

負電荷ポリマーと siRNA リポプレックスを用いた 肝転移がんに対する新規治療法の開発

服 部 喜 之

星薬科大学 医療薬剤学教室

Development of siRNA therapy for liver-metastasized tumor by sequential injection of anionic polymer and siRNA lipoplex

Yoshiyuki HATTORI

Department of Drug Delivery Research, Hoshi University

1. はじめに

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) は、標的遺伝子と相同な配列を有するセンス RNA とアンチセンス RNA からなる二本鎖 RNA (double-strand RNA, dsRNA) を細胞内に導入すると、標的の遺伝子の転写産物 (mRNA) の相同部分を切断し、分解する現象である。細胞内に導入された長鎖の二本鎖 RNA は、細胞質で Dicer とよばれる RNAヌクレアーゼにより 21~23 塩基の small interfering RNA (siRNA) に分解され、その後、RNA-induced silencing complex (RISC) とよばれるタンパク質複合体を形成する。RISC 複合体の siRNA の二本鎖はアンチセンス鎖だけが残り、これが標的配列を認識し、mRNA を切断する。

1998 年に線虫を使用した研究により初めて RNAi が提唱されたが¹⁾、RNAi が発見された当初、哺乳動物細胞においては約 30 塩基対以上の dsRNA を細胞内へ導入するとインターフェロンのシグナル経路が活性化され、非特異的な翻訳抑制や mRNA の分解が引き起こされた。そのため、哺乳動物細胞での利用は困難と考えられていたが、2001 年に 21~23 塩基対の siRNA を細胞内に導入すると、哺乳動物細胞でも細胞毒性を示さずに RNAi を誘導できることが報告された²⁾。このように、siRNA は特定の遺伝子発現のみを効果的に抑制できること、また、配列を変えるだけで様々な標的分子に対応できることから、疾患の発症に関わる遺伝子の機能を特異的に抑制する新しい治療薬として期待されている³⁾。近年、siRNA を用いたがんに対する治療薬の開発が精力的に進められており、がん増殖やアポトーシス抑制に関連する様々な標的分子に対して siRNA が設計され、抗がん活性が調べられている。

転移がんは、がんができた部位 (原発腫瘍) から他の臓器に転移することで発症する。がんの転移先は、脳、

肺、肝臓、骨などに多い。転移がんの治療は、転移前のがんが発症した組織 (原発部位) や転移先によって異なるが、主に外科的切除や抗がん剤により治療が行われる。しかし、現在の治療では予後が悪く、再発する可能性も高い。そのため、siRNA を利用した転移がんの新規治療法の開発が期待されている。

siRNA を利用したがん治療の問題点は、siRNA は水溶性の高分子のため脂質二重膜から構成される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させることが非常に困難であることである。現在、siRNA を効率的にがん組織に送達するためのドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) の研究開発が世界中で進められているが、成功例は非常に少ない。

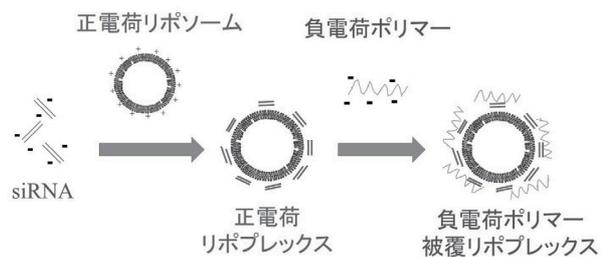


図 1 負電荷ポリマー被覆リポプレックスの調製

正電荷リポプレックスは、正電荷リポソームと siRNA を水溶液中で混合して調製した。負電荷ポリマー被覆リポプレックスは、正電荷リポプレックスと負電荷ポリマーを水溶液中で混合して調製した。

siRNA を細胞内に導入する方法として最も汎用されているのが、正電荷リポソーム製剤を用いたリポフェクション法である⁴⁾。この方法はまず、負電荷を有する siRNA と正電荷を有するリポソーム製剤 (正電荷リポソーム) を混合することで静電的に結合した複合体 (正

電荷リポプレックス)を形成させる(図1)。この正電荷リポプレックスを培養細胞に添加すると、siRNAは効率よく細胞内に導入される。特に、リポソーム製剤は、生体膜の構成成分であるリン脂質等を主成分としているため、毒性や抗原性が低く、患部へのsiRNA送達用ベクターとして有用であると考えられている。

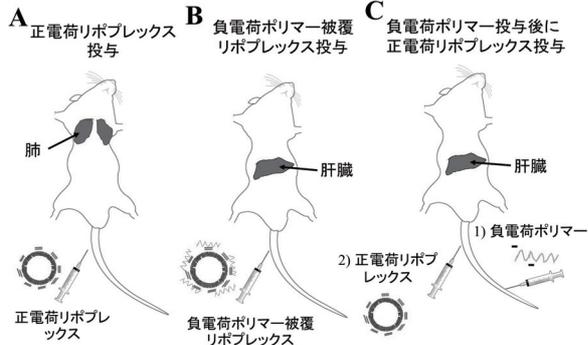


図2 リポプレックス尾静脈内投与後のsiRNAのマウス体内分布の模式図

(A)は正電荷リポプレックスをマウス尾静脈内投与後のsiRNAの分布、(B)は負電荷ポリマー被覆リポプレックスをマウス尾静脈内投与後のsiRNAの分布、(C)は負電荷ポリマー投与後に正電荷リポプレックスを尾静脈内投与した時のsiRNAの分布を示す。灰色の領域は、投与後にsiRNAが集積する組織を示す。

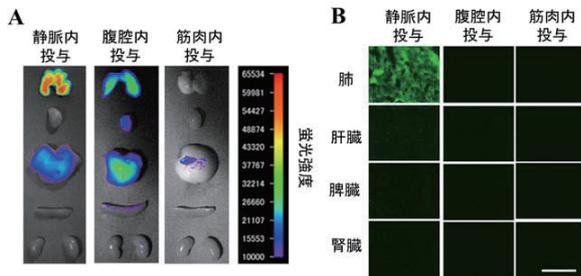


図3 リポプレックス静脈内、腹腔内、筋肉内投与1時間後のsiRNAのマウス生体内分布

Cy5.5 標識 siRNA を用いて調製した正電荷リポプレックスをマウスに静脈内、腹腔内、筋肉内投与した。投与1時間後に各臓器を摘出し、*ex vivo* imaging (A) または凍結切片における蛍光観察 (B) により siRNA の分布・局在を調べた。B におけるスケールバーは、1,000 μ m を示す。

しかしながら、生体に正電荷リポプレックスを静脈内投与すると、血液中ですぐに赤血球などの血液成分と凝集体を形成し、肺の毛細血管に捕捉され、投与後数分以内に肺に集積する⁵⁾(図2A、図3A、B)。また、正電荷リポプレックスを筋肉内または腹腔内投与した場合、ほとんど全身循環に移行せず、siRNAは投与部位周辺の組織に導入されてしまうため、これらの投与方法では主要な組織へsiRNAを送達させることは困難である(図

3A、B)。そのため、肺がんや肺転移がんなど肺にsiRNAを導入する場合には、正電荷リポプレックスの静脈内投与は有効な手段であるものの、肝臓がんなどの肺以外のがんへsiRNAを送達させるためには、まずリポプレックスの肺における集積を回避することが必要不可欠であった。

一般的に血液中でのリポプレックスの凝集を防ぎ、血液中での安定性を向上させるためには、リポプレックスの表面をポリエチレングリコール(PEG)で被覆したPEG修飾リポプレックスを用いる方法がある。しかし、リポプレックスをPEG修飾すると、細胞との相互作用が低下し、リポプレックスの細胞内取り込み量が低下する、また、リポプレックスの安定化のため細胞内でのリポプレックスからのsiRNAの放出性が低下するため、結果としてsiRNAによる遺伝子発現抑制効果が著しく減弱する。そのため、静脈内投与用のリポプレックスに必要な表面修飾の条件は、血液中において血液成分とリポプレックスの相互作用を減少させる一方、標的組織においてはリポプレックスの細胞内取り込みを阻害しないことであった。

2. 負電荷ポリマー被覆リポプレックスの開発

血液中における正電荷リポプレックスと血液成分との静電的相互作用は、正電荷リポソームが有する正電荷に起因することから、リポプレックス表面の正電荷を中性または負電荷にする必要がある。これまでに多くの研究者らによって、プラスミドDNAまたはsiRNAなどの核酸と正電荷リポソームまたは正電荷ポリマーを混合して調製した複合体(リポプレックスまたはポリプレックス)の表面を生分解性の負電荷ポリマーで被覆することで、表面電位を負電荷にした複合体(負電荷ポリマー被覆リポプレックスまたはポリプレックス)の開発が行われてきた(図1、表1)⁶⁻²¹⁾。例えば、負電荷ポリマーとしては、コンドロイチン硫酸⁶⁻¹¹⁾、ヒアルロン酸^{12、16-20)}、ポリ-L-グルタミン酸^{7、9、12-15、21)}、ペクチン¹²⁾、アルギン酸¹²⁾などが、正電荷ポリマーとしてはキトサン^{8、18-21)}、ポリアミドアミン(PAMAM)⁶⁻¹⁷⁾、ポリ-L-アルギニン^{11、12)}、ポリ-L-リシン¹¹⁾、ポリエチレンジアミン(PEI)^{9、10、14、15)}などが用いられている。正電荷リポプレックスまたは正電荷ポリプレックスを負電荷ポリマーで被覆すると、表面電位が負電荷となるため赤血球などの血液成分との凝集を防ぐことができる一方、細胞内への取り込みは阻害されないことが報告されている。そこで、著者はまず、コンドロイチン硫酸やポリ-L-グルタミン酸(図4)などを用いて負電荷ポリマー被覆リポプレックスを調製し、赤血球との相互作用を抑制できるか検討した。

表 1 これまでに報告されている遺伝子送達用の負電荷ポリマー被覆リポプレックスまたはポリプレックス

核酸	負電荷ポリマー	正電荷ポリマー・リポソーム	参考文献
プラスミドDNA	コンドロイチン硫酸	PAMAM dendrimer	[6]
	コンドロイチン硫酸	キトサン	[8]
	コンドロイチン硫酸	正電荷リポソーム ポリアルギニン ポリリジン キトサン	[11]
プラスミドDNA	ヒアルロン酸		[19,20]
プラスミドDNA	コンドロイチン硫酸	ポリエチレンジアミン(PEI)	[9,10,16]
プラスミドDNA	ヒアルロン酸		
プラスミドDNA	コンドロイチン硫酸	正電荷リポソーム	[7]
プラスミドDNA	トアルロン酸		
	ポリ-L-グルタミン酸		
	ポリ-L-グルタミン酸	PEI	[9, 14,15]
プラスミドDNA	ポリ-L-グルタミン酸	プロタミン	[13]
	アルギン酸	正電荷リポソーム	[12]
プラスミドDNA	ポリ-L-グルタミン酸		
	ヒアルロン酸		
	ペクチン		
	ヒアルロン酸	PAMAM	[17]
siRNA	ヒアルロン酸	キトサン	[18]
		ポリアルギニン	[22]
		キトサン	[21]
siRNA	ポリ-L-グルタミン酸		[21]

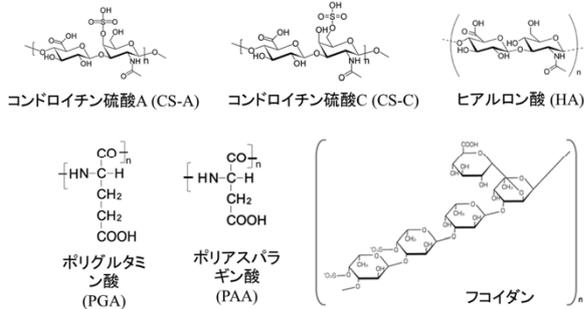


図 4 本研究で用いた負電荷ポリマーの構造

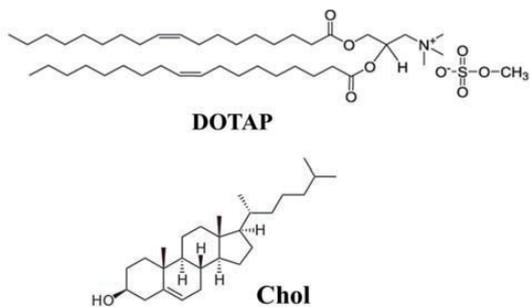


図 5 正電荷リポソームの調製に用いた脂質

DOTAP; 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane methyl sulfate salt, Chol; cholesterol.

正電荷リポソームは、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane methyl sulfate (DOTAP) とコレステロール (Chol) (図 5) を用いて薄膜法により調製した。調製したリポソームの粒子径は、約 100 nm、電位は約 50 mV であった。正電荷リポソームに対して siRNA を荷電比 (-/+) が 1/4 となるように混合し、正電荷リポプレックスを調製したところ、正電荷リポプレックスの粒子径は、約 250 nm、電位は約 40 mV となった。負電荷ポリマー被覆リポプレックスの調製は、負電荷ポリマーに含まれる硫酸基やカル

ボキシ基に由来する負電荷の総数に対する正電荷リポソームに含まれる正電荷脂質 (DOTAP) の分子数の比 (荷電比) (-/+) が、0.5、1、1.5、2、2.5 となるように混合して調製した (図 1)。負電荷ポリマーとしては、コンドロイチン硫酸 C (CS-C) とポリ-L-グルタミン酸 (PGA) (図 4) を用いた。その結果、CS-C を用いた場合は荷電比 (-/+) が 1/1 以上で、PGA を用いた場合は荷電比 (-/+) が 1.5/1 以上で負電荷を有するリポプレックスとなった (図 6)²³⁾。そのため、以後の実験では、CS-C 被覆リポプレックスは荷電比 (-/+) が 1/1 となるように、また PGA 被覆リポプレックスは荷電比 (-/+) が 1.5/1 となるように負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスを混合して調製した。

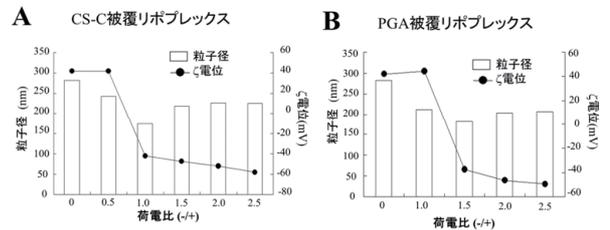


図 6 負電荷ポリマー被覆リポプレックスの粒子径と表面電位²³⁾

正電荷リポプレックスは、siRNA に含まれるリン酸基の数と正電荷リポソームに含まれる DOTAP のモル比 (荷電比) (-/+) が 1/4 となるように混合して調製した。その後、負電荷ポリマーに含まれる硫酸基とカルボキシ基の総数に対する正電荷リポソームに含まれる DOTAP の分子数の比 (モル比) を荷電比 (-/+) とし、CS-C (A) または PGA (B) を様々な荷電比 (-/+) で正電荷リポプレックスに添加して負電荷ポリマー被覆リポプレックスを調製した。

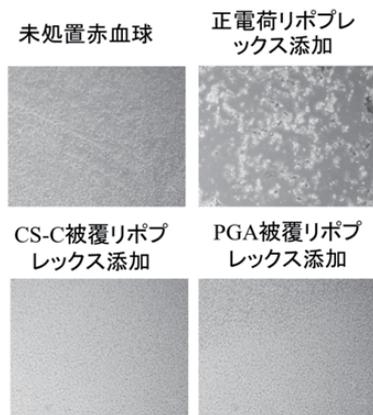


図 7 負電荷ポリマー被覆リポプレックスと赤血球の凝集性²³⁾

マウス血液から回収した赤血球と、正電荷リポプレックス、CS-C または PGA 被覆リポプレックスを混合し、15 分後に顕微鏡にて凝集体を観察した。

調製した負電荷ポリマー被覆リポプレックスをマウス血液から回収した赤血球懸濁液に添加し、凝集体が形成

されるかどうか調べた。まず、正電荷リポプレックスを赤血球懸濁液に添加すると、大きな凝集体が形成された(図7)²³⁾。一方、CS-C被覆リポプレックスまたはPGA被覆リポプレックスを赤血球懸濁液に添加したところ、凝集体の形成は観察されなかった。このことから、負電荷を有するリポプレックスは、赤血球と凝集体を形成しないため、静脈内投与しても血液中で凝集性せず、肺で集積しないものと考えられた。そのため、蛍光標識したsiRNAを用いてCS-C被覆リポプレックスまたはPGA

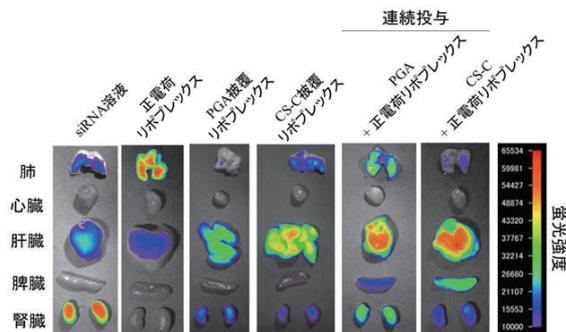


図8 負電荷ポリマー被覆リポプレックス投与1時間後または負電荷ポリマーと正電荷リポプレックス連続投与1時間後のsiRNAのマウス生体内分布の比較^{23, 24)}

正電荷リポプレックスは、Cy5.5標識siRNAを用いて調製した。CS-CまたはPGAを用いて負電荷ポリマー被覆リポプレックスを調製し、マウスに尾静脈内投与した。また、負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与においては、CS-CまたはPGA投与1分後に正電荷リポプレックスを投与した。投与1時間後に臓器を摘出し、各臓器におけるsiRNAの分布をex vivo imagingにより蛍光測定した。

被覆リポプレックスを調製し、マウス尾静脈内投与1時間後のsiRNAのマウス生体内分布を調べた(図8)。

まず、siRNA溶液をマウスに尾静脈内投与したところ、主に腎臓においてsiRNAの集積が観察された(図8)。これはsiRNAの分子量が約14,000と小さいことから、糸球体からろ過されたものと考えられた。一方、正電荷リポプレックスを尾静脈内投与したところ、siRNAの集積は主に肺に観察された(図8)。これは静脈内投与後すぐに血液中の赤血球などの血液成分と凝集し、この凝集体が静脈内投与後に最初に通過する肺の毛細血管で捕捉されたために、肺で集積したものと考えられた。一方、CS-C被覆リポプレックスおよびPGA被覆リポプレックスを尾静脈内投与すると、siRNAの肺での集積は観察されず、主に肝臓でsiRNAの集積が観察された(図8)。負電荷を有するリポプレックスは、血液中で血液成分と凝集しないために肺の毛細血管で捕捉されず、最終的に肝臓に集積したものと考えられた(図2B)。この結果より、負電荷ポリマー被覆リポプレックスは、肝臓にsiRNAを送達させるための遺伝子ベク

ターとして有用性が高いものと考えられた。しかしながら、負電荷ポリマー被覆リポプレックスをsiRNA送達用製剤として用いる時の問題点として、1) siRNAと正電荷リポプレックスを混合後、さらに負電荷ポリマーを混合する二段階の製剤調製が投与直前に必要であること、2) 正電荷リポプレックスと負電荷ポリマーの混合比(荷電比(-/+))がリポプレックスの物性(粒子径や表面電位など)に影響を与えることから正確な荷電比(-/+)で混合する必要があること、3) 正電荷リポプレックスに被覆する負電荷ポリマー量を増加するとリポプレックスに結合したsiRNAが遊離してしまうことであった。そのため、上記の問題を克服するために新たな工夫が必要であった。

3. 負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与による肝臓へのsiRNA送達

これまでに、負電荷を有するプラスミドDNA溶液をマウス尾静脈内投与直後に正電荷リポソームを投与すると、血液中で正電荷リポソームとプラスミドDNAが静電的に結合してリポプレックスを形成後、肺に集積し、プラスミドDNAが肺に導入されることが報告されていた^{25, 26)}。すなわち、あらかじめプラスミドDNAと正電荷リポソームを混合せずに、別々に静脈内投与しても、プラスミドDNAと正電荷リポソームが血液中で相互作用できるとのことであった。そこで著者は、負電荷ポリマーの静脈内投与直後に正電荷リポプレックスを投与すれば、血液中で負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスが静電的に相互作用し、肺での正電荷リポプレックスの集積を減少させ、肝臓にsiRNAを送達できるのではないかと考えた(図2C)。そこで、負電荷ポリマーとして1mgのCS-CまたはPGAをマウスに尾静脈内投与し、その1分後に正電荷リポプレックスを尾静脈内投与した時のsiRNAのマウス生体内分布を調べた²⁴⁾。その結果、負電荷ポリマー投与直後に正電荷リポプレックスを投与しても、負電荷ポリマー被覆リポプレックスを投与した場合と同様にsiRNAは肺に集積せず、主に肝臓にsiRNAを送達できることが判った(連続投与法)(図8)。さらに、肝臓におけるsiRNAの集積量は、負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与の方が、負電荷ポリマー被覆リポプレックスの投与よりも高いことが判った。

また、siRNA、正電荷リポソーム、負電荷ポリマーそれぞれを別々に投与したところ、血液中でsiRNAは正電荷リポソームと相互作用できず、ほとんど腎臓排泄された(データ未掲載)²⁷⁾。そのため、siRNAを肝臓へ効率よく送達させるためには、負電荷ポリマー投与後に正電荷リポプレックスを投与する必要があることが判った。

次に、連続投与法で効率よく肝臓に siRNA を送達できる負電荷ポリマーの種類について検討を行った²⁸⁾。CS-C や PGA 以外のポリアミノ酸または多糖類の負電荷ポリマーとして、コンドロイチン硫酸 A (CS-A)、ヒアルロン酸 (HA)、フコイダン、ポリアスパラギン酸 (PAA) を用いた (図 4)。CS-C と CS-A は 2 単糖あたり硫酸基とカルボキシ基が 1 つずつ、HA は 2 単糖あたりカルボキシ基が 1 つ、フコイダンは 5 単糖あたり硫酸基が 2 つとカルボキシ基が 1 つ、PAA と PGA は 1 アミノ酸あたり 1 つのカルボキシ基が存在する。これら負電荷ポリマーをマウスに尾静脈内投与し、その 1 分後に正電荷リポプレックスを投与したところ、CS-C、CS-A、PGA、PAA の投与においては主に肝臓に (一部

リポプレックスから遊離した siRNA が腎臓に)、また、HA やフコイダンにおいては肺に、siRNA の集積が観察された (図 9)。HA に関しては、分子量 7.5, 17, 215, 975 kDa の 4 種類の HA を用いたが、分子量の違いによる siRNA の生体内分布の違いは観察されなかった。以上の結果より、負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与において肝臓に siRNA を送達するためには、CS-C や PGA のような単糖またはアミノ酸あたり 1 つの負電荷を有するものが血液中で効率よく正電荷リポプレックスと相互作用し、肺への siRNA の集積を抑制できることが推察された。このような負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与による肝臓への siRNA 導入効果は、正電荷リポソームを構成する正電

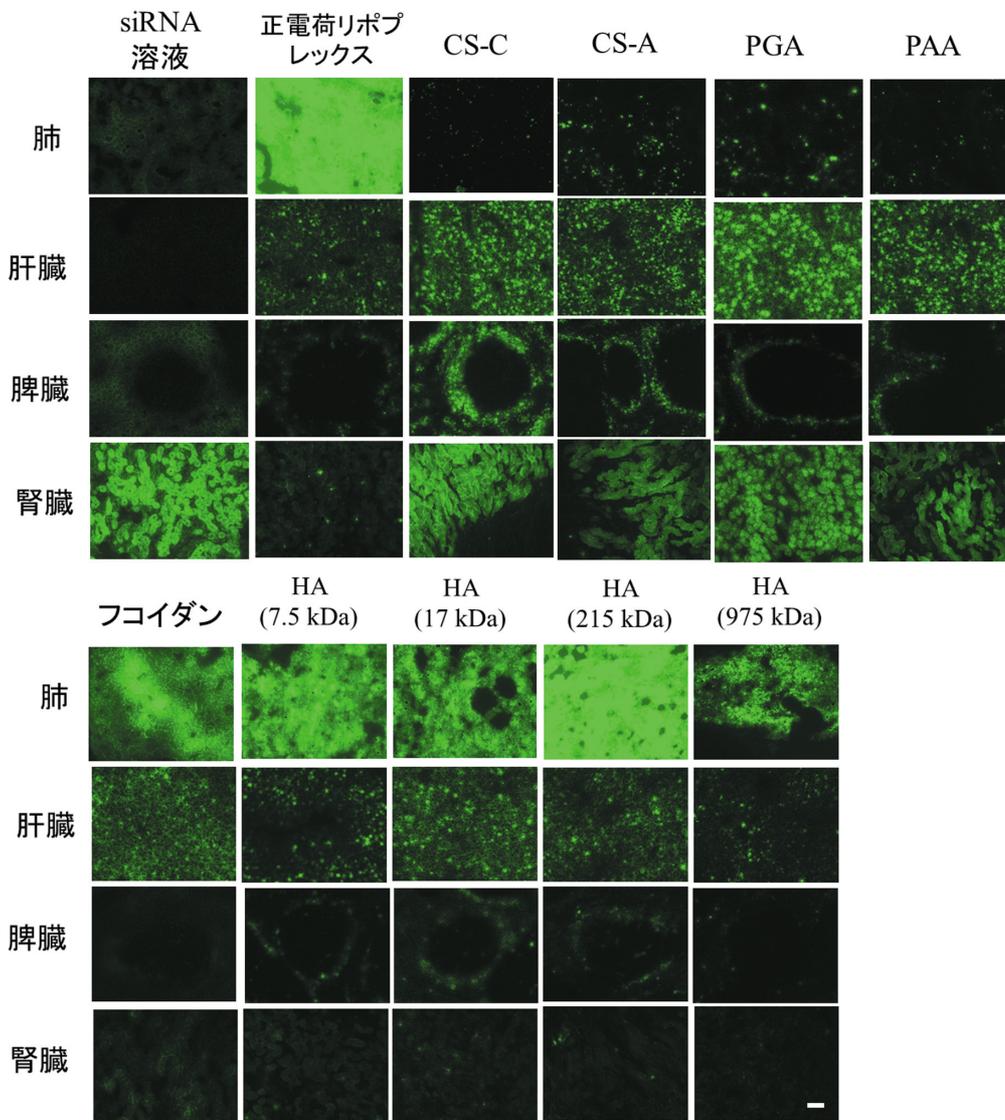


図 9 負電荷ポリマーと正電荷リポプレックス連続投与 1 時間後の siRNA のマウス生体内分布^{24, 27, 28)}

Cy5.5 標識 siRNA を用いて正電荷リポプレックスを調製した。各負電荷ポリマー投与 1 分後に正電荷リポプレックスを投与した。投与 1 時間後に臓器を摘出し、凍結切片を作製した。各臓器における siRNA の局在を蛍光顕微鏡により観察した。スケールバー = 100 μ m

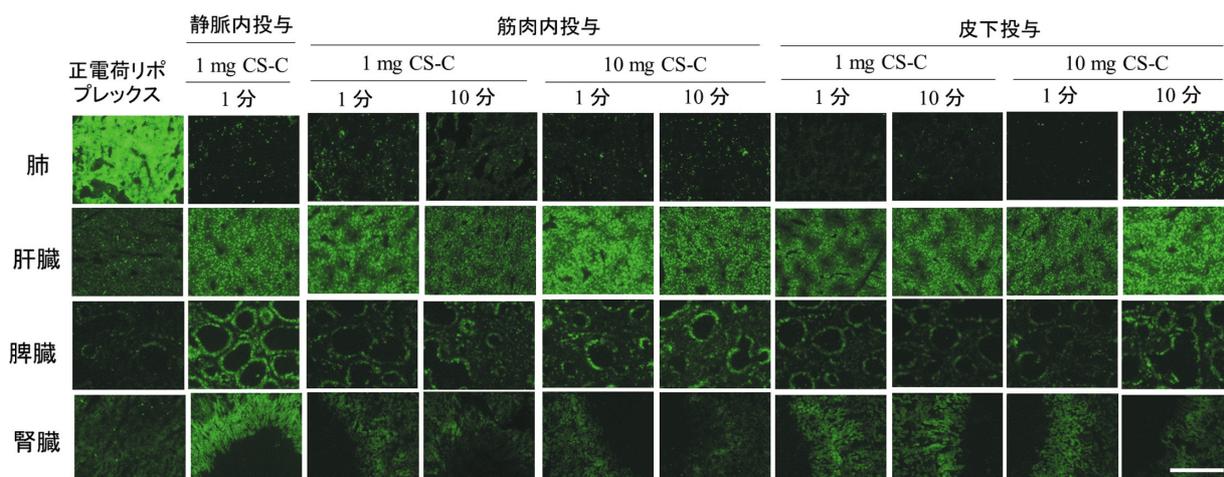


図 10 コンドロイチン硫酸と正電荷リポプレックス連続投与におけるコンドロイチン硫酸の投与方法が及ぼす siRNA のマウス生体内分布への影響²⁸⁾

正電荷リポプレックスは、Cy5.5 標識 siRNA を用いて調製した。CS-C を静脈内、筋肉内、皮下投与 1 分または 10 分後に正電荷リポプレックスを投与した。投与 1 時間後に各臓器を摘出し、凍結切片を作製した。各臓器における siRNA の局在は、蛍光顕微鏡により観察した。スケールバー = 1,000 μm

荷脂質や中性脂質の種類を変えても同様に得られた (データ未掲載)^{24, 27)}。

連続投与方法により肝臓へ siRNA を送達した時の副作用を調べるために、マウスに 1 日 1 回、3 日間連続で siRNA を肝臓に導入後、肝臓と脾臓の障害、血液中の炎症性サイトカイン濃度変化を調べた。その結果、正電荷リポプレックスの単独投与または PGA と正電荷リポプレックスの連続投与においては、肝障害のマーカであるグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) 値の血中濃度の上昇、一過的な脾臓の肥大、血清中の TNF などの炎症性サイトカイン濃度の上昇などの副作用が観察された (データ未掲載)²⁹⁾。一方、CS-C と正電荷リポプレックスの連続投与においては、一過的な脾臓の重量の増加が認められたものの、他に副作用は認められなかった (データ未掲載)²⁹⁾。正電荷リポソムの組成に用いられている DOTAP は炎症を惹起することから、免疫療法においてアジュバンドとして用いられている³⁰⁾。そのため、正電荷リポプレックス投与時に引き起こされる炎症等の副作用の原因は、正電荷リポソムの組成に含まれる DOTAP によるものと考えられた。一方、コンドロイチン硫酸は抗炎症作用を有しており、現在、国内において、症候性神経痛、腰痛症、関節痛、肩関節周囲炎などに対する治療薬として用いられている³¹⁾。以上のことから、CS-C と正電荷リポプレックスの連続投与は、コンドロイチン硫酸の抗炎症作用により正電荷リポプレックス投与によって惹起される炎症症状を抑制できたため、副作用が少なかったのではないかと考えられた³²⁾。

現在国内では、コンドロイチン硫酸の筋注または静注

用製剤が承認されている。そこで、CS-C の静脈内投与以外の投与方法でも同様に連続投与方法により正電荷リポプレックスを肝臓に送達できるかどうか検討を行った。その結果、1 mg または 10 mg の CS-C をマウスに皮下または筋肉内投与 1 分後または 10 分後に正電荷リポプレックスを投与しても、効率よく肝臓に siRNA を送達できることが判った (図 10)²⁸⁾。そのため、CS-C 静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与後のマウス血中濃度を測定した。CS-C の血中濃度は、静脈内投与>筋肉内投与>皮下投与の順で高くなり (表 2)²⁸⁾、血液中に少なくとも 10~20 μg/mL の CS が存在する時に正電荷リポプレックスを投与すると、効率的に肝臓に siRNA を送達できることが判った。ヒトにおいては、200 mg の CS を健康人に筋肉内投与した場合、最高血中濃度が 11.9 μg/mL、最高血中濃度到達時間は 0.45 時間である (添付文書のデータより)。以上の結果から、臨床でヒトに使用されている CS の投与方法・投与量で十分、静脈内投与した正電荷リポプレックスを肝臓に送達できる CS の血中濃度を得ることができると判った。

表 2 コンドロイチン硫酸 (CS-C) 投与後の血中濃度²⁸⁾

投与経路	時間	1 mg CS-C 投与後の血中濃度 (μg/mL)	10 mg CS-C 投与後の血中濃度 (μg/mL)
静脈内投与	1 分	774.2 ± 12.3	-
	10 分	363.5 ± 16.8	-
筋肉内投与	1 分	10.0 ± 11.0	64.0 ± 21.9
	10 分	22.2 ± 3.4	308.9 ± 31.0
皮下投与	1 分	9.5 ± 1.4	14.0 ± 12.5
	10 分	17.0 ± 8.7	68.1 ± 13.8

4. 負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与による肝転移がん治療

負電荷ポリマーと正電荷リポプレックスの連続投与により肝臓に siRNA を送達できることが明らかとなったため、次に肝転移がんに対して連続投与法により siRNA をがん細胞内に送達し、標的遺伝子の発現を抑制できるか検討を行った。ヒト乳がん MCF-7 細胞のルシフェラーゼ発現安定株をマウス脾臓内に移植し、脾臓から門脈を介して肝臓に転移する肝転移がんモデルマウスを作製した。この肝転移モデルマウスに対し、CS-C または PGA とルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA (Luc siRNA) を用いて調製した正電荷リポプレックスを連続投与したところ、コントロール siRNA (Cont siRNA) 投与群と比較して高いルシフェラーゼ活性の抑制効果が観察された (図 11)²⁹⁾。この結果から、連続投与により肝転移がんに送達された siRNA は、がん細胞内で発現している標的遺伝子を特異的に抑制できることが判った。

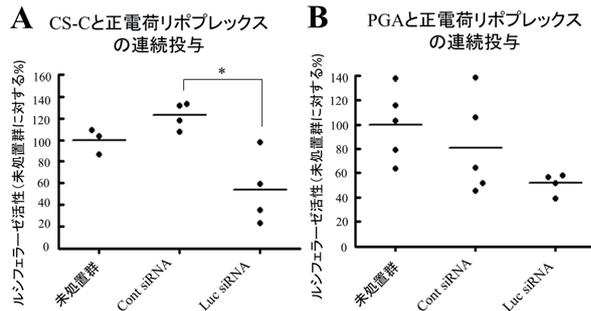


図 11 MCF-7 肝転移乳がんモデルマウスにおけるコンドロイチン硫酸 (CS-C) またはポリグルタミン酸 (PGA) と正電荷リポプレックス連続投与におけるがん細胞における遺伝子発現抑制効果²⁹⁾

MCF-7 細胞のルシフェラーゼ安定株をマウス脾臓内注射し、肝転移がんモデルマウスを作製した。正電荷リポプレックスは、Cont siRNA または Luc siRNA を用いて調製した。移植後 10、11、12 日目に CS-C (A) または PGA (B) 投与 1 分後に正電荷リポプレックスを投与した。移植後 14 日目にがんが転移した肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。* $p < 0.05$ 。

次に、がん増殖を抑制するがん治療用の siRNA を連続投与法により肝転移がんを送達し、転移がんの増殖を抑制できるかどうか検討した。これまでの報告において、protein kinase N3 (PKN3) に対する siRNA のリポソーム製剤 (Atu027) が、肺転移がんなどの転移モデルマウスに対して尾静脈内投与によりがんの転移を抑制できることが明らかにされていた³⁴⁻³⁶⁾。そこで、PKN3 siRNA を転移がん治療用 siRNA として合成し、PKN3 siRNA を用いて調製した正電荷リポプレックスと CS-C を連続投与することで、肝転移がんの増殖を抑制できる

か検討した。肝転移モデルマウスの作製には、PKN3 発現陽性株であるヒト乳がん MDA-MB-231 細胞と PKN3 発現陰性株である MCF-7 細胞を用いた。また、肝転移がんの治療は、PKN3 siRNA と抗がん薬のドキソルビシン (DXR) との併用で行った。その結果、MDA-MB-231 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与で高い抗腫瘍効果が観察されたが、DXR の併用による相加・相乗効果は見られなかった (図 12A)³³⁾。一方、MCF-7 転移がんにおいては、PKN3 siRNA 単独投与では抗腫瘍効果は観察されなかったものの、DXR と PKN3 siRNA の併用群においては、高い抗腫瘍効果が確認できた (図 12B)³³⁾。

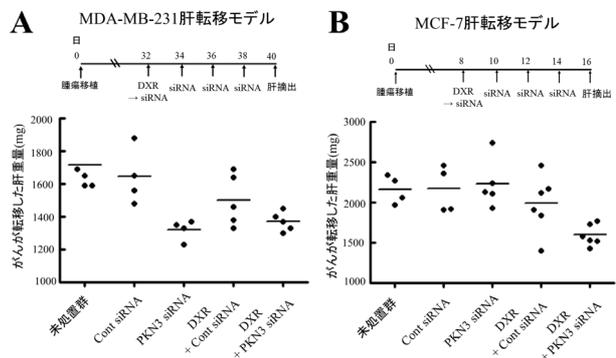


図 12 MDA-MB-231 (A) または MCF-7 (B) 肝転移乳がんモデルマウスにおけるコンドロイチン硫酸と正電荷リポプレックス連続投与による PKN3 siRNA による抗腫瘍効果³³⁾

MDA-MB-231 細胞 (A) または MCF-7 細胞 (B) をマウス脾臓内注射し、肝転移がんモデルマウスを作製した。正電荷リポプレックスは、Cont siRNA または PKN3 siRNA を用いて調製した。肝転移がんに対する siRNA の導入は、1 mg CS-C 静脈内投与 1 分後に正電荷リポプレックスを投与することで行った。MDA-MB-231 肝転移モデルマウスにおいては、移植後 32 日目に 3 mg/kg で DXR を投与し、その 1 時間後に siRNA を投与した。さらに移植後 34、36、38 日目に siRNA を投与し、移植後 40 日目にがんが転移した肝臓を摘出して重量を測定した。また、MCF-7 肝転移モデルマウスにおいては、移植後 8 日目に 3 mg/kg で DXR を投与し、その 1 時間後に siRNA を投与した。さらに移植後 10、12、14 日目に siRNA を投与し、移植後 16 日目にがんが転移した肝臓を摘出して重量を測定した。

PKN3 は、がん細胞以外にも、毛細血管やリンパ管の内皮細胞などにも発現しており、内皮細胞における PKN3 の発現を抑制すると新生血管やリンパ管の形成が阻害できることが報告されている³⁷⁾。さらに血管内皮細胞における PKN3 の発現を抑制すると、血液中を流れるがん細胞と血管内皮細胞との接着に関係する ICAM-1 の発現量が減少することや、血管内皮細胞間の接着性を高める VE カドヘリンの発現量が上昇することも報告されている。以上の知見より、がん細胞における

PKN3 発現の有無によらず PKN3 siRNA 単独または DXR との併用により抗腫瘍効果が得られたのは、連続投与法により PKN3 siRNA が、がん組織中の血管内皮細胞にも導入され、血管形成阻害作用または血液を介したがん転移抑制効果により肝臓における転移がんの増殖を抑制したからではないかと考えられた。以上の結果より、CS-C と正電荷リポプレックスの連続投与による siRNA の肝転移がんへの導入は、肝転移がんの治療に有効であることが明らかとなった。

5. おわりに

siRNA、アプタマー、アンチセンス核酸などの核酸医薬品は、次世代のバイオ医薬品として着目されている。しかしながら、現在、国内外で承認されている核酸医薬品は、加齢黄斑変性症に対する RNA アプタマー (ペガブタニブナトリウム、マクジェン®)、家族性高コレステロール血症の治療のためのアンチセンス核酸 (ミポメルセン)、サイトメガロウイルス性網膜炎の治療のためのアンチセンス核酸 (ホミビルセン) の 3 品目のみであり、いずれも遺伝子ベクターを用いず核酸溶液としてヒ

トに投与されている。今後、核酸医薬品を効率よく疾患部位に送達できる DDS 手法が開発されれば、多くの核酸医薬品が臨床応用されるものと予想される。現在、肝がんや肝転移がんに対する核酸医薬品としては、がん細胞の増殖に関わるキネシンスピンドルタンパク質 (KSP) と血管新生を促す血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する 2 種類の siRNA をリポソーム内に封入した核酸医薬品 (ALN-VSP02) が国外で臨床試験されている。一方、筆者は、正電荷リポプレックス投与時に、コンドロイチン硫酸などの負電荷ポリマーを用いることで、静脈内投与した正電荷リポプレックスの体内動態を変化させ、肝臓や肝転移がん siRNA を送達できる連続投与法を開発している。今後は、肝転移がんや肝がんに対する siRNA の治療において、連続投与法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。

謝辞

本研究は、星薬科大学 医薬品化学研究所 創剤構築研究室において得られた研究成果である。

参考文献

- 1) A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391 (1998) 806-811.
- 2) S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, 411 (2001) 494-498.
- 3) P. Kubowicz, D. Zelazczyk, E. Pekala, RNAi in clinical studies, *Curr Med Chem*, 20 (2013) 1801-1816.
- 4) S. Zhang, D. Zhi, L. Huang, Lipid-based vectors for siRNA delivery, *J Drug Target*, 20 (2012) 724-735.
- 5) H. Eliyahu, N. Serval, A.J. Domb, Y. Barenholz, Lipoplex-induced hemagglutination: potential involvement in intravenous gene delivery, *Gene Ther*, 9 (2002) 850-858.
- 6) M. Imamura, Y. Kodama, N. Higuchi, K. Kanda, H. Nakagawa, T. Muro, T. Nakamura, T. Kitahara, H. Sasaki, Ternary complex of plasmid DNA electrostatically assembled with polyamidoamine dendrimer and chondroitin sulfate for effective and secure gene delivery, *Biol Pharm Bull*, 37 (2014) 552-559.
- 7) Y. Hattori, H. Yamasaku, Y. Maitani, Anionic polymer-coated lipoplex for safe gene delivery into tumor by systemic injection, *J Drug Target*, 21 (2013) 639-647.
- 8) K. Hagiwara, S. Kishimoto, M. Ishihara, Y. Koyama, O. Mazda, T. Sato, In vivo gene transfer using pDNA/chitosan/chondroitin sulfate ternary complexes: influence of chondroitin sulfate on the stability of freeze-dried complexes and transgene expression in vivo, *J Gene Med*, 15 (2013) 83-92.
- 9) T. Kurosaki, M. Uematsu, K. Shimoda, K. Suzuma, M. Nakai, T. Nakamura, T. Kitahara, T. Kitaoka, H. Sasaki, Ocular gene delivery systems using ternary complexes of plasmid DNA, polyethylenimine, and anionic polymers, *Biol Pharm Bull*, 36 (2013) 96-101.
- 10) K. Hamada, C. Yoshihara, T. Ito, K. Tani, M. Tagawa, N. Sakuragawa, H. Itoh, Y. Koyama, Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage-colony-stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer, *J Gene Med*, 14 (2012) 120-127.
- 11) T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Fumoto, K. Nishida, K. Yamamoto, H. Nakagawa, Y. Kodama, N. Higuchi, T. Nakamura, H. Sasaki, Chondroitin sulfate capsule system for efficient and secure gene delivery, *J Pharm Pharm Sci*, 13 (2010) 351-361.
- 12) M. Chen, Z. Zeng, X. Qu, Y. Tang, Q. Long, X. Feng, Biocompatible anionic polyelectrolyte for improved liposome based gene transfection, *Int J Pharm*, 490 (2015) 173-179.
- 13) K. Kanda, Y. Kodama, T. Kurosaki, M. Imamura, H. Nakagawa, T. Muro, N. Higuchi, T. Nakamura, T. Kitahara, M. Honda, H. Sasaki, Ternary complex of plasmid DNA with protamine and gamma-polyglutamic acid for biocompatible gene delivery system, *Biol Pharm Bull*, 36 (2013) 1794-1799.
- 14) S.K. Tripathi, R. Goyal, K.M. Ansari, K. Ravi Ram, Y. Shukla, D.K. Chowdhuri, K.C. Gupta, Polyglutamic acid-based nanocomposites as efficient non-viral gene carriers in vitro and in vivo, *Eur J Pharm Biopharm*, 79 (2011) 473-484.

- 15) T. Kurosaki, T. Kitahara, S. Fumoto, K. Nishida, J. Nakamura, T. Niidome, Y. Kodama, H. Nakagawa, H. To, H. Sasaki, Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials*, 30 (2009) 2846-2853.
- 16) T. Ito, Y. Koyama, M. Otsuka, Preparation of calcium phosphate nanocapsule including deoxyribonucleic acid-polyethyleneimine-hyaluronic acid ternary complex for durable gene delivery, *J Pharm Sci*, 103 (2014) 179-184.
- 17) C.J. Chen, Z.X. Zhao, J.C. Wang, E.Y. Zhao, L.Y. Gao, S.F. Zhou, X.Y. Liu, W.L. Lu, Q. Zhang, A comparative study of three ternary complexes prepared in different mixing orders of siRNA/redox-responsive hyperbranched poly (amido amine)/hyaluronic acid, *Int J Nanomedicine*, 7 (2012) 3837-3849.
- 18) J. Zhang, C. He, C. Tang, C. Yin, Ternary polymeric nanoparticles for oral siRNA delivery, *Pharm Res*, 30 (2013) 1228-1239.
- 19) H.D. Lu, H.Q. Zhao, K. Wang, L.L. Lv, Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis, *Int J Pharm*, 420 (2011) 358-365.
- 20) H. Lu, L. Lv, Y. Dai, G. Wu, H. Zhao, F. Zhang, Porous chitosan scaffolds with embedded hyaluronic acid/chitosan/plasmid-DNA nanoparticles encoding TGF-beta1 induce DNA controlled release, transfected chondrocytes, and promoted cell proliferation, *PLoS one*, 8 (2013) e69950.
- 21) Z.X. Liao, Y.C. Ho, H.L. Chen, S.F. Peng, C.W. Hsiao, H.W. Sung, Enhancement of efficiencies of the cellular uptake and gene silencing of chitosan/siRNA complexes via the inclusion of a negatively charged poly(gamma-glutamic acid), *Biomaterials*, 31 (2010) 8780-8788.
- 22) E.J. Kim, G. Shim, K. Kim, I.C. Kwon, Y.K. Oh, C.K. Shim, Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs, *J Gene Med*, 11 (2009) 791-803.
- 23) Y. Hattori, A. Nakamura, S. Arai, M. Nishigaki, H. Ohkura, K. Kawano, Y. Maitani, E. Yonemochi, In vivo siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-L-glutamic acid-coated lipoplex, *Results in Pharma Sciences*, 4 (2014) 1-7.
- 24) Y. Hattori, S. Arai, R. Okamoto, M. Hamada, K. Kawano, E. Yonemochi, Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver, *Int J Pharm*, 476 (2014) 289-298.
- 25) Y. Tan, F. Liu, Z. Li, S. Li, L. Huang, Sequential injection of cationic liposome and plasmid DNA effectively transfects the lung with minimal inflammatory toxicity, *Mol Ther*, 3 (2001) 673-682.
- 26) J.S. Zhang, F. Liu, C.C. Conwell, Y. Tan, L. Huang, Mechanistic studies of sequential injection of cationic liposome and plasmid DNA, *Mol Ther*, 13 (2006) 429-437.
- 27) Y. Hattori, S. Arai, T. Kikuchi, M. Hamada, R. Okamoto, Y. Machida, K. Kawano, Optimization of siRNA delivery method into the liver by sequential injection of polyglutamic acid and cationic lipoplex, *Pharmacology & Pharmacy*, 6 (2015) 302-310.
- 28) Y. Hattori, Y. Yoshiike, T. Kikuchi, N. Yamamoto, K. Ozaki, H. Onishi, Evaluation of injection route of anionic polymer for siRNA delivery into the liver by sequential injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J Drug Deliv Sci Tec*, 35 (2016) 40-49.
- 29) Y. Hattori, S. Arai, T. Kikuchi, K. Ozaki, K. Kawano, E. Yonemochi, Therapeutic effect for liver-metastasized tumor by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA, *J Drug Target*, 24 (2016) 309-317.
- 30) E.A. Vasievich, S. Ramishetti, Y. Zhang, L. Huang, Trp2 peptide vaccine adjuvanted with (R)-DOTAP inhibits tumor growth in an advanced melanoma model, *Mol Pharm*, 9 (2012) 261-268.
- 31) N. Volpi, Condrosulf(R): structural characterization, pharmacological activities and mechanism of action, *Curr Med Chem*, 21 (2014) 3949-3961.
- 32) F. Ronca, L. Palmieri, P. Panicucci, G. Ronca, Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate, *Osteoarthritis Cartilage*, 6 Suppl A (1998) 14-21.
- 33) Y. Hattori, T. Kikuchi, M. Nakamura, K. Ozaki, H. Onishi, Therapeutic effects for liver- and lung-metastasized tumors by combination therapy of PKN3 siRNA with doxorubicin, *Oncol Lett*, in press.
- 34) M. Aleku, P. Schulz, O. Keil, A. Santel, U. Schaeper, B. Dieckhoff, O. Janke, J. Endruschat, B. Durieux, N. Roder, K. Löffler, C. Lange, M. Fechtner, K. Mopert, G. Fisch, S. Dames, W. Arnold, K. Jochims, K. Giese, B. Wiedenmann, A. Scholz, J. Kaufmann, Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression, *Cancer Res*, 68 (2008) 9788-9798.
- 35) A. Santel, M. Aleku, N. Roder, K. Mopert, B. Durieux, O. Janke, O. Keil, J. Endruschat, S. Dames, C. Lange, M. Eisermann, K. Löffler, M. Fechtner, G. Fisch, C. Vank, U. Schaeper, K. Giese, J. Kaufmann, Atu027 prevents pulmonary metastasis in experimental and spontaneous mouse metastasis models, *Clin Cancer Res*, 16 (2010) 5469-5480.
- 36) D. Strumberg, B. Schultheis, U. Traugott, C. Vank, A. Santel, O. Keil, K. Giese, J. Kaufmann, J. Drevs, Phase I clinical development of Atu027, a siRNA formulation targeting PKN3 in patients with advanced solid tumors, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 50 (2012) 76-78.
- 37) K. Mopert, K. Löffler, N. Roder, J. Kaufmann, A. Santel, Depletion of protein kinase N3 (PKN3) impairs actin and adherens junctions dynamics and attenuates endothelial cell activation, *Eur J Cell Biol*, 91 (2012) 694-705.

Development of siRNA therapy for liver-metastasized tumor by
sequential injection of anionic polymer and siRNA lipoplex

Yoshiyuki HATTORI

Department of Drug Delivery Research, Hoshi University

We developed novel siRNA transfer method to the liver by sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic liposome/siRNA complex (cationic lipoplex). When cationic lipoplex was intravenously injected into mice, the accumulation of siRNA was mainly observed in the lungs. In contrast, when cationic lipoplex was intravenously injected at 1 min after intravenous injection of chondroitin sulfate C (CS), siRNA was accumulated in the liver. Furthermore, when cationic lipoplex was intravenously injected into mice bearing liver metastasis of human breast tumor MCF-7 at 1 min after intravenous injection of CS, siRNA was accumulated in tumor-metastasized liver. In terms of a gene silencing effect, sequential injections of CS plus cationic lipoplex of luciferase siRNA could reduce luciferase activity in liver MCF-7-Luc metastasis. Moreover, sequential injections of CS plus cationic lipoplex of protein kinase N3 (PKN3) siRNA could suppress tumor growth in the mice bearing liver metastasis. From these findings, sequential injection of CS and cationic lipoplex of siRNA might be a novel systemic method of delivering siRNA to liver metastasis.