

No.	Name	Start	Sequence (Sense)	Sequence (Antisense)	Total	Profile	GC	Pos.	Load	Speci.
1	ApoB-5	1375	AGGCUGCAGGAAUCUUAdTdT	UAAAGAUUUCUGCAGCCUdTdT	93.2	66.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	ApoB-6	4962	UUCCAGGGUGUAGAAUUAdTdT	UAAUUCUACACCCUGGAAdTdT	92.6	83.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3	ApoB-4	5878	GGCCAGCUAUUAGUAGUAdTdT	ACUUACUUAUAGCUGCCdTdT	94.0	70.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	ApoB-3	6195	GCCUGUCAUUGCCUUAUUdTdT	AUUAAAGGCAUUGACAGGCdTdT	97.2	86.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	ApoB-9	7305	GUGGCUUAAAGCAUUGUCUdTdT	AGACAUUGCUUUAAGCCAGdTdT	91.9	100.0	100.0	100.0	73.0	100.0
6	ApoB-10	8142	GCCUCUCCAGAAAUGUAdTdT	AUACAUIUUCUGGAAGAGGCdTdT	92.2	70.0	100.0	100.0	94.0	100.0
7	ApoB-2	9515	CUCCUUACUGAAGGAUUUdTdT	AAAUCUUUCAGUAAGGGAGdTdT	99.4	100.0	100.0	100.0	98.0	100.0
8	ApoB-11	12224	AGGCUCUAAGGCUAUUUdTdT	UAAAUAGCCUUAAGAAGCCUdTdT	92.6	78.0	90.0	100.0	100.0	100.0
9	ApoB-7	12443	GGGUGUAGACAGUUAUAdTdT	ACUUAUACUGUCUAACACCCdTdT	96.7	100.0	100.0	100.0	89.0	100.0
10	ApoB-8	13104	UGGGUGGACAGUGAAUAdTdT	AUUAUUACACUGUCCACCCdTdT	93.4	67.0	100.0	100.0	100.0	100.0
11	ApoB-1	10049	GUCAUCACACUGAAUACCAUdTdT	CACAQUAGUGGACUUUUGGUAdTdT						
12	ApoB-1a	10049	GUCAUCACACUGAAUACCAdTdT	CAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	72.6	10.0	30.0	5.0	12.6	15.0
13	ApoB-1b	10050	UCAUCACACUGAAUACCAAdTdT	ACAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	74.8	14.0	27.0	5.0	13.8	15.0
14	ApoB-1c	10051	CAUCACACUGAAUACCAUdTdT	CAGUAGUGGACUUUUGGUAdTdT	68.9	6.0	27.0	5.0	15.9	15.0

Table 1. ApoB siRNA の候補配列とパラメーター

Start: siRNA の開始位置

Sequence (Sense): siRNA のセンス鎖の配列

Sequence (Antisense): siRNA のアンチセンス鎖の配列

Total: 合計スコア

Profile: (=Profile Score) 活性のある siRNA に共通する配列的特徴によるスコア

GC: (=GC Score) siRNA の GC% から算出したスコア

Pos.: (=Position Score) mRNA 中の位置から算出したスコア

Load: (=Load Score) siRNA のエネルギー分布から算出したスコア

Speci: (=Specificity Score) Off target effect の予測によるスコア

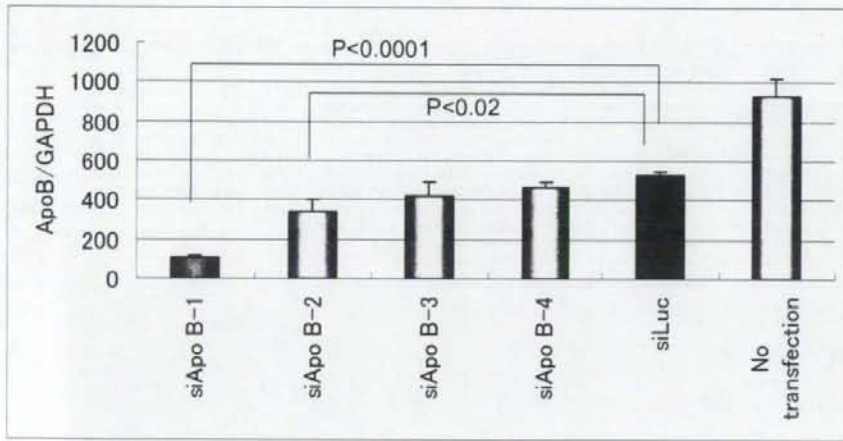


Fig. 1 ApoB siRNA (ApoB-1~B-4)の in vitro スクリーニング

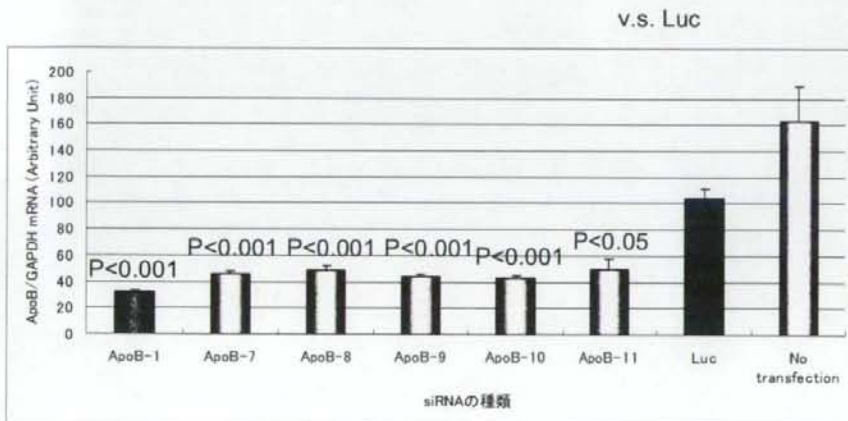


Fig. 2 ApoB siRNA (ApoB-7~B11)の in vitro スクリーニング

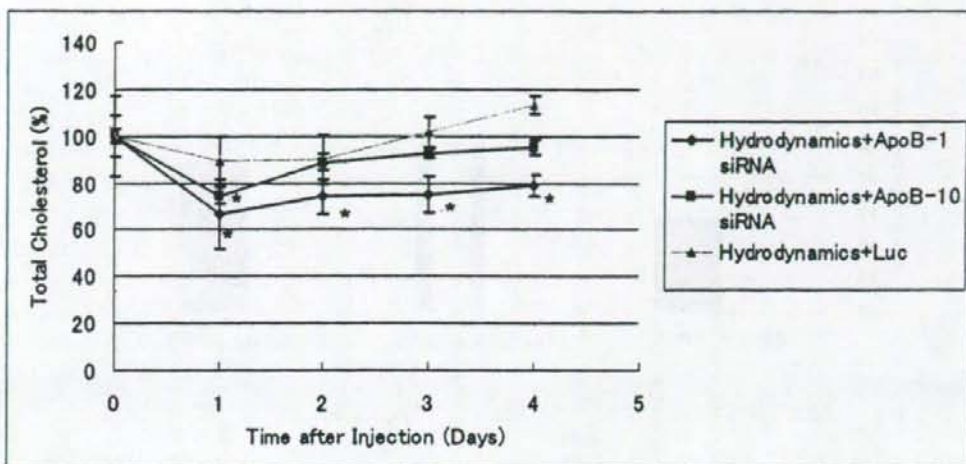


Fig. 3 hydrodynamics法によるApoB siRNAの投与後の血清総コレステロール値の変化。

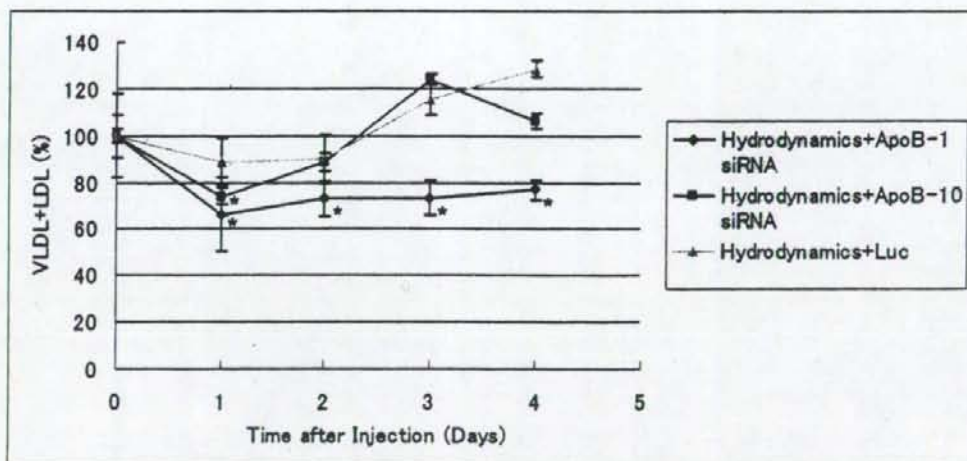


Fig. 4 hydrodynamics法によるApoB siRNAの投与後の血清VLDL+LDLコレステロール値の変化。

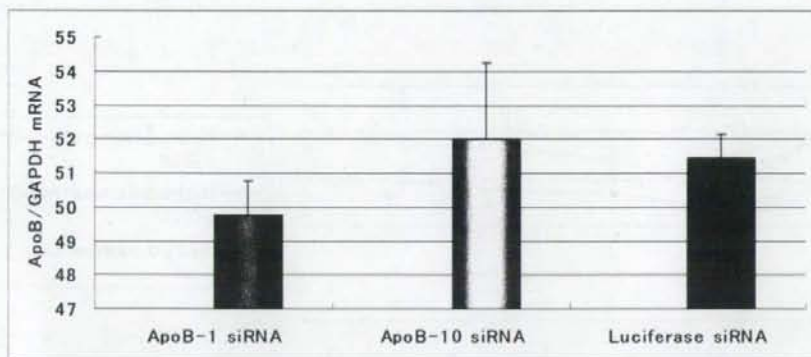


Fig. 5 siRNA投与4日後のマウスの肝臓におけるApoB mRNA量

機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に 対する新しい治療薬の開発

—機能性 siRNA のデリバリー—

分担研究者 山岡 哲二 国立循環器病センター研究所 部長

本研究の目的は、家族性高コレステロール血症に対する新規薬剤の開発であり、機能化 siRNA の経口投与により小腸および肝臓でのリポ蛋白合成を抑制することで、高コレステロール血症の改善を目指すものである。本年度は、肝細胞指標性を有する siRNA の合成を行った。まず、直接的 siRNA 修飾として、肝細胞への優位的な取り込みが知られているブルランを siRNA に結合させた機能化 siRNA の合成について検討した。更に、キャリア分子を介した間接的戦略として、非ウイルスキャリアー分野において注目されているポリエチレンイミンをブルラン側鎖に導入したブルラン-siRNA コンジュゲートを作成し、非修飾 siRNA との複合体形成について検討し、また、マウス肝細胞を用い、ポリエチレンイミンと siRNA の複合体を形成させ、細胞内導入を行ったところ、最適な C/A を見出すことができた。更に、ブルラン-siRNA コンジュゲートを用い、siRNA の発現について検討を行った。

A 研究目的

siRNA が遺伝子の働きを強力に抑制する特徴を有することが知られて以来、修飾 siRNA や送達キャリアーなどに関する研究が様々行われてきた。近年では、siRNA の合成・設計などの基礎的研究だけでなく、臨床へ向けた検討が加速している。siRNA を臨床研究へとステップアップさせるためには目的部位へのターゲティングさらには、到達経路における分解抑制等が必要となり、非常に困難を伴う。それらの問題点を解決するためには、化学的手法による siRNA の修飾が必要となってくる。

本来、細胞内への遺伝子の導入には、細胞膜がバリアーとなり容易ではない。そのため、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が一般的である。ウイルスベクターは、細胞種に依存することなく遺伝子を導入でき、既存のベクターでは最も効率が良いが、ウイルス由来のタンパクに対する免疫反応の誘導やゲノムに変異が挿入される危険性等の大きな問題が存在する。そこで、非ウイルス性の合成高分子キャリアーが注目されてきた。合成高分子キャリアーによる導

入効率は、高分子の分子量や混合する核酸との比率に依存し、導入する細胞によっても異なるため、詳細な検討が必要となる。

本研究は、家族性高コレステロール血症治療を達成するための、経口投与可能な siRNA を開発することである。目的を達成するために、以下の四点をクリアしなければならない。①経口投与から腸管吸収まで siRNA の消化・分解を抑える、②腸管での吸収を促進させる、③SPECT によるトレーサー分子の結合部位を確保する④siRNA を機能させるため、速やかに siRNA をリリースさせる。一段階目として、肝細胞指標性を有する siRNA の合成を行った。具体的には、肝細胞への優位的な取り込みが知られているブルランを用い、siRNA との複合体形成について検討した。更に、細胞に対する遺伝子導入の分野において用いられているポリエチレンイミンをブルラン側鎖に導入し、ポリエチレンイミンと siRNA を相互作用させ、ブルラン-siRNA コンジュゲートの形成について検討した。いずれも、肝細胞への取り込み促進を狙い、且つ、siRNA の機能を保持させる化学的アプローチであ

る。

1. Yamaoka, T. *et al.* Drug Delivery 1, 75-82 (1993).

B. 研究方法

1. ブラン-siRNA コンジュゲートの合成

ブラン (分子量 22,800, 1.083 μmol , 昭和電工) と脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾール (CDI) (7.5mmol, 東京化成) を脱水 DMSO 60 μl 中で 6 時間、室温で放置した。6 時間後、440 μl の DEPC 水を加えた siRNA (Apo-B1 : sense 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAUdTdT-3' antisense 3'-dTdTACAGUAGUGACUUAUGGUUA-5' : sense 鎖の 5' 末端をアミノ化) を、反応溶液に添加し、40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間攪拌した (Scheme 1)。反応終了後、透析膜 (cut-off: 1,000) を用いた透析、凍結乾燥を経て精製を行った。

2. ブラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

ポリ (エチレンオキサソリン) (分子量 50,000) を出発物質とし、酸加水分解反応より、直鎖状ポリエチレンイミンを得た。得られたポリエチレンイミンはクロロホルムに易溶であり、高温条件にて、水、DMSO に可溶であった。

肝指標性を示す高分子としてブランを選択し、ポリエチレンイミンとの複合体形成を試みた。反応は、脱水 DMSO 中でブランの側鎖水酸基をカルボニルビスイミダゾール (CDI) により活性化し、ポリエチレンイミンと混合させた。具体的には、ブランと CDI を DMSO 中で 6 時間、室温で攪拌し、その後、ポリエチレンイミンを反応溶液に添加した。24 時間室温で攪拌した後、透析を用いて残渣を除去し、凍結乾燥を行うことで回収とした (Scheme 2)。

3. ポリエチレンイミンを用いた siRNA 導入

ポリエチレンイミンのアニオン (以下、A) に対して、siRNA のカチオン (以下、C) の割合が 48、24、12、6、3、1.5 となるように調整し、siRNA の細胞への導入実験を行った。2.1 $\times 10^4$ cells/cm² の NMuLi 細胞 (マウス肝細胞) を播種し、24 時間後にポリエチレンイミンと siRNA 100 pmol を混合させ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分インキュベートした。その後、細胞に添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間イ

ンキュベート後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR により ApoB の発現を GAPDH で定量した。

4. ブラン-siRNA コンジュゲートの導入

ブラン-siRNA コンジュゲートを Lipofectamine RNAiMAX を用いて細胞へ導入した。導入 24 時間前に NMuLi 細胞を 2.1 $\times 10^4$ cells/cm² の細胞密度で播種した。導入するブラン-siRNA は、仕込んだ siRNA を基準として 100 pmol になるように調製した。ブラン-siRNA (100 pmol) と Opti-MEM 150 μl 、Lipofectamine RNAiMAX 5 μl と Opti-MEM 143 μl を、それぞれ室温で 5 分間インキュベート後、混合し、続けて室温で 20 分間インキュベートした。その後、96 well プレートを用い、各 well に 300 μl ずつ添加し、24 時間インキュベートした。評価はリアルタイム PCR 法で行った。

C. 研究結果

1. ブラン-siRNA コンジュゲートの合成

精製後、白色の粉末を得た (Table 1)。得られたサンプルは水に易溶であった。siRNA が 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ になるように調整し水に溶解させた。85 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートし、ゆるやかに室温に戻すことで、アニーリング操作を行った。

合成したサンプルの電気泳動を行った (図 1)。電気泳動用に 19% アクリルアミドゲルを作成した。1 well に対し、siRNA が 0.6 μg になるよう調整し、反応前後のサンプル及びサイズマーカーを泳動した。サイズマーカーは 20, 30, 40, 60, 80 mer を用いた。得られた結果から、合成前と合成後に変化は見られなかった。これは、非常に希薄な濃度で反応を行ったため、縮合反応が進行しなかった、或いは、反応がわずかであるため、電気泳動で確認できなかったと考えられる。

2. ブラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

脱水縮合剤の量、ポリエチレンイミンの仕込量を変化させて合成した (Table 2)。溶媒量が少ない場合、系がゲル化した。また、活性剤及びポリエチレンイミンが多い場合、沈殿物の形成、系の白濁化が見られた。一方、希薄条件下において、水に対し

溶解性を有する複合体が得られた。

得られた結果を基に、プルランの分子量を変化させ合成を行った (Table 3)。低分子プルラン (Mw 5,900) を用いた場合、合成条件では全て水に可溶であった。また、元素分析の結果、脱水縮合剤の量が増加するに従い N の割合の増加が見られた。一方、高分子量プルラン (Mw 22,800, 107,000) を用いた場合、脱水縮合剤の量が多い条件で水に不溶であり、白濁した溶液となった。

3. ポリエチレンイミンを用いた siRNA 導入実験

予備的検討として従来のポリエチレンイミンを用いて、マウス肝細胞に siRNA を導入した。結果を図 2 に示す。C/A の増加と共に ApoB の発現は小さくなり、C/A=24 以上で、ApoB の発現が抑制された。C/A=48 において、発現は、コントロールと比較して 20% となった。また、ポリエチレンイミンのみを添加した細胞と、siRNA を導入していない細胞 (コントロール) と比較すると、発現量はほぼ同程度であった。この結果より、ポリエチレンイミンが ApoB の発現に対し、影響を及ぼさないことが解った。さらに、siRNA のみを添加した細胞でも、ApoB の発現量の低下は見られなかった。以上より、ポリエチレンイミンを用いることで、siRNA と複合体を形成し、細胞に影響を与えることなく、効果的に ApoB の発現を抑えることができることがわかった。

4. プルラン-siRNA コンジュゲートの導入

1 で合成したプルラン-siRNA コンジュゲートを用い、Lipofectamine RNAiMAX を導入試薬として使用することで、ApoB の発現抑制に関する検討を行った (図 3)。プルラン-siRNA コンジュゲート (サンプル A-F) を用いた結果、全てのサンプルにおいて ApoB の発現量は低い値を示した。得られた値は、siRNA のみを導入した場合とほぼ同程度を示した。また、導入試薬の有無により、ApoB の発現量は変化しなかった。つまり、プルランを用いることで、siRNA の効果に影響することなく、肝細胞ターゲティングを可能にすると考えられる。

D. 考察

1. 達成度について

本研究は、家族性高コレステロール血症

治療を達成するための、経口投与可能な siRNA を開発することである。本年度は、第一段階として、肝細胞ターゲティング可能な siRNA を見出すために模索検討を行った。肝細胞指標性が報告されているプルランを用い、siRNA を直接反応させ、細胞への導入実験を行った。ApoB の抑制効果に関して優れた結果が得られたが、合成・精製が非常に困難であることがわかった。引き続き、反応条件等の検討を行う。

我々の研究室では、これまで合成遺伝子キャリアーの研究に携わっており、合成から発現評価までの技術を有している。今回、それらの知見を基に、ApoB のキャリアーとして、プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートを合成した。合成条件及びプルランの分子量を変化させることで、最適なキャリアーを見出すことが可能である。更に、機能化 (消化、分解の軽減・トレーサー分子の結合) を見据え、数多くのサンプルを合成できたことは、本研究の達成に向けて大きく前進したといえる。今後、サンプルごとの ApoB の発現を検討していくと共に、キャリアーの機能化、新たなコンジュゲートの開発を行う。

本研究は、遺伝子導入ベクターの開発の世界でも、画期的なことである。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は、臨床応用を目指すものであり、我々のグループは合成キャリアーを用いるという化学的な面からアプローチを行う。プルランが siRNA の機能に対し、影響を及ぼさず、ApoB の発現量の低下が見られたことは、画期的なことである。これは、学術的な意義を持つと共に、臨床応用にむけて、大きなブレークスルーがなされたと考えられる。

3. 今後の展望について

次年度以降は、細胞への導入効果の高い新規キャリアーの開発を行うと共に、経口投与から腸管吸収まで siRNA の消化・分解を抑えるためのキャリアーの化学的修飾の検討、キャリアーごとに ApoB の発現量を測定していく。

E. 結論

本研究において、我々は、プルラン、siRNA

のコンジュゲートの開発を行った。得られたコンジュゲートは siRNA のみと同様に ApoB の発現量を抑制することができた。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Sawada, D. Terada, T. Fujisato, T. Yamaoka, and S. Kitamura. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2008; 83 (6), 943-949.
- 2) T. H. Ying, D. Ishii, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, K. Sudesh, R. Samian, M. Fujita, M. Maeda, and T. Iwata. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials*. 2008; 29, 1307-1317.
- 3) S. Kakinoki, A. Panitch, D. A. Tirrell, and T. Yamaoka. Fundamental Studies on Genetically Engineered Elastin Model Peptides for Biomaterials. *The Japanese Peptide Society*. 2008; 427-428
- 4) T. Yamaoka. Transcription efficiency in the nonviral gene transfer. *高分子*. 2008; 7
- 5) 馬原 淳, 山岡哲二. 幹細胞分離法とポピュレーション解析. In 次世代医療のための高分子材料工学. シーエムシー出版. 東京. 2008; 168-177
- 6) 山岡哲二, 橋 洋一. 細胞移植と分子イメージング. 最近の進歩. *人工臓器*. 2008; 37 (3)

2. 学会発表

- 1) 橋 洋一, 野寄久枝, 橋本朋子, 村上

章, 山岡哲二. 感温性ポリエチレンイミン誘導体を用いた遺伝子導入. 第8回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム. 大阪. 2008年5月9日

- 2) 鎌田和加子, 馬原 淳, 清野泰, 小林正和, 藤林康久, 山岡哲二. PET 追跡遺伝子を導入した細胞の in vivo イメージング. 第8回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム. 大阪. 2008年5月9日
- 3) 山岡哲二. 転写効率向上を目指したポリメリック遺伝子キャリアーの分子設計. 第57回高分子学会年次大会. 横浜. 2008年5月28日
- 4) 東 晃至, 橋 洋一, 飯田秀博, 平野義明, 山岡哲二. ソノポレーション法を用いた高分子造影剤の細胞内導入. 第57回高分子学会年次大会. 横浜. 2008年5月28日
- 5) T. Yamaoka, Y. Tachibana, J. Ennmi, and H. Iida. In Vivo Tracking of the Transplanted Cells Using a Novel Polyric Contrast Agent. 8th World Biomaterials Congress. アムステルダム (オランダ) 2008年5月31日
- 6) 東 晃至, 橋 洋一, 平野義明, 山岡哲二. 分子量の異なる高分子化MRI造影剤を用いた細胞標識と in vivo イメージング. 第57回高分子討論会. 大阪. 2008年9月25日
- 7) 山岡哲二. Novel biomaterials for cell transplantation. TERMIS-AP 2008. 台北 (台湾) 2008年11月7日
- 8) 柿木佐知朗, 平工香織, 山岡哲二. ラミニニンの生理活性配列を付与した構造タンパク質の合成と評価. バイオマテリアル学会シンポジウム 2008. 東京. 2008年11月18日
- 9) 鎌田和加子, 馬原 淳, 清野 泰, 小林正和, 藤林康久, 山岡哲二. 移植細胞の in vivo PET イメージングシステムにおける感度の向上. 第8回日本再生医療学会総会. 東京. 2009年3月6日

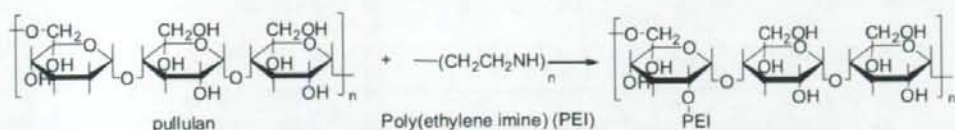
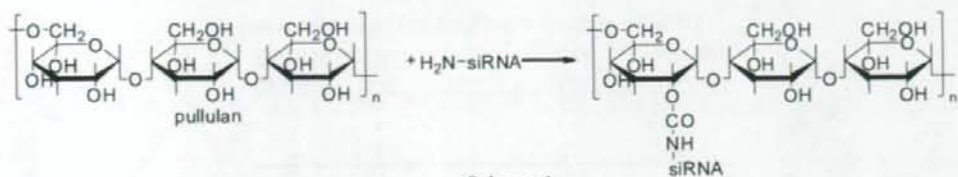


Table 1. Synthesis of pullulan and si-RNA conjugates

	pullulan (μmol , unit)	CDI (μmol)	siRNA (nmol)	DMSO (μl)	DEPC (μl)
A	1.083	0.0542 (5%)	3.25 (0.3%)	60	440
B	1.083	0.542 (50%)	3.25 (0.3%)	60	440
C	0.1083	0.0542 (50%)	3.25 (3%)	60	440
D	0.01083	0.00542 (50%)	3.25 (3%)	60	440
E	0.01083	0.00542 (50%)	3.25 (3%)	50	0
F	0.01083	0.00542 (50%)	3.25 (3%)	0	50

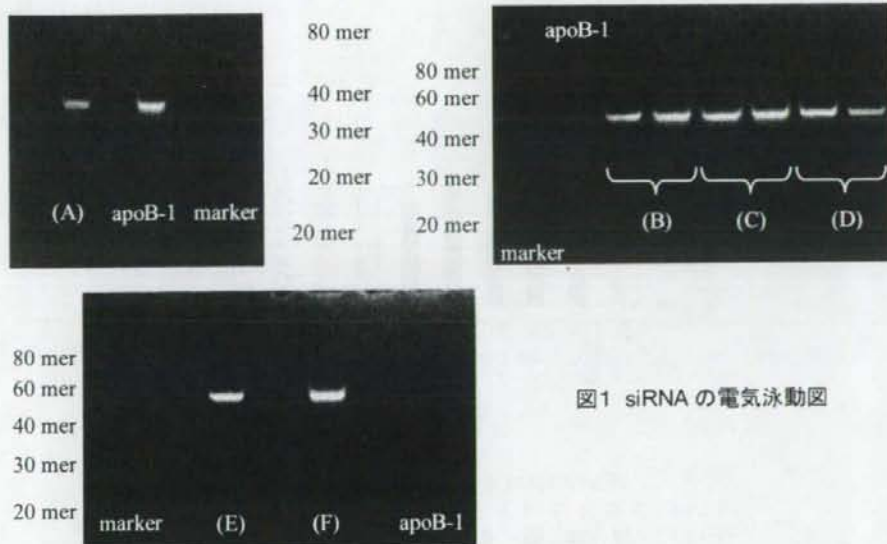


図1 siRNAの電気泳動図

Table 2. Synthesis of pullulan and PEI conjugates

Pullulan (mmol, unit)	CDI (mmol)	PEI (mmol, unit)	DMSO (ml)	Solubility to water
0.1	0.1	1	1	×
0.1	0.2	1	1	×
0.1	0.3	1	1	×
0.1	0.01	0.1	10	○
0.1	0.01	0.3	10	×
0.1	0.01	0.5	10	×
0.1	0.01	1	10	×
0.1	0.05	0.1	10	○
0.1	0.05	0.3	10	○
0.1	0.05	0.5	10	×
0.1	0.05	1	10	×
0.1	0.1	0.1	10	○
0.1	0.1	0.3	10	○
0.1	0.1	0.5	10	○
0.1	0.1	1	10	×

Table 3. Synthesis of pullulan and PEI conjugates

Mw (pullulan)	Pullulan (mmol, unit)	CDI (mmol)	PEI (mmol, unit)	DMSO (ml)	Solubility to water	Ratio of CHN (wt%)
5,900	0.3	0.15	0.3	30	○	40.6 : 6.2 : 3.9
	0.3	0.3	0.3	30	○	40.7 : 6.0 : 4.8
	0.3	0.6	0.3	30	○	39.4 : 5.6 : 7.0
	0.3	0.9	0.3	30	○	37.8 : 5.5 : 8.0
22,800	0.3	0.15	0.3	30	○	41.4 : 6.2 : 3.9
	0.3	0.3	0.3	30	○	41.9 : 6.2 : 3.4
	0.3	0.6	0.3	30	×	41.9 : 5.8 : 3.6
	0.3	0.9	0.3	30	×	39.2 : 5.6 : 9.1
107,000	0.3	0.15	0.3	30	○	41.7 : 6.4 : 3.6
	0.3	0.3	0.3	30	○	41.0 : 5.8 : 3.4
	0.3	0.6	0.3	30	×	40.8 : 5.8 : 3.3
	0.3	0.9	0.3	30	×	41.0 : 5.9 : 2.9

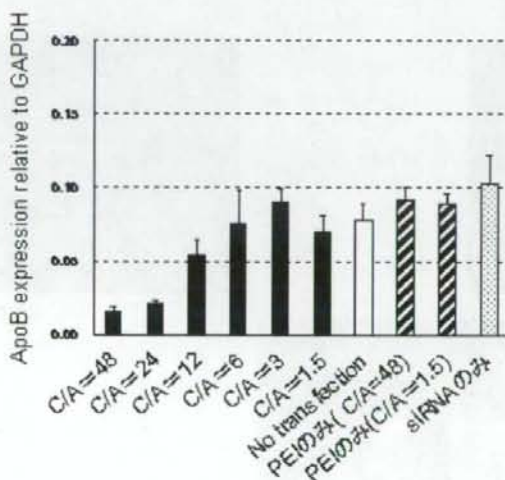


図2 PEI/siRNA複合体によるApoB発現定量
PEI/siRNA複合体導入24時間後のApoB発現量。
PEI/siRNA複合体(■)、未導入(□)、PEIのみ添加(▨)、
siRNAのみ添加(▩)。

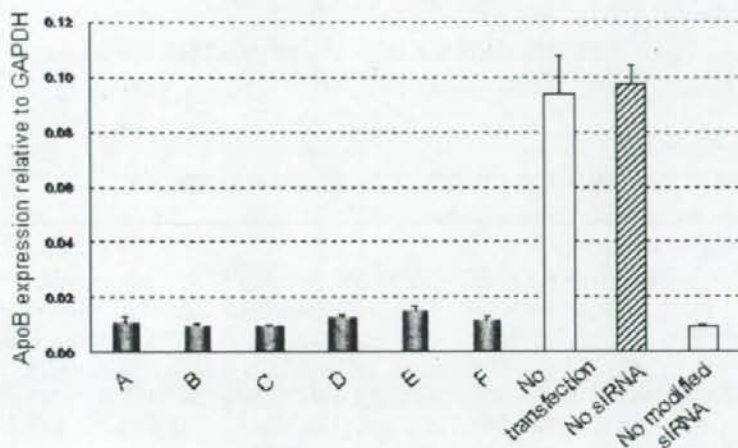


図3 pullulan - siRNAによるApoB発現定量
 合成したpullulan - siRNAを導入24時間後のApoB発現量。pullulan - siRNA
 (■)、未導入 (□)、Lipofectamin RNAiMAXのみ (◐)、未修飾siRNA (◑)。

機能性 siRNA イメージングの基礎研究

分担研究者 飯田秀博 国立循環器病センター研究所・部長

研究要旨

「機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に対する新しい治療法の開発」のプロジェクトを成功させるには、siRNA の体内動態の制御が一番重要である。そのために、我々は放射性同位元素によるラベリングの基礎を構築した。すなわち、 ^{125}I による標識法を確立して、siRNA のラベリングに応用させる技術である。Na ^{125}I の酸化には過酸化水素-乳酸脱水素酵素を用いて、高分子のチロシン残基に ^{125}I を導入する方法である。

研究協力者

斯波真理子 国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部
鈴木 朗 国立循環器病センター研究所
所バイオサイエンス部
山岡 哲二 国立循環器病センター研究所
生体工学部
三宅 義徳 国立循環器病センター放射線
部

輸送するキャリアーが必要である。キャリアーを用いて、投与した siRNA の体内動態を制御する過程を評価するためには、siRNA のイメージングが是非とも必要である。我々は、siRNA を放射性同位元素でラベルするために、まず、 ^{125}I を用いて高分子のラベル法を開発した。

A. 研究目的

siRNA は、細胞に導入された二本鎖 RNA が、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現(タンパク質合成)を抑制する現象のことであり、標的遺伝子(mRNA)を破壊することで発現を抑制する為、遺伝子の機能解析に有効な方法として現在注目されている。siRNA は、配列のわかっている遺伝子を破壊することができる為、遺伝子機能の解析に有効である。siRNA は細胞への導入後、マルチ・タンパク質複合体と結合し、RISC(RNA-induced silencing complex)を形成する。この siRNA-タンパク質複合体が、siRNA と相同性を持つ mRNA に結合し、RISCヌクレアーゼ活性により siRNA-mRNA の結合部位が切断される為、標的遺伝子の発現が抑制される。

siRNA の効果を in vivo で得るためには、siRNA をターゲットの組織まで

B. 研究方法

Na ^{125}I を用いて、ペプチドの標識を行なった。Na ^{125}I の酸化には過酸化水素-乳酸脱水素酵素を用い、ペプチドのチロシン残基に ^{125}I を標識した。

C. 研究成果

^{125}I 標識の方法を図 1 に示す。チロシン残基に ^{125}I による標識がなされた。得られた ^{125}I -ペプチドの放射化学的純度は 96.8%、比放射能は 1006 TBq/mmol 以上であった。 ^{125}I -ペプチドの標識後、HPLC を用いて精製した。

D. 考案

放射性同位元素により、放射化学的純度、比放射能ともに充分に高い標識が得られたと考えられる。得られた画像については、論文発表の予定であり、報告書に記載することは出来ないが、ペプチドの受容体が多量存在する臓器に集積を認めており、siRNA の標識

ない、画像が得られる予定である。

E. 結論

修飾化 siRNA の体内動態を調べるための放射性同位元素による標識法の基礎ができた。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1.論文発表

原著論文

1. Iida H, Eberl S, Kim KM, Tamura Y, Ono Y, Nakazawa M, Sohlberg A, Zeniya T, Hayashi T, Watabe H. Absolute quantitation of myocardial blood flow with ^{201}Tl and dynamic SPECT in canine: optimisation and validation of kinetic modelling. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:896-905, 2008
2. Kudomi N, Slimani L, Jarvisalo M, Kiss J, Lautamaki R, Naum G, Savunen T, Knuuti J, Iida H, Nuutila P, Iozzo P. Non-invasive estimation of hepatic blood perfusion from H_2^{15}O PET images using tissue-derived arterial and portal input functions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:1899-911, 2008
2. Kudomi N, Slimani L, Jarvisalo M, Kiss J, Lautamaki R, Naum G, Savunen T, Knuuti J, Iida H, Nuutila P, Iozzo P. Non-invasive estimation of hepatic blood perfusion from H_2^{15}O PET images using tissue-derived arterial and portal input functions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35:1899-911, 2008
4. Shidahara M, Watabe H, Kim K, Kudomi N, Ito H, Iida H. Optimal scan time of

oxygen-15-labeled gas inhalation autoradiographic method for measurement of cerebral oxygen extraction fraction and cerebral oxygen metabolic rate. *Ann Nucl Med*. 22:667-75, 2008

5. Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Three-dimensional SPECT reconstruction with transmission-dependent scatter correction. *Ann Nucl Med*. 22:549-56, 2008
6. Sohlberg A, Watabe H, Iida H. Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for cardiac SPECT. *Phys Med Biol*. 53:277-85, 2008

7. Yamamoto A, Sato H, Enmi J, Ishida K, Ose T, Kimura A, Fujiwara H, Watabe H, Hayashi T, Iida H. Use of clinical MRI scanner for pre-clinical research on rats. *Radiological Physics and Technology*. 2008
8. Yokoyama I, Inoue Y, Kinoshita T, Itoh H, Kanno I, Iida H. Heart and Brain Circulation and CO_2 in Healthy Men. *Acta Physiol (Oxf)*. 193:303-8, 2008
9. Zeniya T, Watabe H, Kudo H, Hirano Y, Minato K, Iida H. Clinical usability of a compact high resolution detector for high resolution and quantitative SPECT imaging in a selected small ROI. *EEE 2008 Nuclear Science Symposium Conference Record*. 4257-59, 2008

10. 越野 一博, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 福田 肇, 樋掛 正明, 渡部 浩司, 飯田 秀博, 心筋

PET 検査の有用性. 臨床画像. 24:157-64,

2008

13. 林 拓也, 武信 洋平, 久富 信之, 渡部 浩

11. 越野 一博, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 福田 肇, 司, 寺本 昇, 佐藤 博司, 越野 一博, 岩西 樋掛 正明, 渡部 浩司, 飯田 秀博, 心筋 雄大, 永沼 雅基, 森脇 博, 横田 千晶, 成 PET 検査の有用性. 臨床画像. 24:157-64, 富 博章, 蜂松 一夫, 飯田 秀博. 神経画像 2008

法を用いた虚血性脳疾患の前臨床・臨床試験

と病態把握. 循環器病研究の進歩. 48:79-86,

12. 銭谷 勉, 渡部 浩司, 飯田 秀博. SPECT 2008

イメージング. 遺伝子医学MOOK9号「分

子イメージング技術」. 75-81, 2008

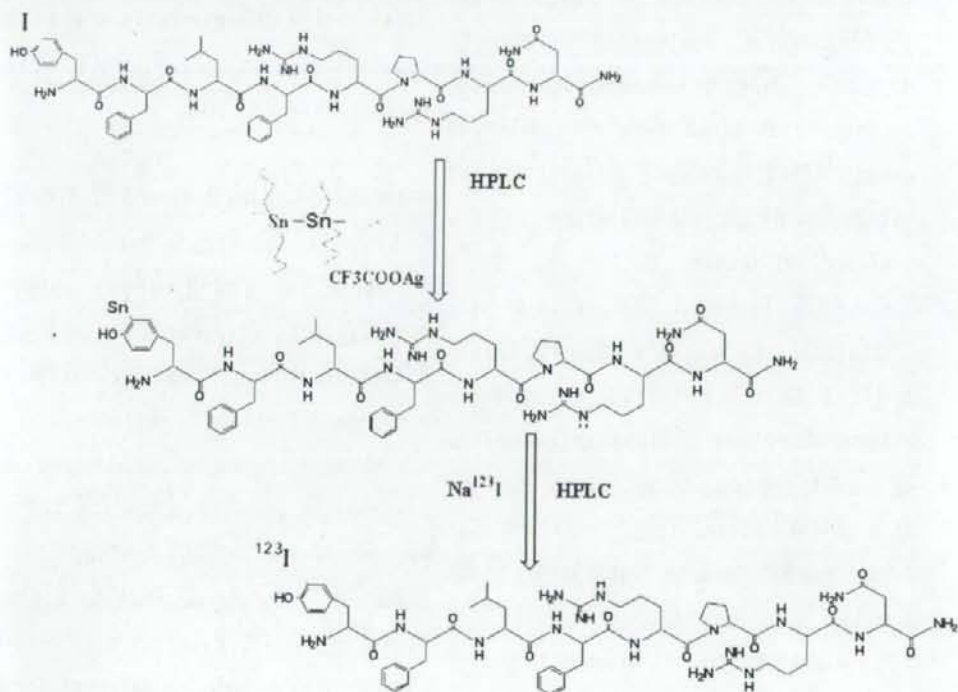


図1. ^{123}I 標識方法

機能性 siRNA 経口投与による家族性高コレステロール血症に対する新しい治療薬の開発

創薬ターゲットとしての mPGES

分担研究者 笹栗 俊之 九州大学大学院 医学研究院 臨床薬理学分野 教授

研究要旨 マクロファージに発現している誘導型プロスタグランジン E 合成酵素 microsomal-prostaglandin E synthase (mPGES) が、粥状硬化巣の炎症を抑制して粥腫を安定化させる新たな創薬ターゲット分子となりうるかどうかを検討した。ヒト骨髄性白血病細胞株 THP-1 をリポ多糖 (LPS) で刺激すると、mPGES の発現が誘導され、PGE₂ の産生が増加した。mPGES に対する特異的な siRNA を細胞に導入したところ、LPS による mPGES 発現誘導および PGE₂ 産生増加は抑制された。これにより、mPGES は、粥腫安定化のための創薬標的分子となる可能性が示唆された。現時点では、臨床使用が可能な特異的 mPGES 阻害薬はないが、我々は、siRNA 以外に、細胞性粘菌由来分化誘導因子 differentiation-inducing factor (DIF) が、炎症性刺激による mPGES の誘導を強力に抑制することを見出した。臨床応用も視野に入れ、そのメカニズムの検討を現在行っている。

A. 研究目的

血管壁の炎症は、粥状硬化巣の病変形成において、中心的な役割を果たすと考えられている。なかでも、マクロファージの活性化は粥腫を不安定化し、粥腫の破裂や血栓の形成を誘導することにより、急性冠症候群の発症に寄与すると考えられている。

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は炎症反応の重要なメディエーターであり、マクロファージは炎症性反応の一つとして PGE₂ を産生する。PGE₂ の産生酵素としては、microsomal-prostaglandin E synthase (mPGES) と cytosolic-prostaglandin E synthase (cPGES) の 2 種類が知られている。このうち mPGES は炎症性刺激によりその発現が上昇し、炎症の進展に関与することが示唆されており、創薬のターゲットになる可能性がある。

そこで我々は、炎症性刺激に対するマクロファージの反応過程における mPGES 発現と PGE₂ 産生への関与について、ヒト骨髄性白血病細胞株 U937 および THP-1 を用いて検

討した。さらに、細胞性粘菌由来分化誘導因子 differentiation-inducing factor (DIF) の新規抗炎症薬としての可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

U937 および THP-1 の培養には 10% ウシ胎仔血清を加えた RPMI1640 培地を用いた。両細胞株ともに、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100nM) にて分化誘導した後、リポ多糖 (LPS) および DIF-1 を用いて刺激した。

2. siRNA 導入

THP-1 に mPGES 特異的 siRNA (Invitrogen) を RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。24 時間培養したのちに、PMA による分化誘導を行った。

3. ウェスタンブロット

刺激した細胞を回収し、SDS-PAGE にてタ

ンパク質を分離した。タンパク質を転写したメンブレンを一次抗体 (COX-2、mPGES、GAPDH) と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

4. PGE₂濃度測定

培養上清に含まれる PGE₂ の濃度は、Prostaglandin E₂ Expression EIA Kit (Cayman Chemical) にて測定した。

C. 研究結果

1. COX-2 および mPGES の発現

THP-1 と U937 を LPS により刺激し、COX-2 および mPGES の発現をウェスタンブロットで検討した。THP-1 では、COX-2 の弱い発現上昇と mPGES の強い発現上昇が認められた。一方、U937 では COX-2 の発現上昇が認められたが、mPGES には変化が認められなかった (図 1)。

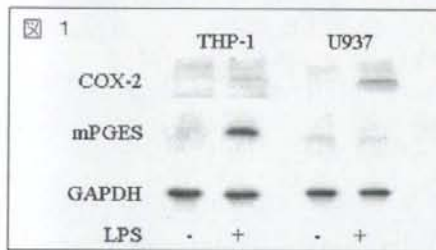


図 1 LPS による COX-2 と mPGES の発現

2. mPGES に対する siRNA の効果

THP-1 に mPGES に対する siRNA を導入した後、PMA で分化誘導を行い、LPS で刺激した。図 2 に示すように、用いた 2 種類の siRNA (#1、#2) は両方とも、LPS による mPGES の発現誘導を抑制した。

また、培養上清に含まれる PGE₂ の濃度を測定したところ、LPS により明らかな PGE₂ の産生上昇が認められたが、siRNA を導入した細胞では、PGE₂ の産生が有意に抑えられた (図 3)。

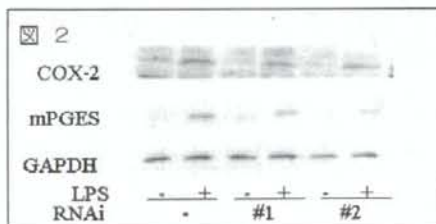
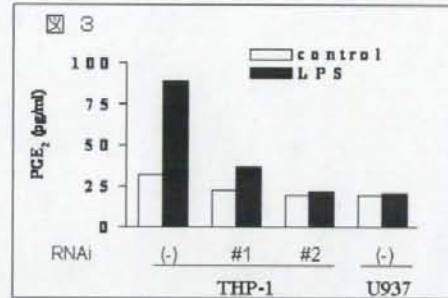


図 2

図 2 mPGES 発現に対する siRNA の効果

図 3 PGE₂ 産生に対する siRNA の効果

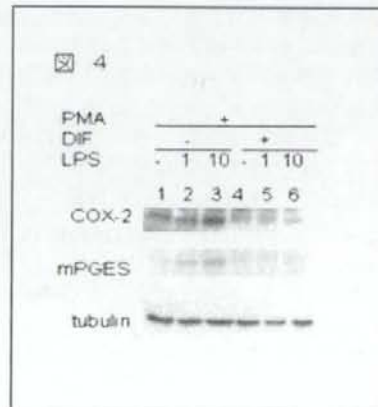
3. mPGES に対する DIF-1 の効果



DIF は細胞性粘菌が産生する分化誘導因子であるが、哺乳類細胞においても種々の作用を発揮することが報告されている。我々は、DIF-1 がウシ大動脈内皮細胞において LPS による COX-2 の誘導を阻害するという知見を得ていたので、THP-1 を用いて LPS による COX-2 および mPGES の発現に及ぼす影響について検討した。

図 4 に示すように、DIF-1 は LPS による COX-2 および mPGES の発現上昇を明らかに抑制していた。

図 4 DIF-1 による炎症反応の抑制



D. 考察

粥腫の炎症を抑制する治療標的分子を探

索する目的で、マクロファージの活性化と炎症反応のメディエーターである PGE₂ の産生系に着目して検討を行った。

既存の抗炎症薬である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を抑制することにより下流の PGE₂ の産生を抑制するが、NSAIDs は COX-1 をも抑制するため、生理機能の維持に必要なエイコサノイドの産生も低下させてしまう。この問題を解決するため、炎症時に誘導される COX-2 に特異的な阻害薬 (セレコキシブなど) が開発され、すでに臨床使用されているが、これらの薬剤は、プロスタサイクリンの産生減少によると思われる心血管イベントの増加を引き起こすことが報告され、その使用が制限されている。

そこで、炎症を増悪させる PGE₂ の産生を特異的に抑制する方法を開発するため、炎症性刺激下における直接的な PGE₂ 産生酵素である mPGES の抑制を試みた。

ヒト骨髄性白血病細胞株 THP-1 を PMA で処置することにより、マクロファージ様細胞に分化させ、これに炎症性刺激を加えると、mPGES タンパク質の誘導、および PGE₂ 産生上昇が認められたが、mPGES 特異的な siRNA を細胞にあらかじめ導入しておくことにより、これらの炎症反応を抑えることができた。

さらに、細胞性粘菌が産生する分化誘導因子 DIF-1 が、炎症性刺激により誘導される mPGES ならびに COX-2 の発現を抑制した。この結果は、DIF が抗炎症作用を有する可能性を示すものである。

E. 結論

mPGES が有望な抗炎症薬の創薬ターゲットであり、DIF が抗炎症薬として機能する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文

1) Tanaka, R., Miwa, Y., Mou, K.,

Tomikawa, M., Eguchi, N., Urade, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Wake, N., & Sasaguri, T. (2009)

Knockout of the L-PGDS gene induces obesity and atherosclerosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (4), 851-856

2) Miwa, Y., Oda, H., Shiina, Y., Shikata, K., Tsushima, M., Nakano, S., Maruyama, T., Kyotani, S., Eguchi, N., Urade, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2008) Association of serum lipocalin-type prostaglandin D synthase levels with subclinical atherosclerosis in untreated asymptomatic subjects. *Hypertens. Res.* 31 (10), 1931-1939

3) Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Jingushi, K., Miwa, Y., Morimoto, S., Hirata, M., & Sasaguri, T. (2008) Celecoxib-induced degradation of T-cell factors-1 and -4 in human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (4), 1185-1190

4) Ohmine, T., Miwa, Y., Yao, H., Yuzuriha, T., Takashima, Y., Uchino, A., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Maehara, Y., & Sasaguri, T. (2008) Association between arterial stiffness and cerebral white matter lesions in community-dwelling elderly subjects. *Hypertens. Res.* 31 (1), 75-81

5) Han, Z., Miwa, Y., Obikane, H., Mitumata, M., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2008) Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 77 (4), 809-818

2. 学会発表

1) 三輪宜一, 白石富美恵, 高橋富美,
笹栗俊之, β_1 アドレナリン受容体遺伝
子多型のアテノロール感受性への影響の
検討. 第29回日本臨床薬理学会年会(12
月4~6日, 東京)

2) 吉原達也, 高橋富美, 笹栗俊之,
Differentiation-inducing factor-1に
よる血管新生制御作用の検討. 第29回
日本臨床薬理学会年会(12月4~6日, 東
京)

3) 高橋富美, 吉原達也, 笹栗俊之, マ
ウスを用いた Differentiation-
inducing factor-1 の体内動態および抗
腫瘍作用の検討. 第29回日本臨床薬理
学会年会(12月4~6日, 東京)

4) 三輪宜一, 大田祐子, 土橋卓也, 富
永光裕, 河野雄平, 笹栗俊之, 上野道雄,
松岡博昭, レニン-アンジオテンシン系
阻害薬投与下でのシルニジピンの蛋白尿
減少効果—24時間家庭蓄尿での検討—.
第31回日本高血圧学会総会(10月9~11
日, 札幌)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mariko Harada-Shiba, Itaru Takamisawa, Kanjiro Miyata, Takehiko Ishii, Nobuhiro Nishiyama, Keiji Itaka, Kenji Kangawa, Fumiki Yoshihara, Yujiro Asada, Kinta Hatakeyama, Noriya Nagaya, zunori Kataoka	Intratracheal Gene T Transfer of Adrenome dullin Using Polyplex Nanomicelles Attenu ates Monocrotaline- induced Pulmonary Hypertension in Rats	Molecular Therapy in press			2009
Shizuya Yamashita, Hideaki Bujo, Hidenori Arai, Mariko Harada-Shiba, Shigeyuki Matsui, Masanori Fukushima, Yasushi Saito, Toru Kita, Yuji Matsuzawa	Long-Term Probuco l Treatment Prevents Secondary Cardiovas cular Events:a cohort Study of Patients with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia in Japan	Jurnal of Atherosc lerosis and Throm bosis	Vol.15, No.6	292-303	2008
Sachiro Kakinoki, Alyssa Panitch, David A. Tirrell, Tetsuji Yamaoka	Fundamental Studies on Genetically Engine ered Elastin Model Pe ptides for Biomaterials	Peptide Science		427-428	2007
馬原 淳 山岡 哲二	幹細胞分離法とポピュ レーション解析	次世代医療のための 高分子材料工学		168-177	2008
山岡 哲二 橋 洋一	細胞移植と分子イメー ジング	人工臓器	37巻	179-181	2008
Hidehiro Iida, Stefan Ebeki, Kyeong-Min Kim, Yoshikazu Tamura, Yukihiko Ono, Mayumi Nakazawa, Antti Sohlberg, Tsutomu Zeniya, Takuya Hayashi, Hiroshi Watabe	Absolute quantitation of myocardial blood flow with ²⁰¹ Tl and dynamic SPECT in ca nine:optimisation and validation of kinetic modelling	Springer-Verlag			2007
A Sohlberg, H Watabe, H Iida	Acceleration of Monte Carlo-based scatter compensation for Car diac SPECT	Phys.Med.Biol	53	277-285	2008
N.Kudomi, L. Slimani, M.Järvisalo, J.Kiss, R.Lautamäki, G.A.Naum, T.Savunen, J.Knuuti, H Iida,	Non-invasive estimati on of hepatic blood perfusion from H ₂ ¹⁵ O PET images using tissue-derived arterial and portal input functi ons	Eur J Nucl Med Mol Imaging	35	1899-1911	2008

P.Nuutila, P.Iozzo					
Yoshikazu Miwa, Hiroshi Oda, Yasuhiko Shiina, Kentaro Shikata, Motoo Tsushima, Satomi Nakano, Taro Maruyama, Singo Kyotani, Naomi Eguchi, Yoshihiro Urade, Fumi Takahashi-Yana ga, Sachio Morimoto, Toshiyuki Sasaguri	Association of Serum Lipocalin-Type Prosta glandin D Synthase Levels with Subclinical Atherosclerosis in Unt reated Asympomatic Subjects	Hypertens Res	31	1931-1939	2008
Fumi Takahashi-Yana ga, Tatsuya Yoshihara, Kentaro Jingushi, Yoshikazu Miwa, Sachio Morimoto, Masato Hirata, Toshiyuki Sasaguri	Celecoxib-induced degradation of T-cell factors-1 and 4 in hu man colon cancer cells	Biochemical and Biophysical Reser ch Communications	377	1185-1190	2008
Zhiyi Han, Yoshikazu Miwa, Hiyo Obikane, Masako Mitsumata, Fumi Takahashi-Yana ga, Sachio Morimoto, Toshiyuki Sasaguri	Aryl hydrocarbon recep tor mediates laminar fluid shear stress-indu ced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells	cardiovascular Res each	77	809-818	2008
Takahiro Ohmine, Yoshikazu Miwa, Hiroshi Yao, Takefumi Yuzuriha, Yuki Takashima, Akira Uchino, Fumi Takahashi-Yana ga, Sachio Morimoto, Yoshihiko Maehara, Toshiyuki Sasaguri	Association between Arterial Stiffness and Cerebral White Matter Lesions in Community- Dwelling Elderly Subjec ts	Hypertens Res	31	75-81	2008
Reiko Tanaka, Yoshikazu Miwa, Kin Mou, Morimasa Tomikawa, Naomi Eguchi, Yoshihiro Urade, Fumi Takahashi-Yana ga, Sachio Morimoto, Norio Wake, Toshiyuki Sasaguri	Knockout of the l-pgds gene aggravates obesity and atheroscle rosis in mice	Biochemical and Biophysical Reser ch Communications	378	851-856	2009