

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 °C でインキュベートした。24 時間後、QuickGene RNA cultured cell kit 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。

B-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。

B-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 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、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 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、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

μl 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。

B-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。結果を Table 4 に示す。

B-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 15 min 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。

B-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。

B-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。

B-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 kit 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。

B-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。

B-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。

(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

C-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 (Table 1)。得られたサンプルは水に易溶であった。siRNA が 1 μ g/1 μ l 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 (Figure 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 μ g 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。

C-2. プルラン-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。

C-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

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 (Figure 2)。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 (Figure 3)。

C-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 (Figure 4)。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。

C-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 (Figure 5)。

C-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 (Figure 6)。

C-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 (Figure 7)。

C-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 (Figure 8)。

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 (Figure 9)。

C-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。結果を Table 4 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 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。

C-10. DM キャリアー/siRNA 複合体のゲル電気泳動

アクリルアミドゲルの電気泳動写真の結果を Figure 10 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。

C-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。結果をFigure 11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 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。

C-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 (Figure 12)。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。

C-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 (Figure 13)。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。

C-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 (Figure 14)。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。

C-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 (Figure 15)。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。

D. 考察

家族性高コレステロール血症を克服するための肝指向性キャリアーの開発を行った。我々は、アシアロ糖タンパクレセプターに着目し、キャリアーにプルランまたはガラクトースユニットを持たせることで、siApoB を肝臓へデリバリーすることに成功した。

初めに、遺伝子導入試薬を用いてプルラン-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、プルランを用いることで 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、異なる濃度のプルラン-siRNA のみを導入した結果から、プルラン修飾のみでは、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プルランが結合した肝指向性プルラン-PEI をキャリアーとして選択した。*in vitro* において、プルラン-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、プルラン₅₉₀₀-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 siRNA 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、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ことから、合成したプルラン-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、プルラン₅₉₀₀-PEIを用いて単回投与、あるいは、プルラン₁₀₇₀₀₀-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、プルラン-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。

更に、プルラン-PEI を用いた実験の知見を基に、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、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、顕微鏡観察の結果、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路の取り込みが起り、エンドサイトーシスと共に、レセプター経路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。

これらの結果から、siApoB を肝臓へ特異的に、効率良くデリバリーできることが示唆された。これより、キャリアーを用いることで、少ない投与量で、最大の効果を発揮させることができる可能性を見出すことができた。

E. 結論

プルラン-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、プルラン-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。

また、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、レセプター経路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て、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. Yamaoka, S-H. Hyon, M. Kodama, and H. Uyama. Preservation of Porcine Hepatocytes in 3D Bioreactor at Room Temperature using Epigallocatechin-3-gallate, Tissue Engineering, 15(3), 345-353 (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,

- 3) S. Kakinoki, S. Uchida, T. Ehashi, A. Murakami, and T. Yamaoka. Modification of PLA Scaffolds Using Bioactive Peptide-Oligo(Lactic Acid) Conjugates The Japanese Peptide Society, 449-450 (2009)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) T. Yamaoka. Transcription efficiency in the nonviral gene transfer, 高分子. 2008; 7
- 10) 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
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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. 総括

1) 山岡哲二.

第2章先端科学技術と DDS 開発. Pharm tech japan.25(13)15-18(2603-2606)(2009)

3. 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. 大阪. 2009 年 7 月 11 日

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) 橘洋一、鎌田和加子、姜貞勲、斯波真理子、山岡哲二. 肝ターゲティングを目的とした si-RNA キャリアの開発. 日本バイオマテリアル学会 第 4 回関西若手研究発表会 大阪. 2009 年 8 月 7 日

4) Y. Tachibana, W. Kamata, J.H. Kang, M. Harada-Shiba, and T. Yamaoka. Development of si-RNA carrier for liver targeting. Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium. 福岡. 2009 年 11 月 4 日

5) W. Kamata, Y. Tachibana, J.H. Kang, H. Miyata, M. Harada-Shiba, S. Obika, and T. 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. 福岡. 2009 年 11 月 4 日

6) J.H. Kang, Y. Tachibana, W. Kamata, M. Harada-Shiba, and T. 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. 福岡. 2009 年 11 月 4 日

7) 橘洋一、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

8) 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

9) 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

10) 東晃至、橘洋一、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

11) 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

12) 東晃至、橘洋一、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

13) 山岡哲二. Novel biomaterials for cell transplantation. TERMIS-AP 2008. 台北 (台湾) 2008 年 11 月 7 日

14) 柿木佐知朗、平工香織、山岡哲二. ラミ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

2010 年 9 月 1 日

- 15) 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
- 16) 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ャリアの創生-. 第 59 回高分子学会年次大会. 横浜. 2010 年 5 月 27 日
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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.

22) 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

23) 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

24) 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

25) 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
橘 洋一
鎌田 和加子

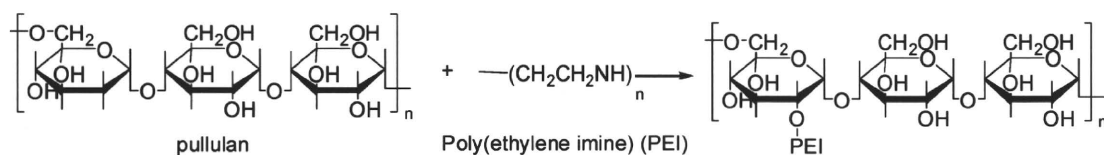
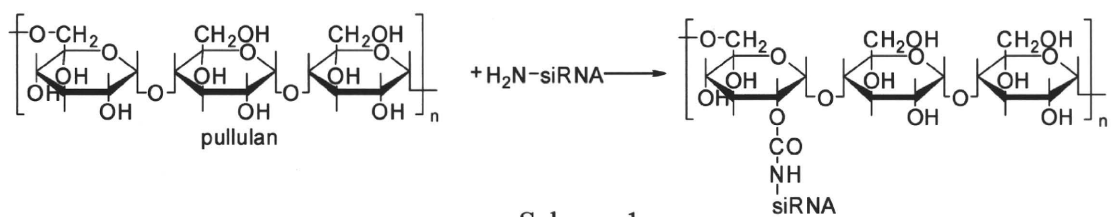


Table 1. Synthesis of pullulan and si-RNA conjugates

	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

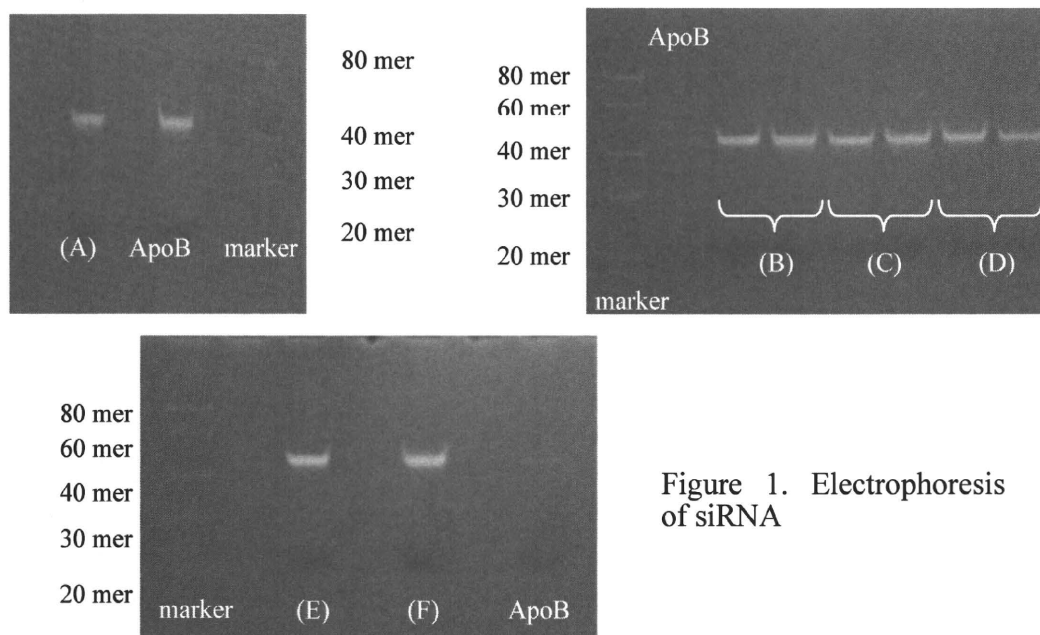


Table 2. Synthesis of pullulan and PEI conjugates

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

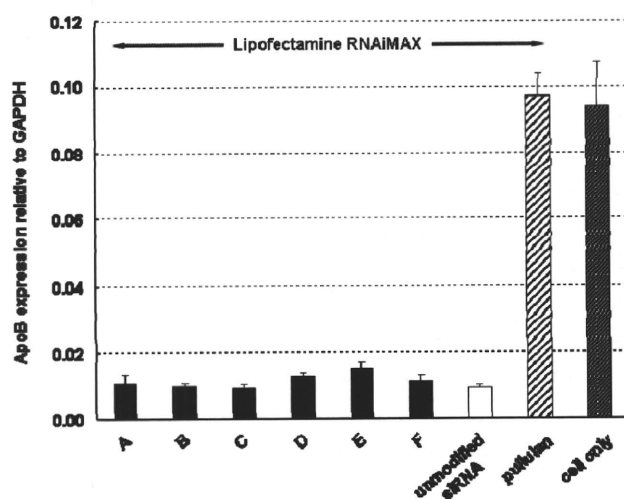


Figure 2. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with 50 nM Pullulan-siRNA using Lipofectamine RNAiMAX for 24 hours. Pullulan-siRNA (■), unmodified siRNA (□), pullulan (▨), no transfection (▩).

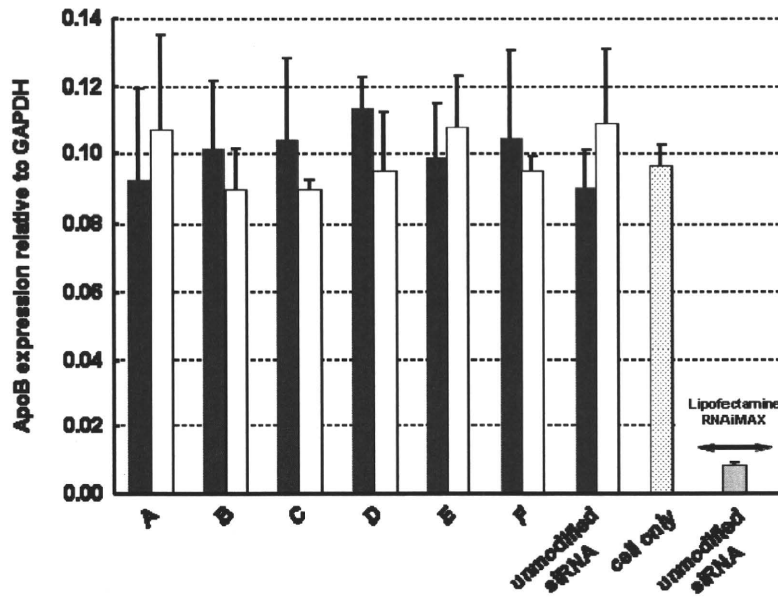


Figure 3. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with 50 nM or 250 nM Pullulan-siRNA without Lipofectamine RNAiMAX. siRNA 50 nM (■), 250 nM (□), 50 nM unmodified siRNA was transfected using Lipofectamine RNAiMAX (■).

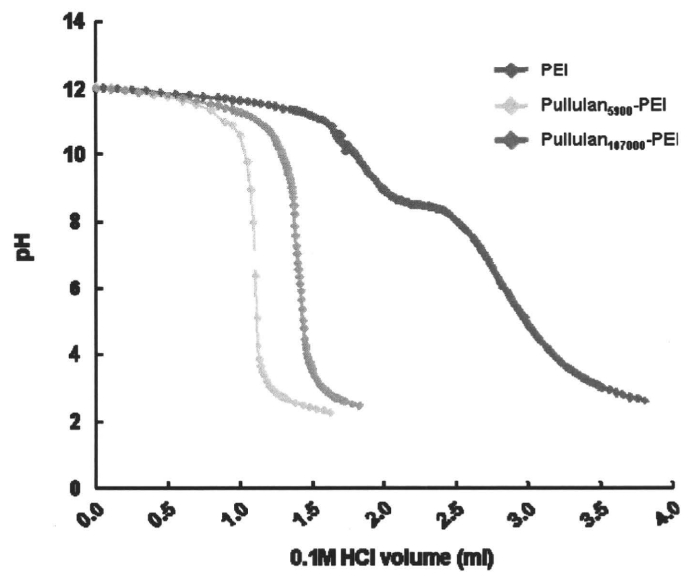


Figure 4. Titration curve of PEI and Pullulan-PEI. A solution of polymer in 150 mM NaCl was titrated with 0.1 M HCl.

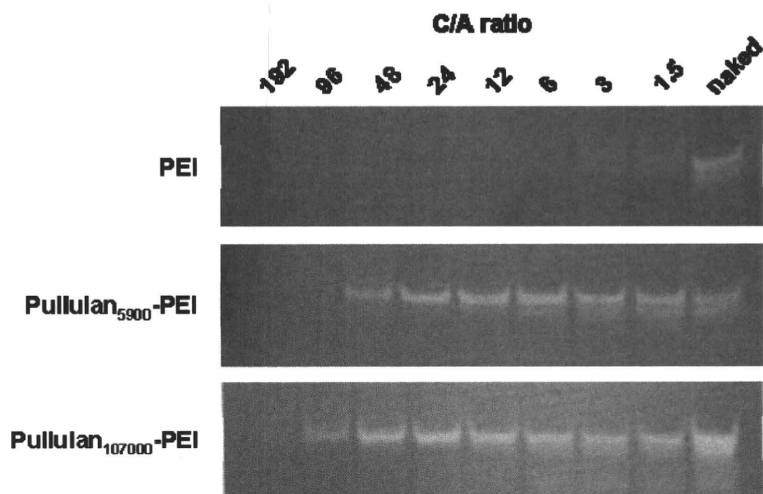


Figure 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of polymer/siRNA complexes at various C/A ratios. Polymer/siRNA complexes containing 20 pmol of siRNA were loaded on the 19 % native polyacrylamide gel. The complexes were electrophoresed at 150 V for 60 min. The gel was illuminated on a UV illuminator to identify the formation of polymer/siRNA complexes after adding 0.1 % ethidium bromide.

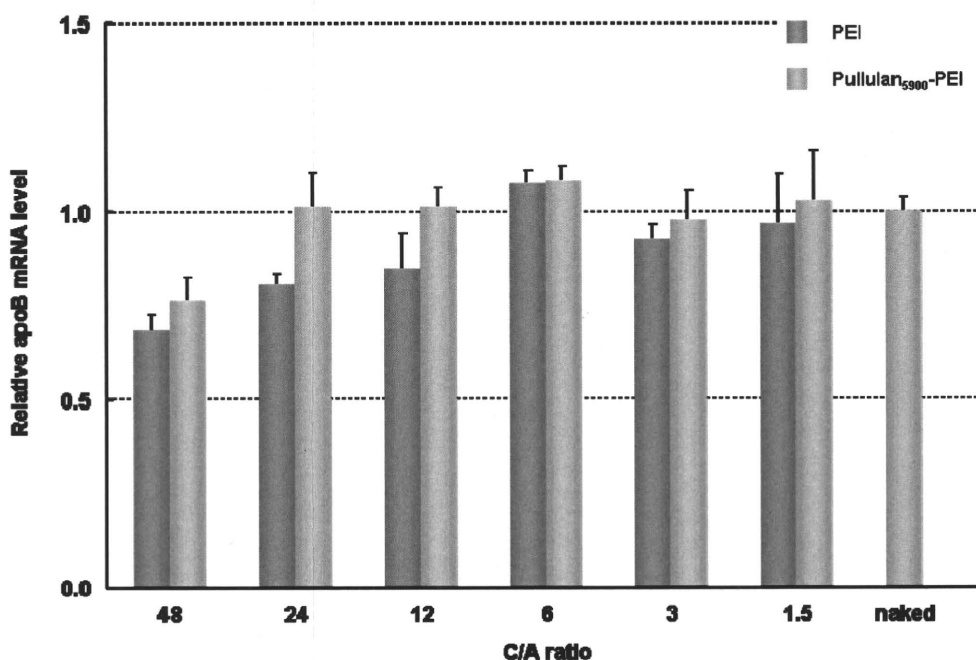


Figure 6. Delivery of siRNA to NMuLi cells at various C/A ratios. NMuLi cells were seeded into 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well. The final siRNA concentration added into culture medium was 10 nM. Expression of apoB messenger RNA (mRNA) was measured at 24 h after the transfection by the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

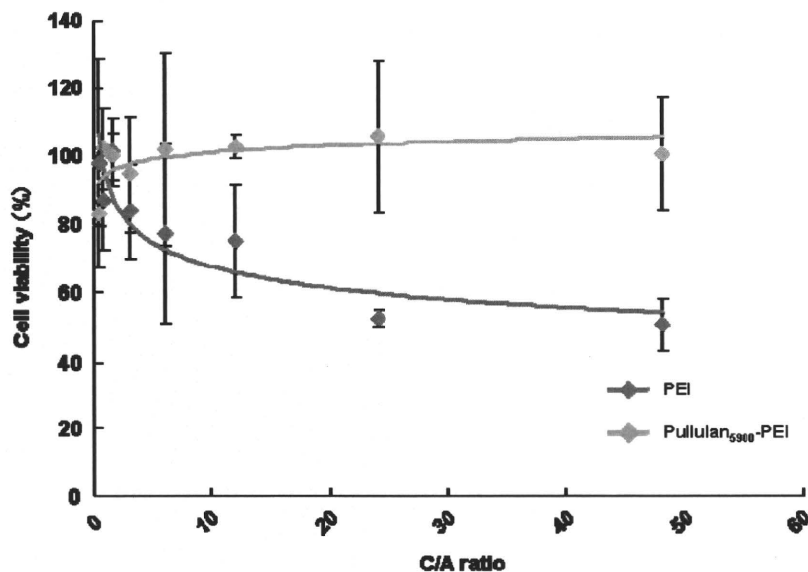


Figure 7. Cytotoxicity of polymer/siRNA complexes at several C/A ratios. NMuLi cells were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well. At 24 h after adding polymer/siRNA, cell viability was detected after adding polymer/siRNA by WST-1. A 10 μ L WST-1 was added to each well, and cells 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.

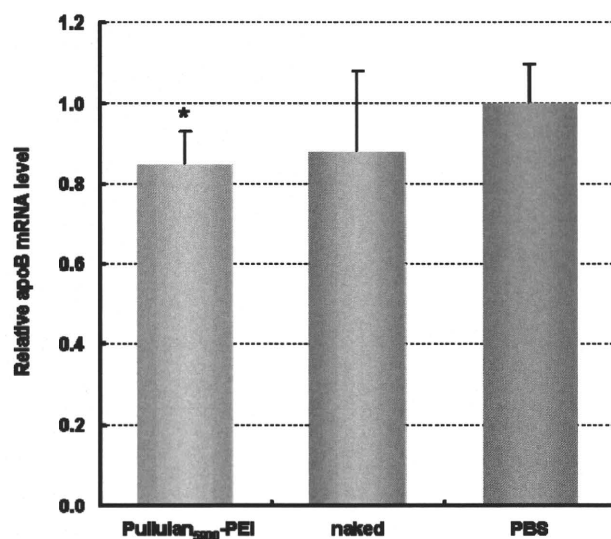


Figure 8. Silencing of apoB mRNA in liver after single i.v. injection. Pullulan₅₉₀₀-PEI/siRNA (3 μ g) complex (C/A=48) was injected to C57BL/6 mice fed a high fat diet for 2 weeks via tail vein. The liver was removed at 96 h after the injection and apoB mRNA were assayed using the realtime PCR. ApoB mRNA were measured relatively of GAPDH mRNA ($n = 3$). Data are shown as mean values \pm SD. * $P < 0.01$, compared with PBS group.

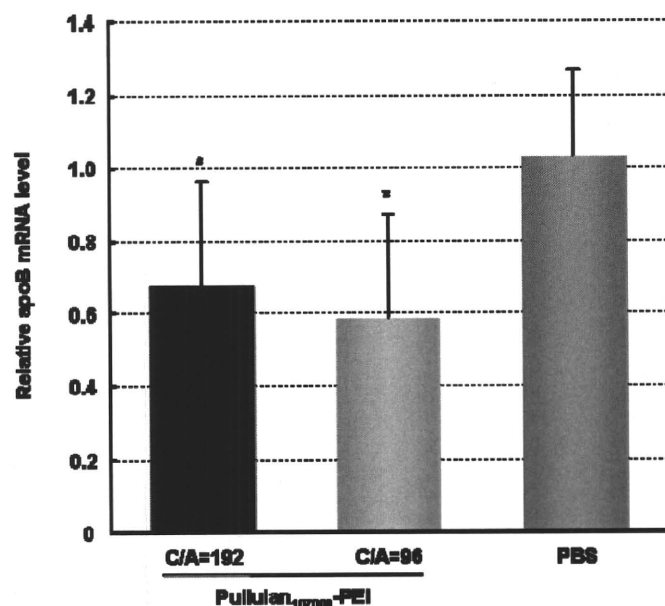


Figure 9. Silencing of apoB mRNA in liver after twice i.v. injection. Pullulan₁₀₇₀₀₀-PEI /siRNA (3 μ g) complex was injected to C57BL/6 mice fed a high fat diet for 2 weeks via tail vein. The liver was removed at 120 h after the first injection and apoB mRNA were assayed using the realtime PCR. ApoB 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.

Table 4. 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

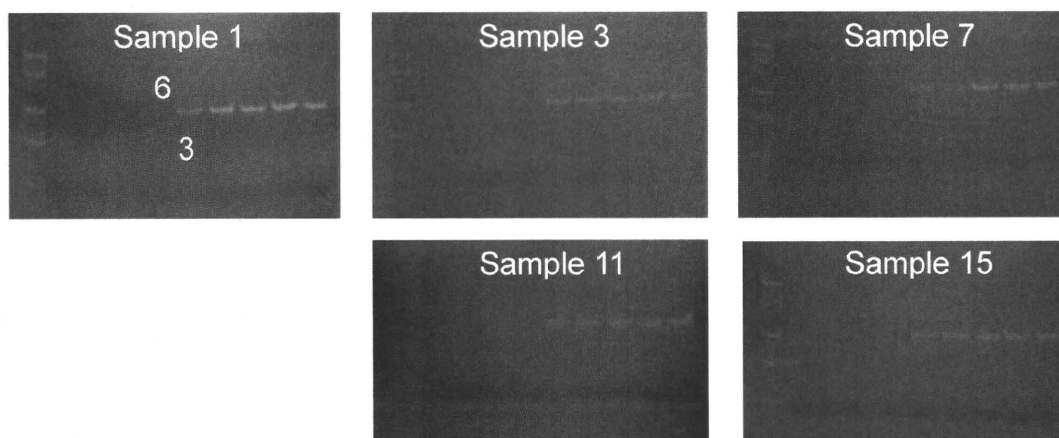


Figure 10. The binding degree between cationic copolymer and siRNA was determined by 19 % acrylamide gel electrophoresis. The complexes were prepared at C/A ratios of 48, 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 and 0.1875, each containing 100 ng (3.03 pmol) of siRNAs.

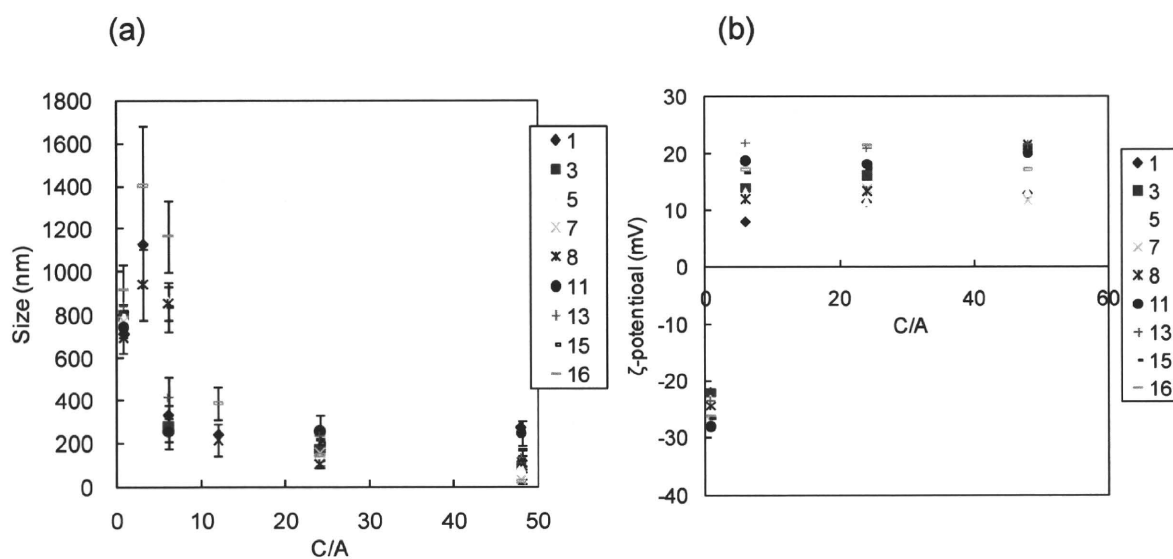


Figure 11. (a) Average diameter and (b) z-potential of polymer/siRNA complexes at various C/A ratios.

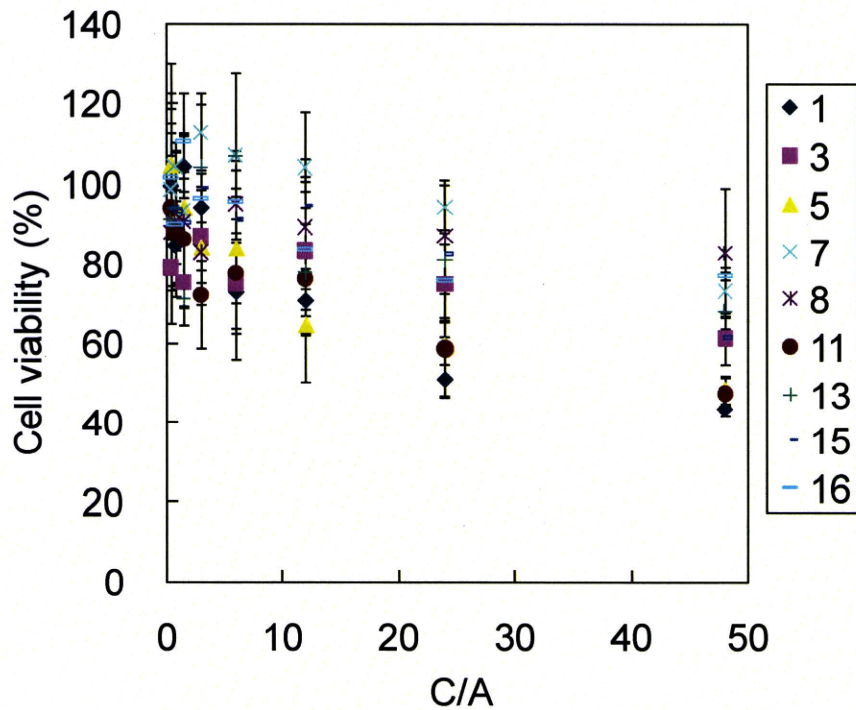


Figure 12. Cytotoxicity of carriers/siRNA complexes at various C/A ratios of 0.75 to 48 in NMuLi cells. Cell viability was determined by WST-1 assay.

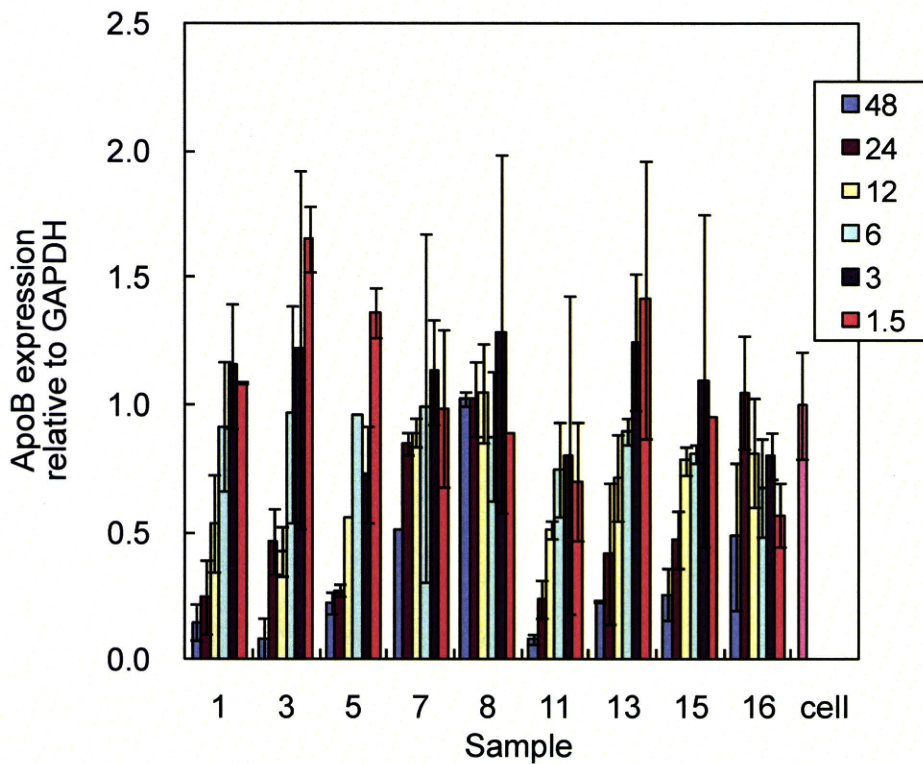


Figure 13. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with samples/siRNA complexes at various C/A ratios from 1.5 to 48 at 24 h after the transfection.

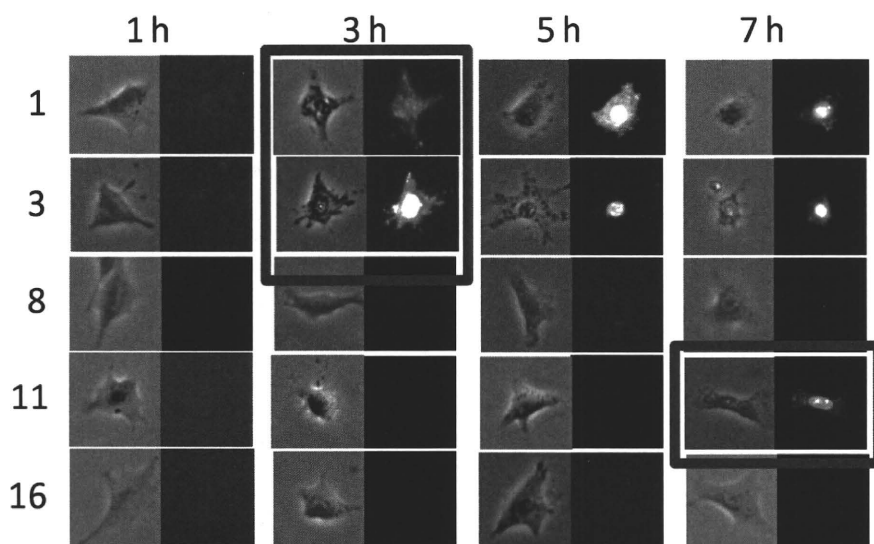


Figure 14. Fluorescence microscopy of NMuLi cells treated with Carriers/YOYO labeled siRNA complexes (sample 1, 3, 8, 16) at C/A ratio 48 at 1, 3, 5 and 7 h after the transfection.

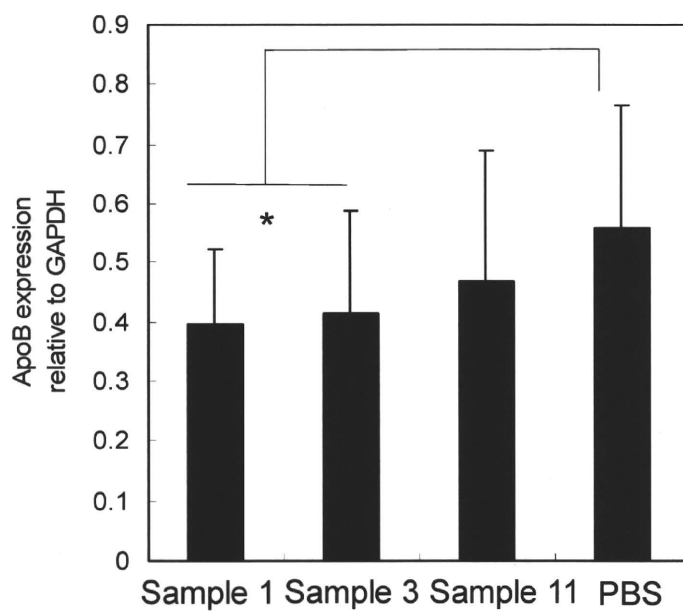


Figure 15. Inhibition of ApoB gene expression by carriers with siRNA at the C/A ratio of 12. * $p < 0.05$

機能性キャリアーの開発と体内動態解析(*in vivo* イメージング)

分担研究者 飯田秀博 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治療を達成するための経口投与可能な送達キャリアーの開発と体内動態解析を行うことである。LDL（悪玉）コレステロールの生成において重要な因子であるアポリポタンパク質 B (ApoB) siRNA を肝臓に選択的かつ効率的に送達するキャリアーを開発し、*in vivo* イメージングと治療効果の評価を行った。肝臓指向能を有するプルランを導入することで肝臓選択的送達システムの構築に成功した。さらに、プルラン (pullulan) の導入は、毒性軽減や ApoB siRNA の血中安定性の向上にも効果的であった。高コレステロールモデルマウスを用いた投与実験からは、血中コレステロール値の有意な低下と肝臓 ApoB mRNA 発現量の抑制が確認できた。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。マウスに経口投与後、肝臓と腎臓で蛍光強度が上昇することが確認でき、今後、複合体の最適化、より安定性の向上のためのコーティング剤などの検討により、siRNA の経口投与による家族性高コレステロール血症治療は十分可能であると判断される。

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 の投与による治療効率の向上には、センスティブな ApoB siRNA の配列選択は重要である。ApoB siRNA は ApoB 遺伝子の働きを強力に抑制する特徴を有しているが、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

ステムの開発は不可欠である。有効な siRNA の送達手段として、siRNA 分子を化学修飾し、体内での安定性を図る手法と、送達キャリアーを用いる手法があげられる。

本研究の目的は、家族性高コレステロール血症治療を達成するための機能性キャリアーの開発と体内動態解析(*in vivo* イメージング)を行うことである。具体的に、1) 肝臓選択的送達システムの開発と体内動態解析、2) 高コレステロールモデルマウスを用いた治療評価、3) 経口投与用のキャリアーの開発と経口投与後の評価である。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の開発を行った。また、キャリアーの毒性評価、体内分布解析、およびマウスにおける臓器障害や死亡率を調査した。次に、高コレステロールモデルマウスにキャリアー/siRNA 複合体を投与し、治療効果を評価した。最後に、経口投与による siRNA の肝臓へのデリバリーを実現するために、腸膜に存在する M 細胞を介するデリバリーシステムを開発した。酵母を積極的に取り込む M 細胞の特徴に着目し、パン酵母の殻である β 1,3-D-glucan をキャリアーとして利用した。パン酵母は食用で使用されているので人体に対する影響はなく、経口投与後は胃腸内環境で非常に安定であるため、胃腸内での複合体の安定性確保に適切なバイオ材料である。 β 1,3-D-glucan 殻へポリマーおよび siRNA を導入し、複合体形成を行った。複合体を有する β 1,3-D-glucan 殻をマウスに経口投与した後、各臓器における蛍光イメージングを観察した。

B. 研究方法

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。

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. 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。

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。

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。

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。

C. 研究結果

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（図 1）。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。（図 2）。

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（図 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（図 4）。

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