

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08251

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸とsiRNAリポプレックスの連続投与による肝転移がん治療

研究課題名(英文)Development of siRNA therapy for liver-metastasized tumor by sequential intravenous injection of chondroitin sulfate and siRNA lipoplex

研究代表者

服部 喜之(Hattori, Yoshiyuki)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90350222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAリポプレックス投与直前にコンドロイチン硫酸を投与する連続投与法を用いて効果的に肝転移がんの治療を行うために、連続投与法に用いる正電荷リポソームの正電荷脂質の違いにより肝転移がんへのsiRNA送達や抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討を行った。その結果、連続投与に用いる正電荷リポソーム製剤の正電荷脂質の違いにより、肝臓へのsiRNAの集積性や遺伝子発現抑制効果が異なることが判った。また、siRNAの効果の高い正電荷リポソームを用いて連続投与法により肝転移がんに対する抗腫瘍効果を調べたところ、肝臓へのがんの転移が抑制できることが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短鎖二本鎖RNA (siRNA)は、配列特異的に遺伝子の発現を抑制できることから、siRNAを利用した肝転移がんなどの難治性疾患に対する創薬開発が期待されているが、標的組織にsiRNAを送達することが困難であった。そこで肝転移がんに対するsiRNAの送達法として、siRNAと正電荷リポソームの複合体 (siRNAリポプレックス) 投与直前にコンドロイチン硫酸を投与する連続投与法を開発し、連続投与に用いる正電荷リポソーム製剤の正電荷脂質の違いによりsiRNAの効果が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that intravenous injection of chondroitin sulfate (CS), followed by intravenous injection of cationic liposome/siRNA complex (siRNA lipoplex) could deliver siRNA into the liver metastasis. In this study, we examined the effects of the type of cationic lipid in the liposome on siRNA delivery into the liver and liver metastasis. We prepared 17 types of cationic liposomes to evaluate the gene-silencing effect of siRNA in mouse liver following sequential injection of CS plus siRNA lipoplex. In 14 types of cationic liposomes, siRNA was accumulated in the liver when siRNA lipoplexes were injected immediately after CS. However, suppression of targeted mRNA expression in the liver after sequential injection of CS plus siRNA lipoplex were observed in only 3 types of cationic liposomes. Furthermore, sequential injection of PKL1 siRNA or HSF1 siRNA lipoplexes into mice with liver HeLa metastasis could suppress tumor growth.

研究分野：薬剤学

キーワード：siRNA 正電荷リポソーム がん治療 肝転移がん コンドロイチン硫酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、短鎖二本鎖 RNA (siRNA) が配列特異的に遺伝子の発現を抑制できることから、siRNA を利用した難治性疾患に対する創薬開発が期待されている。しかしながら、siRNA は水溶性の高分子のため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 を標的細胞に送達することは非常に困難である。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、正電荷リポソーム製剤を用いたリポフェクション法であるが、siRNA と正電荷リポソームの複合体 (siRNA リポプレックス) を静脈内投与すると、赤血球などの血液成分と凝集体を形成し、投与数分以内に肺の毛細血管に捕捉されるため、投与した siRNA は肺にしか集積しない。この問題を解決するために、siRNA リポプレックス静脈内投与直前に負電荷ポリマーを投与することで、血液中で siRNA リポプレックスと血球成分との凝集を抑制し、肺での集積性を減少させ、肝臓や肝転移がんにも siRNA リポプレックスを送達できる連続投与法を開発した。

### 2. 研究の目的

連続投与法に用いる最適な負電荷ポリマーについて検討したところ、ヒアルロン酸、フコイダン、ヘパリンを用いた場合では、連続投与法により siRNA リポプレックスを肝臓へ集積させることができないこと、ポリグルタミン酸を用いた場合は、炎症性サイトカインの惹起や肝障害などが生じることなどから、連続投与法に用いる最適な負電荷ポリマーは、安全性が高く、効率的に肝臓や肝転移がんにも siRNA を送達できるコンドロイチン硫酸 (CS) であることを見出した。しかしながら、連続投与法により高い siRNA の効果を誘導できる正電荷リポソーム組成については詳細に検討していなかった。そこで、CS と siRNA リポプレックスの連続投与により、siRNA を効率よく肝転移がんにも siRNA を送達し、高い抗腫瘍効果を誘導できるリポソーム組成を調べるため、正電荷脂質として 6 種類の正電荷コレステロール誘導体と 11 種類の正電荷アルキル鎖脂質を用いて、17 種類の正電荷リポソーム製剤を調製し、CS との連続投与により、高い siRNA の効果を誘導できるかどうか検討した。さらに、最も効果の高い正電荷リポソーム組成を用いて、連続投与法による肝転移がんに対するがん転移抑制効果も調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 正電荷リポソームと siRNA リポプレックスの調製

正電荷コレステロール誘導体として、OH-Chol、OH-C-Chol、DMAPC-Chol、HAPC-Chol、MHAPC-Chol、DMHAPC-Chol を用いた (図 1)。また、正電荷アルキル鎖脂質として、DOTAP、DC-1-14、DC-1-16、DC-1-18、DC-2-12、DC-3-18D、DC-6-14、DC-9-18L、DC-12-16L、DC-13-14L、TC-1-12 を用いた (図 2)。正電荷リポソームは、正電荷脂質と DOPE を用いて薄膜法により調製した。siRNA リポプレックスは、正電荷リポソームと siRNA を混合して調製した。各正電荷リポソーム製剤の名称は、正電荷脂質の名前の前に LP-を、また正電荷コレステロール誘導体においては -Chol を除いて命名した。

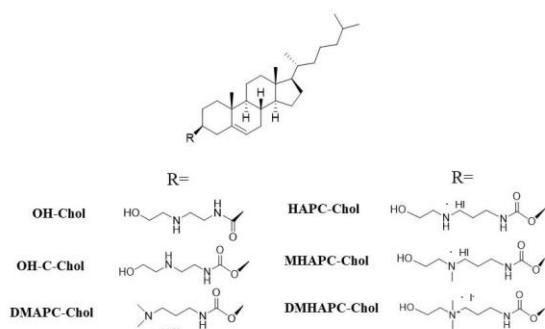


図1 本研究で用いた正電荷コレステロール誘導体の構造

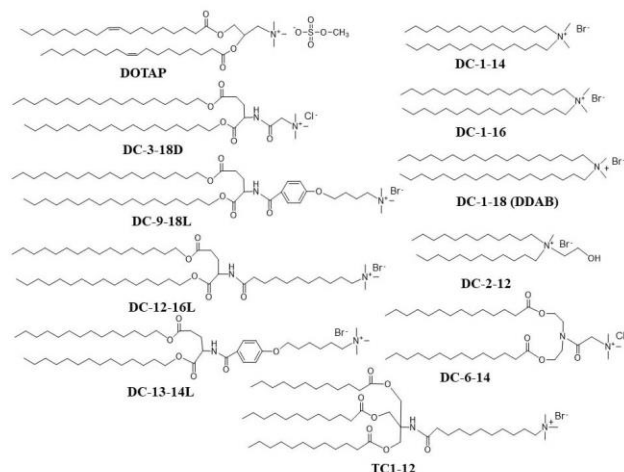


図2 本研究で用いた正電荷アルキル鎖脂質の構造

#### (2) CS 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  $\mu\text{g}$  の CS 添加後すぐに siRNA リポプレックス (2  $\mu\text{g}$  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。

#### (3) CS 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、各正電荷リポソームと 20  $\mu\text{g}$  の Cy5.5 標識 siRNA を混合して調製した。1 mg の CS 静注 1 分後に siRNA リポプレックスをマウスまたは肝転移モデルマウスに投

与した。投与1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 により調べた。

#### (4) CS と siRNA リポプレックス連続投与後の肝臓における遺伝子発現抑制効果

siRNA リポプレックスは、各正電荷リポソームと 50  $\mu$ g のコントロール siRNA (Cont siRNA) またはアポリポタンパク質 B siRNA (ApoB siRNA) を混合して調製した。マウスに 1 mg の CS と siRNA リポプレックスを連続投与した。投与 48 時間後に肝臓を摘出し、定量 PCR により ApoB mRNA 発現量を調べた。

#### (5) CS と siRNA リポプレックス連続投与後の肝臓がんに対する抗腫瘍効果

siRNA リポプレックスは、DOTAP とコレステロールの組成の正電荷リポソームと 50  $\mu$ g の Cont siRNA、polo-like kinase 1 (PLK1) siRNA または heat shock transcription factor-1 (HSF-1) siRNA を混合して調製した。HeLa 細胞を移植した肝臓がんマウスに、CS と siRNA リポプレックスを連続投与した (HeLa 細胞移植 8、10、12、14 日目、計 4 回)。最終投与 2 日後にがんが転移した肝臓を摘出して重量(mg)を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) CS 存在下での siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性

