

201109012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

small interfering RNA (siRNA) とリコンビナント Argonaute 2 の

同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 櫻井 文教

平成 24 年 (2012 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告

small interfering RNA (siRNA) とリコンビナント Argonaute 2 の同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発

(Argonaute 2 の過剰発現および細胞内導入によるノックダウン効率の向上に関する研究)

櫻井 文教 1

II. 分担研究報告

1. バブルリポソームと超音波の併用による siRNA およびたん白質デリバリー特性の評価に関する研究

鈴木 亮 9

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 19

「small interfering RNA (siRNA)とリコンビナント Argonaute 2 の同時細胞内導入による高効率な遺伝子発現抑制システムの開発」

総括研究報告書

Argonaute 2 の過剰発現および細胞内導入によるノックダウン効率の向上に関する

研究

主任研究者 櫻井 文教
大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

Small Interfering RNA (siRNA)は、細胞質内で Argonaute 2 (Ago2)と RNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、高効率に標的遺伝子の発現を抑制する。現在、siRNAは黄斑網膜変性症をはじめとする各種疾患に対する革新的治療薬として期待されており、海外で臨床試験が積極的に進められるとともに、siRNAを細胞内に高効率に導入可能な Drug Delivery System (DDS)技術も開発されつつある。しかし問題点として、①十分量の siRNAが導入できたとしても、細胞内の Ago2 量が足りず、十分な遺伝子発現抑制が得られない、②siRNAが Ago1と相互作用することで、microRNAと同様の機構により標的以外の遺伝子の発現を抑制する (off-target 効果)ことが明らかとなってきた。

そこで本研究では、siRNAとともに、リコンビナント Ago2を細胞内に導入することにより、off-target 効果が少なく、さらに高効率にノックダウン可能なシステムを開発することを試みる。本年度は、まず siRNAの前駆体である shRNAとともに、Ago2を過剰発現させることにより、高効率なノックダウンが可能か検討した。さらに、市販の各種タンパク質導入試薬を用いて培養細胞へのタンパク質導入効率について検討した。

分担研究者

鈴木 亮 帝京大学薬学部
講師

協力研究者

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研究科
教授

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研究科
助教

岡本小百合 大阪大学大学院薬学研究科
非常勤職員

後藤 平 大阪大学大学院薬学研究科
大学院生

A. 研究目的

siRNA は、標的遺伝子の発現を高効率に抑制可能であることから、次世代の革新的医薬品として大きな期待が寄せられている。siRNA は細胞内導入後、細胞質において Argonaute 2 (Ago2)と RNA-induced silencing complex (RISC)を形成する。RISC は、標的 mRNA に結合し切断することで、標的遺伝子の発現を抑制する (Fig.2)。従って、siRNA が標的遺伝子の発現を抑制するには Ago2 が必要不可欠であり、細胞質内の Ago2 量がノックダウン効率を左右する重要な要因であることが明らかとなってきた。

細胞室内の Ago2 量を増加させるには二つの手段があり、一つは Ago2 発現プラスミドを Transfection することで Ago2 を過剰発現させる方法と、リコンビナント Ago2 を細胞内に導入する方法が考えられる。Ago2 発現プラスミドを Transfection した場合には、細胞質 Ago2 量を大きく向上させることが可能であると考えられるが、一方でプラスミドによる過剰発現は臨床では遺伝子治療に該当することとなり、応用面でハードルが高い。それに対し、リコンビナント Ago2 を細胞内導入する場合には遺伝子治療に該当せず、siRNA と同様に臨床応用に向けてハードルも低いと考えられる。そこで本研究では、siRNA とともにリコンビナント Ago2 を細胞内に導入することにより、高効率なノックダウンが可能か検討を行った。

B. 研究方法

1. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターの作製

ヒト Ago2、Exportin-5、および TRBP 遺伝子のクローニングは、以下の通り行った。HeLa 細胞もしくは 293 細胞より回収した RNA を用いて逆転写反応を行うことにより、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、RT-PCR を行うことにより、各遺伝子を回収した。Ago1、Ago2 および TRBP 遺伝子に関しては、pcDNA3.1-hygro(+)にクローニングした。その後、Ago1、Ago2 および TRBP 遺伝子を pcDNA3.1-hygro(+)より切り出し、pHM15-CMV にライゲーションした (pHM15-CMV-Ago1、

pHM15-CMV-Ago2 および pHM15-CMV-TRBP)。Exportin-5 遺伝子については、pHM15-CMV に直接クローニングした (pHM15-CMV-Exp5)。

各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターに関しては、以下のように作製した。まず、pAdHM23 を XbaI で消化したのち (プラスミドの backbone に XbaI サイト有り)、Klenow で処理することにより XbaI サイトを欠損させた。その後、E3 遺伝子欠損領域に存在する Csp45I サイトを XbaI サイトに変更することにより、pAdHM23XbaI を作製した。pAdHM23XbaI を XbaI で消化したのち、AvrII で消化した pHM15-CMV-Ago1、pHM15-CMV-Ago2、-Exp5、-TRBP とそれぞれライゲーションすることにより、pAdHM23-Ago1、-Ago2、-Exp5、-TRBP を作製した。さらに作製したプラスミドを、I-CeuI/PI-SceI で消化したのち、同じく I-CeuI/PI-SceI で消化した pHM5-hU6-siL (ホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現プラスミド)とライゲーションすることにより、pAdHM23-siL-Ago1、-Ago2、-Exp5、-TRBP を作製した (Fig.1)。

作製した上記 Ad ベクタープラスミドを、PacI で消化したのち、293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad ベクターを回収した。Ad ベクターの増幅・精製・タイター測定については、定法に従い行った。

2. 上記 Ad ベクターによる RNA 干渉誘導に関する

96well プレートにホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞を 1×10^4 cells/well で播種した。翌日、各種 shRNA 発現 Ad ベクターを 1000 vector particle (VP)/cell で 1.5 時間作用させた。Ad ベクター作用より 48 時間後、LT2.0 (東洋インキ社より購入)を用いて、ルシフェラーゼ発現量を測定した。

3. 各種タンパク質導入試薬のタンパク質導入効率の比較検討

24 穴プレートに A549 細胞を 5×10^4 cells/well で播種した。翌日、市販の各種タンパク質導入試薬 (Lipofectamine2000、SAINT-PhD、X-fect protein、Bioporter) を用いて、 β -galactosidase (分子量約

116kDa)を Transfection した。Transfection より 24 もしくは 48 時間後、X-gal staining により、細胞内導入された β -galactosidase 量を評価した。

C. 研究結果

1. 各種 RNA 干渉関連タンパク質および shRNA 発現 Ad ベクターの作製による RNA 干渉誘導に関する検討

shRNA による RNA 干渉においては、まず核内において shRNA が転写されたのち、Exportin-5 を介して細胞質に輸送される。細胞質に輸送された shRNA は、細胞質内で Dicer で分解を受けたのち、Ago2 とともに RNA-induced silencing complex (RISC)を形成する。最終的に、RISC が標的 mRNA に結合することにより、mRNA を分解し遺伝子発現を抑制する(Fig.2)。まず本研究では、shRNA による遺伝子発現抑制に関与する分子のなかで、どの分子がノックダウン効率向上に向けて重要か検討した。具体的には、shRNA とともに RNA 干渉に関与する分子を過剰発現させ、ノックダウン効率を検討した。

ホタルルシフェラーゼを安定に発現する A549 細胞に対し、作製した Ad ベクターを種々の MOI で作用し、ノックダウン効率を検討した。その結果、従来の shRNA 発現 Ad ベクター (shRNA 以外は発現しない) では、1000 VP/cell で約 46%のノックダウン効率を示した (Fig.3)。それに対し、Ago2 を発現する Ad ベクターでは、60%のノックダウン効率と、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し、優れたノックダウン効率を示した。なお、TRBP もしくは Exportin-5 を過剰発現させた場合においては、有意なノックダウン効率の向上は観察されなかった。

Ago2 を過剰発現させることによりノックダウン効率の向上が得られたことから、さらに Ago1 と Ago2 において過剰発現によるノックダウン効率の向上について検討を加えた (Fig.4)。その結果、上述のように Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率の向上が観察されたが、一方で Ago1 を過剰発現させた場合においてはむしろノックダウン効率が低下する結果が

得られた。これは、過剰発現により細胞内 Ago1 量が増加したことにより、Ago1 に取り込まれた siRNA が増加し、Ago2 と結合した siRNA が減少したためと考えられた。

2. 各種タンパク質導入試薬のタンパク質導入効率の比較検討

次にリコンビナント Ago2 の細胞内導入に向けて、どのタンパク質導入試薬が最も高効率に導入可能か検討するため、Ago2 とほぼ分子量が同じである β -galactosidase を用いて、市販のタンパク質導入試薬の細胞内導入効率を検討した (Fig.5)。タンパク質導入 24 時間後ならびに 48 時間後における β -galactosidase 活性を X-gal 染色で検討したところ、24 時間後では X-fect protein および Bioporter の群で顕著な X-gal 陽性細胞が観察された。しかし、48 時間後では Bioporter 群では 24 時間後と同様に多くの X-gal 陽性細胞が観察されたものの、X-fect protein 群では X-gal 陽性細胞群は見られなかった。そこで以後の検討では、Bioporter をリコンビナント Ago2 の導入試薬として使用することとした。

3. リコンビナント Ago2 および siRNA の細胞内導入による遺伝子発現抑制に関する検討

次に、リコンビナント Ago2 の細胞内導入によるノックダウン効率の向上に向けて検討を行った。まず、リコンビナント Ago2 とルシフェラーゼに対する siRNA を同時に Transfection したところ、ノックダウン効率の向上は観察されなかった (data not shown)。さらに、リコンビナント Ago2 を先に Transfection し、その後ルシフェラーゼに対する siRNA を Transfection した場合においても、ノックダウン効率の向上は見られなかった。現在、さらに詳細に検討を進めている。

D. 考察

siRNA は次世代の革新的医薬品として期待されているが、その実用化に向けては克服すべき多くの問題点が残されている。それら問題点の中で最も克服すべきは、そのノックダウン効率である。siRNA は培

養細胞においては高いノックダウン効率を示すが、*in vivo* においては様々な要因から、総じてノックダウン効率は *in vitro* と比較すると低くなる。これを克服する方策としては、DDS 技術を活用して高効率に siRNA を導入する必要性が以前より提唱されているが、依然として画期的な DDS 技術は開発されていない。もう一つの方策としては siRNA の細胞内導入量が少なくても、高いノックダウン効率を得られるように siRNA の活性を上げることが挙げられる。siRNA の活性を上げる手段としては、siRNA を化学修飾もしくは構造を改良することにより、ノックダウン効率を改善させる方法と、RNA 干渉に関与する分子を過剰発現させることによりノックダウン効率を改善する方法とが考えられる。特に近年、RNA 干渉に関与する分子が数多く同定されるとともに、それらの分子を過剰発現させることで実際にノックダウン効率が改善することが報告されてきた。そこで本研究では、まず RNA 干渉に関与する分子のうち、どの分子を過剰発現させることが最も効果的か検討した。さらに、その分子のリコンビナントタンパク質を導入することにより、ノックダウン効率の向上が可能かどうか検討した。

まず RNA 干渉に関与する分子のうち、どの分子がノックダウン効率向上に向けて重要か検討するために、アデノウイルスベクターゲノムに siRNA の前駆体である shRNA 発現カセットと各種 RNA 干渉関連分子発現カセットを、それぞれ E1 および E3 欠損領域に搭載し、そのノックダウン効率を検討した。その結果、Ago2 を共発現させた場合、最も高いノックダウン効率を得られた。同様の結果は他のグループからも報告されており、細胞内 Ago2 量がノックダウン効率を決定する最も大きな因子と考えられる。Ago2 は哺乳類で 4 種存在する Ago タンパク質の中で唯一 Slicer 活性 (RNA 切断活性) を有する Ago タンパク質であることから、Ago2 を過剰発現させることでノックダウン効率が向上したものと考えられる。

次に過剰発現させることでノックダウン効率の向上が見られた Ago2 のリコンビナントタンパク質を導入することで、ノックダウン効率の向上が可能かどうか検討した。リコンビナント Ago2 の導入に先立ち、どのタ

ンパク質導入試薬が最も導入効率が良いか、リコンビナント β -galactosidase を用いて検討した。 β -galactosidase は分子量 116kDa と、Ago2 (分子量 100kDa) と分子量が近いことから使用することとした。その結果、Bioporter が最も高い導入効率を示した。そこで以後の実験は Bioporter を用いることとした。X-fect protein reagent では 24 時間後では多くの X-gal 陽性細胞が観察されたものの、48 時間後ではほとんど観察されなかった。これは X-fect protein reagent の場合、 β -galactosidase が細胞表面に吸着するものの、48 時間後では内在化されずに失活してしまったものと考えられる。

今回、リコンビナント Ago2 を用いた検討においては、siRNA との Co-transfection によるノックダウン効率の向上は観察されなかった。これは、リコンビナント Ago2 が細胞質内に放出され siRNA と結合可能になるまでに、siRNA は既に内在性の Argonaute タンパク質と RISC を形成しているためと考えられた。またリコンビナント Ago2 を細胞内導入後、ルシフェラーゼに対する siRNA (最終濃度 10nM) を Transfection した場合には、ノックダウン効率の向上は観察されなかった。これは、ルシフェラーゼに対する siRNA に関しては 10nM で十分なノックダウン効率を得られているため、ノックダウン効率の更なる向上が観察されなかったと思われる。

。来年度はさらに詳細に検討を進めるとともに、リコンビナント Ago2 の大量精製法の確立に向けても検討する予定である。

E. 結論

1. siRNA の前駆体である shRNA とともに、Ago2 を過剰発現させることにより、ノックダウン効率を向上させることに成功した。
2. 市販のタンパク質導入試薬の中で、Bioporter が最も Ago2 の細胞内導入に適していることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

該当なし

G-2 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

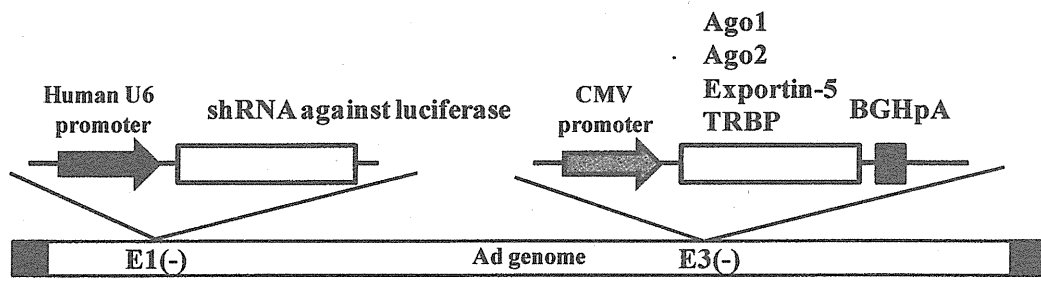


Fig.1 Ad vector genome containing shRNA- and RNAi-related protein Expression cassettes.

Ago; Argonaute.

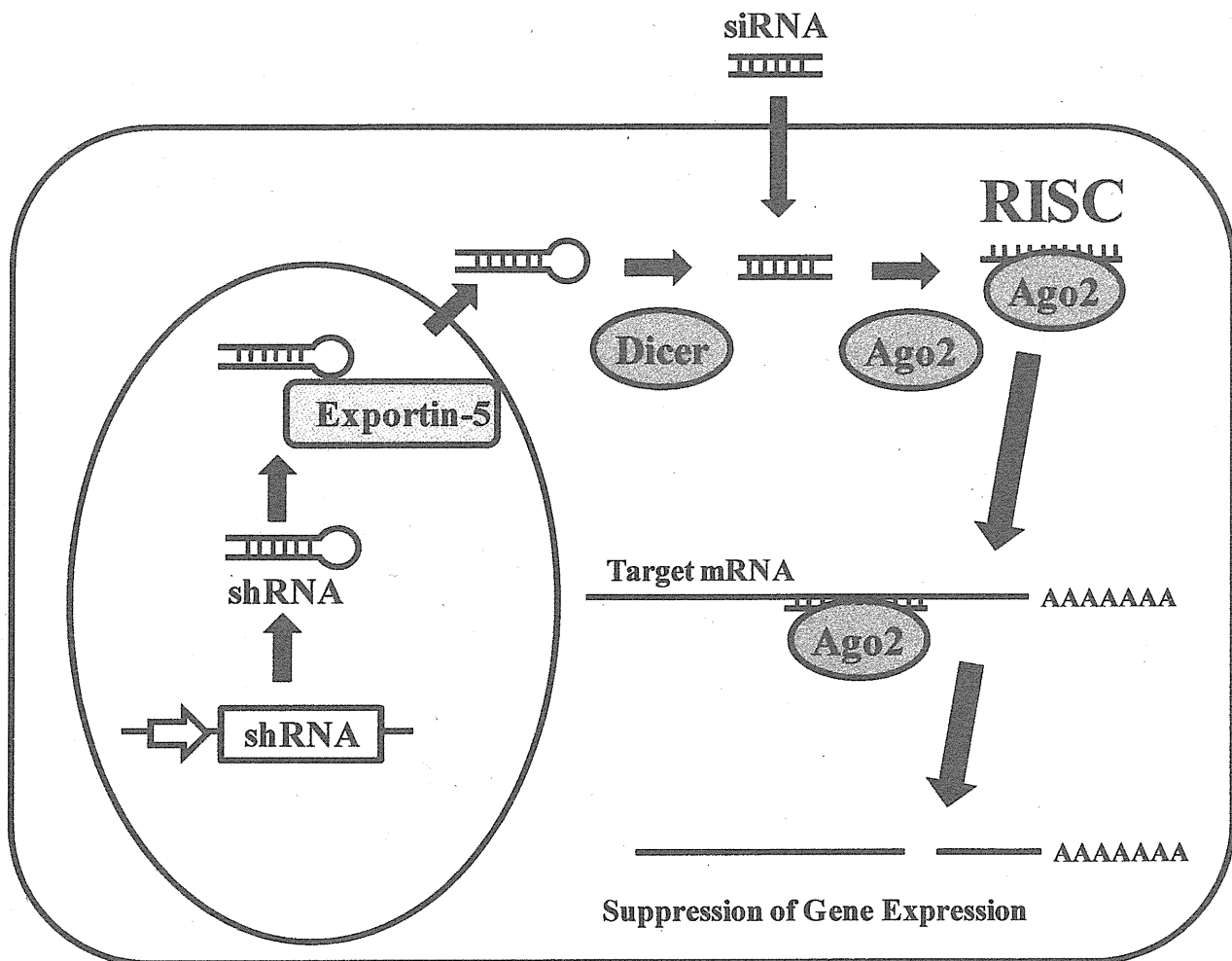


Fig.2 Mechanism of RNA interference.

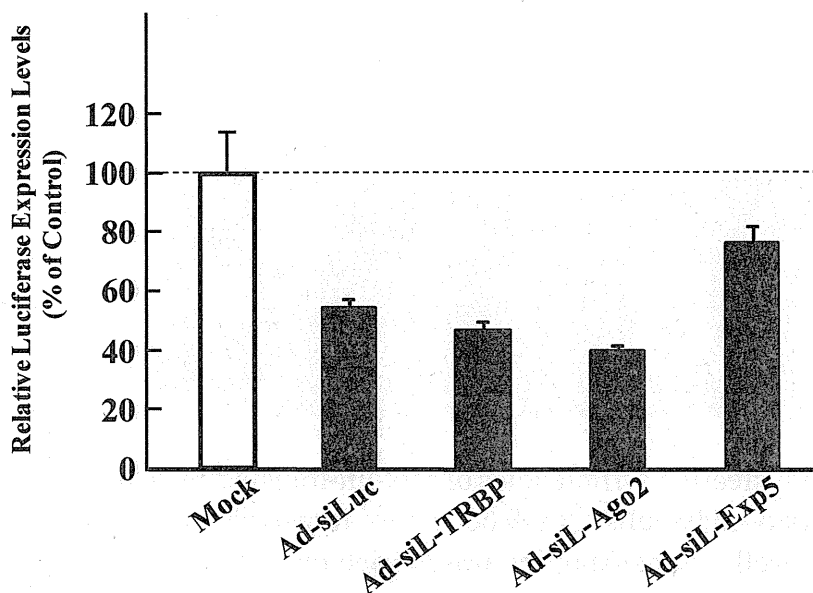


Fig.3 shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase expression following transduction with the Ad vectors expressing shRNA and RNAi-related proteins.

Firefly luciferase-expressing A549 cells were transduced with the Ad vectors at 1000 VP/cell. Firefly luciferase expression was determined 48 h after transduction.

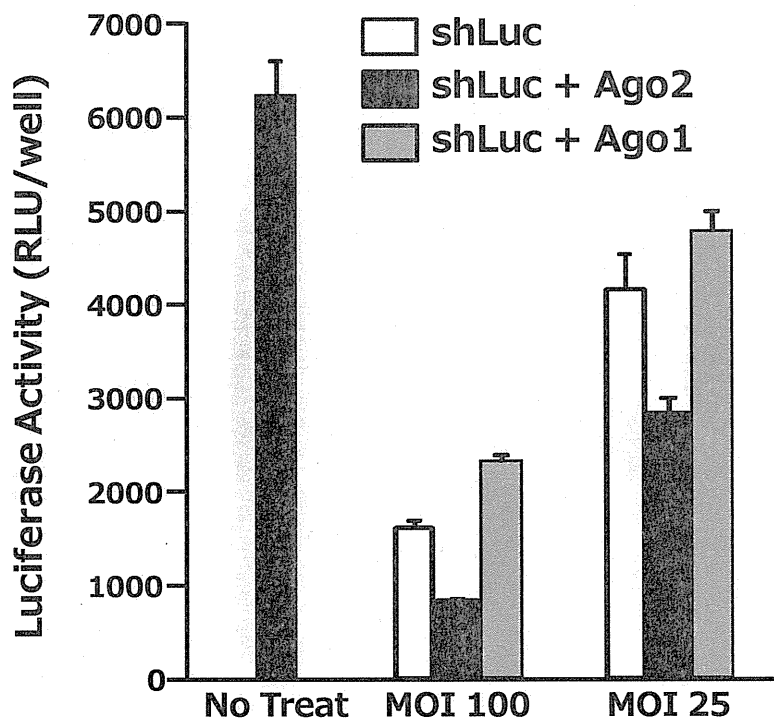


Fig.4 shRNA-mediated knockdown of firefly luciferase following transduction with an Ad vectors expressing shRNA against firefly luciferase and Ago1 or Ago2. Firefly luciferase-expressing A549 cells were transduced with an Ad vector at MOI 25 and 100. Luciferase expression was determined 48 hr after transduction.

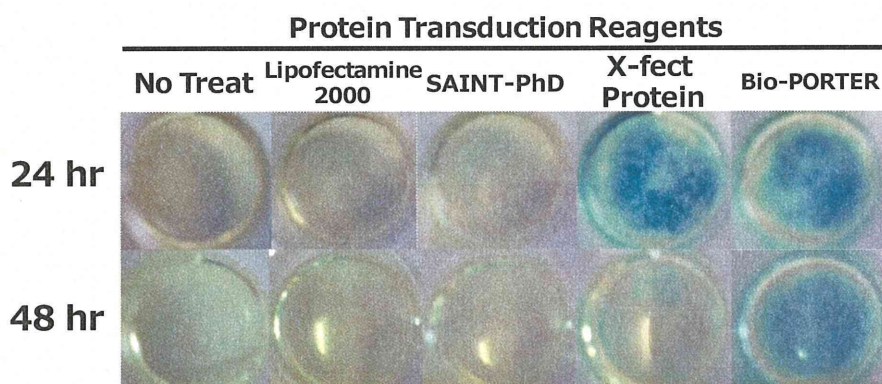


Fig.5 Comparison of transfection efficiencies of protein-transfection reagents following transfection into A549 cells. A549 cells were transfected with recombinant β -galactosidase (2.4 μ g/well). X-gal staining was carried out 24 and 48 hr after transfection.

バブルリポソームと超音波の併用による siRNA および たん白質デリバリー特性の評価に関する研究

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 講師

研究要旨

バブルリポソームと超音波照射を併用した Small interfering RNA (siRNA) および Argonaute2 (Ago2) の細胞質内デリバリーの可能性について評価した。今回の検討では、siRNA およびモデルたん白質を用いて、バブルリポソームと超音波の併用によるデリバリー特性を評価した。その結果、siRNA デリバリーにおいて配列特異的なノックダウン効果を得ることができた。また、たん白質デリバリーではエンドサイトーシス経路を介すことなく細胞質内に直接デリバリーできることを見出した。今後、siRNA と Ago2 の同時細胞質内デリバリーについて検討を行う。

A. 研究目的

Small interfering RNA (siRNA) は、標的たん白質の発現を抑制可能であることから、様々な疾患に対する副作用の少ない新たな治療法として期待されている。これに伴い、疾患に対する標的配列のスクリーニング、siRNA の安定性を向上させるための化学修飾 siRNA の開発や標的部位へのデリバリーシステムの開発が進められている。これらの背景の下、実際に臨床試験が進められている。しかし、細胞内に十分量の siRNA が導入できたとしても、siRNA 効果の発現に必要な Ago2 が枯渇し、十分な遺伝子発現抑制効果が得られない問題点が指摘されている。この問題を解決するためには、siRNA をデリバリーする際に同時に Ago2 を細胞質内に導入すればよいのではないかと考えられる。

これまでに siRNA デリバリーに関する研究は様々行われているが、Ago2 デリバリーの研究はほとんどなされていない。それ以前にたん白質の細胞質内デリバリーの研究があまり進んでいないのが現状である。そのため、当該課題を遂行していくためには、効率よく細胞質内にたん白質をデリバリー可能なシステム開発が必要であると考えられる。

必要であると考えられる。

さて、これまでに我々はリポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）への超音波照射による生じるジェット流を細胞質内への物質デリバリーの駆動力として利用する新たなデリバリーシステムを開発した。本デリバリーシステムは物理的なエネルギーを利用して細胞質内に直接外来性物質を導入することができるため、細胞種や導入したい物質の種類などに影響されないデリバリーシステムとして期待される。特に本研究課題にあるような siRNA と Ago2 の同時デリバリーに応用する上で、本方法が適しているものと考えられる。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波照射の併用による、siRNA と Ago2 の細胞内デリバリーについて検討を行う。なお、本年度はバブルリポソームと超音波照射の併用による細胞への物質導入特性を評価するため、siRNA およびモデルたん白質を用い、それぞれ単独での細胞内デリバリーについて検討した。

B. 研究方法

1. バブルリポソームの調製方法

リポソームは逆相蒸発法により調製した。構成脂質 (total 100 μmol) として Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) : (DSPE-PEG(2K)-OMe) = 94 : 6 (モル比) を秤取し、Chloroform: Isopropylether = 1:1 (total 8 mL) に溶解させ、PBS を 4 mL 加えた。次に、バス型ソニケーターで超音波処理し、w/o 型エマルションを生成し、約 60°C の水浴上でロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去した。その後、ドライアイスアセトン中で凍結融解を 3 回繰り返す、extrusion 法で平均粒子径を約 100 nm にした。このリポソーム懸濁液を脂質濃度 1 mg/mL になるよう PBS で希釈し、リポソーム 2 mL を乾熱滅菌済みのバイアル瓶に入れた。10 mL 用注射筒を用いてバイアル瓶内を 7.5 mL のパーフルオロプロパンガスで置換した。高圧蒸気滅菌したゴム栓とアルミキャップでシールし、10 mL 用シリンジと 27 G 注射針を用いて、同じガス 7.5 mL で加圧した。その後、バス型超音波照射装置で超音波照射し、バブルリポソームを調製した。

2. キャビテーションのおよぼす siRNA への影響評価

2 mL チューブに Luciferase GL2 Duplex (150 nM) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 μg) を混合し、Opti MEM で総量を 500 μL にした。その後、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、フェノール/クロロホルム抽出によりバブルリポソームを除去した。さらにエタノール沈殿し、siRNA を TE buffer で溶解した。溶解した siRNA を 0.7% アガロースゲルにて電気泳動し、そのバンドを確認した。

3. プラスミドと siRNA の共導入方法

2 mL チューブに懸濁状態の COS-7 細胞 (1×10^5 cells) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 μg)、GL2 promoter vector (5 μg)、および Luciferase GL2 Duplex (5 pmol, 12.5 pmol) を混合した。Opti MEM で総量を 500 μL にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心し細胞を沈殿させた。この細胞を培

地にて洗浄し、培地に再懸濁した。この細胞を 48 穴プレートに播種し、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。なお、本検討では、細胞に対する傷害性を評価するため、別途 MTT 法による細胞生存率も検討した。

4. ルシフェラーゼ恒常発現細胞へのルシフェラーゼ siRNA の導入方法

2 mL チューブに懸濁状態のルシフェラーゼ発現 Colon-26 細胞 (1×10^5 cells) とバブルリポソーム (総脂質量: 60 μg)、および control siRNA duplex, ホタルルシフェラーゼ GL3 (100 pmol) を混合した。Opti MEM で総量を 500 μL にし、速やかに超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 50%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec.) 照射した。超音波照射プローブは、直径 6 mm のものを使用した。超音波照射後、直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心し細胞を沈殿させた。この細胞を培地にて洗浄し、培地に再懸濁した。この細胞を 48 穴プレートに播種し、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。

5. ニワトリ卵白アルブミン (OVA) への Alexa488 修飾

2 mL チューブに 5 mg の OVA を 500 μL の 50 mM bicarbonate buffer (pH 9.6) で溶解させた。別に Alexa Fluor 488 succinimidyl ester を N,N-Dimethylformamide (DMF) で溶解し、濃度を 10 mg/mL とした。OVA 溶液に Alexa Fluor 488 succinimidyl ester を 50 μL 加え、室温で 2 時間振とうした。その後、1.5 M の glycine を 100 μL 加え、1 時間振とうすることで反応を終了させた。次に、この溶液を Sephadex G-25 カラムを通し、Alexa Fluor 488 が結合した OVA (Alexa 488-OVA) を回収した。

6. バブルリポソームと超音波照射の併用による OVA の細胞内導入方法

マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) (1×10^6 cells/mL) を glass bottom dish に播種し、CO₂ インキュベーターで 1 晩培養した。その後、その細胞を 10 mM NaN₃ で処理しエンドサイトーシスを阻害した。この細胞に対し、

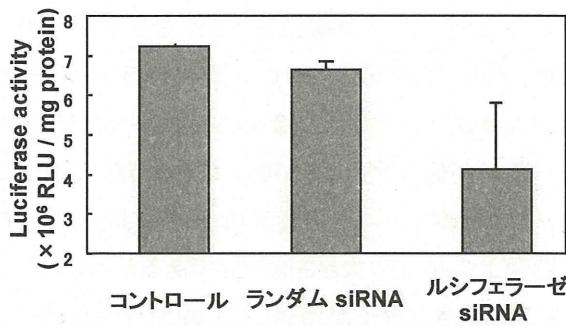


Fig.5 ルシフェラーゼ恒常発現細胞へのルシフェラーゼ siRNA の導入

ルシフェラーゼ恒常発現 Colon:26 細胞 (1×10^5 cells/tube) とバブルリポソーム (60 μ g)、および GL3 siRNA (100 pmol) を添加し、超音波 (Frequency : 2 MHz, Duty : 10%, Burst Rate : 2 Hz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec.) 照射した。細胞を 2 回洗浄し、37°C、5 % CO₂ で 24 時間培養した。培養後、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。なお、ルシフェラーゼ活性は RLU/ mg protein で示した。

4. バブルリポソームと超音波照射による細胞内へのたん白質デリバリー効率を評価するため、モデルたん白質として Alexa488 で蛍光ラベルしたニワトリ卵白アルブミン (Alexa-OVA) を用い検討した (Fig.6)。DC に Alexa-OVA を添加した群、Alexa-OVA とバブルリポソームを添加した群、Alexa-OVA を添加し超音波照射した群では細胞内にドット状の Alexa-OVA が観察された。これはエンドサイトーシスにより取り込まれた Alexa-OVA

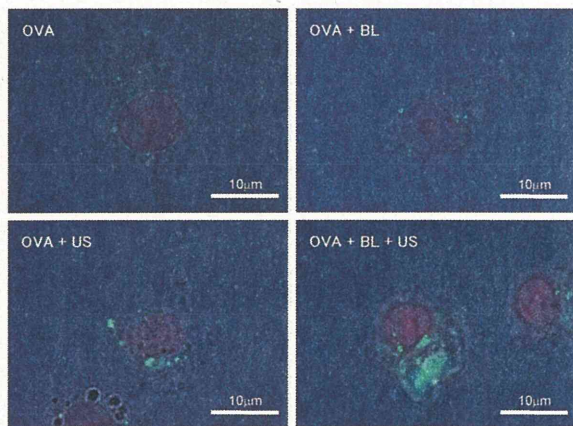


Fig.6 DC における外来性たん白質の細胞内分布

DC に Alexa-OVA (OVA : 緑) とバブルリポソーム (BL) を加え、超音波照射 (US) した。その後、1 時間培養し、3% パラホルムアルデヒドにて細胞固定し、ヨウ化プロピジウム (PI : 赤) にて核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。超音波照射条件 (Frequency : 2 MHz, Intensity : 2 W/cm², Duty : 10%, Time : 10 sec. 3 回, Burst Rate : 2 Hz)

と考えられる。一方、Alexa-OVA とバブルリポソームを添加し、超音波照射した群ではドット状の

Alexa-OVA に加え、細胞質内に広く分布しているのが認められた。これはエンドサイトーシス経路で取り込まれたドット状の Alexa-OVA とエンドサイトーシス非依存的に送達された Alexa-OVA が同時に観察されたと考えられる。

次に、バブルリポソームと超音波による DC への Alexa-OVA の取り込みをエンドサイトーシス阻害下で観察した (Fig.7)。その結果、DC に

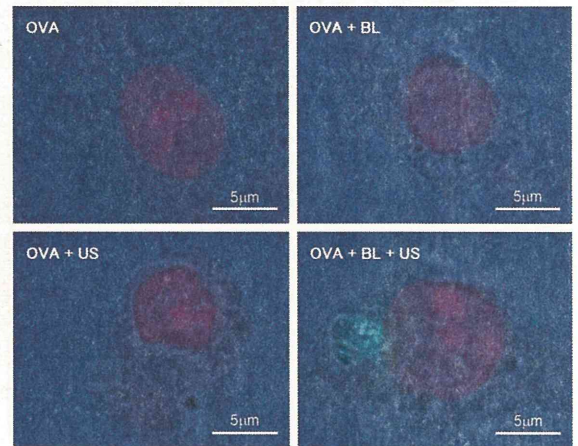


Fig.7 エンドサイトーシス阻害下における外来性たん白質の送達

DC に 10 mM アジ化ナトリウムを添加し、4°C 下で Alexa-OVA (OVA : 緑) とバブルリポソーム (BL) を加え、超音波照射 (US) した。その後、3% パラホルムアルデヒドにて細胞固定し、ヨウ化プロピジウム (PI : 赤) にて核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。超音波照射条件 (Frequency : 2 MHz, Intensity : 2 W/cm², Duty : 10%, Time : 10 sec. 3 回, Burst Rate : 2 Hz)

Alexa-OVA を添加した群、Alexa-OVA とバブルリポソームを添加した群、Alexa-OVA を添加し超音波照射した群では Alexa-OVA による蛍光は観察されなかった。一方、Alexa-OVA とバブルリポソームを添加し、超音波照射した群ではエンドサイトーシス阻害下にもかかわらず、細胞質内で Alexa-OVA による蛍光が観察された。このことからバブルリポソームと超音波照射の併用法はエンドサイトーシスを介さず、外来性たん白質を細胞質に直接導入可能な方法であることが示唆された。さらに、本方法によるエンドサイトーシス非依存的な外来性たん白質の導入効率について検討した。上述と同様の方法でエンドサイトーシスを阻害し、Alexa-OVA とバブルリポソームを加え、超音波照射した。その後、細胞を洗浄し、外来性たん白質の導入率をフローサイトメトリーにて解析した (Fig.8)。

その結果、DC に Alexa-OVA を加えた群、Alexa-OVA とバブルリポソームを加えた群、Alexa-OVA を加え超音波照射した群の導入効率はそれぞれ 4.4%、5.4%、6.9%と低い値であった。一方、Alexa-OVA とバブルリポソームを加え超音波照射した群の導入効率は 30.6% と高い値を示した。このようにバブルリポソームと超音波の併用により、外来性のたん白質が細胞質内に導入されること、またその導入効率が約 30% であることが明らかとなった。このようにバブルリポソームと超音波の併用法が、分子量4万5千の OVA を、エンドサイトーシス経路を介さず細胞質内に導入可能であることが明らかとなった。

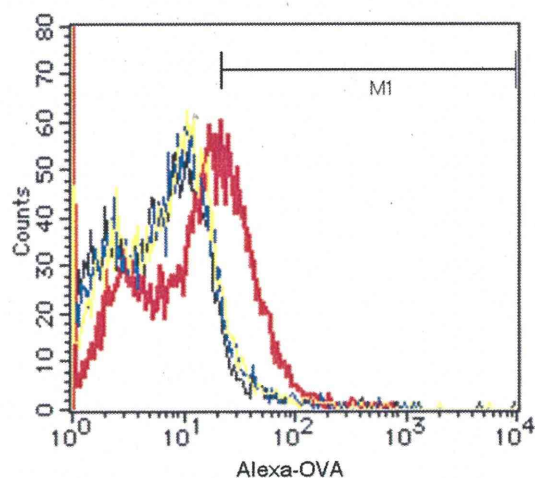
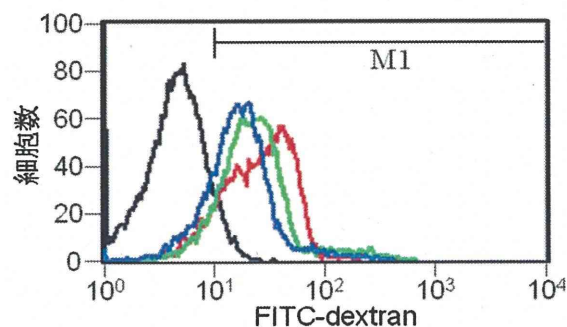


Fig.8 エンドサイトーシス障害下における外来性たん白質の送達効率

DC に 10 mM アジ化ナトリウムを添加し、4°C 下で Alexa-OVA とバブルリポソーム (BL) を加え、超音波照射 (US) した。その後、フローサイトメトリーにより送達効率を解析した。なお、本実験では Alexa-OVA を加えない群を control とした。超音波照射条件 (Frequency : 2 MHz, Intensity : 2 W/cm², Duty : 10%, Time : 10 sec. 3 回, Burst Rate : 2 Hz)

- バブルリポソームと超音波照射の併用による外来性物質の細胞内デリバリーにおける特性を評価するため、分子量の異なる FITC-デキストランを用いて検討をおこなった。その結果、いずれの分子量の FITC-デキストランであっても細胞内にデリバリーできることが明らかとなった。これは、本デリバリー法が細胞膜に一過性の小孔をあけて外来性物質をデリバリーする方法であるため、様々な分子量の分子も細胞内に導入できたものと考えられた。

次に、デリバリー効率におよぼす分子量の影響を検討した。その結果、FITC-デキストランの分子量が大きくなるにつれて、徐々に細胞内へのデリバリー効率が低下することが明らかとなった。これは、バブルリポソームと超音波の併用により生じる細胞膜上の小孔の大きさは一定であるため、分子サイズの大きな分子が透過しにくかったためと考えられた。いずれにしても、本方法では様々な分子を細胞内に導入できる方法であることが示された。



	平均蛍光強度	% of M1 gated
— Non-treat	5.7	6.6
— Mw: 4,000	24.5	86.0
— Mw: 20,000	22.4	87.3
— Mw: 70,000	16.5	77.4

Fig.9 FITC-デキストランの送達効率

DC に 10 mM アジ化ナトリウムを添加し、4°C 下で FITC-デキストランとバブルリポソーム (BL) を加え、超音波照射 (US) した。その後、フローサイトメトリーにより送達効率を解析した。なお、本実験では FITC-デキストランを加えない群を control とした。超音波照射条件 (Frequency : 2 MHz, Intensity : 2 W/cm², Duty : 10%, Time : 10 sec. 3 回, Burst Rate : 2 Hz)

E. 結論

バブルリポソームと超音波照射の併用による siRNA および Ago2 デリバリーの同時デリバリーに向けた基礎的な検討を行った。まず、siRNA のデリバリーについて検討したところ、本デリバリー法により細胞内に siRNA が導入可能であること、またその結果配列特異的な遺伝子発現抑制効果が認められた。さらに、Ago2 のデリバリーの可能性を評価するため、モデルたん白質を利用してデリバリー効率を評価した。その結果、エンドサイトーシス経路を介さずに細胞質内にたん白質がデリバリーできることを見出した。そこで、細胞内へのデリバリー特性評価を目的に分子量の異なる分子を

用いて検討を行った。その結果、分子量が大きくなるにつれてデリバリー効率が徐々に低下する傾向が認められた。しかし、本デリバリー法で様々な分子を導入できる可能性が見出された。このように本デリバリー法が siRNA やたん白質を細胞質内にデリバリー可能な方法であることが明らかとなった。また、本デリバリー法の特性を考えると、siRNA と Ago2 たん白質の同時デリバリーにも十分に応用可能ではないかと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G-1 論文発表

1. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers. *Mol Pharm.*, 8: 2416-2423 (2011)
2. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release* 156: 355-363 (2011)
3. Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M.: A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*, 421: 379-387 (2011)
4. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm.* 8: 543-554 (2011)
5. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K,

Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res.* 28: 712-719 (2011)

6. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex-in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.*, 152: 202-206 (2011)

G-2 学会発表

1. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, The Combination Therapy of Therapeutic Ultrasound and Dendritic Cell-Based Immunotherapy, WFUMB2011、オーストリア、2011年8月26-30日
2. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波造影・治療技術の新展開、日本バイオイメージング学会、北海道、2011年9月1-2日
3. 佐藤紗也佳、真柴拓哉、本田亜紀、Citterio Daniel、小田雄介、鈴木 亮、丸山一雄、鈴木孝治、静岡 DDSカンファランス、静岡、2011年9月16日
4. Ryo Suzuki, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Induction of anti-tumor immunity in the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy、日本癌学会、名古屋、2011年10月3-5日
5. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of an effective gene delivery system with sonoporation in cancer gene therapy, AAPS2011、米国、2011年10月22-27日
6. 鈴木 亮、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を

利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果の増強に関する研究、東京、2011年11月26日

7. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価、マイクバブルと超音波の相互作用に関するシンポジウム、名古屋、2012年1月20日
8. 鈴木 亮、根岸洋一、必ずうまくいくソノポレーション法:実験の実際とコツ、第4回超音波分子診断治療研究会、福岡、2012年3月3日、招待講演

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

なし

H-2 実用新案登録

なし

H-3 その他

なし

I. 研究協力者

小田 雄介

平田 圭一

宇留賀 仁史

関 むつみ

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, <u>Suzuki R</u> , Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y	Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers	Mol Pharm	8	2416-2423	2011
Un K, Kawakami S, Higuchi Y, <u>Suzuki R</u> , Maruyama K, Yamashita F, Hashida M	Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure.	J Control Release	156	355-363	2011
Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, <u>Suzuki R</u> , Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M	A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors	Int J Pharm	421	379-387	2011
Un K, Kawakami S, <u>Suzuki R</u> , Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.	Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier	Mol Pharm	8	543-554	2011
Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, <u>Suzuki R</u> , Maruyama K, Aramaki Y.	Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure	Pharm Res	28	712-719	2011

Hagisawa K, Nishioka T, <u>Suzuki R</u> , Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M.	Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex—in vitro and in vivo study	Int J Cardiol	152	202–206	2011
--	---	---------------	-----	---------	------



A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors

Kouichi Shiraishi^a, Reiko Endoh^a, Hiroshi Furuhashi^a, Masamichi Nishihara^b, Ryo Suzuki^c, Kazuo Maruyama^c, Yusuke Oda^c, Jun-ichiro Jo^d, Yasuhiko Tabata^d, Jun Yamamoto^e, Masayuki Yokoyama^{a,*}

^a Medical Engineering Laboratory, Research Center for Medical Science, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

^b International Institute for Carbon-Neutral Energy Research (I2CNER), Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

^c Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Midori-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-5195, Japan

^d Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawara-cho Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^e Division of Physics and Astronomy, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2011

Received in revised form 27 August 2011

Accepted 2 October 2011

Available online 15 October 2011

Keywords:

Theranostics
Tumor targeting
Ultrasound
Perfluorocarbon
Emulsion

ABSTRACT

Theranostics means a therapy conducted in a diagnosis-guided manner. For theranostics of solid tumors by means of ultrasound, we designed a nano-sized emulsion containing perfluoropentane (PFC5). This emulsion can be delivered into tumor tissues through the tumor vasculatures owing to its nano-size, and the emulsion is transformed into a micron-sized bubble upon sonication through phase transition of PFC5. The micron-sized bubbles can more efficiently absorb ultrasonic energy for better diagnostic images and can exhibit more efficient ultrasound-driven therapeutic effects than nano-sized bubbles. For more efficient tumor delivery, smaller size is preferable, yet the preparation of a smaller emulsion is technically more difficult. In this paper, we used a bath-type sonicator to successfully obtain small PFC5-containing emulsions in a diameter of ca. 200 nm. Additionally, we prepared these small emulsions at 40 °C, which is above the boiling temperature of PFC5. Accordingly, we succeeded in obtaining very small nano-emulsions for theranostics through a very facile method.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

'Theranostics', 'theranosis', or 'theragnosis' is a newly created term in the fields of imaging diagnosis and drug delivery systems. As a word, 'theranostics' (Chen, 2011; Lammers et al., 2010, 2011; MacKay and Li, 2010) is a combination of therapy and diagnosis, and is defined as therapy conducted in a diagnosis-guided manner. A typical example of theranostics is found in a carrier system containing both a contrast agent for diagnosis and a drug for therapy. Theranostics has been studied with various types of drug carriers including liposomes (Kamaly and Miller, 2010), small molecules (Kalber et al., 2011), nano-particles (Jeong et al., 2011; Kim et al., 2010), emulsions (Gianella et al., 2011), synthetic polymers (Bryson et al., 2009), polymeric micelles (Blanco et al., 2009; Kaida et al., 2010; Min et al., 2010; Nakamura et al., 2006; Shiraishi et al., 2009,

2010), and other nano-sized carrier systems (Ai, 2011; Moon et al., 2011; Pan et al., 2008; Sanson et al., 2011). Ultrasound is considered to be a preferable modality for theranostics because ultrasound has been well studied and developed for image diagnoses and local therapies such as ultrasound lithotripsy and hyperthermia.

For theranostics of solid tumors, micron-sized bubbles (microbubbles) (Hernot and Klibanov, 2008; Schutt et al., 2003; Unger et al., 2004) have been actively studied because the bubbles provide strong contrasts in ultrasonic images, and because cavitation of microbubbles (Grishenkov et al., 2009) induced by ultrasound can effectively damage cells. Cells can be damaged by both jet-stream and heat that are generated in the bubbles' cavitation. In the design of microbubbles for tumor applications, the size of the microbubbles is a very important factor. Larger microbubbles can produce stronger ultrasound image contrasts. In contrast, smaller bubbles are preferred for efficient delivery into tumor tissues because the size of the trans-vascular passage from the blood-stream into the tumor interstitial space is of a diameter smaller than 1 μm. It is believed that the maximum diameter for efficient translocation into tumor tissues is 200–400 nm (Ishida et al., 1999; Litzinger et al., 1994; Nagayasu et al., 1996; Yuan et al., 1995). (In this diameter range, bubbles must be called nano-bubbles.) This is an essential dilemma concerning the size of bubbles used for

Abbreviations: PFC, perfluorocarbon; PFC5, perfluoropentane; PFC6, perfluorohexane; DBU, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene; PEG-P(Asp(C7F9)_x), poly(ethylene glycol)-*b*-poly(4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl aspartate) block copolymer.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3433 1111x2336; fax: +81 3 3459 6005.

