

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590045

研究課題名(和文)臨床応用可能な癌細胞特異的全身投与型 siRNA デリバリーシステムの構築

研究課題名(英文) Design and evaluation of cancer cell-specific and systemic siRNA delivery system that clinical application is available for

研究代表者

有馬 英俊 (ARIMA, HIDETOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：50260964

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

研究成果の概要(和文)：我々が新規に開発した siRNA キャリアである  $\alpha$ -シクロデキストリン/デンドリマー結合体(G4)に、がん選択性素子である PEG 化葉酸を修飾した Fol-P C (G4, DSF2) は、 $\alpha$ -CDE (G4) や Fol-PEG C (G3) と比較して、安定性および血中滞留性に優れる癌細胞選択的な全身投与型核酸医薬キャリアとして有用であることが示唆された。今後、Fol-P C (G4, DSF2) を基盤分子として、各種機能性素子を修飾した腫瘍環境応答型 siRNA 放出システムや、抗癌剤と核酸医薬との共デリバリーシステムを構築することにより、臨床応用可能な新規がん治療システムを開発する予定である。

研究成果の概要(英文)：Fol-PEG- $\alpha$ -CDE (G4) which newly adorned pegylated folate as a cancer cell-selective moiety in  $\alpha$ -cyclodextrin/dendrimer conjugate ( $\alpha$ -CDE (G4)) which was the new siRNA carrier developed by us is likely to be useful for as the novel cancer specific and systemic siRNA carrier which has potent stability and blood retention, compared to  $\alpha$ -CDE (G4) and Fol-PEG- $\alpha$ -CDE (G3). We are going to build the novel cancer treatment system which has more potent efficacy and safety in clinical use by constructing the cancer environment-responsible siRNA releasing system appended various functional groups and a co-delivery system of the nucleic acid drug with an anticancer drug, based on Fol-PEG- $\alpha$ -CDE (G4).

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：シクロデキストリン デンドリマー siRNA 腫瘍特異的 葉酸受容体 RNAi 効果 安全性 抗腫瘍効果

## 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、オリジナル化合物である PAMAM デンドリマー/ $\alpha$ -シクロデキストリン 結合体 ( $\alpha$ -CDE) が培養細胞系においてデンドリマー単独に比べて約 100 倍高い遺伝子発現を示し、その要因として  $\alpha$ -CDE 分子中の  $\alpha$ -シクロデキストリン ( $\alpha$ -CyD) によるエンドソーム膜破壊効果の関与を明らかにし、また、 $\alpha$ -CDE は市販の遺伝子導入試薬に比べて細胞障害性が極めて低く、遺伝子導入効率および安全性に優れたキャリアであることを報告した (Arima et al., *Bioconj. Chem.*, 2001, 2002, 2003)。次に我々は、 $\alpha$ -CDE が核内よりも細胞質に留まる性質を有することから、DNA よりむしろ siRNA キャリアとして優れた性質を有することを明らかにした (Tsutsumi et al., *J. Control. Release*, 2007; *J. Pharm. Sci.*, 2007)。加えて、我々は細胞選択的な遺伝子導入キャリアの開発を企図して、ガラクトシル化  $\alpha$ -CDE (Wada et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2005)、マンノシル化  $\alpha$ -CDE (Wada et al., *J. Control. Release*, 2005; Arima et al., *J. Control. Release*, 2006)、ラクトシル化  $\alpha$ -CDE (Arima et al., *J. Control. Release*, 2010) および PEG 化葉酸修飾  $\alpha$ -CDE (Fol-P $\alpha$ C) (Yoshimatsu et al., *Proc. 14th Int. Cyclodextrins Symposium*, 2008) を構築してきた。また我々は、徐放性を有するキャリアシステムの構築を目的に、PEG 鎖との相互作用により難水溶性の超分子複合体を形成する  $\alpha$ -CyD を PEG 化  $\alpha$ -CDE (PEG- $\alpha$ -CDE) に添加することにより、PEG- $\alpha$ -CDE/ $\alpha$ -CyD 超分子複合体が調製できること、その超分子複合体が siRNA 徐放性担体として有用であることを世界で初めて明らかにした。そこで、我々はこの超分子システムを Fol-P $\alpha$ C (Generation 3, G3) に応用する計画を用意していた。しかし、我々のこれまでの検討結果から、Fol-P $\alpha$ C (G3)/siRNA 複合体を担癌マウスに静脈内投与後の RNAi 効果は十分とは言えず、かつその効果の再現性が低いことが問題点として浮かび上がった。その原因として、Fol-P $\alpha$ C 分子は、異なる置換度の Fol-PEG 基および  $\alpha$ -CyD 基を有する混合物であるため、その分子構造がロット間で相違したためと推定された。実際、siRNA の臨床応用を実現するためには、Fol-P $\alpha$ C 分子の精密な構造解析、合成の再現性、PEG 化葉酸や  $\alpha$ -CyD の置換度の異なる混合物ではなく、整数倍の置換度を有する単一置換度 Fol-P $\alpha$ C (sFol-P $\alpha$ C) の単離およびそれらの化学的・物理的性質の規格化、さらには保存時における化学的安定性などが保証される必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血中でキャリアと siRNA が解離せず、安定な複合体として腫瘍組織お

よび癌細胞へ到達可能なキャリアの構築を企図し、 $\alpha$ -CDE に、癌細胞指向性素子である PEG 化葉酸を新たに修飾した Fol-PEG- $\alpha$ -CDE (Fol-P $\alpha$ C (G4)) の siRNA キャリアとしての性能を向上させ、臨床応用可能な全身投与型癌細胞選択的キャリアを構築することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規 Fol-P $\alpha$ C の合成とそれらの物理化学的性質の解析

我々は血中でキャリアと siRNA が解離せず、安定な複合体として腫瘍組織および癌細胞へ到達可能なキャリアの構築を企図し、デンドリマーの世代を第 3 世代から第 4 世代に変更し、従来よりも siRNA との相互作用が強い Fol-P $\alpha$ C (G4) の合成を行った。その際、siRNA との相互作用が強く、葉酸レセプター (FR) との親和性の高い Fol-P $\alpha$ C (G4) を選択するために、PEG 化葉酸の置換度 (DSF) の異なる 4 種の Fol-P $\alpha$ Cs (G4, DSF2, 4, 6, 11) を調製した。次に、アガロースゲル電気泳動を用いて調製した Fol-P $\alpha$ Cs (G4) と siRNA との相互作用について検討した。また、Fol-P $\alpha$ C (G4)/siRNA 複合体の $\zeta$ -電位、粒子径について動的光散乱装置を用いて測定した。

### (2) 培養細胞系における siRNA による遺伝子発現抑制効果の検討

各種 Fol-P $\alpha$ Cs (G4) と siRNA との複合体を調製し、pGL3 ルシフェラーゼ過性発現細胞である KB 細胞 (葉酸レセプター (FR) 高発現)、A549 細胞 (FR 低発現) に pGL3 siRNA/各種キャリア複合体をトランスフェクション後のルシフェラーゼ活性についてルミノメータを用いて測定した。なお、コントロールとして pGL2 siRNA を用いた。次に、KB 細胞で活性化している癌遺伝子 PLK1 遺伝子に対する siRNA と各種 Fol-P $\alpha$ C との複合体を調製し、細胞にトランスフェクション後の遺伝子発現をリアルタイム PCR、Western blot にて確認した。また、レセプター依存的な RNAi 効果を明らかにするために、RNAi 効果に対する競合阻害実験を競合剤として葉酸を用いて行った。さらに、血液中でも複合体が安定に存在することを確認するため、血清存在下での RNAi 効果についても検討を行った。

### (3) 細胞への siRNA の取り込みおよび細胞内動態

蛍光ラベル化 siRNA と Fol-P $\alpha$ C (G4) との複合体を調製し、KB 細胞へ添加後の siRNA の取り込みについて、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡を用いて検討した。また、レセプター依存的な細胞内取り込みを明らかにするために、細胞内取り込みに対する競合阻害実験を競合剤として葉酸を用いて行った。

#### (4) 担癌マウスに静脈内投与後の TRITC ラベル化 Fol-PαC (G4) 及び FITC ラベル化 siRNA の体内動態

TRITC-Fol-PαC (G4)/FITC-siRNA 複合体を担癌マウスの尾静脈に投与後の血漿中 TRITC および FITC の蛍光を蛍光プレートリーダーにて定量し、Fol-PαC (G4)/siRNA 複合体の血中滞留性について評価した。また、静脈内投与後の複合体の体内動態は、各臓器を摘出し、蛍光プレートリーダーを用いて定量することにより検討した。

#### (5) 担癌マウスにおける *in vivo* RNAi 効果

pGL3 ルシフェラーゼ安定発現細胞である Colon-26 細胞を移植した担癌マウスに Fol-PαC (G4)/pGL3 siRNA 複合体を静脈内投与 24 時間後、腫瘍を回収し、腫瘍中ルシフェラーゼ活性についてルミノメータを用いて測定することにより、検討した。

#### (6) *In vitro* および *in vivo* 安全性試験

各種キャリア/siRNA 複合体を KB 細胞にトランスフェクション後の細胞毒性を WST-1 法によりマイクロプレートリーダーにて測定した。また、Fol-PαC (G4)/siRNA 複合体によるインターフェロン応答誘導の有無を確認するため、複合体を KB 細胞に添加後の IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA レベルをリアルタイム PCR により定量した。さらに、*in vivo* における Fol-PαC (G4)/siRNA 複合体の安全性を確認するため、複合体を担癌マウスに静脈内投与後の血液生化学検査値の測定を行った。

### 4. 研究成果

我々は初めに、血中でキャリアと siRNA が解離せず、安定な複合体として腫瘍組織および癌細胞へ到達可能なキャリアの構築を企図し、 dendrimer の世代を第 3 世代から第 4 世代に変更し、従来よりも siRNA との相互作用が強い Fol-PαC (G4) の合成を行った。コア分子の  $\alpha$ -CDE (G4) に対する PEG 化葉酸の添加量を調節することにより、DSF の異なる 4 種の Fol-PαCs (G4, DSF2, 4, 6, 11) の調製を確認した。調製した Fol-PαCs (G4) のうち、Fol-PαC (G4, DSF2) と siRNA との相互作用が最も強く、さらに、*in vitro* における RNAi 効果を検討したところ、Fol-PαC (G4, DSF2) が最も優れた RNAi 効果を誘導した。これらのことから、Fol-PαC (G4) の最適 DSF 値は 2 であることが示唆され、以降は Fol-PαC (G4, DSF2) を用いて検討を行った。

次に、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体の物理化学的性質について検討した。本複合体の平均粒子径は約 148 nm であり、FR を介したエンドサイトーシスに適した粒子径

であることが示唆された。そこで、競合阻害剤である葉酸を添加した際の、FR 高発現 KB 細胞における本複合体の細胞内取り込みおよび RNAi 効果について検討したところ、その効果は有意に減弱した。これらの結果より、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は FR 依存的に細胞内に取り込まれ RNAi 効果を誘導することが示唆された。また、本複合体は 18.4 mV と正電荷の  $\zeta$ -電位を示したことから、血清成分との相互作用が懸念されたため、血清存在下での RNAi 効果について検討した。Fol-PαC (G3)/siRNA 複合体は、50% 血清存在下で RNAi 効果は誘導できなかったのに対し、(G4) 複合体は有意な RNAi 効果を誘導した。このことから、(G4) 複合体は (G3) 複合体よりも血清耐性能が高いことが示唆された。

次に、担癌マウス静脈内投与後の Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体の血中滞留性について検討を行った。その結果、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は、Fol-PαC (G3)/siRNA 複合体と比較して約 7 倍長い血中半減期を示した。この理由として、 dendrimer の世代数の増大により、siRNA とより安定なナノ粒子を形成し、血中での複合体の解離の抑制や血清耐性能の向上が起こったことが考えられる。また、その際の Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体の臓器移行性について検討したところ、他の臓器と比較して腫瘍への移行量が最も高かった。このことから、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は腫瘍選択的に集積可能なことが示唆された。しかしながら、複合体の一部は肝臓などで検出され、これには、複合体がカチオン性の粒子であるため、細網内皮系に認識されたことが関与していると考えられる。今後、より腫瘍選択性を高めるために、粒子の電荷を中性付近に近づけるなど工夫が必要である。

前節までに、*in vitro* 条件下、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は配列特異的な RNAi 効果を示すこと、さらに静脈内投与後、腫瘍に集積することが示唆された。そこで次に、担癌マウスに Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体を静脈内投与後の *in vivo* RNAi 効果について検討した。図 1 に示すように、Fol-PαC (G3)/siGL3 複合体ではコントロールと比較して有意なルシフェラーゼ活性の減少が観察されなかったのに対し、Fol-PαC (G4, DSF2)/siGL3 複合体ではコントロールと比較して有意なルシフェラーゼ活性の減少が観察された。このことより、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は、*in vivo* においても、RNAi 効果を誘導可能であることが示唆された。

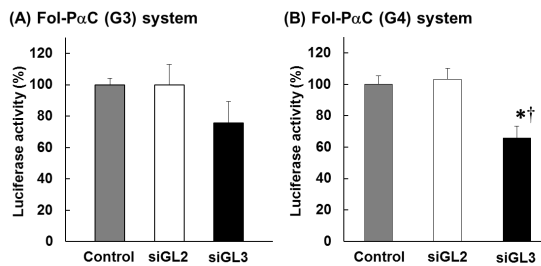


図 1 *In vivo* RNAi 効果

次に、Fol-PαC (G4, DSF2) の安全性について、*in vitro* および *in vivo* において検討を行った。まず初めに、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体の細胞障害性を WST-1 により検討した。デンドリマー (G4)/siRNA 複合体および α-CDE (G4)/siRNA 複合体は、チャージ比 50 以上で顕著な細胞障害性を示したのに対し、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体は、チャージ比 100 においても細胞障害性を示さなかった。また、Fol-PαC (G4, DSF2)/siRNA 複合体によるインターフェロン応答誘導の有無を確認するため、複合体を KB 細胞に添加後の IFN-α, IFN-β, TNF-α mRNA レベルを定量したところ、いずれの値の上昇も確認されなかった。さらに、*in vivo* における安全性を検討するため、本複合体を担癌マウス静脈内投与後の血液生化学検査値を測定した結果、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。これらのことから、Fol-PαC (G4, DSF2) は安全性に優れたキャリアであることが示唆された。

最後に、Fol-PαC (G4, DSF2) の siRNA デリバリーによる癌治療を企図し、癌遺伝子である PLK1 に対する siPLK1 を用いた検討を行った。KB 細胞に Fol-PαC (G4, DSF2)/siPLK1 複合体をトランスフェクション後 24 時間における PLK1 mRNA およびタンパク質レベルを定量したところ、そのレベルは未処理群と比較して有意に減少した。またその際の、本複合体の殺細胞効果について検討したところ、未処理群と比較して、細胞生存率を約 40% 抑制した。これらの結果から、Fol-PαC (G4, DSF2)/siPLK1 複合体は、*in vitro* において細胞死を誘導可能であることが示唆された。

以上述べたように、Fol-PαC (G4, DSF2) は、Fol-PαC (G3) と比較して、安定性および血中滞留性に優れた癌細胞選択的な全身投与型核酸医薬キャリアとして有用であることが示唆された。今後、各種機能性素子を修飾することによる腫瘍環境応答型 siRNA 放出システムの開発や、抗癌剤と核酸医薬との共デリバリーシステムを構築することで、より癌細胞選択性および抗腫瘍効果に優れたシステムへと展開する予定である。

## 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2件)

Arima H, Yoshimatsu A, Ikeda H, Ohyama A, Motoyama K, Higashi T, Tsuchiya A, Niidome T, Katayama Y, Hattori K, Takeuchi T. Folate-PEG-appended Dendrimer Conjugate with α-Cyclodextrin as a Novel Cancer Cell-selective siRNA Delivery Carrier, *Mol. Pharm.*, 9(9), 2591-2604 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1021/mp300188f

Arima H, Arizono M, Higashi T, Yoshimatsu A, Ikeda H, Motoyama K, Hattori K, Takeuchi T, Hirayama F, Uekama K. Potential Use of Folate-polyethylene glycol (PEG)-Appended Dendrimer (G3) Conjugate with α-Cyclodextrin as DNA Carriers to Tumor Cells, *Cancer Gene Ther.*, 19(5), 358-366 (2012). (査読有)  
DOI: 10.1038/cgt.2012.9

[学会発表](計19件)

発表者名: 大山歩務  
PEG 化葉酸修飾デンドリマー/α-シクロデキストリン結合体 (G4) による腫瘍細胞選択的 siRNA デリバリー、日本薬学会 第 134 年会、熊本市総合体育館、3/27-30 (2014).

発表者名: 有馬英俊  
Folate-PEG-appended dendrimer (G4) conjugate with α-cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA carrier, 5th Asian Arden Conference, Aichi Gakuin Daigaku University, Japan, Aug 5-6 (2013).

発表者名: 大山歩務  
Preparation and Evaluation of Folate-PEG-appended Dendrimer (G4) Conjugate with α-cyclodextrin as a Cancer Cell-selective siRNA Carrier, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii, USA, Jul 21-24 (2013).

発表者名: 大山歩務  
PEG 化葉酸修飾デンドリマー/α-シクロデキストリン結合体 (G4) によるがん細胞選択的 siRNA デリバリー、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ、7/4-5 (2013).

発表者名: 大山歩務  
PEG 化葉酸修飾デンドリマー/α-シクロデキストリン結合体 (G4) による血中安定性および腫瘍選択性に優れた siRNA デリバリー、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台市民会館、9/24-26 (2012).

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://seizai.pharm.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 英俊 (ARIMA, Hidetoshi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：50260964

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

本山 敬一 (MOTOYAMA, Keiichi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：50515608