正電荷リポソームの正電荷脂質の違いにより、CS 存在下での siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性に違いがあるのかを調べた。その結果、いずれの正電荷リポソームにおいても、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 存在下では凝集体の形成が抑制された (図 3)。このことから、CS の静注直後に siRNA リポプレックスを投与すると、正電荷リポソームの違いに関わらず、赤血球との凝集を抑制できる可能性が示唆された。

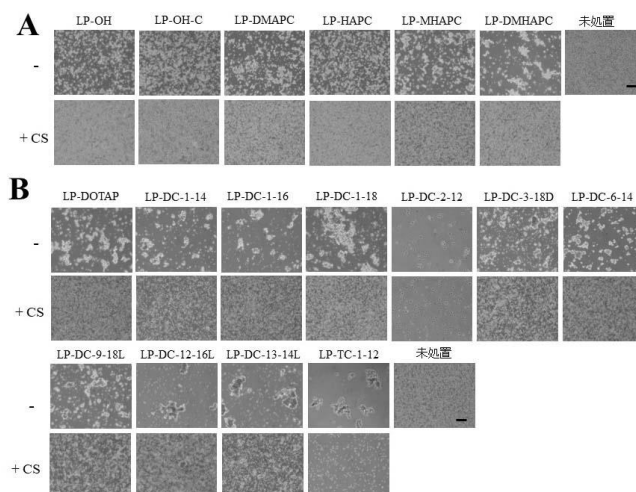


図3 CS存在下でのsiRNAリポプレックスと赤血球の凝集性 A: 正電荷コレステロール誘導体を用いたリポソーム、B: 正電荷アルキル鎖脂質を用いて調製したリポソーム。スケールバー= 100  $\mu$ m

#### (2) 連続投与後の siRNA のマウス生体内分布に及ぼす正電荷リポソーム組成の影響

連続投与方法における肝臓への siRNA の送達性に及ぼす正電荷リポソーム組成の影響を調べるために、CS 静注 1 分後に蛍光標識 siRNA リポプレックスを静注した。いずれの正電荷リポソームにおいても、CS との連続投与により肺での siRNA の集積性は減弱したものの、LP-DC-9-18、LP-DC-12-16、LP-DC-13-14 においては腎臓で高い siRNA の集積が観察された (図 4、5)。これは、血液中で CS によって siRNA がリポプレックスから遊離したことが原因であると考えられた。一方、その他のリポソームにおいては、肝臓で高い siRNA の集積性が観察された。

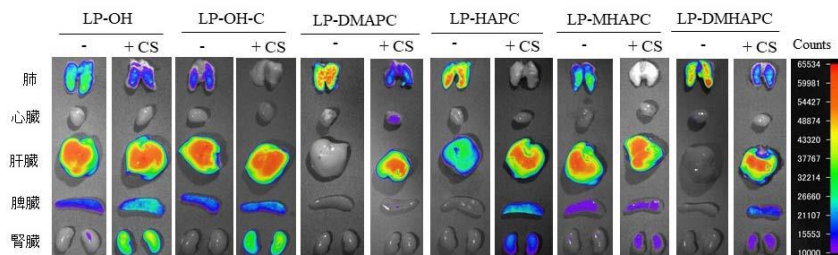


図4 CSとsiRNAリポプレックス連続投与1時間後のマウスにおけるsiRNAの生体内分布に及ぼす正電荷リポソーム組成の影響

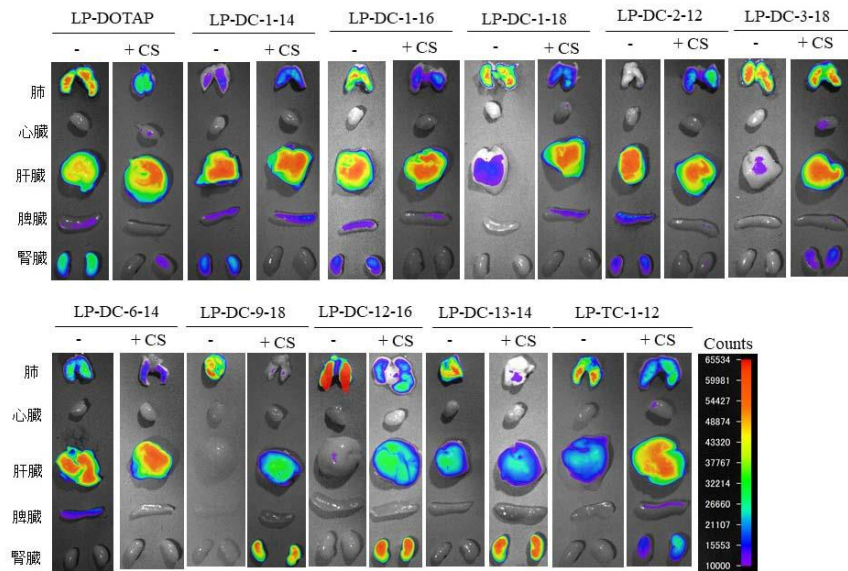


図5 CSとsiRNAリポプレックス連続投与1時間後のマウスにおけるsiRNAの生体内分布に及ぼす正電荷リポソーム組成の影響

### (3) CSとsiRNAリポプレックス連続投与後の肝臓における遺伝子発現抑制効果

CSとsiRNAリポプレックス連続投与法により肝臓に高い集積を示した正電荷リポソーム製剤を用いて、肝臓に集積したsiRNAが、標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができるか検討した。siRNAによる遺伝子発現抑制効果の検討に用いるマウスについては、使用するマウスの数が多いため、肝転移がんモデルマウスではなく、正常マウスを用いた。そして、Cont siRNAまたは肝臓での発現量が高いApoBに対するsiRNAを用いて調製したリポプレックスを連続投与した。正電荷コレステロール誘導体を用いた正電荷リポソームにおいては、CSとsiRNAリポプレックスの連続投与により、ApoB mRNAの発現抑制効果は観察されなかった(図6A)。一方、正電荷アルキル鎖脂質を用いた正電荷リポソームにおいては、正電荷リポソームとしてLP-DC-1-16、LP-DC-1-18、LP-TC-1-12を用いた場合、連続投与により肝臓でのApoB mRNAの発現量が有意に低下した(約20~30%の発現抑制)(図6B)。しかしながら、これまでにDOTAPとコレステロールから調製した正電荷リポソームを用いた場合では、連続投与により約40%程度の肝臓でのApoB mRNAの発現抑制効果が得られており、このリポソーム組成を上回る活性を示すリポソーム組成は今回検討したリポソーム組成の中からは見つからなかった。そのため、肝転移がんの治療においては、DOTAPとコレステロールからなる正電荷リポソーム製剤を用いた。

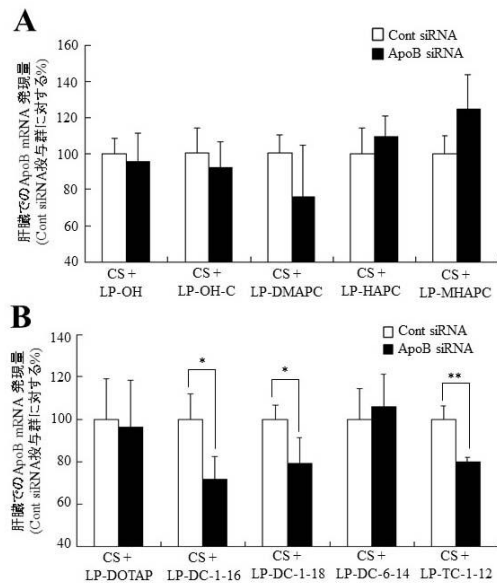


図6 CSとsiRNAリポプレックス連続投与後の肝臓における遺伝子発現抑制効果 A:正電荷コレステロール誘導体を用いたリポソーム、B:正電荷アルキル鎖脂質を用いて調製したリポソーム。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### (4) CS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。PLK1とHSF1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、これらの遺伝子に対するsiRNAを合成し、siRNA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・転移を抑制できるか検討した。まず、子宮頸がんHeLa細胞を移植した肝転移がんモデルにおいて、CSと蛍光標識siRNAの連続投与により、肝臓全体にsiRNAが集積することを確認した(図7A)。さらに、HeLa細胞を移植した肝転移がんマウスに、HSF-1またはPLK1 siRNAリポプレックスを連続投与したところ、がんが転移した肝重量の減少が見られた(図7B)。

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 の肝転移がんへの送達は、肝転移がんの治療に有効であることが明らかとなった。また、CS と siRNA リポプレックスの連続投与に用いる正電荷リポソーム組成の違いにより、肝臓への siRNA の集積性や遺伝子発現抑制効果が異なることも判った。今後も肝転移がんに対する siRNA の治療において、連続投与方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。

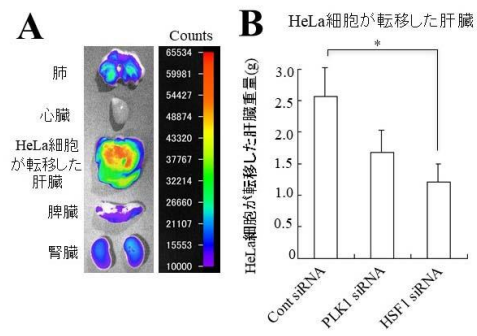


図7 HeLa肝転がんモデルマウスにおけるCSとsiRNAリポプレックス連続投与によるsiRNAの生体内分布(A)とPLK1またはHSF1 siRNAによる抗腫瘍効果(B)  
\* $P < 0.05$

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Hattori, T. Kikuchi, K. Ozaki, H. Onishi	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of in vitro and in vivo therapeutic anti-tumor efficacy of transduction of polo-like kinase 1 and heat shock transcription factor 1 small interfering RNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 4300-4306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2017.5060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Hattori, A. Nakamura, S. Hanaya, Y. Miyabe, Y. Yoshiike, T. Kikuchi, K. Ozaki, H. Onishi	4. 巻 41
2. 論文標題 Effect of chondroitin sulfate on siRNA biodistribution and gene silencing effect in mice after injection of siRNA lipoplexes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 401-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2017.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Hattori	4. 巻 1
2. 論文標題 Progress in the development of lipoplex and polyplex modified with anionic polymer for efficient gene delivery	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Genetic Medicine and Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 3-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.29328/journal.jgmt.1001002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Y. Hattori, N. Takeuchi, M. Nakamura, Y. Yoshiike, M. Taguchi, H. Ohno, K. Ozaki, H. Onishi,	4. 巻 48
2. 論文標題 Effect of cationic lipid type in cationic liposomes for siRNA delivery into the liver by sequential injection of chondroitin sulfate and cationic lipoplex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2018.09.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Hattori, M. Nakamura, N. Takeuchi, K. Tamaki, S. Shimizu, Y. Yoshiike, M. Taguchi, H. Ohno, K. Ozaki, H. Onishi	4. 巻 27
2. 論文標題 Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 217-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2018.1502775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Hattori, K. Tamaki, K. Ozaki, K. Kawano, H. Onishi	4. 巻 52
2. 論文標題 Optimized combination of cationic lipids and neutral helper lipids in cationic liposomes for siRNA delivery into the lung by intravenous injection of siRNA lipoplexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 1042-1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2019.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 服部喜之, 花屋志織, 宮鍋侑大, 中村文子, 尾崎恵一, 大西啓
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸とsiRNAリポプレックス連続投与後のマウス肝臓におけるsiRNAの集積性の検討
3. 学会等名 第17回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部喜之, 竹内のぞみ, 中村麻里, 大西啓
2. 発表標題 正電荷リポソームの正電荷脂質の違いによるsiRNAの遺伝子発現抑制効果およびマウス静注後のsiRNAの生体内分布への影響
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹内のぞみ, 服部喜之, 五十嵐康晃, 梅木優子, 大西啓
2. 発表標題 正電荷コレステロール誘導体を用いて調製したリボソーム製剤による肝臓へのsiRNA送達
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部喜之, 吉池悠貴, 大西啓
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸被覆siRNAリポプレックス投与とコンドロイチン硫酸とsiRNAリポプレックス連続投与による肝臓へのsiRNA送達性の比較
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村麻里, 服部喜之, 設楽亮介, 御園宥江, 大西 啓
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸とsiRNAリポプレックス連続投与における正電荷リボソームの正電荷脂質の違いによるsiRNAの生体内分布への影響
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部喜之, 中村麻里, 竹内のぞみ, 吉池悠貴, 田口将光, 大野浩章, 尾崎恵一, 大西啓
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸とsiRNAリポプレックスの連続投与におけるsiRNAの生体内分布と遺伝子発現抑制効果に及ぼす正電荷リボソームの正電荷脂質の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 服部喜之, 菊地拓人, 尾崎恵一, 大西啓
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸とPLK1またはHSF1 siRNAリポプレックスの連続投与による肝転移がん治療
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本準, 大西啓, 服部喜之
2. 発表標題 siRNA送達用正電荷リポソーム製剤に用いる正電荷脂質と中性脂質の最適化
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>星薬科大学 分子薬剤学研究室 ホームページ  <a href="https://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsuyu/yakuzai/Pharmaceutics%20top-page.htm">https://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsuyu/yakuzai/Pharmaceutics%20top-page.htm</a></p>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考