

201007008B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテーラーメイド研究事業)

**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**

平成 20 年度～平成 22 年度 総合研究報告書

研究代表者 斯波 真理子

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	1
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 斯波真理子	

(資料)

1. 修飾化核酸の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 機能評価	24
斯波 真理子	
2. 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	57
山岡 哲二	
3. 機能性キャリアーの開発と体内動態解析 (<i>in vivo</i> イメージング)	76
飯田 秀博	
4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1	83
笹栗 俊之	

III. 研究成果の刊行物・別刷	90
------------------	----

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

主任研究者 斯波真理子 国立循環器病研究センター研究所・室長

研究要旨

家族性高コレステロール血症(FH)は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では心筋梗塞などの動脈硬化症に伴う重篤な合併症を引き起こし、20 才まで生きられないと言われている。本研究では、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究する。

初年度には、有効な siRNA 配列の選択、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。第2年度は、ApoB siRNA に修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)を搭載して、血清耐性試験、高脂血症モデルマウスへの静脈内投与による治療実験を行ない、治療効果を確認した。合成ベクターについては、*in vitro* において、Pullulan-siRNA 効果、Pullulan-PEI を用いた siRNA 効果、細胞毒性、また *in vivo* において、Pullulan-PEI/siRNA 複合体の尾静脈投与による治療実験を行ない、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ること、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。最終年度は、BNA 化ホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、*in vivo* における効果を評価し、24 日間という長期間、標的 mRNA の低下、血清総コレステロール値の低下を認めた。siRNA キャリアーについては、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 Pullulan-PEI を用いて、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。経口投与による siRNA の肝臓へのデリバリーは、腸膜に存在する M 細胞を介するパン酵母の殻である β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用することで実現した。

3 年間の成果により、修飾化 siBNA の高脂血症モデル動物への 1 回投与による 24 日間の効果持続が可能となったこと、pullulan-PEI を用いて肝臓へのターゲティングが可能となったこと、 β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアーとして使用することで、経口投与による治療が可能となり、当初の目的を達成することができた。

分担研究者

国立循環器病センター研究所

生体工学部 山岡哲二

放射線医学部 飯田秀博

九州大学大学院医学研究院

臨床薬理学分野 笹栗俊之

A. 研究目的

家族性高コレステロール血症(FH)は、LDL 受容体機能に関わる遺伝子に変異を有する遺伝病であり、ホモ接合体では著明な高コレステロール血症、幼少期より進行する動脈硬化症を示し、未治療では心筋梗塞などの動脈硬化症に伴う重篤な合併症を引き起こし、20才まで生きられないと言われている。現在は、LDL アフェレシス療法という血漿交換療法を定期的に行なうことで、動脈硬化の進展を予防している。本研究では、安全性が高く効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後の臨床試験に備えることを目的としている。FH に対しては、1990年代にレトロウィルスベクターを用いた研究が行なわれ、臨床試験にまで至ったが、有効性、安全性において重大な問題点が指摘され、以後は行なわれていない。一方、非ウィルスベクターは、安全性はウィルスベクターに勝ると言われているが、治療効果を現すのに十分な発現効率が得られず、治療法としての確立には至っていない。本研究では、安全性が高く

効率が良く、経口という非侵襲的な方法での siRNA 遺伝子導入システムを開発して、FH をモデル疾患として治療実験を行い、体内動態を含めて総合的に研究し、研究終了後に臨床試験に備えることを目的としている。

初年度には、有効な siRNA 配列の選択、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。第2年度は、ApoB siRNA に修飾化核酸である bridged nucleic acid (BNA)を搭載して、血清耐性試験、高脂血症モデルマウスへの静脈内投与による治療実験を行ない、治療効果を確認した。合成ベクターについては、*in vitro* において、Pullulan-siRNA 効果、Pullulan-PEI を用いた siRNA 効果、細胞毒性、また *in vivo* において、Pullulan-PEI/siRNA 複合体の尾静脈投与による治療実験を行ない、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ること、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。最終年度は、siBNA ホスホロチオエート化、2'-OMe 化、コレステロール化の修飾を施して、*in vivo* における効果を評価し、24日間という長期間、標的 mRNA の低下、血清総コレステロール値の低下を認めた。siRNA キャリアーについては、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 Pullulan-PEI を用いて、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。経口投与による siRNA の肝臓へのデリバリーは、腸膜

に存在する M 細胞を介するパン酵母の殻である β 1,3-D-glucan を経口投与用キャリアとして使用することで実現した。

B. 研究方法

1. 修飾化核酸の作製およびその治療実験 (斯波)

1-1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシーケンスより、Profile Score (活性のある siRNA に共通する配列的特徴との比較によるスコア)、GC Score (siRNA の GC%から算出したスコア)、Position Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Load Score (mRNA 中の位置から算出したスコア)、Specificity Score(UniGene を用いた off-target の予測によるスコア)などのパラメーターを用いて、siRNA に適する配列を選択した。

1-2. siBNA の作製

in vitro および *in vivo* スクリーニングにより効果が認められた ApoB siRNA について、*in vivo* 環境下での安定化、遺伝子発現抑制機能の高効率化、オフターゲット効果の抑制のために、siRNA の一部の核酸を bridged nucleic acid (BNA) に置き換える修飾化 siRNA (siBNA) を作製した。

(小文字は RNA、大文字は BNA)

(siBNA-1)

5'-GTCATcacacugaauaccautt-3'

(siBNA-2)

5'-GTcaTcacacugaa T acCaurtt-3'

1-3. 修飾化核酸の作製

siBNA-2 を基本構造として、さらにホスホロチオエート化、2' -OMe 化、コレステロール化の修飾を行った。以下にその配列構造を示す。

siB2PT-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagugaugac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1M

Sense :

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagu(M)gu(M)guac(dT)(dT)-3'

siB2PTC-1B

Sense:

5'-GTcsasTcsascacugaaTascscCasasus(dT)(dT)-TEGchol3'

Antisense:

5'-auugguauucagTgTguac(dT)(dT)-3'

大文字が 2' ,4' -BNA、s はホスホロチオエート化、M は 2' -OMe 化、TEGchol はコレステロール修飾、小文字は RNA、dT は

DNA のチミンを表す。

1-4. ApoB siRNA の *in vitro* におけるスクリーニング

マウス正常肝細胞 NMuLi 細胞を用いて、ApoB siRNA のスクリーニングを行なった。1 日目に細胞を 6-well plate に撒き、2 日目にそれぞれの siRNA を 1 well あたり 100 pmol ずつ用いて、Lipofectamine RNAiMAX とのコンプレックスを作製してトランスフェクションを行なった。3 日目にプレートから細胞を回収し、Trizol を用いて RNA の抽出を行なった。

1-5. 血清耐性実験

ApoB-1 siRNA および siBNA-1、siBNA-2 を用いて、以下の実験を行なった。マウスの血清 100 μ l に各 siRNA (siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2) を 40 pmol ずつ添加し攪拌して、37°C でインキュベートした。また、添加攪拌した後直ちに (インキュベート開始前) 5 μ l を採り出し、これを 1.5 ml 容量のチューブに入れて液体窒素で瞬間凍結させた。また、この時のサンプルを 0 min とした。

血清から、経時的にサンプリングを行い (0~1500 分) -80°C で保存した。測定時に解凍し、Proteinase K (TaKaRa) 5 μ l と DMSO 5 μ l を入れて 30 分間、37°C でインキュベートし、6× Sample Buffer を 3 μ l 入れ、20% TBE gel (Invitrogen) を用いて電気泳動を行った (始め 75V、15 分の後、110V で 120 分)。電気泳動の後、ゲルを同じ TBE

Buffer 100ml 中に入れ、10 μ l の SYBR Gold (Invitrogen) 入れて 20~40 分ほど浸透した。その後、FujiFilm 製の LAS-4000 mini で撮影を行い、Image J によりゲルの photo image にあるバンドの暗度から、ApoB mRNA の発現量を定量化した。

1-6. ApoB siRNA の *in vivo* におけるスクリーニング (ハイドロダイナミクス法)

ApoB siRNA の *in vitro* におけるスクリーニングの結果、有効であると判断された siRNA について、*in vivo* スクリーニングを行なった。バックグラウンドを C57BL6/J にあわせたアポ E ノックアウトマウスを用いて、12 時間の空腹の後に尾静脈より採血した。さらに、尾静脈より hydrodynamics 法を用いてそれぞれの ApoB siRNA を投与した。すなわち、siRNA 20 μ g を 5% sucrose 溶液 2 ml に溶解して、尾静脈より 5 秒間で投与した。1 日後、2 日後、3 日後、4 日後に採血して、HPLC によりリポ蛋白分画中のコレステロール値を測定した。4 日後には、肝臓を取り出して細切し、液体窒素にて凍結して -80°C 保存して mRNA 抽出、定量化に供した。

1-7. 修飾化核酸の *in vivo* 遺伝子発現抑制実験 (尾静脈注射)

被験動物として 6 週齢のマウス C57BL6/J (雄: 日本クレア) を用いた。二週間の高脂肪食負荷の後、0 日目に採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。3 日目

に再度採血して siBNA-1 あるいは siApoB-1 を 10 pmol/g 体重の割合で静脈内投与を行った。4 日後に下大静脈から採血した後、PBS で上腸間膜静脈より灌流し、終了後、肝臓を採取し、PBS で洗浄した後、細切、液体窒素で瞬間凍結した後、 -80°C で保存した。凍結した肝臓の切片を 5ml の TRIzol Regent (Invitrogen) 内で、ホモゲナイズし AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、*in vitro* 実験と同様の real time RT-PCR 法を用いて mRNA の定量を行なった。

試験期間中に採取した血液は、遠心して血清を分離し、血清総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値、及び HDL コレステロール値を Wako のコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業(株)製) を用いて測定した。また、同様に Wako のトランスアミナーゼ CII-テストワコーで ALT・AST を測定し、肝臓障害度を評価した。さらにリポタンパク分析のため、スカイライトバイオテック株式会社において、HPLC によるリポタンパクの 20 分画のコレステロール値を解析した。

1-8. 細胞および肝臓の mRNA 量の定量

TRIzol reagent を用いて回収した細胞および肝臓を、AGPC 法を用いて RNA を抽出した。その後、10 μg 量の RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、SYBR Green I (Applied Biosystems) を用いたインターカレーター

法で Real-Time PCR を行い目的 mRNA の量を定量した。PCR Primer の配列を以下に示す。

ApoB- Forward primer:

TGGGCAACTTTACCTATGACTT

ApoB-Reverse primer:

AAGGAAATGGGCAACGATA

GAPDH-Forward primer:

CAAAATGGTGAAGGTCGGTGTG

GAPDH-Reverse primer:

ATTGATGTTAGTGGGGTCTCG

1-9. 肝臓でのアポ B100 の蛋白量の測定

凍結保存されていた肝臓切片を Ripa Buffer (Sigma) と complete 20 (Roche) の入ったチューブに入れ、ホモゲナイズした後、Amicon ultra centrifugal filter units-50k (Millipore) を用いて遠心濃縮した。濃縮産物を蒸留水で 200 μL 程度までスケールアップし、BioRad Dc protein assay (BioRad) によりタンパク質濃度を測定した。60 μg 量のタンパク質を採り、2 \times Sample Buffer (Invitrogen) と蒸留水で 18 μL にしてサンプルを調製した。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate gel を準備し Tris-Acetate SDS Running Buffer を泳動槽に入れた。その後、サンプルを 15 μL ずつ well に入れ、75V, 15 分 \rightarrow 120V, 30 分 \rightarrow 150V, 130 分、泳動した。PVDF メンブレンを用意し、Invitrogen 社の Transfer 用モジュールを用いて 200 mA, 140 分で PVDF メンブレンに転写した。Blocking One (ナカライテスク) を用いて転写後、ブロッキングを 4°C 、オーバーナイトで行っ

た。一次抗体は anti-mouse apoB-100, 48 antibody (Biodesign)を 750 倍希釈で使用し、2 時間、室温で反応させた後、PBST で 10 分洗浄を 4 回行い二次抗体反応を行った。二次抗体反応には Horseradish peroxidase-labeled secondary anti-rabbit IgG-antibody (Amersham) を 15000 倍希釈で使用した。その後、FujiFilm 製の LAS-4000 mini で撮影を行い、Image J によりゲルの photo image にあるバンドの暗度を Image J software を用い評価した。

2. siRNA キャリアーの合成と *in vitro* および *in vivo* 評価 (山岡)

2-1. プルラン-siRNA コンジュゲートの合成

プルラン(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 (ApoB : sense 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAUdTdT-3' antisense

3'-dTdTTCACAGUAGUGACUUAUGGUU A-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。

2-2. プルラン-ポリエチレンイミンコンジュゲートの合成

ポリ (エチレンオキサゾリン) (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プルランを選択し、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 中でプル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、プルランと 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)。

2-3. プルラン-siRNA コンジュゲートの導入実験

これまでに、プルラン-siRNA 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、プルラン-siRNA のみの導入を行った。導入するプルラン-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 のプルラン-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。

2-4. プルラン-PEI の中和滴定

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 のプルランを用いて合成したポリマー (プルラン 5900-PEI、プルラン 107000-PEI) を用いた。PEI、プルラン 5900-PEI、プルラン 107000-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、プルラン 5900-PEI には 1.1 ml、プルラン 107000-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、プルラン 5900-PEI は 1.63 ml、プルラン 107000-PEI は 1.825 ml である。

2-5. プルラン-PEI を用いた siRNA との複合体形成

中和滴定より算出したポリマー中のカチオン量から、プルラン-PEI 5 μ l と siRNA 4 μ l (200 pmol) を混合し、37 $^{\circ}$ 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。

2-6. プルラン-PEI/siRNA 複合体を用いた ApoB mRNA 発現定量

プルラン-PEI による siRNA のデリバリーについて、*in vitro* で検討した。プルラン

-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 の条件下でプルラン-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 $^{\circ}$ 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。

2-7. プルラン-PEI/siRNA 複合体の細胞毒性

毒性試験は、プルラン-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、プルラン-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。

2-8. プルラン-PEI/siRNA 複合体の *in vivo* 血中投与による治療効果

プルラン 5900-PEI、プルラン 107000-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/6J) 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 μ g (196 pmol) の siRNA を尾静脈投与した。

複合体の形成は、前述と同様、プルラン 5900-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 μ l 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、プルラン 107000-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、プルラン 107000-PEI/siRNA 複合体 150 μ l をマウス尾静脈より投与した。48 時間後、同量のプルラン 107000-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。

2-9. 構造制御された siRNA キャリアーの合成 (DM キャリアー)

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 回繰り返す、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 時間攪拌を行った。4 時間、透析を行い、その後、凍結乾燥を行い回収した。

2-10. DM キャリアー/siRNA 複合体のゲル電気泳動

得られた DM キャリアーと siApoB 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 15min 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。

2-11. DM キャリアー/siRNA 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。

2-12. DM キャリアー/siRNA 複合体の細胞毒性試験

毒性試験は、NMuLi 細胞に DM 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、DM 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。

2-13. DM キャリアー/siRNA 複合体による ApoB mRNA 抑制

DM 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。DM 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 DM 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。

2-14. DM キャリアー/siRNA 複合体の細胞内取り込み実験

初めに、YOYO と siApoB 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、DM 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。

2-15. DM キャリアー/siRNA 複合体の *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

DM 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/6J) 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 μ l 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 DM 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。

3. 機能性キャリアーの経口投与後の *in vivo* イメージング (飯田)

3-1. プルランを有するポリマーの合成

プルラン修飾ポリエチレンイミン(PEI)ポリマーはプルラン (分子量 5,900 または 107,000、0.3 unit mmol) 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) (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。

3-2. ポリマーの物性評価

異なるポリマーのカチオン (C) に対する siRNA のアニオン (A) の割合 (C/A 比) を有する複合体のサイズとゼータポテンシャルをシスメックス社の Zetasizer(Nano series) を用いて測定した。

3-3. 複合体の毒性評価

異なる C/A 比の複合体をマウスに血中投与した後、死亡率と摘出した臓器での障害を調べた。コントロールとして PEI/siRNA 複合体を用いて同様の実験を行った。

3-4. ポリマー/ApoB siRNA 複合体の血中投与による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。プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体または 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、3、6、12、および 24 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。

3-5. 高コレステロールモデルマウスを用いた治療効果の評価

マウスはプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (C/A 比 192) 投与群、PEI/siRNA 複合体 (C/A 比 3) 投与群、siRNA 単独投与群、およびコントロールとしての PBS 投与群に分けて実験を行った。高脂肪食の 10 日間給餌により高コレステロールモデルマウスを作製し、11 日目から 3 日間連続投与 (1 日 1 回投与) した。投与後 4 日目に血液採取と肝臓摘出を行い、血中コレステロール値と肝臓における Apo B mRNA の変化を調べた。

3-6. 経口投与用のキャリアーの創製とマウス経口投与実験

凍結乾燥した β 1,3-D-glucan に Alex 750

蛍光ラベル化 ApoB siRNA の溶液 (siRNA : β 1,3-D-glucan (w/w) の比率=0.5) を添加し、室温で 3 時間放置した。その後、PEI 溶液 (PEI : siRNA (w/w) の比率=80) を添加し、さらに 6 時間放置することで siRNA と PEI との複合体を形成した。

β 1,3-D-glucan 内で、PEI と siRNA との複合体形成は顕微鏡観察で確認した。複合体を封入した β 1,3-D-glucan をマウスに経口投与してから 6 時間後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る蛍光強度を測定した。

4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1 (笹栗)

4-1. 細胞培養

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。また、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。ヒト由来大腸がん HCT-116 細胞および HeLa ヒト子宮頸がん由来 Hela 細胞の培養には 10% ウシ胎仔血清を加えた DMEM 培地を用いた。

4-2. 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。

4-3. 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。

4-4. PGE2 濃度測定

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

4-5. ヒト mPGES-1 プロモーター活性測定

24 穴培養用プレートに 1×10^5 個のがん由 HCT-116 細胞または HeLa 細胞を撒き、24 時間後、ヒト mPGES-1 プロモーター (-35/-1068 bp) 組み込んだホタルルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basic) と導入効率の適正化のためのウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター (pRL-SV40)を細胞に導入した。24 時間後、DIF-1 (10 または $30 \mu\text{M}$) で 6、12、及び 24 時間処理した。処理後の細胞におけるルシフェラーゼ活性を Promega 社のキット Dual Luciferase Assay System を用いて測定した。

4-6. リアルタイム PCR 解析

刺激した細胞を回収し、TRIzol 試薬 (GIBCO) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出した RNA は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)を用いて cDNA とし、リアルタイム PCR 装置 ABI-7500 を用いて TaqMan

Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems) にて解析を行った。プライマーは GAPDH、mPGES-1 それぞれ Hs99999905_m1、Hs01115610_m1 (Applied Biosystems) を使用した。

(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. 修飾化核酸の作製と *in vitro* および *in vivo* 評価 (斯波)

1-1. ApoB siRNA の配列選択

ApoB のシーケンスより、Profile Score、GC Score、Load Score、Specificity Score などのパラメーターを用いて、Total Score が 90 点以上のもの 10 個を選択した。既報 (Nature 432(11):173-177, 2004 年)の配列を No.11 に ApoB-1 として記載した。

1-2. 選択した ApoB siRNA の *in vitro* スクリーニング

配列により選択された ApoB siRNA の No.1~10(ApoB-2~11)および ApoB-1 を用いてマウス肝細胞にトランスフェクションを行なった。トランスフェクション 1 日後に細胞をかきとり、RNA を精製し、Real Time RT-PCR を用いて ApoB および GAPDH の mRNA 量の定量を行なった。一番効果を示したのは、ApoB-1 であった。

ApoB-7~11 も効果を有することが示された。ApoB-1 は、21 塩基対を有しており、19 塩基対用のソフトではスコアを計算することが出来ないため、1 つずつ塩基をずらして 3 種類の siRNA ApoB-1a、ApoB-1b、ApoB-1c としてスコアを計算した。いずれも、siRNA としてはほとんど効果がない、というスコアであった。

1-3. ApoB siRNA の *in vivo* におけるスクリーニング

in vitro スクリーニングで最も効果を示した ApoB-1 および ApoB-10 を hydrodynamics 法を用いてアポ E ノックアウトマウスに投与した。ApoB-1 投与により、1 日目から 4 日目まで、血清総コレステロール値および VLDL+LDL-コレステロール値の有意な低下を認めたが、ApoB-10 投与によっては、1 日目のみの低下にとどまっていた。4 日後の肝臓でのアポ B mRNA 量は、ルシフェラーゼ siRNA 投与のコントロール群より低下していたが、有意な差は認めなかった。

