

2010 30048A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した
核酸医薬送達ナノシステムの開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した核酸医薬送達ナノシステムの開発	1
吉岡 靖雄	
II. 分担研究報告	
1. ナノマテリアルの体内・細胞内動態解析	16
吉川 友章	
2. 最適な核酸医薬の設計と治療効果の検討	21
形山 和史	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

画期的 C 型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した 核酸医薬送達ナノシステムの開発

研究代表者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師（常勤）

研究要旨

当該研究は、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCVに対する次世代治療戦略を提示するものである。平成22年度には、①肝臓移行性に優れたナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、②核酸医薬の細胞内移行能に関する検討、③ナノマテリアルの核酸医薬送達能を簡便に定量する為の細胞評価系の構築を推進した。研究代表者はこれまでに、直径70 nmの非晶質ナノシリカ(nSP70)が、100 nm以上の素材とは異なる体内動態を有し、静脈内投与後80-90%が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかとしている。そこで、非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルを用いて、肝臓移行性に優れたナノマテリアルのスクリーニングを試みた。Qドットは、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルであり、表面修飾など種々物性のものが存在している。そこで、4種類のQドット（①表面がカルボキシル基で修飾されたもの、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの、③表面がポリエチレングリコール（PEG）で修飾されたもの、④表面がPEGで修飾され、かつ、PEG先端がアミノ基修飾されたもの）を用い、in vitroでの細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。その結果、in vitroでは、上記②が最も細胞内移行に優れ、他の3種類のQドットは全く細胞内に移行しなかった。一方で、マウスに静脈内投与後の体内動態を検討した結果、上記④のPEG修飾Qドットが肝臓に選択的に移行することが明らかとなった。現在、移行率を定量するとともに、透過型電子顕微鏡により詳細な組織分布を精査中であるが、PEG修飾Qドットが優れた肝臓デリバリーキャリアーになり得る可能性が示された。次に、様々な粒子径や表面電荷の非晶質シリカを用い、核酸医薬の細胞内導入効率をin vitroで検討した。しかし、高い遺伝子導入効率を得ることはできなかった。本結果の原因として、ナノマテリアルと核酸医薬の複合体作製条件の不十分さが考えられる。今後、より詳細な検討を進めたいと考えている。さらに、遺伝子の量的変化を簡便かつ鋭敏に評価できる*Firefly luciferase*と、可視化することが簡便な緑色蛍光タンパク*Venus*をモデル標的遺伝子とすることで、siRNAの細胞内送達能とその効果発現のスクリーニングに適した評価細胞を作製した。本研究成果は、HCVに対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV治療に多大に貢献し得ると期待される

分担研究者

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒理学分野・助教

形山 和史・大阪大学大学院薬学研究科・分子生物学分野・助教

A. 研究目的

インターフェロン (IFN) 療法の確立は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、C 型肝炎は“致死的な病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。一方で、重篤な副作用による IFN 療法の中断、薬剤耐性ウイルスの頻発、高額費用などの解決すべき問題が多数残されており、新たな観点からの治療薬開発が世界的に望まれている。本観点から、HCV ゲノム複製に関わる転写・翻訳を、siRNA やアンチセンス等を用いて核酸レベルで抑制する核酸医薬が、上記問題点を克服し得る可能性を秘めていることから、次世代型画期的医薬品として注目されている。しかし核酸医薬は一般に、①血中で速やかに分解される (血中半減期は数十秒)、②肝指向性に極めて乏しい、③細胞外から作用発揮の場である細胞内への移行性が全くない、などの致命的欠点から十分な治療効果を発揮できず、これらを克服し得る薬物送達戦略の開発が待望されている。申請者はこれまでに、『粒子径 100 nm 以下のナノマテリアルが全身投与後、選択的かつ効率良く肝臓に送達され、かつナノマテリアルの粒子表面性状により種々細胞内局在性や細胞選択性を任意に制御できる』という知見を世界に先駆けて明らかとしている。本知見は、ナノマテリアルが核酸医薬を安定かつ効率的に肝臓さらには肝実質細胞内に送達することで、核酸医薬の優れた送達キャリアになり得る可能性を強く示唆するものである。そこで当該研究では、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略を提示するものである。平成 22 年度には、①肝臓移行性に優れ

たナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、②核酸医薬の細胞内移行能に関する検討、③ナノマテリアルの核酸医薬送達能を簡便に定量する為の細胞評価系の構築を推進した。本研究成果は、HCV に対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV 治療に多大に貢献し得ると期待される。

B. 研究方法

粒径分布およびゼータ電位の測定

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または 10% FBS-DMEM で 10 nM に調整した励起波長 705 nm、蛍光波長 405–665 nm の各種表面修飾を施した Quantum Dot (Q ドット) [ポリエチレングリコール (PEG) 修飾: QD1、細胞内移行ペプチド修飾: QD2、カルボキシル基修飾: QD3、PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの: QD4] を、Size & Zeta キャピラリーセルに 1 mL 注入し、Zetasizer Nano-ZS で、粒子サイズおよびゼータ電位を測定した。粒子サイズは動的光散乱法で、ゼータ電位はレーザードップラー法で測定した。

in vivo imaging

HR-1 マウス (6 週齢、雄性) を日本 SLC より購入した。各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を PBS で 400 nM に調整し、マウス尾静脈より 0.1 mL 投与した。投与 24 時間後に、イソフルランで吸入麻酔をかけ、IVIS 100 imaging system を用いて、QD の体内動態を蛍光観察した。

血液の血液学的評価

BALB/c マウス (6 週齢、雄性) を日本 SLC より購入した。励起波長 565 nm、蛍光波長 405–665 nm の PEG 修飾 Q ドットを PBS で 90 nM に調整し、マウス尾静脈より 0.1 mL 投与した。投与 24 時間後に、ネンプタール麻酔下で心臓より採血した。採血は、抗凝固剤として 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液を用いた。3.8% クエン酸ナトリウムと血液の比が 1:9 (v/v) となるように、3.8% ク

エン酸ナトリウムを混合した血液の一部を血球検査に用いた。また、11,500 g で 15 分間遠心分離して血漿を回収し、生化学検査に供した。マウスの血球検査は、電気抵抗法を用いて実施した。採取した血液（全血）を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 を用いて血小板数を測定した。

血液生化学試験

血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アルブミン (ALB)、総ビリルビン (TBIL)、血中尿素窒素 (BUN) を比色法にて測定した。AST 活性は、基質である L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸のアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。ALB は、ブロムクレゾールグリーンとの反応により生じた青色色素を測定した。TBIL は、2,4-ジクロロベンゼンジアゾニウム塩によってジアゾ化反応を受けて生成したジアゾ色素を測定した。BUN は、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置 FUJIDRICHEM 7000 を用いた。

蛍光顕微鏡による in vitro 動態解析

Q ドットの詳細な動態を解析するため、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内動態を観察した。8 穴チャンバースライドに 2×10^4 cells/200 μ L/well で HepG2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO₂ 存在下で 1 時間、または 24 時間培養を行った後、10% FBS-DMEM で希釈した各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 100 μ L 加えた。24 時間後、PBS で 2 回洗浄し、核染色ならびに Q ドットの蛍光退色を防ぐため、Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI を用いてマウントすることで永久組織標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

in vitro 細胞傷害性評価

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ L/well で HepG2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%、CO₂ 存在下で 24 時間培養を行った後、10% FBS-DMEM で希釈した各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 100 μ L 加えた。24 時間後、25% グルタルアルデヒド 20 μ L にて 15 分間細胞を固定し、水で 3 回洗浄後、0.05% メチレンブルー溶液 100 μ L で 15 分間細胞を染色した。染色した細胞を洗浄した後、0.33 N HCl 200 μ L により色素を溶解した。続いて吸光度 (655-415 nm) を測定し、メディウムコントロールを 100% として細胞生存率を算出した。

遺伝子導入効率

Micromod 社から購入した、粒子径がそれぞれ、1000、300、70、30 nm の非晶質ナノシリカ (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30) と、nSP70 と nSP30 をカルボキシル基もしくはアミノ基で修飾した非晶質ナノシリカ (nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) を用いた。また、Sigma-Aldrich Japan 社から購入した、粒子径 0.5-10 μ m のシリカ (sigma-mSP)、粒子径 10-20 nm のシリカ (sigma-nSP)、粒子径 5-15 nm の多孔質シリカ (sigma-mesoSP) を用いた。終濃度 16.7nM の siRNA (invitrogen, Stealth RNAi Reporter Control Duplexes Luciferase Reporter Control) と、Sigma-Aldrich Japan 社のシリカ粒子との混合液をルシフェラーゼ発現肝細胞に作用させ、48 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子の siRNA キャリアーとしての有用性を評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子を導入するプラスミド (promega, E174A pGL3-Control vector) 0.1 μ g と、micromod 社の各シリカ粒子との混合液を HepG2 細胞に作用させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子のプラスミドキャリアーとしての有用性を評価した。

プラスミド構築

様々な細胞で外来遺伝子を安定的に発現可能なヒト EF-1 α プロモーターを有するレンチウイルスベクタープラスミドを選択した。使用する各遺伝子が含まれるプラスミドを鋳型に目的の配列を PCR で増幅した後、レンチウイルスベクタープラスミドの適切な位置にクローニングし、そのシーケンスを確認した。IRES (internal ribosome entry site) を用いて1つのベクターから2つのタンパクを産生させるレンチウイルスベクター (Luc-IRES-Venus) は、CSII-EF-MCS-IRES-Venus のマルチクローニングサイトに Firefly luciferase 遺伝子を挿入することで作製した。自己開裂ペプチド (T2A ペプチド配列) を用いて1つのベクターから2つのタンパクを同時に発現するタイプのレンチウイルスベクター (Venus-T2A-Luc) は、2A ペプチドをコードする配列を含む合成オリゴプライマーを使用した Overlapping PCR 法により作製した。なお、レンチウイルスベクターは三好浩之先生 (理研バイオリソースセンター) よりご供与頂いた。

レンチウイルスベクターの作製

293T 細胞を poly-L-lysine でコートした 100 mm dish へ 5×10^6 cells ずつ播種した。一晚培養後、各遺伝子を搭載したレンチウイルスベクタープラスミドを HIVgp 発現プラスミド、VSV-G/Rev 発現プラスミドと共に Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。翌日、Forskolin を含む培地に交換し、トランスフェクションから 2~3 日培養後上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過してレンチウイルス溶液とした。レンチウイルス溶液は、 -80°C で保存した。本研究で用いたレンチウイルスベクターは緑色蛍光タンパク Venus を発現するため、その発現を指標に感染力価 (TU/ml) を算出した。

細胞の培養

HeLa 細胞と 293T 細胞は 10% FCS と L-glutamine

を添加した High Glucose DMEM 培地を用いて 37°C 、飽和蒸気圧、5%CO₂ 存在下で培養した。

導入遺伝子発現量の評価

ウイルスベクターを作用させた細胞を 2 分割し、片方を Venus 遺伝子の発現測定に、もう片方を Firefly luciferase 遺伝子の発現測定に供した。Venus 遺伝子の測定：ウイルスベクター作用 48 時間後、細胞を回収し、フローサイトメーター (LSR II) を用いて蛍光を測定した。Firefly Luciferase 遺伝子の測定：ウイルスベクター作用 48 時間後、Pica Gene LT 2.0 を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

倫理面への配慮

本研究は、国立大学法人大阪大学、医薬基盤研究所の組換え DNA 実験委員会の承認を得た後に行った。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来試料は使用していない。

C. 研究結果および D. 考察

各種 Q ドットの肝移行能評価

Q ドットは、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルであり、表面修飾など種々物性のものが存在している。そこで、4 種類の Q ドット (①表面がポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたもの：QD1、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの：QD2、③表面がカルボキシル基で修飾されたもの：QD3、④表面が PEG で修飾され、かつ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの：QD4) を用い、in vitro で細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。

まず始めに、ゼータサイザーを用いて、各種 Q ドットの粒子径と表面電荷を解析した (図 1)。その結果、いずれの Q ドットも数十 nm の粒子径を示し、カタログ値と同等であったことから、分散性に優れていることが示された。また、表面電荷もほぼ同様であったが、表面がカルボキシル基で修飾された QD3 のみ、より負電荷を帯びている

ことが示された。

各種 Q ドットを HR-1 マウスに投与し、*in vivo* imaging により体内動態を観察した (図 2)。その結果、QD1、QD2 は全体像からはほとんど検出されなかった。一方で、QD3、QD4 において、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。さらに、各臓器を摘出し観察した結果、全ての群で肝臓、胃に蛍光が検出されたが、QD4 が最も肝臓へ集積していることが明らかとなった。また、QD3、QD4 投与群では、脾臓でも強い蛍光が観察された。表面が PEG 修飾された QD1 は、血中滞留性が亢進し、臓器移行性が低下した可能性が考えられた。一方で、同様の PEG 修飾にも関わらず、PEG 先端がアミノ基修飾された QD4 が優れた肝移行性を有していた事実は非常に興味深い。今後は、QD4 の肝移行量を定量する必要があると考えられる。また QD4 の PEG 先端のアミノ基を活性化することで、核酸医薬との複合体を形成可能と考えられ、核酸医薬送達能を評価していく予定である。

BALB/c マウスに PEG 修飾 Q ドットを投与し、24 時間後に血液組織障害マーカー (AST、ALB、TBIL、BUN) を測定した (図 3)。その結果、マウスの各マーカーの値はコントロールと比較して、有意な差は認められなかった。また、電気抵抗法を用いて血液中の血小板数を測定したが、コントロールと比較して、有意な差は認められなかった。今後は、他の Q ドットにおいても検討を進める予定である。

共焦点蛍光顕微鏡を用いて各種 Q ドットの細胞内への取り込みを評価した (図 4)。その結果、1 時間培養した群では、QD2 のみ細胞内に移行しているのが観察された。一方で 24 時間培養した群では、細胞内に QD2 による強い蛍光が観察されるとともに、QD3 が取り込まれているのが確認された。QD1、QD4 は、細胞内に取り込まれなかった。これは PEG 修飾により生体反応性が低下し、QD1、QD4 は細胞に取り込まれにくくなったが、細胞内移行ペプチドを付与することで QD2 は早急に細胞内に取り込まれたと考えられる。

各種 Q ドットの細胞生存率を評価した (図 5)。その結果、どの群においても生存率はほとんど変化なかったことから、本実験における条件下において Q ドットは細胞毒性をほとんど示さないと考えられる。

核酸医薬送達キャリアーとしての機能性評価

非晶質ナノシリカの siRNA 導入キャリアーとしての有用性を、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対する siRNA を用いて評価した。sigma-mSP、sigma-nSP、sigma-mesoSP を用いて、ルシフェラーゼ発現肝細胞への siRNA 導入効率をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。その結果、いずれの粒子を用いた場合においても、1000 µg/mL 添加群で顕著なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 6A)。また、メチレンブルーアッセイで細胞生存率を評価したところ、いずれの粒子添加群においても、ほとんど細胞傷害性は認められなかった (図 6B)。以上の結果から、いずれの粒子径の非晶質シリカにおいても、高濃度ではあるものの、siRNA の導入キャリアーになり得る可能性が示唆された。しかし、目視により細胞傷害を観察したところ、接着細胞の著しい減少など、細胞傷害性が認められている。従って、細胞傷害性に起因したルシフェラーゼ活性の低下の可能性も考えられ、今後、より詳細な検討が必要と考えられた。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを用いて、プラスミド導入効率を評価した。粒子径・表面修飾の異なる 8 種類 (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30、nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) の非晶質シリカを、プラスミドと混合した後、肝細胞株 HepG2 細胞に作用させ、ルシフェラーゼ活性を指標に遺伝子導入効率を検討した。その結果、いずれの粒子添加群においても、遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 7)。また、細胞傷害性は一切認められないことを確認している。以上の結果より、現在の条件では、非晶質シリカは siRNA やプラスミドなどの導入キャリアーとしての可能性は低いと考えら

れた。

本検討では、製剤的有用性を最重要視して、単に混合するだけの最もシンプルな実験条件を適用した。しかし、この条件では、非晶質シリカの核酸送達キャリアーとしての有用性を見出すことは出来なかった。従って、今後は、ナノマテリアルと核酸の混合比や、複合体形成を促進するための陽電荷ポリマーの添加などを考慮して、より最適な遺伝子導入技術の確立を試みる。また、非晶質ナノシリカに留まらず、Q ドット等を含めて多種のナノマテリアルの適用を試みる予定である。

レンチウイルスベクターの構築

遺伝子の量的変化を簡便かつ鋭敏に評価できる *Firefly luciferase* と、可視化することが簡便な緑色蛍光タンパク *Venus* をモデル標的遺伝子とすることで、siRNA の細胞内送達能とその効果発現のスクリーニングに適した評価細胞を作製した。2つの遺伝子を同時に発現させる際には IRES 配列が利用される場合が多い。しかしながら IRES 配列の前後に挿入する遺伝子の種類や組み合わせなどにより、それぞれの発現量が大きく変動してしまい、理想とする遺伝子発現が観察できない場合もある。従って本研究では、IRES 配列を利用する場合 (Luc-IRES-Venus) に加え、自己開裂ペプチドを用いて1つのプロモーターで2つのタンパクを同時に発現するタイプ (Venus-T2A-Luc) のレンチウイルスベクターを作製した。

様々な細胞種で安定的な遺伝子発現を達成する為にヒト EF-1 α プロモーターを選択し、その下流に自己開裂ペプチドをコードする遺伝子配列 (T2A) あるいは IRES 配列で連結したモデル標的遺伝子を挿入したレンチウイルスベクタープラスミドを構築した (図 8A)。これらを HIVgp 発現プラスミド、VSV-G/Rev 発現プラスミドと共

に 293T 細胞に共導入し、目的とするレンチウイルスベクターを作製した。

自己開裂ペプチドで連結した場合 (Venus-T2A-Luc) には、レンチウイルスベクターの感染量、Venus 発現および luciferase 発現量に正の相関が観察された (図 8B, C)。一方、IRES 配列を用いたベクター感染細胞でも両遺伝子の発現が確認できたが、その発現量に相関が認められなかった。また、Venus-T2A-Luc を感染させたヒト肝癌由来細胞株 SK HEP-1 でも同様に、Venus と luciferase を安定的に発現させることに成功した (data not shown)。

本研究では、Venus 及び Firefly luciferase 遺伝子を同時に発現するレンチウイルスベクターを構築した。また、IRES 配列を用いる場合に比べ、2A ペプチドを利用する方が本研究に適した遺伝子発現パターンを示す事を確認した。本ベクターは種々の細胞に効率良く感染することが可能である。また、ゲノムにインテグレーションされるタイプのベクターである為、安定発現細胞株の作製に適している。モデル標的遺伝子として選択した Venus は緑色蛍光の強度から発現量評価に利用することも可能であるが、遺伝子導入された細胞をセルソーターで単離する場合のマーカーとしても有用であり、目的とする細胞株を容易に作製することが可能となる。本年度は HeLa 細胞と SK HEP-1 細胞を利用して安定発現細胞株を作製したが、次年度以降、HCV に対する核酸医薬の評価に適した他の細胞株 (HepG2 や Huh-7 等) にも応用し、ナノマテリアルによる核酸医薬送達法のスクリーニングに応用する予定である。

E. 結論

平成 22 年度には、①肝臓移行性に優れたナノマテリアルのスクリーニングを実施するとともに、②核酸医薬の細胞内移行能に関する検討、③

ナノマテリアルの核酸医薬送達能を簡便に定量する為の細胞評価系の構築を推進した。

平成 22 年度は当初の予定通り研究が進行したと考えている。平成 23 年度も、これら基盤情報を発展させ、より加速して当該研究を推進する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. Biomaterials. 2011;32(1):3-9.

②学会発表

国外

1. Yoshikawa T, Nabeshi H, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induces class I-restricted processing and presentation of exogenous antigens in murine dendritic cells. The 4th World Congress on Controversies in Urology (CURy2011). Paris (France). 27-30 January, 2011.
2. Yoshioka Y, Higashisaka K, Yamashita K, Fujimura M, Morishita Y, Huiyan P, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.

Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and safety of nanomaterials. SOT 2011. Washington DC (USA). 6-10 March, 2011.

国内

1. 吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
2. 吉岡靖雄, 森重智弘, 吉川友章, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発に向けた非晶質ナノシリカの粒子特性と起炎性の連関評価. 第17回日本免疫毒性学会, 筑波, 2010年9月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

該当事項無し

	修飾	溶媒	SIZE (nm)	Z-potential
QD1	PEG	PBS	32.2	-3.68
		10% FCS medium	22.7	-3.6
QD2	peptide	PBS	29.4	-10
		10% FCS medium	20.5	-7.55
QD3	carboxyl	PBS	25.8	-33.9
		10% FCS medium	32.2	-10.6
QD4	Amino (PEG)	PBS	20.1	-1.96
		10% FCS medium	19.6	-4.36

図 1. 各種 Q ドットの特性評価.

各種 Q ドットの粒子径、表面電荷をゼータサイザーを用いて評価した。

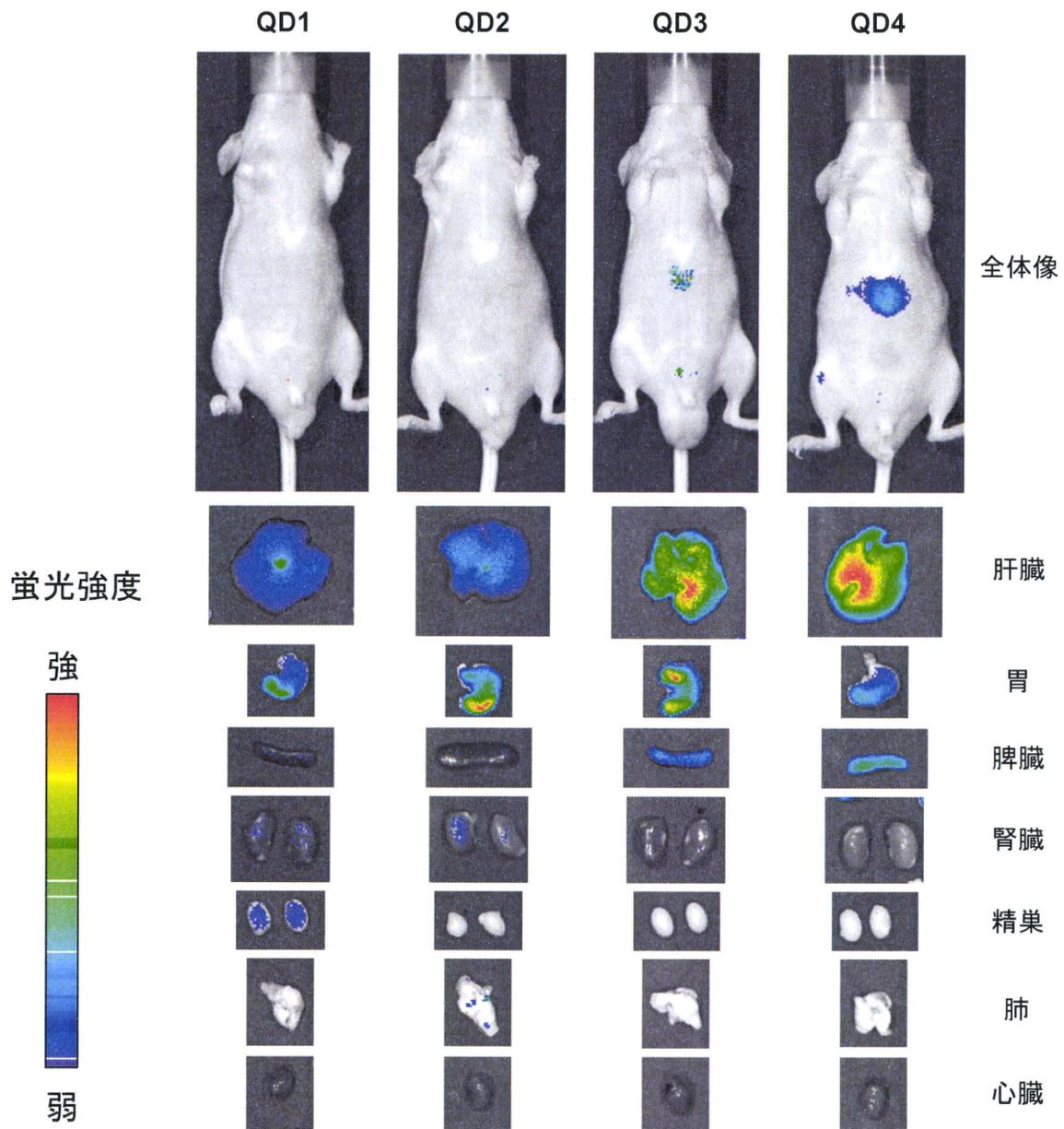


図 2. Q ドットの体内動態評価.

HR-1 マウス (6 週齢、雄性) に各種 Q ドット (QD1、QD2、QD3、QD4) を 40 pmol、マウス尾静脈より投与した。24 時間後、各臓器 (肝臓、胃、腎臓、精巣、肺、心臓) を回収し、Xenogen IVIS 200 imaging system により、Q ドットの体内動態を蛍光観察した。

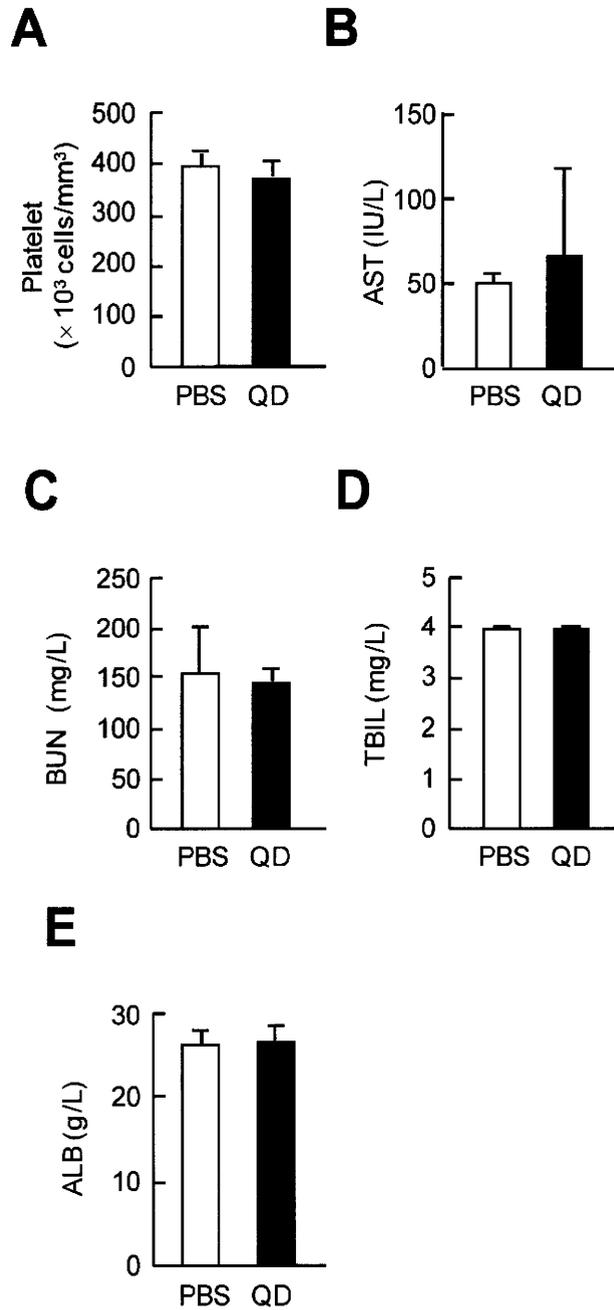


図 3. Quantum Dot 投与マウスの血液検査.

PEG 修飾 QD を BALB/c マウスの尾静脈より投与し、24 時間後に血液を回収した。回収した血液を用いて血小板数 (A) を測定し、血液生化学検査 (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) (B)、血中尿素窒素 (BUN) (C)、総ビリルビン (TBIL) (D)、アルブミン (ALB) (E)) を実施した。

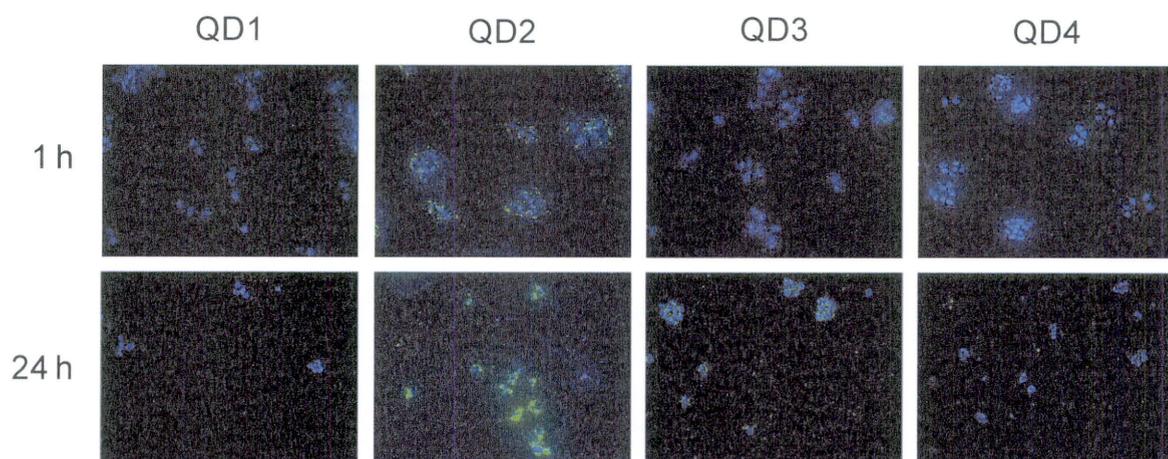


図 4. Q ドットの *in vitro* 動態解析.

HepG2 細胞を 10 nM の各種 Q ドットと共培養した。1 時間後、または 24 時間後に細胞核を DAPI 染色し、共焦点レーザー顕微鏡で、Q ドットの局在を観察した。

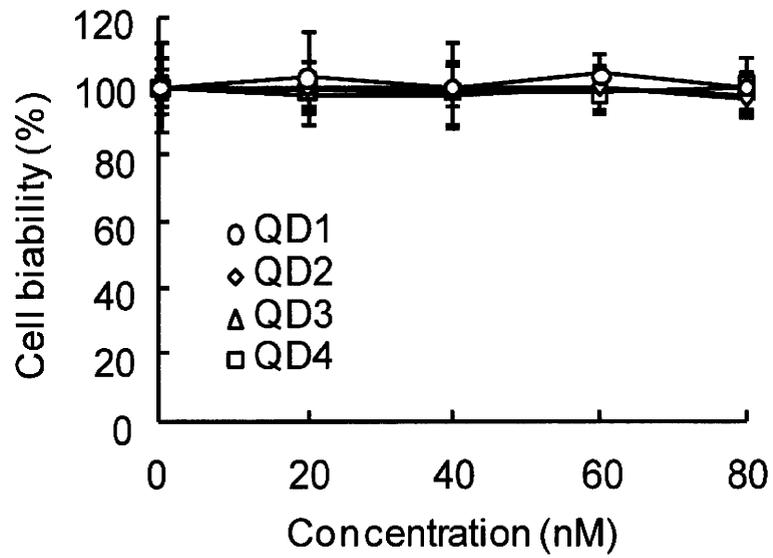


図 5. Q ドットの細胞傷害性評価.

各種 Q ドットを種々の濃度で HepG2 細胞に添加し、24 時間共培養した。細胞生存率をメチレンブルーの取り込み量を指標に評価し、Q ドット 非添加群を 100%として算出した。

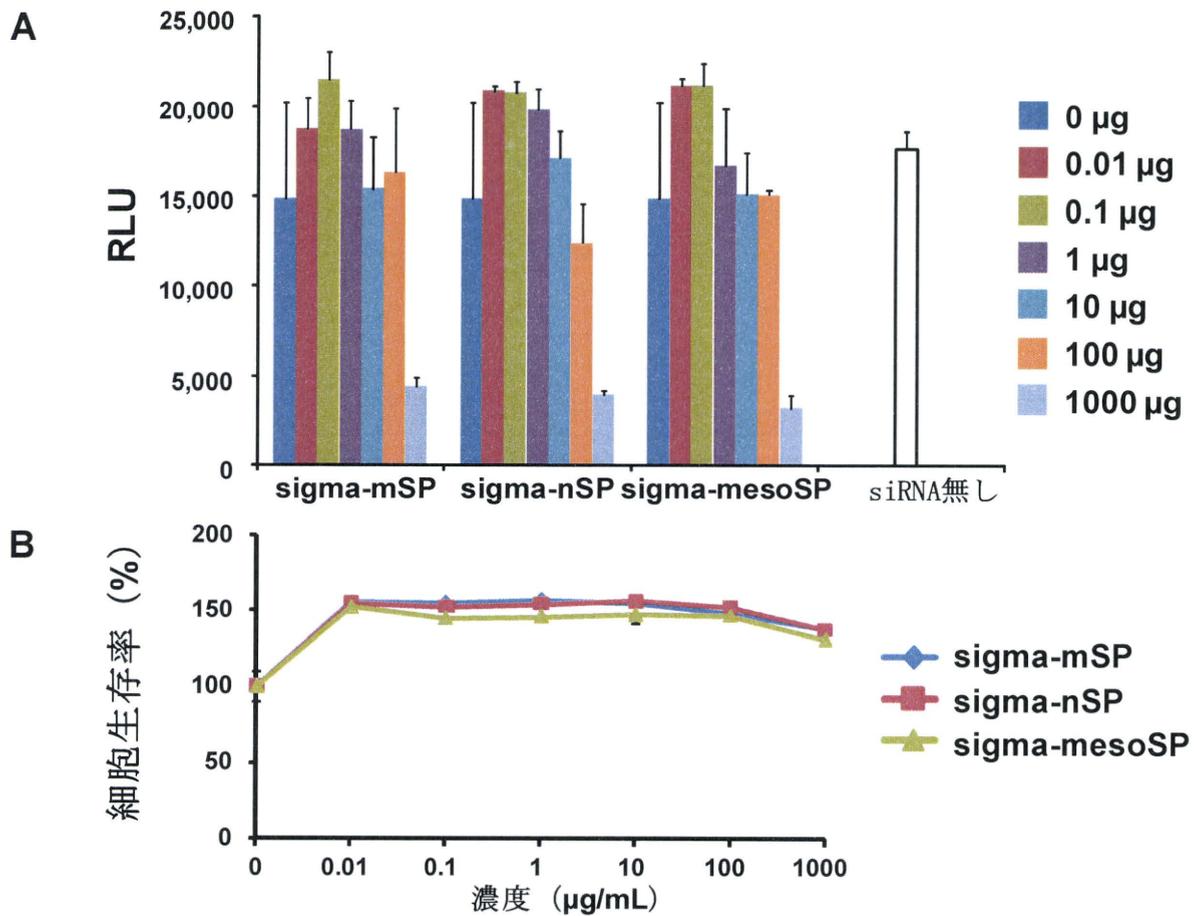


図 6. シリカ粒子の siRNA キャリアとしての有用性評価

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA と、sigma-mSP、sigma-nSP、sigma-mesoSP との混合液をルシフェラーゼ発現肝細胞に作用させ、48 時間後のルシフェラーゼ活性 (A) と細胞傷害性 (B) を評価した。

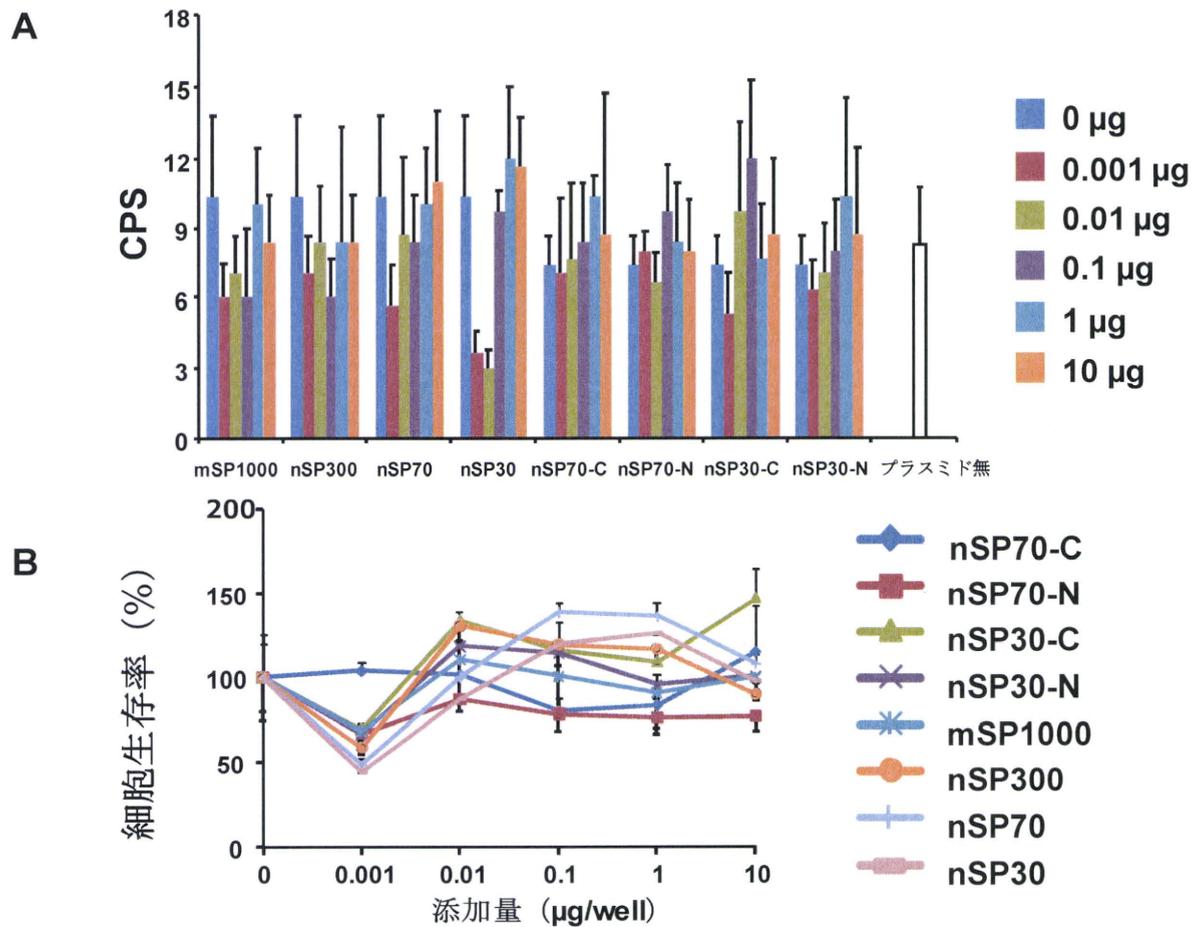


図 7. シリカ粒子のプラスミドキャリアとしての有用性評価

Luciferase 遺伝子を導入するプラスミドと、各シリカ粒子との混合液を HepG2 細胞に作用させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性 (A) と細胞傷害性 (B) を評価した。

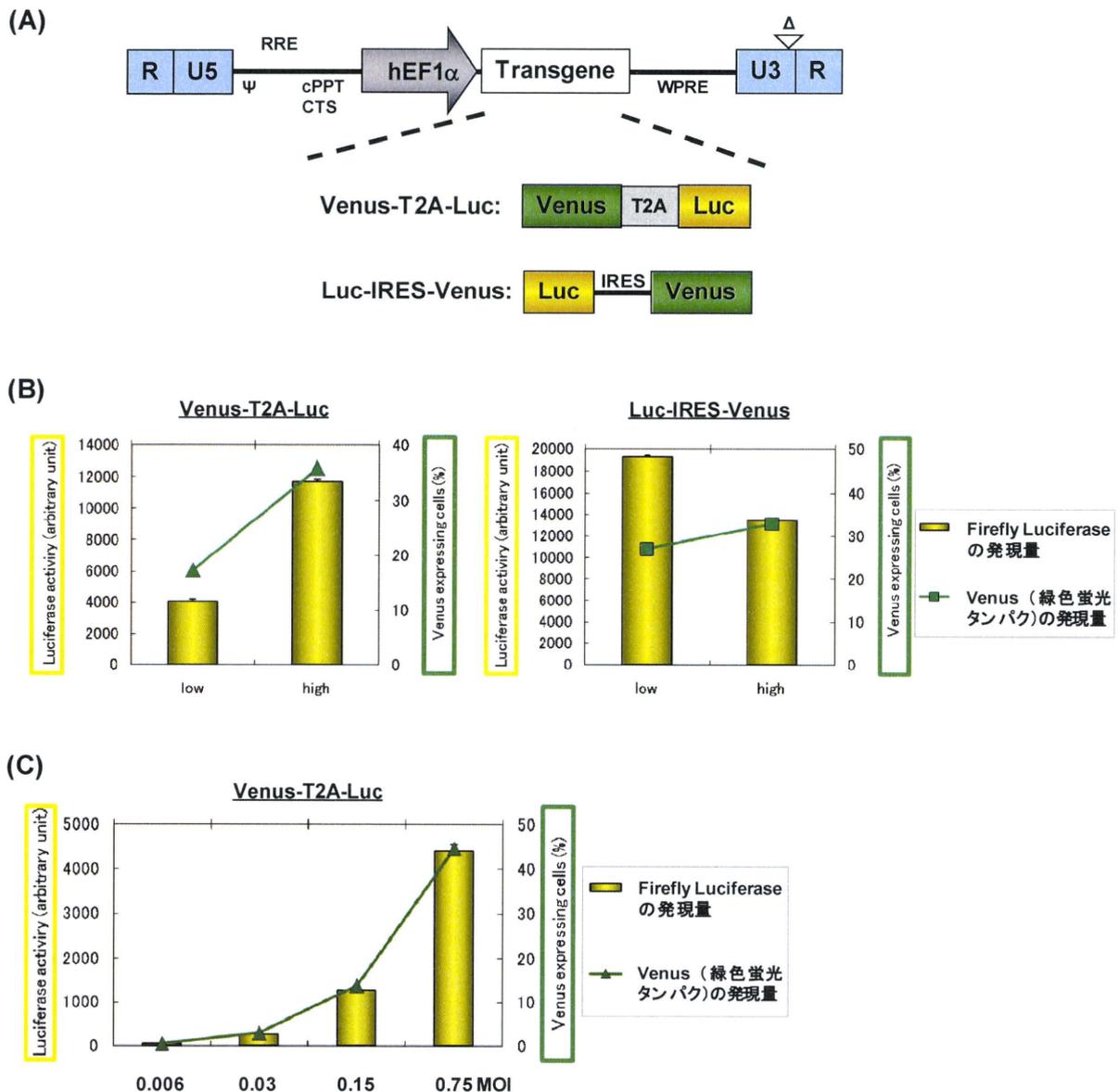


図 8. レンチウイルスベクターの構築と機能評価

(A) ベクター模式図. 略語: CMV, Human cytomegalovirus immediate early promoter; Ψ , Packaging signal; RRE, Rev responsive element; cPPT, Central polypurine tract; CTS, Central termination sequence ; WPRE, Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; T2A, 2A peptide sequence from *Thosea asigna* virus.

(B, C) Hela 細胞に対して、各種レンチウイルスベクターを作用させた。2 日後に、ルシフェラーゼ活性と *venus* の発現を評価した。

ナノマテリアルの体内・細胞内動態解析

研究分担者 吉川 友章 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 助教

研究要旨

本研究では、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCVに対する次世代治療戦略の開発を試みている。本年度は、各種非晶質シリカを用いて、核酸医薬送達能を *in vitro* において比較検討した。まず、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対する siRNA を用いて検討した。粒子径の異なる 3 種類の非晶質シリカを用い、ルシフェラーゼ発現肝細胞への導入効率を検討したところ、いずれの粒子においてもルシフェラーゼ活性の低下を誘導することはできなかった。次に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを用いて、肝細胞への遺伝子導入効率を検討した。粒子径・表面修飾の異なる 8 種類の非晶質シリカを用いて検討したが、いずれの粒子においても、遺伝子発現を確認することができなかった。今後は、核酸医薬と非晶質シリカの複合体形成条件の最適化を図るとともに、他のナノマテリアルを用いた検討を進める予定である。

A. 研究目的

現在世界には 2 億人、本邦には 200 万人の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染者がおり、世界では毎年 300~400 万人ずつ感染者が増加している。周知のように、C 型肝炎治療の基本戦略かつ最も重要なことは肝細胞中の C 型肝炎ウイルス (HCV) を排除することである。現在のところ、インターフェロン (IFN) 療法が最も有効な治療法であり、C 型肝炎の奏効率は 50% にまで向上している。しかし、副作用により IFN 療法の中断を余儀なくされる患者が多数いること、依然として高ウイルス量の患者には IFN 療法の効果が乏しいこと、IFN 耐性ウイルスが出現することが課題となっている。本観点から、siRNA やアンチセンスなどの核酸医薬を用いた抗ウイルス療法の開発に期待が寄せられている。しかし、これら核酸医薬は静脈内投与後、血中で分解されかつ肝指向性にも極めて乏しいことから十分な治療効果を発揮できないという致命的欠点を有している。さらに、肝臓に移行したとしても、治療効果を発揮するた

めには、肝実質細胞の細胞内に移行せねばならないが、①その多くはクッパー細胞に貪食されること、②細胞外から細胞質内に移行するのは極僅か、という現実から、より良いターゲティングキャリアの創製が期待されている。上記観点から、本研究では、ナノマテリアルによる『siRNA・アンチセンスなど核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略の開発を試みている。本年度は、各種非晶質シリカを用いて、核酸医薬送達能を *in vitro* において比較検討した。

B. 研究方法

Micromod 社から購入した、粒子径がそれぞれ、1000、300、70、30 nm の非晶質ナノシリカ (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30) と、nSP70 と nSP30 をカルボキシル基もしくはアミノ基で修飾した非晶質ナノシリカ (nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) を用いた。また、Sigma-Aldrich Japan 社から購入した、粒子径

0.5-10 μm のシリカ (sigma-mSP)、粒子径 10-20 nm のシリカ (sigma-nSP)、粒子径 5-15 nm の多孔質シリカ (sigma-mesoSP) を用いた。終濃度 16.7nM の siRNA (invitrogen, Stealth RNAi Reporter Control Duplexes Luciferase Reporter Control) と、Sigma-Aldrich Japan 社のシリカ粒子との混合液をルシフェラーゼ発現肝細胞に作用させ、48 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子の siRNA キャリアーとしての有用性を評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子を導入するプラスミド (promega, E174A pGL3-Control vector) 0.1 μg と、micromod 社の各シリカ粒子との混合液を HepG2 細胞に作用させ、24 時間後のルシフェラーゼ活性と細胞傷害性を検討することにより、シリカ粒子のプラスミドキャリアーとしての有用性を評価した。

倫理面への配慮

本研究は、医薬基盤研究所の組換え DNA 実験委員会の承認を得た後に行った。

C. 研究結果および D. 考察

非晶質ナノシリカの siRNA 導入キャリアーとしての有用性を、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対する siRNA を用いて評価した。sigma-mSP、sigma-nSP、sigma-mesoSP を用いて、ルシフェラーゼ発現肝細胞への siRNA 導入効率をルシフェラーゼ活性を指標に評価した。その結果、いずれの粒子を用いた場合においても、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加群で顕著なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 1A)。また、メチレンブルーアッセイで細胞生存率を評価したところ、いずれの粒子添加群においても、ほとんど細胞傷害性は認められなかった (図 1B)。以上の結果から、いずれの粒子径の非晶質シリカにおいても、高濃度ではあるものの、siRNA の導入キャリアーになり得る可能性が示唆された。しかし、目視により細胞傷害を観察したところ、接着細胞の著しい減少など、細胞傷害性が認められている。従って、

細胞傷害性に起因したルシフェラーゼ活性の低下の可能性も考えられ、今後、より詳細な検討が必要と考えられた。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを用いて、プラスミド導入効率を評価した。粒子径・表面修飾の異なる 8 種類 (mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30、nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N) の非晶質シリカを、プラスミドと混合した後、肝細胞株 HepG2 細胞に作用させ、ルシフェラーゼ活性を指標に遺伝子導入効率を検討した。その結果、いずれの粒子添加群においても、遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 2)。また、細胞傷害性は一切認められないことを確認している。以上の結果より、現在の条件では、非晶質シリカは siRNA やプラスミドなどの導入キャリアーとしての可能性は低いと考えられた。しかし、これら核酸と非晶質シリカの複合体形成条件を最適化する必要があると考えられ、今後の検討課題である。また、本研究班の代表研究者である吉岡らの成果により、ナノマテリアルの 1 種である Q ドットの修飾体が、優れた細胞内移行能を有することを明らかとしている。今後は、Q ドットを含め他のナノマテリアルについても検討を進めていく予定である。

E. 結論

本検討では、製剤的有用性を最重要視して、単に混合するだけの最もシンプルな実験条件を適用した。しかし、この条件では、非晶質シリカの核酸送達キャリアーとしての有用性を見出すことは出来なかった。従って、今後は、ナノマテリアルと核酸の混合比や、複合体形成を促進するための陽電荷ポリマーの添加などを考慮して、より最適な遺伝子導入技術の確立を試みる。また、非晶質ナノシリカに留まらず、Q ドット等を含めて多種のナノマテリアルの適用を試みる予定である。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, **Yoshikawa T**, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. Biomaterials. 2011;32(1):3-9.

②学会発表

国外

Yoshikawa T, Nabeshi H, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induces class I-restricted processing and presentation of exogenous antigens in murine dendritic cells. The 4th World Congress on Controversies in Urology (CURy2011). Paris (France). 27-30 January, 2011.

国内

吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平

井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

該当事項無し