

17. Bujo H, Yamashita S, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Decrease in HDL-cholesterol levels by purobucol treatment is not associated with cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolemia, 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口
18. Hirano K, Zang B, Yamaguchi S, Ikegami C, Nagasaka H, Miida T, Sasaguri Y, Okazaki M, Harada-Shiba M, Saku K, Tochino Y, Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by in situ perfusion technique, 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口
19. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, Yoshimasa Y, Yokoyama S, Tomoike H, Non HDL-cholesterol as a risk factor for CAD in heterozygous familial hypercholesterolemia(FH), 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口
20. 鈴木朗、宮田完二郎、位高啓二、西山伸宏、宮田浩子、井上麻衣、柴田映子、山口知是、石井武彦、片岡一則、斯波真理子「嚢胞性線維症に対する経肺遺伝子治療法の開発」遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日～11日 大阪
21. 渡部和人、斯波真理子、鈴木朗、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、御供田理沙、栗原亮介、菅尾祐輔、森健、片山佳樹、新留琢郎「肝疾患治療に向けたリジンデンドリマーによるオリゴ核酸デリバリー 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日～11日 大阪
22. 山崎毅、大石基、田村磨聖、斯波真理子、菊池明彦、長崎幸夫「高いHDL/LDL比を示す高機能型胆汁酸吸着剤としての4級化ナノゲルの創製」平成21年度繊維学会年次大会 ポスター発表 2009年6月10日～12日 東京
23. 山崎 毅、大石 基、田村磨聖、斯波真理子、菊池明彦、長崎幸夫「経口投与型胆汁酸吸着剤の設計—高いHDL/LDL比を示す4級化ナノゲルの設計と評価」第58回高分子学会年次大会ポスター発表会 2009年5月27日～29日 神戸
24. 杉沢貴子、斯波真理子、槇野久士、宮本恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友池仁暢「スタチンは家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体における冠動脈疾患(CAD)の発症年齢を遅らせたか？」第106回日本内科学会 ポスター発表 2009年4月10日 東京
25. 杉沢貴子、斯波真理子、槇野久士、宮本恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友池仁暢「家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体におけるLDL-C及びアキレス腱肥厚(ATT)による冠動脈疾患(CAD)高リスク患者の抽出」第106回日本内科学会 ポスター発表 2009年

4月10日 東京

国際学会

1. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H, Impact of statins on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia,

2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月

Boston, USA

2. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H, Identifying very high risk patients of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia from clinical features,

2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月

Boston, USA

3. Yamazaki T, Tamura M, Oishi M, Harada-Shiba M, Kikuchi A, Nagasaki Y, Enhanced serum cholesterol reduction in vivo by PEGylated nanogels containing quaternary polyamine core as a bile acid adsorbent, 3rd International Symposium on Atomic Technology / 3rd Polyscale Technology Workshop 2009年3月 東京

4. Arai H, Yamashita S, Bujyo H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M,

Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Long-term probucol treatment prevents cardiovascular events in coronary artery disease patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, International Symposium on Atherosclerosis 2009年6月 Boston, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

出願人：国立大学法人大阪大学、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：小比賀聡、斯波真理子、和田俊輔

出願日：平成22年2月1日

出願番号：特願2010-20720

発明の名称：脂質異常症治療薬剤としての化学修飾 siRNA

研究協力者

大阪大学大学院薬学系研究科

小比賀 聡

国立循環器病センター研究所

バイオサイエンス部

和田 俊輔

山本 剛史

鈴木 朗

柴田 栄子

宮田 浩子

井上 麻衣

合田 睦美

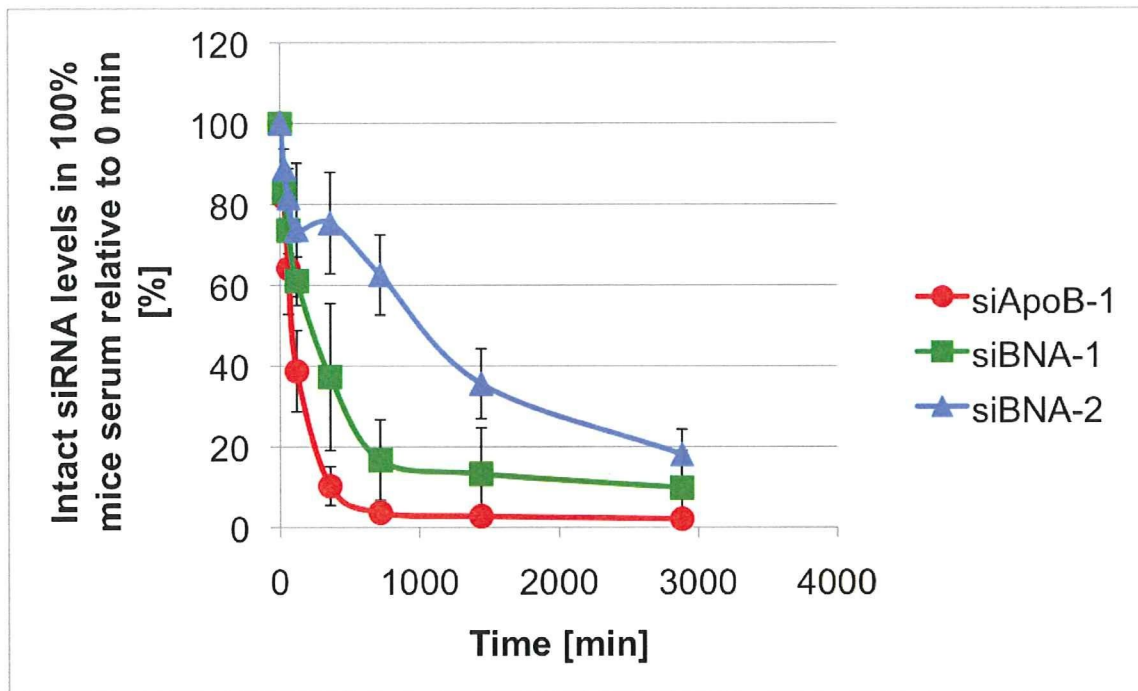


図 1 ApoB siRNA (siApoB-1)、BNA 化した siRNA (siBNA-1、siBNA-2) の血清耐性試験

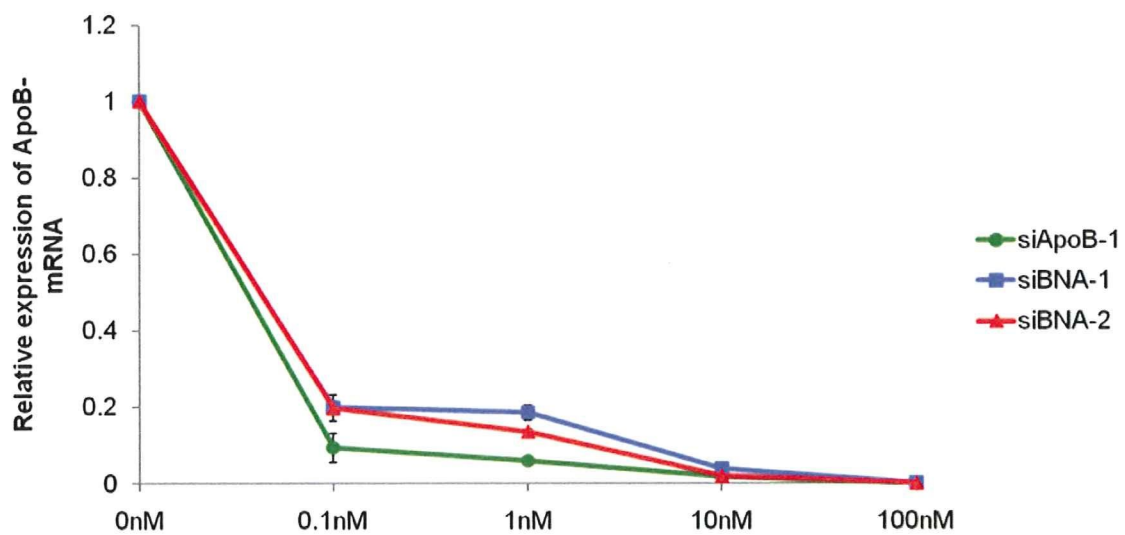


図 2 ApoB siRNA (siApoB-1)、BNA 化した siRNA (siBNA-1、siBNA-2) の in vitro トランスフェクションによる遺伝子発現抑制効果

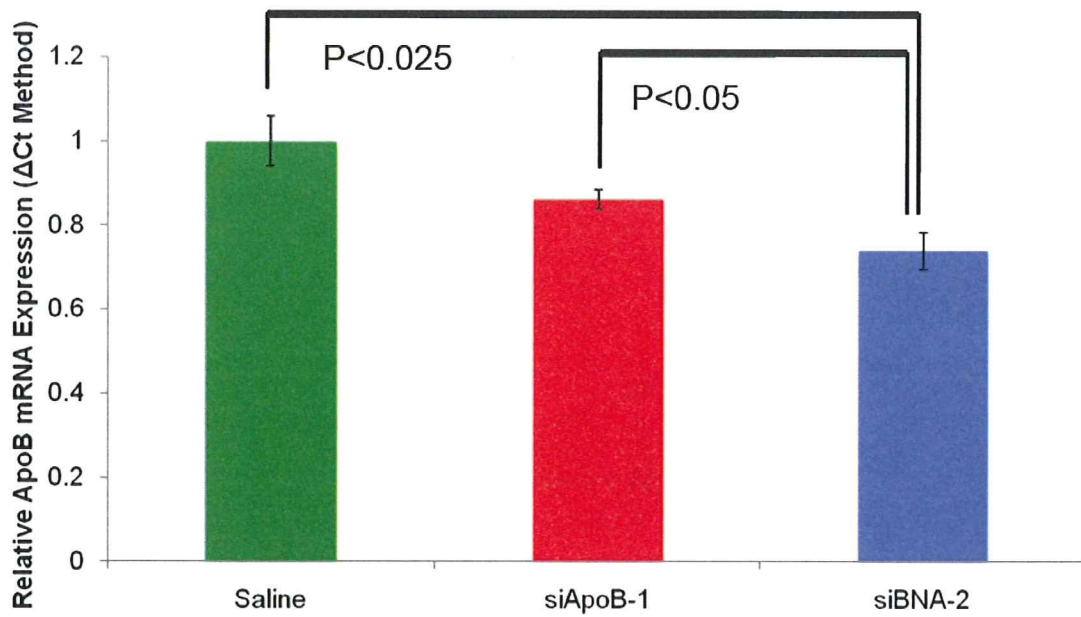


図3. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による肝臓での遺伝子発現抑制効果

: Total Cholesterol Assay

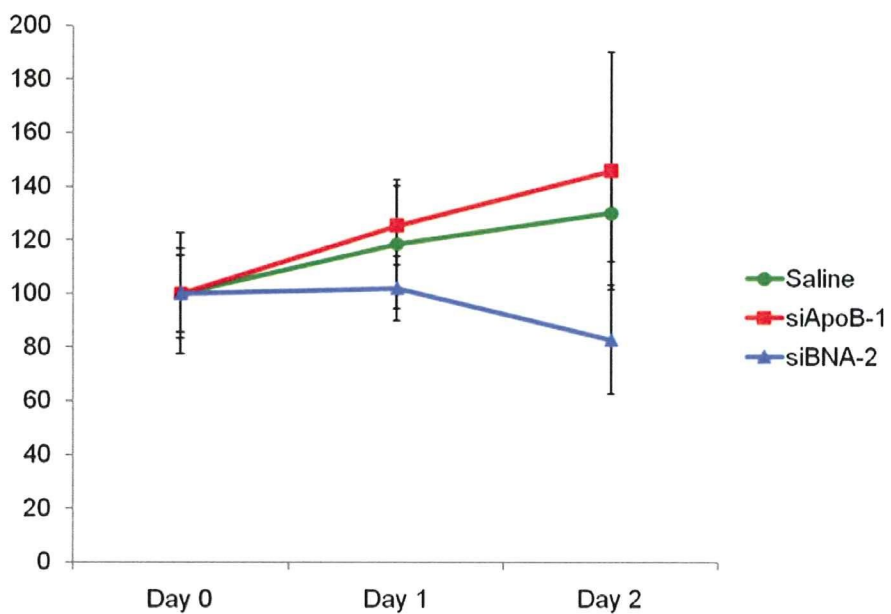


図4. ApoB siRNA(siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中総コレステロール値の変化

VLDL Cholesterol Level of Mice Serum

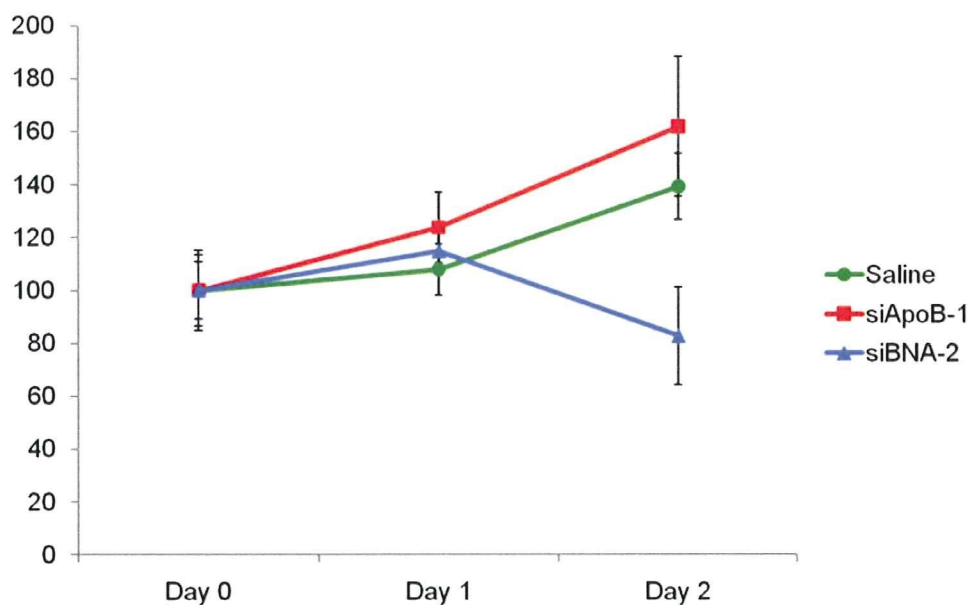


図5. ApoB siRNA (siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中VLDL-コレステロール値の変化

LDL Cholesterol Level of Mice Serum

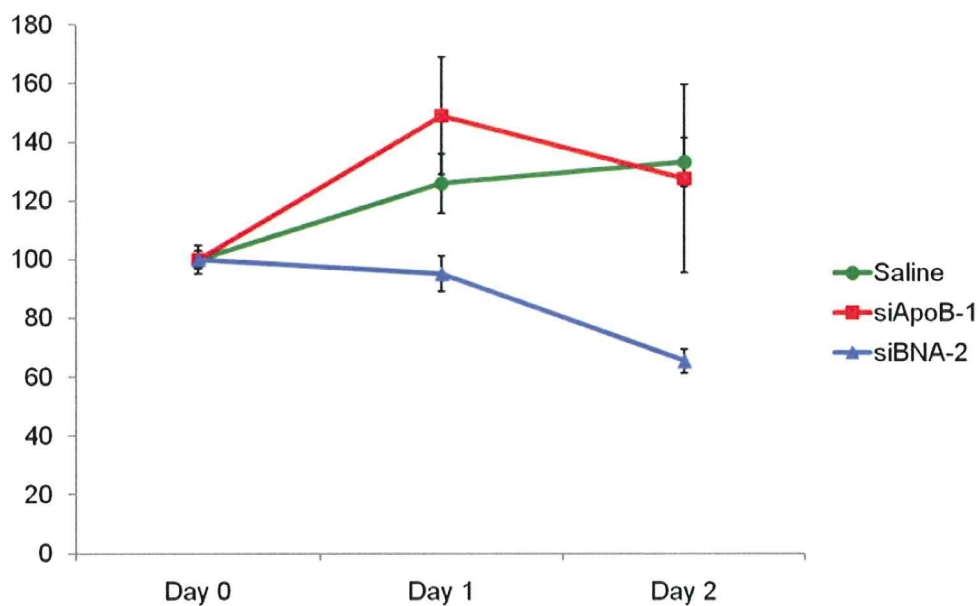


図6. ApoB siRNA (siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中LDL-コレステロール値の変化

HDL Cholesterol Level of Mice Serum

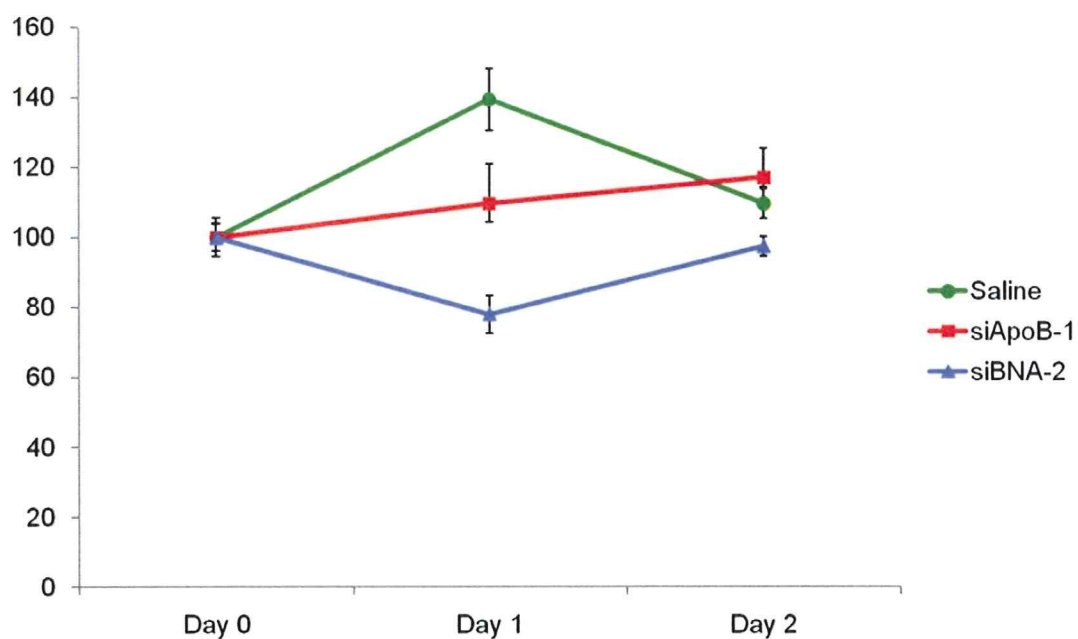


図6. ApoB siRNA (siApoB-1)、siBNA-2の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中HDL-コレステロール値の変化

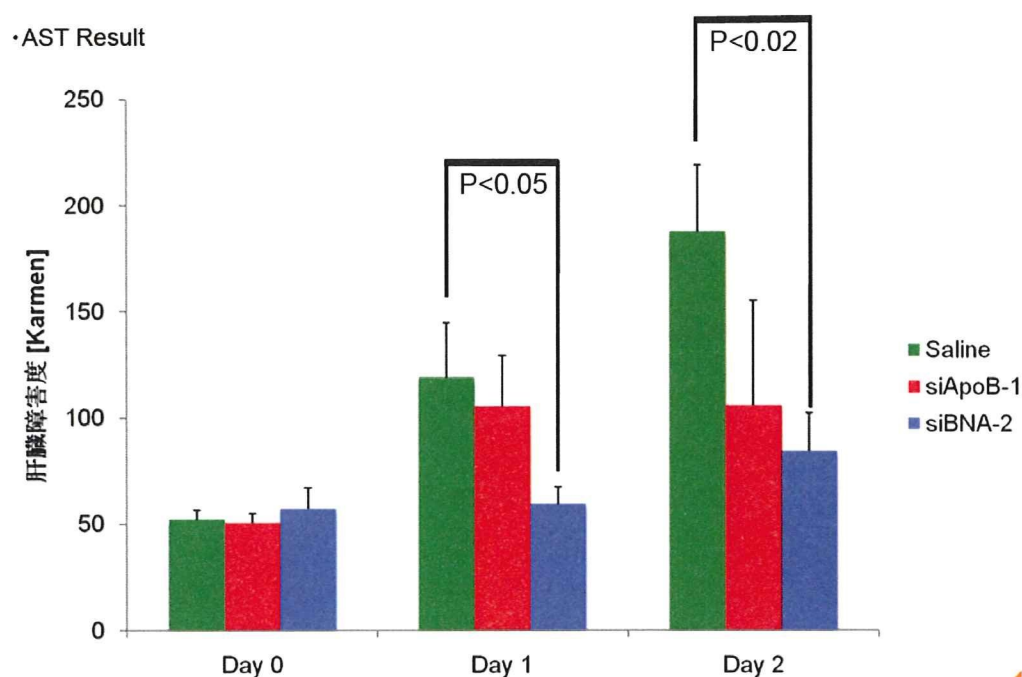


図 6. ApoB siRNA (siApoB-1)、siBNA-2 の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中AST値の変化

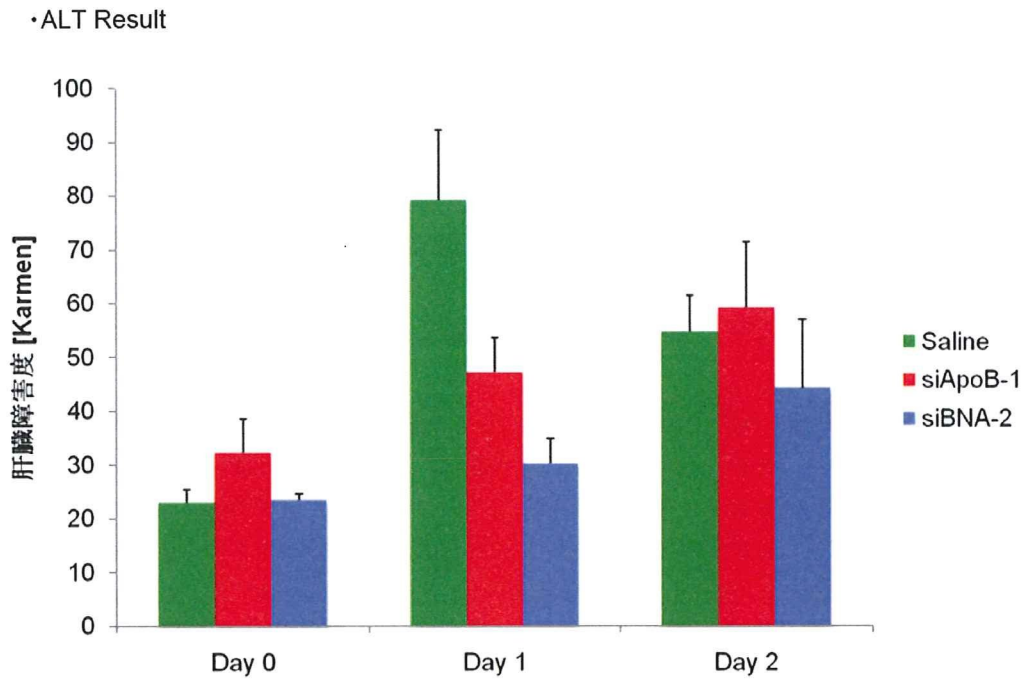


図 7. ApoB siRNA (siApoB-1)、siBNA-2 の高脂肪食負荷マウス静脈内投与による血液中 ALT 値の変化

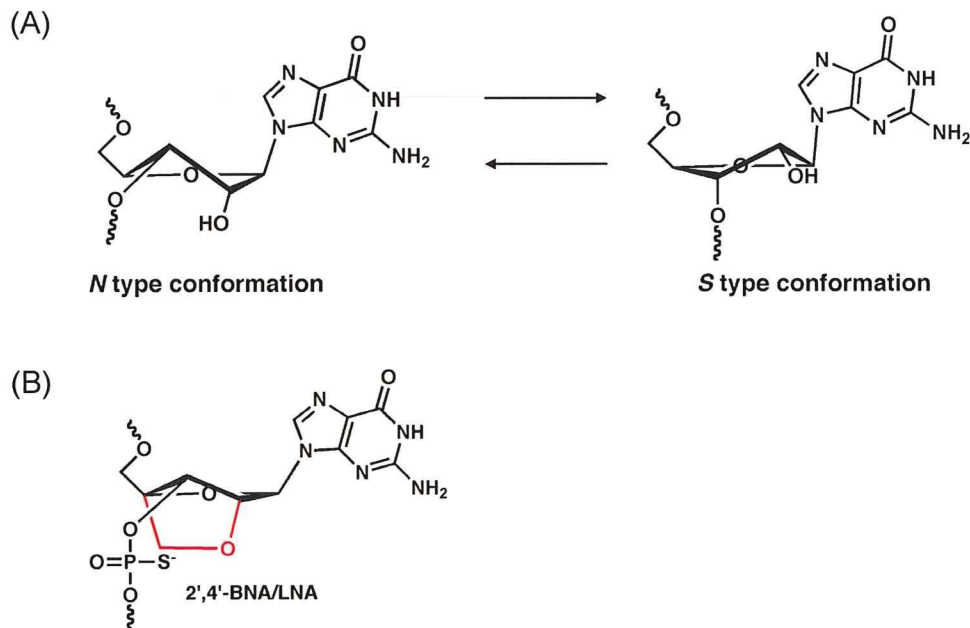


図 8. 核酸の構造 (A) N タイプと S タイプの核酸の構造。(B) Bridged Nucleic Acid (BNA) の構造。

家族性高コレステロール血症を克服するための 機能性 siRNA の開発

分担研究者 山岡 哲二 国立循環器病センター研究所 部長

研究要旨 本研究は、家族性高コレステロール血症に対する新規薬剤の開発を行う。機能化 siRNA を用いて経口投与による腸管での吸収を可能にし、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。これまでに、肝指向性を有する siRNA とキャリアーの合成を完了している。具体的には、siRNA を直接修飾した Pullulan-siRNA、および、pullulan 修飾 Polyethylenimine (PEI) (Pullulan-PEI) の合成を行ってきた。本年度は、*in vitro* において、(1) Pullulan-siRNA 効果、(2) Pullulan-PEI を用いた siRNA 効果、および、(3) 細胞毒性を、また *in vivo* において、(4) Pullulan-PEI/siRNA 複合体の尾静脈投与による治療実験を進めた。その結果、*in vivo* において、単回、または、複数回投与後の肝臓における ApoB mRNA 量を有意に低下させた。別に、本キャリアーの肝臓指向性が示されており、siRNA の肝臓ターゲティングによる治療効果と考えられる。

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、siRNA を用いた研究が様々行われてきた。近年では、siRNA の合成・設計という基礎的な研究だけでなくへ向けた試みも多い。しかし、siRNA を臨床化するためには、目的部位へのターゲティング・途中経路における分解の抑制等が必要となり多くの困難を伴う。それらの問題点を解決するためには、siRNA の化学的修飾が一つの戦略である。

本来、細胞内への遺伝子の導入は、細胞膜によるブロックのために容易ではない。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。しかし、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とされている。しかし、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（ポリエチレンイミンなど）が

着目されてきた。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、③トレーサー分子の結合部位を確保する④目的部位に於いて速やかに siRNA をリリースさせる。一段階目として、肝細胞指向性を有する 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プルランを用い、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、有用であると知られているポリエチレンイミンをプ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、プルラン-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。

B. 研究方法

1. Pullulan-siRNA コンジュゲートの導入実験

これまでに、Pullulan-siRNA (Table 1.) を Lipofectamine RNAiMAX を用いて NMuLi 細胞 (マウス肝細胞) へ導入してきた。本年度は、Pullulan-siRNA のみの導入を行った。導入する Pullulan-siRNA は、仕込んだ siRNA を基準に調製した。NMuLi 細胞を、導入 24 時間前に 2.1×10^4 cells/cm² 播種し、100 pmol、または、500 pmol の Pullulan-siRNA を各 well に添加後、さらに 24 時間インキュベートした。24 時間後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて評価した。

2. Pullulan-PEI 中和滴定

実験には、分子量 22,000 の PEI を用いた。さらに、分子量 5,900、および、107,000 の pullulan を用いて合成したポリマー (Pullulan₅₉₀₀-PEI、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI) を用いた。PEI、Pullulan₅₉₀₀-PEI、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI は、それぞれ mg、4.7 mg、4.8 mg 秤量し、150 mM の NaCl 8.0 ml で溶解した。0.1 M の NaOH を、PEI には 2.1 ml、Pullulan₅₉₀₀-PEI には 1.1 ml、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI には 1.5 ml 添加し、pH≒12 にした。その後、pH≒2 に達するまで 0.1 M の HCl を少量ずつ添加し、中和点を算出した。なお、pH≒2 に達するまで添加した HCl の総量は、PEI は 3.81 ml、Pullulan₅₉₀₀-PEI は 1.63 ml、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI は 1.825 ml である。

3. Pullulan-PEI を用いた siRNA 導入実験

3-1. 複合体形成

中和滴定より算出したポリマー中のカチオン量から、Pullulan-PEI 5 μl と siRNA 4 μl (200 pmol) を混合し、37 °C で 30 分インキュベートすることで、任意の C/A 比で複合体を形成させた。ポリアクリルアミドゲルを用い、100 V、60 分間電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により複合体の形成を評価した。

3-2. ApoB mRNA 発現定量

Pullulan-PEI による siRNA のデリバリーについて、*in vitro* で検討した。Pullulan-PEI/siRNA 複合体を添加する 24 時間前に 2.1×10^4 cells/cm² の NMuLi 細胞を播種した。その後、前述した方法と同様に、C/A=1.5 - 48 の条件下で Pullulan-PEI/siRNA 複合体を形成させ、10 倍希釈した後、細胞へ添加し、さらに 37 °C でインキュベートした。24 時間後、QuickGene RNA cultured cell ket S (富士フィルム製) を用いて RNA を抽出し、リアルタイム PCR により ApoB の発現を GAPDH で定量を行った。

3-3. 細胞毒性

毒性試験は、Pullulan-PEI/siRNA 複合体添加 24 時間後、WST-1 を用いて評価した。 2.1×10^4 cells/cm² の NMuLi 細胞を播種し、24 時間インキュベートした後、Pullulan-PEI/siRNA 複合体を加え、さらに 24 時間培養した。その後、WST-1 を添加し、30 分後にマイクロプレートリーダーで測定した。

3-4. *in vivo* 血中投与による治療効果

Pullulan₅₉₀₀-PEI、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI を用いて、*in vivo* における siRNA のデリバリーを検討した。実験にあたり、6 週齢の雄のマウス (C57BL/6 J) に高脂肪食を 2 週間摂取させた、高コレステロール血症モデルマウスを作成した。実験の開始直前に、3 回絶食を経験 (食餌摂取 8 時間、絶食 16 時間) させたマウスを用い、1 回あたり 3 μg (196 pmol) の siRNA を尾静脈投与した。複合体の形成は、前述と同様、Pullulan₅₉₀₀-PEI と siRNA を混合し、37 °C で 30 分インキュベートした。その後、RNase-free の PBS にて 150 μl にメスアップし、マウス尾静脈より単回投与した。なお、投与直前を 0 時間とし、24 時間ごとに 96 時間後まで採血した。さらに、実験終了時に肝臓を摘出し、肝臓での ApoB の発現量をリアルタイム PCR により定量した。

同様に、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI と siRNA を混合し、37 °C で 30 分インキュベートすることで複合体を形成させ、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI/siRNA 複合体 150 μl をマウス尾静脈より投与した。48 時間後、同量の Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI/siRNA 複合体をさらに投与

し、1回目の投与より120時間後に肝臓を摘出した。

(倫理面への配慮)

封じ込めなどの安全性には施設の基準に沿って十分に注意した。動物実験についても施設における動物実験指針に従い、動物愛護の精神を持って実施した。

C. 研究結果

1. Pullulan-siRNA コンジュゲートの導入実験

これまでに、Lipofectamine RNAiMAXを用いて Pullulan-siRNA を NMuLi 細胞へ導入した結果、Pullulan-siRNA を導入した細胞の ApoB の発現量は、未修飾の siRNA を導入した場合と同程度を示し、Pullulan-siRNA は ApoB の発現を著しく抑制していることが示された (Fig. 1)。次に、Pullulan-siRNA のみの導入を行った。仕込んだ siRNA を基準に 100 pmol、または、500 pmol に調製した Pullulan-siRNA を NMuLi 細胞へ導入した結果、すべてのサンプルにおいて、未処理の細胞と同程度の発現量を示した (Fig. 2)。

2. Pullulan-PEI 中和滴定

ポリマー中のカチオン量は、中和滴定により算出した (Fig. 3)。以後の実験は、C/A=192、96、48、24、12、6、3、1.5、0.75、0.375 の条件下で行った。

3. Pullulan-PEI を用いた siRNA 導入実験

3-1. 複合体形成

Pullulan-PEI と siRNA の複合体形成能について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により評価した。その結果、PEI では、C/A=1.5 で複合体を一部形成し、C/A=6 以上では、完全に複合体を形成していた。Pullulan₅₉₀₀-PEI では、C/A=96 以上で完全に、C/A=48 では一部形成し、C/A=24 以下では複合体を形成していないことが示された。一方、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI では、C/A=192 のみ完全に、C/A=96 では一部複合体を形成し、C/A=48 以下では複合体を形成していないことがわかった (Fig. 4)。

3-2. ApoB mRNA 発現定量

Pullulan-PEI による siRNA のデリバリーについて、NMuLi 細胞を用いて、*in vitro* で検討した。その結果、PEI、および、Pullulan₅₉₀₀-PEI どちらのキャリアーを用いた場合でも、C/A 比の増加とともに ApoB mRNA の発現量の低下が見られた。最終的に C/A=48 において約 0.7 程度まで減少した (Fig. 5)。

3-3. 細胞毒性

キャリアー中のカチオンによる細胞障害について、PEI/siRNA、または、Pullulan-PEI/siRNA 複合体を細胞へ添加し、24 時間後に WST-1 を用いて評価した。PEI では、C/A 比の増加に伴い、細胞毒性がみられ、C/A=24 以上で細胞生存率が 50% であった。一方、Pullulan₅₉₀₀-PEI では、C/A 比の増加に伴う毒性は見られなかった (Fig. 6)。

3-4. *in vivo* 血中投与による治療効果

Pullulan-PEI による siRNA *in vivo* デリバリーを検討した。Pullulan₅₉₀₀-PEI を用いて siRNA を単回投与した結果、PBS 投与群と Pullulan₅₉₀₀-PEI/siRNA 群と比較すると、48 時間後では肝臓における ApoB mRNA の発現量の変化は見られなかった。しかし、96 時間後では、Pullulan₅₉₀₀-PEI 投与群で、約 15% 低下しており、*in vivo* における有意性が示された (Fig. 7)。

さらに、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI を用いて 2 回投与した結果、C/A=192、96 投与群で、PBS 投与群と比較して、有意な減少がみられた。特に、C/A=96 投与群では、40% 以上の低下を示した (Fig. 8)。

D. 考察

遺伝子導入試薬を用いて Pullulan-siRNA コンジュゲートを細胞へ導入した結果、未修飾の siRNA を導入した場合と ApoB の発現量に変化はなかったことから、siRNA の効果に影響することがなかった。そこで、pullulan を用いることで siRNA の機能を損なうことなく、肝細胞ターゲティングを可能にすると考えられる。しかし、異なる濃度の Pullulan-siRNA のみを導入した結果から、pullulan 修飾のみでは、細胞への導入が困難であることが示唆された。そこで、カチオン

性ポリマーに pullulan が結合した肝指向性 Pullulan-PEI をキャリアーとして選択した。in vitro において、Pullulan-PEI による siRNA のデリバリーについて検討した結果、PEI、および、Pullulan₅₉₀₀-PEI 共に C/A 比の増加とともに ApoB mRNA の発現抑制が見られたことから、高い C/A 比においてキャリアーとして有用であることを示している。

また、PEI では、C/A=24 以上で細胞生存率が 50%であったが、Pullulan₅₉₀₀-PEI では、C/A 比の増加に伴う毒性は見られなかったことから、合成した Pullulan-PEI は、細胞への障害を抑え、効率よく肝細胞へ siRNA を送達できることが示唆される。

in vivo において、Pullulan₅₉₀₀-PEI を用いて単回投与、あるいは、Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI を用いて複数回投与、いずれの場合も、PBS 投与群と比較して有意な差がみられた。このことから、in vivo においても、Pullulan-PEI をキャリアーとした siRNA のデリバリーが有効であることが示唆された。

今後、pullulan の分子量の効果について検討するとともに、より効果の高いキャリアーの探索を開始する予定である。

E. 結論

Pullulan-PEI を用いることで、in vivo において、コントロール群と有意な差があることから、pullulan-PEI をキャリアーとした siRNA のデリバリーが可能であることが示された。

(参考文献)

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

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 A. Miskon, T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. Beating behavior of primary neonatal cardiomyocytes and

cardiac-differentiated P19CL6 cells on different extramatrix components. Journal of Artificial Organs. 12, 111-117 (2009)

② D. Ishii, T. Hui Ying, A. Mahara, S. Murakami, T. Yamaoka, W. Lee, and T. Iwata. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. Biomacromolecules. 10 (2), 237-242 (2009)

③ T. Hashimoto, Y. Tachibana, H. Nozaki, O. Mazda, T. Niidome, A. Murakami, and T. Yamaoka. Intracellular Enzyme-responsive Fragmentation of Nonviral Gene Carriers Leads to Polyplex Destabilization and Enhanced Transgene Expression. Chemistry Letter. 38 (7), 718-719 (2009)

④ T. Hashimoto, R. Iwase, A. Murakami, and T. Yamaoka. Self-assemblies of enzymatically degradable amphiphilic oligopeptides as nonviral gene carrier. Polymer Degradation and Stability. 94 (9), 1349-1353 (2009)

⑤ A. Mahara and T. Yamaoka. Antibody-immobilized column for quick cell separation based on cell rolling. Biotechnology Progress. in press

⑥ A. Miskon, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka. A suspension induction for myocardial differentiation of rat mesenchymal stem cells on various ECM proteins. Tissue Engineering, in press

(総説等)

山岡哲二. 第 2 章 先端科学技術と DDS 開発

① 「医用工学と DDS」PHARM TECH JAPAN, 25 (13), 15-18 (2009)

2. 学会発表

① 鎌田和加子、橘 洋一、姜 貞勲、斯波真理子、山岡哲二. 高コレステロール血症治療を目指した siRNA デリバリー. 遺伝子デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム. 大阪. 2009 年 7 月 11 日

3. その他
研究協力者

② 鎌田和加子、橘 洋一、宮田 浩子、斯波真理子、小比賀 聡、山岡 哲二. 高コレステロール血症治療を目的とした糖修飾カチオン性キャリアによる siRNA デリバリー. 第 55 回 高分子研究発表会. 神戸. 2009 年 7 月 17 日

③ Wakako Kamata, Yoichi Tachibana, Jeong-Hun Kang, Hiroko Miyata, Mariko Shiba, Satoshi Obika, Tetsuji Yamaoka. Hepatocyte-specific siRNA delivery for treating familial hypercholesterolemia. Joint Symposium of the 5th Annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense symposium. Fukuoka. 2009 年 11 月 3-6 日

④ Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Jeong-hun Kang, Mariko Shiba, Tetsuji Yamaoka. Development of siRNA carrier for liver targeting. Joint Symposium of the 5th Annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense symposium. Fukuoka. 2009 年 11 月 3-6 日

⑤ Jeong-Hun Kang, Yoichi Tachibana, Wakako Kamata, Mariko Harada-Shiba, Tetsuji Yamaoka. Efficient delivery of short interfering RNA into liver tissue. Joint Symposium of the 5th Annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense symposium. Fukuoka. 2009 年 11 月 3-6 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

Table 1. Synthesis of Pullulan-siRNA conjugates.

sample	pullulan (μmol , unit)	CDI, WSC (μmol)	siRNA (nmol)	DMSO (μl)	water (μl)
A	1.083	0.0542	3.25	60	440
B	1.083	0.542	3.25	60	440
C	0.1083	0.0542	3.25	60	440
D	0.01083	0.00542	3.25	60	440
E	0.01083	0.00542	3.25	50	0
F	0.01083	0.00542	3.25	0	50

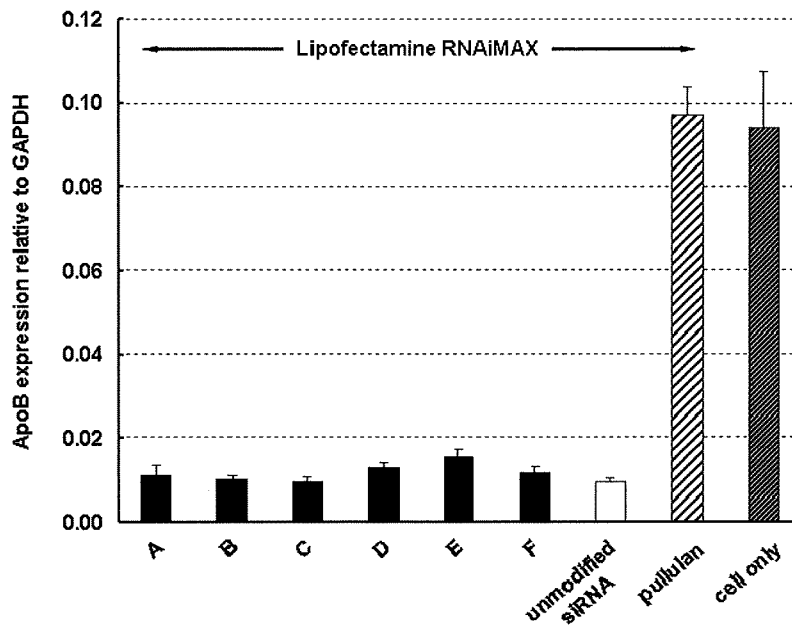


Figure 1. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with 50 nM Pullulan-siRNA using Lipofectamine RNAiMAX at for 24hours. Pullulan-siRNA (■), unmodified siRNA (□), pullulan (▨), no transfection (▩).

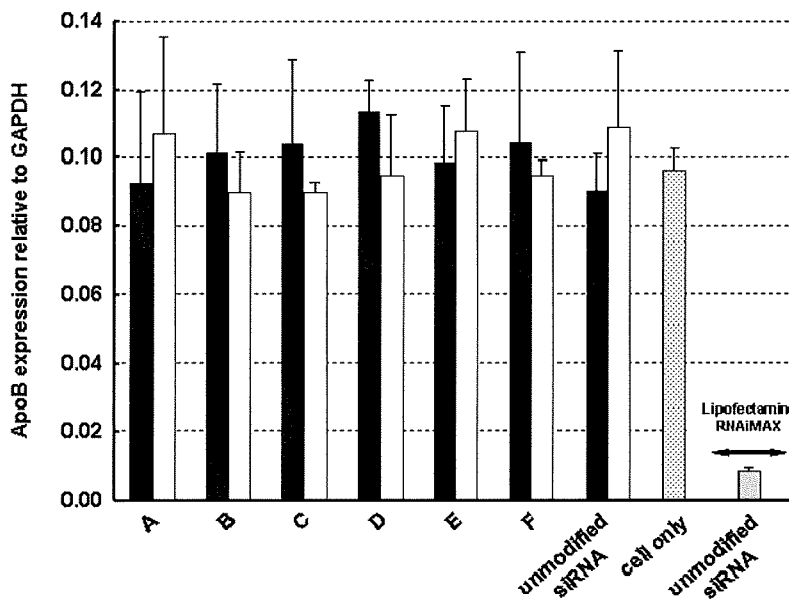


Figure 2. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with 50 nM or 250 nM Pullulan-siRNA without Lipofectamine RNAiMAX. siRNA 50 nM (■), 250 nM (□), 50 nM unmodified siRNA was transfected using Lipofectamine RNAiMAX (▨).

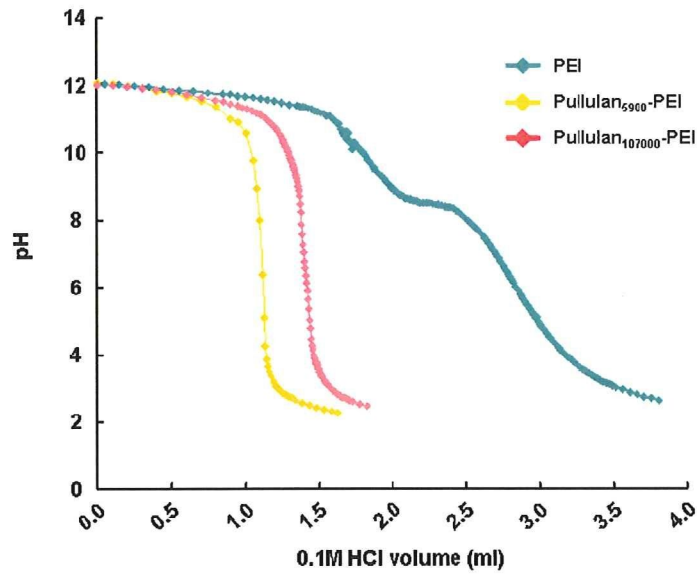


Figure 3. Titration curve of PEI and Pullulan-PEI. A solution of polymer in 150 mM NaCl was titrated with 0.1 M HCl.

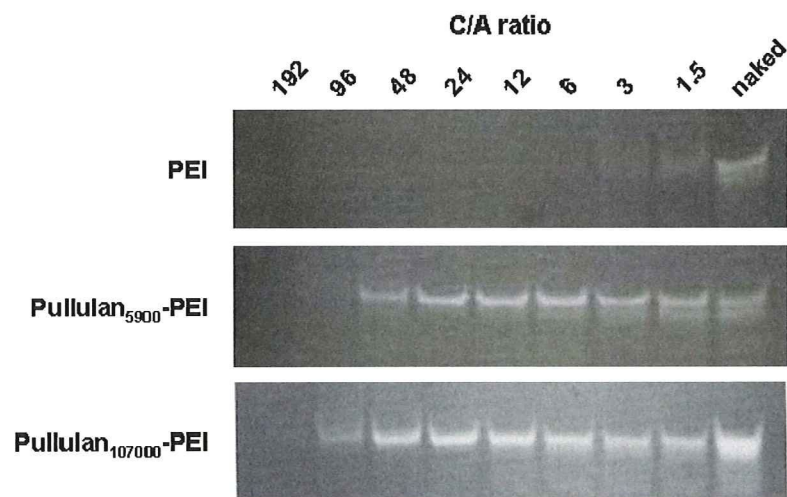


Figure 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of polymer/siRNA complexes at various C/A ratios. Polymer/siRNA complexes containing 20 pmol of siRNA were loaded on the 19 % native polyacrylamide gel. The complexes were electrophoresed at 150 V for 60 min. The gel was illuminated on a UV illuminator to identify the formation of polymer/siRNA complexes after adding 0.1 % ethidium bromide.

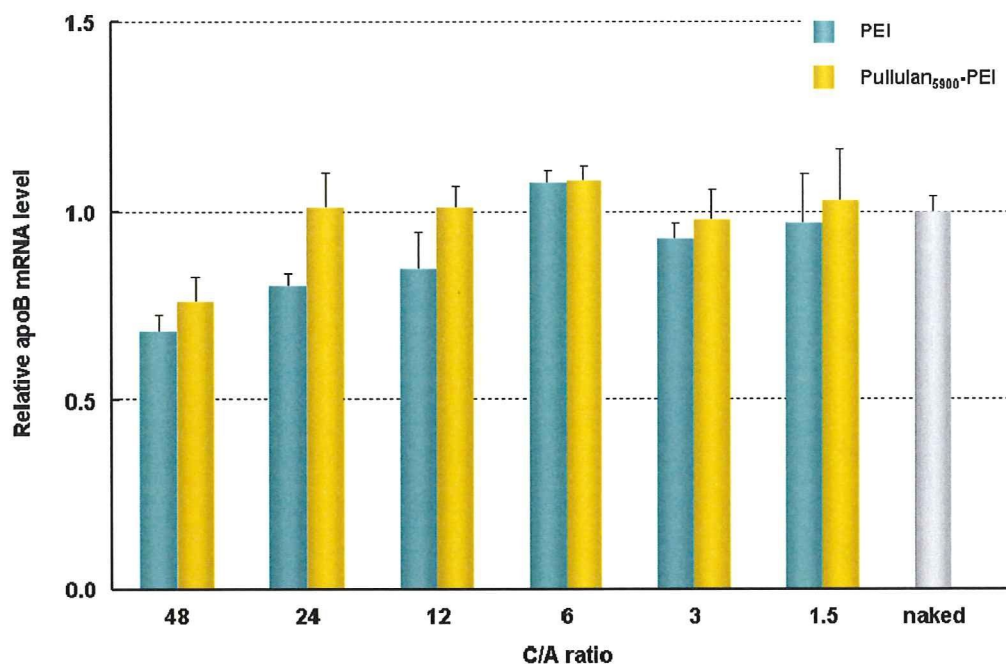


Figure 5. Delivery of siRNA to NMuLi cells at various C/A ratios. NMuLi cells were seeded into 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well. The final siRNA concentration added into culture medium was 10 nM. Expression of apoB messenger RNA (mRNA) was measured at 24 h after the transfection by the realtime PCR

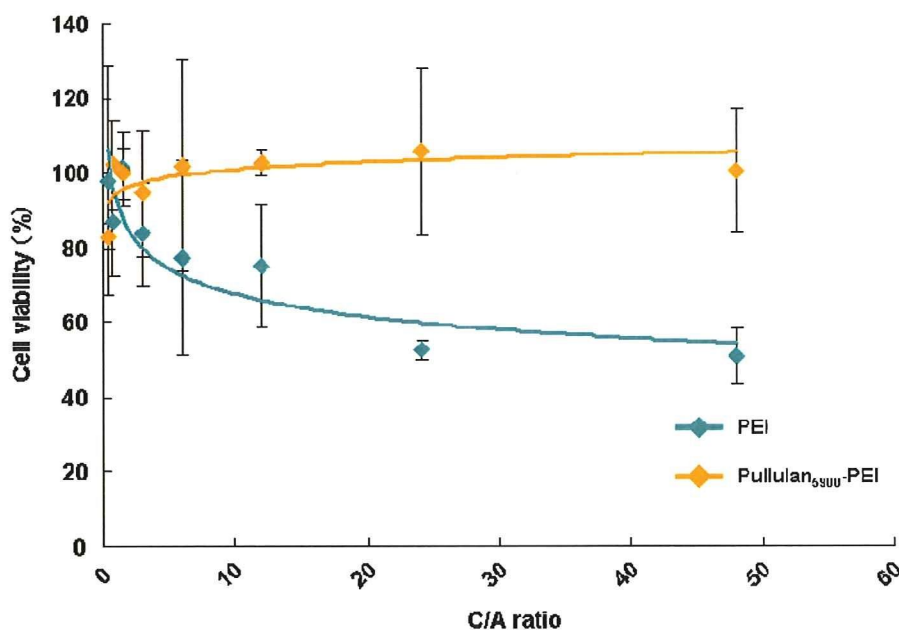


Figure 6. Cytotoxicity of polymer/siRNA complexes at several C/A ratios. NMuLi cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well. At 24 h after adding polymer/siRNA, cell viability was detected after adding polymer/siRNA by WST-1. A 10 μ L WST-1 was added to each well, and cells were incubate for 40 min at 37 °C. The absorbance of the solution was measured using a plate reader at 450 nm with background correction at 650 nm.

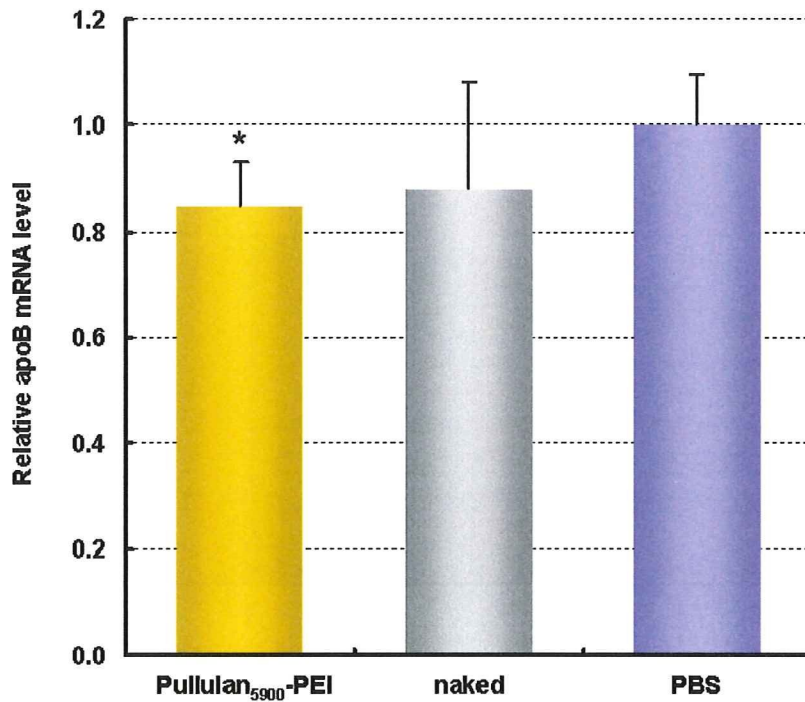


Figure 7. Silencing of apoB mRNA in liver after single i.v. injection. Pullulan₅₉₀₀-PEI /siRNA (3 μ g) complex (C/A=48) was injected to C57BL/6 mice fed a high fat diet for 2 weeks via tail vein. The liver was removed at 96 h after the injection and apoB mRNA were assayed using the realtime PCR. ApoB mRNA were measured relatively of GAPDH mRNA ($n = 3$). Data are shown as mean values \pm SD. * $P < 0.01$, compared with PBS group.

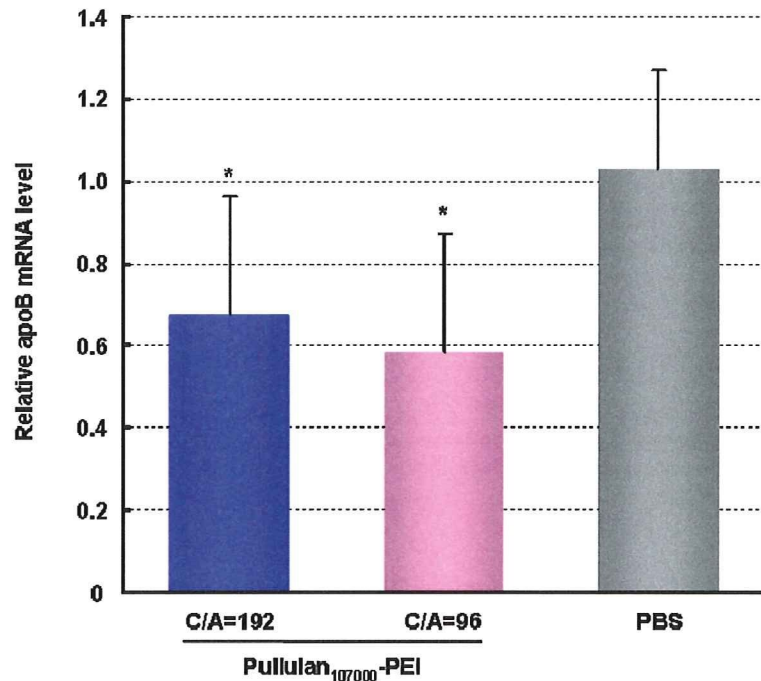


Figure 8. Silencing of apoB mRNA in liver after twice i.v. injection. Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI /siRNA (3 μ g) complex was injected to C57BL/6 mice fed a high fat diet for 2 weeks via tail vein. The liver was removed at 120 h after the first injection and apoB mRNA were assayed using the realtime PCR. ApoB mRNA were measured relatively to GAPDH mRNA ($n = 5$ per polymer/siRNA, $n = 3$ per PBS group). Data are shown as mean values \pm SD. * $P < 0.01$, compared with PBS group.

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

— siRNA のプルラン修飾キャリアーによる肝臓ターゲティングおよびイメージング —

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

本研究の目的は、家族性高コレステロール血症治療のための肝特異的遺伝子制御システムを開発することであり、本年度は、肝臓に ApoB siRNA を選択的かつ効率的に送達するキャリアー（ポリマー）を開発し、肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価を行った。肝臓選択的送達は、肝臓指向能を有するプルランを導入することで実現した。プルランの導入による毒性の軽減や ApoB siRNA の血中安定性の向上を *in vivo* にて確認した。本研究中、プルランの導入による組織に対する毒性の軽減、siRNA の安定性向上、肝臓ターゲティングおよび肝臓選択的イメージングを実現できたことは大きな成果と言える。

A. 研究目的

アポリポタンパク質 B (ApoB) は LDL (悪玉) コレステロールの生成において重要な因子であり、ApoB を標的とする siRNA は血中 LDL コレステロール値の減少に極めて有効とされている。ApoB siRNA による効果的な治療のためには、ApoB siRNA の配列選択が重要であり、我々は多くの候補配列から高い効果を有する siApoB-1 配列を選択した。さらに、一般的に siRNA 分子は体内で非常に不安定であり、分解されやすいため、標的組織に効率よく到達させるデリバリーシステムの開発が不可欠である。このために有効な手段としては、siRNA 分子を直接化学修飾する手法と、機能性の送達キャリアーを用いる手法があげられる。

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送達キャリアーを開発することを目的とする。まず、ApoB の主な標的組織である肝臓に

ApoB siRNA を効率よく送達するために必要な送達キャリアー（高分子キャリアー）の開発を行った。肝臓指向能を有するプルラン (pullulan) を側鎖とする高分子キャリアーである Pullulan-PEI を合成した。次に、合成した Pullulan-PEI の毒性に関する評価を行った。具体的には、複合体（ポリプレックス）をマウス尾静脈より投与した後の臓器障害や死亡率を調査した。さらに、その肝指向性をは、Pullulan-PEI のカチオン (C) に対する siRNA のアニオン (A) の割合 (C/A 比) が異なるポリマー/siRNA 複合体を尾静脈より投与し、*in vivo* イメージャー (Maestro) により経時的に検討するたその体内動態を調べた。

B. 研究方法

1. 肝臓選択的ターゲティングを目指したポリマーの合成

Pullulan-PEI ポリマーはプルラン（分子量

107,000、0.3 unit mmol) と脱水縮合剤として 1, 1'-カルボニルピス-1H-イミダゾール (CDI) (0.15 mmol) を脱水 DMSO 30 mL 中で混合し、室温で 6 時間攪拌した。その後、ポリエチレンイミン (分子量 22 kDa、0.3 mmol) を反応溶液に添加し、さらに 24 時間攪拌した。最後に透析を用いて未反応の残渣を除去し、凍結乾燥を行うことで目的物を回収した。

2. Pullulan-PEI の毒性評価

C/A 比が 3、6、12、24、48 となるように調整したポリマー/siRNA 複合体をマウス (BALB/c) に尾静脈投与した後、死亡率と摘出した臓器での障害を調べた。

3. 肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価

肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価は BALB/c マウス (6 週齢) を用いて行った。ApoB siRNA は Alex 750 蛍光でラベル化した。Pullulan-PEI /siRNA 複合体 (C/A 比 48) または PEI/siRNA 複合体 (C/A 比 3) をマウスの尾静脈より投与した。投与後、1 および 3 時間にマウスを安楽死させ、臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓および脾臓) を摘出し、蛍光イメージャーにより各臓器における蛍光強度を測定した。

C. 研究結果

1. 肝臓選択的ターゲティングを目指したポリマーの合成

PEI 1 mol% に対するプルランの修飾率は 0.64 mol% であった。次は、Pullulan-PEI /siRNA 複合体とコントロールである PEI/siRNA 複合体のサイズを測定した。

PEI/siRNA 複合体のサイズはすべての C/A 比において 200 nm 以下であった。Pullulan-PEI /siRNA 複合体の場合は、C/A 比 12 以上の条件において 200 nm 以下であったが、C/A 比が減少するに従い、サイズの増加が観察された (Figure 1)。

2. ポリマーの毒性評価

PEI/siRNA 複合体を投与したマウス群では、C/A 比の増加に伴い、死亡率が増加した (Table 1)。死亡したマウスの特徴として、呼吸混乱の症状と肺組織からの出血性赤斑点を確認された。しかし、Pullulan-PEI /siRNA 複合体の投与群では C/A 比 48 までマウスの死亡は確認されず、肺組織の異常もなかった (Figure 2)。

3. 肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価

複合体の体内動態を調べるために、Alex 750 蛍光ラベル化 ApoB siRNA を用いた。Pullulan-PEI /siRNA 複合体を BALB/c マウス (6 週齢) に尾静脈投与し、蛍光イメージャーにより各臓器における蛍光強度を測定した。投与 1 時間後、PEI/siRNA 複合体投与群とプルラン修飾 PEI/siRNA 複合体投与群、両方とも主に肺と腎臓から蛍光が検出された。一方、3 時間経過後は、Pullulan-PEI siRNA 複合体を投与したマウスの肝臓のみ強い赤色の蛍光が検出された (Figure 3)。

D. 考察

PEI は siRNA デリバリーに有効な材料として期待が寄せられているが、毒性の問題は克服すべき課題であった。我々はこの問

題を PEI へプルランを導入することで解決した。プルランは急性毒性、慢性毒性など各毒性実験においてその安全性が確認され、我が国では添加物として承認されている。

Pullulan-PEI は PEI に比べてマウスの死亡率を顕著に軽減した。マウス実験では PEI/siRNA 複合体の C/A 比増加に伴い、マウスの死亡率の増加や肺組織での出血性赤斑点の拡大が確認できた。しかし、Pullulan-PEI /siRNA 複合体によるマウスの死亡、臓器損傷を示すような結果は得られなかった。

一方、プルランを PEI へ導入することは、プルラン本来の肝臓指向能に影響を与える可能性があるため、マウスを用いた体内動態実験によりその影響を調べた。Pullulan-PEI /siRNA 複合体を尾静脈によりマウスに投与したところ、肝臓で集積することを確認した。この結果から、プルランを PEI へ導入することは、肝臓指向能に影響を与えないことが明らかとなった。この結果から、開発した Pullulan-PEI は肝臓選択的送達に有効な材料として期待される。本研究で、プルランの PEI への導入により、組織に対する毒性の軽減と同時に、肝臓への選択的送達に成功したことは画期的なものと言える。

さらに、ApoB siRNA は体内で非常に不安定であり、分解されやすいことが体内動態実験により確認した。この問題は、ポリマーと複合体を形成することで解決した。Pullulan-PEI /siRNA 複合体は siRNA の血中安定性を著しく向上し、肝臓ターゲティングおよびイメージングを実現させた。

以上の結果から、より強い Pullulan-PEI /siRNA 複合体の形成、胃酸や腸内酵素によ

る複合体の消化、分化の軽減に必要なコーティング剤の検討を行うことで、Apo B siRNA の経口投与は十分可能であると判断される。

E. 結論

本研究は、肝臓に ApoB siRNA を選択的かつ効率的に送達するキャリアーの開発を目指すものであり、肝臓指向能を有するプルランを修飾することで肝臓選択的送達を実現した。開発した Pullulan-PEI は、肝臓選択的送達の実現だけでなく、毒性の軽減や Apo B siRNA の血中安定性の向上にも優れていることが確認できた。

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. Koshino K, Watabe H, Hasegawa S, Hayashi T, Hatazawa J, Iida H. Development of motion correction technique for cardiac ¹⁵O-water PET study using an optical motion tracking system. *Ann Nucl Med*;24:1-11, 2010
2. 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*;2:13-21, 2009
3. Kudomi N, Hayashi T, Watabe H, Teramoto N, Piao R, Ose T, Koshino K, Ohta Y, Iida H. A physiological model for

- recirculation water correction in CMRO₂ assessment with ¹⁵O₂ inhalation PET. *J Cereb Blood Flow Metab.*;29:355-64, 2009
4. 銭谷勉, 飯田秀博. 小動物の高解像度 SPECT イメージング. *Isotope News*:7-9, 2009
 5. Iwanishi K, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Iida H. Influence of residual oxygen-15-labeled carbon monoxide radioactivity on cerebral blood flow and oxygen extraction fraction in a dual-tracer autoradiographic method. *Ann Nucl Med*;23:363-71, 2009
 6. Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Quantitative evaluation of changes in binding potential with a simplified reference tissue model and multiple injections of [¹¹C]raclopride. *Neuroimage*;47:1639-48, 2009
 7. Iwanishi K, Watabe H, Fujisaki H, Hayashi T, Miyake Y, Minato K, Naganuma M, Uehara T, Yokota C, Moriwaki H, Kajimoto K, Fukushima K, Minematsu K, Iida H. Evaluation of utility of asymmetric index for count-based oxygen extraction fraction on dual-tracer autoradiographic method for chronic unilateral brain infarction. *Ann Nucl Med*;23:533-9, 2009
 8. Kudomi N, Koivuviita N, Liukko KE, Oikonen VJ, Tolvanen T, Iida H, Tertti R, Metsarinne K, Iozzo P, Nuutila P. Parametric renal blood flow imaging using [¹⁵O]H₂O and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*;36:683-91, 2009
 9. Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of Regional Myocardial Oxygen Metabolism in Normal Pigs using Positron Emission Tomography with Injectable ¹⁵O-O₂. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* ;37:377-85, 2009
 10. Ikoma Y, Watabe H, Hayashi T, Miyake Y, Teramoto N, Minato K, Iida H. Measurement of Density and Affinity for Dopamine D₂ Receptors by a Single PET Scan with Multiple Injections of [¹¹C]raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab.*:In Press, 2009
2. 学会発表
 1. Iida H, Teramoto N, Zeniya T, Watabe H, Koshino K, Ose T. Quantitative regional myocardial blood flow and coronary flow reserve in conscious rats assessed using split-dose 201Tl and a dedicated dynamic Micro-SPECT system ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
 2. Iida H, Teramoto N, Koshino K, Ose T, Yokoyama T, Zeniya T, Miyagawa S, Sawa Y. A new experimental pig model of myocardial infarction, with high survival rate, showed cardiac remodeling, reduced myocardial vasodilatation and preserved [F-18]-FDG uptake in non-infarcted myocardium ICNC 9. Barcelona, Spain, 2009
 3. Iida H, Zeniya T, Imabayashi E, Maruno H, Matsuda H, Ishida K, Nakazawa M. Three-dimensional realistic brain