

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790131

研究課題名 (和文) RNAi 創薬の実現に向けた systemic delivery system の構築

研究課題名 (英文) Development of systemic delivery system for RNAi-based therapies

研究代表者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)

静岡県立大学大学院薬学研究科・講師

研究者番号：00381731

研究成果の概要 (和文)：

特定のタンパク質の遺伝子発現を抑制可能な小さな 2 本鎖 RNA (siRNA) は、次世代医薬品の有力候補として期待されている。しかし、siRNA 全身投与による疾患治療を実現するには、siRNA デリバリーの技術開発が大きな課題となっている。そこで本研究では、siRNA 全身投与によるがん治療を実現しうる新規の siRNA デリバリーシステムを構築した。本システムを用いてがんの増殖を促すタンパク質の発現を抑制し、動物実験においてがん治療効果を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

RNA interference (RNAi)-based therapy with small interfering RNA (siRNA) is expected as a potent treatment strategy for intractable diseases. However, systemic injection of siRNA is quite limited because of a problem of DDS technology. In the present study, a novel siRNA delivery system was established to achieve RNAi-based cancer therapies. Our data demonstrated that systemic injection of therapeutic siRNAs using our DDS technology suppressed tumor growth in animal studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) 技術の医療応用には、small interfering RNA (siRNA) デリバリーシステムの確立が必要不可欠といえる。本研究課題では、全身投与型の siRNA ベクターを設計するにあたり、リ

ポソーム技術に着目した。リポソームは、臨床応用されていることから明らかなように、他のベクターと比較して安全面や製造面での優位性が高い。遺伝子治療研究において、リポソームを始めとする非ウイルス系ベクターは、核酸の導入効率が課題としてよく挙

げられる。しかし、RNA 干渉の場合には、siRNA が低濃度で遺伝子ノックダウンを起こすという事実が非ウイルス系ベクターにとって好都合である。また、アデノウイルスベクターを用いて shRNA を導入したマウスにおいて、miRNA 枯渇という副作用が報告されており (Grimm D et al. Nature, 2006)、副作用のコントロールという点においても合成 siRNA を非ウイルスベクターに搭載する方法論にメリットがある。これまでに我々は、siRNA のベクターとして cetyl-polyethylenimine (cetyl-PEI) で膜修飾したポリカチオンリポソームの開発を進めており、優れた導入効率を示すベクターの調製に成功している。さらに、ポリカチオンリポソームのポリエチレングリコール (PEG) 修飾やリガンド修飾の効果についても検討し、疾患治療への応用を進めてきた。本研究課題では先行して開発したこの cetyl-PEI 修飾リポソームを上回る効果を期待し、新規の siRNA ベクターの開発を試みた。ところで、上述したリポソームの PEG 修飾は全身投与時の安定性の確保と siRNA 標的化に極めて有効に機能するが、免疫応答の要因になる性質を有していることが知られている。PEG 修飾リポソームは、2 回目以降投与時に速やかにクリアランスされる現象 (Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象) が報告されており、これはリポソームを用いた siRNA デリバリーにおいては当然クリアすべき課題になると考えられる。siRNA 投与によるがん治療は連続投与する場合がほとんどであると予測でき、繰り返し投与時の体内動態は無視できず、免疫応答回避は systemic DDS にとって重要なポイントになる。そこで本研究課題では、リポソーム繰り返し投与時の免疫応答についても検討を加えた。

本研究課題では治療標的として、免疫応答およびがんの増殖と血管新生に関与する mammalian target of rapamycin (mTOR) の働きに着目した。mTOR の阻害は免疫抑制作用に繋がることがよく知られており、mTOR 阻害剤であるラパマイシンは免疫抑制剤として FDA と EC の承認を受けている。mTOR の阻害 (ラパマイシンによる阻害) は、機能性 p53 を持たない細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導すること (Feng Z et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のシグナル伝達阻害を介して血管新生を抑制すること (Guba M et al. Nat. Med., 2002)、がん新生血管の梗塞を特異的に引き起こし、結果的にがん細胞を死に導くこと (Guba M et al. Blood, 2005) など、大変興味深い知見の報告が相次いでいる。我々はこれまでにがん新生血管を標的としたリポソーム DDS の研究成果を蓄積しており、本研究ではその独自技術を siRNA デリバリーに応用し、mTOR を標的とする siRNA を腫瘍新

生血管にデリバリーすることを試みた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、siRNA 全身投与によってがん治療を実現しうる siRNA デリバリーシステムを開発することである。本研究では、1) 全身投与が可能な新規 siRNA ベクターを開発すること、2) がん新生血管への標的化によって効果の増強を図ること、3) siRNA ベクターを含むナノ粒子の繰り返し投与時に誘導される ABC 現象のメカニズムを解明すること、という 3 つの目標を掲げ、以下に述べる研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規 siRNA ベクターの開発

ポリカチオン脂質として DCP-spermine (DCP-spm)、DCP-spermidine (DCP-spd)、DCP-diethylenetriamine (DCP-DETA)、DCP-triethylenetetraamine (DCP-TETA)、DCP-tetraethylenepentaamine (DCP-TEPA) 他、複数の候補化合物をリポソーム化し、siRNA 導入に適したポリカチオンリポソーム (PCLs) の処方スクリーニングを実施した。本研究で用いる候補化合物は、名古屋工業大学・南後守博士、出羽毅久博士により合成されたものを御供与いただいた。候補化合物の脂質誘導体でリポソーム膜を修飾し、siRNA をデリバリーするのに最適な新規化合物を探索した。リポソームの基本脂質の組成は、細胞内動態の制御を目的とした DOPE と生体内での安定性の確保を目的とした飽和脂質およびコレステロールを適切な比で混ぜた混合脂質で調製した。スクリーニングでは、siRNA によるノックダウン効率ならびにキャリアによる細胞毒性を指標とし、PCLs の有用性を評価した。具体的には蛍光タンパク質 EGFP を恒常的に発現するように構築した HT1080 繊維芽肉腫細胞に EGFP に対する siRNA を導入し、ベクターに依存したノックダウン効率を定量的に比較した。

次に全身投与型の siRNA ベクターの開発を目的とし、処方スクリーニングで絞り込んだ siRNA ベクターに PEG 被覆と PEG 鎖先端へのリガンド修飾を施した。リガンドとしては、がんの新生血管への標的化に有効な APRPG ペプチドあるいは RGD ペプチドを用いた。

### (2) mTOR-siRNA 導入による血管新生抑制効果の検討

mTOR に対する siRNA を設計し、特異的に mTOR をノックダウン可能な配列を決定した。次に、APRPG ペプチド修飾を施した全身投与型ベクターを用いて mTOR-siRNA を血管内皮細胞に導入し、mTOR ノックダウンの効果について検討した。新生血管の内皮細胞のモデルとしては、VEGF 等の増殖因子で刺激したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。mTOR

のノックダウン効率は、RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法によって評価した。次に、mTOR をノックダウンした HUVEC を用い、MTT 法による細胞増殖試験、管腔形成試験等を実施し、その血管新生抑制効果について検討した。

### (3) ABC 現象の機構解明

はじめに ABC 現象を回避することが知られるドキソルビシン (DOX) 封入 PEG 修飾リポソーム (PEG-DOX) を用い、ABC 現象回避の因子を検討するため、free DOX と PEG 修飾リポソームを併用投与し比較検討を行った。また、初回投与時に PEG 鎖未修飾のリポソームを投与し、2 回目投与時に PEG 修飾リポソームの投与を行った際の体内分布を調べることで ABC 現象に関与している免疫担当細胞の認識特異性を検討した。さらに、初回投与時の免疫細胞が認識するサイズ依存性の検討を行うため、約 100~800 nm のサイズに調製した PEG 修飾リポソーム、または PEG 鎖を有する約 10~50 nm の高分子ミセルを投与し、2 回目投与時の約 100 nm に調製した PEG 修飾リポソームの体内動態解析を行った。ABC 現象に関与する免疫担当細胞の同定では T 細胞欠損マウス、T 細胞、B 細胞両欠損マウスを用いて同様の動態解析実験を行った。

### (4) インビボにおける全身投与型 siRNA ベクターの評価

RGD ペプチドを用いてがんおよび新生血管に標的化した全身投与型 siRNA ベクターを調製した。インビボにおいて RNA 干渉効果を評価することを目的とし、ルシフェラーゼを発現する B16F10-luc2 黒色腫細胞を移植した C57BL6 マウスとルシフェラーゼに対する siRNA (luc2-siRNA) を用いて実験系を構築した。B16F10-luc2 細胞をマウスに移植して肺転移モデルを作成した後、ベクターに搭載した luc2-siRNA を尾静脈内投与した。RNA 干渉効果は *in vivo* イメージングシステム (IVIS) を用いて評価した。

次に、がん治療用の siRNA として c-myc、MDM2、VEGF に対する 3 種の siRNA カクテルを全身投与型ベクターに搭載し、B16F10-luc2 肺転移モデルマウスに尾静脈内投与した。IVIS を用いてがん病巣のルシフェラーゼ活性を経時的に測定し、肺転移巣の増殖をモニタリングした。さらに、がん細胞移植 21 日後に解剖して肺転移巣を観察し、siRNA 全身投与によるがん治療効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規 siRNA ベクターの開発

siRNA 導入に適したポリカチオンリポソームの処方スクリーニングを実施した結果、DCP-TEPA を主要成分にしたポリカチオンリポソーム (TEPA-PCL) に高い siRNA 導入効率を見出した (Fig. 1.)。さらに *in vitro* に

おける遺伝子発現抑制効率ならびに *in vivo* におけるベクターの血中安定性を指標にし、TEPA-PCL を構成する最適な基本脂質組成を見出した。次に、TEPA-PCL の PEG 修飾について検討することを目的とし、マウスを用いて体内動態試験を実施したところ、分子量 6,000 の PEG を全脂質に対して 10% 修飾することによって長期血中滞留性が得られることが明らかとなった。さらに、PEG 鎖先端に APRPG ペプチドを結合することで、標的指向性のベクターを調製した。このベクターを用いて Alexa750 標識 siRNA を担がんマウスに静脈内投与し、その体内動態について IVIS を用いて解析した。その結果、がん選択的に siRNA が集積する様子が観察された。

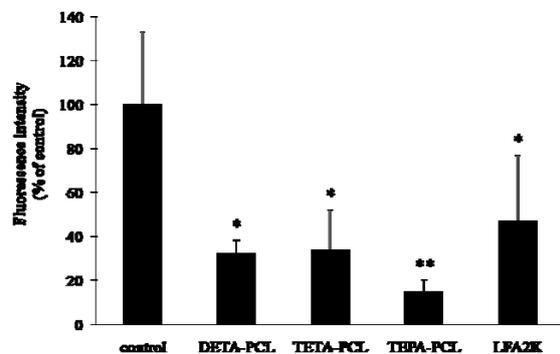


Fig. 1. Gene-silencing efficiency of siRNA in PCLs containing DCP-DETA, DCP-TETA or DCP-TEPA. The fluorescence intensity of EGFP was measured 48 h post transfection and corrected for protein contents. Control was that of cells not transfected with siRNA. Significant differences from control were indicated (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

### (2) mTOR-siRNA 導入による血管新生抑制効果の検討

mTOR の遺伝子発現を強力に抑制するカクテル siRNA (3 種の siRNA を同時トランスフェクション) を設計し、その血管新生抑制効果について検討を行った。mTOR-siRNA の導入には、上記の APRPG-PEG を表面修飾した TEPA-PCL を用いた。カクテル siRNA を HUVEC に導入したところ、低濃度で顕著な遺伝子ノックダウン効果が得られた。HUVEC を用いて細胞増殖試験を実施した結果、対照 siRNA と比較し、mTOR-siRNA によって有意な細胞増殖抑制効果が観察された。加えて、APRPG ペプチドで標的化したベクターは、対照ベクターと比較して有意な増殖抑制効果をもたらした。同様に HUVEC を用いて管腔形成試験を実施した結果、APRPG ペプチドで標的化したベクターを用いて mTOR-siRNA を導入した群に

において最も顕著な管腔形成阻害が生じた。以上より、mTOR-siRNA の抗血管新生効果ならびに本研究で開発した siRNA ベクターの有用性が明らかとなった。

### (3) ABC 現象の機構解明

PEG-DOX における ABC 現象回避の特性検討では、リポソーム内に DOX を封入することで、リポソームを認識した免疫担当細胞が特異的に殺傷され ABC 現象が回避されていることが示唆された。また、その免疫担当細胞は PEG 鎖を有していないリポソームに対しても働くことが明らかになった。ABC 現象は抗原特異性が低い IgM 抗体が一過性に産生されることによって生じることが示唆された。さらに、その免疫反応は粒子径の影響を受け、サイズの小さい粒子では ABC 現象が起こりにくいことが明らかとなった。この ABC 現象は T 細胞欠損マウスにおいては誘導されたが、T 細胞、B 細胞両欠損マウスでは誘導されなかった (Fig. 2, 3)。以上より、ABC 現象の誘導には、T 細胞の関与は低く、B 細胞が重要な役割をしている可能性が考えられ、その際にナノキャリアは TI-2 抗原として B 細胞に認識されていることが示唆された。以上より、ABC 現象に繋がる免疫システムには、T 細胞非依存性抗原に対する B 細胞の応答が深く関わっていると考えられる。

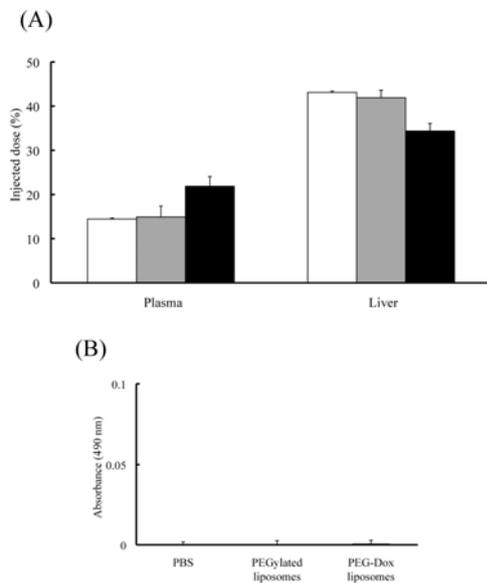


Fig. 2. No induction of the ABC phenomenon in BALB/c SCID mice. (A) Biodistribution of the test-dose PEGylated liposomes 24 h after intravenous injection in the pretreated mice. (B) Amount of anti-PEG IgM in the serum after pretreatment. Data are represented for PBS (open bar),

PEGylated liposomes (gray bar), and PEG-Dox (closed bar) as mean  $\pm$  S.D.

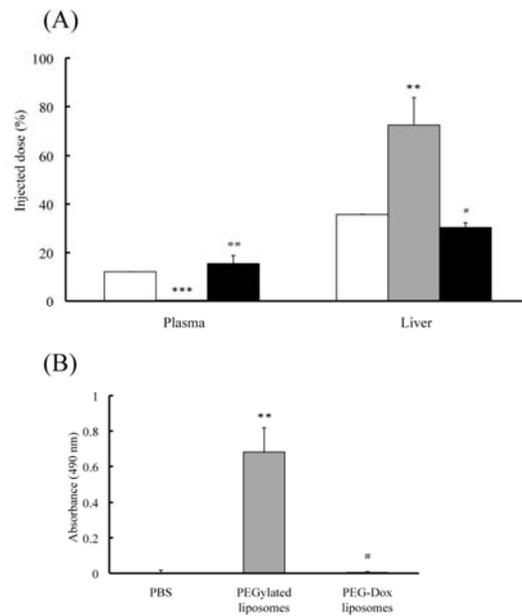


Fig. 3. Induction of the ABC phenomenon in BALB/c nu/nu mice. (A) Biodistribution of the test-dose PEGylated liposomes 24 h after intravenous injection in the pretreated mice. (B) Amount of anti-PEG IgM in the serum after pretreatment. Data are represented for PBS (open bar), PEGylated liposomes (gray bar), and PEG-Dox (closed bar) as mean  $\pm$  S.D. Significant differences: \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. PBS; # $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  vs. PEGylated liposomes.

### (4) 全身投与型 siRNA ベクターのインビボにおける評価

新生血管およびがんへの標的化を目的とし、RGD ペプチドを PEG 鎖先端に結合した TEPA-PCL (RGD-PCL) を全身投与型 siRNA ベクターとして調製した。C57BL6 マウスの肺に B16F10-luc2 黒色腫細胞を移植後、ベクターを用いて luc2-siRNA を尾静脈内投与し、*in vivo* における遺伝子ノックダウン効率を評価した。その結果、luc2-siRNA を搭載した RGD-PCL は、対照ベクター群や対照 siRNA 群と比較して有意にルシフェラーゼ発現を抑制した。次に、がんの増殖に関与する 3 つの遺伝子、c-myc、MDM2、VEGF に対する siRNA のカクテルを用いてがん治療効果を検討した。B16F10-luc2 細胞を移植した肺転移モデルマウスを作製し、RGD-PCL を用いて上記の

治療用 siRNA を尾静脈内投与した。その結果、RGD-PCL を用いて治療用 siRNA を投与した群では、対照群と比較して肺転移巣の増殖が有意に抑制された (Fig. 4)。

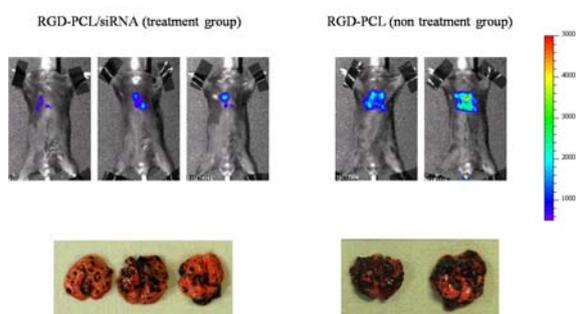


Fig. 4. Therapeutic effect of siRNA cocktails (siRNAs for c-myc, MDM2, and VEGF) in RGD-PEG-modified TEPA-PCL on lung cancer. (A) Luciferase activities in the B16F10-luc2 tumor and (B) photographs of lungs excised from the mice on 21 days after tumor implantation.

以上の結果より、本研究課題で開発した全身投与型の siRNA デリバリーシステムは、がん等の難治性疾患の治療に有用な可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K. et al.: T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.* (2010) in press 査読有
2. Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H. et al.: Development of double-stranded siRNA labeling method using positron emitter and its in vivo trafficking analyzed by positron emission tomography. *Bioconjug. Chem.* (2010) in press 査読有
3. Ishii, T., Asai, T., Urakami, T. et al.: Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res.* 1321, 164-168 (2010) in press 査読有
4. Murase, Y., Asai, T., Katanasaka, Y. et

al.: A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy. *Cancer Lett.*, 287, 165-171 (2010) 査読有

5. Urakami, T., Sakai, K., Asai, T. et al.: Evaluation of  $^{18}\text{F}$ -O-[(18)F] fluoromethyl-D-tyrosine as a radiotracer for tumor imaging with positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol.*, 36, 295-303. (2009) 査読有
6. Takahama, H., Minamino, T., Asanuma, H., (1), Asai, T., (12): Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 53, 709-717. (2009) 査読有
7. Urakami, T., Kawaguchi, A. T., Akai, S., (3), Asai, T., (4): In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif. Organs*, 33, 164-168. (2009) 査読有
8. Koide, H., Asai, T., Hatanaka, K. et al.: Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. *Int. J. Pharm.*, 362, 197-200. (2008) 査読有
9. Asai, T., Miyazawa, S., Maeda, N. et al.: Antineovascular therapy with angiogenic vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC. *Cancer Sci.*, 99, 1029-1033. (2008) 査読有
10. Asai, T., Suzuki, Y., Matsushita, S. et al.: Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368, 243-248 (2008) 査読有

[学会発表] (計 31 件)

1. Asai, T. et al.: PET technology to determine pharmacokinetics of liposomal siRNA. 4th International Liposome Society Conference, 2009 年 12 月 14 日, London, UK
2. Kenjo, E. et al.: Development of siRNA delivery system using novel polycation liposomes for cancer therapy. 4th International Liposome Society Conference, 2009 年 12 月 14 日, London, UK
3. Tsuzuku, T. et al.: Development of in vivo delivery system for siRNA-based cancer therapy. 第 31 回生体膜と薬物の

- 相互作用シンポジウム, 2009年11月30日, 大阪
4. 浅井知浩ら: siRNA体内動態のPET解析と新規ベクターの開発. 第25回日本DDS学会, 2009年7月3日, 東京
  5. Asai, T. et al.: Angiogenic vessel-targeted liposomal DDS for cancer treatment. 11th Liposome Research Days Conference, 2008年7月20日, 横浜
  6. Murase, Y. et al.: Enhancement of the anticancer activity in antineovascular therapy by a novel strategy, "dual-targeting". 11th Liposome Research Days Conference, 2008年7月20日, 横浜
  7. 小出裕之ら: ナノキャリア頻回投与時におけるABC現象の機構解明. 第24回日本DDS学会, 2008年6月30日, 東京
  8. Asai, T. et al.: Angiogenic vessel-targeted liposomes for in vivo delivery of siRNA. Japan Society of Gene Therapy. The 14th Annual Meeting, 2008年6月14日, 札幌
  9. 横田洵一ら: mTOR ノックダウンによるがん治療法の開発. 平成19年度日本薬学会東海支部例会, 2007年12月8日, 岐阜
  10. 鶴田敦ら: 核酸医薬創成に向けた新規 siRNA 搭載技術の開発. 第29回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007年11月27日, 仙台

[図書] (計1件)

1. Asai, T. and Oku, N.: Angiogenic Vessel-Targeting DDS by Liposomalized Oligopeptides. Methods in Molecular Biology, chapter 23, 605, 335-347, Humana Press (2010)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)

静岡県立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号: 00381731

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: