

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12649

研究課題名(和文)肝指向型三元複合体を用いたsiRNA導入による肝線維症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic method for liver fibrosis by introducing siRNA using a liver-targeted ternary complex

研究代表者

黒崎 友亮 (Kurosaki, Tomoaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：00582016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではsiRNAを内包した肝指向型の三元複合体を用いた新たな肝線維症の新規治療法の開発を試みた。siRNAに様々な正電荷化合物を結合させ、さらに肝臓への指向性を有するグリチルリチン酸を結合させた肝指向型三元複合体を作製した。培養細胞を用いてsiRNAの導入効果が高い製剤を選択し、TGF- $\beta$ 1のsiRNAを内包した肝指向型三元複合体をマウスに静脈内投与することで、肝臓におけるTGF- $\beta$ 1の発現を有意に抑制することに成功した。さらに研究を進展させ、安全な肺指向型の複合体を開発し、TGF- $\beta$ 1のshRNAを内包した肺指向型複合体を用いて肺線維症モデルにおける繊維化を顕著に抑制することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維症や肺線維症に対しては根治的な治療技術は未だ開発されておらず、盛んに研究がなされている。siRNAやshRNAを発現するpDNAなどの遺伝子・核酸医薬品も盛んに研究されているが、遺伝子・核酸医薬品を標的となる肝臓や肺に選択的に導入できるdrug delivery systemの開発が不可欠である。本研究では非常に効果や選択性の高い肝指向型三元複合体と肺指向型複合体の開発に成功し、肝臓や肺におけるTGF- $\beta$ 1の発現を抑制することに成功した。この技術は他のsiRNAやpDNAにも応用可能であり、肝線維症や肺線維症の新しい治療技術となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel treatment for liver fibrosis using a liver-targeted ternary complex containing siRNA. siRNA was mixed with various positively charged compounds, and a liver-targeted glycyrrhizic acid was added to the mixture to create a liver-targeted ternary complex. In in vitro study, we selected a most appropriate formulation that was highly effective in introducing siRNA. After intravenous administration of the liver-targeted ternary complex containing TGF- $\beta$ 1 siRNA to mice, we successfully suppressed the expression of TGF- $\beta$ 1 in the liver. Further extending our research, we developed safe lung-targeted nanoparticles and succeeded in significantly suppressing fibrosis in a pulmonary fibrosis model using lung-targeted nanoparticles containing TGF- $\beta$ 1 shRNA.

研究分野：薬剤学

キーワード：ナノ粒子 核酸医薬品 肝線維症

## 1. 研究開始当初の背景

肝線維症は、様々な肝炎ウイルスの感染やアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、肝内胆汁うっ滞、薬剤性肝障害、代謝異常、うっ血肝など、多様な原因により引き起こされる病態である。これまでの肝線維症に対する治療は、抗ウイルス薬や免疫抑制薬を用いてウイルス性肝炎や自己免疫性肝炎などの原疾患の治療を行うものが主体であった。このため、非アルコール性脂肪肝炎や代謝異常など明確な治療法が開発されていない疾患による肝線維化を予防・治療するためには、線維化そのものを抑制する技術が必要である。しかしながら、肝臓における線維化を直接的に抑制できる医薬品の開発には至っていない。

siRNA などの核酸医薬品は既存の薬剤とは大きく異なった機序で作用を示す化合物であり、これまでに治療が困難であった疾患に対しても高い有用性が期待されている。肝線維症に関しても、線維化に重要な働きを示すといわれている transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) や platelet-Derived Growth Factor (PDGF) などに対する siRNA が期待されているが、siRNA は単独で生体内に投与しても血液中の酵素によって容易に分解される。また、化学修飾などの手法によって分解を回避したとしても、速やかに腎臓から排泄され、血液中からの消失が極めて速い。さらに、水溶性で負に帯電した siRNA は膜透過性が低く、同じく負に帯電した細胞膜と静電的に反発するため、細胞内取り込みにも乏しく、in vitro の実験系でさえ単独では遺伝子発現抑制効果はほぼ得られない。

このため、siRNA を肝線維症に応用するためには siRNA の生体における安定性を高めつつ、標的となる肝臓へ効率的に siRNA を送達・導入することが可能な drug delivery system (DDS) の開発が不可欠である。しかしながら、安全性や標的指向性、siRNA の導入効果をすべて満たすことが可能な DDS の報告は、ほばない。

## 2. 研究の目的

これまでに、我々は DNA と正電荷の化合物、負電荷の化合物を静電的に自己組織化することによってコアシェル構造を有した三元複合体の開発を行ってきた。この研究の過程で、申請者は数種の特殊な外殻成分を発見し、核酸医薬品を特定の臓器へ選択的に送達することが可能な臓器標的型三元複合体の開発に成功している。特にグリチルリチン酸 (GL) を外殻とした三元複合体に pDNA を搭載し、マウスへ静脈内投与した結果、三元複合体のほとんどが肝臓に蓄積し、肝臓選択的に遺伝子を導入できることを見出した。さらに、肝指向型三元複合体が内包した pDNA を肝臓へ送達し、薬理効果を示すために十分な量のタンパク質を発現させることも確認している。

本研究の目的は、医薬品や医薬品の添加物、生体分解性の高分子や脂質等の安全な化合物を用いて、siRNA を肝臓へ選択的に送達することが可能な肝指向型三元複合体を構築し、構築した三元複合体に抗線維化作用を有する siRNA を搭載し、肝線維症の新規治療法としての有用性を評価する事である。

## 3. 研究の方法

siRNA と生体分解性の正電荷高分子や脂質、GL を静電的に自己組織化することで、コアシェル構造を有した肝指向型三元複合体を構築した。得られた三元複合体の粒子径や表面電荷を測定し、アガロースゲル電気泳動で安定性を確認した。

次に、肝指向型三元複合体をマウス肝癌細胞株である Hepa1-6 細胞に添加し、細胞内取り込みや siRNA による遺伝子発現抑制効果を評価した。また、肝指向型三元複合体をマウスへ静脈内投与し、体内動態や肝臓組織における遺伝子発現抑制効果を評価した。さらに、肝指向型三元複合体投与後のトランスアミナーゼ活性を測定し、肝障害の有無を確認した。

また、pDNA に様々な正電荷高分子や正電荷脂質、肺指向性を有する N-lauroylsarcosine (LS) を静電的に自己組織化し、肺指向型複合体を作製した。肺指向型複合体の肺への遺伝子導入効果に及ぼす正電荷高分子や正電荷脂質の影響を評価し、最も効果や安全性が高い成分を選択した。さらに、各成分の比率を最適化した肺指向型複合体に TGF- $\beta$  の shRNA を発現する pDNA を搭載し、プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスに投与し、肺におけるヒドロキシプロリンの量を指標に抗線維化効果を評価した。

## 4. 研究成果

まず、siRNA に polyethylenimine (PEI) や poly-L-lysine (PLL) , poly-L-arginine (PLA) , dendrigraft-poly-L-lysine (DGL) などのカチオン性高分子または 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) や 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] cholesterol (DC-Chol) などのカチオン

性脂質を結合させ、安定なカチオン性の微粒子を構築した。このカチオン性の微粒子にアニオン性化合物である GL を静電的に自己組織化することで、数種の肝指向型三元複合体を構築した。得られた複合体の粒子径や表面電荷を測定したところ、概ね 100-200 nm 前後で負電荷を帯びた安定な微粒子であった。一方で、DC-Chol を用いた複合体では粒子径が 500 nm 程度まで増大した。これらの肝指向型三元複合体に血清を添加し、37°C でインキュベート後の安定性を評価した結果、複合体からの siRNA の流出は認められず、非常に高い安定性が示された。そこで、蛍光標識した siRNA を肝指向型三元複合体に搭載し、マウス肝癌細胞株である Hepa1-6 細胞に添加し、細胞内取り込みを評価した。その結果、調製した肝指向型三元複合体は負電荷であるにもかかわらず、効率的に Hepa1-6 細胞へ取り込まれることが確認できた。

ルシフェラーゼに対する siRNA を搭載した各肝指向型三元複合体をルシフェラーゼ恒常発現 Hepa1-6 細胞 (Hepa1-6-Luc 細胞) に添加し、ルシフェラーゼの発現抑制効果を評価した。この結果、PEI や PLL、PLA、DGL などのカチオン性高分子や DC-Chol を用いた肝指向型三元複合体ではルシフェラーゼの発現抑制効果は非常に弱かった。一方で、DOTAP を用いた肝指向型三元複合体では若干のルシフェラーゼ発現抑制効果が認められた。そこで、DOTAP を用いた肝指向型三元複合体にさらに、膜融合脂質やコレステロールを追加し、ルシフェラーゼの発現抑制効果を評価したところ、膜融合脂質 1,2-dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) を加えた siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体が強い遺伝子発現抑制効果を示す事を見いだした。図 1 には siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体による遺伝子発現抑制効果を示す。効果の無い scramble の siRNA を搭載した siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体を添加してもルシフェラーゼの発現量は低下しなかったが、ルシフェラーゼの siRNA を搭載した siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体を添加した細胞では添加量依存的にルシフェラーゼの発現量が低下した。

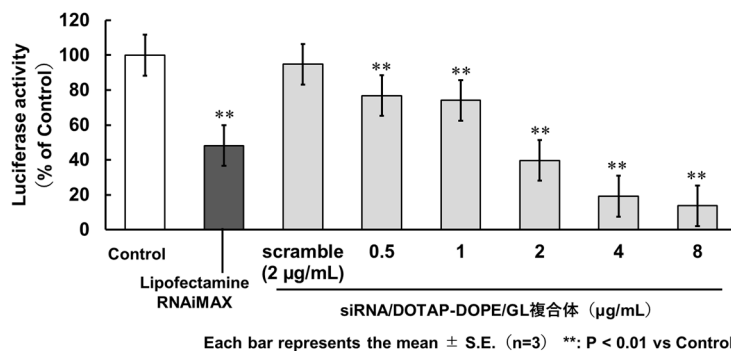


図 1. Hepa1-6-Luc 細胞における肝指向型三元複合体の遺伝子発現抑制効果

この siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体は粒子径が約 120 nm で表面が負に帯電した微粒子であった。また、siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体を Hepa1-6 細胞に添加したところ、細胞障害性が低く、赤血球との凝集や溶血を示さず、静脈内投与後の高い安全性が示唆された。そこで、蛍光標識した siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体をマウスに静脈内投与した結果、そのほとんどが肝臓に集積した。次に、肝臓の繊維化に重要な働きを示す TGF- $\beta$  の siRNA を siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体に搭載し、マウスに静脈内投与した結果、肝臓の TGF- $\beta$  の mRNA 量を顕著に抑制できた。また、siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体の投与による肝障害は確認されなかった。

そこで、肝線維症モデルでの検討を試み、四塩化炭素をマウスに週に 3 回、8 週間継続して投与する事で肝臓の繊維化モデルを作製することに成功した。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の蔓延による学内への立ち入りの制限などで、肝線維症モデルマウスの作製に支障がたため、研究期間内に肝線維症モデルマウスでの十分な治療実験ができなかった。今後、TGF- $\beta$  の siRNA を搭載した siRNA/DOTAP-DOPE/GL 複合体の肝線維症モデルマウスにおける抗繊維化効果を確認していく予定である。

先述の通り、四塩化炭素を用いた肝線維症モデルでは、四塩化炭素を週に 3 回、8 週間継続して投与する必要があり、新型コロナウイルス感染症の影響で実験の遂行に支障が出た。そこで、プレオマイシンを単回経肺投与することで比較的簡便に作製できる肺線維症を標的に、肺指向型製剤の開発と肺線維症治療への応用実験を追加した。研究代表者らは過去に、pDNA と正電荷高分子である PEI、正電荷脂質である 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA)、負電荷脂質である LS を自己組織化することで、肺で極めて高い遺伝子発現効果を示す肺指向型複合体を開発している (Journal of Controlled Release, 136, 213-219, 2009)。そこで、肝指向型三元複合体の開発で得られた知見を応用することで、この肺指向型複合体の成分を最適化し、より安全性や肺での遺伝子発現効果が高い製剤の開発を試みた。

まず、正電荷高分子の最適化を行い、非分解性の PEI に対して、生分解性のポリペプチドである PLL や PLA、DGL と pDNA、DOTMA、LS を用いて肺指向型複合体を作製した。これらの肺指向型複合体をマウスに静脈内投与し、肺における遺伝子発現を評価した結果、PEI を用いた肺指向型複合体と比較して PLL や PLA を用いた肺指向型複合体の遺伝子発現は顕著に低下した。一方で、DGL を用いた肺指向型複合体では PEI を用いた肺指向型複合体に匹敵する遺伝子発現が得られた。そこで、次に正電荷脂質の最適化を行い、DOTMA や DOTAP、1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane (DODAP)、DC-Chol などの正電荷脂質を用いた肺指向型複合体を作製し、静脈内投与後のマウスの肺における遺伝子発現を評価した。この結果、DODAP や DC-Chol を用いた肺指向型複合体では遺伝子発現量が著しく低下し、DOTAP を用いた肺指向型複合体においても DOTMA を用いた場合と比較して遺伝子発現が有意に低値を示した。そこで、最も適した組み合わせとして、pDNA と DGL、DOTMA、LS を選択し、各構成成分の比率を最適化した。最適化した肺指向型複合体にルシフェラーゼを発現する pDNA を搭載し、静脈内投与後のマウスにルシフェリンを投与し、撮影した *in vivo* イメージング画像を図 2 示す。肺のみに高いルシフェラーゼの発現が確認できる。

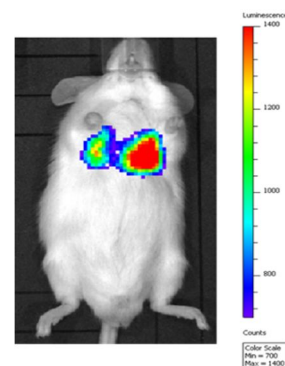


図 2. 肺指向型複合体投与後のマウスの全身のルシフェラーゼ発現

次に、この肺指向型複合体に TGF- $\beta$  の shRNA を発現する pDNA を搭載し、プレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスに投与し、肺における繊維化の指標であるヒドロキシプロリンへの影響を評価した。効果の無い scramble の shRNA を発現する pDNA を搭載した肺指向型複合体を投与した結果、肺のヒドロキシプロリン量の有意な減少は認められなかった。一方で、TGF- $\beta$  の shRNA を発現する pDNA を搭載した肺指向型複合体を投与することで、肺のヒドロキシプロリン量が有意に低下し、肺の繊維化を抑制できていることが示された。

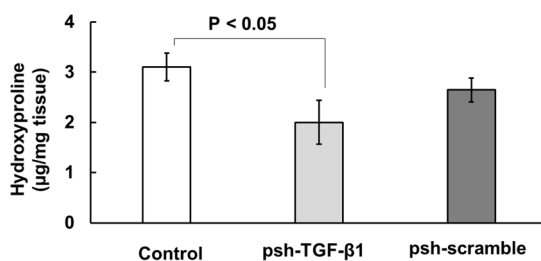


図 3. 肺指向型複合体による肺線維症モデルマウスの抗繊維化効果

以上、本研究では肝臓や肺に siRNA や shRNA を発現する pDNA を効率的に送達可能な安全な肝指向型三元複合体と肺指向型複合体を開発した。特に、肺指向型複合体の投与によって肺線維化の抑制に成功しており、今後は肝指向型三元複合体を用いて肝臓における抗繊維化効果を確認していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurosaki Tomoaki, Kanda Hiroki, Hashizume Junya, Sato Kayoko, Harasawa Hitomi, Nakamura Tadahiro, Sasaki Hitoshi, Kodama Yukinobu	4. 巻 13
2. 論文標題 Delivery of pDNA to the Lung by Lipopolyplexes Using N-Lauroylsarcosine and Effect on the Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1983 ~ 1983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13111983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸送達用担体及び核酸送達複合体	発明者 黒崎友亮, 佐々木均	権利者 長崎大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 45593	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 均  (Sasaki Hitoshi)  (00170689)	長崎大学・熱帯医学研究所・特命教授   (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------