

令和 5 年 4 月 5 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07142

研究課題名(和文) 静脈内投与によりがん組織へsiRNAを送達するための葉酸修飾リポソーム製剤の開発

研究課題名(英文) Development of folate-modified siRNA lipoplexes for tumor-targeting by intravenous injection

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸修飾正電荷リポソームとsiRNAの複合体(葉酸修飾リポプレックス)の血液中での安定性をPEG修飾により改善する一方、がん組織に集積後はPEG誘導体がリポプレックスから脱離し、リポプレックス表面に残された葉酸を介してがん細胞内に効率よくsiRNAを導入できる静脈内投与用の葉酸修飾リポプレックスを調製した。このリポソームを用いてがん増殖阻害効果のあるpolo-like kinase 1 (PLK1) siRNAを静脈内投与したところ肺でのsiRNAの集積量を減少ならびに担がんマウスの腫瘍にsiRNAを集積量を増加させ、その結果、抗腫瘍効果を誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

siRNAは、配列特異的に遺伝子の発現を抑制できることから、がんに対する創薬開発が期待されているが、静脈内投与でsiRNAをがんに送達することが困難であった。本研究課題で開発した葉酸修飾リポプレックスは、静脈内投与でがん組織にsiRNAを送達できることから、今後、siRNAを用いた新しいがんの治療のためのリポソーム製剤の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared small interfering RNA (siRNA)/cationic liposome complexes (lipoplexes) modified with folate (FA)-polyethylene glycol-1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) to facilitate their uptake into tumor cells via folate receptor (FR), and with PEG1600-cholesterol (PEG1600-Chol) or PEG2000-chondroitin sulfate conjugate (PEG2000-CS), to enhance their systemic stability. Among the FA-PEG-modified siRNA lipoplexes, 0.5 mol% FA-PEG5000-DSPE-modified lipoplexes with 2.5 mol% PEG2000-CS or PEG1600-Chol (LP-0.5F5/2.5P2-CS and LP-0.5F5/2.5P1.6-CL, respectively) exhibited selective growth inhibition of human nasopharyngeal carcinoma KB cells through transduction with polo-like kinase 1 (PLK1) siRNA. Furthermore, their lipoplexes markedly decreased the accumulation of siRNA in murine lungs after systemic injection. Finally, systemic injection of LP-0.5F5/2.5P2-CS lipoplexes increased accumulation of siRNA in KB tumor xenografts and induced anti-tumor effect.

研究分野：薬剤学

キーワード：siRNA 葉酸 葉酸受容体 がん リポソーム リポプレックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短鎖二本鎖 RNA (siRNA) は、細胞内に導入すると配列特異的に遺伝子の発現を抑制できることから、抗がん剤が効かない難治性のがんに対する治療薬として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 を標的がん細胞内に送達することは非常に困難であるという欠点を有する。現在、siRNA をがん細胞に効率よく送達する方法の一つとして、正電荷リポソームが汎用されているが、正電荷リポソームと siRNA の複合体 (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。そのため、がん組織に siRNA を送達させるためには、まず血液中でのリポプレックスの安定性を改善し、肺における集積を抑制することが必要不可欠である。これまでに申請者は、リポプレックスの表面に比較的少量 (リポソーム総脂質量の 1~2 mol%) の葉酸修飾ポリエチレングリコール (PEG) ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) を用いて葉酸修飾すると、がんで過剰発現している葉酸受容体を介してがん細胞選択的に siRNA を導入できることを *in vitro* または腫瘍内投与の研究で明らかにしているが、血液中での安定性を向上させるために正電荷リポソームの葉酸 PEG-DSPE 修飾量を増加させると、siRNA リポプレックスの細胞内取り込みが阻害され、リポプレックスの siRNA 活性が消失するため、静脈内投与でがん選択的に siRNA を送達し、がん増殖阻害効果を誘導することには成功していなかった。

2. 研究の目的

本研究課題において、正電荷リポソームの PEG 修飾に用いる PEG 誘導体のアンカー部の構造の違いにより、リポプレックスから PEG 誘導体の脱離のしやすさが異なることに着目し、一過的なリポプレックスの血中安定性を改善するためには脱離しやすい PEG 誘導体を、また、がんリガンドである葉酸をリポプレックスに修飾するためには脱離しにくい葉酸 PEG-DSPE を用いることで、血液中では PEG 修飾により安定性を示す一方、がん組織に集積後は葉酸修飾 PEG-DSPE 以外の PEG 誘導体がリポプレックスから脱離し、リポプレックス表面に残された葉酸を介してがん細胞内に効率よく siRNA を導入できる葉酸修飾正電荷リポソームを調製することを研究の目的とした。そして、葉酸修飾 PEG-DSPE とアンカー部が異なる PEG 誘導体を用いて修飾した (葉酸/PEG 修飾) siRNA リポプレックスの静脈内投与により効率的にがん組織へ siRNA を送達し、がん増殖を抑制できる治療システムの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 葉酸修飾リポソームと siRNA リポプレックスの調製

正電荷脂質としてジメチルジドデシルアンモニウムブロミド (DDAB)、中性脂質としてジオレオイル ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、PEG 脂質として、PEG-ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) (PEG 分子量 2000、3400、5000、PEG₂₀₀₀-DSPE、PEG₃₄₀₀-DSPE、PEG₅₀₀₀-DSPE)、PEG-ジステアリルグリセロール (PEG 分子量 2000、PEG₂₀₀₀-DSG)、PEG コレステロール (PEG 分子量 1600、PEG₁₆₀₀-Chol)、PEG コンドロイチン硫酸 (PEG 分子量 2000、PEG₂₀₀₀-CS)、葉酸修飾 PEG-DSPE (PEG 分子量 2000、3400、5000、FA-PEG₂₀₀₀-DSPE、FA-PEG₃₄₀₀-DSPE、FA-PEG₅₀₀₀-DSPE) を用いた。正電荷リポソームは、正電荷脂質と DOPE をモル比 1:1 となるようにクロロホルムに溶解し、さらに 0.5 mol% の

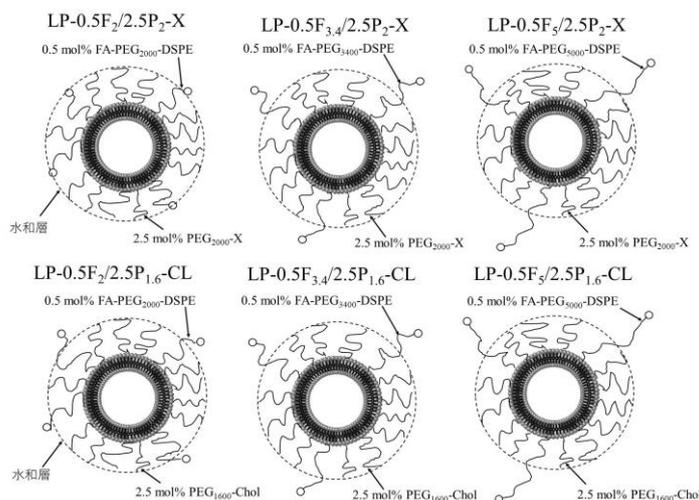


図1 葉酸修飾リポソームの模式図
X = PE、GまたはCS

葉酸修飾 PEG-DSPE および 2.5 mol% の PEG₂₀₀₀-DSPE、PEG₂₀₀₀-DSG、PEG₁₆₀₀-Chol を添加し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 を荷電比 (+:-) 4:1 で混合して調製した。

また、PEG₂₀₀₀-CS 修飾においては、0.5 mol% の葉酸 PEG-DSPE または PEG-DSPE で修飾したリポソームを調製後、siRNA と混合して siRNA リポプレックスを調製し、さらに 2.5 mol% PEG となるように PEG-CS を添加して静電的にリポソーム表面に PEG 修飾した。

各葉酸修飾正電荷リポソームの名称は、リポソームの名前

の最初に LP-を、続いて葉酸 PEG-DSPE を F、PEG-DSPE を P とし、PEG 鎖の分子量 2000、3400、5000 を F と P の後にそれぞれ₂、_{3,4}、₅ と記載した。そして、血液中での安定性改善に用いた PEG 誘導体については、PEG₂₀₀₀-DSPE を P₂-PE、PEG₂₀₀₀-DSG を P₂-G、PEG₁₆₀₀-Chol を P_{1,6}-CL、PEG₂₀₀₀-CS を P₂-CS とした (図 1)。なお、リポソーム名称中の 0.5 と 2.5 はリポソームに添加した PEG の mol%を示す。

(2) 葉酸修飾 PLK siRNA リポプレックス投与後の細胞増殖阻害効果

葉酸受容体を過剰発現しているヒト扁平上皮がん KB 細胞に、コントロール siRNA (Cont siRNA) または細胞増殖抑制効果のある polo-like kinase 1 (PLK 1) siRNA を用いて調製した葉酸修飾 siRNA リポプレックスを最終濃度 50 nM siRNA となるように添加した。48 時間後、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存率を測定した。

(3) 葉酸修飾 siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性

マウス血液から回収した赤血球懸濁液に、siRNA リポプレックス (2 μg siRNA) を混合し、15 分後に顕微鏡にて凝集体の有無を観察した。

(4) 葉酸修飾 siRNA リポプレックス投与後の siRNA のマウス生体内分布

20 μg の蛍光 (Cy5) 標識 siRNA を用いて葉酸修飾 siRNA リポプレックスを調製した。葉酸修飾 siRNA リポプレックスを正常マウスまたは KB 細胞を皮下移植した担がんマウスに尾静脈内投与した。投与 1 時間または 24 時間後に臓器・腫瘍を摘出し、siRNA の分布を *ex vivo* imaging または凍結切片の観察により調べた。

(5) 葉酸修飾 PLK 1 siRNA リポプレックス投与後の KB 担がんマウスに対する抗腫瘍効果

20 μg の Cont siRNA または PLK1 siRNA を用いて調製した葉酸修飾 siRNA リポプレックスを、KB 細胞を皮下移植した担がんマウスに 2 日間隔で計 3 回投与し (KB 細胞移植 5、7、9 日目)、経時的に腫瘍体積を測定した。

4. 研究成果

(1) 葉酸修飾 PLK siRNA リポプレックス投与後の細胞増殖阻害効果

がんリガンド修飾のために 0.5 mol%の葉酸 PEG-DSPE (PEG 分子量 2000、3400 または 5000) を、リポプレックスの血中安定性を改善するために 2.5 mol%の PEG₂₀₀₀-DSPE、PEG₂₀₀₀-DSG、PEG₁₆₀₀-Chol または PEG₂₀₀₀-CS を用いて正電荷リポソームに葉酸 PEG および PEG 修飾し、PEG 鎖長の長さとして PEG のアンカー部が及ぼす葉酸修飾 PLK 1 siRNA リポプレックスの細胞増殖抑制効果の影響を調べた。その結果、① 葉酸 PEG-DSPE については PEG 鎖が長いほど葉酸受容体選択性が高くなること、② PLK 1 siRNA の増殖抑制効果は正電荷リポソームから脱離しやすい PEG₁₆₀₀-Chol または PEG₂₀₀₀-CS 修飾では阻害されないものの、脱離しにくい PEG₂₀₀₀-DSPE や PEG₂₀₀₀-DSG 修飾では阻害されることが判った (図 2)。そのため、正電荷リポソームに 0.5 mol%の葉酸 PEG₅₀₀₀-DSPE と 2.5 mol%の PEG₂₀₀₀-Chol 修飾した LP-0.5F₅/2.5P_{1,6}-CL または 0.5 mol%の葉酸 PEG₅₀₀₀-DSPE と 2.5 mol%の PEG₂₀₀₀-CS 修飾した LP-0.5F₅/2.5P₂-CS は、葉酸受容体を発現しているがん細胞選択的に PLK 1 siRNA による高い細胞増殖阻害効果を誘導できるものと考えられた。

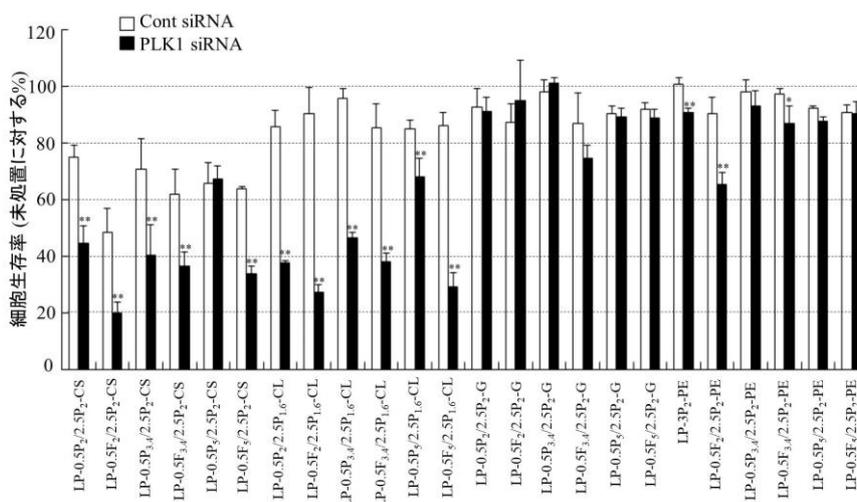


図2 葉酸修飾PLK1 siRNAリポプレックス投与48時間後のKB細胞の生存率

*P<0.05, ** P<0.01

(2) 葉酸修飾 siRNA リポプレックスと赤血球の凝集性

葉酸修飾 siRNA リポプレックスをがん組織に静脈内投与で送達するには、血液中での血液成分の赤血球とリポプレックスとの凝集を抑制し、血液中での安定性を改善する必要がある。そこで、葉酸修飾 siRNA リポプレックスと赤血球を混合し、赤血球との凝集に及ぼす PEG 修飾の影響を調べた。0.5 mol%の葉酸 PEG-DSPE 修飾のみでは、PEG 鎖の分子量に関わらず、赤血球と凝集体を形成した (データ未掲載)。一方、0.5 mol%の葉酸 PEG-DSPE と 2.5 mol%の PEG 誘導体を同時に正電荷リポソームに修飾すると、いずれの葉酸 siRNA リポプレックスにおいても、凝集体の形成が抑制された (図 3)。そのため、2.5 mol% PEG₂₀₀₀-Chol または PEG₂₀₀₀-CS 修飾は、PEG 修飾により siRNA 活性を減弱させないものの、血液中での安定性を改善できることが予測された。

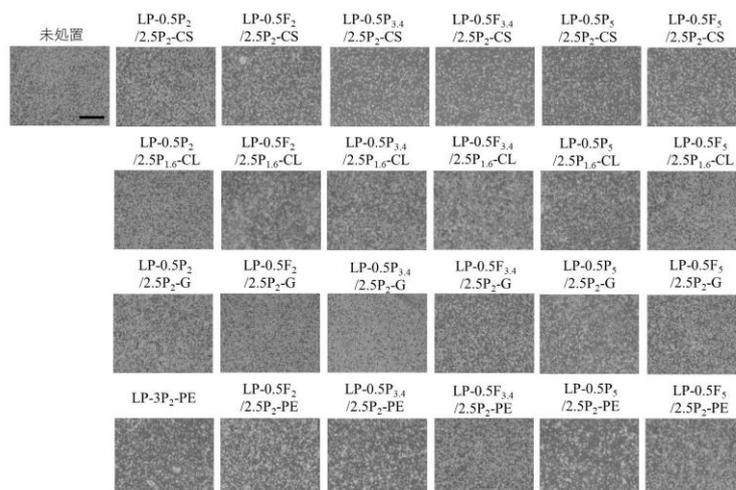


図3 葉酸修飾siRNAリポプレックスとマウス赤血球混合後の凝集性
Scale bar = 100 μ m

(3) 葉酸修飾 siRNA リポプレックス投与後の siRNA のマウス生体内分布

葉酸修飾 siRNA リポプレックスをがん組織へ送達するためには、血液中での赤血球との凝集を抑制し、肺での siRNA の集積を減少させる必要がある。そこで蛍光標識した葉酸修飾 siRNA リポプレックスを静脈内投与し、マウス生体内分布を調べた (図 4)。未修飾リポソーム (LP) および 0.5 mol%の葉酸 PEG-DSPE のみ修飾したリポソーム (LP-0.5F₂, LP-0.5F_{3,4}, LP-0.5F₅) では肺に高い siRNA の集積が観察されたが、0.5 mol%の葉酸 PEG₅₀₀₀-DSPE 修飾に加えて 2.5 mol% PEG₂₀₀₀-CS または PEG₁₆₀₀-Chol で修飾すると (LP-0.5F₅/P_{1,6}-CL または LP-0.5F₅/P₂-CS) いずれの葉酸修飾 siRNA リポプレックスにおいても、肺での siRNA の集積性は減弱し (図 4)、KB 担がんマウスでの腫瘍での siRNA の集積量が増加することが判った (図 5)。

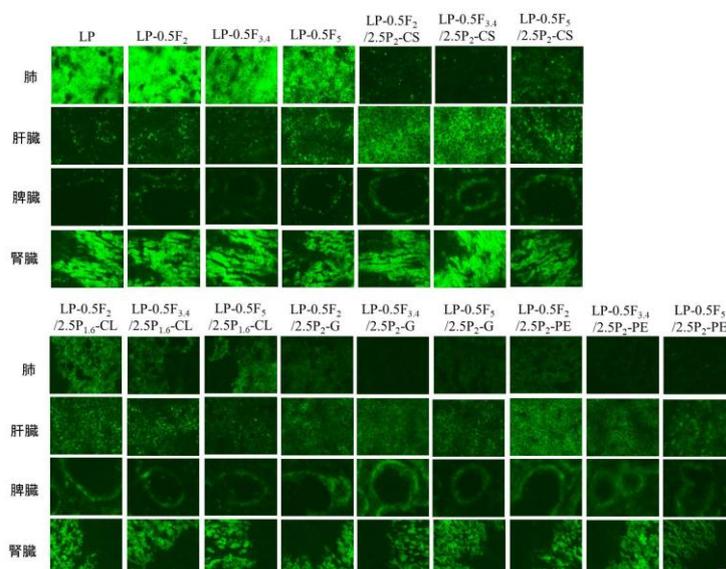


図4 葉酸修飾siRNAリポプレックスのマウス尾静脈内投与1時間後の生体内分布 Scale bar = 100 μ m

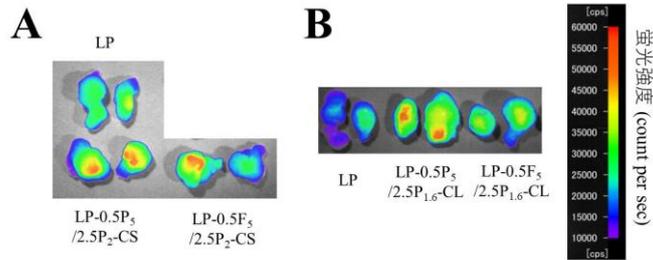


図5 葉酸修飾siRNAリポプレックスの Maus尾静脈内投与24時間の腫瘍集積性

(4) 葉酸修飾 siRNA リポプレックス投与後の KB 担がんマウスに対する抗腫瘍効果

PLK 1 siRNA を用いて調製した葉酸修飾リポプレックス (LP-0.5F₅/P_{1.6}-CL または LP-0.5F₅/P₂-CS) を、KB 細胞を移植した担がんマウスに尾静脈内投与し、経時的に腫瘍体積を測定した。その結果、LP-0.5F₅/P_{1.6}-CL の PLK1 siRNA リポプレックス投与では、がんの増殖抑制効果が観察されなかったものの、LP-0.5F₅/P₂-CS の PLK1 siRNA リポプレックス投与では、有意差は見られなかったものの、がんの増殖抑制効果が観察された (図 6)。

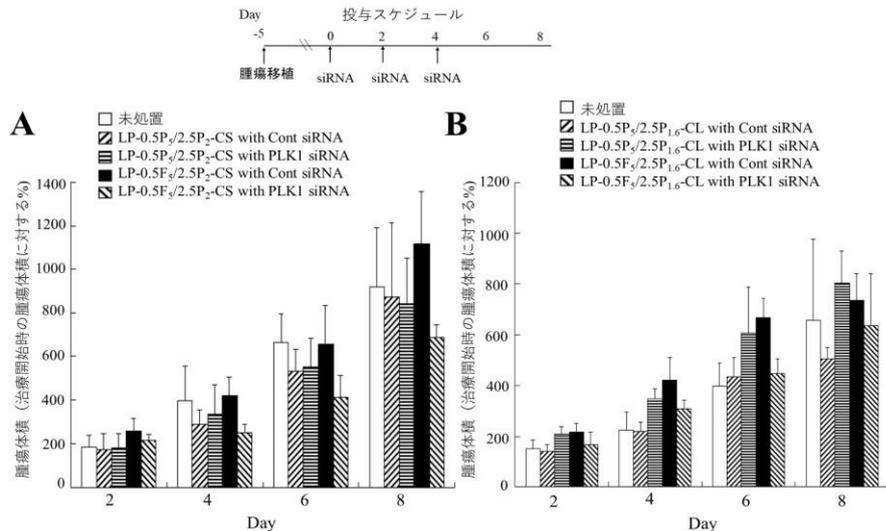


図6 葉酸修飾PLK1 siRNAリポプレックス投与後のKB担がんマウスにおける腫瘍体積変化

以上の結果より、葉酸修飾 siRNA リポプレックスの PEG 修飾に用いる PEG 誘導体のアンカ一部の違いにより、がん選択的な siRNA による遺伝子発現抑制効果が異なることが判った。本研究課題で見出した LP-0.5F₅/P₂-CS リポプレックスは、siRNA の活性を保持したまま、静脈内投与後の血液中での安定性を改善し、腫瘍に集積した後に葉酸受容体を介してがん細胞に取り込まれ、抗腫瘍効果を誘導できることが考えられ、葉酸修飾 siRNA リポプレックスが、がんの治療に有効である可能性が明らかとなった。今後もがんに対する siRNA の治療において、葉酸修飾リポソーム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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hattori Yoshiyuki, Tamaki Kyoko, Sakasai Sho, Ozaki Kei-ichi, Onishi Hiraku	4. 巻 22(5)
2. 論文標題 Effects of PEG anchors in PEGylated siRNA lipoplexes on in vitro gene-silencing effects and siRNA biodistribution in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4183-4196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11525	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 Tang Min, Sakasai Sho, Onishi Hiraku, Kawano Kumi, Hattori Yoshiyuki	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Effect of PEG anchor in PEGylation of folate-modified cationic liposomes with PEG-derivatives on systemic siRNA delivery into the Tumor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 74 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2022.2104860	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐敏、逆井勝、大西啓、川野久美、服部喜之
2. 発表標題 葉酸修飾siRNAリポプレックスのPEG修飾に用いるPEG誘導体のアンカー部が及ぼすマウス生体内分布および抗腫瘍効果の影響
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐敏、逆井勝、大西啓、川野久美、服部喜之
2. 発表標題 葉酸修飾siRNAリポプレックスのPEG修飾に用いるPEG誘導体のアンカー部が及ぼす遺伝子発現抑制効果とマウス生体内分布への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部喜之、玉置響子、逆井 勝、尾崎恵一、大西啓
2. 発表標題 PEG修飾siRNAリポプレックスのPEGアンカー部の違いが及ぼすin vitro遺伝子発現抑制効果とマウス生体内分布の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部喜之、逆井勝、唐敏、大西啓
2. 発表標題 PEG化コンドロイチン硫酸を用いたsiRNAリポプレックスのPEG修飾が及ぼす遺伝子発現抑制効果とマウス生体内分布の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 唐敏、逆井勝、大西啓、服部喜之
2. 発表標題 がん細胞へのsiRNA導入に及ぼす葉酸修飾リポプレックスのPEG修飾の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

星薬科大学 分子薬剤学研究室
<https://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsuyakuzai/Pharmaceutics%20top-page.htm>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------