

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590059

研究課題名(和文) siRNAの肺組織内動態とRNA干渉能に基づく吸入用微粒子製剤処方の最適化

研究課題名(英文) Fate of siRNA in the lungs and optimization of siRNA inhalant formulation based on RNA interference effect

研究代表者

岡本 浩一 (OKAMOTO, Hirokazu)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：00308941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAのセンス鎖をCy5.5で標識することにより、siRNAのRNA干渉能に影響を与えることなく体内動態を追跡できるCy5.5-siRNAを開発した。ベクターを添加することで未添加時に比べてsiRNAの肺内滞留性が増加し、全身移行が抑制できることが示された。また、肺局所投与により、全身投与に比べてはるかに少ない量のsiRNAで肺局所RNA干渉効果が得られた。Cy5.5-siRNAの生体内安定性に関しては、今回新たにPCI混合溶液を用いてsiRNAとCy5.5を分離後電気泳動する手法を確立した。これらの成果は、siRNAの体内動態に基づいた製剤処方最適化に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed Cy5.5-siRNA, that enable us to trace the fate of siRNA in a body without affecting its RNA interference effect. Adding a vector to siRNA increased the retention time of siRNA in the lungs and suppressed siRNA entering into blood. The local pulmonary administration of siRNA reduced the amount of siRNA required to express the RNA interference effect compared to the systemic administration. Regarding to the stability of Cy5.5-siRNA in a body, we developed a novel electrophoresis method that separates siRNA and Cy5.5 by using a PCI solution. The results obtained by this study will contribute greatly to the development of siRNA formulations based on the fate of siRNA in the body.

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 siRNA 遺伝子治療 蛍光標識 吸入剤 吸入粉末剤 体内動態

1. 研究開始当初の背景

siRNA は塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制することから、遺伝子疾患の治療薬として注目されている。嚢胞性線維症、気道過敏症、肺がんなどの呼吸器系疾患は、遺伝子を気管から直接投与できることから実用化の可能性が高いと考えられる。当研究室ではこれまでに、生体適合性の高いキトサンを非ウイルス性ベクターとして、プラスミド遺伝子の肺内送達用微粒子製剤の開発を行ってきた。超臨界二酸化炭素晶析法で調製した微粒子をマウス肺内に適用することにより、高い遺伝子発現が認められている。また、肺転移癌モデルマウスを用いた実験で、マウスインターフェロン β をコードする pCMV-Mu β 遺伝子の微粒子製剤の肺内投与により、効率的に転移癌増殖が抑制されることも見出した。この調製手技は siRNA の吸入用微粒子調製にも適用可能である。pCMV-Luc を形質転換したマウス結腸がん細胞 CT-26/Luc を尾静注して作成した肺転移癌モデルマウスに、ルシフェラーゼ遺伝子に配列特異的な GL3 siRNA の微粒子製剤を肺内投与することにより、配列特異的にルシフェラーゼ発現が抑制されることを確認している。

当研究室では、独自に開発したシリンジ法により微粒子をマウス肺内に投与している。遺伝子発現及び siRNA による RNA 干渉能は、微粒子の肺内送達の程度に大きく依存するが、小動物を用いた研究では、微粒子がどの程度肺内に送達されたかが把握できないという問題があった。この問題点を解決するため、微粒子を蛍光物質インドシアニングリーンで標識し、投与後肺から発する蛍光を In Vivo Imaging System (IVIS) で体外から観察・定量する方法を開発した。フルオロセインなどの緑色蛍光は、生体内の自家蛍光との区別が困難であるが、インドシアニングリーンは近赤外領域の蛍光を発するので、体内からの光でも十分観察・定量可能である。この方法は、ルシフェラーゼ遺伝子をターゲットとした GL3 siRNA 微粒子製剤にも応用可能である。

本研究ではこの手法を発展させ、インドシアニングリーンによる製剤の蛍光標識に替えて、siRNA 自体を Cy5.5 などにより標識することを試みる。すなわち、微粒子の肺内分布と siRNA の肺組織内動態を蛍光で、RNA 干渉効果を蛍光抑制で視覚的に観察するとともに数値化する。この改良型「デュアルイメージング法」を適用することで、製剤の肺内分布、siRNA の肺組織内動態、RNA 干渉能をリアルタイムに評価し、siRNA 微粒子製剤処方最適化をめざす。

2. 研究の目的

siRNA 製剤に限らず、吸入剤の有用性を評価する際は、製剤の肺内での分布を把握することは重要である。当研究室でのこれまでの検討から、肺に投与したプラスミド遺伝子の発

現あるいは siRNA による RNA 干渉能は、製剤の肺内投与手技に大きく依存することが明らかとなっている。したがって、小動物を用いて吸入剤の評価を行う場合、薬剤の血中濃度や薬理効果を測定するだけでは不十分であり、個々の動物における製剤の肺内分布を把握することで、製剤処方最適化の有益な情報が得られることになる。古くは、トリパンブルーなどの色素を肺内に投与し、摘出肺を観察することで製剤到達部位を評価した例もあるが、製剤の分布をリアルタイムに評価することは不可能であった。しかし、近年のイメージング手技の進歩により、In Vivo Imaging System (IVIS) 等の機器を用いて、リアルタイムに生体内で発する光を観察し、定量することが可能となり、当研究室では製剤の肺内分布を蛍光で、遺伝子発現を蛍光で観察・定量する「デュアルイメージング法」を確立した。本研究はこの手法を発展させ、siRNA 自体を蛍光標識し、siRNA 微粒子製剤の投与直後の肺内分布、siRNA の肺組織内動態を評価するとともに、ルシフェラーゼによる蛍光を利用して RNA 干渉能を評価することで、最適な siRNA 製剤処方を明らかにすることを目的とする。この目的を達成するために、以下の点を順次明らかにしてゆく。

○肺組織内体内動態評価に適した蛍光標識 siRNA のデザイン: 生体透過性のよい近赤外蛍光指示薬で siRNA を標識する。蛍光指示薬の構造及び標識部位 (siRNA のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖) を変えることで、キトサンなどの遺伝子ベクターとの複合体形成に及ぼす影響が小さく、肺組織内で安定で、RNA 干渉能を損なわない標識 siRNA を選択する。

○siRNA の肺組織内動態評価法確立: 超臨界二酸化炭素晶析法もしくは噴霧急速凍結乾燥法により、siRNA の微粒子を調製する。正常マウスの肺に、蛍光標識 siRNA の溶液製剤もしくは微粒子製剤を投与し、IVIS 観察により標識 siRNA が肺組織内動態マーカーとして機能するか評価するとともに、siRNA の肺内動態が製剤化によりどのように影響されるかを明らかにする。

○siRNA の肺組織内動態と RNA 干渉能の評価に基づく製剤処方最適化: 種々の蛍光標識 siRNA 製剤を CT-26/Luc 肺転移モデルマウスに投与し、siRNA の肺組織内分布・動態と RNA 干渉の程度を明らかにする。特に徐放性微粒子では、siRNA の肺内残存量を定量的かつ視覚的に捉え、徐放効果を確認できると期待できる。これらの結果に基づき、製剤処方最適化を行う。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識 siRNA の作成と RNA 干渉能の評価

モデル siRNA としてホタルルシフェラーゼ遺伝子をターゲットとする siRNA (siGL3) を用いた (図 1)。近赤外蛍光標識 siRNA には、

siGL3 のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖の 5' 末端を近赤外蛍光指示薬である Cy5.5 (Ex: 675nm/Em: 720nm) で化学修飾したもの (Cy5.5-siGL3) を用いた (図 2)。

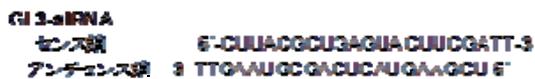


図 1 siGL3 の塩基配列

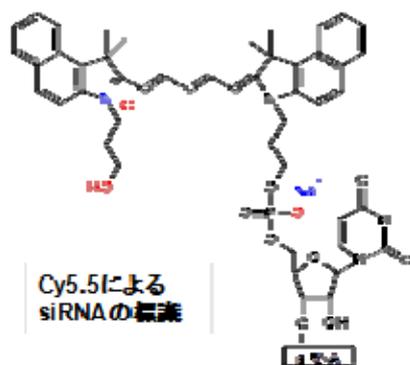


図 2 Cy5.5-siGL3 の構造の一部

非ウイルス性ベクターとして、キトサンより遺伝子送達能が高い Lipofectamine 2000 (LFN) を使用した。マウス結腸癌細胞 CT26 にルシフェラーゼ遺伝子を導入した CT26-Luc 培養細胞に、siGL3/LFN 溶液もしくは Cy5.5-siGL3/LFN 溶液を適用した後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(2) 蛍光標識 siRNA の肺内挙動の評価

正常マウスに経気管的に Cy5.5-siRNA 溶液を投与し、Cy5.5 由来の蛍光を IVIS を用いて追跡することで、体内動態および肺局在性について評価した。

(3) siRNA の吸入粉末剤の調製と評価

ベクターとして分子量 70,000 の分岐型 PEI (B-PEI)、賦形剤にマンニトール、分散補助剤にロイシンを用いて噴霧急速凍結乾燥法により siRNA の吸入粉末剤を調製した。標識 siRNA、キトサン、賦形剤の混合水溶液 (試料溶液) を液体窒素中に噴霧して微細な氷滴としたのち凍結乾燥して、吸入に適した中空多孔性の微粒子を得た。

正常マウスに経気管的に Cy5.5-siRNA 粉末を投与し、Cy5.5 由来の蛍光を IVIS を用いて追跡することで、体内動態および肺局在性について評価した。

(4) 肺転移癌モデルマウスでの効果

マウスに CT26/Luc 細胞を尾静注し、肺転移癌モデルマウスを作成した。ルシフェリン腹腔内投与後の肺組織中ルシフェラーゼ活性が一定の強度に達したマウス (通常 CT26/Luc 接種 10 日目後) に siRNA 微粒子製剤をシリンジ法により肺内投与した。IVIS を用い、Cy5.5 由来の蛍光で、製剤肺内分布、siRNA

肺組織内動態を、ルシフェリン投与後の発光で RNA 干渉能を評価した。RNA 干渉能が siRNA 配列特異的に現れているかどうかは、ルシフェラーゼ遺伝子に配列特異性のない RL siRNA 製剤投与で確認した。

(5) siRNA の吸入粉末剤の肺局所障害性

分子量が異なる B-PEI (25 kDa および 70 kDa) をベクターとした siGL3 微粒子および溶液をマウス肺内に投与し、24 時間後にリン酸緩衝液を用いて回収した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性ならびに炎症性サイトカイン濃度を測定した。

(6) Cy5.5-siRNA の構造安定性

Cy5.5-siRNA (3 mM) 20 μ L とウシ胎児血清 (FBS) または肺ホモジネート (1 mg/mL) 140 μ L を混合し、37°C でインキュベートした。0、1、3、6、24 時間後の試験溶液 40 μ L と氷冷しておいた PCI 溶液 (水飽和フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 50:49:1) 40 μ L を混合、遠心分離し、水層、タンパク層、有機層に分離した。Cy5.5-siRNA および siRNA の分解物は水溶性が高いため水層へ、一方 siRNA から解離した Cy5.5 は脂溶性が高いため有機層へ移行する。変性液として尿素を加えた変性ポリアクリルアミドにより両層を電気泳動法した。泳動後、SYBR®Gold で核酸を染色し、蛍光イメージアナライザーを用いて、SYBR®Gold 由来の蛍光および Cy5.5 由来の蛍光を検出・解析することで Cy5.5-siRNA としての構造安定性を評価した。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識 siRNA の作成と RNA 干渉能の評価

siRNA は細胞内でアンチセンス鎖が RISC と複合体を形成して活性型となる、したがって、アンチセンス鎖を標識することで、siRNA の肺組織内動態と RNA 干渉能の関連がより明確になると期待できる。一方、アンチセンス鎖を標識することで、RNA 干渉能が低下する可能性もある。そこで、アンチセンス鎖もしくはセンス鎖いずれか一方の 5' 末端を標識し、siRNA 肺組織内動態マーカーとしてどちらが適切であるか検討を加えた。

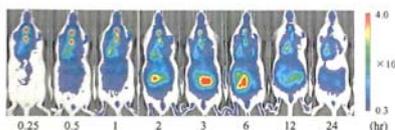
CT26-Luc 細胞に siGL3/LFN 溶液を適用した後のルシフェラーゼ活性は siGL3 濃度依存的に抑制された。センス鎖を Cy5.5 で標識した siGL3 では未標識の siGL3 と同等の効果が得られた一方、アンチセンス鎖を Cy5.5 で標識した siGL3 では、効果が減弱する傾向が認められた。これは、RNA 干渉に直接関わるアンチセンス鎖を Cy5.5 で標識することで、ターゲットとなる mRNA の認識能が低下したためと考えられる。

(2) 蛍光標識 siRNA の体内挙動の評価

マウスに経気管的に肺内投与した

Cy5.5-siRNA の体内動態および肺局在性について IVIS を用いて評価した。Naked Cy5.5-siRNA 溶液では投与 0.5-1 時間後から Cy5.5 由来の蛍光が肺から肝臓、腸へと移行していくのが観察されるとともに、時間経過に伴い蛍光が体内から消失した。Cy5.5 の標識位置は、naked Cy5.5-siRNA 溶液の体内動態に大きな影響を与えなかった。一方、Cy5.5-siRNA/LFN 溶液では肺内で滞留する様子が確認でき、投与 3 時間後から肝臓へと移行した (図 3)。肺局在性については、標識した位置 (センス鎖およびアンチセンス鎖の 5' 末端) による違いは認められなかった。

Naked Cy5.5-siGL3 溶液 (アンチセンス鎖標識, Cy5.5-siRNA として 20 μ g 投与)



Cy5.5-siGL3/LFN 溶液 (アンチセンス鎖標識, Cy5.5-siRNA として 20 μ g 投与)

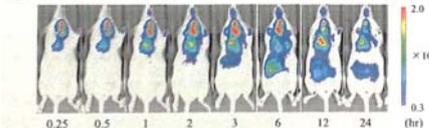


図 3 蛍光標識 siRNA の体内挙動

(3) siRNA の吸入粉末剤の調製

噴霧急速凍結乾燥法で、吸入に適した中空多孔性の微粒子製剤を調製できた (図 4)。

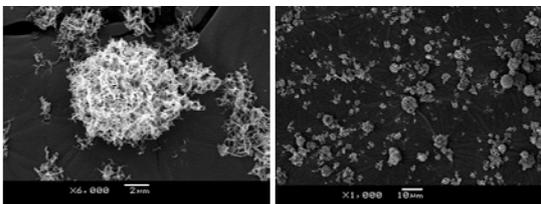


図 4 siRNA の吸入粉末剤

ベクターとして B-PEI を用いた場合、Naked Cy5.5-siRNA に比べ、Cy5.5-siRNA/B-PEI 複合体では、Cy5.5 由来の蛍光強度が約 1/10 に減弱した。Cy5.5 のスルホニル基に由来する負電荷が、B-PEI の正電荷と静電的相互作用を起こすためと考えられる。

雌性 ICR マウスに粉末製剤および溶液を肺内投与し、Cy5.5-siRNA の体内動態を近赤外蛍光イメージングにより評価した。B-PEI との複合体形成による Cy5.5 由来の蛍光強度の減弱が認められた。Naked Cy5.5-siRNA 粉末製剤および溶液投与群では投与 3 時間後で肺内の Cy5.5 蛍光強度が最大となり、その後肝臓、腸などへ移行した。一方、Cy5.5-siRNA/B-PEI 粉末製剤および溶液投与群では肺での蛍光強度がより長時間維持した。

(4) 肺転移癌モデルマウスでの効果

CT-26/Luc 細胞懸濁液を BALB/c マウスに尾静注し作成した肺転移癌モデルマウスに粉

末製剤および溶液を肺内投与した。Control 群および配列非特異的な siRL/B-PEI 粉末製剤投与群、B-PEI 粉末製剤投与群、naked siGL3 粉末製剤投与群では肺内発光強度が経日的に顕著に増加した。siGL3/B-PEI 粉末製剤投与群では day1 から day3 まで肺内発光強度の増加は認められず、siGL3 の投与量依存的な遺伝子発現抑制効果が確認された。また、siGL3/B-PEI 溶液よりも優れた遺伝子発現抑制効果が確認された (図 5)。これまでの siRNA マウス静脈内投与による遺伝子発現抑制研究では、1 回あたり 60 μ g 程度の多量の siRNA が複数回投与されることが多い。当研究室でのこれまでの検討でも、1 回あたり 60 μ g の siRNA を 2 回肺内に投与してきた。今回 siRNA 投与量 3 μ g でも遺伝子発現を有意に抑制できたことは、局所投与では静脈内投与に比べて siRNA の投与量を減じられる可能性が強く示唆している。

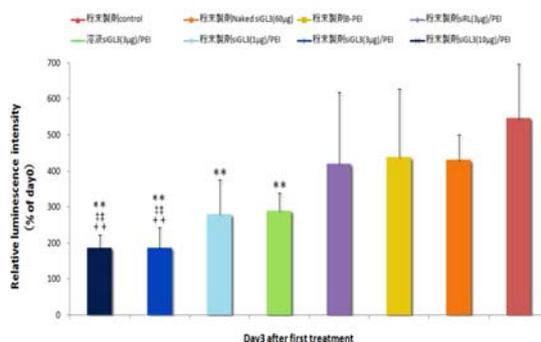


図 5 siRNA/B-PEI 粉末製剤肺内投与による in vivo 遺伝子発現抑制効果 (day3): 左から粉末製剤 siGL3(10 μ g)/PEI、粉末製剤 siGL3(3 μ g)/PEI、粉末製剤 siGL3(1 μ g)/PEI、溶液 siGL3(3 μ g)/PEI、粉末製剤 siRL(3 μ g)/PEI、粉末製剤 B-PEI、粉末製剤 Naked siGL3 (60 μ g)、粉末製剤 Control。

(5) siRNA の吸入粉末剤の肺局所障害性

分子量が異なる B-PEI (25 kDa および 70 kDa) を用いた 微粒子をマウス肺内に投与し、BALF 中の LDH 活性ならびに炎症性サイトカイン濃度を測定した。siRNA の投与量依存的な肺組織障害性が認められるとともに、25 kDa よりも 70 kDa の B-PEI の肺組織障害性が高いことが示唆された。一方、微粒子投与群の方が同組成溶液投与群よりも LDH 活性が低かった (図 6)。B-PEI の分子量ならびに溶液および粉末の違いに依らず siRNA として 3 μ g 投与群においては、炎症性サイトカイン濃度がコントロール群と同程度であったことから、炎症性は比較的軽微であることが示唆された。

(6) Cy5.5-siRNA の構造安定性

Cy5.5 で化学修飾した Cy5.5-siRNA について、構造安定性を電気泳動により評価した。核酸染色に用いた SYBR Gold と Cy5.5 由来の蛍光のバンドを比較したところ、血清中よりも肺

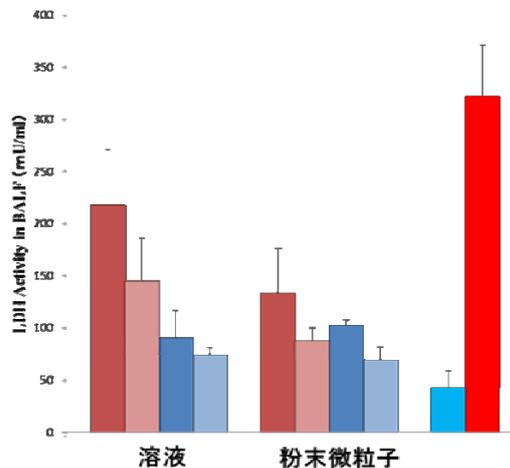


図6 siRNAの溶液および粉末微粒子の肺局所障害性：溶液・粉末微粒子とも左から siGL3(30μg)/B-PEI(70kDa)、siGL3(3μg)/B-PEI(70kDa)、siGL3(30μg)/B-PEI(25kDa)、siGL3(3μg)/B-PEI(25kDa)。青は水（negative control）、赤は0.1% SDS（positive control）。

ホモジネート中の方がCy5.5-siRNAとして安定に存在していた。またCy5.5-siRNAをマウス肺内に投与し、摘出肺を溶解した試料を電気泳動により評価したところ、siRNAのバンドの位置にCy5.5由来の蛍光が検出され、肺内での構造安定性が確認できた（図7）。Cy5.5-siRNA/B-PEIの静脈投与および経気道投与において、Cy5.5-siRNA単独よりも生体内でのCy5.5-siRNAの構造安定性が高められた。

