

## 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 22 日現在

機関番号：23803  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790045  
 研究課題名（和文） 先端的がん治療に向けた全身投与型 siRNA デリバリーシステムの開発  
 研究課題名（英文） Systemic delivery system of siRNA for cancer treatment  
 研究代表者  
 浅井 知浩（ASAI TOMOHIRO）  
 静岡県立大学大学院薬学研究科・准教授  
 研究者番号：00381731

## 研究成果の概要（和文）：

small interfering RNA (siRNA) を始めとする核酸医薬品シーズの実用化に期待が高まる中、最大の鍵となっているのがデリバリーシステムの開発である。本研究では、末端を化学修飾した siRNA とポリカチオンリポソームから形成される安定なナノ粒子を開発し、がん治療研究への応用展開を試みた。インビボにおいて新規ナノ粒子を用いて siRNA を腫瘍へ送達し、がんの進行に関与する mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナルを抑制したところ、有意ながん治療効果が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

RNA interference effectors such as small interfering RNA (siRNA) are promising therapeutic tools for treating cancer. A practical and applicable delivery system is required to deliver enough of the therapeutic RNA to target tissues. In this study, we developed novel lipid nanoparticles carrying cholesterol-grafted siRNA for RNAi-based cancer therapy. Inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling with siRNA systemically delivered by the lipid nanoparticles resulted in tumor suppression *in vivo*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム、small interfering RNA、がん治療

## 1. 研究開始当初の背景

small interfering RNA (siRNA) 医薬品の開発においては、siRNA が生体内で速やかに分解されることや細胞膜をほとんど透過しな

いことなどから、siRNA デリバリーシステムの開発が医薬品開発の成否の鍵を握っている側面がある。生体において標的組織に必要な量の siRNA を送達し、十分な治療効果を得る

には、siRNA ベクターの導入効率、安定性、細胞選択性、安全性等に高いクオリティーが要求される。

そこで申請者は、siRNA の医療応用を念頭におき、siRNA 導入ベクターとしてポリカチオンリポソーム (polycation liposomes; PCL) の開発を進めてきた。PCL の開発コンセプトは、機能性高分子であるポリカチオンの研究領域とリポソーム DDS の研究領域の融合によって、独創的かつ高導入効率の核酸導入キャリアを創成するところにある。PCL は、ポリカチオン部分に由来する強力なプロトンスポンジ効果とリポソーム特有の膜融合効果を併せ持つ機能的な核酸導入ベクターであり、これまでも論文や学会等でその研究成果を多数報告してきた。近年では、PCL のポリカチオン部分について siRNA 導入に適した化学構造を探索し、新しい素材の開発を進めてきた。その中で新規ポリカチオン脂質 dicetyl phosphate-tetraethylene pentamine (DCP-TEPA) を含む PCL (TEPA-PCL) に高い導入活性を見出し、siRNA 等の核酸導入に有用な新素材として DCP-TEPA 等の複数の新規化合物を特許出願するに至った。

本研究課題は、これまでの研究成果を発展させる形で、siRNA 全身投与によるがん治療を実現しうる新規 siRNA デリバリーシステムの構築を目指すものである。化学修飾 siRNA を用いた新規ナノ粒子の調製により、*in vivo* における安定性および導入効率の向上を図る。siRNA 末端の化学修飾は比較的容易であるうえ、RNA 干渉の活性を保持したまま siRNA の安定性向上や細胞への取り込み促進に繋がる化学修飾が知られている。これまでの様々な化学修飾に関する研究は、siRNA 自体の安定性の向上、ひいては活性の向上を目的としたものであるが、本研究ではナノ粒子の安定化を目的として siRNA に化学修飾を施す。これまでも siRNA のような短鎖の核酸は、プラスミド DNA のような長鎖の核酸と比較して生体内でカチオン性キャリアから乖離しやすいことをノースウエスタン大学の R.C. MacDonald 博士を始めとした複数の研究者が指摘していた。実際、例えばノースカロライナ大学の Leaf Huang 博士は、脂質とポリカチオンと DNA から構成される LPD というナノ粒子を siRNA デリバリーに応用しているが、DNA はナノ粒子に siRNA を安定に保持させる目的で添加している。実際に申請者らのこれまでの研究においても、ナノ粒子の PEG 修飾工程で siRNA が PCL から乖離してしまう現象が観察されていた。そこで、本研究課題においては、添加剤を用いることなく、siRNA の化学修飾によってナノ粒子を安定化し、全身投与型の新しい siRNA デリバリーシステムの構築を試みる。このような研究アプローチは、がんに対する RNA 干渉療

