

201212004B

別添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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 川上 茂

平成 25 (2013) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
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-----	23
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	24

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発 研究事業）  
（総合）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、糖修飾リポソームによる細胞特異的・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。昨年度までに、肝類洞血管内皮細胞及び肝星（伊東）細胞を標的とした糖修飾リポソームの開発に成功した。最終年度となる本年度は、siRNA (gp-46) を搭載させたマンノース6リン酸 (M6P) 修飾リポソーム製剤のin-vivoでの評価を行った。まず、蛍光標識siRNA (gp-46)/M6P修飾リポソームをマウス尾静脈内投与し、肝臓を分離したところ、肝臓非実質細胞への集積が認められた。四塩化炭素投与による肝硬変モデルマウスにおいて、gp-46の有意なノックダウン効果が認められた。さら肝硬変マーカーとして肝臓内のgp-46,  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA), procollagen-1ならびに組織メタロプロテナーゼ阻害物質-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; TIMP-1) mRNAの有意な抑制効果が認められ、肝硬変治療へ応用できる可能性が示された。また、バブルリポプレックス製剤の医療応用を目的としたアニオン性ナノバブルリポポリプレックスの新規調製法の開発に成功した。

#### 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を別々に投与し、体外からの超音波 (ultrasound; US) 照射を行うことで、糖修飾リポソームの標的細胞でのキャビテーションエネルギーによる細胞穿孔に基づい

た細胞質内への遺伝子導入に基づく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、マンノース修飾バブルリポソームと超音波を用いた肝類洞血管内皮への送達法開発、2年目はマンノース6リン酸 (M6P) 修飾リポソームを用いた肝星（伊東）細胞を標的とし、かつ、標的細胞内へ高効率にsiRNAを送達させるためのDDSキャリア開発、3年目は肝硬変モデルマウスを用い、2年目までに開発したM6P修飾リポソームによるsiRNA送達に基づく肝硬変モデルマウスにおける治療効果の確認が目標である。

昨年度までに、肝類洞血管内皮細胞及び肝星（伊東）細胞を標的とした糖修飾リポソームの開発

に成功した。最終年度となる本年度は、siRNA (gp46) を搭載させたM6P修飾リポソーム製剤のin-vivoでの評価を行った。また、1年目の研究成果を発展させるため、超音波造影ガスを封入したバブルリポソームの脂質組成の最適化を行った。

まず、放射標識siRNA (gp46)/M6P修飾リポ

ソームをマウス尾静脈内投与し、肝臓を分離したところ、肝臓非実質細胞への集積が認められた。また、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 投与による肝硬変モデルマウスにおいて、gp-46の有意なノックダウン効果が認められた。さら肝硬変マーカーとして肝臓内のgp46, α-SMA, procollagen-1ならびにTIMP-1 mRNAの有意な抑制効果が認められた。また、新たに赤血球と相互作用しないアニオン性バブルリポソーム製剤の調製に成功した。

以上、M6P修飾リポソームが肝硬変モデルマウスにおいて肝星 (伊東) 細胞へ細胞選択的に移行し、siRNA複合体を用いることで肝硬変治療へ応用できる可能性が示された。また、安全な超音波応答性リポソーム製剤の調製法構築に成功した。

## B. 研究方法

### マンノース修飾バブルリポソーム (Man-PEG<sub>2,000</sub> bubble liposome) の調製 :

バブルリポソームの脂質組成としては、我々のプラスミドDNAを用いた以前の報告 (Biomaterials, 31 (30), 7813-7826 (2010)) を参考に、DSTAP: DSPC: Man-PEG<sub>2,000</sub>-DSPEをモル比で7:2:1の割合で混合したものを用い、リポソームを調製後、パーフルオロプロパンガスを封入した。未修飾バブルリポソーム (Bare-PEG<sub>2,000</sub> bubble liposome) を対照として評価した。

### 物理化学的性質の評価 :

電位、平均粒子径などの物理化学的性質は、ゼータサイザーナノ (マルバーン社製) により評価をおこなった。

### 急性肝炎モデルマウスの作製 :

LPS/D-ガラクトサミンの腹腔内投与によりLPS誘発性肝炎モデルマウスを作成した。

### siRNA (ICAM-1) :

siRNA (21 mer) はジーンデザイン社より購入し、配列の最適化検討を行った結果、最終的には、以下の配列を有するものを用いた。5'-GAA AGA UCA GGA UAU ACA

AdTdT-3' (センス鎖)、5' -UUG UAU AUC CUG AUC UUU CdTdT-3' (アンチセンス鎖)。対照のscramble siRNAとしては、以下のものを用いた。5'-GUA CUG UAC CAC UCU CAA AdTdT-3' (センス鎖)、5'-CUG UUC CGC AUU UUA AUU UdTdT-3' (アンチセンス鎖)。

### マウスにおけるsiRNA導入法 :

10 µg siRNA/マウス (C57BL/6系雄性マウス、17-19 g) の投与量で尾静脈より投与し、5分後にマウス腹腔側から直径20 mmのプロブを用いて超音波 (US) 照射 (frequency 1.045 MHz; duty 50%; burst rate 10 Hz; intensity 4.0 W/cm<sup>2</sup>; sonopore-4000 sonicator, ネッパジーン社製) を2分間行った。

### マウス肝臓内siRNA分布の評価 :

蛍光標識は、alexa-488を用い、本DDS製剤を投与1時間後にコラゲナーゼ灌流法により肝臓実質細胞と肝臓非実質細胞を分離し、さらに肝臓非実質細胞に関しては、磁気細胞分離法により肝類洞血管内皮細胞とKupffer細胞を分離した。

### マウス肝臓中ICAM-1発現の評価 :

肝臓中ICAM1発現の評価は、ELISA法と定量的PCR法により行った。

### 炎症性サイトカイン産生の評価 :

炎症性サイトカインとしては、血清TNF-α, IFN-γ, IL-6濃度をELISA法により評価した。

### 肝毒性の評価 :

肝毒性に関しては、血清ALT, AST濃度を測定した。また、肝組織切片を作成し顕微鏡での観察を行った。

### 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) (後述: Fig. 11) 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  $\mu\text{m}$ 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。

#### 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 $[^3\text{H}]$ 標識DSPCを用いて $[^3\text{H}]$ 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、 $2 \times 10^5$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{m}$ 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scrambled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scrambled 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scrambled 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 /<sup>3</sup>H]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<sup>3</sup>H]標識cholesterol hexadecyl ether (CHE) を用いて、<sup>3</sup>H] 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<sup>3</sup>H]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 $2 \times 10^5$  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 /<sup>3</sup>H]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:

$1 \times 10^7$  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 $1 \times 10^7$  cells播種し24時間培養後、PBSで細胞をwashし、リポプレックス含有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。

#### M6P修飾リポソームの調製:

siRNAとの複合体形成可能なカチオン性を有するM6P修飾コレステロール誘導体含有リポソームを作製するために、各種構成脂質を下記構成比率(図6)でクロロホルム中に溶解し、ナス型フラスコに分取後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去して脂質薄膜とし、減圧下で3時間以上乾燥した。これに5%グルコース溶液を加え、振盪機を用いた攪拌後、バス型

ソニケーターにより 10 分間超音波処理後、窒素置換下チップ型ソニケーターを用いた 3 分間の超音波処理を行い、0.45  $\mu\text{m}$  の孔径を有するポリカーボネート膜を用いて滅菌濾過を行った。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測定した。

その後、M6P 修飾リポソーム/siRNA (gp46) 複合体を形成するため、siRNA (gp46) と M6P 修飾コレステロール誘導体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調製した。M6P 修飾リポソーム/siRNA (gp46) 複合体の物理化学的性質としては、ゼータサイザーナノにより平均粒子径および電位を測定することで評価し、平成 23 年度 厚生労働省科学研究費補助金 医療機器開発推進 研究事業 総括研究報告書とほぼ同じ物理化学的性質であることを確認した。

#### 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導肝硬変モデルマウスの作製:

肝硬変モデルマウスの肝星 (伊東) 細胞では M6P 受容体が発現誘導されることが知られている。そこで、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 溶液 (2% in olive oil, 10 mL/kg) を C57BL/6 マウス腹腔内に週 2 回/4 週間頻回投与して四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスを作製した。

#### 肝臓内分布の評価:

肝硬変モデルマウスの肝星細胞においては M6P 受容体が発現誘導されることが知られているため、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 溶液 (2% in olive oil, 10 mL/kg) を C57BL/6 マウス腹腔内に週 2 回/4 週間頻回投与して四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導肝硬変モデルマウスを作製し、当該肝硬変モデルマウスに対して [<sup>3</sup>H] 標識リポソーム製剤を静脈内投与し、6 時間後に肝臓をコラゲナーゼ灌流により実質細胞 (PCs) 及び非実質細胞 (NPCs) に分画し、各画分の放射活性を細胞数で標準化して評価した。この際、リポソームの脂質組成としては、DSPC:Chol:M6P-Chol のモル比を 5 : 35 : 5 (M6P (5.0)-liposome), 5 : 25 : 15 (M6P

(15)-liposome), 5 : 0 : 40 (M6P (40)-liposome) とし、リポソームにおける M6P 修飾率の割合の評価を行った。

#### M6P 酸修飾コレステロール誘導体含有リポソーム/gp46 siRNA 複合体による四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスにおける gp46 発現抑制効果、並びに肝硬変治療効果の評価:

M6P 修飾リポソーム/gp46 siRNA 複合体を電荷比 1.0:3.1 (-:+) として作製した。リポソームの脂質組成としては、1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) :cholesterol (Chol) :M6P-Chol のモル比を 5 : 35 : 5 (M6P (5.0)-liposome), 5 : 30 : 10 (M6P (10)-liposome), 5 : 25 : 15 (M6P (15)-liposome), 5 : 20 : 20 (M6P (20)-liposome) とし、リポソームにおける M6P 修飾率の割合の評価を行った。M6P 修飾コレステロール誘導体含有リポソーム/gp46 siRNA 複合体 (50  $\mu\text{g}$ /マウス) を頻回静脈内投与 (週 2 回/3 週間、この間、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) は週 2 回腹腔内投与を継続) による、肝硬変モデルマウスにおける肝臓内 gp46 発現抑制効果をリアルタイム PCR 法ならびにウエスタンブロッティング法により評価した。

四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 誘導肝硬変における各種マーカーに及ぼす影響に関しては、肝硬変病態においてコラーゲン産生に関与する活性化肝星細胞のマーカー分子である  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA) は、肝繊維化・肝硬変に繋がるコラーゲンの前駆体であるプロコラーゲン-1 (procollagen-1)、肝硬変病態において発現誘導され、コラーゲン分解等に関与する組織メタロプロテアーゼの阻害因子である組織メタロプロテアーゼ阻害物質-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; TIMP-1) の肝臓中での mRNA 量をリアルタイム PCR 法により評価した。

#### アニオン性のナノバブルリポポリプレックスの新規調製法開発と評価:

カチオン性の高分子としてプロタミン硫酸やポリリジン、ポリアルギニンとポリリジン dendrimer を用いてポリプレックス

スを調製し、DSPG (1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]), polyethylene glycol (PEG)<sub>2,000</sub>-DSPCから構成されるアニオン性リポソームと3元複合体を調製し、その後、平成22年度総括報告書と同様の方法でパーフルオロプロパンガスを封入しナノバブルリポポリプレックスを調製した。その後、マウス赤血球との相互作用を評価した。

(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する。同様に、DNAを取り扱う実験を行う場合は同様に承認を受け、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

肝臓における炎症反応は様々な薬物、外科的処置や外部刺激に起因して誘導されることが報告されているが、惹起される炎症反応の重症性、持続期間、並びにその誘導機構は多岐に渡る。そこで本節では、炎症反応のモデル薬物としてリポポリサッカライド(LPS)を腹腔内投与して作製した急性肝炎モデルに対し、マンノース修飾バブルリポソームと超音波 (US) 照射の併用によってマンノース受容体発現細胞である肝血管内皮細胞に ICAM-1 siRNA を送達による抗炎症効果の評価を行った。

### 2010 1-a ICAM-1 に対する siRNA 配列の最適化

siRNA を用いた疾患治療においては、標的遺伝子の発現抑制効率の増強のみならず、off-target 効果の有無を確認する上でも、siRNA 配列の最適化が重要である。そこで本研究では、100 ng/mL LPS 処置を施したマウス肝血管内皮細胞初代培養系を用いて、3種類配列の ICAM-1 siRNA 並びに scrambled siRNA (Fig. 1A) による ICAM-1 の発現抑制効果を定量的 PCR 法により検討した。

LPS 処置の 24 時間前に静電的相互作用を介した高効率なトランスフェクション可能な汎用試薬である Lipofectamine® 2000 の推奨プロトコルに従い各 siRNA をトランスフェクションし検討した。

その結果、Fig. 1B に示すように 3 種類の ICAM-1 siRNA 全てにおいて顕著な *icam-1* mRNA の発現抑制が認められ、特に sequence 1 の siRNA において最も高い *icam-1* mRNA 発現抑制効果が認められた。一方、本研究において選択した scrambled siRNA において、*icam-1* mRNA の発現抑制効果は認められなかったことから (Fig. 1B)、off-target 効果による ICAM-1 発現抑制ではなく、配列特異的な遺伝子ノックダウン効果であることが示唆された。

以上、本研究においては sequence 1 の siRNA 並びに上記 scrambled siRNA を用いて以下の検討を行った。

A

sequence 1	sense: GAAAGAU CAGGAUUA CAA dTdT antisense: UUGUAUAUCCUGAUCUUUC dTdT
sequence 2	sense: CAGAGAAAGALICAGGAUUA dTdT antisense: AUAUCCUGAUCUUUCUCUC dTdT
sequence 3	sense: GUACUGUACCACUCUCAA dTdT antisense: UULUGAGAGUGGUACAGUAC dTdT
scrambled	sense: AAAUUAAAUGCGGAA CAG dTdT antisense: CUGUJCCGCAUUULAAUUL dTdT

B

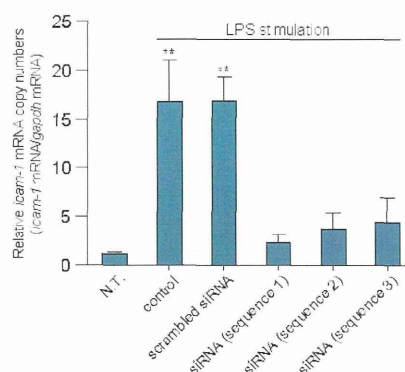


Fig. 1 ICAM-1に対するsiRNA配列デザイン (A)とLPSで刺激したマウス肝類洞血管内皮細胞初代培養系における*icam-1* mRNAの発現抑制効果 (B)

### 2010 1-b 初代培養マウス肝血管内皮細胞における ICAM-1 発現抑制効果

まず in-vitro において、LPS 処置により ICAM-1 発現を誘導させた初代培養マウス肝血管内皮細胞に対し、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による ICAM-1 発現抑制効率を検討した。ICAM-1 siRNA を用いて超音波応答性リポソーム複合体を作製した。

その結果、パーフルオロプロパンの封入に伴い溶液の白濁が認められ、リポソーム複合体内への超音波造影ガスの封入が確認された。また、ICAM-1 siRNA を用いて作製した各種リポソーム複合体の物理化学的特性を粒子径並びに表面電荷測定は、未修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体及びマンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体の粒子径及び表面電荷はそれぞれ  $106.3 \pm 5.9$  nm、 $47.2 \pm 4.2$  mV 及び  $108.0 \pm 6.2$  nm、 $49.7 \pm 6.2$  mV であった。また、未修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体及びマンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体の粒子径及び表面電荷はそれぞれ  $545 \pm 29$  nm、 $49.8 \pm 7.8$  mV 及び  $547 \pm 16$  nm、

47.0 ± 3.8 mV であった。これらの複合体の物理化学的性質の値は、以前の pDNA 複合体における知見と良く一致するものである。

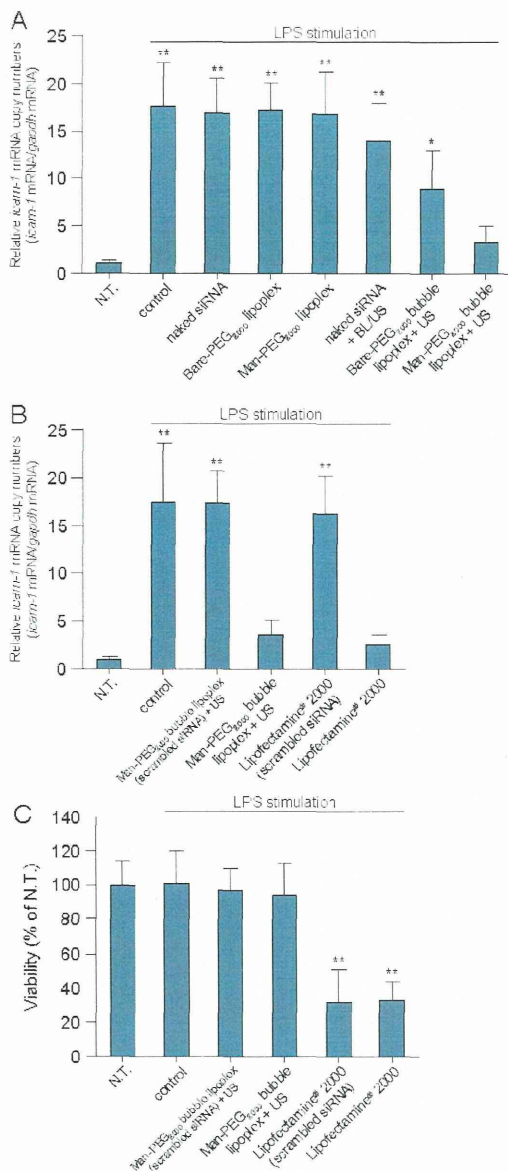


Fig. 2 マウス肝血管内皮細胞初代培養系 *icam-1* mRNA発現の遺伝子ノックダウン効果に及ぼす各種製剤の影響 (A, B) と細胞毒性 (C)

次に、LPS 処置の 24 時間前に各核酸導入法を用いて ICAM-1 siRNA を初代培養マウス肝血管内皮細胞に送達した結果、マウス肝血管内皮細胞における *icam-1* mRNA 発現は、マンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体の単独添加時や naked ICAM-1 siRNA とバブルリポソーム/超音

波(US)照射を併用する従来のソノポレーション法、未修飾バブルリポソームと超音波(US)照射の併用による ICAM-1 siRNA 送達時と比較して、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達により最も顕著に抑制されることが示された(Fig. 2A)。本結果は、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射の併用による ICAM-1 siRNA 送達においても、超音波応答性リポソーム/siRNA 複合体化、並びにマンノース修飾による標的細胞との相互作用に増大に伴い、標的細胞内核酸導入効率の増強が得られることを示唆している。また、これらの結果は scrambled siRNA では認められず、本方法による *icam-1* mRNA 発現抑制効果は ICAM-1 siRNA に起因することも確認できた。さらにマンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体と超音波(US)照射による ICAM-1 siRNA 送達に伴う *icam-1* mRNA 発現抑制効果は、核酸導入試薬として汎用される Lipofectamine® 2000 に匹敵した(Fig. 2B)、一方、核酸導入に伴う細胞毒性は、高効率なトランスフェクション可能な汎用試薬である Lipofectamine® 2000 において有意に認められたが、マンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体と超音波(US)照射による送達法ではほとんど認められなかった (Fig. 2C)。

### 2010 1-c ICAM-1 siRNA の肝臓内分布特性

LPS誘導急性肝炎モデルにおいて、炎症反応発生初期には肝臓の血管内皮細胞上にICAM-1が発現誘導され、好中球の血管内皮細胞との接着、回転、並びに組織内浸潤等に関与する。従って、in-vivoにおいて肝血管内皮細胞選択的なICAM-1 siRNA送達を達成することが、ICAM-1発現抑制に基づく抗炎症治療のために不可欠であるので、次にマンノース修飾バブルリポソームと超音波照射によるsiRNA送達後のICAM-1 siRNAの肝臓内分布特性を検討した。マンノース修飾バブルリポソ

ーム/siRNA複合体と超音波(US)照射併用によりAlexa-488標識ICAM-1 siRNAを送達し、1時間後にコラゲナーゼ灌流により肝臓を実質細胞と非実質細胞に分画した。さらに肝非実質細胞をマイクロビーズ標識抗マウスF4/80抗体並びにCD146(LSEC)抗体を用いた磁気細胞分離法によりKupffer細胞と肝血管内皮細胞に分画し、それぞれの画分におけるAlexa-488由来の蛍光強度を測定した。

その結果、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用したICAM-1 siRNA送達により、マンノース受容体発現細胞であるKupffer細胞と肝血管内皮細胞において得られるICAM-1

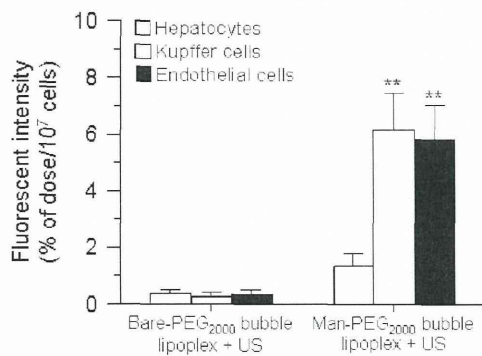


Fig. 3 マウスへ各種製剤を静脈内投与し、超音波照射後の肝臓内細胞分布

siRNA移行量は、マンノース受容体非発現細胞である肝実質細胞と比較して顕著に高いことが明らかとなった (Fig. 3)。一方、未修飾バブルリポソームと超音波(US)照射の併用によるICAM-1 siRNA送達では、マンノース受容体発現の有無によるICAM-1 siRNA移行量の差異は認められず、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を用いた方法では、ICAM-1発現抑制に基づく抗炎症療法の標的細胞となる肝血管内皮細胞に対する効率的なICAM-1 siRNA送達が可能であることが示された。

#### 2010 1-d 肝臓における ICAM-1 発現抑制効果

次に、LPS/D-ガラクトサミン腹腔内投

与に伴う炎症反応の惹起により ICAM-1発現を誘導させたマウスに対し、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用して ICAM-1 siRNA を送達することによる ICAM-1 発現抑制効果を評価した。各核酸導入法を用いてマウスに対し ICAM-1 siRNA を送達した 24 時間後に LPS/D-ガラクトサミンを腹腔内投与し、その 3 時間後に肝血管内皮細胞を単離して細胞内 *icam-1* mRNA、並びに細胞膜上における ICAM-1 発現量を評価した。

その結果、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達により肝血管内皮細胞

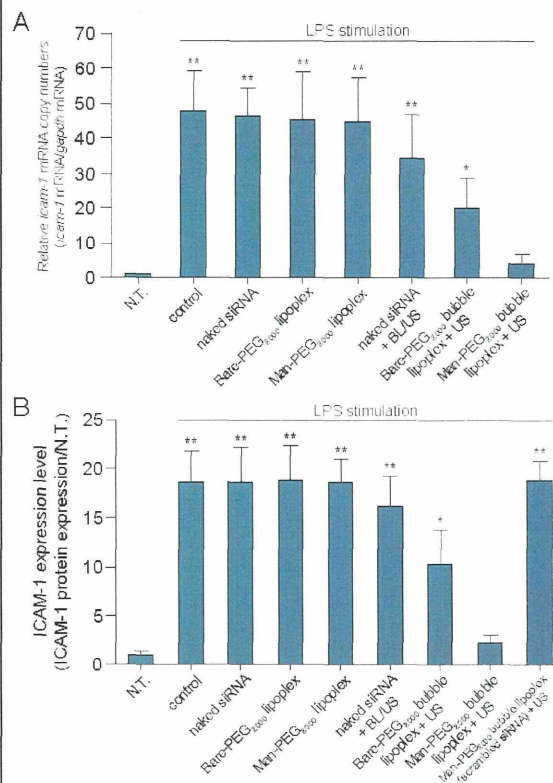


Fig. 4 LPS誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の肝臓類洞血管内皮細胞におけるICAM-1 mRNA (A) およびICAM-1 タンパク質発現の評価 (B)

胞において得られる *icam-1* mRNA 発現量は、マンノース修飾リポソーム/siRNA 複合体、naked ICAM-1 siRNA とバブルリポソームを併用する従来のソノポレーション法、未修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体と超音波(US)照射併用による ICAM-1

siRNA 送達時と比較して顕著に低いことが示された (Fig. 4A)。また細胞膜上の ICAM-1 タンパク質発現についても ELISA 法により評価した結果、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射により ICAM-1 siRNA を送達することで、最も高い ICAM-1 発現抑制効果が得られた(Figs. 4B)。また、同様の結果は、ウエスタンブロッティング法でも確認された (data not shown)。一方、これらの結果は scrambled siRNA では認められず、本方法による *icam-1* mRNA 及び ICAM-1 発現抑制効果は ICAM-1 siRNA に起因することも確認された。従って、マンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体と超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達法によって、LPS 誘導急性肝炎モデルにおける ICAM-1 発現誘導を効率的に抑制可能であり、LPS 刺激に起因する炎症反応を抑制できる可能性が示唆された。

#### 2010 1-e 組織内への好中球浸潤、並びに炎症性サイトカイン産生抑制効果

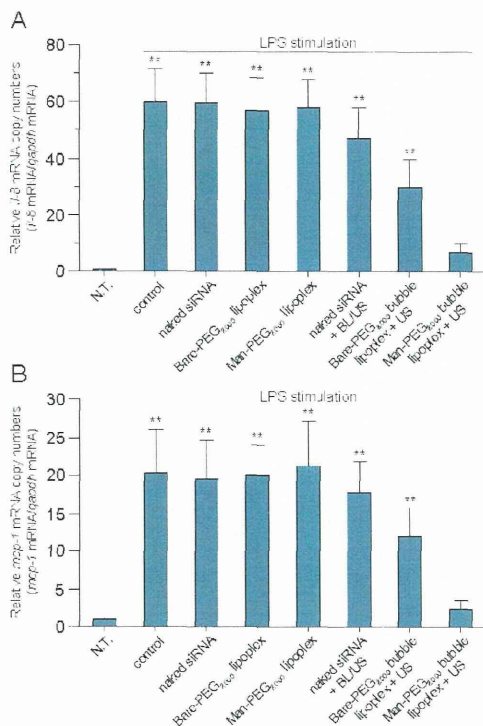


Fig. 5 LPS誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の肝臓における *il8* mRNA (A) および *mcp-1* mRNAの評価 (B)

LPS 誘導急性肝炎の発生初期においては、肝血管内皮細胞上に ICAM-1 が発現し、それに伴い好中球等の組織内浸潤が惹起され、その後浸潤した好中球等より好中球及び単球走化性因子の分泌、並びに炎症性サイトカイン産生が誘導される。そこでマンノース修飾バブルリポソーム/siRNA 複合体と超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA による ICAM-1 発現抑制に伴う、LPS/D-ガラクトサミン誘導急性肝炎モデルマウスにおける好中球の組織内浸潤抑制効果を評価した。ICAM-1 siRNA 送達24時間後に LPS/D-ガラクトサミンを腹腔内投与し、その6時間後に肝臓における好中球走化性因子 *il-8* mRNA 並びに単球走化性因子 *mcp-1* mRNA を評価した。

その結果、他の核酸送達法と比較し、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達によって、肝臓中 *il-8* 及び *mcp-1* mRNA 発現量が最も効率的に抑制されることが明らかとなった(Fig. 5)。また naphthol AS-D chloroacetate 法により組織内に浸潤した好中球の染色後に顕微鏡観察した結果、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用して ICAM-1 siRNA を送達したマウス肝臓において、好中球浸潤の程度が最も低いことも示された