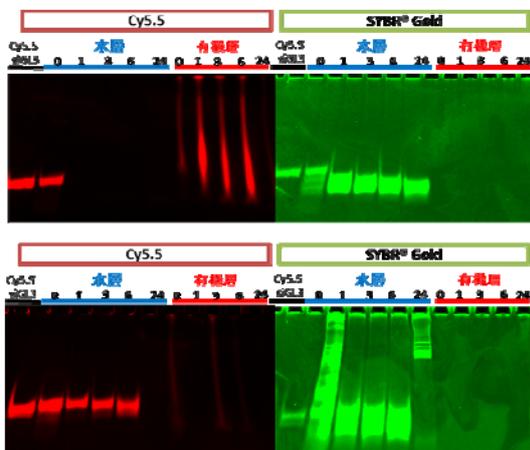


図7 電気泳動結果：(上)血清、(下)肺ホモジネート。横軸の数値は時間。

(7) まとめ

本研究において、センス鎖をCy5.5で標識することにより、siRNAのRNA干渉能に影響を与えることなく体内動態を追跡できることが示された。Cy5.5-siRNAは、噴霧急速凍結乾燥法によって微粒子化しても、安定であった。ベクターを添加することで未添加時に比べてsiRNAの肺内滞留性が増加し、全身移行が抑制できることが示された。また、肺局所投与により、全身投与に比べてはるかに少ない量のsiRNAで肺局所RNA干渉効果を得ることに成功した。Cy5.5-siRNAを用い

た体内動態試験では、Cy5.5-siRNAの生体内安定性に関する知見が重要であるが、今回新たにPCI混合溶液を用いてsiRNAとCy5.5を分離後電気泳動する手法を確立した。これらの成果は、siRNAの体内動態に基づいた製剤処方最適化に大きく貢献す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 奥田知将、岡本浩一、近赤外蛍光ラベル化吸入用遺伝子粉末微粒子による肺内送達量/遺伝子発現量解析、名城大学総合研究所紀要、査読無、19、2014 69-72
- ② 岡本浩一、奥田知将、分枝型ポリエチレンイミンをベクターとするsiRNA吸入粉末剤の開発、名城大学総合研究所紀要、査読無、18、2013、105-108
- ③ 岡本浩一、奥田知将、近赤外蛍光標識によるsiRNAの肺内動態評価、名城大学総合研究所紀要、査読無、17、2012、47-50

〔学会発表〕（計6件）

- ① 市岡みづき、水谷公泰、奥田知将、岡本浩一、吸入用siRNA/分岐型ポリエチレンイミン噴霧急速凍結乾燥微粒子による肺組織障害性評価、日本薬学会第134年会2014年3月30日、熊本
- ② 石川奈央佳、豊田容子、奥田知将、岡本浩一、近赤外蛍光イメージングによるsiRNA/分岐型ポリエチレンイミン複合体投与後のsiRNAの体内動態および構造安定性評価、日本薬学会第134年会2014年3月30日、熊本
- ③ 豊田容子、石川奈央佳、奥田知将、岡本浩一、In vivoイメージングによる体内動態評価への応用に向けたCy5.5-siRNAの構造安定性評価、第29回日本DDS学会2013年7月4日、京都
- ④ 水谷公泰、森下将輝、豊田容子、奥田知将、岡本浩一、噴霧急速凍結乾燥法で調製した吸入用siRNA/PEI粉末微粒子のin vitroおよびin vivo遺伝子発現抑制効果、日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・日本薬学会東海支部合同学術大会2012、2012年11月18日、岐阜
- ⑤ 森下将輝、水谷公泰、豊田容子、奥田知将、岡本浩一、噴霧急速凍結乾燥法で調製した吸入用siRNA/PEI粉末微粒子の体内動態および遺伝子発現抑制効果、第28回日本DDS学会、2012年7月4日、札幌
- ⑥ 奥田知将、鬼頭大輔、大竹裕子、岡崎真貴、岡本浩一、近赤外蛍光標識siRNA粉末微粒子による肺内投与後のsiRNA体内動態および遺伝子発現抑制効果の評価、

第 27 回日本 DDS 学会、2011 年 6 月 9
日、東京。

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 浩一 (OKAMOTO, Hirokazu)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：00308941

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

奥田 知将 (OKUDA, Tomoyuki)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号：20513857