法の開発に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、生体内における全身投与型 siRNA ベクターの安定性および導入効率の向上を目的とし、siRNA の化学修飾技術を応用した斬新な脂質ナノ粒子の開発を行う。siRNA の化学修飾は、siRNA のセンス鎖 3' 末端にコレステロールを共有結合によって付加する。化学修飾 siRNA を TEPA-PCL に搭載後、ポリエチレングリコール (PEG) および標的化リガンドを用いてナノ粒子表面を修飾することにより、全身投与型 siRNA ベクターを調製する。培養細胞における RNA 干渉効果、インビボ蛍光イメージングシステムによる siRNA 体内動態の解析を実施し、新規ナノ粒子の有用性を評価する。さらに siRNA 体内動態の定量的解析を実施し、バイオアベイラビリティやがんへの集積性を評価する。ルシフェラーゼ強制発現がん細胞をマウスに移植したモデルにおいて、mammalian target of rapamycin (mTOR) に対する siRNA のがん治療効果を評価する。セリン・スレオニンキナーゼの一種である mTOR は、細胞周期の進行、血管新生などに関与することが知られている。RNA 干渉法による mTOR ノックダウンは、ラパマイシン感受性が高い PTEN 欠損細胞のみならず、ラパマイシンに耐性を示す PTEN 陽性細胞に対しても増殖抑制を示す可能性がある。そこで mTOR を標的とした腫瘍 RNA 干渉療法の開発を目的とし、mTOR に対する siRNA (simTOR) のがん細胞および新生血管内皮細胞への選択的デリバリーを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 化学修飾 siRNA を用いた新規ナノ粒子の開発

ポリカチオンリポソーム (TEPA-PCL) にコレステロール結合型 simTOR を搭載後、生体内における安定性維持のためにポリエチレン PEG を TEPA-PCL 表面に修飾したナノ粒子 (PEG-TEPA-PCL) を調製した。さらに、標的能を付与することを目的とし、VEGF receptor-1 (VEGFR1) に対して結合性を示すペプチド Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) を PEG 先端に結合した APRPG-PEG を TEPA-PCL 表面に修飾したナノ粒子 (APRPG-TEPA-PCL) を調製した。すべてのナノ粒子は粒子径 100-150 nm となるように調製し、各実験に用いた。粒子径はゼータサイザーナノ ZS を用いて測定した。

(2) 新規ナノ粒子を用いた培養細胞への siRNA 導入

腫瘍新生血管ならびにがんを標的とした RNA 干渉療法について検討するにあたり、マウス内皮細胞様細胞株である 2H-11 細胞、マ

ウスメラノーマ細胞株である B16F10 細胞を実験に用いた。はじめに 2H-11 細胞および B16F10 細胞における VEGFR1 および PTEN の発現をウエスタンブロッティング法によって確認した。コレステロール結合型 simTOR を APRPG-TEPA-PCL あるいは PEG-TEPA-PCL を用いてそれぞれの細胞に導入し、RNA 干渉試験、細胞増殖抑制試験、Akt (ser473) のリン酸化アッセイ、また 2H-11 細胞においてのみ管腔形成試験を実施した。これらの試験においては、対照としてラパマイシン処理による阻害効果についても検討した。

