

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790164

研究課題名（和文）次世代型 siRNA 搭載ナノバブルと超音波併用による新規血管新生療法の開発

研究課題名（英文）Novel angiogenic therapy using siRNA-loaded Bubble liposomes with ultrasound exposure

研究代表者

高橋 葉子（遠藤葉子）(TAKAHASHI YOKO)

東京薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：30453806

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまでに我々が開発してきた超音波造影と遺伝子導入を可能とする超音波造影ガス封入リポソーム（バブルリポソーム）を基本に、全身投与における低分子核酸の導入効率の向上を目的とした siRNA 搭載ナノバブルの開発を行い、その有用性を評価した。構成脂質としてカチオン性脂質を用いることで、膜表面に負電荷を有する siRNA の搭載が可能であること、その搭載には静電的相互作用のみならず、ポリエチレングリコール（PEG）鎖が重要であることを明らかとした。さらに、血清成分存在下において、siRNA の安定性を向上させることを明らかとした。また、数種のカチオン性脂質含有バブルリポソームを調製し、超音波造影効果・導入効果・傷害性などの観点から比較検討を行うことで、核酸キャリアーとしてのみならず、造影剤としても有用な新規ナノバブル製剤の開発に成功した。また、下肢虚血モデルへ尾静脈投与したところ、疾患部位である下肢筋組織への到達性も確認できたことから、本法は血管新生療法の有用なツールになり得るものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, we developed polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes (Bubble liposomes; BLs) entrapping an ultrasound (US) imaging gas. In this study, we prepared novel siRNA-loaded BLs (si-BLs) using cationic lipids, DOTAP, DSTAP, DSDAP, and DDAB, and examined the usability of those BLs as a carrier and an US contrast agent. We demonstrated that siRNA could be loaded onto BLs and that siRNA-loaded BLs was stable in serum. A specific gene-silencing effect was also achieved by transfection with si-BLs. We also could optimize the lipid component of BLs in terms of the US imaging, the gene transfer efficiency, and toxicity. Furthermore, BLs injected into tail vein could reached to ischemic hindlimb of model mice. These results suggest that this method could be a useful tool for angiogenic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：超音波、リポソーム、siRNA

1. 研究開始当初の背景

虚血性疾患治療において、血管新生促進因子をコードした遺伝子を導入する血管新生遺伝子治療の研究が近年盛んに行われているが、低酸素状態での遺伝子の低発現が治療効果の低下につながっている。また促進因子による浮腫や炎症などの問題点も指摘されている。血管新生を負に制御する遺伝子発現を siRNA による抑制することで、これらの問題を回避可能な新規治療法になり得るものと期待される。

また近年、siRNA はその標的遺伝子特異的な抑制効果の高さから、難治性疾患の有用な治療法となることが期待されているが、生体への適用にはデリバリーの点で大きな課題がある。これまでに我々は、ナノサイズのポリエチレングリコール修飾リポソーム (PEG-リポソーム) に超音波造影ガスを封入したナノバブル製剤 (バブルリポソーム) の開発に着手し、成功をおさめている。さらに、開発したバブルリポソームを用い、下肢筋肉への局所投与による siRNA 導入とその抑制効果を確認しており、治療への応用が期待できると考えている。このバブルリポソーム表面への siRNA の結合により、投与後のバブルリポソームと siRNA の生体内挙動の一致させることは、局所投与のみならず、血管内投与を介した際においても導入の効率化が可能となり、さらに、超音波診断と治療を同時に行うシステムの開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでに siRNA の細胞内導入に成功している超音波造影ガス封入 PEG リポソーム (バブルリポソーム) を基本に、血管内投与後のバブルリポソームと siRNA の体内挙動の一致、およびの siRNA の血中安定性の獲得を可能とする新規バブル製剤の開発を行う。そこで、カチオン性脂質を用いてバブルリポソームを調製し、その膜表面へ、静電的相互作用により siRNA を搭載したバブルリポソーム (si-BLs) の調製を試みる。siRNA 導入効果、超音波造影効果、細胞障害性等を指標に、siRNA キャリアーおよび超音波造影剤としての有用性を明らかにする。さらに、バブルリポソームと超音波照射の併用により、血管新生を負に制御する因子を標的とした siRNA の導入を試み、血管新生促進因子への影響に関して評価する。

3. 研究の方法

(1) バブルリポソームの調製

基本脂質に DPPC 及び DSPE-PEG₂₀₀₀-OME を使用し、それぞれの組成比が 94:6(molar ratio)としたリポソームを REV 法により調製した。また、カチオン性脂質含有バブルリポ

ソーム調製の際には、DOTAP, DSTAP, DSDAP, DDAB を用いた。さらに、PEG 鎖長の影響を検討する際には、PEG₇₅₀ を用いた。調製したリポソームに超音波造影ガス (パーフルオロプロパン) を封入することで、バブルリポソームとした。その粒子径およびゼータ電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

(2) 造影ガスの封入確認 (*in vitro* における造影効果)

バブルリポソームの懸濁液を 6 well プレートに添加し、超音波造影装置(50 MHz, B-mode) (NP60R-UBM ; NEPA GENE, CO. LTD)を用いてバブルリポソームの超音波イメージングを行うことで、ガスの封入・保持を評価した。

(3) バブルリポソームと siRNA の相互作用

各種カチオン性脂質含有バブルリポソームを調製 Buffer で希釈し、FITC 標識 siRNA を添加、混合後、フローサイトメトリーにより評価した。

(4) 血清存在下における siRNA の安定性

siRNA 単独、もしくはバブルリポソームに相互作用させた後の siRNA を 50% FCS 存在下、37°C、15-60 分インキュベーションさせたものをサンプルとした。このサンプル溶液に loading buffer を混合した試料を 15% ポリアクリルアミドゲルに添加し、90V 定電圧下で泳動した。その後、SYBR SAFE を含む TBE 溶液にゲルを浸漬して約 15 分間染色し、siRNA のバンドを UV 照射 (AIC Epi-Light UV FA1100 ; Aisin)により検出した。

(5) siRNA 細胞内導入効果

siRNA の細胞内導入効果について評価するため、レポーター遺伝子として、CMV プロモーター制御下で Luciferase を発現する pCMV-GL3 と Luciferase 遺伝子特異的な siRNA を用いた。48well プレートに COS-7 細胞を播種し、1 日培養後、バブルリポソームおよび pCMV-GL3 を 10% FCS 含有培地で希釈、混合し、各 well に添加した。その後、速やかに超音波照射 (Frequency: 2 MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 2.0 W/cm², Time: 10 sec.) (SONOPORE KTAC-3000; NEPA GENE, CO. LTD)を行った。無血清培地にて細胞を 2 回洗浄し、余剰のバブルリポソームと pDNA を除去した。1 日培養後、si-BL を用い、上述の条件で超音波照射を行い、siRNA を導入した。2 日間培養後、細胞を回収し、Luciferase 活性を測定した。

また、血管新生制御因子に対する siRNA の導入効果について検討するため、C2C12、NIH3T3、HUVEC へ、上述と同様の方法で

siRNA の導入を行った。数日培養後、細胞を回収し、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法により、各種血管新生促進因子への影響について検討した。

(6) キャビテーション誘導能の評価

バブルリポソームは、超音波照射に伴いキャビテーションを効率よく誘導することで、細胞内導入の駆動力を生じさせている。そこで、各種バブルリポソームのキャビテーション誘導能について、COS-7 細胞へ上述⑤と同様に p-CMV GL3 の導入を行い、Luciferase 活性を指標に評価した。

(7) 下肢虚血モデルの作製

ICR マウス (5 週齢、♂) の左大腿動脈を結紮、切除し、切開した皮膚を外科縫合糸を用いて縫合した。虚血処置の 10 日後、自然回復が停止し、虚血が慢性化したマウスを下肢虚血モデルとした。

なお、動物実験に関しては、所属機関における指針に基づき、動物実験委員会に申請し、承認を受けた後、ヘルシンキ宣言に基づき動物愛護の精神を遵守しつつ行った。

(8) *in vivo* における造影効果

超音波造影剤としての有用性について検討するため、ICR マウス (5 週齢、♂) の尾静脈より各種バブルリポソームを投与し、超音波診断装置 Aplio (東芝) を用いて心臓の超音波イメージングを行った。

また、各種バブルリポソームの疾患部位への到達性を評価するため、下肢虚血モデルマウスの尾静脈よりバブルリポソームを投与し、虚血下肢の超音波イメージングを行った。

(9) *in vivo* における siRNA 導入効果

血管新生制御因子に対する siRNA の導入効果について検討するため、下肢虚血モデルの虚血部位へ si-BLs を筋肉内投与し、速やかに超音波照射 (Frequency: 2 MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 1.0 W/cm², Time: 2 min) を行った。数日後、超音波照射部位の筋組織を回収し、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法により、各種血管新生促進因子への影響について検討した。

(10) 傷害性評価

si-BLs と超音波照射併用による細胞傷害性について、Cell Counting Kit-8 を用いて検討した。また、赤血球への影響について、ICR マウスより採血した血液より赤血球浮遊液を調製し、各種バブルリポソームを添加して、赤血球凝集試験および溶血試験を行った。

さらに、各種バブルリポソームの血管内投与および治療用超音波照射に伴う肝機能・筋組織の傷害性について、生化学検査値の変化

より評価した。

4. 研究成果

siRNA を表面に搭載したカチオン性脂質含有バブルリポソーム (si-BLs) を調製し、siRNA キャリアー、および超音波造影剤としての有用性について検討し、以下の結果を得た。

(1) カチオン性脂質として DOTAP を用いてバブルリポソームを調製し、超音波イメージングにより評価したところ、造影輝度の増強が確認されたことから、DOTAP 含有リポソームは造影ガスの封入・保持が可能であることを明らかとした。

(2) DOTAP 含有バブルリポソームと siRNA の相互作用についてフローサイトメトリーにより評価したところ、バブルリポソーム表面に siRNA の搭載が可能であることが明らかとなった。さらに、PEG の含有率 6 mol% のうち一部を短い鎖長の PEG₇₅₀ を用いることで、PEG₂₀₀₀ のみの場合と比較して、相互作用が増強することが明らかとなった (Fig. 1)。

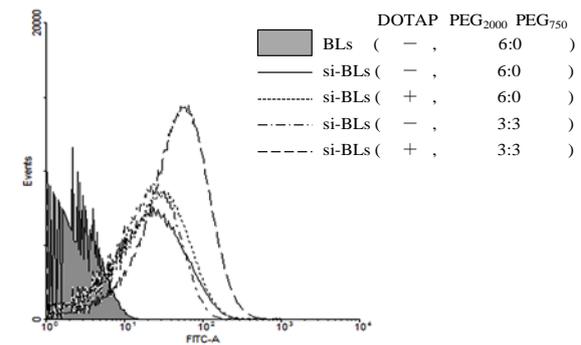


Fig. 1 Effect of PEG chain length on the interaction of siRNA with Bubble liposomes

(3) バブルリポソームへの siRNA 搭載の目的の一つとして、分解されやすい siRNA の分解酵素に対する耐性の獲得が挙げられる。そこで、50%の血清存在下、siRNA または si-BLs を 37°C でインキュベーション後、アクリルアミドゲル電気泳動により評価した。その結果、siRNA 単独と比較し、バブルリポソーム膜表面に結合することで、高濃度の血清存在下においても siRNA の安定性が向上することが明らかとなった (Fig. 2)。

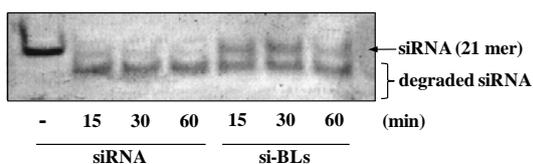


Fig. 2 Stability of siRNA in the presence of serum

(4) si-BLs の細胞内導入能を評価するため、siRNA の導入前日に、あらかじめ pCMV GL3 を導入した細胞に対して、si-BLs を用いて siRNA の導入を行い、その抑制効果について検討した。その結果、カチオン性脂質を含まない従来型と同程度の siRNA 導入効果を有することが示された(Fig. 3)。

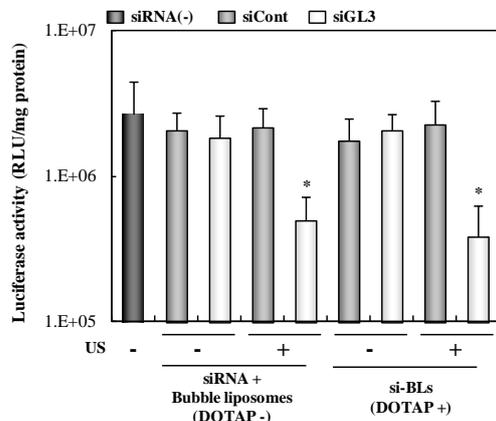


Fig. 3 Down regulation of luciferase gene expression by siRNA transfected with si-BLs and US

* indicates P value <0.05 compared with siCont as a negative control.

(5) DOTAP 含有バブルリポソームの siRNA キャリアーとしての有用性は示されたものの、超音波造影剤としての利用においては、造影ガスの保持、および造影効果の持続の点において改善の余地があった。そこで、DOTAP に変わるカチオン性脂質として、DSTAP, DSDAP, DDAB を含有するリポソームをそれぞれ調製した。いずれの脂質においてもガスの保持が可能であり、DOTAP 含有バブルリポソームと比較して安定であることが示唆された。また、その造影効果においても、DOTAP と比較して改善されることが明らかとなった。

(6) 新たに調製した各種バブルリポソームへの siRNA の搭載をフローサイトメトリーにより、超音波照射に伴うキャビテーション誘導能を細胞内への遺伝子導入効果により検討した。さらに、細胞傷害性を WST-8 assay により評価し、赤血球凝集試験、溶血試験による検討も加えた。その結果、いずれのバブルリポソームも siRNA の搭載が可能であること、キャビテーション誘導能を有すること、細胞および赤血球に対する顕著な傷害性は認められないことが明らかとなった。

(7) バブルリポソームを下肢虚血モデルマウスへ尾静脈投与し、疾患部位への各種バブルリポソームの到達性について、超音波造影効

果を指標に評価した。その結果、いずれのバブルリポソームも虚血部位の微細な血管を介して虚血下肢へ到達可能であることが示された。

(8) 各種バブルリポソームの血管内投与、および治療用超音波照射併用による肝機能および筋組織への傷害性について、生化学検査値の変化を検討した。その結果、いずれのバブルリポソームにおいても顕著な傷害性は認められなかった。

以上、超音波造影効果、および *in vitro* における導入効果、傷害性の観点から、3 種のうち DSDAP 含有バブルリポソームが最も有用なキャリアーとなり得ることが示唆された。また、本バブルリポソームは、微細な血管を介して、下肢虚血部位へ到達可能なことから、超音波照射との併用により、虚血性疾患の診断および核酸治療の有用なツールになり得るものと期待される。しかしながら、本研究期間内においては、数種の血管新生制御因子に対する siRNA の導入効果について、*in vitro* および *in vivo* において検討したが、標的遺伝子の抑制とそれに伴う血管新生因子への顕著な影響は認められなかった。siRNA の標的因子を変更して検討を続ける必要がある。それとともに、今後は更なる導入の効率化を目指し、標的指向性を付与した siRNA 搭載型ナノバブルの開発を進める予定である。

本研究において開発した DSDAP 含有バブルリポソームは、siRNA と同様に負電荷を有する他の核酸をも搭載可能であることから、虚血性疾患のみならず、種々の疾患に対する診断および核酸治療システムへの応用に繋がるものと考えられる。

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 3 件)

① Y. Endo-Takahashi, et al., Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound, *Int. J. Pharm.*, 査読有, 422, 2012, p504-509, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.11.023

② Y. Negishi, Y. Endo-Takahashi, et al., siRNA delivery system using Bubble liposomes and ultrasound, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 査読有, 22, 2012, p91-97

③ Y. Endo-Takahashi, et al., Novel siRNA-loaded Bubble liposomes with ultrasound exposure for RNA interference, *AIP Conf. Proceedings*, 1359, 2011, p326-329

[学会発表] (計 11 件)

- ①中村有沙, 高橋葉子, 正電荷脂質含有バブルリポソームの遺伝子導入キャリアーとしての有用性評価, 第 10 回日本超音波治療研究会, 2011 年 11 月 26 日, 東京
- ②高橋葉子, 超音波核酸デリバリーシステムにおける正電荷脂質含有バブルリポソームの機能評価, アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011, 2011 年 9 月 2 日, 大阪
- ③高橋葉子, 核酸表面結合型バブルリポソームの脂質組成に関する基礎的検討, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京
- ④高橋葉子, 核酸表面結合型バブルリポソームの調製と基礎的検討, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 静岡
- ⑤高橋葉子, siRNA 表面結合型バブルリポソームの調製と基礎的検討, 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回夏期セミナー, 2010 年 9 月 1 日, 滋賀
- ⑥ Y. Endo-Takahashi, Novel siRNA-loaded Bubble liposomes with ultrasound for efficient siRNA delivery, International Liposome Research Days and Lipids, Liposomes, & Membrane Biophysics, 2010,08,04, Vancouver
- ⑦ Y. Endo-Takahashi, Novel siRNA-loaded Bubble liposomes with ultrasound exposure for RNA interference, 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound, 2010,06,10, Tokyo
- ⑧遠藤葉子, siRNA 表面結合型バブルリポソームの調製と有用性の評価, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山
- ⑨遠藤葉子, siRNA 表面結合型新規バブルリポソームの調製および基礎的検討, 第 8 回日本超音波治療研究会, 2009 年 11 月 28 日, 東京 (最優秀発表賞)
- ⑩ Y. Endo, Novel siRNA-loaded liposomal Bubbles with ultrasound exposure for RNA interference, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, 2009,11,04, Fukuoka
- ⑪遠藤葉子, バブルリポソームによるマウス脛部筋組織への siRNA 送達システムの有用性の評価, 日本薬剤学会第 24 年会

[図書] (計 1 件)

- ①根岸洋一, 高橋葉子, 新槇幸彦, シーエムシー出版, ドラッグデリバリーシステムの新展開 II, 2012, p54-61

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 葉子 (遠藤葉子) (TAKAHASHI YOKO)

東京薬科大学・薬学部・助手

研究者番号 : 30453806