博士論文 (要約)

Preparation and Characterization of Inorganic/Organic Hybrid Micelles with siRNA-Loaded Calcium Phosphate/Charge-Conversional Polymer for siRNA Delivery

(リン酸カルシウムと pH 応答性電荷反転型ポリマーから構築される無機／有機ハイブリッドミセル型 siRNA キャリアの調製と機能評価)

前田　芳周　(Yoshinori Maeda)

近年、特定の遺伝子発現を制御する方法としてsmall interfering RNA (siRNA)によるRNA干渉法が広く普及している。siRNAは、20–23塩基対の短い2本鎖RNAであり、自身の持つ塩基配列と相補的な配列を有するmRNAの分解を誘起することで、標的遺伝子の発現を抑制する。この配列特異的かつ高効率の遺伝子発現抑制効果から、siRNAはがんやウィルス感染症など様々な疾患に対する治療薬としての応用が期待されている。一方で、siRNAは細胞膜と同様に負電荷を帯びているため細胞膜透過性が低く、また細胞内に取り込まれたとしても細胞内消化器官である後期エンドソーム／リソソームへと移送され分解を受ける。さらに、生体内においては分解酵素により速やかに分解・代謝されるため、単独で標的とする組織に到達することは困難である。そこで、これらの問題点を解決し得る送達システムが必要となる。

先行研究において、リン酸カルシウム (CaP) を poly(ethylene glycol)と pH 応答性電荷反転型ポリアニオン poly{*N''*-[*N'*-(*N*-*cis*-aconityl-2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide}のブロック共重合体 (PEG-PAsp(DET-ACO): PEG-CCP)で被覆した siRNA 送達システムが報告されている。CaP 粒子は歯や骨と同様の組成であることから、生体適合性に優れ、かつ siRNA のようなポリアニオンを吸着することが知られている。また、PEG-CCP は細胞外の中性環境下 (pH 7.4)ではポリアニオン型 (PEG-PAsp(DET-ACO))として存在するが、エンドソーム内酸性環境下 (pH 5.5)では膜傷害性を有するポリカチオン型 (PEG-PAsp(DET))へと変換され、CaP粒子に担持された核酸のエンドソーム脱出を促進する。これまでにCaP粒子をPEG-CCPで被覆することで、粒子径100 nm以下のsiRNA内包ミセルが調製できること、および*in vitro*で siRNA のエンドソーム脱出を促進することが明らかとなっている。

本研究では特にがん治療を目的として、全身投与を可能とする siRNA 送達システムの構築および siRNA 内包 PEG-CCP/CaP ミセルの更なる機能性向上を検討した。

まず、PEG-CCP を用いて siRNA 内包ミセルを調製し、37℃の 10%牛胎児血清 (FBS)含有培地中および疑似細胞質液中において、ミセルからの siRNA 放出挙動を蛍光相関分光法(FCS)により確認した。ミセルに内包された蛍光標識 siRNA の拡散係数は、10%FBS 含有培地中では 24 時間変化しなかったが、疑似細胞質液中では 1 時間以内に siRNA 単体と等しい値まで増加した。このことから siRNA は、カルシウムイオン (Ca^{2+})濃度の高い FBS 含有培地中では安定にミセルに内包される一方で、Ca^{2+}濃度の低い細胞質環境ではイオン平衡による CaP 粒子の溶出に伴い、ミセルから放出されることが示唆された。さらに、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する siRNA (siVEGF)内包ミセルを調製し、*in vitro* においてヒト膵臓がん細胞 (BxPC3)に対する導入試験を行った。siVEGF 内包ミセルは、非治療用 siRNA (siScr)内包ミセルと比較し、顕著な遺伝子発現抑制効果を発揮した。併せて細胞毒性試験も行ったところ、有意な細胞毒性は見られなかった。すなわち、siRNA 内包 PEG-CCP/CaP ミセルは、siRNA を効率的に培養細胞内へ導入可能、かつ安全性にも優れることが示された。そこで、BxPC3 皮下移植モデルマウスを作製し、腫瘍体積変化を指標にミセルの抗腫瘍効果を評価した。その結果、無治療群、siRNA 非内包ミセル、および siScr 内包ミセル投与群と比較し、

siVEGF 内包ミセル投与群は有意に腫瘍の増殖を抑制した。得られた抗腫瘍効果が RNA 干渉によるものであることを確認するため、siRNA 内包ミセル投与 24 時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍組織中の VEGF mRNA 量を定量的 PCR 法により評価した。結果として、siVEGF 内包ミセル投与群においてのみ VEGF mRNA の有意な減少が確認された。さらに、蛍光標識 siRNA を用いて siRNA 内包ミセルの腫瘍集積性を確認したところ、siRNA 単体投与群と比較し、siRNA 内包ミセルは顕著に腫瘍組織へ集積した。したがって、siRNA を PEG-CCP/CaP ミセルに内包することで、siRNA が安定な状態で腫瘍組織へと送達された結果、RNA 干渉による VEGF mRNA の減少を通じて優れた腫瘍増殖抑制効果が得られたと考えられる。以上の結果より、PEG-CCP/CaP ミセルががん治療用 siRNA 送達システムとして、優れたプラットホームであることが示された。

一般的に、がん細胞皮下移植モデルマウスでは、実際の腫瘍組織の周辺環境や発現タンパクなどを再現することが困難である。臨床応用を目指す上では、より臨床症状に近いモデルを用いた評価が重要となる。そこで、Zhang らが確立した自然発症膵臓がんモデルマウス (腫瘍部位にルシフェラーゼを発現)を用い、siRNA 内包 PEG-CCP/CaP ミセルの遺伝子発現抑制効果を確認した。具体的には、腫瘍由来の発光量変化を指標として、ミセルのルシフェラーゼ遺伝子 (Luc)発現抑制効果を評価した。siLuc 内包ミセル投与群は、siScr 内包ミセル投与群と比較し、顕著に腫瘍由来の発光量を抑制した。さらに、腫瘍組織内ルシフェラーゼタンパク量を検量線を用いて定量したところ、siLuc 内包ミセル投与群において、ルシフェラーゼタンパクの減少傾向が確認された。したがって、siLuc 内包ミセル投与後における腫瘍由来の発光量の減少が、siLuc によるタンパクの減少によるものであることが示唆された。さらに、蛍光標識 siRNA を用いてミセルの腫瘍集積性を *in vivo* イメージングシステム (IVIS)および腫瘍組織切片にて確認したところ、siRNA 単体投与群と比較し、siRNA 内包ミセルは顕著に siRNA を腫瘍組織へ送達していた。このことから、siRNA 内包ミセルは自然発症膵臓がんモデルマウスにおいても siRNA を安定に腫瘍組織へ送達していることが示された。さらに、siRNA 内包ミセル投与後の血中肝・腎毒性マーカーおよび炎症性サイトカイン産生量を評価したところ、目立った毒性マーカーの変化および炎症性サイトカイン産生は見られなかった。自然発症膵臓がんモデルに対して、siRNA キャリアの全身投与による遺伝子発現抑制効果を発揮した報告は本研究が世界初であり、PEG-CCP/CaP ミセルが膵臓がん治療へ向けて有望な siRNA 送達システムであることが示唆された。

siRNA は未だ高価な化合物であり、実用化に向けてはより低用量で遺伝子発現抑制効果を発揮することが望まれる。一方、これまでに上述の PEG-CCP (PEG-PAsp(DET-ACO)) (以下 ACO と表記)は合成過程で電荷反転をしない副生成物が生じることがわかっている。この副生成物を無くすことで、PEG-CCP による siRNA のエンドソーム脱出能を向上させることが期待される。そこで、さらに効率の良い siRNA 送達システムの構築に向け、PEG-CCP/CaP ミセルの改良を行った。具体的には、ミセルのエンドソーム脱出効率の改善を目指し、合成過程で副生成物を生じない新規 PEG-CCP として

PEG-*block*-poly(*N''*-{*N'*-[*N*-(3-propionyl-2-methylmaleamyl)-2-aminoethyl]-2-aminoethyl}aspartamide)を新たに合成した。この新規 PEG-CCP (以下 PMM と表記)は、従来の ACO と比較し、エンドソーム内酸性環境下でより迅速にポリカチオン型へと電荷反転することで、細胞内取り込み後に迅速なエンドソーム脱出を惹起することが期待される。合成された PMM は副生成物を生じること無く、かつ pH 5.5 において迅速にポリカチオン型へ変換されることが確認された。また、PMM を用いて調製された siRNA 内包ミセル (以下 PMM ミセル)は、DLS 測定の結果、粒子径 53 nm、多分散度 0.10 以下を示し、ACO ミセルと同様に粒度分布の狭いミセルを形成した。さらに、37℃の 10%FBS 含有培地中における PMM ミセルの安定性を FCS により評価したところ、24 時間後においても安定に存在することが確認された。次に、siLuc 内包 PMM ミセルを調製し、ルシフェラーゼ発現ヒト卵巣がん細胞 (SKOV3-Luc)を用いて *in vitro* における導入試験を行い、ACO ミセルと遺伝子発現抑制効果を比較した。その結果、PMM ミセルは ACO ミセルより低用量で顕著な遺伝子発現抑制効果を発揮した。PMM ミセルと ACO ミセルの間で見られた遺伝子発現抑制効果の差を明らかにするため、蛍光標識 siRNA 内包ミセルを調製し、フローサイトメーターを用いた時間依存的な細胞内取り込み量、および共焦点顕微鏡観察下における siRNA のエンドソーム脱出効率の評価を行った。その結果、PMM ミセルおよび ACO ミセルの両者で細胞内取り込み量に有意な差は見られなかった。一方で、PMM ミセルは ACO ミセルと比較し、顕著に siRNA のエンドソーム脱出を促進している様子が観察された。以上より、PEG-CCP の電荷反転速度を向上させることで、PEG-CCP/CaP ミセルの siRNA 送達効率を向上することに成功した。

さらに、PMM ミセルをがん治療へ応用する際に、ミセルが効率良く腫瘍組織へ送達される工夫として、環状 RGD ペプチド (cRGD)の導入を行った。cRGD は様々な腫瘍組織で過剰発現している $\alpha_v\beta_{3/5}$ インテグリンへ高い親和性を有するため、ミセルの腫瘍選択性向上に伴う抗腫瘍効果の増強が期待される。cRGD 導入 PMM を用いてミセルを調製し、DLS 測定を行った結果、cRGD 導入 PMM ミセルは粒子径 67 nm、多分散度 0.10 以下の単峰性のミセルを形成した。そこで、siLuc 内包 cRGD 導入 PMM ミセルを調製し、$\alpha_v\beta_{3/5}$ インテグリンを発現していることで知られるヒト子宮頸がん細胞 (HeLa-Luc)に対する導入試験を行った。その結果、cRGD 導入ミセルは cRGD 非導入ミセルと比較し、遺伝子発現抑制効果を有意に改善した。

以上より、siRNA 内包 PEG-CCP/CaP ミセルは、皮下移植膵臓がんモデルマウスだけでなく、より臨床症状へ近い自然発症膵臓がんモデルマウスに対しても優れた遺伝子発現抑制効果を発揮した。さらに、PEG-CCP の電荷反転を促進し、かつ腫瘍選択性を賦与することで、従来型よりも効果の高いミセルを創製することに成功した。