### (3) 担がん動物における RNA 干渉療法の評価

B16F10 細胞あるいはルシフェラーゼを恒常的に発現する B16F10 細胞 (B16F10-luc2 細胞) を C57BL6 マウスの肺に移植し、肺転移モデルを作成した。<sup>3</sup>H 標識 TEPA-PCL あるいは近赤外蛍光色素 Alexa750 標識 siRNA を用いてナノ粒子製剤を調製し、TEPA-PCL および siRNA の体内動態を解析した。3H 標識 TEPA-PCL の測定には液体シンチレーションカウンタを用い、Alexa750 標識 siRNA の測定には蛍光インビボイメージングシステムを用いた。さらに、肺転移モデルマウスを用いたがん治療実験を実施した。APRPG-TEPA-PCL あるいは PEG-TEPA-PCL を用いてコレステロール結合型 simTOR (2 mg/kg) を B16F10-luc2 肺転移モデルマウスに尾静脈内投与した。肺における腫瘍成長の様子は発光インビボイメージングを用いてモニタリングし、最終的には解剖後に肺重量を測定することで simTOR の治療効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 化学修飾 siRNA を用いた新規ナノ粒子の開発

siRNA のセンス鎖 3'末端にコレステロールを結合することによって TEPA-PCL と siRNA の複合体が安定化することを電気泳動法で証明した。コレステロール結合によって siRNA の活性が低下しないことは、レポーター遺伝子を用いたノックダウン実験で確認した。ナノ粒子の粒子径は、コレステロールの有無で変化せず、約 100-150 nm であった。そこで、APRPG-TEPA-PCL にコレステロール結合 simTOR を封入した新規ナノ粒子を調製し、以下の実験を実施してその有用性を検討した。

### (2) 新規ナノ粒子を用いた培養細胞への mTOR 導入

ウエスタンブロッティング法によって VEGFR1 と PTEN の発現を調べた結果、2H-11 細胞および B16F10 細胞において両分子の発

現が認められた。VEGFR1 の発現は APRPG ペプチドによって標的化が可能な細胞であることを示唆しており、また PTEN 発現はラパマイシン耐性細胞であることを示唆している。APRPG-TEPA-PCL あるいは PEG-TEPA-PCL を用いてコレステロール結合型 simTOR を導入したところ、2H-11 細胞および B16F10 細胞の両細胞において mTOR の mRNA およびタンパク質の発現を特異的に抑制した。APRPG-TEPA-PCL は、PEG-TEPA-PCL と比較して、効率的に遺伝子ノックダウンを誘導した。Fig. 1 には 2H-11 細胞における mTOR タンパク質抑制の結果を示した。

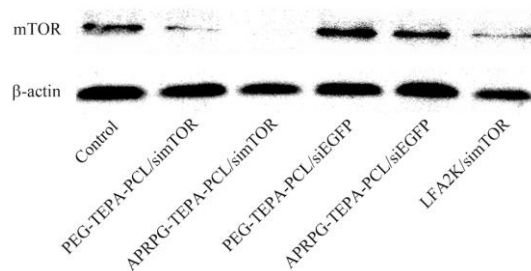


Fig. 1. mTOR knockdown by simTOR transfection with TEPA-PCL-based vectors.

2H-11 cells were seeded at the density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 6-well plates. Twenty-four hours after the seeding, each siRNA sample was added. Total protein was extracted from 2H-11 cells at 72-h post-transfection, and 10  $\mu$ g total protein was separated by SDS-PAGE. Western blotting was performed with anti-mTOR rabbit polyclonal antibody or anti- $\beta$ -actin rabbit polyclonal antibody.

mTOR ノックダウンによる細胞増殖抑制効果について試験を実施した。遊離のラパマイシンは 2H-11 細胞および B16F10 細胞の両細胞において細胞増殖抑制効果を示さず、Akt (ser473) のリン酸化が確認された。対照的に、APRPG-TEPA-PCL あるいは PEG-TEPA-PCL を用いてコレステロール結合型 simTOR を導入した両細胞においては、有意な細胞増殖抑制効果が得られ、Akt (ser473) のリン酸化を阻害していた。Akt (ser473) のリン酸化はラパマイシン耐性に関与することが知られており、mTOR ノックダウンはラパマイシン耐性細胞に対しても細胞増殖抑制効果を示すことが示唆された。さらに、コレステロール結合型 simTOR の導入によって 2H-11 細胞の管腔形成が顕著に阻害されることが明らかになった (Fig. 2)。一方、ラパマイシンは 2H-11 細胞の管腔形成を阻害しなかった。

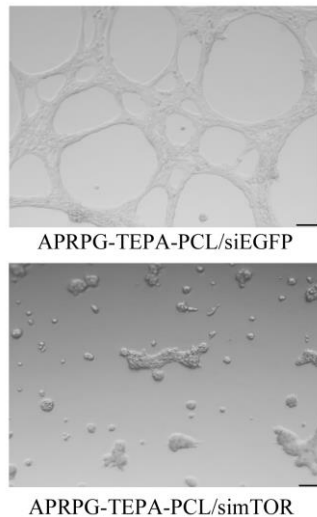


Fig. 2. Effect of mTOR knockdown on tube formation of 2H-11 cells.

Tube formation assay was performed by using 2H-11 cells transfected with simTOR or siEGFP. The transfected cells were collected at 24-h post-transfection or incubation and then incubated on Matrigel at 37°C for 6 h.

### (3) 担がん動物における RNA 干渉療法の評価

B16F10 細胞の肺転移モデルマウスにおいて、<sup>3</sup>H 標識 TEPA-PCL の投与 24 時間後の体内分布を測定した。その結果、肺転移モデルマウスにおいて、PEG-TEPA-PCL/siRNA および APRPG-TEPA-PCL/siRNA は、正常マウスに投与した場合と比較して有意に高い肺集積性を示した。さらに、APRPG-TEPA-PCL/siRNA は、PEG-TEPA-PCL/siRNA と比較して有意に高く肺に集積した。次に、siRNA の体内動態を解析するため、Alexa750 標識 siRNA を用い、PEG-TEPA-PCL/siRNA、APRPG-TEPA-PCL/siRNA の体内動態を近赤外蛍光インビボイメージング法にて解析した。その結果、投与 24 時間後の肺転移モデルマウスにおいて、APRPG-TEPA-PCL/siRNA は、PEG-TEPA-PCL/siRNA と比較して顕著な肺集積を示す様子が観察された。したがって、APRPG-TEPA-PCL を siRNA ベクターとして用いることにより、肺転移巣へのアクティブターゲティングが可能であることが示唆された。そこで、肺転移モデルマウスを用いたがん治療実験を実施した。APRPG-TEPA-PCL を用いて全身投与したコレステロール結合型 simTOR は、対照 siRNA を搭載した APRPG-TEPA-PCL 投与群やラパマイシン投与群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を

示した。したがって、肺転移モデルにおいて、mTOR ノックダウンがラパマイシン耐性がんの治療法として有効であることが示唆された。

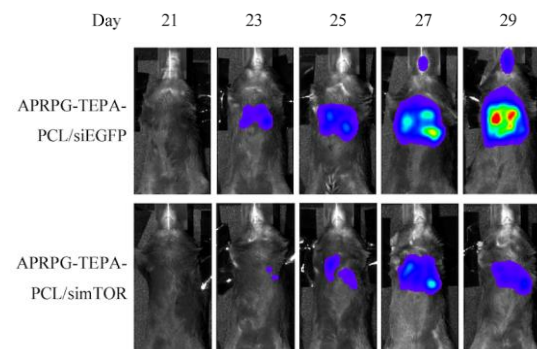


Fig. 3. Therapeutic effect of simTOR delivered with APRPG-TEPA-PCL in tumor-bearing mice.

B16F10-Luc2 cells ( $1.0 \times 10^5$  cells/mouse) were injected via a tail vein into 5-week-old C57BL6 male mice. Each formulation of siRNA (siRNA; 2 mg/kg) was intravenously injected at day 18, 21, 24, and 27 after the tumor cell injection. Luciferase activity in the tumor-bearing mice was monitored with IVIS on days 21, 23, 25, 27, and 29.

以上より、simTOR 全身投与による腫瘍 RNA 干渉療法の有効性が示唆されるとともに、化学修飾 siRNA を用いたナノ粒子設計の有用性がインビボにおいて証明された。

### 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 17 件)

- 1) Ando H, Okamoto A, Yokota M, Shimizu K, Asai T, Dewa T, Oku N: Development of miR-92a delivery system for antiangiogenesis-based cancer therapy. *J. Gene Med.* **15**, 20-27 (2013) 査読有. DOI: 10.1002/jgm.2690
- 2) Honda M, Asai T, Oku N, Araki Y, Tanaka M, Ebihara N: Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. *Int J Nanomedicine* **8**, 495-504 (2013) 査読有. DOI: 10.2147/IJN.S30725
- 3) Ishii T, Asai T, Fukuta T, Oyama D, Yasuda N, Agato Y, Shimizu K, Minamino T, Oku N: A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral

- ischemia/reperfusion. *Int. J. Pharm.* **439**, 269-274 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.026
- 4) Koide H, Asai T, Kato H, Ando H, Shiraishi K, Yokoyama M, Oku N: Size-dependent induction of accelerated blood clearance phenomenon by repeated injections of polymeric micelles. *Int. J. Pharm.* **432**, 75-79 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.049.
- 5) Tokutomi K, Tagawa T, Korenaga M, Chiba M, Asai T, Watanabe N, Takeoka S, Handa M, Ikeda Y, Oku N. Ability of fibrinogen  $\gamma$ -derived dodecapeptides with different sequences to bind to rat platelets. *Int J Pharm.* **438**, 296-301 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.016
- 6) Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N: Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J. Control. Release* **160**, 81-87 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.02.004
- 7) Yonenaga N, Kenjo E, Asai T, Tsuruta A, Shimizu K, Dewa T, Nango M, Oku N: RGD-based active targeting of novel polycation liposomes bearing siRNA for cancer treatment. *J. Control. Release* **160**, 177-181 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.004
- 8) Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T: Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J. Control. Release* **160**, 274-280 (2012) 査読有. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.010
- 9) Ogata M, Yano M, Umemura S, Murata T, Park EY, Kobayashi Y, Asai T, Oku N, Nakamura N, Matsuo I, Usui T: Design and synthesis of high-avidity tetravalent glycoclusters as probes for sambucus sieboldiana agglutinin and characterization of their binding properties. *Bioconjug. Chem.* **23**, 97-105 (2012) 査読有. DOI: 10.1021/bc200440e
- 10) Asai T, Matsushita S, Kenjo E, Tsuzuku T, Yonenaga N, Koide H, Hatanaka K, Dewa T, Nango M, Maeda N, Kikuchi H, Oku N: Dicyclic phosphate-tetraethylenepentamine-based liposomes for systemic siRNA delivery. *Bioconjug. Chem.* **22**, 429-435 (2011) 査読有. DOI: 10.1021/bc1004697

他 7 件

[学会発表] (計 30 件)

- 1) 浅井知浩：脂質ナノ粒子を用いた腫瘍新生血管への核酸・薬物デリバリー。日本薬学会第133年会(横浜)，一般シンポジウム，2013年3月30日
- 2) 浅井知浩、奥 直人：脂質ナノ粒子を用いた small RNA デリバリー。創剤カンファレンス静岡(静岡)、講演要旨集、p.24、2012年12月14日
- 3) Tomohiro Asai, Naoto Oku: Targeted delivery of small interfering RNA with RGD-decorated polycation liposomes for cancer therapy. (Invited speaker) Oligonucleotide Delivery: Biology, Engineering and Development (Hernstein, Austria) Session IV #4、2012年10月9日
- 4) 浅井知浩：siRNA イメージング技術の開発とデリバリーシステム研究への応用(奨励賞受賞講演)第58回日本薬学会東海支部総会・大会(静岡)、講演要旨集、p.17、2012年7月7日

他 26 件

[図書] (計 2 件)

- 1) Koide H, Asai T, Shimizu K, Oku N: Drug carrier systems for anticancer agents. *Polymeric Biomaterials*, 2, chapter 6, 153-170 CRC Press (2013)
- 2) Dewa T, Asai T, Oku N, Nango M: Polyamine-lipid conjugates as effective gene carriers: chemical structure, morphology, and gene transfer activity. *Non-Viral Gene Therapy*, 243-266 In Tech (2011)

[その他]

ホームページ等

Publications & Awards

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/mbc/Publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)

静岡県立大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：00381731