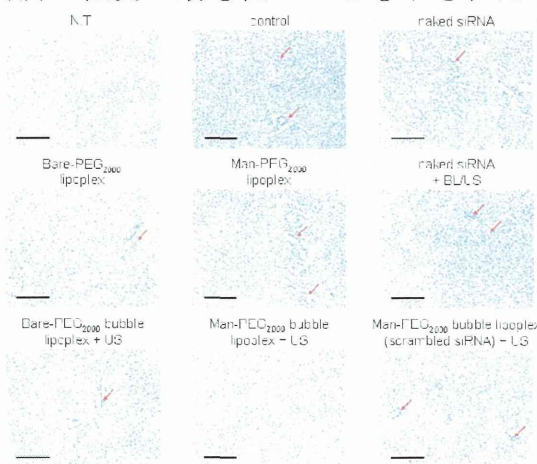


Fig. 6 LPS誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の肝臓における好中球浸潤の評価

(Fig. 6)。

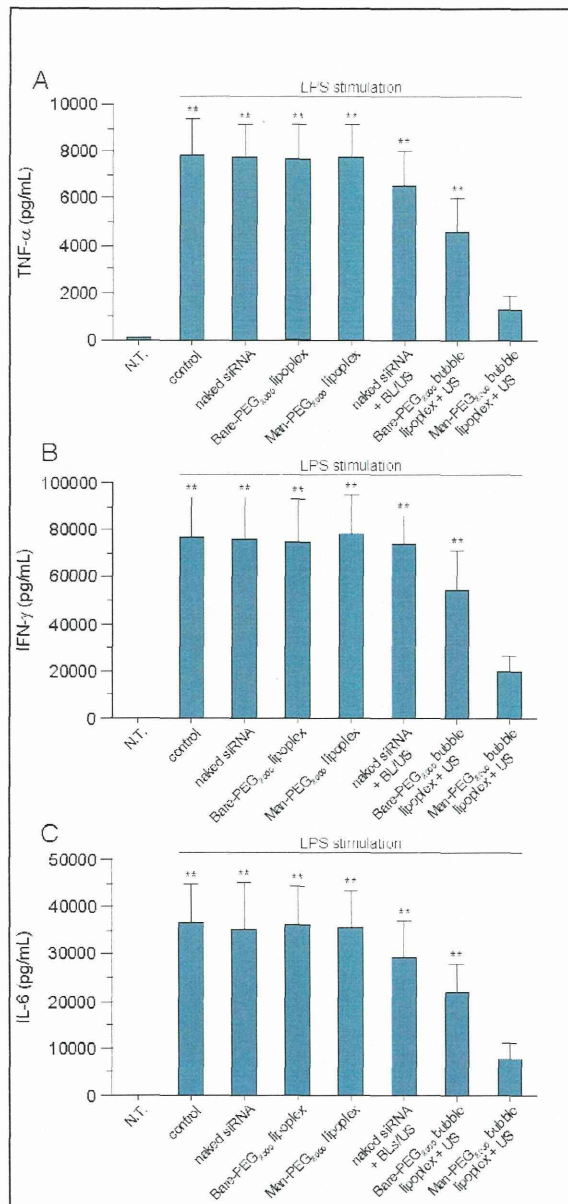


Fig. 7 LPS誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の血清におけるTNF $\alpha$  (A), IFN $\gamma$  (B), IL-6 (C) 濃度の評価

次に、マンノース修飾バブルリポソーム/と超音波(US)照射を用いた ICAM-1 siRNA による ICAM-1 発現抑制に伴う血清中炎症性サイトカイン分泌量を評価した。ICAM-1 siRNA 送達 24 時間後に LPS/D-ガラクトサミンを腹腔内投与し、その 12 時間後の血清中炎症性サイトカイン量を評価した結果、血清中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及び IL-6 濃度はマンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用して ICAM-1 siRNA を送達することで最も効

率的に抑制されることが明らかとなった (Fig. 7)。さらにマンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達に伴い得られるこれらの結果は、scrambled siRNA ではいずれも認められなかった(data not shown)。従って、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による ICAM-1 発現抑制に伴い、LPS 誘導急性肝炎モデルマウスにおける炎症反応の惹起に参与する好中球の組織内浸潤、並びに炎症性サイトカイン産生が顕著に抑制されることが示された。

### 2010 1-f 肝毒性評価

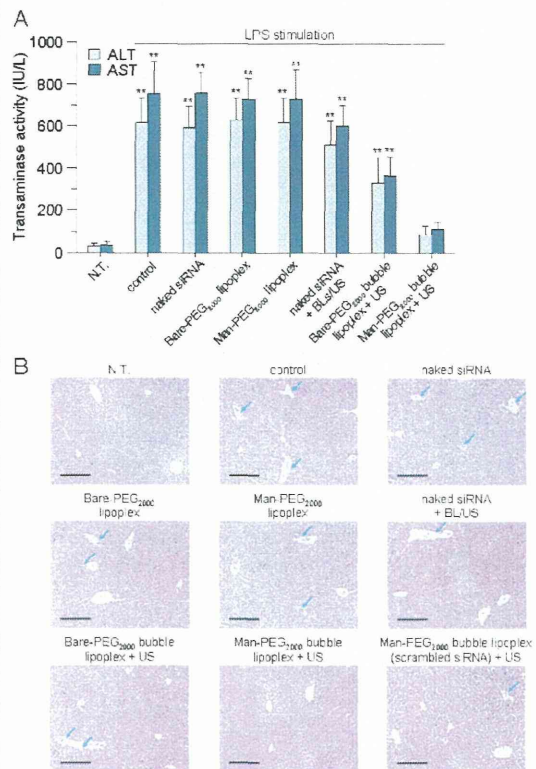


Fig. 8 LPS誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の血清におけるALT, AST活性(A)と肝臓組織切片観察(B)の評価

さらにマンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による ICAM-1 発現抑制に伴う LPS 誘導急性肝炎の抑制効果を、血清中トランスアミナーゼ活性並びに Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色に基づく組

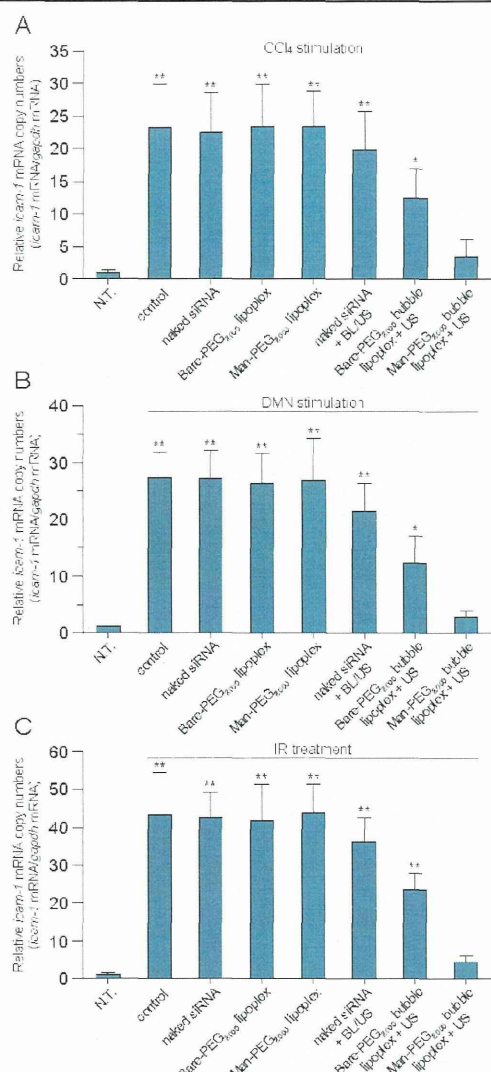


Fig. 9 CCl<sub>4</sub> (A), DMN (B), IR(C) 誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の肝臓類洞血管内皮細胞におけるicam-1 mRNAの評価

織学的評価により検討した。まずマンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達に伴い、LPS/D-ガラクトサミン誘導急性肝炎モデルマウスに対して得られる血清中トランスアミナーゼ活性の抑制効果を検討するために、ICAM-1 siRNA 送達 24 時間後に LPS/D-ガラクトサミンを腹腔内投与し、その 24 時間後の血清中 ALT, AST 活性を測定した。その結果、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用して ICAM-1 siRNA を送達したマウスにおいて、血清中 ALT, AST 活性が最も顕著に抑制されることが示された(Fig. 8A)。また肝臓の H&E 染色後に顕微鏡観察した結

果、LPS 誘導急性肝炎モデルマウスの肝臓においては肝血管構造の変化、特に肝血管内皮細胞構造の崩壊が認められた一方、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射により ICAM-1 siRNA を送達したマウス肝臓では上記のような構造変化は観察されず、未処置のマウス肝臓と同様の H&E 染色像が観察された(Fig. 8B)。以上の知見より、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達では、肝血管内皮細胞における効率的な ICAM-1 発現抑制に伴う好中球の組織内浸潤、並びに炎症性サイトカイン産生の抑制に基づき、LPS 刺激に起因する炎症反応を効果的に抑制できることが示唆された。

ここまでマンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を使用した ICAM-1 siRNA 送達によって、炎症反応のモデル薬物として汎用される LPS に起因した急性肝炎モデルに対して高い抗炎症効果が得られることを明らかにした。しかしながら、臨床においては様々な薬物のみならず外科的処置等によっても炎症反応が誘導されるため、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による抗炎症療法の臨床応用可能性を検討するためには、多種多様な炎症モデルに対して有効であることを示す必要がある。そこで、四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)、ジメチルニトロソアミン(DMN)誘導急性肝炎、並びに虚血再灌流(ischemia-reperfusion; IR)性肝傷害モデルマウスにおいても、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による抗炎症効果の評価を行った。

## 2010 2-a 各種炎症反応に伴う ICAM-1 発現の抑制効果

まず、各種炎症反応に伴い ICAM-1 が発現誘導されたマウスに対し、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を併用して ICAM-1 siRNA を送達する

ことによるICAM-1発現抑制効果を検討した。各核酸導入法を用いてマウスに対しICAM-1 siRNAを送達した 24 時間後にCCl<sub>4</sub>、DMN投与並びにIR処置を行い、その 6 時間後に肝血管内皮細胞を単離して細胞内*icam-1* mRNA発現量を評価した結果、いずれの急性肝炎・肝傷害モデルマウスにおいても、肝血管内皮細胞内*icam-1* mRNA発現は、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用してICAM-1 siRNAを送達により、最も効果的に抑制された(Fig. 9)。またマンノ-

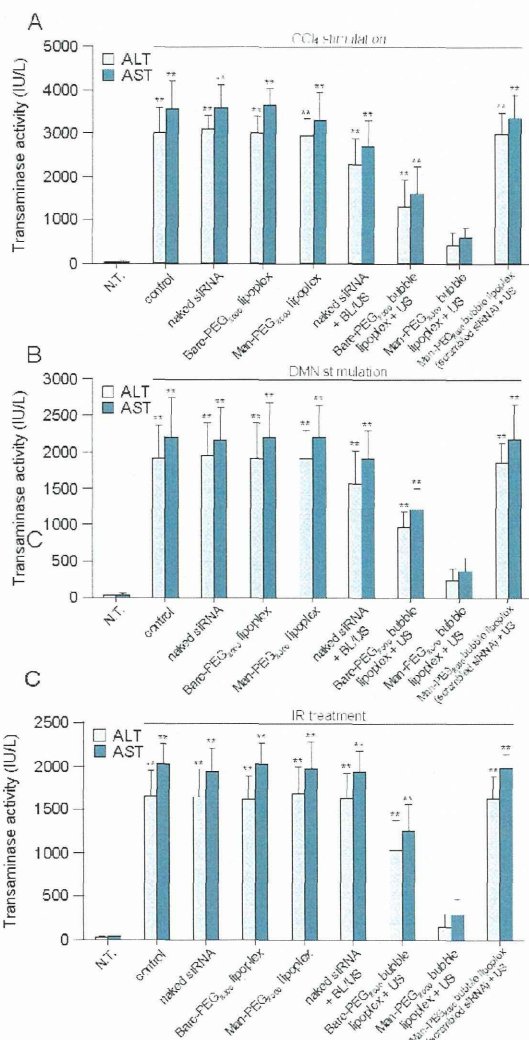


Fig. 10 CCl<sub>4</sub> (A), DMN (B), IR(C) 誘発性肝炎モデルマウスへ各種製剤を静脈内投与、超音波照射後の血清中ALT, AST活性の評価

ス修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用してICAM-1 siRNA送達によって得られた本結果は、scrambled siRNAで

は認められなかった (data not shown)。従って、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用したICAM-1 siRNA送達によるICAM-1発現抑制効果は、LPS誘導肝炎のみならず様々な急性肝炎及び肝傷害に対しても認められることが示唆された。

## 2010 2-b 肝毒性評価

さらに、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用したICAM-1 siRNA送達によるICAM-1発現抑制に伴う各種急性肝炎・肝傷害モデルマウスにおける炎症反応抑制効果を、血清中トランスアミナーゼ活性測定により評価した。様々な核酸導入法を用いたICAM-1 siRNA送達 24 時間後にCCl<sub>4</sub>、DMN投与並びにIR処置を行い、その 24 時間後の血清中ALT, AST活性を測定した。

その結果、いずれの急性肝炎・肝傷害モデルマウスにおいても、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達により血清中ALT/AST 活性が最も顕著に抑制された(Fig. 10)。以上の知見より、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用した ICAM-1 siRNA 送達による急性炎症反応抑制効果は、LPS 誘導急性肝炎のみならず様々な急性肝炎及び肝傷害に対しても認められることが示された。

## 2010 考察

本章では、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用した遺伝子導入法をsiRNA送達に応用し、肝血管内皮細胞内にICAM-1 siRNAを効率的に送達することによる、各種炎症反応に対する抗炎症効果を評価した。

Off-target 効果、並びに TLR-3/7/8 と siRNA の相互作用に基づく炎症反応は、siRNA 活性を評価する上で排除されるべき現象であり、かつ siRNA 医薬の臨床応用に向けて克服すべき問題である。本研究では、3 種類の ICAM-1 siRNA 並びに

scrambled siRNAについてICAM-1の発現抑制効果を検討した結果 (Fig. 1A)、scrambled siRNAを除く全てのICAM-1 siRNAにおいて高いICAM-1発現抑制効果、並びに炎症反応の抑制効果が認められ(Fig. 1B)、off-target効果によるICAM-1発現抑制の可能性が極めて低いことを、治療効果の検討に先立ち確認した。またIFN- $\gamma$ 産生等の炎症反応は、エンドソーム内でのTLR-3/7/8との相互作用により惹起されるが、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を使用したsiRNA送達では、製剤への超音波照射に伴う細胞穿孔によって細胞質内にsiRNAが直接導入されるため、本方法においてはTLR分子種との相互作用に伴う炎症反応の惹起を考慮する必要がないと考えられる。一方、siRNAは細胞質内に存在するRIG-1等にも認識され炎症反応を誘発すると考えられるので、本研究においては、RIG-1経路の下流に存在する転写因子IRF3/7の活性化を抑制できることが報告されている3'末端へのオーバーハング配列(dTdT)をsiRNAに付与することでその影響を抑えることとした。このように、本方法では超音波照射に伴う超音波(US)応答性リポプレックスの崩壊に伴う細胞膜上に一過性に生じる小孔を介してsiRNAが細胞質内に直接導入され、従来のリポフェクション法によるsiRNA送達において障壁とされていたエンドソーム脱出効率の低さやエンドソーム内での分解等を考慮する必要がなく、siRNAが直接送達される細胞質内はsiRNAの機能発現部位であるため、本方法は高効率かつ細胞選択的なsiRNA送達法として優れた特性を有する。

マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用したICAM-1 siRNA送達では、ICAM-1発現を惹起するLPS処置を施した初代培養マウス肝血管内皮細胞において、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用したICAM-1 siRNA送達により、他の方法を用いてICAM-1 siRNAを送達した場合と比較して、細胞内*icam-1* mRNA発現が最も抑制されることが明らかとなった (Fig. 4)。ま

たin-vivoにおいても、ICAM-1発現が惹起されるLPS誘導急性肝炎モデルマウスにおいて、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射を利用したICAM-1 siRNA送達後のマウス肝血管内皮細胞におけるICAM-1発現抑制効率を評価した結果、細胞内*icam-1* mRNA発現量、並びに細胞膜上のICAM-1発現量共に最も顕著に抑制されることが明らかとなった (Fig. 4)。さらに本方法を用いたICAM-1 siRNA送達によるICAM-1発現抑制に伴い、好中球の組織内浸潤、並びに炎症性サイトカイン産生を抑制でき(Figs. 5-7)、その結果LPS誘導急性肝炎モデルマウスの炎症反応を顕著に抑制できることが明らかとなった(Fig. 8)。マンノース修飾バブルリポソーム/siRNA複合体と超音波照射を用いた方法では、以前のpDNA複合体送達における我々の知見と同様、標的細胞となる肝臓及び脾臓のマンノース受容体発現細胞への選択的かつ高効率なsiRNA送達により、ICAM-1発現抑制に基づく抗炎症療法の標的細胞となる肝血管内皮細胞に対する効率的なICAM-1 siRNA送達が可能であると考えている。実際、本研究で用いたsiRNA量は10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  (0.5 mg/kg)であり、少量の投与により治療効果を得ることができた。これは、本DDS製剤による高効率かつ細胞選択的なsiRNA送達性を強く支持するものである。

一方、LPSは急性炎症反応を惹起するためのモデル薬物として汎用されるが、臨床においては様々な薬物のみならず外科的処置や物理刺激等によっても炎症反応が誘導される。従って、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用したICAM-1 siRNA送達による抗炎症療法の臨床応用の可否を検討するためには、多種多様な炎症モデルに対する効果を評価する必要がある。そこで、CCl<sub>4</sub>、DMN誘導急性炎症、並びにIR性肝傷害に対する抗炎症効果を評価した。その結果、いずれの急性肝炎・肝傷害モデルマウスにおいても、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用して



ICAM-1 siRNAを送達することで、高い肝血管内皮細胞内*icam-1* mRNA発現抑制効果を示し(Fig. 9)、それに伴い各種急性肝炎モデルマウスの炎症反応を顕著に抑制できることが明らかとなった(Fig. 10)。

LPS、CCl<sub>4</sub>及びDMN投与並びにIR処置に伴う炎症反応の詳細な発生機序は異なるが、炎症反応発生過程における肝血管内皮細胞上へのICAM-1発現誘導は本研究において使用した薬物やIR処置のみならず、様々な刺激誘導性炎症反応においても報告されている。従って、マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射を利用したICAM-1 siRNA送達による抗炎症治療では、様々な急性肝炎及び肝傷害に対して高い効果が期待できると考えられる。

siRNAを用いた疾患治療においては、遺伝子発現抑制効果のみならず、その抑制効果持続時間も重要な因子である。一般的に細胞質内に導入されたsiRNAは細胞分裂に伴う希釈やヌクレアーゼ等生体固有のRNA分解機構により速やかに消失する。本研究では、急性炎症を標的疾患としているため遺伝子発現抑制時間を考慮する必要はないが、来年度以降、本DDSを利用したsiRNAの肝星(伊東)細胞への細胞送達法による肝硬変治療への応用には、生体内におけるsiRNA分解を抑制するためにコレステロール修飾や、2'-4'間に架橋構造を有するLocked Nucleic Acid(LNA)の導入等を検討する必要があるかもしれない。

マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射により ICAM-1 siRNA を肝血管内皮細胞に対し選択的かつ高効率に送達することで、様々な刺激誘導性炎症反応に対する抗炎症効果を得られることが明らかとなった。急性肝炎は様々な薬物治療と共に偶発的に発生し、また IR 処置に伴う炎症反応は生体肝移植時における問題点として知られている。マンノース修飾バブルリポソームと超音波(US)照射による ICAM-1 siRNA 送達に基づく抗炎症療法は、siRNA に起因した有害作用が低く、かつ様々な炎症反応に対して広く

適応できる可能性を秘めているので、炎症反応が懸念される疾患治療前に本 DDS により ICAM-1 siRNA を送達することで、炎症反応の発生を抑制できると考えられる。

### 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 Fig.11 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。

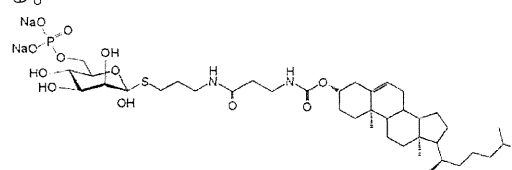


Fig. 11 マンノース-6-リン酸修飾コレステロール誘導体(M6P-Chol)の化学構造

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。

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。

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) (80:40:0)	100 ± 6.0	-6.88 ± 0.3
M6P(2.5)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:37.5:2.5)	95.5 ± 2.1	-2.28 ± 0.4
M6P(5.0)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:35:5)	100 ± 7.2	-5.19 ± 1.1
M6P(7.5)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:32.5:7.5)	99.6 ± 7.7	-6.78 ± 0.3
M6P(10)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:30:10)	101 ± 6.0	-8.96 ± 0.5
M6P(15)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:25:15)	101 ± 6.6	12.1 ± 2.4
M6P(20)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:20:20)	99.4 ± 6.9	-16.6 ± 2.7
M6P(40)-liposome	DSPC:Chol(M6P-Chol) (80:0:40)	102 ± 6.8	-22.5 ± 2.0

### 1-b M6P 修飾リポソームの細胞取り込み機構、細胞選択性の評価

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 (Fig. 12)。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。

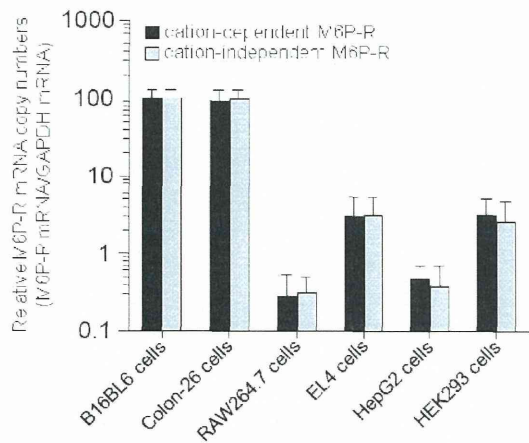


Fig. 12 様々な細胞における M6P レセプター mRNA の発現

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  $[^3\text{H}]$  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。 $[^3\text{H}]$  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 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 (Fig.13)。

また M6P 過剰量 (20 mM) 添加により M6P-Chol 誘導体を含有する 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 (Fig.14)。また、通常の場合において 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

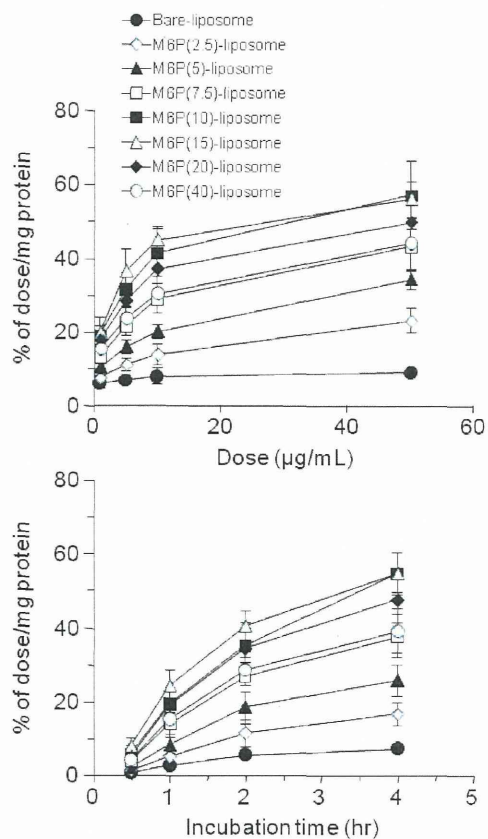


Fig. 13 M6P レセプターを発現する B16BL6 細胞への取り込み及び  $[^3\text{H}]$  標識 M6P 修飾リポソームにおける M6P-Chol 含量 (2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40%) 並びに投与量の影響

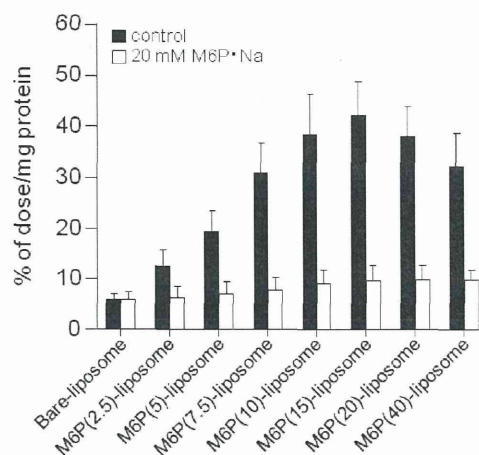


Fig.14 B16BL6 細胞における種々の割合での  $[^3\text{H}]$  標識 M6P(2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40) 修飾リポソームの細胞結合特性

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。

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 (Fig.15A)。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 (Fig.15B)。

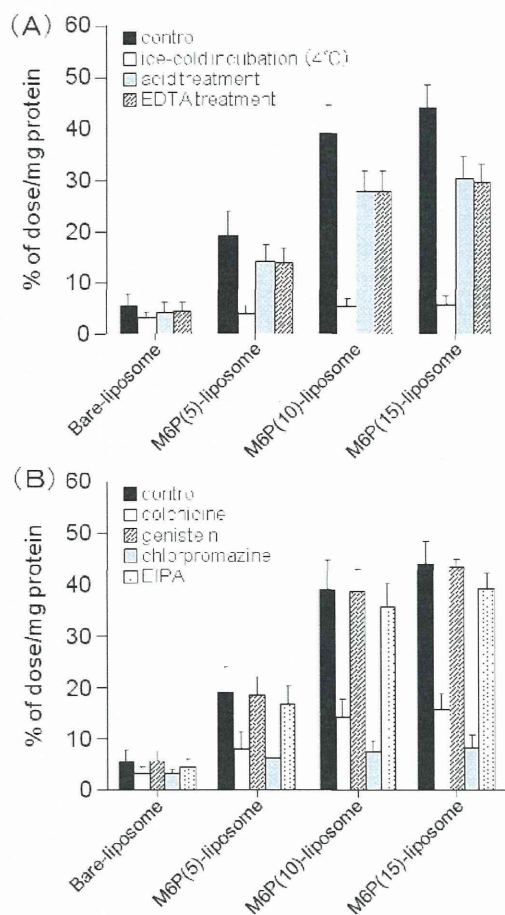


Fig. 15 B16BL6 細胞における様々な条件や阻害剤共存下での $[^3\text{H}]$ 標識 M6P(5, 10, 15) 修飾リポソームの細胞結合特性

Fig. 13 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 (Fig.16)。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。

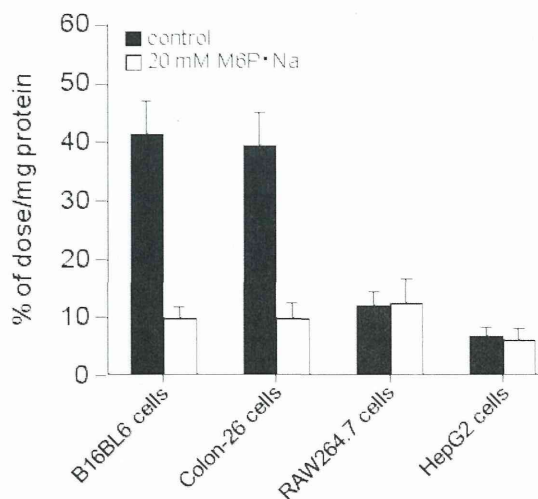


Fig. 16 M6P レセプター高発現、B16BL6 並びに Colon 26 細胞、M6P レセプター低発現、RAW264.7 並びに HepG2 細胞での $[^3\text{H}]$ 標識 M6P(15)修飾リポソームの細胞結合特性

### 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

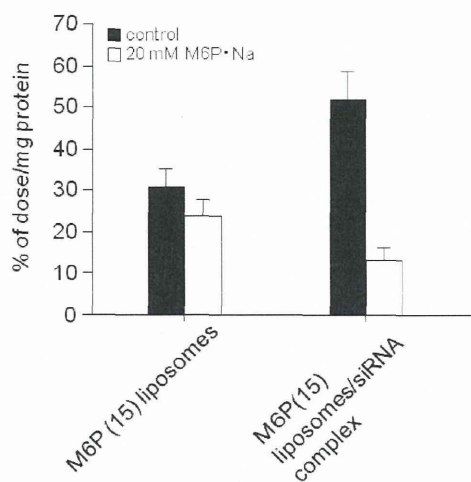
siRNA との複合体形成可能なカチオン性を有する M6P-Chol 誘導体含有リポソームを作製するために、各種構成脂質をカチオン性脂質である DOTAP と pH 応答性脂質の中性脂質である DOPE(dioleoyl phosphatidylethanolamine)から構成される脂質を表 2 の比率で混合し、M6P 修飾カチオン性リポソームを調製した。リポソーム/siRNA 複合体は、firefly luciferase に対する siRNA と M6P 修飾コレステロール誘導体 (15 mol%) 含有カチオン性リポソームを電

荷比 1.0:3.1 (-:+)として 5%デキストロース中で混合して作製した。

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

その結果、調製した製剤の物理化学的性質について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、 $^3\text{H}$ cholesterol hexadecyl ether (CHE)を用い、 $^3\text{H}$ 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。Fig. 17 B16BL6 細胞における $^3\text{H}$ 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

Fig. 17 に示すように、 $^3\text{H}$ 標識カチオン性リポソーム/luciferase siRNA 複合体に比べ、 $^3\text{H}$  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。

また、20 mM M6P · Na 共存下において $^3\text{H}$ 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、 $^3\text{H}$  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關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。

Fig.18 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、Fig.12 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。

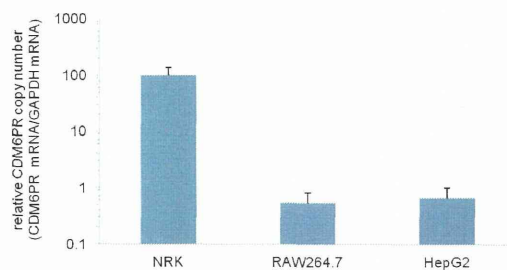


Fig. 18 NRK 細胞における M6 P レセプター mRNA の発現の確認

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