

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590305

研究課題名（和文）インターフェロン応答を回避可能な siRNA 全身デリバリー法

研究課題名（英文）Systemic siRNA delivery to prevent interferon-response in animals

研究代表者

武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70362233

研究成果の概要（和文）：

RNA 干渉は短い 2 本鎖 RNA (short interfering RNA, siRNA) を用いた標的遺伝子発現抑制法である。本課題ではインターフェロン応答配列を有する siRNA をアテロコラーゲンと複合体化してマウスに投与しても、免疫刺激反応が全く起きない事を示した。同複合体が末梢血単核球細胞と相互作用して細胞内に取り込まれない事がその理由である事を見出した。アテロコラーゲンが siRNA の持つ免疫刺激活性を抑制可能な in vivo delivery vehicle であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

RNA interference is an endogenous gene-silencing method that involves double-stranded short RNA (siRNA)-mediated sequence-specific mRNA degradation. Here, we showed intravenously administered siRNA/atelocollagen complex did not induce immunostimulatory adverse effects (interferon-response) in mice. We also found the complex did not entered into peripheral blood mononuclear cells as a reason of the immunostimulatory-null effect of the complex. Atelocollagen is an excellent and promising delivery vehicle, and it has the useful advantage of evading detection by the "radar" of innate immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：RNA 干渉、siRNA、インターフェロン応答、薬物送達、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

RNA interference (RNAi) は標的遺伝子配列に対応した短い 2 本鎖 RNA (short interfering RNA, siRNA) による遺伝子発現抑制法である。RNAi による遺伝子サイレンシ

ングは、その配列特異性と発現抑制効果が高いことから、癌などの難治性疾患に対する臨床応用が期待されている。しかし、2 本鎖 RNA である siRNA は、哺乳動物に投与されると、自然免疫系に感知されて、いわゆる I 型イン

ターフェロン応答が起き、インターフェロン (Interferon) α , β や炎症性サイトカインの TNF- α などが誘導される。我々は siRNA 核酸医薬のデリバリー vehicle として開発中のアテロコラーゲンをを用い、この副作用の抑制 (siRNA の免疫賦活の抑制) に挑むことにした。

2. 研究の目的

siRNA の塩基配列として Interferon (IFN)-inducible sequence (IIS) を有する siRNA (以下 siRNA-IIS) を陽イオン脂質 (リポソーム) と複合体化して動物に投与すると、I 型 IFN 応答が起きる。この現象 (=副作用) は siRNA 核酸医薬を開発する上で大きな障壁の 1 つになっている。本課題では siRNA-IIS をマウス個体に全身性に投与しても、IFN 応答が起きないような安全でかつ臨床応用可能な Drug delivery system の開発を目指す。我々はこれまでに、生体高分子アテロコラーゲンをを用いた siRNA 核酸医薬のマウス個体レベルでの DDS やその治療効果 (癌や炎症モデル) を示してきた。本課題では、siRNA-IIS を化学修飾しないで、IFN 応答を回避する世界初の試みを施行した。

3. 研究の方法

(1) siRNA-IIS のマウス個体レベルでの IFN 応答の解析

siRNA-IIS を 3 種の delivery vehicle (アテロコラーゲン、陽イオンリポソーム Invivofectamine、高分子ポリマー In vivo PEI) と混合・複合体化し、マウスに尾静脈注にて投与した。

I 型 IFN 応答の測定 : マウスから採血し、得た血清において、マウス IFN- α と IFN- β 濃度を ELISA 法 (PBL Biomedical Laboratories 社) にて測定した。

IFN 応答関連遺伝子の発現の定量 上記の 3 種の siRNA-IIS 複合体をマウスに尾静脈注し、3 時間後、肝臓、脾臓、腎臓、肺を採取した。

4 種の IFN 応答関連遺伝子 (OAS-1, OAS-2, IRF-9, IFIT-1) の発現量をリアルタイム PCR 法にて定量した。

(2) siRNA-IIS の細胞レベルでの IFN 応答の解析

siRNA-IIS を 3 種の delivery vehicle (アテロコラーゲン、陽イオンリポソーム Invivofectamine、高分子ポリマー In vivo PEI) と混合・複合体化し、ヒト末梢血単核球細胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC 細胞) に添加した。

細胞培養上清中の IFN の定量 : 各 siRNA-IIS 複合体を添加し、24 時間後に上清を採取した。ヒト IFN- α と IFN- β 濃度を ELISA 法 (PBL Biomedical Laboratories 社) にて測定した。

各 siRNA-IIS 複合体の PBMC 細胞への取込 siRNA-IIS を複合体化後、PBMC 細胞に添加した。細胞に取り込まれた siRNA-IIS を抽出し、逆相 HPLC 法で定量した。Cy3 標識 siRNA-IIS についても同様に細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) siRNA-IIS のマウス個体レベルでの IFN 応答の解析

siRNA-IIS を 3 種の delivery vehicle (アテロコラーゲン、陽イオンリポソーム Invivofectamine、高分子ポリマー In vivo PEI) と混合・複合体化し、マウスに尾静脈注にて投与した。siRNA-IIS \cdot Invivofectamine 複合体や siRNA-IIS \cdot In vivo PEI 複合体を投与したマウスにおいて、血中 IFN- α , IFN- β , TNF- α 濃度の顕著な増加を認めた。一方、siRNA-IIS \cdot アテロコラーゲン複合体を投与したマウスでは IFN- α , IFN- β , TNF- α が検出されなかった。マウスの系統別にこの結果を検証すると、Balb/c マウスや ICR マウスにおいて IFN 応答が強く観察され、C57BL/6J マウスでは若干応答性が弱かった。

(2) siRNA-IIS の細胞レベルでの IFN 応答の

解析

siRNA-IIS を 3 種の delivery vehicle (アテロコラーゲン、陽イオンリポソーム Invivofectamine、高分子ポリマー In vivo PEI) と混合・複合体化し、ヒト末梢血単核球細胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC 細胞) に添加した。siRNA-IIS・Invivofectamine 複合体や siRNA-IIS・In vivo PEI 複合体を添加した細胞において、培養上清中の IFN- α 、IFN- β 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 濃度の顕著な増加を認めた。一方、siRNA-IIS・アテロコラーゲン複合体では全く検出されなかった。IFN 応答関連遺伝子の発現を調べると、siRNA-IIS・Invivofectamine 複合体において、OAS-1 (約 70 倍)、OAS-2 (約 30 倍)、IRF-9 (約 6 倍)、IFIT-1 (約 400 倍) の発現が見られた (比率は無添加細胞に対する比)。siRNA-IIS・アテロコラーゲン複合体においては、全く上昇がなく、無添加細胞と同じ発現量であった。

siRNA-IIS・Invivofectamine 複合体の PBMC 細胞への取込量を定量すると、約 1.5 ng の siRNA-IIS が細胞内に取り込まれた (PBMC 10⁶ 個あたり)。Cy3 標識 siRNA-IIS・Invivofectamine 複合体についても同様に細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、細胞内に Cy3 の赤色蛍光を観察した。一方、siRNA-IIS・アテロコラーゲン複合体は、全く PBMC 細胞に取り込まれなかった (逆相 HPLC 法における定量値：感度以下)。

以上、siRNA-IIS・アテロコラーゲン複合体が血中の PBMC 細胞に取り込まれない事が in vivo 免疫刺激反応を回避可能な理由であった。この特長は、一般に汎用される陽イオンリポソームや陽イオンポリマーでは全く見られず、アテロコラーゲンに特異的なものであった。アテロコラーゲンは siRNA の持つ免疫刺激活性を抑制可能な in vivo delivery vehicle であるといえる。

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 14 件)

1. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, Kinashi H, Sawai A, Noda Y, Mizuno T, Shimizu H, Fujita Y, Matsui K, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF- β induces VEGF-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*, in press. 査読有り
2. Kubo T, Takei Y, Mihara K, Yanagihara K, Seyama T. Amino-modified and lipid-conjugated dicer-substrate siRNA enhances RNAi efficacy. *Bioconjugate Chem*, 23:164-173 (2012). 査読有り
3. Bhattacharyya J, Mihara K, Ohtsubo M, Yasunaga S, Takei Y, Yanagihara K, Sakai A, Hoshi M, Takihara Y, Kimura A. Overexpression of BMI-1 correlates with drug resistance in B-cell lymphoma cells through the stabilization of survivin expression. *Cancer Sci*, 103:34-41 (2012). 査読有り
4. Inaba S, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Ishimoto T, Matsuo S, Kadomatsu K, Takei Y. Atelocollagen-mediated systemic delivery prevents immunostimulatory adverse effects of siRNA in mammals. *Mol Ther*, 20:356-366 (2012). 査読有り
5. Mihara K, Bhattacharyya J, Kitanaka A, Yanagihara K, Kubo T, Takei Y, Asaoku H, Takihara Y, Kimura A. T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells. *Leukemia*, 26:365-367 (2012). 査読有り
6. Kubo T, Yanagihara K, Takei Y, Mihara K, Morita Y, Seyama T. Palmitic acid-conjugated 21-nt siRNA enhances

- gene-silencing activity. *Mol Pharm*, 8:2193-2203 (2011). 査読有り
7. Sakamoto K, Bu G, Chen S, Takei Y, Hibi K, Kodera Y, McCormick LM, Nakao A, Noda M, Muramatsu T, Kadomatsu K. The premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1 (LRP1). *J Biol Chem*, 286:8405-8413 (2011). 査読有り
 8. Takei Y*, Takigahira M, Mihara K, Tarumi Y, Yanagihara K. The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. *Cancer Res*, 71:1442-1453 (2011).
*, corresponding author. 査読有り
 9. Sawai A, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Toda S, Ito I, Hattori R, Matsukawa Y, Gotoh M, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 26:2322-2332 (2011). 査読有り
 10. Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, Kitanaka A, Imai C, Bhattacharyya J, Kubo T, Takei Y, Yasunaga S, Takihara Y, Kimura A. Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 151:37-46 (2010). 査読有り
 11. Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, Yamamoto T, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Matsuhashi A, Yamada K, Takei Y. EWS/Fli-1 chimeric fusion gene up-regulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer*, 126:2790-2798 (2010). 査読有り
 12. Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Sawai A, Tanaka A, Maruyama S, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Lymphatic vessels develop in tubulo-interstitial fibrosis. *Kidney Int*, 75:828-838 (2009). 査読有り
 13. Mu P, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Kadomatsu, K, Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer*, 125:2978-2990 (2009). 査読有り
- [学会発表] (計 18 件)
1. Takei Y. Antimetastatic therapy for human scirrhous gastric cancers to repress their peritoneal dissemination via microRNA-based medicine. Global COE 3rd International Symposium. New Trends in Basic and Clinical Cancer Research for Innovative Therapy (Nagoya, JAPAN Dec 8-9, 2011).
 2. Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Nagura F, Sato W, Tsuboi N, Maruyama S, Imai E, Takei Y, Matsuo S. Lymphangiogenesis develops during peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients and rat peritonitis model. American Society of Nephrology, Renal Week 2011 (Philadelphia, PA, USA Nov 8, 2011).
 3. 小出直史、武井佳史 miR-302 ファミリーの導入によって HEK293 細胞からリポグラミングした mirPS 細胞における網

羅的遺伝子発現解析 第 84 回 日本生化学会大会 (京都市・2011 年 9 月 23 日)

4. 久保貴紀、柳原五吉、武井佳史、瀬山敏雄 脂肪酸コンジュゲート 2 本鎖 RNA は RNA 干渉効果を向上する アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011 (第 21 回アンチセンスシンポジウム・第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 合同シンポジウム) (吹田市・2011 年 9 月 1 日)
5. Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. Honolulu, Hawaii, USA, Dec 16, 2010. Symposium session: Nucleic Acid Based Therapeutics
6. Sawai A, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Toda S, Ito I, Sato W, Tsuboi N, Maruyama S, Imai E, Takei Y., Yuzawa Y, Matsuo S. Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. American Society of Nephrology, Renal Week 2010 (Colorado Convention Center, Denver, CO, USA Nov 16, 2010).
7. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Kinashi H, Sato W, Maruyama S, Imai E, Takei Y., Matsuo S. Lymphangiogenesis develops during tubulo-interstitial fibrosis via the TGF β - VEGF-C pathway in rat unilateral ureteral obstruction. American Society of Nephrology, Renal Week 2010 (Colorado Convention Center, Denver, CO, USA Nov 16, 2010).
8. 武井佳史、柳原五吉 MicroRNA-516a-3p はヒトスキルス胃癌の腹膜播種性転移抑制の標的となりうる新規 metastamir である 第 69 回 日本癌学会総会 (大阪市・2010 年 9 月 24 日)
9. ムー・ピン、門松健治、武井佳史 Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. 第 74 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (名古屋市・2010 年 5 月 29 日)
10. Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Kinashi H, Sato W, Maruyama S, Takei Y., Imai E, Yuzawa Y, Matsuo S. Lymphangiogenesis develop during tubulointerstitial fibrosis in rat unilateral ureteral obstruction via TGF β - VEGF-C pathway. International Society of Nephrology (ISN) NEXUS Symposium -The Kidney and the Vascular System: Emerging Culprits in Pathogenesis and Advances in Therapy. (Kyoto, JAPAN Apr 15, 2010).
11. 武井佳史 癌腹膜播種性転移を制御する miRNA の同定とその転移抑制の治療戦略 第 14 回 神経芽腫研究会 (名古屋市・2010 年 3 月 6 日)
12. Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Cancer Genomics, Epidemiology, and the Development of Novel Therapeutics. (Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, USA Feb 5, 2010).
13. 武井佳史 アテロコラーゲンによる腫瘍特異的な siRNA 全身デリバリー法 第 82

回日本生化学会大会 シンポジウム (神戸市・2009年10月24日)

14. 武井佳史、柳原五吉 MicroRNA-516a-3p はヒトスキルス胃癌の腹膜播種性転移に関与する 第68回 日本癌学会総会 (横浜市・2009年10月2日)

[図書] (計2件)

1. Takei Y, Kadomatsu K. Midkine and chemoresistance in cancers. Midkine: From Embryogenesis to Pathogenesis and Medication (2012). in press
[Publisher, Springer]

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1.
名称: 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、前立腺癌治療用細胞製剤
発明者: 山本徳則、小出直史、後藤百万、武井佳史
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2010/071633

出願年月日: 2010年12月3日

国内外の別: 国外

2.
名称: 脂肪組織由来間葉系幹細胞を含有する、勃起不全又は尿意障害用の細胞製剤
発明者: 山本徳則、小出直史、武井佳史、松川宣久、舟橋康人、後藤百万
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2010/065271
取得年月日: 2010年9月7日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70362233

(2) 研究分担者

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80204519