

て Day 2 と同程度の減少が確認された。siApoB-1 投与群においては Day 14 から総コレステロール値が上昇し始めたが siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群は Day 2 および Day 7 と同程度の抑制を認めた。Day 24 で siApoB-1 投与群は完全に総コレステロール値が前値に戻ったが、siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群は上昇を認めるものの、依然として 40%程度の抑制を認めた。

それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の肝臓での ApoB mRNA の発現量を図 4 に示す。Day 2 では siApoB-1 投与群で 80%、siBNA-2 及び siB2PT-1 投与群では 85%程度の抑制を認めた。siApoB-1 投与群に関しては day 7 より上昇が開始し、Day 24 までに前値に戻ったが、siBNA-2 や siB2PT-1 投与群は Day14 まで 80%程度の抑制が維持されており、Day 24 で若干回復し 50%程度の抑制効果を認めた。

それぞれの機能性核酸腹腔内投与後の肝臓での apoB-100 タンパク質発現量の変化を図 5 に示す。siApoB-1 投与群は Day 2 より siBNA-2 や siB2PT-1 投与群に比べて遺伝子発現抑制効果が低く、Day 7 から Day 14 にかけて PBS コントロール群と同程度に回復した。一方、siBNA-2 や siB2PT-1 投与群は Day 7 まで 90%以上の抑制を示しており Day 14 より抑制効果の低下を認めた。また、Day 24 では全ての群でコントロール群と同程度に回復している事がわかった。これらのことから、2', 4' -BNA で修飾した siBNA-2 と siB2PT-1 は天然のものに比べて有意に長く遺伝子発現抑制効果が持続す

ることがわかった。

機能性核酸投与による肝機能への影響を調べるために、血清 AST/ALT 値を測定した。それぞれの時点の AST 値、ALT 値をそれぞれ図 8、9 に示す。機能性核酸投与後 Day 2 で AST の上昇を認めたが、その後は全ての群で正常値範囲内であった。ALT においても投与直後の Day 2 では正常範囲内での上昇を認めた。

D. 考案

本研究は、家族性高コレステロール血症 (FH)ホモ接合体に対して、アポリポタンパク B をターゲットとした siRNA を用いて、経口投与による核酸医薬の開発を目的としている。昨年度の成果で、siApoB-1 に比べて siBNA-2 は Tm の有意な増加および著明な血清耐性を示したこと、尾静脈投与により、総コレステロール値および VLDL+LDL-コレステロール値が有意に低下を認め、*in vivo* での有効性が示されたことから、本年度の研究は siBNA-2 を用いてさらにコレステロール修飾等を施して長期効果を検討した。

Invivofectamine と複合体を作成した siRNA を 1 回、尾静脈投与することにより、従来の siRNA である siApoB-1 は、1 週間は血清コレステロール値の低下を認めたが、その後上昇を認めたのに対し、BNA を搭載した siBNA-2 およびホスホロチオエート化を加えた siB2PT-1 投与群では血清コレステロール値の低下は 14 日間持続しており、24 日目においても前値の 50%程度にとど

まっている。BNA 化およびホスホロチオエート化により、*in vivo* において細胞内での遺伝子発現抑制効果が持続することが示されたことから、1 カ月に 1 回の投与によってコレステロール値が良好にコントロールされる可能性が示された。

E. 結論

BNA 化、ホスホロチオエート化 siRNA は、*in vivo* で長期間にわたって遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかになった。核酸医薬としての大きな可能性が示されたと言える。

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

(欧文)

- 1) Kang J, Tachibana Y, Kanata W, Mahara A, Harada-Shiba M, Yamaoka T
Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine(PEI)-pullulan carrir: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010; 18: 3946-3950
- 2) Fujita Y, Kakino A, Harada-Shiba M, Sato Y, Otsui K, Yoshimoto R, and Sawamura T
C-reactive protein uptake by macrophage cell line via class-A scavenger receptor. *Clinical Chemistry*, 2010; 56, 3: 478-481
- 3) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino

H, Abe M, Tsushima M, Yoshimasa Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H, Yokoyama S

Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, 2010; 17, 7: 667-674

(和文) なし

2. 総説

欧文 なし

和文

1) 斯波真理子

「家族性高コレステロール血症 (FH)」
循環器病研究の進歩 (通巻50号) Vol.XXXI
No.1 25-33 2010

2) 山本剛史, 斯波真理子

「LDL受容体のあらたな制御機構と治療戦略」
医学のあゆみ Vol.234 Nos.7,8 754-757
2010

3) 斯波真理子, 山下貴裕

「ARHとPCSK9」
Medical Practice Vol.27 No.03 494-495
2010

4) 斯波真理子, 山下貴裕

「家族性高コレステロール血症の治療」
Medical Practice Vol.27 No.03 527-532 2010

5) 山本剛史, 斯波真理子

「PCSK9阻害薬の可能性」
Mebio, 2010; 27(5):54-62

3. 著書

欧文

1) Iwamoto N, Harada-Shiba M

Intratracheal gene transfer using polyplex nanomicelles and their application to cardiology, *Nanomedicine and Cardiovascular System*, edited by Victor R. Preedy, Science Publishers, in press

学会発表

(国内)

1) 斯波真理子

家族性高コレステロール血症

第10回動脈硬化教育フォーラム, 教育講演, 2010年2月, 広島

2) 斯波真理子

家族性高コレステロール血症の性差

日本性差医学医療学会, シンポジウム, 2010年2月, 東京

3) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino

H, Abe M, Tsushima M, Yoshimasa Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H, Yokoyama S Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia

日本循環器学会, シンポジウム, 2010年3月, 京都

4) 鈴木彩香, 馬原淳, 山下敦, 姜貞勲, 森反俊幸, 斯波真理子, 山岡哲二

血中LDL濃度の低下効果を有するガラクトース修飾デキストラン硫酸の合成と評価
日本再生医療学会, ポスター発表, 2010年3

月, 広島

5) 中谷理恵子, 宮本恵宏, 大畑洋子, 斯波真理子, 山下貴裕, 槇野久士, 岸本一郎
医長障害を繰り返すミトコンドリア糖尿病(3243変異)に対してBOT療法を検討した一例

第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 口頭発表, 2010年5月, 岡山

6) 内田智士, 位高啓史, Qixian Chen, 長田健介, 宮田完二郎, 斯波真理子, 片岡一則

コンドロイチン硫酸添加型ナノミセルの機能解析—組織傷害性軽減による安全かつ効率的な遺伝子導入

遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, 2010年6月, 北海道

7) 柴田映子, 井上麻衣, 宮田完二郎, 位高啓史, 西山伸宏, 石井武彦, 西川元也, 高倉喜高, 片岡一則, 斯波真理子
PEG-P[Asp-(DET)]を用いた気管内投与による遺伝子導入—臨床応用に向けての炎症変化軽減の試み—

遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道

8) 山本剛史, 斯波真理子, 和田俊輔, 生川径祐, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 今西武, 小比賀聡

新規PCSK9阻害薬の開発: 2', 4' -BNA/LNA修飾型人工核酸による抗高コレステロール血症作用の評価

遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム, 2010年6月, 北海道

9) 鎌田和加子, 橘洋一, 姜貞勲, 井

- 上麻衣, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二
糖修飾カチオン性キャリアを用いたsiRNA
による高コレステロール血症治療
遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジ
ウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道
- 10) 橘洋一, 鎌田和加子, 姜貞勲, 斯波真理子, 山岡哲二
肝細胞指向性キャリアーを用いた抗ApoB
siRNAのデリバリー
遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジ
ウム, 2010年 6月, 北海道
- 11) 和田俊輔, 山本剛史, 井上麻衣,
柴田映子, 山岡哲二, 鳥越秀峰, 小比賀聡
, 斯波真理子
機能性siRNA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
遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジ
ウム, ポスター発表, 2010年6月, 北海道
- 12) Harada-Shiba M, Makino H,
Miyamoto Y, Kishimoto I, Iwamoto N,
Yokoyama S, Tomoike H
Diagnosis and treatment of familial
hypercholesterolemia (FH)
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
シンポジウム, 2010年7月, 岐阜
- 13) Harada-Shiba M
Management of familial hypercholesterolemia
(FH)
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
シンポジウム, 2010年7月, 岐阜
- 14) Harada-Shiba M
Long term effect of LDL-apheresis on familial
hypercholesterolemia
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
ランチョンセミナー, 2010年7月, 岐阜
- 15) Ohta N, Harada-Shiba M, Miyamoto
Y, Makino H, Yamamoto S, Fujiyama H, Sano
T, Sano M, Tomoike H
Genetic analysis of familial ypercholesterolemia
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ
スター発表, 2010年7月, 岐阜
- 16) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Wada
S, Torigoe H, Yamaoka T, Narukawa K,
Imanishi T, Obika S
Antisense therapy for dyslipidemia:
2',4'-BNA/LNA-modified oligonucleotide
targeting PCSK9
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ
スター発表, 2010年7月, 岐阜
- 17) Yuasa Y, Makino H, Osaki T,
Mnamino N, Usami M, Ishikawa Y, Yoshimasa
Y, Tomoike H, Harada-Shiba M
Proteomic analysis of substances removed by
LDL-Apheresis(LDL-A)treatment
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ
スター発表, 2010年7月, 岐阜
- 18) Wada S, Yamamoto T, Yamaoka T,
Obika S, Harada-Shiba M
Therapeutic approach for homozygous familial
hypercholesterolemia by using
2',4'-BNA/LNA-modified small-interfering
RNA
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、ポ
スター発表, 2010年7月, 岐阜
- 19) Asada T, Kodama M, Fujiwara A,
Murakami M, Yoshida R, Sano T, Sano M, Ito

- Y, Hirano T, Harada-Shiba M
Analysis of LDL and sdLDL measurement in familial hypercholesterolemia(FH) patients
第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2010年7月, 岐阜
- 20) 姜貞勲, 橘洋一, 鎌田和加子, 馬原淳, 斯波真理子, 山岡哲二
プルラン修飾キャリアーによる Apo B siRNAの肝臓選択的デリバリー
第59回高分子討論会、一般口演、2010年9月, 札幌
- 21) 和田俊輔, 山本剛史, 鳥越秀峰, 小比賀聡, 斯波真理子
架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAを用いた家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療の開発
第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月, 大阪
- 22) 中谷萌夏, 斯波真理子, 山本剛史, 和田俊輔, 生川径祐, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 今西 武, 小比賀 聡
家族性高コレステロール血症治療を目的とした高機能性核酸医薬の開発 (2)
第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 一般口演, 2010年10月, 大阪
- 23) 小川浩司, 西垣孝行, 四井田英樹, 高橋裕三, 吉田幸太郎, 西岡宏, 峰崎純一, 染川将太, 林輝行, 岩宮正, 池田智明, 岩本紀之, 槇野久士, 斯波真理子
家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合型妊婦に関するLDL-apheresisの経験
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 24) 湯浅由美子, 槇野久士, 岩本紀之, 尾崎司, 南野直人, 宇佐美眞, 斯波真理子
「LDL-Aによって除去される動脈硬化危険因子について」排液Proteome解析からの検討
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 25) 槇野久士, 岩本紀之, 岸本一郎, 斯波真理子
家族性高コレステロール血症ホモ接合体におけるLDLアファレシス治療
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 26) 岩本紀之, 槇野久士, 斯波真理子
FHにおける妊婦とLDLアファレシス
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 27) 斯波真理子, 湯浅由美子, 槇野久士, 岩本紀之, 宇佐美眞, 岡島年也
LDLアファレシスに除去される物質と病態
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 28) 山岡哲二, 斯波真理子, 姜貞勲, 山下敦, 鈴木彩香, 馬原淳
新しい病医物質除去システムへのチャレンジ: DNCS
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 29) 斯波真理子, 湯浅由美子, 槇野久士, 岩本紀之, 宇佐美眞, 岡島年也
LDLアファレシスに除去される物質と病態
第31回日本アファレシス学会学術大会, 2010年11月, 千葉
- 30) 山本剛史, 斯波真理子, 中谷萌夏,

和田俊輔, 鳥越秀峰, 佐々木澄美, 山岡哲二, 生川径祐, 今西武, 小比賀聡

2',4'-BNA/LNA修飾型抗PCSK9アンチセンス医薬の薬理評価

第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸

31) 和田俊輔, 山本剛史, 山岡哲二, 小比賀聡, 斯波真理子

糖部架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAを用いた家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療の開発

第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸

32) 橘洋一, 山下敦, 小宮山萌美, 鎌田和加子, 姜貞勲, 森反俊幸, 鳥越秀峰, 斯波真理子, 小比賀聡, 山岡哲二

抗PCSK9アンチセンスBNA徐放化による高脂血症治療

第20回アンチセンスシンポジウム, ポスター発表, 2010年12月, 神戸

33) 斯波真理子

家族性高コレステロール血症の病態と核酸医療治療へのアプローチ

第20回アンチセンスシンポジウム, 招待講演, 2010年12月, 神戸

34) 斯波真理子

原発性高コレステロール血症

第14回日本病態栄養学会年次学術集会, 2011年1月, 横浜

(国際)

1) Yamashita T, Harada-Shiba M,

Makino H, Ohata Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H

Long term LDL-apheresis prevents catastrophic cardiovascular events in patients with homozygous familial hypercholesterolemia

XXth World Congress of the International Society for Heart Research, ポスター発表, 2010年5月13-16日, 京都

2) Wada S, Harada-Shiba M, Yamamoto T, Sasaki K, Yamaoka T, Obika S, Torigoe H

Applying 2',4'-BNA/LNA-modified siRNA for familial hypercholesterolemia, 2010 Round Table in France, 2010年8月, France

3) Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Narukawa K, Sasaki K, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S

Systemic administration of 2', 4'-BNA-LNA-modified anti-PCSK9 antisense, 6th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2010年10月, Dana Point, USA

H. 知的所有権の出願・取得状況

1) 脂質異常症治療薬剤としての化学修飾siRNA

出願番号: 特願2010-020720

発明者: 斯波真理子、小比賀聡、和田俊輔 他

出願人: ヒューマンサイエンス振興財団、大阪大学

出願日: 平成22年2月1日

2) オリゴヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する

脂質異常症治療剤

出願番号：特願2010-195187

発明者：斯波真理子、小比賀聡、山本剛史
他

出願人：国立循環器病研究センター研究所
、大阪大学、東京理科大学

出願日：平成22年8月31日

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

分子薬理部

和田 俊輔

山本 剛史

井上 麻衣

柴田 映子

森本 恵

中谷 萌夏

湯浅 由美子

浦田 由美子

吉田 晶子

APOB/GAPDH

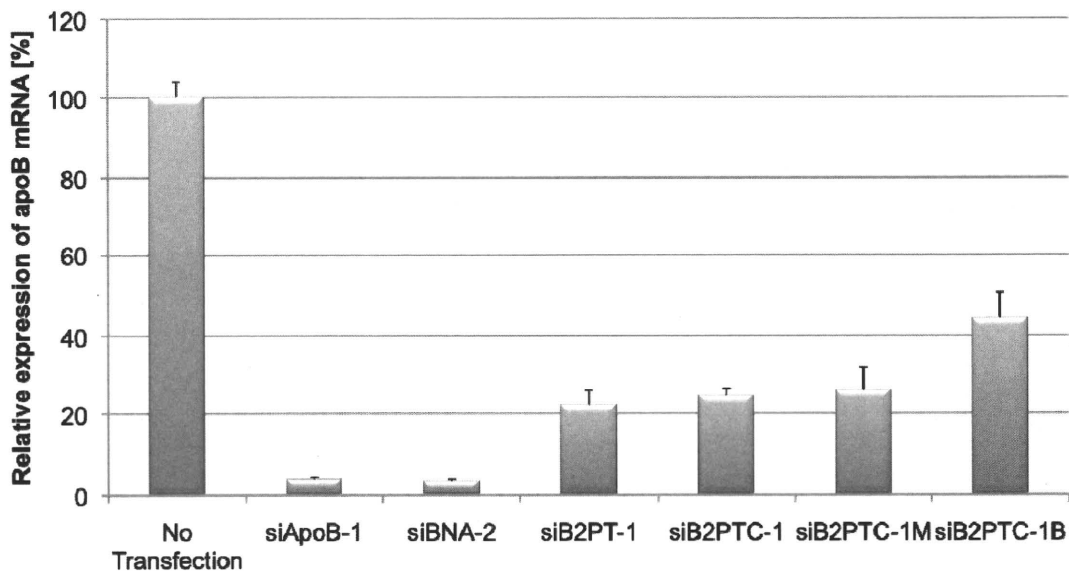


図1 *in vitro* トランスフェクションによる遺伝子発現抑制効果

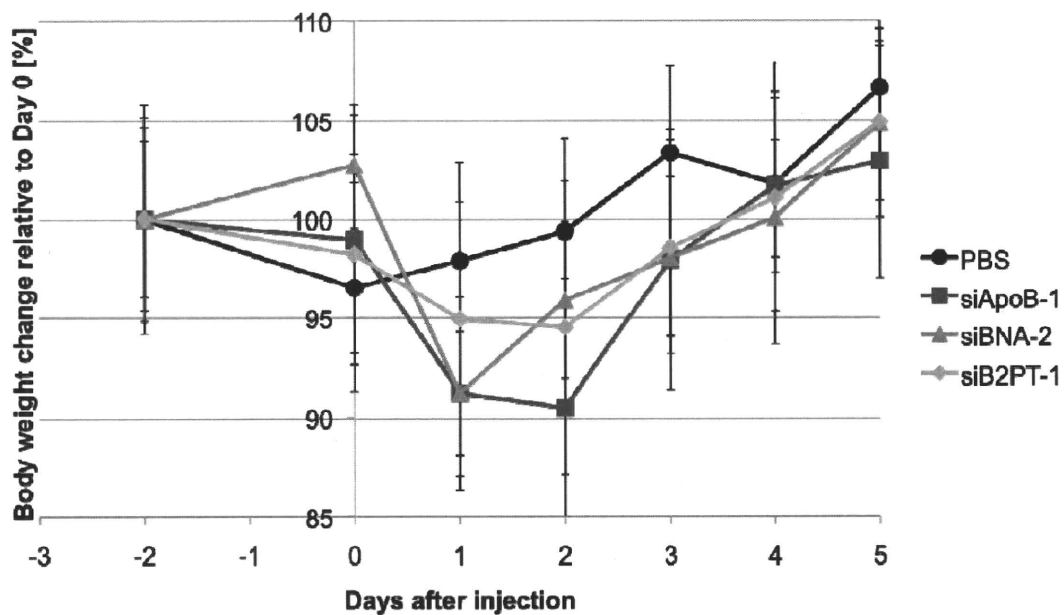


図2 相対体重変化

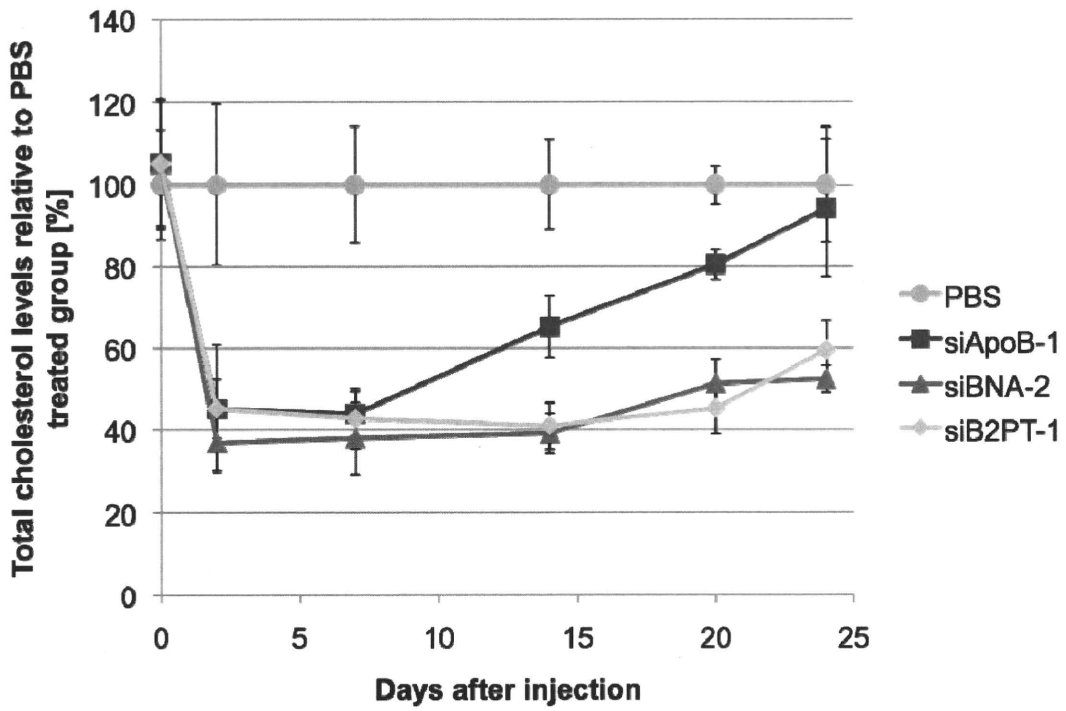


図3 相対総コレステロール値変化

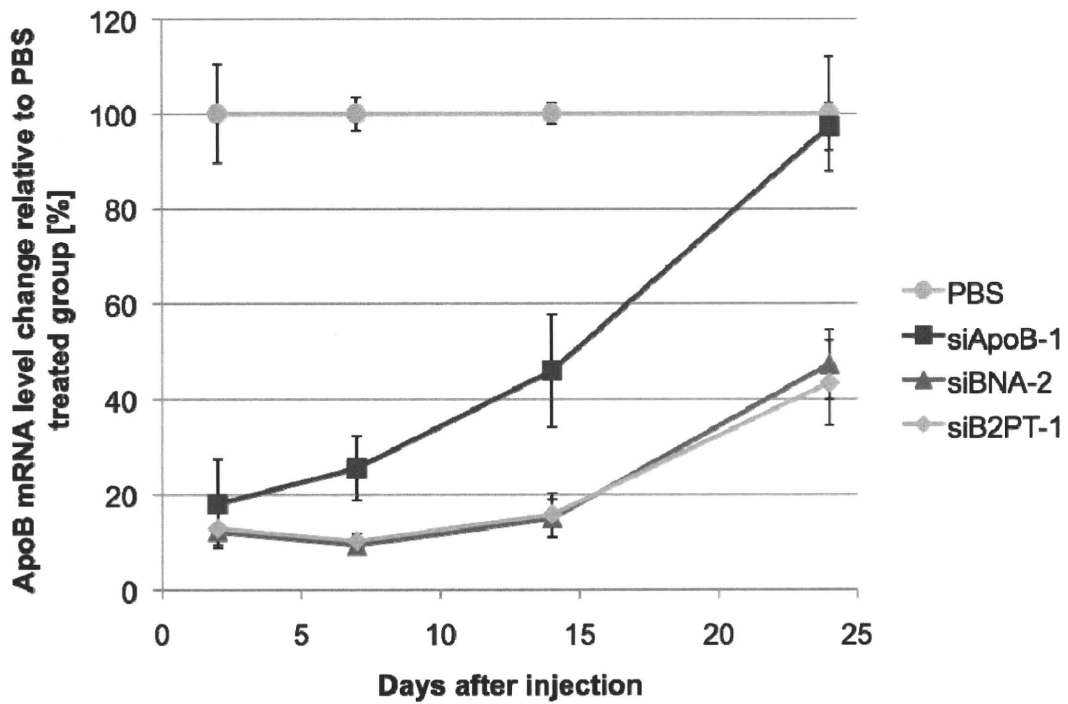
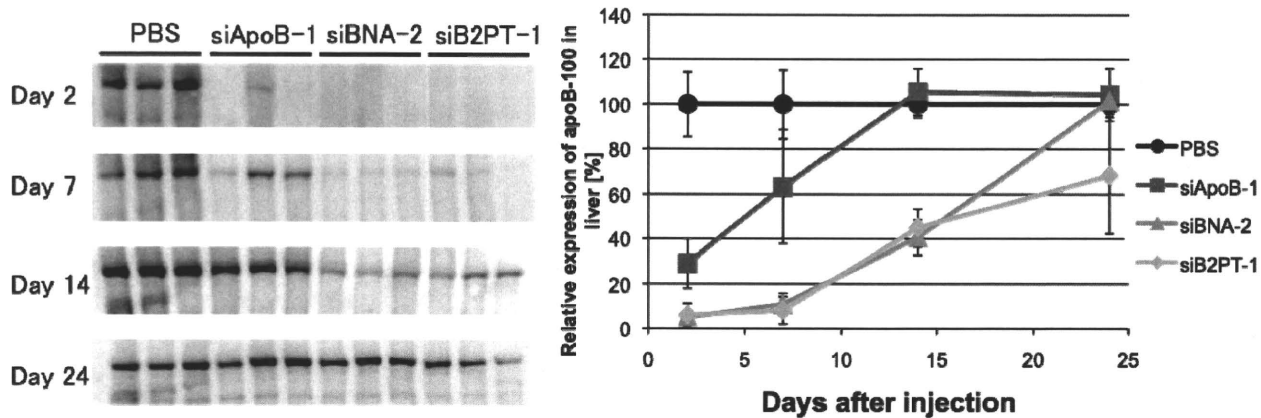


図4 ApoB mRNA 発現量変化



A

B

図5 apoB-100 Western Blot イメージ(A)と発現量変化(B)。

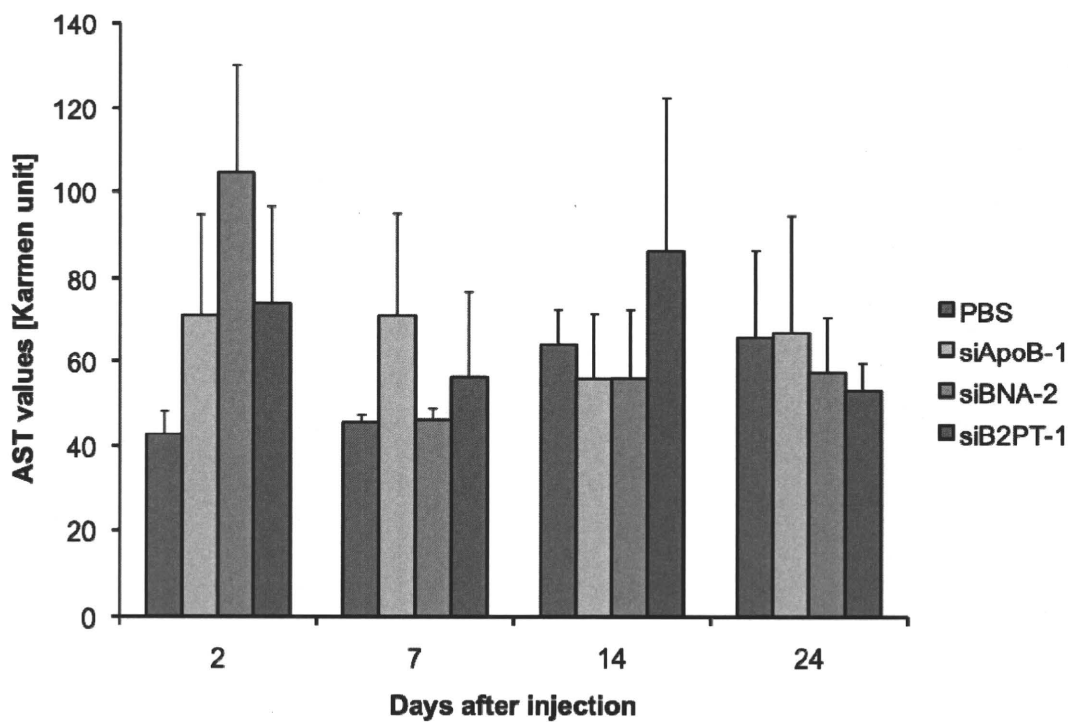


図6 AST 値変化

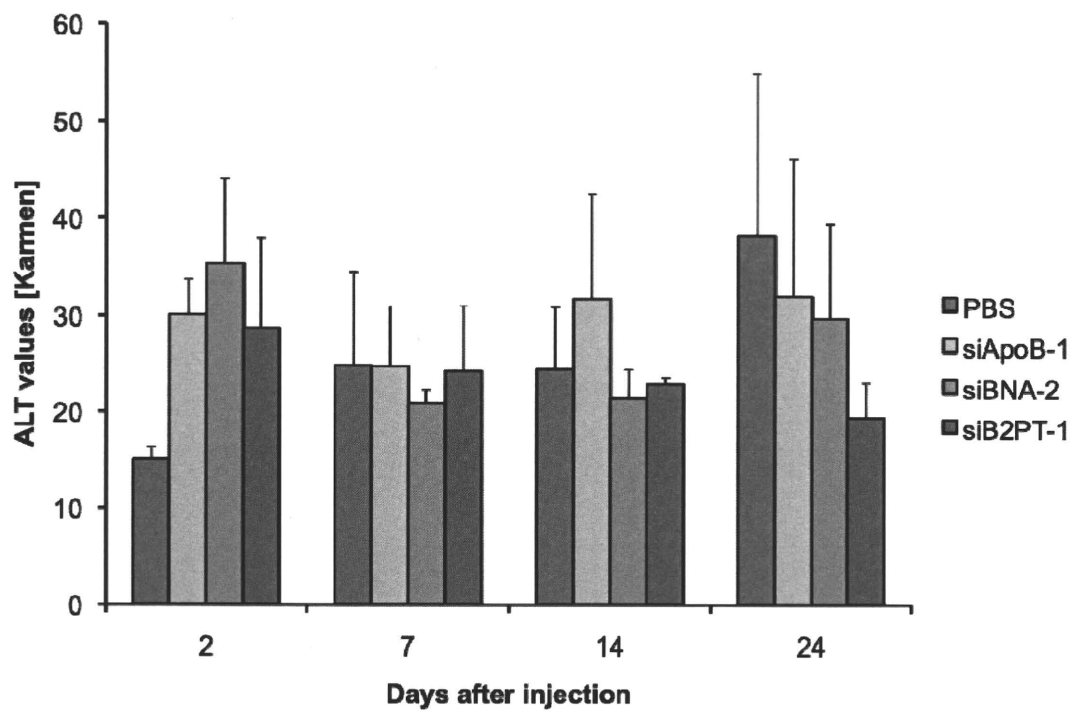


图7 ALT 值变化

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

—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 国立循環器病研究センター研究所 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。前年度までに、肝指向性を有する siRNA キャリアーの合成を行った。具体的には、pullulan 修飾 Polyethylenimine (PEI) (Pullulan-PEI) の合成を行ってきた。本年度は、前年度までの結果を踏まえ、側鎖にガラクトースユニットとカチオンユニットを有する高分子を合成し、キャリアーとしての有用性について検討を行った。*in vitro* において、(1) 複合体形成能、(2) 複合体のサイズ・ζ-ポテンシャルの測定、(3) 細胞毒性および、(4) ApoB-1 の抑制効果の検討を、また *in vivo* において、(5) キャリアー/siRNA 複合体の尾静中投与による治療実験を進めた。その結果、本研究で得られたキャリアーは siRNA と複合体を形成し、効果的に細胞内へ導入できることが解った。また、*in vitro* の結果より、抑制効果が高く、*in vivo* において、尾静中投与後の肝臓における ApoB mRNA 量を有意に低下させた。これより、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臨床応用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。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。前年度までに、肝細胞指向性を有する siRNA の合成を行ってきた。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・mRNA の抑制効果について検討してきた。

本年度は、上記で得られた知見を基に、より精密に制御された構造を持つ高分子キャリアーを合成し、細胞毒性・mRNA の抑制効果について検討を行った。

B. 研究方法

1. siRNA キャリアーの合成

モノマーとして、2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) 、6-o-vinyl adipoyl galactose 及び、6-o-vinyl adipoyl glucose を用いてラジカル重合を行った。具体的には、モノマーを DMSO に溶解させ、凍結融解を3回繰り返し、反応溶媒内の酸素を抜きだした後、AIBN を開始剤として、60 °C で4時間撹拌を行った。4時間、透析を行い、その後、凍結乾燥を行い回収した。結果を Table 1 に示す。

2. ゲル電気泳動

得られたキャリアーと siApoB-1 を混合し、37 °C、30 min インキュベートすることで、複合体を形成させた。C/A は 48, 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 とした。事前に 19%アクリルアミドゲルを作成し、それを用いてゲル電気泳動を行った。泳動条件は 150 V、1 h とし、泳動終了後、エチジウムブロマイド溶液に 15 分浸漬した。その後、蛍光イメージャーを用いて写真の撮像を行った。

3. 複合体のサイズ・ζ-ポテンシャルの測定

様々な C/A において複合体を形成させ、室温においてサイズ・ζ-ポテンシャルの測定の測定を行った。測定はゼータナノサイザーを用いた。測定は、すべてのサンプルにおいて、複合体形成より 1 時間以内に行った。

4. 細胞毒性試験

毒性試験は、NMuLi 細胞にキャリアー/siRNA

複合体添加 24 時間後、WST-1 を用いて評価した。具体的には、 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、キャリアー/siRNA 複合体を加え、さらに 24 時間培養した。その後、プロトコールに従って、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。

5. ApoB mRNA 発現定量

キャリアーによる siRNA のデリバリーについて、*in vitro* で検討した。キャリアー/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 の条件下でキャリアー/siRNA 複合体を形成させ、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。

6. 複合体の細胞内取り込み実験

初めに、YOYO と siApoB-1 を混合し、37 °C で 30 min インキュベートを行った。その後すぐに、キャリアーを所定量混合し、更に、37 °C で 30 min インキュベートを行うことで、複合体の形成を行った。5 に示す実験と同様に、細胞の播種、トランスフェクションを行い、所定の時間(1, 3, 5, 7 and 24) 後に蛍光顕微鏡観察を行った。

7. *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

キャリアーを用いて、*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、高コレステロール血症モデルマウスを作成した。1 回あたり 300 pmol の siRNA を C/A=12 の条件で複合体を形成させ、RNase-free の PBS にて 150 µl にメスアップし、尾静脈投与した。初回投与後から、2 日後に同量のキャリアー/siRNA を尾静中投与した。5 日後、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。

(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. siRNA キャリアーの合成

DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl galactose 及び DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl glucose の共重合を行った。結果を Table 1 に示す。DMAEMA のみの場合、収率は 32% 程度であり、分子量は 8.6×10^4 であった。Galactose 及び Glucose を導入した場合、いずれにおいても、仕込みの糖ユニットの増加に従い、収率・分子量の低下が見られた。得られたキャリアーにおいて、Galactose の場合 35%、Glucose の場合 39% が最も導入率が高かった。

2. ゲル電気泳動

アクリルアミドゲルの電気泳動写真の結果を Figure 1 に示す。糖ユニットの導入率が 30% 以下の場合において、C/A=6 以上において複合体が形成していた。糖ユニットが 30% 以上では、Galactose 及び Glucose のいずれにおいても、C/A=3 においてバンド輝度の低下が見られた。つまり、C/A=3 においてある程度の複合体を形成していることが解った。

3. 複合体のサイズ・ ζ -ポテンシャルの測定

次に、得られた複合体のサイズ・ ζ -ポテンシャルの測定を行った。結果を Figure 2 に示す。粒径の測定の結果、C/A に依存していた。C/A が高い条件では、すべてのサンプルで粒径は 150-200 nm であり、C/A=12 において 200-400 nm であった。更に、C/A の減少に従い、粒径の増加が見られ、最終的には 1 μ m となった。また、Galactose 及び Glucose による差はほとんど見られなかった。

4. 細胞毒性試験

キャリアー中のカチオンによる細胞毒性について、キャリアー/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 (Figure 3)。すべてのサンプルにおいて、C/A 比の増加に伴い、細胞毒性が見られた。DMAEMA のみの場合、

C/A=6 において生存率は 70% に低下し、最終的に C/A=48 で 50% となった。一方、糖含有量が多いキャリアーの場合、細胞毒性は低く、C/A=48 においても生存率は 80% 程度となった。

5. ApoB mRNA 発現定量

キャリアーによる 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 (Figure 4)。その結果、C/A 比の増加とともに ApoB mRNA の発現量の低下が見られた。また、糖含有量の増加に伴い、メッセージの抑制効果は見られなくなった。

6. 複合体の細胞内取り込み実験

YOYO ラベル化した siApoB-1 とキャリアーとの複合体を NMuLi 細胞に取り込ませ、径時変化について顕微鏡観察を行った (Figure 5)。取り込み開始後 1 時間では、いずれのキャリアーの場合でも細胞内に複合体は観察されなかった。しかし、3 時間後においては、サンプル 1 及びサンプル 3 の場合において、細胞内に取り込まれていることが観察された。更に、サンプル 3 の場合、細胞の核に多く取り込まれていることが確認された。一方、サンプル 11 の場合、取り込み開始 7 時間後に細胞内に複合体が存在することが確認された。また、糖ユニットが多い場合 (サンプル 8 及び 16)、7 時間後においても細胞内には取り込まれていなかった。

7. *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

キャリアーによる siRNA *in vivo* デリバリーを検討した (Figure 6)。サンプル 1、3、11 及び PBS を尾静脈投与した。その結果、PBS 投与群と比較すると、サンプル 1 及び 3 において、48 時間後では肝臓における ApoB mRNA の発現量の低下が有意差を持って見られた。しかし、サンプル 11 を投与した系では、ほとんど差が見られなかった。この結果より、本研究で合成したキャリアーを用いた肝臓デリバリーは、*in vivo* における有意性が示された。

D. 考察

前年度までに、肝指向性キャリアーとしてプル

ランを用いて研究を行った。本年度は、その知見を基に、より精密に構造が制御された高分子キャリアーの開発に着手した。具体的には、側鎖にカチオンユニットとガラクトースユニットを有する共重合体を合成した。細胞毒性試験の結果 (Figure 3)、カチオンのみが導入されたキャリアーと比較して糖が導入された場合、毒性が低い結果となった。また、mRNA の抑制実験 (Figure 4)、顕微鏡観察の結果 (Figure 5)、糖ユニットが多い場合、細胞内にほとんど取り込まれないことが解った。これらの結果より、糖ユニットの含有量の増加と共に、複合体の状態の変化が示唆される。これらの中には、電荷密度の低下や糖ユニットによるシールド効果などが考えられる。

また、複合体の細胞内取り込み実験 (Figure 5) において、カチオンユニットのみのキャリアー (サンプル1) と比較して、サンプル11では取り込み時間に差が見られた。これは、グルコースユニットを導入することで、複合体の電荷密度が低下し、エンドサイトーシスによる取り込みを阻害するためだと考えられる。一方、ガラクトースユニットを導入した場合、グルコースと同様に、取り込みは阻害されると考えられるが、細胞に発現しているガラクトースレセプター経由の取り込みが起り、エンドサイトーシスと共に、レセプター経由の取り込みが行われるので、取り込み時間が早くなったと考えられる。サンプル3の取り込み写真の結果から、細胞の核に複合体が集積していることが観察され、これらの取り込みに関する考察を裏付けている。

E. 結論

側鎖にカチオンユニット及び糖ユニットを有する高分子キャリアーの合成を行った。導入する糖ユニットにより、取り込み時間に差が見られることから、レセプター経由による取り込みが起こっていた。更に、*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、本研究で合成したキャリアーを用いた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 S. Kakinoki and T. Yamaoka. Stable modification of poly(lactic acid) surface with neurite outgrowth-promoting peptides via hydrophobic collagen-like sequence. Acta Biomaterialia. 6, 1925-1930 (2010)

② T. Ehashi, A. Nishigaito, T. Fujisato, Y. Moritan, and T. Yamaoka. Peripheral nerve regeneration and electrophysiological recovery with CIP-treated allogeneic acellular nerve. J. Biomat. Sci. 22, 627-640 (2011)

③ Y. Tachibana, J. Enmi, A. Mahara, H. Iida, and T. Yamaoka. Design and characterization of a polymeric MRI contrast agent based on PVA for in vivo living-cell tracking. Contrast Media and Molecular Imaging. 5, 309-317 (2010)

④ Jeong-Hun Kang, Y. Tachibana, W. Kamata, A. Mahara, M. Harada-Shiba, and T. Yamaoka. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 18, 3946-3950 (2010)

⑤ Y. Tachibana, T. Hashimoto, H. Nozaki, A. Murakami, T. Yamaoka. Timing-controlled Decomposition of Polyplexes In Vivo Greatly Enhances Transgene Expression. Chem. Lett. 39, 1238-1239 (2010)

2. 学会発表

① 鎌田和加子、橘洋一、姜貞勲、井上麻衣、斯波真理子、小比賀聡、山岡哲二. siRNA による高コレステロール血症治療—糖修飾カチオン性キ

キャリアの創生ー. 第 59 回高分子学会年次大会. 横浜. 2010 年 5 月 27 日

② 橘洋一、鎌田和加子、姜貞勲、斯波真理子、山岡哲二. 肝細胞指向性キャリアーを用いた抗 ApoB si-RNA のデリバリー. 遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム. 北海道. 2010 年 6 月 2 日

③ 鎌田和加子、橘洋一、姜貞勲、井上麻衣、斯波真理子、小比賀聡、山岡哲二. 糖修飾カチオン性キャリアーを用いた siRNA による高コレステロール血症治療. 遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム. 北海道. 2010 年 6 月 2 日

④ 鎌田和加子、橘洋一、姜貞勲、井上麻衣、斯波真理子、小比賀聡、山岡哲二. 糖修飾カチオン性キャリアーを用いた siRNA の肝ターゲティング. 第 26 回日本 DDS 学会. 大阪. 2010 年 6 月 17 日

⑤ 橘洋一、鎌田和加子、姜貞勲、斯波真理子、山岡哲二. 肝細胞指向性キャリアーによる抗 ApoB si-RNA デリバリー. 第 26 回日本 DDS 学会. 大阪. 2010 年 6 月 17 日

⑥ 姜貞勲、橘洋一、鎌田和加子、斯波真理子、山岡哲二. プルラン修飾キャリアーによる Apo B siRNA の肝臓デリバリー. 遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回夏期セミナー. 大津. 2010 年 9 月 1 日

⑦ T Yamaoka, Jeong-hun Kang, M Harada-Shiba. Liver Targetted sirna delivery using pullulan-PEI conjugates. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2010 asia pacific meeting. シドニー. 2010 年 9 月 17 日

⑧ 山下敦、橘洋一、鎌田和加子、姜貞勲、鳥越秀峰、斯波真理子、小尾賀聡、山岡哲二. アンチセンス BNA 徐放化による In vivo 高脂血症治療効果. 第 59 回高分子討論会. 北海道. 2010 年 9 月 17 日

⑨ 姜貞勲、橘洋一、鎌田和加子、馬原淳、斯波真理子、山岡哲二. プルラン修飾キャリアーによる Apo B siRNA の肝臓選択的デリバリー. 第 59 回高分子討論会. 北海道. 2010 年 9 月 15 日

⑩ 姜貞勲、橘洋一、鎌田和加子、馬原淳、斯波真理子、山岡哲二. 肝指向性プルラン修飾キャリアーによる Apo B siRNA の肝臓デリバリー. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 神戸. 2010 年 12 月 2 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

3. その他
なし

研究協力者

鎌田 和加子
橘 洋一

Table 1: Copolymerization of DMAEMA, 6-o-vinyl adipoyl galactose and 6-o-vinyl adipoyl glucose

Carrier	DMAEMA	A	B	yield (%)	Mn ^{a)} ($\times 10^4$)	Mw/Mn ^{a)}	percent of sugar unit ^{b)}
1	1.0	0.0		31.9	8.6	1.90	
2	0.9	0.1		29.0	7.7	1.90	4.5
3	0.8	0.2		24.1	7.2	1.90	8.4
4	0.7	0.3		19.0	7.0	1.91	11.2
5	0.6	0.4		15.7	6.4	1.95	13.5
6	0.5	0.5		15.3	5.8	1.90	16.2
7	0.4	0.6		14.3	4.6	1.83	29.0
8	0.2	0.8		8.9	2.9	1.80	35.1
9	0.0	1.0		2.5	0.5	1.30	
10	0.9		0.1	28.5	8.5	1.85	5.0
11	0.8		0.2	25.0	8.1	1.83	7.8
12	0.7		0.3	22.6	6.9	1.95	12.3
13	0.6		0.4	19.7	4.4	1.99	17.1
14	0.5		0.5	18.1	4.3	1.99	21.0
15	0.4		0.6	19.0	5.0	1.83	28.4
16	0.2		0.8	10.8	3.5	1.87	39.1
17	0.0		1.0	1.5	0.4	1.29	

(A) 6-o-vinyl adipoyl galactose (B) 6-o-vinyl adipoyl glucose

^{a)} Determined by SEC vs poly(ethylene glycol) standards with 55 % H₂O, 45 % acetonitrile and 0.1 % trifluoroacetic acid as eluent at 40 °C. ^{b)} Determined by elemental analysis

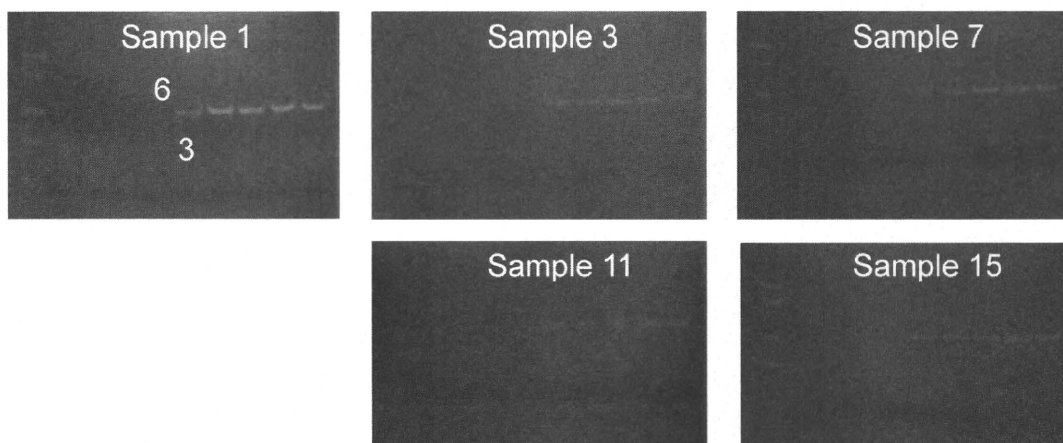


Figure 1. The binding degree between cationic copolymer and siRNA was determined by 19 % acrylamide gel electrophoresis. The complexes were prepared at C/A ratios of 48, 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 and 0.1875, each containing 100 ng (3.03 pmol) of siRNAs.

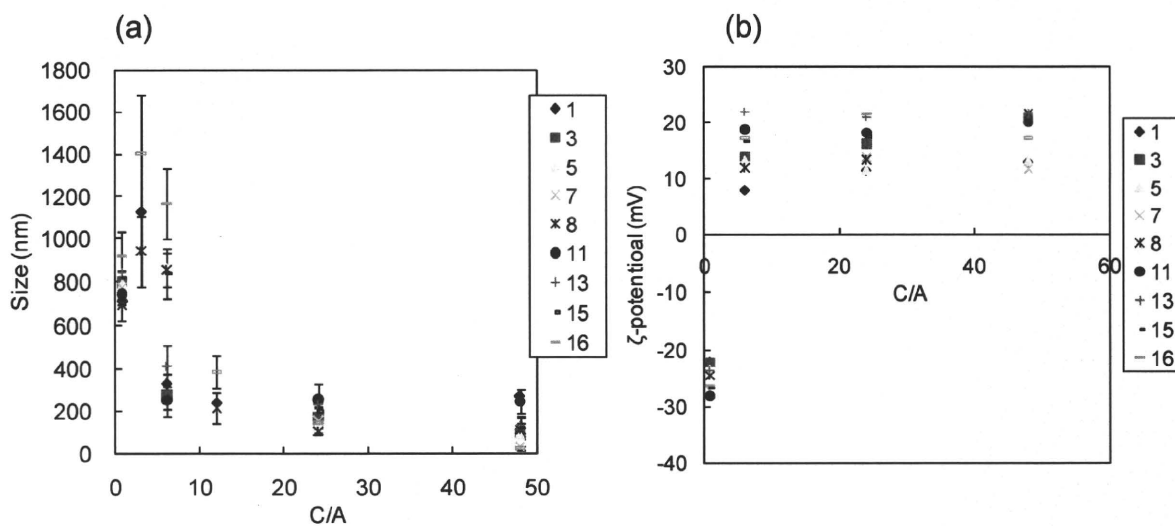


Figure 2. (a) Average diameter and (b) z-potential of polymer/siRNA complexes at various C/A ratios.

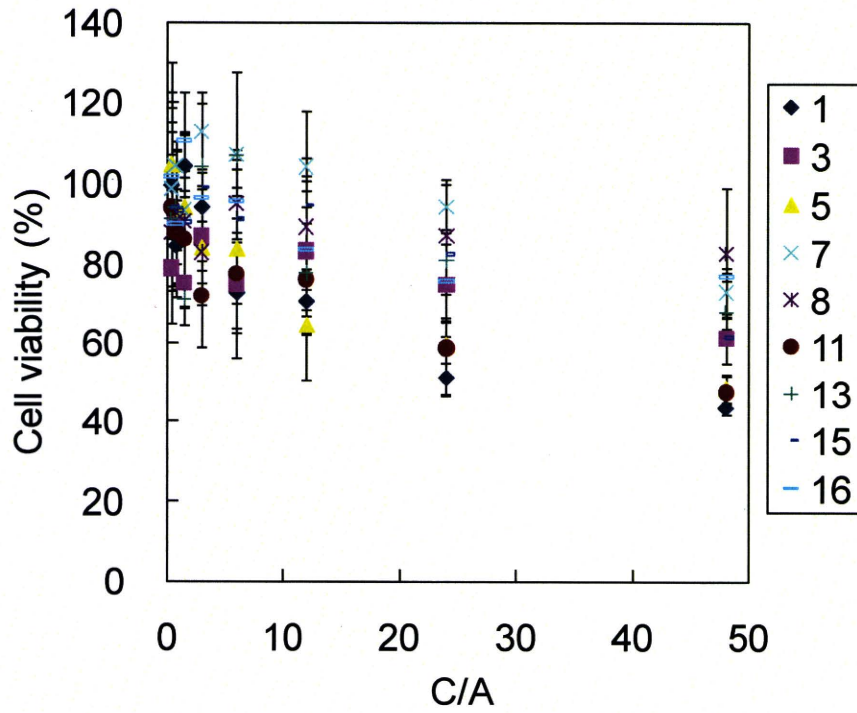


Figure 3. Cytotoxicity of carriers/siRNA complexes at various C/A ratios of 0.75 to 48 in NMuLi cells. Cell viability was determined by WST-1 assay.

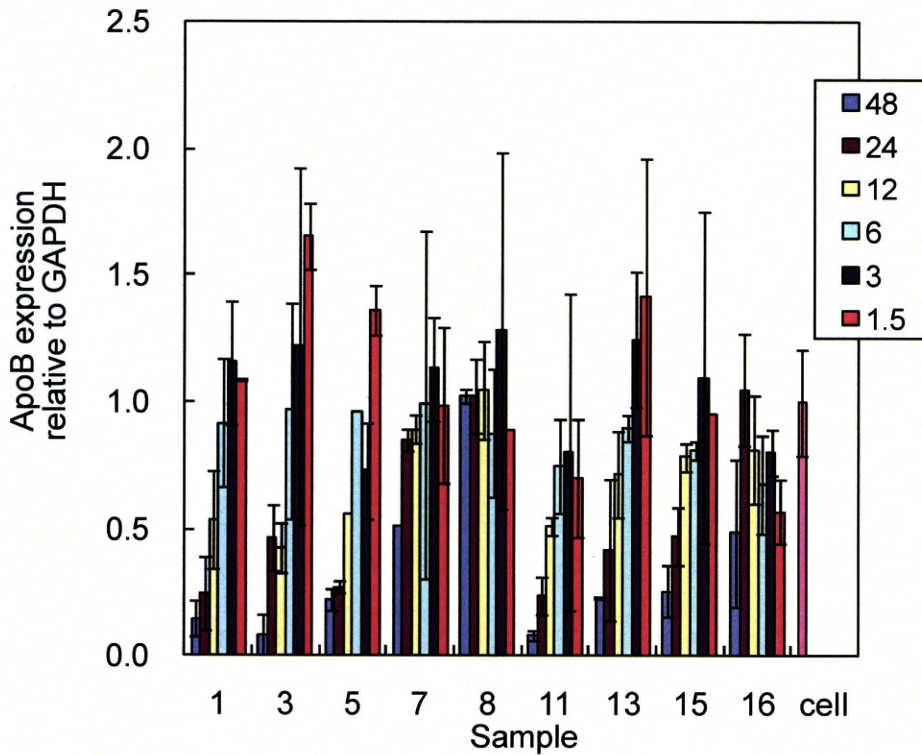


Figure 4. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with samples/siRNA complexes at various C/A ratios from 1.5 to 48 at 24 h after the transfection.

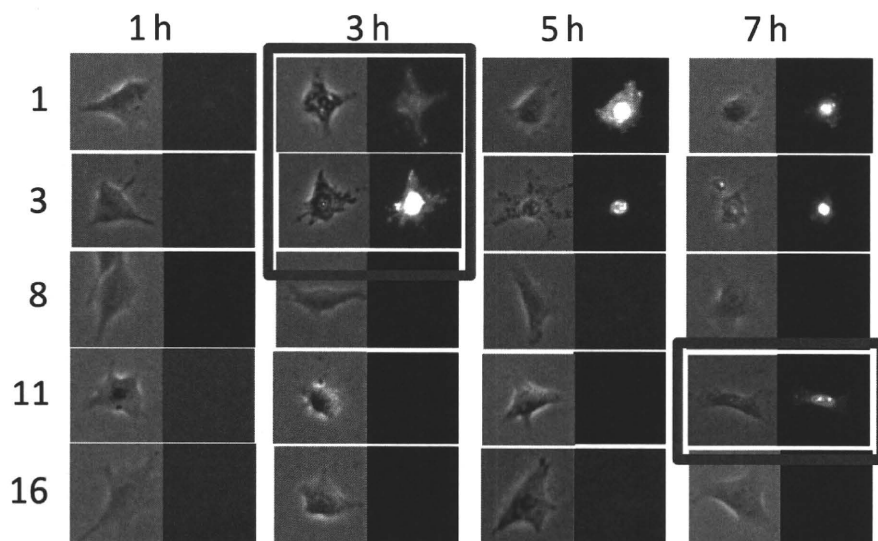


Figure 5. Fluorescence microscopy of NMuLi cells treated with Carriers/YOYO labeled siRNA complexes (sample 1, 3, 8, 16) at C/A ratio 48 at 1, 3, 5 and 7 h after the transfection.

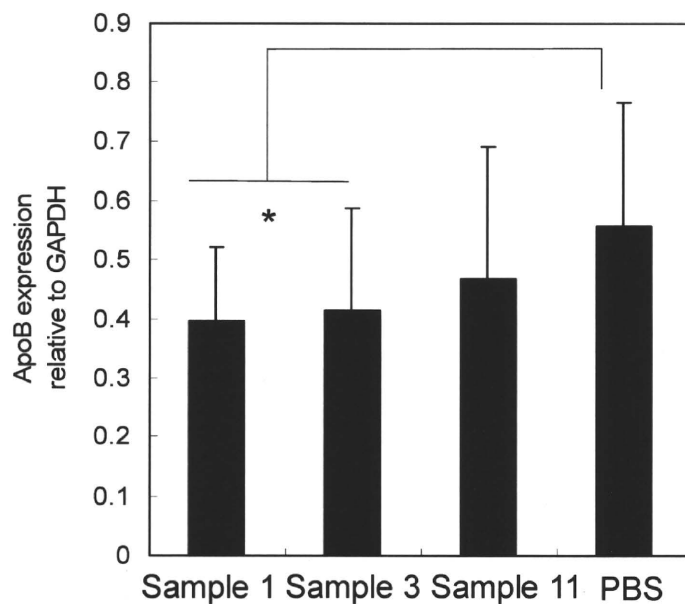


Figure 6. Inhibition of ApoB gene expression by carriers with siRNA at the C/A ratio of 12. * $p < 0.05$