

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 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790143

研究課題名（和文） マイクロリボ核酸デリバリーシステムの構築とがん治療への応用

研究課題名（英文） Development of a microRNA delivery system for cancer therapy

研究代表者

島山 浩人（HATAKEYAMA HIROTO）

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：70504786

研究成果の概要（和文）：

次世代の核酸医薬による癌などの難治性疾患の治療には大きな期待が寄せられており、効率的なドラッグデリバリーシステム（DDS）が必要とされている。マイクロ RNA（miRNA）を標的とした DDS の構築を目的に、miRNA や miRNA 阻害核酸を封入可能な脂質膜構造体を構築した。また細胞内動態の改善によりモデル核酸を用い in vivo でも機能し、抗腫瘍効果を誘起することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Because miRNA/anti-miRNA oligonucleotide (AMO) are considered to be a potential therapeutic tool for cancer, the aim of the study is to development of AMO delivery system based on lipid nanoparticles (NPs). miRNA/AMO were successfully encapsulated in NPs. The systemic administration of NPs modified with functional device for improving intracellular trafficking could induce anti-tumor effect in in vivo tumor-bearing mice model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、核酸医薬、がん治療、miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、創薬の中心が従来の低分子化合物から抗体・タンパク質を用いたバイオ医薬へとパラダイムシフトしており、次世代の医薬として核酸に大きな期待が寄せられている。しかし、有用な送達システムが皆無であるため、臨床への適用は局所投与に限られているの

が現状で、効率性と安全性に優れた全身投与型送達システムの開発こそが、核酸医薬の成功の鍵と言える。

核酸を効率よく標的組織へ送達し機能を発揮させるためには、投与部位から組織までの体内動態と、その後の標的細胞の標的オルガネラに至る細胞内動態、両者の制御が必要

不可欠となる。当研究室では、理想的な送達システムの開発を目指して、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発を進めている。MEND は送達したい核酸をポリカチオンでコア粒子化し、脂質エンベロープで覆う構造をしている。体内・細胞内動態制御素子のトポロジーを考慮して配置をすることが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、核酸のうち、タンパク質をコードしない non-coding RNA で最も注目を集めているマイクロ RNA (microRNA : miRNA) に着目した。近年 miRNA の発現異常とがんの病態が深く関わっていることが報告されている。そこで miRNA 発現の制御を可能とする、miRNA や anti-miRNA oligonucleotide (AMO) など機能性核酸を封入した全身投与型の新規送達システムの開発を目的とする。

静脈内投与後にはがん組織に集積可能な PEG 修飾 MEND によりがん細胞内の miRNA を制御する。

がん組織に MEND を送達するにはポリエチレングリコール (PEG) などの水溶性高分子の修飾による血中滞留化と、がんにおける新生血管の特性による Enhanced permeability and retention (EPR) 効果に基づく、受動的な集積が有効である。しかし、一方で PEG 修飾は MEND と標的とするがん細胞との親和性を低下させるため、siRNA のがん細胞内への送達や活性は大きく阻害されてしまう。

この問題を解決するため我々は癌特異的に活性化しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に着目し、MMP で PEG が切断される腫瘍選択的活性化素子 (PPD) の合成と、PPD を MEND に組み込んだ PPD-MEND を開発している。本研究では、PPD-MEND の全身投与による核酸の癌への送達を試みた。また、さらなる活性の向上を目指し、細胞内動態、特にエンドソーム脱出に着目し、膜融合性ペプチド GALA に着目し、GALA を修飾した MEND による癌への核酸送達システムの構築を目的とし、効率的な核酸封入を可能とする調製条件の検討や GALA 修飾の最適化を行った。

3. 研究の方法

(1) 機能性核酸の MEND へのパッケージングの検討

miRNA/AMO などの機能性核酸を効率よく送達するためには、MEND へ効率よくパッケージングする必要がある。そこで、負電荷を有する機能性核酸と正電荷を有するカチオン分子の相互作用を利用し核酸コアを調製し、MEND 脂質膜へのパッケージング

を試みた。その際、電荷比や緩衝液濃度、pH など最適条件を検討した。調製した MEND の粒子径、表面電位、機能性核酸の封入率、また血清酵素からの核酸の分解抵抗性を指標にパッケージングを評価した。

(2) in vitro、in vivo における標的遺伝子、核酸の制御の評価

機能性核酸をパッケージングした MEND へ腫瘍環境応答性 PEG 脂質 (PPD) や pH 応答性膜融合ペプチド GALA を修飾し in vitro 細胞系、また in vivo 担癌モデルマウスを用いた機能評価を行った。

In vitro 細胞系では、エンドソーム/ライソソーム画分を緑色蛍光で染色し、赤色蛍光で標識した MEND を添加後、共焦点レーザー顕微鏡により細胞内局在を観察した。標的遺伝子、miRNA の制御は、real-time PCR 法によって評価した。

In vivo では、HT1080 細胞などを皮下移植した担癌モデルマウスへ投与し、腫瘍組織のルシフェラーゼ活性を指標に機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) 機能性核酸のパッケージング

負電荷の核酸と静電的に相互作用する正電荷分子の候補としてプロタミン、ステアリル化オクタアルギニン、ポリエチレンイミンを用い、様々な電荷比で粒子化を試みた。その結果、プロタミンで 100nm 以下の粒子化が可能であった。また検討過程で、siRNA ではオルニチン/トリプトファンアナログがコア粒子化に優れていることを明らかとした (Sato Y, et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2010)。今後は、機能性核酸による検討を行う予定である。

MEND へのコア粒子の封入について、緩衝液の pH や PEG 脂質濃度、精製温度等の封入条件を最適化し、封入率を RiboGreen で評価した結果、90%以上であることが示された。また、マウス血清とのインキュベーション後に電気泳動により評価したところ、MEND で封入した場合、24 時間まで分解から保護されていることが示された (図 1)。以上より、効率よく機能性核酸を MEND に封入可能な調製法を確立した。

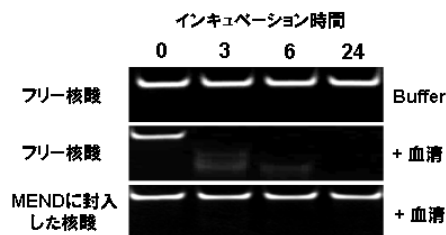


図 1 核酸の MEND への封入と血清耐性能

(2) in vitro、in vivo 機能評価

脂質膜もしくは内封核酸を蛍光標識した PEG-MEND は細胞内でエンドソームを示す緑色と共局在しており、細胞内に取り込まれた後、エンドソームにトラップされていたが、PEG を PPD に置き換えた PPD-MEND では赤色単独のパーティクルが多く観察された (図 2A)。これは MMP 酵素に反応して PEG が切除された結果、エンドソーム脱出効率が向上したためであることが示唆された。さらに in vivo 担癌モデルへ静脈内投与すると、腫瘍組織のがん細胞に PPD-MEND は広く分布しており、標的レポーター遺伝子活性を 70%程度低下させることに成功した (図 2B) (Hatakeyama et al. Biomaterials, 2011)。

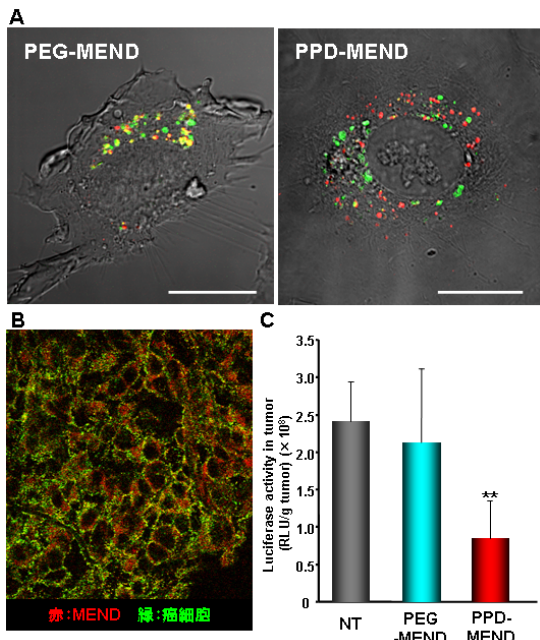


図 2 PPD-MEND の in vitro/in vivo 機能評価

一方、GALA を PEG-MEND に修飾した場合、血中滞留性が著しく阻害されることが判明した。そのため、GALA のアミノ酸鎖長を短縮した短鎖 GALA (short GALA:shGALA) を新たに設計した。shGALA 修飾 PEG-MEND は PEG-MEND と同等の血中滞留性を示した。

そこで shGALA 修飾 PEG-MEND の in vitro および in vivo 機能評価を行った。標的がん細胞における標的 miRNA が検討中であったため、機能性核酸のモデルとした。

In vitro では、shGALA の修飾により PEG-MEND のエンドソーム脱出が促進され、内因性遺伝子のノックダウンが亢進した。

In vivo 担癌モデルでは、蛍光標識 MEND を用いて、静脈内投与後に腫瘍組織の凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、腫瘍組織全体に MEND が到達している様子が観察された (図 3A)。また標的の内因性

遺伝子の発現量を real-timePCR で評価した結果、shGALA の修飾でノックダウン活性の向上を示した (図 3B)。また抗腫瘍効果の誘起にも成功した (図 3C)。以上の結果より、shGALA 修飾 PEG-MEND は核酸送達システムとして有用であることが示された。今後は miRNA/AMO を封入し、in vivo がん組織における miRNA 制御を行う予定である。

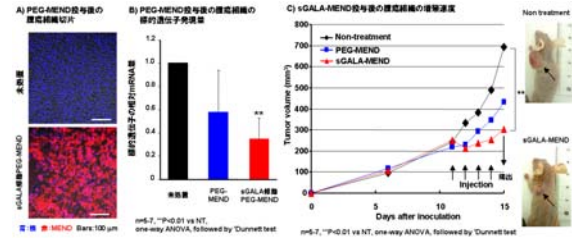


図 3 shGALA 修飾 PEG-MEND の in vivo 機能評価

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 7 件)

①Sakurai Y*, Hatakeyama H*, Sato Y, Akita H, Takayama K, Kobayashi S, Futaki S, Harashima H. Endosomal Escape and the Knockdown Efficiency of Liposomal-siRNA by the Fusogenic Peptide shGALA. *Biomaterials*, 32: 5733-5742 (2011) doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.047 査読有

②Hatakeyama H, Akita H, Ito E, Hayashi Y, Oishi M, Nagasaki Y, Danev R, Nagayama K, Kaji N, Kikuchi H, Baba Y, Harashima H. Systemic delivery of siRNA to tumors using a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Biomaterials*, 32: 4306-4316 (2011) doi:10.1038/mt.2011.24 査読有

③Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for drug and gene delivery to tumors based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63: 152-160 (2011) doi:10.1016/j.addr.2010.09.001 査読有

④楠本憲司、畠山浩人、原島秀吉. siRNA キャリアーとしてのリポソームの現状と将来. *ファルマシア* 47(8), 719-723 (2011) 査読無

⑤Sato Y, Hatakeyama H, Harashima H. Ornithine and tryptophan analogs as efficient polycations for siRNA delivery to tumor cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(7):1246-1249 (2010) 査読有

⑥ Hatakeyama H, Akita H, Kogure K, Harashima H. A Novel Nonviral Gene Delivery System: Multifunctional Envelope-Type Nano Device. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 119: 197-230 (2010) doi: 10.1007/10_2008_40 査読有

⑦秋田英万、畠山浩人、原島秀吉。「多機能性エンベロープ型ナノ構造体を用いた核酸デリバリー」Drug Delivery System, 25(6): 590-597 (2010) doi:10.2745/dds.25.590 査読無

[学会発表] (計 19 件)

①佐藤悠介、畠山浩人、櫻井遊、兵藤守、秋田英万、原島秀吉. siRNA 搭載 pH 応答性 MEND の構築と in vivo への応用. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 30 日. 北海道大学 (札幌市)

②Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Akita H, Harashima H. Endosomal Escape of liposomal siRNA via membrane fusion and in vivo delivery to tumor. 7th annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. 2011 年 9 月 8-10 日. The Black Diamond at The Royal Library Copenhagen (Denmark).

③19) Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. In vivo siRNA delivery with pH-sensitive liposome. 7th annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. 2011 年 9 月 8-10 日. The Black Diamond at The Royal Library Copenhagen (Denmark).

④櫻井遊、畠山浩人、秋田英万、二木史朗、原島秀吉. pH 応答性膜融合性ペプチドを用いた腫瘍組織への in vivo siRNA デリバリー技術の構築. 遺伝子デリバリー研究会第 11 回夏期セミナー. 2011 年 8 月 8-9 日. 三翠園ホテル (高知).

