

9.4 肝標的経腸デリバリーのマウスにおける検証

ビタミンE (α -トコフェロール) の6位の水酸基をアミダイト化し、肝のApoB遺伝子発現を選択的に抑制する、化学修飾を施した29塩基のsiRNAのアンチセンス鎖5'末端にアミダイトを介して直接結合し、これと対応する27塩基のセンス鎖に追跡用の蛍光色素(Cy3)を結合したものをアニーリングさせて蛍光標識VE-siRNAを作成した。この合成VE-siRNAは血清中のRNA分解酵素に対し耐性があり、マウス血清内では24時間以上安定に存在できることを確認した。また、その分子量はおおよそ20kDであり、大腸粘膜においてリンパ指向性を示すことが予想された。また、小腸粘膜と比較して、大腸粘膜では前述したように吸収促進剤による粘膜透過の促進にとって有利であると考えられた。

Cy3標識VE-siRNAを、CM形成を促すために濃縮ミルクを事前投与したマウスの大腸ループ内にリノール酸-界面活性剤混合ミセル(MM)と共に投与し、その肝臓への移行性を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、4時間後の肝細胞内にCy3に基づく顕著なドット状の蛍光が認められた(図3A)。このVE-siRNAの移行は、肝臓に特異的であり、また、吸収促進剤が存在しない場合(図3B)やビタミンEを結合しない場合(図3C)には殆ど認められず、ビタミンEの結合と吸収促進剤であるMMの双方が必要であることが示された。一方、この肝細胞内へのVE-siRNAの移行は、絶食やCM形成のない条件下、LPLの阻害剤などによって顕著に減少した。また、蛍光相関分光法による検討から、siRNA自身はCMと複合体を形成しないが、VE-siRNA投与後の胸管リンパ管から採取したリンパ液ではVE-siRNAがCMと複合体を形成していることが示された。これらの結果は、消化管を透過したVE-siRNAは、リンパ管内を上行する間にCMに取り込まれて複合体を形成し、静脈へ移行した後LPLの働きでCM-Rに変換された後、肝組織に存在するCM-R受容体を介して効率よく取り込まれることを示している。すなわち、企図した通り、*in vivo*においてDDSを構築し、CMによるビタミンEの生理的輸送経路を介して肝への特異的なデリバリーを達成するというコンセプトが実際に機能することが示された。さらに、顕微鏡像からは、細胞内に特殊輸送で取り込まれたVE-siRNAの一部はエンドソーム(ES)内に存在するものとみられ、その活性を発揮するためには、ESから標的分子の存在する細胞質へ移行し、切断酵素であるDicerなどの働きにより活性化される必要がある。肝臓から短鎖RNAを抽出し、VE-siRNAのアンチセンス鎖を認識するプローブでノザンプロットを行ったところ、投与した元の29塩基と共にDicerによって細胞内で切り出された鎖長と一致する21塩基の計2本のアンチセンス鎖が検出された(図3D)。これはマウス肝細胞内に取り込まれたVE-siRNAは、細胞質まで移行し活性型に変換されていることを示している。そこで、VE-siRNAを促進剤と10 mg/kgの用量で1日3回直腸投与し、肝細胞での標的遺伝子のmRNAの発現量を定量的RT-PCRにより調べたところ、標的遺伝子の発現が約40%抑制されることが明らかとなった。また、血清LDL-コレステロール値及びトリグリセリド値も24時間後で有意に(約40%)減少していることが確認された。この際、肝臓におけるoff-target

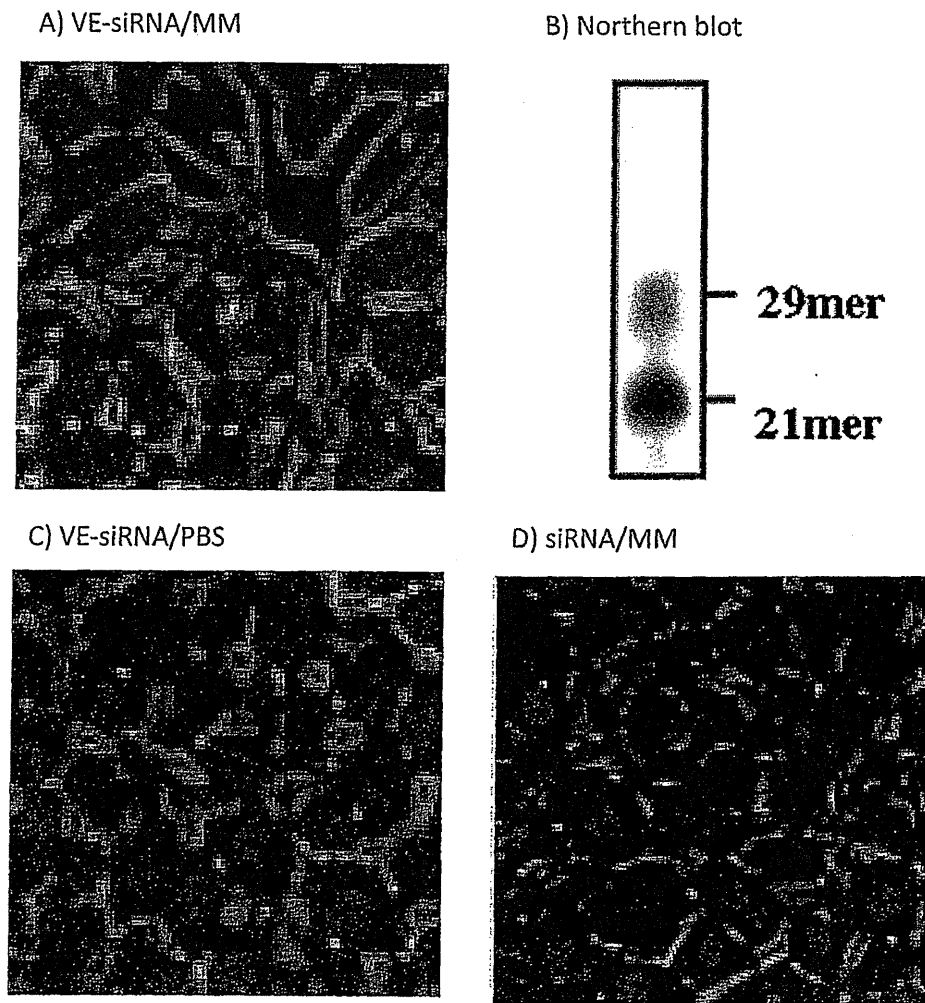


図3 Cy3 標識 VE-siRNA をマウス大腸投与 4 時間後の肝組織への移行
 A. VE-siRNA+混合ミセル, B. 肝細胞内のアンチセンス RNA 鎖の検出, C. VE-siRNA 単独, D.
 siRNA (ビタミン E 非修飾) +混合ミセル

効果は認められず、また、血液学的にインターフェロン応答や肝機能・腎機能障害を含めた副作用が認められなかったことから、肝への特異的な集積により siRNA の副作用が回避されていることが示唆された。今後は、siRNA と CM 形成とを最適に同調させる方法の検討が必要であると考えている。

9.5 今後の展望

機能性オリゴ核酸の経腸管投与方法を開発し、siRNA の肝細胞特異的なデリバリー及び効果発現に成功した。これは非注射投与による真の全身性 RNA 干渉を達成した世界初の例であるといえる。本経腸デリバリー技術基盤は、①化学修飾による安定化技術、②消化管吸収促進技術、③リンパターゲティング技術、④リポタンパク質を利用した肝特異的デリバリー技術により構成されているが、*in vivo* fabrication コンセプトの導入によって、経腸デリバリー上の克服困難な課

題に対して、最終的にはCM形成下におけるビタミンEを結合したsiRNAと吸収促進剤の直腸内への共投与という単純な実施形で解決法を与えることができた。さらに適当な大腸DDS技術^{14,15)}を組み入れることで、経口製剤の開発も可能であり、この方向での技術開発を進めていきたい。

本デリバリー技術は、利用する生体内担体と標的臓器、対象とする核酸分子、化学修飾法、吸収促進剤、最終剤形を含めた設計において、多様な拡張性を有するものと思われる。最近、桑原らは、VE-siRNAとHDLとの複合体が脳血管内皮細胞に特異的にデリバリーされ取り込まれることを報告しており¹⁶⁾、将来的には脳をターゲットする経口剤のような夢のDDSの開発が現実のものとなることを期待したい。

以上のように、本技術は、殊に、キャリアの安全性及びデリバリー効率の双方から、近年研究の進歩が目覚ましい機能性オリゴ核酸の実用開発における有力なアプローチ法の一つとして期待される。

文 献

- 1) Soutschek J, *et al.*: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432(7014): 173-178 (2004)
- 2) G.R. Rettig, M.A. Behlke, Progress toward *in vivo* use of siRNAs-II, *Mol. Ther.*, Dec.20 (2011), (doi: 10.1038/mt.2011.263.)
- 3) M. Aouadi, *et al.*, Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* 458, 1180-1184 (2009)
- 4) T.X. Xiang, B.D. Anderson, Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. *Biophys. J.* 75, 2658-2671 (1998)
- 5) S. Muranishi, Absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7, 1-33 (1990)
- 6) C. R. Dass, Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy *in vivo*. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 593-601 (2002)
- 7) J. D Tousignant, *et al.* Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum. Gene Ther.* 11: 2493-2513 (2000)
- 8) M.V. Pasquetto, *et al.*, Targeted drug delivery using immunoconjugates: principles and applications, *J Immunother.* 34 (9): 611-628 (2011)
- 9) Wolfrum C, *et al.*, Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 25 (10): 1149-1157 (2007)
- 10) Nishina K, *et al.*, Efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver by conjugation of α -tocopherol. *Mol Ther* 16 (4): 734-740 (2008)

第2章 核酸医薬への展開

- 11) T.E. Willnow, Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance. *Diabet. Med.* 14, S75-S80 (1997)
- 12) H. Yoshikawa, *et al.*, Molecular weight dependence of permselectivity to rat small intestinal blood-lymph barrier for exogenous macromolecules absorbed from lumen. *J. Pharmacobiodyn.* 7, 1-6 (1984)
- 13) H. Yoshikawa *et al.*, Absorption of oligodeoxynucleotide by suppository from rat rectal route, *Biol. Pharm. Bull.*, 20 (10), 1116-1118 (1997)
- 14) K. Takada, Microfabrication-derived DDS: From batch to individual Production. *Drug Discov. Ther.* 2 (3): 140-155 (2008)
- 15) A.K. Philip, B. Philip, Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *Oman Med. J.*, 25: 70-78 (2010)
- 16) Kuwahara, *et al.*, Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Mol. Ther.* 19:2213-2221 (2011)

