの一つであるアポトーシスを促進する BH-3-only タンパクメンバーの一つである。Bmf は、Bcl-2 メンバーのうち、Bcl-2 タンパクに結合し相互作用することでアポトーシスを引き起こしており、BH-3-only タンパクの中でも特にアクチン細胞骨格に関連する BH-3 only タンパクとして同定されている。なぜなら Bmf は多数ある apoptosis 誘導シグナルのうち、細胞骨格に影響を与える細胞と細胞外マトリクス間の結合やインテグリンのシグナルが喪失したことが引き金となる apoptosis に関与しているからである。このような経路を介する apoptosis はアノキスと呼ばれている。よって、Ago2 遺伝子 knockdown によって生じた apoptosis は、Bmf 発現増加に伴うアノキスの誘導によるものである可能性が考えられる。

さらに、Ago2-knockdown による細胞骨格に対する影響を検討したところ、actin stress fiber が影響を受け、結果として細胞の形態や運動性が変化している可能性が強く示唆された。さらに、運動性も著しく抑制されていたことから、Ago2 遺伝子を knockdown することで、細胞増殖抑制効果のみならず、がん細胞の浸潤・転移抑制効果も得られる可能性があることが示唆された。

Ago2-knockdown によって細胞増殖抑制および apoptosis が誘導されたことから、この Ago2 に対する siRNA をがん新生血管に標的化したリポソームに搭載させ、in vivo での抗腫瘍効果が得られるか検討した。その結果、大変残念ながら systemic injection では期待したほどの効果を得ることができなかった。これは、①静脈内投与では直接投与ほど多量の siRNA を送達することができない、②マウスモデルにおける腫瘍内新生血管はマウス由来であり、ヒト Ago2 に対してデザインした siRNA が十分に機能しない、③他の新生血管阻害薬でも見られるように、血管新生抑制効果のみでは腫瘍体積の減少にはつながらない、④我々の別の検討から、ポリエチレングリコール(PEG)で表面を修飾したリポソームを繰り返し投与すると

抗 PEG-IgM が誘導されることを報告しており、誘導された IgM によって次回以降に投与した複合体が排除された、などの理由によるものではないかと考えている。

## E. 結論

当該研究期間において、Ago2-knockdown によって in vivo でも細胞増殖抑制が得られること、さらに knockdown 効率の高い処方調整法とそのもとなる機構、新生血管に親和性を持つリポソームの開発と systemic injection では残念ながら予想した効果が得られないこと、などを明らかにすることができた。当初の計画に反して、静脈内投与では有意な効果を得ることができなかったが、このような現象は低分子や抗体などを用いた抗新生血管療法でも見られていることでもある。今後これらの薬剤の使用法にならば、我々の siRNA/リポソーム複合体も抗がん剤と併用時の抗腫瘍効果などを検討すべきであると考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Shiraga, E., Barichello, J.M., Ishida, T., Kiwada, H., A metronomic schedule of cyclophosphamide combined with PEGylated liposomal doxorubicin has a highly antitumor effect in an experimental pulmonary metastatic mouse model. *Int. J. Pharm.*, **353**, 65-73 (2008)
- (2) Hatakeyama, H., Akita, H., Ishida, E., Hashimoto, K., Kobayashi, H., Aoki, T., Yasuda, J., Obata, K., Kikuchi, K., Ishida, T., Kiwada, H., Harashima, H., Tumor targeting of doxorubicin by anti MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int. J. Pharm.*, **342**, 194-200 (2007)
- (3) Atobe K., Ishida T., Ishida, E., Hashimoto K., Kobayashi H., Yasuda J., Aoki, T., Obata K., Kikuchi H., Akita, H., Asai, T., Harashima, H., Oku, N., Kiwada, H., In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 972-978 (2007)
- (4) Ishida, T., Wang X.Y., Shimizu, T., Nawata, K., Kiwada, H., PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T-cells independent manner. *J. Control. Release*, **122**, 349-355 (2007)
- (5) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T.,

Kiwada, H., Nango, M., Oku, N., Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243-248 (2008)

### 2. 学会発表

・招待講演・発表

- (1) 石田竜弘、際田弘志、ポリエチレングリコール修飾リポソーム投与時に生ずる accelerated blood clearance (ABC)現象、シンポジウム S6、日本薬学会第 127 年回 (富山) 2007 年 3 月
  - (2) 石田竜弘、ポリマー修飾ナノ微粒子の組織・細胞反応性とバイオ応用に関する研究、花王芸術・科学財団第 9 回助成研究発表会 (東京) 2007 年 5 月
  - (3) 石田竜弘、PEG 修飾リポソーム投与時に者忌諱される免疫反応に関する研究、奨励賞受賞講演、日本薬剤学会第 22 年会 (大宮) 2007 年 5 月
  - (4) 石田竜弘、リポソーム DDS による体内動態制御に基づく創薬・育薬の試み、Bio Japan2007, World Business Forum, (横浜) 2007 年 9 月
  - (5) 石田竜弘、抗がん剤含有新生血管標的ナノキャリアの開発とその腫瘍休眠療法への展開、とくしま健康・医療クラスター創成フォーラム 2008 (徳島) 2008 年 1 月
  - (6) 石田竜弘、リポソームを基盤とした DDS の開発研究～効果増強と安全性の観点から～、第三回 DDS 熊本シンポジウム (熊本) 2008 年 2 月
- ・一般講演
- (1) 田上辰秋、廣瀬聖実、Barichello, J.M., 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
  - (2) 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 127 年会 (富山) 2007 年 3 月
  - (3) 松下小緒里、鈴木佑子、浅井知浩、石田竜弘、際田弘志、前田典之、奥 直人：腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2-siRNA による抗血管新生効果、第

- 7 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム  
(東京) 2007年5月
- (4) Ishida, T., Tagami, T., Barichello, J.M., Hirose, K., Yamazaki, N., Asai, T., Oku, N., Kiwada, H., Argonaute2 (Ago2) gene silencing by liposomal transfection with siRNA for Ago2 induces apoptosis on HT1080 cells and HUVECs. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
- (5) Barichello, J.M., Ishida, T., Soares, L.A.L., Kizuki, S., Tagami, T., Hirose, K., Kobayashi, H., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Kiwada, H., Agitation during siRNA-cationic liposomes (CL) complex formation is a key step to improve in vitro RNA interference by lipofection. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
- (6) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yokota, J., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., Development of Antineovascular RNAi Cancer Therapy Targeting to Argonaute2. American Society of Gene Therapy 10<sup>th</sup> Annual Meeting (WA) US, 2007年5月
- (7) 廣瀬聖実、田上辰秋、鈴木卓也、Barichello, J.M., 山崎尚志、浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、Argonaute2 (Ago2)標的 siRNA 細胞内導入による細胞増殖抑制に関する検討、日本薬剤学会第22年会(大宮) 2007年5月
- (8) 城慎二、Barichello, J.M., 田上辰秋、跡部一孝、小林英夫、橋本浩一、菊池寛、石田竜弘、際田弘志、siRNA リポプレックス(LP)の新規調製法がもたらすノックダウン効率向上のメカニズムに関する検討、第23回日本DDS学会(熊本) 2007年6月
- (9) 鈴木卓也、跡部一孝、嶋津史恵、田上辰秋、Barichello J. M., 浅井知浩、奥直人、石田竜弘、際田弘志、マウス皮下新生血管誘導モデルを用いたカチオンリポソームの新生血管親和性の検討、第23回日本DDS学会(熊本) 2007年6月
- (10) Miyauchi, H., Ichikawa, K., Urakami, T., Yonezawa, S., Shimizu, K., Ishida, T., Kiwada, H., Asai, T., Oku, N., Antigen-conjugated liposomes enhanced hyposensitization immune therapy with extra-low doses. 34<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CA, USA) 2007年7月
- (11) Barichello, J.M., 城慎二、田上辰秋、菊池寛、石田竜弘、際田弘志、Dose the application of vortex-mixing during complex formation minimize the electrostatic association of cationic liposomes and siRNA? 第16回DDSカンファランス(静岡) 2007年7月
- (12) Barichello, J.M., 石田竜弘、城慎二、田上辰秋、廣瀬聖実、菊池寛、際田弘志、siRNA リポプレックス調製時における攪拌操作による遺伝子抑制効果促進メカニズムの検討：フローサイトメトリーによるリポプレックス-細胞相互作用およびリポプレックスの内在化に関する研究、第29回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(仙台) 2007年11月
- (13) 中村和也、鈴木卓也、嶋津史恵、田上辰秋、Barichello, J.M., 石田竜弘、際田弘志、siRNA カチオンリポソーム複合体の体内動態と新生血管親和性との相関に関する検討、第46回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(高知) 2007年11月
- (14) Koide, H., Hatanaka, K., Tsuruta, A., Asai, T., Ishida, T., Kiwada, H., Oku, N., T cell-independent B cell response induces accelerated blood clearance phenomenon caused by a repeated injection of PEGylated liposomes. International Liposome Society 2007 Annual Meeting (London, UK) 2007年12月
- (15) 田上辰秋、廣瀬聖実、Barichello J.M., 石田竜弘、際田弘志、siRNA のリポフェクションが細胞内遺伝子発現および遺伝子サイレンシングに与える影響、日本薬学会第128年会(横浜) 2008年3月
- (16) 廣瀬聖実、田上辰秋、Barichello J.M., 山崎尚志、浅井知浩、石田竜弘、奥直人、際田弘志、Argonaute2(Ago2)標的 siRNA 細胞内導入による細胞生存抑制効果に関わる遺伝子発現変化に関する検討、日本薬学会第128年会(横浜) 2008年3月
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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** 昨年度までに Argonaute2 (Ago2) ノックダウンによる血管新生抑制効果を明らかにし、一方で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てきた。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、様々な解析を進めてきた。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。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、本デバイスを用いることでリガンド選択的な siRNA の導入や遺伝子ノックダウンが実現しうることを明らかにした。

本年度は、Ago2 ノックダウンが miRNA システムに及ぼす影響をゲル電気泳動法ならびにリアルタイム PCR によって解析した。その結果 Ago2 ノックダウンにより、細胞内 miRNA が減少することが示唆された。一方で siRNA ベクターに有用なポリカチオン脂質 (dicetylphosphate-diethylenetriamine) を新たに合成し、高いノックダウン効率を示す新規ベクターの開発に成功した。さらに新規ベクターに上記の新生血管親和性ペプチドを修飾することにより、標的化ベクターの開発に成功した。*In vivo* への応用を念頭に siRNA を搭載した新規標的化ベクターの安定性を評価し、siRNA が 90% 血清存在下において 24 時間以上安定であることを明らかにした。さらに、蛍光色素 Alexa750 で標識した siRNA をがん新生血管に標的化したベクターに搭載し、担がんマウスにおける体内動態を蛍光 *in vivo* イメージング法によって解析した。その結果、投与 24 時間後において、siRNA が腫瘍に選択的に集積している様子が明らかとなった。以上の検討により、血管新生抑制活性を有する Ago2-siRNA をがん新生血管へ選択的にデリバリーしうるシステムを開発した。

#### A. 研究目的

RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の主要タンパク質 Argonaute2 (Ago2) 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抑制、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ことを目的としている。本年度は、1) Argonaute2 (Ago2) ノックダウンが miRNA 制御システムに及ぼす影響、2) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスの開発、ならびに 3) siRNA デリバリーシステムの *in vivo* における評価を実施した。

具体的には、昨年度までに配列決定した Ago2 に対する siRNA (siAgo2) を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)

に導入し、miRNA システムに及ぼす影響をゲル電気泳動法ならびにリアルタイム PCR 法によって解析した。一方で siRNA ベクターに有用なポリカチオン脂質 (dicetylphosphate-diethylenetriamine) を新たに合成し、従来よりも高いノックダウン効率を示す新規ベクターの開発に取り組んだ。この新規ベクターに昨年度までに新生血管への siRNA デリバリーに有用であることを明らかにした新生血管親和性ペプチドを修飾した。さらに、*in vivo* におけるデリバリー効率の評価として近赤外蛍光色素 Alexa750 を末端修飾した siRNA を新規ベクターに搭載し、*in vivo* における体内動態を非侵襲的に解析した。以上の検討を実施することにより、血管新生抑制効果を発揮する siAgo2 をがん新生血管へ選択的にデリバリーしうるシステムの

開発を試みた。

## B. 研究方法

### (1) Ago2 ノックダウン

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。

(2) Ago2 ノックダウンが miRNA システムに及ぼす影響

#### 【ゲル電気泳動】

血清存在下、PCL を用いて siAgo2 を HUVEC に導入し、24、48 時間培養した。各時間において Total RNA を抽出した後、mirVana miRNA Isolation Kit を利用して small RNA を抽出した。small RNA を電気泳動によって分離後、Ethidium Bromide により染色し、各バンドの蛍光強度を測定して small RNA 量を評価した。

#### 【リアルタイム PCR】

siAgo2 を HUVEC に導入し、24、48 時間に miRNA の発現解析を行った。miRNA としては、多種の細胞で恒常的に発現することが知られている miR-16 を選択した。核内の RNA である U6 snRNA によって miR-16 の発現量を補正し、未処理の細胞に対する相対的な量として評価した。

### (3) 新規 siRNA ベクターの調製

脂質組成比 dicetylphosphate-diethylenetriamine (DCP-DETA)/DOPE/Cholesterol=1/1/1 となるように調製した凍結乾燥混合脂質粉末を DEPC 水で復水後、エクストルーダーを用いて粒子径約 100 nm の PCL を調製した。PCL と siRNA の複合体を形成させた後、DSPE-MPEG (2000) あるいは DSPE-PEG-APRPG 溶液を添加し、60°C で 10 分間インキュベートした。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。

(4) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスのキャラクターゼーション

#### 【siRNA の安定性】

siRNA 濃度 1.35 ng/ $\mu$ L となるように調製した siRNA 搭載リポソーム溶液に最終濃度 90%血清となるように血清を混和し、37°C にて 6、12、24 時間インキュベートした。siRNA を電気泳動によって分離後、Ethidium Bromide により染色し、各バンドの蛍光強度を測定した。

### 【Ago2 ノックダウン】

新生血管選択的 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。

#### 【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。

(5) *in vivo* イメージングによる siRNA 体内動態の解析

近赤外蛍光色素である Alexa750 で標識した siRNA を用いて、新生血管標的化 siRNA 搭載リポソームを調製した。あらかじめ colon26 NL-17 細胞を皮下投与して作製した担がんマウスに、siRNA 量として 30ug となるよう、尾静脈内投与した。蛍光イメージングシステム IVIS を用いて投与直後より経時的に siRNA の体内動態を観察した。

## C. 研究結果

(1) Ago2 ノックダウンが miRNA システムに及ぼす影響

#### 【ゲル電気泳動】

miRNA を含む small RNA の発現量をゲル電気泳動によって解析し、Ago2 ノックダウンによる miRNA への影響を検討した結果、siAgo2 導入細胞では、導入 24 および 48 時間後において miRNA が減少する傾向が見られた。

#### 【リアルタイム PCR】

未処理および siEGFP 導入細胞と比較して siAgo2 導入細胞において、導入 24 時間後から有意に miR-16 の発現が減少し、導入 48 時間後には顕著に miR-16 の発現量が減少した。

(2) 新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスのキャラクターゼーション

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、電位はほぼ中性であった。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。

#### 【siRNA の安定性】

新生血管選択的 siRNA 導入デバイスに搭載した siRNA は、90%血清存在下において少なくとも 24 時間まで安定であることが明らかとなった。対照的に naked siRNA は血清と混和後速やかに分解

され、バンドが確認できなかった。

#### 【Ago2 ノックダウン】

本年度に開発した新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスを用いて siAgo2 を HUVEC に導入したところ、昨年度までに開発してきたベクターと比較して高いノックダウン効率を得られた。

#### 【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た。

(3) *in vivo* イメージングによる siRNA 体内動態の解析

投与3時間後までは siRNA が体内に広く分布している様子が観察され、投与6時間を過ぎたあたりから、siRNA ががんを選択的に集積している様子が観察された。特に投与24時間後においてはがんのみに siRNA が残存している様子が観察された。対照的に siRNA 単独で投与した場合には体内から速やかに代謝される様子が観察された。これらの結果より、新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスはがん組織に siRNA を効果的に送達できることが示唆された。

#### D. 考察

昨年度までの検討により siAgo2 に血管新生抑制効果があることが明らかとなり、本年度はその機構解明のひとつとして Ago2 ノックダウンが miRNA システムに及ぼす影響について検討した。他の RISC 構成成分 Dicer については既に血管新生への関与が知られているが、切断酵素活性を有する Ago2 についてはまったく知られていない。本年度の検討の結果、Ago2 ノックダウンによって細胞内 miRNA が減少することが示唆された。ノックダウンによって miRNA システムによる遺伝子発現制御機構に影響を及ぼすことが明らかとなり、この現象が血管新生抑制効果に繋がった可能性が考えられる。

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。新規ポリカチオン脂質 DCP-DETA を構成成分とする新規 PCL を開発し、昨年度までに開発したデバイスと比較して高い siRNA 導入効果を得た。本年度に新たに開発した新生血管選択的 siRNA 導入デバイスに siRNA を搭載することにより、高いノックダウン効果と血清中における高い siRNA 保護効果を得られた。さらに *in vivo* における検討では、Alexa750 で標識した siRNA を用い、新生血管選択的 siRNA 導入デ

バイスの体内動態を非侵襲的に解析した。本年度に開発した新生血管選択的 siRNA 導入用デバイスを用いることにより、siRNA を選択的にがんへ送達可能なことが示唆された。

#### E. 結論

血管新生抑制効果を有する siAgo2 を搭載した新生血管選択的 siRNA 導入デバイスを用いることにより、独創的な薬理作用機構に基づくがん治療が実現しうる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Asai, T., Miyazawa, S., Maeda, N., Hatanaka, K., Katanasaka, Y., Shimizu, K., Shuto, S., Oku, N.: Antineovascular therapy with angiogenic vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC. *Cancer Sci.*, (*in press*)
- (2) Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, M., Oku, N.: Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243-248 (2008)
- (3) Shimizu, K., Sawazaki, Y., Tanaka, T., Asai, T., Oku, N.: Chronopharmacologic cancer treatment with an angiogenic vessel-targeted liposomal drug. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 95-98. (2008)
- (4) Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N., Oku, N.: Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2300-2307. (2007)

##### 2. 学会発表

- (1) 米澤 正、鈴木佑子、浅井知造、石田竜弘、際田浩志、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 127 年会（富山）講演要旨集 1、P272、2007 年 3 月 30 日
- (2) 松下小緒里、鈴木佑子、浅井知造、石田竜弘、際田弘志、前田典之、奥 直人：腫瘍新生血管を標的とした siRNA デリバリーの構築と Argonaute2-siRNA による抗血管新生効果。第

7 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム  
(東京) 要旨集、P47、2007 年 5 月 18 日

- (3) Tomohiro Asai, Yuko Suzuki, Saori Matsushita, Junichi Yokota, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Naoto Oku: Development of Antineovascular RNAi Cancer Therapy Targeting to Argonaute2. American Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting (Seattle, WA) Final Program 231 S87、2007 年 5 月 31 日
- (4) Haruna Miyauchi, Kanae Ichikawa, Takeo Urakami, Sei Yonezawa, Kosuke Shimizu, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Antigen-conjugated liposomes enhanced hyposensitization immune therapy with extra-low doses. 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Long Beach, CA) 2007 年 7 月 9 日
- (5) Hiroyuki Koide, Kentaro Hatanaka, Atsushi Tsuruta, Tomohiro Asai, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Naoto Oku: T cell-independent B cell response induces accelerated blood clearance phenomenon caused by a repeated injection of PEGylated liposomes. International Liposome Society 2007 Annual Meeting (London) Abstract P66、2007 年 12 月 8 日
- (6) 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) 薬学雑誌 Vol.126 Suppl 4, p.20-21、2006 年 11 月 10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし