

## 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25年 5月 14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390165

研究課題名（和文）難治性呼吸器疾患に対する経気道的粉末製剤投与による核酸治療及び分子標的治療の開発

研究課題名（英文）Trial to suppress gene expression in airway by intratracheal administration of dry-powdered siRNA

研究代表者

服部 登（HATTORI NOBORU）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00283169

研究成果の概要（和文）：

低分子キトサン/siRNA 複合体乾燥微粒子製剤の経気道投与による遺伝子抑制について評価を行う目的で、Green fluorescent protein (GFP)を標的とした低分子キトサン/GFP siRNA 複合体乾燥微粒子製剤、及びGFPを強制発現させたLewis Lung Carcinoma細胞(LLC-GFP)を準備した。同製剤をGFPトランスジェニックマウス及びLLC-GFP肺転移マウスに対し経気道投与後し肺組織切片の蛍光輝度を測定したところ、気管支、細気管支、肺胞上皮、LLC-GFP肺転移腫瘍におけるGFP蛍光の抑制をみとめた。

このことから、低分子キトサンはsiRNAの肺内送達に適したキャリアであり、本製剤は様々な肺疾患において特定の遺伝子発現を抑制する有用な手段と成りうることを示された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we tried to determine whether intratracheal administration of dry powdered low-molecular-weight chitosan (LMWC)/siRNA complexes suppressed gene expression in murine lung. Dry powdered LMWC/siRNA targeting green fluorescent protein (GFP-siRNA) and Lewis lung carcinoma cells stably expressing GFP (LLC-GFP) were prepared. Dry powdered LMWC/GFP-siRNA complex was intratracheally administered to GFP transgenic mice and the C57BL/6 mice carrying lung metastatic tumors consisting of LLC-GFP cells. The fluorescence intensity in the lung tissue sections was analyzed with a fluorescence microscope. Intratracheal administration of dry powdered LMWC/GFP-siRNA complex was found to suppress the fluorescence level of bronchi, bronchiole, alveoli, and metastatic lung tumors consisting of LLC-GFP cells.

The results of the present study suggest that LMWC is an effective carrier for siRNA delivery to the lung, and dry powdered LMWC/siRNA complexes may become a promising tool to knock-down a specific gene expression in various lung diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：RNA干渉，GFP，吸入療法

### 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉とは、1988年に発表された二本鎖RNAによる配列特異的な遺伝子発現抑制システムであり、この発見には2006年ノーベル生理学賞が授与された。このシステムの応用は生物科学における重要な研究手段の一つとなったが、近年核酸医薬として難治性疾患に対する新規治療法を開発する動きが高まっている。実際米国では加齢黄斑変性症や悪性黒色腫への治療応用を試みる臨床試験も始まったが、RNA干渉による遺伝子抑制効果はそれを引き起こすsiRNAが存在する細胞に限局するものであることから、標的臓器や細胞への送達手段が必要となり、この克服が治療応用への鍵を握っているといえる。呼吸器疾患に対するsiRNAの治療応用の手段としては、呼吸器が気道を通して外界と交通していることを利用して経気道投与方法が検討されている。しかしながら、siRNAは溶液中での安定性が低く、またネブライザーを使用した場合には液滴の微細化の過程で分解されるため、現在臨床で広く用いられている加圧式定量噴霧や超音波ネブライザーを利用することは困難であった。

### 2. 研究の目的

そこで、今回この問題を解決するため、名城大学薬学部の協力のもと、低分子キトサンをベクターとしたsiRNA/低分子キトサン複合体乾燥微粒子製剤を作製した。

本研究の目的は、本製剤の経気道投与により、実際に肺組織のどの部位において遺伝子抑制効果を示すのかを検証するものである。

### 3. 研究の方法

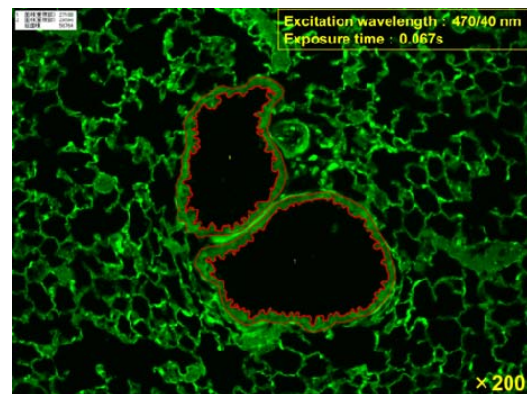
実験材料として、全身細胞にGFPによる蛍光を発しているC57BL/6-Tag(CAG-EGFP)マウス(GFPトランスジェニックマウス)、GFPを恒常的に発現しているマウス肺癌細胞株Lewis Lung Carcinoma (GFP-LLC)、そしてGFPに対

するsiRNA(GFP-siRNA)を用いた低分子キトサン/GFP siRNA複合体乾燥微粒子製剤を準備した。

#### 【実験①】

6~8週齢のfemale WT C57BL/6マウス及びGFPトランスジェニックマウスを、薬剤投与を行わないWTマウス、薬剤投与を行わないGFPトランスジェニックマウス、低分子キトサン/Control siRNA複合体乾燥微粒子製剤を気道投与するGFPトランスジェニックマウス、低分子キトサンGFPsiRNA複合体微粒子製剤を気道投与するGFPトランスジェニックマウスの4群に分割し、薬剤投与を行う2群に対してday 1, 3, 5, に1.5 mgのsiRNA微粒子製剤を非侵襲的に気道投与を行った。Day 7に肺を摘出し固定の後、パラフィン包埋した。これら全肺を5 $\mu$ m切片に薄切し、200枚毎に1枚を抽出しサンプルとした。サンプル切片は脱パラフィン処理後に蛍光退色阻止剤で封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。各スライド上で観察される全ての気道上皮を撮影し、グレースケール画像を作成。蛍光顕微鏡付属のソフトを用いて気道上皮の領域を抽出し、その領域の輝度積算値を領域面積で割り算し、気道上皮の平均輝度を算出して、上記4群間での比較を行った。(Figure 1)

Figure 1 気道上皮の抽出・計測

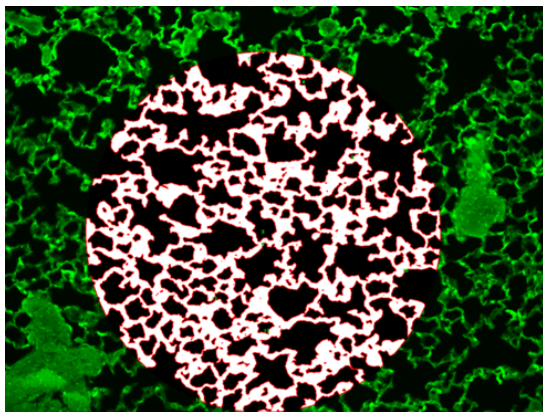


また、同様の処理にて作製したパラフィン包埋肺組織を5 $\mu$ m切片に薄切し、600枚毎に1枚をサンプルとして採取。脱パラフィン処理後に蛍光退色阻止剤で封入した。

作製した切片をランダム化、ブラインド化した後に蛍光顕微鏡で撮影し、サンプルスライド毎に肺泡領域からランダムに4か所の円形領域を設定した。同領域中、共通に設定した蛍光閾値以上の輝度を示す領域を肺泡領域として顕微鏡付属ソフトを用いて抽出し、輝度積算値を領域面積で割り算を行い、平均輝度を算出。上記4群間での比較を行った。

(Figure 2)

Figure 2 肺泡領域の抽出・計測



【実験②】

対数増殖期にある LLC-EGFP を PBS で  $10 \times 10^6$ /ml の細胞浮遊液とし、6~8週齢の C57BL/6 マウスに対して 100  $\mu$ l 尾静脈注射を行い、肺転移モデルを作製した。

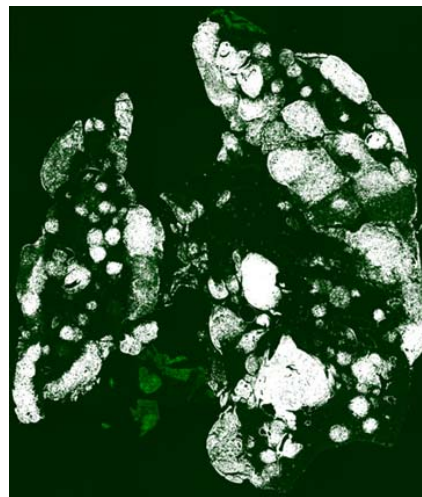
これらマウスを、GFP siRNA 投与群、Control siRNA 投与群、製剤非投与群の3群に分割した。siRNA 乾燥微粒子製剤投与群において day10, day12 に1匹当たり 1mg を非侵襲的に気道投与した。Day14 に肺を摘出、固定後に OCT 包埋・凍結し、その後 20  $\mu$ m 凍結切片を作製し退色防止剤で封入した。

マウス1匹ごとにランダムに10スライドをサンプルとして採用し、蛍光顕微鏡にて全て同一撮影条件でグレースケール画像を撮影

した。

腫瘍組織由来の蛍光を検出するため、蛍光を発する腫瘍組織部分は抽出され正常肺組織はほとんど抽出されないよう共通の閾値を設定した。顕微鏡付属のソフトを用いてこの閾値以上の輝度を示す領域を抽出し、輝度積算値を領域面積で割り算して、平均輝度を算出、上記3群間での比較を行った。(Figure 3)

Figure 3 腫瘍組織の抽出・計測



4. 研究成果

【実験①】

設定した4群の、気管支上皮、細気管支上皮、肺泡領域の蛍光輝度を比較したが、Control siRNA 投与群、製剤無投与群と比較して、GFP siRNA 投与群において有意な蛍光の抑制を認めた。(Figure 4, 5, 6)

Figure 4 気管支領域の平均輝度

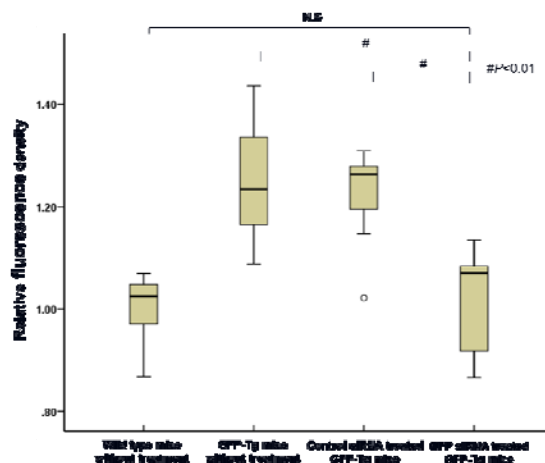


Figure 5 細気管支領域の平均輝度

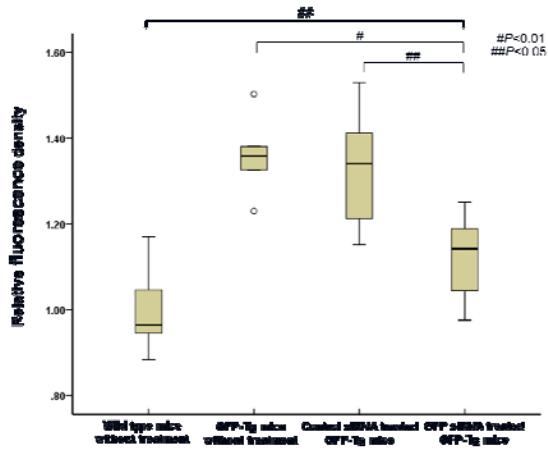
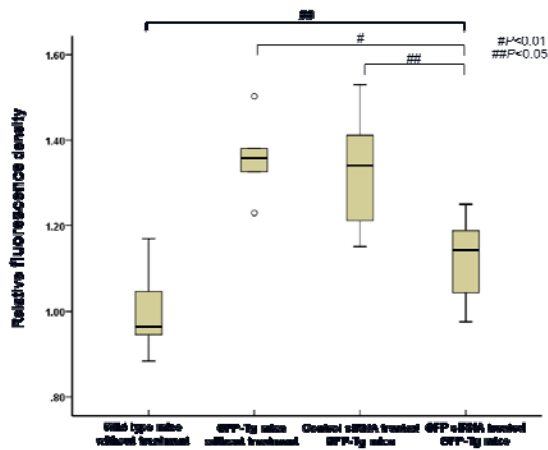


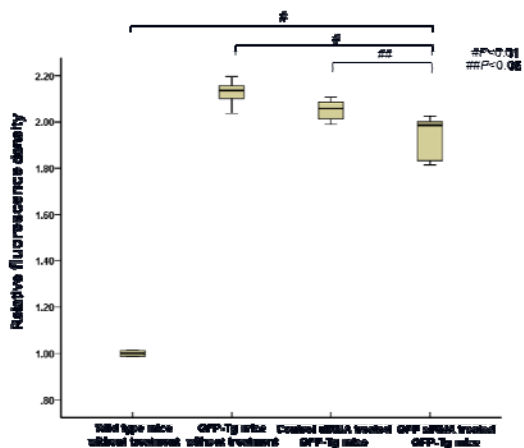
Figure 6 肺泡領域の平均輝度



【実験②】

上記3群間のうち、GFP siRNA 微粒子製剤投与群において、他2群と比較し肺転移腫瘍の平均蛍光輝度の有意な抑制を認めた。(Figure 7)

Figure 7 肺転移腫瘍の平均輝度



このことから、低分子キトサン/GFP siRNA 複合体乾燥微粒子製剤の経気道投与は、肺転移腫瘍においても GFP 発現を抑制可能であることが示された

本研究では、我々は低分子キトサンを非ウイルスベクターとして siRNA 低分子キトサン複合体の乾燥微粒子製剤を作製し、in vivo での経気道投与を行った。

In vivo での siRNA 経気道投与の報告はこれまでもみられ、本製剤以外にも様々な siRNA 製剤が、溶液の点鼻投与、ネブライザー投与などを用いて行われている。

しかし、これら報告で用いられた siRNA 製剤は潜在的に siRNA の不安定性や剤型に起因する分解・損失や、ベクターによる副反応などの問題を抱えており、将来的な臨床応用には克服すべき課題が多い。

そこで核酸送達機能や分解酵素からの保護機能を有しながら、他の核酸送達ベクターと比較して天然由来素材で生体適合性が高く、生分解性で低毒性とされる chitosan をベクターに用い、コスト・利便性・保存安定性に優れた乾燥微粒子製剤とすることで、これらの問題を克服出来る可能性があると考えている。我々の知る限り、本研究の如く siRNA 微粒子製剤を in vivo で気管内へ反復投与を行った報告これまで無い。

またこれまで siRNA 気道投与による遺伝子抑制の評価方法として、in vivo imaging system などによる体外からの蛍光・発光を計測する方法や、肺ホモジネートを用いたウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法などが用いられてきた。しかしこれら手法は肺全体としての遺伝子発現抑制を間接的に評価するには優れるが、気道、肺泡、肺腫瘍といった肺組織局所毎での評価を行う事は出来ない。

そこで、本研究では肺組織切片において morphometric な手法を用いることにより、初めて気管支、細気管支、肺胞、肺内腫瘍といった肺組織局所毎での本製剤の遺伝子抑制機能について定量的することに成功した。その結果、低分子キトサン/siRNA 複合体乾燥微粒子製剤の経気道投与は、気道上皮のみならず肺胞領域や肺腫瘍組織においても遺伝子抑制効果を認め、その抑制効果は気道上皮、とくに中枢側の気管支領域でより高いことが示された。

この結果から、将来的な本製剤の臨床応用においては、特に気管支喘息や COPD など気道性疾患に最も有効と考えられ、それ以外の間質性肺炎などの肺実質疾患や腫瘍性疾患に対しても有効性が期待される。疾患の性質を限定することなく呼吸器疾患全般に対する適応の可能性が示された点でも、同製剤は呼吸器疾患治療薬として非常に有望であると言える。

今後、疾患モデルに対する治療介入研究を検討してゆく方針である。

## 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 20 件)

1. Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, Onari Y, Iwamoto H, Kanehara M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N. Intra-airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor-1 attenuates allergic asthma in mice. (査読有) Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011; 301: L908-L916.
2. Okamoto H, Shiraki K, Yasuda R, Danjo K, Watanabe Y. Chitosan-interferon- $\beta$  gene complex powder for inhalation treatment of lung metastasis in mice. (査読有) J Control Release 2011;

150:187-195.

3. Mohri K, Okuda T, Mori A, Danjo K, Okamoto H. Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation. (査読有) J Control Release 2010; 144: 221-226.
4. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. (査読有) Thorax 2010; 65: 334-340.

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 登 (HATTORI NOBORU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00283169

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

岡本 浩一 (OKAMOTO HIROKAZU)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：00308941