1-4. 血清耐性実験

血清耐性実験の結果、対応する未修飾の siRNA は、その血清半減期が 138 分であるのに対して、siBNA-1 の血清半減期は 267 分、siBNA-2 の血清半減期は 1107 分であった。siRNA の一部 BNA 化することにより、血清中での耐性が極端に上昇すること、BNA 化する核酸の位置によって、血清耐性の程度が大きく変化することがわかった。

1-5. 修飾化核酸の *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

siApoB-1、siBNA-1、siBNA-2 の濃度依存的遺伝子発現抑制実験の結果、siBNA-1、siBNA-2 とともに、マウス肝細胞株において siApoB-1 と同様の濃度依存的アポ B 遺伝子発現抑制効果を示すことがわかった。

1-6. 修飾化核酸の *in vivo* 遺伝子発現抑制実験

生理食塩水を投与した対照群 (Saline 投与群)、及び siApoB-1 または siBNA-2 をそれぞれ投与した被験群における肝臓での ApoB の mRNA の発現量を Relative CT Method により評価した結果、*in vivo* で、siBNA-2 は、ApoB に対する未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも有意に ApoB の mRNA 発現を抑制した ($P < 0.05$)。このことから、siBNA-2 は、生体内で、未修飾 siRNA (siApoB-1) よりも高い RNA 干渉効果を発揮することがわかった。siRNA を BNA 化することにより、生体内で有効な低分子干渉 RNA 分子として機能することが確認された。

siBNA-2 投与群は、生理食塩液や siApoB-1 投与群に比し、総コレステロールおよび VLDL コレステロール値は 2 日後に有意に低下、LDL コレステロール値は 1 日後に有意に低下を認めた。一方、HDL コレステロール値は、有意な変化を認めなかった。これらのことから、siBNA-2 は、肝臓でのアポ B mRNA 発現を低下させること

により、血中の総コレステロール値、VLDL コレステロール値、LDL コレステロール値を低下させることが示された。

修飾化 siRNA の毒性を調べるために、siApoB-1、siBNA-2 投与後のマウス血清における AST および ALT 値を測定して、生理食塩液投与群と比較した。生理食塩液投与群に比べて siBNA-2 投与群で AST、ALT の低下を認めた。

1-7. siBNA-2 シリーズの *in vitro* 遺伝子発現抑制実験

siApoB-1, siBNA-2, siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M, siB2PTC-1B をマウス肝細胞にトランスフェクションして、*in vitro* における標的遺伝子発現抑制効果を調べた。siApoB-1、siBNA-2 にて、アポ B mRNA 発現量は 95% 以上の低下を認めたが、siB2PT-1, siB2PTC-1, siB2PTC-1M では 80% 程度の抑制にとどまった。また、アンチセンス鎖に 2', 4' -BNA を組み込んだ siB2PTC-1B は OMe で同様に修飾した siB2PTC-1M とは異なり遺伝子発現抑制効果が 60% 程度であり、活性はやや低下を認めた。

1-8. siBNA-2 シリーズの *in vivo* における遺伝子発現抑制および毒性評価

機能性核酸の投与後の体重は、PBS コントロール群に対し siApoB-1 や siBNA-2 投与群では投与後、顕著に減少している事がわかる。また、siB2PT-1 投与群では投与後、コントロール群とは有意差がないものの

減少傾向にあった。

それぞれの機能性核酸投与後の血清総コレステロール値変化は、siApoB-1 投与群で総コレステロール値が Day 2 において有意に減少しており、siBNA-2 投与群が有意差は無いが最も高い効果を示しており、68% の低下を認めた。Day 7 においても全ての機能性核酸において 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投与後の肝臓での ApoB mRNA の発現量は、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 Day 14 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投与後の肝臓での apoB-100 タンパク質発現量の変化を測定したところ、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値を調べた。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。

2. siRNA キャリアーの合成と *in vitro* および *in vivo* 評価 (山岡)

2-1. プルラン-siRNA コンジュゲートの合成

精製後、白色の粉末を得た。得られたサンプルは水に易溶であった。siRNAが1 µg/1 µlになるように調整し水に溶解させた。85 °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。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つ

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。

2-2. プルラン-ポリエチレンジミンコンジュゲートの合成

脱水縮合剤の量、ポリエチレンジミンの仕込量を変化させて合成した。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ジミンが多い場合、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。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。

2-3. プルラン-siRNA コンジュゲートの導入実験

これまでに、Lipofectamine RNAiMAXを用いてプルラン-siRNAをNMuLi細胞へ導入した結果、プルラン-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、プルラン-siRNAはApoBの発現を著しく抑制していることが示された。次に、プルラン-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に調製したプルラン-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。

2-4. プルラン-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。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。

2-5. プルラン-PEI を用いた siRNA との複合体形成

プルラン-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。プルラン₅₉₀₀-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、プルラン₁₀₇₀₀₀-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。

2-6. プルラン-PEI/siRNA 複合体を用いた ApoB mRNA 発現定量

プルラン-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、プルラン₅₉₀₀-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。

2-7. プルラン-PEI/siRNA 複合体の細胞毒性

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、プルラン-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、プルラン₅₉₀₀-PEI では、C/A 比の増加に伴う毒性は見られなかった。

2-8. プルラン-PEI/siRNA 複合体の *in vivo* 血中投与による治療効果

プルラン-PEI による siRNA *in vivo* デリバリーを検討した。プルラン₅₉₀₀-PEI を用いて

siRNA を単回投与した結果、PBS 投与群とプルラン₅₉₀₀-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、プルラン₅₉₀₀-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。

さらに、プルラン₁₀₇₀₀₀-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。

2-9. 構造制御された siRNA キャリアーの合成 (DM キャリアー)

DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl galactose 及び DMAEMA と 6-o-vinyl adipoyl glucose の共重合を行った。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 DM 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。

2-10. DM キャリアー/siRNA 複合体のゲル電気泳動

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。

2-11. DM キャリアー/siRNA 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。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 μm 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。

2-12. DM キャリアー/siRNA 複合体の細胞毒性試験

DMキャリアー中のカチオンによる細胞毒性について、DM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。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DM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。

2-13. DM キャリアー/siRNA 複合体によるApoB mRNA 抑制

DM 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。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。

2-14. DM キャリアー/siRNA 複合体の細胞内取り込み実験

YOYO ラベル化した siApoB と DM 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。取り込み開始後 1 時間では、いずれの DM 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、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。

2-15. DM キャリアー/siRNA 複合体の *in vivo* 尾静中投与による治療効果実験

DM キャリアーによる siRNA *in vivo* デリバリーを検討した。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 DM 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。

3. 機能性キャリアーの経口投与後の *in vivo* イメージング (飯田)

3-1. ポリマーの合成と物性評価

プルラン修飾 PEI を合成した。PEI 1 mol% に対するプルランの修飾率は分子量 5,900 のプルランを有するポリマーの場合は 0.69 mol%、分子量 107,000 のプルランを有するポリマーは 0.64 mol% であった。プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体のサイズは C/A 比が減少するに従い、サイズの増加が観察された。中性のゼータポテンシャル付近で複合体を強く形成することを確認した。

3-2. 複合体の毒性評価

PEI/siRNA 複合体を投与したマウス群で

は、C/A 比 6 で 50%の死亡率と肺組織での損傷を確認した。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が確認された。一方、プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体の投与群では C/A 比 192 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。

3-3. ポリマー/ApoB siRNA 複合体の血中投与による肝臓ターゲティングおよびイメージングの評価

プルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体の投与群では、24 時間まで強い蛍光強度が肝臓から観察された。低分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (PEI-pullulan(MW, 5,900)/siRNA) よりも、高分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA) のほうが優れた血中安定性を示した。一方、PEI/siRNA 複合体 (C/A 比 3) 投与群では、肝臓よりも肺への集積が高いことが分かった。

3-4. 高コレステロールモデルマウスを用いた治療効果の評価

高脂肪食を 10 日間給餌して作製した高コレステロールモデルマウスに 3 日間連続投与 (1 日 1 回投与) を行った。高い分子量のプルラン修飾 PEI ポリマー/siRNA 複合体 (PEI-pullulan(MW, 107,000)/siRNA) 投与群では TC (トータルコレステロール)、LDL、および VLDL 値の低下と肝臓 Apo B siRNA の発現量の減少が確認できた。一方、

siRNA 単独投与群、または PEI/siRNA 複合体投与群では、コントロール群 (PBS 投与群) と比べて変化はなかった。

3-5. 経口投与用のキャリアーの創製と経口投与による評価

パン酵母である β 1,3-D-glucan の中で PEI と siRNA が複合体を形成していることが顕微鏡観察で確認できた。また、マウス経口投与実験では、わずかながら肝臓と腎臓で蛍光強度が上昇していることが確認できた。

4. 創薬ターゲットとしての mPGES-1 (笹栗)

4-1. mPGES に対する siRNA の効果

THP-1 に mPGES-1 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。用いた 2 種類の siRNA は両方とも、LPS による mPGES-1 の発現誘導を抑制した。

4-2. DIF ファミリーによる mPGES-1 のタンパク質発現抑制

PMA を 24 時間作用させて THP-1 細胞に分化を誘導し、DIF-1 (30 μ M) にて 3 時間刺激した後、LPS (1 または 10 μ g/ml) で 24 時間刺激した。回収したサンプルの COX-2 および mPGES-1 のタンパク質発現について検討したところ、DIF-1 での前処置によりこれらの酵素の発現が抑制されていた。さらに、DIF-1 による mPGES-1 発現抑制の時間依存性の検討を行った。PMA

で分化誘導を行った THP-1 細胞を LPS (10 μ g/ml) で 24 時間刺激した後 DIF-1 (30 μ M) を添加し 1、3、6、12、24 時間後にサンプルを回収した。LPS で 24 時間刺激することにより mPGES-1 の発現は明らかに上昇し、時間経過とともにさらに発現が上昇していく。一方 LPS で 24 時間刺激後に DIF-1 を添加した群では、時間経過にしたがって若干の発現上昇が認められるものの、コントロール群と比較して明らかな発現抑制効果が認められた。次に DIF-1 の濃度を変化させて検討を行ったところ、濃度依存性が認められた。DIF-1 のアナログの一つである DIF-3 の効果について検討したところ、DIF-3 にも DIF-1 と同様に mPGES-1 発現抑制作用が認められた。この結果から、mPGES-1 の発現抑制は DIF ファミリーに共通した作用である可能性が示唆された。

4-3. DIF-1 による mPGES-1 mRNA 発現抑制

PMA で分化誘導を行った THP-1 細胞を LPS (10 μ g/ml) で 24 時間刺激した後 DIF-1 (30 μ M) を添加し 24 時間後にサンプルを回収し総 RNA を抽出した。これを用いてリアルタイム PCR 法にて mRNA の発現量の変化を検討した。DIF-1 の添加により明らかな mPGES-1 の mRNA の発現量の低下が認められた。この結果から、DIF-1 が mRNA の発現量を低下させることにより、mPGES-1 のタンパク質発現量を減少させていることが示唆された。

4-4. DIF-1 の他 PGES への影響

PGES には、mPGES-1 の他にも数種類存在するので、他の PGES に及ぼす DIF-1 の効果を検討したが、特に変化はみられなかった。

4-5. がん細胞における非誘導性 mPGES-1 の DIF-1 によるタンパク質発現抑制

子宮けいがん細胞および大腸がん細胞では、炎症性の刺激が存在しなくても mPGES-1 が発現していることが知られている。そこで、それらの細胞 mPGES-1 の発現の及ぼす DIF の影響について検討した。両細胞において時間依存性に DIF により mPGES-1 の発現が抑制されたが、その効果は刺激後 6 時間以降で明らかに認められた。

4-6. DIF-1 の mPGES-1 プロモーター活性への影響

次に DIF-1 の mPGES-1 プロモーター活性に及ぼす影響について検討を行った。両がん細胞において、DIF-1 は mPGES-1 のプロモーター活性を抑制し、その効果はタンパク質の発現抑制よりも早い時間経過を示した。特に HeLa 細胞では刺激後 1 時間から、明らかな活性の低下が認められた。

4-7. DIF-1 による mPGES-1 mRNA 発現抑制

HeLa 細胞に DIF-1 (30 μ M) を添加し 1、3、6 時間後にサンプルを回収し総 RNA を抽出した。これを用いてリアルタイム PCR 法にて mRNA の発現量の変化を検討した。