

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21800001

研究課題名（和文）肝臓標的型 siRNA 搭載多機能性ナノ構造体による 2 型糖尿病関連遺伝子群の機能解析

研究課題名（英文）In vivo functional analysis of type 2 diabetes related new genes using liver siRNA delivery technique

研究代表者

林 泰弘 (HAYASHI YASUHIRO)

北海道大学大学院 薬学研究院・特任助教

研究者番号：30548178

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、まず初めに肝臓に核酸送達可能なデリバリーシステムの構築を試みた。細胞内導入効率が非常に高い膜透過性 R8 ペプチド、エンドソーム脱出効率の高い GALA ペプチド等を用いることで、pDNA、siRNA の送達システムの構築に成功した。次にマイクロアレイ解析によって、約 4 万 1 千遺伝子の中から糖尿病の進行に深く関わると考えられる新規な 1 遺伝子に着目し、siRNA を用いた in vivo 機能解析を行った。その結果、標的遺伝子をノックダウンした病態マウスにおいて有意な血糖値の減少、及び体重の減少が認められた。従って、この新規遺伝子は 2 型糖尿病、または肥満の治療ターゲットとして有望である。

研究成果の概要（英文）：First, nucleic acid such as pDNA and siRNA delivery system to the liver was developed. This mission was achieved by optimizing the density of R8 peptide which has high ability to internalize into cell and GALA peptide as pH sensitive fusogenic peptide. Second, a new candidate gene which related the progression of type 2 diabetes was screened by DNA microarray analysis. Third, in vivo functional analysis of this new gene was performed using siRNA. When knocking down for this gene in the liver of type 2 diabetes model mice, significant reduction of both blood glucose level and body weight was observed. Thus, this new gene is promising therapeutic target for type 2 diabetes as well as obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,170,000	651,000	2,821,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：肝臓、siRNA デリバリー、in vivo 機能解析、マイクロアレイ解析、2 型糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、特定の遺伝子の発現抑制を可能とする RNAi 技術は、創薬標的分子の同定を可能にする基盤技術に留まらず、究極の分子標的薬として最も大きな期待が寄せられている。

しかしながら、標的組織へ安全かつ効率的に siRNA を送達させるシステムが少ないために、siRNA を用いた個体レベルでの研究、更には RNAi 創薬研究が効率的に行われていないのが現状である [Dorsett Y et al. *Nat Rev*

*Drug Discov.* 318 (2004)]. 一方、申請者はマイクロアレイ解析によって肝臓における新規2型糖尿病関連遺伝子群の探索を行っており、10個程度の候補遺伝子の抽出に成功している。従って、この候補遺伝子の機能を個体レベルで簡単に解析する技術構築が必要であった。

## 2. 研究の目的

肝臓を標的とした *in vivo* siRNA デリバリーシステムの構築を行うことで、個体レベルでの遺伝子機能解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝臓実質標的型 MEND の構築

初めに肝臓におけるルシフェラーゼ遺伝子発現活性を指標にして MEND の最適化を検討し、肝実質細胞、非実質細胞の選択性を評価した。

次に pDNA、siRNA を肝臓の実質細胞に効率的に送達可能な MEND の構築を行うため、細胞内導入効率の高い膜透過性の良い R8 ペプチド、及びエンドソーム脱出能力を有する GALA ペプチドの修飾量の最適化、及び凝縮化コアの形状についての検討をルシフェラーゼ発現を指標にして *in vivo* での検討を行った。

### (2) マイクロアレイ解析による新規2型糖尿病関連遺伝子群の抽出

2型糖尿病モデル動物と正常モデル動物の肝臓の RMA を回収し、マイクロアレイ実験を行い、各条件での遺伝子発現プロファイルを作成した。次にデータ解析によって、新規2型糖尿病関連遺伝子群の抽出を行った。

### (3) 新規遺伝子を標的とした *in vivo* 機能解析

新規遺伝子を標的とする siRNA の最適配列をマウス初代培養細胞を用いて決定した。この siRNA を病態マウスの肝臓に導入し、新規遺伝子の糖尿病病態に与える影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝臓実質標的型 MEND の構築

一般的に市販の *in vivo* transfection 試薬として利用されている Lipoplex 体では、肺での遺伝子発現活性が肝臓に比べて約25倍高かった。一方、核酸を脂質膜でコートした構造を有する MEND では肺の遺伝子発現活性の上昇を抑え、肝臓での遺伝子発現活性が5倍上昇した。つまり、MEND の構造は Lipoplex 構造に比べて肝臓へ核酸を導入するのに有利であることが示唆された。次にエンドソーム脱出素子である GALA を修飾した MEND では約10倍遺伝子発現活性が上昇したため、細

胞内動態の制御（特にエンドソーム脱出過程）が効率的な核酸導入に重要なことが示唆された。次に肝臓を実質細胞と非実質細胞に分離して細胞数あたりの遺伝子発現活性を調べたところ、非実質細胞は実質細胞に比べて約6倍活性が高く、非実質細胞選択的キャリアであることを明らかにした [Yamauchi J, Hayashi Y et al. *Biol. Pharm. Bull.* (2010)]。

そこで、R8 ペプチドを用いて pDNA、siRNA を肝臓の実質細胞に効率的に送達可能な MEND の構築を試みた。負電荷を有する核酸凝縮化体を封入した R8-MEND は、肝臓での高い遺伝子発現が認められなかったが、エンドソーム脱出素子である GALA を R8-MEND に修飾した場合は、約800倍遺伝子発現活性の上昇が見られた。更に最適化された R8-GALA-MEND は肺、脾臓での遺伝子発現活性が肝臓の約1/13倍、1/30倍であり、肝臓特異性の高い核酸キャリアシステムであることを明らかにした。[Khalil Ikramy, Hayashi Y et al. (Submitted)]。次に、肝実質細胞で主に発現している SR-BI 遺伝子を標的とする siRNA を構築された R8-GALA-MEND 搭載して、肝臓でのノックダウン効果を評価した。その結果、投与量依存的な SR-BI 遺伝子の機能発現を制御することに成功した。さらにこのシステムは肝毒性を誘起しない安全なキャリアであることも明らかにした [Hayashi Y et al. (Submitted)]。膜透過性ペプチドを用いた肝臓への siRNA デリバリー成功例はほとんどなく、本研究が初めてである。今後は更なる改良を行い、最高性能のキャリアの構築を目指す。

### (2) マイクロアレイ解析による新規2型糖尿病関連遺伝子群の抽出

糖尿病発症後のマウスで正常マウスに比べて10倍以上発現亢進している遺伝子は、約4.1万遺伝子中27遺伝子であった。この27遺伝子のうち、糖尿病発症が進行するにつれて発現量が2倍以上増加している遺伝子群は9遺伝子であった。RT-PCR 解析、及び文献検索により、最も可能性の高い新規な1遺伝子を絞り込んだ。更に糖尿病ラットに関しても同様に候補遺伝子の抽出に成功した [Hayashi Y et al. *Biol. Pharm. Bull.* (2010)]。

### (3) 新規遺伝子を標的とした *in vivo* 機能解析

標的遺伝子に対する siRNA の最適配列をマウスの肝初代培養細胞を用いて評価した。市販の Transfection 試薬を用いて siRNA を導入したところ、最適配列は10nM という低濃度で85%程度のノックダウン効果を示した。この siRNA を病態マウスの肝臓に導入し、この遺伝子のノックダウン効果を評価したと

ころ、ネガティブコントロール siRNA 投与群と比較して投与3日後に92%のノックダウンが確認された。そしてそのときの血糖値は有意な減少傾向を示していた。更に体重増加率が有意に減少していたことから、この新規遺伝子は2型糖尿病の予防・治療標的遺伝子のみならず、肥満治療薬としても期待が持てると考えられる。これまでにこの遺伝子の in vivo 機能解析はほとんど行われておらず、非常にインパクトが高い結果だと考えられる。

#### 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 2 件)

1. Hayashi Y, Kajimoto K, Iida S, Sato Y, Mizufune S, Kaji N, Kamiya H, Baba H, Harashima H. DNA microarray analysis of whole blood cells and insulin-sensitive tissues reveals the usefulness of blood RNA profiling as a source of markers for predicting type 2 diabetes. *Biol. Pharm. Bull.* 33(6):1033-42 (2010). (査読有)

2. Yamauchi J, Hayashi Y, Kajimoto K, Akita H, Harashima H. Comparison between a multifunctional envelope-type nano device and lipoplex for delivery to the liver. *Biol. Pharm. Bull.* 33(5):926-9 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. 林泰弘、水野諒一、Khalil Ikramy、原島秀吉. R8 ペプチドを用いた肝臓への遺伝子送達システムの構築、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日～31 日、静岡

2. J. Yamauchi, Y. Hayashi, K. Kajimoto, H. Akita, H. Harashima. “The usefulness of multifunctional envelope-type nano device for gene delivery to the liver” The 8<sup>th</sup> International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Sep1-2, 2010. Sapporo, Japan

3. M. Ukawa, H. Akita, T. Masuda, Y. Hayashi, T. Konno, K. Ishihara, H. Harashima. “Analysis of Intracellular Trafficking of MPC-Coated Multifunctional Envelope-Type Nano Device (MPC-MEND)

in Isolated Hepatocyte” The 8<sup>th</sup> International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Sep1-2, 2010. Sapporo, Japan

4. Y. Hayashi, J. Yamauchi, H. Akita, T. Masuda, M. Ukawa, T. Konno, K. Ishihara, H. Harashima. “Modification of biocompatible polymers and endosomal escape device can go up liver gene expression and prevent immune response” International liposome research days & lipids liposomes & membrane biophysic. Aug4-8, 2010. Vancouver, Canada

5. J. Yamauchi, Y. Hayashi, K. Kajimoto, H. Akita, H. Harashima. “Comparison between a multifunctional envelope-type nano device and lipoplex to the liver” International liposome research days & lipids liposomes & membrane biophysic. Aug4-8, 2010. Vancouver, Canada

6. 鶴川真実、秋田英万、増田智也、林泰弘、金野智浩、石原一彦、原島秀吉. マウス肝ブライマリー細胞における多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)のMPCポリマー修飾による遺伝子発現活性上昇メカニズムの解明、第26回日本DDS学会、2010年6月17日～18日、大阪

7. 山内順、林泰弘、梶本和昭、秋田英万、原島秀吉. ナノキャリアと Lipoplex における肝臓への遺伝子デリバリーの比較. 遺伝子・デリバリー研究会 第10回シンポジウム、2010年6月2日～3日、札幌

8. 鶴川真実、秋田英万、増田智也、林泰弘、金野智浩、石原一彦、原島秀吉. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体のMPCポリマー修飾による肝実質細胞における遺伝子発現活性上昇のメカニズムの解明. 遺伝子・デリバリー研究会 第10回シンポジウム、2010年6

月 2 日～3 日、札幌

9. M. Ukawa, H. Akita, T. Masuda, Y.

Hayashi, T. Konno, K. Ishihara, H.

Harashima. “Analysis of Intracellular

Trafficking of MPC-Coated Multifunctional

Envelope-Type Nano Device (MPC-MEND)

in Isolated Hepatocyte” The 13<sup>th</sup> Annual

Meeting of the American Society of Gene

and Cell Therapy May 19-22, 2010.

Washington, DC, USA

10. 山内順、林泰弘、梶本和昭、秋田英万、

原島秀吉. 肝臓への遺伝子デリバリーにお

けるナノキャリアと Lipoplex の比較. 日本

薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12 日～14

日、徳島

11. 林泰弘、山内順、秋田英万、増田智也、

鶴川真実、金野智浩、石原一彦、原島秀吉.

MPC ポリマー修飾 GALA-MEND による肝

臓での遺伝子発現上昇と免疫応答の軽減. 日

本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12 日～

14 日、徳島

12. 山内順、林泰弘、梶本和昭、秋田英万、

原島秀吉. 肝臓への遺伝子導入における多機

能性エンベロープ型ナノ構造体の有用性の

検証. 第 134 回薬学会北海道支部例会、2010

年 5 月 8 日～9 日、札幌

13. 鶴川真実、秋田英万、増田智也、林泰弘、

金野智浩、石原一彦、原島秀吉. 多機能性エ

ンベロープ型ナノ構造体の MPC ポリマー修

飾による遺伝子発現活性上昇機構の解明. 第

134 回薬学会北海道支部例会、2010 年 5 月 8

日～9 日、札幌

14. 鶴川真実、秋田英万、増田智也、林泰弘、

金野智浩、石原一彦、原島秀吉. 多機能性エ

ンベロープ型ナノ構造体の MPC ポリマー修

飾による遺伝子発現活性上昇メカニズムの

解明. 第 130 回日本薬学会、2010 年 3 月 28

日～30 日、岡山

15. 林泰弘、梶本和昭、飯田慎也、加地範匡、

高崎一朗、田渕圭章、紙谷浩之、馬場嘉信、

原島秀吉. 2 型糖尿病の発症を予測するマー

カーとしての白血球遺伝子発現プロファイル

の有用性の検証. 第 52 回日本糖尿病学会

年次学術集会、2009 年 5 月 24 日、大阪

16. 高橋恭平、林泰弘、梶本和昭、飯田慎也、

加地範匡、紙谷浩之、馬場嘉信、原島秀吉.

DNA マイクロアレイ解析による 2 型糖尿病

遺伝子治療を可能とする新規標的遺伝子の

探索. 日本薬剤学会第 24 年会、2009 年 5 月

21 日—5 月 23 日、静岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 2 型糖尿病診断剤

発明者 : 原島秀吉、林泰弘、紙谷浩之、梶本

和昭、馬場嘉信、加地範匡

権利者 : 国立大学法人北海道大学、国立大学

法人名古屋大学

種類 :

番号 : 特願 2009-125826

出願年月日 : 2009 年 4 月 28 日

国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 泰弘 (HAYASHI YASUHIRO)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号 : 30548178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし