

201308002A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 26(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 26 年(2014)年 3 月

【目 次】

I. 総括研究報告書

- 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. 分担研究報告書

1. 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…………… 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）
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（東京理科大学薬学部生命創薬科学科）
4. 経口遺伝子治療に資するヌクレアーゼ耐性型 DNA-RNA ヘテロ二重鎖核酸の設計と
合成及び機能評価…………… 21
小比賀 聡（大阪大学大学院薬学研究科）

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

研究代表者 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

研究要旨

ビタミン E (VE)核酸医薬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)に PEG を介して VE を結合させた VE-PEG-CCP の合成に成功し、昨年度開発した新規の VE 結合二本鎖アンチセンス核酸(heteroduplex oligonucleotide: HDO)のマウス肝臓における標的遺伝子発現抑制効果を向上させることを示した。また、腸管環境を模した核酸のヌクレアーゼ耐性評価系を新規開発し、VE-HDO の腸管環境における安定性を評価し、適切な核酸修飾を用いることにより新規核酸医薬が腸管環境下でも安定であることを示した。さらに、その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、ヌクレアーゼ耐性を有しかつ RNAi 活性を阻害しない数種のカチオン性人工オリゴ糖の合成に成功した。最後に、VE-siRNA-混合ミセル混合物を霊長類であるカンクイザルに注腸投与して、肝臓の標的遺伝子発現抑制効果によると考えられる表現系の変化を確認し、本事業の最終目的を達成した。

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：東京理科大学薬学部 生命創薬科学科・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

調製した。結合比率は、片岡グループで行った蛍光相関分光法にて HDL と VE-PEG-CCP 及び VE-HDO との結合結果を解析した結果に基づき算出した。得られた核酸送達リポ蛋白複合体を VE-HDO 量にして 0.09mg/kg でマウスに静脈投与し、3 日後の肝臓における ApoB の mRNA 量を定量的 RT-PCR 法(qRT-PCR)で定量した。

2)腸管内を模した評価系における酵素耐性能の評価

ICR 雄性マウス (8~10 週齢)を麻酔下、腸管ループを作製し、生理食塩水を注入して 2 時間インキュベートした。残存する腸内インキュベーション液及び粘膜上皮組織を採取し、生理食塩水を加えてホモジナイズした後、4°C、3,000×g にて遠心分離して沈殿を除去した。RNase A 活性を 1×10^{-5} unit/ μ l に調整した粘膜ホモジネート液又は腸内インキュベーション液に、小比賀グループが合成した各種核酸 (2.5 μ M)を添加し、37°C でインキュベーションした後、一定時間後に酵素反応を停止したものをサンプルとした。各サンプルを 15%ポリアクリルアミドで電気泳動後、核酸染色し、分解性の評価を行った。

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、マウス及び最終目的としての霊長類動物実験を行なう。

B.研究方法

1)VE-PEG-CCP、VE-HDO と HDL からなる会合体の in vivo での遺伝子発現抑制評価

マウス血清から超遠心法を用いて高比重リポ蛋白 (high-density lipoprotein: HDL)を抽出した。この HDL に VE-PEG-CCP と VE-HDO (ApoB 標的)

なお、今回 HDO を構成する二本の核酸であるアンチセンス鎖(Antisense Oligonucleotide: ASO)とその相補 RNA 鎖(complementary RNA: cRNA)について、それぞれ腸管内での安定性を検討した。問題となるのは化学修飾の少ない cRNA 鎖であることから、ASO を 1 種類に対して cRNA を 5 種類合成した (小比賀グループ)。用いた ASO 並びに各 cRNA の配列とその化学修飾様式を下に示す。

5'-G(L)*A(L)*A*G*G*T*C*A*T*G*G(L)*C(L)*A(L)

cRNA0: 5'-u*g*c*CAUGACCU*u*c-3'

cRNA1: 5'-u*g*c*C*AU*GAC*C*U*u*c-3'

cRNA2: 5'-u*g*c*C*A*U*G*A*C*C*U*u*c-3'

cRNA3: 5'-u*g*c*[CAUGACCU]*u*c-3'

cRNA4: 5'-u*g*c*cAuGAccu*u*c-3'

なお、上記配列中の化学修飾様式は以下の通りである。

X(L): LNA, X: DNA, X: RNA, x: 2'-OMe, \overline{X} : 2'-F,

*: PS 結合

3) 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するカチオン性人工オリゴ糖による二本鎖核酸の酵素耐性能の評価

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸の主構の幅に合致し、核酸のリン酸ジエステル部位の負電荷と効果的に相互作用可能な正電荷を有するオリゴアミノ糖として和田グループに新たに合成されたオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- α -D-マンノース (ODMan) およびオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- β -D-ガラクトース (ODGal) を結合させた二本鎖核酸の酵素耐性能を評価した。

4) 霊長類における VE-siRNA-混合ミセル混合物の遺伝子治療効果の評価

霊長類を用いた実験は、医薬基盤研霊長類医学研究センターにおいて、VE-siRNA/CM によるカンクイザル及びマーモセットを用いた遺伝子治療実験計画 (承認番号 ; DS22-11) に基づいて行った。本検討では、当該施設にて繁殖・飼育された 2.4kg~

2.9kg のカンクイザルを用いた。実験の前日の午後

に絶食を施し、翌朝、投薬 3 時間前にミルク (20g/30ml、約 100kcal) を胃内投与した。各サルを筋肉注射によるケタミン・キシラジン麻酔後、VE-siRNA を 10mg/kg の用量で、脂質分散製剤とした被検液 3ml を直腸内投与し、投与後暫時保定した。投与は一日おきに二回繰り返し、各投与直前および最終投与翌日に採血し、生化学検査を行って肝機能・腎機能等の副作用の評価及び今回の VE-siRNA の標的遺伝子である APOB を抑制することで期待される低比重リポ蛋白 (low-density lipoprotein: LDL) や中性脂肪 (Triglyceride: TG) 等の血清中各種脂質の測定を行った。

(倫理面への配慮)

マウスに係る全ての実験は、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、東京医科歯科大学及び大阪大谷大学の動物実験委員会規定と動物実験指針に基づいて行った。霊長類に係る全ての実験は、独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター内で、(社) 予防衛生協会 研究支援企画部の支援および管理下に行われ、同センターの規定および実験指針に基づき、動物愛護の精神に沿って行った。

C. 研究結果

1) VE-PEG-CCP、VE-HDO と HDL からなる会合体の in vivo での遺伝子発現抑制評価

HDL 及び VE-PEG-CCP と HDL との複合体を投与しても ApoB の mRNA 量の減少は観察されなかった。一方で、VE-HDO と HDL の複合体及び核酸送達リポタンパクを投与した際には、それぞれ 40%、60% 程度の mRNA 量の低下が確認された (図 1)。このことから、VE-PEG-CCP は ApoB の mRNA 量低下には関与せず、なおかつ mRNA 低下には HDO が必要であることが確認された。さらに、VE-PEG-CCP を有する核酸送達リポタンパクの方が VE-HDO と HDL との複合体に比べて mRNA 量の低下が大きかったため、VE-PEG-CCP の存在に

より VE-HDO のエンドソーム脱出が促進され、効率的に HDO を細胞質へ送達可能なことが示唆された。

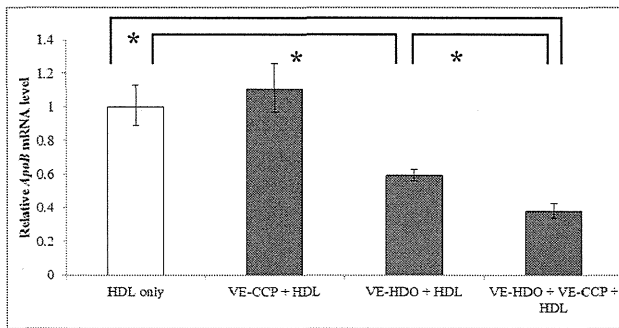


図1. 核酸送達リポタンパク及び関連化合物の静注投与後のマウスの肝臓における ApoB mRNA 量 (*: $p < 0.05$)

2) 腸管内を模した評価系における酵素耐性能の評価

化学合成した各種 cRNA のマウス結腸粘膜ホモジネート中での安定性を調べた (図2)。その結果、コントロールとして用いた天然型 RNA (Naked ssRNA) が5分以内に分解されるのに対し、cRNA0~cRNA4については、その化学修飾の種類や程度に応じて分解耐性特性が異なっていた。すなわち、配列の5'側3残基と3'側2残基のみ2'-OMe体の導入に加えリン酸ジエステル結合をホスホロチオアート化 (PS結合化) した cRNA0 は、天然型 RNA と同じく5分以内に分解されたが、一方で、配列中央部のピリミジン残基部位を PS 化した cRNA1 においては、安定性向上が認められた。また、配列中央部を全て PS 化した cRNA2 については、cRNA1 と顕著な違いは認められず、プリン残基部分の PS 化による安定性向上は限定的である事が確認された。一方、cRNA3 と cRNA4 については、配列中央部のピリミジン残基をそれぞれ2'-F 体及び2'-OMe 体に変換したものであり、配列の両末端側以外にリン酸ジエステル結合部分の PS 化修飾は行っていない。特に、ピリミジン残基の2'-OMe 体にした cRNA4 において優れた安定化効果が認められた。

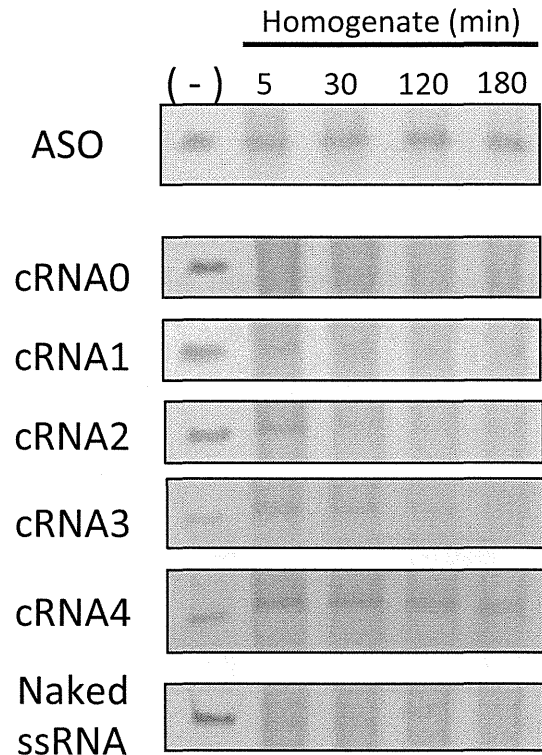


図2. マウス結腸粘膜ホモジネート中における各 cRNA の安定性

3) 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するカチオン性人工オリゴ糖による、二本鎖核酸の酵素耐性能の評価

RNA 二重鎖、 $r(\text{CGCGAAUUCGCG})_2$ と3量体または4量体の ODGal (1当量) の複合体を形成させ、二本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼである RNase A で処理した後に、逆相 HPLC によって加水分解生成物を解析した。その結果、dsRNA 単独では完全に分解される条件で、ODGal 3量体は dsRNA の分解をほとんど抑制できなかったが、ODGal 4量体は顕著に dsRNA の分解を抑制した。

4) 霊長類における VE-siRNA-混合ミセル混合物の遺伝子治療効果の評価

カニクイザル ($n = 3$) に対し、APOB を標的にした VE-siRNA を、リノール酸 (10mM) を吸収促進剤とするナノ脂質分散製剤を一日おきに合計二回、30mg/head/回で注腸投与を行った。

核酸製剤投与前後に採取した血液サンプルの免疫

学的及び生化学的検査から、VE-siRNA 注腸剤投与による肝機能障害等の顕著な副作用は検出されなかった。これに対して、投与後の血清中のトリグリセリド(TG)及びLDL コレステロール(LDLC)の有意な減少、及び HDL コレステロール(HDLC)の有意な上昇が観察された (図 3)。これらの効果は、投与した VE-siRNA による肝臓での APOB 遺伝子発現の抑制効果に基づくものと考えられた。

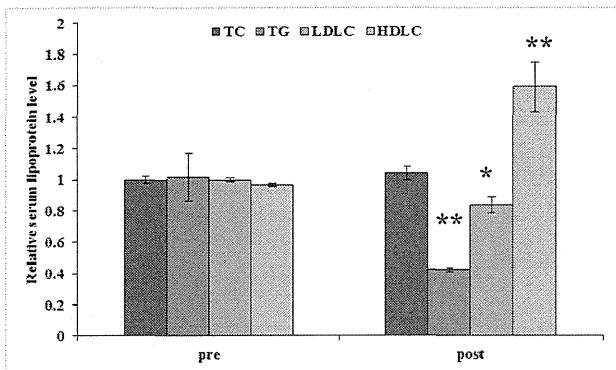


図 3. カニクイザルにおける VE-siRNA 脂質ナノ分散剤投与の血清脂質濃度に及ぼす効果：各個体の投与 1 週前の値を基準として、一回目の核酸投与前のミルク投与直後(pre)と、二回目の核酸投与一日後(post)で採血した値を相対値化して、pre と post で比較した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

D. 考察

核酸医薬品開発において核酸分子の安定性は大きな課題の一つである。特に本研究においては RNase A を中心とした各種核酸分解酵素に対して耐性を持たせることが重要となる。そこで核酸医薬の創薬に必要なことは実際の腸管内環境を模した *in vitro* の評価系の確立であった。今回新たに開発した評価系を用いた実験の結果、VE-siRNA 以上の高い有効性を示す VE-HDO の注腸投与を考慮する際に最大の問題点であった cRNA 鎖の RNase 耐性が、適切な化学修飾によって回避できる可能性が示された。腸管内環境下での各種の化学修飾のなかで、DNA 鎖で汎用されている PS 化より、ピリミジン残基の 2'-OMe 体が高い酵素耐性能を示す事が確認された点は特筆すべき点と思われる。今後は VE-HDO の有効性を保ったまま腸管内環境下で安定となる化学

修飾の種類と修飾挿入部位の決定が必要である。

一方、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するカチオン性人工オリゴ糖について、グルコース骨格を有する誘導体の二本鎖核酸安定化作用は既に示していたが、今年度の研究で新たにマンノース及びガラクトース骨格を有する誘導体の合成にも成功し、特にガラクトース誘導体は 4 量体とすることで RNase A による二本鎖核酸分解をほぼ阻害することを示しており、実際の VE-siRNA 及び VE-HDO への今後の応用が期待される。

一方、核酸医薬の細胞内でのデリバリーにおいて最大の問題となるのが、エンドソーム脱出である。エンドソーム脱出素子として開発された CCP は高いエンドソーム脱出能を示すが、CCP を VE-siRNA や VE-HDO に応用する際に問題となるのが、どのようにして CCP を VE 結合核酸医薬に導入するか、という点であった。VE 結合核酸医薬は生体内で HDL 等のリポ蛋白と結合することが分かっていることから、本年度新規に VE-PEG-CCP を開発・合成した。実際にマウス血清から抽出した HDL に VE-HDO 及び VE-PEG-CCP を結合させた複合体をマウスに投与することで、HDL に VE-HDO のみを結合させた複合体よりも強い標的遺伝子発現抑制効果を確認できた。今後は最適な結合比率の決定等が必要となるが、エンドソーム脱出素子の VE 結合核酸への導入による更なる有効性の向上が期待される。

最後に、本研究の最終目標である霊長類における VE 結合核酸の注腸投与による肝臓での遺伝子治療の可能性について、実際にカニクイザルへの APOB 遺伝子を標的とした VE-siRNA-混合ミセル混合物の注腸投与を行った。投与前後の採血結果を比較すると、投与による LDLC 及び TG の低下を認め、明らかな副作用を認めなかった。LDLC の低下は軽度であるが、LDLC の血中半減期が 2-3 日と長く、初回投与から 3 日後の採血であったことから、実際の LDLC 低下の効果はより高いと考えられる。TG がほぼ半減していることは、血中 TG の多くを占める超低比重リポ蛋白(very low-density lipoprotein: VLDL)の低下を反映している可能性が高く、VLDL

は肝臓から血中に放出された直後の状態であることから、APOBの抑制効果をよりよく示しているものと考えられた。また、HDLは投与前と比較して約1.6倍に上昇しており、一般的な高脂血症治療薬であるスタチン系の抗高脂血症薬投与時の効果と同じ傾向となっていること、今回吸収促進剤として用いたリノール酸にはHDLを増加させず、過剰摂取で寧ろ低下させることが報告されている。よって、今回のAPOBを標的としたVE-siRNA-混合ミセル混合物の注腸投与に伴うこれら血清中脂質の変化は、いずれも肝臓においてAPOBを抑制させた結果生じたためと考えられた。

E. 結論

HDLを担持体として用いることで、VE-核酸とVE-PEG-CCPとの結合体の調製が可能となった。さらに、*in vivo*における遺伝子発現抑制評価において、VE-PEG-CCPの導入は標的遺伝子発現抑制効果の増強に貢献した。

VE-HDOを形成するASO鎖及びcRNA鎖について、腸管環境においてASO鎖が極めて安定である事、さらにはcRNA鎖においても化学修飾を適切に施す事により、十分な安定性を付与することが可能である事が見いだされた。

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、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性人工オリゴ糖として、グルコース、マンノース、ガラクトース骨格を有する誘導体の機能を比較し、ガラクトース誘導体が最も優れた性質を有することが示された。

VE-siRNAの脂質ナノ分散剤が、霊長類においても、肝臓を標的とする経腸デリバリーシステムとして有効であることが示された。

以上から、最終目標である経口核酸医薬の実現に向けた様々な障害の多くを本研究で解決することに成功した。今後更なる最適化を行うことで、臨床応用に向けた進展が大いに期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwata R, Nishina K, Yokota T, Wada T. Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 1394-1403.
2. Piao W, Nishina K, Yoshida-Tanaka K, Kuwahara H, Nishina T, Sakata M, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus. *J Med Dent Sci* 2013; 60: 9-16.

2. 学会発表

(国内学会)

1. 横田隆徳. 画期的な新規核酸医薬の分子技術の創出. 日本化学会第94春季年会イブニングセッション, 名古屋, 2014.3.29.
2. 筋野裕美子, 仁科一隆, 朴文英, 田中規恵, 仁科智子, 桑原宏哉, 水澤英洋, 横田隆徳. 新規核酸の静脈内投与による家族性アミロイドポリニューロパチーに対する遺伝子治療. 第23回アンチセンスシンポジウム, 徳島, 2013.11.29.
3. 仁科一隆, 朴文英, 田中(吉田)規恵, 仁科智子, 桑原宏哉, 水澤英洋, 横田隆徳. DNA/RNAヘテロ二重鎖核酸を用いた効果的な遺伝子抑制法の開発. 第23回アンチセンスシンポジウム, 徳島, 2013.11.29.
4. 横田隆徳. 新規核酸医薬の開発. 第5回日本RNAi研究会, 広島, 2013.8.30.
5. 横田隆徳. TTRアミロイドーシスの遺伝子治療. 第1回日本アミロイドーシス研究会学術集会シンポジウム2アミロイドーシスの発症機序とその制御, 東京, 2013.8.30.
6. 横田隆徳. 新規核酸医薬の開発. 第15回分子

複合医薬研究会, 大阪, 2013.7.12.

7. 朴文英, 仁科一隆, 田中規恵, 桑原宏哉, 仁科智子, 横田隆徳, 水澤英洋. アンチセンスオリゴヌクレオチドの脈絡叢への効率的なデリバリー. 第54回日本神経学会学術大会. 東京. 2013.6.31.

8. 仁科一隆, 朴文英, 田中規恵, 仁科智子, 桑原宏哉, 横田隆徳, 水澤英洋. 新規核酸医薬を用いた家族性アミロイドポリニューロパチーの治療法の確立. 第54回日本神経学会学術大会. 東京. 2013.6.30.

3.その他

特になし

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許出願

発明の名称: 薬剤送達用のキャリア、コンジュゲートおよびこれらを含んでなる組成物並びにこれらの投与方法

出願人: 東京医科歯科大学

発明人: 横田隆徳, 桑原宏哉, 仁科一隆, 水澤英洋.

出願番号: 特願 2013-242347

出願日: 2013.11.22

発明の名称: System for Delivering Nucleic Acids for Suppressing Target Gene Expression by Utilizing endogenous Chylomicron.

出願人: 東京医科歯科大学

発明人: Takanori Yokota, Kazutaka Nishina, Hiswhiro Mizusawa, Toshinori Unno.

米国出願番号: 13/668,668

米国登録番号: 8,507,458

米国分割出願日: 2012.11.5

米国登録日: 2013.8.13

2.実用新案登録

特になし

II. 分担研究報告

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

研究分担者 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

研究要旨

本分担研究では、VE-核酸/CM の核酸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核酸キャリアの開発を行っている。本年度は、VE が PEG スペーサーを介して CCP と結合した VE-PEG-CCP の合成に成功した。さらに、得られた VE-PEG-CCP と VE-核酸とで核酸デリバリーキャリアを調製するにあたり、HDL を担持体として選択することで、双方が同時に結合された会合体を調製可能なことを発見した。調製された会合体の遺伝子発現抑制試験を実験マウスにて行ったところ、VE-CCP を会合体に結合することで遺伝子発現抑制効果が向上することが明らかとなった。

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 を CM や HDL(high density lipoprotein)等のリポタンパク質と結合させるために、VE と CCP とが PEG スペーサーを介して連結された VE-PEG-CCP を開発した (図 1)。得られた VE-PEG-CCP は、生体由来のリポタンパク質を介した VE-核酸との会合体調製 (核酸送達リポタンパク) を可能とし (図 2)、なおかつ動物実験レベルでの遺伝子発現抑制効果の向上が

確認された。本年度において開発されたシステムにより、CCP と核酸との会合体の in vivo における有効性が実証された。

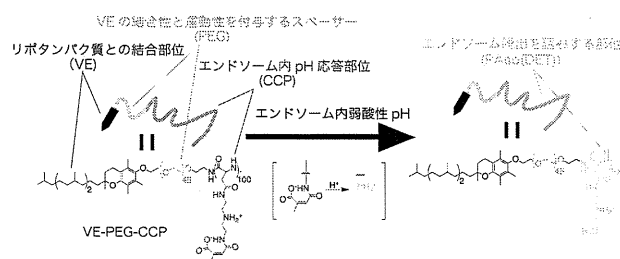


図 1. VE-PEG-CCP の化学構造及びイラスト

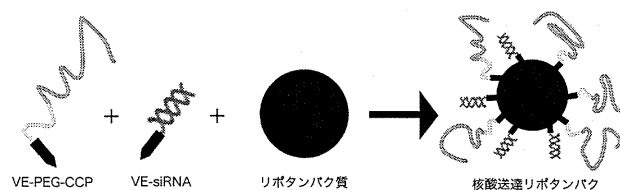


図 2. 核酸送達リポタンパクのイラスト

B.研究方法

1) VE-PEG-CCP の合成

VE-PEG-NH₂ を開始剤とした β -benzyl-L-aspartate-N-carboxyanhydride (BLA-NCA) の重合を行うことで、VE-PEG-PBLA を合成した。得られた VE-PEG-PBLA に対し、diethylenetriamine (DET) を反応させて VE-PEG-PAsp(DET) を合成した。さらに、

Citraconic anhydride を反応させることで、目的物である VE-PEG-CCP (VE-PEG(PAsp(DET-Cit))) を合成した (図 3)。

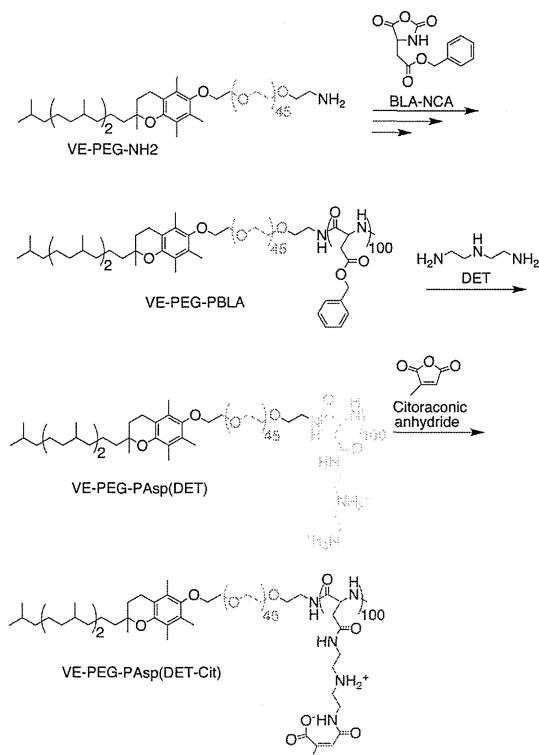


図 3. VE-PEG-CCP の合成スキーム

2) VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の CM や HDL との会合体形成評価

VE-PEG-CCP に Cy5 標識したもの (1 分子あたり 1 つの Cy5 分子を導入) と Cy3 標識した VE-siRNA を用いてリポタンパク質との会合体形成挙動を蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) により解析した。PEG-VE-CCP 及び VE-siRNA の濃度を 100nM に固定して混合し、2 種類のリポタンパク質 (CM、HDL) を混合することで PEG-VE-CCP 由来の拡散時間の変化を観察した。

3) VE-PEG-CCP、VE-HDO と HDL からなる会合体の in vivo での遺伝子発現抑制評価

in vivo での核酸送達リポタンパク質の遺伝子発現抑制評価を行うにあたって、siRNA 以上の効能を有する HDO (HeteroDuplex Oligonucleotide) を用いた。VE-PEG-CCP と VE-HDO (ApoB 標的) と

を HDL を介して結合し、核酸送達リポタンパク質を調製した。得られた核酸送達リポタンパク質を HDO にして 0.09mg/kg の量をマウスに静脈投与し、3 日後の肝臓における ApoB の mRNA 量を qRT-PCR で定量した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) VE-PEG-CCP の合成

VE-PEG-NH₂ を開始剤とした VE-PEG-PBLA の合成において、PBLA の平均重合度が 100 の高分子が得られた (Mw/Mn=1.1)。さらに、それに続く PBLA 側鎖への DET 導入及び CCP 構造の導入により、目的物である VE-PEG-CCP (VE-PEG-PAsp(DET-Cit)) の合成に成功した。PAsp 側鎖への CCP 構造の導入率は ¹H NMR 解析により、>95%であった。

2) VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の CM や HDL との会合体形成評価

まず、リポタンパク質を加えない場合の両者の拡散時間はそれぞれ VE-PEG-CCP で 2800µs、VE-siRNA で 900µs であることから、リポタンパク質の非存在下では両者は会合しないことが示された。そして、CM を混合した際にはその濃度上昇に応じて両者ともに拡散時間は増大したものの、等しい数値を示さなかった (図 4)。このことから、CM を介して両者が結合するのではなく、別々に CM と相互作用している様子が示唆された。一方で、HDL と混合した際には、両者の拡散時間は等しい挙動を示した (図 5)。このことから、HDL が両者を担持し、本研究の目的である核酸送達リポタンパク質の調製が可能であることが示唆された。HDL 濃度上昇に伴う拡散時間の上昇及びそれに続く下降は、次のように説明される。VE を有さない siRNA の拡散時間は 100µs 程度であり、PEG-CCP においてもその分子量を元に算出すると数百 µs である。ここで、

VE-siRNA 及び VE-PEG-CCP の拡散時間が 900 μ s 及び 2800 μ s であるため、双方ともに水溶液中において自己会合していると考えられる。また、VE-siRNA 及び VE-PEG-CCP の水中での挙動は HDL 存在下において自己会合状態から HDL への結合状態へと変化すると推察される。実際に、HDL 単体の拡散時間は数百 μ s であることを考慮すると、HDL 濃度が低い状態では HDL に対して多くの VE-siRNA 及び VE-PEG-CCP が結合するため拡散時間の大きな粒子が形成されるが、HDL 濃度上昇とともに HDL 当たりの VE-siRNA 及び VE-PEG-CCP の結合数が減少し、それに伴って拡散時間の小さな粒子が形成されたと考察される。

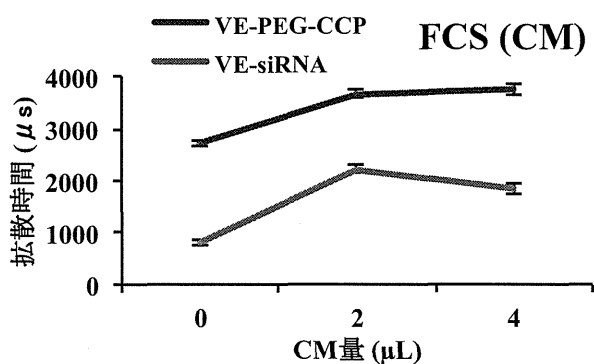


図4. CM 存在下での VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の拡散時間 (FCS 解析)

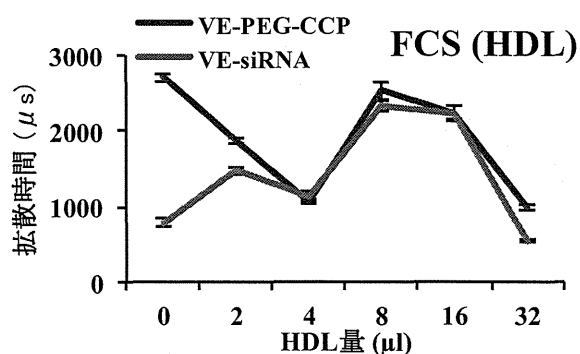


図5. HDL 存在下での VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の拡散時間 (FCS 解析)

3) VE-PEG-CCP、VE-HDO と HDL からなる会合体の in vivo での遺伝子発現抑制評価

HDL 及び VE-PEG-CCP と HDL との複合体を投

与しても ApoB の mRNA 量の減少は観察されなかった。一方で、VE-HDO と HDL の複合体及び核酸送達リポタンパクを投与した際には、それぞれ 40%、60%程度の mRNA 量の低下が確認された (図6)。このことから、VE-PEG-CCP は apoB の mRNA 量低下には関与せず、なおかつ mRNA 低下には HDO が必要であることが確認された。さらに、VE-PEG-CCP を有する核酸送達リポタンパクの方が VE-HDO と HDL との複合体に比べて mRNA 量の低下が大きかったため、VE-PEG-CCP の存在により粒子のエンドソーム脱出が促進され、効率的に HDO を細胞質へ送達可能なことが示唆された。

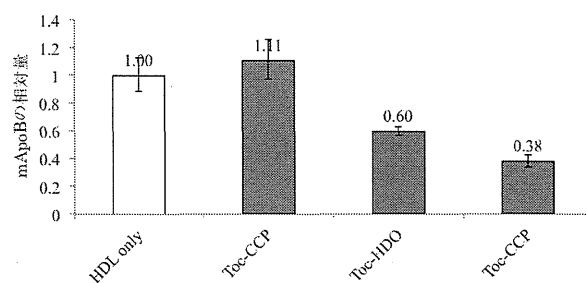


図6. 核酸送達リポタンパク及び関連化合物の i.v. 投与後のマウスの肝臓における mApoB 量 (qRT-PCR)

D.考察

本年度は、VE-PEG-CCP の合成に成功し、核酸と CCP とをリポタンパク質を介して結合することに成功した。担持体として用いるリポタンパク質として、CM では VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の双方を同時に担持することが難しいのに対し、HDL は本研究の目的である結合体の調製を可能とした。このことから、複数種類の高分子を VE によりリポタンパク質に結合させる際には、その都度最適なりポタンパク質を選別する必要性が窺えた。

本研究において調製された核酸送達リポタンパクは、核酸として VE-HDO を用いることで、肝臓における標的 mRNA 量の低下を誘導可能であった。今後は、in vivo での遺伝子発現抑制評価を続行し、核酸送達リポタンパクの構成比と生物活性との相関を調査する予定である。

E. 結論

本年度は、HDL を担持体として用いることで、VE-核酸と VE-PEG-CCP との結合体の調製が可能となった。さらに、in vivo における遺伝子発現抑制評価において、VE-PEG-CCP の導入は標的 mRNA 量の低下に貢献した。このことから、本研究が目的としている高機能性核酸送達キャリアの具現化へ大きく近づいたと言える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kim HJ, Miyata K, Nomoto T, Zheng M, Kim A, Liu X, Cabral H, Christie RJ, Nishiyama N, Kataoka K. siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 2014; 35: 4548-4556.
- Pittella F, Cabral H, Maeda Y, Mi P, Watanabe S, Takemoto H, Kim HJ, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K. Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J Control Release* 2014; 178: 18-24.
- Kim HJ, Ishii T, Zheng M, Watanabe S, Toh K, Matsumoto Y, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K. Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv Transl Res* 2014; 4: 50-60.
- Deshayes S, Cabral H, Ishii T, Miura Y, Kobayashi S, Yamashita T, Matsumoto A, Miyahara Y, Nishiyama N, Kataoka K. Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J Am Chem Soc* 2013; 135: 15501-15507.
- Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, M. R. Kano, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to

glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 2013; 7: 8583-8592.

- 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 α -associated immune response. *Angew Chem Int Ed* 2013; 52: 6218-6221.
- 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.

2. 学会発表

(国内学会)

- 片岡一則. 超分子ナノマシンによるがんの標的治療への挑戦. JAPAN NANO 2014 第12回ナノテクノロジー総合シンポジウム, 江東区, 2014.1.31. (特別講演)
- 片岡一則. ナノ・バイオによる診断・治療, TUS フォーラム 2013 基礎科学と医療 -科学は技術を招き、技術は科学を深める-. 千代田区, 2013.11.6. (招待講演)
- 片岡一則. ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療～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10回日本中性子捕捉療法学会学術集会, 岡山市, 2013.9.7. (特別講演)
- 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」がんのイメージング・標的治療への挑戦. In vivo イメージングフォーラム 2013, 東京都, 2013.9.6. (特別講演)
- 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」: がんの標的治療への挑戦. イノベーションフォーラム in つくば【第一部】第13回開催 日経エデュケーションチャレンジ, 茨城県, 2013.8.20. (教育講演)
- 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」: がんの標的治療への挑戦. 第2回国際先端生物学・医学・工学会議, 名古屋市, 2013.7.27. (基調講演)
- 片岡一則. ナノテクノロジーで創る魔法の弾丸～がんの標的治療への挑戦～. ナノ学会第11回大会, 東京都, 2013.6.7. (基調講演)
- 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20回クロマトグラフィーシンポジウム, 神戸市, 2013.6.6. (特別講演)
- 片岡一則. ナノテクノロジーで創る「魔法の弾

丸」～がんの標的治療への挑戦～. 日産化学工業 生物科学研究所講演会, 埼玉県, 2013.6.4. (招待講演)

10. 片岡一則. 核酸医薬デリバリーのための超分子ナノデバイス～その現状と将来展望～. 第13回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 東京都, 2013.5.11. (招待講演)
11. 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～スマートヘルスケアの実現を目指して～. BIOtech 2013 セミナー「国際戦略拠点キングスカイフロンテ発のライフイノベーション」, 東京都, 2013.5.8. (招待講演)
12. 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. 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたストラテジーセミナー, 東京都, 2013.4.26.

(国際学会)

1. Kataoka K. Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery, The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Japan, 2013.12.16. (招待講演)
2. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, CEMS International Symposium on Supramolecular Chemistry and Functional Materials 2013, Tokyo, 2013.12.15. (招待講演)
3. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines. Nanosystems Initiative Munich - Advisory Board Meeting and Workshop, München Germany, 2013.11.17. (招待講演)
4. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines. UCLA-USC-Caltech Nanotechnology & Nanomedicine Symposium, Nanotechnology Innovations in Cancer, Infectious Diseases, and Regenerative Medicine, California USA, 2013.10.17. (招待講演)
5. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymers. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013), Tokyo, 2013.10.8. (基調講演)
6. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymer, 12th

International Conference "Polymers for Advanced Technologies" PAT 2013, Berlin Germany, 2013.10.1. (招待講演)

7. Kataoka K. Block copolymer micelles as smart nanocarriers for gene and drug delivery, The 5th Asian Arden Conference, Pharmaceutical Materials Science and Engineering - Characterization and Applications -, Aichi, 2013.8.6. (基調講演)
8. Kataoka K. Supramolecular nanodevices to treat cancers intractable by current chemotherapy. Gordon Research Conferences in 2013, Vermont, USA, 2013.7.15. (招待講演)
9. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. FRONTIERS2013 - Joint EPFL/University of Tokyo Symposium on "Frontiers in Nanomedicine and Imaging", Lausanne Switzerland, 2013.6.21. (基調講演)
10. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. Joint Symposium of the 5th Utah-Inha DDS & Advanced Therapeutics Research Center Symposium and the 7th International Symposium on Intelligent DDS (Dedicated to Prof. You Han Bae's 60th Birthday), Incheon Korea, 2013.5.23. (招待講演)
11. Kataoka K. Polymeric micellar nanocarriers for gene and oligonucleotide delivery. 16th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT), Salt Lake City Utah USA, 2013.5.15. (招待講演)
12. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. Seminar at Free University of Berlin, Berlin Germany, 2013.4.12. (招待講演)
13. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. SFB (Center-of-Excellence) Seminar University of Bayreuth Bayern Germany, 2013.4.7. (招待講演)
14. Kataoka K. Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices. FZI-Seminar, Mainz Germany, 2013.4.3. (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者 村上 正裕 大阪大谷大学薬学部薬剤学

研究要旨

肝臓を標的とする核酸医薬品の経口送達製剤の開発を目指している。これまでマウスにおいて、ビタミン E を結合した siRNA (VE-siRNA) を脂質ナノ粒子分散製剤として注腸投与することによって、腸管より siRNA を肝特異的に送達できること、また、これに基づく RNA 干渉及び薬理効果が得られることを実証し、さらにその送達機構について明らかにしてきた。今年度は、アニマルスケールアップとしてカニクイザルにおける注腸剤の投与実験を行い、霊長類においても本システムが有効であることを示す結果が得ら

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。

前年度までの研究により、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 Vitamin-E 修飾型核酸（以降 VE-siRNA）を選択的に送達できること、さらに製剤を均一な脂質ナノ粒子分散液とすることによって、肝への送達効率を改善し、変動を抑制できることを明らかにした。また、VE-siRNA が消化管腔及び粘膜において代謝分解に安定であることを示唆する結果を得た。

本年度は、製剤学的検討をさらに進め、これまでの基礎検討結果を総合して、霊長類において、本経腸デリバリーシステムの有効性を、横田グループ（東京医科歯科大学）と共同して検討した。

B.研究方法

【脂質ナノ分散製剤の調製】

核酸としては、肝特異的に発現する ApoB 遺伝子を標的とする VE-siRNA (Cy3 非標識体) を、吸収促進剤として長鎖脂肪酸を含む脂質ナノ分散製剤として実験に使用した。すなわち、リノール酸 (MP Bio 社製、もしくはシグマ社製)、もしくは高純度オレイン酸 (日本油脂より供与) 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て混合ミセル化した。さらに均一なナノ製剤とするため、混合ミセルをメンブランフィルター (ミリポア社製、0.45 μ m poresize) でろ過後、核酸分子と混合分散することにより注腸剤を調製した。なお、脂質分散製剤の粒子特性及び均質性は、動的光散乱法 (DLS) により粒度分布を評価することで確認した。

【霊長類における遺伝子治療効果の評価】

霊長類を用いた実験は、基盤研霊長類医科学研究センターにおいて、VE-siRNA/CM によるカニクイザル及びマーモセットを用いた遺伝子治療実験計画 (承認番号 ; DS22-11) に基づいて行った。本検討では、2.4kg~2.9kg の当該施設にて繁殖・飼育されたカニクイザルを用いた。実験の前日午後に絶食を施し、翌朝、投薬 3 時間前にミルク (20g/30ml、約 100kcal) を胃内投与した。各サルを筋肉注射によ

るケタミン・キシラジン麻酔後、VE-siRNA を 10mg/kg の用量で、脂質分散製剤とした被検液 3ml を直腸内投与し、投与後暫時保定した。投与は一日おきに二回繰り返し、各投与直前および投与翌日に採血し、生化学検査に供した。

[マウスにおける肝移行性の評価]

自由摂水下 16 時間絶食したマウス (ICR, 6-8 週齢) に、製剤投与 90 分前より脂肪乳を経口投与し、ネプブタール麻酔下、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、結紮後一定時間後に全血採血した。冷却した生理食塩水にて脱血還流を施した後、臓器を摘出し、評価に供した。

[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 (Cy 3、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。

(倫理面への配慮)

霊長類に係る全ての実験は、独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター内で、(社) 予防衛生協会 研究支援企画部の支援および管理下に行われ、同センターの規定および実験指針に基づき、動物愛護の精神に沿って行った。また、マウスを用いた小動物に係る実験は、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

[核酸含有脂質ナノ分散製剤における不飽和脂肪酸の検討]

これまでの検討において、リノール酸が、

VE-siRNA に対する腸管吸収促進効果に最も優れことが明らかとなっている。しかし、DLS による検討から、脂質ナノ分散型製剤は、室温保存では比較的均質なナノサイズの粒子径を保つが、4℃以下では比較的不安定で継時的に粒度分布に変化がみられることが明らかとなった。一方、吸収促進効果は、室温保存することにより、数日単位で低下することが明らかとなった。また、製造元の異なるリノール酸について比較検討を行ったところ、植物由来のリノール酸 (和光純薬) では、検討した条件では、ほとんど吸収促進効果を示さないことが明らかとなった。これに対して、化学合成品であるシグマ社製のリノール酸は、10mM において顕著な吸収促進効果を示した (図 1 上段)。この効果は、通常使用 MP Bio 社製リノール酸 (高純度化学合成品) と同等もしくはやや劣る程度であった。さらに、今回検討した高純度オレイン酸 (日本油脂提供) では、図 1 下段に示すように、5mM を最適濃度として、顕著な吸収促進効果を示すことが明らかとなった。

DLS による粒子評価により、和光純薬製リノール酸 20mM 脂質ナノ分散製剤では、10nm 付近とは別に 100nm 付近にもピークが観察され、この 100nm 付近のピークはフィルターろ過では除去されないことが示された。

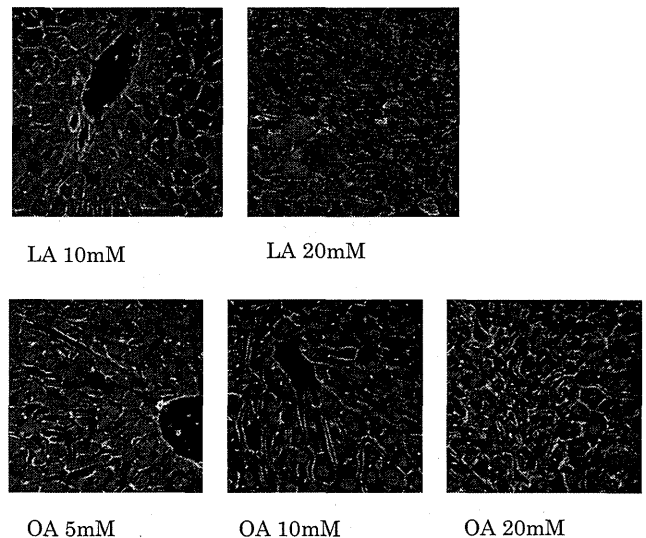


図 1 VE-siRNA の肝へのデリバリー効率における高純度脂肪酸の効果。

[霊長類における遺伝子治療効果の評価]

カニクイザル($n=3$)に対し、*ApoB1*に対する核酸である VE-siRNA を、リノール酸 (10mM) を吸収促進剤とするナノ脂質分散製剤を一日おきに合計二回、30mg/head/回で注腸投与を行った。

核酸製剤投与前後に採取した血液サンプルの免疫学的及び生化学的検査から、VE-siRNA 注腸剤投与による顕著な副作用は検出されなかった。これに対して、図1に示すように、投与した VE-siRNA による肝での *ApoB* 遺伝子発現の抑制効果に基づくと考えられる、血清中のトリグリセリド (TG) ,LDL コレステロール (LDLC) の有意な減少、及び HDL コレステロール (HDLC) の上昇が観察された。

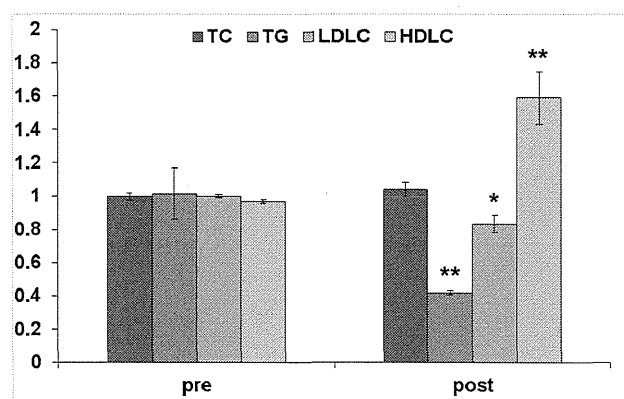


図2 カニクイザルにおける VE-siRNA 脂質ナノ分散製剤投与の血清脂質濃度に及ぼす効果. 各個体の投与 1W 前の値を基準として、一回目の核酸投与前のミルク投与直後(pre)と、二回目の核酸投与一日後(post)で採血した値を相対値化して、pre と post で比較した. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

D.考察

霊長類における検討に先立ち、脂質ナノ分散型製剤に関する製剤学的検討を行った。リノール酸を含む製剤の室温保管により、製剤の分散性には影響が小さかったにもかかわらず送達効果に低下が認められたのは、二価不飽和脂肪酸であるリノール酸が比較的自動酸化されやすいためと考えられた。一方、

一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、リノール酸に比べて自動酸化を受けにくく安定で、刺激性が少ないことから、医薬品や化粧品の原料に多く使用されているが、これまでの検討では、リノール酸の効果にやや劣る結果が得られていた。しかし、今回検討した高純度オレイン酸では、有効濃度は異なるものの、リノール酸に匹敵する肝へのデリバリー効果の得られることが明らかとなった。なお、本研究の核酸モデルとして用いた *ApoB* 標的 siRNA では、その対象疾患である脂質代謝異常症等の臨床を考慮すれば、 ω -6 系脂肪酸であるリノール酸よりも、オレイン酸の利用が優れると思われる。以上のように、脂肪酸の吸収促進効果には、脂肪酸の純度、不飽和度、分散した際の粒子径及び粒度分布が影響することが示された。

カニクイザルにおける遺伝子治療効果の検討において用いた 30mg/head/回という用量は、マウスの実験において有効であった 10mg/kg/回という用量にほぼ匹敵する用量である。マウスでは、一日3回三日間連続投与を行ったが、カニクイザルでは、マウスと異なり、一日に複数回投与することができないため、隔日で合計二回という投与スケジュールとなった。それでも結果に示したように、中性脂肪である TG が顕著に減少し、また、LDLC の減少と HDLC の有意な増加が認められた。このように、標的遺伝子の抑制に基づくと考えられる有意な薬理効果が確認できたことは、肝臓を標的とする経腸デリバリーシステムとしての本製剤の有用性を強く示唆する結果と考える。

E.結論

ビタミン E 結合型 siRNA の脂質ナノ分散製剤が、霊長類においても、肝臓を標的とする経腸デリバリーシステムとして有効であることが示唆された。

F.健康危険情報

特記事項なし