

- [27] S.C. Semple, S.K. Klimuk, T.O. Harasym, N.D. Santos, S.M. Ansell, K.F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P.R. Cullis, M.J. Hope, P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochim. Biophys. Acta* 1510 (2001) 152–166.
- [28] E. Ambegiaa, S. Ansell, P. Cullis, J. Heyesa, L. Palmera, I. MacLachlan, Stabilized plasmid–lipid particles containing PEG–diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression, *Biochim. Biophys. Acta* 1669 (2005) 155–163.
- [29] J. Heyes, K. Hall, V. Tailor, R. Lenz, I. MacLachlan, Synthesis and characterization of novel poly(ethylene glycol)–lipid conjugates suitable for use in drug delivery, *J. Control. Release* 112 (2006) 280–290.
- [30] J. Conner, M.B. Yatvin, L. Huang, pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984) 1715–1718.
- [31] A.D. Judge, M. Robbins, I. Tavakoli, J. Levi, L. Hu, A. Fronda, E. Ambegia, K. McClintock, I. MacLachlan, Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 661–673.
- [32] J. Heyes, L. Palmer, K. Bremner, I. MacLachlan, Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J. Control. Release* 107 (2005) 276–287.
- [33] S.C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A.P. Sandhu, B.R. Mui, C.K. Cho, D.W. Sah, D. Stebbing, E.J. Crosley, E. Yaworski, I.M. Hafez, J.R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K.G. Rajeev, K.F. Wong, L.B. Jeffs, L. Nechev, M.L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M.A. Maier, M. Srinivasulu, M.J. Weinstein, Q. Chen, S.A. Barros, S. De, S.K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W.L. Cantlev, Y.K. Tam, M. Manoharan, M.A. Ciufolini, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P.R. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 172–176.
- [34] I.M. Hafez, P.R. Cullis, Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 139–148.
- [35] M. Takahashi, C. Nagai, H. Hatakeyama, N. Minakawa, H. Harashima, A. Matsuda, Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 5787–5793.
- [36] P. Erbacher, A.C. Roche, M. Monsigny, P. Midoux, Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes, *Exp. Cell Res.* 225 (1996) 186–194.
- [37] M.A. Wolfert, L.W. Seymour, Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro, *Gene Ther.* 5 (1998) 409–414.
- [38] Y.H. Choi, F. Liu, J.S. Kim, Y.K. Choi, J.S. Park, S.W. Kim, Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier, *J. Control. Release* 54 (1998) 39–48.
- [39] A. Akinc, M. Thomas, A.M. Klibanov, R. Langer, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.* 7 (2005) 657–663.

## 新規 pH 応答性カチオン性脂質を用いた効率的な short interference RNA (siRNA) デリバリーシステムの開発

佐藤悠介,\* 畠山浩人, 兵藤 守, 秋田英万, 原島秀吉

### Development of an Efficient Short Interference RNA (siRNA) Delivery System with a New pH-Sensitive Cationic Lipid

Yusuke Sato,\* Hiroto Hatakeyama, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, and Hideyoshi Harashima  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University;  
Kita 12 Nishi 6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan.

(Received July 30, 2012)

The development of a carrier for the delivery of siRNA is a factor in the realization of RNA interference (RNAi) therapeutics. Modification of siRNA carriers with polyethylene glycol, *i.e.*, PEGylation, is a general strategy for stabilizing a particle in the blood stream and delivering it to tissue or cells. However, it is well-known that, when a carrier is modified by PEGylation, it results in a significant inhibition of both cellular uptake and the endosomal escape process. In a previous study, we reported on the development of a multifunctional envelope-type nano device (MEND) for delivering siRNA and peptide-based functional devices for overcoming the effects conferred by PEGylation and succeeded in the delivery of siRNA to tumor tissue. In this study, we noticed that the pH-sensitive property, changing from neutral to cationic in response to a decrease in pH, could avoid the inhibition caused by PEGylation and succeeded in synthesizing a pH-sensitive cationic lipid, YSK05. The YSK05-MEND had a higher fusogenicity and potency for endosomal escape than other MENDs containing conventional cationic lipids. The PEGylated YSK05-MEND induced efficient gene silencing and avoided the inhibition of endosomal escape caused by PEGylation followed by optimization of the lipid composition. Furthermore, the intratumoral injection of the PEGylated YSK05-MEND resulted in a more efficient gene silencing compared with MENDs containing conventional cationic lipids. Thus, the YSK05-MEND is a promising siRNA carrier for avoiding the inhibition in intracellular trafficking caused by PEGylation both *in vitro* and *in vivo*.

**Key words**—pH-sensitive cationic lipid; short interference RNA; endosomal escape; multifunctional envelope-type nano device; intracellular trafficking

#### 1. はじめに

RNA interference (RNAi) は, RNA を細胞内に導入することにより, その塩基配列特異的に mRNA を切断することで特定の遺伝子発現が抑制される現象であり, 1998 年に Fire や Mello らにより線虫において初めて報告された.<sup>1)</sup> 2001 年, Tuschl らが 3' overhang を有する約 21 塩基対短鎖二本鎖 RNA, いわゆる short interference RNA (siRNA) を発見したことにより,<sup>2)</sup> 哺乳動物細胞においても RNAi 技術が応用可能となり, 現在, 分子生物学などの研

究に欠かせないツールとなっている。さらに, siRNA は理論的にはほぼすべての遺伝子を標的にすることが可能であることから, がんを始めとする難治性疾患に対する次世代医薬として期待されている。<sup>3)</sup> しかしながら, siRNA は pM レベルという極めて低い濃度でその効果を発揮可能である<sup>4)</sup> 一方, 多くの場合, それ単独で使用することは困難である。これは, siRNA が生体内ではヌクレアーゼによって速やかに分解を受け, 非常に不安定であること, また, siRNA は負電荷を有する水溶性高分子であるために, 標的とする組織や細胞に到達しても細胞膜を突破することが極めて困難であることに起因する。すなわち, siRNA を *in vivo* へ応用, さらには医薬へ応用するためには, siRNA を標的組織・細胞に効率的に送達し, その機能を発揮可能なデリバリーシ

The authors declare no conflict of interest.

北海道大学大学院薬学研究院 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

\*e-mail: yukke\_overture@mail.sci.hokudai.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 132 年会シンポジウム S15 で発表したものを中心に記述したものである。

ステムの開発がカギとなると言って過言ではない。

そこで、本稿では、デリバリーシステム開発においてしばしば問題となる「PEG のジレンマ (後述)」を回避することを可能とするわれわれの戦略や現在までの取り組みについて紹介する。

## 2. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND)

siRNA の効果を発揮させるためには、siRNA をキャリアに搭載し、それを投与部位から標的とする組織・細胞に届けるだけでは不十分であり、キャリアを標的細胞に取り込ませ、さらに siRNA が機能する場である標的細胞の細胞質へ送達させる必要がある。すなわち、siRNA デリバリーキャリアの開発では、投与部位から標的組織・細胞への送達という体内動態、さらにその後の標的細胞の細胞質への送達という細胞内動態の両者に存在するいくつものバリアを突破することが可能なキャリアの設計が重要である。

そこでわれわれは理想的な siRNA デリバリーキャリアの構築を目的として、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multifunctional envelope-type nano device; MEND) の開発を行っている (Fig. 1).<sup>5)</sup> MEND は siRNA とポリカチオンとの複合体が脂質二重膜に内封された構造を有している。脂質二重膜には特異的リガンドや血中滞留化素子、また細胞内動態制御素子など多種類の機能性素子を修飾することが可能である。

## 3. 「PEG のジレンマ」

従来の MEND を含めた多くの siRNA キャリアは、負電荷を帯びた siRNA の効率的な搭載や、細胞への高い親和性を目的として表面にカチオン性を帯

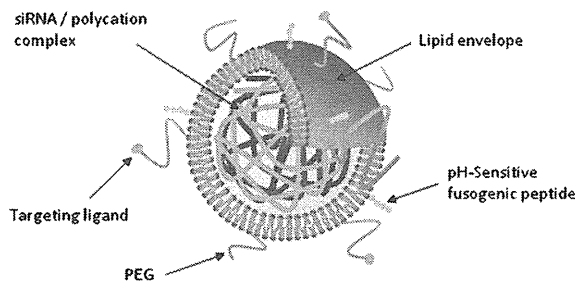


Fig. 1. Schematic Representation of the MEND

MEND particles are composed of a siRNA/polycation complex and a lipid envelope containing various functional devices including fusogenic peptides which enhance endosomal escape, targeting ligands that are designed to enhance specific cellular uptake into targeted cells, and PEGs to improve particle stability in the blood stream.

びている。しかしながら、カチオン性キャリアを静脈内投与すると血漿タンパク質などの生体成分と非特異的に相互作用することで細網内皮系 (reticulo-endothelial system; RES) に認識され、血中から速やかに排除されてしまう。これを回避するために、キャリア表面を水溶性高分子であるポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) で修飾することで表面に水和層が形成され、RES による認識を回避させる手法が広く用いられている。しかしながら、われわれは MEND に PEG を修飾した場合、その修飾量依存的に *in vitro* 培養細胞におけるトランスフェクション活性が著しく低下することを明らかにしている。<sup>6,7)</sup> これは PEG 修飾による水和層の形成により、MEND と細胞膜との相互作用が抑制され、細胞への取り込みやエンドソーム脱出といった細胞内動態が阻害された結果であると考えられる。すなわち、PEG 修飾は体内動態を考えた場合には必須である一方、細胞内動態を考えた場合には邪魔となり、「PEG のジレンマ」ともいべき問題が生じてしまう。<sup>8)</sup> これは体内動態と細胞内動態の両方が制御された理想的なキャリアを開発する上で越えるべき障壁の 1 つであると言える。われわれは既に PEG のジレンマを克服するための独自の機能性素子を開発し、全身投与による *in vivo* がん組織における標的遺伝子の抑制及び抗腫瘍効果の上昇に成功している。<sup>9,10)</sup> これらの戦略は機能性素子を修飾することで PEG のジレンマを「克服する」というアプローチであったが、今回われわれは、従来のキャリアと比較し、体内動態改善に必要な PEG 修飾量を大きく低下させることで PEG のジレンマを「回避する」というアプローチで研究を行った。

## 4. pH 応答性による PEG のジレンマの回避

カチオン性リポソームと中性リポソームにそれぞれ同条件で PEG を修飾した場合、カチオン性リポソームの血中滞留性は中性リポソームに劣ることが知られている。<sup>11)</sup> すなわち、カチオン性リポソームの血中滞留性を中性リポソームと同等にするためには、カチオン性リポソームにより多くの PEG を修飾する必要がある、これは PEG のジレンマの影響を大きくさせる要因である。これまでわれわれが報告してきた MEND は脂質組成にカチオン性脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (Fig. 2) を含んでおり、それに伴って

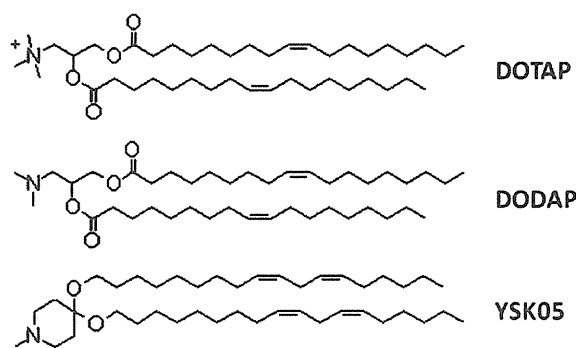


Fig. 2. Chemical Structures of Cationic Lipids Incorporated in MENDs

DOTAP and DODAP are conventional and available cationic lipids which contain quaternary ammonium groups, which are cationic irrespective of the pH, and a tertiary amine, which is positively charged at an acidic pH and neutral at physiological pH, respectively. YSK05 is a cationic lipid that contains a tertiary amine group, which confers pH-sensitivity.

*in vivo* に応用する際には 10 mol% 以上の大量の PEG を修飾していた。そこで、われわれは pH 応答性カチオン性脂質に着目した。これは、血中などの生理的 pH では電氣的に中性を示し、エンドソームなどの酸性環境下ではカチオン性に変化する脂質である。このような性質を示す脂質は既に報告されており、その中でも 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane (DODAP) (Fig. 2) はいくつかの報告例がある。DODAP は親水部分にある三級アミンが pH の低下に伴ってプロトン化することでカチオン性に変化する。<sup>12)</sup> まず、MEND の基準の脂質組成を DOTAP, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) 及び cholesterol (Chol) をモル比で 30 : 40 : 30 とした。DOTAP を DODAP に置き換えた脂質組成で MEND を調製し、脂質膜の見かけの酸乖離定数 ( $pK_a$ ) を、sodium 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonate (TNS) という蛍光物質を利用して評価した。TNS は負電荷と脂溶性部位を持ち、水溶液中ではクエンチングを起こしているが、カチオン性脂質膜と静電的に相互作用することで強い蛍光を発するようになる性質を持ち、pH 応答性リボソーム脂質膜の見かけの  $pK_a$  の測定に用いられる。<sup>13)</sup> 評価した結果、DODAP を含む MEND (DODAP-MEND) 脂質膜の見かけの  $pK_a$  は 5.8 を示し、DODAP-MEND が生理的 pH 以下の範囲で pH 応答性を示すことが確認された (データ未掲載)。次に、DODAP-MEND は従来の DOTAP を含む MEND (DOTAP-MEND) と比較して少な

い PEG 修飾量で優れた血中滞留性を示すかどうかを検証したところ、DODAP-MEND は非常に少ない PEG 修飾量で、従来の DOTAP-MEND と同等以上の血中滞留性を獲得した [Fig. 3(a)]. つまり、カチオン性から pH 応答性に変えることで PEG のジレンマを回避し得る可能性が示唆された。次に、Firefly luciferase に対する siRNA を封入した MEND を、Firefly 及び *Renilla* luciferase を発現する dual-luciferase 安定発現 HeLa 細胞 (HeLa-dluc) にトランスフェクションすることで、各 MEND の遺伝子発現抑制活性を評価した。その結果、DODAP-MEND の *in vitro* 培養細胞における遺伝子発現抑制活性を評価したところ、従来の DOTAP-MEND よりも活性が非常に低いことが明らかとなった [Fig. 3(b)]. pH 応答性 MEND で siRNA の機能を効率よく発揮させるためには、エンドサイトーシスによる細胞への取り込み後、エンドソーム内の pH の低下に素早く反応してカチオン性へと変化すること、また、エンドソーム膜と相互作用して膜融合を効率的に誘起することでエンドソーム脱出することがカギとなると考えられる。しかしながら、DODAP-MEND 脂質膜の見かけの  $pK_a$  は 5.8 であり、エンドソーム内の pH 低下に素早く反応するには難しい低い値であることが予想された。また、赤血球に対する膜障害性を指標に、各 MEND の膜融合性を評価したところ、DODAP-MEND の膜融合性はエンドソームやリソソーム内を模倣した低 pH 条件下においても低く、DODAP-MEND はエンドソーム脱出効率が悪いことが予測された [Fig. 3(c)]. したがって、体内動態だけではなく細胞内動態にも優れた pH 応答性 MEND の構築が不可欠であることが明らかとなった。

## 5. 新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 の合成

カチオン性脂質の構造がトランスフェクション活性に大きく影響することが知られており、高い活性を目的として様々なカチオン性脂質が開発されている。<sup>14)</sup> また、siRNA ベンチャー企業である Alnylam Pharmaceuticals 社は、pH 応答性カチオン性脂質の炭化水素鎖の不飽和度、また、炭化水素鎖と親水性部位をつなぐリンカーの種類がキャリアの活性に大きく影響することを見出した。<sup>13,15)</sup> 合理的な構造のデザインに基づいて開発された pH 応答性カチオ

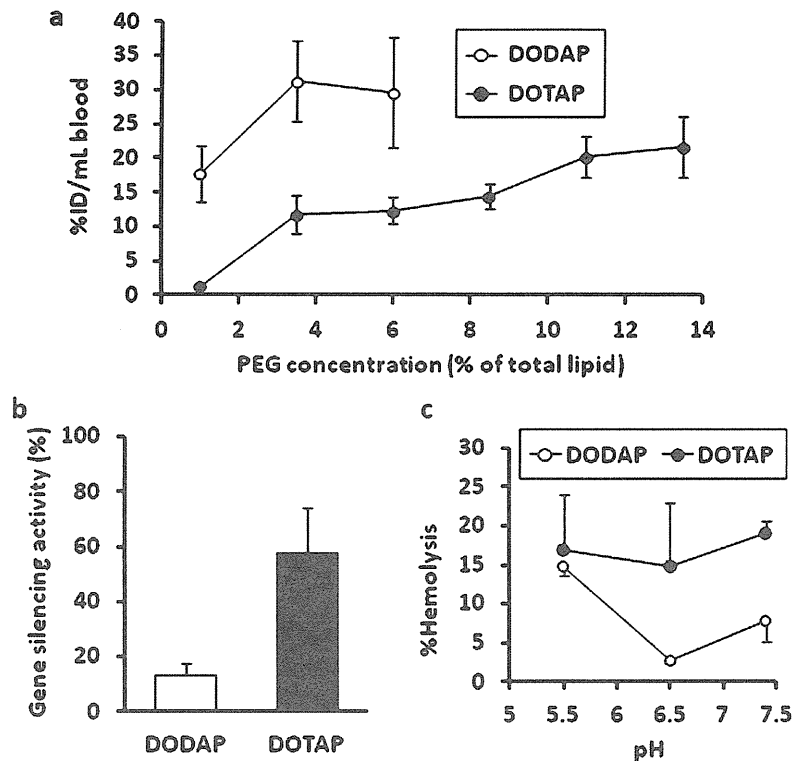


Fig. 3. Stabilities in Blood Stream, Gene Silencing Activities and Hemolytic Activities of DOTAP- and DODAP-MEND

(a) Lipid concentration of [<sup>3</sup>H]-CHE-labeled DODAP- and DOTAP-MEND containing various amount of PEG were evaluated at 6 h after i.v. injection. Data represent as the % injected dose per mL of blood. (b) Gene silencing activities of DODAP- and DOTAP-MEND in HeLa-dluc cells were evaluated at 24 h after transfection. Firefly luciferase activity was normalized by Renilla luciferase activity and treated samples were compared to untreated samples to determine degree of luciferase silencing. (c) Hemolytic activities of DODAP- and DOTAP-MEND were evaluated by measurement of the absorbance of hemoglobin after incubating the MEND and red blood cells in phosphate buffers at various pH values. Data represent the % hemolysis of total hemolysis. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3-4$ .

ン性脂質, DLin-KC2-DMA を含むキャリア (stable nucleic acid lipid particles; SNALP) をマウスやサルに静脈内投与することにより, 肝臓においてそれぞれ ED<sub>50</sub> で 0.02 mg/kg, 0.3 mg/kg という高い活性を達成した.<sup>15)</sup> また, 分子構造などの詳細は非公表であるが, DLin-KC2-DMA よりもさらに高い活性を有する pH 応答性カチオン性脂質 MC3 を含む第二世代 SNALP を用い, 重症高コレステロール血症及び家族性トランスサイレチンアミロイドーシス治療の臨床試験をそれぞれ 2011 年及び 2012 年より開始した.<sup>16,17)</sup> そこでわれわれは, DODAP と比較して見かけの pK<sub>a</sub> 及び膜融合性に優れた新規 pH 応答性カチオン性脂質の開発を試みることにした. 開発の条件として, 原料が安価で容易に入手可能であることや, 合成のプロセスが短く, 再現性や高い収率が確保できることなども考慮した. その結果, われわれは新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 の合成に成功した (Fig. 2).

**6. *In vitro* における YSK05-MEND の機能評価**  
YSK05 を含む MEND (YSK05-MEND) 脂質膜の見かけの pK<sub>a</sub> は 6.6 であり, DODAP-MEND と比較してわずかな pH 低下に反応してカチオン性へ変化可能であることが予想された(データ未掲載). また, DODAP- 及び YSK05-MEND の pH 7.4 における zeta 電位は DOTAP-MEND と比較して有意に低かった [Fig. 4(a)]. すなわち, YSK05-MEND は DODAP-MEND と同様, 生理的 pH においてはほぼ中性を示すことが示唆された. さらに, YSK05-MEND の膜融合性を評価したところ, DOTAP- あるいは DODAP-MEND と比較して低 pH 領域において高い膜融合性を示した [Fig. 4(b)]. 続いて *in vitro* 培養細胞における遺伝子発現抑制活性を評価したところ, YSK05-MEND は他と比較して高い活性を有していた [Fig. 4(c)]. 一方で, 細胞への取り込み量は DODAP-MEND と同程度であり, DOTAP-MEND よりも低かった [Fig. 4(d)]. す

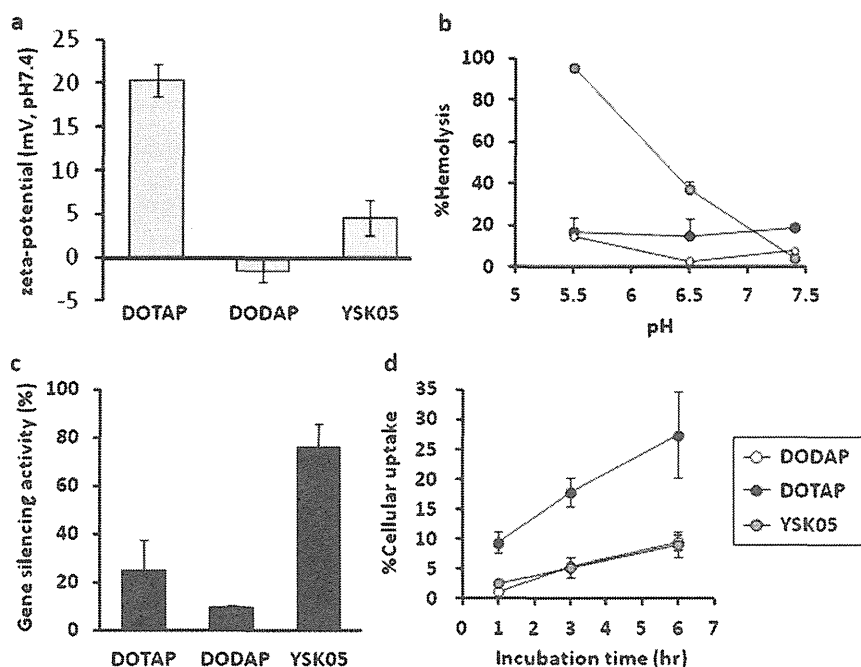


Fig. 4. Comparison of MENDs Containing Each Cationic Lipid *In Vitro*

(a) Zeta-potential of MENDs in 10 mM HEPES buffer at the pH of 7.4 were measured using a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (MALVERN Instrument). (b) Hemolytic activities of MENDs were evaluated as described above. (c) Gene silencing activities of MENDs in HeLa-dluc cells were evaluated as described above. (d) Cellular uptake of [<sup>3</sup>H]-CHE-labeled MENDs in HeLa-dluc cells were evaluated at 1, 3 and 6 h after transfection. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n=3-4$ .

なわち、DODAPをYSK05に変更することで、生理的pHにおいて中性を示す性質は保持しつつ、エンドソーム内の酸性化に素早く反応してカチオン性へと変化し、効率的に膜融合を誘起してエンドソーム脱出を達成したものと考えられる。

## 7. 脂質組成の最適化

高い遺伝子発現抑制活性を達成させるための最適な脂質組成が存在すると考え、まず用いるリン脂質の種類に着目した。分子全体で電気的に中性を示すリン脂質として phosphatidylethanolamine (PE) 及び phosphatidylcholine (PC) がよく用いられている。PEはPCと比較して親水部位が小さく、炭化水素鎖が嵩高いコーン型の分子構造をとり、膜融合性が高いことが知られている。<sup>18)</sup> また、脂質の炭化水素鎖の種類も脂質の性質に大きく影響することが知られている。例えば、飽和脂肪酸は融点が高く、脂質二重膜の運動性は低くなる一方、不飽和脂肪酸は融点が高く、脂質二重膜の運動性は増す。そこで、親水基及び、炭化水素鎖の構造が異なるリン脂質、計5種について比較検討した。YSK05-MENDの脂質組成のリン脂質をそれぞれ変更して粒子を調製し、*in vitro* 培養細胞における遺伝子発現抑制活

性を評価した [Fig. 5(a)]. その結果、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (POPE) を含む組成が、DOPEを含む組成と比較して約3倍高い活性を示した。一方、各種PCを含む組成では活性はほとんど認められず、これは前述の脂質構造に起因すると考えられる。また、各種リン脂質を含むYSK05-MENDの血清中における安定性を評価したところ、POPEを含む組成で最も高い安定性が認められた [Fig. 5(b)]. 一般に、DOPEは膜融合性が高く、*in vitro* において高いトランスフェクション活性が得られることが知られているが、本検討においては意外にもPOPEがそれを上回る活性を示した。これに関するメカニズムは不明であるが、DOPEを含む組成は血清存在下における物理的安定性に乏しかったことが一因と考えられる。続いて、YSK05-MENDに含まれる3種の脂質の割合を様々に変更することで最適化を行った結果、YSK05, POPE, Cholをモル比で50:25:25とした組成を見出し、これを最適化YSK05-MENDとした。最適化YSK05-MENDは最適化前のものと比較して10倍以上の遺伝子発現抑制活性を示し、市販のトランスフェクション試薬であるLipofecta-

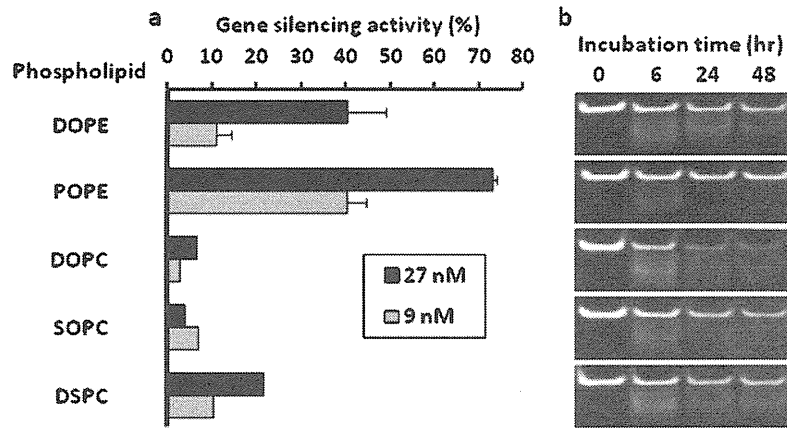


Fig. 5. Effect of Phospholipid Type on Particle Stability in Mouse Serum and Gene Silencing Activity of the YSK05-MEND  
 (a) Gene silencing activities of YSK05-MEND containing each phospholipid in HeLa-dluc cells were evaluated as described above. (b) Tolerability of YSK05-MEND containing each phospholipid in 90% mouse serum was evaluated at 0, 6, 24 and 48 h after incubation at 37°C. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n=1-3$ .

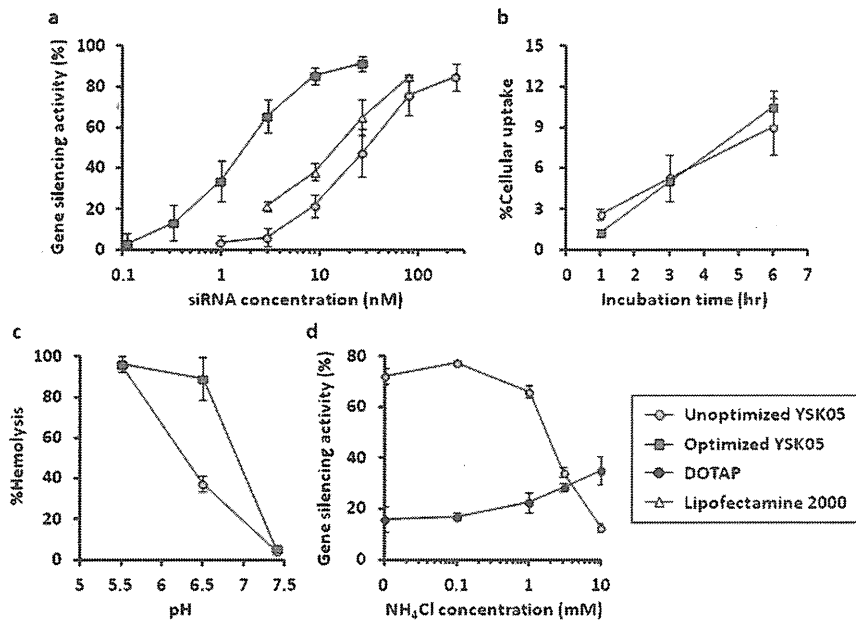


Fig. 6. Evaluation of Optimized YSK05-MEND *In Vitro*

(a) Gene silencing activities of optimized and unoptimized YSK05-MEND and Lipofectamine 2000 were evaluated in HeLa-dluc cells as described above. (b) Cellular uptake of [ $^3$ H]-CHE-labeled optimized and unoptimized YSK05-MEND in HeLa-dluc cells were evaluated as described above. (c) Hemolytic activities of the optimized and unoptimized YSK05-MEND were evaluated as described above. (d) Gene silencing activities of optimized YSK05-MEND and DOTAP-MEND with various concentration of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  were evaluated in HeLa-dluc cells as described above. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n=3-6$ .

mine 2000 と比較して約 10 倍高い活性を達成した [Fig. 6(a)]. また、最適化 YSK05-MEND の細胞内取り込み量は最適化前のもと同程度であった [Fig. 6(b)] 一方、膜融合性は顕著に上昇していた [Fig. 6(c)]. すなわち、最適化により、YSK05-MEND のエンドソーム脱出過程がさらに改善することで、遺伝子発現抑制活性が上昇したことが示唆

された。ここで、最適化 YSK05-MEND がエンドソーム酸性化を引き金としてエンドソーム脱出を行っているかを確認するため、エンドソーム酸性化阻害剤である塩化アンモニウム存在下でのトランスフェクションを行った [Fig. 6(d)]. その結果、対照である DOTAP-MEND の活性は塩化アンモニウム濃度依存的に活性がわずかに上昇した。エンドソーム

酸化阻害によってエンドソームとリソソームとの融合が阻害されることや、リソソーム酵素活性が减弱することが知られており、それによって DOTAP-MEND の一部がリソソームによる分解を回避したことが活性の上昇に起因すると考えられる。その一方、最適化 YSK05-MEND の活性は塩化アンモニウム濃度依存的に顕著に減少した。すなわち、最適化 YSK05-MEND がエンドソーム脱出を達成するためにはエンドソーム酸性化が必須であることが示された。

#### 8. *In vitro* における YSK05-MEND への PEG 修飾の影響

構築した最適化 YSK05-MEND が PEG のジレンマを回避することが可能かを検証するため、比較対照を DOTAP-MEND として PEG 修飾前後の最適化 YSK05-MEND の *in vitro* における評価を行った。DOTAP-MEND 及び最適化 YSK05-MEND の PEG 修飾量はそれぞれ 11 mol%, 5 mol% とした。この PEG 修飾量は各 MEND のマウスにおける血中滞留性を評価して決定したものであり、この条件では最適化 YSK05-MEND の方がやや高い値を示すことを確認している (データ未掲載)。まず *in vitro* 培養細胞への取り込み量を評価したところ、PEG 修飾により取り込み量は大きく減少した [Fig. 7 (a)]。次に遺伝子発現抑制活性を評価したところ、最適化 YSK05-MEND の活性は PEG 修飾により減弱はしたものの、その減少度合いは小さく、PEG 修飾後も市販のトランスフェクション試薬である Lipofectamine 2000 と同等の活性を示した [Fig. 7

(b)]。また、活性の減少幅は取り込み量の減少幅とほぼ同程度であることから、最適化 YSK05-MEND は PEG 修飾により細胞への取り込みは減少したものの、エンドソーム脱出過程は PEG 未修飾のものと同等の効率を維持したものと考えられる。一方、DOTAP-MEND の活性は PEG 修飾により大幅に減少し、ほとんど活性を示さなくなった [Fig. 7 (b)]。PEG 修飾による活性の減少幅の違いは血中滞留化に必要な PEG 修飾量の違いに大きく起因すると考えられ、最適化 YSK05-MEND は *in vitro* 培養細胞において PEG のジレンマを回避したことが示唆された。

#### 9. *In vivo* における YSK05-MEND の機能評価

PEG 修飾最適化 YSK05-MEND が *in vivo* においても *in vitro* と同様に高い活性を示すかどうかを検証した。ヒト腎細胞がん由来 OS-RC-2 細胞をヌードマウスに皮下移植することでがんマウスを作製し、*polo-like kinase 1* (PLK1) に対する siRNA を封入した各 PEG 修飾 MEND を皮下移植がん組織に局所投与した [Fig. 8 (a)]。その結果、DOTAP-及び DOTAP-MEND では PLK1 発現抑制は認められなかった一方、YSK05-MEND では抑制が認められた。コントロールの siRNA 投与群では抑制は認められなかったことから、この抑制は siRNA の配列特異的な効果であることが示唆された。つまり、YSK05-MEND は *in vivo* においても PEG のジレンマを回避し、他の MEND と比較して高い活性を示した結果であると考えられる。さらに、*in vivo* がん組織における PLK1 発現抑制が RNA 干渉を介し

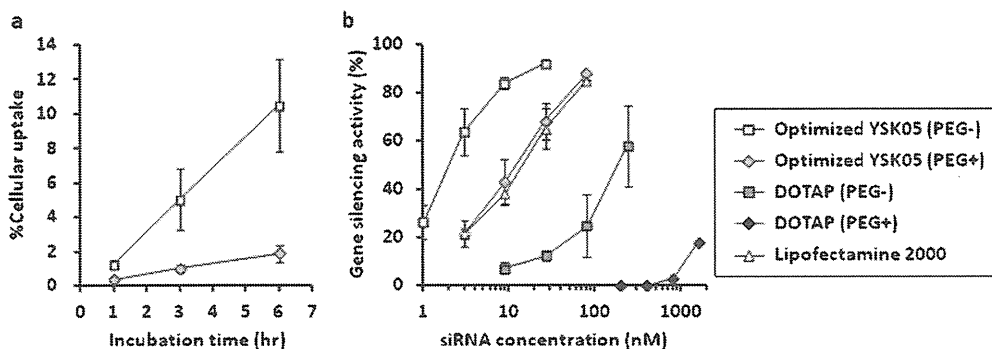


Fig. 7. Effect of PEG Incorporation into Optimized YSK05-MEND *In Vitro*

(a) Cellular uptake of  $[^3\text{H}]$ -CHE-labeled optimized YSK05-MEND with and without PEG were evaluated in HeLa-dluc cells as described above. (b) Gene silencing activities of optimized YSK05-MEND with and without PEG, Lipofectamine 2000 and DOTAP-MEND with and without PEG were evaluated in HeLa-dluc cells as described above. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n=1-3$ .



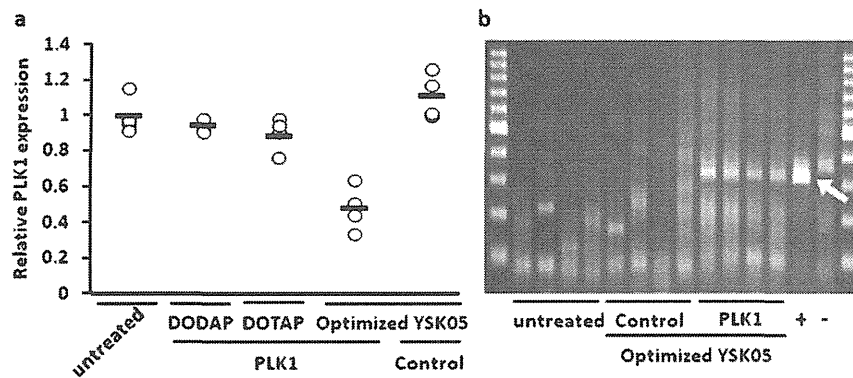


Fig. 8. Evaluation of *In Vivo* Gene Silencing of MENDs Incorporating PEG and Detection of RNAi Specific mRNA Cleavage Products by 5'RACE PCR

(a) *In vivo* gene silencing activities of MENDs incorporating PEG were evaluated in OS-RC-2 subcutaneous implanted tumors at 24 h after the topical injection of MENDs at a dose of 10  $\mu$ g siRNA/tumor. Each circle indicates different tumor tissue and each bar indicates the average. (b) RNAi specific mRNA cleavage products were detected after 24 h topical injection of optimized YSK05-MEND. Positive control from *in vitro* OS-RC-2 cell lysate treated with siRNA indicated plus sign and negative control indicated by minus sign. Each lane represents different tumor tissues. Arrow indicates objective band. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.,  $n=4$ .

ていることを確認するため、5' rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction (5'RACE PCR)を行った。この手法は本来、未知遺伝子のクローニングを行う際に用いられるものであるが、近年、siRNAによる標的遺伝子発現抑制効果が確かにRNA干渉によるものかを証明するためにならず行うべき評価と認識されている。<sup>19)</sup>通常、RNA干渉によるmRNAレベルでの標的遺伝子発現抑制効果を評価するには定量的逆転写PCR法が用いられ、これはRNA干渉による切断・分解を受けずに残ったmRNAを増幅・検出することで、標的遺伝子発現量を定量する。一方で5'RACE PCR法は、RNA干渉により特異的に切断されて生じたmRNA断片を増幅・検出する手法である。未投与及びPEG修飾YSK05-MENDを局所投与したがん組織から抽出したtotal RNAを用いて5'RACE PCR法を行ったところ、未処理及びコントロールsiRNA投与群では矢印で示した目的の位置にバンドは検出されなかった一方、PLK1に対するsiRNAを投与した群のすべての個体で、目的のバンドが明確に検出された [Fig. 8(b)]。すなわち、がん組織におけるPLK1遺伝子発現の抑制は確かにRNA干渉を介したものであることが確認された。

#### 10. おわりに

われわれは新規pH応答性カチオン性脂質YSK05を開発し、*in vitro*及び*in vivo*においてPEGのジレンマを回避可能なsiRNA送達キャリアを構築す

ることに成功した。しかし、PEG修飾によるエンドソーム脱出効率の低下は回避したものの、細胞内取り込みの低下は起きており、標的化リガンドの修飾などによる標的細胞への取り込み量の上昇は今後の課題であると考えている。また、今回はがん組織への局所投与への応用に留まっているが、今後は全身投与での応用へ展開し、その成果を報告していきたい。キャリアの体内動態、腫瘍組織内動態、そして細胞内動態を多角的に評価することで、それらが精密に制御されたsiRNA送達キャリアを開発し、核酸治療の基盤技術の確立に貢献したいと考えている。

#### REFERENCES

- 1) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., *Nature*, **19**, 806-811 (1998).
- 2) Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., *Genes Dev.*, **15**, 188-200 (2001).
- 3) Whitehead K. A., Langer R., Anderson D. G., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 129-138 (2009).
- 4) Vaishnav A. K., Gollob J., Gamba-Vitalo C., Hutabarat R., Sah D., Meyers R., de Fougères T., Maraganore J., *Silence*, **1**, 14 (2010).
- 5) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., *J. Control. Release*, **98**, 317-323 (2004).

- 6) Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Oishi M., Nagasaki Y., Kihira Y., Ueno M., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., *Gene Ther.*, **14**, 68–77 (2007).
- 7) Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Harashima H., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1549–1556 (2007).
- 8) Hatakeyama H., Akita H., Harashima H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 152–160 (2010).
- 9) Hatakeyama H., Akita H., Ito E., Hayashi Y., Oishi M., Nagasaki Y., Danev R., Nagayama K., Kaji N., Kikuchi H., Baba Y., Harashima H., *Biomaterials*, **32**, 4306–4316 (2011).
- 10) Sakurai Y., Hatakeyama H., Sato Y., Akita H., Takayama K., Kobayashi S., Futaki S., Harashima H., *Biomaterials*, **32**, 5733–5742 (2011).
- 11) Semple S. C., Klimuk S. K., Harasym T. O., Santos N. D., Ansell S. M., Wong K. F., Maurer N., Stark H., Cullis P. R., Hope M. J., Csherrer P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1510**, 152–166 (2001).
- 12) Bailey A. L., Cullis P. R., *Biochemistry*, **33**, 12573–12580 (1994).
- 13) Heyes J., Palmer L., Bremner K., MacLachlan I., *J. Control. Release*, **107**, 276–287 (2005).
- 14) Schroeder A., Levins C. G., Cortez C., Langer R., Anderson D. G., *J. Intern. Med.*, **267**, 9–21 (2010).
- 15) Semple S. C., Akinc A., Chen J., Sandhu A. P., Mui B. L., Cho C. K., Sah D. W. Y., Stebbing D., Crosley E. J., Yaworski E., Hafez I. M., Dorkin J. R., Qin J., Lam K., Rajeev K. G., Wong K. F., Jeffs L. B., Nechev L., Eisenhardt M. L., Jayaraman M., Kazem M., Maier M.A., Srinivasulu M., Weinstein M.J., Chen Q., Alvarez R., Barros S.A., De S., Klimuk S. K., Borland T., Kosovrasti V., Cantley W. L., Tam Y. K., Manoharan M., Ciufolini M. A., Tracy M. A., Fougerolles A., MacLachlan I., Cullis P. R., Madden T. D., Hope M. J., *Nat. Biotechnol.*, **28**, 172–176 (2010).
- 16) ClinicalTrials.gov, A Service of the U.S. National Institutes of Health: <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01559077?term=ALN-TTR&rank=2>>, cited 6 July, 2012.
- 17) ClinicalTrials.gov, A Service of the U.S. National Institutes of Health: <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01437059?term=ALN-PCS&rank=1>>, cited 6 July, 2012.
- 18) Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413–7417 (1987).
- 19) Judge A. D., Robbins M., Tavakoli I., Levi J., Hu L., Fronda A., Ambegia E., McClintock K., MacLachlan I., *J. Clin. Invest.*, **119**, 661–673 (2009).