⑤佐藤悠介、畠山浩人、秋田英万、兵藤守、原島秀吉. pH 変化に応答する siRNA 封入 MEND の構築. 薬剤学会第 26 年会. 2011 年 5 月 29 日. タワーホール船堀 (東京).

⑥櫻井遊、畠山浩人、秋田英万、原島秀吉. 細胞内動態制御に基づく in vivo siRNA デリバリー技術の構築. 薬剤学会第 26 年会. 2011 年 5 月 31 日. タワーホール船堀 (東京).

⑦畠山浩人、秋田英万、原島秀吉. 腫瘍選択的 siRNA デリバリーシステムの開発. 薬剤学会第 26 年会. 2011 年 5 月 29 日. タワーホール船堀 (東京).

⑧原島秀吉、秋田英万、畠山浩人. 多機能性エンベロープ型ナノ構造体による siRNA の送達制御. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2010 年 11 月 29-30 日. 富山国際会議場 (富山).

⑨櫻井遊、畠山浩人、秋田英万、二木史朗、

原島秀吉. エンドソーム脱出素子を搭載した siRNA デリバリーシステムの開発. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2010 年 11 月 29-30 日. 富山国際会議場 (富山).

⑩Hatakeyama H. Development of systemic siRNA delivery system: manipulation of intracellular trafficking. 13 the JOINT Hokkaido University-Seoul national University SYMPOSIUM. 2010 年 11 月 26 日. 北海道大学 (札幌市)

⑪ 畠山浩人、秋田英万、原島秀吉. Development of Systemic siRNA Delivery System for Tumor with endosomal escape device. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 23 日. 大阪国際会議場 (大阪).

⑫Hatakeyama H, Ito E, Akita H, Oishi M, Nagasaki Y, Futaki S, Harashima H. Development of siRNA-containing nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing in tumor by controlling intracellular trafficking. 12th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE. 2010 年 8 月 4 日. The University of British Columbia (Canada).

⑬佐藤悠介、畠山浩人、原島秀吉. オルニチン/トリプトファン(Orn/Trp)アナログを用いたがん細胞への効率的な siRNA デリバリー. 第 26 回日本 DDS 学会. 2010 年 6 月 17-18 日. 大阪国際交流センター (大阪).

⑭櫻井遊、畠山浩人、秋田英万、二木史朗、原島秀吉. siRNA 封入 MEND のエンドソーム脱出促進と in vivo がんへのデリバリー. 第 26 回日本 DDS 学会. 2010 年 6 月 17 日. 大阪国際交流センター (大阪).

⑮畠山浩人、秋田英万、原島秀吉. 腫瘍を標的とする革新的な in vivo siRNA デリバリーシステムの構築. 第 26 回日本 DDS 学会. 2010 年 6 月 18 日. 大阪国際交流センター (大阪).

⑯Hatakeyama H, Ito E, Akita H, Oishi M, Nagasaki Y, Futaki S, Harashima H. Application of siRNA-containing nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing in tumor by controlling intracellular trafficking. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy. 2010 年 5 月 20 日. Marriott Wardman Park Hotel (USA).

⑰Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H, Oishi M, Nagasaki Y, Futaki S, Harashima H. A pH-sensitive fusogenic peptide modified siRNA-encapsulating nanoparticles exerts the gene silencing synergistically with tumor-specific cleavable PEG-lipid. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2010 年 5 月 20 日. Marriott Wardman Park Hotel (USA).

⑱ Sato Y, Hatakeyama H, Harashima H.

Ornithine and tryptophan as an efficient polycation for siRNA delivery to tumor cells. The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2010年5月22日. Marriott Wardman Park Hotel(USA).

⑱ 畠山浩人、秋田英万、原島秀吉. がんへの核酸デリバリーシステムの開発 ～PEG のジレンマへの挑戦～. 薬剤学会第25年会. 2010年5月12日. 徳島県郷土文化会館 (徳島).

[図書] (計2件)

① Akita H, Hatakeyama H, Khalil IA, Yamada Y, Harashima H. Elsevier. Comprehensive Biomaterials. 2011. 3750(411-444).

② 秋田英万、山田勇磨、中村孝司、畠山浩人、林泰弘、梶本和昭、原島秀吉. シーエムシー出版. 蛍光イメージング/MRIプローブの開発. 2011年. 196(163-172).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 浩人 (HATAKEYAMA HIROTO)
北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号：70504786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし