

令和元年6月21日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08201

研究課題名(和文) 高機能化脂質ナノ粒子の開発とRNA干渉療法への応用

研究課題名(英文) Development of functional lipid nanoparticles for RNA interference-based therapy

研究代表者

浅井 知浩 (Tomohiro, Asai)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：00381731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉薬は、アンドラッグابلとされているタンパク質を治療標的とすることが可能であり、アンメットメディカルニーズ疾患の治療への応用が期待されている。しかし、その実用化には、drug delivery system (DDS) 技術の開発が不可欠である。本研究では、効果的にRNA干渉を引き起こすための特殊なDDS技術を開発した。本研究で得られた成果は、RNA干渉のがん治療への応用に繋がるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA干渉薬をアプタマー医薬や抗体医薬と比較すると、細胞内タンパク質が創薬ターゲットになるという利点が大きく、DDSの技術革新次第では数多くの画期的医薬品が創出される可能性がある。つまり、RNAを安全に患部に運搬するシステムが確立されれば、アンドラッグابل問題の解消へと繋がり、医療の進歩に大きく貢献できる。本研究の成果は、RNA干渉薬開発に必要なDDSについて重要な基礎的知見を与えるものであり、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Small interfering RNA (siRNA) capable of inducing gene silencing is a promising drug candidate to address unmet medical needs. However, siRNA is difficult to induce gene silencing without an appropriate delivery vehicle. The establishment of effective delivery systems is one of the most important tasks to develop RNA interference (RNAi)-based drugs. Functional lipid nanoparticles are attractive and promising vectors for RNAi therapy. In the present study, we developed novel lipid nanoparticles containing a possible RNAi enhancer for cancer treatment. Our findings provide new insights into the design of effective lipid nanoparticles for RNAi therapy.

研究分野：薬物送達学

キーワード：脂質ナノ粒子 RNA干渉 オートファジー siRNA verteporfin DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

アンメットメディカルニーズに応える医薬品のシーズとして、siRNA に大きな期待が寄せられている。siRNA を実用化するうえで最大の課題になっている DDS の技術革新がなされれば、数多くの画期的医薬品が生まれると考えられる。アンメットメディカルニーズへの対応にあたり、siRNA 医薬は細胞内タンパク質を創薬標的にすることができ、医薬品化で先行する抗体医薬とは差別化が図れる。生体内では、エクソソームが RNA のベクターとして機能し、RNA を細胞内まで運搬することが知られている。人工の脂質ナノ粒子は、この生命現象を模した siRNA ベクターとして、大変有望であると考えられる。

これまでに我々は、siRNA デリバリーに有用なポリアミン脂質誘導体（図 1）を設計・合成し、その誘導体を主成分とする脂質ナノ粒子を開発してきた。がん細胞への標的化能やエンドソームからの脱出能などの機能を備えた脂質ナノ粒子を調製し、その有用性の評価を重ねてきた。脂質ナノ粒子を用いて抗がん活性を有する siRNA や microRNA (miRNA) を担がんマウスに静脈内投与し、標的遺伝子のサイレンシングや有意な腫瘍増殖抑制効果について報告してきた。

これまでに我々は siRNA ベクターの設計にあたり、いかに多くの siRNA を標的細胞の細胞質に送り届けるかを主眼において研究を展開してきた。siRNA 投与後の標的組織への到達量、標的細胞に対する選択性、細胞内への取り込み量、細胞内におけるエンドソームからの脱出などについて検討を重ねることで、高い導入効率を示す siRNA ベクターの開発を目指してきた。競合技術もおおむねこのような方向性でベクター開発がなされてきている。しかしながら、細胞質に到達された siRNA がどの程度 RISC に取り込まれ、効率的に遺伝子サイレンシングに利用されているかは不明のままである。mRNA の切断活性を示す AGO2 は分解を受けやすく、フリーの AGO2 (miRNA や siRNA を保持していない AGO2) の量は限られているため、一過性に多量の siRNA を送達したところで、効率的に RISC を形成していない可能性が考えられる。そこで本研究では、オートファジー阻害作用ならびに AGO2 発現増加作用（図 2）を予試験的に確認している verteporfin を用いることで、脂質ナノ粒子をさらに高機能化し、RNA 干渉効率の増強と効果的ながん併用療法を目指した。

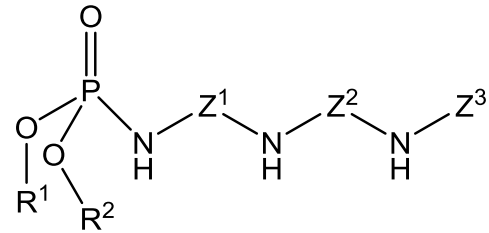


図1 ポリアミン脂質誘導体  
R: 脂肪酸、Z: 炭化水素鎖  
(特許登録: US 12/550, 196)

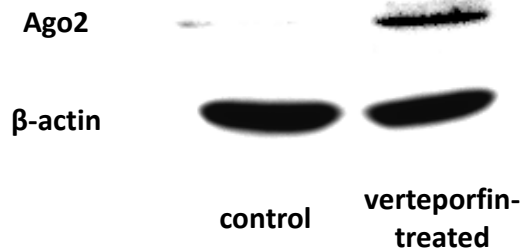


図2 verteporfin処理によるAgo2量の増加

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞質到達後の siRNA の運命と遺伝子サイレンシングの関係について解析を行い、さらには到達後 siRNA の利用効率の改善を図ることにより、革新的な DDS 技術の創出を目指した。具体的には、我々が開発した脂質ナノ粒子に verteporfin を封入し、細胞質に到達した siRNA の利用率の向上を図った革新的 DDS 技術の開発を行った。図 3 に本研究戦略の概略図を示したように、verteporfin のオートファジー阻害ならびに AGO2 発現増加作用を利用し、細胞内において siRNA が効率的に RISC を形成するように誘導する。オートファジー阻害による AGO2 発現増加に関してはすでに報告があり

(NATALIA J. et al. RNA, 2013)、また我々の予試験的なデータでも確認されている。さらに、リソソーム阻害剤の bafilomycin A1 やオートファゴソーム形成阻害剤の 3-MA といったオートファジー阻害剤で細胞を処理する

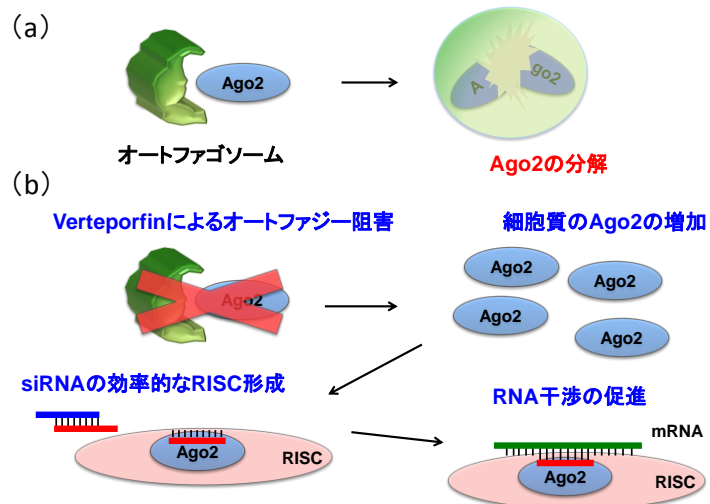


図3 本研究戦略の概略図  
(a) Ago2の分解と(b) Ago2の分解抑制によるRNA干渉促進機構

ことで、細胞内の AGO2 量が増加することも知られている。本研究では、verteporfin が加齢黄斑変性症の光線力学療法に用いられる既承認薬 Visudyne の主成分であるという理由で本化合物に着目した。verteporfin のドラッグリポジショニング (DR) によって研究開発を進めることにより、充実した安全性情報、迅速な医薬品開発、開発成功率の向上などの優位性が見込まれる。さらに、リポソーム製剤として承認されている verteporfin は、脂質ナノ粒子化に際し有利な物理化学的性質を有する。Visudyne はリポソームを溶媒として利用した製剤であり、生体内では verteporfin が血清タンパク質に移ることが知られている。しかし我々は、生体内において verteporfin を安定に保持するリポソームの作成技術をすでに確立しており (Ichikawa K et al. *Biochim Biophys Acta.*, 2005)、このノウハウを verteporfin の脂質ナノ粒子化に応用する。脂質ナノ粒子に verteporfin を含有させることにより、siRNA を標的細胞に送達するだけにとどまらず、到達した siRNA が効率的に RNA 干渉を引き起こすための仕組みを持った DDS 技術の開発を行う。

また近年、オートファジー阻害剤は、その抗がん作用が注目されており、新しいタイプの抗がん剤として研究開発が行われている。verteporfin のオートファジー阻害効果ならびに抗がん活性は、これまでの我々の研究においても確認されており、用いる用量によっては抗がん効果も期待できる。したがって、verteporfin と抗がん活性を示す siRNA の組み合わせでは、オートファジー阻害による抗がん効果と siRNA による抗がん効果の併用効果が期待できる。加齢黄斑変性症の光線力学療法に用いられる verteporfin は、安全性情報が充実した既承認薬である一方で、がん治療を目的とした場合においては siRNA との相乗効果が期待される有望な抗がん剤シーズという側面を持つ。そこで、がん治療への応用を念頭に verteporfin の用量について検討し、verteporfin と siRNA を含有する脂質ナノ粒子の併用効果について明らかにする。

### 3. 研究の方法

[verteporfin の AGO2 安定化作用とオートファジー阻害作用]

RNA 干渉促進剤を含有する脂質ナノ粒子の開発を目的とし、はじめにフリーの (脂質ナノ粒子化していない) verteporfin の AGO2 安定化作用とオートファジー阻害作用について、MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を用いて検討した。AGO2 安定化作用は、verteporfin 処理後の AGO2 タンパク質の発現量を指標にして評価した。オートファジー阻害作用は、verteporfin 処理後の LC-3 タンパク質の発現量を指標にして評価した。また、verteporfin 処理が細胞増殖に与える影響について、WST-8 assay で評価した。オートファジー阻害による細胞増殖抑制効果が出現しない濃度域において AGO2 安定化作用を検討した。

[verteporfin 処理による RNA 干渉促進作用の検討]

AGO2 安定化作用が見られた用量の verteporfin (フリー) を処理した MDA-MB-231 細胞に脂質ナノ粒子を用いて siRNA を導入し、verteporfin 処理による遺伝子サイレンシングの促進効果について検討した。脂質ナノ粒子としては、我々が開発した dioleoyl phosphate-diethylenetriamine derivative (DOP-DETA、図 4) を主成分とするものを用いた。DOP-DETA を用いて作成したリポソーム (DL) は、インビトロにおいて非常に低用量の siRNA (<1 nM) で遺伝子サイレンシング効果が得られる。verteporfin 処理による RNA 干渉促進作用は抗がん活性を示す polo-like kinase 1 (PLK1) の siRNA (siPLK) を用いて遺伝子サイレンシング実験を行い、verteporfin の効果を検証した。遺伝子サイレンシングの評価は、リアルタイム RT-PCR および Western blotting で行った。

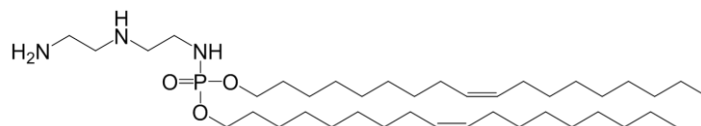


図4 DOP-DETAの構造式

[verteporfin と siPLK の併用効果]

オートファジー阻害作用を有する verteporfin と抗がん活性を示す siPLK は、相乗的に抗がん効果を発揮する可能性がある。そこで、MDA-MB-231 細胞に verteporfin と siPLK を併用処理し、その抗がん活性を WST-8 assay で評価した。

verteporfin を含有する DL を調製し、verteporfin の封入量、安定性、粒子径・ゼータ電位等の物理化学的性質を評価した。verteporfin の用量は抗がん活性を指標にして決定した。MDA-MB-231 細胞を用いて verteporfin 単独、siPLK 単独、ならびに併用の抗がん効果を比較した。本検討により、siPLK の抗がん効果を verteporfin が増強するか否かについて評価した。

[細胞質到達後の siRNA の運命と遺伝子サイレンシングの関係性]

siRNA を MDA-MB-231 細胞に導入し、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれた siRNA 量について評価した。AGO2 に対して免疫沈降反応を行い、AGO2 に結合した siRNA の量を定量した。verteporfin 処理の有無によって RISC に取り込まれた siRNA 量が変化するか検討し、RNA 干渉増強効果のメカニズムについて考察した。

### 4. 研究成果

はじめに verteporfin のオートファジー阻害効果、ならびにオートファジーの分解基質であり、RNA 干渉において主要な活性を示すタンパク質である AGO2 の分解抑制効果を評価した。一

一般的にオートファジーは *K-ras* 遺伝子に変異を有している細胞種においてその高い亢進性が知られているため、本検討では *K-ras* 遺伝子の変異が報告されているヒト乳がん MDA-MB-231 細胞を選択した。verteporfin のオートファジー阻害効果の評価には細胞質中でオートファゴソーム形成の際にそのオートファゴソームの脂質膜表面に発現する LC3 に着目した。Western blotting の結果、verteporfin を作用させることで MDA-MB-231 細胞中の LC3 の発現は抑制されることが明らかとなり、verteporfin によってオートファジーが阻害されることが示唆された。一方で、細胞内 AGO2 タンパク質を Western blotting で評価したところ、verteporfin を作用させることで AGO2 タンパク質量が増加することが明らかとなった。この 2 つの結果から MDA-MB-231 細胞において verteporfin を作用させることで細胞内のオートファジーが阻害され、その分解基質である AGO2 の分解が抑制される可能性が示された。しかしながら、この AGO2 の増加は verteporfin のオートファジー阻害によるものと異なる、他の経路に起因する可能性もあるため、リアルタイム RT-PCR 法にて細胞内の AGO2 遺伝子発現量を評価した。その結果、verteporfin を作用させても AGO2 遺伝子の発現量に有意な変化は認められず、verteporfin による細胞内 AGO2 の増加は AGO2 遺伝子の発現増加に起因するものではないことが明らかとなった。これらの結果から verteporfin は MDA-MB-231 細胞内の AGO2 遺伝子の発現量に影響を与えず、オートファジーを阻害することで AGO2 の増加を誘導している可能性が高いと考えられる。次に verteporfin の MDA-MB-231 細胞に対する細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、verteporfin は濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示し、verteporfin 単剤の抗がん効果が認められた。

verteporfin の AGO2 増加効果が RNA 干渉効果を増強させるかを MDA-MB-231 細胞を用いて検討した。本検討には、細胞周期の調節を担うタンパク質である PLK1 を標的とした siRNA を用いた。siPLK1 は *K-ras* 遺伝子に変異を有するがん種においてその高い有効性が報告されているため、MDA-MB-231 細胞の siPLK1 への感受性は高いと考えられる。siRNA 導入ベクターとしては、DOP-DETA を主要構成脂質とするリポソーム DL を使用した。siPLK1 と DL の複合体、siPLK1-DL を調製し、MDA-MB-231 細胞に導入した。siPLK1 と verteporfin の併用によるノックダウン効果をリアルタイム RT-PCR および Western blotting にて評価した。その結果、siPLK1 単独処理群と比較し、siPLK1 と verteporfin の併用群にて PLK1 のノックダウン効果が増強されることが明らかとなった。なお、verteporfin 単独処理群では PLK1 の発現量に有意な差は認められなかった。したがって、siPLK1 と verteporfin の併用による PLK1 ノックダウンの増強は、verteporfin の AGO2 増加効果に起因する RNA 干渉増強効果である可能性が示された。siPLK1 の増殖抑制効果を WST-8 assay により評価したところ、siPLK1 濃度として 0.5 nM という低濃度において有意な細胞増殖抑制効果が認められた。さらに、verteporfin を封入した DL を用いて siPLK1 を MDA-MB-231 細胞に導入したところ、siPLK1 単独処理群や、verteporfin 単独処理群と比較して、有意な細胞増殖抑制効果が認められた。最後に verteporfin 処理による AGO2 量増大に伴う RISC 形成について検討したところ、verteporfin 存在下では AGO2 に結合した siRNA 量が有意に増加することが明らかになった。以上のことから、verteporfin の RNA 干渉増強作用が、siRNA が効率的に RISC に取り込まれた結果であることが強く示唆された。本研究で得られた成果は、RNA 干渉増強作用をもつ高機能化脂質ナノ粒子の開発に繋がるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- 1) Okamoto A, Koide H, Morita N, Hirai Y, Kawato Y, Egami H, Hamashima Y, Asai T, Dewa T, Oku N. Rigorous control of vesicle-forming lipid pKa by fluorine-conjugated bioisosteres for gene-silencing with siRNA. *J. Control. Release.* **295**, 87-92 (2019) doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.044.
- 2) Okamoto A, Asai T, Hirai Y, Shimizu K, Koide H, Minamino T, Oku N: Systemic administration of siRNA with anti-HB-EGF antibody-modified lipid nanoparticles for the treatment of triple-negative breast cancer. *Mol Pharm.* **15**, 1495-1504 (2018) doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01055.
- 3) Toyota H, Asai T, Oku N: Process optimization by use of design of experiments: Application for liposomalization of FK506. *Eur. J. Pharm. Sci.* **102**, 196-202 (2017) doi: 10.1016/j.ejps.2017.03.007.

他 17 件

[学会発表] (計 39 件)

- 1) リポソーム DDS を用いた新規がん化学療法の開発. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2018, シンポジウム 1「がん治療研究の新展開: 薬物動態と副作用の制御」, 2018 年 11 月 4 日, 静岡
- 2) リポソーム製剤の薬効における薬物放出性の影響. 日本薬学会第 138 年会, 一般シンポジウム「ナノ DDS 製剤の特性解析とその分析評価技術」, 2018 年 3 月 28 日, 金沢
- 3) 核酸デリバリーを目的とした脂質ナノ粒子の設計戦略. 日本核酸医薬学会第 3 回年会, シ

- ンポジウム 3「DDS」, 2017年7月13日, 札幌
- 4) *in vivo* イメージングによるナノ DDS 製剤の評価. 第 25 回日本バイオイメージング学会,  
シンポジウム 4「薬学とバイオイメージング」, 2016年9月6日, 名古屋
- 他 35 件

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Asai T, Huang L, Oku N: Nanoparticle-mediated RNA interference for cancer therapy. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*, 1st Edition, chapter 17, 521-540 Elsevier (2018)
- 2) 岡本彩香, 浅井知浩, 奥 直人: DDS 先端技術の製剤への応用開発 第3節 脂質ナノ粒子を用いた核酸医薬デリバリー p173-180, 株式会社 技術情報協会 (2017)

〔その他〕

ホームページ等

静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室ウェブサイト

<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/>