

201227016A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した
核酸医薬送達ナノシステムの開発

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
画期的C型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した核酸医薬送達ナノシステムの開発	-----1
吉岡 靖雄	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----13

画期的 C 型肝炎ウイルス阻害療法の確立を目指した 核酸医薬送達ナノシステムの開発

研究代表者 吉岡 靖雄 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

研究要旨

インターフェロン（IFN）療法の確立は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、C型肝炎は“致命的な病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。一方で、重篤な副作用によるIFN療法の中断、薬剤耐性ウイルスの頻発、高額費用などの解決すべき問題が多数残されており、新たな観点からの治療薬開発が世界的に望まれている。本観点から、siRNAやプラスミドなどの核酸医薬が、次世代型画期的医薬品として注目されている。しかし核酸医薬は一般に、①血中で速やかに分解される（血中半減期は数十秒）、②肝指向性に極めて乏しい、③細胞外から作用発揮の場である細胞内への移行性が全くない、などの致命的欠点から十分な治療効果を発揮できず、これらを克服し得る薬物送達戦略の開発が待望されている。申請者はこれまでに、『粒子径100nm以下のナノマテリアルが全身投与後、選択的かつ効率良く肝臓に送達され、かつナノマテリアルの粒子表面性状により種々細胞内局在性や細胞選択性を任意に制御できる』という知見を明らかにしている。本知見は、ナノマテリアルが核酸医薬を安定かつ効率的に肝臓さらには肝実質細胞内に送達することで、核酸医薬の優れた送達キャリアになり得る可能性を強く示唆するものである。そこで当該研究では、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA・プラスミドなどの核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCVに対する次世代治療戦略を提示するものである。平成24年度には、表面修飾の異なる非晶質ナノシリカを用い、プラスミド導入キャリアーとしての有用性をin vitro、in vivoで評価した。その結果、in vitroにおいては、いずれの非晶質ナノシリカにおいても、市販の遺伝子導入試薬と比較して、遺伝子導入効率の向上を達成することはできなかった。一方で、in vivoにおいては、プラスミド単独投与群と比較して、ナノシリカ・プラスミド複合体の投与群において、肝臓で顕著に高い遺伝子導入を達成可能であることが判明した。以上の結果から、詳細なメカニズム解明が必要ではあるものの、非晶質ナノシリカはin vivoにおいて、肝臓での高い遺伝子発現を可能とする優れた遺伝子導入キャリアーであることが判明した。今後、本研究成果を発展させることで、HCVに対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV治療に多大に貢献し得ると期待される。

A. 研究目的

インターフェロン（IFN）療法の確立は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染者の劇的な死亡率低下を

もたらし、C型肝炎は“致命的な病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。一方で、重篤な副作用によるIFN療法の中断、薬剤耐性ウイルスの頻

発、高額費用などの解決すべき問題が多数残されており、新たな観点からの治療薬開発が世界的に望まれている。本観点から、siRNA やプラスミドなどの核酸医薬が、次世代型画期的医薬品として注目されている。しかし核酸医薬は一般に、①血中で速やかに分解される（血中半減期は数十秒）、②肝指向性に極めて乏しい、③細胞外から作用発揮の場である細胞内への移行性が全くない、などの致命的欠点から十分な治療効果を発揮できず、これらを克服し得る薬物送達戦略の開発が待望されている。申請者はこれまでに、『粒子径 100 nm 以下のナノマテリアルが全身投与後、選択的かつ効率良く肝臓に送達され、かつナノマテリアルの粒子表面性状により種々細胞内局在性や細胞選択性を任意に制御できる』という知見を明らかにしている。本知見は、ナノマテリアルが核酸医薬を安定かつ効率的に肝臓さらには肝実質細胞内に送達することで、核酸医薬の優れた送達キャリアになり得る可能性を強く示唆するものである。そこで当該研究では、申請者独自の知見を基盤とし、ナノマテリアルによる『siRNA やプラスミドなどの核酸医薬の肝臓送達システムの新規開発』を図り、HCV に対する次世代治療戦略を提示するものである。

平成 22 年度には、肝臓特異的に移行するナノマテリアルのスクリーニングを試みた。研究代表者はこれまでに、直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) が、100 nm 以上の素材とは異なる体内動態を有し、静脈内投与後 80-90% が肝実質細胞などの肝臓組織に移行することを明らかにしている。そこで、非晶質ナノシリカ以外のナノマテリアルを用いて、肝臓移行能に優れたナノマテリアルのスクリーニングを試みた。Q ドットは、体内画像診断用試薬としてマウスレベルで汎用されるナノマテリアルであり、表面修飾など種々物性のものが存在している。そこで、4 種類の Q ドット（①表面がカルボキシル基で修飾されたもの、②表面が細胞内移行ペプチドで修飾されたもの、③表面がポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたもの、④表面が PEG で修飾され、か

つ、PEG 先端がアミノ基修飾されたもの)を用い、in vitro での細胞内移行能とマウスでの体内動態を評価した。その結果、in vitro では、上記②が最も細胞内移行に優れ、他の 3 種類の Q ドットは全く細胞内に移行しなかった。一方で、マウスに静脈内投与後の体内動態を検討した結果、上記④の PEG 修飾 Q ドットが肝臓に選択的に移行することが明らかとなった。

平成 23 年度には、粒子径・表面修飾の異なる Q ドットを用い、siRNA 導入キャリアーとしての有用性を in vitro で評価した。その結果、表面が細胞内移行ペプチドやアミノ基で修飾された Q ドットは、未だ不十分ではあるものの、siRNA による遺伝子発現抑制効果が認められ、siRNA の細胞内導入キャリアーになり得る可能性が示された。また、非晶質シリカの、核酸医薬の細胞内導入効率の低さの原因を追及するために、細胞内動態を精査した。その結果、非晶質シリカは優れた細胞内移行活性を有することから、核酸医薬と非晶質シリカの複合体形成条件を精査する必要性が明らかとなった。

これまでの結果を鑑み、平成 24 年度には、表面修飾の異なる非晶質ナノシリカを用い、プラスミド導入キャリアーとしての有用性を in vitro、in vivo で評価した。

B. 研究方法

in vitroにおける遺伝子導入効率の検討 (プラスミドを用いた検討)

HepG2 細胞を 1.5×10^4 cells/well となるように、96 穴プレートに播種し、24 時間培養した。24 時間後、PBS で洗浄後、DMEM、1%抗生物質 (FCS フリー) のアッセイ用培地 $80 \mu\text{L}/\text{well}$ に入れ替えた。遺伝子導入には、プラスミド導入試薬 FuGENE (FuGENE HD Transfection Reagent : Roche)、ルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Control Vector) を用いた。プラスミドを終濃度 $100 \text{ ng}/\text{well}$ 、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう opti-MEM にそれぞれ混和し、15 分間室温にて、インキュベートした。15 分のインキュベート後に、FuGENE を終濃度 250、50、10、0 nL/well となるように添加して、さらに 15 分間インキュベートした。インキュベート後に、 $20\mu\text{L}$ ずつ、各 well に添加した。添加 24 時間後に、ルシフェラーゼ発現効率からプラスミド導入効率を評価した。各 well に $100\mu\text{L}$ のルシフェラーゼ測定試薬 (One-Glo Luciferase Assay SYstem : Promega) を加え、3 分間静置した後、1 秒の露光で発光量を測定して、ルシフェラーゼ発現強度を比較した。細胞傷害性は WST-8 アッセイにより評価した。

in vitroにおける遺伝子導入効率の検討 (siRNA を用いた検討)

ルシフェラーゼを発現する肝細胞株を 1.5×10^4 cells/well となるように、96 穴プレートに播種し、24 時間インキュベートした。PBS で洗浄後に、DMEM、1%抗生物質、1%G418 (FCS-) のアッセイ用培地 $80 \mu\text{L}/\text{well}$ に入れ替えた。siRNA の導入には、siRNA 導入試薬 (Lipofectamine RNASiMAX ; invitrogen)、ルシフェラーゼ control siRNA (Stealth RNAi Receptor control Duplease Luciferase control : invitrogen) を用いた。siRNA を終濃度 1.67 nM 、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう opti-MEM にそれぞれ混和し、15 分間室温にて、

インキュベートした。15 分のインキュベート後に Lipofectamine を終濃度 100、50、25、0 nL/well となるように添加して、さらに 15 分間インキュベートした。インキュベート後に、 $20\mu\text{L}$ ずつ、各 well に添加した。添加 24 時間後に、ルシフェラーゼ発現効率から siRNA 導入効率を評価した。各 well に $100\mu\text{L}$ のルシフェラーゼ測定試薬 (One-Glo Luciferase Assay SYstem : Promega) を加え、3 分間静置した後、1 秒の露光で発光量を測定して、ルシフェラーゼ発現強度を比較した。ルシフェラーゼアッセイの Non specific-siRNA とルシフェラーゼ-siRNA のノックダウン効率を比較し、siRNA の導入効率を比較した。細胞傷害性は WST-8 アッセイにより評価した。

in vivoにおける遺伝子導入効率の検討

ルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Control Vector) を 100、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈し、各シリカ溶液 (nSP70、nSP70-C、nSP70-N) を 10、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。上記の溶液を混和して、プラスミド-ナノシリカの混合溶液 (プラスミド : ナノシリカ = 50 : 5、10 : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液) を作成して、30 分間インキュベートした。本溶液 0.2、1mL を、マウスの尾静脈から 5 秒以内に投与した (ハイドロインジェクション)。添加 8 時間後にマウスを解剖し、肝臓中のルシフェラーゼ活性を測定した。

倫理面への配慮

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委

員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」（基発第 0207004 号）【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」（基発第 0331013 号）が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果および D. 考察

in vitro における遺伝子導入効率の検討（プラスミドを用いた検討）

我々はこれまでに、ナノシリカとプラスミドを混合し、複合体を作成した後、*in vitro* で細胞に添加しても、ほとんど遺伝子導入効率の上昇が観察されないことを確認している。これは、ナノシリカ・プラスミド複合体の細胞内取り込みが乏しいためではないかと考えられる。そこで、市販の遺伝子導入試薬を用いて、ナノシリカ・プラスミド複合体を強制的に細胞内に導入した場合、遺伝子発現効率の増加が観察されるかを検討した（図 1）。本検討は、粒子径 70nm の非晶質ナノシリカ（nSP70）と、nSP70 の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾された nSP70-C、nSP70-N を用いた。また、プラスミドには、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼをコードするものを使用した。ナノシリカ・プラスミド複合体を作成した後、濃度を変化させた遺伝子導入試薬（FuGENE）と混和し、細胞に添加した。その結果、これまでの検討結果と一致して、FuGENE 0 ng/mL 添加（コントロールはプラスミド単独であり、ナノシリカ群はナノシリカ・プラスミド複合体）では、ナノシリカによる遺伝子発現の増加は観察されなかった。一方で、FuGENE 10、50 ng/mL 添加

群（とくに 50 ng/mL 添加群）では、コントロール群（プラスミドと FuGENE の混合）では、遺伝子発現が全く認められなかったものの、nSP70、nSP70-N 添加群では、コントロール群と比べて、微弱ながら遺伝子発現の増加傾向が認められた。なお、この際に、細胞傷害性は認められなかった。しかし、FuGENE 250 ng/mL 添加において、コントロール群において非常に高い遺伝子発現が認められたものの、ナノシリカ添加群では全く遺伝子発現の増加が観察されなかった。以上の結果から、ナノシリカは過剰量添加により、FuGENE の効果を阻害する可能性が認められた。一方で、ナノシリカ-プラスミド-FuGENE を適正比率で混和することにより、プラスミド-FuGENE のみではプラスミド導入が困難であるに濃度においても、遺伝子導入が可能である可能性が考えられた。

in vitro における遺伝子導入効率の検討（siRNA を用いた検討）

次に、ナノシリカの siRNA 導入キャリアーとしての有用性を、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼに対する siRNA を用いて評価した（図 2）。本検討においても、nSP70、nSP70-C、nSP70-N を用いて、ルシフェラーゼ発現肝細胞への siRNA 導入効率をルシフェラーゼ活性を指標に評価した（図 2）。まず、ナノシリカと siRNA の複合体を作成し、siRNA の導入効率を評価したところ、コントロールである市販の siRNA 導入試薬を用いた場合、顕著なルシフェラーゼ活性の低下が観察された一方で、ナノシリカによる遺伝子発現の低下は全く認められなかった。そこで本原因が、ナノシリカ・siRNA 複合体の細胞内取り込みが乏しいためではないかと考え、市販の siRNA 導入試薬を用いて、ナノシリカ・siRNA 複合体を強制的に細胞内に導入した場合、遺伝子発現効率の低下が観察されるかを検討した（図 3）。その結果、siRNA 導入試薬と siRNA を混和した場合、siRNA 導入試薬の濃度依存的にルシフェラーゼ活性の低下が観察された。一方で、ナノシリカ・siRNA 複合体と siRNA 導入試薬を共存させた場合、ナノ

シリカが siRNA 導入試薬の効果を減弱させる可能性が示された。以上の結果から、詳細は不明であるものの、*in vitro* において、ナノシリカを siRNA 導入試薬として用いることを非常に困難であると考えられた。

in vitro における遺伝子導入効率の検討 (siRNA を用いた検討)

これまでの検討から、ナノシリカは *in vitro* において、プラスミド、siRNA どちらを用いた場合においても、効率的な遺伝子導入キャリアーにはなり得ない可能性が示された。一方で、ウイルスベクターを用いた検討では、*in vitro* の遺伝子発現効率が極めて低い場合においても、*in vivo* で高い遺伝子発現を示す例が報告されている。例えば、遺伝子導入キャリアーとして汎用されるアデノウイルスベクターにおいて、血中安定性を向上させる目的で高分子ポリエチレングリコールで表面修飾した場合、アデノウイルスと感染受容体との結合が阻害されるため、*in vitro* においては顕著な遺伝子発現の低下が観察される。しかし、静脈内投与した場合、血中安定性の増加に伴う肝集積性の増大も相俟って、未修飾のアデノウイルスベクターと比較して、肝臓で有意に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなっている。そこで、ナノシリカの遺伝子導入キャリアーとしての可能性を *in vivo* において評価した。本検討においても、nSP70、nSP70-C、nSP70-N を用いた。また、プラスミドには、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼをコードするものを使用した。まず、プラスミド単独をマウスに静脈内投与して、肝臓における遺伝子発現を評価した (図 4)。その結果、プラスミド単独では全く遺伝子発現の増加は観察されなかった。一方で、ナノシリカ・プラスミド複合体を静脈内投与した場合、nSP70 や nSP70-C ではほとんど遺伝子発現が認められなかったものの、nSP70-N では、プラスミド単独群と比較して高い遺伝子発現が観察された。

現在、動物実験レベルにおいて、肝臓での高い遺伝子発現効果を期待する場合、ハイドロダイナ

ミック法が汎用されている。通常、マウスに静脈内投与する場合、100~200 μL の溶液を投与する。一方でハイドロダイナミック法では、1 mL 程度の過剰量のプラスミド溶液を約 5 秒以内に静脈内投与する方法であり、本方法では、肝臓で高い遺伝子発現を達成可能であることが多数報告されている。本方法は、過激かつ臨床では適用困難な方法であると考えられるが、投与ルートを変更した方法により、臨床応用も期待されている。そこで、プラスミドをハイドロダイナミック法により投与したところ、先ほどの結果と同様に通常の投与方法では全く遺伝子発現の上昇が観察されない一方で、ハイドロダイナミック法により肝臓で高い遺伝子発現が観察された (図 5)。次に、ナノシリカ・プラスミド複合体をハイドロダイナミック法により投与した。その結果、nSP70-C 群では、プラスミド単独群とほぼ同等の遺伝子発現であった一方で、nSP70 および nSO70-N 投与群では、プラスミド単独群の約 7 倍の遺伝子発現の増大が観察された。また、肝臓傷害の指標である ALT を評価したところ、ハイドロダイナミック法により ALT の上昇が認められたが、nSP70-N 群では大差は認められなかった。以上の結果から、今後、より詳細な検討が必要ではあるものの、ナノシリカは *in vivo* において、肝臓を標的とした遺伝子導入キャリアーになり得る可能性が示された。

E. 結論

これまでの結果を鑑み、平成 24 年度には、表面修飾の異なる非晶質ナノシリカを用い、プラスミド導入キャリアーとしての有用性を *in vitro*、*in vivo* で評価した。その結果、*in vitro* においては、いずれの非晶質ナノシリカにおいても、市販の遺伝子導入試薬と比較して、遺伝子導入効率の向上を達成することはできなかった。一方で、*in vivo* においては、プラスミド単独投与群と比較して、ナノシリカ・プラスミド複合体の投与群において、肝臓で顕著に高い遺伝子導入を達成可能であることが判明した。特に、肝臓での遺伝子発現に汎

用されるハイドロダイナミック法（臨床応用も図られている）を適用した場合には、肝臓で非常に高い遺伝子発現が観察された。以上の結果から、詳細なメカニズム解明が必要ではあるものの、非晶質ナノシリカは *in vivo* において、肝臓での高い遺伝子発現を可能とする優れた遺伝子導入キャリアーであることが判明した。今後、本研究成果を発展させることで、HCV に対する核酸医薬開発の最大の問題点を克服可能であり、HCV 治療に多大に貢献し得ると期待される。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

該当事項無し

②学会発表

国外

該当事項無し

国内

1. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 市橋宏一,

吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 抗原プロセッシングに着目した非晶質ナノシリカのハザード同定., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.

2. 永野貴士, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 國枝章義, 畑 勝友, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの創製に資する microRNA の安全性評価マーカーとしての有用性評価., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

該当事項無し

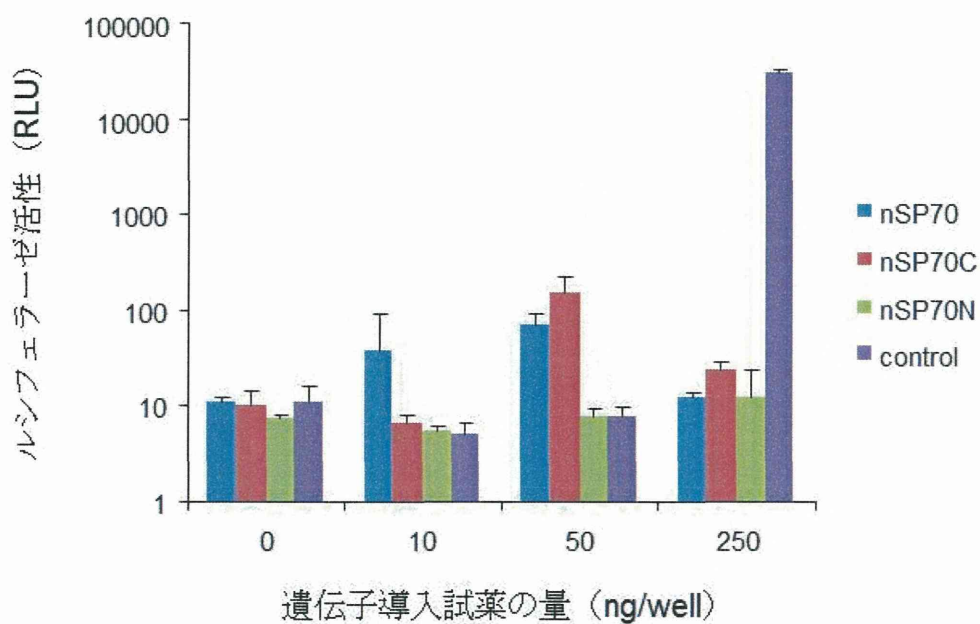


図 1. ナノシリカによる遺伝子導入効率の検討.

遺伝子導入には、プラスミド導入試薬 FuGENE (FuGENE HD Transfection Reagent : Roche)、ルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-Control Vector) を用いた。プラスミドを終濃度 100 ng/well、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 100 µg/mL になるよう混和した後に、市販の遺伝子導入試薬を終濃度 250、50、10、0 ng/well となるように添加し、HepG2 細胞に添加した。添加 24 時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

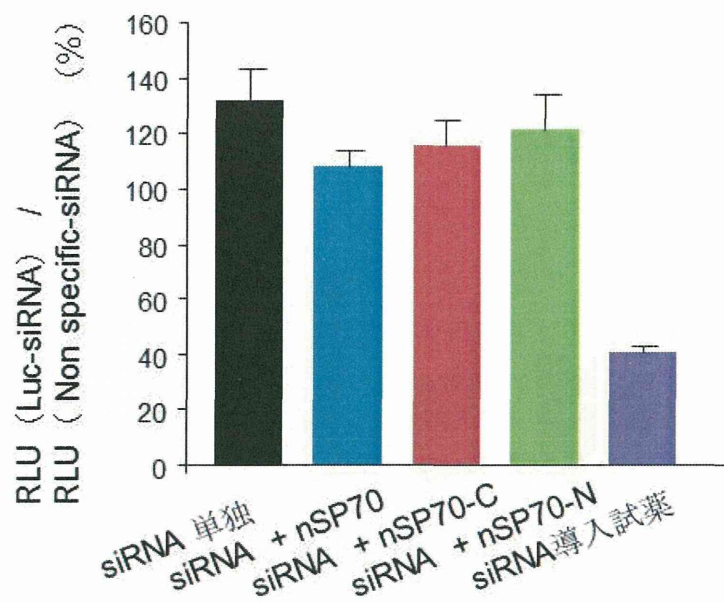


図 2. ナノシリカによる siRNA 導入効率の検討.

siRNA の導入には、siRNA 導入試薬 (Lipofectamine RNASiMAX ; invitrogen)、ルシフェラーゼ control siRNA (Stealth RNAi Receptor control Duplease Luciferase control : invitrogen) を用いた。siRNA を終濃度 1.67 nM、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 20 µg/mL になるよう混和した後、ルシフェラーゼ発現細胞に添加した。添加 24 時間後に、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

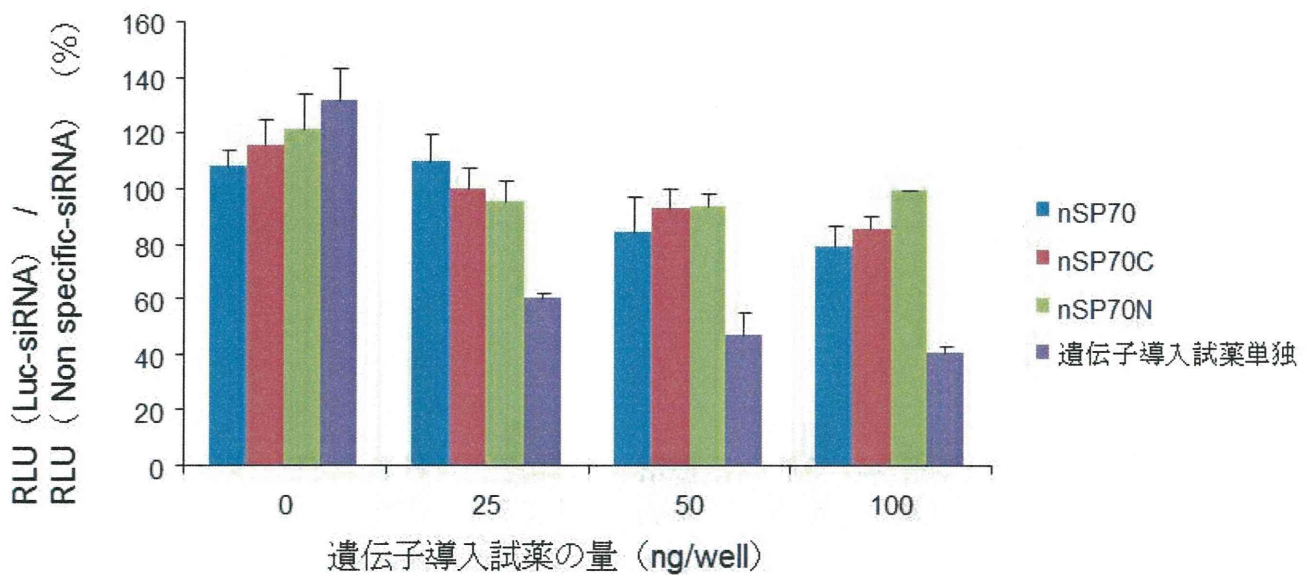


図 3. ナノシリカによる siRNA 導入効率の検討.

siRNA の導入には、siRNA 導入試薬 (Lipofectamine RNASiMAX ; invitrogen)、ルシフェラーゼ control siRNA (Stealth RNAi Receptor control Duplease Luciferase control : invitrogen) を用いた。siRNA を終濃度 1.67 nM、及び nSP70、nSP70-C、nSP70-N を終濃度 20 µg/mL になるよう混和した後に、遺伝子導入試薬を終濃度 100、50、25、0 nL/well となるように添加した。それら混合物をルシフェラーゼ発現細胞に添加し、24 時間後に、ルシフェラーゼ発現効率から siRNA 導入効率を評価した。

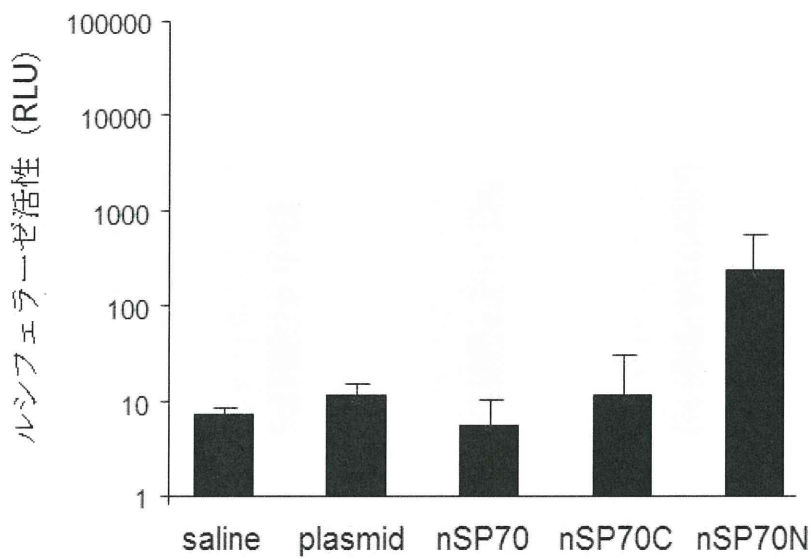


図4. マウスにおけるナノシリカの遺伝子導入効率の検討

ルシフェラーゼ発現プラスミドと、各シリカ溶液（nSP70、nSP70-C、nSP70-N）を混和した後、マウスに静脈内投与した。添加8時間後にマウスを解剖し、肝臓中のルシフェラーゼ活性を測定した。

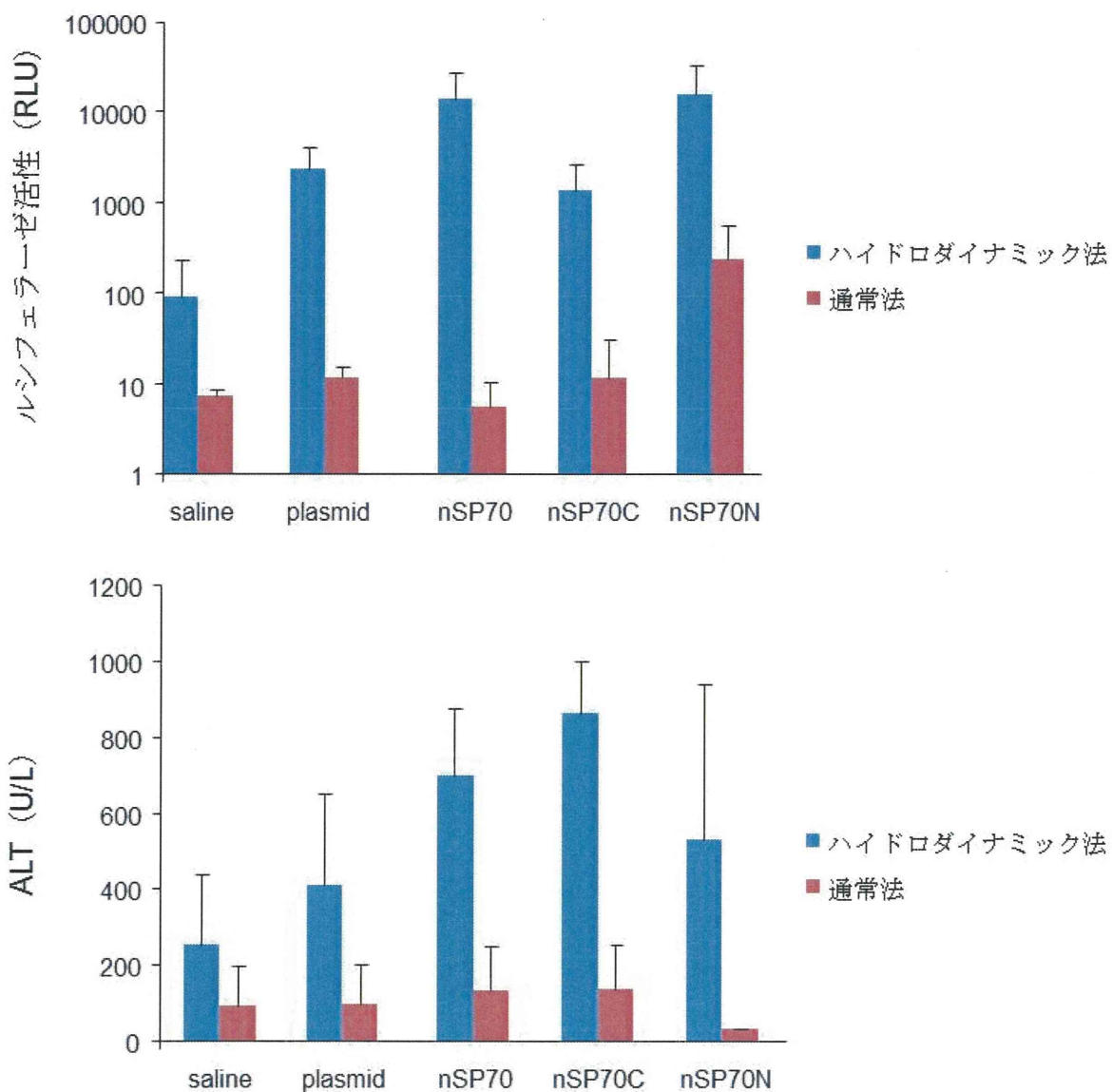


図 5. マウスにおけるナノシリカの遺伝子導入効率の検討

ルシフェラーゼ発現プラスミドと、各シリカ溶液 (nSP70、nSP70-C、nSP70-N) を混和した後、マウスの尾静脈から 5 秒以内に投与した (ハイドロインジェクション)。添加 8 時間後にマウスを解剖し、肝臓中のルシフェラーゼ活性を測定した。

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
無し					

