

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893001

研究課題名(和文)腫瘍血管へのsiRNA送達システムの構築：細胞内動態と体内動態の最適化

研究課題名(英文)Development of siRNA delivery system tot tumor vesssels: optimization of intracellular trafficking and pharmacokinetics

研究代表者

櫻井 遊 (Sakurai, Yu)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・その他

研究者番号：00707234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんは自身の成長のために栄養の供給を担う血管の増殖が必要不可欠である。私はがんの血管内皮細胞に治療用の核酸を送達するシステム(RGD-MEND)の構築を行った。RGD-MENDはsiRNAを内封したリポソーム状ナノキャリアに腫瘍の血を認識するcyclic RGDペプチドを表面提示させている。RGD-MENDを用いて腫瘍の血管内皮細胞に増殖を抑制する核酸を送達したところ、腫瘍の成長を有意に抑制させた。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is indispensable for a progression of cancer via a supplement with oxygen and nutrients. I developed a nanocarrier for delivering small interfering RNA (siRNA) to tumor endothelial cells (TECs). I called the carrier "RGD-MEND". SiRNA is encapsulated in lipid envelope of RGD-MEND, and further cyclic RGD, which recognize TECs, is displayed on the surface of RGD-MEND. When the formulated siRNA to inhibit a growth of TECs was administered into tumor bearing-mice via the tail vein, tumor growth was significantly inhibited. In addition, mRNA expression level or the target gene was reduced by siRNA injection.

研究分野：薬物送達学

キーワード：siRNA リポソーム アクティブターゲティング 血管新生阻害療法 がん治療

1. 研究開始当初の背景

がんは本邦において、長年に亘って死因の第一位を占めているものの未だ根本的治療法の存在しない疾患の一つである。がんが 2 mm 以上に成長するためには、酸素や栄養の供給を担う血管の新生が必要であるという概念が提唱され、腫瘍の異常な血管新生を止めることによりがんを治療する血管新生阻害療法が注目されている。しかしながら、現在までに開発されている血管新生阻害剤は全身に送達されることで生体のホメオスタシスにも関わる血管新生経路をも抑制してしまうことで、消化管穿孔や動脈血拴塞症など時に重篤な副作用を引き起こすことが問題となっていた。このことから、より安全で効果的な血管新生阻害療法の確立には、腫瘍の血管にのみ薬剤を送達するシステムの開発は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

上記のような背景の中、私は新規の治療用分子である small interfering RNA (siRNA) を目的の臓器に送達するシステムの開発を行ってきた。siRNA は体内ですぐに分解されてしまうこと、また細胞膜透過性に乏しいことからそのままの形で静脈内投与しても効果はない。そこで、私の所属する研究室では siRNA を脂質二重膜内に内封し、表面に機能素子を修飾可能な多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multi functional envelop type nano-device; MEND) の開発を進めている。これまでに新規の脂質として、細胞内の pH 変化に応答して膜融合性を発揮するカチオン性脂質 (YSK05) の設計に成功している (Sato Y et al., J Control Release 2012)。腫瘍組織は上述したように血管新生が他の臓器では見られないほど盛んであることから、血管に間隙やフェネストラと呼ばれる空孔を有しているなど歪な構造を有している。血中滞留性を持たせた高分子が静脈内投与されると、この脆弱な血管構造により腫瘍組織内へと漏れ出すことが知られている。これまでに、この性質を利用して受動的に siRNA を腫瘍組織に送達するシステムの構築に成功している (Sakurai Y et al., Mol Ther)。こうした所謂 "Passive targeting" には多くのグループが成功しているものの、標的化リガンドと呼ばれる機能素子により細胞を積極的に認識し、薬剤を到達するいわば "Active targeting" の成功例は未だ少ない。

そこで、本研究では MEND に対して腫瘍の血管内皮細胞 (tumor endothelial cells; TECs) を認識するリガンドを標識することで、腫瘍の血管内皮細胞特異的に siRNA を送達するシステムの構築を目標とする。

3. 研究の方法

cyclic RGD (cRGD) は腫瘍の血管内皮細胞に発現している $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを認識するリガンドとして、これまでがんの撮像

などに用いられてきた。ここでは、cRGD で MEND を修飾することで、TECs 選択的に siRNA を送達可能なシステム (RGD-MEND) の構築に着手する (図 1)。

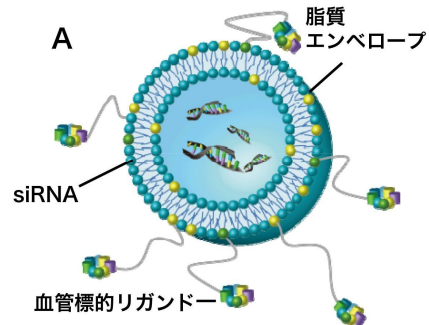


図1 RGD-MENDの模式図。siRNAがリボソームによって覆われた構造を有しており、表面には機能素子を備えている。

まず、cRGDをMEND表面に提示させるために、cRGDとPEG脂質をアミド結合で結合させた誘導体の合成を行った。リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で活性カルボン酸を頭部に有するPEG脂質と cyclo (Arg-Gly-Asn-D-Phe-Lys) を混合し、24時間室温でインキュベートした。24時間後反応溶液を透析に供することで、未反応のcRGDペプチドの除去を行った。なお、誘導体の合成の確認は matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOS-MS) により行った。cRGDの分子量が603であり、反応後に元のPEG脂質より分子量がおよそ600大きい分子イオンピークを確認した (図2)。

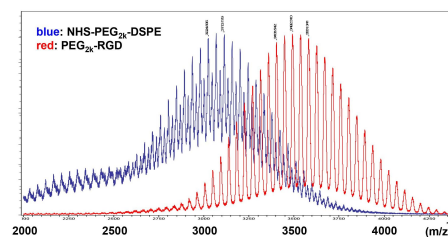


図2 合成した誘導体のMALDI TOF-MSの結果。青は反応前、赤は反応後を示している。

MENDへの修飾は、上記で合成した誘導体とMENDを60、30分インキュベートすることにより行った。RGD修飾量最適化の為に、0%、1.0%、2.5%、5.0%、10%修飾したものの比較を行った。動的光散乱法により粒子の大きさを測定したところ、全て粒子径は100 nm前後で粒子の表面電位を表すゼータ電位に違いは見られなかった。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの陽性、陰性細胞としてそれぞれヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) およびヒト胎児腎線維芽細胞 (HEK293T) を用いた。先ほど調製した各RGD密度の

RGD-MEND を蛍光脂質 DiD で標識し、各細胞と 2 時間インキュベートしたのちの細胞内取り込み量を測定した。その結果、HUVEC 細胞を用いた場合には 5% と 10% 修飾した場合に有意な取り込みの上昇が認められた。一方で、HEK293T 細胞ではこうした上昇は見られなかった。これらのことから、5% 修飾で十分な取り込みが認められると判断し、以降は 5% 修飾のものを用いた。

次に、siRNA 送達効率の上昇を評価するため、polo like kinase 1 (PLK1) に対する siRNA を RGD-MEND に内封し、細胞外に添加 24 時間後の PLK1 発現量を定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) 法により測定した。その結果、HUVEC 細胞において投与量依存的な PLK1 のノックダウンが観察された(図 3)。一方で、HEK293T 細胞では、この投与量において活性の向上は見られなかった。

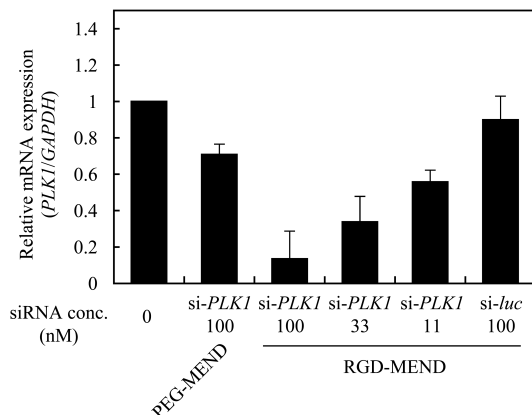


図 3 RGD-MEND による in vitro 培養細胞でのノックダウン効果。HUVEC 細胞にトランスフェクションして 24 時間後に標的遺伝子である PLK1 の発現量を qRT-PCR 法で測定した。

次に、in vivo 担癌モデルマウスを用いた検討を進めた。ヒト腎細胞がん OS-RC-2 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植したモデルに対して RGD-MEND に血管内皮細胞成長因子受容体 2 (VEGFR2) に対する siRNA を内封し、投与を行った。投与から 24 時間後に腫瘍を摘出し、qRT-PCR 法により標的の VEGFR2 の発現量を測定した。その結果、4.0 mg siRNA/kg bodyweight を投与した群では、有意な遺伝子発現の抑制が認められた。さらに、この遺伝子抑制が非特異的なものではないことを示すために rapid amplification of 5' cDNA end PCR 法 (RACE-PCR 法) により、siRNA により切断を受けたと考えられる mRNA 断片の検出を試みた。その結果、4.0 mg/kg を投与した群において、明確に切断を示すバンドが得られた。これらの結果は、RGD-MEND が in vivo のマウスモデルにおいても siRNA を効率的に送達できたことを示すものである。

最後に治療効果の検証を行った。

VEGFR2 の抑制は、血管新生の抑制により腫瘍の退縮に繋がることが報告されている。そこで、RGD-MEND に VEGFR2 に対する siRNA を搭載し、3.0 mg/kg で週に 3 回マウスに静脈内投与を行い、その後の腫瘍の成長の経過観察を行った。その結果、VEGFR2 に対する siRNA を搭載した RGD-MEND を投与した場合に、腫瘍の成長の抑制が認められた(図 4)。一方で、コントロールの siRNA を搭載した群では、遺伝子抑制が認められなかったことから、この腫瘍の成長抑制は VEGFR2 の抑制によるものであることが示唆された。

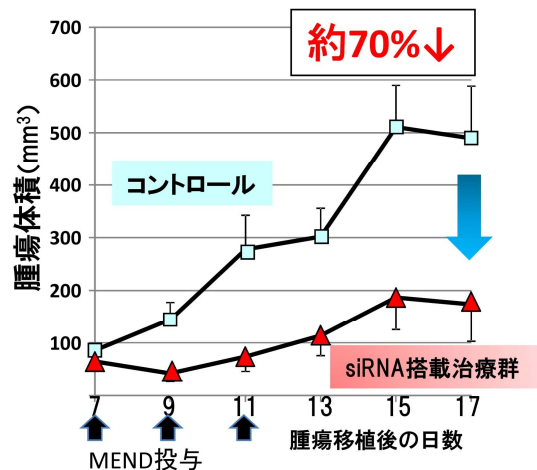


図 4 RGD-MEND による抗腫瘍効果。腫瘍を移植してから 7、9、11 日目に MEND を投与し、随時的に腫瘍体積の測定を行った。

4. 研究成果

本研究の推進により、TECs 選択的に siRNA を送達可能なシステムの構築に成功した。これまでに TECs においてノックダウンを直接的に報告した例は皆無であり、新規性の高い研究であると言える。また、Active targeting 技術の確立により、今後はリガンドを変更するのみでべつの目的細胞に siRNA を送達することが可能なシステムの構築に繋がることが期待される。

今後は、腫瘍の血管を標的とする本システムと別の両方を組み合わせることにより、より効率的な新規のがん治療法の開発へと展開していく予定である。

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 6 件)

- 1) **Sakurai Y**, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA

- system. **J Control Release.** 173: 110-118 (2014)、査読有り
- 2) Ara N, Matsuda T, Hyodo M, **Sakurai Y**, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H. An aptamer ligand based liposomal nanocarrier system that targets tumor endothelial cells, **Biomaterials.** 35(25): 7110-7120 (2014)、査読有り
 - 3) **Sakurai Y**, Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. Improvement of doxorubicin effect using liposomal anti-polo like kinase 1 siRNA in human renal cell carcinomas, **Mol Pharm.** 11(8): 2713-9 (2014)、査読有り
 - 4) Ara N, Matsuda T, Hyodo M, **Sakurai Y**, Ohga N, Hida K, Harashima H. The construction of an aptamer modified liposomal system targeted to tumor endothelial cells, **Biol Bull Pharm**, 37(11):1742-9 (2014)、査読有り
 - 5) Afsana A, Hayashi Y, **Sakurai Y**, Ohga N, Hida K, Harashima H. Ligand density at the surface of a nanoparticle and different uptake mechanism: two important factors for successful siRNA delivery to liver endothelial cells, **Int J Pharm.** 475(1-2): 227-237 (2014)、査読有り
 - 6) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, **Sakurai Y**, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Rice NC, Harashima H, Kohara M, Takana Y, Takaoka A, RIG-I dually functions as an innate sensor and as a direct antiviral factor for hepatitis B virus, **Immunity**, 20(42):123-132 (2015)、査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 櫻井遊、畠山浩人、秋田秀万、大賀則孝、樋田京子、原島秀吉.” 腫瘍血管内皮細胞へのアクティブターゲティング型 siRNA デリバリーシステム ”、第 23 回アンチセンスシンポジウム、2013

年 11 月 28-29 日、徳島、徳島大学大塚講堂 (口頭発表)

- 2) 櫻井遊、畠山浩人、佐藤悠介、兵藤守、秋田英万、大賀則孝、樋田京子、原島秀吉.” 腫瘍血管内皮細胞への in vivo siRNA 導入法の確立 ”、第 21 回日本血管生物医学会、2013 年 9 月 26-28 日、大阪、千里中央ホテル (口頭発表)
- 3) **Sakurai Y**, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. “Development of an in vivo Active siRNA Delivery System to Tumor Endothelial Cells using Cyclic RGD-modified Liposomal siRNA”, 9 th Annual Meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society, October 6-8th 2013, Italy, Napoli, Royal Continental Hotel (ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
櫻井 遊 (SAKURAI, Yu)

北海道大学 大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号：00707234