

Fig. 5. Cytotoxicity study of tumor cells and tumor endothelial cells using free DOX. OSRC-2 and OSRC-ECs recovered from OSRC-2 tumor tissue were incubated with free DOX for 8 h followed by 18 h reincubation and cell counting (A). Cells were treated with 10 µg/ml of DOX for 8 h and amount of internalized DOX was calculated (B). Data presented as mean ± SD, $n = 3-4$. Statistical analysis was done by unpaired t -test (** $P < 0.01$).

target the TECs of tumor tissue. Therefore, the therapeutic effect of RGD-PEG-LPs (DOX) was observed and compared with that of Doxil in mice bearing RCC tumors. Doxil itself failed to inhibit tumor growth (Fig. 3A), as it accumulated in OSRC-2 tumor cells which are resistant to DOX (Fig. 5A). Unexpectedly, small size RGD-PEG-LP (DOX) had no effect against tumor growth. Conversely, large size RGD-PEG-LP with a lower dose of DOX resulted in a significant

reduction in tumor growth (Fig. 3A), despite the similar bio-distribution to its small size version (Fig. S1B). These results raised the question as to the reason for the better therapeutic effect of large size RGD-PEG-LP over its small size version.

To explore the mechanism of the size dependent therapeutic effect of PEG-LPs (DOX), we next evaluated the induction of apoptosis in tumor tissues. Doxil failed to induce apoptosis in

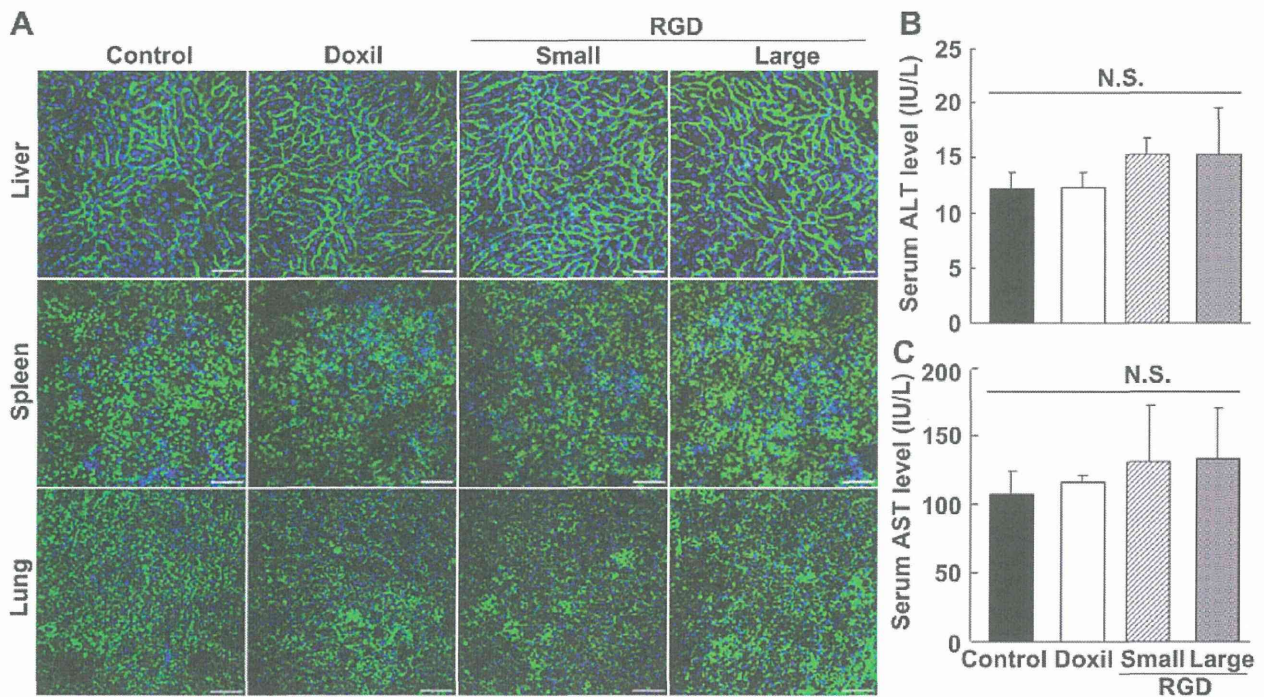


Fig. 6. Observation of the morphology of normal blood vessels treated with PEG-LPs (DOX). Confocal images of normal organs from mice bearing OSRC-2 tumor were treated with PBS (control) or three consecutive once daily dose of 1.5 mg/kg doxorubicin (i.v. injection via tail vein) in PEG-LPs. At 24 h post-injection, the animals were sacrificed; organs were collected and stained with FITC-Isolectin (for blood vessel) and Hoechst 33342 (for nuclei) followed by analysis under CLSM. Representative images from three independently studied mice for each PEG-LP (DOX) are shown (A). Simultaneously, blood sample was collected and toxicological study was performed by measuring the serum ALT (B) and AST (C) level. Data are presented as the mean ± SD. Statistical analysis vs control was performed by One-way ANOVA followed by Dunnett-test. N.S., not significant.

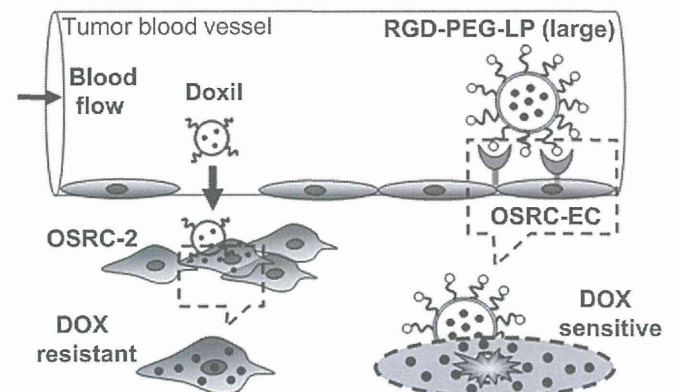
tumor tissues (Fig. 4A–B). In contrast, a huge amount of apoptotic cells was detected in tumors that had been treated with both small and large size RGD-PEG-LP (DOX) (Fig. 4A), however no significant difference in the area of the apoptotic cells was observed between these two groups (Fig. 4B). We further calculated the % of apoptotic cells that were co-localized with tumor vessels (Fig. 4C). The extent of co-localization of apoptotic cells with tumor vessels (Fig. 4C), as indicated by arrows (Fig. 4A), was significantly higher in tumors that had been treated with large size RGD-PEG-LP (DOX), but not for the small size version, where such co-localizations were rarely observed. These results indicate that large size RGD-PEG-LP (DOX) preferentially targets and kills the TECs, where the small size largely acts directly on tumor cells.

