

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460046

研究課題名(和文) 負電荷ポリマー投与によるがん組織へのsiRNAリポプレックスの送達

研究課題名(英文) siRNA delivery to tumor by sequential injection of anionic polymer and siRNA lipoplex

研究代表者

服部 喜之(Hattori, Yoshiyuki)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90350222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：短鎖二本鎖RNA(siRNA)を肝転移がんを送達するための手法として、負電荷ポリマーであるコンドロイチン硫酸(CS)の投与直後にsiRNAと正電荷リポソームの複合体(siRNAリポプレックス)を投与する連続投与法を開発した。CS投与直後にsiRNAリポプレックスを投与すると、血液中で赤血球などの血液成分とsiRNAリポプレックスの凝集を回避することで肺でのsiRNAの集積性を抑制し、がんが転移した肝臓全体にsiRNAが集積すること、さらに連続投与法によりがんの転移に関わるprotein kinase N3に対するsiRNAを投与すると、転移がんの増殖を抑制できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We developed novel siRNA transfer method to the liver by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic liposome/siRNA complex (siRNA lipoplex). When siRNA lipoplex was intravenously injected into mice bearing liver metastasis, the accumulation of siRNA was mainly observed in the lungs. In contrast, when siRNA lipoplex was intravenously injected into mice bearing liver metastasis immediately after intravenous injection of chondroitin sulfate (CS), siRNA was accumulated in tumor-metastasized liver. In terms of a gene silencing effect, sequential injections of CS plus siRNA lipoplex could reduce expression of target gene in liver metastasis. Moreover, sequential injections of CS plus siRNA lipoplex of protein kinase N3 (PKN3) siRNA could suppress tumor growth in the mice bearing liver metastasis. From these findings, sequential injection of CS and siRNA lipoplex might be a novel systemic method of delivering siRNA to liver metastasis.

研究分野：薬剤学

キーワード：siRNA リポソーム 肝転移がん コンドロイチン硫酸 負電荷ポリマー

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉は、標的遺伝子と相同な配列を有するセンス RNA とアンチセンス RNA からなる二本鎖 RNA (siRNA) を細胞内に導入すると、標的の遺伝子の転写産物 (mRNA) の相同部分を切断し、分解する現象である。siRNA は特定の遺伝子発現のみを効果的に抑制できること、また、配列を変えるだけで様々な標的分子に対応できることから、がんなどの疾患の発症に関わる遺伝子の機能を特異的に抑制する新しい治療薬として期待されている。しかしながら、siRNA を利用したがん治療の問題点は、siRNA は水溶性の高分子のため脂質二重膜から構成される細胞膜を透過しにくいこと、生体内の核酸分解酵素により容易に分解されることなどから、静脈内投与により有効量の siRNA を標的がん細胞内に送達させることが非常に困難であることである。現在、siRNA を効率的にがん組織に送達するためのドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究開発が世界中で進められているが、成功例は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

siRNA を細胞内に導入する方法として最も汎用されているのが、リポソーム製剤 (正電荷リポソーム) を用いたリポフェクション法である。この方法はまず、負電荷を有する siRNA と正電荷リポソームを混合することで静電的に結合した複合体 (siRNA リポプレックス) を形成させる。この siRNA リポプレックスを培養細胞に添加すると、siRNA は効率よく細胞内に導入される一方、siRNA リポプレックスを静脈内投与すると、血液中ですばやく赤血球などの血液成分と凝集体を形成し、肺の毛細血管に捕捉され、投与後数分以内に肺に集積する。そのため、がん siRNA を送達させるためには、血液中での siRNA リポプレックスと血球成分との凝集性を回避する必要があった。近年我々は、負電荷ポリマーであるコンドロイチン硫酸(CS)静注直後に siRNA リポプレックスを静注すると (連続投与法)、肺での siRNA の集積を減少させることができることを見出していた。そこで、本研究課題では、負電荷ポリマー投与直後に siRNA リポプレックスを投与することで、肺での siRNA の集積性を抑制し、腫瘍組織に siRNA を送達することができるか検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 担がんマウスの作製：がん皮下移植モデルマウスでは、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞をマウス皮下に移植して固形がんを作製した。肝転移がんモデルマウスは、ヌードマウスの脾臓にルシフェラーゼ安定株のヒト乳がん MCF-7-Luc 細胞または MDA-MB-231-Luc 細胞を移植して作製した。

(2) 正電荷リポソームと siRNA リポプレックスの調製：正電荷リポソームは、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane methyl sulfate とコレステロール (モル比 1:1) を用いて薄膜法により調製した。調製したリポソームの粒子径は、約 100 nm、 $\zeta$  電位は約 50 mV であった。siRNA リポプレックスは、正電荷リポソームに対して siRNA を荷電比 (+/-) が 4/1 となるように混合して調製した。siRNA リポプレックスの粒子径は、約 250 nm、 $\zeta$  電位は約 40 mV であった。

(3) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与後の siRNA のマウス生体内分布：siRNA リポプレックスは、50  $\mu$ g の Cy5.5 標識 siRNA を用いて調製した。1 mg または 10 mg の CS またはやポリグルタミン酸(PGA) 静注、筋注または皮下注 1 分後または 10 分後に siRNA リポプレックスをマウスに投与した。投与 1 時間後または 24 時間後に臓器を摘出し、各臓器における siRNA の分布を *ex vivo* imaging、または凍結切片の蛍光顕微鏡での観察により評価した。

(4) 負電荷ポリマー存在下での赤血球と siRNA リポプレックスの凝集性：マウス血液から回収した赤血球に、10  $\mu$ g の CS または PGA を添加後すぐに siRNA リポプレックス (2  $\mu$ g siRNA 相当) を混合し、15 分後に顕微鏡にて凝集体の形成を観察した。

(5) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与後の肝転移がんにおける遺伝子発現抑制効果：siRNA リポプレックスは、50  $\mu$ g のコントロール siRNA (Cont siRNA) またはルシフェラーゼ siRNA (Luc siRNA) を用いて調製した。ルシフェラーゼ発現安定株である MCF-7-Luc 細胞を移植した肝転移がんマウスに、1 mg の CS または PGA と siRNA リポプレックスを連続投与した。連続投与は、1 日 1 回、3 日間連続して行い、最終投与 48 時間後に肝臓におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与後の副作用：マウスに、1 mg の CS または PGA と siRNA リポプレックス(50 μg siRNA 相当)を連続投与した。連続投与は、1 日 1 回、3 日間連続して行い、最終投与 2 時間後に血中サイトカイン濃度、最終投与 24 時間後に血中 GOT 濃度、最終投与 1 日後と 7 日後に肝重量(mg)を測定した。

(7) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与後の肝転移がんに対する抗腫瘍効果：siRNA リポプレックスは、50 μg の Cont siRNA または protein kinase N3 (PKN3) siRNA を用いて調製した。連続投与は、1 mg の CS 静注 1 分後に siRNA リポプレックスを静注することで行った。MDA-MB-231 細胞または MCF-7 細胞を移植した肝転移がんマウスの治療は、抗がん薬ドキソルビシン(DXR)を 3 mg/kg で投与 1 時間後に CS と siRNA リポプレックスを連続投与した。翌日から、1 日 1 回 3 日間、CS と siRNA リポプレックスを連続投与した。最終投与 2 日後に肝臓を摘出して重量(mg)を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) ポリグルタミン酸(PGA)と siRNA リポプレックス連続投与後のがん皮下移植担がんマウスにおける siRNA の生体内分布

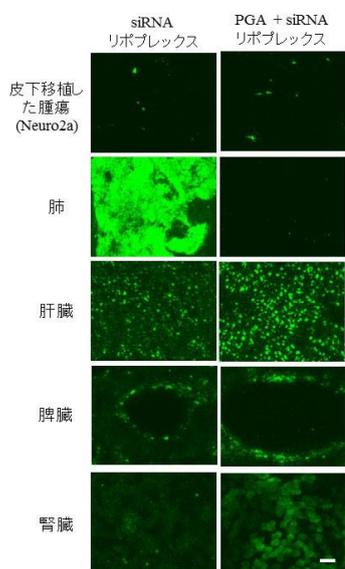


図 1 PGA と siRNA リポプレックス連続投与 1 時間後の Neuro2a 皮下移植担がんマウスにおける siRNA の生体内分布  
スケールバー = 100 μm

がん皮下移植モデルマウスにおいて、負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスの連続投与により、がんへ siRNA を送達できるかどうか

か検討した。1 mg の PGA 静注 1 分後に siRNA リポプレックスを静注した。その結果、siRNA リポプレックス単独投与と比較し、PGA と siRNA リポプレックス連続投与は、siRNA の肺での集積性が著しく減少したものの、腫瘍での集積性は上昇しなかった (図 1)。しかしながら、肝臓において siRNA の高い集積性が観察されたため、連続投与法が肝転移がんに対する siRNA 送達法として利用できるのではないかと考えた。

(2) 連続投与法による肝転移がんモデルマウスでの siRNA の集積性

連続投与法による肝転移がんに対する siRNA の送達性を評価するために、MCF-7 肝転移マウスに 1 mg のコンドロイチン硫酸 (CS) または PGA 静注 1 分後に siRNA リポプレックスを静注した。siRNA リポプレックス投与においては、投与 1 時間後、24 時間後いずれも肺に siRNA の集積が観察されたが、CS または PGA との連続投与においてはがんが転移した肝臓全体に siRNA の集積が観察された (図 2)。

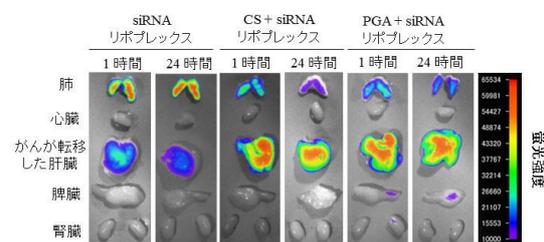


図 2 PGA または CS と siRNA リポプレックス連続投与 1 時間後または 24 時間後の MCF-7 肝転移がんマウスにおける siRNA の生体内分布

(3) 負電荷ポリマーの投与経路の違いによる連続投与後の siRNA の集積性の影響

CS は、現在臨床において静注または筋注で用いられている。そこで、CS の投与経路の違いにより、連続投与後の siRNA の生体内分布に影響があるのか検討した。

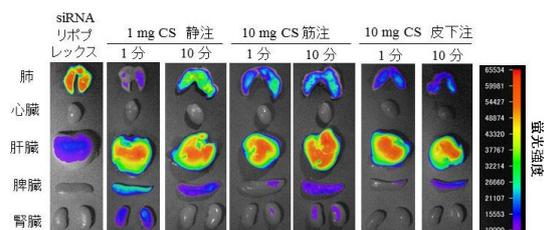


図 3 CS 静注、筋注、皮下注 1 分後または 10 分後に siRNA リポプレックスを静注した時の siRNA のマウス生体内分布

1 mg の CS を静注 1 分後または 10 分後に siRNA リポプレックスを投与、あるいは 10 mg の CS を筋注・皮下注 1 分後または 10 分後に siRNA リポプレックスを投与した。その結果、CS の投与経路の違いに関わらず、CS と siRNA リポプレックス連続投与後の siRNA の集積は、主に肝臓で観察された (図 3)。さらに、CS 静注・筋注後の血中濃度と連続投与後の siRNA リポプレックスの肝集積量を比較したところ、CS の血中濃度が約 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上存在する時に効率よく siRNA リポプレックスが肝臓に送達されることが判った (データ未掲載)。このことより、連続投与方法における CS の投与経路は静注以外でも同様の結果が得られることが判った。

#### (4) 負電荷ポリマー存在下での siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性

負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスの連続投与により肝臓へ siRNA が送達されるメカニズムを調べるために、負電荷ポリマー存在下での siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性を調べた。その結果、siRNA リポプレックスと赤血球を混合すると凝集体の形成が観察されたが、CS または PGA 存在下では凝集体の形成が見られなかった (図 4)。このことから、負電荷ポリマーの静注直後に siRNA リポプレックスを投与すると、血液中中で負電荷ポリマーが siRNA リポプレックスと静電的に相互作用することで赤血球との凝集を抑制するため、肺での siRNA リポプレックスの集積量が減少し、その結果、siRNA が肝臓に送達されたのではないかと考えられた。

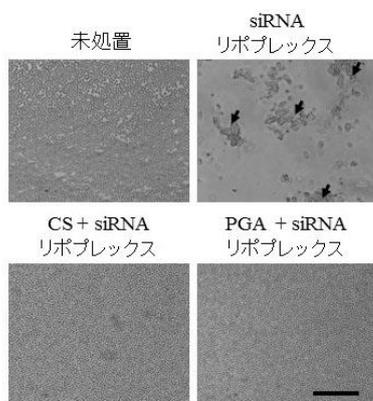


図 4 負電荷ポリマー存在下での siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性 スケールバー = 100  $\mu\text{m}$

#### (5) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレック

ス連続投与後の肝転移がんにおける遺伝子発現抑制効果

CS または PGA と siRNA リポプレックス連続投与により肝転移がんを集積した siRNA が、がんの遺伝子発現を特異的に抑制することができるか検討した。コントロール (Cont) siRNA またはルシフェラーゼ (Luc) siRNA を用いて調製したリポプレックスを連続投与方法により、Luc 安定株の MCF-7 細胞を移植した肝転移がんマウスに投与した。

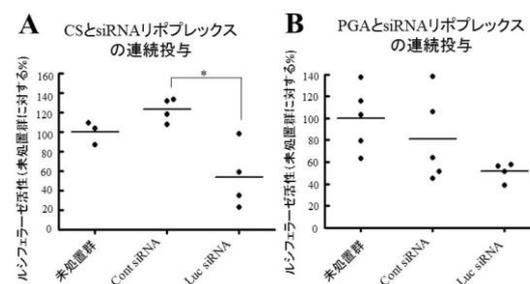


図 5 MCF-7 肝転移がんマウスにおける CS または PGA と siRNA リポプレックス連続投与後のがん細胞における遺伝子発現抑制効果 \* $P < 0.05$

CS または PGA と siRNA リポプレックスの連続投与いずれにおいても、Cont siRNA 投与群と比較して Luc siRNA 投与群において高いルシフェラーゼ活性の抑制効果が観察された (図 5)。この結果から、連続投与により肝転移がんに送達された siRNA は、がん細胞内で発現している標的遺伝子を特異的に抑制することが判った。

#### (6) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスの連続投与後の副作用

負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与後の副作用を調べるために、マウスに 1 日 1 回、3 日間連続で連続投与方法により siRNA を投与した後、肝障害と血液中のサイトカインの濃度変化を調べた。その結果、siRNA リポプレックスの単独投与または PGA と siRNA リポプレックスの連続投与においては、一過的な肝重量の増加 (図 6A) と肝障害のマーカであるグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) 値の血中濃度の上昇などの肝障害が観察された (図 6B)。一方、CS と siRNA リポプレックスの連続投与においては、これらの副作用は認められなかった。

さらに、血清中のサイトカイン濃度においては、siRNA リポプレックス単独投与または

PGA と siRNA リポプレックスの連続投与において、未処置群と比較し、IL-2、-10、-1L-12、GM-CSF、TNF- $\alpha$  などの血清中濃度の上昇が認められたが、CS と siRNA リポプレックスの連続投与においては、サイトカイン濃度の大きな変化は観察されなかった(図 7)。

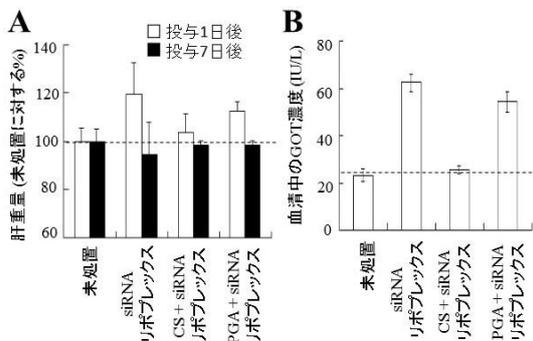


図 6 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与 1 日後または 7 日後の肝重量(A) と連続投与 1 日後の血清中 GOT 濃度(B)

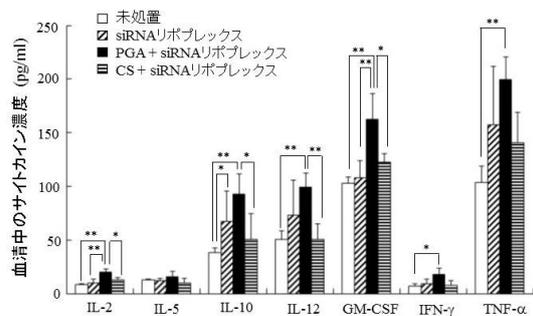


図 7 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与 2 時間後の血清中サイトカイン濃度 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

コンドロイチン硫酸は抗炎症作用を有しており、現在、国内において症候性神経痛、腰痛症、関節痛、肩関節周囲炎などに対する治療薬として用いられている。CS と siRNA リポプレックスの連続投与は、コンドロイチン硫酸の抗炎症作用により、siRNA リポプレックスにより惹起される炎症症状を抑制できたため、副作用が少なかったのではないかと考えられた。

#### (7) 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックス連続投与による肝転移がんに対する抗腫瘍効果

がん増殖を抑制するがん治療用の siRNA を連続投与法により肝転移がんへ送達し、転移がんの増殖を抑制できるかどうか検討した。Protein kinase N3 (PKN3) は、がんの転移に重要な役割をしていることが報告されていたため、PKN3 に対する siRNA を合成し、PKN3

siRNA を用いて調製したリポプレックスと CS を連続投与することで、肝転移がんの増殖を抑制できるか検討した。肝転移がんの治療は、PKN3 siRNA と抗がん薬のドキソルビシン(DXR)との併用で行った。その結果、MDA-MB-231 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与で高い抗腫瘍効果が観察されたが、DXR の併用による相加・相乗効果は見られなかった(図 8A)。また、MCF-7 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与では抗腫瘍効果は観察されなかったものの、DXR と PKN3 siRNA の併用群においては、有意な抗腫瘍効果が確認できた(図 8B)。以上の結果より、CS と siRNA リポプレックスの連続投与による siRNA の肝転移がんへの導入は、肝転移がんの治療に有効であることが明らかとなった。

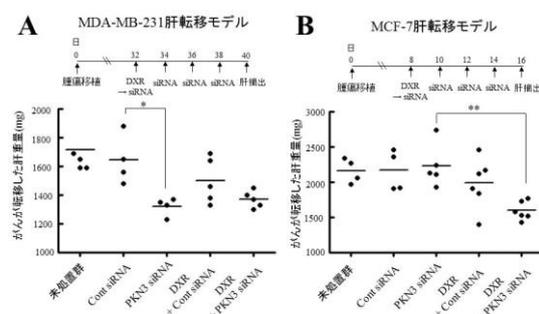


図 8 MDA-MB-231(A) または MCF-7(B) 肝転移乳がんモデルマウスにおける CS と siRNA リポプレックス連続投与による PKN3 siRNA による抗腫瘍効果 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

本研究課題において、我々は siRNA リポプレックス投与前に、CS などの負電荷ポリマーを投与することで、静注後の siRNA リポプレックスの体内動態を変化させ、肝転移がんへ siRNA を送達できる連続投与法を開発した。今後は、肝転移がんや肝がんに対する siRNA の治療において、連続投与法が臨床応用できるよう、研究開発を進めたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Y. Hattori, T. Kikuchi, M. Nakamura, K. Ozaki, H. Onishi, Therapeutic effects for liver- and lung-metastasized tumors by combination therapy of PKN3 siRNA with doxorubicin, *Oncol. Lett.*, in press. 査読有
- ② Y. Hattori, Y. Yoshiike, T. Kikuchi, N. Yamamoto, K. Ozaki, H. Onishi, Evaluation of injection route of anionic polymer for siRNA delivery into the liver by sequential injection of

anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J. Drug Deliv. Sci. Tec.*, **35**, 40-49 (2016). 査読有 DOI: 10.1016/j.jddst.2016.05.005

③ Y. Hattori, S. Arai, T. Kikuchi, K. Ozaki, K. Kawano, E. Yonemochi, Therapeutic effect for liver-metastasized tumor by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J. Drug Target.*, **24**(4): 309-317 (2016). 査読有

DOI: 10.3109/08982104

④ Y. Hattori, S. Arai, T. Kikuchi, M. Hamada, R. Okamoto, Y. Machida and K. Kawano, Optimization of siRNA delivery method into the liver by sequential injection of polyglutamic acid and cationic lipoplex, *Pharmacology & Pharmacy*, **6** (7):302-310 (2015). 査読有

DOI: 10.4236/pp.2015.67032

⑤ Y. Hattori, A. Nakamura, S. Arai, K. Kawano, Y. Maitani, E. Yonemochi, siRNA delivery to lung-metastasized tumor by systemic injection with cationic liposome, *J. Liposome Res.*, **25**(4) 279-286 (2015). 査読有

DOI: 10.3109/08982104

⑥ Y. Hattori, E. Hara, Y. Shingu, D. Minamiguchi, A. Nakamura, S. Arai, H. Ohno, K. Kawano, N. Fujii, E. Yonemochi, siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes, *Biol. Pharm. Bull.*, **38**: 30-38 (2015). 査読有

DOI: 10.1248/bpb.b14-00526

⑦ Y. Hattori, S. Arai, R. Okamoto, M. Hamada, K. Kawano, E. Yonemochi, Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver, *Int. J. Pharm.*, **476**: 289-298 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.059

[学会発表] (計 11 件)

#### ①第 32 回日本 DDS 学会学術集会

2016 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 静岡, PKN3 siRNA リポプレックスとドキシソルビシンの併用療法による肝ならびに肺転移乳がんに対する抗腫瘍効果の検討, 菊地拓人, 服部喜之, 中村麻里, 尾崎恵一, 大西啓

#### ②遺伝子・デリバリー研究会 第 16 回シンポジウム

2016 年 5 月 16 日, 神奈川, PKN3 siRNA リポプレックスとドキシソルビシンの併用療法による肝転移乳がんに対する抗腫瘍効果の検討, 服部喜之, 菊地拓人, 大西啓

#### ③日本薬学会 第 136 年会

2016 年 3 月 26-29 日, 横浜, コンドロイチン硫酸と siRNA リポプレックスの連続投与後の siRNA の生体内分布に及ぼすコンドロイチン硫酸の投与方法の検討, 吉池悠貴, 服部喜之, 菊地拓人, 大西啓

#### ④日本薬学会 第 136 年会

2016 年 3 月 26-29 日, 横浜, コンドロイチン硫酸と siRNA リポプレックスの連続投与と

ドキシソルビシンの併用療法による肝転移がんに対する抗腫瘍効果の検討, 菊地拓人, 服部喜之, 大西啓

#### ⑤第 31 回日本 DDS 学会学術集会

2015 年 7 月 2-3 日, 東京, ポリグルタミン酸と正電荷リポプレックスの連続投与による肝臓への siRNA 送達, 菊地拓人, 服部喜之, 新井翔平, 町田曜子, 濱田めぐみ, 岡本遼, 川野久美, 米持悦生

#### ⑥遺伝子・デリバリー研究会 第 15 回シンポジウム

2015 年 5 月 1 日, 京都, 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスの連続投与による肝転移がんに対する抗腫瘍効果と安全性評価, 服部喜之, 新井翔平, 川野久美

#### ⑦日本薬学会 第 135 年会

2015 年 3 月 25-28 日, 神戸, 負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスの連続投与による肝転移がんに対する遺伝子発現抑制効果と抗腫瘍効果, 服部喜之, 新井翔平, 川野久美, 米持悦生

#### ⑧ アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014

2014 年 9 月 8-9 日, 東京, コンドロイチン硫酸と正電荷リポプレックスの連続投与による肝臓ならびに肝臓転移がんに対する siRNA 送達, 新井翔平, 服部喜之, 川野久美, 米持悦生

#### ⑨ Liposome Research Days 2014

2014 年 8 月 4-7 日, デンマーク, コッペンハーゲン, Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver, Y. Hattori, S. Arai, R. Okamoto, M. Hamada, K. Kawano, E. Yonemochi

#### ⑩第 30 回日本 DDS 学会学術集会

2014 年 7 月 30 -31 日, 東京, ポリグルタミン酸と正電荷リポプレックスの連続投与は肝臓ならびに肝臓転移がんに対して siRNA による遺伝子発現抑制を誘導する, 新井翔平, 服部喜之, 岡本遼, 濱田めぐみ, 川野久美, 米持悦生

#### ⑪日本薬剤学会 第 29 年会

2014 年 5 月 20 -22 日, 埼玉, 肝臓へ siRNA を送達するための負電荷ポリマー溶液と正電荷リポプレックスの連続投与方法の開発, 新井翔平, 服部喜之, 岡本遼, 濱田めぐみ, 川野久美, 米持悦生

[その他]

ホームページ :<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/iryoyakuzai/hattori.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

服部 喜之 (HATTORI, Yoshiyuki)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 90350222