

研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2006-2009
課題番号：18200032
研究課題名（和文）SIRNA 搭載多重型ナノ構造体の開発と 2 型糖尿病関連遺伝子群の機能解析
研究課題名（英文）Development of multilayered MEND with siRNA and in vivo functional analysis on type two diabetes related genes
研究代表者
原島 秀吉（HARASHIMA HIDEYOSHI）
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：00183567

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学
キーワード：遺伝子デリバリー、2 型糖尿病、siRNA、網羅的解析、遺伝子診断

1. 研究計画の概要

本研究においては、肝臓、筋肉、脂肪組織などの主要標的組織において 2 型糖尿病発症の前後で遺伝子発現が変動している遺伝子群の中で、サンプリングが容易な白血球においてもその変動を反映する遺伝子群を診断用候補遺伝子として網羅的に探索することを第一の目的とする。候補遺伝子群の診断用遺伝子としての妥当性を検証するためには、*in vivo* 機能解析が必須である。現在、筋肉や脂肪組織などへのデリバリーシステムは血管内皮細胞がバリアーとなり、高度な戦略と技術を必要とするため、現在まで開発されてこなかった。本申請研究は、血管内皮細胞を超えることができる *in vivo* デリバリーシステムを開発し、上記により絞り込んだ候補遺伝子群に対する siRNA を用いて *in vivo* 機能解析を行なうことを目的とする。

2. 研究の進捗状況

2 型糖尿病の早期遺伝子診断を可能とする白血球遺伝子、及び新規 2 型糖尿病疾患標的遺伝子を探索するために、OLETF ラットの白血球、肝臓、脂肪組織、骨格筋に着目して DNA マイクロアレイ実験を行った。その結果、糖尿病発症前の段階で白血球と肝臓で共に発現変動している遺伝子は 59 遺伝子、白血球と脂肪組織では 41 遺伝子、白血球と骨格筋では 14 遺伝子存在していた。そして糖尿病発症後においても白血球と肝臓で共に発

現変動する遺伝子が存在するか否かを明らかにするために、糖尿病発症後でも同様の解析を行ったところ、白血球と肝臓で 62 遺伝子が共に発現変動していた。これらの遺伝子群の中には、2 型糖尿病早期診断を可能にする候補遺伝子群、及び新規 2 型糖尿病疾患標的候補遺伝子が含まれている可能性が高いことを明らかにした。

また、デリバリーの観点からは、尾静脈内投与後に高い遺伝子発現を獲得可能なキャリアの構築を試みた。肝臓が実質細胞であることを考え、置く多アルギニン(R8)修飾リポソームの体内動態を解析したところ、強い肝臓指向性が見られた。そこで、R8 修飾リポソームの細胞内取込み機構と細胞内動態を解析したところ、マクロピノサイトーシスにより細胞内へ取込まれ、効率的に細胞質へ脱出可能であることがわかった。さらに、マクロピノソームからの脱出には、pH に依存して二種類の脱出機構を用いて効率的に細胞質へ脱出することが明らかとなった。さらに、ある種の糖を表面修飾した粒子が核に蓄積することを明らかとし、エンドソーム脱出素子と共にエンベロープに搭載した遺伝子封入ナノ粒子を静脈内に投与することで、従来の市販の試薬に比べても高い遺伝子発現を獲得できることが明らかとなった。

さらに、血管透過型のデリバリーシステムを構築するために、ファージディスプレイにより網羅的なリガンドスクリーニングの結

果、トランスサイトosisに重要な役割を果たすと考えられているカベオラ経路を標的化することが可能なペプチド(IRQ)の探索に成功した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

2型糖尿病のモデル実験動物を用いて、遺伝子診断用候補遺伝子群の探索に成功した。今後は、肝臓を中心とした *in vivo* 機能解析を行ない、白血球を用いた遺伝子診断という新しいコンセプトの検証を行なう。さらに、血管透過型人工遺伝子デリバリーシステムの創製を行ない、肝臓以外の疾患組織における *in vivo* 機能解析への道を拓きたい。4. 今後の研究の推進方策

siRNA による *in vivo* 機能解析を行うために、肝臓標的型 siRNA 搭載 MEND の構築を行う。そして構築されたシステムを用いて新規2型糖尿病感受性遺伝子の妥当性、及び治療標的遺伝子の検討を行う。

またIRQペプチドの *in vivo* における応用性の検証を開始する。IRQを表面修飾したナノ粒子の体内動態を解析すると共に、遺伝子や siRNA を内封してその機能を評価する。また、ナノキャリアのトランスサイトosisを解析するための評価系として、トランスウェルチャンバーへの単層培養系を用いるが、既存品ではナノ粒子の透過性評価に不適であることが明らかとなったため、トランスウェル用に細胞培養基材の最適化を行う。さらに、本評価系を用い、様々なペプチドを表面修飾したナノ粒子の透過性を解析する。さらに、サイズや電荷といった物性とトランスサイトosis能の間の相関性を明らかとする。

4. 今後の研究の推進方策

最終年度は、これまでに構築した肝臓へ siRNA を送達するシステムを用い、網羅的解析によりスクリーニングした2型糖尿病関連遺伝子に対する siRNA を搭載して、*in vivo* で候補遺伝子の機能解析を行なう。

5. 代表的な研究成果

(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15件)

1.I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, and H.

Harashima. High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to an efficient intracellular trafficking for gene expression. *J. Biol. Chem.* 281(6): 3544-51 (2006)査読有り

2.I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, K. Kataoka, and H. Harashima. Octaarginine-modified envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Therapy* 14(8): 682-9 (2007). 査読有り

3.H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguchi, I. A. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure and H. Harashima. Multi-layered nano particles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* 30(15): 2940-9 (2009). 査読有り

[学会発表] (計19件)

1.D. Mudhakhir. A novel IRQ ligand modified nano-carrier mediated a unique caveolae targeting. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy 2007年6月1日、Boston, Massachusetts, USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計15件)

国内

1. 名称：2型糖尿病診断剤。
番号：特願2007-72563
発明者：原島秀吉、飯田慎也、紙谷浩之、林泰弘、馬場嘉信、
出願日：2007年3月20日
権利者：北海道大学、名古屋大学

海外

1. 名称：粒子を脂質膜で被覆する方法。
番号：PCT/JP2006/300603
発明者：小暮健太郎、箕浦ありさ、原島秀吉
出願日：2006年1月18日
権利者：北海道大学。

○取得状況 (計1件)

国内

1. 名称：2型糖尿病診断用キット
番号：特許第4214235号
発明者：原島秀吉、紙谷浩之、桑島正道
取得日：2008年11月14日
権利者：北海道大学。