

20111019A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進 研究事業

細胞特異的・高効率なsiRNA送達法の開発と難治性肝疾患治療への展開

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 川上 茂

平成 24 (2012) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
細胞特異的・高効率なsiRNA送達法の開発と難治性肝疾患治療への展開---	1	
川上 茂		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	8
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	9

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発 研究事業）
（総括）研究報告書

細胞特異的・高効率なsiRNA送達法の開発と難治性肝疾患治療への展開

研究代表者 川上 茂 京都大学大学院薬学研究科 講師

研究要旨：本研究では、細胞特異的・高効率なsiRNA送達法を開発し、難治性肝疾患治療への応用を目指す。1年目は、肝類洞血管内皮、2年目は肝星（伊東）細胞を標的とした高効率DDSキャリア構築、3年目は、肝硬変モデルマウスを用いてsiRNA DDSによる新規治療法開発が目標である。2年目となる本年度は、肝星細胞に発現するマンノース6リン酸（M6P）レセプターに認識させるための認識素子をリポソーム表面提示させるためM6P修飾脂質（M6P-Chol）を用いて、M6P修飾リポソームを調製した。また、M6P修飾リポソームがM6Pレセプターを介して、同レセプターを高発現するB16BL6細胞に結合し、B16BL6細胞結合量はM6P含有量15%で最大になった。そこでヒトHSP47のラットホモログであるgp46を標的とするsiRNAとの複合体調製が可能なM6P修飾カチオン性リポソーム/siRNA複合体の調製を行った。M6P受容体を発現するNRK細胞を用いた評価では、M6P-Chol含有量15,20%のM6P修飾リポソーム複合体において、顕著なgp46の遺伝子ノックダウン効果を示すことが示された。

A. 研究目的

核酸の高効率なin vivo送達は、小動物を用いて原発臓器・細胞を対象とした遺伝子機能解析並びに病態モデル動物作成による創薬標的遺伝子/タンパク質および治療薬探索や直接作用を発揮させる遺伝子治療を通じて、創薬のためのライフサイエンス研究の進展に貢献する。その実現のためには、標的細胞に核酸医薬を送達する技術の開発が不可欠であり、現在、世界中でベクター開発が活発に行われている。とりわけ近年、siRNAを用いた標的指向DDS送達による治療効果に関する報告がなされ、今後の医療展開が期待されている。

リポソームや高分子など非ウイルスベクターによる送達は、低免疫原性、安全性、調製の容易さから広範囲な研究施設での使用やヒト適用において利点を有する。申請者らは、肝臓を構成する各細胞が固有に有し、厳密な基質認識性を有する糖鎖認識機構に認識されるように分子設計した糖修飾カチオン性リポソームを開発した。その後、全身・臓器・細胞レベルでの定量的な動態解析・最適化を行い、細胞選択的な核酸医薬送達並びに治療展開に成功した。また、糖修飾リポプレックスとバブルリポソームの併用と超音波(ultrasound; US)照射により標的細胞での細胞穿孔に基づいた遺伝子発現の増強に成功した。

このような背景を基盤として本研究では、申請者らが開発を進めている糖鎖による生体分子の特異的認識に基づくin vivo誘導と超音波による細胞穿

孔を組み合わせた新規DDS技術を、創薬シーズが多く生体での多様な作用が期待できるsiRNA送達法に応用し開発を進める。さらに、肝類洞血管内皮並びに肝星（伊東）細胞を標的とした高効率送達による難治性肝疾患に対する新規治療法開発を目指す。

本計画は3年間であり、1年目は、肝類洞血管内皮、2年目は肝星（伊東）細胞を標的とした高効率DDSキャリア構築、3年目は肝硬変モデルマウスを用いたsiRNA DDSによる新規治療法開発が目標である。まず1年目は、超音波応答性マンノース修飾バブルリポソーム(Man-PEG_{2,000} bubble liposome)の調製法と体外からの超音波照射による肝類洞血管内皮への細胞特異的・高効率なsiRNAの送達法の開発と肝炎治療への応用を行い、ICAM-1に対するsiRNAを用いた肝臓類洞血管内皮細胞への高効率な細胞選択的ターゲティングにより、種々の急性肝炎モデルマウスに対して治療効果を示させることに成功した。2年目となる本年度は、肝星（伊東）細胞を標的とした高効率DDSキャリア構築が目標である。この目標を達成するため肝星（伊東）細胞に発現するマンノース6リン酸レセプターへ認識されるマンノース6リン酸修飾リポソームの開発を行った。また得られた情報を基に、siRNA送達を目的にカチオン性脂質と組み合わせてマンノース6リン酸修飾カチオン性リポソームを調製し、siRNAと静電的相互作用を利用して複合体を形成させ、マンノース6リン酸レセプター発現細胞へのsiRNAデリバリーの最適化を行った。

B. 研究方法

M6P修飾リポソームの調製：

バンガム法により行った。まず、DSPC (ジステアロイルフォスファチジルコリン)、Cholesterol (Chol)、マンノース6リン酸修飾コレステロール誘導体 (M6P-Chol) (図1)を様々な比率 (M6P-Chol含量：2.5, 5.0, 7.5, 10, 15, 20, 40% (mol))で混合し、クロロホルムに溶解し、これをナスフラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去し、薄膜を形成させた。減圧したデシケーター中に3時間以上入れ、クロロホルムを完全に除去後、溶媒として5%グルコース溶液あるいはHBSSを添加し、脂質薄膜を30分間振とう機を用いて水和後、バス型ソニケーターより10分間超音波照射後、窒素置換したチップ型ソニケーターを用いた超音波照射を3分間行い、0.45 μm の孔径を有するポリカーボネート膜を用いてろ過滅菌を行い、リポソームを調製した。リポソーム濃度は、リン脂質またはコレステロール量を基準に補正を行った。

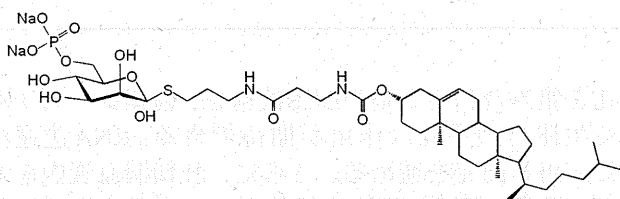


図1 マンノース-6-リン酸修飾コレステロール誘導体(M6P-Chol)の化学構造

物理化学的性質の評価：

と電位、平均粒子径は、ゼータサイザーナノZS (Malvern Instrument Ltd.社製)により測定をおこなった。

培養細胞とM6Pレセプター発現評価：

B16BL6細胞、colon26細胞、RAW264.7細胞、EL4細胞、HepG2細胞、HEK293細胞を用い、それぞれの細胞におけるM6Pレセプターの発現量を定量的PCR法により測定した。ハウスキーピング遺伝子としてはGAPDHを測定し、補正を行った。

M6P修飾リポソームの細胞取り込み特性評価：

放射標識体として ^3H 標識DSPCを用いて ^3H M6P修飾リポソームの調製を行った。M6Pレセプターを介した細胞取り込みを評価するため、文献調査ならびに定量的PCRによりM6Pレセプターの高発現を確認できたB16BL6細胞を用い、B16BL6細胞に種々のM6P-Chol含量で調製したリポソーム (saline, 10 $\mu\text{g}/\text{well}$)を2時間添加し、 2×10^5 cellsで12-wellプレートに細胞を洗浄後の細胞における放

射活性を評価した。M6Pレセプターの関与を検討するため、20 mM D-M6P・Na共存下での実験をおこなった(900 μl HBSSに22.2mM D-M6P・Naを添加し、30分間プレインキュベーションし、その後100 μl リポソーム (10 $\mu\text{g}/\text{well}$ となるように)を添加した。)。具体的には、細胞取り込み過程におけるエンドサイトーシスの関与を評価するため、colchicine, genistein, chlorpromazine, EIPA存在下での取り込みの評価を併せて行った。また、タンパク定量を行い、細胞数の影響に関する補正を行った。さらに、上記実験で良好な取り込み特性を示したM6P-Cholを15%含有するM6P(15)リポソームに関しては、細胞選択性を評価するため、M6Pレセプターポジティブ細胞として、colon-26細胞、M6Pレセプターネガティブ細胞として、RAW264.7細胞、HepG2細胞を用いて同様の実験を行った。

M6P修飾カチオン性リポソームの調製：

負電荷を有するsiRNAと静電的相互作用を介して複合体を形成させるため、カチオン性を示す脂質であるDOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propane methylsulfate)を用いた新しい脂質組成のM6P修飾カチオン性リポソームの調製を行った。M6P修飾リポソームと同様に各種脂質をクロロホルム中に溶解し、これをナスフラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去し、薄膜を形成させた。減圧したデシケーター中に3時間以上入れ、クロロホルムを完全に除去後、溶媒として5%グルコース溶液を添加し、脂質薄膜を30分間振とう機を用いて水和後、バス型ソニケーターより10分間超音波照射後、窒素置換したチップ型ソニケーターを用いた超音波照射を3分間行い、0.45 μm の孔径を有するポリカーボネート膜を用いてろ過滅菌を行い、リポソームを調製した。リポソーム濃度は、リン脂質またはコレステロール量を基準に補正を行った。

siRNA/M6P修飾カチオン性リポソーム複合体の調製：

5%グルコース溶液で溶解あるいは分散させたsiRNAとM6P修飾カチオン性リポソームを我々のマンノース修飾カチオン性リポソームを用いた過去の我々の検討 (Kuramoto et al., J Gene Med, 10 (4), 392-399, 2008) でオリゴ核酸であるCpG DNAの細胞選択的デリバリーが可能であった電荷のモル比 (-:+) 1.0: 3.1で調製を行った。

siRNA：

以下の配列を有するものを用いた。
Firefly luciferase, gp46に対するsiRNAは、以下のも

のを用いた。(A: アデノシン、G: グアノシン、C: シチジン、U: ウリジン、T: チミジン、X: リボヌクレオチド、dX: デオキシリボヌクレオチド)

なお、gp46に関しては遺伝子ノックダウン実験を行ったので、非特異的な遺伝子ノックダウン効果を検証するため、対照としてscramble配列のsiRNAも併せて実験を行った。

①Firefly luciferaseに対するsiRNA

センス鎖: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT-3'

アンチセンス鎖: 5'-UCG AAG UAC UCA GCG UAAGdTdT-3'

②gp46に対するsiRNA及び対照のscramble siRNA

センス鎖: 5'-GAA AGA UCA GGA UAU ACA AdTdT-3'

アンチセンス鎖: 5'-UUG UAU AUC CUG AUC UUU CdTdT-3'

対照のscramble siRNA

センス鎖: 5'-GUA CUG UAC CAC UCU CAA AdTdT-3'

アンチセンス鎖: 5'-CUG UUC CGC AUU UUA AUU UdTdT-3'

siRNA / [³H]CHE標識M6P修飾カチオン性リポソーム複合体の細胞取り込みの評価:

siRNAとしては、入手が容易であった firefly luciferase に対する siRNA をモデルとして用いた。放射標識体として [³H] 標識 cholesterol hexadecyl ether (CHE) を用いて、 [³H] M6P 修飾カチオン性リポソームの調製を行った。次に、5% グルコース中で [³H] M6P 修飾カチオン性リポソームと siRNA (firefly luciferase) 1 μg と電荷比 (-:+) 1.0:3.1 で複合体を調製した。細胞としては、B16BL6 細胞を 2 × 10⁵ cells、12-well プレートに播種し、24 時間培養し、細胞を洗浄後の細胞を実験に用いた。また、競合阻害実験では、最終濃度が 20 mM で実験を行った。まず、siRNA 1 μg / [³H] リポソーム複合体を 100 μl 添加し、2 時間後の放射活性を測定した。具体的には、900 μl Opti-MEM® 中へ D-M6P · Na (22.2 mM) を添加し、30 分間プレインキュベーションを行った。

ラット腎細胞由来の繊維芽細胞、NRK 細胞における M6P レセプター発現の確認:

1 × 10⁷ cells あたりの NRK 細胞での M6P レセプターの発現を定量的 PCR により評価した。対照として、M6P レセプターを発現していない RAW264.7 細胞、HepG2 細胞を用いた。

NRK 細胞における gp46 siRNA ノックダウン効率

の評価:

上記実験で M6P レセプターの発現を確認した NRK 細胞は gp46 を発現していることが知られており (Nature Biotech, 26, 431-442, 2008)。まず、NRK 細胞における gp46 mRNA 発現の確認と gp46 に対する siRNA による Lipofectamine™ を用いた際の NRK 細胞における遺伝子ノックダウン効果を評価した。NRK 細胞を 1 × 10⁷ cells 播種し 24 時間培養後、PBS で細胞を wash し、リボプレックス含有 Opti-MEM® に置換した。6 時間後に 10% 牛血清含有 DMEM に置換し (500 μL)、その後 42 時間 37 °C で培養を行った。次に、セルスクレイパーを用いて細胞を回収し、細胞での gp46 発現を定量的 PCR 法により定量を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会によって承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。また、環境問題および実験者の安全に十分配慮して行った。

C. 研究結果 & D. 考察

1-a M6P 修飾リポソームの調製と物理化学的性質の評価

使用した M6P-Chol 誘導体の構造を図 1 に示す。コレステロールを疎水アンカー部に有しており、この部分がリポソーム脂質 2 重膜に安定に組み込まれ、スパーサーを介して、水溶性の Man6P 残基がリポソーム表面に提示されるように設計している。

調製した各リポソームの物理化学的性質に関しては、粒子径並びに表面電荷を指標として評価を行った。

表1 リポソームの脂質組成、平均粒子径並びにゼータ電位

Formulations	Lipid composition (molar ratio)	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)
Bare-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:40:0)	100 ± 6.0	-0.03 ± 0.3
M6P(2.5)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:37.5:2.5)	99.5 ± 6.1	-2.26 ± 0.4
M6P(5.0)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:35.5)	100 ± 7.3	-5.19 ± 1.1
M6P(7.5)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:32.5:7.5)	99.6 ± 7.7	-6.76 ± 1.3
M6P(10)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:30.10)	101 ± 6.0	-8.96 ± 1.8
M6P(15)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:25.15)	101 ± 6.8	-13.1 ± 2.4
M6P(20)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:20.20)	99.4 ± 6.9	-16.0 ± 2.5
M6P(40)-liposome	DSPC/Chol/M6P-Chol (60:0.40)	102 ± 6.8	-22.5 ± 2.6

その結果、各リポソームの粒子径は全脂質組成で約 100 nm となった一方、表面電荷は M6P-Chol 誘導体含有量が多くなるに従い低下した(表1)。これは、M6P-Chol のリン酸基に由来した負電荷の影響がでたものと考えられる。

1-b M6P 修飾リポソームの細胞取り込み機構、細胞選択性評価

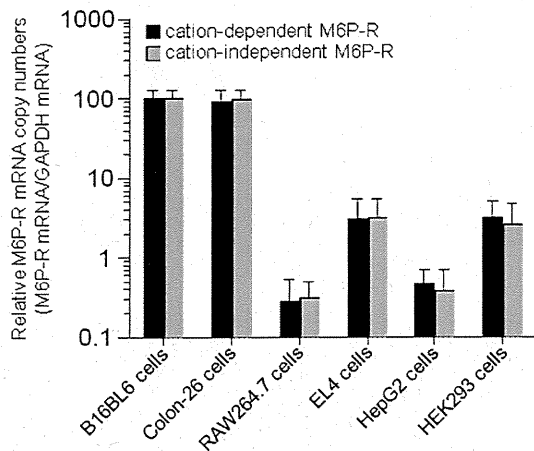


図2 様々な細胞におけるM6Pレセプター mRNA の発現

M6P レセプターの発現定量をおこなったところ、M6P レセプター高発現細胞は、B16BL6 細胞、Colon-26 細胞であった(図2)。この知見は、以前の Prakash らの報告と良く一致するものであった(Int J Cancer, 126, 1966-1981, 2010)。一方、EL4 細胞、HEK293 細胞で中程度の発現、RAW264.7 細胞、HepG2 細胞では低発現であった。

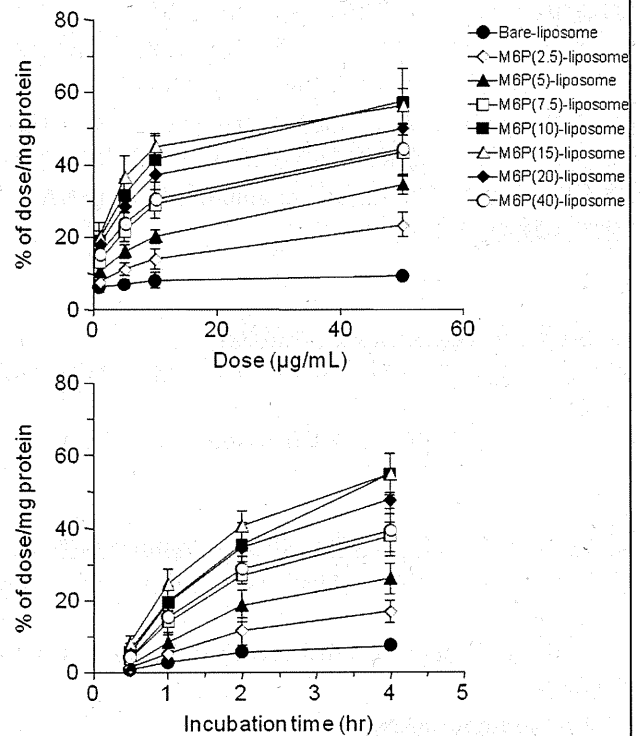


図3 M6Pレセプターを発現するB16BL6細胞への取り込み及び³H標識M6P修飾リポソームにおけるM6P-Chol含量(2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40%)並びに投与量の影響

M6P リポソームが、標的分子となる M6P レセプター認識特性を有することを確認するため、細胞への取り込み機構の検討を行った。まず、リポソーム膜に安定に組み込まれる放射標識体である³H標識-DSPC を用いて M6P リポソームを作製し、M6P レセプターを発現するメラノーマ由来癌細胞株 B16BL6 を用いて、M6P-Chol 誘導体含有リポソームの M6P レセプターを介した細胞内取り込みを評価した。³H標識リポソーム添加後 2 時間培養した結果、細胞へのリポソームの取り込み量は M6P-Chol

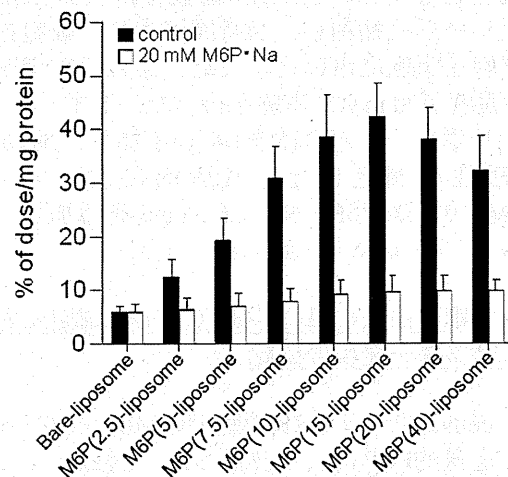


図4 B16BL6細胞における種々の割合での³H標識M6P(2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40)修飾リポソームの細胞結合特性

含有量依存的に増加し、M6P-Chol 誘導体含有量 15% で最大となった (図 3)。

また M6P 過剰量 (20 mM) 添加により M6P-Chol 誘導体を含む M6P 修飾リポソームの細胞結合が阻害されたことから、本リポソーム製剤が細胞膜上の M6P レセプターを介して細胞内に取り込まれる可能性が示唆された (図 4)。また、通常条件において M6P-Chol 含有量が高く、高い細胞結合を示していた M6P 修飾リポソームの結合もほぼ未修飾リポソームとほぼ同程度であった。

M6P レセプターはエンドサイトーシスによって M6P 修飾された高分子を細胞内に取り込むことが知られている。そこで、M6P 修飾リポソームの M6P レセプター高発現細胞を用いて、B16BL6 細胞への取り込み特性を検討を行うため、 $[^3\text{H}]$ 標識 M6P リポソームを用いて、様々な条件やエンドサイトーシス阻害剤共存下での実験を行った。

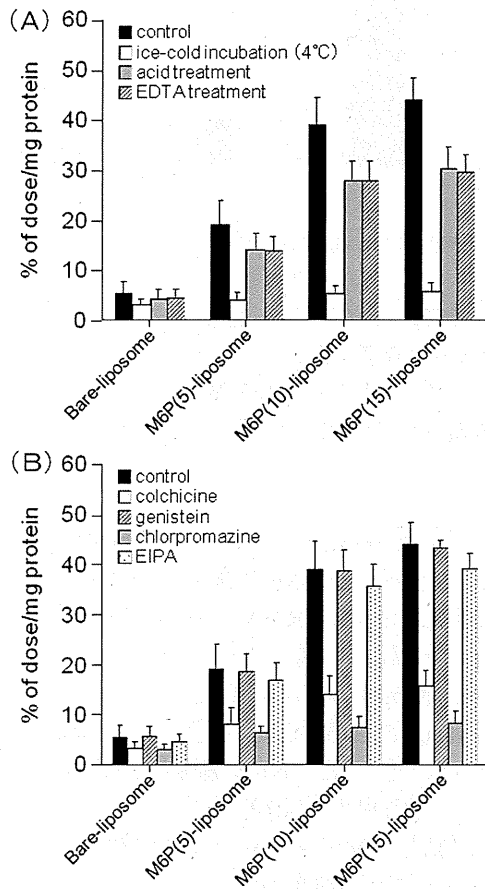


図5 B16BL6細胞における様々な条件や阻害剤共存下での $[^3\text{H}]$ 標識M6P(5, 10, 15) 修飾リポソームの細胞結合特性

その結果、通常の 37 °C 培養に比べ、4 °C 培養での放射活性の有意な低下が認められ、エネルギー依存的な細胞取り込みの可能性が示された (図 5A)。また、クロロプロマジン共存下、細胞取り込みは有意な阻害が認められ、クラスリン介在性エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれていることが示唆さ

れた (図 5B)。図 3 において、Man6P レセプターを介した細胞取り込みが示唆されたため、さらに M6P レセプター発現特性の異なる細胞を用いた細胞選択性に関する評価を行った (図 6)。その結果、M6P レセプターを高発現する B16BL6、colon-26 細胞においては M6P レセプターを介した細胞内取込が認められた一方、M6P レセプター非発現細胞である RAW264.7、HepG2 細胞においては M6P 受容体介在性の細胞取り込みは認められなかった。また、過剰量の M6P・Na (20 mM) 共存下、B16BL6、colon-26 細胞では取り込み阻害効果が認められたが、RAW264.7、HepG2 細胞では取り込み阻害が認められなかった。これらのデータからは、B16BL6、colon-26 細胞における細胞取り込みに M6P レセプターによる取り込みが関与していることを強く示唆している。

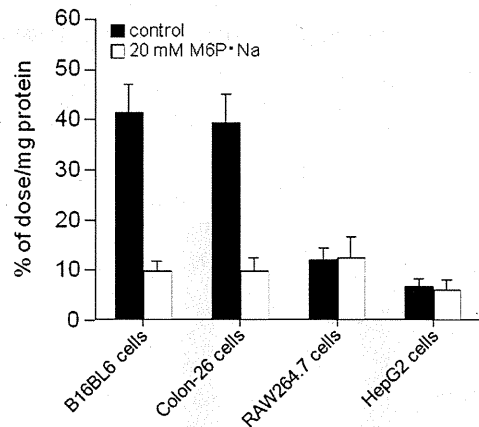


図6 M6Pレセプター高発現、B16BL6並びにColon 26細胞、M6Pレセプター低発現、RAW264.7並びにHepG2細胞での $[^3\text{H}]$ 標識M6P(15)修飾リポソームの細胞結合特性

1-c siRNA 送達への適用: M6P-Chol 誘導体含有 M6P 修飾カチオン性リポソーム/siRNA 複合体の調製と物理化学的性質の評価

siRNA との複合体形成可能なカチオン性を有する M6P-Chol 誘導体含有リポソームを作製するために、各種構成脂質をカチオン性脂質である DOTAP と pH 応答性脂質の中性脂質である DOPE(dioleoyl phosphatidylethanolamine)から構成される脂質を表 2 の比率で混合し、M6P 修飾カチオン性リポソームを調製した。リポソーム/siRNA 複合体は、firefly luciferase に対する siRNA と M6P 修飾コレステロー

表2 M6P修飾カチオン性リポソーム、siRNA複合体の脂質組成、平均粒子径並びにゼータ電位

Complex	Lipid composition (molar ratio)	Mean diameter (nm)	Zeta potential (mV)
Liposomes	DOTAP/DOPE/Chol/M6P-Chol (40:20:25:15)	101 ± 6.3	46.4 ± 2.2
siRNA complex	DOTAP/DOPE/Chol/M6P-Chol (40:20:25:15)	102 ± 4.3	28.0 ± 2.3

ル誘導体 (15 mol%) 含有カチオン性リポソームを電荷比 1.0:3.1 (-:+)として 5%デキストロス中で混合して作製した。

その結果、調製した製剤の物理化学的性質を粒子径並びに表面電荷の測定により評価した結果、粒子径は siRNA 複合体化に関らず約 100 nm となった一方、表面電荷は siRNA 複合体形成により低下した。M6P 修飾カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体の M6P レセプターを介した細胞取り込みを調べるため、B16BL6 細胞を用いた取り込み実験を行った。トレーサーとしては、 ^3H cholesterol hexadecyl ether (CHE)を用い、 ^3H 標識 M6P 修飾カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体の調製をおこなった。図 7 に示すように、 ^3H 標識カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体に比べ、 ^3H 標識 M6P 修飾カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体の細胞取り込みは高い値を示した。

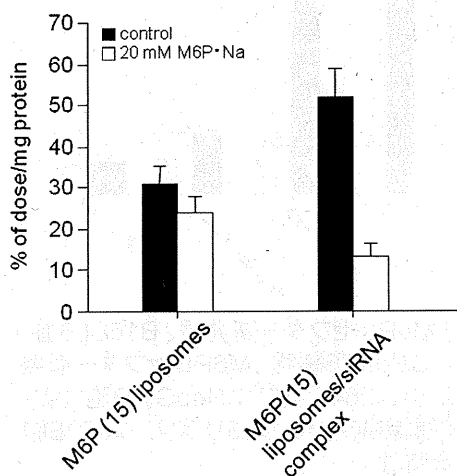


図7 B16BL6細胞における ^3H 標識 M6P(15)修飾カチオン性リポソームならびにM6P(15)修飾カチオン性リポソーム/siRNA複合体の細胞結合特性

また、20 mM M6P · Na 共存下において ^3H 標識カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体の細胞取り込みに影響は無かったものの、 ^3H 標識 M6P 修飾カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体の細胞取り込みの低下が認められた。これは、M6P 修飾カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体が M6P レセプターを介して、B16BL6 細胞に効率的に取り込まれていることを示唆するものである。

1-c M6P カチオン性リポソーム/gp46 siRNA 複合体の NRK 細胞における細胞取り込み、遺伝子ノックダウン効果の評価

gp46 はコラーゲン産生に関与するシャペロンタンパク(ヒトにおいては HSP47)であり、肝硬変病態時において発現誘導されることが報告されており、当該遺伝子の抑制によりコラーゲン産生が抑制され、肝硬変進行の抑制並びに治療が達成される。NRK における M6P レセプターの発現を定量的 PCR 法により評価した。

図 8 に示すように、NRK 細胞において高い MRP レセプターの発現が認められた。一方、ネガティブコントロールである RAW264.7 細胞、HepG2 細胞では、図 2 での結果と良く対応し、M6P レセプターの発現は低レベルであった。

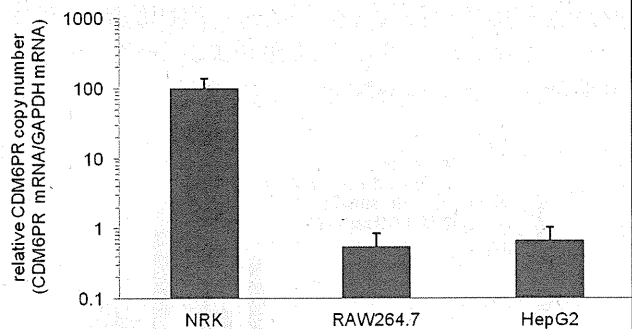


図8 NRK細胞におけるM6Pレセプター mRNA の発現の確認

そこで、M6P レセプターと gp46 が発現する NRK 細胞を M6P 修飾カチオン性リポソーム/ gp46 siRNA 複合体における細胞選択的 siRNA デリバリーの機能のための評価系として選択し、以下の実験を行った。

まず、様々な比率(5%, 10%, 15%, 20%)で M6P-Chol を含有する M6P 修飾カチオン性リポソームを調製し、gp46 siRNA と複合体を形成させた。リポソームの脂質組成は、DOTAP/DOPE/Chol/M6P-Chol (40:20:x:y)で、x:y (x+y=20)において Chol と M6P-Chol を置換して実験に用いた(図 9 A)。そこで、NRK 細胞における gp46 のノックダウン効果を定量的 PCR により評価を行った。その結果、M6P-Chol 含量が 10%において遺伝子ノックダウン効果が認められ、また、15%, 20%において最も強い値を示すことが明らかとなった。また、M6P 修飾カチオン性リポソーム/scrambled siRNA 複合体では、遺伝子ノックダウン効果は認められなかったため、この遺伝子ノックダウン効果は、siRNA の配列特異的なものであることが示唆された。

また、リポソームの脂質組成を DOTAP/Chol/M6P-Chol (60:x:y) (x と Y は Chol or M6P-Chol, x+y=20) として、DOPE を含有していないものを調製したが、上記の結果とほぼ同じで、M6P-Chol

含量依存的な遺伝子ノックダウン効果が認められた。これは、M6P-Cholをある程度含有させることで(図9B)糖修飾リポソームとしての機能が脂質組成に依存せず発揮できることを示唆するものである。

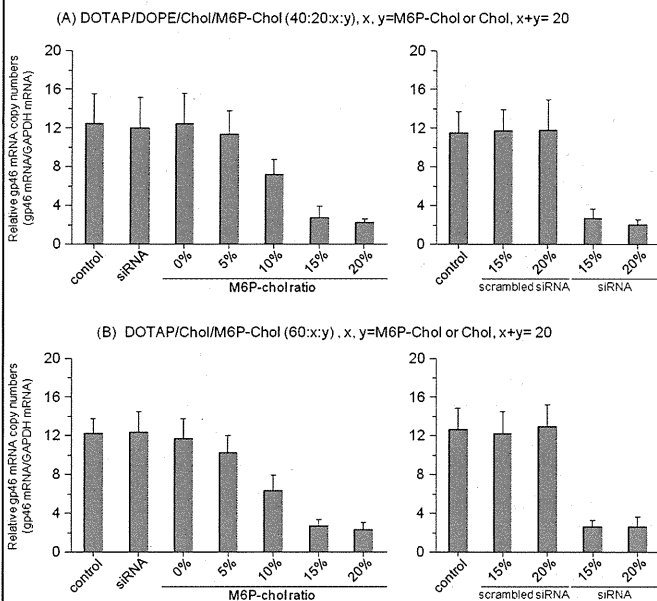


図9 NRK細胞におけるM6P(0, 5, 10, 15, 20)修飾カチオン性リポソーム/gp46 siRNA複合体投与後のgp46 mRNA ノックダウン効果

E. 結論

本年度は、究成果を得ることができた。2年目は、肝星(伊東)細胞を標的としたsiRNAのDDSを構築するため、Man6P修飾リポソームを開発し、Man6Pレセプター介在性エンドサイトーシスを利用したMan6P発現B16BL6細胞への細胞取り込みを確認した。また、得られた情報を基にMan6P修飾脂質カチオン性脂質と組み合わせて、Man6P修飾カチオン性リポソームを調製し、静電的相互作用を介してsiRNA(gp46)との複合体の形成を確認した。また、Man6Pレセプターを発現するNRK細胞を用いて、gp46のノックダウン効果を評価したところ、Man6P脂質含量が15, 20(mol)%において有意なノックダウン効果を得ることができた。一方、scramble配列のsiRNAではノックダウン効果は認められず、このノックダウン効果はoff target効果によるものではなく、配列特異的であることが示唆された。来年度は、in vivoでの最適化を行う予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Keita Un, Shigeru Kawakami[†], Mitsuru Yoshida, Yuriko Higuchi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Fumiyoshi Yamashita and Mitsuru Hashida[†]: Efficient suppression of ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation,

Hepatology, in press (2012)

2. 学会発表

1. Shigeru Kawakami: Cell-selective gene delivery using glycosylated bubble lipoplex with ultrasound exposure, 第17回日本遺伝子治療学会学術集会、九州大学医学部百年講堂、福岡県、2011年7月17日 (シンポジウム講演)

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
Keita Un, Shigeru Kawakami [†] , Mitsuru Yoshida, Yuriko Higuchi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida [†] ([†] : corresponding authors)	Efficient suppression of ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation	Hepatology	In press doi: 10.1002/hep. 25607. [Epub ahead of print]		2012

Hepatology

Original Research

Efficient suppression of murine ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammationKeita Un (un@nihs.go.jp)^{1,2},Shigeru Kawakami (kawakami@pharm.kyoto-u.ac.jp)^{1*},Mitsuru Yoshida (yoshida.mituru@ax3.ecs.kyoto-u.ac.jp)¹,Yuriko Higuchi (higuchi@pharm.kyoto-u.ac.jp)³,Ryo Suzuki (r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp)⁴,Kazuo Maruyama (maruyama@pharm.teikyo-u.ac.jp)⁴,Fumiyooshi Yamashita (yama@pharm.kyoto-u.ac.jp)¹,Mitsuru Hashida (hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp)^{1,5*}

*corresponding authors

¹Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

²The Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Chiyoda-ku, Tokyo 102-8471, Japan.

³Institute for Innovative NanoBio Drug Discovery and Development, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

⁴Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Sagamiko, Sagamihara, Kanagawa 229-0195, Japan.

⁵Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Yoshida-ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8302, Japan.

Keywords:

siRNA delivery; ultrasound exposure; mannose receptor; drug-induced hepatic inflammation; hepatic ischemia-reperfusion injury

Contact Information

Address reprint requests to:

Mitsuru Hashida, Ph.D. and Shigeru Kawakami, Ph.D.

Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

Phone: +81-75-753-4545. Fax: +81-75-753-4575.

E-mail: hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp (M. Hashida)

E-mail: kawakami@pharm.kyoto-u.ac.jp (S. Kawakami)

List of Abbreviations:

ICAM, intracellular adhesion molecule; IR, ischemia-reperfusion; HECs, hepatic endothelial cells; siRNA, small interfering ribonucleic acid; US, ultrasound; LPS, lipopolysaccharide; CCl₄, carbon tetrachloride; DMN, dimethylnitrosamine; NF- κ B, nuclear factor- κ B; BLs, bubble liposomes; IL, interleukin; MCP, monocyte chemoattractant protein; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; TLRs, Toll-like receptors; RIG-1, retinoic acid-inducible gene-1; MDA-5, melanoma differentiation-associated gene-5; IRF, interferon regulatory factor; LNA, locked

nucleic acid.

Financial Support

This work was supported in part by the Programs for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), by the Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Noninvasive and Minimally Invasive Medical Devices from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Abstract

Hepatitis is often associated with the over-expression of various adhesion molecules. In particular, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which is expressed on hepatic endothelial cells (HECs) in the early stage of inflammation, is involved in serious illnesses. Therefore, ICAM-1 suppression in HECs enables the suppression of inflammatory responses. Here, we developed an ICAM-1 siRNA transfer method using ultrasound (US)-responsive and mannose-modified liposome/ICAM-1 siRNA complexes (Man-PEG₂₀₀₀ bubble lipoplexes; Man-PEG₂₀₀₀ BLs), and achieved efficient HEC-selective ICAM-1 siRNA delivery in combination with US exposure. Moreover, the sufficient ICAM-1 suppression effects were obtained by this ICAM-1 siRNA transfer *in vitro* and *in vivo*, and potent anti-inflammatory effects were observed in various types of inflammation, such as lipopolysaccharide (LPS), dimethylnitrosamine (DMN), carbon tetrachloride (CCl₄), and ischemia-reperfusion (IR)-induced inflammatory mouse models. *Conclusion:* In the present study, we demonstrated that HEC-selective and efficient ICAM-1 siRNA delivery using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure enables to suppress various types of acute hepatic inflammation. This novel siRNA delivery method may offer a valuable system for medical treatment where the targeted cells are HECs.

Hepatitis resulting from conditions such as drug-induced hepatic inflammation and IR-induced liver injury followed by surgery is a major obstacle for medical treatment [1,2]. Moreover, it was reported that chronic hepatitis progresses to cirrhosis and liver cancer [3,4]; therefore, the prevention and early treatment of hepatitis are important for patients and medical professionals. Most drug-induced hepatitis is caused by nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and pro-inflammatory cytokine production followed by various stimulations in medical treatments [5]. In IR-induced liver injury, a large amount of reactive oxygen species produced by IR-stimulation are involved in the induction of inflammatory responses [6]. Although the mechanism for each inflammatory response is different, various adhesion molecules, such as VCAM and ICAM, are abundantly expressed on HECs in the early stage of inflammatory responses followed by various types of stimulation [7]. Among these, ICAM-1 is known as a major molecule that is highly involved in the adhesion, diapedesis, and tissue infiltration of leukocytes contributing to the deterioration in inflammatory responses [8]. During alcohol-induced liver injury, it was reported that ICAM-1 expression and the resultant leukocyte infiltration are involved in the deterioration of alcohol-induced liver injury [9]. Therefore, the suppression of inflammatory responses may be achieved by selective knockdown of ICAM-1 in HECs.

RNA interference is an important endogenous mechanism for gene regulation by cleaving specific mRNA possessing the complementary sequence using small interfering RNA (siRNA) [10,11]. Although this siRNA is a promising candidate for molecular therapy, an effective method for siRNA transfer into the cytoplasm of targeted cells *in vivo* is still being developed. The effective methods for *in vivo* siRNA delivery involve non-viral carriers, including liposomes, emulsions, micelles, and polymers [12-18]. However, since the non-viral carriers are taken up into the cells *via* endocytosis, the degradation within endosomes, and

escape from endosomes, are major obstacles for the improvement of siRNA therapeutics. Moreover, the efficient and selective siRNA delivery into HECs is essential to achieve the potent anti-inflammatory effects produced by ICAM-1 siRNA.

Recently, the delivery of nucleic acids into cells using microbubbles and US (also known as “sonoporation methods”) is preferred due to the high transfer efficiency into the cytoplasm [19-22]. Our group has developed US-responsive and mannose-modified liposomes/plasmid DNA complexes for *in vivo* gene transfer, and successfully obtained efficient gene expression in mannose receptor-expressing cells, such as HECs and splenic dendritic cells [23-25]. Moreover, we demonstrated that a large amount of plasmid DNA could be directly transferred into the cytoplasm through a mechanism involving transient pores created on the cell membrane by the destruction of microbubbles following US exposure [26]. Therefore, the efficient transfer of ICAM-1 siRNA into HECs might be achieved by applying this method to siRNA delivery.

In the present study, we developed an ICAM-1 siRNA transfer system based on US-responsive and mannose-modified liposome/siRNA complexes (Man-PEG₂₀₀₀ bubble lipoplexes; Man-PEG₂₀₀₀ BLs) for anti-inflammatory therapy. ICAM-1 siRNA delivered by Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure was selectively and efficiently transferred into HECs *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, sufficient ICAM-1 suppression and potent anti-inflammatory effects were achieved by ICAM-1 siRNA transfer against various types of inflammation induced by LPS, DMN, CCl₄, and IR. To our knowledge, this is the first report that a gene transfer method using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure for the selective and efficient transfer of siRNA to HECs. This novel siRNA transfer method could be valuable for medical treatments that target HECs.

Materials and Methods

In vitro siRNA delivery. After incubation of HECs for 72 h, the culture medium was replaced with Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing lipoplexes/bubble lipoplexes (BLs) (1 μg siRNA). At 5 min after siRNA transfer, HECs were exposed to US (frequency, 2.062 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 4.0 W/cm^2) for 20 s. In the siRNA delivery using naked siRNA and conventional nanobubbles, at 5 min after addition of naked siRNA (1 μg) and conventional nanobubbles (60 μg total lipids) were added, and cells were immediately exposed to US. US was generated using a Sonopore-4000 sonicator (Nepa Gene, Chiba, Japan). At 1 h after US exposure, the medium was replaced with RPMI-1640 and incubated for an additional 23 h. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used according to the recommended procedures with an exposure time of 1 h, which is the same exposure time in other experiments using lipoplexes.

In vivo siRNA delivery. Six-week-old C57BL/6 female mice were intravenously injected with BLs containing 10 μg siRNA via the tail vein. At 5 min after the injection of the bubble lipoplexes, US (frequency, 1.045 MHz; duty, 50%; burst rate, 10 Hz; intensity 1.0 W/cm^2 ; time, 2 min) was applied transdermally to the abdominal area using a Sonopore-4000 sonicator. In the siRNA delivery using naked siRNA and conventional nanobubbles, at 4 min after intravenous injection of conventional nanobubbles (500 μg total lipid), naked siRNA (10 μg) was intravenously injected and US was exposed at 1 min after naked siRNA injection.

Statistical analyses. Results were presented as the mean \pm SD of more than three experiments. Analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical significance of differences among groups. Two-group comparisons were performed by Student's *t*-test and

multiple comparisons between control and other groups were performed by Dunnett's test.

Results

Suppression effects of ICAM-1 siRNA. The suppression of LPS-induced ICAM-1 expression by ICAM-1 siRNAs (Supplementary Fig. 1A) was investigated in primary mouse HECs. As shown in Supplementary Fig. 1B, the suppression of ICAM-1 was the highest in ICAM-1 siRNA with sequence 1, and not observed in scrambled siRNA. Therefore, ICAM-1 siRNA containing sequence 1 and scrambled siRNA were used in the following examinations.

Physicochemical properties of Man-PEG₂₀₀₀ BLs. Following enclosure of US imaging gas into Man-PEG₂₀₀₀ BLs, lipoplexes became cloudy (data not shown) and the average particle size increased (Supplementary Fig. 2A). Following gel electrophoresis experiments, the formation of siRNA complexes in BLs was confirmed (Supplementary Fig. 2B). Moreover, ζ -potentials of BLs were lower than that of liposomes (Supplementary Fig. 2A), suggesting that siRNA was attached to the surface of cationic bubble liposomes. These physicochemical properties are consistent with our previous reports using plasmid DNA [23-26].

Intracellular transport characteristics of ICAM-1 siRNA. The siRNA transfer efficiency was investigated in primary mouse HECs expressing mannose receptors (Supplementary Fig. 4). The amount of siRNA delivered by BLs and US exposure was significantly higher than that by lipoplexes only (Supplementary Fig. 3A). Moreover, the amount of siRNA delivered by Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure was higher than unmodified BLs. However, the amount of siRNA was significantly suppressed in the presence of mannan but not suppressed in the presence of chlorpromazine, an endocytosis inhibitor

(Supplementary Figs. 3B and 3C). Confocal microscopy analysis of cells after siRNA transfer by bubble lipoplexes with US exposure revealed that siRNA was not co-localized in endosomes (Fig. 1A). These observations suggest that siRNA is directly transferred into the cytoplasm of targeted cells and not mediated by endocytosis in this siRNA transfer method.

Suppression effects of LPS-induced ICAM-1 expression in vitro. As shown in Figs. 1B and 1C, ICAM-1 expression induced by LPS stimulation was suppressed by approximately 80% in siRNA transfer using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure. The suppression effect of ICAM-1 expression was not observed for scrambled siRNA. Moreover, this suppression effect was comparable to that by Lipofectamine 2000 (Fig. 1D) but with decreased cytotoxicity (Fig. 1E).

In vivo distribution of ICAM-1 siRNA. We investigated the pharmacokinetic profiles and the tissue distribution of BLs after intravenous administration into mice. Compared to non-modified BLs, the retention time of Man-PEG₂₀₀₀ BLs in the blood was reduced, and localization in both the liver and spleen were increased (Fig. 2A). Moreover, a large amount of ICAM-1 siRNA was distributed in HECs that abundantly express mannose receptors when delivered using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure (Figs. 2B and 2C).

Suppression effects of drug-induced hepatic ICAM-1 expression in vivo. The suppression of ICAM-1 expression by siRNA delivery was investigated in an LPS/D-galactosamine-induced acute hepatitis mouse model (Fig. 3A). As shown in Figs. 3B-D, ICAM-1 mRNA and protein levels in HECs induced by LPS/D-galactosamine stimulation were suppressed by approximately 80% using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure.

Moreover, ICAM-1 expression induced by CCl₄- and DMN-stimulation was also significantly suppressed by the same ICAM-1 siRNA delivery system (Supplementary Figs. 6B and 7B). The effects of siRNA dose on ICAM-1 suppression and the duration of ICAM-1 suppression were examined in an LPS/D-galactosamine-induced inflammatory mouse model. Following siRNA delivery using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure, suppression was obtained at 10 µg of ICAM-1 siRNA (Supplementary Fig. 5A), and was sustained for at least three days (Supplementary Fig. 5B).

Anti-inflammatory effects against drug-induced hepatitis. First, the suppression of leukocyte infiltration by ICAM-1 siRNA delivery was evaluated in an LPS/D-galactosamine-induced inflammatory mouse model (Fig. 4A). As shown in Figs. 4B and 4D, the expression of interleukin (IL)-8 and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 was suppressed, and a significantly decreased number of infiltrated leukocytes were detected after siRNA delivery using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure. Moreover the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , and IL-6) were also suppressed by this siRNA delivery (Fig. 4C).

The anti-inflammatory effects obtained by ICAM-1 siRNA delivery were next investigated. As shown in Fig. 5A, alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase (ALT/AST) activities in the serum were markedly suppressed by siRNA delivery using Man-PEG₂₀₀₀ BLs and US exposure (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, hepatic apoptosis induced by LPS/D-galactosamine stimulation was significantly suppressed by this ICAM-1 siRNA delivery. Moreover, we performed H&E-staining of liver sections to evaluate the effects on hepatic structural features. Although the circular and tube formations of hepatic central vein were observed in normal liver section (Fig. 5C: left), its formations is crushed in