

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20015003
 研究課題名（和文）：がん選択的多機能性エンベロープ型ナノ構造体の開発とがん治療への応用
 研究課題名（英文）：Multifunctional Envelope-type Nano Device as non-viral gene delivery system for cancer therapy
 研究代表者
 原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)
 北海道大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：00183567

研究成果の概要（和文）：我々が独自に開発した *in vivo* がん送達型多機能性エンベロープ型ナノ構造体(PPD-MEND)に、がん細胞で選択的に発現している遺伝子に対する siRNA を搭載し、抗腫瘍効果を誘起することができ、かつ、安全性の高い人工遺伝子デリバリーシステムを開発し、がん治療へと応用することを最終目標とした。その結果、shGALA 修飾 PEG-MEND は、静脈内投与により腫瘍組織で mRNA をノックダウンし抗腫瘍効果を誘起できることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral siRNA delivery system for cancer, which can induce the knockdown of tumor specific genes and anti-tumor effect with no toxicity. First, we measured antigen presentation of OVA encapsulated R8-MEND in dendritic cell (DC). As a result, R8-MEND showed specific MHC class I presentation, although showed low MHC class II presentation. Moreover, mice subcutaneously immunized by R8-MEND were showed significant antitumor effect compared with control mice. Next, we prepared GALA/DMEND encapsulating siRNA core condensed with protamine. To investigate antitumor effects, we immunized DCs which were silenced SOCS1 by GALA/DMEND to mice. As a result, SOCS1- silenced DC significantly suppressed tumor growth compared with control DC. Therefore, we succeeded in enhancing antitumor effect by silencing SOCS1 of DC with GALA/DMEND. For systemic siRNA delivery, HT1080 cells were s.c. inoculated into nude mice. After i.v. injection to tumor-bearing mice, GALA/PEG-MEND exhibited high systemic stability and accumulated in tumor tissue. Target α -actin expression in tumor tissue was knockdowned more than 60% after administration of GALA/PEG-MEND (4mg siRNA/kg), which resulted in suppression of tumor growth (特願 2010-39667). Serum level of ALT remained normal value, and body weight was unchanged after i.v. administration of GALA/PEG-MEND. These results suggested that GALA/PEG-MEND should be a valuable siRNA delivery system for *in vivo* tumor and siRNA therapeutics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：がん、遺伝子治療、siRNA、ワクチン、MEND

1. 研究開始当初の背景

我々は多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の開発に成功し、細胞膜透過機能を有するオクタアルギニン(R8)修飾したR8-MENDは、培養細胞系においてアデノウイルスと同等の遺伝子発現を示すことを明らかにした(Harashima, et al.: PCT/JP2004/14500)。さらに、*in vivo* でがん組織選択的な遺伝子デリバリーシステムを開発するために、がん組織内で特異的に発現するペプチダーゼにより切断されてPEGを脱離し、がん細胞内へ侵入するという新しい戦略(PPD-MEND)に基づいて、*in vivo* における遺伝子発現にも成功した。また、siRNAを搭載しPEG5000で最適化したPPD-MENDは全身投与後、腫瘍組織において高いRNAi効果を誘起することにも成功した。本請研究では、PPD-MENDをさらに発展させ、siRNAを搭載し抗腫瘍効果を誘起できる有効かつ安全な遺伝子デリバリーシステムを開発する。

2. 研究の目的

(1)MENDによる細胞性免疫応答の誘導と抗腫瘍効果の評価

①R8-MENDによる選択的な細胞性免疫の誘導

効率的な細胞性免疫を誘導するためには、抗原をMHCクラスIに提示させる必要があるが、そのためには抗原を細胞質に送達させる必要がある。通常、外来性抗原はライソソームでの分解を受け、MHCクラスIIに提示されてしまうため、MHCクラスIの抗原提示効率の低さが問題となっていた。以前、我々はR8をMEND表面に高密度に修飾することで、ライソソームによる分解を回避できることを明らかにしている。そこで、抗原をR8-MENDに封入することで、効率的に抗原を細胞質に送達し、MHCクラスI抗原提示及び抗腫瘍効果を誘導できると考えた。

②樹状細胞への導入方法

樹状細胞(dendritic cell: DC)は、免疫反応の中心的な役割を担う抗原提示細胞であり、未成熟状態で病原体などを取り込み、成熟状態へと変化することで、効率的にT細胞を活

性化する。しかしながらDCへの遺伝子導入は非常に困難であり、非ウイルスベクターによる成功例はない。加えて、成熟状態のDCは取り込み能が極端に低下していることも知られている。故にDCに遺伝子導入可能な非ウイルスベクターの開発や成熟DCへの導入法の確立は重要であると考えられる。

③DNAマイクロアレイによる安全性の解析

pDNAを封入したMENDを投与し、生体内でいかなる反応が生じているかを先験的に予見することは難しい。そこで、マイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行ない、安全性の検討を行なった。生体適合性分子PEG修飾によるMENDの免疫応答を解析し、細胞内動態制御に基づいたMENDの安全性向上を試みた。

(2)siRNA搭載統合型MENDによる抗腫瘍効果

①GALA/MENDによるsiRNAのDCへのデリバリー

suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)は、サイトカインシグナル伝達におけるネガティブフィードバック分子として同定され、JAK/STAT経路を介する広範なサイトカインのシグナル伝達を阻害する。これまでに、SOCS1を欠損したDCは強力なT細胞刺激作用・サイトカイン産性能を示すことが報告されている。故に、siRNAの標的分子として注目されている。しかしながら、非ウイルスベクターを用いたDCへのsiRNAの導入は困難であることから、siRNAを効率的にDCへ導入可能な非ウイルスベクターの開発が望まれている。そこで我々は、膜枚数を制御し、エンドソーム脱出のための機能性素子であるGALAを修飾したGALA/DMENDを構築し、DCにおけるノックダウンを試みた。

②GALAによるエンドソーム脱出の促進

がんへのデリバリーにはMENDへPEG修飾し血中滞留性を付与し、EPR効果で腫瘍に送達するが、PEGはエンドソーム脱出を阻害する。そこでpH応答性膜融合ペプチドGALAによるエンドソーム脱出促進を試みた。

③shGALA による systemic デリバリー

GALA 修飾すると MEND の血中安定性が低下し EPR 効果による癌への送達が不十分であった。GALA が PEG の水和層を突き出ていることが原因と考え、ペプチド配列の一部を削除した short GALA (shGALA) を新たに構築し、siRNA の in vivo デリバリーを試みた。

3. 研究の方法

(1)MEND による細胞性免疫応答の誘導と抗腫瘍効果の評価

①R8-MEND による選択的な細胞性免疫の誘導

蛍光ラベルした R8-MEND を調製し、in vitro でマウス骨髄細胞から誘導した DC に取り込ませ、フローサイトメーターを用いた取り込み経路解析及び共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 細胞内動態解析を行った。またモデル抗原として ovalbumin (OVA) を封入した R8-MEND を調製し、MHC 分子と OVA ペプチド複合体を特異的に認識する T 細胞ハイブリドーマを用いて抗原提示量の評価を行った。比較対照として、エンドソーム脱出能の低いカチオン性リポソームを用いた。さらに in vivo において R8-MEND を用いて 1 週間毎に計 2 回皮下免疫を行った後、OVA 発現腫瘍細胞 E.G7-OVA 細胞を移植し、その増殖を経時的に測定することで、抗腫瘍活性を評価した。

②樹状細胞への導入方法

R8-MEND に OVA を内封し、未成熟 DC 及び成熟 DC に暴露し、フローサイトメーターによる取り込み量評価と T 細胞ハイブリドーマを用いた抗原提示評価を行った。また MEND を取り込ませた DC をマウスに免疫し、⁵¹Cr-release assay を用いて CTL 活性を測定した。ポリカチオンであるプロタミンを用いてルシフェラーゼをコードした pDNA を凝縮化し、2 種類の脂質膜を有する tetra-lamellar MEND (T-MEND) を調製した。T-MEND を DC の細胞株である JAWSII 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定することで、遺伝子発現活性を評価した。

③DNA マイクロアレイによる安全性の解析

pDNA 封入 MEND とその PEG 修飾 MEND (PEG-MEND) を調製し、マウス尾静脈から投与後 2 時間後の脾臓から RNA を抽出しマイクロアレイ解析、および qRT-PCR 法により mRNA 発現量を測定した。また投与後の血清サイトカインを ELISA 法により測定した。またエンドソーム脱出促進を目的に

PEG-MEND に GALA を修飾し免疫応答性を評価した。

(2)siRNA 搭載統合型 MEND による抗腫瘍効果

①GALA/MEND による siRNA の DC へのデリバリー

ポリカチオンであるプロタミンを用いて siRNA のコアを調製し、DOPE/PA/GALA の脂質からなる SUV と混合した後、R8 を表面修飾し GALA/DMEND を調製した。DC に GALA/DMEND をトランスフェクションし、SOCS1 の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。加えて SOCS1 をノックダウンしたことによる STAT1 のリン酸化をウエスタンブロット法により調べた。DC からのサイトカイン産生量の変化を ELISA 法を用いて測定した。また GALA/DMEND を用いて SOCS1 をノックダウンした DC をマウスに投与し E.G7-OVA を用いた抗腫瘍活性評価を行った。

②GALA によるエンドソーム脱出の促進

蛍光標識 PEG-MEND へ GALA を修飾し、細胞内取り込み後のエンドソーム脱出過程を共焦点レーザー顕微鏡で評価した。ルシフェラーゼ活性を指標に、siRNA 封入 PEG-MEND への GALA および腫瘍特異的に切断を受ける PEG(PPD)修飾がノックダウン活性へ及ぼす影響を、in vitro 培養細胞及び in vivo 腫瘍局所投与で評価した。

③shGALA による systemic デリバリー

PEG-MEND へ GALA を修飾すると血中滞留性が減少することが明らかとなった。この原因として GALA が PEG による水和層を突き抜けたため血清タンパクから認識されるためと考えた。そこで GALA のアミノ酸 30 残基を 22 残基に改変した shGALA のコレステロール誘導体を新たに合成した。ヒト α -actin に対する siRNA 封入 PEG-MEND に shGALA を修飾し、担癌マウスへ尾静脈投与し、腫瘍組織における mRNA のノックダウンおよび腫瘍増殖抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1)MEND による細胞性免疫応答の誘導と抗腫瘍効果の評価

①R8-MEND による選択的な細胞性免疫の誘導蛍光ラベルした R8-MEND 及びカチオン性リポソームの DC による取り込み経路を阻害剤を用いて調べた結果、共にアミロライドで顕著な阻害が認められたことから、マクロピ

ノサイトーシスを介して取り込まれることが明らかになった。一方で、DC に取り込まれた後の細胞内動態を観察した結果、カチオン性リポソームとは異なり、R8-MEND を取り込ませた DC において内封物の細胞質への拡散が認められたことから、R8-MEND は内封物を効率的に細胞質に送達可能であることが明らかになった。また OVA を内封した R8-MEND を DC に取り込ませ、その抗原提示量を測定した結果、R8-MEND は MHC クラス II への提示効率は低く、特異的な MHC クラス I 抗原提示を示した。さらに R8-MEND を用いて皮下免疫したマウス群では、コントロール群と比較して著しい腫瘍増殖抑制効果が認められた。以上の結果から、R8-MEND は MHC クラス I への特異的な抗原提示を有しており、in vivo において強力な抗腫瘍活性を示したことから、効率的に細胞免疫を誘導できる癌ワクチンキャリアーとして有用であることが示唆された (Nakamura T et al. *Mol. Ther.* 2008)

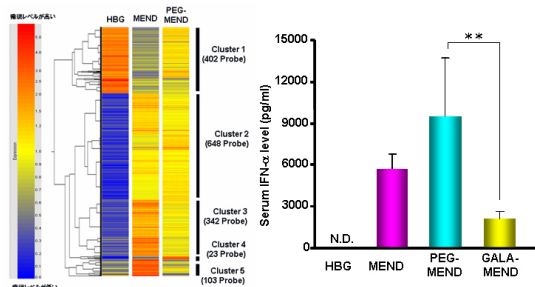
②樹状細胞への導入方法

OVA を封入した R8-MEND を DC に取り込ませた結果、取り込みが低下した成熟化 DC においても非常に高い取り込みを示した。また R8-MEND を用いて成熟化 DC へ抗原を送達させた方が、未成熟 DC に送り込んだバアを比較して高い抗原提示と CTL 活性を示した (Homhuan A et al. *J. Control. Release* 2009)。

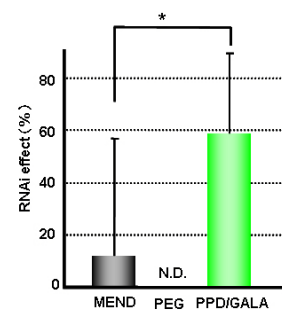
また JWASII 細胞に T-MEND を用いて遺伝子導入した結果、従来の MEND や市販試薬である lipofectamine2000 を大きく上回る遺伝子発現活性を示した。さらに T-MEND の細胞内動態を観察した結果、蛍光ラベルした pDNA が JAWSII 細胞の核内に送達されていることが確認された (Akita H et al. *Biomaterials* 2009)。

③DNA マイクロアレイによる安全性の解析

pDNA 封入 MEND および PEG-MEND を投与後の脾臓においてコントロール群と比較して 3 倍以上発現変動のあった 1581 遺伝子をクラスタリング解析した結果、半数の遺伝



子は PEG 修飾で変動が改善していることが明らかとなった。一方で予想に反して PEG 修飾で発現変動がかえって悪化する遺伝子群が検出された (下図左 Cluster 4)。



この多くは I 型

インターフェロンであった。パスウェイ解析で上流エンドソーム内 TLR9 との相互作用が原因と考え、エンドソーム脱出促進を目的に PEG-MEND に GALA を修飾したところ、IFN- α 産生量は減少し (上図右)、細胞内動態制御が安全性向上に有用な手段であることが示唆された (投稿準備中)。

(2) siRNA 搭載統合型 MEND による抗腫瘍効果

① GALA/MEND による siRNA の DC へのデリバリー

SOCS1 に対する siRNA を搭載した GALA/DMEND を DC にトランスフェクションし、mRNA 量を測定した結果、未処理の細胞群と比較して 87.5% の発現抑制が確認された。また SOCS1 をノックダウンすることにより、STAT1 のリン酸化が増強されているかを調べた結果、SOCS1 をノックダウンした DC において 8 時間後までの持続的な STAT1 のリン酸化が認められた。

加えて、SOCS1 をノックダウンすることによる DC からの TNF- α 及び IL-6 の産生量の変化を調べた結果、未処理群と比較して TNF- α で 2.3 倍、IL-6 で 4.2 倍の産生増加が認められた。さらに GALA/DMEND を用いて SOCS1 をノックダウンした DC をマウスの footpad に免疫し、1 週間後に E.G7-OVA を移植後、その増殖を観察した。その結果、control siRNA を用いた群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制されており、SOCS1 に対する siRNA の導入により DC の抗腫瘍効果を増強することに成功した。今回得られた結果は、非ウイルスベクターを用いて DC へ効率的に siRNA を導入し、免疫誘導能を増強することに成功した初めての例である。このことから、GALA/DMEND は非常に有用な siRNA デリバリーシステムであることが示された (Akita H et al. *J. Control. Release* 2010)。

② GALA によるエンドソーム脱出の促進

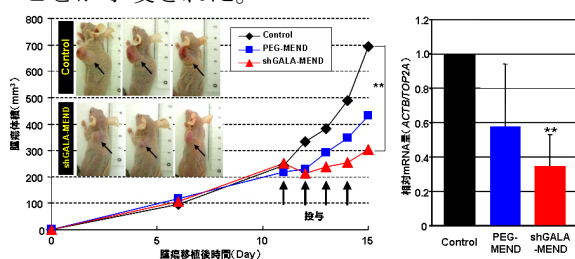
赤色蛍光標識 PEG-MEND は細胞内でエンドソームを示す緑色と共局在していたが、

GALAを導入することで赤色単独のパーティクルが多く観察され、PEG-MENDのエンドソーム脱出が促進された。また、GALA修飾により標的ルシフェラーゼ活性の強いノックダウンに成功した (Sakurai, Y. et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2009)。

また、GALAとPPDを修飾したMENDをルシフェラーゼ安定発現HT1080皮下移植腫瘍マウスに局所投与したところ、PEG未修飾MENDと比較して強いルシフェラーゼノックダウン効果が誘起された (Hatakeyama, H. et al. *J. Control. Release* 2009)。

③shGALAによる systemic デリバリー

shGALA修飾したPEG-MEND (shGALA-MEND)をRI標識マウスへ尾静脈から投与したところ、PEG-MENDと比較して血中滞留性の減少は観察されなかった。一方、*in vitro*における標的ヒト α -actinのノックダウン活性は、shGALA修飾により著しく増大した。そこで、HT1080皮下移植マウスへ静脈内投与(4 mg siRNA/kg)すると、標的ヒト α -actinのmRNAが60%以上ノックダウン可能であった。それに伴い、腫瘍増殖の抑制が観察された(特願2010-39667)。またshGALA-MEND投与後の体重変化や肝毒性は観察されず、炎症性サイトカインの産生もわずかであった。以上の結果より、shGALA修飾PEG-MENDは静脈内投与後に腫瘍組織でmRNAをノックダウンし抗腫瘍効果を誘起可能で、また安全性にも優れたデリバリーシステムであることが示唆された。



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8件)

① H. Hatakeyama, E. Ito, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima. A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *J. Control. Release*, 査読有, 139, 2009, 127-132.

② Y. Sakurai, H. Hatakeyama, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima. Efficient siRNA delivery to tumor cells using the combination of octaarginine, GALA and tumor-specific, cleavable PEG system. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有, 32, 2009, 928-932.

③ A. El-Sayed, IA. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J. Biol. Chem.* 査読有, 283, 2008, 23450-23461.

④ T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, N. Shastri, H. Harashima. Efficient MHC Class I Presentation by Controlled Intracellular Trafficking of Antigens in Octaarginine-modified Liposomes. *Mol. Ther.* 査読有, 16, 2008, 1507-1514.

⑤ K. Sasaki, S. Chaki, Y. Nakamura, K. Kogure, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nano-particles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* 査読有, 391, 2008, 2717-2727.

⑥ H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguchi, IA. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure, H. Harashima. Multi-layered nano particles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials*, 査読有, 30, 2009, 2940-2949.

⑦ A. Homhuan, K. Kogure, T. Nakamura, N. Shastri, H. Harashima. Enhanced antigen presentation and CTL activity by transfection of mature rather than immature dendritic cells with octaarginine-modified liposomes. *J. Control. Release*, 査読有, 136, 2009, 127-132.

⑧ H. Akita, K. Kogure, R. Moriguchi, Y. Nakamura, T. Higashi, T. Nakamura, S. Serada, M. Fujimoto, T. Naka, S. Futaki, H. Harashima. *J. Control. Release*. 査読有, 印刷中.

[学会発表] (計6件)

① H. Hatakeyama, et al. Systemic siRNA Delivery Using a Multifunctional Nanodevice with Programmed Tumor Activation. 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE. 2008年7月22日. Yokohama, Japan. The Yong Investigator Award 受賞

② Y. Sakurai, H. Hatakeyama, et al. Development of efficient siRNA delivery system to tumor cells by combining octaarginine, GALA and enzymatically-cleavable PEG-lipid. The Asian

Federation for Pharmaceutical Sciences 2009.
2009年10月15日. Fukuoka, Japan. The AFPS
Nagai-Shukri Pre-doctoral Oral Presentation
Award 受賞

③H. Harashima. Multifunctional envelope type
nano device for non-viral gene delivery: Concept
and application of Programmed Packaging. 13th
International Symposium on Recent Advances in
Drug Delivery Systems. 2007年2月26-28日.
Salt Lake City. Utah. USA.

④原島秀吉 多機能性エンベロープ型人工
遺伝子デリバリーシステムの創製 日本薬
学会第127年会 学術振興賞受賞講演 2007
年3月29日 富山

⑤原島秀吉 多機能性エンベロープ型ナノ
構造体による人工遺伝子デリバリーシステ
ムの創製 第23回日本DDS学会 永井賞受
賞講演 2007年6月15日 熊本

⑥H. Harashima. Controlled Intracellular
Trafficking of Non-viral Vector. The 10th Annual
Meeting of American Society of Gene Therapy:
Education Session: Topical Review: Non-viral
Vector design and Efficacy. 2008年5月30日.
Seattle. Washington. USA.

[図書] (計1件)

①H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, H.
Harashima. A Novel Nonviral Gene Delivery
System: Multifunctional Envelope-Type Nano
Device. Adv Biochem Eng Biotechnol. (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 機能性ポリペプチド及び当該ポリペプ
チドで修飾された脂質膜構造体

発明者: 原島秀吉, 秋田英万, 畠山浩人, 他
権利者: 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-39667

出願年月日: 2010年2月25日

国内外の別: 国内

名称: 腫瘍組織で選択的に分解性を示す血中
滞留性素子

発明者: 秋田英万, 畠山浩人, 原島秀吉

権利者: 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2008/072624

出願年月日: 2008年12月12日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)

北海道大学大学院薬学研究院: 教授

研究者番号: 00183567

(2)研究分担者

紙谷 浩之 (KAMIYA HIROYUKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 10204629

山田 勇磨 (YAMADA YUMA)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 60451431

畠山 浩人 (HATAKEYAMA HIROTO)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 70504786

馬場嘉信 (BABA YOSHINOBU)

名古屋大学大学院工学研究科・教授

研究者番号: 30183916

(3)連携研究者

なし