

3) 共焦点顕微鏡観察

各臓器は 4%パラホルムアルデヒドにて固定後、30%スクロースにて置換し、O.C.T compound にて包埋した。凍結した包埋ブロックを、Cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)にて薄切し、細胞核を TO-PRO-3 (Invitrogen, Carlsbad, CA、青)、細胞骨格を fluorescein (FITC) phalloidin (Invitrogen、緑)にて染色し、VE-siRNA(Cy3、赤)の臓器移行性と局在を、共焦点顕微鏡 (LSM510 META (Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Germany))により観察・評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物愛護、および実験動物の適正管理、動物実験の適正化の観点から、大阪大谷大学動物実験委員会規定と動物実験指針に基づいて行った。

C.研究結果

1) 核酸を用いた DDS 処方の検討

製剤処方化検討の一環として、吸収促進剤に関して、リノール酸混合ミセルと臨床で使用実績のあるカプリン酸ナトリウムとの比較検討を行った。カプリン酸ナトリウムの場合、10mM の直腸投与では、VE-siRNA を肝臓へ送達出来るものの薬物の多くが大腸内に残留しており、又、30mM の高濃度では、吸収の改善が認められるものの、リノール酸混合ミセルの場合と比較すると、肝臓への VE-siRNA の移行の程度は低いことが明らかとなり、吸収促進剤としては、脂肪酸混合ミセルが最も優れていることが示された。

経腸経リンパ管デリバリーシステムを用いて、高活性で新規核酸医薬品の有力候補であるアンチセンスオリゴヌクレオチド LNA(12mer、Cy3-LNA) および VE-LNA (12mer、Cy3-LNA/Toc-cRNA) の肝臓へのデリバリーを検討した。LNA 及び VE-LNA は、いずれも混合

ミセルと大腸投与することによって、肝臓へ顕著な移行が観察された。また、siRNA の場合とは異なり、小腸投与によっても肝臓へ送達できることが明らかとなった。一方、VE-LNA は一様に肝細胞質内に検出されたが、LNA は細胞質内にドット状に集積している像が観察され、この傾向は小腸投与、大腸投与ともに、又、投与濃度に係わらず観察された。このことは、LNA と VE-LNA との間で、細胞内動態又は移行様式が異なる可能性のあることを示唆している。

2) 核酸/脂肪酸混合ミセル混合物および核酸/リンパ液混合物の物理的性状の解析

オリゴ核酸の混合ミセル溶液並びに生体内とくに重要なリンパ液中での物理的性状を検討する目的で、オリゴ核酸 (siRNA 及び VE-siRNA) と混合ミセルとの混合物及びリンパ液との混合物について、混合前後の粒径変化を DLS により測定することにより検討した。

動物実験に用いる混合ミセルは用事調製して用いているが、実際、調製直後の混合ミセルは高い再現性をもって 13nm 付近($13.2\text{nm} \pm 0.2\text{nm}$) にメインの粒子径ピークを示し、一部 100nm 付近および 1500nm 付近等に少量ではあるが多峰性ピークを示した (多分散指数 0.13 ± 0.02)。ただし、混合ミセルは調製後、時間経過に伴い会合して粒径がやや増大する傾向が認められた。

siRNA は、5.2nm 付近にメイン粒径ピークを示し、680nm、7700nm 付近に少量の粒径ピークを持つ、多峰性ピークを示した。一方、VE-siRNA は、9.9nm 付近のメイン粒径ピークおよび 160nm 付近の少量のピークの二峰性ピークのみであった。次に、siRNA 又は VE-siRNA を混合ミセルと 37°C で 30 分インキュベーション後、粒子径を測定したところ、siRNA/混合ミセルは、メイン粒径ピークが $15.1 \pm 0.6\text{nm}$ の多峰性ピークを示したが (多分散指数 0.07 ± 0.01)、VE-siRNA/混合ミセルは $16.6 \pm 0.5\text{nm}$ の単一粒径ピークを示した (多分散指数 0.05 ± 0.01)。このことより、

VE-siRNA と混合ミセルは会合して均質な混合ミセルを形成していることが示唆され、VE 修飾がこの複合体形成を補助していることが示唆された。

ミルクを投与後の ICR マウスより採取したリンパ液は、平均粒径 $269.5 \pm 4.3 \text{ nm}$ の単一でブロードなピーク（ピークにおける粒径、 $356.1 \pm 7.7 \text{ nm}$ 、多分散指数 0.22 ± 0.01 ）を示した。siRNA とリンパ液を混合して 37°C で 30 分インキュベーションした siRNA/リンパ液混合液では、平均粒子径が増大 ($272.5 \pm 2.3 \text{ nm}$) したが、リンパ液単独の場合と同様、単一のブロードな幅の広さを示した（ピークにおける粒径 $402.4 \pm 22.4 \text{ nm}$ 、多分散指数 0.269 ± 0.001 ）。一方、VE-siRNA とリンパ液との混合液では、リンパ液単独と比較して、平均粒子径は減少 ($238.5 \pm 1.6 \text{ nm}$) し、単一で幅のより狭いピークが観察され（ピークにおける粒径 $296.7 \pm 6.7 \text{ nm}$ 、多分散指数 0.19 ± 0.01 ）、siRNA/リンパ液に比較し、VE-siRNA/リンパ液は有意差をもって平均粒径、ピークにおける粒径および多分散指数が小さくなることが明らかとなった。また、リンパ液と VE-siRNA を混合することによりピークが単一となり、又、リンパ液から分離して得られたカイロミクロン分画と VE-siRNA を混合した場合も同様の単一ピークを示すことが明晰となった。

以上から、VE-siRNA とカイロミクロンは会合している可能性が示唆された。

D. 考察

開発中の経腸経リンパ管デリバリーシステムによる肝への送達程度が、分子量の異なる siRNA ($\sim 19 \text{ k}$) と LNA ($\sim \text{数 k}$) では大きく異なることが明らかとなった。とくに、分子量の小さい LNA では小腸からのデリバリーも可能であることが見出され、経口投与製剤の設計上有益な情報が得られた。一方、LNA の VE 修飾体と非修飾体で、混合ミセルとの同時投与時における肝への移行像が明らかに異なっており、このことは肝

臓への移行後、細胞内への取り込み様式又は細胞内取り込み後の動態が異なることを示唆しており、生理活性との関連から興味深い知見が得られたものと考えられる。すなわち、VE 修飾は機能核酸分子の細胞内動態にも影響を与え、とくに細胞質に拡散して見えることは、その効果の発現上有利であるかも知れない。一方、DLS を用いた粒径解析の結果より、VE-siRNA が製剤中では脂肪酸混合ミセルと、又、リンパ液中ではカイロミクロン分画成分と会合して、比較的均一な複合体を形成して存在していることが示唆された。さらに、siRNA の結果との比較より、この会合には VE 修飾が寄与していることが明らかとなった。ただし、VE-siRNA の混合ミセル溶液の腸管腔内での安定性およびカイロミクロンとの生体内での相互作用を実証するためには、さらに詳細な解析が必要であると考えられる。比較的分子量が低い LNA では、VE 修飾による混合ミセル及びカイロミクロンとの親和性が siRNA よりも相対的に強い可能性が高い。一方、リノール酸混合ミセルと比較して、カプリン酸ナトリウムと VE-siRNA との親和性は低いと予測される。したがって、カプリン酸ナトリウムや LNA においても同様の物理的検討及び解析を加えることで、促進剤の効果の差や混合ミセルの効果が siRNA の場合と異なる理由を解明する手がかりが得られるものと期待され、さらに検討を継続する予定である。

E. 結論

siRNA に加えて、LNA に対しても、開発中のデリバリー技術による肝選択的な経腸デリバリーが可能なが示された。また、比較的分子量の LNA の場合は、脂肪酸混合ミセルにより、小腸からのデリバリーも可能なが明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡像の分析から、VE 修飾がオリゴ核酸分子の細胞内動態に影響している可能性が示唆された。一方、DLS による物理的検討結果より、VE-siRNA が、製剤中では脂肪酸混合ミセルと、又、リンパ液中ではカ

イロミクロン分画と、均質な複合体を形成して存在していることが示唆された。また、この複合体形成に VE 修飾が寄与していることが示された。以上、本研究により、核酸医薬品の経腸デリバリー技術の確立及びこれを利用した経腸 DDS 製剤設計に資する有益な基礎情報が得られた。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

横田隆徳、村上正裕、仁科一隆、
PCT/JP2011/004642 (国際出願)、経大腸吸収用
医薬組成物、Aug 2011

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

和田 猛¹⁾

¹⁾ 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

研究要旨

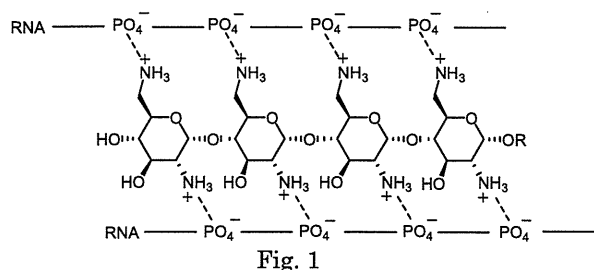
A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸に選択的に結合し、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性人工オリゴ糖を合成した。さらに、その分子にビタミン E およびそのアナログを結合した分子を合成し、siRNA と複合体を形成させ、肝細胞特異的なデリバリーを可能にする新規 DDS の開発をおこなった。

A. 研究目的

核酸医薬の経口治療薬の開発を目指し、二本鎖核酸に強く結合し、生体内でその高次構造を安定化し、様々な分解酵素による分解を阻害する人工分子の合成をおこなう。さらに、その分子にビタミン E を結合させ、核酸医薬と複合体を形成させることにより、ビタミン E の代謝経路を利用した肝細胞特異的なデリバリーを可能にする新規 DDS の開発をおこなう。

B. 研究方法

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループの幅に合致し、核酸のリン酸ジエステル部位の負電荷と効果的に相互作用可能な正電荷を有するオリゴジアミノ糖 (Fig. 1) をデザインし、合成する。



さらに、オリゴジアミノ糖とビタミン E およびそのアナログ分子を結合させ、siRNA の肝細胞特異

的なデリバリーを可能にする新規キャリアの合成をおこなう。

(倫理面への配慮)

現時点では特に倫理面への配慮は必要ない。

C. 研究結果

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループに結合可能な湾曲した構造を有するオリゴジアミノ糖として、2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシグルコースが α グリコシド結合により連結したオリゴマー (1-4 糖) の合成を達成した。

RNA 二重鎖とオリゴジアミノグルコースの相互作用を解析するため、Tm (二重鎖の熱力学的安定性の評価)、CD スペクトル (二重鎖の構造変化の観測)、ITC (相互作用により発生する熱量の観測) などの実験を行った。オリゴジアミノグルコースの 1-4 量体のうち、糖鎖長の長い 3、4 量体を用いた場合に、顕著な Tm 値の上昇と CD スペクトルの若干の変化が観測された (Fig. 2)。一方、対照実験として二重鎖 DNA に対しても同様の実験を行ったところ、1-4 量体いずれを加えた場合にも Tm 値、CD スペクトルの有意な変化は観測されなかった。さらに ITC では、4 量体を RNA12 量体に加えることで発生する熱量が、

DNA の場合と比較し 2 倍程度の値であるという結果が得られた。つまり、オリゴジアミノグルコースが、RNA 二重鎖に対し、DNA 二重鎖よりも強く結合することが示された。

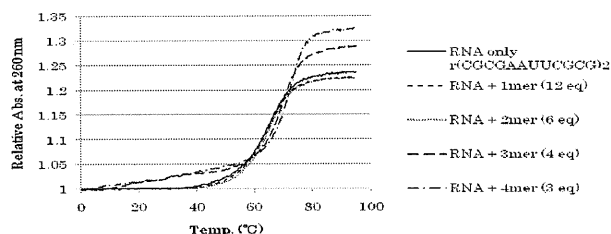


Fig. 2 RNA 二重鎖 T_m 曲線の変化

次に、siRNA の肝細胞特異的なデリバリーを目指し、オリゴジアミノグルコースと同様な湾曲した構造を有し、A 型核酸二重鎖との高い結合親和性が期待できる 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシガラクトースが β グリコシド結合により連結したオリゴマー (3 糖) にビタミン E およびそのアナログが共有結合した分子の合成を検討した。保護基の検討や反応条件の最適化をおこなうことにより、目的とするビタミン E が結合したオリゴジアミノガラクトース誘導体の合成を達成した。これらの誘導体は、オリゴジアミノグルコース誘導体と同様に、RNA 二重鎖に結合し、それらを安定化する効果を有することが確認できた。

D. 考察

本研究でデザイン、合成したオリゴジアミノ糖、2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシグルコースおよび 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシガラクトース誘導体は、湾曲した高次構造を有し、分子の両側に位置するアミノ基間の距離 (6Å) は、A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループ幅 (7~8Å) に極めて近いことから、グループの両側のリン酸部位と相互作用することが可能であり、湾曲した構造は、RNA 二重鎖のメジャーグループに結合する際にエントロピー的に有利である。

E. 結論

本研究では、A 型核酸二重鎖との高い結合親和性を有するオリゴジアミノグルコース誘導体の合成に成功した。さらに、siRNA の肝臓への効率的輸送を展望し、オリゴジアミノガラクトースとビタミン E およびそのアナログを結合させたオリゴジアミノ糖誘導体の合成に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Iwata R, Sudo M, Nagafuji K, Wada T. Synthesis of Oligodiaminosaccharides Having α -Glycoside Bonds and Their Interactions with Oligonucleotide Duplexes. *J. Org. Chem.* 76: 5895–5906, 2011.
- Arai K, Uchiyama N, Wada T. Synthesis and properties of novel 2'-O-alkoxymethyl-modified nucleic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 6285–6287, 2011.
- Uchiyama N, Ogata T, Oka N, Wada T. Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate-promoted Reductive 2'-O-arylmethylation of Ribonucleoside Derivatives. *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* 30: 446–456, 2011.
- Oka N, Wada T. Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. *Chem. Soc. Rev.* 40: 5829–5843, 2011.

2. 学会発表

- Iwata R, Hirochi S, Kuwahara H, Nishina K, Yokota T, Wada T. Construction of covalent and noncovalent α -tocopherol-siRNA conjugates toward liver delivery of RNAi drugs. 38th International Symposium on Nucleic Acids

Chemistry 2011, 11.9, 2011, Hokkaido

University

2. Wada T. Synthesis of

oligodiaminosaccharides binding to A-RNA
duplexes. Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids,
2011, 10.15, 2011, Wuhan University, China

3. 岩田倫太郎, 和田猛. ビタミン E 修飾型 RNA
二重鎖結合性オリゴジアミノ糖の合成と性質, 日
本化学会第 92 春季年会, 3.25, 2012, 慶応大学日
吉キャンパス

4. 中山太, 岩田倫太郎, 和田猛. siRNA の肝細胞
特異的デリバリーを指向したビタミン E 結合型
ネオマイシン誘導体の合成, 日本化学会第 92 春
季年会, 3.25, 2012, 慶応大学日吉キャンパス

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 和田猛, 額賀陽平. 中性条件下除去可能な 2' -
水酸基保護基を用いる RNA の製造法.

US61/600,095 東京大学, 2.19, 2012

2. 実用新案登録

3. その他

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

小比賀 聡¹⁾

¹⁾ 大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学

本研究グループ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、核酸医薬の薬物動態を評価するための技術構築を進めた。本研究では、大掛かりな装置を用いずに簡便にアンチセンス核酸を定量することが可能な ELISA 法を応用した定量法を構築した。本法の正確性を検証した結果、再現性、定量性に優れ、広い測定域を有する定量技術であることを見出した。また実際に、アンチセンス核酸を投与したマウスにおける肝臓内蓄積量を定量した結果、投与量と臓器内薬物蓄積量の間には正比例関係が存在することを見いだした。本法は、アンチセンス核酸の種々の組織への分布や長期的な蓄積量を正確に定量するツールとして利用できる。

A. 研究目的

核酸医薬は、難病や稀少疾患にも応用可能な創薬技術として期待されており、精力的に研究が進められてきた。核酸は他のバイオ医薬とは異なり、幅広い有機合成化学の技術が利用できる点で、核酸自身の構造を有機化学的に様々に改変することや、アンチセンス鎖に多様な機能を有する化合物をコンジュゲートすることが容易で、アンチセンス核酸を“高機能化”することが可能である。我々は、これまでに数多くの化学修飾型人工核酸を開発し、優れた機能性を発揮する架橋型人工核酸を見いだすことに成功している。一方で、核酸医薬の薬効をコントロールし、機能のさらなる補完のためには、薬物動態に関する情報を収集することが非常に重要である。しかしながら、これまで核酸の体内動態に関する情報やそれを評価する手段は殆どなかった。そこで、本研究では、核酸医薬の代表であるアンチセンス医薬の体内動態を正確に評価するための評価技術の構築を目指した。

アンチセンス核酸を定量するための技術としては例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (LC/MS-MS)、キャピラリー電気泳動 (CGE) を利用する方法が知られている。しかしながら、これらは非常に大掛かりな装置・設備が必要であり、高度な専門知識も要求される。それに関わらず、評価限界は決して高いとは言えない。また、PET 技術等のイメージング技術を利用する評価法は経時的変化に関する情報が視覚的にも定量的にも得られるため有用であるが、これらについても装置が大掛かりであることや放射性核種の半減期の問題で長期的な薬物動態を観察するのが困難であるなどの制限がある。

そこで本研究では、簡便にかつ広い測定範囲の定量が可能な ELISA 法に注目し、本法を応用した測定系の構築を試みた。ここでは本法が非常に高い再現性や真度を有しており、また実際にアンチセンス核酸の組織内蓄積量を迅速にかつ正確に定量評価することに成功したので報告する。

B.研究方法

1) ELISA 法における検量線の作成

材料

2',4'-BNA/LNA搭載型アンチセンス核酸と、それに相補的な3'位ビオチン化したDNA (5'-gaatagcgaggataatgtgctatgagccc-3') をtemplate DNA、5'位及び3'位をそれぞれリン酸化及びジゴキシゲニン化したDNA (5'-tcgctattc-3') をprobe DNAとした(表1)。これらの修飾DNAは日本バイオサービスから購入した。Reacti-Bind

NeutrAvidincoated polystyrene strip plates

(Thermo Fisher Scientific, Cat#436015) をサーモフィッシャーより購入した。TemplateDNAをバッファー (60 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 0.9 M NaCl, and 0.24% Tween 20) に溶解し、100nMとした。LigationProbeと1.5 units/wellのT4 DNA ligase (TaKaRa, Cat#2011A)をバッファー (66mM Tris-HCl (pH7.6), 6.6mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.1mM ATP) に溶解し、200nMに調製した。洗浄バッファー (25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.15 M, NaCl, 0.1% Tween 20) を準備した。抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ抗体 (Roche, Cat#1093274) を1:2000の割合で SuperBlock blocking buffer (Pierce, Cat#37515) を用いて希釈した。アルカリフォスファターゼの基質として250 μMのCDP-Star (Roche, Cat#1685627) を使用した。

方法

2mLチューブに凍結肝臓切片、1mLのPBS及びビーズ (φ = 5 mm, Irie) を添加し、TissueLyserIIを用いて2分間破碎した。総タンパク質量をBIO RAD DC Protein Assayを用いて定量し、一定量加えて検量線を128 pM から400 nMの範囲内で10点とった。

次に templateDNA 溶液 (100μL) 及び 10μL の検量線サンプル及び肝臓抽出液を 96well のマイクロプレートに加え、37°Cで1時間インキュベーションした。その後、200μLの洗浄バッファ

図 1 ELISA 系の原理の概略

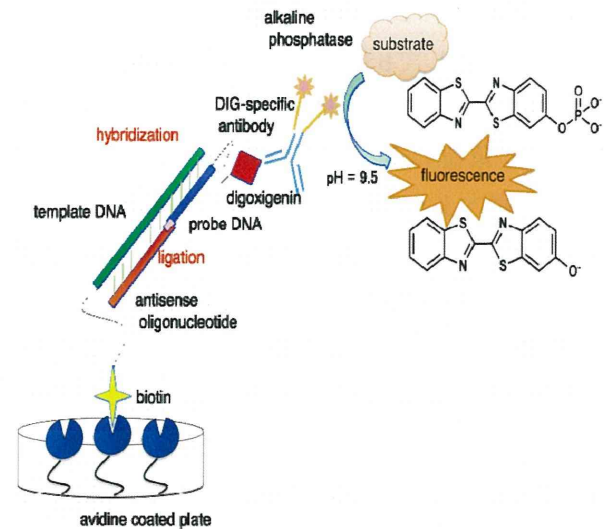


表 1 使用配列

Sequence ID	Sequence
antisense oligonucleotide	5'-GsgsgsCsTsCsastsasgscsas CsasTsTsasTsCsc-3'
template DNA	5'-gaatagcgaggataatgtgctatgagccc-3'
probe DNA	5'-tcgctattc-3'

大文字: 2',4' BNA/LNA 小文字: DNA
s: ホスホロデオアート

ーで3回洗浄した。続いて LigationProbe を100μL 加え、15°Cで3時間インキュベーションした。その後、200μLの洗浄バッファーで3回洗浄した。2さらに100μLの抗体ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ抗体を加え37°Cで1時間インキュベーションした。3回洗浄した後、100μLの CDP-Star 溶液を加え、1秒後に Centro XS3 luminometer (Berthold)を用いて発光強度を測定した(図1)。

2) ELISA 法の同時再現性の検証

アンチセンス核酸未処置の C57BL/6J マウスより摘出した肝臓の凍結切片を先と同様に破碎し、タンパク質濃度を測定した。段階希釈した濃度既知のアンチセンス核酸 (0.128~400 nM) を一定量のマウス肝臓ホモジネートに加え、本 ELISA 法を用いて、蛍光強度を測定した。各濃度のサンプルを複数 (n=8) 用いて測定を行い、その結果から真度と精度を求めた。

3) 投与量及び組織蓄積量の検討

被験動物として6週齢のマウスC57BL/6J (♂: 日本クレア) を各投与群で例数5匹となるように準備した。負荷の後、0日目に採血して、アンチセンスを静脈内より単回投与した (5-70mg/kg/回)。その後72時間後に絶食下に於いて尾静脈より採血を行なった。マウスを麻酔後、PBSで下大静脈より灌流し、肝臓を採取、PBSで洗浄した後、細切し、液体窒素で瞬間凍結した後、-80℃にて保存した。

凍結した肝臓の切片を1mLのTRIzol Regent (Invitrogen, Cat#15596018) 内でホモジナイズし、クロロホルム200μLを加えた後、13,200rpm、4℃にて15分間遠心した。上清220μLをイソプロパノール400μLに添加して転倒混和し、13,200rpm、4℃にて15分間遠心した後、イソプロパノールを除去した。次いで、75%エタノール800μLを加えた後、13,200rpm、4℃にて5分間遠心した。Total RNAを含む沈殿をRNAフリー水 (Water, DEPC treated, RNase tested; ナカライテスク) 80μLに溶解した。抽出したTotal RNAを分光光度計で定量し、RNAの存在を1%アガロースゲル電気泳動で確認した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat#4368813) を用いてTotal RNA10μgからcDNAを作製した。得られたcDNAをTaqMan® Gene Expression Master Mixを用いてリアルタイムPCRを行い、標的のmRNA量を定量した。

C. 研究結果

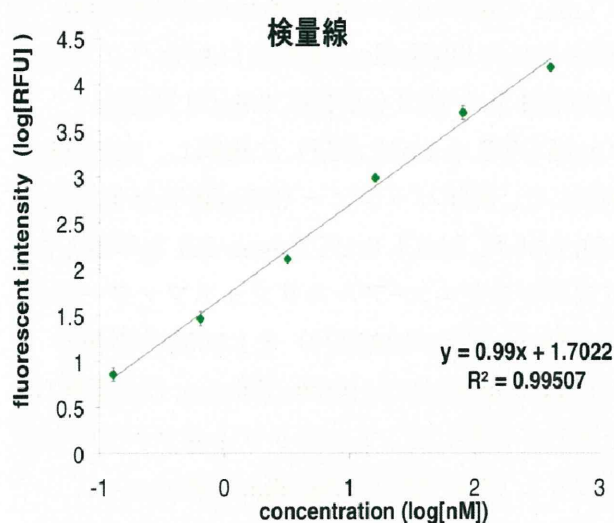
1) ELISA 法における検量線の作成

アンチセンス核酸の濃度と測定した蛍光強度をそれぞれ対数化し、得られた値から検量線を作成した (図 2)。広い濃度範囲において高い直線性を有する値を得た。

表 2 真度及び精度

理論値(nM)	400	80	16	3.2	0.64	0.128
実測濃度 (nM)	317.9	121.3	24.9	2.84	0.55	0.158
	298.1	109.2	26.6	3.05	0.64	0.092
	296.0	109.5	18.5	2.67	0.56	0.174
	310.9	90.8	23.6	2.22	0.61	0.181
	351.6	109.3	20.8	1.97	0.77	0.145
	318.2	95.0	18.6	1.55	0.40	0.148
	304.8	98.8	26.2	2.85	0.53	0.130
395.3	110.6	15.4	2.88	0.69	0.093	
平均値 (nM)	320.9	102.4	20.1	2.63	0.59	0.147
標準偏差 (nM)	22.2	9.1	2.8	0.44	0.09	0.016
真度 (%)	80.2	128.1	125.9	82.1	92.5	114.9
精度 (%)	6.9	8.9	14.1	16.8	14.8	11.1

図 2 検量線



2) ELISA 法の同時再現性の検証

上で得られた検量線より、各サンプルの実濃度を算出した。各サンプルの理論値と実測濃度の平均値及び標準偏差値より、真度及び精度を算出した (表 2)。定量範囲 0.128-400 nM において、真度: 80.2 - 128%、精度: 16.8%以下という非常に高い正確性を有する評価系であることが見いだされた。

3) 薬物投与量と組織蓄積量の比較

マウスに対してアンチセンス核酸を静脈内より単回投与 (5-70mg/kg/回) した場合の肝臓にお

ける蓄積量を評価した。ELISA 測定より得られた濃度データを肝臓の総タンパク質量でノーマライズし、肝臓タンパク質 1 μg 中のアンチセンス分子の量 (ng) の形で表現した。検討の結果、投与量に正比例して肝臓内に蓄積することが見いだされた (図 3)。この時、肝臓における蓄積量の飽和現象は認められなかった。

D. 考察

1) ELISA 法における検量線の作成

アンチセンス分子の濃度 (濃度域 0.128~400 nM) と測定した蛍光強度をそれぞれ対数化し、得られた検量線では、決定係数 $R^2 \geq 0.99$ という高い相関性が認められた。本手法は、0.128~400 nM の非常に広い濃度範囲で BNA 搭載型アンチセンス核酸を定量することが可能である。

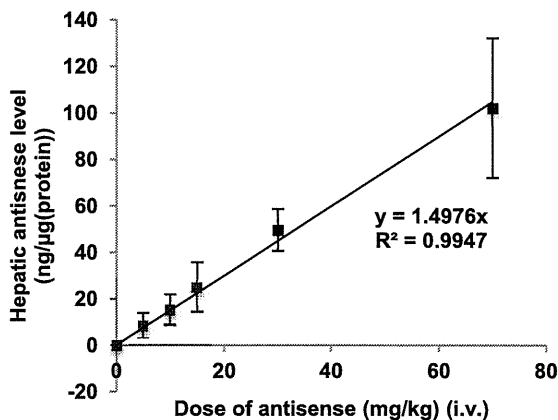


図 3 各投与量におけるアンチセンス核酸の肝蓄積量

2) ELISA 法の同時再現性の検証

Viswanathan らの報告 (C. T. Viswanathan *et al.*, *AAPS Journal*, 2007, 9, 30)によれば、分析測定法において検量線サンプルの真度が 80~120% (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの真度は 75~125%)、検量線サンプルの精度が 20%以下 (但し、測定可能濃度域の定量下限、定量上限の検量線サンプルの精度が

25%以下) であることが望ましいとしている¹⁾。

今回の結果では精度は上記基準を満たしている。真度についても、一部の濃度では基準を若干程度上回っているが、67% (6 個中 4 個)以上のサンプルが条件を満たしており、十分に正確性の高い測定系であることが言える。

3) 薬物投与量と組織蓄積量および薬効の比較

静脈内投与に伴い、肝臓にアンチセンス分子が投与量に正比例して増加していることを見いだした。本結果から、70 mg/kgの高用量でも肝臓への蓄積に飽和が無く、また1 mg/kgあたりの投与量に対して、0.65 μg が肝臓タンパク質1 g あたりに蓄積することを見出した。これは1mg/kgあたりの投与量に対して0.65 μg が肝臓1gあたりに蓄積する計算になり、投与量の約6%が72時間後にも肝臓に未変化体として残存していることになる。これほどまでに肝臓が効率よくアンチセンス分子を取り込み、長い半減期を示したのは、BNAの生体内での高い安定性のもとより、肝臓の豊富な血流量と類洞内の遅い血流速度、さらにその内部に広がるDisse腔などの広い内腔にタンパク質結合型及び非結合型アンチセンスが取り込まれ、細胞内への取り込みや代謝の機会を増加させるからであると考えられる。ホスホロチオアート化したアンチセンスは非特異的に様々なタンパク質と結合することが見出されており、中でも血清中の主なタンパク質であるアルブミンとは非常に親和性が高く、 α_2 マクログロブリン、 γ グロブリン、フィブリノゲンや α_1 酸性糖タンパク質ともアルブミン程ではないが相互作用することが知られている。また血液中のタンパク質のみならず細胞の表面や内部のタンパク質 (ラミン、フィブロネクチンなど) と相互作用することが見出されており、アンチセンスはまず血清中のタンパク質との結合し、その後細胞表面のタンパク質との結合を経て、細胞内のタンパク質へと移り、最終的に標的RNAと結合するような動態モデルが提案さ

れている。今後、本ELISA系を利用し、さらなる核酸医薬の体内動態の解明研究を進める。

E. 結論

本技術は、定量領域 3000 倍を越える広範囲において高い再現性を保ちながら簡便に、アンチセンス核酸を定量することが可能であることを証明した。本研究で例示したような肝臓における核酸の動態評価のみならず、本系は種々の組織、臓器に展開することが可能であり、非常に強力な解析ツールであると言える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Narukawa K, Sasaki K, Shibata M, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S. Cholesterol-Lowering Action of BNA-based Antisense Oligonucleotides Targeting PCSK9 in Atherogenic Diet-Induced Hypercholesterolemic Mice, *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, 2012, in press.
2. Mori K, Kodama T, Obika S. Design, Synthesis and Properties of Boat-shaped Glucopyranosyl Nucleic Acid, *Org. Lett.* 13: 6050-6053, 2011.
3. Shrestha A R, Hari Y, Yahara A, Osawa T, Obika S. Synthesis and Properties of a Bridged Nucleic Acid with a Perhydro-1,2-oxazin-3-one Ring, *J. Org. Chem.* 17: 7918-7926, 2011.

2. 学会発表

1. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Yasuhara H, Wada S, Narukawa K, Sasaki K, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S. Bridged nucleic acid-based antisense therapeutics targeting PCSK9 reduced serum LDL-cholesterol levels of mice fed a diet in high cholesterol. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012). 3.26-29, 2012. Sydney. Australia.
2. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Sasaki K, Yasuhara H, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S. Evaluation of Efficacies of BNA-modified Anti-PCSK9 Antisenses. The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. 11.9-11, 2011. Sapporo. Japan. (Outstanding Poster Presentation Award)
3. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Yasuhara H, Wada S, Narukawa K, Sasaki K, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S. Potency Comparison of Series of BNA-Based Antisenses in Dyslipidemic Animals, 7th Annual Meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society. 9.8, 2011. Copenhagen. Denmark.

H. 知的所有権の取得状況（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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの謝辞の有無
Kuwahara H, Yokota T, Mizusawa H.	Delivery of siRNA into the blood-brain barrier: recent advances and future perspective.	Ther Deliv	3	417-420	2012	無
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.	19	2213-2221	2011	無
Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T.	HDL facilitates in vivo delivery of α -tocopherol-conjugated siRNA to the brain.	Hum Gene Ther.	22	711-719	2011	無
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.	405	204-209	2011	有
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.	22	27-34	2011	無
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	有
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	有
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	有
Arai K, Uchiyama N, Wada T	Synthesis and properties of novel 2'-O-alkoxymethyl-modified nucleic acids	Bioorg Med Chem Lett	21	6285-6287	2011	無

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年	GRANT への謝辞 の有無
Iwata R, Sudo M, Nagafuji K, Wada T	Synthesis of Oligodiaminosaccharides Having α -Glycoside Bonds and Their Interactions with Oligonucleotide Duplexes	J Org Chem	76	5895-5906	2011	無
Uchiyama N, Ogata T, Oka N, Wada T	Trimethylsilyl Trifluoromethanesulfonate- promoted Reductive 2'-O- arylmethylation of Ribonucleoside Derivatives	Nucleos Nucleot Nucl Acids	30	446-456	2011	無
Yamamoto T, Harada-Shiba M, Nakatani M, Wada S, Yasuhara H, Narukawa K, Sasaki K, Shibata M, Torigoe H, Yamaoka T, Imanishi T, Obika S.	Cholesterol-lowering Action of BNA-based Antisense Oligonucleotides Targeting PCSK9 in Atherogenic Diet- induced Hypercholesterolemic Mice	Molecular Therapy- Nucleic Acids	1	in press	2012	無
Mori K, Kodama T, Obika S.	Design, Synthesis and Properties of Boat-shaped Glucopyranosyl Nucleic Acid	Org. Lett.	13	6050-6053	2011	無
Shrestha AR, Hari Y, Yahara A, Osawa T, Obika S.	Synthesis and Properties of a Bridged Nucleic Acid with a Perhydro-1,2-oxazin-3-one Ring	J. Org. Chem.	17	7918-7926	2011	無

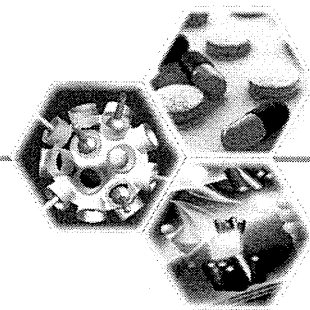
英文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年
Oka N, Wada T	Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms	Chem Soc Rev	40	5829-5843	2011

邦文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年
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	48	102-105	2012
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	238	542-546	2011
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. 中外医学社	Annual Review 2011神 経	-	42-52	2011
和田 猛	核酸医薬品に求められるもの	医薬ジャーナル	48	61-63	2012
和田 猛	リン原子修飾核酸の合成と医薬 への応用	医薬ジャーナル	48	71-76	2012

IV. 研究成果の刊行物、別刷



Delivery of siRNA into the blood–brain barrier: recent advances and future perspective

“Practically speaking, it may be easier to establish techniques to deliver siRNA into the blood–brain barrier rather than across it...”

Keywords: blood–brain barrier ■ brain capillary endothelial cell ■ neurological disease ■ siRNA delivery

The development of gene-silencing therapy for neurological diseases has placed great importance on the delivery of siRNA from the blood into the brain across the blood–brain barrier (BBB). Increasingly, gene-silencing therapy in the BBB itself is being considered because the BBB is associated with the pathophysiologies of many major diseases such as brain ischemia, multiple sclerosis and neurodegenerative disorders. Practically speaking, it may be easier to establish techniques to deliver siRNA into the BBB rather than across it, because there has been an accumulation of knowledge concerning the dynamic interactions between the blood circulation and brain capillary endothelial cells (BCECs), the chief components of the BBB. The purpose of this Editorial is to explain the recent advances in siRNA delivery into the BBB and to express some opinions on future research in this field.

The blood–brain barrier

The BBB is composed mainly of BCECs and has pericytes, astrocyte foot processes and nerve endings terminating at the capillary surfaces [1]. The BBB is a unique structure in the CNS that is both a physical barrier, resulting from the presence of endothelial tight junctions, and a transport barrier, resulting from selective membrane transporters and vesicular trafficking via BCECs [2]. It is generally considered that for compounds to cross the BBB they should have a molecular weight of less than 400 Da and be lipophilic [1].

The establishment of a technique to deliver siRNA across the BBB is expected to result in the development of gene-silencing therapies for a variety of neurological diseases; however, delivering siRNA across the BBB remains a challenge since siRNA molecules weigh more than

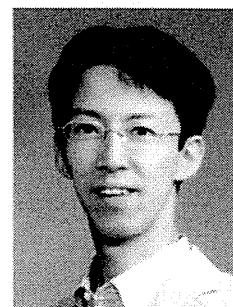
10,000 Da and are not lipophilic. So far, many technical developments have been reported such as the chemical modification of liposomal complexes with siRNA, the direct conjugation of siRNA to ligands for the BBB and the use of cell-penetrating peptides that can be noncovalently complexed or covalently linked to siRNA [3]. The precise mechanisms of these delivery strategies remain to be elucidated; therefore, most preclinical and clinical studies on the delivery of siRNA into the central nervous system have used the invasive techniques of intracerebral, intracerebroventricular or intrathecal injection into or near the targeted tissues [3]. To our knowledge, no trials have used intravascular injections to deliver siRNA across the BBB.

Pathophysiologies at the BBB

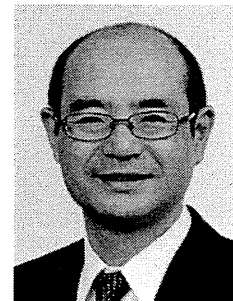
It is noteworthy that some major neurological diseases have pathophysiologies at the BBB itself, especially at BCECs, apart from those at neurons or glia [4,5]. BCECs express a range of molecules that can be targeted for silencing.

Inflammatory cell-adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1, and the selectins are responsible for secondary neuronal injury after reperfusion in brain ischemia [6]. The matrix-degrading metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-9, are involved in the process of neuroinflammation associated with the ischemic condition [7]. In an *in vitro* BBB model, silencing of MMP-9 by siRNA was reported to enhance BBB integrity [8].

Inflammatory cell-adhesion molecules are also related to the pathophysiologies of multiple sclerosis [9]. They help activated leukocytes cross the BBB and enter the brain, resulting in the initiation of immune-mediated demyelination [9]. The therapeutic concept of inhibiting



Hiroya Kuwahara
Department of Neurology &
Neurological Science, Graduate
School, Tokyo Medical & Dental
University



Takanori Yokota
Author of correspondence:
Department of Neurology &
Neurological Science, Graduate
School, Tokyo Medical & Dental
University, 1–5–45, Yushima,
Bunkyo-ku, Tokyo 113–8519, Japan
Tel.: +81 3 5803 5234
Fax: +81 3 5803 0169
E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp

Author affiliations continue
overleaf...

**FUTURE
SCIENCE**





Hidehiro Mizusawa
Department of Neurology &
Neurological Science, Graduate
School, Tokyo Medical & Dental
University

the adhesion of leukocytes to BCECs in multiple sclerosis is currently being employed in the clinical setting; natalizumab, a monoclonal antibody against very late antigen-4 in leukocytes, inhibits leukocytes from binding to VCAM-1 (the receptor of very late antigen-4) in BCECs [10].

In Alzheimer's disease, the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in BCECs mediates the transport of the neurotoxic amyloid- β peptide from the blood into the brain, leading to oxidative stress and neuroinflammation [11]. Expression of RAGE in BCECs is approximately 2.5-times higher in Alzheimer's disease patients than in age-matched controls, and inhibition of RAGE in BCECs may alleviate the disease pathology [12].

The diseases mentioned above have a high prevalence in most developed countries, and effective therapies remain to be established. As clinicians in neurology, we wish to emphasize that the BBB itself possesses great potential as an important target for gene-silencing therapy for these diseases.

Delivery of siRNA into the BBB

Few attempts of using the concept of gene-silencing at the BBB itself have been reported. We first reported the delivery of siRNA into BCECs via a hydrodynamic injection technique [13], and the same strategy was adopted in subsequent studies [14,15]. One possible delivery mechanism of this technique is that rapid loading of an extremely large volume of solution results in a considerable increase in hydrostatic pressure in the brain capillaries. Another possible explanation is that rapid injection of a large volume of solution prevents the solution from mixing with the serum containing RNase, thereby keeping the concentration of siRNA high in the brain capillaries. However, hydrodynamic injection cannot be used clinically because it can result in injury to various organs and tissues. There is, therefore, a need to develop an alternative strategy that is clinically feasible.

We recently reported the efficient delivery of siRNA into BCECs along with endogenous lipoprotein [16]. A cholesterol-conjugated siRNA was incorporated into extracted endogenous high-density lipoproteins and then intravenously injected into mice. Cholesterol-conjugated siRNA was not delivered into neurons or glia, but was successfully delivered into BCECs by receptor-mediated uptake. Because cholesterol is taken up into BCECs along with lipoproteins but generally does not pass through the BBB,

cholesterol conjugation might be an effective strategy to deliver siRNA into BCECs. To date, our report is the only one to have demonstrated a technique that enables siRNA to be delivered into BCECs and be used in a clinical setting, although improvements would need to be made before this could be done [16].

Future perspective

The biggest challenge for the efficient delivery of siRNA into BCECs is the enhancement of delivery through the reduction of tropism to the liver, secretion from the kidney and uptake into the reticuloendothelial system, such as the spleen, lymph node and bone marrow. In addition to optimizing the size, charge and lipophilicity of siRNA vectors, other possible improvements include modification of their surfaces, for example, by binding them to ligands that interact with the BCEC membrane proteins, or by coating them with polyethylene glycol to increase retention in the blood. Recently, Chen *et al.* succeeded in delivering an increased amount of a gene to BCECs by inserting polypeptides, selected from a phage library by *in vivo* panning, into the binding site of an adeno-associated virus vector to its receptor [17]. Increase in affinity to BCECs and decrease in distribution to other organs/tissues will be helpful in reducing the dosage and side effects of siRNA.

It is also important to investigate the therapeutic utility by using model animals for the neurological diseases mentioned above. Our previous reports regarding a hydrodynamic injection technique [13] and a lipoprotein vector [16] demonstrate only the proof-of-principle of siRNA delivery into BCECs by targeting organic anion transporter 3, which is exclusively expressed in BCECs in the brain and is not recognized as a pathological molecule in any neurological disease. If gene-silencing therapy in BCECs is actually demonstrated to be effective by *in vivo* delivery of siRNA in some disease models, research in this field is expected to be remarkably facilitated.

We believe that techniques to deliver siRNA into BCECs could be further developed into techniques to deliver siRNA into the brain across the BBB. Theoretically, delivery across the BBB can be achieved by using either the intercellular or intracellular route. At the BBB, there is a unique intercellular junctional complex without fenestrations that is formed from tight junctions, adherence junctions and basement membranes. Intercellular delivery across the BBB would

probably be accompanied by disruption of this junctional complex, leading to nonspecific entry of serum proteins and agents into the brain and subsequent toxicity for neurons and glia; this toxicity should be avoided.

Intracellular delivery across the BBB could result from the establishment of a method to deliver molecules into BCECs. Knowledge of the physiological transport mechanisms present at the BBB has increased remarkably [2]. A wide variety of transporters contribute to the selective influx into the brain of energy resources, amino acids, hormones and organic ions [2]. For example, glucose transporter-1, which is abundantly expressed in BCECs [18], contributes to the transport of D-glucose and vitamin C, and may work as a carrier of siRNA. Similarly, it might be possible to use amino acid transporters, monocarboxylic acid transporters or thyroid hormone transporters. However, there may be strict limitations on the structure of substrates, and it could therefore be difficult for siRNA to enter the brain via these transporters.

The unique endocytosis/transcytosis at the BBB involves a receptor-mediated mechanism (cargo such as transferrin, insulin and lipoprotein) and an adsorptive-mediated mechanism (cargo such as cationic proteins and cell-penetrating peptides) [2]. Utilization of these endocytosis/transcytosis systems may be an alternative strategy for the effective and safe delivery of macromolecules such as siRNA [19]. Short peptides derived from the rabies virus glycoprotein, which bind to the acetylcholine receptor, have been used to deliver siRNA across the BBB [20]. Other candidate ligands that can be used include

the low-density lipoprotein receptor (LDLR)-binding domain of apolipoprotein B (the ligand for LDLR) [21], Angiopep-2 (the ligand for LDLR-related protein-1) [22] or the nontoxic form of the diphtheria toxin receptor, CRM197 (the ligand for diphtheria toxin receptor) [23]. To achieve delivery across the BBB, it will be necessary for the cargo to stay in the endosome during intracellular trafficking. Even if the cargo can reach the abluminal membrane of BCECs, there remain at least two hurdles to overcome: the mechanism of detaching the cargo from the BCECs and the passage through the basement membrane. Accumulating knowledge of the biology of the BBB is expected to be helpful in the establishment of a method of delivering siRNA across the BBB.

In conclusion, the pursuit of delivering siRNA into the BBB to develop gene-silencing therapy for diseases involving BCECs is noteworthy. Research from this perspective might result in important knowledge for the development of techniques to deliver siRNA from the blood into the brain across the BBB.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (#2212070 and #2212148) and a grant from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (#20659138). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

- Pardridge WM. Blood–brain barrier genomics. *Stroke* 38(2), 686–690 (2007).
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37(1), 13–25 (2010).
- Mathupala SP. Delivery of small-interfering RNA (siRNA) to the brain. *Expert Opin. Ther. Pat.* 19(2), 137–140 (2009).
- Zlokovic BV. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57(2), 178–201 (2008).
- Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C *et al.* Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(3), 169–182 (2011).
- Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33(8), 2115–2122 (2002).
- Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood–brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol. Dis.* 38(3), 376–385 (2010).
- Bonoiu A, Mahajan SD, Ye L *et al.* MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier. *Brain Res.* 1282, 142–155 (2009).
- Simka M. Blood–brain barrier compromise with endothelial inflammation may lead to autoimmune loss of myelin during multiple sclerosis. *Curr. Neurovasc. Res.* 6(2), 132–139 (2009).
- Ransohoff RM. Natalizumab for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 356(25), 2622–2629 (2007).
- Yan SD, Chen X, Fu J *et al.* RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382(6593), 685–691 (1996).
- Deane R, Yan SD, Subramanian RK *et al.* RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood–brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9(7), 907–913 (2003).
- Hino T, Yokota T, Ito S *et al.* *In vivo* delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(1), 263–267 (2006).

- 14 Campbell M, Kiang AS, Kenna PF *et al.* RNAi-mediated reversible opening of the blood–brain barrier. *J. Gene. Med.* 10(8), 930–947 (2008).
- 15 Fuest C, Bankstahl M, Winter P, Helm M, Pekcec A, Potschka H. *In vivo* down-regulation of mouse brain capillary P-glycoprotein: a preliminary investigation. *Neurosci. Lett.* 464(1), 47–51 (2009).
- 16 Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K *et al.* Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Mol. Ther.* 19(12), 2213–2221 (2011).
- 17 Chen YH, Chang M, Davidson BL. Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nat. Med.* 15(10), 1215–1218 (2009).
- 18 Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y *et al.* Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* 117(2), 333–345 (2011).
- 19 Lichota J, Skjærtinge T, Thomsen LB, Moos T. Macromolecular drug transport into the brain using targeted therapy. *J. Neurochem.* 113(1), 1–13 (2010).
- 20 Kumar P, Wu H, McBride JL *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448(7149), 39–43 (2007).
- 21 Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood–brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(18), 7594–7599 (2007).
- 22 Demeule M, Currie JC, Bertrand Y *et al.* Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J. Neurochem.* 106(4), 1534–1544 (2008).
- 23 Gaillard PJ, de Boer AG. 2B-trans technology: targeted drug delivery across the blood–brain barrier. *Methods Mol. Biol.* 437, 161–175 (2008).

Efficient *In Vivo* Delivery of siRNA Into Brain Capillary Endothelial Cells Along With Endogenous Lipoprotein

Hiroya Kuwahara¹, Kazutaka Nishina¹, Kie Yoshida¹, Tomoko Nishina¹, Mariko Yamamoto¹, Yukari Saito¹, Wenying Piao¹, Masayuki Yoshida², Hidehiro Mizusawa¹ and Takanori Yokota¹

¹Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ²Department of Life Science and Medical Ethics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

The brain capillary endothelial cell (BCEC) is a major functional component of the blood–brain barrier and is an underlying factor in the pathophysiology of various diseases, including brain ischemia, multiple sclerosis, and neurodegenerative disorders. We examined gene silencing in BCECs by using endogenous lipoprotein to introduce short-interfering RNA (siRNA) *in vivo*. A cholesterol-conjugated 21/23-mer siRNA targeting organic anion transporter 3 (OAT3) mRNA (Chol-siOAT3) was intravenously injected into mice after its incorporation into extracted endogenous lipoproteins. Chol-siOAT3 was not delivered to neurons or glia, but was successfully delivered into BCECs and resulted in a significant reduction of OAT3 mRNA levels when injected after its incorporation into high-density lipoprotein (HDL). Efficient delivery was not achieved, however, when Chol-siOAT3 was injected without any lipoproteins, or after its incorporation into low-density lipoprotein (LDL). Investigations in apolipoprotein E (ApoE)-deficient and LDL receptor (LDLR)-deficient mice revealed that the uptake of HDL-containing Chol-siOAT3 was mainly mediated by ApoE and LDLR in mice. These findings indicate that siRNA can be delivered into BCECs *in vivo* by using endogenous lipoprotein, which could make this strategy useful as a new gene silencing therapy for diseases involving BCECs.

Received 3 February 2011; accepted 4 August 2011; advance online publication 13 September 2011. doi:10.1038/mt.2011.186

INTRODUCTION

The blood–brain barrier (BBB) is composed of brain capillary endothelial cells (BCECs) with pericytes, astrocyte foot processes, and nerve endings terminating on the capillary surface.¹ The BBB is a unique structure in the central nervous system that represents a physical barrier formed by endothelial tight junctions and a transport barrier resulting from selective membrane transporters and vesicular trafficking in the BCECs.²

BCECs are associated with the pathophysiology of various diseases, including brain ischemia, multiple sclerosis (MS), and

neurodegenerative disorders.³ *In vivo* gene silencing in BCECs can be a potentially useful approach for treating these above diseases because BCECs express different molecules that are considered to be important for the pathology of each disease. Inflammatory cell adhesion molecules, such as the intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and selectins, are potential target molecules for the treatment of brain ischemia and MS. This is because the adhesion of activated leukocytes to BCECs induces secondary neuronal injury after reperfusion^{4,5} and immune-mediated demyelination in MS.^{6,7} In Alzheimer's disease (AD), inhibition of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) can be expected to alleviate AD pathology, because RAGE expressed in BCECs mediates an influx transport of the neurotoxic amyloid- β peptide (A β) from the blood into the brain.^{8,9}

RNA interference is a powerful tool to achieve post-transcriptional gene silencing. Efficient *in vivo* delivery of synthetic short-interfering RNA (siRNA) is the biggest challenge for the therapeutic application of this tool.¹⁰ We first reported the delivery of siRNA into BCECs with a hydrodynamic injection technique,¹¹ and the same strategy was adopted in the subsequent reports.^{12,13} However, the hydrodynamic injection technique cannot be applied clinically because of the volume overload and extremely high hydrostatic pressure involved; therefore, there is a need to develop an alternate strategy that would be clinically feasible.

We hypothesized that the best *in vivo* carrier of siRNA into BCECs is the molecule that is taken up into BCECs but cannot pass through the BBB. Cholesterol meets these requirements: cholesterol is a major lipid of lipoproteins which can be endocytosed via lipoprotein receptors expressed in BCECs, but most cholesterol cannot enter the brain.¹⁴ Extracted endogenous lipoproteins have been reported to work as effective vectors for the delivery of siRNA to the liver by conjugation of cholesterol (Chol-siRNA).¹⁵ This report showed that although Chol-siRNA incorporated into high-density lipoprotein (HDL) or low-density lipoprotein (LDL) accumulated in the liver, kidney, adrenal gland, ovary, stomach, and intestine, it was not detected in the brain after intravenous injection.¹⁵ However, we suspect that it does not necessarily preclude the transport of Chol-siRNA into the BCECs, because the

Correspondence: Takanori Yokota, Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: tak-yokota.nuro@tmd.ac.jp