Furthermore, the effect of PEG-LPs (DOX) on the morphology of tumor vessels was evaluated. Both the small and large size RGD-PEG-LP (DOX) clearly destroyed the tumor vessels (Fig. 4D), as indicated by the area of the vessels (Fig. 4E), where the large size version had a stronger effect. However, only the large size RGD-PEG-LP (DOX) significantly reduced the number of nuclei (Fig. 4F), indicating the death of tumor cells in a blood supply-dependent manner. These results revealed that large size RGD-PEG-LP was able to readily approach tumor vessels, and to efficiently bind to them, which would result in efficient internalization; consequently, to deliver higher amounts of DOX to the TECs where it provides a superior cytotoxic effect, since the large size LP (~300 nm) possesses about a 10 times higher internal volume than the small size (~100 nm) [43]. After disruption of the tumor vasculature, the blood supply within the tumor microenvironment would be discontinued resulting in the eventual death of the tumor cells. To investigate the cytotoxic effect of large size RGD-PEG-LP (DOX) on the TECs in tumor vasculature, we additionally compared the sensitivity of RCC tumor cells (OSRC-2) and TECs (OSRC-ECs) isolated from RCC tumor tissue to DOX; where, the OSRC-ECs show higher sensitivity to DOX, as compared to OSRC-2 cells (Fig. 5A). Generally, tumor cells grow at a faster rate than other cells including TECs, which might affect cell viability (Fig. 5). To assess this issue, we evaluated the growth rate of OSRC-2 and OSRC-ECs over 24 h; however, no significant difference in growth rates of the cells was observed (Fig. S4). Therefore, the effect of growth rate on cell viability can be excluded. These findings indicate the sensitivity of OSRC-ECs to DOX, suggesting that TECs are a promising target for the delivery of DOX in treating RCC. Therefore, the *in vivo* anti-tumor effect of large size RGD-PEG-LP in OSRC-2 tumor-bearing mice can be attributed to the specific apoptotic effect on TECs followed by rapid destruction of tumor vasculatures, known as anti-angiogenic effect, rather than on OSRC-2 tumor cells (Fig. S5). This result is supported by the previous reports showing that anti-angiogenic therapy would be effective in suppressing the growth of RCC tumors [31,32].

The RGD motif is readily recognized by Integrin $\alpha v \beta 3$ that is expressed largely by TECs [6,7] as well as more limitedly from normal endothelial cells of the spleen, lungs etc [48,49]. Therefore, it is necessary to evaluate the effect of RGD-PEG-LPs (DOX) on normal organs. We first evaluated the morphology of blood vessels of the major organs. No remarkable changes in the blood vessel structures were observed (Fig. 6A). Additionally, the induction of apoptosis by PEG-LPs (DOX) in normal organs was evaluated (Fig. S6). Although the preparations exhibited a size dependent induction of apoptosis in normal organs; however, the magnitude of the effects was only about 2-fold as compared to the control. Additionally, as the liver is the major clearance organ for nanoparticles, the serum ALT and AST enzyme levels of OSRC-2 mice were also measured (Fig. 6B–C). Although large size RGD-PEG-LP (DOX) showed a 20% reduction in liver blood vessel area (Fig. S7), no significant difference in above enzymes levels was observed

among the treated groups (Fig. 6B–C). Additionally, our system shows anti-tumor effect at lower dose of DOX as compared to others where a higher dose of DOX was used [50–52]. Therefore, due to lower dose of DOX, large size particle would not provide any serious toxicity in liver and spleen despite its higher accumulations (Fig. S1). Moreover, no significant difference in body weights of the treated mice and the control group was observed (data not shown). Collectively, these results indicate that the preparations might not appear to have any serious toxicity.

Based on the results obtained in the present study, we propose the following mechanism for the anti-tumor effect of large size RGD-PEG-LP (DOX). In an *in vitro* study, 40,000 OSRC-2 cells were incubated with a dose of 10 $\mu\text{g/ml}$ DOX and the amount of internalized DOX was determined to be 23.7×10^4 ng/cell, which caused the death of about 20% of the cells (Fig. 5A). On the other hand, OSRC-2 tumor bearing mice (20 g body weights) were injected with 3 μg of DOX (1.5 mg/kg) and the amount of Doxil in tumors via the EPR effect was found to be 3% ID/g tumor (Fig. 2A), where 1 g of tumor tissue contains 10^8 cells [53]. Hence, the availability of DOX would be 90×10^8 ng/tumor cell (Fig. 7), which is about 2600 times lower than the dose found in the *in vitro* situation, indicating that, to kill 20% of the tumor cells in an RCC tumor, a ~2600 times higher amount of Doxil would be required, which is a practical impossibility. Therefore, an insufficient amount of DOX in tumor cells delivered by Doxil fails to provide a sufficient anti-tumor effect. On the other hand, TECs (OSRC-EC) derived from OSRC-2 tumor tissue were found to be ~100-fold more sensitive to



Parameters	Doxil	RGD-PEG-LP (large)	Relative value (vs tumor cell)
Target site	OSRC-2	OSRC-EC	-
No. of cell	$10^8/\text{g tumor}$	$2 \times 10^6/\text{g tumor}$	-
Injected DOX (total)	3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$	3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$	-
Delivered DOX dose (%)	3% ID/g tumor	2.5% ID/g tumor	-
Delivered DOX /cell	90×10^{-8} ng	37.5×10^{-6} ng	40
DOX sensitivity (EC_{50})	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100

Fig. 7. Comparisons describing the therapeutic efficacy of large size RGD-PEG-LP (DOX) over Doxil in RCC tumor. Doxil (small size PEG-LP, ~100 nm) extravasates to tumor cells (OSRC-2) which are resistant to DOX. Large size RGD-PEG-LP (~300 nm) minimizes the extravasation and preferentially targets the TECs (OSRC-EC) which are ~100 times more sensitive to DOX. Compared to DOX delivered by Doxil to tumor cells, about 40 times higher amount of DOX could be delivered by large size RGD-PEG-LP to TECs indicating its efficiency for the treatment of RCC.

DOX than OSRC-2 cells (Fig. 5A). At a dose of 10 $\mu\text{g/ml}$ DOX to OSRC-EC, the internalized DOX/cell was found to be 2.38×10^{-4} ng, which causes the death of about 80% of cells (Fig. 5A). In addition, at a dose of 3 μg DOX/20 g body weight of mice, the amount of large size RGD-PEG-LP (DOX) was found to be 2.5 %ID/g tumor (Fig. 2A), where most of the particles targeted the TECs (Fig. 2B). TECs represent about 2% of tumor tissue (2×10^6 cells/g tumor) [38,54], the availability of DOX in one TEC would be 37.5×10^{-6} ng (Fig. 7), which is only 6 times lower than the DOX found *in vitro* conditions. It is feasible that a ~ 6 times higher amount of DOX delivered by the large size RGD-PEG-LP (DOX) would be able to kill $\sim 80\%$ of the OSRC-ECs in OSRC-2 tumors. Furthermore, the number of tumor cells is about 100-times greater than the TECs in tumor tissues [38,54,55], hence attacking one TEC would lead the suppression of growth or death of many surrounding tumor cells [29,56]. Compared to the DOX delivered by Doxil to tumor cells, about 40 times higher amount of DOX could be delivered by large size RGD-PEG-LP to TECs (Fig. 7) where TECs are ~ 100 times more sensitive to DOX. These calculations explain the better therapeutic efficacy of large size RGD-PEG-LP for the treatment of RCC. Due to the resistance of RCC, DOX is not used clinically. However, this study outlines a potential approach for treating RCC by utilizing DOX loaded nanoparticles via the targeting of tumor vessels.

5. Conclusions

Collectively, small size PEG-LPs (either Doxil or RGD-PEG-LP) extravasate to DOX resistant tumor cells via the EPR effect, where the large size RGD-PEG-LP (DOX) can minimize the EPR effect and specifically bind to and kill the TECs, a process called the anti-angiogenic effect. This then leads to the death of angiogenesis dependent tumor cells. Therefore, the anti-tumor activity of the large size RGD-PEG-LP (DOX) at its lower dose against RCC tumors can be ascribed to the selective targeting and apoptosis of TECs (OSRC-ECs) and destruction of the tumor vasculature rather than having a direct effect on drug resistant OSRC-2 cells. For targeting TECs in drug-resistant cancer, the large size particle shows more promise than the small size version, because of its higher targetability and drug delivery efficiency to TECs. Even though; large size particles remained beyond the interest of use, our results show an application of such particles in cancer therapy, indicating the shift of paradigm. The results obtained in this study revealed an effective anti-angiogenic therapy mediated by controlling the size of the nanoparticles for the treatment of drug-resistant, rapidly growing kidney cancer, indicating an attractive approach for future clinical trials.

Conflict of interest

The authors have no potential conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

This study was supported in parts by grants from the Special Education and Research Expenses of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT); as well as by a Grant-in-Aid for Research on Medical Device Development from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW). We thank Dr. Milton S. Feather for editing the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.094>.

References

- [1] Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* 2012;17:160–6.
- [2] Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 2008;26:57–64.
- [3] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000;65:271–84.
- [4] Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (Stealth[®]) liposomes in a human tumor xenografts. *Cancer Res* 1994;54:3352–6.
- [5] Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Cilli M, Gambini C, Ribatti D, et al. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res* 2003;63:7400–9.
- [6] Murphy EA, Majeti BK, Barnes LA, Makale M, Weis SM, Lutu-Fuga K, et al. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9343–8.
- [7] Schiffelers RM, Koning GA, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, et al. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J Control Release* 2003;91:115–22.
- [8] Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Sapra P, Moase EH, Allen TM, et al. Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-dsialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003;63:86–92.
- [9] Poljaková J, Eckschlager T, Hřebáčková J, Hraběta J, Stiborová M. The comparison of cytotoxicity of the anticancer drugs doxorubicin and ellipticine to human neuroblastoma cells. *Interdiscip Toxicol* 2008;1:186–9.
- [10] Park J, Bae E, Lee C, Yoon SS, Chae YS, Ahn KS, et al. RNA interference-directed caveolin-1 knockdown sensitizes SN12CPM6 cells to doxorubicin-induced apoptosis and reduces lung metastasis. *Tumour Biol* 2010;31:643–50.
- [11] Burg MA, Pasqualini R, Arap W, Ruoslahti E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res* 1999;59:2869–74.
- [12] Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, et al. Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 2004;108:301–6.
- [13] Oku N, Asai T, Watanabe K, Kuromi K, Nagatsuka M, Kurohane K, et al. Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 2002;21:2662–9.
- [14] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000;156:1363–80.
- [15] Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999;51:691–743.
- [16] Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee SY, Chiappini C, Liu X, et al. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J Control Release* 2010;141:320–7.
- [17] Gentile F, Curcio A, Indolfi C, Ferrari M, Decuzzi P. The margination propensity of spherical particles for vascular targeting in the microcirculation. *J Nanobiotechnol* 2008;6:9.
- [18] Haun JB, Hammer DA. Quantifying nanoparticle adhesion mediated by specific molecular interactions. *Langmuir* 2008;24:8821–32.
- [19] Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1104:95–101.
- [20] Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Kojima S, Sugiyama A, Iwatsuru M. Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphiphatic poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:44–9.
- [21] Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphiphatic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1994;1190:99–107.
- [22] Kibria G, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H. Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery. *J Control Release* 2011;153:141–8.
- [23] Vogelzang NJ, Stadler WM. Kidney cancer. *Lancet* 1998;352:1691–6.
- [24] Efferth T, Volm M. Protein expression profiles indicative for drug resistance of kidney carcinoma. *Cancer Genomics & Proteomics* 2004;1:17–22.
- [25] Mourad WF, Dutcher J, Ennis RD. State-of-the-art management of renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2012 Aug 2. [Epub ahead of print].
- [26] Staehler M, Rohrmann K, Bachmann A, Zaak D, Stief CG, Siebels M. Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int* 2005;95:1153–61.
- [27] Soto-Vega E, Arroyo C, Richaud-Patin Y, García-Carrasco M, Vázquez-Lavista LG, Llorente L. P-glycoprotein activity in renal clear cell carcinoma. *Urol Oncol* 2009;27:363–6.
- [28] Shimizu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004;27:599–605.
- [29] Hida K, Hida Y, Shindoh M. Understanding tumor endothelial cell abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci* 2008;99:459–66.
- [30] Kaelin Jr WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:6290S–5S.

- [31] Hutson TE. Targeted therapies for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: clinical evidence. *The Oncologist* 2011;16:14–22.
- [32] Di Lorenzo G, Buonerba C, Biglietto M, Scognamiglio F, Chiurazzi B, Riccardi F, et al. The therapy of kidney cancer with biomolecular drugs. *Cancer Treat Rev* 2010;36(Suppl. 3):S16–20.
- [33] Zhang L, Bhasin M, Schor-Bardach R, Wang X, Collins MP, Panka D, et al. Resistance of renal cell carcinoma to sorafenib is mediated by potentially reversible gene expression. *PLoS One* 2011;6:e19144.
- [34] Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:1063–71.
- [35] Hammers HJ, Verheul HM, Salumbides B, Sharma R, Rudek M, Jaspers J, et al. Reversible epithelial to mesenchymal transition and acquired resistance to sunitinib in patients with renal cell carcinoma: evidence from a xenograft study. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1525–35.
- [36] Di Lorenzo G, Porta C, Bellmunt J, Sternberg C, Kirkali Z, Staehler M, et al. Toxicities of targeted therapy and their management in kidney cancer. *Eur Urol* 2011;59:526–40.
- [37] Takara K, Hatakeyama H, Kibria G, Ohga N, Hida K, Harashima H. Size-controlled, dual-ligand modified liposomes that target the tumor vasculature show promise for use in drug-resistant cancer therapy. *J Control Release* 2012;162:225–32.
- [38] Matsuda K, Ohga N, Hida Y, Muraki C, Tsuchiya K, Kurosu T, et al. Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:947–54.
- [39] Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, et al. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am J Pathol* 2009;175:2657–67.
- [40] Tsuchiya K, Hida K, Hida Y, Muraki C, Ohga N, Akino T, et al. Adrenomedullin antagonist suppresses tumor formation in renal cell carcinoma through inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial progenitor mobilization. *Int J Oncol* 2010;36:1379–86.
- [41] Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Stüss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1633–40.
- [42] Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradient in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta* 1993;1151:201–15.
- [43] Enoch HG, Strittmatter P. Formation and properties of 1000-Å-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:145–9.
- [44] Xu X, Khan MA, Burgess DJ. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *Int J Pharm* 2012;423:410–8.
- [45] A mathematical model to predict drug encapsulation inside liposomes. Available from URL: <http://www.liposomemodel.com>.
- [46] Ogawara K, Un K, Tanaka K, Higaki K, Kimura T. In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells. *J Control Release* 2009;133:4–10.
- [47] Montet X, Funovics M, Montet-Abou K, Weissleder R, Josephson L. Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display. *J Med Chem* 2006;49:6087–93.
- [48] Singh B, Rawlings N, Kaur A. Expression of integrin alphavbeta3 in pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* 2001;16:1037–46.
- [49] Singh B, Fu C, Bhattacharya J. Vascular expression of the alpha(v)beta(3)-integrin in lung and other organs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L217–26.
- [50] Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, Nico B, Pezzolo A, Marimietri D, et al. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Res* 2006;66:10073–82.
- [51] Wang Z, Yu Y, Dai W, Lu J, Cui J, Wu H, et al. The use of a tumor metastasis targeting peptide to deliver doxorubicin-containing liposomes to highly metastatic cancer. *Biomaterials* 2012;33:8451–60.
- [52] Du B, Han H, Wang Z, Kuang L, Wang L, Yu L, et al. Targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Mol Cancer Res* 2010;8:135–44.
- [53] Zheng JY, Chen D, Chan J, Yu D, Ko E, Pang S. Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A. *Cancer Gene Ther* 2003;10:764–70.
- [54] Dass CR, Choong PF. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer Cell Int* 2006;6:17.
- [55] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27–31.
- [56] Molema G, Meijer DL, de Leij LF. Tumor vasculature targeted therapies: getting the players organized. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1939–45.

医療薬学

～次世代医療を担う最新テクノロジー～ 2

~~~~~

### ブラッシュアップ講座

~~~~~

核酸医薬の現状と創薬のパラダイムシフト

1. 核酸医薬の歴史と分類

核酸医薬とは、DNA や RNA を構成するヌクレオシド(塩基が結合した糖)がリン酸結合やそれに類似する結合により複数連なった構造体を利用した医薬である。これまで用いられてきた低分子化合物や、現在さまざまな疾患に利用され始めている抗体等のタンパク質に代わる第3の医薬分子として研究が進められている。広義にはウイルスや大腸菌由来のベクターも含まれると考えられるが、ここでは人工的に数十個のヌクレオチドが連結・合成された合成核酸医薬を核酸医薬として定義する。核酸医薬の歴史は、セントラルドグマとアンチセンス法の発見から始まったと言われている。セントラルドグマは1958年にCrickが提唱した遺伝情報の一連の流れのことであり、染色体DNAがメッセンジャーRNA(mRNA)へと転写されたのちに、実際に生体内においてさまざまな機能を持つタンパク質へと翻訳されるという概念である。この概念からタンパク質に翻訳される前の、mRNAを抑えることで病気の原因になっているタンパク質の生成を抑制できるのではないかと予想された。実際に、1978年、Zamecnikらがニワトリの胎児繊維芽細胞において、ラウス肉腫ウイルスのゲノムと相補的な配列を有する13ヌクレオチドからなるオリゴDNAを用いてラウス肉腫ウイルス由来のタンパク質の生成を阻害し、複製と増殖を阻害可能であるという報告を行っている¹⁾。また、第一回でも触れたように、2006年にノーベル生理学医学賞を受賞したFire AndrewとCraig Melloらによる化学合成された短鎖small interfering RNAを用いて標的遺伝子の抑制を行うRNAi法の発見は、より効率的な発現制御を可能とした²⁾。これらの



北海道大学大学院 薬学研究院

未来創剤学研究室

特任助教 櫻井 遊

発見とヒトゲノム解析技術の発展によって、低分子化合物や抗体に代わる革新的治療法として核酸医薬に大きな期待が寄せられている。ここではウイルスベクターやプラスミドDNAベクターを用いた例には触れず、化学合成により作製可能な合成核酸医薬品について取り上げる。

核酸医薬は標的分子の違いからおおよそ以下の5種に分類される。アンチセンス、アプタマー、デコイ核酸、アンチmicroRNA(miRNA)、siRNAである。それぞれ標的分子はmRNA、低分子・タンパク質を含むあらゆる分子、転写因子、miRNA、mRNAとなる。このうちsiRNA以外の核酸医薬は、標的分子との単純な結合によって効果を発揮するのに対して、siRNAは生体が本来持つRNAiという現象を利用するという点で異なる(RNAiについては次項で詳しく述べる)。核酸医薬が現在大きな注目を集めているのは、ヒトの遺伝情報を網羅的に明らかとしたヒトゲノム計画や、それぞれのゲノムDNAやmRNA配列が実際にはどのように発現しているのかを明らかとするようなマウスエンサイクロペディアプロジェクトなどが行われたことと関係している。これらの解析の結果、ある疾患を起こす原因遺伝子さえ明らかになればそれに対応するmRNAやゲノムDNA上の配列情報に容易にアクセスすることが可能となった。すなわち、標的遺伝子の発見と同時に、その標的遺伝子を抑制するための核酸医薬が設計可能となったとも言い換えることができる。これは、核酸医薬があらゆる疾患の治療薬になり得る可能性を秘めていると同時に、従来の低分子化合物や抗体がスクリーニング等によって莫大な費用と時間を掛けていたこれまでの創薬の様式を

表1 現在進行中の siRNA 医薬の一例

会社	コードネーム	DDS	Phase	標的疾患・症状
Alnylam	ALN-TTR02	リポソーム	Phase II	家族性アミロイドーシス
	ALN-PCS	リポソーム	Phase I	高脂血症
	ALN-RSV01	siRNAのみ	Phase II	呼吸器多核体ウイルス感染
	ALN-VSP	リポソーム	Phase I	肝臓がん
Tekmira	TKM-PLK1	リポソーム	Phase I	肝臓がん
	TKM-Ebola	リポソーム	Phase I	エボラ出血熱
Arrowhead	CALAA-01	ポリマー型DDS	Phase I	固形がん
Quark+Silene+Pfizer	PF-04523655	siRNAのみ	Phase II	脈絡膜における血管新生
Quark+Silence+Novartis	QPI-1002	siRNAのみ	Phase I/II	腎臓移植後の急性腎不全
Quark+Biospring	QPI-1007	siRNAのみ	Phase I	視神経障害
Silence Therapeutics	Atu027	AtuPLEX	Phase I	固形がん
RXi	RXI-109	siRNAのみ	Phase I	手術後の傷創部の整形
Silenseed	siG12D LODER	生分解性ポリマー	Phase I	膵臓がん
Sylentis	SYL040012	siRNAのみ	Phase II	眼圧亢進

一変させる可能性があることを示唆している。

既に医薬として販売されている核酸医薬は、エイズ患者を対象としたサイトメガロウイルス性網膜炎治療薬のアンチセンス医薬である「ホミビルセン」(ピトラベン)と加齢性黄斑変性症(AMD)に対するアプタマー医薬「マクジェン」(ペガブタニブ)の2つである。これらの内マクジェンには123,457円と高い薬価が付けられていることから、核酸医薬の有効性が示唆される。一方で、これら二つの薬の適応部位に目を向けてみると、いずれも眼科領域である。これはDNAやRNAなどの天然に存在する核酸は基本的に血液内で核酸を分解する酵素であるヌクレアーゼにより容易く分解を受け、また、そのままの形で静脈内投与を行っても腎排泄される等、血中に投与した後の体内動態を制御する方法が無かったことが原因である。すなわち、核酸医薬が本来期待されたようなあらゆる疾患の治療薬として用いられるためには、体内動態を制御するドラッグデリバリーシステム(DDS)技術の開発が必要不可欠である。しかしながら、このDDS技術の開発は困難を極め、2008年にマクジェンが上市されて以来2012年までに新たに臨床応用された核酸医薬はない。本稿で

は、現在目下開発が進んでいる核酸そのものへ意匠を施す試みや革新的なナノテクノロジーによるDDS開発の試みについて、最も開発の進んでいるアンチセンス・アンチmiRNA、そしてsiRNAの例を挙げて紹介したい(表1)。

2. アンチセンス、アンチmiRNAとその他の核酸医薬

アンチセンス医薬は1998年のホミビルセンの誕生に端を発し注目を集めてきたものの、先に述べた生体内での安定性や細胞への低い親和性が問題となっていた。また、siRNAに比べて効率の面で劣っているとされたこともあり、一時期影を潜めた。しかしながら、現在では優れた化学修飾核酸の開発により再び注目を集めている。図1には代表的な核酸の修飾様式を示した。現在臨床開発中の核酸医薬では、これらの内一つあるいは複数を組み合わせることで目的の薬効が発揮できるように設計されている。また、標的とする分子についても当初はタンパク質をコードしているmRNAが主であったが、miRNAに代表されるようなタンパク質の生合成に直接関与していない非コードRNAに関して開発が進められている。

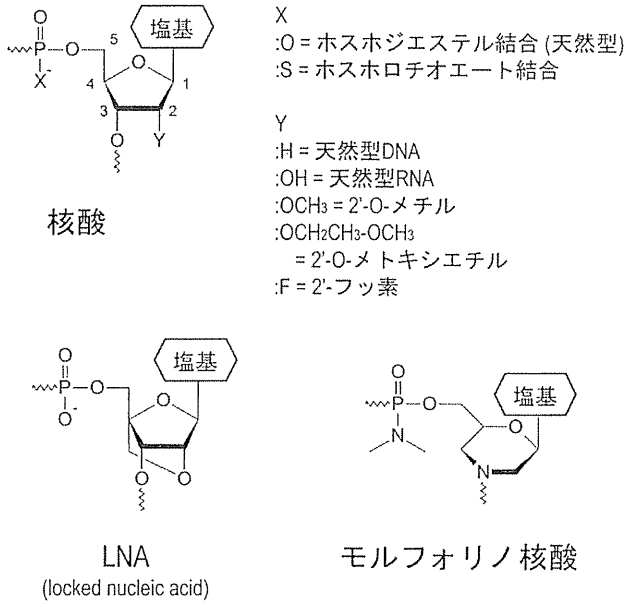


図1 核酸医薬に用いられる典型的な化学修飾の例

(1) アンチセンス医薬

2つ目のアンチセンス医薬として、「ミボメルセン」が2013年に米食品医薬品局 (FDA) によって承認された。ミボメルセンはホモ接合型家族性高コレステロール血症 (ホモ FH) と呼ばれる遺伝性疾患を持つ患者を対象とした全身投与型 (皮下投与型) アンチセンス医薬である。ホモ FH は高 LDL コレステロール血症や若年性の冠動脈硬化症を呈する疾患であり、進行に伴いさまざまな臓器障害を引き起こす。現在ヘテロ接合体の患者にはスタチン系の薬物治療が第一選択として行われているが、ホモ FH では有効な治療薬がないのが実情である。ミボメルセンは、生体内や細胞内でのヌクレアーゼに対する安定性を上昇させるために、全てのホスホジエステル結合がホスホロチオエート結合に置き換えられ、さらに両末端が2'-O-メトキシエチル基で修飾されたヌクレオチドを持つ20個の DNA からなるオリゴヌクレオ

チドである。ミボメルセンはアポリポタンパク質 B (ApoB) の mRNA に結合し、二本鎖を形成する。細胞内には RNase H と呼ばれる DNA-RNA のハイブリット二本鎖を分解する酵素が存在するため、ApoB mRNA とミボメルセンの複合体がこの酵素により切断を受けることで翻訳が阻害され、肝臓で生成する ApoB タンパク質の量が減少する。この結果、LDL コレステロール値が低下するというのが、アンチセンス医薬ミボメルセンの作用機序である。これまでに無い機序の医薬であることから非常に高い有用性があるとされているものの、循環器での副作用を理由に欧州医薬品庁が認可を拒否する判断を出すなど、依然として全身投与型の核酸医薬においてはリスクとベネフィットのバランスの判断が続いている状況であると言える。

(2) アンチ miRNA 医薬

タンパク質をコードしていないことから、これまで「ジャンク」とされてきたゲノム DNA 領域から転写される非コード RNA を標的とする医薬の開発も進んでいる。こうした領域から長い pri-miRNA として転写され、その後プロセッシングを受けてヘアピン構造を持つ pre-miRNA となり、exportin 5 と呼ばれるタンパク質によって核から細胞質へと輸送された後、さらなるプロセッシングを受け、最終的に一本鎖、ないし数塩基の非相補的な部分を有する二本鎖 RNA、いわゆる成熟

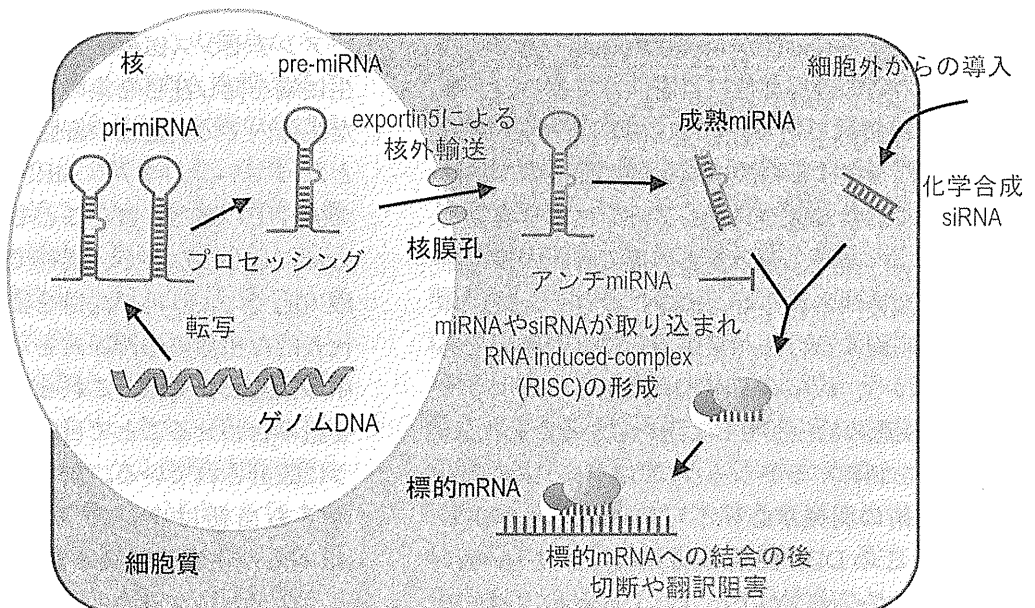


図2 内因性 miRNA と外から導入した siRNA の mRNA 阻害機構の模式図

miRNAとなる。この成熟miRNAは、化学合成siRNAと同様のRISCを形成したのちに、mRNAの3'非翻訳領域と呼ばれる部分に存在する相補性の高い領域に結合することで、標的のmRNAを分解あるいは翻訳の抑制を担っている(図2)。miRNAは発生や増殖などの成長に必須な現象はもちろんのこと、がんや高脂血症などの他さまざまな疾患に深く関与していることが知られており、疾患治療の標的としても注目を集めている³⁾。また、miRNAを初めとする非コードRNAの多様性がヒトの高次機能を規定する要因の一つではないとも言われている。実際、タンパク質をコードする遺伝子の数ではヒトとマウスでは大きな差はないが、miRNAの数では2012年現在miRBase ver.18.0と呼ばれるデータベースに登録されている数はヒトで1921、マウス1157と大きく異なっている。新規のmiRNAの発見や疾患との関わりを示す報告は続いており、現在もお盛んに研究が行われている分野である。医薬開発においては、非コードRNAであるmiRNAを標的とするアンチmiRNA医薬である「ミラビルセン」の開発が現在進行中である。現在、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する治療薬としてミラビルセンのフェーズII試験を終了したことが、本薬を開発しているSantaris Pharma社より発表された。HCVに感染しているヒトは全世界で1億7000万人、本邦でも150~200万人ほどと見積もられている。HCVに持続感染を起こした患者は肝臓の線維化、肝硬変を経て肝臓がんへと移行してしまう。現在ではペグ化インターフェロンやウイルスプロテアーゼ阻害剤など新規治療薬が開発されているが、ウイルスのジェノタイプによっては奏効率が低い場合もあり、依然新規の作用機序を持つ新薬の開発が望まれている⁴⁾。ミラビルセンはLNAと呼ばれる特徴的なヌクレオチドで構成されるオリゴヌクレオチドであり、肝臓特異的に発現するヒトのmiRNA-122と相補的に強く結合することで阻害する。また、近年ではプロセッシングを受ける前のpri-miRNAやpre-miRNAと結合することで、成熟miRNA-122の生成を抑制するとも報告されている⁵⁾。宿主であるヒト由来のmiRNA-122は、HCVのRNAゲノムへの結合を介してHCVの複製に重要な役割を果たすことが報告されており、ミラビルセンはこのmiRNA-

122とHCVのRNAゲノムの結合を競合的に阻害することで、結果的にHCVの複製を抑えるという機構である。これは従来の薬とは異なり、変異頻度の高いウイルスそのものではなく宿主側を対象とした薬であることから、耐性変異ウイルスの少ない治療法として注目を集めている。

(3) その他の核酸医薬

これまで紹介した例と一線を画する機構の核酸医薬の代表格としては、エキソスキッピングを利用した例が挙げられよう。通常mRNAは、エキソンと呼ばれるタンパク質をコードする配列とイントロンと呼ばれ切り取られる余分な配列をもつRNAとして染色体DNAから転写され、スプライシングを受けイントロン部分が切り出されることで成熟mRNAとなり、タンパク質を生成する。エキソスキッピングでは、遺伝子異常により働かなくなったエキソン部をイントロン部がスプライシングを受ける際に一緒に切り出させる技術である。その中でも最も臨床応用の研究が進められているのは、ディシェンヌ型筋ジストロフィーに対するものである。ディシェンヌ型筋ジストロフィーは、筋肉の収縮・伸展や、筋細胞の正常な増殖に必要なタンパク質であるジストロフィンの異常によって引き起こされる。ジストロフィン71のエキソンから成る巨大な遺伝子である。ディシェンヌ型筋ジストロフィーではジストロフィン遺伝子のエキソンの内のいくつかの部位で、ゲノムDNAに点変異などが生じることにより、翻訳の際に異常なタンパク質が生成し筋肉が正常に発達・機能異常を起こす。この内、51番目のエキソンで変異が生じる例が最も多く、全変異のうち12%を占めていると報告されている⁶⁾。「ドリサベルセン」はゲノムDNAからジストロフィン遺伝子がpre-miRNAが転写されたのちのスプライシングを受けて成熟mRNAとなる段階で、変異の起きたエキソンの51番目が除去されるように働く。51番目のエキソンが除かれることで生成するジストロフィンタンパク質は、正常よりもアミノ酸の数が少なく働きも弱いものの、ある程度はジストロフィンとして作用するため臨床症状が改善されるのである。ドリサベルセンでは全ての2'位の水酸基とリン酸ジエステル結合が、2'-O-メチル基とホスホロチオエート結合に置換された構造を有

しており、通常の核酸と比較して体内での安定性と mRNA との複合体形成能が高められている。ドリサベルセンはジストロフィンの pre miRNA の51番目のエキソンと結合し、スプライシングを行うタンパク質の近接を阻害することで異常なエキソンが読み飛ばされるようにする。これにより得られる成熟 mRNA 内には異常な51番目のエキソンが存在せず、ある程度機能するジストロフィンタンパク質が生成する。2013年9月現在、GlaxoSmithKline社の主導でフェーズⅢ試験を行っているところであり、今後の報告が待たれる。また、より効率的にエキソスキッピングを誘導可能なモルフォリノ核酸などを用いた治験も進行中である。このように天然とは異なる形を有する人工核酸の開発により、生体内での安定性や標的の核酸との親和性が飛躍的に高まっており、さまざまな難治性疾患の治療への応用は現実のものになろうとしている。

3. siRNA 医薬

上記に挙げた核酸医薬が基本的には単純な分子間の結合を介した阻害であるのに対し、siRNA は本来生体内にある分子機構を利用する。これにより、siRNA による阻害は1:1ではなく、1:複数という量的関係となるため、一つ疾患関連遺伝子を抑制するのに必要な核酸量は少量となり、効率に優れるとされてきた。siRNA はガイド鎖(アンチセンス鎖)と呼ばれる mRNA に相補的であり分解を担う一本鎖 RNA と、パッセンジャー鎖(センス鎖)と呼ばれる一本鎖 RNA から成る。お互いの鎖は21ヌクレオチドから構成される化学合成された短鎖 RNA であり、19ヌクレオチドが2本鎖となっており、3'側は2ヌクレオチド分相補鎖を形成してせず突出した構造になっている。siRNA は細胞に導入された後に他のタンパク質を呼び込むことで RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し、自分と相補的な配列を有する mRNA を切断し、翻訳が行われないようにする(図2)。そのため、アンチセンス医薬のような体内動態を改善するための化学修飾を siRNA に施した場合には、RISC の形成が阻害してしまう siRNA としての活性を失ってしまうことが報告されている。このことから、siRNA を構成するヌクレオチドへの化学修飾は、この RISC 形成

を阻害しない程度の簡易なものに制限されている。先に述べたように未修飾の核酸はそのままの形で RNase 感受性であるために、siRNA 単体での医薬化はアンチセンス医薬などと比較して困難である。そのため、siRNA の全身投与によって疾患を治療するためには、核酸自体の構造の変化を伴わない DDS が重要となる。現在のところ、siRNA 分子単体での応用例として最も研究が進んでいる疾患は局所的な投与が可能な疾患であり、眼科領域と感染症領域である。眼科領域としては AMD の開発が行われている。AMD は全米で糖尿病に次いで失明の原因の第1位であり、近年本国においても患者数の増加が報告されている難治性疾患である。その本態は網膜の中心部にある黄斑と呼ばれる部位において異常な血管の新生が起こり、血液中の水分が漏出することによる黄斑の水腫である。この異常な血管新生を阻害するために、血管新生を惹起する遺伝子に対する siRNA を硝子体内投与することにより治療する試みが行われている⁷⁾。また、乳幼児で感染例の多い呼吸器多核体ウイルスに対する吸入型の siRNA 治療薬の開発なども進んでおり、現在臨床試験のフェーズⅡが行われている。

siRNA を DDS により標的細胞に送達する試みとしては、自己会合性の単分子の集合体であるポリマーを用いた報告や、脂質二重膜を有するリポソームを用いる報告が多い。現在最も上市に近いとされているのは、カナダのベンチャー企業である Alnylam 社の lipid nano particle (LNP) 技術による DDS である^{8,9)}。彼らの技術では、siRNA は脂質膜に内封された構造を有していると考えられている。生体内のアポリポタンパク質 E (ApoE) が LNP に吸着することで、肝臓に発現している低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) を介して取り込まれるという機構により肝臓に高い選択性を示す¹⁰⁾。現在、肝臓の遺伝子を対象とした、家族性アミロイドーシス、血友病、高脂血症、肝臓がんなどの主に肝臓での遺伝子の異常に端を発する疾患に対しての治療薬の臨床試験が進行中である。

4. 細胞内環境に応答するナノ粒子の利用

著者らは、リポソームが細胞に取り込まれてエンドソームと呼ばれる小胞から siRNA の機能す

る場である細胞質へと移行する際のメカニズムに着目したDDSの開発を進めている。siRNAは通常の薬剤と違い自発的に細胞内に拡散することは無いため、静脈内投与してから標的の組織に移行する細胞内動態、そしてその後取り込まれてから細胞質へと移動するまでの細胞内動態を制御する技術の開発が必要不可欠となる。リポソーム様キャリアがエンドソームを脱出する際には、負電荷を帯びたエンドソーム膜の脂質分子と核酸と複合体を形成するための正電荷を帯びたsiRNA封入リポソームの脂質分子間で静電的相互作用が初めに起こる。その後、両分子間で逆ヘキサゴナル構造と呼ばれる凝集を起こし、siRNAが細胞質へ移行するというモデルが報告されている。本モデルに基づき、我々は新規の脂質分子YSK05の設計を行った。これまでの培養細胞を用いた評価により、YSK05を含むリポソームにsiRNAを内封すると非常に高いsiRNA送達活性が認められることを明らかとしている(図3)¹¹⁾。また、このようなpH応答性の機構を有するYSK05にはもう1

つ大きな利点がある。それは、生体内の生理的なpHでは荷電せず中性であることから、タンパク質との非特異的な結合を回避することができるという点である。この特徴はがん組織を標的とする際に特に有効であると考えられる。現在市販されているがんを標的とするドキシソルピシンのリポソーム製剤である「ドキシル」はエイズ関連カポジ肉腫や化学療法後に増悪した卵巣がんなどに適応されている。enhanced permeability and retention (EPR)効果と呼ばれる現象を利用して、静脈内投与後のがん選択的な集積を示す。EPR効果とは、腫瘍の脆弱な血管とリンパ管の構造に起因する。静脈内投与後に血中を長時間滞留可能な高分子は脆くなった血管壁を超えてがん組織へと移行する。通常臓器では、こうした高分子はリンパ管を介して組織から排泄されるものの、がん組織ではリンパ管の発達が未熟なためこうした排泄が起こらず、徐々に高分子ががん組織へと蓄積するのである。通常のリポソームでは静脈内投与後に速やかに血中より排泄を受けるが、ポリエチレングリコール(PEG)と呼ばれる水溶性の分子で表面を覆った場合にはこのようなクリアランスを回避可能であることが知られている。通常siRNAをがんへと送る場合には核酸との複合体形成能や細胞への親和性を得るために強い正電荷を帯びており大量のPEGが必要となるが、著者らのpH応答性の脂質を用いることで比較的少ないPEG量で血中を滞留させることが可能となる。これらの仮説に従って、マウスを用いた実験を行ったところ、マウスに移植した腫瘍組織でsiRNA特異的な遺伝子発現の抑制を起こすことに成功している¹²⁾。現在、脂質分子の構造に着目し更に効率の良いDDSの開発に着手している。

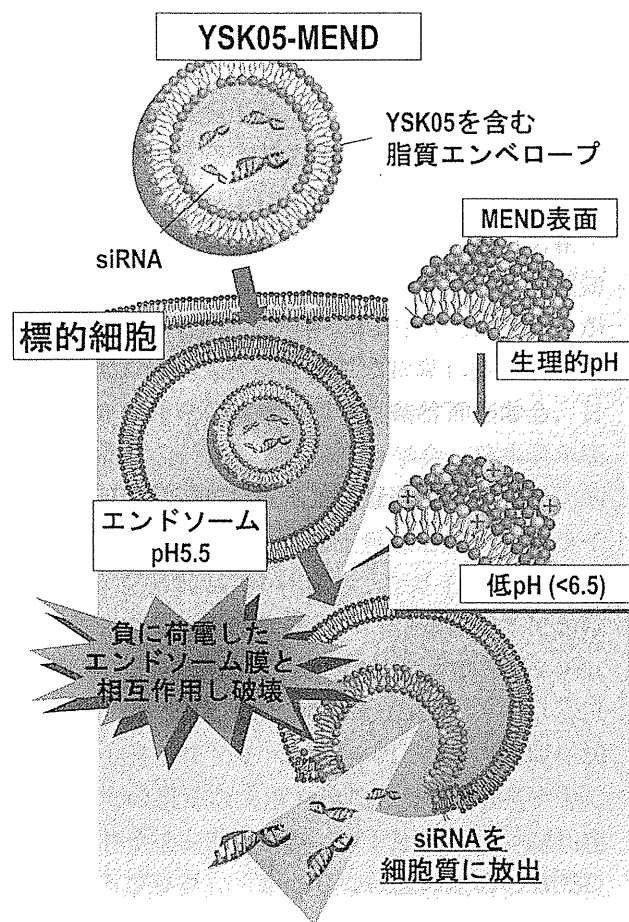


図3 pH応答性脂質によるエンドソーム脱出

文献

- 1) Zamecnik, P.C., and M.L. Stephenson: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 1 1978.
- 2) Fire, A., S. Xu, et al: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391, 6669 1998.
- 3) Garzon, R., G. Marcucci, et al: Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 10 2010.