

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23790038
 研究課題名（和文）細胞内動態素過程の定量的解析に基づいた *in vivo* siRNA 送達システムの創製
 研究課題名（英文） Design of systemic siRNA delivery system based on quantitative analyses of intracellular trafficking
 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、高活性な *in vivo* 核酸デリバリーシステムを構築するために、*in vitro/in vivo* における各細胞内動態過程（1. 細胞内への取り込み過程、2. エンドソーム脱出過程、3. 脱凝縮過程）定量化して比較解析を行った。その結果、低投与量になるにつれて 1 の過程が *in vivo* において重要な要素になること、そして 3 の過程を改善することで薬理効果が改善することが明らかとなった。一方、構築された *in vivo* 核酸デリバリーシステムに予防・治療用核酸を搭載することで、急性肝炎の予防効果や、2 型糖尿病・肥満の著しい病態改善効果を生み出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, comparative analyses between *in vitro* and *in vivo* settings were examined in order to develop an efficient *in vivo* nucleic acid delivery system. We focused on three main intracellular trafficking processes; accumulation, endosome escape, and decondensation process in tissues or cells. We found that the accumulation process is a key factor in achieving *in vivo* nucleic acid activity at low dose. In addition, nucleic acid activity was increased by improving nucleic acid decondensation process in cytoplasm. Lastly, we have succeeded to prevent acute liver hepatitis and the symptoms of type 2 diabetes and obesity in mice by using the *in vivo* nucleic acid delivery system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：核酸デリバリー、細胞内動態、肝臓、急性肝炎、2 型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

in vivo siRNA デリバリー研究は国内外で精力的に行われているが、Peter Cullis らのグループは、エンドソーム脱出過程に着目して世界最高性能のキャリアを開発しており [Semple SC et al. *Nat Biotechnol* 28(2);172-6, 2010]、特に国内での *in vivo* デリバリーシステム開発は劣っているのが現状である。原因の一つとしては、*in vitro* と *in vivo* のジレンマ、つまり、*in vitro* で効果を有するキャリアが *in vivo* で効果が弱

いということが挙げられる。このジレンマは DDS 開発を行う全ての研究者の悩みの種であるにもかかわらず、*in vivo* における細胞内動態素過程を定量化する方法がないために、このジレンマを解く普遍的な解決策が見い出せないでいるのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、*in vivo* における細胞内動態素過程を定量化する方法を解決することで、(1) *in vitro*、*in vivo* 間に存在す

る大きなギャップ、『死の谷』がどの細胞内動態素過程に存在するのかを突き止め、(2)細胞内素過程の律速段階を改善を行い、(3)構築された核酸デリバリーシステムを用いて肝臓を疾患とする病態(肝炎、2型糖尿病)への応用を試みた。

3. 研究の方法

(1) in vitro/in vivo の比較解析

モデルキャリアとして、マウス肝臓にpDNA、siRNAを送達可能であるオクタアルギニン(R8)とエンドソーム脱出素子(GALA)を組み合わせたナノ粒子(R8-GALA-MEND)[Khalil Ikramy, Hayashi Y et al. *J Control Release*. 156(3):374-80 (2011), Hayashi Y et al. *Int J Pharm*. 419(1-2):308-13 (2011)]を使用した。モデル核酸として、肝臓で発現しているSR-BI 遺伝子に対するsiRNAを使用した。In vitro/in vivoの両系においてsiRNA内封R8-GALA-MENDを処理し、各処理時間後におけるsiRNAの分子数をRT-PCR法により算出した。そして単位細胞数あたりのsiRNA分子数を算出し、in vitroとin vivoのデータを比較した。またin vitro/in vivoにおけるSR-BIの遺伝子発現抑制効果とsiRNA分子数との関連性についても解析を行った。

(2) 細胞内素過程の改良

siRNA凝縮化剤であるstearylated-octaarginine (STR-R8)、またはstearylated-octahistidine (STR-H8)を用いたsiRNA polycation complex (STR-R8/siRNA complex、STR-H8/siRNA complex)を作成し、R8-GALA-D-MEND[Akita H et al. *J Control Release*. 143(3):311-7 (2010)]にそれぞれ内封した。各粒子の特性(サイズ、表面電位、封入率)はZeta-sizerにて、siRNA凝縮化剤からのsiRNAの解離はRiboGreenを用いてfree型のsiRNAの量を測定することで評価を行った。細胞内の取り込み量、取り込み分布はFACSにて評価し、エンドソーム脱出効率は顕微鏡観察にてLysotrackerとsiRNAの局在率を算出することで評価した。細胞質内におけるsiRNAの拡散効果は、顕微鏡の画像定量より、細胞の面積に対する蛍光siRNAの面積の割合を算出することにより脱凝縮過程の改善効果を評価した。遺伝子発現抑制効果は、luciferase活性を指標として評価した。

(3) 肝臓疾患への応用

Hepatocyte Growth FactorをコードしたpDNAをR8-GALA-MENDに内封し、正常マウスに尾静脈投与した。その後、D-galactosamineとLipopolysaccharide溶液を腹腔内投与することで急性肝炎を誘導させ、その誘導効果の抑制効果を血清中のGOT、GPT値を指標として

評価した。また、急性肝炎におけるマウスの死亡率についても評価を行った。また肝臓へのpDNA送達効率、安全性について評価するため、市販の肝臓導入試薬であるin vivo jet PEIを用いてR8-GALA-MENDとの比較を行った。

一方、2型糖尿病の予防効果の検討実験においては、病態進行に関与すると考えられる肝臓遺伝子の選定から行った。DNA microarrayによりKKAyマウスとC57BL/6を比較し、全マウス遺伝子の中から病態に関連する遺伝子の抽出を行った。その後RT-PCR法で20個程度の遺伝子の発現量を測定し、その中で最も発現量の高い遺伝子を候補遺伝子として決定した。この遺伝子に対するsiRNAを用いて、ナノ粒子に内封し、in vivo機能解析を実施した。標的遺伝子の遺伝子発現抑制効果はRT-PCR法にて、血清中、肝臓内の各種パラメーターは市販のkitにて測定を行った。

4. 研究成果

(1) in vitro/in vivo の比較解析

In vitro、in vivo間のsiRNAの活性の違いがどの素過程に起因するののかについてIntracellular Pharmacokinetics (PK)、Intracellular Pharmacodynamics (PD)、の2つの要因に着目した。その結果、細胞内PK、PDについてはin vitro/in vivo間で大きな違いがみられなかったものの、細胞/組織に集積率には両者に大きな違いが認められ、特に投与量を下げた場合、in vivo肝臓における集積率が著しく低下することが観察された。従って、in vitroとin vivo間の活性の大きな違いを決定づけている素過程は初期の細胞/組織への取り込み/集積過程であることが明らかとなった[Hayashi Y et al. *J Control Release*. 161(3):757-62 (2012)]。In vitroとin vivoにおけるNanoparticleの活性が相関しないのは多くのDDS研究者の間でよく知られている事実であるものの、実際どの素過程に原因があるのかについて詳細な検討がなされたことはほとんどなかった。本研究はそのような問題を初めて解決したという点で非常に有益な情報である。

(2) 細胞内素過程の改良

In vitroとin vivoにおけるNanoparticle活性の比較解析から、内在性遺伝子を50%抑制するのに必要なsiRNAの分子数が約4万分子であるということが明らかとなった。しかしながら、500分子程度で十分であるという報告が複数の研究グループから報告されていたことから[Landesman Y et al. *Silence*. 1(1):16 (2010), Pei Y et al. *RNA*. 16(12):2553-63 (2010)]、細胞質内におけるsiRNAの拡散が不十分ではないかという仮説を立てて、siRNA凝縮化剤からの解離に着目したキャリアの改

良を試みた。そこで、従来使用してきた脱凝縮剤である stearyl-ated-octaarginine (STR-R8) の代わりに pH 応答性である stearyl-ated-octahistidine (STR-H8) を使用したところ、STR-H8 を使用した場合、細胞質における siRNA の解離度合い、遺伝子発現抑制効果の改善が観察された [Toriyabe N et al. *Biomaterials*. 34(4):1337-43 (2013)]。この結果は、細胞質内における siRNA の脱凝縮過程の重要性を初めて示唆した結果であり、本検討で使用した STR-H8 は今後重要な核酸凝縮化剤として利用されることが考えられる。

(3) 肝臓疾患への応用

最後に、これまでの研究で構築された Nanoparticle を用いた Application 例として、Hepatocyte Growth Factor をコードした pDNA を急性肝炎誘導マウスに投与したところ、肝障害の抑制、及び死亡率の低下が観察された [Hayashi Y et al. *Nucleic Acid Ther.* 22(5):360-3 (2012)]。一方、in vivo jetPEI を用いた場合は、急性肝炎進行による死亡よりも早くマウスが死亡してしまったことから、R8-GALA-MEND は in vivo jetPEI と比べて安全性の高い肝臓遺伝子送達キャリアであることが示唆された。以上の結果は、HGF pDNA を搭載した R8-GALA-MEND が肝炎の予防に有望である可能性を示唆している。

さらに、DNA microarray により独自に同定された新規 2 型糖尿病関連遺伝子を in vivo siRNA delivery system を用いて機能解析を行った結果、2 型糖尿病、肥満、脂肪肝の改善効果を得ることに成功した。血糖値の抑制効果ばかりでなく、肝臓内や血清中の脂質量の改善、さらには体重減少効果まで観察された [Hayashi Y et al. (in preparation)]。さらにキャリア投与による顕著な毒性は観察されなかったことから、この分子を標的とした新しい Nanomedicine の開発が今後期待される。このように、疾患標的因子の選定及び non-viral siRNA delivery system を用いた in vivo 機能解析といった一連の流れは次世代型の核酸医薬開発に直結するものであり、非常にインパクトが高い成果であると確信している。

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 5 件)

1. Toriyabe N, Hayashi Y, Harashima H. The transfection activity of R8-modified nanoparticles and siRNA condensation using pH sensitive stearyl-ated-octahistidine. *Biomaterials*. 34(4): 1337-43 (2013).

(doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.043.) (査読有)

2. Hayashi Y, Mizuno R, Ikramy IA, Akita H, Harashima H. Pretreatment of hepatocyte growth factor gene transfer mediated by octaarginine peptide-modified nanoparticles ameliorates LPS/D-galactosamine-induced hepatitis. *Nucleic Acid Ther.* 22(5); 360-3 (2012). (doi:10.1089/nat.2012.0352.) (査読有)
3. Hayashi Y, Noguchi Y, Harashima H. Non-linear pharmacokinetics of octaarginine-modified lipid nanoparticles: barriers from in vitro to in vivo. *J Control Release*. 161(3); 757-62 (2012). (doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.036.) (査読有)
4. Khalil IA, Hayashi Y, Mizuno R, Harashima H. Octaarginine- and pH sensitive fusogenic peptide-modified nanoparticles for liver gene delivery. *J Control Release*. 156(3); 374-80 (2011). (doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.012.) (査読有)
5. Hayashi Y, Yamauchi J, Khalil IA, Kajimoto K, Akita H, Harashima H. Cell penetrating peptide-mediated systemic siRNA delivery to the liver. *Int J Pharm.* 419(1-2); 308-13 (2011). (doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.038.) (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. 末光永理奈、林泰弘、梶本和昭、佐藤悠介、Afsana Akhter、櫻井遊、畠山浩人、兵藤守、加地範匡、馬場嘉信、原島秀吉。Mogat1 siRNA 搭載型 in vivo デリバリーシステムを用いた 2 型糖尿病予防効果の検証。日本薬学会北海道支部第 139 回例会、2012 年 12 月 8 日、札幌・学術交流会館
2. Y. Hayashi. “Identifying therapeutic targets for type 2 diabetes in combination with a DNA microarray and the non-viral delivery of siRNA” The 15th Hokkaido University-Seoul National University joint symposium. December 7, 2012. 学術交流会館・Sapporo, Japan.
3. N. Toriyabe, Y. Hayashi, H. Harashima. “The new pH sensitive polycation improves the transfection activity of R8-nanoparticles by facilitating

- siRNA condensation” 72nd FIP World Congress 2012. October 3-8, 2012. RAI Amsterdam, Amsterdam, Netherlands.
4. **Y. Hayashi**, K. Kazuaki, Y. Sato, E. Suemitsu, A. Akhter, Y. Sakurai, H. Hatakeyama, M. Hyodo, N. Kaji, Y. Baba, H. Harashima. “An integrated strategy with DNA microarray and non-viral in vivo siRNA delivery to discover novel therapeutic targets for type 2 diabetes” 10th Annual discovery on target. October 1-3, 2012. Copley Marriott Hotel, Boston, MA, USA.
 5. 鳥谷部尚之、**林泰弘**、原島秀吉. 新規 pH 応答性ポリカチオンを用いた“細胞質”動態制御型 siRNA キャリアの有用性と評価. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、2012 年 9 月 24 日～26 日、仙台・仙台市民会館
 6. **林泰弘**、水野諒一、Khalil IA、秋田英万、原島秀吉. Hepatocyte growth factor 遺伝子搭載ナノキャリアによる急性肝炎の予防効果の検証. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、2012 年 9 月 24 日～26 日、仙台・仙台市民会館
 7. R. Mizuno, **Y. Hayashi**, IA. Khalil, H. Harashima. “Gene therapy for LPS/D-GalN-induced hepatitis by octaarginine peptide-modified nanoparticles” The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. Jul 15-18, 2012. Centre des Congres de Quebec, Quebec, Canada.
 8. Y. Noguchi, **Y. Hayashi**, H. Harashima. “*In vitro* / *in vivo* correlation analysis using siRNA-loaded lipid nanoparticles” The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. Jul 15-18, 2012. Centre des Congres de Quebec, Quebec, Canada.
 9. 野口裕生、**林泰弘**、原島秀吉. ナノキャリアを用いた *in vitro/in vivo* 活性相関解析. 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28 日～31 日、札幌・北海道大学
 10. 野口裕生、**林泰弘**、原島秀吉. R8-MEND を用いた *in vitro/in vivo* における siRNA の定量的解析. 第 137 回日本薬学会北海道支部例会、2011 年 12 月 3 日、札幌・学術交流会館
 11. **Y. Hayashi**, R. Mizuno, J. Yamauchi, IA. Khalil, H. Harashima. “Octaarginine peptide-based nanoparticle system for liver-targeted nucleic acid delivery” The 9th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care. Sep 29-30, 2011. Sapporo, Japan・北海道大学医学部学友会館
 12. **林泰弘**、水野諒一、Ikramy Khalil、原島秀吉. R8 ペプチドと GALA ペプチドを用いた肝臓への遺伝子デリバリーシステムの開発. 第 27 回日本 DDS 学会、2011 年 6 月 9～10 日、東京・東京大学
 13. 山内順、**林泰弘**、Ikramy Khalil、梶本和昭、秋田英万、原島秀吉. 膜透過性ペプチドを用いた肝臓への siRNA 送達. 第 27 回日本 DDS 学会、2011 年 6 月 9～10 日、東京・東京大学
 14. 水野諒一、**林泰弘**、Khalil Ikramy、原島秀吉. オクタアルギニン(R8)と GALA を用いた肝臓への遺伝子送達キャリアの構築、日本薬学会北海道支部第 136 年会、2011 年 5 月 21 日、札幌・学術交流会館
 15. **Y. Hayashi**, R. Mizuno, IA. Khalil, H. Harashima. “Octaarginine- and pH Sensitive Fusogenic Peptide-Modified Nanoparticles for Liver Gene Delivery” The 14th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy May 18-21, 2011. Washington State Convention & trade center, Seattle, WA, USA.
 16. J. Yamauchi, **Y. Hayashi**, IA. Khalil, H. Akita, H. Harashima. “Cell Penetrating Peptide-Mediated Systemic siRNA Delivery to the Liver” The 14th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy May 18-21, 2011. Washington State Convention & trade center, Seattle, WA, USA.
- [図書] (計 3 件)
1. 小暮健太郎、**林泰弘**、原島秀吉. 第 3 章 DDS 用バイオマテリアル 多機能性エンベロープ型ナノ構造体による遺伝子デリバリー. 「先端バイオマテリアルハンドブック」 P364-369. (2012 年 5 月) エヌティーエス出版.
 2. **林泰弘**、梶本和昭、原島秀吉. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体の創薬への応用. 細胞 44(2):8-11 (2012) ニューサイエンス社
 3. 秋田英万、山田勇磨、中村孝司、畠山浩人、**林泰弘**、梶本和昭、原島秀吉. 第 4 編 イメージングを可能とする周辺技術 第 18 章 プローブデリバリーシステム. 「蛍光イメージング/MRI プローブの開発」 P163-172. (2011 年 9 月) シーエムシー出版.
- [その他]
1. **林泰弘**. 肝臓を標的とした DDS による 2 型糖尿病治療法開発. 北海道医療新聞

2012年6月22日.

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