

201212009A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 25(2013)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 24 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 25 年(2013)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 ..... 7  
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 ..... 13  
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 ..... 17  
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. 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 ..... 21  
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

### 研究要旨

VE 修飾 siRNA 製剤の改良による有効性の改善に関する検討を行ない、VE 修飾核酸-混合ミセル混合物を均一なナノ粒子製剤とすることによって、肝への送達効率の改善とその変動を抑制できることを見出した。核酸分子の消化管内における安定性を向上させる目的で 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、RNase A 耐性を有してかつ RNAi 活性を阻害しないカチオン性ペプチドの合成に成功した。siRNA の肝細胞内エンドソーム脱出効率を高めることを目的として、Charge Conversional Polymer (CCP) の側鎖に pH 応答性結合を介することにより siRNA を導入した新規 siRNA コンジュゲート (REC) を開発した。さらに核酸医薬の有効性を向上させるために、通常一本鎖であるアンチセンス鎖に相補鎖核酸をハイブリダイズさせた新規の二本鎖アンチセンス核酸を開発した。この方法により、相補鎖側に VE 修飾することにより肝へのデリバリー効率や標的遺伝子抑制効果を飛躍的に向上させることに成功した。

### 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

吸収促進剤との脂質分散製剤として実験に使用した。リノール酸等の吸収促進剤を、用時、3.0% HCO-60 を添加後、5 分間 20kHz, 30W、氷上で超音波処理により分散し混合ミセル化し、さらに siRNA を添加後、混合分散することにより調製した。

### 2) 動物実験

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。

### A. 研究目的

臨床応用を念頭に、合成機能性核酸分子の安定性及び有効性の向上、脂質分散製剤の送達効率及びその変動を改善するための核酸化学的検討、マウス動物実験を行なう。

### B. 研究方法

#### 1) 脂質分散製剤の調製

オリゴ核酸モデルとしては、主に VE-siRNA (Cy3 蛍光標識体又は非標識体) を、単独、又は、

### 3) 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  $\mu\text{m}$  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。

### 4) 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)。

(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、東京医科歯科大学、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. 脂質ナノ分散製剤化による送達性の改善

前年度の DLS を用いた検討結果より、VE-siRNA は、リノール酸-HCO60 混合ミセル (MM) と会合し、製剤中では約 14nm のナノ微粒子 (Lipid nanoparticles, LNP) を形成して存在することが示唆された。一方、この製剤には、少数ながら 1500nm 以上に多峰性の粒子分布を含むことが示された。そこで、脂肪酸の混合ミセルを調製後、

フィルター (0.45 $\mu\text{m}$  カット) 処理して  $\mu\text{m}$  サイズの粒子を除去することで、製剤を単一分散の脂質ナノ分散液とし、これらの送達効率を比較検討した。従来の調製法と比較して、均質ナノ粒子化した製剤を用いた場合、Cy3 標識 VE-siRNA の肝臓への送達性が顕著に改善されることが明らかとなった。肝移行性の経時的変化の比較から、 $\mu\text{m}$  サイズの粒子の混在により、肝への送達効率の低下や遅延を生じることが示唆された。

### 2. オリゴ核酸分子の消化管粘膜内での *in vitro* 安定性

核酸分子の製剤中並びに投薬後の安定性は、その DDS 効率および薬効に大きな影響を与える。そこで、核酸分子の消化管腔内及び粘膜層での安定性を評価する目的で、VE-siRNA を腸管内インキュベーション液及び粘膜ホモジネートと 37 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした際の分解物の産生を経時的に調べた。

その結果、VE-siRNA の 29bp は比較的安定であったが、経時的に増加する核酸断片が観察され、消化管内や消化管粘膜内において RNase による分解が起こっていることが示された。

### 3. 二本鎖

#### 核酸に結合するカチオン性ペプチドの開発

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カチオン性分子として、アミノ基を有し、側鎖メチレン長が 1-4 のオリゴペプチド (カチオン性残基数=8) の合成を達成した。 $T_m$  値を測定したところ、L-2,4-ジアミノブタン酸オリゴマー (Dabs) が  $\Delta T_m=14.0^{\circ}\text{C}$  と二重鎖の安定化効果を示し、蛍光異方性測定により、カチオン性ペプチドと RNA 二重鎖の解離定数 ( $K_d$  値) 0.071 $\mu\text{M}$  であり、RNA 二重鎖に対して強く結合することが示された。CD スペクトルの測定から、これらのカチオン性ペプチドは A 型 RNA 二重鎖の高次構造に変化を与えないこともわかった。さらに、RNase A 耐性が獲得されたこ

とがポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、RNAi 活性に影響がないことを培養細胞系への導入後の標的 RNA の qRT-PCR にて検証した。

#### 4. エンドソーム脱出素子の設計および作成

VE-siRNA/MM の siRNA デリバリー効率を高めることを目的として CCP の側鎖に pH 応答性結合を介して siRNA を導入した新規 siRNA コンジュゲート (siRNA-releasable/ endosome-disrupting conjugate, REC)を開発した。本コンジュゲートは、pH7.4 においてはアニオン性を示すためにカチオン性ポリマーと安定なポリオンコンプレックス(PIC)を形成するが、エンドソーム内の低 pH 環境においては CCP がエンドソーム膜に選択的な傷害性を示すカチオン性の PAsp(DET)へと変換され、さらに siRNA がポリマーから脱離することによって効率的な細胞質内への siRNA デリバリーが達成されることを、電気泳動法(PAGE)、蛍光相関分光(FCS)測定、培養細胞の細胞内における分布、標的遺伝子のルシフェラーゼのノックダウン効率にて検証した。さらに、siRNA コンジュゲートにおいては、Toll 様受容体-3 (TLR3)による認識を介した免疫反応の惹起が問題となりうるが、REC は効率的に細胞質へと移行し、さらに酸性環境下においてコンジュゲートから siRNA が速やかに放出されるために、免疫反応が回避されることが示された。

#### D. 考察

開発中の本経腸経リンパ管デリバリーシステムにおいて、吸収促進剤として選定したリノール酸含有混合ミセルは、その粒径が DDS 効率を左右する重要な因子となっていることが明らかとなった。消化管粘膜表層は、粘液層に被覆されており、これらはムコ多糖のような高分子により網目構造なし拡散層を形成している。このため  $\mu\text{m}$  オーダーの粒子では腸管上皮細胞層へ至るまでの拡散過程が律速を与えるため、結果に示したように、注腸製剤の分散粒子からマイクロサイズの

粒子を排除してナノ粒子として均質化することによって、肝送達性が顕著に改善したものと推察される。ナノ均質化された製剤は、粒子間同士の会合や合一を生じにくく、製剤としての安定性も向上することから、製剤(調製)間や投与のタイミングによる変動も抑制されるため、好ましい。

一方、核酸医薬品開発において核酸分子の安定性はもう一つの大きな課題である。本研究の結果、VE-siRNA は腸粘膜ホモジネート中においても長時間に渡り安定であることが示され、吸収に必要な時間において、VE-siRNA が十分に安定性を保持できることが示されたので霊長類への実験移行は有望であると判断した。一方、腸管腔内は分泌液や水分の吸収に伴い RNase 活性が著しく変動し得ることが示され、粘膜組織の RNase 活性を上回る可能性のあることが考えられる。このことから、さらなる生物学的な安定性を示しその高い生理活性を維持しつつ改善するための革新的な分子技術の開発が必要である。

その点で、和田らの開発したカチオン性ペプチド Dab<sub>8</sub> は、A 型構造を有する二本鎖 RNA に結合することにより、RNase A 耐性が獲得されるが、RNAi 活性は阻害しないことが示さ、有望と考えられた。

さらに標的の肝細胞内で siRNA の有効性向上のために、エンドソーム脱出効率を高めることを目的とした Charge Conversional Polymer (CCP) : REC を利用した完全合成系の siRNA キャリア PIC の開発に成功した。今後は VE-siRNA/CM への導入が課題である。

一方、siRNA の遺伝子抑制効果には限界があることが懸念され、新規の核酸医薬の開発を試みた。ビタミン E 結合機能核酸は、siRNA で報告があるように集積の点で肝臓へのデリバリーに際して有用であることが示されていた。そこでビタミン E を直接 ASO に結合してみたものの、逆に有効性を損ねる結果となった。そのため間接的にビタミン E を ASO に結合させるために、ASO に対する相補鎖を設計し、それにビタミン E を結合さ

せることで、肝臓特異的なデリバリー及び効果の著明な向上という二点を成し遂げることができた。今後の問題点として、現状の VE-dsASO は特に cRNA 中央部の RNA に化学修飾を施しておらず、酵素耐性が不十分であるので、ASO に影響を及ぼさずに酵素耐性を増すことができる有用な化学修飾の開発を行う。

## E. 結論

VE 修飾核酸-混合ミセル混合物を均一なナノ粒子製剤とすることによって、吸収の促進およびデリバリー効率の改善と、RNase A 耐性を有してかつ RNAi 活性を阻害しない二重鎖核酸結合性を有するカチオン性ペプチドの合成に成功した。

核酸医薬の有効性向上のために、エンドソーム脱出効率を高めた Charge Conversional Polymer (CCP) : REC を利用した完全合成系の siRNA キャリア PIC の開発に成功する一方、飛躍的に肝臓へのデリバリー効率や標的遺伝子抑制効果を向上できる新規核酸である二本鎖アンチセンス核酸を開発した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hirai T, Enomoto M, Machida A, Yamamoto M, Kuwahara H, Tajiri M, Hirai Y, Sotome S, Mizusawa H, Shinomiya K, Okawa A, Yokota T. Intrathecal shRNA-AAV9 inhibits target protein expression in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult mice. *Hum Gene Ther Methods* 2012; 23: 119-127.
2. Nishina K, Mizusawa H, Yokota T. Short interfering RNA and the central nervous system: development of nonviral delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10: 289-292.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 仁科一隆, 吉田規恵, 桑原宏哉, 朴文英, 仁科智子, 横田隆徳, 水澤英洋. ビタミン E 結合 siRNA の注腸投与による家族性アミロイドポリニューロパチーの治療法の検討. 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012. 5.23
2. 横田隆徳. Efficient *in vivo*  $\alpha$ -tocopherol-conjugated siRNA from colorectum to liver. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012.7.4
3. 朴文英, 仁科一隆, 田中規恵, 仁科智子, 桑原宏哉, 水澤英洋, 横田隆徳. 新規アンチセンス核酸の脳脈絡叢へのデリバリー. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012. 7. 4
4. 田中規恵, 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 の肝への新規 DDS の開発. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012. 7. 4
5. 仁科一隆, 朴文英, 田中規恵, 坂田美奈, 桑原宏哉, 仁科智子, 水澤英洋, 横田隆徳. アンチセンス核酸の脳脈絡叢へのデリバリー. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 仙台, 2012. 9.26

(国際学会)

1. Yoshida-Tanaka K, Kuwahara H, Nishina K, Nishina T, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Delivery of siRNA to brain capillary endothelial cells with endogenous lipoprotein *in vivo*. Oligonucleotide Therapeutics Society(OTS) annual meeting 2012, Boston, 2012.10.30
2. Nishina K, Uno Y, Piao W, Tanaka-Yoshida K, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of  $\alpha$ -tocopherol-conjugated siRNA with HDL to the brain. Oligonucleotide Therapeutics Society(OTS) annual meeting 2012, Boston, 2012.10.30



## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1. 特許出願状況

発明の名称：経大腸吸収用医薬組成物

出願人：東京医科歯科大学

発明人：横田隆徳, 村上正裕, 仁科一隆.

