

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890003

研究課題名（和文） 腫瘍選択的活性化 siRNA デリバリーシステムの開発

研究課題名（英文） Development of siRNA delivery system with programmed tumor activation

研究代表者

畠山 浩人 (HATAKEYAMA HIROTO)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：70504786

研究成果の概要（和文）：

siRNA は次世代のがん治療への応用に大きな期待が寄せられており、効率的なドラッグデリバリーシステム（DDS）が必要とされている。そこで、DDS の細胞内のけるエンドソーム脱出と細胞質への siRNA の放出に着目して効率的な DDS 開発を行った。膜融合性ペプチドの導入によりエンドソーム脱出が促進され *in vitro* および *in vivo* がん組織でノックダウン効果の向上に成功した。またスクリーニングにより従来よりも優れたポリカチオンを得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

siRNA is considered to be a potential therapeutic tool for cancer. To realize siRNA therapy, brilliant DDS carriers should be essential. Therefore, we developed efficient carriers by controlling intracellular trafficking of carriers and release of siRNA in cytosol. Fusogenic peptide accelerated the endosomal escape of the carrier, resulting in enhanced gene knockdown *in vitro* and *in vivo*. The superior polycation which exhibited higher activity than the conventional was successfully discovered through screening.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：医療薬学

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、siRNA、がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、創薬の中心が従来の低分子化合物から抗体・タンパク質を用いたバイオ医薬へと

パラダイムシフトしており、次世代のバイオ医薬として核酸、特に短鎖二本鎖 RNA (siRNA) に大きな期待が寄せられている。

しかし、有用な送達システムが皆無であるため、臨床への適用は局所投与に限られているのが現状で、効率性と安全性に優れた全身投与型送達システムの開発こそが、siRNA 医薬の成功の鍵と言える。

siRNA を効率よく標的組織へ送達し機能を発揮させるためには、投与部位から組織までの体内動態と、その後の標的細胞の標的オルガネラに至る細胞内動態、両者の制御が必要不可欠となる。当研究室では、理想的な送達システムの開発を目指して、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発を進めている。MEND は送達したい siRNA をポリカチオンでコア粒子化し、脂質エンベロープで覆う構造をしている。体内・細胞内動態制御素子のトポロジーを考慮して配置をすることが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究は、siRNA によりガン治療を可能とする全身投与型の新規送達システムの開発を目的とする。研究戦略は、静脈内投与後ががん組織に集積可能なリポソーム型 siRNA ベクター MEND により行う。

がん組織に MEND を送達するにはポリエチレングリコール (PEG) などの水溶性高分子の修飾による血中滞留化と、がんにおける新生血管の特性による Enhanced permeability and retention (EPR) 効果に基づく、受動的な集積が有効である。しかし、一方で PEG 修飾は MEND と標的とするがん細胞との親和性を低下させるため、siRNA のがん細胞内への送達や活性は大きく阻害されてしまう。

この問題を解決するため我々は癌特異的に活性化しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に着目し、MMP で PEG が切断される腫瘍選択的活性化素子 (PPD) の合成と、PPD を MEND に組み込んだ PPD-MEND を開発した。

本研究では、この PPD-MEND を基盤技術として in vivo 担癌マウスにおいて、効率よく siRNA を送達可能な MEND の構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

siRNA を効率よく送達するためには、MEND の細胞内動態の最適化が必要不可欠である。MEND は PPD の切断を受け、エンドサイトーシスによってがん細胞に取り込まれた後、エンドソームを脱出し、細胞質へ移行する。その後、細胞質において siRNA がコア粒子からリリースされることで siRNA は機能を発揮する。そこで (1) エン

ドソーム脱出過程および (2) コア粒子からの siRNA のリリース過程に着目し、細胞内動態の改善を行うことで、従来よりも効率的に siRNA を送達可能な MEND の構築を試みた。

### (1) エンドソーム脱出促進

pH 応答性膜融合ペプチド GALA は、エンドソーム内の低 pH 下で構造変化することで膜融合を誘起することが知られており、リポソームに GALA を修飾することで内封物を細胞質へ効率よくリリースすることが可能である。そこで、PPD-MEND に GALA を修飾し、in vitro 細胞系、また in vivo 担癌モデルマウスを用いた機能評価を行った。

In vitro 細胞系では、エンドソーム/ライソソーム画分を緑色蛍光で染色し、赤色蛍光で標識した MEND を添加後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内局在を観察した。またルシフェラーゼ安定発現細胞を用いて、ルシフェラーゼ活性を指標にノックダウン活性を評価した。

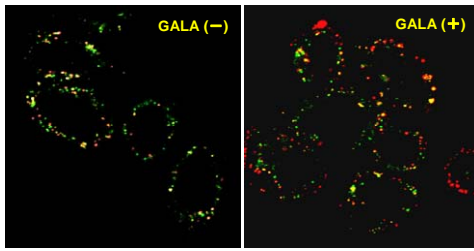
In vivo では、ルシフェラーゼ安定発現 HT1080 細胞を皮下移植した担癌モデルマウスへ投与し、腫瘍組織のルシフェラーゼ活性を指標に機能評価を行った。

(2) コア粒子からの siRNA のリリース  
siRNA はポリカチオンによってコア粒子の形成を行っている。核酸の種類や性質によって、最適なポリカチオン分子は異なることが明らかとなっている。現在まで、siRNA に最適なポリカチオンとしてステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) を用いてきた。本研究では、様々なポリカチオン分子を用いて siRNA コア粒子を調製し、それを封入した MEND を in vitro 細胞にトランスフェクションし、マーカー遺伝子のノックダウン活性を指標に STR-R8 よりも優れたポリカチオンのスクリーニングを行った。

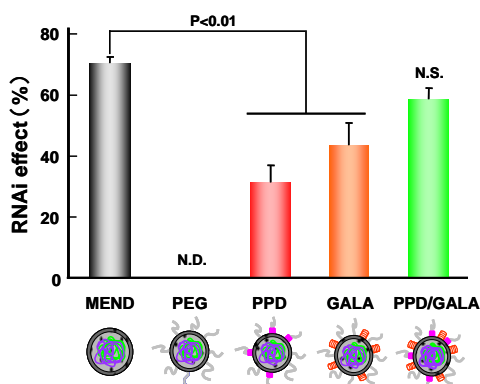
## 4. 研究成果

### (1) エンドソーム脱出促進

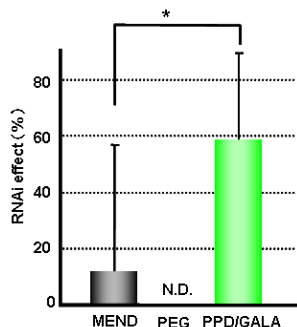
赤色蛍光標識 PEG-MEND は細胞内でエンドソームを示す緑色と共局在していたが、GALA を導入することで赤色単独のパーティクルが多く観察された。従って、PEG-MEND のエンドソーム脱出は GALA の導入によって促進可能であることが示唆された。また、PEG-MEND への GALA 修飾により標的ルシフェラーゼ活性の強いノックダウンに成功した (Sakurai et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2009)。



GALA と PPD を組み合わせて MEND へ修飾したところ、GALA、PPD それぞれ単独の場合よりルシフェラーゼ活性の強いノックダウンを示した。これは PEG の切断による取り込みの向上やその後の GALA によるエンドソーム脱出促進による細胞内動態の改善によるものと考えられる。



またルシフェラーゼ安定発現 HT1080 皮下移植担癌マウスに局所投与したところ、PEG 未修飾 MEND ではまったくノックダウン効果は見られなかった。In vitro で最も効果の高い PEG 未修飾 MEND は in vivo 局所投与ではわずかなノックダウン効果しか示さなかったが、一方で GALA/PPD を修飾した MEND は非常に強いルシフェラーゼノックダウン効果を誘起することが可能であった (Hatakeyama et al. *J. Control. Release* 2009)。この結果は、細胞内動態の改善が in vitro のみならず、in vivo においても効率の向上に有用であることを示唆するものである。今後は血中安定性などの評価を通じて更なる最適化を行い、静脈内投与型 MEND の開発を行う予定である。

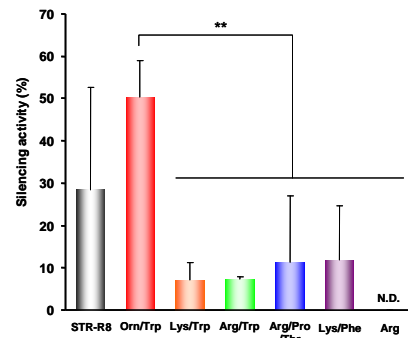


## (2) コア粒子からの siRNA のリリース

siRNA のコア粒子化に用いるポリカチオン分子のスクリーニングでは、塩基性アミノ酸を含む 10 種類のポリペプチド、およびプロタミンを採用した。調製したコア粒子の粒子径を測定し、癌への送達の観点から 100 nm 以下のものを選択した結果、6 種類のポリペプチドを得た。

得られた siRNA コア粒子を MEND に搭載したところ、ポリカチオン分子によらず粒子径 120-170 nm、ゼータ電位 15-25 mV 程度であった。

上記 6 種類の MEND および従来から用いられている STR-R8 による siRNA コア搭載 MEND をルシフェラーゼ安定発現 HeLa 細胞へトランスフェクションしたところ、オルニチン/トリプトファン (Orn/Trp) で構成されたポリペプチドで調製した siRNA コア粒子を搭載した MEND のみ、STR-R8 の場合よりも有意に高いノックダウン活性を示すことが明らかとなった (Sato et al. *Biol. Pharm. Bull.* In press)。今後は、細胞内におけるリリース過程に着目し、メカニズムの解明を行う予定である。また本検討で得られた結果に基づき、最適なポリカチオンの設計を行うことで、より高いノックダウン効率を可能とする MEND の構築を行う予定である。



## 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 5 件)

①Y. Sato, H. Hatakeyama, H. Harashima. Ornithine and tryptophan analogs as efficient polycations for siRNA delivery to tumor cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, in press.

②H. 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.

③ 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.

④ 畠山浩人, Diky Mudhakar, 秋田英万, 原島秀吉. 「多機能性エンベロップ型ナノ構造体の開発—血管をキーワードとして」血管医学メディカルレビュー社 査読無, 9(2), 2008, 181-187.

⑤ 畠山浩人, 秋田英万, 小暮健太郎, 原島秀吉. 「多機能性エンベロッ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」化学工業 化学工業社, 査読無, 59(4), 2008, 263-268.

[学会発表] (計 17 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 enhanced the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo”. Joint Symposium of OTS-Antisense 2009. 2009 年 11 月 3-6 日. Fukuoka, Japan.

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.

③ 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.

④ H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ito, M. Oishi, Y. Nagasaki, H. Harashima. “Development of systemic siRNA delivery for tumor with specifically tumor activation system”. The 11th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2008 年 6 月. Boston, MA, USA.

⑤ 櫻井遊, 畠山浩人, 秋田英万, 大石基, 長崎幸夫, 二木史朗, 原島秀吉. “血清耐性 MEND を用いたがん選択的 siRNA デリバリーシステムの機能評価” 日本薬学会第 129 年会. 2009 年 3 月 28 日. 京都.

[図書] (計 2 件)

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

② 畠山浩人, 原島秀吉. 「細胞内動態の制御を可能とする多機能性エンベロップ型ナノ構造体による遺伝子導入」, 遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術」(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・国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山浩人 (HATAKEYAMA HIROTO)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号: 70504786

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし