

20111022A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

肝臓に対する新規 DDS を活用した  
経口遺伝子治療法の開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 24(2012)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

平成 23 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 24 年(2012)年 3 月

# 【目 次】

## I. 総括研究報告

- 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発 ..... 1  
横田 隆徳（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学）

## II. 分担研究報告

1. エンドソーム脱出素子の設計および作成 ..... 9  
片岡 一則（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻）
2. 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発 ..... 15  
村上 正裕（大阪大谷大学薬学部薬剤学講座）
3. 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発 ..... 19  
和田 猛（東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻）
4. *In vivo* ELISA 系によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの定量解析法の構築 ..... 22  
小比賀 聡（大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 27

## IV. 研究成果の刊行物、別刷 ..... 29

# I. 総括研究報告

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

横田 隆徳<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学

本研究では核酸医薬の経口投与を可能とする基盤技術の開発を目指し、新規 DDS として混合ミセルとともに Toc-siRNA を注腸投与する際の薬物動態を評価した。本年度は、頻回投与による Toc-siRNA の生体内分布、Toc-siRNA 投与による標的遺伝子抑制効果と副作用、Toc-siRNA の注腸投与時のデリバリー経路の解明を主に研究を行い、Toc-siRNA の注腸投与時にほぼ肝臓に局限してデリバリーされること、肝臓において標的遺伝子の発現を抑制でき、明らかな副作用も認められないこと、リンパ管を経由して受容体介在性に肝臓に取り込まれることを確認した。デリバリー機序をさらに明らかにすべく、小比賀は組織内の核酸医薬の定量のための ELISA 法の開発を、村上是 Toc-siRNA がリンパ中内でのカイロミクロンと複合体の評価方法を、また有効性向上のために片岡はエンドソーム脱出素子として Charge Conversional Polymer(CCP) を利用した VE-PEG-CCP の合成を、和田は腸管内の RNase 耐性獲得のための新規 siRNA 設計を行い、それぞれ成果を上げた。

### 分担研究者

片岡 一則：東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻・教授

村上 正裕：大阪大谷大学薬学部 薬剤学・教授

和田 猛：東京大学大学院新領域創成科学研究科  
メディカルゲノム専攻・准教授

小比賀 聡：大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学・教授

### A.研究目的

化学合成した small interfering RNA (siRNA) やアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)等の機能核酸は、有用な遺伝子ノックダウンツールとして広く用いられている。しかし、遺伝子治療を目的とした *in vivo* への応用において、標的器官へのデリバリー効率の低さとそれに伴う副作用が大きな障壁となっていた。しかし近年、肝臓をターゲットとしたベクターとして、改良型カチオンリポソーム等が開発され、有効性が高く副作用も低い機能核酸の肝臓へのデリバリーが確立されつつある。

しかしこれらの投与方法は全て静脈注射によるものであり、これらの機能核酸を臨床でより幅広く応用するためには、自己投与や長期間投与が可能な経口投与方法を確立する必要がある。

経口投与時の機能核酸のベクターとして最も好ましいのは、標的組織に不可欠で、自身で合成できない分子であり、かつ経口摂取によって体内に取り込まれ標的組織へデリバリーされる物質であると考えた。この条件に当てはまるのはビタミンであり、中でもビタミン E は過剰摂取しても毒性が低いため、ベクターとして適していると考えられた。我々は天然型ビタミン E (VE)である  $\alpha$ -tocopherol (Toc) をベクターとして直接 siRNA に結合させた Toc-siRNA の静脈投与によって、マウス肝臓のアポリポ蛋白 B (*apoB*) mRNA を低下させることに成功している。そこで、本研究では食後にカイロミクロン(CM)を介して Toc が肝細胞に運搬される経路を利用して、Toc-siRNA を直腸内に投与することで肝疾患を治療する可能性を検討した。本年度は Toc-siRNA を用いた注腸投与での肝臓へのデリバリー法の確立及びそのデリバリー経路の解明・確認を主に研究を行った。

本総括研究報告書では本研究の中心となる上記について記載し、並行して行った新たな機能核酸である Locked Nucleic Acid (LNA)を用いた ASO の、経口投与に向けた化学修飾の最適化や、エンドソーム脱出因子である CCP の注腸投与に向けた最適化については、それぞれ施行した分担研究者の分担研究報告書に記載した。

## B.研究方法

### 1) siRNA の合成

siRNA は 27 塩基のセンス鎖と 29 塩基のアンチセンス鎖 (北海道システム・サイエンス) を化学合成し、アンチセンス鎖 3'末端を 2 塩基突出末端とした。siRNA と  $\alpha$ -toc を結合させるため  $\alpha$ -toc phosphoramidite を tetrahydrofuran 中で dl- $\alpha$ -toc (Tokyo Kasei) と 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidite, diisopropylethylamine によって合成し、アンチセンス鎖 5'末端にリン酸結合させた。マウスの *apoB* mRNA をターゲットとする siRNA (*apoB*-1) の配列を以下に示す。

5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAUGCUgGA-3'  
5'-UCcaGcAUUGGUAUUCAGUGUGAUGAcaC-3'

(上段:センス鎖、下段:アンチセンス鎖、太文字: 2'-O-メチル化、小文字: phosphorothioate)  
*apoB*-1 のアンチセンス鎖 5'末端にビタミン E を上記方法で結合させて、Toc *apoB*-1 を合成した。

### 2) 動物実験 (頻回投与実験)

8 週齢の ICR マウス (日本クレア)、7 週齢の C57BL/6J マウス (オリエンタル酵母)、7 週齢の LDL 受容体 KO (LDLR<sup>-/-</sup>) マウス (129S7-Ldlr (tm1 Her)/J マウス, Jackson laboratory) を Toc-siRNA のデリバリー確認に用いた。マウスを 16 時間絶食にし、300  $\mu$ l のミルクを 30 分おきに 3 回強制経口投与し、最終投与の 30 分後に麻酔をかけた。まず、小腸または大腸にシリコンチューブを挿入し、生理食塩水で腸管を洗い、腸管の遠位側または肛門を結紮することで約 5 cm の腸管ループを作った。そし

て小腸ループの近位側または肛門から、下記の条件で 1 回の投与につき 10 mg/kg の siRNA を投与した。単回投与の実験では 0.5、4、24 時間後、2 時間おき 3 回投与の実験では最終投与の 2、24 時間後に採血をし、冷却した PBS で灌流した後に各臓器を採取した。蛍光相関分光法 (FCS) で用いたリンパ液は、siRNA の腸管内投与 2 時間後に胸管リンパ管にビニールカテーテルを挿入して採取した。LDLR<sup>-/-</sup>マウスの実験では、0.8 mg/kg のリコンビナント マウス LDL receptor related protein-associated protein 1 (LRPAP, R&D Systems) を尾静脈投与した直後に siRNA を直腸より投与した。また LPL の作用を検討した実験では、LPL inhibitor である Triton X-100 (和光純薬工業) を 20 mg/kg で尾静脈投与し、30 分後に siRNA を直腸投与した。

### 3) siRNA/混合ミセル (siRNA/MM) の調整

3.0 w/w % PEG-60 hydrogenated castor oil (HCO-60、日光ケミカルズ)、10 mM リノール酸 (和光純薬工業) を RNase free のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) に溶かし、Digital Sonifer Models S-250D (Branson) を用いて 20 kHz、30 W、on ice で 5 分間超音波処理して混合ミセル (mixed micelle: MM) を作った。Cy3 標識 siRNA、Cy3 標識 Toc-siRNA、Toc-siRNA のいずれかと MM をピペットでよく混ぜ、siRNA/MM とした。

### 4) 組織学的検討

各臓器を 4%パラホルムアルデヒドで浸透固定し、30% sucrose で置換後、OCT compound (サクラファインテックジャパン) で包埋し切片を作製した。各切片を Alexa-488 phalloidin (Invitrogen) (緑) と ToPro-3 (Invitrogen) (青) で染色後、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging) にて Cy3 標識 siRNA (赤) を観察した。bar = 20  $\mu$  m で表示した。また核酸投与部位である大腸において炎症細胞浸潤等の副作用を生じているかどうか確認するため、大腸の切片の H&E 染色を行い、顕微鏡で観察した。

#### 5) 定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 解析

マウス肝臓の total RNA を Isogen (Nippon Gene) によって抽出した。抽出した RNA から Superscript III (Invitrogen) を用いて、cDNA を合成した。qRT-PCR は LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) を用い、LightCycler 480 II (Roche Diagnostics) で定量した。プライマーとプローブはマウス apoB、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) を使用した (Applied Biosystems)。

#### 6) siRNA のアンチセンス鎖の Northern Blot 解析

マウス肝臓内の small RNA (200 nt 以下) を MirVana (Ambion) を用いて抽出した。Ethachinmate (Nippon Gene) によって濃縮し、14% polyacrylamide-urea ゲルで電気泳動した後、Hybond-N+ membrane (Amersham Biosciences) で転写した。プロットは Gene Images 3'-Oligolabelling kit (Amersham Biosciences) でラベルしたセンス鎖をプローブとして用いた。シグナルは、Gene Images CDP-star Detection Kit (Amersham Biosciences) を用いて検出した。

#### 7) ApoB タンパクの Western Blot 解析

siRNA の 3 回投与 24 時間後のマウス血清をホジナイズバッファー (0.1% SDS, 1% TritonX, 1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF) で調整し、サンプルとした。1 次抗体は sc11795 goat anti-ApoB (Santacruz) を 500 倍希釈、2 次抗体は sc2020 donkey anti-goat (Santacruz) を 2000 倍希釈でを使用した。Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo) で蛍光発色させ、Chemi Doc XRS-J (BIO RAD) で撮影した。

#### 8) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

マウスリンパ液をゲルろ過 HPLC 法にて分離し、脂質成分のモニタリングと粒子の大きさから、各フラクションがどのリポ蛋白であるかを特定した

(Skylight Biotech)。CM、VLDL、LDL、HDL のフラクションを FCS での分析に用いた。

#### 9) 蛍光相関分光法 (FCS) による解析

測定は ConfoCor 3 (Carl Zeiss MicroImaging) を用いて行った。Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を投与したマウスより採取したリンパ液中の Cy3 シグナル、または、未投与マウスより採取したリンパ液の各リポ蛋白フラクションをナイルレッドで染色したものを 8-well Lab-Tek chambered slide (Nalgen Nunc International) に入れ、室温で Diffusion time (拡散時間) を測定した。

### C. 研究結果

#### 1) Toc-siRNA の生体内分布

リノール酸、HCO-60 からなる混合ミセルを作成し、Cy3 標識 siRNA とともに消化管内に投与した。投与 4 時間後における諸臓器の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

肝臓で Cy3 シグナルが認められる直腸投与 4 時間後の肺、腎臓、脾臓、心臓、骨格筋、脳の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、明らかな Cy3 シグナルは認められなかった (図 1)。投与した Toc-siRNA は肝臓特異的にデリバリーされている。

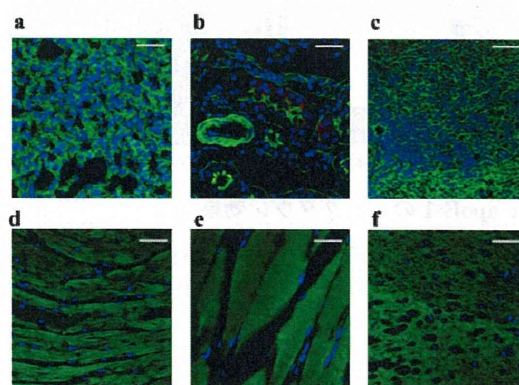


図 1 Toc-siRNA の生体内分布

(a-f) Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 4 時間後の肺(a)、腎臓(b)、脾臓(c)、心臓(d)、骨格筋(e)、脳(f)を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。いずれの臓器でも Cy3 シグナルは見られない。

## 2) Toc-siRNA の注腸投与による標的遺伝子発現抑制効果と副作用

Toc-siRNA を 2 時間おきに 10 mg/kg で 3 回注腸投与した際の *in vivo* での標的遺伝子発現抑制効果を確認した。Toc apoB-1 のターゲットである *apoB* mRNA の肝臓における発現は、MM のみ投与したコントロールに比べ、有意に低下していた (図 2a)。その際、非特異的な他の遺伝子の発現抑制は見られなかった。同時に、血清中の apoB 蛋白、中性脂肪、LDL コレステロールも測定したところ、投与から 24 時間の時点で、顕著な低下が認められた (図 2b-d)。また、血液検査の結果免疫賦活性を含めた明らかな副作用は認められなかった (表 1)。さらに、核酸投与部位である大腸の H&E 染色において炎症細胞浸潤等の明らかな異常は認められなかった (図 3)。これらの結果から、Toc apoB-1 の注腸投与は新たな高脂血症治療となり得ると考えた。

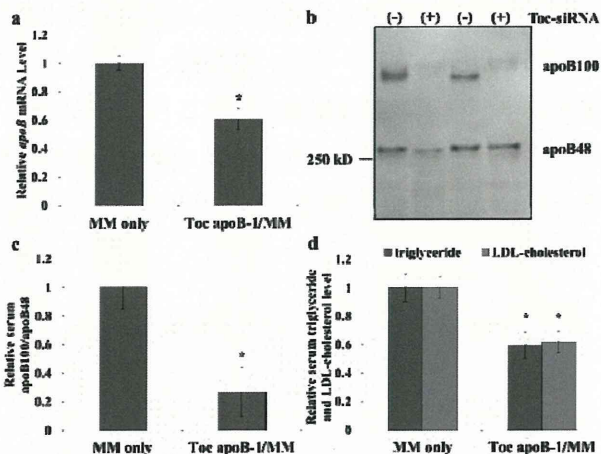


図 2 Toc apoB-1 のノックダウン効果

Toc apoB-1/MM を 2 時間おきに 10 mg/kg で 3 回投与し、最終投与の 24 時間後の *apoB* mRNA 発現抑制効果を、MM のみ投与した群を対照群として比較した。 ( $n = 3$ , mean values  $\pm$  s.e.m.,  $*P < 0.05$ )

(a) 肝臓中の *apoB* mRNA の発現量を qRT-PCR で測定した。対照群と比較して 40% の発現抑制を認めた。

(b,c) 血清中の apoB を Western blot で検出し (b)、バンド濃度を定量して apoB 100/48 比を求めた (c)。対照群と比較して 74% 減少した。

(d) 血清中の中性脂肪値、LDL コレステロール値を測定した。対照群と比較してどちらも 40% 低下した。

	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	Cre (mg/dl)	ALT (U/l)
PBS alone	< 12.5	0.12 $\pm$ 0.01	26.0 $\pm$ 3.21
Toc-siRNA/MM	< 12.5	0.13 $\pm$ 0.03	15.3 $\pm$ 1.76

表 1 副作用

Toc-siRNA/MM または PBS のみを 3 回投与後の血清中の IFN- $\alpha$ 、Cre、ALT の値。IFN- $\alpha$  のみ投与 3 時間後、その他は 24 時間後の血清を測定した。PBS のみ投与群と比較して有意差を認めない。値は平均値 $\pm$ s.e.m. ( $n = 3$ )



図 3 Toc-siRNA 投与時の大腸組織学的検索

Toc-siRNA/MM を 3 回投与後の大腸の H&E 染色。炎症細胞浸潤や浮腫等の明らかな異常所見を認めない。

## 3) Toc-siRNA の注腸投与時のデリバリー経路の解明

Toc-siRNA が直腸から肝臓に運ばれるメカニズムを調べた。

まず、腸管リンパ液中に Toc-siRNA がデリバリーされているかを確認した。Cy3 標識 Toc-siRNA を投与したマウスの腸管リンパ管よりリンパ液を採取し、Cy3 シグナルの拡散時間を FCS で測定した。拡散時間は蛍光標識が結合している粒子のサイズに比例する。リンパ液中の Cy3 が結合している粒子の拡散時間は約 3000  $\mu$ s であり、HPLC によってリンパ液を分離した際の CM 分画の拡散時間と一致した (図 4a)。これは直腸より投与された Toc-siRNA が吸収されてリンパ管に入り、リンパ管内で CM と結合していることを示している。

次に CM の薬理的な役割を調べるために、Toc-siRNA 投与前のミルク投与、CM を分解する lipoprotein lipase (LPL) の inhibitor の投与がデリバリー効率にどのように影響するかを確認した。リンパ管内、血中ともに CM がほとんど存在



しない絶食状態でマウスに Cy3 標識 Toc-siRNA を投与したところ、肝臓における Cy3 シグナルはほとんど見られなかった (図 4b)。LPL inhibitor である Triton X-100 を Cy3 標識 Toc-siRNA 投与前に静注した場合も同様に Cy3 シグナルは見られなかった (図 4c)。LPL は CM を肝臓に取り込まれる形であるカイロミクロンレムナント (CMR) に代謝する作用、CMR がレセプターを介して肝臓に取り込まれる際の ligand-bridging 作用の二つを持っており、それらが阻害されたために Toc-siRNA のデリバリー効率が低下したと考えられる。以上のことから、Toc-siRNA は CM の生理学的代謝経路を介して肝臓に運ばれていることが確認された。

最後に Toc-siRNA が肝細胞に取り込まれる際、CMR レセプターである LDL receptor (LDLR)、LDL receptor related protein 1 (LRP1) を介して取り込まれているかどうかを確認した。それらのレセプターが両方とも機能しないモデルマウスとして、LDLR<sup>-/-</sup>マウスに LRP1 の阻害剤である LRPAP を静脈投与したマウスを用意し、肝臓にデリバリーされた Toc-siRNA 量を Toc apoB-1 のアンチセンス鎖を検出する Northern blot にて評価したところ、まず ICR マウスでは 29 mer と 21 mer のバンドが見られた。これは細胞質に存在する RNase である Dicer によって siRNA が切断されたことを示しており、Toc-siRNA が肝細胞の細胞質にデリバリーされ、RNAi 効果を持つ 21 mer の siRNA にプロセスされたことが確認できた。一方 LRPAP を静注した LDLR<sup>-/-</sup>マウスではほとんどバンドが見られなかった (図 4d)。このことから直腸投与された Toc-siRNA は CMR レセプターを介して肝臓に取り込まれていることが証明された。

以上の結果から、直腸に投与された Toc-siRNA は混合ミセルの吸収促進作用により直腸粘膜を通過して、リンパ管内を吻側に移行してミルク投与によって小腸からリンパ管内へ分泌された CM と結合し、CM が肝臓に取り込まれる生理学的な

経路によって肝細胞のレセプターを介してデリバリーされたと考えられた。

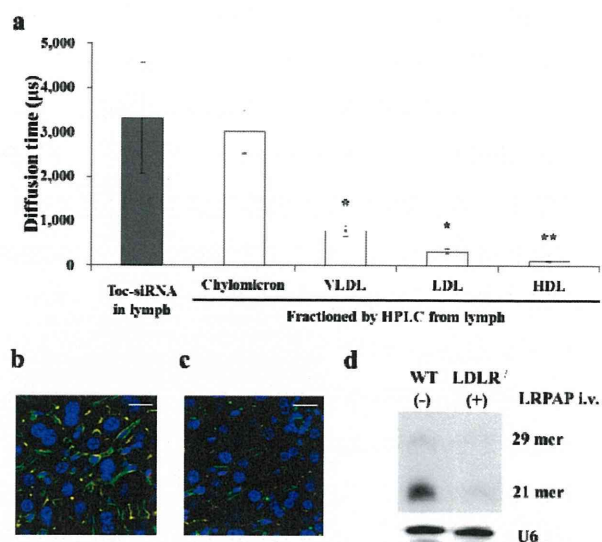


図 4 デリバリー経路の解明

(a) Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 2 時間後のリンパ液の拡散時間と、無処置のマウスから採取したリンパ液を HPLC でリポ蛋白分画を分離したものの拡散時間を FCS で測定し、比較した。  
 (b,c) 絶食状態(b)または Triton X-100 (20 mg/kg)を投与したマウス(c)に、Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 4 時間後の肝臓を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。  
 (d) LRPAP を投与した LDLR<sup>-/-</sup>マウスに Toc-siRNA/MM 投与後、肝臓より small RNA を抽出し、Toc-siRNA のアンチセンス鎖を Northern blot にて検出した。

#### D. 考察

肝臓への経消化管 siRNA デリバリーは、RNase による siRNA の分解や水溶性巨大分子である siRNA の膜透過性の低さなどの障害から、今まで報告がなかった。しかし我々は経口摂取後のビタミン E の生理学的取り込み経路を利用することで、肝細胞への経消化管 siRNA デリバリーに成功した。

経口摂取された Toc が小腸で吸収され、CM に取り込まれてリンパ管に入り、CM をベクターとして肝臓へデリバリーされるという生理学的経路を利用するためには、本来の吸収の場である小腸に Toc-siRNA を投与することが理想であったがうまくいかず、直腸投与に変えることで siRNA が消化管膜を通過して肝臓に到達することができるようになった

た。まず小腸ではなく直腸で成功した理由について考察する。

経口摂取されたTocは小腸においてscavenger receptor class B type 1、Niemann-Pick C1-like 1 protein等のレセプターやトランスポーターを介した細胞内経路を通過して吸収される。この際Toc-siRNAではsiRNAの大きさ・親水性・負電荷が問題となり、Tocのみと同じ経路では通過できなかったと考えられる。そこで細胞内ではなく細胞間を通過させる傍細胞輸送経路を用いるため、タイトジャンクションのゆるい直腸に投与したところToc-siRNAは腸間膜を通過することができた。これは混合ミセルが吸収促進剤としてうまく作用しタイトジャンクションが開いたことと、Toc-siRNAが両親媒性の分子であったことが効果的に働いたためと予想される。両親媒性の利点として、一つはTocの疎水性によってsiRNAが混合ミセルとミセル化して消化管内での滞留性が増すこと、もう一つはsiRNAの親水性によって膜に付着してしまうことなく、開いた細胞間を通り抜けられることが考えられる。Toc-siRNA/MMの直腸投与は傍細胞輸送経路を利用したsiRNAの腸間膜通過を成功させるのに最適な条件であった。

次にCMをベクターとした肝臓特異的デリバリーに成功した理由について考察する。本研究で使用したToc-siRNAは、①2'-O-メチル化及びphosphorothioate化によりRNase耐性が高く、②分子量(20 kDa)が血行性よりもリンパ行性に吸収されやすい大きさであり、③疎水性のTocを有するため脂質であるCMとリンパ管内で結合することができた。③の利点について詳細を述べる。血中CM濃度は最も高くなる食後においても、コレステロール値でリポ蛋白全体の1%未満である。そのため静脈投与されたToc-siRNAは他のリポ蛋白やアルブミンなどの血清蛋白に取り込まれてしまうが、構成成分の大部分がCMであるリンパ管内ではToc-siRNAは*in vivo* incubationによって主にCMと結合するため(図4a)、より肝臓特異的なデリバリーに成功した。また、④投与個体自身の内因性セルフベクターを用

いているため副作用が全くない点で、カチオニックリポソーム等の化学合成脂質ベクターよりも優れている。

経消化管siRNAデリバリーである本方法は経口腸溶剤や座薬に応用できるため、自己投与・長期間投与が可能となり、静脈注射で必須だった頻回の受診等を避けられることから費用対効果も優れている。本年度は主にapoBを標的としたsiRNAを用いることで高脂血症治療の可能性を示したが、標的を変えることでウイルス性肝炎、肝臓がん、家族性アミロイドポリニューロパチー等の治療も可能になると考えられる。これらは長期に渡る治療が必要であり、経口投与は患者のQuality of Lifeの維持に大きく寄与する。

## E. 結論

経口摂取後のビタミンEの生理学的取り込み経路を利用することで、肝細胞への経消化管siRNAデリバリーに成功した。今後は反復投与での有効性と安全性の確認、siRNAやMMの改良によって低用量でRNAi効果を得ること、現行の直腸投与から経口投与への移行が課題である。特にsiRNAに変えてより標的遺伝子発現抑制効果の高い新規機能核酸を用いることで、今回のデリバリー法を用いたより効果の高い方法も確立できる可能性があり、本年度確立した方法をさらに改善させて、次年度以降核酸の必要量を減らしたうえで、高脂肪食投与マウスやhTTR-TgMといった疾患モデルマウスに対して長期反復投与を行う予定である。

## F. 健康危険情報

本研究で合成した各種化学修飾を含む機能核酸やそれに付随するオリゴ糖誘導体、ビタミンE誘導体は極めて生体適合性の高い分子であると考えられる。また脂肪酸や界面活性剤は食品や薬剤の一部として用いられている。しかし様々な新規化合物も含まれており、今後細胞毒性や生体内での安全性に関する試験を適宜行う必要がある。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Kuwahara H, Yokota T, Mizusawa H. Delivery of siRNA into the blood-brain barrier: recent advances and future perspective. *Ther Deliv.* 2012; 3: 417-420.
2. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Yamamoto M, Saito Y, Piao W, Yoshida M, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Mol Ther.* 2011; 19: 2213-2221.
3. Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T. HDL facilitates *in vivo* delivery of  $\alpha$ -tocopherol-conjugated siRNA to the brain. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 711-719.
4. Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 405: 204-209
5. Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. *In vivo* application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 27-34.
6. 仁科一隆, 横田隆徳. 肝臓を標的とした新規 siRNA テクノロジー. *医薬ジャーナル.* 2012; 48: 102-105.
7. 横田隆徳. 神経変性疾患の RNA 干渉による創薬—RNA 医学・医療 あらたな診断・治療を拓く—. *医学のあゆみ.* 2011; 238: 542-546.
8. 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳. 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. 『Annual Review

2011 神経』中外医学社. 2011; 42-52.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴文英, 水澤英洋, 横田隆徳. RNA 干渉を用いた脳血管内皮細胞における遺伝子発現抑制法—多発性硬化症の新規治療法としての可能性—. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会. 東京. 2011. 9.17
2. 吉田規恵, 村上正裕, 仁科一隆, 桑原宏哉, 水澤英洋, 横田隆徳. 直腸投与による siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 21 回アンチセンスシンポジウム. 大阪. 2011. 9. 1
3. Nishina K, Murakami M, Yoshida K, Kuwahara H, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of  $\alpha$ -tocopherol-conjugated siRNA from colorectum to liver. 第 17 回日本遺伝子治療学会総会. 福岡. 2010. 7.16
4. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the brain endothelial cells in mice. 第 17 回日本遺伝子治療学会総会. 福岡. 2010. 7.16
5. 仁科智子, 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 朴文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の *in vivo* デリバリー法. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5.20
6. 朴文英, 仁科一隆, 桑原宏哉, 平井高志, 宇野佳孝, 町田明, 仁科智子, 吉田規恵, 榎本光裕, 水澤英洋, 横田隆徳. 血清リポ蛋白ベクターを用いた後根神経節神経細胞への siRNA デリバリー方法の開発. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5.18

(国際学会)

1. Iwata R, Hirochi S, Kuwahara H, Nishina K, Yokota T, Wada T. Construction of covalent and noncovalent a-tocopherol-siRNA conjugates toward liver delivery of RNAi drugs. 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011. Hokkaido. 2011.11.9
2. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the brain endothelial cells in mice. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting. Seattle. WA. 2011.5.20
3. Nishina K, Murakami M, Yoshida K, Kuwahara H, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of vitamin E-conjugated siRNA from colorectum to liver. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting. Seattle. WA. 2011.5.19

#### H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

##### 1.特許取得

横田隆徳, 小比賀聡, 仁科一隆.

キメラ2重鎖核酸.

特願 2011-275488 (2011.12.16)

##### 2.実用新案登録

特になし

##### 3.その他

特になし

## II. 分担研究報告

## エンドソーム脱出素子の設計および作成

片岡 一則<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻

本分担研究では、VE-siRNA/CM の siRNA デリバリー効率を高めることを目的としたエンドソーム脱出素子として Charge Conversional Polymer(CCP) を利用した VE-PEG-CCP の合成と完全合成系の siRNA キャリアとして CCP を表面に導入した高分子ミセル型核酸キャリアの開発を行っている。本年度は、VE-PEG-CCP の合成に着手し、途中段階の末端にアミノ基を有する VE-PEG 誘導体まで合成することができた。一方、CCP 搭載遺伝子内包ミセルを構築し、その機能を物性評価ならびに培養細胞への遺伝子導入実験により実証することができた。

### A.研究目的

siRNA などの核酸医薬を用いた分子治療は、肝疾患を含めた各種難治性疾患における新しい治療法として期待されているが、有効性と安全性の両面を満たすデリバリー方法の開発が確立されていないのが現状である。研究代表者の横田らは、これまでに siRNA とビタミン E(VE)を共有結合させ(VE-siRNA)、これをカイロミクロン(CM)に ex vivo で取込ませた新規ベクター(VE-siRNA/CM)を開発し、マウスにおいて低用量で肝臓の apoB の発現を効果的に抑制できることが明らかになっている。そこで本分担研究では、VE-siRNA/CM の siRNA デリバリー効率を高めることを目的としてエンドソーム脱出素子 (Charge Conversional Polymer, CCP)を開発し、VE-siRNA/CM と複合化が可能な機能性分子として VE と CCP が PEG のスペーサーによって連結された VE-PEG-CCP の合成を行っている (図 1)。さらに、CCP を利用した完全合成系の siRNA キャリアとして、分担研究者の片岡が世界に先駆けて研究開発を進めている高分子ミセル型核酸キャリアの表面に CCP を導入した新規デリバリーシステムの開発も行った(図 2)。これらのシステムは in vivo における siRNA のデリバリー効率を飛躍的に高めることができるナノキャリアとし

て期待される。

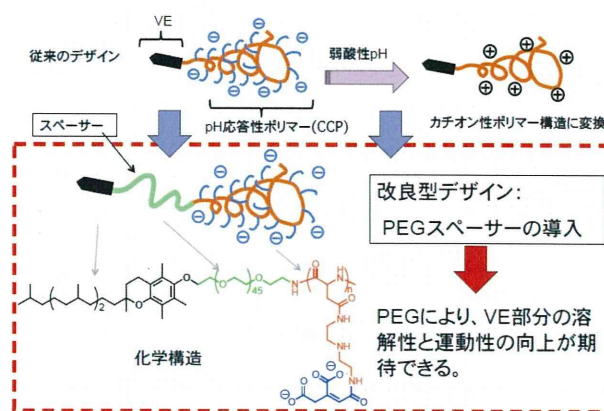


図 1. 末端に VE を持つエンドソーム脱出素子の設計

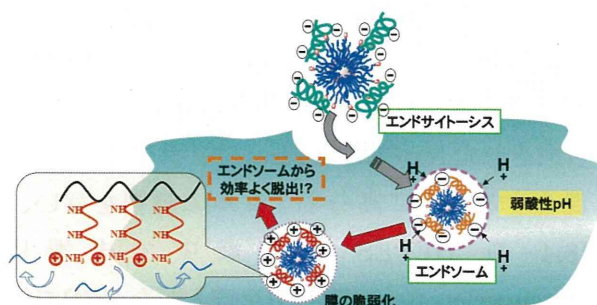


図 2. CCP を表面に有する高分子ミセル型 siRNA キャリアによる効率的な細胞質内への核酸デリバリー

### B.研究方法

#### 1) VE-PEG-CCP の合成

VE-PEG-CCP の合成は、図 3 の合成スキームに従い合成した。

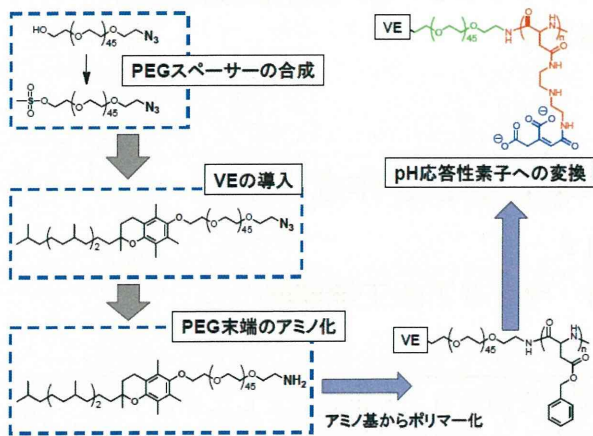


図 3. VE-PEG-CCP の合成スキーム

## 2) CCP 搭載高分子ミセル型遺伝子キャリアの開発と機能評価

PEG 末端にアジド基を有する  $N_3$ -poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lysine) ( $N_3$ -PEG-*b*-PLys)を以下の図 4 の合成スキームにより合成した。

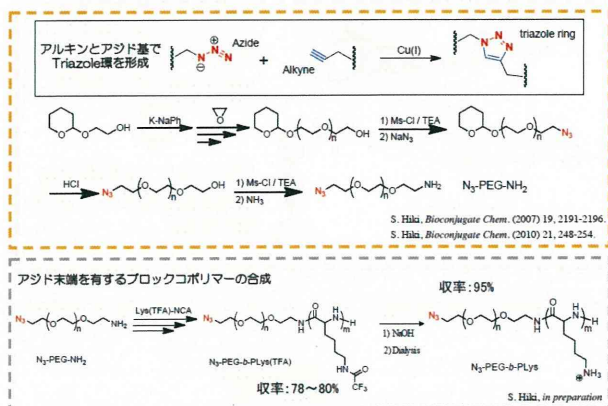


図 4.  $N_3$ -PEG-*b*-PLys の合成スキーム

合成された  $N_3$ -PEG-*b*-PLys はプラスミド DNA と混合することに高分子ミセルの調製を行い、pH8.4 の HEPES 緩衝液中で末端に Dibenzocyclooctyne (DIBO)を導入した CCP を混合することによって Click Conjugation でミセル表面に CCP を導入した。調製されたミセルに関しては、動的光散乱測定(DLS)およびゼータ電位測定を行い、肝がん Huh-7 細胞に対する遺伝子発現効率をルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を用いたルシフェラーゼアッセイによって評価した。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C.研究結果

### 1) VE-PEG-CCP の合成

本年度は、CCP として PAsp(DET-Aco)の末端に対して VE を導入した誘導体の合成において、PAsp(DET-Aco)と VE との間にスペーサーを組み込むための分子設計を行った。また、高い VE 導入率を実現するために、VE に PEG スペーサーを結合し、その誘導体をベースにして PAsp(DET-Aco)を創り込む設計とした。まず PEG スペーサーの合成では精密重合法によって、末端にアジド基を持つ誘導体を得た (図 5)。

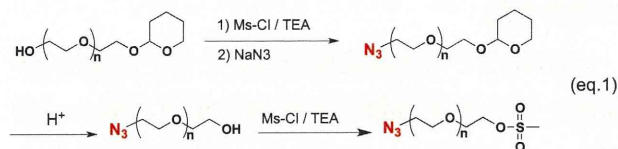


図 5. アジド基を有する PEG スペーサーの合成

次に、末端にアジド基を有する PEG を VE に対して反応させることにより、VE へのスペーサーの導入に成功した。アジド基の還元反応により、アミノ基へと変換した。

### 2) CCP 搭載高分子ミセル型遺伝子キャリアの開発と機能評価

プラスミド DNA を内包した高分子ミセルに Click Conjugation を利用して CCP を導入した結果、粒径および多分散度(PDI)には変化が見られなかったが、ゼータ電位は 0.5mV から -5mV に減少することが確認された(図 6)。これは、アニオン性の CCP がミセル表面に導入されることによってミセル表面の電荷が中性からアニオン性に変化したことに起因するものと思われる。一方、CCP 導入ミセルの pH を 7.4 から 5.5 に低下させたところ、ゼータ電位が -5mV から 25mV に増加することが確認された(図 6)。これは pH の低下によって、アニオン性の PAsp(DET-Aco)からカチオン性の PAsp(DET)に変化することに起因するも

のと思われる。すなわち、ミセル表面の CCP は周囲の pH に応答してカチオン性からアニオン性へと電荷がシフトすることを示唆する結果が得られた。

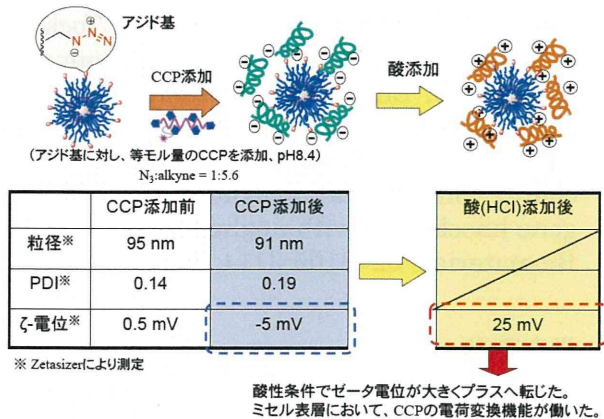


図6. 遺伝子内包ミセルへの CCP の導入と粒径およびゼータ電位の変化

ミセル表面の CCP 導入率を変化させた時の遺伝子発現効率を図 7 に示した。その結果、CCP 添加量を増加させるに従って遺伝子発現効率が増加することが確認された(図 7 左)。一方、DIBO と反応しない Methoxyl 基を末端に有する PEG-*b*-PLys から形成されるプラスミド DNA 内包ミセルに CCP を添加したところ遺伝子発現効率の向上は見られなかった(図 7 右)。この結果より、CCP は単なる混合ではなく、Click Conjugation によってミセル表面に導入することがエンドソーム脱出に重要であることが示唆された。

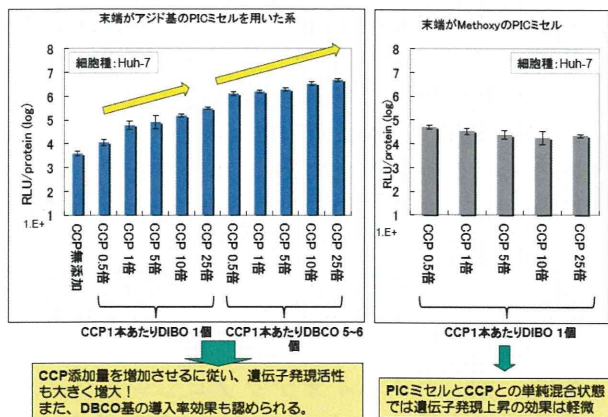


図7. CCP 導入量の異なる遺伝子内包ミセルの遺伝子発現効率(ルシフェラーゼアッセイ)

## D. 考察

以前の研究では、VE と CCP をスペーサーを用いずに直接結合していたが、CM と混合した結果、CM 表面にうまく導入されないことが明らかとなった。本年度は VE と CCP の間にスペーサーを導入した VE-PEG-CCP を合成した。PEG は、親水性という特性や鎖長制御性の良さから、最適なスペーサーであると考えられる。本年度は、末端にアミノ基を有する VE-PEG 誘導体まで合成できたので、今後はこのアミノ基に種々の鎖長を持つ PAsp(DET-Aco) を導入する予定である。

一方、CCP 搭載高分子ミセル型遺伝子キャリアに関しては、CCP がミセル表面に導入されることが確認され、CCP 導入後もミセルの粒径や粒径分布は変化しないことが確認された。また、ミセル表面の CCP は pH の低下によってアニオン性からカチオン性へと電荷が反転することが確認された。さらに、Huh-7 細胞への遺伝子導入実験により CCP をミセル表面に導入することによって遺伝子導入効率が有意に向上することが確認された。以上のように、本年度は CCP 搭載プラスミド DNA 内包ミセルの構築法を確立し、その機能を物性評価ならびに培養細胞への遺伝子導入実験により実証することができた。

## E. 結論

本年度は、VE-siRNA/CM のエンドソーム脱出効率を高めるための機能性素子として VE-PEG-CCP の合成に着手し、途中段階の末端にアミノ基を有する VE-PEG 誘導体まで合成することができた。一方、完全合成系の siRNA キャリアとして CCP を表面に配置した遺伝子内包高分子ミセルを構築し、その機能を物性評価ならびに培養細胞への遺伝子導入実験により実証することができた。

## F. 健康危険情報

該当なし



## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Kumagai M, Shimoda S, Wakabayashi R, Kunisawa Y, Ishii T, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K, Nakano N. Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination. *J. Control. Release* in press
2. Uchida S, Itaka K, Chen Q, Osada K, Ishii T, Shibata MA, Harada-Shiba M, Kataoka K. PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol Ther* in press
3. Rafi M, Cabral H, Kano MR, Mi P, Iwata C, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhus gastric tumors and their lymph node metastasis. *J. Control. Release* in press
4. Baba M, Matsumoto Y, Kashio A, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K, Yamasoba T. Micellization of cisplatin (NC-6004) reduces its ototoxicity in guinea pigs. *J. Control. Release* 157: 112-117, 2012.
5. Suma T, Miyata K, Ishii T, Uchida S, Uchida H, Itaka K, Nishiyama N, Kataoka K. Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 33: 2770-2779, 2012.
6. Kim HJ, Oba M, Pittella F, Nomoto T, Cabral H, Matsumoto Y, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. *J. Drug Target.* 20: 33-42, 2011.
7. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* 6: 815-823, 2011.
8. Christie RJ, Miyata K, Matsumoto Y, Nomoto T, Menasco D, Lai TC, Pennisi M,

Osada K, Fukushima S, Nishiyama N, Yamasaki Y, Kataoka K. Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer Comprising thiols and amidines. *Biomacromolecules* 12: 3174-3185, 2011.

9. Pittella F, Zhang M, Lee Y, Kim HJ, Tockary T, Osada K, Ishii T, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K. Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32: 3106-3114, 2011.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 片岡一則, ナノテクノロジーが先導するドラッグデリバリーシステムの革新, 第28回日本医学会総会, 2011.04.09, 東京国際フォーラム, 東京, 教育講演
2. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 第38回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「最先端医療の現状と展望」, 2011.06.01, 東京大学医科学研究所, 東京, 招待講演
3. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第27回日本DDS学会学術集会, 2011.06.09 東京大学本郷キャンパス, 年会長講演
4. 片岡一則, ナノバイオが先導する未来医療, 北海道大学大学院薬学研究院特別講演, 2011.06.30, 北海道大学大学院薬学研究院, 札幌, 北海道, 招待講演
5. 片岡一則, 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計, 千里ライフサイエンスセミナー「新しい先端医薬品としての核酸医薬品の戦略」, 2011.07.08, 千里ライフサイエンスセンタービル, 大阪府, セミナー
6. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる遺伝子・siRNA デリバリー, アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム, 2011.09.02, 大阪大学コンベンションセンター, 吹田市, 大阪府, 特別講演
7. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー~, 大阪大学羅針塾, 2011.09.03, セントレジスホテル大阪, 大阪府, 招待講演

8. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～, 新学術領域研究「バイオアセンブラ」第1回シンポジウム, 2011.10.12, トランスシティカンファレンス・丸の内, 東京都, 特別講演
9. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～, 日本脳神経外科学会第70回学術総会, 特別企画「医工学と脳神経外科」, 2011.10.14, パシフィコ横浜, 神奈川県, 特別企画講演
10. 片岡一則, 薬を患部に運ぶナノカプセル～医真菌学領域への応用の展望～, 第55回日本医真菌学会学術集会, 2011.10.21, 椿山荘, 東京都, 特別講演
11. 片岡一則, "ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー～", 第16回臨床BRM研究会, 2011.10.27, サイプレスガーデンホテル, 名古屋市, 愛知県, 特別講演
12. 片岡一則, 高分子が先導するライフ・イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 東京工業大学 COE 特別授業, 2011.11.10, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都, 特別授業
13. 片岡一則, 高分子ミセルによる抗がん剤のピンポイントデリバリー, 第33回日本バイオマテリアル学会, 2011.11.22, 京都テルサ, 京都府, 招待講演
14. 片岡一則, 高分子ミセルによるドラッグデリバリー ～その現状と将来展望～, 東京女子医科大学 櫻井靖久名誉教授追悼シンポジウム「医学・薬学・工学の融合を目指して」, 2011.12.02, 東京女子医科大学弥生記念講堂, 東京都, 招待講演
15. 片岡一則, 学融合に基づく医療システムイノベーション, 東大病院先端医療開発部局合同シンポジウム「再生医療・細胞医療の早期実用化にむけた開発戦略」, 2011.12.17, 東京大学医学部 教育研究棟鉄門記念講堂, 東京都, 基調講演
16. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション ～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 特許庁 先端技術研修会, 2011.12.22, 経済産業省別館, 東京都, 招待講演

(国際学会)

1. Kataoka K. Polymer Chemistry in Nanomedicine: Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 2011 Spring Meeting, Korean Polymer Society, 2011.04.07, Daejeon, Korea, 基調講演
2. Kataoka K. Self-assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Seminar at Nankai University, 2011.05.06, Nankai University, Tianjin, China, 招待講演
3. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, The 2nd FAPS Polymer Congress (FAPS-PC2011), 2011.05.09, China National Convention Center (CNCC), Beijing, China, 基調講演
4. Kataoka K. Self-assembled Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, Distinguished Lecture at Waterloo Institute for Nanotechnology, University of Waterloo, 2011.05.19, University of Waterloo, Waterloo, Canada, Distinguished Lecture
5. Kataoka K. Smart Supramolecular Structures from Block Copolymer as Nanocarriers in Gene and Drug Delivery, 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Biomaterials 2011, 2011.05.30, Guilin, China, 基調講演
6. Kataoka K. Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, 23rd Pezcoller Symposium, 2011.06.17, Trento, Italy, 招待講演
7. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 2011 Gordon Research Conference "Cancer Nanotechnology", 2011.07.17, Colby College, Waterville, ME, USA, 招待講演
8. Kataoka K. Can We Manage Penetration Barriers in Tumor Tissue by Tuning the Size of Nanocarriers?, 2011 Gordon Research Conference "Cancer Nanotechnology", 2011.07.17, Colby College, Waterville, ME, USA, 招待講演
9. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for siRNA Delivery, 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.07.30, Gaylord National Resort and

Convention Center, National Harbor, Maryland, USA, 招待講演

10. Kataoka K. Smart Polymeric Micelles from PEG-based Block Copolymers for Advanced Drug Delivery, 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2011.08.01, Gaylord National Resort and Convention Center, National Harbor, Maryland, USA, 招待講演
11. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Bayreuth Polymer Symposium 2011, 2011.09.11, Bayreuth, Germany, 基調講演
12. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Seminar at Friedrich Schiller University Jena, 2011.09.14, Jena, Germany, 招待講演
13. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Smart Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 3rd Asian Biomaterials Congress, 2011.09.16, BEXCO Busan, Korea, 基調講演
14. Kataoka K. Supramolecular Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, Tateshina Conference on Organic Chemistry, 2011.11.13, Tateshina Forum, Chino, Nagano, Japan, 招待講演
15. Kataoka K. Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, The 12th Pacific Polymer Conference, 2011.11.15, The Shilla Jeju, MD Jeju-do, Korea, 基調講演
16. Kataoka K. Block Copolymer Micelles for Targeted Cancer Therapy, EMA Webinar, 2011.11.29, Tokyo, Japan, 招待講演
17. Kataoka K. Block Copolymer Micelles and Vesicles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011.12.02, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan, 招待講演
18. Kataoka K. Self-Assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, 2011.12.10, Tokyo Station Conference, Tokyo, Japan, 招待講演
19. Kataoka K. Supramolecular Nanodevices from Functionalized Block Copolymers for Molecular Therapy, "France-Japan Workshop "The Nanotech Revolution from

Science to Society: a Time for Passion and a Time for Reason", 2011.12.13, Amphithéâtre, Marie Curie, ENS Cachan, France, 招待講演

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

村上 正裕<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 大阪大谷大学薬学部 薬剤学講座

siRNA およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(LNA)の経口投与製剤の開発を目的に、VE-siRNA 及び VE-LNA の経腸管経路による肝臓への選択的な送達製剤の処方検討及び基礎評価を行った。小動物における検討より、脂肪酸混合ミセルを配合した注腸剤により、肝実質細胞に siRNA および LNA を送達できることを実証した。一方、これら機能性オリゴ核酸のデリバリーシステムの最適化に必要な機構に関する情報を得るための基礎検討を行い、VE-siRNA が製剤中では脂肪酸混合ミセルと、又、リンパ中ではカイロミクロンと複合体を形成して存在することを示唆する結果を得た。

### A.研究目的

核酸医薬品を用いた遺伝子治療において、いくつかの新薬の開発がなされてきて難治性疾患における新しい治療法の確立が期待されている。しかし、デリバリー技術開発の遅れから、その投与法は局所への注入による投与に限定されており、開発中の静脈注射による全身投与にも安全性、コストなど課題が多く、核酸医薬品の普及を強く制限している。本研究では、核酸医薬品の経腸デリバリー技術を確立することによって、患者の負担が少ない自己投与が可能な、安全かつ簡便で、有効性の高い内服薬や坐剤などの経腸吸収製剤の開発基盤を構築することを最終目的とする。

### B.研究方法

#### 1) VE-siRNA の大腸投与法

実験には、マウス (ICR (6-8 週令)) を使用した。自由摂水下、16 時間絶食したマウスに、脂肪乳を 30 分毎 3 回経口投与した。脂肪乳の最終投与 30 分後にネブタール麻酔を施し、約 5cm の腸管ループを作成した。腸管ループを生理食塩水で洗浄後、ビタミン E 修飾(VE-)siRNA、又は、LNA (Cy3 蛍光標識体又は非標識体)を、単独、

又は、吸収促進剤と共に肛門から直腸内に注入した。麻酔維持下、一定時間後、採血した後、冷却した生理食塩水にて脱血還流を行い、各臓器を摘出した。組織及び血液サンプルは、共焦点顕微鏡観察 (以上、大阪大谷大学)、血液検査、ウェスタンブロットティング、ノーザンブロットティング、定量 PCR (以上、東京医科歯科大学) 等の各評価に供した。また、VE-siRNA のリンパ液中における存在状態を調べるため、同様の手順により絶食、脂肪乳投与したマウスの腸管リンパ管よりリンパ液を採取した。なお、試験液及びリンパ液中微粒子の粒径測定及び解析は、粒径測定システム、ELS-z (大塚電子) 測定装置を用いて行った。

#### 2) 腸内薬物輸送の為の VE-siRNA/LNA の調製

混合ミセルは、3.0% HCO-60 にリノール酸等の吸収促進剤を混合し、Digital Sonifier Models S-250D (Branson, Danbury, CT)にて 5 分間 20kHz, 30W、氷上で超音波をかけることによって用時調製した。siRNA もしくは LNA は、混合ミセル及び各種吸収促進剤溶液に添加後ピペッティングにより混合し、37°C で 30 分間インキュベーションして使用した。