米国出願番号：13/817,172（移行日：2013.2.15）

EP出願番号：11817940.7（移行日：2013.3.15）

国際出願番号：PCT/JP2011/004642

出願日：2011.8.19

### 2. 特許出願

発明の名称：キメラ二重鎖核酸

出願人：東京医科歯科大学, 大阪大学

発明人：横田隆徳, 仁科一隆, 水澤英洋,  
小比賀聡.

国際出願番号：PCT/JP2012/083180

出願日：2012.12.17

発明の名称：二重鎖核酸結合剤、当該結合剤－二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法.

出願人：東京医科歯科大学

発明人：横田隆徳, 仁科一隆, 和田猛,  
前田雄介.

出願番号：2013-057521

出願日：2013.3.21

### 3. 実用新案登録

特になし

### 4. 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

### 研究要旨

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) を利用した完全合成系の siRNA キャリアの開発を行っている。本年度は、siRNA のエンドソーム脱出効率を高めることを目的として、CCP の側鎖に pH 応答性結合を介して siRNA を導入した新規 siRNA コンジュゲートを開発した。siRNA コンジュゲートはポリカチオンと混合することによってポリイオンコンプレックス(PIC)を形成し、PIC は培養細胞に対して免疫応答を惹起することなく効率的な RNAi 効果を示すことが明らかになった。

### 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 Charge Conversional Polymer, CCP を利用したエンドソーム脱出素子およびエンドソーム脱出能を具備した完全合成系の siRNA キャリアの開発を行っている。

本年度は、CCP の側鎖に pH 応答性結合を介して siRNA を導入した新規 siRNA コンジュゲート (siRNA-releasable/endosome-disrupting conjugate, REC) (図 1(b)) を開発した。本コンジュゲートは、pH7.4 においてはアニオン性を示すためにカチオン性ポリマーと安定なポリイオンコンプレックス(PIC)を形成するが、エンドソーム内の低 pH 環境においては CCP がエンドソーム膜に選択的な傷害性を示すカチオン性の PAsp(DET)へと変換され、さらに siRNA がポリマーから脱離することによって効率的な細胞質内への siRNA デリバリーが達成されるものと考えられる (図 1(a))。本研究では、この概念を実証するために、pH 応答性を示さない siRNA コンジュゲート (siRNA-releasable but endosome-disrupting conjugate, uREC) (図 1(c)) の開発も行った。

ーム内の低 pH 環境においては CCP がエンドソーム膜に選択的な傷害性を示すカチオン性の PAsp(DET)へと変換され、さらに siRNA がポリマーから脱離することによって効率的な細胞質内への siRNA デリバリーが達成されるものと考えられる (図 1(a))。本研究では、この概念を実証するために、pH 応答性を示さない siRNA コンジュゲート (siRNA-releasable but endosome-disrupting conjugate, uREC) (図 1(c)) の開発も行った。

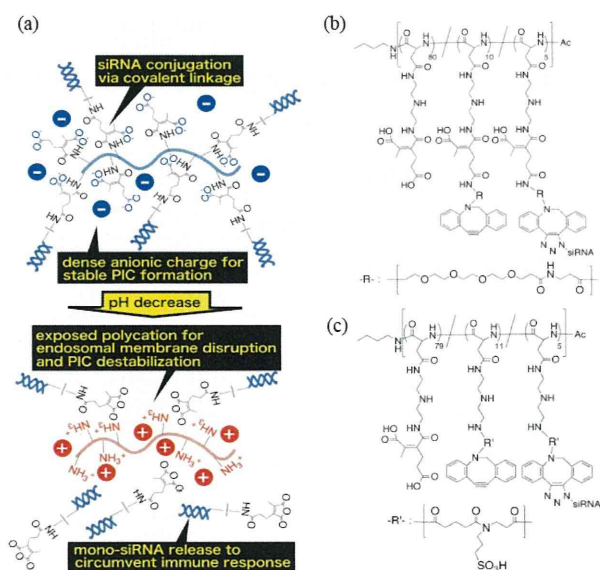


図 1. CCP を導入した siRNA コンジュゲートの設計と合成スキーム

## B.研究方法

### 1) siRNA コンジュゲートの合成

まず、poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PBLA)の dietylenetriamine(DET)によるアミノリシス反応によって PAsp(DET)を合成した。次に、無水マレイン酸および bibenzyl cyclooctyne (DBCO)を導入したマレイン酸誘導体を PAsp(DET)の側鎖のアミノ基に導入することによって低 pH 環境に反応して開裂するマレイン酸アミド(MAA)リンカーを介して DBCO を導入した CCP を合成した。このポリマーにアジド基を導入した siRNA を凍結融解法を利用した Click コンジュゲーションによって DBCO に反応させることにより目的とする siRNA コンジュゲート(REC) (図 1(b))を得た。一方、siRNA がリリースされないコンジュゲート(uREC)に関しては MAA リンカーを用いずに CCPに DBCO を導入することによって合成した (図 1(c))。

### 2) siRNA コンジュゲートを搭載した PIC の調製と物性評価

REC および uREC を PAsp(DET)と混合することによってポリイオンコンプレックス(PIC)を調製した。調製した PIC は、pH7.4 および pH5.0 の緩衝液中で1時間インキュベーションした後に、siRNA のリリースを PAGE により評価した。さらに Cy3 標識 siRNA(Cy3-siRNA)を用いて会合体の形成および異なる pH 環境下で 30 分インキュベートした後の相対拡散係数  $D_s$ (ストークス-アインシュタイン式により粒径に反比例)の変化を蛍光相関分光(FCS)測定により評価した。

### 3) siRNA コンジュゲートを搭載した PIC の in vitro 機能評価

siRNA コンジュゲートを搭載した PIC のヒト卵巣がん(SKOV3-Luc)細胞内における分布を Cy3-siRNA を用いて評価した。ここでは、PIC のエンドソーム脱出を評価するために、Lyso Sensor Green を用いてエンドソーム/リソソーム

を染色し、Cy3 との共局在を評価した。また、PIC の RNAi 効果を siLuc を用いたルシフェラーゼのノックダウン効率(SKOV3-Luc 細胞)および siPLK1(細胞周期関連タンパク質)による細胞死誘導能の測定(A549 細胞)により評価した。一方、PIC の免疫応答に関してはマウスマクロファージ Raw264.7 細胞を用いてインターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )の産生を測定することにより評価した。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C.研究結果

### 1) siRNA コンジュゲートの合成

得られたコンジュゲートの解析を行なった結果、1 分子のコンジュゲート[PAsp(DET)の重合度:100]に対して側鎖の 30%に DBCO が導入されており、最終的に 5 分子の siRNA が導入されていることが確認された。

### 2) siRNA コンジュゲートを搭載した PIC の調製と物性評価

REC および uREC を PAsp(DET)と混合することによって形成された PIC を H7.4 および pH5.0 の緩衝液中で1時間インキュベーションした後に、siRNA のリリースを PAGE により評価した(図 2(a))。その結果、REC から形成された PIC において pH7.4 では siRNA はリリースされないが、pH5.0 においてリリースされることが確認された。一方、uREC から形成された PIC では如何なる条件においても siRNA はリリースされなかった。

一方、Cy3-siRNA を用いた FCS 測定では、REC と uREC のどちらも PIC を形成することが確認された(図 2(b), (c))。カウンターポリアニオンとして Heparin を添加した時においては、pH7.4 においては REC と uREC のどちらの PIC も  $D_s$  の更なる減少が確認され、Heparin が PIC に取り込まれても siRNA はリリースされることが確認された(図 2(b), (c))。一方、pH5.5 においては REC

から形成された PIC においてのみ Ds が siRNA と同程度まで増加することが確認された(図 2(b))。これらの結果より、REC から形成された PIC は pH5.0 の環境で選択的に siRNA を放出することが確認された。

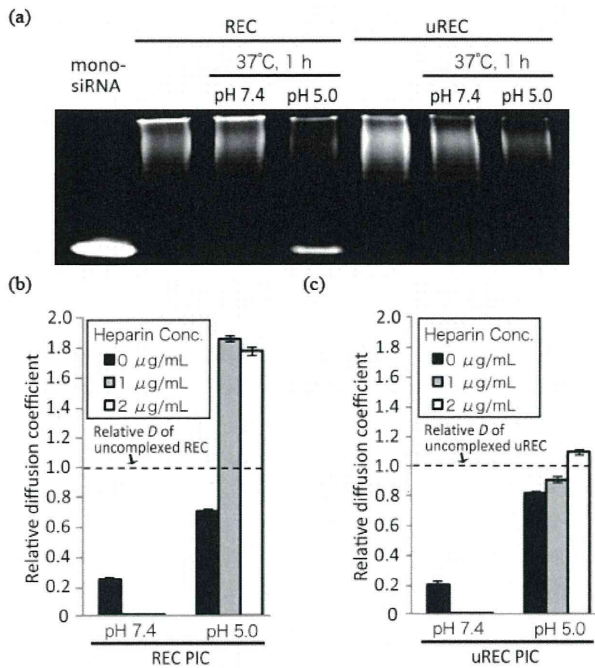


図 2. REC および uREC から形成される PIC の PAGE(a)と FCS 測定による拡散係数 Ds の相対値の変化(REC(b)、uREC(c))

### 3) siRNA コンジュゲートを搭載した PIC の in vitro 機能評価

Cy3-siRNA および REC、uREC からなる PIC の SKOV3-Luc 細胞における Lyso Sensor Green との共局在を評価した(図 3)。その結果、Cy3-siRNA においては黄色の蛍光が確認され(図 3(a))、siRNA はエンドソーム内に留まっているものと考えられた。一方、REC、uREC からなる PIC においては赤色の蛍光が多く観察され(図 3(b), (c))、時間依存的に共局在率が低下することが確認された(図 3(d))。これらの結果より、REC と uREC のどちらから形成される PIC においても siRNA コンジュゲートは効率的な細胞質への移行を示すことが示唆された。

PIC の RNAi 効果に関して、SKOV3-Luc 細胞に対するルシフェラーゼのノックダウン効率の

評価では、mono-siRNA、REC および uREC から形成された PIC のすべてにおいて有意なルシフェラーゼの発現抑制が確認されたが、その効果は REC から形成された PIC において最も顕著であった(図 4(a))。さらに、siPLK1 による A549 細胞の細胞増殖抑制効果に関しては REC から形成された PIC が最も高い効果を示した(図 4(b))。さらに Raw264.7 細胞を用いた評価では、REC からなる PIC を作用させた場合の IFN- $\alpha$  産生量は  $24.3 \pm 3.5$  pg/mL、uREC からなる PIC を作用させた場合は  $60.8 \pm 12.9$  pg/mL であり、REC によって siRNA の導入による免疫反応が抑制されることが示唆された。

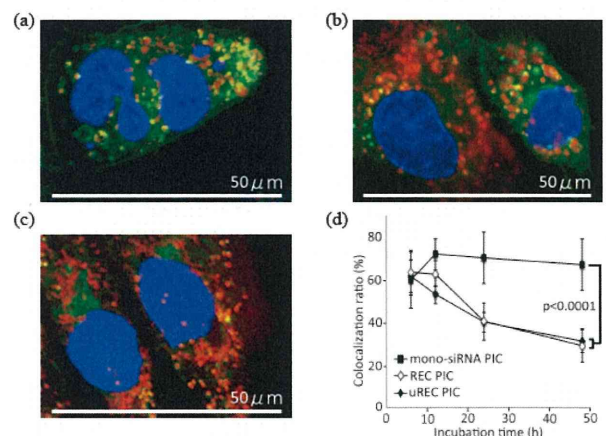


図 3. Cy3-siRNA(a)および REC、uREC からなる PIC(b,c)の SKOV3-Luc 細胞における Lyso Sensor Green との共局在と共局在率の経時的変化(d)

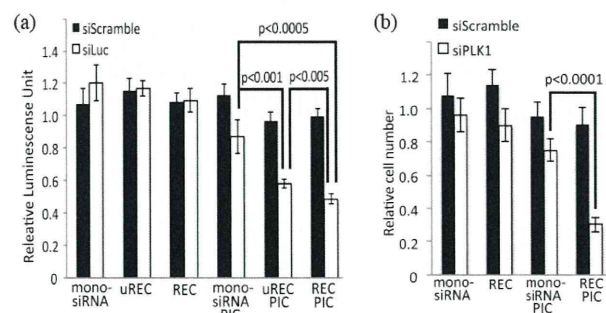


図 4. (a) SKOV3-Luc 細胞におけるルシフェラーゼのノックダウン効率、(b)A549 細胞における siPLK1 の導入に基づく細胞増殖抑制効果

## D. 考察

本年度は、CCP の側鎖に pH 応答性結合を介して siRNA を導入した新規 siRNA コンジュゲート (REC) を開発した(図 1)。本コンジュゲートは、pH7.4 においてはアニオン性を示すためにカチオン性ポリマーと安定な PIC を形成するが、エンドソーム内の低 pH 環境においては CCP が PAsp(DET)へと変換され、さらに siRNA がポリマーから脱離することが確認された(図 2)。培養がん細胞を用いた実験では、REC から形成される PIC は、効率的に細胞質へと移行し、効率的なレポーター遺伝子のノックダウンと PLK1 のノックダウンに基づくがん細胞の増殖抑制効果を示した(図 3, 4)。さらに、siRNA コンジュゲートにおいては、Toll 様受容体-3(TLR3)による認識を介した免疫反応の惹起が問題となりうるが、REC は効率的に細胞質へと移行し、さらに酸性環境下においてコンジュゲートから siRNA が速やかに放出されるために、免疫反応が回避されることが示された。

## E. 結論

本年度は、CCP を利用したエンドソーム脱出因子およびエンドソーム脱出能を具備した完全合成系の siRNA キャリアとして、REC を開発した。REC は、高分子量化による PIC の安定性の向上に寄与する一方で、細胞内において CCP による効率的なエンドソーム脱出と pH 応答性結合の利用による siRNA の放出といったマルチ機能を同時に達成することができるスマート siRNA コンジュゲートとして *in vivo* 応用が期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takemoto H, Miyata K, Hattori S, Ishii T, Suma T, Uchida S, Nishiyama N, Kataoka K.

Acidic pH-Responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN $\alpha$ -associated immune response. *Angew Chem Int Ed* in press.

2. Gouda N, Miyata K, Christie RJ, Suma T, Kishimura A, Fukushima S, Nomoto T, Liu X, Nishiyama N, Kataoka K. Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials* 2013; 34: 562-570.
3. Suma T, Miyata K, Anraku Y, Watanabe S, Christie RJ, Takemoto H, Shioyama M, Gouda N, Ishii T, Nishiyama N, Kataoka K. Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 2012; 6: 6693-6705.
4. Takemoto H, Miyata K, Ishii T, Hattori Osawa S, Nishiyama N, Kataoka K. Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate. Chem* 2012; 23: 1503-1506. [Selected as Cover Picture]
5. Pittella F, Miyata K, Maeda Y, Suma T, Watanabe S, Chen Q, Christie RJ, Osada K, Nishiyama N, Kataoka K. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J Control Release* 2012; 161: 868-874.
6. Christie RJ, Matsumoto Y, Miyata K, Nomoto T, Fukushima S, Osada K, Halnaut J, Pittella F, Kim H-J, Nishiyama N, Kataoka K. Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 2012; 6: 5174-5189.
7. 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* 2012; 33: 2770-2779.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 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. BIOtech,

- 東京, 2012.4.27
2. 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 51 回日本生体医工学会大会, 福岡, 2012.5.10
  3. 片岡一則. 薬物・遺伝子ターゲットングのための超分子ナノキャリア設計. 高分子学会 12-1 超分子研究会, 東京, 2012.5.15
  4. 片岡一則. 高分子の機能と材料開発: ナノバイオテクノロジー分野への展開を中心に. 東レ第 2 回先端材料研究フォーラム, 滋賀, 2012.5.21
  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. 情報機構セミナー「核酸医薬の開発戦略と今後の展望」, 大井町, 2012.5.24
  6. 片岡一則. 薬物・遺伝子ターゲットングのための超分子ナノデバイス設計. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012.7.4
  7. 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~. 第 28 回創薬セミナー, 山梨, 2012.7.26
  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~. 第 19 回愛媛オンコロジーフォーラム, 松山, 2012.8.10
  9. 片岡一則. 医療イノベーションを先導するバイオマテリアル~高分子ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~. 日本技術士会化学部会 2012 年 8 月度例会, 東京, 2012.8.23.
  10. 片岡一則. 最先端ナノ DDS が拓く医療イノベーション~超分子なデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~. 東海メディカルプロダクツ創立 30 周年記念シンポジウム, 名古屋, 2012.9.1
  11. 片岡一則. 高分子ミセルによる薬物・遺伝子デリバリー/ミセル製剤によるピンポイントデリバリーを中心に、がんや難病治療における DDS 製剤の現状およびバイオ医薬品の有効性・安全性を高める DDS 製剤への期待を含む内容. 第 7 回品質/科学技術特別研修ナノメディシン(ナノ医薬品)による DDS の現状と展望, 東京, 2012.11.14
  12. 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」: がんの標的医療への挑戦. 東京大学 2012 第 63 回駒場祭, 東京, 2012.11.25
  13. 片岡一則. 難治がんの標的治療を実現する最先端ナノ DDS 技術. NanoTech2013 第 12 回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議, 東京, 2013.1.30
  14. 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~. AKUA 学術集会特別講演, 東京, 2013.3.1 (国際学会)
1. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for drug delivery. Seminar at Eisai Inc./Andover Site, Massachusetts, 2012.4.9
  2. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for drug delivery. Seminar at Novartis Institute for BioMedical Research, Massachusetts, 2012.4.9
  3. Kataoka K. Supramolecular structures self-assembled from engineered block copolymers for theranostics nanodevice. MRS Spring Meeting, San Francisco, 2012.4.11
  4. Kataoka K. Block copolymer self-assemblies as smart nanocarriers in gene and drug delivery. High Polymer Research Group Conference 2012, Cheshire, 2012.5.2
  5. Kataoka K. Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery. Seminar at West China School of Pharmacy, Chengdu, 2012.6.2
  6. Kataoka K. Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, 2012.6.4
  7. Kataoka K. Supramolecular nanodevices from functionalized block copolymers for molecular therapy. CIMTEC 2012 (4th International Conference on Smart Materials, Structures and Systems), Italy, 2012.6.14
  8. Kataoka K. Medical innovation through polymer chemistry: Supramolecular structures of block copolymers as smart nanodevices for gene and drug delivery. IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), Virginia, 2012.6.24
  9. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), Virginia, 2012.6.25
  10. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. The University of Texas MD Anderson Cancer Center & The University of Tokyo 1st Joint Symposium 2012 "Bridging

Cancer Nanotechnology”, Houston, 2012.8.13

11. Kataoka K. Self-Assembled nanostructures of block copolymers as smart vehicles for gene and drug delivery. 2nd Symposium on Innovative Polymers for Controlled Delivery (SIPCD 2012), Suzhou, 2012.9.12
12. Kataoka K. Smart supramolecular nanotheranostic to overcome resistances to the treatment of severe diseases. 10th France-Japan DDS Symposium In Memory of Gérard Délérís, Bordeaux, 2012.10.11
13. Kataoka K. Supramolecular nanomedicines for targeted cancer therapy. From Nanotechnology Platform to Clinical Nanomedicine, Korea, 2012.11.22
14. Kataoka K. Self-assembled nanostructures of block copolymers as smart vehicles for gene and drug delivery. 2012 USA-Japan Seminar on Polymer Synthesis – From Monomers to Polymers to Materials to Applications, Santa Barbara, 2012.12.3
15. Kataoka K. Successful developments of phospholipid polymer biomaterials designed with bioinspiration NIPAM-80 New Innovations in Polymers And (bio)Materials. A Symposium on the Future of Biomaterials to Celebrate Allan S. Hoffman's 80th Birthday , Maui, 2012.12.16

#### 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

### 研究要旨

ビタミン E (VE) 修飾した核酸分子を腸管より肝特異的に送達する技術を基盤とする経口投与製剤の開発を目指している。脂質混合ミセルを配合した注腸剤の投与により、マウスの肝細胞内に siRNA などの核酸分子を選択的に送達できることを実証した。今年度は、核酸分子の安定性に関する基礎評価及び製剤の改良による有効性の改善に関する検討を行ったところ、VE 修飾核酸-混合ミセル混合物を均一なナノ粒子製剤とすることによって、肝への送達効率の改善とその変動を抑制できることを見出した。また、VE-siRNA が消化管粘膜においては比較的安定であることを示唆する結果が得られた。

### A.研究目的

核酸医薬品を用いた難治性疾患の治療において新薬の開発がなされており、適用の拡大を可能とする新しいデリバリー技術の確立が期待されている。局所への注入や静脈注射による全身投与には、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、患者の負担が少なく、自己投与が可能な、安全かつ簡便で、有効性の高い内服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目的とする。

前年度の検討により、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マウスにおいて実証した。また、動的光散乱法(DLS)による検討から、ビタミン E (VE-)修飾核酸分子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が得られた。今年度は、臨床応用を念頭に、合成機能性核酸分子の安定性及び脂質分散製剤の送達効率及びその変動を改善するための基礎検討を行った。さらに、横田グループ（東京医科歯科大）と共同し、本製剤投与による安全性に関する基礎評価を行った。

### B.研究方法

[脂質分散製剤の調製]

オリゴ核酸モデルとしては、主に VE-siRNA (Cy3 蛍光標識体又は非標識体) を、単独、又は、吸収促進剤との脂質分散製剤として実験に使用した。リノール酸等の吸収促進剤を、用時、3.0% HCO-60 を添加後、5 分間 20kHz, 30W、氷上で超音波処理により分散し混合ミセル化し、さらに siRNA を添加後、混合分散することにより調製した。

[マウスにおける肝移行性の評価]

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、製剤投与 90 分前より脂肪乳を経口投与した。ネンブター麻酔下、大腸に約 5cm の腸管ループを作成し、生理食塩水で洗浄した。薬液を肛門から直腸内に注入し、一定時間後全血採血した。冷却した生理食塩水にて脱血還流を施し、各臓器を摘出した。組織及び血液サンプルは、それぞれ共焦点顕微鏡観察、HE 標本観察 (以上、大阪大谷大)、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、血液検査 (以上、東京医歯大) 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、超遠心法によりカイロ

ミクロン画分を得た。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。

[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。

[オリゴ核酸分子の *in vitro* 安定性評価]

麻酔下、マウスの腸管内に 37°C に加温した生理食塩水を注入後、2 時間インキュベーションして腸内容液を回収し、又粘膜上皮層を採取した。回収した腸内インキュベーション液および粘膜上皮組織は、生理食塩水を加えホモジナイズした後、4°C、3000g にて遠心して、その上清の RNase 活性を測定した。RNase 活性を  $1 \times 10^{-7}$  unit/ul に標準化して実験に供した。オリゴ核酸を腸粘膜ホモジネート液に添加後、37°C でインキュベーションし、経時的にサンプルを採取した。各サンプルは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を施した後、染色し、デンシドメトリーにより分解性の評価を行った。

(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. 脂質ナノ分散製剤化による送達性の改善

前年度の DLS を用いた検討結果より、VE-siRNA は、リノール酸-HCO60 混合ミセルと

会合し、製剤中では約 14nm のナノ微粒子 (Lipid nanoparticles, LNP) を形成して存在することが示唆された。一方、この製剤には、少数ながら 1500nm 以上に多峰性の粒子分布を含むことが示された。さらに詳細な検討により、製剤調製後の時間経過に伴って、その粒径が増加することが明らかとなった。そこで、これら  $\mu\text{m}$  オーダーの粒子の混在や経時変化は、製剤間での送達性の変動要因の一つとなっている可能性が考えられた。そこで、脂肪酸の混合ミセルを調製後、フィルター (0.45 $\mu\text{m}$  カット) 処理して  $\mu\text{m}$  サイズの粒子を除去することで、製剤を単一分散の脂質ナノ分散液とし、これらの送達効率を比較検討した。

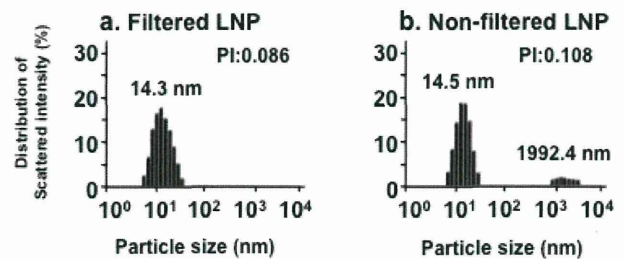


図 1 フィルトレーションによる均一ナノ粒子化

図 1 に示すように、フィルター処理によって、製剤が単一ピークの均質なナノ粒子となっていることが分かる。図 2 は、VE-siRNA を含むこれらの製剤をマウス大腸ループ内に注腸投与して、肝組織への移行性を調べた結果である。

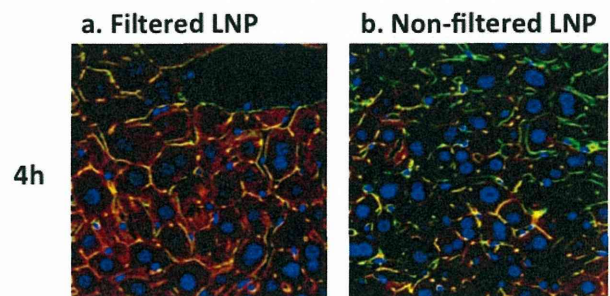


図 2 均質ナノ粒子化による VE-siRNA の肝へのデリバリー効率の改善 (LNP, lipid nanoparticle)

従来の調製法（図 2-b）と比較して、均質ナノ粒子化した製剤を用いた場合（図 2-a）、赤色で観察される Cy3 標識 VE-siRNA の肝臓への送達性が顕著に改善されることが明らかとなった。肝移行性の経時的変化の比較から、 $\mu\text{m}$  サイズの粒子の混在により、肝への送達効率の低下や遅延を生じることが示唆された。

## 2. オリゴ核酸分子の *in vitro* 安定性

核酸分子の製剤中並びに投薬後の安定性は、その DDS 効率および薬効に大きな影響を与える。特に、分解酵素活性の高い消化管及び粘膜上皮は、核酸分子に対する高い透過障壁としてのみならず、これに匹敵する吸収過程における分解障壁として働くこと知られている。そこで、核酸分子の消化管腔内及び粘膜層での安定性を評価する目的で、VE-siRNA を腸管内インキュベーション液及び粘膜ホモジネートと  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした際の分解物の産生を経時的に調べた。

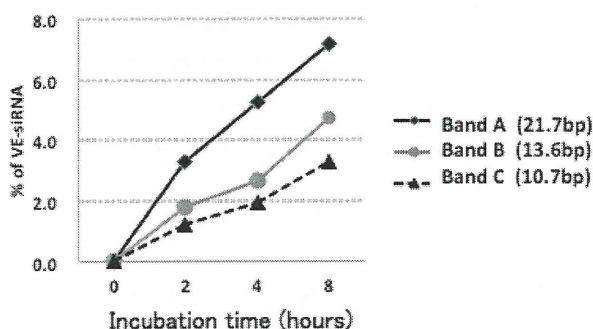


図 3 腸粘膜ホモジネートにおける VE-siRNA の分解反応

腸粘膜ホモジネートとインキュベーションした場合、8 時間後の段階でも VE-siRNA の 29bp 付近に 80%以上の強いバンドが観察されたが、一方、図 3 に示すように、2 時間後より、22、14、11 bp 付近にフラグメントのバンドが検出され、これらのフラグメントは経時的に増加する傾向を示した。一方、腸管内でインキュベーションした液の RNase 活性は動物間で大きく変動し、固体に

よって、極めて低活性である場合や粘膜組織の活性を大きく上回る活性を示すことが明らかとなった。

## 3. 安全性の評価

血液サンプルの免疫学的及び生化学的検査、腸管組織の形態学的評価を通じて、VE-siRNA を注腸製剤の投与による顕著な副作用は検出されなかった。

## D. 考察

開発中の本経腸経リンパ管デリバリーシステムにおいて、吸収促進剤として選定したリノール酸含有混合ミセルは、ビタミン E 修飾核酸と会合して LNP を形成するが、本研究により、その粒径が DDS 効率を左右する重要な因子となっていることが明らかとなった。消化管粘膜表層は、粘液層に被覆されており、これらはムコ多糖のような高分子により網目構造なし拡散層を形成している。このため  $\mu\text{m}$  オーダーの粒子では腸管上皮細胞層へ至るまでの拡散過程が律速を与えるため、結果に示したように、注腸製剤の分散粒子からマイクロサイズの粒子を排除してナノ粒子として均質化することによって、肝送達性が顕著に改善したものと推察される。ナノ均質化された製剤は、粒子間同士の会合や合一を生じにくく、製剤としての安定性も向上することから、製剤（調製）間や投与のタイミングによる変動も抑制されるため、好ましい。

一方、核酸医薬品開発において核酸分子の安定性はもう一つの大きな課題である。とくに、我々の開発する経腸デリバリーシステムにおいては、核酸分子の消化管粘膜吸収過程における安定性はそのデリバリー効率に影響する重要な因子と考えられた。本研究に用いたモデル siRNA は、二本鎖核酸であり、また、ホスホロチオエート及び 2'-O メチル化により RNase に対して高耐性化修飾されているが、消化管における高い RNase に対しても安定であるかは不明であった。本研究

の結果、VE-siRNA は腸粘膜ホモジネート中において、継時的に一部分解を受けるものの比較的安定であり、粘膜透過～吸収過程においては安定性を保持していることが示唆された。

一方、腸管腔内は分泌液や水分の吸収に伴い RNase 活性が著しく変動し得ることが示され、粘膜組織の RNase 活性を上回る可能性のあることが考えられる。このことから、核酸分子の投与後の吸収過程においては、とくに管腔内での滞留時間がその安定性との関係においてより重要な因子で、VE-siRNA の生物学的利用率を改善し、また、その変動を低減するためには、安定性をさらに高める分子技術並びに製剤化技術との組み合わせが望まれる。とくに、RNase 耐性化のための化学修飾によって生理活性が損なわれる機能性核酸分子については、その高い生理活性を維持しつつ生物学的な安定性を改善するための革新的な分子技術の開発が必須と考えられる。

## E. 結論

本開発中の経腸経リンパ管デリバリーシステムにおいて、VE 修飾核酸-混合ミセル混合物を均一なナノ粒子製剤とすることによって、吸収の促進およびデリバリー効率の改善と変動の抑制を図ることができた。また、核酸の安定性は、核酸の効果及び薬物動態の解析において重要であるが、本研究により、我々の用いた RNase 耐性型 VE 修飾 siRNA については、大腸粘膜組織中で比較的安定であることが示された。これに対して、腸管腔内では RNase 活性の変動が激しく、VE-siRNA の核酸分子の生物学的利用率を高めその変動を抑制するためには、さらに他の分子技術や製剤化技術との組み合わせによる腸管腔内での安定性の改善が必要であると考えられる。

なお、VE 修飾 siRNA を含有する本製剤の投与による安全性の検討から、マウスにおいては問題となる副作用は検出されなかった。

以上のように、本研究の結果、今後の臨床応用を目指した霊長類における検証的研究に移行す

るにあたって有益な基礎情報が得られた。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. ビタミン E 結合型 siRNA の経腸デリバリーによる肝遺伝子発現の抑制. 村上正裕, 横田隆徳. ドラッグデリバリーシステムの新展開 II. シーエムシー出版. 2012; 78-85.

### 2. 学会発表

(国内学会)

1. 田中規恵, 村上正裕, 仁科一隆, 渡辺知恵, 横田隆徳. 直腸投与による siRNA の肝臓へのデリバリー. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012.7.4

(国際学会)

1. Murakami M, Yokota T. New strategy for enteral oligonucleotide delivery to liver via the lymphatic route and gene silencing. International Symposium on Drug Discovery and Pharmaceutical Sciences, Suzhou, 2012.5.26

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許出願状況

発 明 の 名 称 : 経大腸吸収用医薬組成物

出 願 人 : 東京医科歯科大学

発 明 人 : 横田隆徳, 村上正裕, 仁科一隆.

米国出願番号 : 13/817,172 (移行日 : 2013.2.15)

EP 出願番号 : 11817940.7 (移行日 : 2013.3.15)

国際出願番号 : PCT/JP2011/004642

出 願 日 : 2011.8.19

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし