

201308002B

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 23 ～ 25 年度 総合研究報告書

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 横田 隆徳

平成 26 年(2014)年 3 月

【目 次】

I. 総合研究報告書

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

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）	1
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）	12
村上 正裕（大阪大谷大学薬学部薬剤学）	22
和田 猛（東京理科大学薬学部生命創薬科学科）	27
小比賀 聡（大阪大学大学院薬学研究科）	34

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

47

III. 研究成果の刊行物、別刷

49

I. 総合研究報告

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

本研究では核酸医薬の経口投与を可能とする基盤技術の開発を目指し、新規 DDS として混合ミセルとともに Toc-siRNA を注腸投与する際の薬物動態を評価した。具体的項目として、マウスを用いて①Toc-siRNA 注腸投与時の生体内分布の確認、②Toc-siRNA 注腸投与による標的遺伝子抑制効果と副作用の確認、③ Toc-siRNA 注腸投与時のデリバリー経路の解明、を中心とした研究を行い、①Toc-siRNA の注腸投与時にほぼ肝臓に限局してデリバリーされること、②肝臓において標的遺伝子の発現を抑制でき、明らかな副作用も認められないこと、③リンパ管を経由して受容体介在性に肝臓に取り込まれること、をそれぞれ確認した。最後に、Toc-siRNA-混合ミセル混合物を霊長類であるカニ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

経口投与時の機能核酸のベクターとして最も好ましいのは、標的組織に不可欠で、自身で合成できない分子であり、かつ経口摂取によって体内に取り込まれ標的組織へデリバリーされる物質であると考えた。この条件に当てはまるのはビタミンであり、その中でもビタミン E (VE) は過剰摂取しても毒性が低いため、ベクターとして適していると考えられた。我々は天然型 VE である α -tocopherol (Toc) をベクターとして直接 siRNA に結合させた Toc-siRNA の静脈投与によって、マウス肝臓のアポリポ蛋白 B (ApoB) mRNA を低下させることに成功している。そこで本研究では食後にカイロミクロン(CM)を介して Toc が肝細胞に運搬される経路を利用して、臨床応用を念頭に Toc-siRNA を直腸内に投与することで肝疾患を治療する可能性を検討した。具体的な検討項目として、siRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotide: ASO) 等の合成機能核酸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、エンドソーム脱出素子である Charge Conversional Polymer (CCP) の機能核酸への導入を行い、これらの成果を基にマウス及び霊長類を用いた動物実験での有効性確認を行った。本報告書で

A. 研究目的

化学合成した small interfering RNA (siRNA) や アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)等の機能核酸は、有用な遺伝子ノックダウンツールとして広く用いられている。しかし、遺伝子治療を目的とした *in vivo* への応用において、標的器官へのデリバリー効率の低さとそれに伴う副作用が大きな障壁となっていた。しかし近年、肝臓をターゲットとしたベクターとして、改良型カチオンリポソーム等が開発され、有効性が高く副作用も低い機能核酸の肝臓へのデリバリーが確立されつつある。

しかしそれらは全て注射製剤であり、これらの機能核酸を臨床でより幅広く応用するためには、自己投与や長期間投与が可能な経口投与法を確立する必要がある。

は主に本事業の中心となる動物実験について記載し、並行して行った新たな核酸化学修飾及び二本鎖核酸に特異的に結合するオリゴ糖の合成や、CCP及び脂質分散剤の最適化等については、それぞれ施行した分担研究者の研究報告書に記載した。

B. 研究方法

1) マウスへの核酸注腸投与実験

8週齢のICRマウス（日本クレア）、7週齢のC57BL/6Jマウス（オリエンタル酵母）、7週齢のLDL受容体KO (LDLR^{-/-})マウス (129S7-Ldlr (tm1 Her)/Jマウス, Jackson laboratory)をToc-siRNAのデリバリー確認に用いた。マウスを16時間絶食にし、300 µl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。蛍光相関分光法 (FCS) で用いたリンパ液は、siRNAの腸管内投与2時間後に胸管リンパ管にビニールカテーテルを挿入して採取した。LDLR^{-/-}マウスの実験では、0.8 mg/kgのリコンビナントマウスLDL receptor related protein-associated protein 1 (LRPAP, R&D Systems)を尾静脈投与した直後にsiRNAを直腸より投与した。またLPLの作用を検討した実験では、LPL inhibitorであるTriton X-100 (和光純薬工業)を20 mg/kgで尾静脈投与し、30分後にsiRNAを直腸投与した。

2) siRNA/混合ミセル (siRNA/MM) の調整

3.0 w/w % PEG-60 hydrogenated castor oil (HCO-60、日光ケミカルズ)、10 mM リノール酸 (和光純薬工業)をRNase freeのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) に溶かし、Digital Sonifer

Models S-250D (Branson) を用いて20 kHz、30 W、on iceで5分間超音波処理して混合ミセル (mixed micelle: MM) を作った。Cy3標識siRNA、Cy3標識Toc-siRNA、Toc-siRNAのいずれかとMMをピペットでよく混ぜ、siRNA/MMとした。

3) 核酸注腸投与時の組織学的検討

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 (サクラフア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 µm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を確認するため、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*ApoB*、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*を使用した (Applied Biosystems)。

5) siRNAのアンチセンス鎖のNorthern Blot解析

マウス肝臓内のsmall RNA (200 nt以下)をMirVana (Ambion) を用いて抽出した。Ethachinmate (Nippon Gene) によって濃縮し、14% polyacrylamide-ureaゲルで電気泳動した後、Hybond-N+ membrane (Amersham Biosciences) で転写した。プロットはGene Images 3'-Oligolabelling kit (Amersham Biosciences) でラベルしたセンス鎖をプローブとして用いた。シグナ

ルは、Gene Images CDP-star Detection Kit (Amersham Biosciences) を用いて検出した。

6) ApoB タンパクの Western Blot 解析

siRNA の 3 回投与 24 時間後のマウス血清をホモジナイズバッファー (0.1% SDS, 1% TritonX, 1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF) で調整し、サンプルとした。1 次抗体は sc11795 goat anti-ApoB (Santa Cruz) を 500 倍希釈、2 次抗体は sc2020 donkey anti-goat (Santa Cruz) を 2000 倍希釈で使用した。Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo) で蛍光発色させ、Chemi Doc XRS-J (BIO RAD) で撮影した。

7) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

マウスリンパ液をゲルろ過 HPLC 法にて分離し、脂質成分のモニタリングと粒子の大きさから、各フラクションがどのリポ蛋白であるかを特定した (Skylight Biotech)。CM、VLDL、LDL、HDL のフラクションを FCS での分析に用いた。

8) 蛍光相関分光法 (FCS) による解析

測定は ConfoCor 3 (Carl Zeiss MicroImaging) を用いて行った。Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を投与したマウスより採取したリンパ液中の Cy3 シグナル、または、未投与マウスより採取したリンパ液の各リポ蛋白フラクションをナイルレッドで染色したものを 8-well Lab-Tek chambered slide (Nalgene Nunc International) に入れ、室温で Diffusion time (拡散時間) を測定した。

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

ビタミン E 結合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 Toc を結合させた Toc-PEG-CCP を合成した (片岡グループの報告書参照)。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 Toc-PEG-CCP と、*ApoB* を標的とした、横田グループが新規開発した新規の Toc 結合二本鎖アンチセンス核酸 (heteroduplex oligonucleotide: HDO) と結合させることで、核酸送達リポ蛋白複合体を調製した。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 Toc-PEG-CCP 及び Toc-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 Toc-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 qRT-PCR 法で定量した。

10) 霊長類における Toc-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、「Toc-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、当該施設にて繁殖・飼育された 2.4kg~2.9kg のカニクイザルを用いた。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、Toc-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 Toc-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。

C. 研究結果

1) Toc-siRNA の生体内分布

リノール酸、HCO-60 からなる混合ミセルを作成し、Cy3 標識 siRNA とともに消化管内に投与した。投与 4 時間後における諸臓器の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

肝臓で Cy3 シグナルが認められる直腸投与 4 時間後の肺、腎臓、脾臓、心臓、骨格筋、脳切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、明らかな Cy3 シグナルは認められなかった (図 1)。投与した Toc-siRNA は肝臓特異的にデリバリーされている。

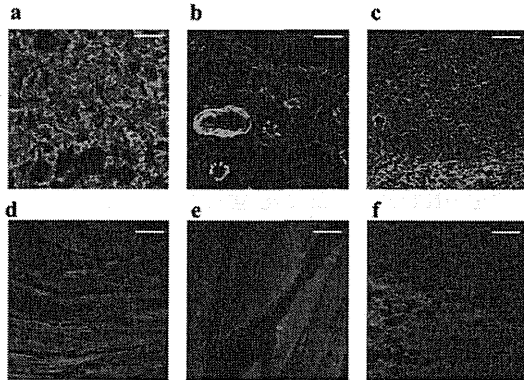


図 1 Toc-siRNA の生体内分布

(a-f) Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 4 時間後の肺(a)、腎臓(b)、脾臓(c)、心臓(d)、骨格筋(e)、脳(f)を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。いずれの臓器でも Cy3 シグナルは見られない。

2) Toc-siRNA の注腸投与による標的遺伝子発現抑制効果と副作用

Toc-siRNA を 2 時間おきに 10 mg/kg で 3 回注腸投与した際の *in vivo* での標的遺伝子発現抑制効果を確認した。Toc apoB-1 のターゲットである *ApoB* の肝臓における発現抑制を mRNA レベル (図 2a) や血清中性脂肪、LDL コレステロール (図 2d) だけでなく、血清中の ApoB タンパクレベルでも確認した (図 2b,c)。また、血液検査の結果免疫賦活性を含めた明らかな副作用は認められなかった (表 1)。さらに、核酸投与部位である大腸の H&E 染色において炎症細胞浸潤等の明らかな異常は認められなかった (図 3)。これらの結果から、Toc apoB-1 の注腸投与は新たな高脂血症治療法となり得ると考えた。

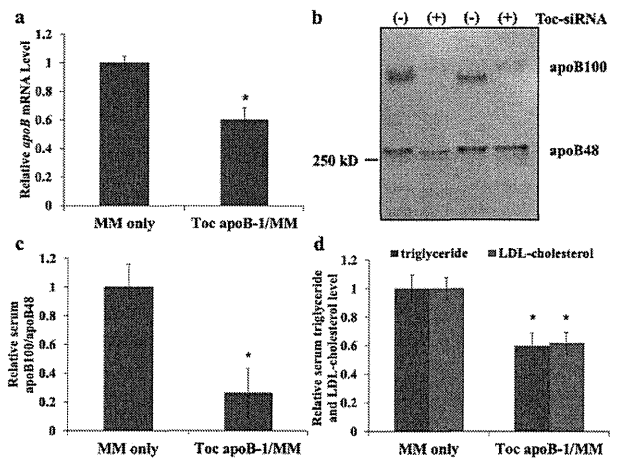


図 2 Toc apoB-1 のノックダウン効果

Toc apoB-1/MM を 2 時間おきに 10 mg/kg で 3 回投与し、最終投与の 24 時間後の *apoB* mRNA 発現抑制効果を、MM のみ投与した群を対照群として比較した。 ($n = 3$, mean values \pm s.e.m., $*P < 0.05$) (a) 肝臓中の *ApoB* mRNA の発現量を qRT-PCR で測定した。対照群と比較して 40% の発現抑制を認めた。(b,c) 血清中の ApoB を Western blot で検出し(b)、バンド濃度を定量して apoB 100/48 比を求めた(c)。対照群と比較して 74% 減少した。(d) 血清中の中性脂肪値、LDL コレステロール値を測定した。対照群と比較してどちらも 40% 低下した。

	IFN- α (pg/ml)	Cre (mg/dl)	ALT (U/l)
PBS alone	< 12.5	0.12 \pm 0.01	26.0 \pm 3.21
Toc-siRNA/MM	< 12.5	0.13 \pm 0.03	15.3 \pm 1.76

表 1 副作用

Toc-siRNA/MM または PBS のみを 3 回投与後の血清中の IFN- α 、Cre、ALT の値。IFN- α のみ投与 3 時間後、その他は 24 時間後の血清を測定した。PBS のみ投与群と比較して有意差を認めない。値は平均値 \pm s.e.m. ($n = 3$)



図 3 Toc-siRNA 投与時の大腸組織学的検索

Toc-siRNA/MM を 3 回投与後の大腸の H&E 染色。炎症細胞浸潤や浮腫等の明らかな異常所見を認めない。

3) Toc-siRNA の注腸投与時のデリバリー経路の解明

Toc-siRNAが直腸から肝臓に運ばれるメカニズムを調べた。まず、腸管リンパ液中に Toc-siRNA がデリバリーされているかを確認した。Cy3 で標識した Toc-siRNA を投与したマウスの腸管リンパ管よりリンパ液を採取し、Cy3 シグナルの拡散時間を FCS で測定した。拡散時間は蛍光標識が結合している粒子のサイズに比例する。リンパ液中の Cy3 が結合している粒子の拡散時間は約 3000 μ s であり、HPLC によってリンパ液を分離した際の CM 分画の拡散時間と一致した (図 4a)。これは直腸より投与された Toc-siRNA が吸収されてリンパ管に入り、リンパ管内で CM と結合していることを示している。

次に CM の薬理的な役割を調べるために、Toc-siRNA 投与前のミルク投与、CM を分解する lipoprotein lipase (LPL) の inhibitor の投与がデリバリー効率にどのように影響するかを確認した。リンパ管内、血中ともに CM がほとんど存在しない絶食状態でマウスに Cy3 標識 Toc-siRNA を投与したところ、肝臓における Cy3 シグナルはほとんど見られなかった (図 4b)。LPL inhibitor である Triton X-100 を Cy3 標識 Toc-siRNA 投与前に静注した場合も同様に Cy3 シグナルは見られなかった (図 4c)。LPL は CM を肝臓に取り込まれる形であるカイロミクロンレムナント (CMR) に代謝する作用、CMR がレセプターを介して肝臓に取り込まれる際の ligand-bridging 作用の二つを持っており、それらが阻害されたために Toc-siRNA のデリバリー効率が低下したと考えられる。以上のことから、Toc-siRNA は CM の生理学的代謝経路を介して肝臓に運ばれていることが確認された。

最後に Toc-siRNA が肝細胞に取り込まれる際、CMR レセプターである LDL receptor (LDLR)、LDL receptor related protein 1 (LRP1) を介して取り込まれているかどうかを確認した。それらのレセプターが両方とも機能しないモデルマウスとして、LDLR^{-/-}マウスに LRP1 の阻害剤である LRPAP を静脈投与したマウスを用意し、肝臓にデリバリーさ

れた Toc-siRNA 量を Toc apoB-1 のアンチセンス鎖を検出する Northern blot にて評価したところ、まず ICR マウスでは 29 mer と 21 mer のバンドが見られた。これは細胞質に存在する RNase である Dicer によって siRNA が切断されたことを示しており、Toc-siRNA が肝細胞の細胞質にデリバリーされ、RNAi 効果を持つ 21 mer の siRNA にプロセスされたことが確認できた。一方 LRPAP を静注した LDLR^{-/-}マウスではほとんどバンドが見られなかった (図 4d)。このことから直腸投与された Toc-siRNA は CMR レセプターを介して肝臓に取り込まれていることが証明された。

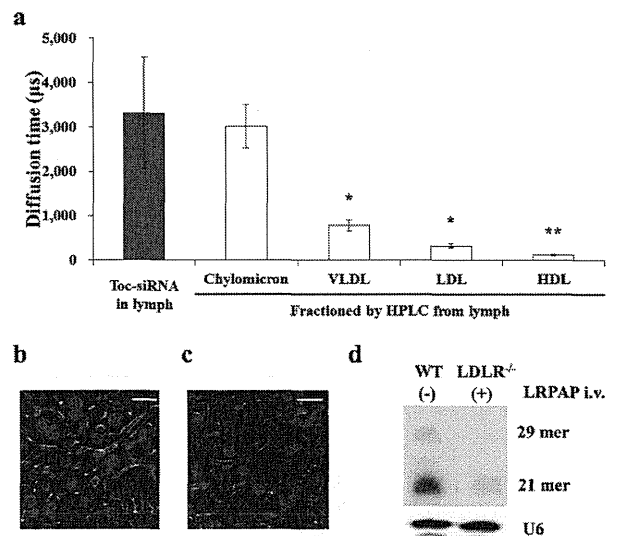


図 4 デリバリー経路の解明

(a) Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 2 時間後のリンパ液の拡散時間と、無処置のマウスから採取したリンパ液を HPLC でリポ蛋白分画を分離したものの拡散時間を FCS で測定し、比較した。(b,c) 絶食状態(b)または Triton X-100 (20 mg/kg) を投与したマウス(c)に、Cy3 標識 Toc-siRNA/MM を直腸に投与した 4 時間後の肝臓を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(d) LRPAP を投与した LDLR^{-/-}マウスに対して Toc-siRNA/MM 投与後、肝臓より small RNA を抽出し、Toc-siRNA のアンチセンス鎖を Northern blot にて検出した。

以上の結果から、直腸に投与された Toc-siRNA は混合ミセルの吸収促進作用により直腸粘膜を通過して、リンパ管内を吻側に移行してミルク投与によっ

て小腸からリンパ管内へ分泌された CM と結合し、CM が肝臓に取り込まれる生理学的な経路によって肝細胞のレセプターを介してデリバリーされたと考えられた。

4) Toc-PEG-CCP、Toc-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 Toc-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、Toc-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 5)。このことから、Toc-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、Toc-PEG-CCP を有する核酸送達リポタンパクの方が Toc-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、Toc-PEG-CCP の存在により Toc-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。

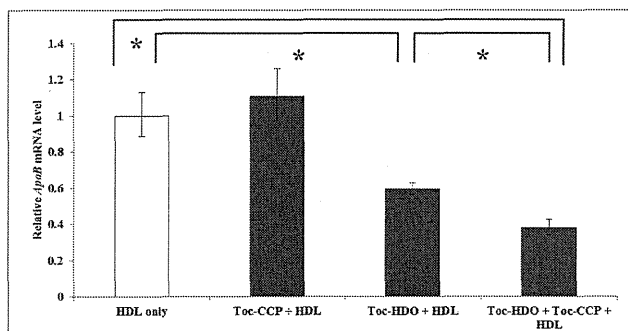


図 5 Toc-PEG-CCP の有効性

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 量を定量した。Toc-HDO と Toc-CCP を HDL に結合させた群で最も強い標的遺伝子発現抑制効果を示した。(n = 3, mean values ± s.e.m., *P < 0.05)

5) 霊長類における Toc-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 Toc-siRNA を、リノール酸 (10mM) を吸収促進剤とするナノ脂質分散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、Toc-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)の有意な低下、及び HDL コレステロール(HDLC)の有意な上昇が観察された (図 6)。これらの効果は、投与した Toc-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。

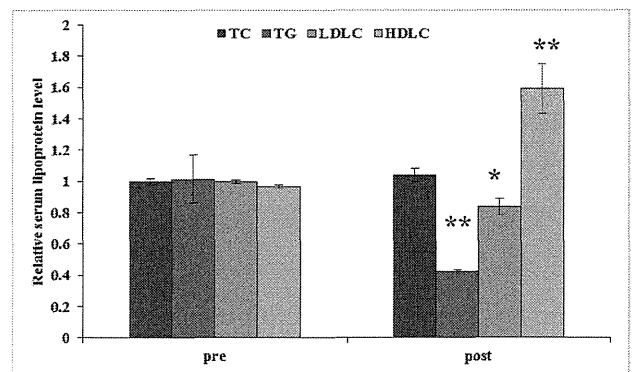


図 6 カニクイザルにおける *APOB* 遺伝子を標的とした Toc-siRNA 脂質ナノ分散剤投与の有効性

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。Toc-siRNA-混合ミセル混合物注腸血中 HDL 値の有意な上昇を認めた。(n = 3, mean values ± s.e.m., *P < 0.05, **P < 0.01)

D. 考察

肝臓への経消化管 siRNA デリバリーは、RNase による siRNA の分解や水溶性巨大分子である siRNA の膜透過性の低さなどの障害から、今まで報告がなかった。しかし我々は経口摂取後のビタミン E の生理学的取り込み経路を利用することで、肝細胞への経消化管 siRNA デリバリーに成功した。

経口摂取された Toc が小腸で吸収され、CM に取り込まれてリンパ管に入り、CM をベクターとして肝臓へデリバリーされるという生理学的経路を利用するためには、本来の吸収の場である小腸に Toc-siRNA を投与することが理想であったがうまくいかず、直腸投与に変えることで siRNA が消化管膜

を通過して肝臓に到達することができるようになった。まず小腸ではなく直腸で成功した理由について考察する。

経口摂取されたTocは小腸において scavenger receptor class B type 1、Niemann-Pick C1-like 1 protein等のレセプターやトランスポーターを介した細胞内経路を通過して吸収される。この際Toc-siRNAではsiRNAの大きさ・親水性・負電荷が問題となり、Tocのみと同じ経路では通過できなかったと考えられる。そこで細胞内ではなく細胞間を通過させる傍細胞輸送経路を用いるため、タイトジャンクションのゆるい直腸に投与したところToc-siRNAは腸間膜を通過することができた。これは混合ミセルが吸収促進剤としてうまく作用しタイトジャンクションが開いたことと、Toc-siRNAが両親媒性の分子であったことが効果的に働いたためと予想される。両親媒性の利点として、一つはTocの疎水性によってsiRNAが混合ミセルとミセル化して消化管内での滞留性が増すこと、もう一つはsiRNAの親水性によって膜に付着してしまうことなく、開いた細胞間を通り抜けられることが考えられる。Toc-siRNA/MMの直腸投与は傍細胞輸送経路を利用したsiRNAの腸間膜通過を成功させるのに最適な条件であった。

次にCMをベクターとした肝臓特異的デリバリーに成功した理由について考察する。本研究で使用したToc-siRNAは、①2'-Oメチル化及びphosphorothioate化によりRNase耐性が高く、②分子量(20 kDa)が血行性よりもリンパ行性に吸収されやすい大きさであり、③疎水性のTocを有するため脂質であるCMとリンパ管内で結合することができた。③の利点について詳細を述べる。血中CM濃度は最も高くなる食後においても、コレステロール値でリポ蛋白全体の1%未満である。そのため静脈投与されたToc-siRNAは他のリポ蛋白やアルブミンなどの血清蛋白に取り込まれてしまうが、構成成分の大部分がCMであるリンパ管内ではToc-siRNAは*in vivo incubation*によって主にCMと結合するため(図4a)、より肝臓特異的なデリバリーに成功した。

また、④投与個体自身の内因性セルフベクターを用いているため副作用が全くない点で、カチオニックリポソーム等の化学合成脂質ベクターよりも優れている。

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Toc結合核酸医薬に応用する際に問題となるのが、どのようにしてCCPをToc結合核酸医薬に導入するか、という点であった。Toc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、同様にHDLとCCPを結合させることを目的として新規にToc-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Toc-HDO及びToc-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Toc-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(図5)。今後は最適な結合比率の決定や、注腸投与時の安定性の確認等が必要となるが、エンドソーム脱出素子のToc結合核酸への導入による更なる有効性の向上とが期待される。

最後に、本研究の最終目標である霊長類におけるToc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Toc-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の低下を認めた(図6)。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。

経消化管核酸医薬デリバリー法である本研究は経口腸溶剤や座薬に応用できるため、自己投与・長期間投与が可能となり、静脈注射で必須だった頻回の医療機関への受診等を避けられることから費用対効果も優れている。本研究は主にApoBを標的とした核酸医薬を用いることで高脂血症治療の可能性を示したが、標的を変えることでウイルス性肝炎、肝臓がん、家族性アミロイドポリニューロパチー等の治療も可能になると考えられる。これらは長期に渡る治療が必要であり、経口投与は患者のQuality of Lifeの維持に大きく寄与する。

E. 結論

経口摂取後のビタミンEの生理学的取り込み経路を利用することで、肝細胞への経消化管 siRNA デリバリーに成功した。また、*in vivo*における遺伝子発現抑制評価において、Toc-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。最後に、Toc-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し、その有効性を高めることに成功した。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

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.
3. 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.
4. 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.
5. Kuwahara H, Yokota T, Mizusawa H. Delivery of siRNA into the blood-brain barrier: recent advances and future perspective. *Ther Deliv.* 2012; 3: 417-420.
6. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Yamamoto M, Saito Y, Piao W, Yoshida M, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Mol Ther.* 2011; 19: 2213-2221.
7. Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H, Yokota T. HDL facilitates *in vivo* delivery of α -tocopherol-conjugated siRNA to the brain. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 711-719.
8. Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T,

- Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 405: 204-209
9. Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 27-34.
10. 仁科一隆, 横田隆徳. 肝臓を標的とした新規 siRNA テクノロジー. *医薬ジャーナル.* 2012; 48: 102-105.
11. 横田隆徳. 神経変性疾患の RNA 干渉による創薬—RNA 医学・医療—あらたな診断・治療を拓く—. *医学のあゆみ.* 2011; 238: 542-546.
12. 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳. 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. 『*Annual Review 2011 神経*』中外医学社. 2011; 42-52.
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.
9. 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.
10. 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.
11. 横田隆徳. Efficient *in vivo* α -tocopherol-conjugated siRNA from colorectum to liver. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012.7.4.
12. 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.
13. 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.
14. 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 仁科智子, 朴文

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.

- 英, 水澤英洋, 横田隆徳. RNA 干渉を用いた脳血管内皮細胞における遺伝子発現抑制法—多発性硬化症の新規治療法としての可能性—. 第23回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2011. 9.17.
15. 吉田規恵, 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 の肝臓へのデリバリー. 第 21 回アンチセンスシンポジウム, 大阪, 2011. 9.1.
16. Nishina K, Murakami M, Yoshida K, Kuwahara H, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in vivo delivery of α -tocopherol-conjugated siRNA from colorectum to liver. 第 17 回日本遺伝子治療学会総会, 福岡, 2010. 7.16.
17. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the brain endothelial cells in mice. 第 17 回日本遺伝子治療学会総会, 福岡, 2010. 7.16.
18. 仁科智子, 桑原宏哉, 仁科一隆, 吉田規恵, 朴文英, 水澤英洋, 横田隆徳. 内在性リポ蛋白を用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011. 5.20.
19. 朴文英, 仁科一隆, 桑原宏哉, 平井高志, 宇野佳孝, 町田明, 仁科智子, 吉田規恵, 榎本光裕, 水澤英洋, 横田隆徳. 血清リポ蛋白ベクターを用いた後根神経節神経細胞への siRNA デリバリー方法の開発. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011. 5.18.
- 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.
3. Iwata R, Hirochi S, Kuwahara H, Nishina K, Yokota T, Wada T. Construction of covalent and noncovalent α -tocopherol-siRNA conjugates toward liver delivery of RNAi drugs. 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011, Hokkaido, 2011.11.9.
4. Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Piao W, Mizusawa H, Yokota T. Efficient delivery of cholesterol-conjugated siRNA to the brain endothelial cells in mice. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, Seattle WA, 2011.5.20.
5. Nishina K, Murakami M, Yoshida K, Kuwahara H, Mizusawa H, Yokota T. Efficient in vivo delivery of vitamin E-conjugated siRNA from colorectum to liver. American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting, Seattle WA, 2011.5.19.

(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

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

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

3. その他

特になし

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

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

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きた。具体的には、VE が PEG スペーサーを介して CCP と結合した VE-PEG-CCP を合成し、VE-PEG-CCP と VE-核酸を HDL に同時に搭載できることを確認した。この HDL 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 の導入による遺伝子発現抑制効果の向上が確認された。また異なる系として、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、培養がん細胞に対する遺伝子発現抑制効果を明らかにした。

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きた。

具体的には、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 (図 1)、生体由来のリポタンパク質に VE-PEG-CCP と VE-核酸と VE-核酸を同時に搭載した会合体 (核酸送達リポタンパク) を調製し、その有効性を確認した。また、これとは異なる系として、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) (図 2(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、エンドソーム膜に選択的な傷害性を示すカチオン性の PAsp(DET)へと変換

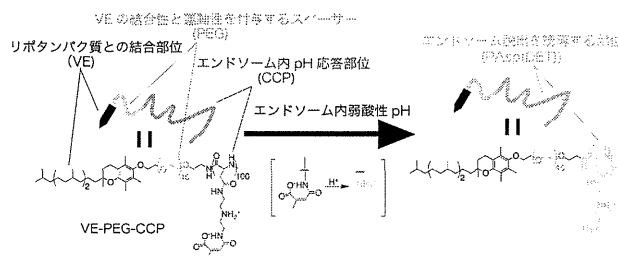


図 1. VE-PEG-CCP の化学構造及びイラスト

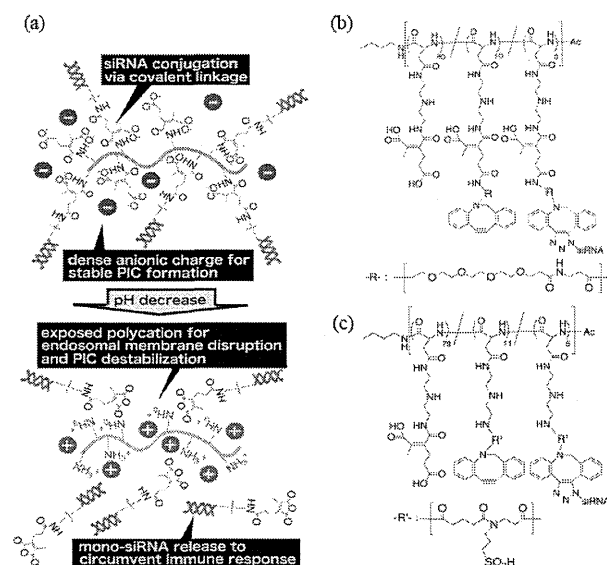


図 2. CCP を導入した siRNA コンジュゲートの設計

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 2(a))。本研究では、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 2(c)) を合成し、これと比較を行うことにより培養細胞に対する REC の有効性を確認した。

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。

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

Cy5 標識 VE-PEG-CCP と Cy3 標識 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を調製した。得られた核酸送達リポタンパクを 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。

4) REC の合成と in vitro 機能評価

PAsp(DET)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 2(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 2(c))。次に、合成した REC および uREC は、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。PIC のヒト卵巣がん (SKOV3-Luc)細胞内における分布は 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 の遺伝子発現抑制効果を 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。

(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 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 2800 μ s、VE-siRNA で 900 μ s 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 (data not shown)。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 3)。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 100 μ s 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 μ s 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 濃度上昇に伴って 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。

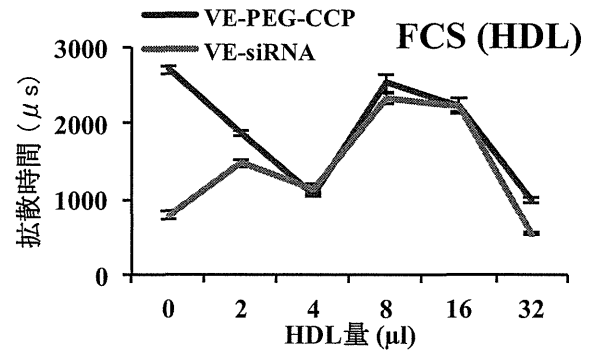


図 3. HDL 存在下での VE-PEG-CCP 及び VE-siRNA の拡散時間 (FCS 解析)

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 4)。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。

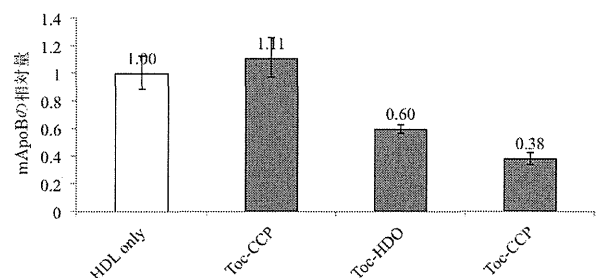


図 4. 核酸送達リポタンパク及び関連化合物の i.v. 投与後のマウスの肝臓における mApoB 量 (qRT-PCR)

4) REC の合成と 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 5)。その結果、Cy3-siRNA においては黄色の蛍光が確認され(図 5(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 5(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 5(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。

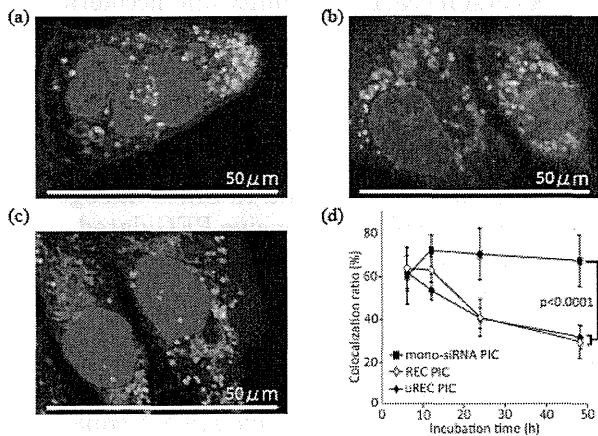


図 5. Cy3-siRNA(a)および REC、uREC からなる PIC(b,c)の SKOV3-Luc 細胞における Lyso Sensor Green との共局在と共局在率の経時的変化(d)

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 6(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 6(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- α 産生量は 24.3 ± 3.5 pg/mL、uREC からなる PIC を作用させた場合は 60.8 ± 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。

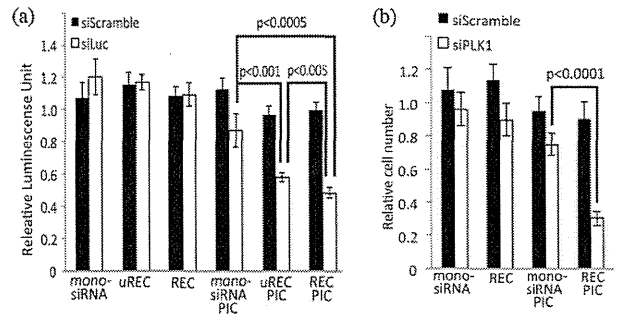


図 6. (a) SKOV3-Luc 細胞におけるルシフェラーゼのノックダウン効率、(b) A549 細胞における siPLK1 の導入に基づく細胞増殖抑制効果

D. 考察

本分担研究では、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質は、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質の構成比と生物活性との相関を調査する予定である。

一方、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) に関しては、カチオン性ポリマーと安定な PIC を形成することが確認され、培養がん細胞を用いた実験において、効率的な細胞質への移行とレポーター遺伝子のノックダウンならびに PLK1 のノックダウンに基づくがん細胞の増殖抑制効果が確認された。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。

E. 結論

本分担研究では、VE-PEG-CCP を合成し、VE-核酸/リポタンパク質複合体に搭載することで、当初目標であった肝細胞へ核酸導入効率を有意に高めることができた。このことから、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。さらに、CCP を利用した完全合成系の 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機能型 siRNA コンジュゲートして 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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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]
11. 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.