E-mail address: masajun2093ryo@jikei.ac.jp (M. Yokoyama).

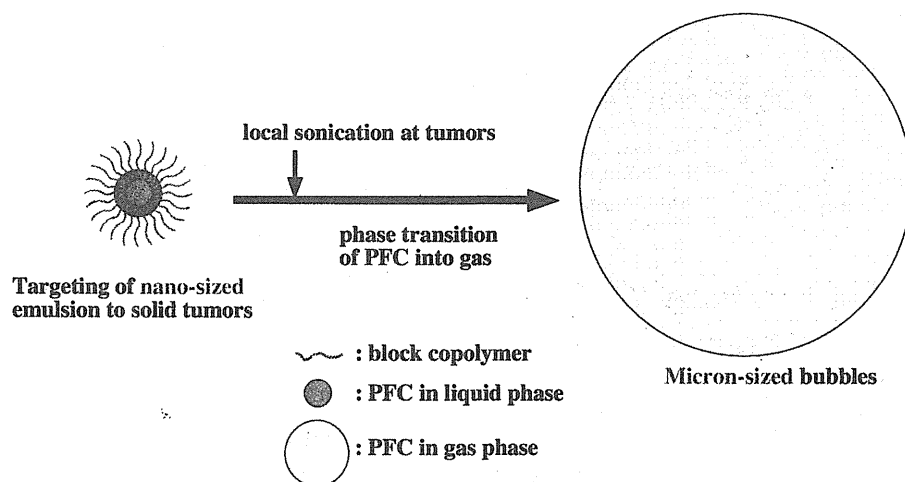


Fig. 1. Concept of phase-transition type nano-emulsion.

tumor theranostics. In order to resolve this dilemma, Kawabata et al. (Asami et al., 2009, 2010; Kawabata et al., 2005, 2010a,b) and Rapoport et al. (Mohan and Rapoport, 2010; Rapoport et al., 2007, 2009a, 2009b, 2010a,b, in press) examined nano-emulsions incorporating a specific kind of perfluorocarbon, as illustrated in Fig. 1. A boiling temperature of this perfluorocarbon (perfluoropentane, PFC5) is 29 °C, which is lower than normal human body temperature, but the integrity of these nano-emulsions is maintained owing to interfacial excessive pressure called Laplace pressure (Rapoport et al., 2009a). Upon ultrasound irradiation, the integrity of these nano-emulsions is broken, and this liquid perfluorocarbon exhibits a phase-transition into gas. Accordingly, the nano-emulsions change into microbubbles. Efficient delivery into tumor tissues is attained with the nano-emulsions, and then local sonication at the tumor tissues generates the microbubbles from the nano-emulsions, resulting in high imaging and therapeutic efficiencies. This phase-transition type nano-emulsion may be an ideal system for the theranostics of solid tumors.

Generally, preparations of smaller emulsions in a nano-meter range are more difficult because a higher power input is required in the emulsion preparations. (Tadros et al., 2004) Previously, we had prepared perfluorocarbon-containing emulsions by means of vigorous mechanical stirring with a magnetic stirrer and obtained emulsions of ca. 600 nm in diameter (Nishihara et al., 2009). In this paper, we have tried to obtain much smaller emulsions by means of ultrasound irradiation as well as high-pressure emulsification. Another important parameter for preparations of the phase-transition type nano-emulsion is temperature. A boiling temperature (29 °C) of perfluoropentane (PFC5) is close to the room temperature; therefore, preparations must be carried out at a low temperature and in a small scale for evasion of evaporation of PFC5 because heat generated in emulsification or sonication processes must be efficiently removed for the evasion. We want to find a facile preparation method that can be carried out at either room or a higher temperature, and that can be easily scaled up because the heat removal is a much less serious concern than the conventional method. Rapoport et al. (Rapoport et al., 2010b) reported preparations of nano-bubbles by means of ultrasound irradiation (with a probe type sonicator at 20 kHz) in ice-cold water. They obtained nano-emulsions of ca. 600 nm in diameter.

In this paper, we have tried to obtain very small nano-emulsions containing PFC5 by using an inexpensive bath-type sonicator (usually used as an ultrasonic cleaner) at room temperature or higher. For this emulsion preparation, we synthesized fluorinated block copolymers and optimized their compositions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

We purchased perfluoropentane (PFC5) and perfluorohexane (PFC6) from Stream Chemicals (Newburyport, MA, USA) and Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA), respectively, and used them as received. We purchased 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl iodide from Sigma-Aldrich (Tokyo branch, Japan) and used it as received. We purchased reagent-grade solvents, dehydrated *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), and diethyl ether from Wako Chemicals (Tokyo, Japan), and used them as received. Poly(L-lactic acid)-grafted gelatin was prepared through a coupling reaction between a primary amine group of gelatin and a terminal hydroxyl group of the poly(L-lactic acid) by the use of disuccimidyl carbonate according to a published synthetic procedure. (Tanigo et al., 2010) Poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lactic acid) block copolymer (PEG-*b*-PLA) was purchased from Sigma-Aldrich (Tokyo branch, Japan). The average molecular weights of the PEG block and the PLA block were 750 and 1,000, respectively.

2.2. Block copolymer synthesis

Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl aspartate) block copolymers (PEG-*P*(Asp(C7F9)*x*)) were prepared by means of esterification of the aspartic units of poly(ethylene glycol)-*b*-poly(aspartic acid) block copolymer (PEG-*P*(Asp)) by the use of an iodinated compound, as shown in Fig. 2. PEG-*P*(Asp) was synthesized according to our previous paper (Yamamoto et al., 2007). A value *x* in the PEG-*P*(Asp(C7F9)*x*) formula denotes mol.% of the esterified units. This esterification reaction was carried out with a corresponding iodinated compound in the presence of a super base according to a previously reported procedure (Opanasopit et al., 2004; Yokoyama et al., 2004; Yamamoto et al., 2007) with a slight modification.

The starting material was poly(ethylene glycol)-*b*-poly(aspartic acid) block copolymer (PEG-*P*(Asp)). The average molecular weight of PEG was 5200 (*n*=119 in Fig. 2), and the average number of Asp units per one chain was 26.0. The aspartate amide bond can be either α or β , and our group previously had reported that a ratio of α : β was 1:3 (=a:b in Fig. 2) (Yokoyama et al., 2004). PEG-*P*(Asp) (2.001 g, containing 6.33×10^{-3} mol Asp residue) was dissolved in 20 mL of DMF. To this mixture, was added both 4.904 g of 4,4,5,5,6,6,7,7,7-nonafluoroheptyl iodide (which is