

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590037

研究課題名（和文）癌細胞特異的・血中滞留型及び徐放型 siRNA デリバリー超分子システムの構築

研究課題名（英文）Design and evaluation of supramolecular system for siRNA delivery having tumor-cell specific, long-circulating and sustained release properties

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

研究成果の概要(和文):本研究の目的は、究極の分子標的薬として知られる siRNA または short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターに徐放性/血中滞留性/癌細胞選択性を付与する新規超分子複合体デリバリーシステムを構築することにより、癌に対して効果的かつ副作用のない新規抗がん剤治療システムを構築することである。検討の結果、我々が新規に開発した PEG-Fol- α -CDE/ γ -CyD と siRNA との複合体は、徐放性/血中滞留性/癌細胞選択性を付与する新規超分子複合体デリバリーシステムとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The aim of the present study is to design and evaluate novel supramolecular-based drug delivery system having sustained release, long-circulating and tumor-selective properties for siRNA and shRNA, which are known to be an ultimate molecularly-targeted drug. Eventually, these results suggest that PEG-Fol- α -CDE/ γ -CyD supramolecular complexes have the potential for novel siRNA delivery system having sustained release, long-circulating and tumor-selective properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は α -シクロデキストリン (α -CyD)/デンドリマー結合体 (α -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 α -CDE 分子中の α -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、 α -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るキャリアであることを報告した。加えて最近我々は、 α -CDE が siRNA および short hairpin RNA

発現ベクター (shRNA) 用キャリアとしても安全性および導入効率から非常に優れた性質を有することを明らかにした。一方、siRNA・shRNA は極微量で遺伝子の発現を配列特異的に抑制することから次世代の医薬品として期待されている。しかし、siRNA・shRNA による遺伝子発現抑制効果の血中滞留性作用時間は短く、効果の持続化が望まれている。これまで世界中で多くの siRNA・shRNA キャリアが開発されてきたが、理想的なキャリアは未だ開発されていない。一方、PEG-Fo1- α -CDE は、血中滞留性・癌細胞選択性を有する我々オリジナルの siRNA 導入用キャリアであるとともに、PEG-Fo1- α -CDE/ γ -CyD 超分子複合体は我々が世界に先駆けて開発する DDS 製剤であり、siRNA・shRNA に徐放性・血中滞留性および癌細胞選択性といった高機能性を付与するものである。このように本超分子複合体は、これまで報告されているいかなるキャリアシステムとも異なるものであり、斬新かつ優れたアイデア・技術に基づく、新規性・優位性・有効性に優れたシステムであると自負するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、siRNA・shRNA に徐放性/血中滞留性/癌細胞選択性を付与する新規超分子複合体デリバリーシステムを構築することである。すなわち、癌細胞特異的かつ血中滞留性を有するキャリアの構築を企図して、我々が遺伝子・siRNA キャリアとして独自に開発した α -CDE に PEG 化葉酸を導入した PEG-Fo1- α -CyD を構築する。次に、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 γ -CyD を PEG-Fo1- α -CDE に添加することにより、

PEG-Fo1- α -CDE/ γ -CyD 超分子を調製する。本超分子は、我々が独自に開発した分子を基盤としているため全く新規のキャリアであるとともに、 α -CDE は市販の遺伝子導入試薬に比べて極めて細胞障害性が低いこと、また γ -CyD もすでに臨床使用されていること、さらに本超分子複合体は siRNA・shRNA、PEG-Fo1- α -CDE と γ -CyD 含有溶液を混合するだけで非常に簡便かつ非水性溶媒を使用することなく調製可能であることなどの優れた特徴を有する。

3. 研究の方法

(1) PEG-Fo1- α -CDE の合成とそれらの化学的・物理的性質の解析
葉酸レセプター (FR) との親和性の高い PEG-Fo1- α -CDE を選択するために、PEG 分子量 (1000, 2000, 3500, 6000)、葉酸・PEG 置換度 (1, 3, 5) 並びに α -CyD 置換度 (1, 3, 5) を有する種々の PEG-Fo1- α -CDE を調製し、その後、ゲル濾過により精製した。得られた結合体の純度、分子量および構造を TLC、 $^1\text{H-NMR}$ 、FAB-Mass 等を用いて明らかにし、結合体の溶解度、ゼータ電位、粒子径 (動的光散乱装置、コールターカウンター) などを測定した。

(2) siRNA および shRNA の構築

pGL3、ラミンならびに Fas 遺伝子に対する siRNA は Dharmacon 社から購入した。shRNA は、各遺伝子に対してステムループ型 siRNA 発現ベクターを Pol III 系 piGENEHU6 ベクターを用いて作成した。なお、shRNA の調製は熊本大学組換え DNA 安全管理規則に則って行った。

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

PEG-Fol- α -CDE 結合体と siRNA・shRNA との複合体を調製し、ルシフェラーゼ安定発現 KB 細胞に pGL3 siRNA・shRNA/PEG-Fol- α -CDE 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をルミノメータを用いて測定した。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 効果に対する競合実験を行った。その際、競合剤として葉酸を用い、レセプター依存的な RNA 効果の発現の有無について検討を行った。

(4) 細胞毒性

siRNA・shRNA/各種キャリア複合体を上記 3 種の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。

(5) 細胞への siRNA の取り込みおよび細胞内動態

FITCラベル化 siRNA (FITC-siRNA) と α -CDE または PEG-Fol- α -CDE との複合体を調製し、KB 細胞へ適用後の siRNA の取り込みをフローサイトメーターおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を観察し、市販の siRNA・shRNA 導入試薬を用いた場合の siRNA 導入細胞数並びに siRNA の細胞内局在性について比較検討を行った。

(6) マウスに静脈内投与後の PEG-Fol- α -CDE および FITC-siRNA の体内動態

FITC-siRNA と テトラメチルローダミンラベル化 PEG-Fol- α -CDE (TRITC-PEG-Fol- α -CDE) との複合体をマウスの尾静脈に投与後の血漿中 FITC および TRITC の蛍光を蛍光 HPLC にて定量し、これら PEG-Fol- α -CDE 複合体の血中滞留性について評価した。

(7) 超分子複合体の調製・構造確認・物理化学的性質

siRNA/PEG-Fol- α -CDE 溶液と γ -CyD 溶液を混合後、4°C で 12 時間、インキュベーションする。その後、遠心分離し、その沈査を得る。水で洗浄したものをサンプルとし、¹H-NMR および MALDI-TOF Mass にて超分子複合体の形成を確認する。超分子複合体からの PEG-Fol- α -CDE/shRNA 複合体の放出を、インキュベーション後の上清中の FITC 由来の蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定し評価した。

(8) *In vitro* RNAi 効果

各種 siRNA/キャリア複合体存在または非存在下における KB 細胞中のルシフェラーゼ活性を化学発光量により評価した。

(9) *In vivo* 安全性および体内動態

siRNA/PEG-Fol- α -CDE/ γ -CyD の安全性を確認するため、siRNA 複合体を正常 Balb/c マウスに皮下投与後の血液中生化学検査値の測定ならびに各臓器を肉眼的および染色組織切片を顕微鏡にて観察し、他の siRNA/キャリア複合体の場合と比較検討する。また、蛍光ラベル化 siRNA 複合体を投与後の血中蛍光強度を HPLC にて検出し体内動態を評価した。

(10) 担がんマウスにおける *in vivo* RNAi 効果の検討

Colon-26 細胞移植マウスの皮下または腫瘍内にそれぞれ siRNA/PEG-Fol- α -CDE/ γ -CyD を投与後のルシフェラーゼ遺伝子の発現量を上記と同様に調べる。

4. 研究成果

(1) α -CDE と葉酸との間にスパーサーとし

て PEG (MW 2,000) 鎖を挿入し、 α -CDE と Fol-PEG 残基をそれぞれモル比 1:2、1:4、1:7 で結合させた PEG-Fol- α -CDE (Degree of substitution of folate (DSF) 2, 4, 7) を調製した。これら結合体の中で PEG-Fol- α -CDE (DSF 4)/siRNA 複合体が葉酸レセプター (FR) 高発現 KB 細胞において最も高い配列特異的な遺伝子発現抑制効果を示し、この抑制効果は FR 依存的であることを明らかにした。また、PEG-Fol- α -CDE/siRNA 複合体の遺伝子発現抑制効果に PEG-Fol- α -CDE 分子中の α -CyD によるエンドソーム膜破壊効果も関与することが示唆された。

(2) PEG-Fol- α -CDE/siRNA 複合体は *in vitro* において、チャージ比 100 まで細胞障害性を示さなかった。また、この siRNA 複合体をマウス尾静脈内に投与後、血液生化学的パラメータに影響を及ぼさなかったことから、PEG-Fol- α -CDE は *in vitro* および *in vivo* において極めて安全性に優れたキャリアであることが示唆された。

(3) ルシフェラーゼ遺伝子安定発現 Colon-26-luc 細胞を移植した担がんマウスの腫瘍内に PEG-Fol- α -CDE/siRNA 複合体を直接投与した場合、配列特異的な遺伝子発現抑制効果を示し、*in vivo* においても RNAi 効果を誘導することが示唆された。また、PEG-Fol- α -CDE/siRNA 複合体を担がんマウス尾静脈内に投与した場合、配列特異的な遺伝子発現抑制効果を誘導する傾向が示された。

(4) テトラメチルローダミン (TRITC) でラベル化した PEG-Fol- α -CDE と FITC でラベル化された siRNA の複合体を担がんマウスの尾静脈内に投与した場合、腫瘍組織における FITC-siRNA レベルは 1 時間後までは経時的に上昇し、3~5 時間後にかけてほぼプラトーとなった。一方、TRITC-PEG-Fol- α -

CDE は、1 時間後までは経時的に上昇し、3~5 時間後にかけて緩やかに下降した。これらのことから、静脈内投与後複合体の一部は解離するものの、FITC-siRNA および TRITC-PEG-Fol- α -CDE は腫瘍組織に移行することが示唆された。

(5) 各種 Carrier/FITC-siRNA 複合体を静脈内投与 3 時間後の腫瘍組織における FITC-siRNA レベルは有意に高かったことから、PEG-Fol- α -CDE 分子中の FR 認識リガンドである葉酸が腫瘍組織への移行に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(6) フローサイトメトリー法による検討より、PEG-Fol- α -CDE/siRNA 複合体は FR 介在性の GPI アンカー型タンパク質リッチなクラスリン非依存的エンドサイトーシス (CLIC/GEEC エンドサイトーシス) 経路により細胞内へ取り込まれることが示唆された。

(7) 蛍光顕微鏡による観察から、PEG-Fol- α -CDE は KB 細胞へ添加 1 時間後にはエンドソームを脱出し、siRNA を細胞質に局在させることが示され、RNAi 効果の発現に有利な細胞内分布を示すことが示唆された。また、このエンドソーム脱出には PEG-Fol- α -CDE 分子中の α -CyD が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(8) Dendrimer および α -CDE に PEG (MW 2,000) 鎖を結合させた PEG-dendrimer および PEG- α -CDE を調製した。

(9) γ -CyD は、PEG-dendrimer および PEG- α -CDE と難水溶性の沈殿物を形成した。一方、 β -CyD は沈殿物を形成しなかった。また、 γ -CyD は PEG 鎖 2 本を包接し、PEG-dendrimer/ γ -CyD および PEG- α -CDE/ γ -CyD 超分子複合体を形成することが示唆された。

(10) shRNA のモデルとしてルシフェラーゼをコードする pGL3 を PEG-dendrimer/pDNA

および PEG- α -CDE/pDNA 複合体は、遺伝子導入能を有し、チャージ比 50 まで細胞障害性を示さず、安全性に優れることが示唆された。

(11) pDNA 存在下、PEG-dendrimer および PEG- α -CDE は γ -CyD と超分子複合体を形成した。また、pGL3 は PEG-dendrimer/ γ -CyD および PEG- α -CDE/ γ -CyD 超分子複合体中に効率よく会合されることが示唆された。

(12) PEG-dendrimer/pGL3/ γ -CyD および PEG- α -CDE/pGL3/ γ -CyD 超分子複合体からの pGL3 の放出は抑制され、その放出は溶出溶媒量の低下に伴い減少した。今後、PEG-Fol- α -CDE/siRNA/ γ -CyD 超分子複合体の形成、徐放性および血中滞留性について検討する予定である。

以上の結果から、我々が新規に開発した PEG-Fol- α -CDE/ γ -CyD と siRNA・shRNA 複合体は徐放性/血中滞留性/癌細胞選択性を付与する新規超分子複合体デリバリーシステムとして有用であることが示唆された。

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 12 件)

① K. Motoyama, K. Hayashida, H. Arima, Potential Use of Polypseudorotaxanes of Pegylated Polyamidoamine Dendrimer with Cyclodextrins as Novel Sustained Release Systems for DNA. Chem. Pharm. Bull., 査読有、Vol. 59, 476-479 (2011).

② K. Motoyama, Y. Nakashima, Y. Aramaki, F. Hirayama, K. Uekama, H. Arima, *In Vitro* Gene Delivery Mediated by Asialofetuin-appended Cationic Liposomes Associated with γ -Cyclodextrin into Hepatocytes. J. Drug Delivery, 査読有、Vol. 2011, 1-13 (2011).

③ 有馬英俊, 本山敬一, siRNA の DDS: クロデキストリン/デンドリマー結合体, Drug Delivery System, 査読有、Vol. 25, 598-606

(2010).

④ H. Arima, S. Yamashita, Y. Mori, Y. Hyashi, K. Motoyama, K. Hattori, T. Takeuchi, H. Jono, Y. Ando, F. Hirayama, K. Uekama, *In Vitro* and *In Vivo* Gene Delivery Mediated by Lactosylated Dendrimer/ α -Cyclodextrin Conjugates (G2) into Hepatocytes. J. Control. Release, 査読有、Vol. 146, 106-117 (2010).

⑤ T. Tsutsumi, F. Hirayama, K. Uekama, H. Arima. Potential use of Polyamidoamine Dendrimer/ α -Cyclodextrin Conjugate (generation 3, G3) as a Novel Carrier for Short Hairpin RNA-Expressing Plasmid DNA. J. Pharm. Sci., 査読有、Vol. 97, 3022-3034 (2008).

[学会発表] (計 17 件)

① 有馬英俊, 池田晴菜, 吉松歩美, 本山敬一, PEG 化葉酸修飾 α -CDE を用いた siRNA の癌細胞特異的 *in vivo* デリバリー, 第 20 回アンチセンスシンポジウム, 2010 年 12 月 2 日, 甲南大学

② 有馬英俊, 本山敬一, 標的指向性 siRNA キャリアとしてのシクロデキストリン/デンドリマー結合体の設計と評価, 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010 年 11 月 29 日, 富山国際会議場

③ H. Arima, Potential Use of PAMAM Dendrimer (G3) Conjugates as Novel Carriers of DNA and RNA, The 9th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium 2010, 2010 年 7 月 21 日, 中国、長春、中国科学院長春応用化学研究所

④ 有馬英俊, 吉松歩美, 池田晴菜, 本山敬一, 平山文俊, 上釜兼人, 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を用いたがん細胞選択的 siRNA デリバリー, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28-30 日, 岡山桃太郎アリーナ

⑤ 有馬英俊, 吉松歩美, 有菌雅代, 池田晴菜, 本山敬一, 服部憲治郎, 竹内 知子, 平山文俊, 上釜兼人, 腫瘍ターゲティング用遺伝子キャリアとしての 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の有効利用, 第 26 回シクロデキストリンシンポジウム, 2009 年 9 月 9-10 日, 栃木県総合文化センター

⑥ 有馬英俊, 吉松歩美, 有菌雅代, 池田晴菜, 本山敬一, 服部憲次郎, 竹内知子, 平山文俊,

上釜兼人、がん細胞選択的遺伝子デリバリーを企図した非ウイルスベクターとしての PEG 化葉酸修飾 dendrimer/ α -シクロデキストリン結合体の構築と評価、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム、2009 年 7 月 11 日、大阪大学コンベンションセンター

⑦有馬英俊、吉松歩美、堤 利仁、本山敬一、平山文俊、上釜兼人、 α -シクロデキストリン/dendrimer 結合体による siRNA の in vivo デリバリー、第 25 回日本 DDS 学会、2009 年 7 月 4 日、東京ドームホテル

⑧有馬英俊、吉松歩美、有菌雅代、小野寺理沙子、本山敬一、服部憲治郎、竹内知子、平山文俊、上釜兼人、葉酸修飾 dendrimer/ α -シクロデキストリン結合体を用いたがん細胞選択的遺伝子導入用キャリアの構築、第 18 回アンチセンスシンポジウム、2008 年 11 月 17-18 日、岐阜大学医学部記念会館

⑨有馬英俊、有菌雅代、吉松歩美、服部憲治郎、竹内知子、平山文俊、上釜兼人、がん細胞選択的遺伝子デリバリーを企図した PEG 化葉酸修飾 dendrimer/ α -シクロデキストリン結合体の構築、第 24 回日本 DDS 学会、2008 年 6 月 29 日、六本木アカデミーヒルズ

[図書] (計 5 件)

① H. Arima, K. Motoyama, T. Irie. Recent Findings on Safety Profiles of Cyclodextrins, Cyclodextrin Conjugates and Polypseudorotaxanes. "Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications", Ed. by Erem Bilensoy, John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, 2011, pp. 91-122.

② H. Arima, K. Motoyama. Recent Findings of PAMAM Dendrimer Conjugates with Cyclodextrins as Carriers of DNA and RNA Sensors, 9, 6346-6361 (2009).

③ K. Uekama, F. Hirayama and H. Arima. Pharmaceutical applications of cyclodextrins and their derivatives. "Cyclodextrins and their complexes", Ed. by H. Dodziuk, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008, pp. 381-422.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：腫瘍細胞に特異的な DNA 又は RNA デリバリー試薬
発明者：有馬英俊、本山敬一

権利者：国立大学法人熊本大学
種類：特許権
番号：2009-234177
出願年月日：2009 年 10 月 8 日
国内外の別：国内

名称：DNA 又は RNA を徐放化および標的指向化できる超分子システム
発明者：有馬英俊、本山敬一
権利者：国立大学法人熊本大学
種類：特許権
番号：2009-220108
出願年月日：2009 年 9 月 25 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：細胞に RNA を導入する方法
発明者：有馬英俊、平山文俊、上釜兼人
権利者：有馬英俊
種類：特許権
番号：特許第 4649571 号
取得年月日：2010 年 12 月 24 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://seizai.pharm.kumamoto-u.ac.jp/index.html>

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

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

甲斐広文 (KAI HIROFUMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：30194658