



Title	新規pH応答性脂質を用いた肝臓標的型siRNAキャリアの開発と肝疾患治療への応用
Author(s)	佐藤, 悠介
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第11416号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11416
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/55768
Type	theses (doctoral)
File Information	Yusuke_Sato.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

新規 pH 応答性脂質を用いた肝臓標的型
siRNA キャリアの開発と肝疾患治療への応用

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬剤分子設計学研究室
佐藤 悠介

目次

略語表.....	3
序論.....	5
本論.....	12
第1章 YSK05-MEND による <i>in vivo</i> 肝臓への siRNA 送達と HCV 治療への応用 ...	12
1-1 緒言	12
1-2 結果	16
1-2-1 YSK05-MEND の組成最適化	16
1-2-2 YSK05-MEND の体内分布と肝毒性評価.....	20
1-2-4 YSK05-MEND の保存安定性評価.....	23
1-2-5 YSK05-MEND による HCV 治療	25
1-3 考察	28
1-4 小括	31
第2章 新規 pH 応答性脂質を用いた肝臓における活性向上と pKa 依存性の検討.....	32
2-1 緒言	32
2-2 結果	33
2-2-1 新規 pH 応答性脂質および MC3 を含む MEND の脂質膜 pKa 評価	33
2-2-2 肝臓 FVII ノックダウン活性における脂質膜 pKa 依存性評価.....	34
2-2-3 脂質 A2-MEND による FVII ノックダウンのメカニズム	35
2-2-4 新規 pH 応答性脂質を含む MEND の肝毒性評価.....	36
2-2-5 脂質 A2-MEND の保存安定性評価	37
2-2-6 各 pH 応答性脂質の膜融合活性評価.....	37
2-2-7 <i>In vitro</i> ノックダウン活性、体内動態、および肝臓内分布の pKa 依存性評価	39
2-2-8 LSEC 標的化の検討.....	40
2-2-9 脂質 A2-MEND の肝実質細胞特異的ノックダウンに関する検討	43
2-4 小括	48
第3章 YSK05-MEND による固形がん組織への siRNA 送達	49
3-1 緒言	49
3-2 結果	51
3-2-1 各種がん細胞株における <i>in vitro</i> ノックダウン活性と細胞毒性評価.....	51
3-2-2 各種がん細胞皮下移植モデルにおけるノックダウン活性と抗腫瘍実験.....	54
3-2-3 各種皮下移植がん組織のキャラクタリゼーションと MEND のがん組織浸透性	58
3-2-4 YSK05-MEND のがん組織浸透性の粒子径依存性評価	62

3-2-5 マイクロ流路を用いた小型 YSK05-MEND の調製と物性・活性評価	66
3-3 考察	71
3-4 小括	76
結論	77
実験方法	79
謝辞	91
参考文献	93

略語表

7-AAD	7-aminoactinomycin
ALT	L-alanine aminotransferase
ApoB	apolipoprotein B
ApoE	apolipoprotein E
ASGPR	asialoglycoprotein receptor
AST	L-asparatase aminotransferase
BSA	bovin serum albumin
cDNA	complementary DNA
Chol	cholesterol
CV	coefficient of variety
DDS	drug delivery system
DDW	distilled deionized water
DMG	dimiristoylglycerol
DODAP	2,3-dioleyl- <i>N,N</i> -dimethylaminopropane
DPC	dynamic polyconjugate
dpm	degradation per minute
DSG	distearoylglycerol
dsRNA	double strand RNA
EPR	enhanced permeability and retention
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovin serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HDL	high density lipoprotein
hr	hour
IFN α	interferon α
IRES	internal ribosomal entry site
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LNP	lipid nanoparticles
LSEC	liver sinusoidal endothelial cell

MEND	multifunctional envelope-type nano device
min	minute
mRNA	messenger RNA
NMR	nuclear magnetic resonance
O/N	overnight
PBS	phosphate buffered saline
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PE (蛍光)	phycoerythrin
PEG	polyethyleneglycol
PFA	paraformaldehyde
PLK1	polo-like kinase 1
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RBC	red blood cell
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
RONDEL	RNAi/oligonucleotide nanoparticle delivery
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	sodium dodecylsulfonate
sec	second
SHM	staggered herringbone microfluidic mixing device
siRNA	short interference RNA
SNALP	stable nucleic acid lipid particle
SR-B1	scavenger receptor type B class 1
<i>t</i> BuOH	tertially butyl alcohol
TNS	sodium 6-(<i>p</i> -toluidino)-2-naphthalene sulfonate
TTR	transthyretin
VEGF	vascular endothelial growth factor

リン脂質については、本文中で初めて使用した際に名称を記載した。

序論

RNA interference (RNAi) は、細胞質内に導入された短鎖 2 本鎖 RNA である short interference RNA (siRNA) が細胞内タンパク質と RNA-induced silencing complex (RISC) というタンパク質-RNA 複合体を形成し、siRNA の guide strand と相補的な塩基配列を有する messenger RNA (mRNA) を切断し、タンパク質への翻訳反応を阻害する現象のことである。この現象は、1998 年に Fire および Mello らによって初めて報告された[1]。この時の発見は、線虫に人為的に長鎖 double strand RNA (dsRNA) を導入した際に、dsRNA と相補的な塩基配列を有する遺伝子の mRNA の分解が起き、その遺伝子の発現抑制が認められたというものであった。その後、この現象は様々な種において高度に保存されたメカニズムであることが明らかになった。一方で、哺乳類細胞に長鎖 dsRNA を導入すると、非特異的な mRNA の分解、タンパク質合成の抑制、そしてインターフェロン応答の活性化が誘起され、導入された細胞はアポトーシスを起こすことから、RNAi の哺乳類細胞への応用性が問題視された[2,3]。しかし、2001 年に Elbashir らが、21 塩基長の dsRNA である siRNA を用いることで、哺乳類細胞において重篤な副作用を生じさせずに RNAi を誘起させることに成功した[4]。それ以来、siRNA は今日の分子生物学に欠かせないツールとなっている。

siRNA は、その塩基配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、医薬への応用が期待されている。近年、オミックス研究の進展によって、疾患に関与するタンパク質などの標的遺伝子の同定が容易になってきたにも関わらず、従来の低分子医薬では、標的分子への十分な親和性、特異性、体内動態、さらには毒性プロファイルを全て満たす阻害薬を発見する作業が律速段階になっているため、新薬開発の効率は一向に改善していないのが現状である[5]。それと比較して siRNA の場合、近年行われたヒトゲノムプロジェクトの完遂により、標的分子の同定が出来れば siRNA 配列を極めて迅速に設計することが可能である。また、siRNA は数 pM から fM レベルの極めて低濃度で効果を発揮するものもしばしば見受けられ、低分子医薬と比較しても標的分子に依存せずに安定的に高い活性を得ることができると考えられている[6]。さらに、低分子医薬や、近年の医薬品市場への躍進が著しい抗体医薬では、標的になり得る疾患関連遺伝子の 2 割程度しかカバーできていないと見積もられている一方で、siRNA は原理的にほぼ全ての遺伝子を標的とすることが可能であることから、治療対象になる疾患領域を大幅に広げることが可能である[7]。siRNA にはこれらの数多くの利点があるため、医薬への応用研究が盛んに行われ、硝子体内投与、皮下投与および吸入等の局所投与さらには全身投与での臨床試験が行われている。

一方で、siRNA は分子量約 13,000 の負電荷を有する親水性高分子であるため、単純拡散による細胞膜透過は期待できない。また、血中に投与した場合、速やかに腎クリアランスを受け、体外に排泄されてしまう。さらに、生体内では豊富に存在するヌクレアーゼによって容易に分解されてしまう。siRNA を 2'-OMe 修飾や 2'-F 修飾、ホスホロチオエート結合に代表される化学修飾を施すことで、ヌクレアーゼ耐性を向上させることは可能であるが

[8,9,10,11]、修飾 siRNA は活性の低下を引き起こすことも知られ、その化学修飾の程度は厳しく制限される[12]。血中投与による化学修飾 siRNA デリバリーは、2004 年に米国の siRNA ベンチャー企業である Alnylam Pharmaceuticals 社が、3'末端にホスホロチオエート結合を、数塩基に 2'-OMe 修飾を施し、センス鎖の 3'末端にリンカーを介して cholesterol (Chol) を結合させた siRNA (Chol-siRNA) を報告した[13,14]。Chol-siRNA は体内の low density lipoprotein (LDL) や high density lipoprotein (HDL) 等のリポタンパク質と結合し、それぞれの受容体である LDL 受容体 (LDLR) や scavenger receptor type B class 1 (SR-B1) を介して肝臓細胞へ取り込まれ、静脈内投与での ED₅₀ 値は 50 mg/kg であると報告された。また、 α -tocopherol を 5'末端に結合させた Dicer substrate 型 siRNA が、2008 年に Nishina らにより報告され、前述の Chol-siRNA と標的は異なるものの、ED₅₀ 値が 2 mg/kg となり、活性が飛躍的に向上した[15]。さらに最近では、Alnylam 社が化学修飾 siRNA のセンス鎖の 5'末端にリンカーを介して *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) クラスタを結合させたコンジュゲート (GalNAc-siRNA) を開発した (Fig. 1)。GalNAc-siRNA は肝実質細胞の細胞膜表面に高密度に存在するアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) を介して肝実質細胞に取り込まれる。静脈内投与よりも皮下投与の方が適切であることが見出され、transthyretin (TTR) を標的として ED₅₀ 値で 5 mg/kg を示し、現在、家族性アミロイド多発ニューロパシー¹に対する第 II 相臨床試験が行われている (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01981837)。しかし、このような化学修飾 siRNA の静脈内投与におけるバイオアベイラビリティは、後述する siRNA キャリアと比較して 1/100~1/1000 程度に留まる。そのため、siRNA をより効率的に標的組織へ送達させる drug delivery system (DDS) の開発研究が盛んに行われている。肝臓、がん組織、脳および肺などの様々な組織への siRNA 送達キャリアの開発が報告されており、その中でも肝臓およびがん組織を標的とした研究が非常に多い。詳細は後述するが、これら組織の血管には直径 100 nm 以上の間隙が存在するため、100 nm 以下の粒子径に制御されたキャリアは血管を透過してそれぞれの組織の実質細胞に物理的にアクセスすることが、他の組織と比較して容易であることが最大の理由である。以降に肝臓およびがん組織を標的とした siRNA キャリアの中で特に優れた成果を挙げている例を順に述べる。

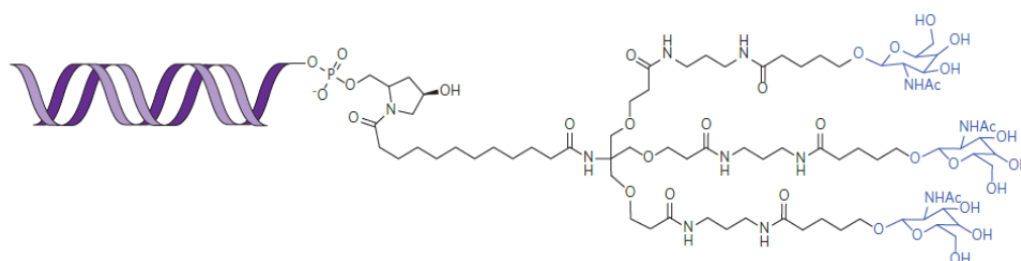


Fig. 1 Alnylam社のGalNAc-siRNAコンジュゲートの構造を示す。

¹ 遺伝的に変異した transthyretin タンパク質が主に肝臓から産生され、血中へ分泌されると、繊維状のアミロイドと呼ばれる特異なタンパク質が形成される。このアミロイドが神経節を含む末梢神経、自律神経系や他の組織に沈着することにより臓器障害を引き起こす、予後不良のアミロイド症である。

静脈内投与によって肝臓、特に肝実質細胞に siRNA キャリアを送達する方法として、能動的標的化および受動的標的化の 2 種類が存在する。前者は肝実質細胞に標的化可能なりガンド分子をキャリアに結合することで行われる。古くは galactose (Gal) の ASGPR への親和性を利用した標的化が広く行われていた。また、前述した GalNAc は Gal よりも ASGPR への高い親和性を有することが知られることから、用いられるようになった[16]。一方、後者に関しては、Yan らが、中性リン脂質と Chol で構成される中性リポソームをマウスに静脈内投与した際、リポソームが内因性の apolipoprotein E (ApoE) 依存的に肝実質細胞に取り込まれることを報告している[17]。また、血中に投与されたキャリアが肝実質細胞へ取り込まれるためには、肝類洞血管内皮細胞に存在するフェネストラと呼ばれる穴を通過し、ディッセ腔側へ移行する必要がある[18]。フェネストラの直径は動物種によって異なるが、マウスでは平均 141 nm 程度、ヒトでは平均 107 nm 程度であると報告されている[19]。従って、肝臓を標的とする際に、キャリアの直径をフェネストラ直径よりも小さく制御する必要がある。

肝臓への siRNA デリバリーキャリアとして臨床試験が進行している例としては、stable nucleic acid-lipid particle (SNALP) (現在の名称は lipid nanoparticle (LNP)) や、dynamic polyconjugates (DPC) を用いる方法がある。まず、LNP は Protiva Biotherapeutics 社 (現 Tekmira 社) がその製造特許を有するリポソーム型 siRNA キャリアである。膜融合活性に優れた独自の pH 応答性カチオン性脂質を含み、エンドソーム内の酸性環境下で中性からカチオン性に変化し、効率的に膜融合を誘起する特徴を持つ[20,21,22]。Alnylam 社は、pH 応答性脂質 DLin-DMA (Fig. 2a) を含む第 1 世代 LNP を用い、標的遺伝子を TTR として、家族性アミロイド多発ニューロパシーに対する第 I 臨床試験を 2010 年 6 月より開始した (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01148953)。最大投与量 1 mg/kg において標的遺伝子の抑制が観察されたが、その効率は 1 人の患者において 80% 程度に達したものの、平均では 40% 程度に留まった[23]。しかし、2012 年に、新たな pH 応答性脂質 DLin-MC3-DMA (MC3) (Fig. 2a) を開発することで、静脈内投与での ED₅₀ 値が 0.005 mg/kg を達成し、肝臓への siRNA 送達効率を飛躍的に向上させることに成功した[24]。そこで、この MC3 を含む第 2 世代 LNP を用いた第 I 相臨床試験が開始され (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01559077) 、0.15

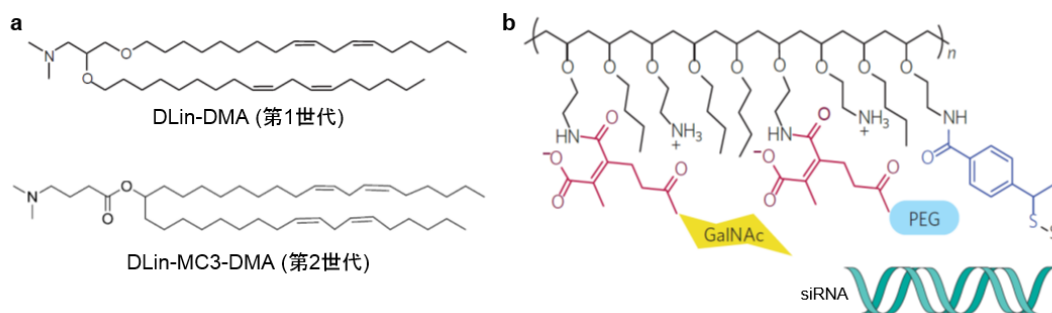


Fig. 2 肝臓標的型 siRNA キャリアの構造と構成物質。(a) LNP に用いられる pH 応答性カチオン性脂質の構造式を示す。(b) DPC の構造を示す。膜障害性を有する poly(butyl amino vinyl ether) (PBAVE) ポリマーの第 1 級アミンに、赤色で示された carboxylated dimethyl maleic acid (CDM) を介して GalNAc あるいは PEG が結合し、また、ジスルフィド結合を介して siRNA が結合している。

mg/kgあるいはそれ以上の投与量では全ての被験者において80%以上のTTR遺伝子発現抑制効果が観察され、血液学的パラメーターの変化も観察されなかったことから、安全性と十分な活性が示された[23]。現在はPatisiranという名前で、第Ⅲ相臨床試験中である(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01960348)。また、この第2世代LNPを用い、標的遺伝子をProprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)として、家族性高コレステロール血症に対する第Ⅰ相臨床試験が2011年9月より開始され(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01437059)、良好な結果が報告されている[25]。さらにMaierらは、MC3を基盤構造として炭化水素鎖の末端あるいは中央部にエステル結合を入れた構造を有する新規pH応答性脂質の開発を報告した[26]。この脂質は細胞内でリパーゼによりエステル結合を切断され、さらにβ酸化を受けることで、siRNA送達後に細胞内で速やかに分解・排泄を受けるため、カチオン性脂質の蓄積毒性が回避され、MC3と比較して毒性が低減されている。また、MC3と同程度の高い活性を有するため、Alynlam社はこの脂質を第3世代として報告している。このような目覚ましい進展により、LNPは現在最もsiRNA医薬の上市に近い技術であると言われている。また、Arrowhead Research Corporation社が特許を有するDPCは、2007年、Rozemaらによって初めて報告された[27]。DPCは膜障害性カチオン性ポリマーに、siRNAがジスルフィド結合を介して結合されている。また、ポリマーのカチオン性を担うアミノ基は、酸性下で速やかに切断されるcarboxylated dimethyl maleic acid (CDM)を介してポリエチレングリコール(PEG)あるいはGalNAcで修飾されることでマスクされている(Fig. 2b)。また、siRNAが結合していないポリマーと、Chol-siRNAを共投与することでも、それぞれが肝実質細胞へ移行し、同一エンドソーム内に移行するために、遺伝子抑制が達成されることが報告された[28]。さらに、ポリマーを膜障害性melittin様ペプチドに置き換えた場合、ED₅₀で0.01 mg/kgという高い活性を達成し[29]、安全性も確認されたため、現在はHepatitis B virus (HBV)に対する第Ⅰ相臨床試験が2013年6月より開始されている(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01872065)。

また、静脈内投与によってがんにsiRNAキャリアを送達するために、PEGでキャリア表面を修飾する手法が汎用されている。がん組織では、細胞分裂が盛んながん細胞へ酸素や栄養を供給するためのルートである血管を確保するために、血管新生が非常に亢進している。この新生血管は正常組織の血管とは異なり、無秩序に発達するために血管内皮細胞間に数百nm程度の間隙が多く存在し、血管透過性が亢進しているという特徴を有する。血中に長時間滞留する高分子はこの間隙を介して受動的にがん組織へ蓄積していく。また、がん組織では高分子化合物の組織外排泄を担うリンパ管の発達未熟であるため、蓄積した高分子化合物は組織からの排泄を受けにくい。この現象はenhanced permeability and retention (EPR)効果として知られている[30,31]。キャリアをPEGで修飾することで、キャリア表面に水和層が形成されることで血漿タンパク質の吸着が抑制される。その結果、血中で長時間循環するようになり、EPR効果によってがん組織へ蓄積することが知られている。現在報告されているsiRNAキャリアのほとんどが、このEPR効果を介したがん組織への受動

的標的化を行っている。このように、PEG 修飾はキャリアの体内動態を向上させるには非常に有用ではあるが、キャリアの細胞内動態の観点では大きな弊害を起すことも明らかになっている。多くの核酸キャリアは、負電荷を有する核酸との静電的な結合と、負電荷を帯びた細胞膜との相互作用を目的として、表面がカチオン性を帯びている。前述のように、PEG 修飾はキャリア表面に水和層を形成させることでカチオン性をマスクするため、細胞膜との結合を阻害することで、キャリアの細胞への取り込みを低下させる[32]。また、リポソームに関して、カチオン性リポソームはエンドソーム膜と逆ヘキサゴナル相への相転移を介した膜融合を起こすことでエンドソーム脱出するモデルが提唱されているが (Fig. 3a) [33]、PEG 修飾はキャリアとエンドソーム膜との結合を阻害する。また、リポソーム脂質膜への PEG 修飾に用いられる PEG 脂質は非常に嵩高い親水部位を有するため、脂質全体として逆コーン型をとる (Fig. 3c)。従って、PEG 脂質は親水部位を内側に向けた円柱型の逆ヘキサゴナル相への相転移を抑制することで、エンドソーム脱出過程を妨げる (Fig. 3b,c) [34]。これらの結果として、PEG で修飾された核酸キャリアによる核酸の細胞質への送達効率が顕著に低下することはよく知られている[35]。この PEG ジレンマとも呼ぶべき、PEG 修飾に伴う細胞内動態効率の低下は、EPR 効果を利用した核酸キャリアを開発する上で回避しなければならない問題である[36]。

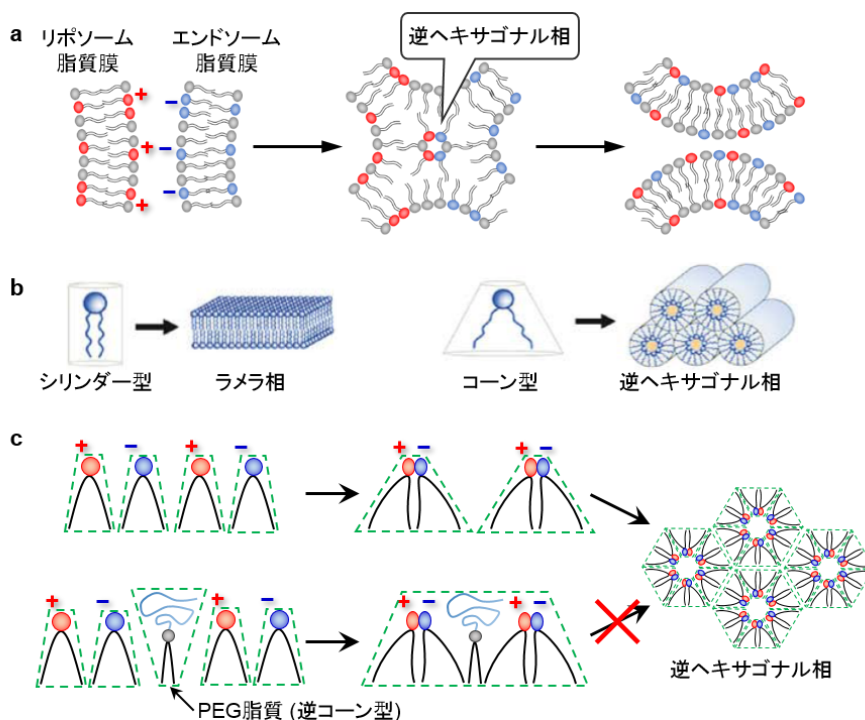


Fig. 3 膜融合過程および、脂質形状と相(多形)の関係。(a) カチオン性リポソーム膜と負電荷リン脂質を含むエンドソーム膜は静電的に結合し、逆ヘキサゴナル相への相転移を介して融合する。(b) 親水部位と疎水部位の断面積が同程度のシリンダー型脂質の集合体はラメラ相を安定にとる。一方で、疎水部位が親水部位と比べて嵩高いコーン型脂質は逆ヘキサゴナル相を安定にとる。(c) カチオン性脂質とアニオン性脂質の各親水部位が静電的相互作用によって近接することで、見かけ上、コーン型に近い構造をとるため、逆ヘキサゴナル相への相転移が促進される。しかし、非常に嵩高い親水部位を有し、逆コーン型をとるPEG脂質が存在する場合、存在しない場合と比較してシリンダー型に近い形になるため、逆ヘキサゴナル相への相転移が妨げられる。

がんへの siRNA デリバリーキャリアとして臨床試験に進行している例としては LNP、RNAi/oligonucleotide nanoparticle delivery (RONDEL)、siRNA-EphA2-DOPC、そして Atu027 がある。LNP に関しては、標的遺伝子を kinesin spindle protein (KSP) および vascular endothelial growth factor (VEGF) とし、肝転移を起こした固形がん患者を対象に行われた[37]。安全性が確認され、また、0.7 mg/kg 以上の投与量では 50%の患者で stable disease を示し、一定の治療効果も確認されている。また、RONDEL は Arrowhead 社の子会社である Calando Pharmaceuticals 社が特許を有し、シクロデキストリンを含むカチオン性ポリマー (CDP)、siRNA、アダマンタンが末端に結合した PEG、さらにその PEG の反対側の末端にトランスフェリンを結合させたもの、計 4 種の構成物を単純混合することで調製される (Fig. 4) [38]。トランスフェリン修飾により、トランスフェリン受容体を高発現するがん細胞に効率よく取り込まれる。固形がん患者を対象に、2008 年 5 月より第 I 相臨床試験が開始され (NCT00689065)、世界で初めてヒトにおける RNAi の誘導を証明したものの[39]、2012 年に RONDEL が腎糸球体基底膜上で分解されることで血中から速やかにクリアランスされることが明らかとなった[40]ことから、2014 年 1 月現在で Arrowhead 社の pipeline から消えている。また、siRNA-EphA2-DOPC はテキサス大学の Sood らのグループにより、2005 年に報告されたものであり、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) と siRNA を *t*BuOH 中で混合し、さらに Tween 20 を混合した溶液を凍結乾燥させ、生理食塩水で再溶解させることで調製される[41]。卵巣がんの腹膜播種モデルや乳がんの同所移植モデルにおけるがんの成長を抑制したことを報告している[41,42,43]。また、本キャリアを多孔性シリコン粒子に組み込むことで siRNA を徐放化し、3 週間に亘って遺伝子発現を持続的に抑制したことを報告した[44]。2012 年 5 月に ClinicalTrials.gov に登録され、今年にも固形がんを対象とした臨床試験が開始される見込みとなっている。

以上のように、現在までに様々な siRNA キャリアが臨床試験に移行しているものの、siRNA 送達の問題が完全に解決している訳ではない。Alynlam 社は、肝臓の遺伝子抑制効率と、肝臓内の RISC に結合した siRNA 量との関係を検討した結果、遺伝子発現を 50%抑

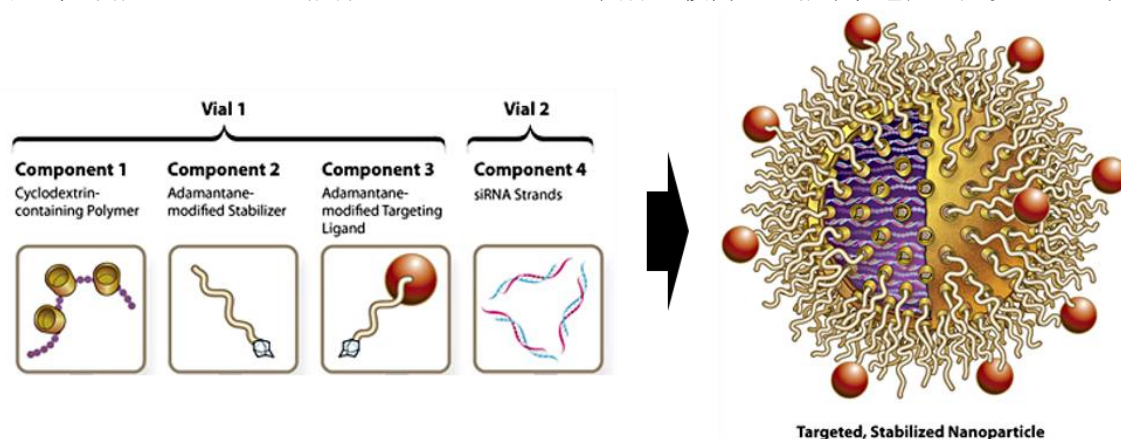


Fig. 4 RONDELの概念図。4種の構成物の単純な混合によって調製を行う。

制するのに必要な siRNA は 1 細胞当たり 400-500 個足らずであることを明らかとした。ED50 や肝細胞数を考慮して計算すると、現時点で世界最高性能を有すると考えられる MC3-LNP による siRNA の肝細胞への送達効率は、僅か 2%程度であると推察されている。実際に、MC3-LNP に siRNA 結合金ナノ粒子を封入し、静脈内投与後の肝臓における金ナノ粒子の細胞内局在を観察したところ、僅か 2%しか細胞質に存在せず、残りの 98%はリソソームに局在していることが明らかとなっている[45]。従って、エンドソーム脱出過程は依然として大きな改善の余地が残されており、本過程の効率の向上は数十倍の活性の向上につながることを示唆している。また、がんを標的とした siRNA 送達キャリアは、肝臓を標的としたものと比較して比較的高い投与量を必要としている。また、達成される遺伝子ノックダウンの効率は 50-70%程度に留まり、肝臓の様に標的遺伝子の発現を 90%以上の高い効率で抑制したデータは見受けられない[46,47]。これは、破綻した血管構造や低 pH 環境等に代表されるがん組織特有の何らかの特徴が関与している可能性が考えられる。

当研究室は、siRNA デリバリーシステムとして、脂質膜が siRNA の周りを覆った構造を有する多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (multifunctional envelope-type nano device; MEND) の開発研究を行っている[48,49]。これまでに、*in vivo*においては肝臓への siRNA 送達に一定の成功を収めているものの、標的遺伝子のノックダウン効率は 1 mg/kg という高い投与量においても 50%程度に留まっていた[50,51]。また、がん組織においても標的遺伝子のノックダウンに成功しているものの、その効率は 40%程度であった[47]。そこで本研究では、筆者が以前に開発した高い膜融合活性を有する pH 応答性脂質、YSK05 (本章の第 1 章において詳細に述べる) を用いた *in vivo* siRNA 送達キャリアの構築を目的とした。肝臓はウィルス性肝炎を抱える臓器であり、新規治療薬の開発が強く望まれている領域であることから、第一の標的を肝臓とした。さらに、依然として強いアンメットメディカルニーズの存在する疾患であるがんを第二の標的とした。第 1 章では、YSK05 を用いた siRNA キャリアの肝臓における遺伝子抑制活性の向上と、hepatitis C virus (HCV) 治療効果の検討を行った。第 2 章では、新規 pH 応答性脂質を用い、pH 応答性脂質の脂質膜 pKa がキャリアの動態・活性等に及ぼす影響についての検討を行った。第 3 章では、効率的な遺伝子ノックダウンを達成するために必要な siRNA キャリアの条件とがん組織の特性との関連性の解明と、それ踏まえた siRNA キャリアの改良を試みた。

本論

第 1 章 YSK05-MEND による *in vivo* 肝臓への siRNA 送達と HCV 治療への応用

1-1 緒言

序論でも述べたように、肝臓の血管内皮細胞にはフェネストラと呼ばれる 100~150 nm 程度の間隙が存在しているために、血中に投与された直径 100 nm 以下のナノ粒子はディッセル腔へ移行し肝実質細胞へアクセスすることが可能である (Fig. 1-1)。また、肝臓は糖尿病、高脂血症、肝炎、肝がんなどの多くの疾患に関わっていることから、肝臓を標的とした核酸キャリア開発が多く行われている。

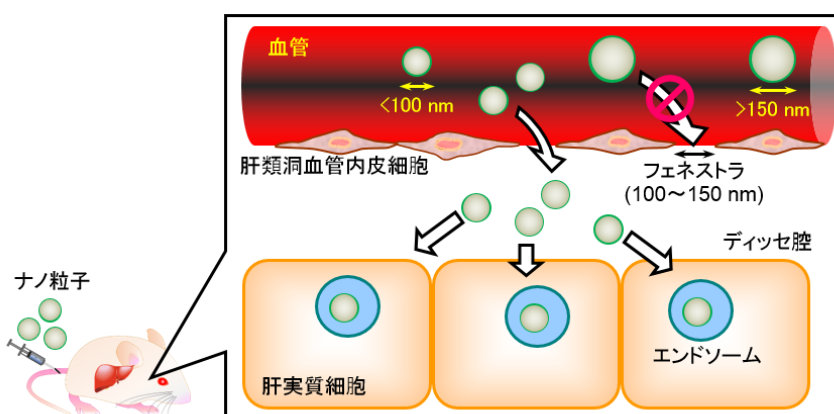


Fig. 1-1 肝類洞血管内皮細胞にはフェネストラと呼ばれる、直径100~150 nm程度の間隙が多数存在している。そのため、直径100 nm以下に制御されたナノ粒子はフェネストラを通過することで血管からディッセル腔へ移行することが物理的に可能であるため、肝実質細胞へアクセスし得る。

電荷が中性のリン脂質とコレステロールからなる中性リポソームを血中に投与すると、ApoE がリポソーム表面に結合し、LDLR を発現する肝実質細胞に取り込まれる。そのため、中性リポソームは肝実質細胞に対する核酸キャリアとして有用であると考えられるが、多くの核酸キャリアは、負電荷を有する核酸をキャリアに効率的に搭載するため、また、負電荷脂質を含むエンドソーム膜との膜融合を目的として内膜および外膜はカチオン性を帯びている。しかし、このようなカチオン性リポソームは血中において血漿タンパク質と非特異的に結合することで細網内皮系により血中から速やかに排除され、標的の肝実質細胞へ移行することができないというジレンマが存在する。

序論で述べた LNP はこのジレンマを解決した 1 つの例である。LNP (Fig. 1-2a) は序論で示したように、親水部位に第 3 級アミンを持つ pH 応答性脂質を含み、血中などの中性環境ではプロトン化しないが、エンドソームなどの酸性 pH ではカチオン性に変化することでエンドソーム膜と相互作用し、膜融合を介して siRNA を細胞質へと送達する (Fig. 1-2b) [52,53,54]。Zimmermann らは、pH 応答性脂質 DLin-DMA を含む LNP を用い、マウス

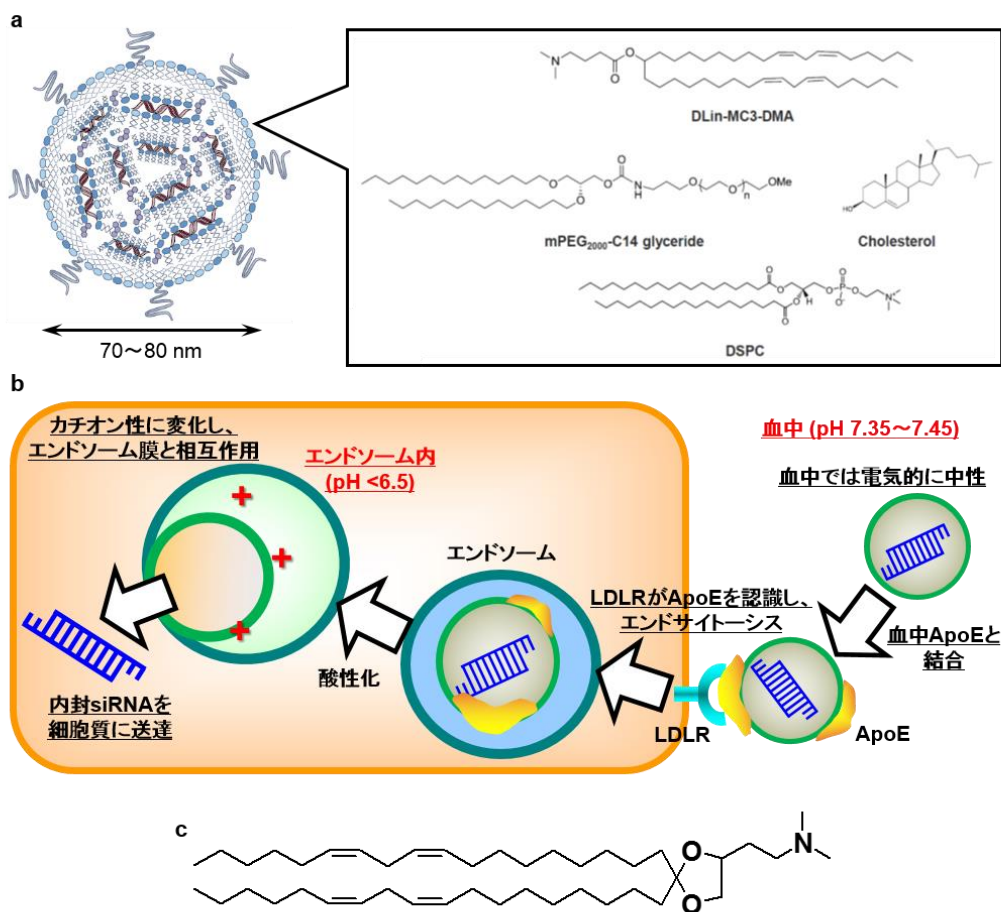


Fig. 1-2 LNPの構造とsiRNA送達メカニズム (a) LNPIは右に示した脂質4種とsiRNAから構成されており、siRNAは脂質に取り囲まれるように内封されている。また、LNPは直径70~80 nm程度に制御されている。(b) pH応答性を有するLNPは血中では電的に中性を示し、ApoEと結合する。ApoEが肝実質細胞上に存在するLDLRと結合することでLNPがエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれる。エンドソームの成熟化に伴ってエンドソーム内pHが減少するとLNPはカチオン性へ変化し、エンドソーム膜との静電的に相互作用を介して内封siRNAを細胞質に送達する。(c) DLin-KC2-DMAの構造式。DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine.

およびサル肝臓において標的遺伝子の顕著なノックダウンに成功した[21]。また、序論で述べたように、エンドソーム膜との膜融合はラメラ相から逆ヘキサゴナル相への相転移過程が重要であるため、この相転移が促進されるように疎水部位が嵩高いコーン型を有する pH 応答性脂質 DLin-KC2-DMA が合理的に設計された[20]。さらにそれを基に多くの pH 応答性脂質が設計された中で DLin-MC3-DMA が見出され、肝実質細胞特異的遺伝子である FVII を ED₅₀ 値として 0.005 mg/kg という投与量でノックダウンが達成された[24]。

当研究室においても独自の pH 応答性脂質である YSK05 の開発に成功している [47,55,56,57]。YSK05 は第 3 級アミンを有する親水基と鎖状ケタール結合を介して 2 本の *cis,cis*-octadeca-9,12-dienol が結合した構造を有する (Fig. 1-3b)。YSK05 が高い膜融合性を有することは、次に示す実験によって示されている。YSK05 あるいは既存の pH 応答性脂質である 2,3-dioleoyl-*N,N*-dimethylammoniumpropane (DODAP) (Fig. 1-3a) を含みリポソームとマウス赤血球を、様々な pH に調整した緩衝液中で混合し、インキュベート後、リポソーム膜と赤血球膜との膜融合による膜の不安定化に伴う赤血球からのヘモグロビン

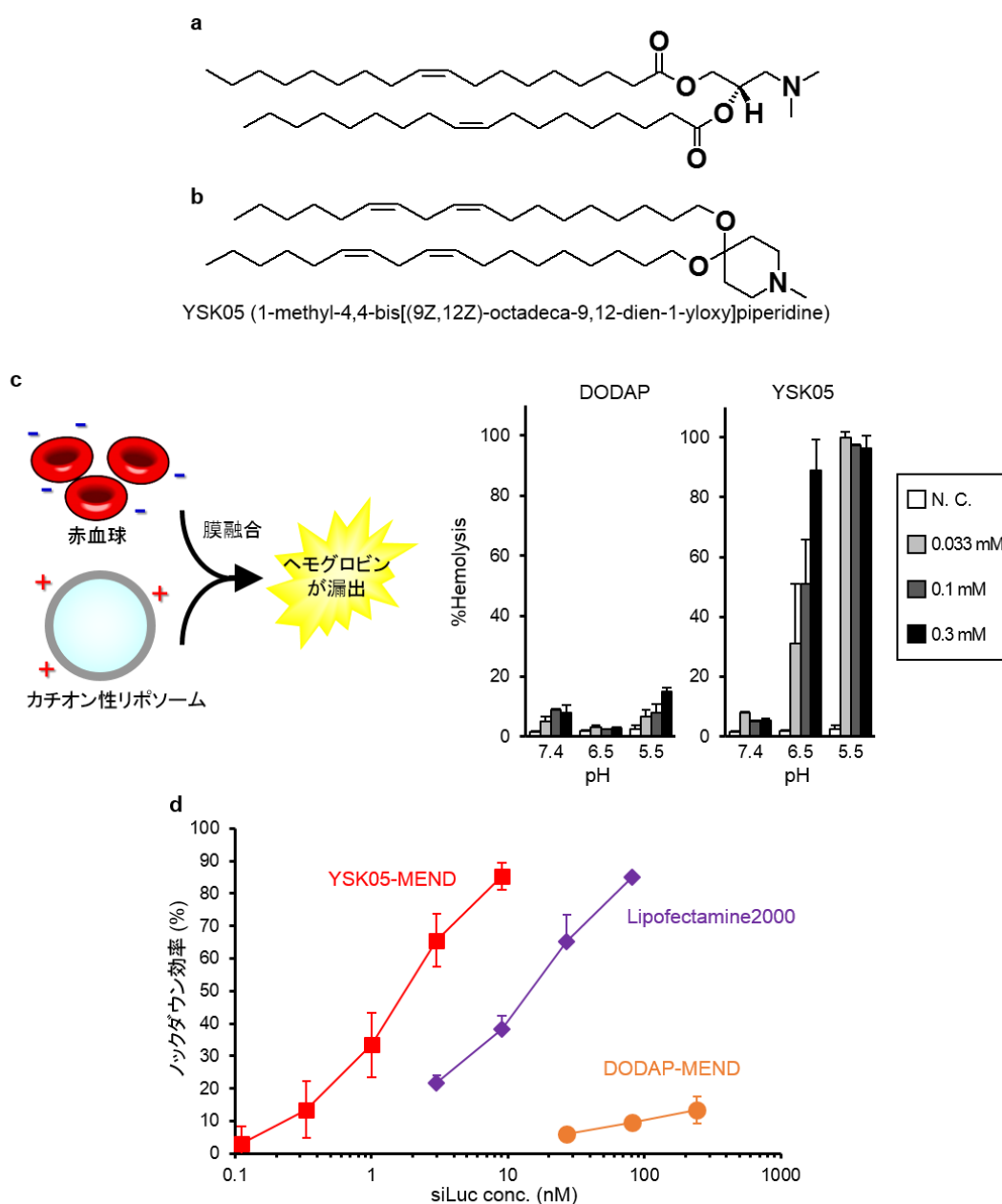


Fig. 1-3 脂質構造と活性。(a,b) DODAP (a) およびYSK05 (b) の構造式。(c) YSK05を含むリポソームの膜融合活性。表面にカチオン性を有するリポソームと赤血球を混合した際、リポソームと赤血球間で膜融合が誘起された場合に、赤血球の膜構造が不安定化し、ヘモグロビンが漏出する。一定量の赤血球と、DODAPあるいはYSK05を含む様々な濃度のリポソームを各pH緩衝液中で混合し、インキュベート後、ヘモグロビン由来の吸光度を測定することで膜融合活性を評価した。(d) YSK05-MENDの*in vitro*における遺伝子ノックダウン活性評価。*In vitro*で培養された、luciferase安定発現HeLa細胞に各MENDおよびLipofectamine 2000を用いてluciferaseに対するsiRNAをトランスフェクションし、luciferaseのノックダウン効率を評価した。なお、DODAPは市販のpH応答性脂質であり、コントロールとして用いた。N.C.: negative control. DODAP: 2,3-dioleoyl-*N,N*-dimethylammonium propane.

の漏出を測定した。その結果、YSK05を含むリポソームでは弱酸性 pH (5.5~6.5) において高いヘモグロビン漏出を引き起こした (Fig. 1-3c)。また、luciferase を安定発現した HeLa 細胞に YSK05 を含む (YSK05-MEND) に封入された luciferase に対する siRNA (siLuc) を添加したところ、添加濃度依存的に luciferase のノックダウンが認められた (Fig. 1-3d)。そのノックダウン活性は DODAP を含む MEND (DODAP-MEND) と比較して非

常に高く (IC₅₀ 値: 2 nM) 、また、市販のトランスフェクション試薬である Lipofectamine 2000 と比べて 10 倍程度上回る高い活性であることが明らかとなった。しかし、YSK05-MEND が静脈内投与後に肝臓において効率的な遺伝子ノックダウンを達成可能かの検討はなされていない。本章では、YSK05-MEND の静脈内投与後の肝臓におけるノックダウンについての検討と、肝疾患治療への応用性の検討を試みた。

1-2 結果

1-2-1 YSK05-MEND の組成最適化

In vitro 培養細胞におけるノックダウン活性を指標として最適化した YSK05-MEND の脂質膜成分には phosphatidylethanolamine (PE) の 1 種である 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (POPE) が含まれている (Fig. 1-4)。PE 系脂質の親水部位の占有体積は小さいため、疎水性部位が比較的高高いコーン型脂質に分類される [58]。従って、PE 系脂質はラメラ相よりも逆ヘキサゴナル相を取りやすく、PE 系脂質を含むリポソームは膜融合活性が高いことが知られている [58]。一方、phosphatidylcholin (PC) 系脂質は親水部位の占有体積が比較的大きいため、シリンダー型を取り、ラメラ相を安定化させる。脂質組成の一部に PE あるいは PC を含む MEND の *in vitro* 培養細胞におけるノックダウン活性を調べたところ、PE 系脂質を含む MEND の活性は PC 系脂質を含む MEND と比較して高いことが明らかとなっている [56]。しかしながら、PE 系脂質を含むリポソームを血中に投与すると補体 C3b と結合する [59]。補体 C3b はその内部にチオエステル結合を有し、タンパク質、糖質そして脂質のヒドロキシル基やアミノ基と共有結合することが知られる [60,61,62]。そのため、第 1 級アミンを持つ PE 系脂質は補体 C3b と共有結合し、オプソニン化を受けることでマクロファージにより認識され、血中から速やかに排除されるため、PE 系脂質を含むリポソームは標的細胞へ到達することが困難である [63]。従って、YSK05-MEND の脂質組成を、*in vivo* 用に最適化する必要がある。実際に、*in vitro* において最適化された脂質組成 (YSK05/POPE/Chol/PEG-DMG (50/25/25/3, mol%)) を有する YSK05-MEND は *in vivo* 肝臓においてノックダウン活性を全く示さなかった (データ未揭示)。そこでまず、YSK05-MEND の脂質組成比を、過去の論文 [16] を参考として YSK05/DSPC/Chol/PEG-DMG (50/10/40/3, mol%) と (Fig. 1-4) し、これを基準組成とした。YSK05 は MEND のエンドソーム膜との膜融合に必須である。また、Chol はリポソームの血液中における物理的安定性を確保する上で必須であることが知られている [64,65,66]。PEG-DMG は炭素数 14 のミリスチン酸を疎水性部位に持つ PEG 脂質である

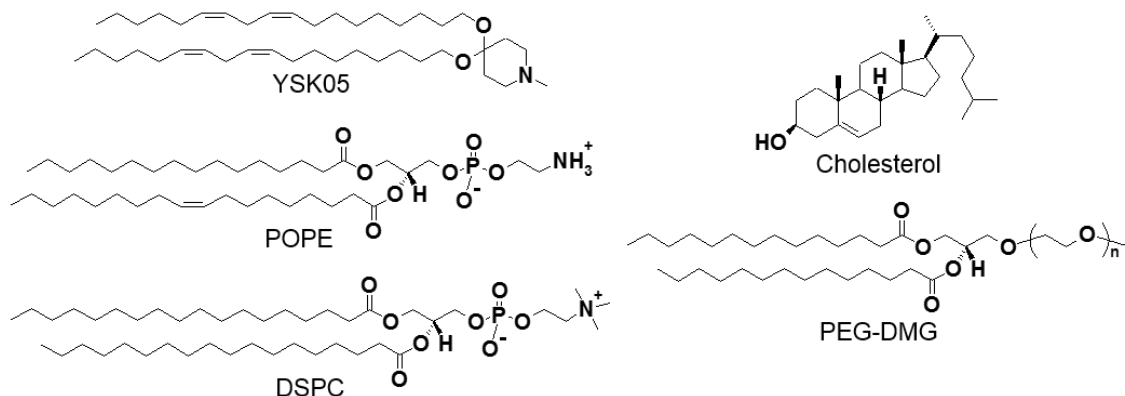


Fig. 1-4 本章で用いた主な脂質の構造式。POPE: 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine. DSPC: 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylcholine. DMG: 1,2-dimiristoyl-*sn*-glycerol.

(Fig. 1-4)。脂肪酸鎖長が短いため、リポソーム膜との疎水的結合力が低い。従って、血中への投与によってリポソーム溶液が希釈されると PEG-DMG はリポソーム膜から容易に脱離するために、リポソームの血中滞留化にはほとんど寄与しない[67,68]。しかし、MEND 調製時の粒子の凝集防止や粒子径制御に必須であるために使用している。本章では以降、脂質組成を様々に変化させた YSK05-MEND を調製したが、平均粒子径は全て 66~81 nm の値を示した。

まず、DSPC の必要性について検討を行った。DSPC を含まない YSK05-MEND の脂質組成は YSK05/Chol/PEG-DMG (55/45/3, mol%) とした。また、siRNA は当研究室の林らが用いてきた、HDL の主な受容体として知られる scavenger receptor type B class 1 (Sr-b1) に対する siRNA (siSr-b1) を使用した。各 YSK05-MEND に封入した siSr-b1 をマウスに 1 mg/kg で静脈内投与し 24 hr 後の肝臓中 Sr-b1 発現を qRT-PCR 法により測定した。その結果、DSPC を含む基準組成 (PC(+)) と DSPC を含まない組成 (PC(-)) との間に有意なノックダウン効率の差は認められなかった (Fig.1-5a)。この実験から、肝臓における遺伝子ノックダウンに DSPC は必須ではないと判断し、以降、DSPC は用いないこととした。続いて、YSK05 と Chol の最適な比を、YSK05/Chol で 55/45~80/20 mol% の範囲で検討した。その結果、YSK05 70 mol% までは、YSK05 含量の増加に伴ってノックダウン活性が上昇した (Fig. 1-5b)。また、YSK05 含量 70%~80% の範囲では、YSK05 含量の増加によってノックダウン活性の減少傾向が観察された (Fig. 1-4c)。以上の結果から、YSK05/Chol/PEG-DMG (70/30/3, mol%) が最も高いノックダウン活性を有すると判断し、これを最適組成とした。ここで、最適化前後の YSK05-MEND の Sr-b1 ノックダウン活性を比較した。その結果、基準組成および最適組成 YSK05-MEND は ED₅₀ 値でそれぞれ 0.8 mg/kg と 0.1 mg/kg を示し、最適化によってノックダウン活性が 8 倍上昇したことが明らかとなった (Fig. 1-6a)。他の標的遺伝子においても同様の結果が得られることを確かめるために、肝臓におけるノックダウン活性の指標に汎用され、肝実質細胞特異的遺伝子である

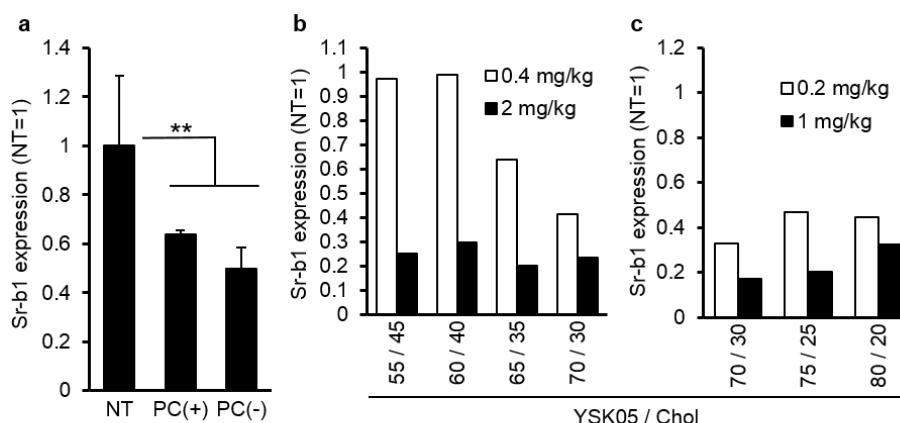


Fig. 1-5 YSK05-MENDの脂質組成比の最適化。様々な脂質組成比のYSK05-MENDに封入したsiSr-b1をICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Sr-b1発現をqRT-PCR法により測定した。(a) DSPCの有無がノックダウン活性に与える影響。DSPCを含む組成のMENDはPC(+), 含まない組成のMENDはPC(-)として表されている。投与siRNA量は1 mg/kg (n=3)。(b,c) YSK05/Cholesterol比がノックダウン活性に与える影響。投与siRNA量は0.2~2 mg/kg (n=2)。データは平均±SDとして表した。NT: non-treatment.

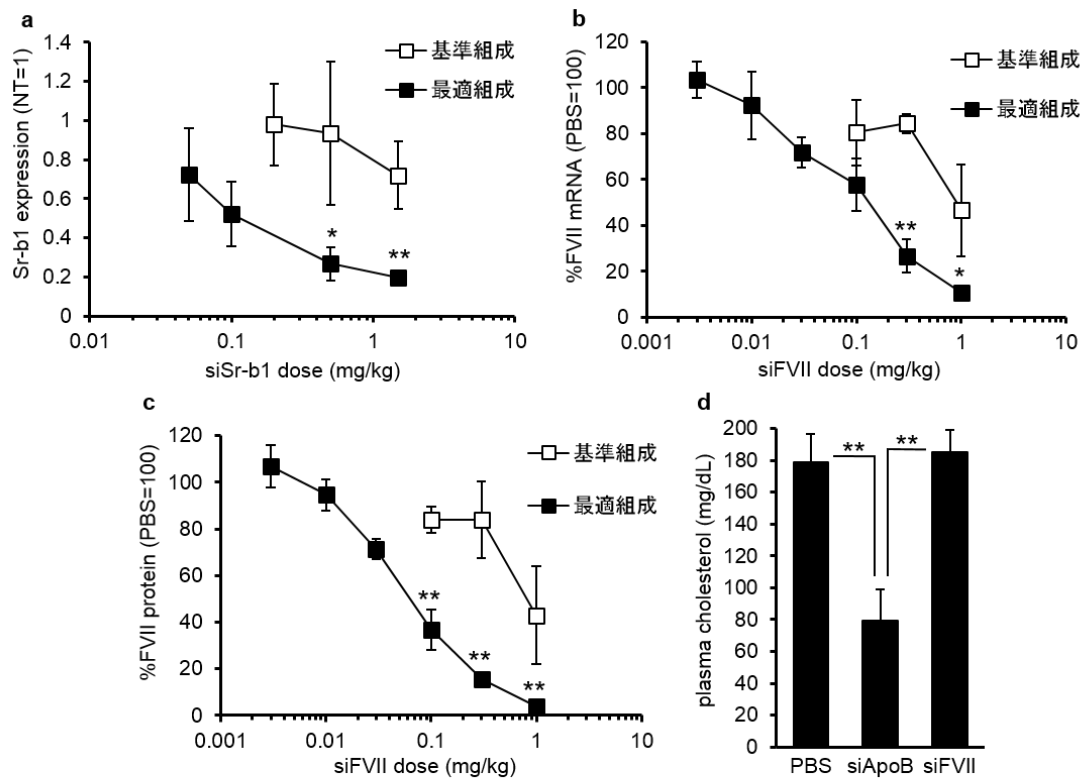


Fig. 1-6 最適化YSK05-MENDのノックダウン活性。(a) 基準組成あるいは最適組成YSK05-MENDに封入したsiSr-b1をICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Sr-b1発現をqRT-PCR法により測定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student's t-test, $n=3$)。(b,c) 基準組成または最適組成YSK05-MENDに封入したsiFVIIを、ICRマウスに静脈内投与し、48 hr後の肝臓中FVII mRNA発現をqRT-PCR法により (b)、血漿中FVII酵素活性をFVII assayにより測定した (c) (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student's t-test, $n=3 \sim 4$)。(d) 最適組成YSK05-MENDに封入したsiApoBあるいはsiFVIIを1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、72 hr後の血漿中総cholesterol値を測定した (**: $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test, $n=3$)。データは平均 \pm SDとして表した。(n=3~4) NT: non-treatment.

coagulation factor vii (FVII) を標的遺伝子として、最適化前後の YSK05-MEND のノックダウン活性を比較した。また、FVII に対する siRNA (siFVII) は、Alnylam 社が用いている siRNA と同じ配列および化学修飾様式のものを使用した[69,70]。各 YSK05-MEND に封入された siFVII をマウスに静脈内投与し、48 時間後における肝臓中 FVII mRNA 発現を qRT-PCR 法により、また、血漿中 FVII タンパク質発現を酵素活性の測定により、それぞれ調べた。その結果、最適組成では投与量依存的な FVII 発現の減少が観察され、ED₅₀ 値は mRNA レベルで 0.1 mg/kg、タンパク質レベルで 0.06 mg/kg であった (Fig. 1-6b,6c)。また、Sr-b1 のノックダウン実験と同様に、最適組成 YSK05-MEND は基準組成 YSK05-MEND と比べて高い遺伝子ノックダウン活性を有することが明らかとなった (Fig. 1-6b,6c)。また、1 mg/kg の投与量において、タンパク質レベルで 96% のノックダウン効率を得られた (Fig. 1-6c) ことから、最適組成 YSK05-MEND はほぼ全ての肝実質細胞に取り込まれてノックダウンを誘起したことが示唆された。続いて、最適組成 YSK05-MEND の投与により、期待される薬理効果が確かに得られるかを調べることにした。アポリポタンパク質の 1 種である apolipoprotein B (ApoB) は、血漿中コレステロールレベルを調節する因子として知られ、ApoB 発現を抑制することで血中コレステロール値が減少することが知

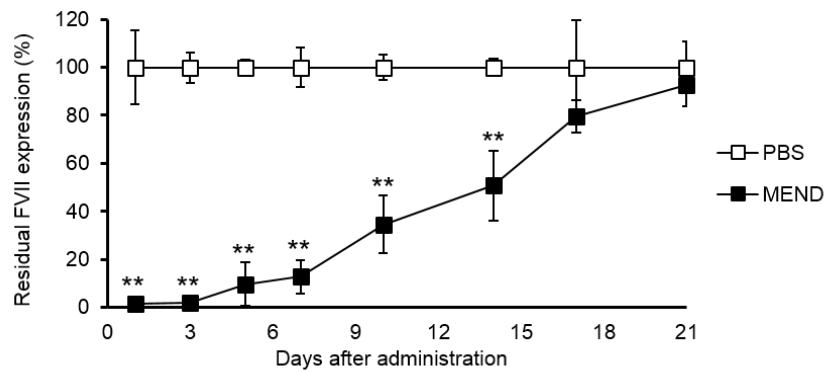


Fig. 1-7 最適化YSK05-MEND投与によるFVIIノックダウンの持続性。YSK05-MENDに封入したsiFVIIを1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、経時的に採血し、血漿中FVII酵素活性を測定した。データは平均±SDとして表した。(**: $p < 0.01$, Student's t-test, $n=3$)

られており[21,71,72]、本遺伝子を標的としたアンチセンス医薬 KYNAMRO (mipomersen sodium) が米国で承認されている。そこで、最適組成 YSK05-MEND に封入された siApoB をマウスに 1 mg/kg で静脈内投与し、48 hr 後の血漿中総コレステロール濃度を測定した。その結果、siApoB 投与群において総コレステロール値の 55%の減少が認められた (Fig. 1-6d)。次に、FVII ノックダウンの持続性を調べた。siFVII 封入最適組成 YSK05-MEND をマウスに 1 mg/kg で静脈内投与し、血漿中 FVII タンパク質を経時的に測定した。その結果、投与から 14 日後まで有意な FVII 発現の抑制が観察された (Fig. 1-7)。

そこで、脂質組成最適化前後の YSK05-MEND の物性を比較することで、ノックダウン活性上昇の原因の解明を試みた。まず、脂質膜 pKa を TNS assay により測定した[73]。TNS は負電荷および疎水性部位を有する蛍光物質であり、水溶液中では疎水性部位が水和することでほとんど蛍光を発さないが、カチオン性を帯びた脂質膜と静電的に相互作用し、疎水性部位が脂質膜中に移行することで強い蛍光を発する (Fig. 1-8a)。従って、YSK05-MEND と TNS を、様々な pH に調整した緩衝液で希釈・混合し、その溶液の蛍光強度を測定し、pH と蛍光強度との関係をプロットすることで、YSK05 の脂質膜 pKa を *in situ* で測定することが可能である。測定の結果、基準組成は pKa 6.6 を、最適組成では脂質膜 pKa

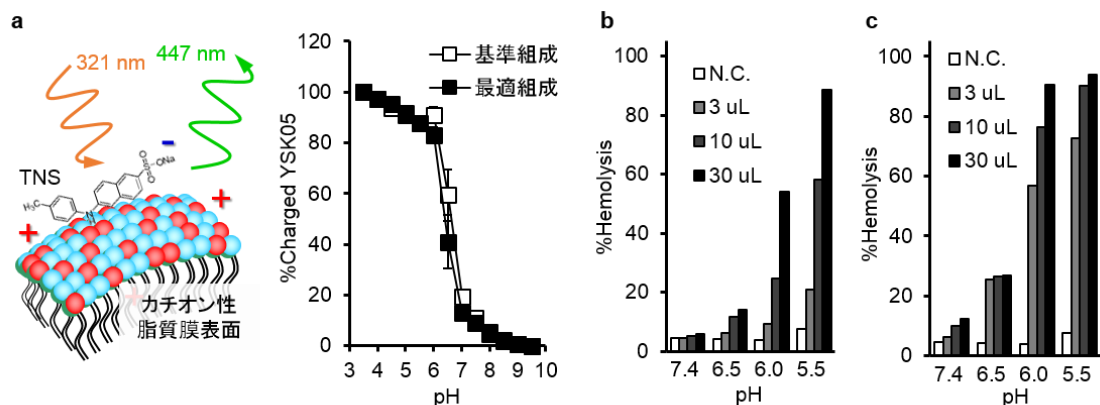


Fig. 1-8 基準組成および最適組成YSK05-MENDの脂質膜pKaおよび膜障害活性の比較。(a) TNSはカチオン性脂質膜と相互作用することで強い蛍光を発する。siRNAを含まない各YSK05-MENDの脂質膜pKaを、TNS assayにより測定した。(b,c) 様々な量の基準組成 (b) あるいは、最適組成 (c) YSK05-MENDと、マウス赤血球を各pHの緩衝液中で混合し、37°C、30 minインキュベート後、赤血球から漏出したヘモグロビン由来の吸光を測定した。データは平均±SDとして表した。(n=2-3) N.C. : Negative Control

6.4 を示し、最適化によって pK_a が 0.2 ユニット減少したことが明らかとなった (Fig. 1-8a)。続いて、YSK05-MEND の膜融合活性を、赤血球に対する膜障害活性を指標に調べた。YSK05-MEND とマウス赤血球を各 pH の緩衝液中で混合し、37°C、30 min でインキュベート後、赤血球から漏出したヘモグロビン由来の吸光を測定した。その結果、pH7.4 においては両 YSK05-MEND とも膜障害活性を示さず、低 pH 領域では pH の低下および YSK05-MEND 量の増加に依存して高い膜障害活性が上昇した (Fig. 1-8b,8c)。また、最適組成は基準組成と比較して高い膜障害活性を示した。例として、pH6.0 において、基準組成では 55%の膜障害効率を示すのに 30 μ L 分の MEND を必要とするが、最適組成ではその 1/10 量の 3 μ L で同程度の効率を示した。

1-2-2 YSK05-MEND の体内分布と肝毒性評価

最適組成 YSK05-MEND の静脈内投与後の体内分布を調べた。Cy5 標識 siGL3 および DiD (脂質膜染色用蛍光物質) を用いることで、それぞれ siRNA および MEND 脂質膜の分布を調べた。各蛍光物質で標識された最適組成 YSK05-MEND (0.5 mg/kg の siRNA 量を含む) をマウスに静脈内投与し、30 min 後の肝臓、肺、脾臓への siRNA および MEND 脂質膜移行量を、組織ホモジネート中の蛍光強度を基に算出した。その結果、siRNA と MEND 脂質膜は共に肝臓へ 70%程度の高い集積を示した (Fig. 1-9a)。これより、最適組成 YSK05-MEND は内封 siRNA を血中で漏出することなく、肝臓へ送達していることが示唆された。また、静脈内投与後、最初に通過する組織である肺への集積は 1%未満であった。また、肝臓と同様に、リポソームの主要なクリアランス臓器として知られる脾臓への集積量は 10% 以下であった。また、Cy5 標識 siGL3 を単独で静脈内投与したところ、肝臓への集積量は 1.7%と低く、肺や脾臓に関しては検出感度以下であった (Fig. 1-9b)。従って、最適組成 YSK05-MEND に封入された Cy5 標識 siGL3 の各組織への移行量は、Cy5 標識 siRNA あるいは Cy5 の非特異的な集積によるアーティファクトではなく、YSK05-MEND による送達の結果を表していることが確認された。続いて、siRNA の肝臓内分布を調べた。最適組成 YSK05-MEND に封入した Cy5 標識 siGL3 をマウスに 0.5 mg/kg で静脈内投与し、30 min 後の肝臓をパラホルムアルデヒドにより固定し、凍結切片を作成後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。その結果、siRNA が肝臓内に均一に分布している様子が観察された (Fig. 1-10)。また、多くが血管外に局在していることから、肝実質細胞へ効率的に移行していることが示唆された。体内分布および肝臓内分布実験の結果より、最適組成 YSK05-MEND は肝実質細胞に多く移行していることが示唆されたため、肝毒性が懸念された。そこで、最適組成 YSK05-MEND による肝毒性を、肝逸脱酵素である血清中 AST および血清中 ALT 活性を指標に調べた。また、全身的な毒性の指標として、最適組成 YSK05-MEND 投与前後の体重変化を測定した。最適組成 YSK05-MEND をマウスに 0.3 または 1 mg/kg で静脈内投与し、24 hr 後の体重、血清中 AST および ALT 活性を測定した。その結果、いずれの投与量においても、PBS 投与群と有意な差は認められず、本投与量では最適

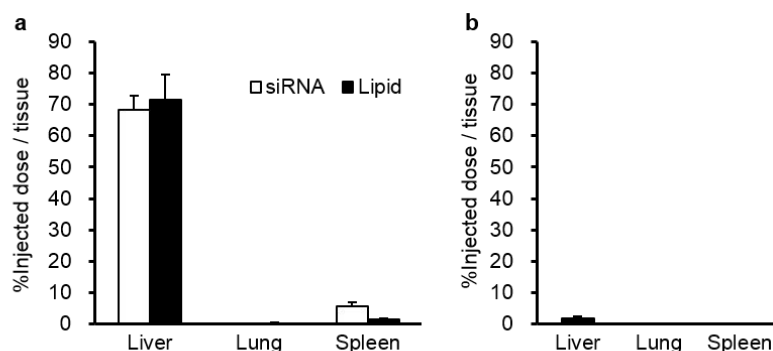
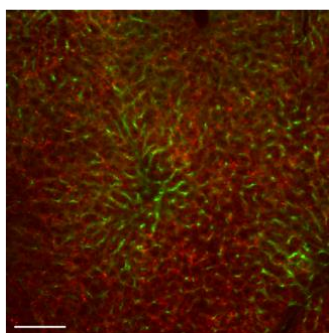


Fig. 1-9 YSK05-MENDの静脈内投与後の体内分布。(a) DiD標識YSK05-MENDあるいはCy5標識siGL3封入YSK05-MEND (それぞれ.5 mg/kgのsiRNA量を含む) をICRマウスに静脈内投与し、30 min後の肝臓、肺、脾臓への集積量を、組織ホモジネート中の蛍光強度を測定した。(b) Cy5標識siGL3を0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、30 min後の組織集積量を同様に測定した。データは平均±SDとして表した。(n=3)



Red : siRNA (Cy5) Green : blood vessels (FITC-Isolectin B4) bars : 100 μm

Fig. 1-10 YSK05-MENDの静脈内投与後の肝臓内分布。最適組成YSK05-MENDに封入したCy5標識siGL3を0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、30 min後の肝臓内分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

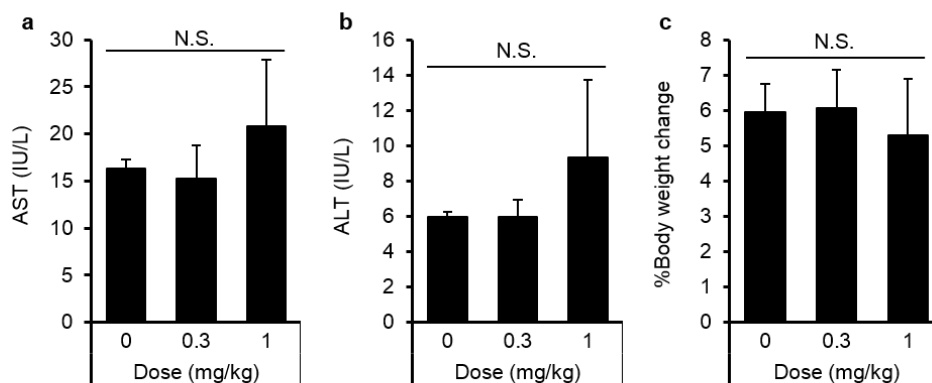


Fig. 1-11 最適組成YSK05-MENDの毒性。最適組成YSK05-MENDに封入したsiPLK1を0.3~1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後における血清中AST値 (a)、血清中ALT値 (b)、体重変化 (c) を測定した。データは平均±SDとして表した。nrANOVAによって検定し、 $p > 0.05$ であったときに有意差なしを判断した (n=3) N.S.: not significance.

組成 YSK05-MEND による顕著な毒性はないことが示唆された (Fig. 1-11)。

1-2-3 YSK05 の炭素鎖不飽和度の検討

Heyes らは、pH 応答性カチオン性脂質の炭化水素鎖の不飽和結合の数は、その脂質の膜

融合活性およびその脂質を含有するキャリアの *in vitro* 培養細胞における活性に大きな影響を与え、不飽和数 2 の炭化水素鎖を有する脂質が最も siRNA 送達に適していると報告している[74]。YSK05 はこの報告を基に、不飽和数 2 のリノール酸を原料に用いて合成している。今回、*in vivo*において最適な不飽和数の検討を行なうために、0~3 の各不飽和数の炭化水素鎖を有する YSK05 誘導体 (Fig. 1-12a) を合成し、比較することとした。これまで用いてきた YSK05 は、不飽和数 2 の炭化水素鎖を含むため、ここでは YSK05-2 と表記する。また、不飽和数 0 の YSK05 誘導体 (YSK05-0) に関しては、アルコールに不溶であり、MEND の調製が困難であったため、検討から除外した。まず、*in vitro*におけるノックダウン活性を調べた。脂質組成は YSK05 誘導体/DOPE/Chol/PEG-DMG (30/40/30/3, mol%) とした。各 YSK05 誘導体-MEND に封入した luciferase に対する siRNA (siGL4) を、dual-luciferase 安定発現 HeLa (HeLa-dluc) 細胞に各濃度で添加し、24 hr 後における luciferase の発現を dual-luciferase assay により測定した。その結果、不飽和数 3 の YSK05 誘導体 (YSK05-3) の活性がやや高い傾向はみられたものの、全ての添加濃度において他の YSK05

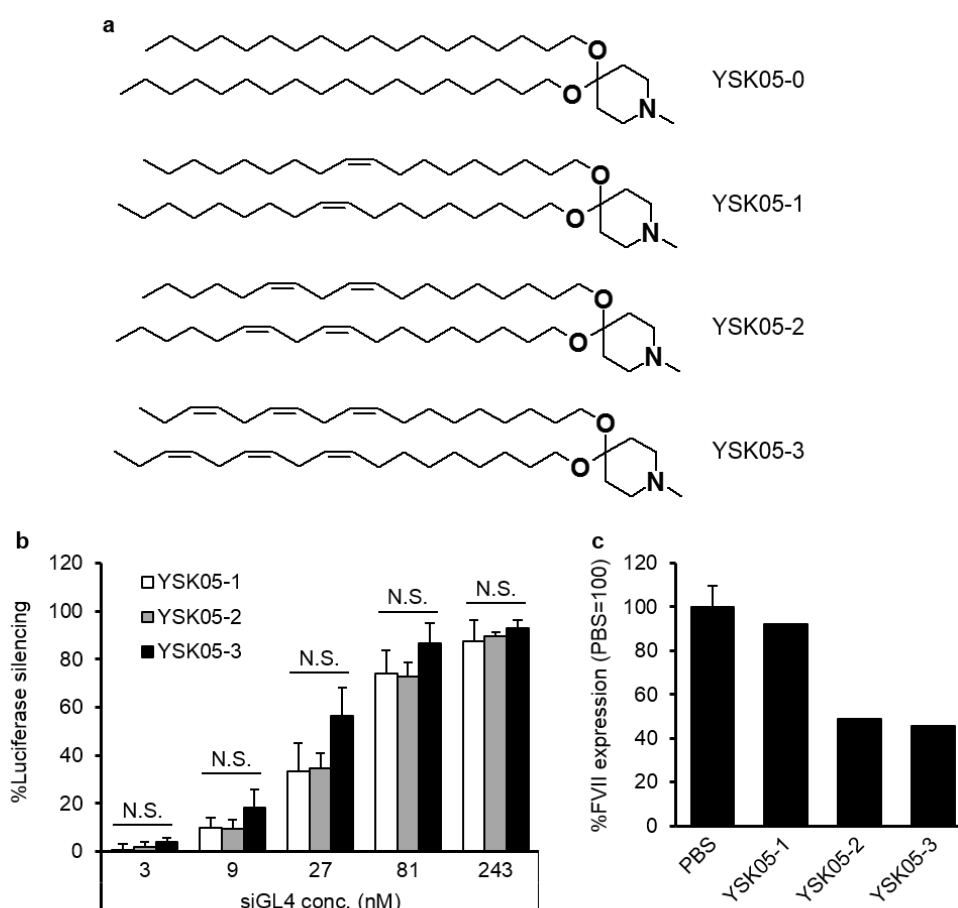


Fig. 1-12 YSK05の炭化水素鎖の不飽和度がノックダウン活性に与える影響。(a) 炭化水素鎖の不飽和数がそれぞれ異なる4種のYSK05誘導体の構造式。(b) YSK05誘導体/DOPE/Chol/PEG-DMG (30/40/30/3)の脂質組成比のYSK05誘導体-MENDIに封入したsiGL4を様々な濃度でHeLa-dluc細胞に添加し、24 hrインキュベート後、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した (nrANOVAによって検定し、 $p > 0.05$ であったときに有意差なしを判断した、 $n=3$)。(c) YSK05誘導体/Chol/PEG-DMG (70/30/3)の脂質組成比のYSK05誘導体-MENDIに封入したsiFVIIを0.2 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の血漿中FVII酵素活性を測定した ($n=2\sim3$)。データは平均±SDとして表した。 ($n=2\sim3$) N.S.: not significance.

誘導体と有意な差は認められなかった (Fig. 1-12b)。そこで、マウス肝臓における FVII ノックダウン活性を調べた。MEND の脂質組成は YSK05 誘導体/Chol/PEG-DMG (70/30/3, mol%) とした。各 YSK05 誘導体-MEND に封入した siFVII を 0.2 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、24 hr 後における血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、不飽和数 1 の YSK05 誘導体 (YSK05-1) はノックダウンを示さず、YSK05-2 および YSK05-3 は共に 50% 程度のノックダウン効率を示した (Fig. 1-12c)。以上の結果より、YSK05 の炭化水素鎖の不飽和数を変化させることでノックダウン活性の顕著な上昇は見られなかったものの、*in vitro* および *in vivo* の両方において、YSK05-3 が、YSK05-2 と同等の高い活性を示した。YSK05-3 の原料である α -リノレン酸は様々な植物油に含まれるが、その含有量は低いため、リノール酸と比較してやや高価であり、製品の純度も低い。また、不飽和数が多いほど、脂質の過酸化が発生しやすく、潜在的に化学的安定性が低いと考えられる。以上より、以降の実験も引き続き YSK05-2 を使用することとした。

1-2-4 YSK05-MEND の保存安定性評価

キャリアの調製後の保存安定性は、その実用化において重要な因子である。保存安定性を向上させるためには、キャリア自体の安定性向上に関する検討と、キャリアの適切な保存条件の検討が重要であると考えられる。前者に関しては、キャリアの保存安定性とノックダウン活性が相反する可能性や、目的や優先度に応じて最適とする条件が異なる場合が想定され、検討が煩雑になるために、今回は後者に関する検討を行った。また、YSK05-MEND は pH 応答性を有することから、保存溶液の pH は YSK05-MEND の安定性に影響を与えることが予想されることから、pH に着目して検討を行うこととした。温度に関しては、MEND の崩壊を加速させるために 50°C の高温条件とした。まず、50°C に短時間おいた後の siRNA の YSK05-MEND からの漏出を調べた。siSr-b1 封入最適組成 YSK05-MEND を様々な pH (4.0~7.4) の緩衝液中、50°C で 0~180 min 間インキュベートした後、Ribogreen assay により siRNA の漏出率を算出した。その結果、緩衝液の pH が上昇するにつれて siRNA の漏出率が上昇した (Fig. 1-13a)。また、その上昇は、最適組成 YSK05-MEND の脂質膜 pKa 6.4 より高い pH 領域において特に顕著であった。また、pH6.0 において、リン酸緩衝液とクエン酸緩衝液の 2 種を用いることで、緩衝液の種類の影響を同時に評価したが、両緩衝液間に顕著な差は認められなかった。そこで、今後の実験では pH4.0~6.0 の範囲に高い緩衝能を有するクエン酸緩衝液を使用した。最初に、50°C で長時間インキュベートした後の siRNA の漏出を調べた。先と同様の実験の加温時間を 0~3 day に延長して行った。その結果、先の結果とは異なり、pH5.5 以下の領域で、pH が低下するにつれて siRNA の漏出が顕著に上昇した (Fig. 1-13b)。この時、pH4.0 と pH4.5 においては、siRNA 量の減少が認められた (Fig. 1-13c)。以上の結果から、最適組成 YSK05-MEND の保存に最適な pH は 5.5 であることが示唆された。次に、siFVII 封入最適組成 YSK05-MEND をクエン酸緩衝液 (pH5.5) 中、4°C で 0~4 week 保存し、物性およびマウス肝臓における FVII のノックダ

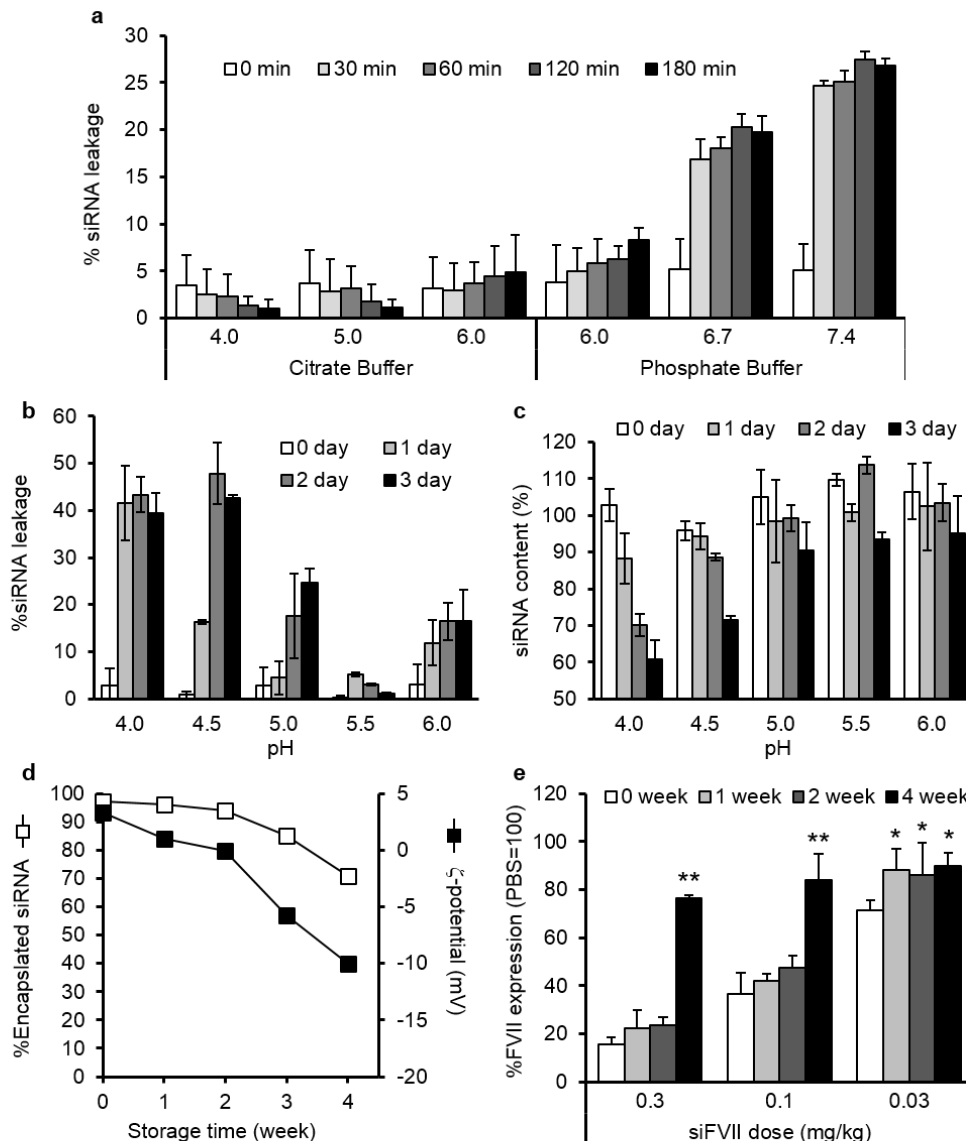


Fig. 1-13 YSK05-MENDの保存安定性。(a) YSK05-MENDを各pHの緩衝液中で50°C、0-180 minインキュベートした後、siRNA漏出率をRibogreen assayにより測定した (n=3)。(b,c) YSK05-MENDを各pHの緩衝液中で50°C、0~3 dayインキュベートした後、siRNA漏出率 (b) およびsiRNA量 (c) をRibogreen assayにより測定した (n=3)。(d) YSK05-MENDをpH5.5に調整したクエン酸緩衝液中で4°Cで0~4 week保存し、siRNA封入率をRibogreen assayにより測定し、 ζ -potentialをZetasizer nano ZSを用いて測定した (n=1)。(e) siFVII封入YSK05-MENDをpH5.5に調整したクエン酸緩衝液中で4°Cで0~4 week保存し、PBSを用いて希釈後、0.03-0.3 mg/kgのsiRNA量でICRマウスに静脈内投与し、48 hr後における血漿中FVII酵素活性を測定した (*: p<0.05, **: p<0.01, nrANOVA followed by Dunnett test vs. 0 week, n=3)。データは平均±SDとして表した。(n=1~3)

ウン活性を経時的に測定した。まず、 ζ 電位および siRNA 封入率を測定したところ、調製後 2 week まではどちらの物性に関しても値が減少傾向にあるものの、調製時と同程度の値を維持していた (Fig. 1-13d)。しかし、2 week 以降では、どちらの物性に関しても値の減少が顕著となった。また、FVII のノックダウン活性に関しては、2 week まではノックダウン活性をおおよそ維持していたものの、4 week 保存後はノックダウン活性が顕著に減少した (Fig. 1-13e)。

1-2-5 YSK05-MEND による HCV 治療

YSK05-MEND の脂質組成を *in vivo* 用に最適化することで、FVII ノックダウン活性は ED₅₀ 値で 0.06 mg/kg となり、1 mg/kg の投与量では単回投与で FVII タンパク質を 95% 以上の効率でノックダウンすることが可能となった。また、pH5.5、4°C の条件で 2 週間は活性がほぼ維持されることが明らかとなった。そこで、YSK05-MEND の肝疾患治療への応用可能性を検討することとした。

HCV 患者数は全人口の数%に上るとされ、ウイルスに感染後は慢性炎症化し、肝硬変や肝がんへ発展する確率が非常に高いとされている[75]。また、肝がん患者の 80%以上は HCV 陽性であることが知られていることから、HCV 治療は肝がんの発症を未然に防ぐ上で極めて重要である。PEG 化 IFN α とリバビリンの併用が標準的な抗ウイルス療法となることで著効率は向上したが、難治性のゲノタイプ I 型・高ウイルス症例では著効率が 40%程度に留まり、半分以上の症例ではウイルスを排除することができない。また、同療法による重篤な副作用によって治療を中断せざるを得ない場合も多いことから、C 型肝炎は既存の治療薬とメカニズムの異なる新規治療法がの開発が強く望まれている疾患領域である。東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクトの小原道法らは、siRNA プールから優れたノックダウン活性を有する siRNA 配列を選定可能な Dicer-hunting 法を独自に開発し、HCV ゲノムの internal ribosomal entry site (IRES) 領域の dsRNA を Dicer 処理することで得られた siRNA プールから、非常に高活性な 3 種の siRNA 配列 (siHCV) 見出すことに成功している。そこで、siHCV 封入最適組成 YSK05-MEND を用いて有効な HCV 治療を行うことが可能かを検討することとした。本共同研究は、筆者が siHCV 封入 YSK05-MEND を調製し、小原道法らがマウスへの投与実験を行う体制で行われた。

まず、Cre/loxP/HCV-MxCre トランスジェニックマウス²[76]に、polyIC (1 mg/kg) を腹腔内投与することで HCV タンパク質を発現させ、HCV 慢性肝炎発症マウスを作製した。最適組成 YSK05-MEND に封入した siHCV を、マウスに 1 mg/kg で 2 日おきに 2 回静脈内投与し、2 回目の投与から 2 日後における肝臓の病理組織診断を行った。その結果、siRNA 未投与マウスあるいは siControl 投与マウスでは矢印で示した炎症細胞の浸潤が多く認められた (Fig. 1-14)。一方、siHCV 投与マウスではそのような病理像がほとんど観察されず、肝臓の正常化が認められた (Fig. 1-14)。

さらに、uPA/SCID マウス³[77]に凍結ヒト正常肝細胞を移植することで、大部分の肝実質細胞がヒト由来に置換されたヒト肝臓キメラマウスを作製した。さらにこのマウスにゲノタイプ 1b の HCV 10⁶ コピーが含まれる HCV 患者血清を投与することで HCV 持続感染

² Cre/loxP システムで HCV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと Cre を誘導する Mx-Cre トランスジェニックマウスを交配することにより作製されるトランスジェニックマウス。このトランスジェニックマウスに Poly IC を投与することで IFN α 誘導性の Cre 酵素が発現し、loxP 配列に挟まれているネオマイシン耐性遺伝子をループアウトすることで、任意の時期に HCV 蛋白を発現させることが可能である。

³ Albmin プロモーター制御下で urokinase type plasminogen activator (uPA) が過剰発現することで、肝実質細胞の細胞死が促進される Alb-uPA マウスと、体液性免疫能と細胞性免疫能の双方の欠陥を特徴とする severe combined immunodeficiency (SCID) マウスと交配させることにより作製されるマウス。

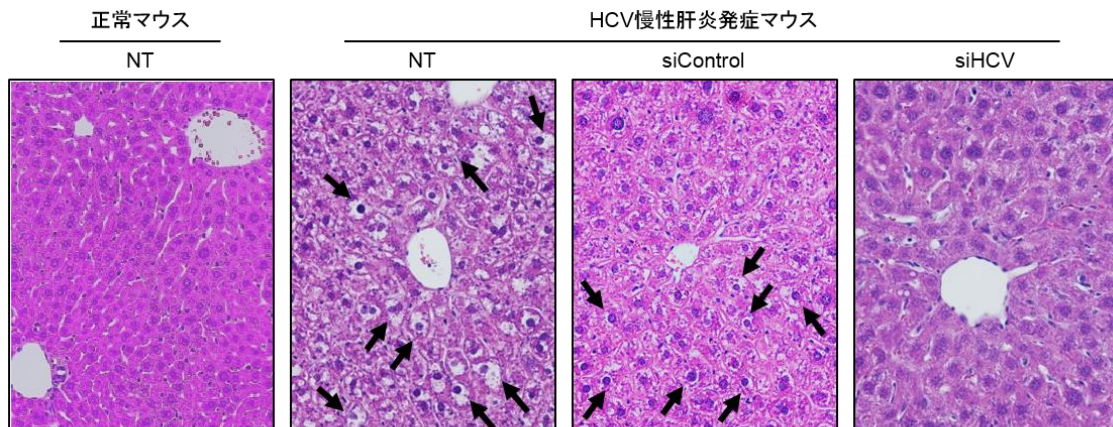


Fig. 1-14 HCV慢性肝炎発症マウスにおける最適組成YSK05-MENDの炎症改善効果。最適組成YSK05-MENDに封入したsiHCVを1 mg/kgで2日おきに2回、HCV慢性肝炎発症マウスに静脈内投与し、2回目の投与から2日後における肝臓の病理組織観察を行った。矢印は白血球の浸潤を示す。NT: non-treatment.

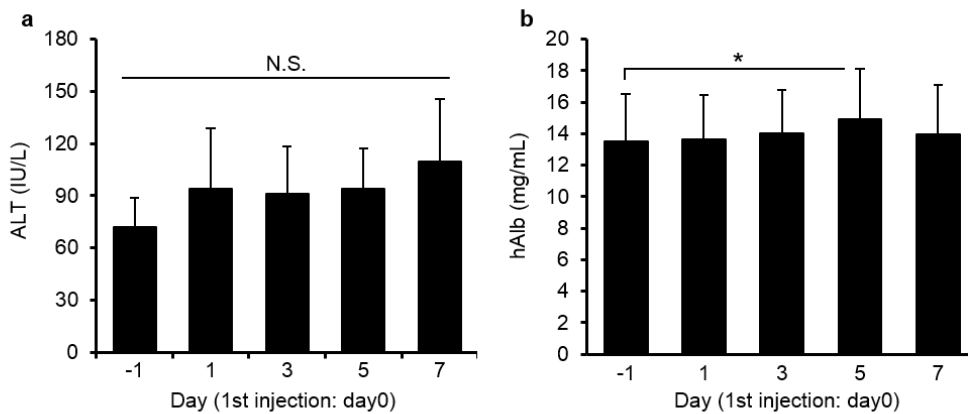


Fig. 1-15 最適組成YSK05-MENDのHCV持続感染マウスにおける肝毒性。最適組成YSK05-MENDに封入したsiHCVを1 mg/kg/injectionでday0からday6にかけて1日おきに計4回、HCV持続感染マウスに静脈内投与し、day-1, 1, 3, 5, 7における血漿中ALT値 (a) および血漿中hAlb値 (b) を測定した。データは平均±SDとして表した。(*: $p < 0.05$, nrANOVA followed by Dunnett test vs. day -1, $n=4$) N.S.: not significance.

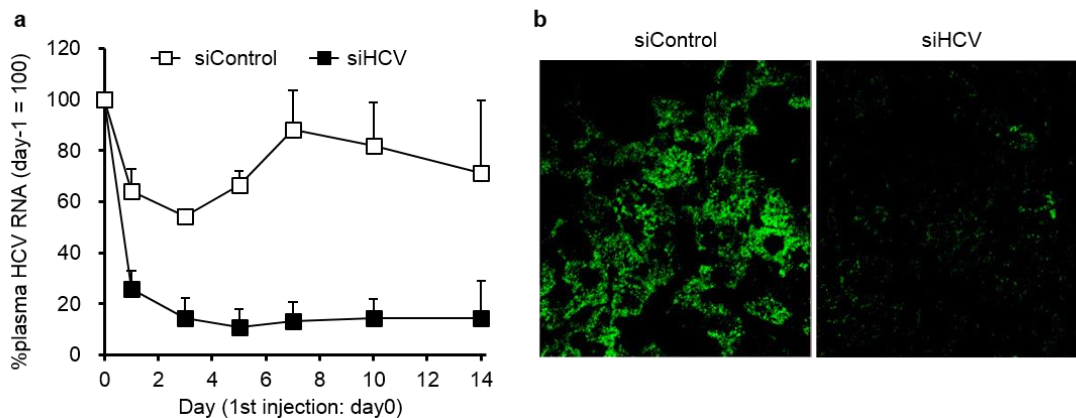


Fig. 1-16 最適組成YSK05-MENDのHCV抑制効果。(a) 最適組成YSK05-MENDに封入したsiHCVを1 mg/kg/injectionでday0およびday2に計2回、HCV持続感染マウスに静脈内投与し、day-1, 1, 3, 5, 7, 10, 14における血漿中HCVゲノムRNA量をqRT-PCR法により測定した。データは平均±SDとして表した。(b) day14における肝臓中HCVコアタンパク質を、免疫染色法により検出した。

マウスを作製した。まず、最適組成 YSK05-MNED の連続投与による本マウスへの毒性を調べた。最適組成 YSK05-MEND に封入された siHCV をマウスに 1 mg/kg で 1 日おきに

4回投与し、血清中ALT値および血清中human albumin (hAlb) 値を測定した。その結果、最適組成 YSK05-MEND の投与によるALT値の上昇は認められず、また、hAlb 値の僅かな上昇は認められたものの、肝毒性によるhAlb 値の低下は観察されなかった (Fig. 1-15)。続いて、HCVの抑制効果を調べた。最適組成 YSK05-MEND に封入したsiHCVを1 mg/kgで1日おき計2回でマウスに静脈内投与し、最初の投与から14日後までの血清中HCVゲノムRNAをqRT-PCR法により測定し、最初の投与から14日目における肝臓中HCVコアタンパク質を免疫染色法により検出した。その結果、siHCV投与群では投与から14日後まで、血漿中HCVゲノムRNA量の90%程度の持続的な抑制効果が認められた (Fig. 1-16a)。さらに、siHCV投与マウス肝臓内のHCVコアタンパク質の大幅な減少が認められた (Fig. 1-16b)。

1-3 考察

マウス肝臓におけるノックダウン活性を指標に YSK05-MEND の脂質組成の最適化を行った結果、基準組成と比較して活性を 10 倍程度上昇させることに成功した (Fig. 1-6a~6c)。この最適化に伴い、最適組成の脂質膜 pK_a は基準組成と比較して 0.2 減少した (Fig. 1-8a)。pH 応答性脂質の粒子中の割合 (密度) が上昇するにつれて、その脂質膜 pK_a は電荷の反発の影響により減少することが知られている [73]。脂質組成の最適化により、YSK05 含量は 50 mol% から 70 mol% に増加しているため、電荷の反発の影響がより大きくなったことで脂質膜 pK_a が減少したと考えられる。また、肝臓におけるノックダウン活性に最適な脂質膜 pK_a は 6.2~6.5 であるという報告がある [24]。基準組成の脂質膜 pK_a は 6.6 である一方、最適組成の脂質膜 pK_a は 6.4 であり、最適な脂質膜 pK_a の範囲内に入っている。従って、脂質組成の最適化に伴う脂質膜 pK_a の減少が FVII のノックダウン活性の上昇に関与している可能性はあるが、僅かな変化であるため、その寄与は一部であると考えられる。また、脂質組成の最適化により、エンドソーム内 pH 環境に近い pH6.0 における膜融合活性は 10 倍程度上昇した (Fig. 1-8b,8c)。ノックダウン活性の上昇も 10 倍程度である (Fig. 1-6a~6c) ことから、YSK05-MEND の膜融合活性の上昇が、ノックダウン活性の上昇の主要な要因であると考えられる。また、YSK05 含量を 70% よりも増加させることで、ノックダウン活性の減少が認められた (Fig. 1-5c)。YSK05 含量 85~100% の YSK05-MEND も調製は試みたものの、粒子調製後の限外濾過による精製時に YSK05 含量の増加依存的な siRNA の漏出が顕著に認められたことから、YSK05 含量の増加あるいは cholesterol 含量の減少は、YSK05-MEND の物理的安定性の減少に寄与することが示唆される。すなわち、YSK05 含量 75% 以上の YSK05-MEND は血中において siRNA を漏出し、肝臓へ siRNA を効率的にできなかったものと考えられる。また、最適組成では、siRNA の肝臓への移行量が MEND 脂質膜と同程度であった (Fig. 1-9a) ことから、最適組成 YSK05-MEND は肝臓に siRNA を送達するために必要な物理的安定性を十分に有していると言える。

最適組成 YSK05-MEND を 50°C に加温した際、緩衝液の pH に大きく依存して内封 siRNA を放出した。まず前提として、YSK05 はコーン型脂質であるため、それ単独では逆ヘキサゴナル構造を安定にとると考えられる [58]。ここでは、この親水部を中心とする曲率を負の曲率とする (Fig. 1-17a)。一方、YSK05-MEND は水中で分散しているため、疎水性部位を粒子内部に隠し、粒子表面に親水部を提示するような形を取っていると考えられる (Fig. 1-17b)。この疎水性部位を中心とする曲率を正の曲率とする。YSK05 が安定にとる構造と、実際に調製される YSK05-MEND の表面に存在する YSK05 がとる構造とでは、曲率の符号が逆であることから、YSK05-MEND 表面は安定性の高い構造ではないと考えられる。この不安定な構造を安定化しているのは、膜安定化作用を有する Chol と、逆コーン型脂質である PEG-DMG の存在であると考えられる。また、YSK05 が正に荷電している場合 ($pH < pK_a$)、互いに近接した YSK05 の親水部同士が電荷の反発を起こすため、YSK05 は見かけ上シリンダー型に近い脂質であると考えられる (Fig. 1-18)。従

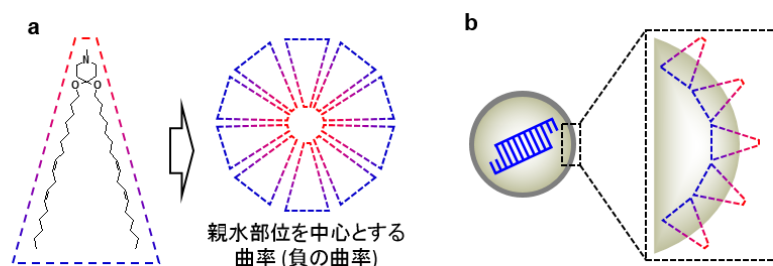


Fig. 1-17 YSK05がとる相。(a) YSK05がコーン型脂質であるため、YSK05集合体は親水部を中心とした負の曲率をもつ相を安定にとる。(b) YSK05-MENDの粒子表面に存在するYSK05は、疎水性部位を中心とした正の曲率をもつ配置をとる。

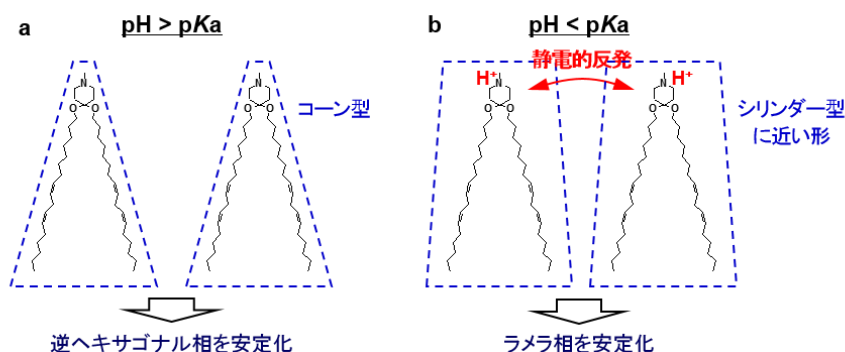


Fig. 1-18 YSK05の荷電状態と構造との関係。(a) 電荷を持たないYSK05はコーン型であるため、逆ヘキサゴナル相の安定化に寄与する。(b) YSK05が正に荷電した場合、近接したYSK05の親水部同士の静電的反発が生じることで親水部の嵩高さが見かけ上大きくなる。その結果、YSK05全体として見かけ上シリンダー型に近い形をとるため、ラメラ相の安定化に寄与する。

って、正に荷電した YSK05 は荷電していない場合よりも正の曲率を比較的安定にとると考えられる。最適組成 YSK05-MEND を短時間加温した際、脂質膜 pK_a よりも高い pH 領域において pH の上昇依存的に siRNA を放出した (Fig. 1-13a) のは、YSK05 の荷電率が低いほど、MEND 表面に存在する YSK05 がとる構造 (正の曲率) が不安定であり、部分的に逆ヘキサゴナル相への相転移が生じることで、内封 siRNA を漏出したものと考えられる。また、高い pH 領域 ($pH > pK_a$) では MEND 表面の YSK05 はほとんど正に荷電していないため、脂質と siRNA との静電的な相互作用はなく、漏出した siRNA の再封入は起こらないと考えられる。また、加温時間を日単位に延長することで、pH が低下するにつれて siRNA の漏出が顕著に上昇した (Fig. 1-13b)。これは、YSK05 の加水分解によるものであると考えられる。まず、最適組成 YSK05-MEND を構成する脂質の中で、酸加水分解を受け得る部位は、YSK05 の鎖状ケタール結合と PEG-DMG のエステル結合である。さらにその中で、より加水分解を受けやすいのは YSK05 の鎖状ケタール結合である。酸性条件下で加温することで、YSK05-MEND 表面の YSK05 が加水分解を受け、膜が不安定化し、内封 siRNA が漏出したものと考えられる。また、保存に最適と判断した pH5.5 の緩衝液で長期保存した最適組成 YSK05-MEND の FVII のノックダウン活性は 4 week において著しく減弱した (Fig. 1-13e)。その時の siRNA 漏出率は 30%程度である (Fig. 1-13d) が、ノックダウン活性は 1/10 以下となっており、単なる siRNA の漏出では全く説明ができない。この結果からも、低 pH 条件下における siRNA の漏出の原因は、YSK05 の加水分解による可

能性が示唆される。今後は実際に YSK05 が酸加水分解を受けていることを、NMR 法や LC/MS 法等によって確認する必要がある。また、加温試験において siRNA の漏出が生じなかった pH5.5 の条件が、4℃における長期保存においても最適であるのか、さらに、YSK05-MEND 等のナノ粒子の保存安定性を評価する際に、今回用いた加温試験が適切であるのかについても今後検証する必要がある。

siHCV 封入 YSK05-MEND の投与により、HCV 持続感染マウスにおける HCV が平均 90%程度抑制されたものの、HCV の完全な排除は認められなかった (Fig. 1-16a)。HCV 持続感染マウスは、ヒト肝細胞を移植するために体液性免疫能および細胞性免疫能の双方を欠落した **severe combined immunodeficiency (SCID)** マウスを基に作成されている。従って、免疫系による HCV の排除機構が働かないために、HCV の完全な排除は困難な実験系であると考えられる。逆に、本 HCV モデルにおいて 90%程度の HCV の排除が認められたことから、免疫機能の観点からは、HCV 患者においてはさらに顕著な抑制効果が期待される。また、HCV に対する標準治療である PEG 化 IFN α とリバビリンの併用療法の問題点の1つは、高ウィルス量症例における奏効率の低さである。siHCV 封入 YSK05-MEND の投与によってウィルス量を減少させることで標準療法による奏効率の向上が期待される。また、ヒト肝臓キメラマウスの肝細胞の配置やフェネストラ直径等の構造的特徴は、ヒトと類似していることが知られている。これより、YSK05-MEND がヒトにおいても肝実質細胞へ siRNA を効率的に送達し得る強いエビデンスを得ることに成功したと考えられる。

1-4 小括

本章では、*in vitro*において膜融合性の高さおよびノックダウン活性の高さが示されている pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を用い、*in vivo* 肝臓において優れたノックダウン活性を有する siRNA 封入 YSK05-MEND を構築し、肝疾患治療薬としての応用性を確認することを目標とした。まず、YSK05-MEND の脂質組成をマウス肝臓におけるノックダウン活性を指標に最適化したところ、ED₅₀ 値で 0.06 mg/kg を示し、基準組成と比較して活性を 10 倍程度上昇されることに成功した。最適化により膜融合活性が顕著に上昇したことから、ノックダウン活性の向上はエンドソーム脱出効率の上昇に起因することが示唆された。また、YSK05-MEND は静脈内投与した内の 70%程度が肝臓に集積したものの、肝毒性は認められなかった。また、加温試験の結果より、YSK05-MEND の保存時の適切な pH は 5.5 であることが示され、4°C、pH5.5 で保存した場合、2 週間程度はノックダウン活性を維持することが明らかとなった。最後に、siHCV 封入 YSK05-MEND の静脈内投与により、HCV 慢性肝炎発症マウスにおける肝組織の正常化および HCV 持続感染マウスにおける HCV 量の減少が観察され、構築した YSK05-MEND の肝疾患治療薬としての有用性を示すことに成功した。

第2章 新規 pH 応答性脂質を用いた肝臓における活性向上と pKa 依存性の検討

2-1 緒言

第1章において、以前に開発した pH 応答性脂質 YSK05 を用いた肝臓実質細胞への siRNA 送達キャリアを構築し、HCV 治療効果を得ることに成功した。しかし、最適化した YSK05-MEND の肝臓におけるノックダウン活性は、Alnylam 社により報告されている MC3-LNP と比較して低い (Fig. 2-1)。また、Jayaraman らは、様々な pH 応答性脂質を含む LNP の肝臓の FVII ノックダウン活性を調べ、最適な脂質膜 pKa が 6.2~6.5 であることを見出した[24]。しかし、彼らは最適 pKa を示してもノックダウン活性の低い pH 応答性脂質が混ざった計数十種の脂質のノックダウン活性を基にして最適な pKa 範囲を見積もっている。また、最適範囲外の LNP に関してどの過程が問題であるかについての実験的検討がなされていない。そこで本章では、MEND の肝実質細胞におけるノックダウン活性を向上させること、また、脂質膜 pKa 変化に伴う MEND の動態および活性変化を詳細に調べることを目的とした。この目的のために、様々な pKa を有する YSK05 誘導体である脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズの合成に成功したので、これらの脂質を用いて検討を行った。

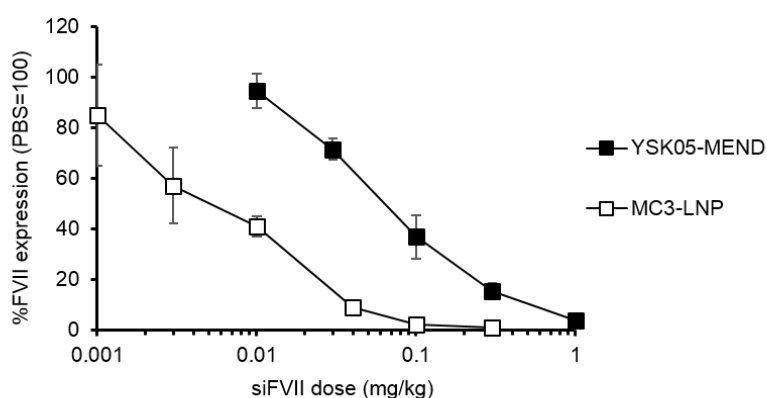


Fig. 2-1 第1章において最適化したYSK05-MENDと、文献[24]に記載されたMC3-LNPのFVIIノックダウン活性を示す。

2-2 結果

2-2-1 新規 pH 応答性脂質および MC3 を含む MEND の脂質膜 pKa 評価

本章で用いた MEND の脂質組成は、特に断りが無い場合、pH 応答性脂質/Chol/PEG-DMG で 70/30/3 mol%とした。また、この脂質組成比においては、全ての MEND の平均粒子径は 70~85 nm の範囲内であった。まず、新たに開発した pH 応答性脂質、脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズを含む MEND の脂質膜 pKa を調べることにした。脂質 A は脂質膜 pKa を変化させるために、構造が一部異なる脂質シリーズであり、脂質膜 pKa が低い方から順に脂質 A1、脂質 A2 および脂質 A3 の 3 種が存在する。また、脂質 B も同様に、脂質膜 pKa が低い方から順に脂質 B1、脂質 B2、脂質 B3 および脂質 B4 の 4 種が存在する。これら計 7 種の pH 応答性脂質を含む MEND の脂質膜 pKa を TNS assay により測定した。また、Alylam 社によって開発された MC3 を、文献[24]を基に合成し、ポジティブコントロールとして使用した。測定の結果、脂質 A シリーズ、脂質 B シリーズ共に脂質構造の部分的な違いにより脂質膜 pKa が異なり、脂質 A1~脂質 A3 は順に 5.70、6.45、6.80 を (Fig. 2-2a)、脂質 B1~脂質 B4 は順に 5.80、6.65、7.10、7.25 を (Fig. 2-2b)、また、MC3 は 6.25 を示した (Fig. 2-2c)。これより、脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズを用いることで、ポジティブコントロールである MC3 の脂質膜 pKa を含む、広い範囲にお

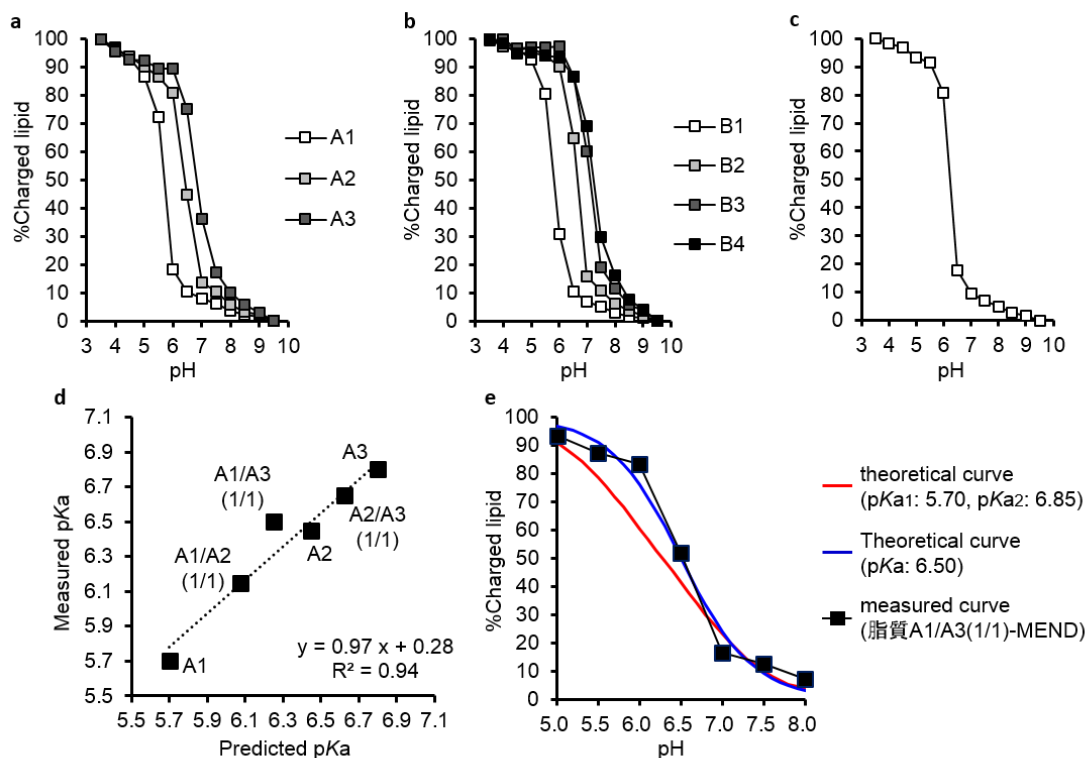


Fig. 2-2 各pH応答性脂質を含むMENDの脂質膜pKa評価。(a) 脂質A1-, 脂質A2-, 脂質A3-MENDの各pHにおける膜荷電率。(n=2) (b) 脂質B1-, 脂質B2-, 脂質B3-, 脂質B4-MENDの各pHにおける膜荷電率。(n=2) (c) MC3を含むMENDの各pHにおける脂質荷電率。(n=2) (d) 2種類の脂質Aを等量ずつ含むMENDの実測pKaと、各脂質AのpKaと混合比から予測されるpKaとの関係。(e) Henderson-Hasselbalchの式より求められる荷電率の理論曲線と、脂質A1/A3(1/1)-MENDの各pHにおける荷電率の実測曲線(n=2) データは平均として表した。

いて脂質膜 pK_a による影響を評価可能であることが明らかとなった。また、2種の脂質 A を等量混合した MEND の脂質膜 pK_a 実測値と、1種の脂質 A を含む MEND の脂質膜 pK_a と脂質混合比から予測される脂質膜 pK_a との相関性を調べたところ、高い相関性を示した (Fig. 2-2d) ことから、2種の pH 応答性脂質を様々な比で組み合わせることで、MEND の脂質膜 pK_a を自由に微調整することが可能であることが明らかとなった。さらに、脂質 A1 と脂質 A3 を等量混合した MEND (脂質 A1/A2(1/1)-MEND) の各 pH における脂質荷電率推移と、脂質 A1/A3(1/1)-MEND の脂質膜 pK_a 6.50 の理論的な脂質荷電率曲線および、脂質 A1-MEND と脂質 A3-MEND の脂質膜 pK_a 5.70 と 6.80 とそれぞれ pK_{a1} 、 pK_{a2} に持つ場合の理論的な脂質荷電率曲線を Fig. 2-2e に示した。その結果、実測値は pK_a 6.50 の理論的な荷電率曲線に類似した推移を示すことが明らかとなった。

2-2-2 肝臓 FVII ノックダウン活性における脂質膜 pK_a 依存性評価

脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズを含む MEND のマウス肝臓の FVII ノックダウン活性における脂質膜 pK_a 依存性を調べた。siFVII 封入各 pH 応答性 MEND を ICR マウスに 0.03 mg/kg で静脈内投与し、48 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、脂質 A シリーズ (Fig. 2-3a) および脂質 B シリーズ (Fig. 2-3b) 共に、 pK_a 6.45 において最も高いノックダウン効率が認められた。これより、FVII ノックダウンに最適な脂質膜 pK_a

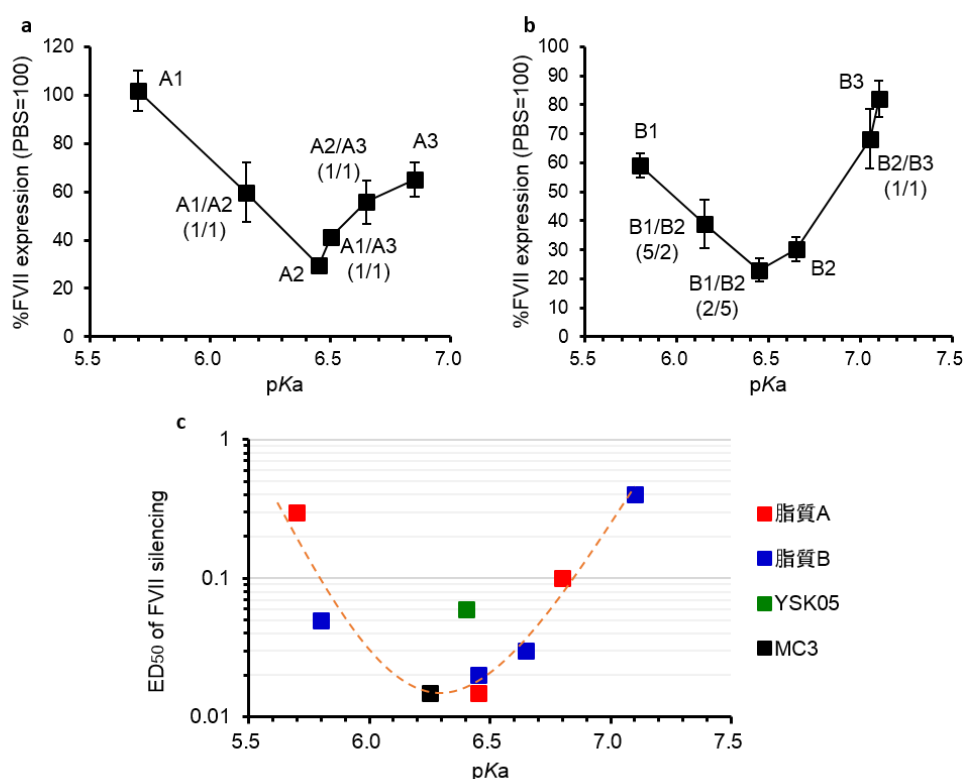


Fig. 2-3 各pH応答性脂質を含むMENDのFVIIノックダウン活性と pK_a との関係。(a) 各脂質A-MENDに封入したsiFVIIを0.03 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、48 hr後における血漿中FVII酵素活性を測定した。(n=3) (b) 各脂質B-MENDに封入したsiFVIIを0.03 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、48 hr後における血漿中FVII酵素活性を測定した。(n=3) (c) 各pH応答性脂質を含むMENDのFVIIノックダウンのED₅₀と脂質膜 pK_a との関係。データは平均±SDとして表した。

は 6.45 であり、文献[24]の 6.2~6.5 と類似した結果となった。また、各 MEND の FVII ノックダウンの ED₅₀ 値と、脂質膜 pKa との関係を図 2-3c に示した。赤色で示した脂質 A シリーズ、青色で示した脂質 B シリーズ、および黒色で示した MC3 は、オレンジ色の点線で示した曲線上に分布しており、これらの pH 応答性脂質は互いに同等の FVII ノックダウンを有することが示唆された (Fig. 2-3c)。また、緑色で示した YSK05 は同等の脂質膜 pKa を示す他の pH 応答性脂質よりも高い ED₅₀ 値を示した (Fig. 2-3c)。これより、脂質 A-MEND および脂質 B-MEND は YSK05-MEND よりも優れたノックダウン活性を有することが明らかとなった。

2-2-3 脂質 A2-MEND による FVII ノックダウンのメカニズム

今回開発した新規 pH 応答性脂質の中で、最も優れた FVII ノックダウン活性 (ED₅₀: 0.015 mg/kg) を示した脂質 A2-MEND を用い、FVII ノックダウンの ApoE、LDLR、および粒子径依存性を調べた。まず、siFVII 封入脂質 A2-MEND を、野生型 BALB/c マウスお

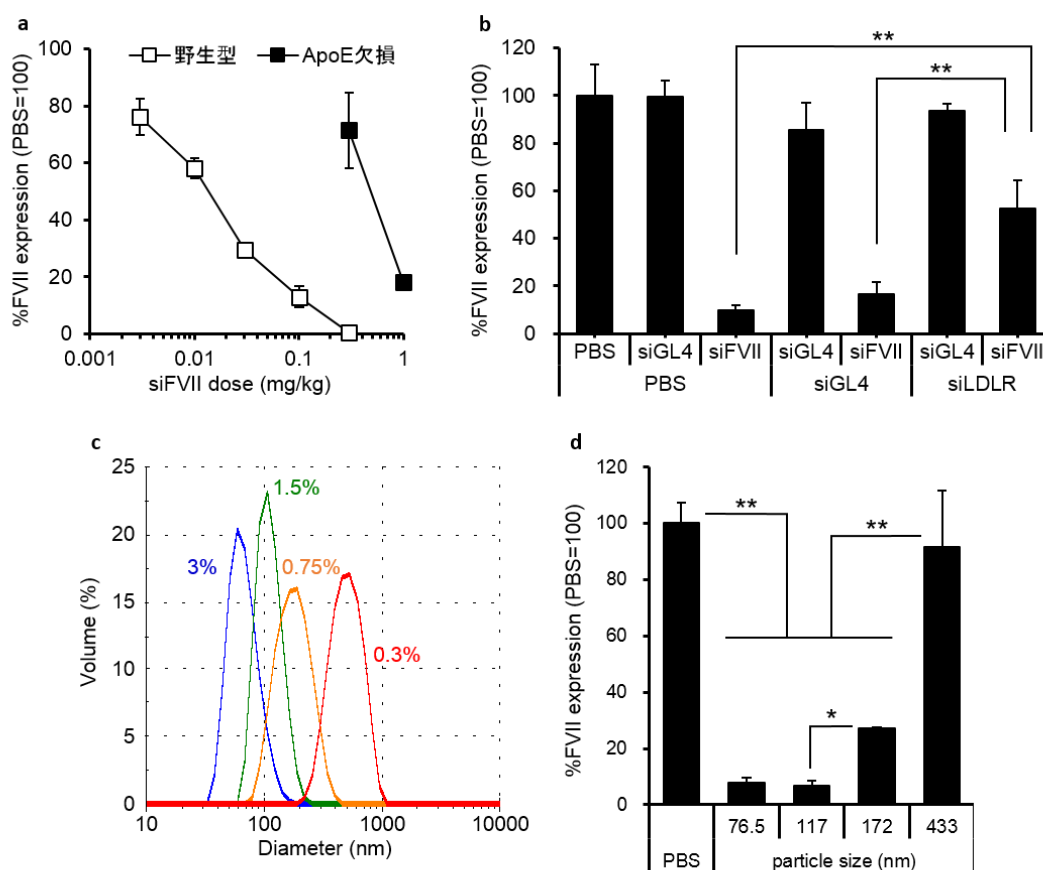


Fig. 2-4 FVIIノックダウンのApoE、LDLRおよび粒子径依存性。(a) 脂質A2-MENDに封入したsiFVIIを野生型BALB/cマウスおよびApoE欠損BALB/cマウスに静脈内投与し、48 hr後における血漿中FVII酵素活性を測定した。(n=3) (b) 脂質A2-MENDに封入したsiLDLRあるいはsiGL4を0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、72 hr後に脂質A2-MENDに封入したsiFVIIあるいはsiGL4を0.1 mg/kgで静脈内投与し、さらに24 hr後の血漿中FVII酵素活性を測定した。(**: p<0.01, nrANOVA followed by SNK test, n=3) (c) 0.3~3 mol%のPEG-DMGを添加して調製した脂質A2-MENDの粒子径分布を、動的光散乱法により測定した。(d) 0.3~3 mol%のPEG-DMGを添加して調製した脂質A2-MENDに封入したsiFVIIを0.1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後における血漿中FVII酵素活性を測定した。(*: p<0.05, **: p<0.01, nrANOVA followed by SNK test, n=3) データは平均±SDとして表した。

よび ApoE 欠損 Balb/c マウスに静脈内投与し、48 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、ApoE 欠損マウスにおいて FVII ノックダウンは認められた (ED₅₀: 0.5 mg/kg) もの、野生型マウスと比較して ED₅₀ 値が 30 倍程度上昇した (Fig. 2-4a)。これより、脂質 A2-MEND による FVII ノックダウンは ApoE に大きく依存していることが示された。続いて、ApoE の受容体の 1 つである LDLR の関与を調べた。siLDLR または siGL4 封入脂質 A2-MEND を ICR マウスに 0.5 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、72 hr 後に siFVII または siGL4 封入脂質 A2-MEND を 0.1 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、さらに 24 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、siLDLR を前投与した群では、PBS や siGL4 を前投与した群よりも FVII ノックダウン効率が有意に低かった (Fig. 2-4b)。これより、脂質 A2-MEND による FVII ノックダウンは LDLR に依存していることが示唆された。さらに、MEND 粒子径の影響を調べた。PEG-DMG 添加量を 0.3~3 mol% の間で変化させて脂質 A2-MEND を調製したところ、PEG-DMG 添加量の減少に伴って粒子径は増大し、平均粒子径で 77 nm~433 nm の広い範囲で様々な粒子径を有する MEND を 4 種調製することに成功した (Fig. 2-4c)。これら 4 種の脂質 A2-MEND に封入した siFVII を ICR マウスに 0.1 mg/kg で静脈内投与し、24 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、平均粒子径 77 nm および 117 nm の MEND は互いに同等の高い活性を示した (Fig. 2-4d)。一方、より大きな MEND のノックダウン活性は低く、平均粒子径 433 nm の MEND はノックダウン活性を示さなかった (Fig. 2-4d)。以上より、脂質 A2-MEND による FVII ノックダウンには、120 nm 程度以下の粒子径、ApoE および LDLR の存在が極めて重要であることが示された。

2-2-4 新規 pH 応答性脂質を含む MEND の肝毒性評価

脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズの中で最も優れた FVII ノックダウン活性を示した、脂質 A2-MEND と脂質 B1/B2(2/5)-MEND の毒性を調べた。各 MEND を ICR マウスに 0.3~1 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、24 hr 後の血清中 AST および ALT 活性および、投与前からの体重変化を測定した。その結果、いずれにおいても PBS 投与群と比較

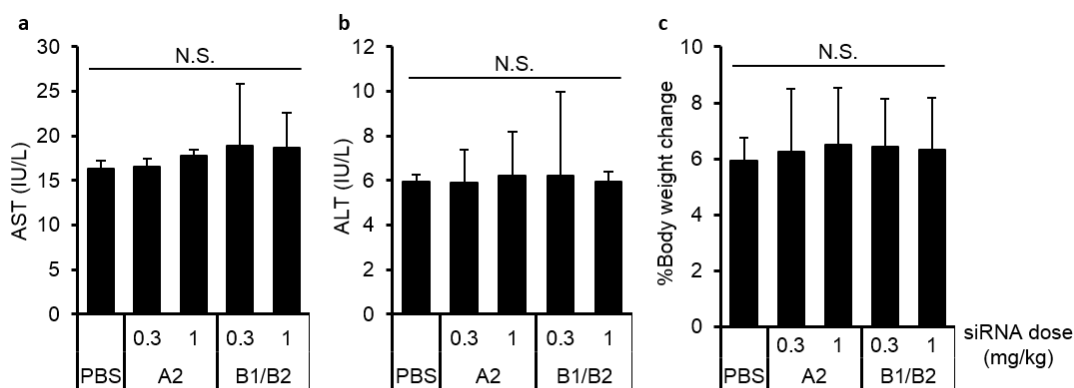


Fig. 2-5 MENDの毒性評価。脂質A2-MENDあるいは脂質B1/B2(2/5)-MENDに封入したsiPLK1をICRマウスに静脈内投与し、24 hr後における血清中AST (a)、血清中ALT (b)、投与前からの体重変化 (c) を評価した。nrANOVAによって検定し、 $p > 0.05$ であったときに有意差なしと判断した。(n=3) データは平均±SDとして表した。N.S.: not significance.

して有意な毒性は認められなかった (Fig. 2-5)。両 MEND の FVII ノックダウンの ED₅₀ 値は 0.015~0.02 mg/kg であり、その 50 倍の投与量においても顕著な毒性が認められなかったことから、これら MEND は広い治療域を有することが示唆された。

2-2-5 脂質 A2-MEND の保存安定性評価

第 1 章において、YSK05-MEND の保存に適した pH を検討し、加温試験によって pH5.5 が最適であることが示されたものの、4°C で保存後の FVII ノックダウンは 4 週間後においてほぼ消失した (Fig. 1-13e)。そこで、今回開発した pH 応答性脂質の中で最も高い FVII ノックダウン活性を示した脂質 A2-MEND の保存安定性を調べた。siFVII 封入脂質 A2-MEND を pH5.5、4°C で各日数保存後、ICR マウスに 0.1 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、24 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。その結果、脂質 A2-MEND は調製から 105 日後もノックダウン活性を完全に保持しており、YSK05-MEND と比較して高い保存安定性を有することが明らかとなった (Fig. 2-6)。

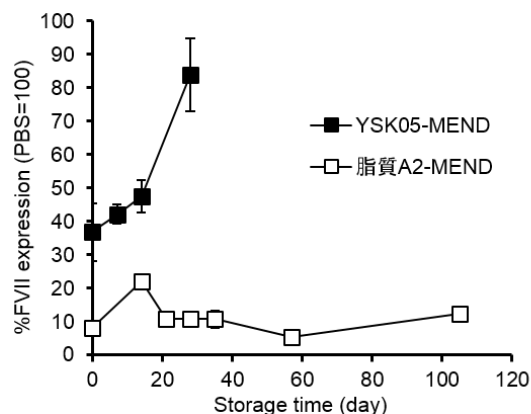


Fig. 2-6 MEND の保存安定性評価。siFVII 封入 YSK05-MEND あるいは脂質 A2-MEND を pH5.5、4°C 下で各日数保存後、0.1 mg/kg の siRNA 量で ICR マウスに静脈内投与し、24 hr 後の血漿中 FVII 酵素活性を測定した。(n=3) データは平均±SD として表した。

2-2-6 各 pH 応答性脂質の膜融合活性評価

YSK05 および脂質 A の膜融合活性を、³¹P NMR 法により比較した。ラメラ相および逆ヘキサゴナル相に含まれるリン脂質の分子運動が相ごとに制限されるため、化学シフト異方性により、それぞれの相は固有の ³¹P NMR スペクトルを示すことが知られている [78,79,80,81]。Fig. 2-7 に示したように、ラメラ相は高磁場側に、逆ヘキサゴナル相は低磁

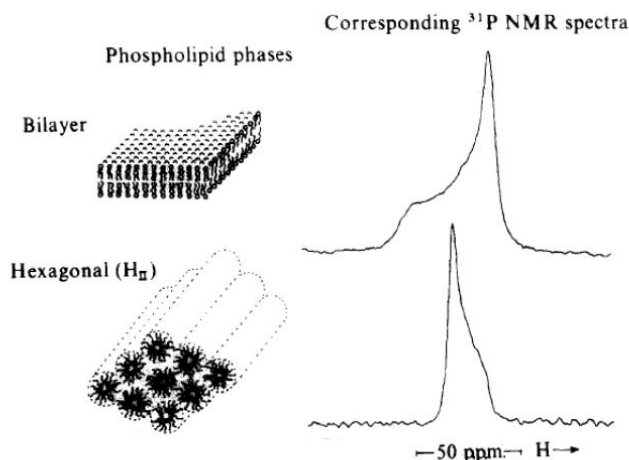


Fig. 2-7 リン脂質がとる相と³¹P NMRスペクトルの関係。上の脂質二重膜 (ラメラ相) および下の逆ヘキサゴナル相はそれぞれ高磁場 (右) 側および低磁場 (左) 側に偏った形のピークを示す。

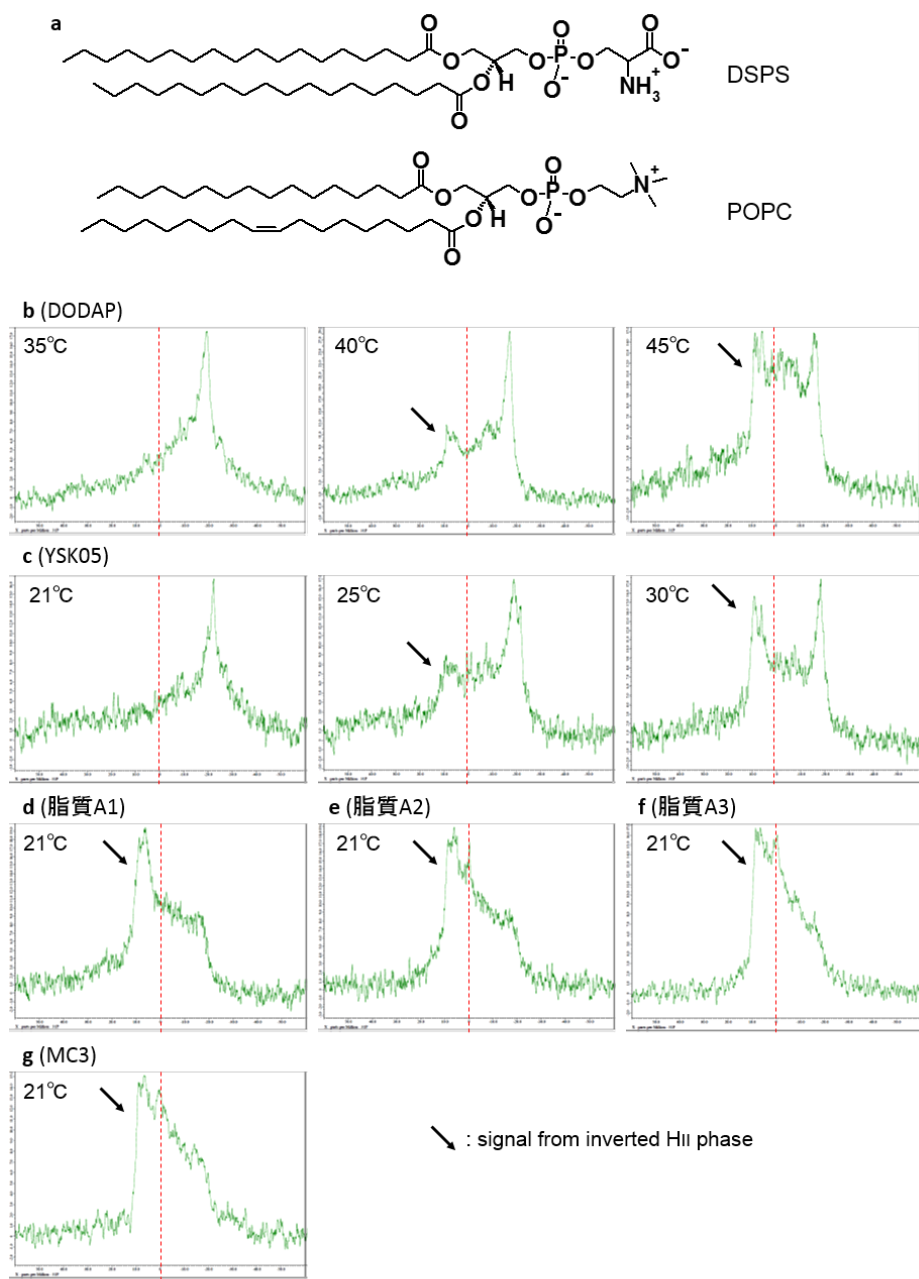


Fig. 2-8 脂質懸濁液の作製に用いたリン脂質の構造式および ^{31}P NMR法による各pH応答性脂質の相転移温度の測定。(a) 負電荷リン脂質であるDSPSおよび中性リン脂質であるPOPCの構造式。(b-g) ^{31}P NMRスペクトル。pH応答性脂質/POPC/DSPSで1/1/1の組成比の脂質フィルムを10 mM citrate buffer (pH4.0) で水和させることで調製した総脂質濃度48 mMの脂質懸濁液の表記温度における ^{31}P NMRスペクトルを測定した。それぞれ (b) DODAP、(c) YSK05、(d) 脂質A1、(e) 脂質A2、(f) 脂質A3、(g) MC3の結果を表した。矢印は逆ヘキサゴナル相由来のピークを示す。POPC: 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylcholin, DSPS: 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylserine.

場側に偏った形のピークを示す。従って、pH 応答性脂質と負電荷リン脂質の混合脂質懸濁液の様々な温度における ^{31}P NMR スペクトルを測定することで、ラメラ相から逆ヘキサゴナル相への相転移温度を評価することが可能である[82]。そこで、pH 応答性脂質、中性リン脂質である 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylcholin (POPC) (Fig. 2-8a) および、負電荷リン脂質である 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylserine (DSPS) (Fig. 2-8a) を等量ずつ混合した脂質懸濁液 (pH4.0) の ^{31}P NMR スペクトルを測定した。ネガ

ティブコントロールとして既存の pH 応答性脂質である DODAP を、ポジティブコントロールとして MC3 を用いた。測定の結果、DODAP では 40°C 以上で逆ヘキサゴナル相由来のシグナルが出現したことから、本実験系における DODAP の相転移温度は 35~40°C であることが明らかとなった (Fig. 2-8b)。また、YSK05 の相転移温度は 21~25°C であり、DODAP と比較して高い膜融合活性を有することが、本評価系においても示された (Fig. 2-8c)。3 種の脂質 A は 21°C において逆ヘキサゴナル相をとり、YSK05 と比較して膜融合活性が高いことが明らかとなった (Fig. 2-8d~8f)。また、ポジティブコントロールである MC3 も脂質 A と同様に、21°C で逆ヘキサゴナル相を示した (Fig. 2-8g)。以上より、膜融合活性の序列は、脂質 A ≒ MC3 > YSK05 > DODAP であることが明らかとなった。

2-2-7 *In vitro* ノックダウン活性、体内動態、および肝臓内分布の pKa 依存性評価

脂質膜 pKa が異なる脂質 A-MEND の FVII ノックダウン活性は互いに大きく異なっていた。一方、3 種の脂質 A は全て高い膜融合活性を有していることが確認された。そこで、このノックダウン活性の違いが何に由来するのかを調べることにした。まず、MEND の体内動態を考慮しなくてよい *in vitro* 培養細胞における遺伝子ノックダウン活性を比較した。

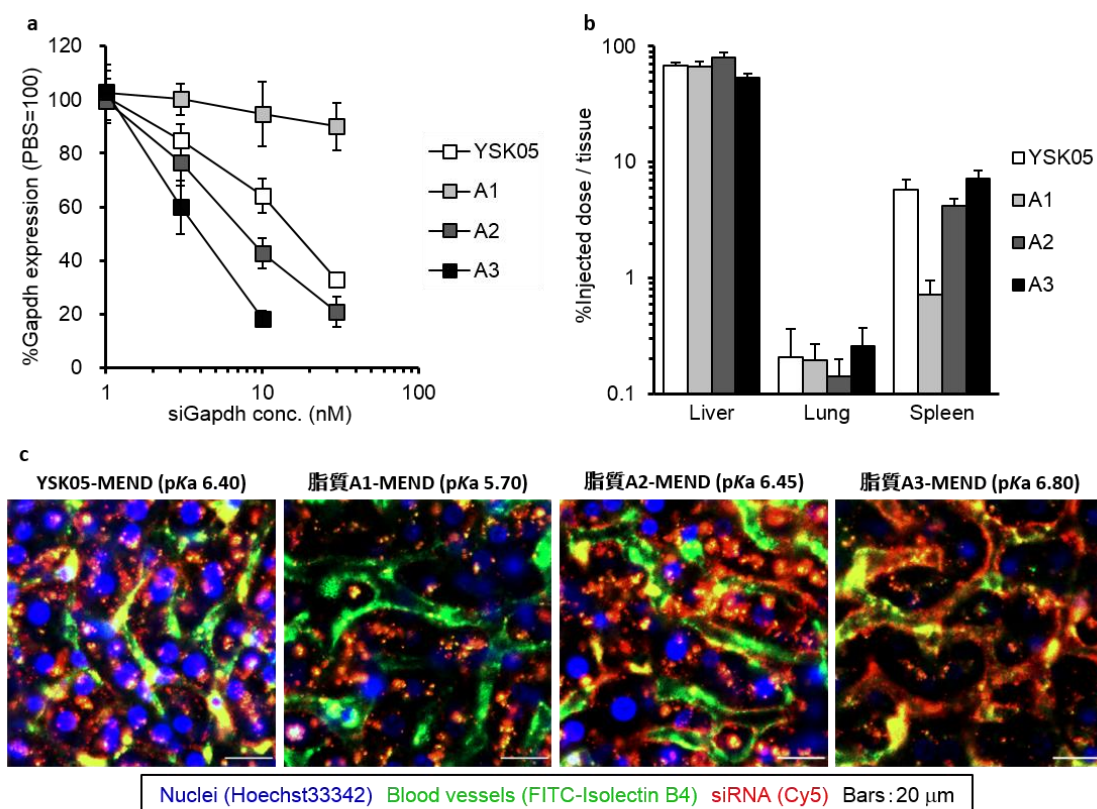


Fig. 2-9 YSK05-MEND および各脂質 A-MEND の活性・動態の比較。(a) 各 MEND に封入した siGapdh を、3 μg/mL hApoE3 存在下で Hepa1c1c7 細胞に添加し、2 hr インキュベート後、培地交換してからさらに 22 hr 後における Gapdh 発現を qRT-PCR 法により測定した。(n=3) (b) 各 MEND に封入した Cy5 標識 siGL3 を 0.5 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、30 min 後の肝臓、肺、脾臓への集積量を、組織ホモジネート中の蛍光強度を測定した。(n=3) (c) YSK05-MEND および各脂質 A-MEND に封入した Cy5 標識 siGL3 を 1 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、30 min 後の肝臓内分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。データは平均 ± SD として表した。

細胞株はマウス肝細胞がん由来 Hepa1c1c7 を用いた。本細胞の FVII 発現量が非常に低かったために標的遺伝子を Gapdh とし、Gapdh 発現量は Actb 発現量で補正した。siGapdh 封入 YSK05-MEND または各脂質 A-MEND を、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の recombinant human ApoE3 (hApoE3) 存在下で Hepa1c1c7 に添加してから 2 hr インキュベートし、培地交換し、さらに 22 hr 後の Gapdh 発現を qRT-PCR 法により測定した。その結果、脂質 A1-MEND はノックダウン活性をほとんど示さなかった (Fig. 2-9a)。また、脂質 A-MEND の脂質膜 pKa が大きいほど、そのノックダウン活性が高かった (Fig. 2-9a)。また、YSK05-MEND と同等の脂質膜 pKa を有する脂質 A2-MEND は YSK05-MEND よりも 2 倍程度高い活性を示した (Fig. 2-9a)。

続いて、YSK05-MEND および各脂質 A-MEND の静脈内投与後の体内分布を比較した。YSK05-MEND および各脂質 A-MEND に封入した Cy5 標識 siGL3 を、ICR マウスに 0.5 mg/kg で静脈内投与し、30 min 後の各臓器への移行量を組織ホモジネート中の蛍光強度を測定することで算出した。その結果、いずれの MEND も肝臓への高い集積が認められた (Fig. 2-9b)。また、MEND が静脈内投与後に初めに通過する肺への移行量はいずれの MEND も 1%以下であった (Fig. 2-9b)。また、脾臓への集積量は、MEND の脂質膜 pKa の上昇 (5.70~6.80) に伴って増加 (0.7~7.2%injected dose/tissue) した (Fig. 2-9b)。

さらに、各脂質 A-MEND の肝臓内分布を比較した。各脂質 A-MEND に封入した Cy5 標識 siGL3 を 1 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、30 min 後の siRNA の肝臓内分布を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。その結果、脂質膜 pKa 5.70 の脂質 A1-MEND ではほぼ全ての siRNA が血管外に移行している様子が観察された (Fig. 2-9c)。また、脂質膜 pKa 6.45 の脂質 A2-MEND および脂質膜 pKa 6.40 の YSK05-MEND では多くの siRNA は血管外へ移行しており、一部は血管構造に沿うように局在していた (Fig. 2-9c)。さらに、脂質膜 pKa 6.80 の脂質 A3-MEND では多くの siRNA は血管構造に沿った分布を示し、血管外へ移行した量は少ない様子が観察された (Fig. 2-9c)。以上より、脂質膜 pKa が 6.45 以下の MEND は多くが血管外の肝実質細胞へ移行し、脂質膜 pKa が比較的高い MEND は肝類洞血管内皮細胞 (LSEC) へ多く分布することが示唆された。

2-2-8 LSEC 標的化の検討

MEND の肝臓内分布における脂質膜 pKa 依存性を調べたところ、脂質膜 pKa の上昇に伴う LSEC への移行量の上昇が観察された。これより、LSEC においても肝実質細胞と同様に、遺伝子ノックダウン活性の脂質膜 pKa 依存性が存在すると予想された。そこで、YSK05-MEND、各脂質 A-MEND および各脂質 B-MEND を用いることで、LSEC における遺伝子ノックダウンの脂質膜 pKa 依存性を調べることにした。標的遺伝子は血管内皮細胞マーカーの 1 つである Cd31 とし、Cd31 発現量を別の血管内皮細胞マーカーである vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) 発現量で補正した。各 MEND に封入した siCd31 を 0.3 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、24 hr 後の肝臓中 Cd31 発現を qRT-

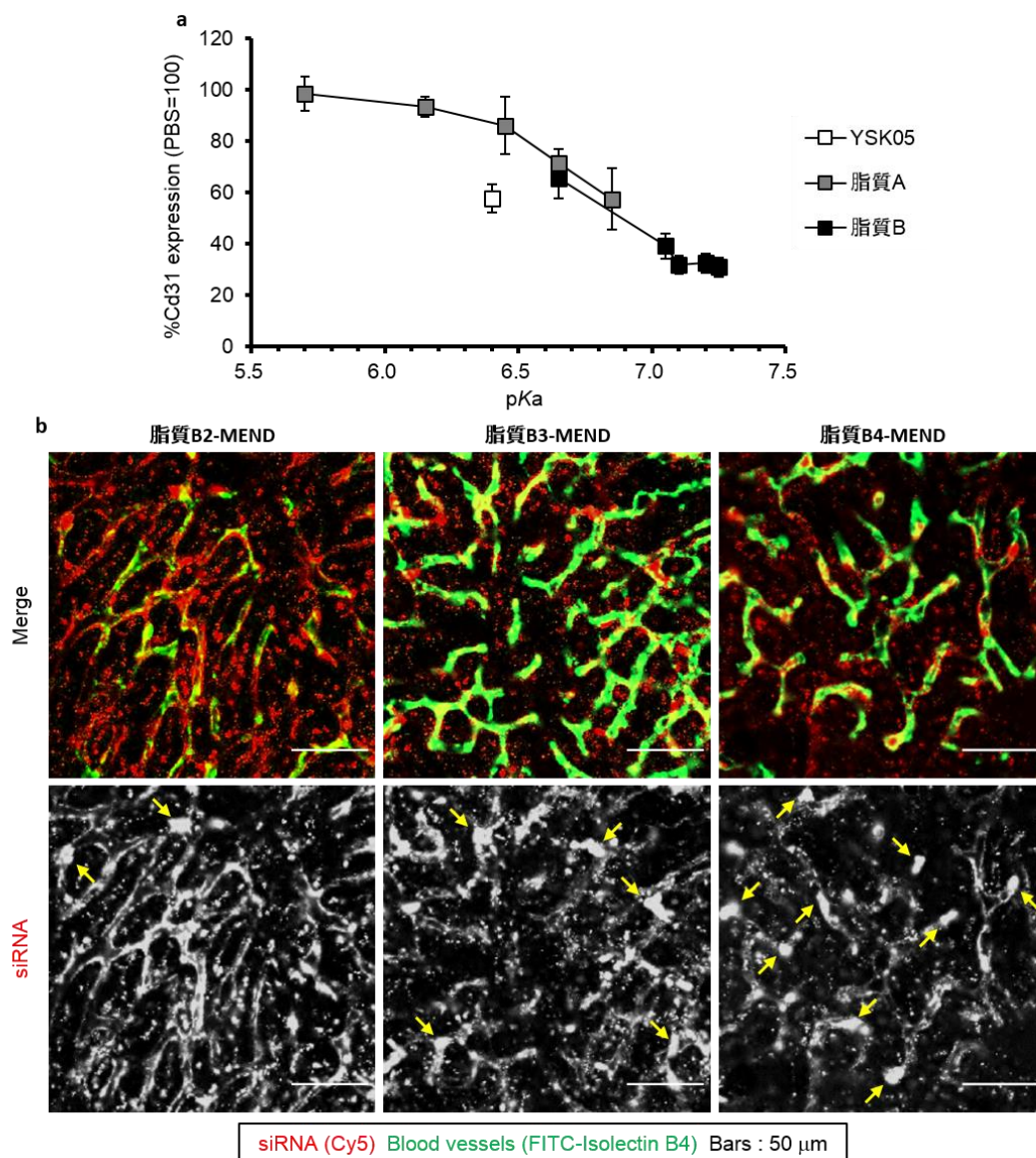


Fig. 2-10 LSECにおけるノックダウン活性およびLSECへの移行と脂質膜pKaの関係。(a) 各MENDに封入したsiCd31を0.3 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。(n=3) (b) 各脂質B-MENDに封入したCy5標識siGL3を0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、30 min後の肝臓内分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。下側にCy5由来の蛍光をグレースケールで表した。データは平均±SDとして表した。

PCR法により測定した。その結果、脂質A-MEND脂質B-MENDにおいて脂質膜pKaが上昇するにつれてノックダウン効率が上昇した (Fig. 2-10a)。脂質A-MENDと脂質B-MENDはほぼ同じ曲線上に存在した (Fig. 2-10a)。脂質膜pKa 7.10~7.25の脂質B-MENDのノックダウン効率は今回評価した中で最も高く、LSECにおける遺伝子ノックダウンに最適なpKa範囲であることが示唆された。また、YSK05-MENDは同等の脂質膜pKaを有する脂質A2-MENDと比較して高いノックダウン効率を示した (Fig. 2-10a)。

続いて、各脂質B-MENDの静脈内投与後の肝臓内分布を比較した。各脂質B-MENDに封入したCy5標識siGL3を0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、30 min後のsiRNAの肝臓内分布を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。その結果、脂質膜pKa

6.65 の脂質 B2-MEND では、多くの siRNA は血管構造に沿った形で局在していた (Fig. 2-10b)。また、脂質膜 pKa の上昇につれて、そのような血管構造に沿った分布は減少し、黄色矢印で示した血管内の一部分への高い集積性が認められた (Fig. 2-10b)。この観察結果と Fig. 2-9c の結果より、LSEC への移行に最適な脂質膜 pKa の範囲は 6.65~6.80 程度であることが示唆された。

続いて、LSEC における Cd31 ノックダウンの ApoE および粒子径依存性を調べた。YSK05-MEND あるいは脂質 A2-MEND に封入した siCd31 を 0.3 mg/kg で ApoE 欠損 BALB/c マウスに静脈内投与し、24 hr 後の肝臓中 Cd31 発現を qRT-PCR 法により測定した。hApoE3 を共投与する場合は、投与直前に hApoE3 を 0.1 mg/kg の投与量となるように MEND 溶液に混合した。実験の結果、両 MEND 共に hApoE3 の共投与によりノックダ

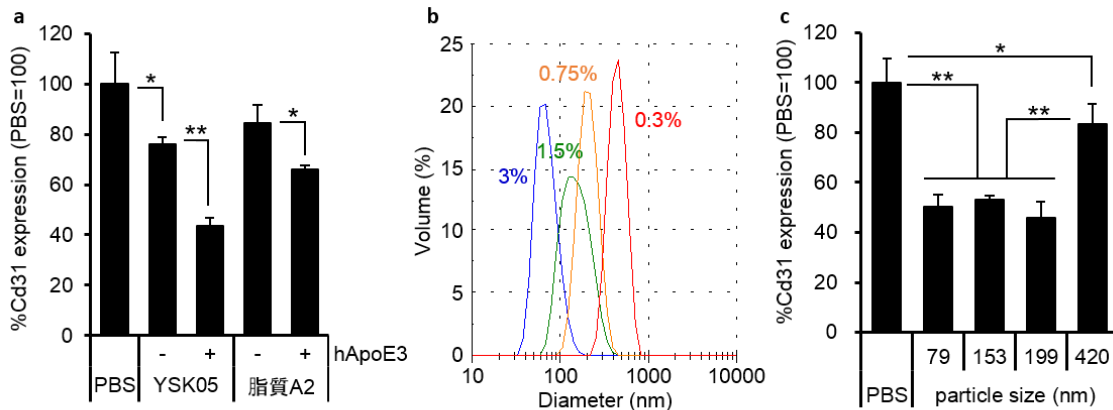


Fig. 2-11 Cd31ノックダウンのApoEおよび粒子径依存性。(a) 各MENDに封入したsiCd31を0.3 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。- はMENDのみを投与、+ はMENDと共にhApoE3を0.1 mg/kgで投与したことを表す。(*: p<0.05, **: p<0.01, Student's t-test, n=3) (b) 0.3~3 mol%のPEG-DMGを添加して調製した脂質B3-MENDの粒子径分布を、動的光散乱法により測定した。(c) 0.3~3 mol%のPEG-DMGを添加して調製した脂質B3-MENDに封入したsiCd31を0.1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。(*: p<0.05, **: p<0.01, nrANOVA followed by SNK test, n=3) データは平均±SDとして表した。

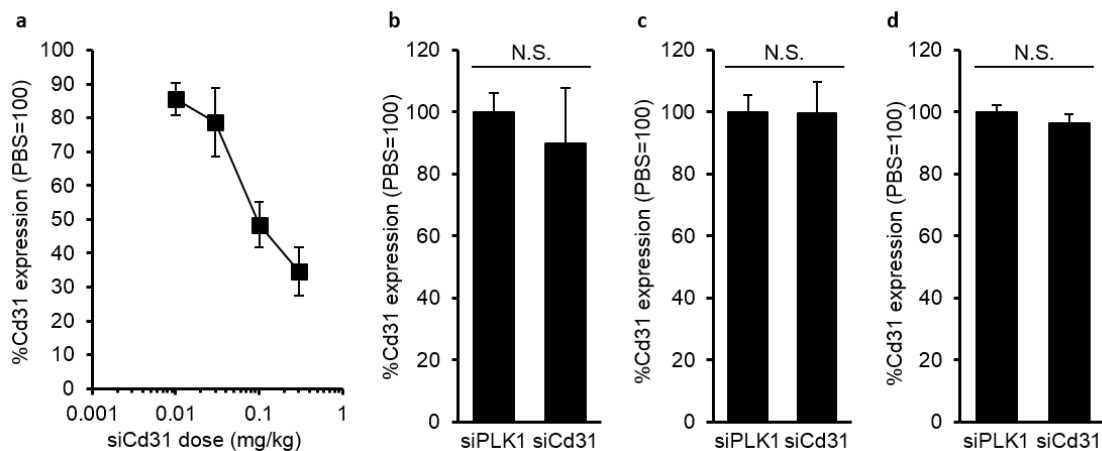


Fig. 2-12 脂質B3-MENDの各臓器におけるCd31ノックダウン活性。(a) 脂質B3-MENDに封入したsiCd31をICRマウスに静脈内投与し、24 hr後の肝臓中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。(n=3) (b-d) 脂質B3-MENDに封入したsiCd31を0.3 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、肺 (b)、心臓 (c)、腎臓 (d) 中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。nrANOVAによって検定し、p>0.05であったときに有意差なしと判断した。(n=3) データは平均±SDとして表した。N.S.: not significance.

ウン活性が有意に上昇したことから、Cd31 ノックダウンは ApoE に依存していることが示唆された (Fig. 2-11a)。また、hApoE3 の共投与を行わない場合でも YSK05-MEND では ノックダウン活性が認められたことから、ApoE は Cd31 ノックダウンにおいて不可欠ではないことが示唆された (Fig. 2-11a)。また、Fig. 2-4c 同様に粒子径の異なる 4 種の MEND を用いることで、LSEC における Cd31 ノックダウンの粒子径依存性を調べた。ただし、キャリアは LSEC における遺伝子ノックダウンに優れる脂質 B3-MEND を用いた。PEG-DMG 添加量の減少に伴った MEND 粒子径の増加が確認された (Fig. 2-11b)。この粒子径が様々に異なる 4 種の脂質 B3-MEND に封入された siCd31 を、ICR マウスに 0.1 mg/kg で静脈内投与し、24 hr 後の肝臓中 Cd31 発現を qRT-PCR 法により測定した。その結果、平均粒子径 79~199 nm の MEND ではいずれも 50%前後のノックダウン効率が認められたが、粒子径 420 nm の MEND では 17%のノックダウン効率に留まり、ノックダウン活性が有意に減少した (Fig. 2-11c)。

さらに、脂質 B3-MEND による Cd31 ノックダウンの投与量依存性を調べた。脂質 B3-MEND に封入した siCd31 を 0.01~0.3 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、24 hr 後の肝臓中 CD31 発現を qRT-PCR 法により測定した。また、最大投与量である 0.3 mg/kg に関しては肺、心臓および腎臓における Cd31 発現も同様に調べた。その結果、LSEC において投与量依存的な Cd31 ノックダウンが認められ、ノックダウンの ED₅₀ 値は 0.1 mg/kg であった (Fig. 2-12a)。一方、肺、心臓および腎臓では Cd31 ノックダウンは全く観察されなかった (Fig. 2-12b~12d)。以上より、脂質 B3-MEND は LSEC への選択性が高いことが明らかとなった。

2-2-9 脂質 A2-MEND の肝実質細胞特異的ノックダウンに関する検討

脂質 A2-MEND は同等の脂質膜 pKa を有する YSK05-MEND と比較し、LSEC における Cd31 ノックダウン活性が低いことが明らかとなった。そこで、両 MEND の Cd31 ノックダウン活性の投与量依存性を調べたところ、4 倍程度の違いがあることが明らかとなった (Fig. 2-13a)。また、FVII ノックダウン活性に関しては、脂質 A2-MEND の方が ED₅₀ 値で 4 倍高いことが明らかとなっている (Fig. 2-3c,13a)。一方、両 MEND の肝臓内分布は類似 (Fig. 2-9c) しており、膜融合活性は YSK05 よりも脂質 A の方が高い (Fig. 2-8c~8f) ことが示されている。従って、LSEC における低いノックダウン活性は、脂質 A2-MEND が特異的に何らかの不活性化を受けているためであると考えられる。ここで、内皮リパーゼは主に血管内皮細胞で合成されるホスホリパーゼ 1 活性を有する細胞外リパーゼであり、HDL 中のリン脂質の分解を介して血中 HDL 濃度の調節に深く関与している [83,84,85]。脂質 A2-MEND の LSEC における不活性化に対する内皮リパーゼの寄与を、内皮リパーゼ阻害剤である GSK264220A [86] を用いて調べることにした。脂質 A2-MEND または YSK05-MEND に封入された siCd31 を 1 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、同時に GSK264220A を 30 mg/kg あるいは同容量の vehicle を腹腔内投与し、24 hr 後の肝臓中

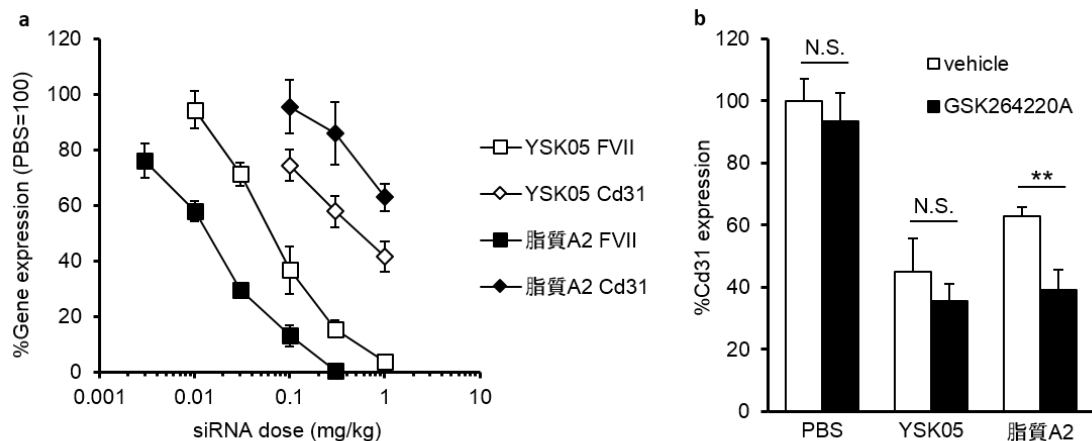


Fig. 2-13 脂質A2-MENDの肝実質選択性および内皮リパーゼの影響。(a) YSK05-MENDおよび脂質A2-MENDのFVIIおよびCd31ノックダウン活性のsiRNA投与量依存性。(n=3-4) (b) YSK05-MENDおよび脂質A2-MENDに封入したsiCd31を1 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、同時にGSK264220Aあるいはvehicleを30 mg/kgで腹腔内投与し、24 hr後の肝臓中Cd31発現をqRT-PCR法により測定した。(**: $p < 0.01$, Student's t-test, $n = 3$) データは平均±SDとして表した。N.S.: not significance.

Cd31 発現を qRT-PCR 法により測定した。その結果、PBS および YSK05-MEND の静脈内投与群においては、GSK264220A の腹腔内投与による Cd31 発現の有意な低下は認められなかった (Fig. 2-13b)。一方、脂質 A2-MEND の静脈内投与群においては、GSK264220A の腹腔内投与により、Cd31 発現が有意に低下した (Fig. 2-13b)。これより、脂質 A2-MEND は LSEC 上の内皮リパーゼにより特異的に不活性化されることが示唆された。

2-3 考察

それぞれ一部分の構造が異なる様々な脂質膜 pK_a を示す脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズの開発に成功した。また、脂質 A1~A3 は全て MC3 と同等レベルの高い膜融合活性を有することが明らかとなった (Fig. 2-8d~8g)。この条件下で FVII ノックダウンの脂質膜 pK_a 依存性を調べたところ、ノックダウンに最適な脂質膜 pK_a は 6.45 であることが示された (Fig. 2-3)。 *In vitro* 培養細胞において、脂質膜 pK_a が上昇するにつれて遺伝子ノックダウン活性が上昇した (Fig. 2-9a) ことから、脂質膜 pK_a が高いほどそのキャリアのエンドソーム脱出効率が高いと考えられる。また、脂質膜 pK_a 5.70~6.80 の範囲では、脂質膜 pK_a の上昇に伴って、MEND の肝臓内局在が肝実質細胞から肝類洞血管内皮細胞へ大きく変化した (Fig. 2-9c)。一方、遺伝子ノックダウン活性は、標的細胞への移行量と、エンドソーム脱出効率の積で算出されると考えられる。脂質膜 pK_a 6.45 を示す MEND は肝実質細胞への移行量とエンドソーム脱出効率のバランスが最も優れていたため、他の脂質膜 pK_a を示す MEND と比較して高いノックダウン活性を示したと考えられる。

脂質 A2-MEND、脂質 B1/B2(2/5)-MEND そして MC3-MEND が互いにほぼ同じ FVII ノックダウンの活性 (ED_{50} 値で 0.0012~0.02 mg/kg) を示したことが偶然であるのか、あるいは必然であるのかについて議論は、更に高活性な siRNA キャリアを構築する上で重要である。必然であると考えた場合、3 種の MEND に共通して制限されている過程等が存在するはずである。MC3-LNP のエンドソーム脱出効率は僅か 2%程度に留まり、エンドソーム脱出は膜の多重化が起きていない初期エンドソームで特異的に起きていることが明らかとなっている [45]。初期エンドソーム内の pH はおおよそ 6.5 程度であるために、FVII ノックダウンに最適な pK_a 6.4 程度の脂質膜の荷電率は半分程度に留まる。これが、上記 3 種の MEND に共通する特徴であると考えられる。また、脱出可能な初期エンドソーム内において脂質荷電率が半分程度に制約されることは本システムの最大の欠点であるとも言える。 *In vitro* 培養細胞において、脂質膜 pK_a の上昇に伴うノックダウン活性の上昇が認められた (Fig. 2-9a) が、脂質膜 pK_a の違いによる細胞への取り込み量の違いの影響も含み得るものの、脂質膜 pK_a の上昇によるエンドソーム脱出効率の向上が示唆される。さらに *in vivo* の LSEC において、脂質膜 pK_a 6.65~7.25 の範囲で、脂質膜 pK_a の上昇に伴って siRNA 移行量の減少が観察された (Fig. 2-10b) が、ノックダウン効率の明らかな上昇が認められた (Fig. 2-10a)。これは、脂質膜 pK_a の上昇による移行量低下という負の影響よりも、エンドソーム脱出効率上昇という正の影響の方が大きかった結果であると考えられる。この結果から、脂質膜 pK_a が高いほどエンドソーム脱出効率が良いものの、肝実質細胞への高い移行量を確保するために脂質膜 pK_a を下げることでエンドソーム脱出効率の低下も同時に生じていると考えることができる。これは、MC3 のエンドソーム脱出効率が 2%程度に留まるという、Gilleron らの報告 [45] とも矛盾しない。この考えに基づけば、これまでと同様の pH 応答性脂質の開発手法では桁が変わるほどの大幅な活性向上への期待は薄い。本システムは、pH の値のみに依存するシステムであるため、例として、細胞内における還

元環境などの他の環境応答的活性化の機能を合理的に組み合わせることで飛躍的な活性向上が達成可能かもしれない。また、同様に pH 応答性という言葉で表現されるが、Arrowhead 社の DPC に利用されている、第 1 級アミンに対する 2-propanoic -3-methylmaleic anhydride 誘導体によるリバーシブルな共有結合は、pH の‘値’だけではなく、酸性 pH 環境に晒される‘時間’にも大きく依存するため、MC3 の pH 応答性とは性質が大きく異なる[87]。このような他のエンドソーム脱出メカニズムは、今後の pH 応答性リポソームによる siRNA 送達効率の飛躍的な向上に大きく貢献すると期待される。

脂質膜 pKa 5.70~6.80 の範囲内において、脂質膜 pKa の上昇により LSEC への移行性が飛躍的に上昇した (Fig. 2-9c)。また、ApoE 欠損マウスにおいて、ApoE の共投与により Cd31 ノックダウン活性が向上した (Fig. 2-11a) ことから、肝実質細胞と同様に ApoE の関与が示唆された。しかし、脂質膜 pKa 5.70 を示す脂質 A1-MEND は、野生型マウスにおいて肝実質細胞へは効率的に移行しているものの、LSEC へはほとんど移行していない (Fig. 2-9c)。従って、LSEC への移行における ApoE は不可欠ではなく補助的な存在であり、粒子表面のカチオン性が不可欠な要素であると考えられる。また、脂質膜 pKa 6.65~7.25 の範囲において、脂質膜 pKa の上昇によって LSEC への移行はむしろ減少した (Fig. 2-10b) ため、過剰なカチオン性は LSEC への指向性を減弱させるか、あるいは他の細胞種への指向性を上昇させることで副次的に LSEC への移行量を減少させたと考えられる。脂質膜 pKa 7.25 を示す脂質 B4-MEND の静脈内投与の結果、siRNA は血管上の一部へ多く集積した (Fig. 2-10b)。その部分は血管の中でも FITC-Isolectin B4 により特に強く染色される部位と一致する。肝臓における常在性マクロファージであるクッパー細胞は、肝臓の非実質細胞の中でも血管内に存在することを特徴とする細胞であり、当研究室におけるこれまでの知見により、マクロファージは FITC-Isolectin B4 に対する高い親和性を有することが明らかとなっている。これより、脂質 B4-MEND に封入された siRNA はクッパー細胞へ分布したと考えられる。また、LSEC は多種のスカベンジャー受容体を高発現しており、他臓器の血管内皮細胞と比較して ovalbumin、酸化 LDL、リソソーム酵素等の多様な高分子を血中から除去する能力に長けている[88,89,90,91]。このような細胞の性質により、脂質 B3-MEND は LSEC 特異的に取り込まれることで肝臓特異的に Cd31 をノックダウンしたと考えられる (Fig. 2-11a~11d)。また LSEC は、ファゴサイトーシスに特化したマクロファージとは対を成し、ピノサイトーシスに特化しており、専らクラスリン介在性エンドサイトーシスを介した 200 nm 以下の物質の排除を担当している[90]。LSEC における Cd31 ノックダウンの粒子径依存性を調べた結果、平均粒子径 79-199 nm の MEND では同程度の活性を有していたものの、420 nm の MEND では著しく活性が低下した (Fig. 2-11c)。これは、LSEC におけるピノサイトーシスの性質上、420 nm の粒子を効率的に取り込めないことが原因であると考えられる。

脂質 A2-MEND は LSEC 上で内皮リパーゼにより不活性化を受けることでノックダウン活性が減少した (Fig. 2-13b)。マウスにおいて内皮リパーゼは肝実質細胞上にはほとんど

存在しないことが知られているため[92]、肝実質細胞におけるノックダウンは減弱せずに、YSK05-MEND よりも高い活性を示したと考えられる。その結果、脂質 A2-MEND の Cd31 および FVII ノックダウンの ED₅₀ 値はそれぞれ 0.4 mg/kg 程度および 0.015 mg/kg であり、予期せずに肝実質細胞に高い選択性を示す siRNA キャリアの構築に成功した (Fig. 2-13a)。また、脂質 B3-MEND の Cd31 および FVII ノックダウンの ED₅₀ はそれぞれ 0.1 mg/kg および 0.3 mg/kg であり、比較的 LSEC 選択的な siRNA キャリアであると言える (Fig. 2-3c,12a)。脂質 A や脂質 B は Cd31 ノックダウンの pKa 依存性評価の結果より、同様の ‘Cd31 ノックダウン効率-脂質膜 pKa’ 曲線に位置する (Fig. 2-10a) ことから、脂質 B3 も脂質 A2 と同様に内皮リパーゼによる不活性化を強く受けていると考えられる。従って、内皮リパーゼのホスホリパーゼ 1 活性に対して耐性の pH 応答性脂質を開発することで、LSEC における遺伝子ノックダウン活性および LSEC 選択性の大幅な向上が期待される。さらに、MEND 粒子径の上昇による遺伝子ノックダウン活性の減弱は、LSEC と比較して肝実質細胞において顕著である (Fig. 2-4d,11e) ため、粒子径を 200 nm 程度に制御することで更なる LSEC 選択性の向上が期待される。LSEC は近年になって、細胞性免疫機能の制御[93]や、結腸がんの肝転移[94]に深く関わっていることが明らかになってきている。肝実質細胞および LSEC 選択的 siRNA キャリアは、*in vivo* において細胞種特異的な遺伝子ノックダウンを可能とすることから、肝疾患の進行メカニズムの解明、さらにはその治療に貢献すると期待される。

2-4 小括

それぞれ異なる脂質膜 pK_a を示す新規 pH 応答性脂質である、脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズの開発し、脂質膜 pK_a が pH 応答性 MEND の動態や活性に与える影響についての検討を行った。脂質 A1~A3 が全て YSK05 よりも高い膜融合活性を有することが保証された上で、脂質 A-MEND の FVII ノックダウン活性を調べた結果、ノックダウンに最適な脂質膜 pK_a は 6.45 であることが明らかとなった。また、脂質 A2-MEND および脂質 B1/B2(2/5)-MEND は MC3-MEND と同程度の高いノックダウン活性を示した (ED_{50} : 0.015~0.02 mg/kg)。また、1 mg/kg の投与量においても毒性は観察されなかったことから、両 MEND は広い治療域を有することが示された。また、脂質膜 pK_a が 6.45 よりも高い MEND の FVII ノックダウンの減少は、LSEC への移行量の増加に起因することが明らかとなり、高 pK_a を示す MEND は高い Cd31 ノックダウン活性を示した (ED_{50} : 0.1 mg/kg)。また、その血管内皮細胞における遺伝子ノックダウンは肝臓特異的であった。また、脂質 A2-MEND は LSEC 上で内皮リパーゼにより不活性化を受けることで Cd31 ノックダウン活性が減少していることが示唆された。これより、脂質 A2-MEND は YSK05-MEND と比べて肝実質細胞への選択性が非常に高いシステムであることが明らかとなった。今後は内皮リパーゼ感受性、脂質膜 pK_a 、粒子径等に注目することで LSEC 特異的な siRNA 送達システムを構築していく予定である。

第3章 YSK05-MEND による固形がん組織への siRNA 送達

3-1 緒言

序章でも述べたように、腫瘍新生血管は物質透過性が亢進しているため、血中を長時間滞留し、直径 100 nm 以下に制御されたリポソームは EPR 効果によって受動的にがん組織に集積する (Fig. 3-1a)。リポソームの血中滞留性を向上させるために PEG 修飾がよく用いられているが、過剰な PEG 修飾はリポソームの膜融合活性を大きく減弱させる。特に、カチオン性リポソームは血漿タンパク質との静電的相互作用を起こしやすいため、血中滞留化に必要な PEG 修飾量が多い。従って、EPR 効果による高いがん組織集積性と、がん細胞

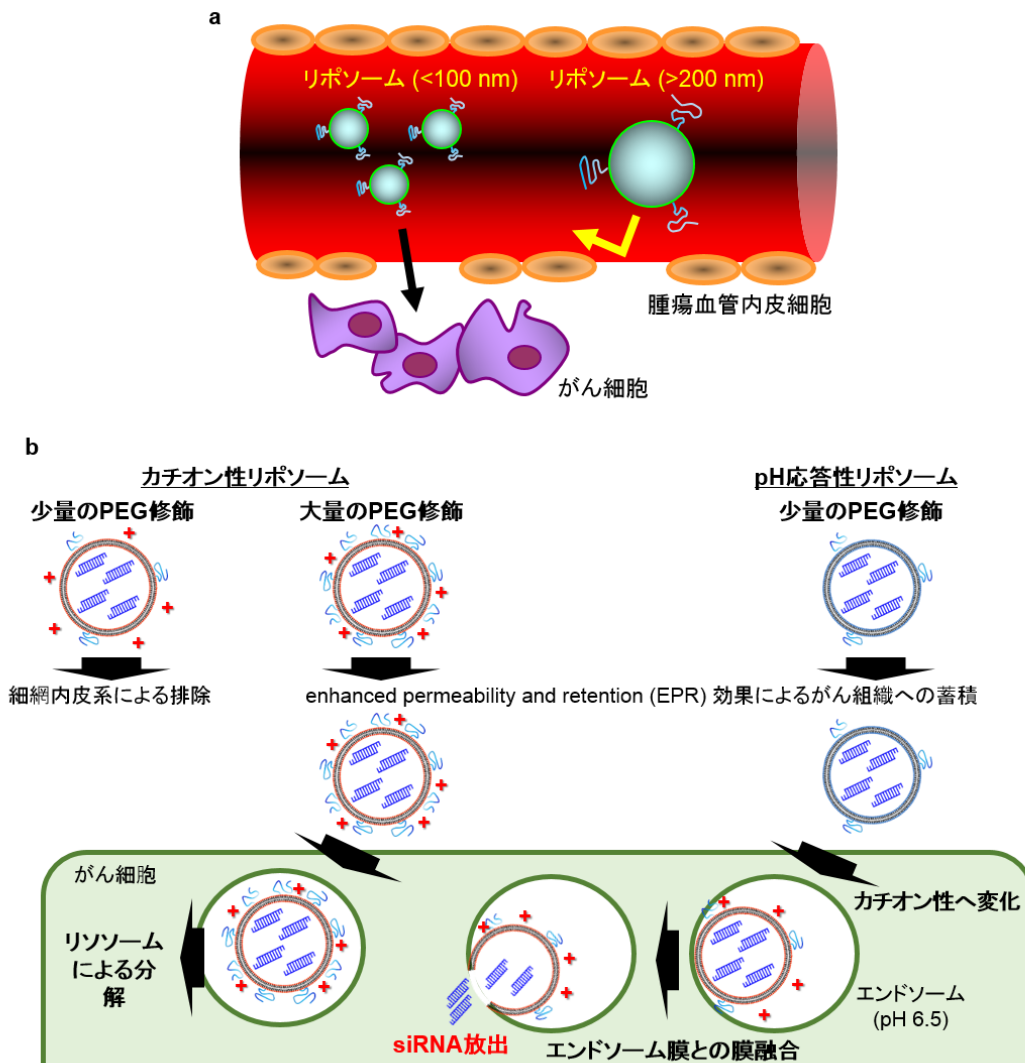


Fig. 3-1 (a) PEG等で修飾されることで高い血中滞留性を有し、粒径が100 nm以下に制御されたリポソームは、腫瘍血管内皮細胞の間隙を通過してがん組織に蓄積する。(b) カチオン性リポソームは高い血中滞留性を得るために大量のPEGで修飾される必要がある。そのため、細胞内動態が悪化し、リソソームにおいて分解される。一方で、pH応答性リポソームは少量のPEG修飾で血中滞留化する。そのため、カチオン性リポソームと比較してPEG修飾による細胞内動態の悪化の影響が少なく、エンドソーム膜との膜融合を介したsiRNAの細胞質送達に有用である。

における優れた細胞内動態の両立は難しい。一方、pH 応答性リポソームは血中では電氣的にほぼ中性を示し、血漿タンパク質との非特異的な相互作用がカチオン性リポソームと比べて元々少ないため、血中滞留化に必要な PEG 修飾量が少ないことが知られる[95,96,97]。そのため、pH 応答性リポソームは EPR 効果によるがん組織標的化に有用であると考えられる (Fig. 3-1b)。

siRNA キャリアを用いてがん組織における標的遺伝子をノックダウンしたという報告は多く存在するが、ノックダウン効率が 50%程度に留まる報告がほとんどである[46,47]。さらに多くの場合、それぞれの報告でキャリア、標的遺伝子、siRNA 配列、がんモデルが全て異なっており、がん組織の特性についての言及もなされていないために、効率的な遺伝子ノックダウンを達成させる条件に関する統一的な見解が出されていないのが現状である。

当研究室の櫻井は、第 1 章の基準組成 YSK05-MEND を PEG で修飾し血中滞留化させることで、皮下移植腎細胞がん組織へ siRNA を送達したことを報告している[47]。本章では、肝臓において最適化された YSK05-MEND の血中滞留化を行い、様々ながんモデルにおける siRNA 送達について検討すると共に、がん組織への siRNA 送達効率に及ぼすナノ粒子の物性およびがん組織の特性との関わりを明らかにすることを目的とした。

3-2 結果

3-2-1 各種がん細胞株における *in vitro* ノックダウン活性と細胞毒性評価

細胞株によって核酸の導入効率が異なることが知られている。そこで、初めに、様々ながん細胞株における、YSK05-MEND による標的遺伝子のノックダウン活性を比較した。YSK05-MEND の脂質組成は第 1 章において肝臓用に最適化された YSK05/Chol/PEG-DMG (70/30/3, mol%) とした。平均粒子径は 70~80 nm の範囲であった。標的遺伝子は、*polo-like kinase 1* (PLK1) とした。PLK1 は非小細胞肺癌、胃癌、メラノーマ、乳がん、卵巣がんなど幅広いがん種で高発現していることが知られており、正常細胞では発現が低いために、本遺伝子の機能阻害は、がん細胞選択的な殺細胞作用を誘起することが知られている[98,99]。まず、YSK05-MEND に封入した siPLK1 を、各がん細胞株に様々な濃度で添加し、24 hr 後における PLK1 発現量を qRT-PCR 法により測定した。その結果、がん

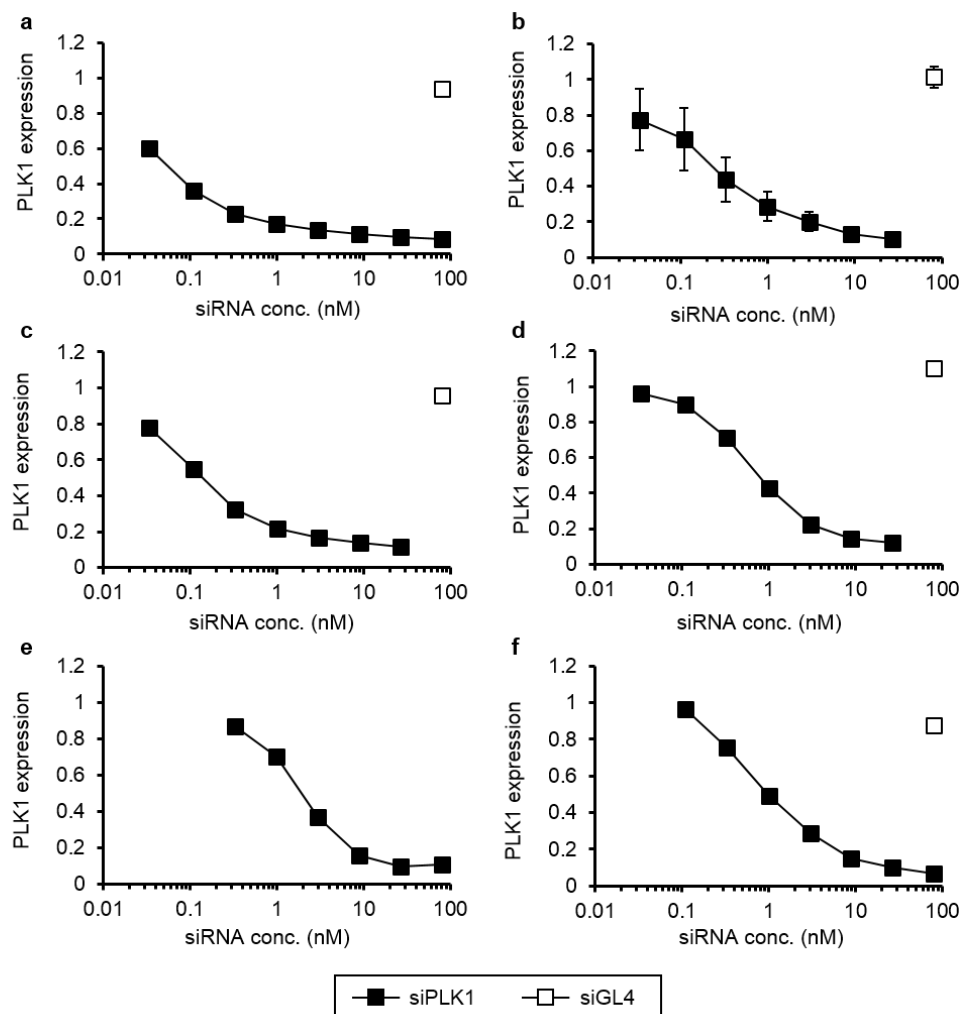


Fig. 3-2 YSK05-MENDの各がん細胞株におけるPLK1ノックダウン活性。PEG-DMG修飾YSK05-MENDIに封入した各siRNAを、OS-RC-2細胞 (a)、Huh7細胞 (b)、HepG2細胞 (c)、HCT116細胞 (d)、HeLa-dluc細胞 (e)、MDA-MB-231細胞 (f) に添加し、24 hrインキュベートした後にqRT-PCR法によってPLK1遺伝子の発現を測定した。データは平均±SDとして表した。(n=1~3)

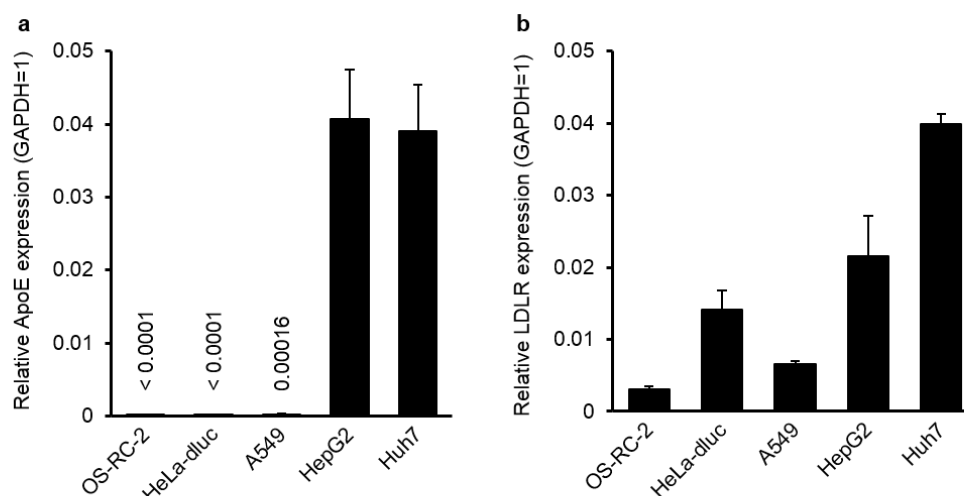


Fig. 3-3 各がん細胞株における遺伝子発現量。各がん細胞株における、ApoE (a) およびLDLR (b) 遺伝子の発現をqRT-PCR法により測定した。データは平均±SDとして表した。(n=3)

細胞株によってノックダウン活性は大きく異なり、50%阻害濃度 (IC₅₀ 値) で 0.05~2 nM を示した (Fig. 3-2)。ヒト腎細胞がん由来 OS-RC-2 細胞において最も高い活性 (IC₅₀: 0.05 nM) を示し (Fig. 3-2a)、次いで、ヒト肝細胞がん由来 Huh7 細胞および HepG2 細胞において高い活性 (IC₅₀: 0.2 nM) を示した (Fig. 3-2b,2c)。また、HeLa-dluc 細胞、ヒト結腸がん由来 HCT116 細胞、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞においては比較的活性が低かった (IC₅₀: 0.8~2 nM) (Fig. 3-2d~2f)。

次に、がん細胞株間の YSK05-MEND による PLK1 のノックダウン活性が、がん細胞株によって大きく異なる原因に着目した。まず、各がん細胞株における PLK1 発現量を比較したところ、mRNA レベルで GAPDH 発現量を 1 とした時に 0.05~0.015 を示した (データ未提示)。がん細胞株間で PLK1 発現量に大きな差がないことから、PLK1 発現量とノックダウン活性との相関性は低いと考えられた。第 1 章でも述べた通り、血中で電気的に中性を示すリポソームは ApoE-LDLR 経路を介して肝実質細胞に効率的に取り込まれることが明らかとなっている [17]。そこで、がん細胞株間のノックダウン効率の違いが、各がん細胞株の ApoE および LDLR 発現量の違いに起因する可能性があるかと予想し、各がん細胞株におけるこれらの遺伝子発現量を qRT-PCR 法により比較した。その結果、ApoE 遺伝子は肝細胞がん由来 Huh7 細胞および HepG2 細胞において高発現していた一方、OS-RC-2 細胞、HeLa-dluc 細胞および A549 細胞ではほとんど発現していない、あるいは検出感度以下であった (Fig. 3-3a)。また、ApoE の主な受容体である LDLR 遺伝子は、ヒト肝細胞がん由来 Huh7 細胞および

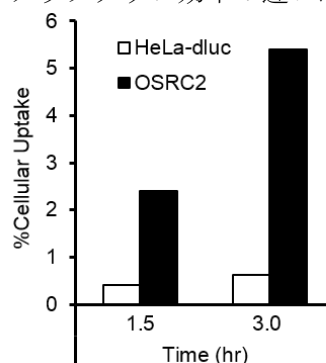


Fig. 3-4 YSK05-MENDの各がん細胞株への取り込み量。³H標識したPEG-DMG修飾YSK05-MENDに封入したsiRNAを100 nMの濃度で、HeLa-dluc細胞およびOS-RC-2細胞に添加し、1.5~3.0 hrインキュベートした後、細胞内の放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。データは平均として表した。(n=2)

び HepG2 細胞において比較的高発現しており、OS-RC-2 細胞、HeLa-dluc 細胞およびヒト小細胞肺癌由来 A549 細胞においては比較的低発現であった (Fig. 3-3b)。このことから、ヒト肝細胞がん由来細胞株における高いノックダウン活性は、肝実質細胞の場合と同様、ApoE-LDLR 経路を介した YSK05-MEND の効率的な細胞取り込みの結果であることが示唆された。また、OS-RC-2 細胞では、今回用いたがん細胞株の中で最も高いノックダウン活性が示されたものの、OS-RC-2 細胞における ApoE、LDLR 量遺伝子の発現は共に最も低く (Fig. 3-3)、ApoE-LDLR 経路は関与していないことが示唆された。また、³H 標識 YSK05-MEND に封入した siGL4 を 100 nM で細胞に添加し、1.5 hr あるいは 3 hr インキュベート後、細胞中の放射線量を測定することで、細胞への取り込み量を測定した。その結果、YSK05-MEND は HeLa-dluc 細胞と比較して OS-RC-2 細胞に 1.5 hr インキュベート時で 6.0 倍、3 hr インキュベート時で 8.6 倍、多く取り込まれていた (Fig. 3-4)。このことから、OS-RC-2 細胞における高いノックダウン活性は、細胞への高い取り込み量に起因していることが示唆された。

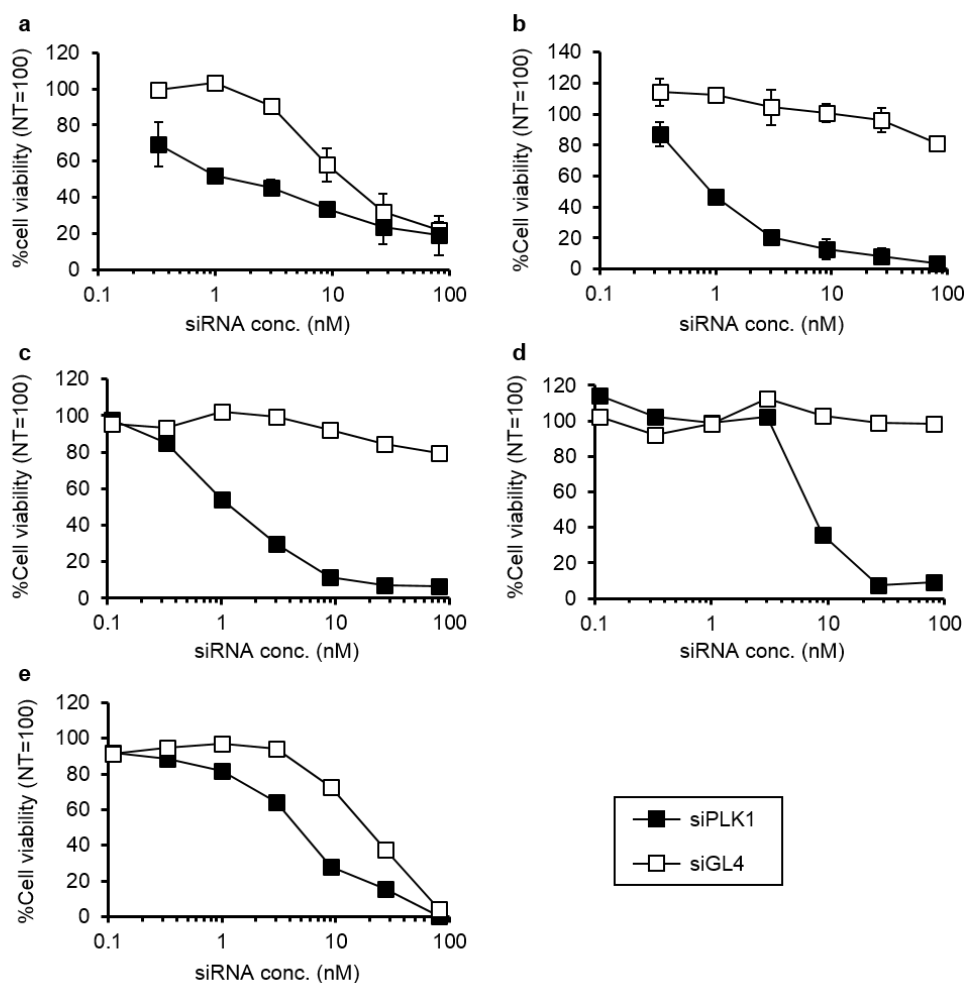


Fig. 3-5 各がん細胞株におけるPLK1ノックダウンが細胞生存率に与える影響。PEG-DMG修飾YSK05-MENDに封入した各 siRNAを、OS-RC-2細胞 (a)、Huh7細胞 (b)、HCT116細胞 (c)、HeLa-dluc細胞 (d)、MDA-MB-231細胞 (e) に添加し、24 hrインキュベートした後に培地を交換し、さらに48 hr培養した際の細胞生存率をBCA法によって求めた。データは平均±SDとして表した。(n=1~3)

Table 3-1 各がん細胞株におけるYSK05-MENDIによるPLK1のノックダウン活性およびPLK1のノックダウンによる殺細胞効果

がん細胞株	由来	PLK1のノックダウン活性 (IC ₅₀ , nM)	PLK1のノックダウンによる殺細胞効果 (IC ₅₀ , nM)	感受性 (ノックダウンIC ₅₀ /殺細胞IC ₅₀)
OS-RC-2	ヒト腎細胞がん	0.05	1	0.05
Huh7	ヒト肝細胞がん	0.2	1	0.2
HepG2	ヒト肝細胞がん	0.2	-	-
HeLa-dluc	ヒト子宮頸がん	2	7	0.29
HCT116	ヒト結腸腺がん	0.8	1	0.8
MDA-MB-231	ヒト乳腺がん	1	5	0.2

次に、PLK1 の発現抑制による各がん細胞株の殺細胞効果を評価した。また、がん細胞株ごとに PLK1 ノックダウンの IC₅₀ 値が異なるため、がん細胞株ごとの PLK1 ノックダウンの IC₅₀ 値と殺細胞の IC₅₀ 値との比 (殺細胞 IC₅₀ 値 / ノックダウン IC₅₀ 値) を算出することで、PLK1 発現抑制に対する殺細胞効果の感受性を比較した (Table 3-1)。YSK05-MEND に封入した siPLK1 を細胞に添加し、72 hr 後の細胞に含まれるタンパク質量を指標に調べた。その結果、IC₅₀ 値はがん細胞株ごとに 1~7 nM の様々な値を示した (Fig. 3-5)。HCT116 細胞の感受性は 0.8 を示し (Table 3-1)、用いたがん細胞株の中で最も殺細胞効果を得やすい細胞株であることが明らかとなった。また、Huh7 細胞、HeLa-dluc 細胞および MDA-MB-231 細胞の感受性はそれぞれ 0.2、0.29、0.2 を示した (Table 3-1)。また、OS-RC-2 細胞の感受性は最も低い 0.05 を示し (Table 3-1)、殺細胞効果を最も得にくい細胞株であることが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、OS-RC-2 細胞は YSK05-MEND を効率的に取り込み、高い PLK1 のノックダウン活性を示すものの、最も低い殺細胞効果の感受性を示した。2 種のヒト肝細胞がん由来 Huh7 細胞および HepG2 細胞は ApoE-LDLR 経路を介した YSK05-MEND の効率的な取り込みが示唆され、比較的高いノックダウン活性を示した。また、Huh7 細胞において殺細胞効果も認められた。HCT116 細胞は、中程度の PLK1 のノックダウン効率を示し、最も高い殺細胞効果の感受性を示した。HeLa-dluc 細胞および MDA-MB-231 細胞は低い PLK1 のノックダウン活性を示し、高い殺細胞効果の IC₅₀ 値を示した。

3-2-2 各種がん細胞皮下移植モデルにおけるノックダウン活性と抗腫瘍実験

続いて、YSK05-MEND を、*in vivo* 皮下移植がん組織に応用するため、血中滞留化の検討を行った。これまで用いてきた YSK05-MEND は、粒子径制御のために、基本構成脂質に対して 3 mol% の PEG-DMG (Fig. 3-6a) を添加してあるが、第 1 章でも述べた通り、構成脂肪酸 (ミリスチン酸) が短く疎水的相互作用が低いために、希釈によって MEND 脂質膜から速やかに脱離し、MEND の血中滞留化能をほとんど持たない。そこで、より長い脂肪酸であるステアリン酸を有し、MEND 脂質膜からの脱離速度が遅い PEG-DSG (Fig. 3-6a) を用いることで、YSK05-MEND の血中滞留化を行うこととした。そこで、YSK05-MEND の粒子径を一定にするために PEG 脂質の総添加量を 3 mol% に固定し、PEG-DMG の一部あるいは全部を PEG-DSG に置き換えることで 4 種の YSK05-MEND を調製した。

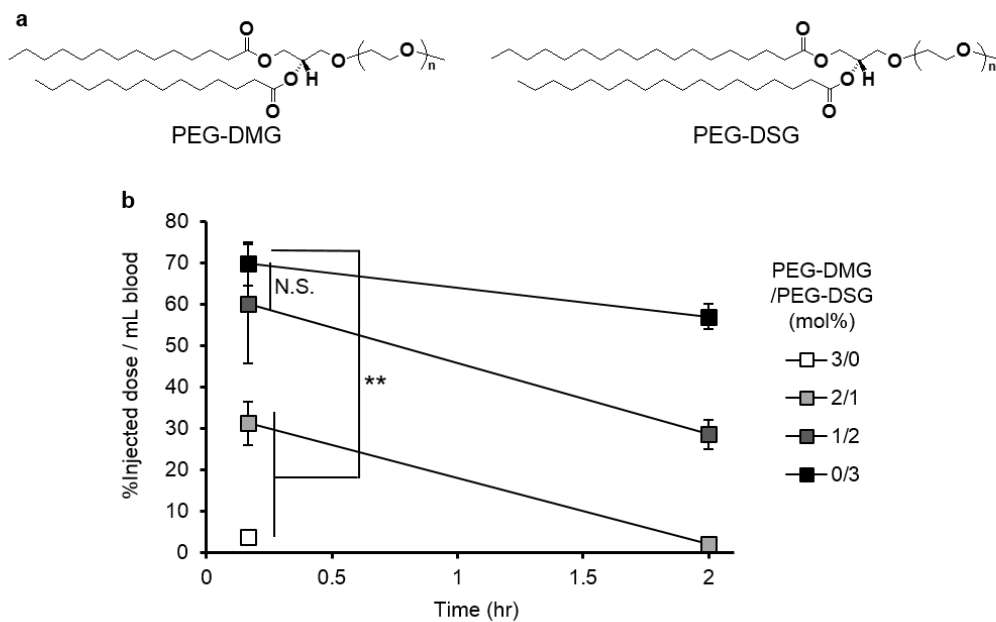


Fig. 3-6 PEG脂質の構造と各PEG脂質修飾YSK05-MENDの静脈内投与後の血中濃度。(a) PEG-DMGとPEG-DSGの構造式を示す。(b) PEG-DMGとPEG-DSGが各モル比で修飾された ^3H 標識YSK05-MEND (1.5 mg/kgのsiRNA量を含む)でICRマウスに静脈内投与し、10 minおよび2 hr後に採血し、血中放射線量を測定した。データは平均 \pm SDとして表した。(**: $p > 0.01$, nrANOVA followed by SNK test, $n = 3$) DSG: 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol. N.S.: not significance.

4種のYSK05-MENDは同等の平均粒子径(75~85 nm)およびsiRNA封入率(>90%)を示すことを、それぞれ動的光散乱法およびRibogreen assayにより確認した。4種の各 ^3H 標識YSK05-MEND(1.5 mg/kgのsiRNA量を含む)をICRマウスに静脈内投与し、10 minおよび2 hr後に採血し、血液に含まれる放射線量を測定することで各YSK05-MENDの血中濃度を測定した。その結果、PEG-DMGのみの添加で調製したYSK05-MENDは投与から10 min後には血中からほぼ消失していた(Fig. 3-6b)。また、PEG-DSG添加量依存的血中濃度の増大が認められた(Fig. 3-6b)。また、PEG-DSG添加量2 mol%および3 mol%で調製したYSK05-MEND間で、投与から10 min後の血中濃度に有意な差はなかった(Fig. 3-6b)。また、PEG-DSG添加量3 mol%で調製したYSK05-MENDの血中濃度は10 min後から2 hr後にかけて僅か20%の減少に留まった(Fig. 3-6b)。これより、PEG-DSG添加量2 mol%と3 mol%との間に血中濃度上昇の飽和が起きていると判断でき、より高いPEG-DSG添加量の検討は必要ないと判断した。

続いて、様々ながん細胞株をマウス背部皮下に移植することで作成した皮下移植がん組織における、血中滞留化YSK05-MENDによるPLK1のノックダウン活性を調べた。その際、まず、血中濃度が比較的高かった、2 mol%あるいは3 mol%のPEG-DSGで調製した2種のYSK05-MENDの静脈内投与によるPLK1のノックダウン活性を、OS-RC-2細胞皮下移植モデルを用いて比較した。その結果、両YSK05-MENDも投与量依存的なノックダウンを示したが、0.75 mg/kgにおいて、PEG-DSG添加量3 mol%で調製したYSK05-MENDの方が有意に高いノックダウン効率を示した(Fig. 3-7a)。この結果より、*in vivo*皮下移植がんモデルにおけるノックダウンに最適なPEG添加は、PEG-DSG 3 mol%であると判

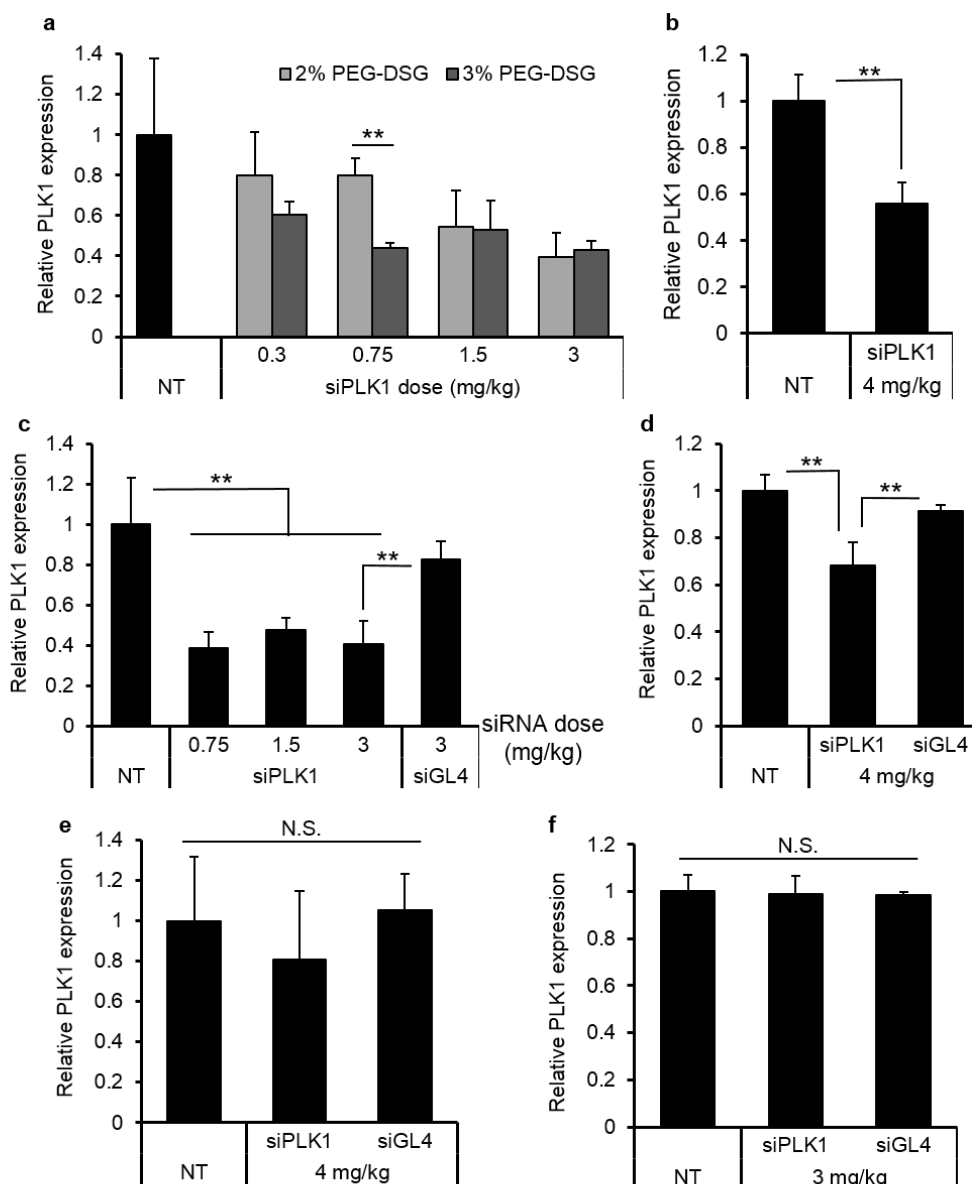


Fig. 3-7 YSK05-MENDの各皮下移植がん組織におけるノックダウン活性。PEG-DSG修飾YSK05-MENDに封入した各 siRNAを、OS-RC-2細胞 (a) (**: $p < 0.01$, Student's t-test, $n = 3$)、HepG2細胞 (b) (**: $p < 0.01$, Student's t-test, $n = 3 \sim 5$)、Huh7細胞 (c) (**: $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test, $n = 3 \sim 4$)、HCT116細胞 (d) (**: $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test, $n = 3 \sim 4$)、A549細胞 (e) (nrANOVAによって検定し、 $p > 0.05$ であったため、有意差なしと判断, $n = 6$)、MDA-MB-231細胞 (f) (nrANOVAによって検定し、 $p > 0.05$ であったため、有意差なしと判断, $n = 3$) を皮下移植することで作成したがんマウスに静脈内投与し、24 hr後にqRT-PCR法によってがん組織中のPLK1遺伝子の発現を測定した。データは平均 \pm SDとして表した。(n=3~6) N.S.: not significance.

断し、以降の実験では PEG-DSG 3 mol%添加 YSK05-MEND を用いた。続いて、他のがん細胞株を用いた皮下移植モデルにおける PLK1 のノックダウン活性を調べた (Fig. 3-7b~7f)。その結果、ヒト肝細胞がん由来 HepG2 細胞および Huh7 細胞の皮下移植モデルでは、それぞれ 44%および 60%程度の有意なノックダウン効果が認められた (Fig. 3-7b,7c)。特に、Huh7 細胞皮下移植モデルにおいては、最も低い投与量である 0.75 mg/kg においても 61%の有意なノックダウンが観察され (Fig. 3-7c)、OS-RC-2 細胞皮下移植モデルと同様に低い投与量でノックダウンを誘起可能なモデルであることが明らかとなった。また、OS-

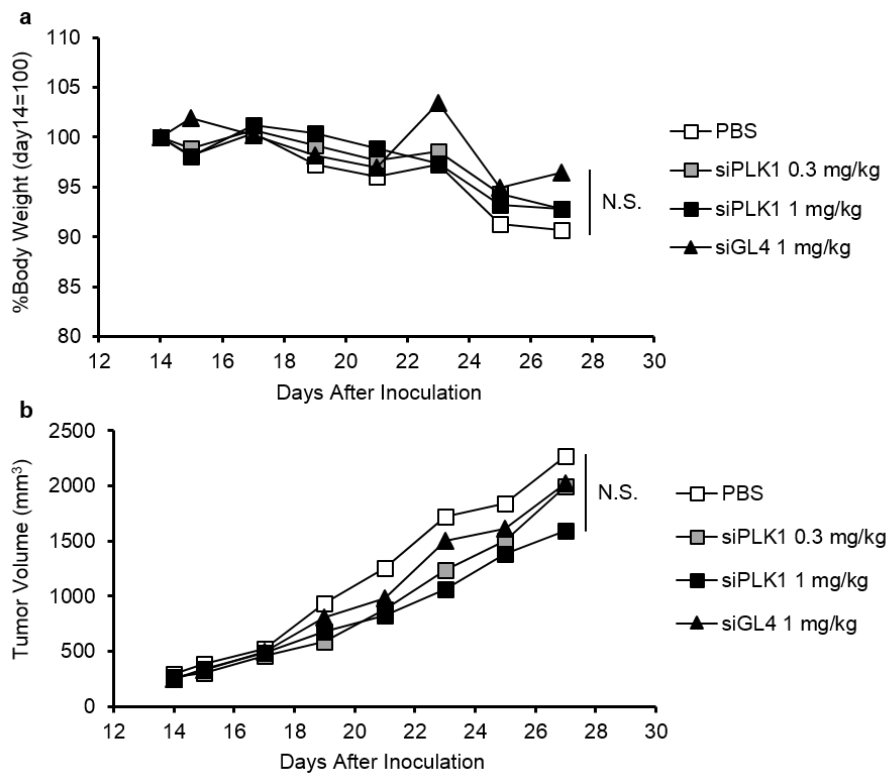


Fig. 3-8 YSK05-MENDのHuh7細胞皮下移植モデルマウスにおける抗腫瘍効果。PEG-DSG修飾YSK05-MENDに封入した各siRNAを、Huh7細胞を皮下移植することで作成したがんマウスに、がん細胞移植後15日から25日の間に1日おきに計6回静脈内投与し、体重 (a) およびがん組織体積 (b) を経時的に測定した。データは平均として表した。nrANOVAによって検定し、 $p>0.05$ であったときに有意差なしと判断した。(n=3~5) N.S.: not significance.

RC-2細胞およびHuh7細胞の両皮下移植モデルにおいて、ノックダウン効率が60%付近で飽和する現象が観察された (Fig. 3-7a,7c)。また、HCT116細胞皮下移植モデルにおいても有意なノックダウンが認められたものの、32%の低い効率であった (Fig. 3-7d)。さらに、A549細胞およびMDA-MB-231細胞皮下移植モデルでは、それぞれ4 mg/kgおよび3 mg/kgという比較的多いsiRNA量を静脈内投与したものの、有意な遺伝子ノックダウンは観察されなかった (Fig. 3-7e,7f)。

続いて、PLK1のノックダウンによる抗腫瘍効果について検討した。OS-RC-2細胞皮下移植モデルにおいて高いノックダウン効率が得られているが、OS-RC-2細胞は*in vitro*の検討においてPLK1のノックダウンによる殺細胞効果の感受性が低い (Table 3-1) こと、また、PLK1発現が90%以上抑制される条件でsiPLK1をトランスフェクションしたOS-RC-2細胞を皮下移植した場合にも腫瘍の成長抑制がかからなかった (データ未掲載) ことから、*in vivo*においてPLK1のノックダウンによる抗腫瘍効果を得ることは困難であると予想されたため、検討から省いた。そこで、用いるモデルは、60%程度の比較的高いノックダウン効率が得られたHuh7細胞皮下移植モデルとした。Huh7細胞をヌードマウスに皮下移植し、15日目から1日おきに計6回に亘ってsiPLK1あるいはsiGL4封入YSK05-MENDを静脈内投与し、マウス体重および腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、体重は全ての群において減少傾向 (3.5~9.3%) にあるものの、PBS投与群とYSK05-MEND投

与群の間に有意な差は認められなかったことから、本投与スケジュールで YSK05-MEND の静脈内投与による顕著な毒性はないことが示唆された (Fig. 3-8a)。また、腫瘍体積は、PBS 投与群、siGL4 投与群と比較して siPLK1 投与群で低い傾向はあるものの、有意な増殖抑制効果は観察されなかった (Fig. 3-8b)。In vitro において Huh7 細胞の PLK1 のノックダウンによる顕著な殺細胞効果は確認されている (Fig. 3-5b, Table 3-1) ことから、in vivo がん組織におけるノックダウン効率が 60%程度に留まる (Fig. 3-7c) ことが、顕著な抗腫瘍効果が得られない原因である可能性が示唆された。

3-2-3 各種皮下移植がん組織のキャラクタリゼーションと MEND のがん組織浸透性評価

様々ながん皮下移植モデルにおける YSK05-MEND による PLK1 のノックダウン効率を調べた結果、0.75 mg/kg で 60%程度のノックダウンを達成可能なモデルから、4 mg/kg の高い投与量でもノックダウンが観察されないモデルまで様々に存在することが明らかとなった (Fig. 3-7)。In vitro においてノックダウンの IC₅₀ 値が比較的低い OS-RC-2 細胞 (0.05 nM)、Huh7 細胞 (0.2 nM)、HepG2 細胞 (0.2 nM) に関して、皮下移植モデルにおいて 40%~60%の有意なノックダウンが得られた (Fig. 3-7a~7c)。また、in vitro において比較的ノックダウンの IC₅₀ 値が高い HCT116 細胞 (0.8 nM) に関しては皮下移植モデルにおいて 30%程度のノックダウンが認められ (Fig. 3-7d)、ノックダウンの IC₅₀ 値がさらに高い MDA-MB-231 細胞 (1 nM) に関しては、皮下移植モデルにおいてノックダウンが認められなかった (Fig. 3-7f)。このことから、in vitro におけるノックダウンのし易さが、in vivo 皮下移植モデルにおけるノックダウンのし易さと相関している可能性が示唆された。また、高いノックダウン効率が得られた OS-RC-2 細胞および Huh7 細胞皮下移植モデルにおいて、ノックダウン効率が 60%程度で飽和する現象が観察された (Fig. 3-7a,7c)。この結果は、静脈内投与された YSK05-MEND が、標的とするがん細胞全体に移行していないことを示唆すると考えられる。すなわち、YSK05-MEND を高い投与量で静脈内投与した際に、60%程度のがん細胞には YSK05-MEND が多く移行し PLK1 発現を高い効率 (>90%) で抑制しているが、残り 40%程度のがん細胞には YSK05-MEND がほとんどあるいは全く移行していないために、PLK1 発現をほとんど抑制できず、がん組織全体の PLK1 発現は 60%の抑制に留まっている、と考えた場合に、ノックダウン効率の飽和現象を説明可能である。従って、in vivo におけるノックダウンのし易さは、in vitro におけるノックダウンのし易さだけでは説明されず、in vivo がん組織特有の構造・微小環境も関わっていることが考えられる。がん組織はがん細胞だけではなく、血管内皮細胞、ペリサイト、繊維芽細胞、マクロファージ、その他白血球など、多彩な細胞種で構成されており、それらが互いに協調することでがん組織特有の構造を作り、また、がん細胞が増殖・浸潤・転移しやすい微小環境を整えている[100,101]。ペリサイトは血管内皮細胞を外側から被覆する形で存在し、血管構造の安定化に寄与するが、がん組織ではペリサイトによる血管内皮細胞の被覆ががん組織の盛んな血管新生に追い付かず、腫瘍新生血管ではペリサイトの脱落が生じ、血管の物質

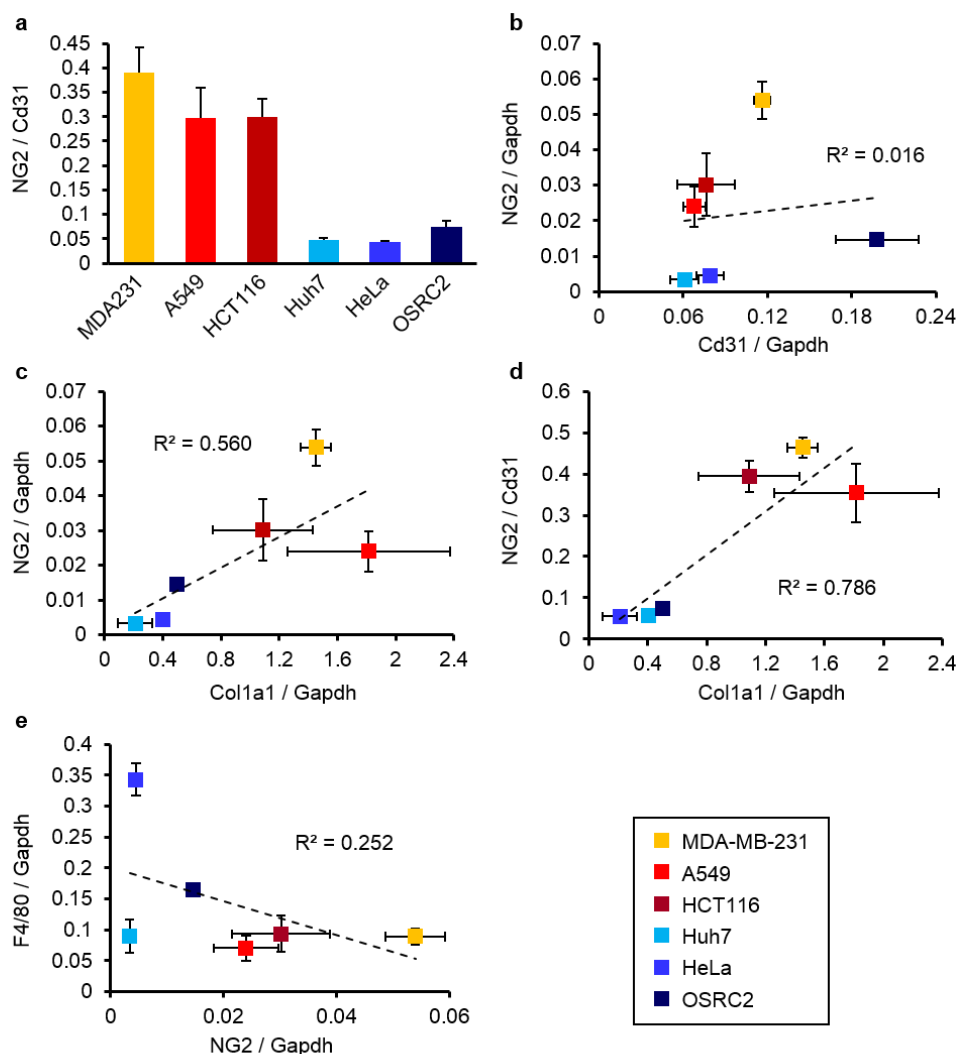


Fig. 3-9 各皮下移植がん組織における遺伝子発現量。OS-RC-2細胞、HeLa-dluc細胞、Huh7細胞、HCT116細胞、A549細胞、MDA-MB-231細胞を皮下移植して作製したがん組織中の遺伝子発現を、qRT-PCR法により測定した。(a) NG2発現量をCd31発現量で除した値として表した。(b) NG2発現量とCd31発現量の関係を表した。(c) NG2発現量とCol1a1発現量の関係を表した。(d) NG2発現量をCd31発現量で除した値とCol1a1発現量との関係を表した。(e) F4/80発現量とNG2発現量の関係を表した。データは平均±SDとして表した。(n=3-4)

透過性が亢進している[102,103,104,105]。血管内皮細胞のペリサイトによる被覆率は、血管透過性の指標となると考えられる。また、繊維芽細胞はがん組織中のコラーゲンやヒアルロン酸等の細胞外マトリックスを構成する高分子ポリマーを合成する。このようなコラーゲンやヒアルロン酸の存在が、ナノ粒子のがん組織における浸透性を物理的に妨害することが知られている[106,107,108]。そこで、ナノ粒子のがん組織内浸透性に深く関わると考えられる、血管内皮細胞、ペリサイト、そして、繊維芽細胞に特に着目した。血管内皮細胞マーカーである Cd31、ペリサイトマーカーである NG2、繊維芽細胞マーカーである Col1a1 (がん間質に多く存在するコラーゲン α 1 (I) 鎖をコードする遺伝子)、また、マクロファージマーカーである F4/80 遺伝子の発現を qRT-PCR 法により測定し、様々ながん組織間で比較した。まず、血管構造の成熟度に着目し、単位 Cd31 発現あたりの NG2 発現量 (NG2/Cd31 値) を算出し、がん組織間で比較した。その結果、*in vivo*においてノックダウ

ンが観察されなかった MDA-MB-231 細胞および A549 細胞、30%程度のノックダウン効率が留まった HCT116 細胞皮下移植がん組織では、高い NG2/Cd31 値を示した (Fig. 3-9a)。一方、60%程度ノックダウン効率が観察された OS-RC-2 細胞および Huh7 細胞皮下移植がん組織は低い NG2/Cd31 値を示した (Fig. 3-9a)。このことから、NG2/Cd31 値が、YSK05-MEND の *in vivo* がん組織におけるノックダウン効率に関連している可能性が示唆された。また、各がん組織の Cd31 発現量と NG2 発現量との間に相関性は認められなかった (Fig. 3-9b)。続いて、NG2 発現量と Col1a1 発現量との相関性を調べたところ、 R^2 値で 0.560 を示し、一定の相関性を示した (Fig. 3-9c)。また、NG2/Cd31 値と Col1a1 発現量との相関性を調べたところ、 R^2 値で 0.786 を示し、より高い相関性が認められた (Fig. 3-9d)。これらの結果より、がん組織中の繊維芽細胞量、あるいはコラーゲン合成活性は、血管内皮細胞辺りのペリサイト量、すなわち、腫瘍血管の成熟度と関連した事象であることが

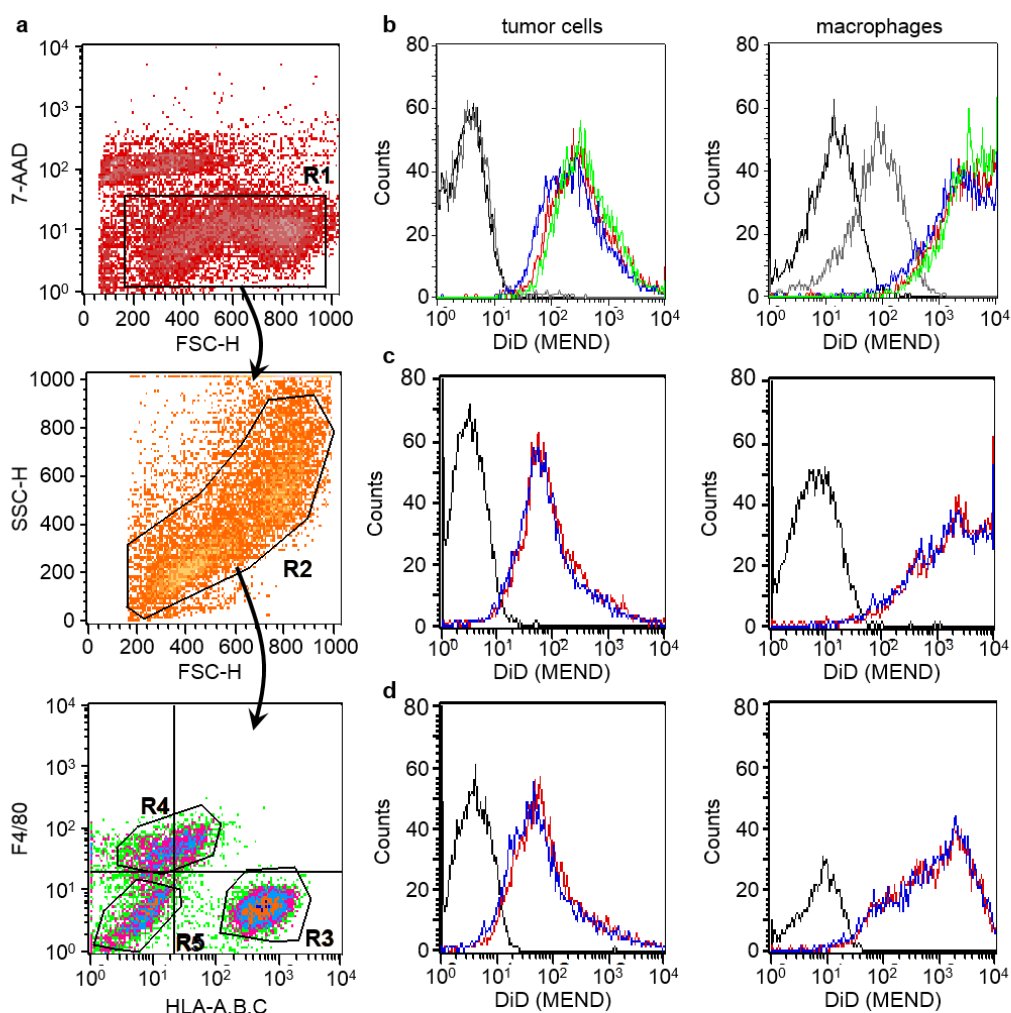


Fig. 3-10 YSK05-MENDのがん細胞への取り込み評価。DiD標識YSK05-MEND (2 mg/kgのsiRNA量を含む) を坦がんマウスに静脈内投与し、24 hr後におけるYSK05-MENDのがん細胞への取り込みをフローサイトメーターを用いて解析した。(a) 解析手順を表した。まず7-AAD陰性の生細胞 (R1) についてFSC-SSCのドットプロットに展開し、さらにR2内に存在する細胞集団について、HLA-A,B,C-F4/80のドットプロットに展開した。R3のHLA-A,B,C陽性細胞およびR4のF4/80陽性細胞をそれぞれがん細胞およびマクロファージとし、この集団におけるDiDの蛍光強度をヒストグラムで表した。(b-d) 実際にDiDの蛍光強度を測定した結果。それぞれ、OS-RC-2細胞 (b)、Huh7細胞 (c)、A549細胞 (d) の皮下移植モデルにおける結果であり、左側ががん細胞、右側にマクロファージの結果を示した。未投与マウスは黒、灰色で、MEND投与群は赤、青、緑色で表した。

示唆された。また、NG2/Cd31 値と F4/80 発現量との間に相関性は認められなかった (Fig. 3-9e)。以上より、高 NG2/Cd31 値を示したがん組織においては、YSK05-MEND の血管透過性とがん組織内の浸透性の両方の過程が悪く、標的がん細胞に効率よく取り込まれないため、ロックダウン効率が得られない、あるいは低いロックダウン効率に留まった一方で、低 NG2/Cd31 値を示したがん組織においては、血管漏出性やがん組織内浸透性の効率は比較的良く、60%程度のロックダウン効率を達成したものと考えられた。しかしながら、低 NG2/Cd31 値を示したがん組織においても、ロックダウン効率が最大 60%程度で飽和したことから、このような特性を持つがん組織においても、YSK05-MEND のがん組織内分布に大きな問題が存在することが明らかとなった。

続いて、YSK05-MEND のがん組織中の標的がん細胞への取り込みを評価した。DiD 標識 YSK05-MEND を 2 mg/kg で皮下がんマウスに静脈内投与し、24 hr 後のがん組織を回収し、分解酵素処理によって細胞分散液を調製し、フローサイトメーターを用いて解析した。標的がん細胞とマクロファージの検出のため、PE 標識抗ヒト HLA-A,B,C 抗体と FITC 標識抗マウス F4/80 抗体処理を行い、また、死細胞の検出のため、7-aminoactinomycin (7-AAD) 処理を行った。解析は Fig. 3-10a に示した手順で行った。まず、7-AAD 陰性の生細胞 (R1) のみに関して forward scatter (FSC) - side scatter (SSC) ドットプロットに展開し、さらに R2 内に存在する細胞を、HLA-A,B,C-F4/80 ドットプロットに展開した。R3 内の HLA-A,B,C 陽性細胞を標的がん細胞、R4 内の F4/80 陽性細胞をマクロファージとして、各細胞に取り込まれた DiD の蛍光強度分布をヒストグラムで表した (Fig. 3-10b~10d)。その結果、OS-RC-2 細胞への取り込み量 (Fig. 3-10b 左) は、HCT116 細胞および A549 細胞への取り込み量 (Fig. 3-10c 左, 10d 左) と比較して高かった。また、蛍光強度が 100 倍以上の範囲で広く分布 (Fig. 3-10b 左) しており、がん細胞への取り込み量がヘテロであることが明らかとなった。また、HCT116 細胞および A549 細胞への取り込みに関しては、低い蛍光強度の範囲 (10^2) に大部分の細胞が分布 (Fig. 3-10c 左, 10d 左) しており、高い取り込み量を示した細胞はごく一部であった。また、マクロファージへの取り込み量は全てのがんモデルにおいて 11~21 倍高かった (Fig. 3-10b~10d)。また、マクロファージはこれらのがん組織を構成する細胞の 22~34%を占め、がん細胞数と大きく変わらない (Fig. 3-11) ことから、がん組織に到達した YSK05-MEND の多くはマクロファージに取り込まれ、標的がん細胞にはごく一部しか取り込まれていないことが示唆された。

さらに、同じ皮下移植がんモデルを用いて、YSK05-MEND のがん組織内分布を調べた。

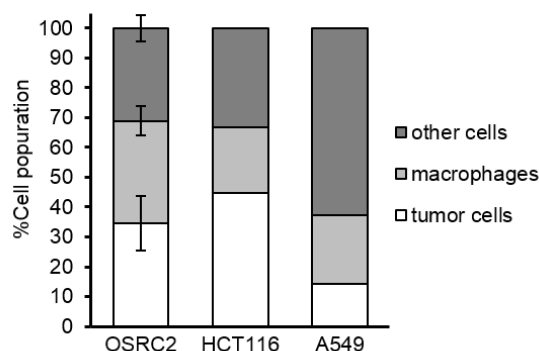


Fig. 3-11 各皮下移植がん組織中に存在する細胞の割合。Fig. 3-10aのR3、R4、R5内の細胞をそれぞれがん細胞、マクロファージ、その他の細胞種とした際の各細胞集団の存在割合を表した。データは平均±SDとして表した。(n=2~3)

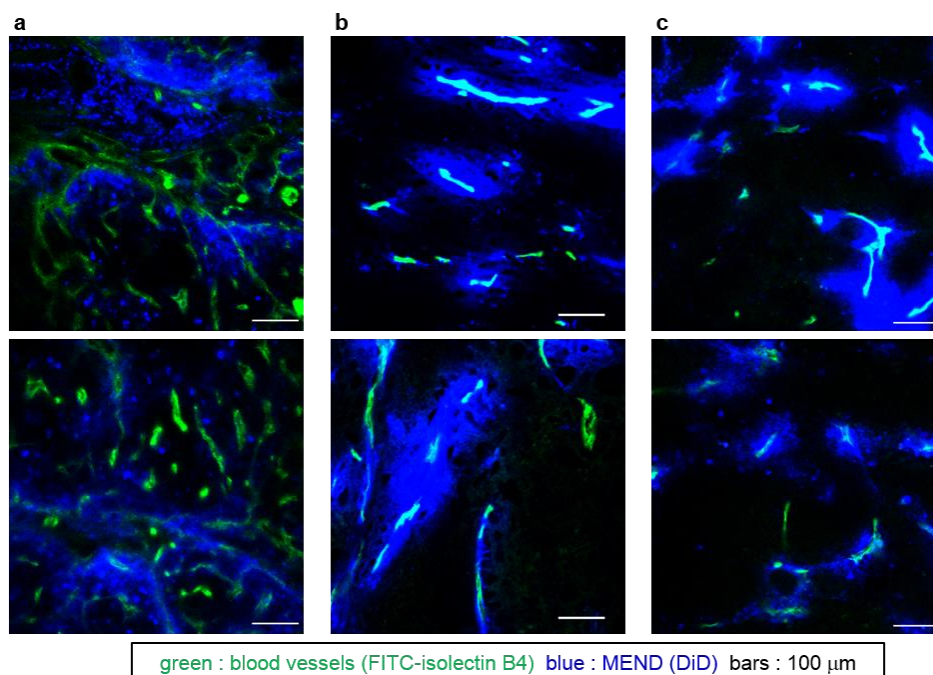


Fig. 3-12 YSK05-MENDのがん組織内分布評価。DiD標識YSK05-MEND (1 mg/kgのsiRNA量を含む) をOS-RC-2細胞 (a)、HCT116細胞 (b)、A549細胞 (c) を皮下移植することで作成した坦がんマウスに静脈内投与し、24 hr後におけるYSK05-MENDのがん組織内分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

DiD 標識 YSK05-MEND を 1 mg/kg の siRNA 量で、各坦がんマウスに静脈内投与し、24 hr 後のがん組織を回収し、固定・包埋後、組織切片を作製して共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。また、がん組織を回収する 10 min 前に、FITC 標識 isolectin B4 を静脈内投与することで血流の存在する腫瘍血管を染色した。観察の結果、OS-RC-2 細胞皮下移植がん組織は他のがん組織と比べて血管が豊富であり、また、太くて分岐の多い未熟な血管の特徴を有していた (Fig. 3-12a)。また、YSK05-MEND は他のがん組織と比較して広い範囲に移行している様子が観察されたものの、ほとんど移行できていない領域も存在し、その分布はヘテロであった (Fig. 3-12a)。一方、HCT116 細胞および A549 細胞皮下移植がん組織は血管量が比較的少なく、細くて分岐の少ない成熟血管の特徴を有する血管が多かった (Fig. 3-12b,12c)。また、YSK05-MEND の分布は血管周辺に限局し、血管から離れた部位にはほとんど移行していない様子が観察され、さらに、YSK05-MEND が全く漏出していない血管も一部存在した (Fig. 3-12b,12c)。

3-2-4 YSK05-MEND のがん組織浸透性の粒子径依存性評価

これまでの結果より、YSK05-MEND のがん組織内浸透性の悪さが、ノックダウン効率の大きな制約となっていることが示唆された。近年、がん組織内にはナノ粒子の浸透を阻害する間質バリアが存在することが知られている。間質バリアは、主に活性化した繊維芽細胞によって生成されたコラーゲンやヒアルロン酸等の高分子ポリマーで構成されている。これらはがん組織内に網目状に存在しており、ナノ粒子の浸透を物理的に阻害する要因となっている。ミセルや金コロイド等のナノ粒子の粒子径を小さくした場合に、それらのがん組織

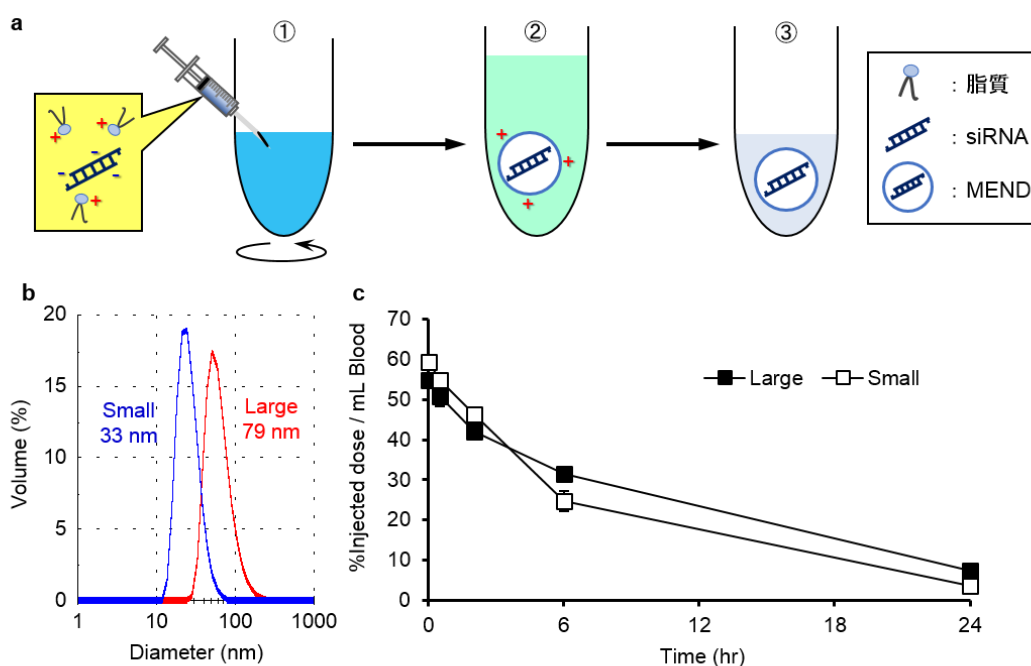


Fig. 3-13 *t*-BuOH希釈法によるMENDの調製手順およびMENDの粒子径分布と血中滞留性の比較。(a) ボルテックスミキサーで撹拌されたクエン酸緩衝液中に、脂質とsiRNAの混合溶液をシリンジおよび注射針を用いて注入する(①)と、正に帯電したMENDが形成される(②)。限外濾過によりアルコールの除去や緩衝液の置換、濃縮を行うことで精製されたMEND溶液(③)が得られる。(b) 各YSK05-MENDの粒子径分布を動的光散乱法により測定した。(c) ³H標識した各MEND (2 mg/kgのsiRNA量を含む)をICRマウスに静脈内投与した後、経時的に採血し、血液中の放射線量を測定した。データは平均±SDとして表した。(n=3)

内浸透性が改善されるという報告があり[105,109,110,111]、リポソーム型ナノ粒子においても同様のことが言えると予想される。そこで、粒子径の小さな YSK05-MEND の調製を試みた。YSK05-MEND は、筆者が以前に構築した *t*-BuOH 希釈法により調製した。本調製法では、siRNA と脂質が溶解した 60% *t*-BuOH を、ボルテックスミキサーで激しく撹拌したクエン酸緩衝液 (pH4.0) に、シリンジと注射針を用いて注入し、*t*-BuOH 濃度を素早く下げることで粒子形成を行う (Fig. 3-13a)。アルコールを用いたリポソーム調製法は古くに報告されており[112]、脂質が溶解したアルコール溶液のアルコール濃度の減少速度が大きいほど、調製されるリポソームの粒子径は最小値に近づくことが知られている[113,114]。今回用いている *t*-BuOH 希釈法は、ボルテックスミキサーとシリンジを用いた手動の方法であるため、抜本的な調製法の変更を行わない限り、アルコールの希釈速度の大幅な上昇は望めない。そこでまず、YSK05-MEND の粒子径を小さくすることでがん組織内浸透性が改善されるかどうかの proof of concept を得ることを優先することとし、脂質組成の変更による MEND の小型化を試みた。種々の組成の検討の結果、YSK05 含量の低下お

⁴ 酸性緩衝液に溶解した siRNA とアルコールに溶解したカチオン性脂質を含む脂質混合物を混合すると静電的結合及び疎水的結合により、siRNA と脂質の溶解性が減少して過飽和状態になる。siRNA と脂質は静電的結合及び疎水的結合により核を形成 (nucleation) し、核の成長 (growth) が起き、最終的には凝集・析出する。Nucleation と growth の過程は同時に起こる現象であるが、growth 過程の速度は比較的遅いため、2 種の溶液が衝突してから完全混合するまでのタイムスケールを growth のタイムスケールよりも大幅に短くすることで growth を防ぐことが可能である。疎水的結合によって分子が集合することで形成されるナノ粒子は、溶媒の極性が低いとその構造は不安定となるため、そのような状況下では growth が起こる。従って、粒子調製時のアルコール濃度の減少速度を上げることで growth 過程が最小限に抑えられ、小さなナノ粒子を得ることができる。

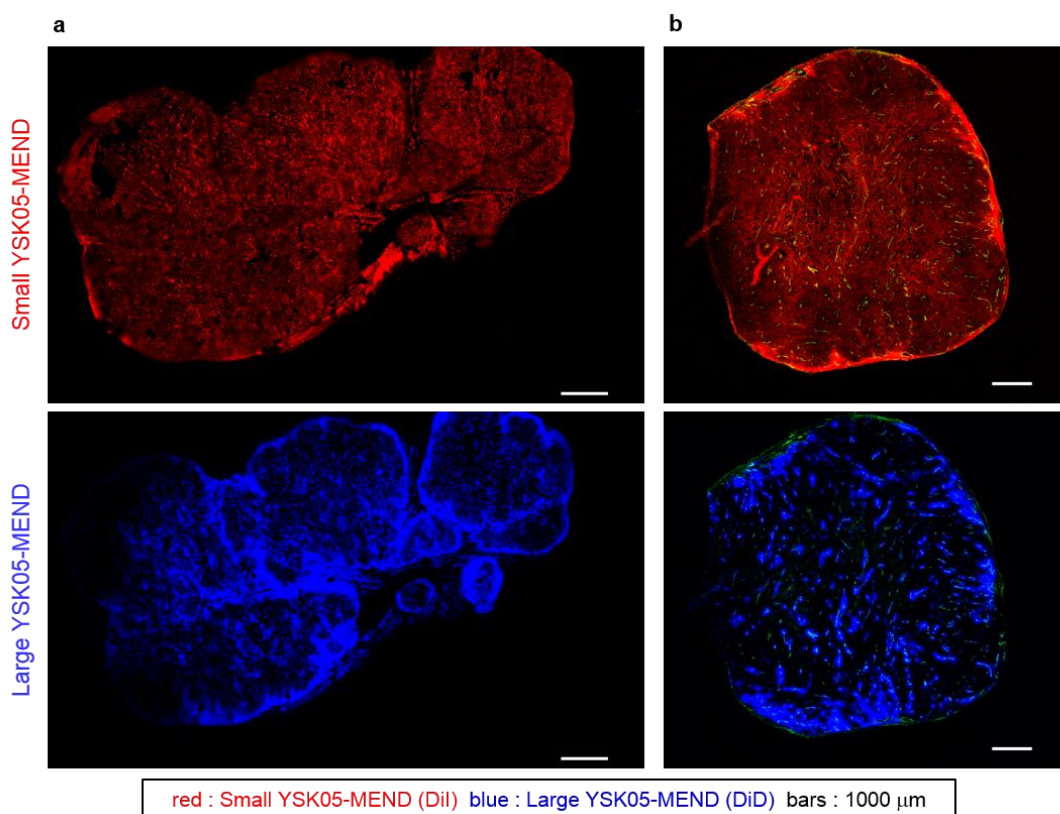


Fig. 3-14 LargeおよびSmall YSK05-MENDのがん組織内分布。DiD標識Large YSK05-MENDとDiI標識Small YSK05-MEND (それぞれ1 mg/kgのsiRNA量を含む) を、OS-RC-2細胞 (a) およびHCT116細胞 (b) を皮下移植することで作成した坦がんマウスに同時に静脈内投与し、24 hr後におけるMENDのがん組織内分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察しラージイメージを取得した。

よび 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) の添加により、小さな粒径を達成可能であることを見出し、YSK05/DPPC/Chol/PEG-DSG (40/20/40/10, mol%) の脂質組成比において粒径の小さな YSK05-MEND を得た。ここでは、この小さな MEND を Small YSK05-MEND とし、ここまで用いてきた MEND を Large YSK05-MEND とする。まず、両 MEND の粒子径を、動的光散乱法により測定した。その結果、Large および Small YSK05-MEND の平均粒子径は、それぞれ 79 nm および 33 nm であり、粒子径分布の重なりは少ないことが確認された (Fig. 3-13b)。次に、両 YSK05-MEND の血中滞留性を評価した。³H 標識された各 YSK05-MEND (2 mg/kg の siRNA 量を含む) をマウスに静脈内投与し、投与 1 min 後から 24 hr 後までの血中濃度を経時的に測定した。その結果、両 YSK05-MEND の血中滞留性に大きな差はなく、Small YSK05-MEND の EPR 効果によるがん組織への蓄積性に問題はないことが確認された (Fig. 3-13c)。

続いて、がん組織内分布の粒子径依存性を調べた。DiD 標識 Large YSK05-MEND および DiI 標識 Small YSK05-MEND をそれぞれ 1 mg/kg の siRNA 量で坦がんマウスに同時に静脈内投与し、24 hr 後における各 YSK05-MEND のがん組織内分布を、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。がん組織全体における様子を観察するため、ラージイメージを取得した。その結果、OS-RC-2 細胞皮下移植がん組織において、青色の疑似カラーで

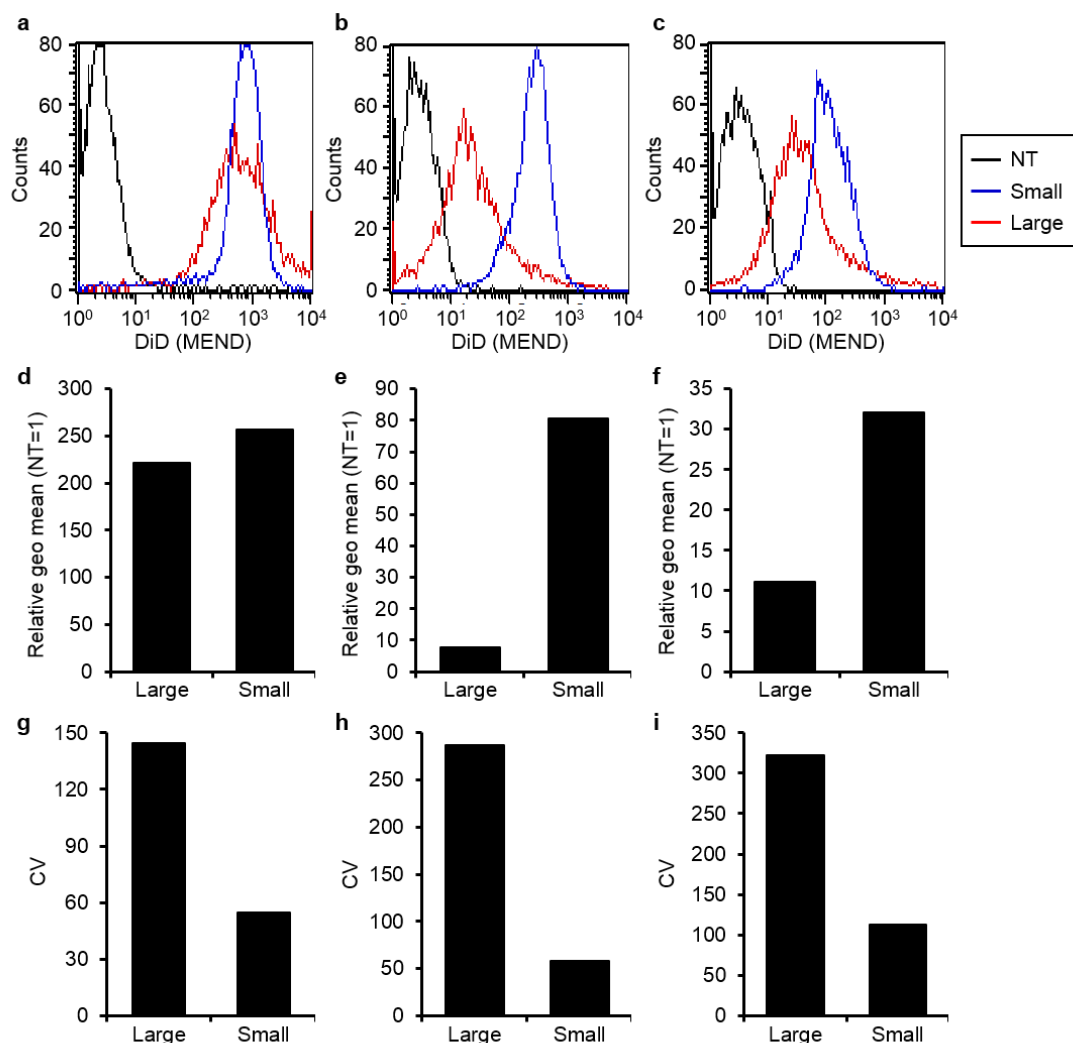


Fig. 3-15 LargeおよびSmall YSK05-MENDのがん細胞への取り込み。DiD標識LargeおよびSmall YSK05-MEND (それぞれ1 mg/kgのsiRNA量を含む)を、OS-RC-2細胞 (a,d,g)、HCT116細胞 (b,e,h)、A549細胞 (c,f,i)を皮下移植することで作成した担がんマウスに静脈内投与し、24 hr後のMENDのがん細胞への取り込みをフローサイトメーターを用いて解析した。(a-c)がん細胞に取り込まれたDiD蛍光強度についてヒストグラムで表した。(d-f)未処理を1とした時の相対geo mean値を棒グラフで表した。(g-i)ヒストグラムのCV値を棒グラフで表した。CV: coefficient of variation.

表示した Large YSK05-MEND は組織辺縁部に高い集積性を示し、内部への移行量は比較的少なく、ヘテロな分布が観察された (Fig. 3-14a 下)。一方、赤色の疑似カラーで表示した Small YSK05-MEND は組織全体に均一的に分布している様子が観察された (Fig. 3-14a 上)。また、HCT116 細胞皮下移植がん組織においては、Large YSK05-MEND は斑点状の分布を示し、浸透できていない領域が多く存在することが確認された (Fig. 3-14b 下)。一方、Small YSK05-MEND はこのがんモデルにおいても均一的な分布を示した (Fig. 3-14b 上)。以上より、YSK05-MEND のがん組織内浸透性は、その粒子径に大きく影響されることが示され、また、粒子を小型化することでがん組織内分布を大幅に改善することが可能であることが示された。

さらに、YSK05-MEND の小型化によるがん組織内分布の均一化が、標的がん細胞への取り込みの改善に寄与するかについて調べた。DiD で標識された Large あるいは Small

/YSK05-MEND を、各坦がんマウスに 1 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、24 hr 後にがん組織を回収し、標的がん細胞への各 YSK05-MEND の取り込みを、フローサイトメーターを用いて解析した。その結果、OS-RC-2 細胞皮下移植モデルにおいては、粒子の小型化による取り込み量の上昇はほとんど見られなかった (Fig. 3-15d) もの、取り込み量分布がシャープになった (Fig. 3-15a)。標準偏差を平均値で除することで算出され、相対的なばらつきを表す Coefficient of variation (CV) 値を用いて、取り込みのばらつきの度合いを定量化したところ、粒子の小型化によって CV 値の低下が確認された (Fig. 3-15g)。すなわち、本モデルにおいては、小型化によって標的がん細胞への取り込み量自体は変化しないものの、各がん細胞に均一的に取り込まれるようになったことが明らかとなった。また、HCT116 細胞および A549 細胞皮下移植モデルにおいては、粒子の小型化によって取り込み量がそれぞれ 10.5 倍 (Fig. 3-15e) および 2.9 倍 (Fig. 3-15f) 上昇した。また、CV 値の減少も両モデルで認められた (Fig. 3-15h,15i)。以上より、YSK05-MEND を小型化することで、がん組織内浸透性が改善し、標的がん細胞への均一的な移行や移行量の上昇が達成されることが示された。

3-2-5 マイクロ流路を用いた小型 YSK05-MEND の調製と物性・活性評価

YSK05-MEND の粒子径を小さくすることでがん組織内浸透性 (Fig. 3-14) および標的がん細胞への移行性 (Fig. 3-15) が改善することが確認された。Small YSK05-MEND の組成は Large YSK05-MEND と異なり、粒子径を小さく制御するために YSK05 含量を大幅に下げている (70 mol%→40 mol%)。そのため、がん組織内浸透性の粒子径依存性を評価するために構築した Small YSK05-MEND のノックダウン活性が Large YSK05-MEND のノックダウン活性と比較して著しく低いことは、第 1 章における脂質組成の最適化の過程からも明らかである。そのため、高いノックダウン活性と小さな粒子径を両立するためには、少なくとも Large YSK05-MEND と同様に脂質組成で小さな粒子を調製することが必要である。前述したように、現状の調製方法は手動であり、粒子形成時のアルコール濃度の減少速度を大幅に上昇させることが困難であるために、調製方法を変更する必要がある。流路を用いることでアルコール希釈法の原理を利用して小さなリポソームを調製する試みがいくつか報告されており [115,116,117]、その中で Zhigaltsev らは、staggered herringbone

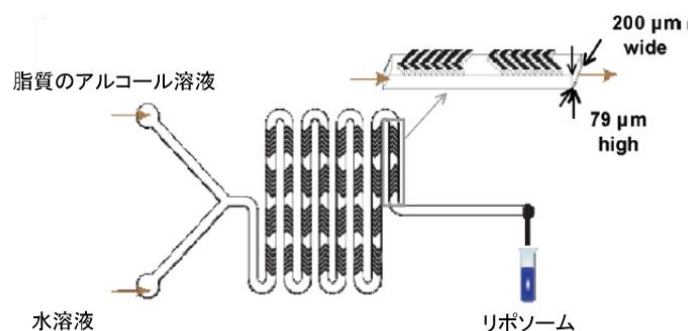


Fig. 3-16 staggered herringbone microfluidic mixing device (SHM) の構造。

microfluidic mixing device (SHM) を用いて理論的最少粒子径を有するリポソームを調製することに成功している[113]。SHM は流路内にヘリンボン模様の溝を有しており、注入された 2 種の溶液は流路内を通過する際に乱流を起こすことで、各溶液が接する表面積が指数関数的に増加するため、極めて速い混合が達成される (Fig. 3-16) [118]。そこで、この SHM を用いて YSK05-MEND の調製を試みることにした。SHM は北海道大大学院工学研究 院 生物計測化学研究室 渡慶次学教授よりご供与頂いたものを使用した。流路内に溶液を流す際の流速が大きい程、2 種の溶液の混合速度が上昇、すなわち、アルコール濃度の減少速度が大きくなるが、流速が大きいほど SHM にかかる圧が大きくなり、流路の破損をきたす。そこでまず、用いた SHM で達成可能な最大流速の検討を行ったところ、最大 1.5 mL/min の流速に耐えることが明らかとなったため、以降の実験は全て総流速 1.5 mL/min

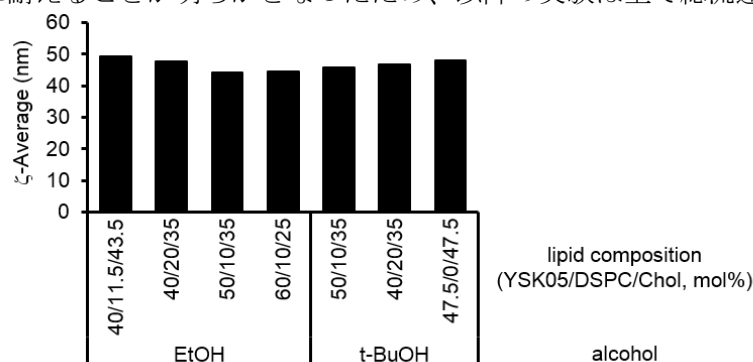


Fig. 3-17 マイクロ流路法により調製したYSK05-MENDの平均粒子径。脂質組成比および調製時に使用する有機溶媒を変えてYSK05-MENDをマイクロ流路法により調製し、動的光散乱法により平均粒子径を測定した。

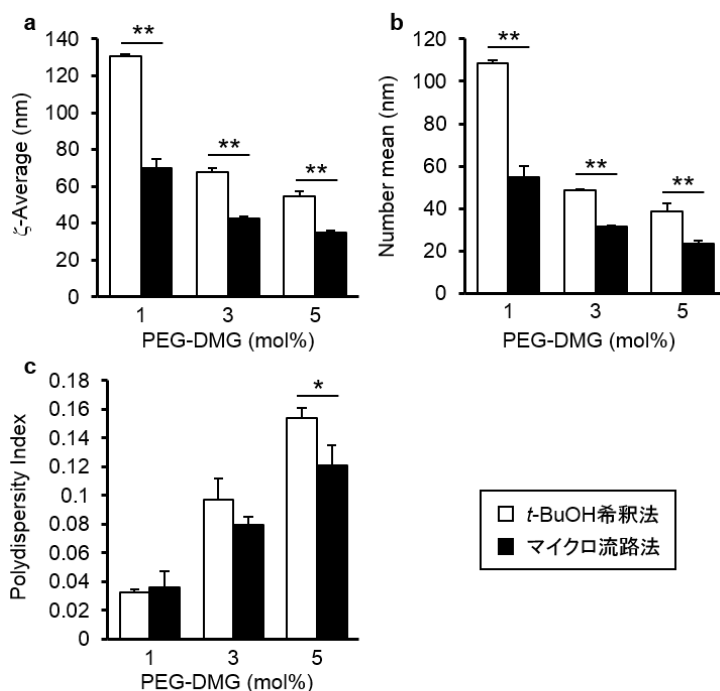


Fig. 3-18 t-BuOH希釈法およびマイクロ流路法により調製したYSK05-MENDの物性評価。各量のPEG-DMGを添加して調製したYSK05-MENDのz-average (a) number mean (b)、polydispersity Index (c) を、動的光散乱法により測定した。データは平均±SDとして表した。(*: p<0.05, **: p<0.01, Student's t-test, n=3)

とした。MEND を調製する際、脂質を溶解したアルコールと、siRNA を溶解した酸性緩衝液をそれぞれ流路内に注入するが、その際に用いるアルコールの検討を行った。検討するアルコールは 100% EtOH および 72% *t*-BuOH とし、流路内に注入する流速比は、脂質溶液:siRNA 溶液でそれぞれ 1:3 および 1:5 とした。脂質は YSK05、DSPC、Chol を様々なモル比で用い、さらに PEG-DMG を総脂質量に対して 5 mol%量を添加した。マイクロ流路を用いて粒子を形成させ、透析によってアルコールを除去し、緩衝液を PBS に置換後、各 YSK05-MEND の平均粒子径を動的光散乱法により測定した。その結果、各 YSK05-MEND は、脂質組成およびアルコールの種類に寄らず、全て同程度の粒子径を有していることが明らかとなった (Fig. 3-17)。以降の実験では、100% EtOH を脂質溶解用のアルコールとして用いることとした。

続いて、調製法の違いによる YSK05-MEND の物性の比較を行った。脂質組成は、YSK05/Chol (70/30) に 1~5 mol%の PEG-DMG を添加した比とした。粒子径の表示は動的光散乱法により算出される平均粒子径 (ζ -Average)、および数平均 (Number Mean) 値

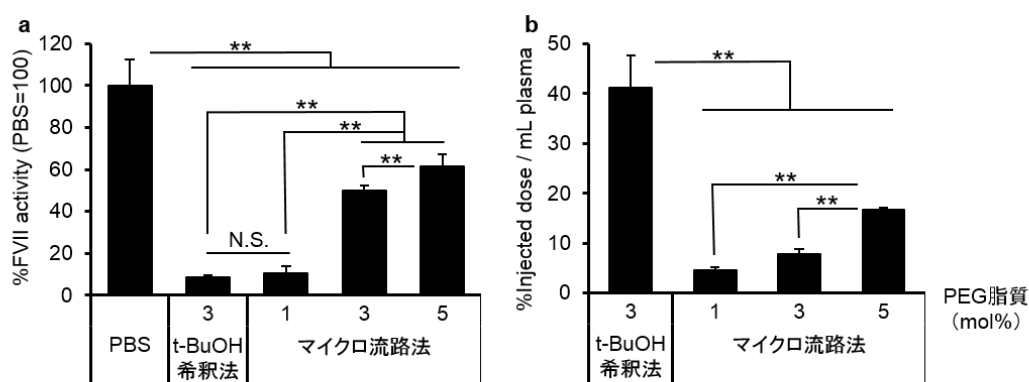


Fig. 3-19 *t*-BuOH希釈法およびマイクロ流路法により調製したYSK05-MENDのFVIIノックダウン活性と血中滞留性。(a) 各量のPEG-DMGを添加して調製したYSK05-MENDに封入したsiFVIIを0.5 mg/kgでICRマウスに静脈内投与し、24 hr後における血中FVII酵素活性を測定した。(b) 各量のPEG-DSGを添加して調製したDiR標識YSK05-MEND (1 mg/kgのsiRNA量を含む) をICRマウスに静脈内投与し、6 hr後の血漿中蛍光強度を測定した。データは平均±SDとして表した。(**: $p < 0.01$, nrANOVA followed by SNK test, $n=3$) N.S.: not significance.

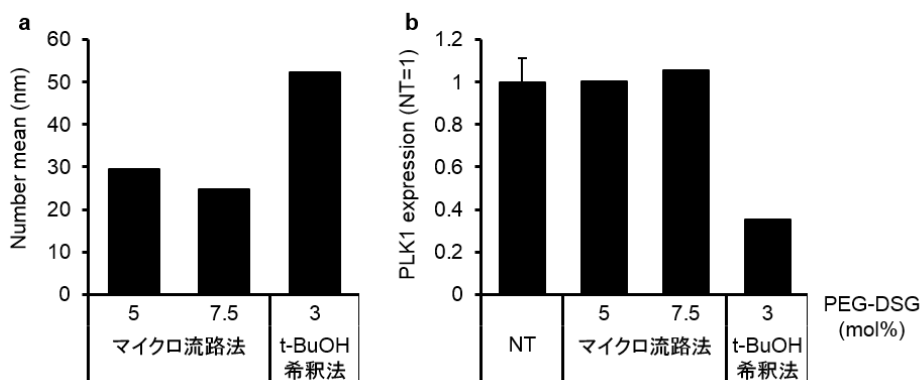


Fig. 3-20 *t*-BuOH希釈法およびマイクロ流路法により調製したYSK05-MENDの粒子径とPLK1ノックダウン活性。(a) 各量のPEG-DSGを添加して調製したYSK05-MENDの粒子径を動的光散乱法により測定した。(b) 各MENDに封入したsiPLK1を2 mg/kgで、OS-RC-2細胞を皮下移植することで作成したがんマウスに静脈内投与し、24 hr後にqRT-PCR法によってがん組織中のPLK1遺伝子の発現を測定した。データは平均±SDとして表した。(n=2~3)

の 2 種で表示した。Number Mean 値は、動的光散乱法により得られた光散乱強度の分布を、各大きさの粒子数分布に換算した際の平均値のことであり、電子顕微鏡観察により求めた粒子径の算術平均値に近い値をとることが報告されている[113]。測定の結果、PEG-DMG 添加量の上昇に伴った粒子径の減少が観察された (Fig. 3-18a,18b)。また、いずれの PEG-DMG 添加量においても、マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND は *t*BuOH 法で調製したものと比較して有意に小さな粒子径を有することが明らかとなった。また、マイクロ流路で調製した PEG-DMG 1 mol%添加 YSK05-MEND は、*t*BuOH 希釈法で調製した PEG-DMG 3 mol%添加 YSK05-MEND と同等の粒子径を有していた。

続いて、マイクロ流路で調製された YSK05-MEND が活性を有する粒子であるかを調べるため、肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性を測定した。各 YSK05-MEND に封入した siFVII を 0.5 mg/kg で ICR マウスに静脈内投与し、24 hr 後に血液を回収し、血漿中 FVII 酵素活性を測定した (Fig. 3-19a)。その結果、いずれの YSK05-MEND もノックダウン活性を示したものの、マイクロ流路法により調製した YSK05-MEND のノックダウン活性は、PEG-DMG 添加量依存的に著しく減少することが明らかとなった。しかし、マイクロ流路で調製した PEG-DMG 1 mol%添加 YSK05-MEND は、*t*BuOH 法で調製した PEG-DMG 3 mol%添加 YSK05-MEND と同等の高い活性を有していた。

粒子径の小さな YSK05-MEND は弱いながらもノックダウン活性を有していたため、続いて、血中滞留化の検討を行った。血中滞留化のため、PEG-DMG を全て PEG-DSG に置き換えて調製した。添加する PEG 脂質の変更により、調製される YSK05-MEND の粒子径に変化が無いことは確認している。DiR (脂質膜染色用蛍光物質) 標識 YSK05-MEND を、ICR マウスに 1 mg/kg の siRNA 量で静脈内投与し、6 hr 後に血液を回収し、血漿中の蛍光強度を測定することで血中濃度を算出した (Fig. 3-19b)。その結果、マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND は PEG-DSG 添加量依存的に血中濃度の上昇が認められたものの、PEG-DSG 5 mol%添加 YSK05-MEND においても、*t*BuOH 希釈法で調製した PEG-DSG 3 mol%添加 YSK05-MEND と比較して半分以下の有意に低い血中濃度を示した。

マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND は *t*BuOH で調製したものと比較して劣るものの、ある程度のノックダウン活性および血中滞留性を示したことから、がん組織におけるノックダウン活性を検討することとした。用いた YSK05-MEND の PEG-DSG 添加量は 5 mol%と、より高い血中滞留性が期待される PEG-DSG 7.5 mol%とした。また、ポジティブコントロールとして、*t*BuOH 希釈法で調製した PEG-DSG 3 mol%添加 YSK05-MEND を用いた。マイクロ流路法で調製した各 YSK05-MEND はポジティブコントロールと比べて小さな粒子径に制御されていることが確認された (Fig. 3-20a)。各 YSK05-MEND に封入した siPLK1 を 2 mg/kg で、OS-RC-2 細胞を皮下移植することで作成したがんマウスに静脈内投与し、24 hr 後におけるがん組織中の PLK1 発現を qRT-PCR 法により測定した。その結果、ポジティブコントロール投与群では 65%のノックダウン効率が得られたものの、マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND 投与群ではノックダウンが認められなかった

(Fig. 3-20b)。

3-3 考察

本章では、第1章において構築した肝実質細胞標的型 YSK05-MEND を基盤とした、固形がん標的 siRNA キャリアの構築を目的とした。

初めに、YSK05-MEND による様々な *in vitro* 培養がん細胞株における PLK1 のノックダウン活性を調べたところ、ノックダウンの IC₅₀ 値ががん細胞株ごとに大きく異なることが明らかとなった (Fig. 3-2)。Lee らは、肝臓において優れたノックダウン活性 (ED₅₀: 0.02 mg/kg) を示す pH 応答性脂質 DLin-KC2-DMA を含む LNP を用いて、前立腺がん組織におけるアンドロゲン受容体のノックダウンを試みたが、ノックダウン活性を得るのに 10 mg/kg×4 回の静脈内投与という非常に高い投与量を要し、高いノックダウン活性を得るためには肝実質細胞における ApoE/LDLR 経路のような効率的な取り込みメカニズムが必要であると結論付けている[119]。また、Shahzad らは、内因性リポタンパク質である HDL を模倣した siRNA キャリアを構築し、HDL の主な受容体である SR-B1 陽性の卵巣がんおよび結腸がんにおいて、静脈内投与で 0.2 mg/kg という低投与量でノックダウン活性を得たことを報告している[120]。これらのことから、効率的な取り込みメカニズムの存在は、遺伝子ノックダウン活性に極めて大きな影響を与えることが分かる。ヒト肝細胞がん由来の Huh7 細胞および HepG2 細胞は比較的低い IC₅₀ 値を示した (Fig. 3-2b,2c) が、これらの細胞は肝実質細胞と同様、ApoE およびその主な受容体である LDLR を共に高発現していた (Fig. 3-3) ことから、他の細胞と比較して YSK05-MEND の取り込み量が高いために、効率的なノックダウンが達成されたものと考えられる。その一方で、最も低い IC₅₀ 値を示したヒト腎細胞がん由来 OS-RC-2 細胞は ApoE を発現していなく、LDLR も低発現であった (Fig. 3-3) ことから、本細胞株における高いノックダウン活性には、ApoE/LDLR 経路による取り込みメカニズムの関与は無いと考えられる。YSK05-MEND の OS-RC-2 細胞への取り込み量は高かった (Fig. 3-4) ことから、別の何らかの取り込みメカニズムが存在すると考えられる。OS-RC-2 細胞の由来臓器である腎臓は、HDL の主要なアポリポタンパク質である ApoA-I の主要なクリアランス臓器であることが知られているため[121,122]、OS-RC-2 細胞における関連受容体遺伝子 SR-B1、cubilin および megalin[123]の発現を qRT-PCR 法により測定したが、いずれの遺伝子発現も低かった (データ未提示)。以上より、YSK05-MEND の OS-RC-2 細胞への効率的な取り込みに寄与する因子を見出すことができなかった。効率的な取り込みメカニズムの同定は、高活性な薬物キャリアの構築の手掛かりになると考えられるため、今後は取り込みメカニズムを明らかにする必要がある。

当研究室の櫻井は、第1章の基準組成 YSK05-MEND を PEG-DSG で修飾することでがん標的化を試みた結果、3 mg/kg 以上の高い投与量においてのみ明確な遺伝子ノックダウンが得られることを報告している[47]。今回、最適組成 YSK05-MEND を PEG-DSG で修飾することで 0.3 mg/kg においてノックダウンが認められた (Fig. 3-7a)。これより、肝臓における脂質組成の最適化はがん組織におけるノックダウン活性の向上にも大きく寄与したと考えられる。

YSK05-MEND は皮下移植がん組織の深部まで浸透せず、不均一な分布を示した (Fig. 3-12)。静脈内投与されたナノ粒子は、まず血管からがん組織側に漏出する必要がある。ペリサイトの存在量とナノ粒子のがん組織浸透性との間に関連性があるという報告が存在する [104]。確かに、高 NG2/Cd31 値を示した HCT116 細胞および A549 細胞皮下移植がん組織において、YSK05-MEND が全く漏出していない血管が存在した (Fig. 3-12b,12c) ことから、漏出性の低い血管は一部存在することが分かる。しかしながら、大部分の血管から YSK05-MEND が漏出している様子が観察された (Fig. 3-12b,12c) ことから、YSK05-MEND のヘテロながん組織内分布の主要な原因は血管漏出性の乏しさではないと考えられる。NG2/Cd31 値と Colla1 発現量との間に相関性が認められた (Fig. 3-9d) ことから、血管成熟度の高いがん組織はコラーゲン量が多いことが示唆されるため、間質バリアが YSK05-MEND のヘテロながん組織内分布の原因であると考えられる。Netti らは、がん組織中コラーゲン濃度とナノ粒子の拡散係数との間に正の相関があると報告している [106]。また、Eikenes らは、坦がんマウスにヒアルロン酸分解酵素を静脈内投与または腫瘍内局所投与することで、ナノ粒子のがん組織内分布が改善すると報告している [108]。本研究では Colla1 mRNA 発現量の測定に留まるため、今後はコラーゲンタンパク質量やヒアルロン酸量を測定することで、YSK05-MEND のがん組織内浸透性を制約する原因についてより詳細に検討していく必要がある。

また、ナノ粒子の不均一ながん組織内分布における、ナノ粒子側の要因はいくつか知られている。一つはナノ粒子の標的細胞との親和性の強さがある。抗体等の高親和性リガンドで修飾されたナノ粒子が腫瘍新生血管からがん組織内部へ以降した後、そのほとんどが血管近くに存在する標的細胞に結合してしまい、血管から離れたがん組織深部の方へ移行できなくなる、‘binding site barrier’ 現象が知られている [124,125,126]。今回用いた YSK05-MEND の表面は細胞標的化能を持たない PEG 鎖で修飾されているのみであるため、この binding site barrier は考慮しなくてよいと判断した。二つ目の要因としてキャリアの表面電荷がある。アニオン性およびカチオン性リポソームは中性リポソームと比較して、細胞外マトリックスモデルであるマトリゲル中における拡散係数が著しく低いことが知られる [127]。YSK05-MEND は脂質膜 pKa 6.40 の pH 応答性カチオン性を有し、pH7.4 の血中ではほぼ中性を示す。一般にがん組織は血管機能が破綻しているため、特にがん組織深部は低栄養、低酸素、低 pH 環境に陥っている。がん組織内 pH はがん種によって大きく異なり、一般に 6.0~6.8 程度であると言われている [128]。また、がん組織内 pH は、血管から離れるにつれて徐々に低下していくことが知られている [129,130]。そのため、YSK05-MEND はがん組織の比較的深部ではカチオン性に変化し、その浸透性が著しく低下する可能性は考えられる。第 2 章において用いた脂質 A-MEND や脂質 B-MEND のがん組織内分布の脂質膜 pKa 依存性を検討することで、電荷の影響について調べることが可能であると考えられる。また、結果的にではあるが、YSK05-MEND は粒子径を小さくすることでほぼ均一ながん組織内分布を示したことから、電荷の影響は小さいと考えられる。最後に、三つ目の要

因としてはナノ粒子の粒子径がある。今回、NG2/Cd31 値および Col1a1 発現量と、YSK05-MEND のがん組織内分布の観察結果との間に関連性が示唆されたため、粒子径に着目することにした。Cabral らは、プラチナ系抗がん剤を封入した 30~100 nm の高分子ミセルを、間質の多い腫瘍モデルマウスに静脈内投与したところ、最も小さい 30 nm のミセルのみがん組織深部まで浸透し、強力な抗腫瘍効果を示すことを報告している[105]。このように、ナノ粒子の粒子径を小さくすることでがん組織内分布が改善するという報告はいくつか存在するが、リポソームに関する報告はほとんど無い。これは、100 nm 以下の小さく均一性の高いリポソームを調製することが、他のナノ粒子と比較して困難であることが原因としてある。小さなリポソーム調製についての検討は様々行われているが、いずれの手法でも 50 nm 以下のリポソーム調製に成功していない[115,116]。2012 年、SHM を用いることで理論的最少粒子径のリポソーム調製が報告された[113]。本研究では、筆者が以前に構築した *t*BuOH 希釈法を用い、脂質組成を変更することで 30 nm 程度の YSK05-MEND の調製に成功した。YSK05 はコーン型脂質であるため、第 1 章で述べた通り、複数の YSK05 の集合体が安定に取る構造の曲率と、実際に YSK05-MEND 表面に存在する YSK05 が取る曲率の符号は逆である (Fig. 1-17)。YSK05 含量の減少に伴って YSK05-MEND の粒子径の減少傾向が認められたのは、負の曲率に寄与する構成物 (YSK05) の減少に起因すると考えられる。また、一般に PC 系脂質はシリンダー型に分類されるが、構成する脂肪酸が飽和脂肪酸でかつその長さが短い場合、疎水部位が小さいために逆コーン型に分類される。今回用いた DPPC は飽和脂肪酸であるパルミチン酸で構成されており、リポソームに汎用され、ステアリン酸を有する DSPC と比較して脂肪酸が短いため、正の曲率に寄与する逆コーン型に比較的近い構造を有する。このため、DPPC を YSK05-MEND に含有させることで粒子径が減少したと考えられる。さらに短い脂肪酸を有するホスファチジルコリンを用いることでも小さな粒子を形成させることは可能であると予想されるが、粒子を構成する脂質の脂肪酸が短い場合、PEG 脂質と粒子との疎水的結合力が減少し、PEG 脂質が容易に脱離してしまうことが報告[131]されており、今回は高い血中滞留性を確保するために DPPC が最適であると判断して使用した。さらに、逆コーン型脂質の代表である PEG 脂質 (PEG-DSG) を 10 mol% 添加することで粒子径の減少と共に血中滞留性を狙った。最近、*in silico* における siRNA 封入脂質ナノ粒子の詳細な構造が予測されてきており[132]、今後、計算科学的手法による今回の考察の裏付けをとる必要がある。調製された Small YSK05-MEND はがん組織内に均一的に分布 (Fig. 3-14) し、Large YSK05-MEND と比較して標的細胞への均一的な取り込みおよび取り込み量の増加が認められた (Fig. 3-15)。このことから、Large YSK05-MEND は、がん間質の物理的バリアによって浸透が妨げられていたものと考えられる。また、Large YSK05-MEND は標的がん細胞よりもマクロファージに非常に多く取り込まれていた (Fig. 3-10b~10d)。このことから、Large YSK05-MEND はがん組織内でマクロファージへ速やかに取り込まれ、がん細胞への移行が妨げられていると考えることもできる。この検証は、クロドロン酸内包リポソームの投与等によってマクロファージ

を排除した場合における Large YSK05-MEND のがん組織内分布を評価することで行うことが可能であると考えられる。MEND の小型化によって、標的がん細胞への取り込みが大きく変化した。がん組織中マクロファージへの移行は Large および Small YSK05-MEND 間で大きく変わらなかった(データ未提示)ことから、マクロファージによる YSK05-MEND のがん組織内分布への影響は少ないと考えられる。ただし、マクロファージへの取り込みを抑え、標的がん細胞への選択性を上昇させることは、投与量の低減に大きく貢献すると考えられるため、その点に関する検討は今後の重要な課題である。

マイクロ流路法により調製した粒子径の小さい YSK05-MEND の肝臓におけるノックダウン活性が弱く (Fig. 3-19a)、がん組織においてはノックダウン活性が全く観察されなかった (Fig. 3-20b)。Tam らは、マイクロ流路を用いて調製した小さな KC2-LNP の肝臓におけるノックダウン活性が低いことを述べているが、その原因についての言及はなされていない[133]。調製法がマイクロ流路法であっても、*t*-BuOH 法により調製したものと同等の粒子径を有する YSK05-MEND は同程度の高いノックダウン活性を有していた (Fig. 3-19a)。従って、調製法の違いによる何らかの悪影響によってノックダウン活性が低下したわけではなく、ノックダウン活性は調製された粒子の粒子径に強く依存していると考えられる。前述したとおり、粒子径が小さくなるほど、粒子表面の正の曲率が大きくなる (Fig. 3-21) ため、YSK05 の集合体が安定にとる曲率と MEND 表面に存在する YSK05 がとる曲率との差がより大きくなり、物理的に不安定な粒子が調製されていると考えられる。実際、マイクロ流路法で調製された小さな YSK05-MEND は、pH7.4、4°C条件下で保存している間に siRNA を漏出することが明らかとなっている。また、その漏出は調製直後の粒子径が小さいほど顕著になる。やや状況は異なるが、第 1 章において、負の曲率をとる YSK05 の含

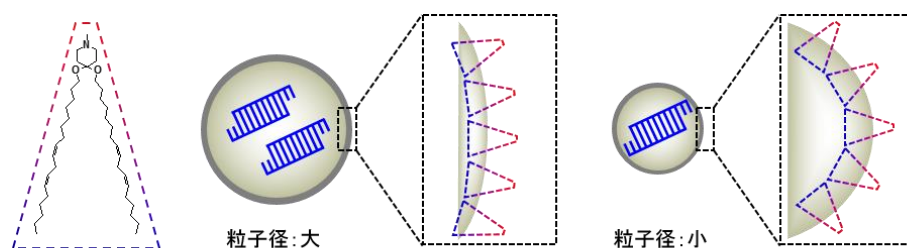


Fig. 3-21 MEND粒子径が表面の曲率に与える影響。MENDの粒子径が減少することで粒子表面に存在する脂質の曲率が上昇する。YSK05はコーン型脂質であるため、曲率の上昇によって脂質間の間隙が大きくなり、膜の物理的安定性は減少すると考えられる。

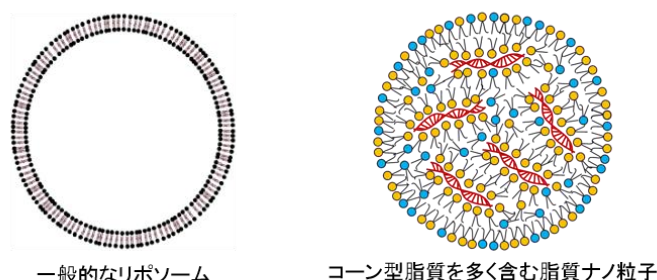


Fig. 3-22 脂質集合体の構造を示す。シリンダー型のリン脂質やコレステロールからなる一般的なリポソームは内部に水相を有する脂質二重膜構造をとる。一方で、コーン型脂質を多く含む脂質集合体は、脂質が内部に詰まった構造をとる。

量がさらに高い、YSK05/Chol/PEG-DMG で 80/20/3 の組成比では、70/30/3 の組成比と比較して肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性が減少した (Fig. 1-5c)。更に YSK05 含量の高い 90/10/3 または 100/0/3 の組成比では、YSK05-MEND の調製中に siRNA の漏出が起り、一部封入された siRNA 量で投与量補正してマウスに静脈内投与しても、膜融合活性の高い YSK05 が多く含まれているにも関わらず、肝臓における遺伝子ノックダウンは全く観察されない (データ未提示)。このように、試験管内で siRNA を簡単に漏出してしまう YSK05-MEND の *in vivo* におけるノックダウン活性は低いことが明らかとなり、そのような不安定な YSK05-MEND は静脈内投与後、血中で siRNA を漏出し、siRNA を効率的に肝臓へ送達できないため、ノックダウン活性が低い可能性が考えられる。今後、細胞内動態効率を落とさずに物理的安定性を向上させることで、粒子径の小ささと高いノックダウン活性を両立した YSK05-MEND の構築を行う必要がある。

また、マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND の血中滞留性は、*t*-BuOH 希釈法で調製された YSK05-MEND と比較して低かった。YSK05 のようなコーン型脂質を多く含む脂質組成の粒子は、一般的なリポソームの様な内部に水相を含む閉鎖脂質二重膜構造ではなく、リポタンパクの様に脂質が内部に詰まった構造を有する (Fig. 3-22) ことが知られており [132]、本 YSK05-MEND も同様の構造を有すると考えられる。そのため、脂質量が一定の場合、粒子径が小さくなるほど粒子の総表面積は増加する。具体的には、粒子径が 1/2 倍になった場合、1 粒子当たりの表面積は 1/4 倍となるが、粒子数は 8 倍となるため、粒子全体の総表面積は 2 倍に増加する。マイクロ流路で調製した PEG-DSG 5 mol% 添加 YSK05-MEND の number mean 値は、*t*-BuOH 希釈法で調製した YSK05-MEND の 1/2 以下であるため、前者の PEG-DSG 添加量は後者と比較して 1.6 倍多いが、粒子表面の PEG 密度は後者よりも計算上低くなる。粒子表面の PEG 密度は粒子の血中滞留性を規定する大きな要因であることから、マイクロ流路法で調製した YSK05-MEND は *t*-BuOH 希釈法で調製した YSK05-MEND と比べて表面の PEG 密度が低いために、比較的低い血中濃度を示したものと考えられる。

3-4 小括

本章では、YSK05-MEND を用いた固形がん組織への siRNA 送達を試みた。様々な皮下移植がん組織における PLK1 ノックダウンを評価したところ、がんモデルごとに得られるノックダウン活性に大きな差があることが明らかとなった。また、各がん組織中の様々なマーカー遺伝子発現を評価したところ、NG2/Cd31 値および Col1a1 発現量の高いがんモデルにおいて、遺伝子ノックダウンを誘起することが困難であることが明らかとなった。また、そのようながんモデルにおいて、YSK05-MEND は極めてヘテロながん組織内分布を示し、標的がん細胞への取り込み量も低かった。脂質組成を変更することで調製に成功した平均粒子径 30 nm 程度の小さな YSK05-MEND を用いて同様の評価を行ったところ、がん組織内分布の大幅な改善、がん細胞への均一的な取り込みおよび取り込み量の上昇が観察された。これより、YSK05-MEND のヘテロながん組織内分布はがん間質による物理的バリアによる YSK05-MEND のがん組織内浸透の阻害に起因すると結論した。マイクロ流路を用いて調製された小さな YSK05-MEND は肝臓におけるノックダウン活性および血中滞留性が低く、がん組織においてもノックダウン活性を示さなかった。今後は、小型かつ高いノックダウン活性を両立する siRNA キャリアの構築をしていく予定である。

結論

本研究では、pH 応答性リポソームを用いた肝臓への効率的な siRNA 送達キャリアの構築と、脂質膜 pKa がそのキャリアの動態や活性に及ぼす影響に関する検証、さらにはがん組織への siRNA 送達効率に関わるがん組織側および siRNA キャリア側因子の解明を目的とした。

第 1 章では、筆者が以前に開発した、高い膜融合活性を有する pH 応答性脂質 YSK05 を用いて肝臓への siRNA 送達キャリアの構築を行った。MEND 脂質組成の最適化を通して肝臓におけるノックダウン活性を 10 倍程度上昇させ、ED₅₀ 値で 0.06 mg/kg を達成し、単回投与で 2 週間程度の持続的なノックダウンが観察された。HCV 慢性炎症発症マウスへの投与実験において肝臓の正常化が、さらに、HCV 持続感染マウスにおける HCV の顕著な減少が観察されたことから、肝臓の標的遺伝子を抑制可能な siRNA キャリアは肝疾患治療に有効であることが示唆された。

第 2 章では、様々な脂質膜 pKa を示す新規 pH 応答性脂質、脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズを用いることで、脂質膜 pKa が肝臓への siRNA 送達効率に及ぼす影響を検証した。脂質 A-MEND および脂質 B-MEND は脂質膜 pKa 依存的な肝実質細胞における遺伝子ノックダウンを示し、ノックダウンに最適な pKa は 6.45 であった。また、脂質 A は YSK05 と比較して膜融合活性が高く、肝実質細胞において MC3 と同等の高いノックダウン活性を示した (ED₅₀: 0.015 mg/kg)。また、脂質膜 pKa が上昇するにつれて、キャリアの肝臓内分布は肝実質細胞から肝類洞血管内皮細胞へ劇的に変化していくことが明らかとなった。肝類洞血管内皮細胞においても脂質膜 pKa 依存的な遺伝子ノックダウンが観察され、適切な pKa は 7.10~7.25 であることが明らかとなった。また、脂質 A2-MEND は内皮リパーゼによって血管内皮細胞上で選択的に不活性化された。その影響により、脂質 A2-MEND は肝実質細胞選択的に遺伝子ノックダウンを誘起することが明らかとなった。一方で、脂質膜 pKa 7.10 を示す脂質 B3-MEND は肝類洞血管内皮細胞選択的に遺伝子ノックダウンを誘起した。

第 3 章では、第 1 章において構築した最適組成 YSK05-MEND を基盤とし、血中滞留化させることでがん組織への受動的標的化を行った。さらに、様々ながんモデルのキャラクターを評価することで YSK05-MEND によるがん組織への siRNA 送達に影響するがん組織側とキャリア側の因子の解明を行った。YSK05-MEND による遺伝子ノックダウン効率はがんモデルによって大きく異なった。がん組織中の各種マーカー遺伝子発現量を評価した結果、血管透過性が低く、間質量の多いがんモデルにおいて遺伝子ノックダウンが困難であることが明らかとなった。さらに、それは YSK05-MEND のがん組織内浸透性が間質の存在によって物理的に妨害されることで標的がん細胞へ移行できていないことが原因であると示唆された。実際に、粒子径の小さな YSK05-MEND はがん組織全体に均一的に分布し、がん細胞への取り込み量が増加し、取り込みの均一性の向上も観察された。また、マイクロ流路を用いることで脂質組成を変更せずに粒子径の小さな YSK05-MEND を調製すること

に成功した。しかし、YSK05-MEND の遺伝子ノックダウン活性はその粒子径の減少に伴って著しく減少することが明らかとなった。

以上のことから、世界最高峰の活性を有する MC3 と同等の活性を有する siRNA キャリアの構築に成功した。また、脂質膜 pKa を変化させることでキャリアの肝臓内局在を大きく変化させることが可能であることを明らかとした。また、明瞭な HCV 治療効果を得ることに成功した。一方で、がん組織においては、いくつかのがんモデルで遺伝子ノックダウンの誘起に成功したものの、間質の存在によるキャリアのがん組織内浸透性の制約により、標的がん細胞への移行が妨げられていることを明らかとした。

In vivo において目的の遺伝子発現をノックダウンする技術は、HCV 治療薬としての有用性に加え、学術的にも大きな意義があると考えられる。従来用いられてきた培養細胞を利用した実験では、実際の臓器の環境を再現することができず、利用した培養細胞の性質が *in vivo* における性質を完全に再現している保証は無い。また、*in vivo* 組織中の細胞は他の細胞と複雑に関わり合いながら生存しているため、たとえ対象細胞自身の性質が同じであったとしても、*in vitro* において遺伝子機能を抑制した際のフェノタイプが、*in vivo* でも同様に得られるかの保証もない。本技術は *in vivo* において直接的に任意の遺伝子発現を任意の時期に効率的に抑制することを可能とさせる。これは、siRNA の発見によって *in vitro* 培養細胞における遺伝子機能解析の実験手法が大きく変貌したのと同様に、本技術は *in vivo* 分子生物学とも呼ぶべき新たな研究手法への展開を助けるものであると考えられる。

また、がん組織に関しても、YSK05-MEND は比較的浸透性が良いがんモデルにおいては遺伝子ノックダウンを誘起した。高い活性を維持した小型の MEND を構築することができれば、上記で述べた *in vivo* 分子生物学をがん組織にも応用可能になると期待される。

本研究で得られた知見が siRNA 医薬の実用化や新たな疾患関連遺伝子の効率的な探索に繋がる一歩となることを期待し、本稿を終えたい。

実験方法

MEND の調製 (*t*-BuOH 希釈法)

2 mg/mL の siRNA 溶液 80 μ L と DDW 120 μ L を混合した溶液を調製した (①)。また、10 mM pH 応答性脂質、10 mM Chol (SIGMA Aldrich)、10 mM DSPC (日本油脂) および 10 mM DPPC (日本油脂) の 90% *t*-BuOH 溶液を表記したモル比、全量を 300 μ L となるように調製した。そこに、2 mM PEG-DMG (日本油脂) および 2 mM PEG-DSG (日本油脂) の 90% *t*-BuOH 溶液を表記したモル比となるように添加し、90% *t*-BuOH で全量を 400 μ L とした溶液を調製した (②)。②をボルテックスミキサーで攪拌しながら①を全量滴下した (③)。27G 注射針を装着した 1 mL テルモシリンジを用いて③を回収し、ボルテックスミキサーで 20 mM citrate buffer (pH4.0) 2.0 mL を攪拌しているところに③を注入した。PBS (-) を加えて希釈しながら、AmiconUltra-15 (MWCO 100,000、Millipore) に移し、限外濾過により *t*-BuOH の除去、バッファー交換、濃縮を行った。最後に適当な容積に PBS (-) を用いてメスアップした。MEND の粒子径、Polydispersity Index および ζ 電位は、Zetasizer nano ZS (Malvern) を用いて測定した。siRNA 回収率と封入率は RNA に特異的にインターカレーションを起こして蛍光を発する試薬 Ribogreen (Invitrogen) を用いたアッセイにより定量を行った。調製した MEND 溶液に対して、カチオン性を帯びた MEND 表面から siRNA を乖離させるために 20 μ L/mL デキストラン硫酸ナトリウム (和光純薬) 水溶液を添加した溶液を①、さらに MEND の膜構造を破壊するために 0.1% TritonX-100 (SIGMA Aldrich) を添加した溶液を②とし、下記の (1) 式に従って siRNA 回収率を、(2) 式にしたがって siRNA 封入率の計算を行った。保存安定性評価を除き、全ての MEND サンプルはどちらのも 90%以上を示すことを確認した。

$$\text{siRNA 回収率 (\%)} = \frac{\text{②溶液の siRNA 濃度}}{\text{回収率 100\%とした時の理論上の siRNA 濃度}} \times 100 \dots (1)$$

$$\text{siRNA 封入率 (\%)} = \frac{\text{②溶液の siRNA 濃度} - \text{①溶液の siRNA 濃度}}{\text{②溶液の siRNA 濃度}} \times 100 \dots (2)$$

本研究において使用した siRNA の配列は下表に示す。

siRNA 名		配列 5' → 3'	
siFVII	sense		gga <u>uca</u> <u>ucu</u> <u>caa</u> <u>guc</u> <u>uua</u> cTsT
	antisense		<u>gua</u> aga <u>cuu</u> gag <u>aug</u> <u>auc</u> cTsT
siSr-b1	sense		guc gca ugg cuc aga gag uTT
	antisense		acu cuc uga gcc aug cga cTT
siGL4	sense		ccg ucg ucu ucg uga gca aTT
	antisense		uug cuc acg aau acg acg gTT
siApoB	sense		gga auc uua uau uug auc caa
	antisense		uug gau caa aua uaa gau ucc cu
GL3	sense		Cy5-gcg cug cug gug cca acc cTT
	antisense		ggg uug gca cca gca gca gcc cTT
siPLK1	sense		aga uca ccc ucc uua aa auu
	antisense		uau uua agg agg gug auc uuu
siGapdh	sense		gug gca aag ugg aga uug uuu
	antisense		aca auc ucc acu uug cca cuu
siCd31	配列 1	sense	gca cag uga ugc uga aca aTT
		antisense	uug uuc agc auc acu gug cTT
	配列 2	sense	gug cau agu uca agu gac aTT
		antisense	ugu cac uug aac uau gca cTT
	配列 3	sense	gca aga agc agg aag gac aTT
		antisense	ugu ccu ucc ugc uuc uug cTT
siLdlr	配列 1	sense	gug uug acg gcu ccc aug aTT
		antisense	uca ugg gag ccg uca aca cTT
	配列 2	sense	cag aag ucg aca cug uac uTT
		antisense	agu aca gug ucg acu ucu gTT
	配列 3	sense	cuc aga cga aca agg cug uTT
		antisense	aca gcc uug uuc guc uga gTT

大文字は DNA を、小文字は RNA を、太文字は 2'-OMe 修飾体を、下線は 2'-F 修飾体を、s はホスホロチオエート結合をそれぞれ示す。

MEND の調製 (マイクロ流路法)

2 mg/mL の siRNA 溶液 110 μ L と 25 mM acetate buffer (pH4.0) 1390 μ L を混合した溶液を調製した (①)。また、20 mM YSK05 と 20 mM Chol の EtOH 溶液をそれぞれ 280 μ L と 120 μ L を混合した。そこに、4 mM PEG-DMG、4 mM PEG-DSG の EtOH 溶液を表記したモル比となるように添加し、EtOH で全量を 500 μ L とした溶液を調製した (②)。①および②をそれぞれ 2.5 mL および 1 mL のハミルトンシリンジ (HAMILTON) に充填し、シリンジを Standard Infusion Only Pump 11 Elite (HARVARD APPARATUS) に装着した。SHM とシリンジを接続し、①および②をそれぞれ 1.125 mL/min および 0.375 mL/min の流速で SHM 内に注入した。流路の出口から出てきた溶液を Spectra/Por 4 dialysis membrane (MWCO 12,000-14,000、Spectrum Laboratories) に移し、外水相を 20 mM MES buffer (pH6.0) とし、4°C で 4 hr 以上透析を行った。外水相を PBS (-) (pH7.4) に変え、さらに 4°C で一夜透析を行った。必要に応じて、Spectra/Gel Absorbent (Spectrum Laboratories) を用いて溶液を濃縮した。上記と同様に粒子径、Polydispersity Index、 ζ 電位および siRNA 濃度・封入率を測定した。

脂質膜 pKa の測定 (TNS assay)

20 mM citrate buffer (150 mM NaCl, pH3.50~5.50)、20 mM phosphate buffer (150 mM NaCl, pH6.00~8.00)、20 mM Tris-HCl buffer (150 mM NaCl, pH8.50~9.50) それぞれ 368 μ L と 0.6 mM TNS (和光純薬) 4 μ L を混合した溶液を調製した (①)。また、siRNA 未封入 MEND 溶液を脂質濃度 0.5 mM となるように Saline で希釈した溶液を調製した (②)。96-well fluoronunc plate (Nunc) に①および②をそれぞれ 188 μ L および 12 μ L を添加し、混合した。Varioskan Flash (Thermo scientific) を用いて蛍光強度を測定した。

測定条件は以下に示す。

Excitation wavelength: 321 nm
Emission wavelength: 447 nm
Temperature: 37°C
Measurement time: 500 msec/well
Band width: 5 nm
Dynamic range: Autorange

膜障害活性評価 (Hemolysis assay)

ICR マウス (4 週齢) から血液を採取し、ヘパリン処理後に氷冷した。生理食塩水で希釈し、4°C、400×g、5 min の条件で遠心し、上清を取り除く作業を 5 回繰り返すことで赤血球懸濁液を得た。赤血球懸濁液を、0.5% TritonX-100 添加時に 545 nm における吸光度が 2 となる濃度に、20 mM HEPES/MES buffer (130 mM NaCl, pH5.0~7.5) で希釈した溶液を調製した (①)。また、脂質濃度 1.5 mM のリポソーム溶液 1~30 μL と各 pH の HEPES/MES buffer を混合して計 300 μL とした溶液を調製した (②)。①と②を 300 μL ずつ混合し、37°C、30 min でインキュベーションした。4°C、400 g、5 min で遠心後、上清の 545 nm における吸光度を測定した。ネガティブコントロールはバッファーのみのサンプルとし、ポジティブコントロールは終濃度 0.5 w/v% の TritonX-100 存在下のサンプルとした。生理食塩水の吸光度を 0%、pH7.5 におけるポジティブコントロールの吸光度を 100% として、ネガティブコントロールを含む各サンプルの溶血割合 (%Hemolysis) を算出した。

³¹P NMR 法による相転移温度の測定

20 mM pH 応答性脂質、20 mM POPC の EtOH 溶液をガラス試験管 (三商) に 400 μL ずつ添加し、エバポレーターを用いて EtOH を留去した。さらに 20 mM DSPS の chloroform 溶液 400 μL を加えて脂質を再溶解させ、再びエバポレーターを用いて減圧留去することで脂質フィルムを調製した。10 mM citrate buffer (pH4.0) 500 μL 添加し、60°C 水浴中で水和させ、ボルテックスミキサーを用いて脂質をガラス試験管から剥がした。バス型ソニケーターを用いて超音波処理することで脂質を分散させた。得られた脂質懸濁液を NMR 管に移し、ECX 400P (JEOL) または ECA 500 (JEOL) を用いて以下の測定条件で ³¹P NMR スペクトルを得た。得られたデータは Delta NMR software v5.0.2 を用いて解析した。Window 関数を exponential、広幅化因子を 50 Hz としてフーリエ変換し、手動により位相補正した。

x-angle	60°
spectral width	280 kHz (400 MHz) or 350 kHz (500 MHz)
data points	32,768
relaxation_delay	1 sec
scan times	1500
temperature	21~50°C

細胞培養

HeLa-dluc 細胞、Huh7 細胞、HepG2 細胞、HCT116 細胞は DMEM (SIGMA Aldrich) を、OS-RC-2 細胞、MDA-MB-231 細胞、Hepa1c1c7 細胞は RPMI-1640 (SIGMA Aldrich) を、A549 細胞は F-12k (Gibco) を培地として、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、そして 100 ng/mL ストレプトマイシンを加えた培養液中で培養を行った。HeLa-dluc 細胞はセレクションのために G418 (Nacalai tesque) 0.4 mg/mL となるように加えた。全ての細胞は、5% CO₂、95%水蒸気下、37°Cで培養した。凍結された細胞ストックを 37°Cの水浴中で素早く溶かし、培地 9 mL に添加した後に遠心操作 (r.t., 1,000 rpm, 5 min) を行なった。その後、上清を除去後に沈殿した細胞を 1 mL の培地に懸濁し、10 mL の培地を含む 10-cm dish (Falcon) に播種した。継代は、80~90%コンフルエントになった際に、0.125% トリプシン 2 mL で剥離させた細胞を 8 mL の培地に添加した後に遠心操作 (r.t., 1,000 rpm, 5 min) を行い、細胞を計数した後に適当な濃度で再播種を行った。

トランスフェクション (ルシフェラーゼ法によるノックダウン評価)

トランスフェクションの 24 hr 前に、Firefly および Renilla 由来ルシフェラーゼを安定発現している HeLa-dluc 細胞を 5×10^3 cells/well で 96-well plate (Corning) に播種した。任意の siRNA 濃度となるように MEND を DMEM (10% FBS, 400 μ g/mL G418) で希釈し、100 μ L/well で添加した。24 hr 後に細胞を PBS (-) 100 μ L/well で洗浄し、1×Passive Lysis Buffer (Promega) 24 μ L 添加し、室温で 10 min 程度インキュベートした。Dual-Luciferase Reporter Assay buffer II (Promega) を 50 μ L 添加した 2 sec 後から 10 sec 発光量を測定し、Stop & GLO buffer 50 μ L を添加した 2 sec から 10 sec 発光量を測定した。発光量の測定は Luminescencer-PSN AB-2200 (ATTO) を用いた。

トランスフェクション (qRT-PCR 法によるノックダウン評価)

トランスフェクションの 24 hr 前に、OS-RC-2 細胞を 1×10^5 cells/well で、Huh7 細胞を 1.5×10^5 cells/well で、HepG2 細胞を 3×10^5 cells/well で、HCT116 細胞を 2×10^5 cells/well で、HeLa-dluc 細胞を 1×10^5 cells/well で、MDA-MB-231 細胞を 1×10^5 cells/well で、Hepa1c1c7 細胞は 1×10^5 cells/well で 6-well plate (Corning) に播種した。任意の siRNA 濃度になるように MEND を各細胞に適した培養液で希釈し、1 mL/well で添加した。Hepa1c1c7 細胞に関してのみ、MEND の添加から 2 hr 後に上清を除き、20 U/mL ヘパリン PBS (-) 500 μ L/well \times 2 回で洗浄し、新しい培養液を 1 mL/well で添加した。MEND の添加から 24 hr 後に細胞を PBS (-) 1 mL/well で洗浄し、TRIZOL (Invitrogen) 500 μ L/well 添加した。これを後述する total RNA 抽出用のサンプルとした。

培養細胞における細胞毒性評価

トランスフェクションの 24 hr 前に、OS-RC-2 細胞を 1×10^4 cells/well で、Huh7 細胞を 2×10^4 cells/well で、HCT116 細胞を 1.5×10^4 cells/well で、HeLa-dluc 細胞を 1×10^4 cells/well で、MDA-MB-231 細胞を 1×10^4 cells/well で 24-well plate (Corning) に播種した。任意の siRNA 濃度となるように MEND を各細胞に適した培養液で希釈し、 $500 \mu\text{L/well}$ で添加した。24 hr 後に上清を除き、MEND を含まない培養液を 1 mL/well で添加した。さらに 48 hr 後、細胞を PBS (-) $500 \mu\text{L/well}$ で洗浄し、1% TritonX-100 含有 PBS (-) $100 \mu\text{L/well}$ 添加した。BCA 法により細胞溶解液のタンパク質濃度を測定し、未処理の細胞を 100%とした相対的な細胞生存率として計算した。

培養細胞における MEND の取り込み評価

トランスフェクションの 24 hr 前に、OS-RC-2 細胞および HeLa-dluc 細胞を 1×10^5 cells/well で、6-well plate に播種した。100 nM siRNA となるように ^3H 標識 MEND を各細胞に適した培養液で希釈し、 1 mL/well で添加した。1.5 hr または 3 hr 後に上清を除き、細胞を 20 U/mL ヘパリン含有 PBS (-) 1 mL/well で 2 回洗浄し、 $1 \times$ Passive Lysis Buffer 1 mL/well 添加して細胞を回収した。細胞溶解液全量をバイアルに入れ、Hionic Fluor 10 mL を加えた。放射活性として、LSC-6100 (ALOKA) を用いて dpm の測定をした。1 well に添加した MEND の内、何%が細胞に取り込まれたかを算出した。

MEND の静脈内投与

PBS (-) で任意の siRNA 濃度とした MEND 溶液を、ジエチルエーテル麻酔下のマウスの尾静脈より、 $10 \sim 15 \text{ mL/kg weight}$ の容量で投与した。マウスは ICR マウス (4~8 週齢、雄性、slc)、BALB/c マウス (4 週齢、雄性、slc)、BALB/c.KOR-*ApoE^{shl}* マウス (4 週齢、雄性、slc) または、BALB/cAjcl-nu/nu マウス (4 週齢、雄性および雌性、日本クレア) を使用した。MEND と hApoE3 0 を共投与する際は、hApoE3 投与量が 0.1 mg/kg となるように、投与直前に hApoE と MEND 溶液を混合した。GSK264220A を腹腔内投与する際は、GSK264220A を以下の組成の薬物溶解液に 3 mg/mL で溶解させ、 30 mg/kg (10 mL/kg) で腹腔内投与した。坦がんマウスへの MEND の投与は、皮下移植がん組織体積が平均で 100 mm^3 程度になった時に行った。

がんマウスの作製

各細胞を上記に従って培養し、移植の3~4日前に15-cm dish (Corning) を用いて大量培養した。0.125% トリプシン溶液を用いて細胞を回収し、細胞を計数した後に遠心 (r.t., 1,000 rpm, 5 min) し、OS-RC-2 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、Huh7 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、HepG2 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、HCT116 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、HeLa-dluc 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、A549 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L、MDA-MB-231 細胞は 1×10^6 cells/80 μ L となるように PBS (-) に再懸濁した。細胞懸濁液は on ice で保存し、回収してから可能な限り素早くジエチルエーテル麻酔下の BALB/cAjlcr-nu/nu の左背部皮下に 27G 注射針を用いて細胞懸濁液 80 μ L を移植した。HeLa-dluc 細胞の移植には雌性、その他の細胞の移植に雄性のマウスを用いた。

血漿中 FVII 酵素活性評価

MEND を表記マウス (4 週齢) に投与してから表記の時間後、ジエチルエーテル麻酔下で心臓または尾より採血し、ヘパリン処理した。これを遠心操作 (4°C, 800 \times g, 5 min) した後の上清を血漿とした。FVII 酵素活性は Biophen FVII kit (Hyphen BioMed) を用いて測定した。血漿を Tris-BSA Buffer で 10,000 倍希釈したものを測定サンプルとし、以降は添付文書に従って呈色反応を行った。呈色反応後、吸光度計 DU-630 (Beckmann Coulter) あるいはマルチウェルプレートリーダー Varioskan Flash (Beckmann Coulter) を用いて 405 nm における吸光度を測定した。PBS (-) 投与群を 100% とした相対的な FVII 活性を算出した。

コレステロール定量

MEND を ICR マウス (8 週齢) に投与から 48 hr 後、ジエチルエーテル麻酔下で心臓より採血し、ヘパリン処理した。これを遠心処理 (4°C, 800 \times g, 5 min) した後の上清を血漿とした。血漿中総コレステロール濃度はコレステロール定量キット E ワコー (和光純薬) を用いて定量した。

肝毒性評価

ICR マウス (4 週齢) に対して、表記した投与量で siRNA 封入 MEND を静脈内投与し、心臓より採血した。室温で 30 min 程度静置し、軽くタッピングした後、遠心操作 (4°C, 10,000 rpm, 10 min) し、血清サンプルとした。AST、ALT はトランスアミナーゼ CII テストワコー (和光純薬) を用いて定量した。

Total RNA 抽出

組織は TRIZOL 500 μL 溶液中で PreCellys 24 (Bertin Technologies) を用いて、5,500 rpm、20 sec \times 2 回の条件で破碎したものを抽出サンプルとした。抽出サンプルに対して 1/5 量の chloroform を加えボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した後 5 min 静置し、遠心操作 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 5 min) を行った。上清 200 μL を別のチューブに移し、等量の isopropanol を添加しボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した後 5 min 静置し、遠心操作 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 5 min) を行った。得られた沈殿物に対して 750 μL の 75% EtOH を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後遠心操作 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\times g$, 2 min) を 2 回繰り返した。得られた沈殿物を風乾させ、適量の DDW に再溶解させた。RNA の定量は、この RNA 溶液を、TE 緩衝液を用いて任意の倍率で希釈したサンプルの A230、A260 および A280 を測定することで行った。

cDNA の調製

Total RNA 0.4~1.0 μg 分の RNA 溶液を、DDW を用いて 4.5 μL にメスアップし、65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min で加熱させた後 4 $^{\circ}\text{C}$ まで急冷することで RNA の 2 次構造を壊した。その後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (ABI) の 20 \times RT Enzyme Mix 0.5 μL と 2 \times RT Buffer Mix 5.0 μL を加え、42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min で逆転写反応を行った。

qRT-PCR

得られた cDNA 溶液を、DDW を用いて 40 倍希釈し、下記の組成および反応条件に従って LightCycler 480 (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム PCR を行った。

2 \times Fast SYBR Green Master Mix	7.5 μL
100 μM forward primer	0.075 μL
100 μM reverse primer	0.075 μL
40 倍希釈 cDNA	2.64 μL
<u>DDW</u>	<u>4.71 μL</u>
Total	15.0 $\mu\text{L}/\text{well}$

95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 sec \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 sec \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 sec \rightarrow Melting curve analysis
40 cycles

本研究において用いたプライマーセットは下表に示す。

遺伝子名 (Gene ID)		配列 5' → 3'
Gapdh (14433)	forward	AGC AAG GAC ACT GAG CAA G
	reverse	TAG GCC CCT CCT GTT ATT ATG
GAPDH (2597)	forward	CCT CTG ACT TCA ACA GCG AC
	reverse	CGT TGT CAT ACC AGG AAA TGA G
FVII (14068)	forward	TCG AAT CCA TGT CAG AAC GGA GGT
	reverse	CCG ACC CTC AAA GTC TAG GAG GCA
Actb (11461)	forward	AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC
	reverse	CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT
Sr-b1 (20778)	forward	TCC AGC CTG ACA AGT CGC ATG G
	reverse	GCT TGC TCT CCA TCA ATA TCG AGC C
SR-B1 (949)	forward	AGA ACA TCA GCA GGA TCC AC
	reverse	GGA CTC AGG AGT CAT GAA GG
APOE (348)	forward	TCC TTG AGT CCT ACT CAG CC
	reverse	CCA CAG AAC CTT CAT CTT CC
LDLR (3949)	forward	ATG AAC CCA TCA AAG AGT GC
	reverse	TCT TAA GGT CAT TGC AGA CG
PLK1 (5347)	forward	AAT AAA GGC TTG GAG AAC CC
	reverse	ACC TCA CCT GTC TCT CGA AC
NG2 (121021)	forward	AAG GAA GTG CAG AGG AG
	reverse	CAT CTC GTG CTC ATA CAG
Cd31 (18613)	forward	TAC AGT GGA CAC TAC ACC TG
	reverse	GAC TGG AGG AGA ACT CTA AC
Col1a1 (12842)	forward	AGA GAG GTG AAC AAG GTC
	reverse	AAG GTC TCC AGG AAC AC
F4/80 (13733)	forward	GGG TAT CAT GAG TTG ATG GC
	reverse	TTC TCC TTG GTG CAT GAA AC
VE-Cad (12562)	forward	GCC AGT AAA CCC AAA GTT C
	reverse	TAAACT GCC CAT ACT TGA CC
Tie2 (21687)	forward	GAC CAG ACT GTA AGC TCA G
	reverse	AAT CCT CTA TCT GTG GAG TC

体内分布・血中滞留性評価 (蛍光)

蛍光標識 MEND を ICR マウス (4 週齢) に表記の投与量で静脈内投与した。体内分布評価に関しては投与から 30 min 後、ジエチルエーテル麻醉下で各組織を回収し、湿重量を測定し、ハサミで細断した一部をチューブに回収した。100 mg wet tissue/mL の濃度となるように 1% SDS を加え、PreCellys 24 (Bertin Technologies) を用いて、5,500 rpm、20 sec × 2 の条件で組織を破碎した。遠心操作 (4°C, 12,000 × g, 10 min) 後、上清 200 μL を 96-well fluoronunc plate (Nunc) に移し、Varioskan Flash (Beckmann Coulter) を用いて蛍光強度を測定した。また、血中滞留性に関しては投与から 6 hr 後、ジエチルエーテル麻醉下で心臓より採血し、ヘパリン処理した。遠心操作 (4°C, 800 × g, 10 min) 後、血漿を得た。96-well fluoronunc plate 上で、血漿 50 μL、10% SDS 20 μL、PBS (-) 130 μL を混合し、Varioskan Flash を用いて蛍光強度を測定した。

測定条件は以下に示す。

Excitation wavelength: 648 nm (Cy5, DiD), 745 nm (DiR)

Emission wavelength: 669 nm (Cy5, DiD), 780 nm (DiR)

Temperature: r.t.

Measurement time: 500 msec/well

Band width: 5 nm

Dynamic range: Autorange

血中滞留性評価 (放射性同位体)

³H 標識 MEND を ICR マウス (4 週齢) に表記の投与量で静脈内投与した後、表記の時間に採血した。全血 20 μL を 1 mL の soluene-350 (PerkinElmer) が入ったプラスチックバイアル (Thermo Fisher Scientific) に対して加え、細胞が溶解するまで数分静置した。この溶液に対して 30% H₂O₂ 300 μL を 3 回に分けて加え良く振り脱色した後、Hionic Flour (PerkinElmer) 10 mL を加えて 4°C、O/N でケミルミネッセンスが収まるまで静置したものを測定サンプルとした。放射活性として、LSC-6100 (ALOKA) を用いて dpm を測定した。下記の式に従い、血液 1 mL 中に存在する MEND の割合を算出した。

$$\% \text{Injected dose/mL blood} = \frac{1 \text{ mL の血液に含まれる放射活性 (dpm/mL blood)}}{\text{マウスに投与した総放射活性 (dpm)}}$$

組織内分布評価用サンプルの調製 (固定組織切片)

肝臓に関しては、Cy5 標識 siGL3 封入 MEND を ICR マウス (6 週齢) に 0.5 mg/kg で静脈内投与し、25 min 後に FITC 標識 Isolectin B4 40 µg/mouse を静脈内投与した。さらに 5 min 後に開腹し、門脈より 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を還流し、肝臓の前固定を行った。肝臓を 4°C、O/N で 4% PFA 中に浸すことで後固定を行った。その後、30% ショ糖溶液に浸すことで置換を行い、OCT Compound (Sakura Fine Technical) 中に包埋した。がん組織に関しては、DiD および DiI 標識 MEND を坦がんマウスに 1 mg/kg で静脈内投与し、24 hr 後に FITC 標識 Isolectin B4 40 µg/mouse を静脈内投与した。さらに 10 min 後にがん組織を回収し、4°C、O/N で 4% PFA 中に浸すことで浸透固定を行った。その後、30% ショ糖溶液に浸すことで置換を行い、OCT compound 中に包埋した。

その後、CM3000 (Leica) を用いて凍結切片を作製し、スライドガラスに張り付けた後、PBS (-) で 2 回洗浄した。その後、カバーガラスで覆い、観察まで 4°C、遮光下で保存した。

組織内分布評価用サンプルの調製 (生組織)

Cy5 標識 siGL3 封入 MEND を ICR マウス (4 週齢) に表記の投与量で静脈内投与し、25 min 後に FITC 標識 Isolectin B4 40 µg/mouse を静脈内投与した。さらに 5 min 後に肝臓の一部を回収し、10 µg/mL Hoechst33342 添加 PBS (-) に浸して氷冷し、遮光下で 10 min 以上インキュベートした。

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた MEND の組織内分布評価

作成した組織切片を、以下の共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

Confocal Imaging system (A1R+, Nikon)

Microscopy (ECLIPSE Ti-E, Nikon)

Objective (PlanApo 10×, PlanApo-VC 20×, PlanApo-VC 60×A WI, Nikon)

Lasers (40 mW 457/488/514 nm Multi Ar Laser, 10 mW 561 nm Solid Laser, 10 mW 640 nm Diode Laser, Nikon)

1st Dynamic Mirror (405/488/561/640, Nikon)

Filter Set (450/50, 525/50, 595/50, 700/75, Nikon)

がん組織における MEND の取り込み評価

DiD 標識 MEND を坦がんマウスに表記の投与量で静脈内投与してから 24 hr 後、がん組織を回収し、冷 HBSS (SIGMA) に浸した。ハサミでがん組織を細かく刻み、以下の組成の組織分散溶液に入れた。

280 U/mg コラゲナーゼ type II (Gibco)	20 mg
10 mg/mL DNase I (Gibco)	20 μ L
非働化 FBS	1 mL
<u>500 mM calcium chloride</u>	<u>20 μL</u>
HBSS	up to 2 mL

シェーキングインキュベーターで 37°C、1,300 rpm、30 min でインキュベートすることで細胞を分散させた。100 μ m セルストレーナー (BD Falcon) に通し、冷 HBSS 10 mL を加えて希釈・冷却したサンプルを遠心 (4°C, 400 \times g, 4 min) した。上清を除き、冷 HBSS 10 mL を加え、同様の遠心操作を行い、上清を除いた。コンタミネートした赤血球を除くために RBC lysis buffer (SIGMA) 1 mL で懸濁し、室温で数分静置し、冷 HBSS 10 mL で希釈して同様の遠心操作を行った後、上清を除いた。適当量の FACS バッファーで懸濁した溶液の細胞を計数し、 1×10^6 cells/tube となるように細胞懸濁液を分注した。ブロッキングのためにラット抗マウス CD16/32 抗体 (101302, Biolegend) を 4°C、10 min 処理した。ヒトがん細胞の検出のために PE 標識抗ヒト HLA-A,B,C 抗体 (311406, Biolegend) で、マクロファージの検出のために FITC 標識抗マウス F4/80 抗体 (123108, Biolegend) で処理した。アイソタイプコントロールとしては、PE 標識マウス IgG2a, κ アイソタイプコントロール抗体 (400211, Biolegend) および FITC 標識ラット IgG2a, κ アイソタイプコントロール抗体 (400505, Biolegend) を用いた。冷 HBSS 1 mL で懸濁したものを測定サンプルとし、FACSCalibur を用いて測定を行った。また、死細胞の検出のために 7-AAD (IMGENEX) で 10 min 処理し、陽性細胞群をゲートアウトすることで生細胞のみの測定を行った。解析は Cell Quest を用いて行った。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、また適切なお指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室教授・原島秀吉先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、研究内容への適切な御助言・御教示のみならず研究に挑む姿勢にまでも深いご理解をして頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授・秋田英万先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日頃から活発な議論をして頂くと共に、的確かつ有益なる御助言を頂きました、元・北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤学研究室特任助教、現・日本学術振興会 海外特別研究員 (MD Anderson Cancer Center) の畠山浩人先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有機化学を初めとした多くの技術を御教示して頂くと共に、日頃から活発な議論をして頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤学研究室特任助教・兵藤守先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言と深いご理解を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室助教。山田勇磨先生、同・中村孝司先生、および北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤学研究室准教授・梶本和昭先生、同研究室特任助教・櫻井遊先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、HCV 治療実験において本システムを使用して頂くと共に、有益な議論をして頂きました、公益財団法人 東京都医学総合研究所 新型インフルエンザ及び C 型肝炎ウイルス感染症の予防と治療プロジェクト プロジェクトリーダー・小原道法先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、マイクロ流路をご提供して頂くと共に、的確かつ有益なる御助言を頂きました、北海道大学大学院工学研究院 生物計測化学研究室教授・渡慶次学先生に深く感謝致します。

本論文を審査して頂きました北海道大学大学院薬学研究院 薬化学研究室教授松田彰先生、同研究室准教授・市川聡先生に深く感謝致します。

楽しい研究環境を築いて頂きました、医歯学総合研究棟の皆様に心より感謝致します。

有益な御助言を頂きました薬剤分子設計学研究室の諸先輩、同輩、後輩の皆様に感謝致します。

2013年2月 佐藤 悠介

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] G.R. Stark, I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, R.D. Schreiber, How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 227-264.
- [3] A. Judge, I. MacLachlan, Overcoming the innate immune response to small interfering RNA, *Hum Gene Ther* 19 (2008) 111-124.
- [4] 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.
- [5] Y. Sakiyama, H. Yuki, T. Moriya, K. Hattori, M. Suzuki, K. Shimada, T. Honma, Predicting human liver microsomal stability with machine learning techniques, *J Mol Graph Model* 26 (2008) 907-915.
- [6] A.K. Vaishnaw, J. Gollob, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougerolles, J. Maraganore, A status report on RNAi therapeutics, *Silence* 1 (2010) 14.
- [7] M.K. Sakharkar, K.R. Sakharkar, S. Pervaiz, Druggability of human disease genes, *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007) 1156-1164.
- [8] S. Choung, Y.J. Kim, S. Kim, H.O. Park, Y.C. Choi, Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy, *Biochem Biophys Res Commun* 342 (2006) 919-927.
- [9] T.P. Prakash, C.R. Allerson, P. Dande, T.A. Vickers, N. Sioufi, R. Jarres, B.F. Baker, E.E. Swayze, R.H. Griffey, B. Bhat, Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells, *J Med Chem* 48 (2005) 4247-4253.
- [10] C.R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T.P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, L. Wanders, R.H. Griffey, E.E. Swayze, B. Bhat, Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA, *J Med Chem* 48 (2005) 901-904.
- [11] D.A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M.A. White, D.R. Corey, RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA, *Biochemistry* 42 (2003) 7967-7975.
- [12] G.R. Rettig, M.A. Behlke, Progress toward in vivo use of siRNAs-II, *Mol Ther*

- 20 (2012) 483-512.
- [13] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Röhl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature* 432 (2004) 173-178.
- [14] C. Wolfrum, S. Shi, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R.K. Pandey, K.G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E.M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1149-1157.
- [15] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol, *Mol Ther* 16 (2008) 734-740.
- [16] A. Akinc, W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, K.G. Rajeev, W.L. Cantley, J.R. Dorkin, J.S. Butler, L. Qin, T. Racie, A. Sprague, E. Fava, A. Zeigerer, M.J. Hope, M. Zerial, D.W. Sah, K. Fitzgerald, M.A. Tracy, M. Manoharan, V. Koteliansky, A. Fougerolles, M.A. Maier, Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms, *Mol Ther* 18 (2010) 1357-1364.
- [17] X. Yan, F. Kuipers, L.M. Havekes, R. Havinga, B. Dontje, K. Poelstra, G.L. Scherphof, J.A. Kamps, The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse, *Biochem Biophys Res Commun* 328 (2005) 57-62.
- [18] F. Jacobs, E. Wisse, B. De Geest, The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer, *Am J Pathol* 176 (2010) 14-21.
- [19] E. Wisse, F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik, B. De Geest, The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer, *Gene Ther* 15 (2008) 1193-1199.
- [20] S.C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A.P. Sandhu, B.L. Mui, C.K. Cho, D.W. Sah, D. Stebbing, E.J. Crosley, E. Yaworski, I.M. Hafez, J.R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K.G. Rajeev, K.F. Wong, L.B. Jeffs, L. Nechev, M.L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M.A. Maier, M. Srinivasulu, M.J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S.A. Barros, S. De, S.K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W.L. Cantley, Y.K. Tam, M. Manoharan, M.A. Ciufolini, M.A.

- Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P.R. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat Biotechnol* 28 (2010) 172-176.
- [21] T.S. Zimmermann, A.C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M.N. Fedoruk, J. Harborth, J.A. Heyes, L.B. Jeffs, M. John, A.D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L.V. Nechev, L.R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A.J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, I. MacLachlan, RNAi-mediated gene silencing in non-human primates, *Nature* 441 (2006) 111-114.
- [22] M. Frank-Kamenetsky, A. Grefhorst, N.N. Anderson, T.S. Racie, B. Bramlage, A. Akinc, D. Butler, K. Charisse, R. Dorkin, Y. Fan, C. Gamba-Vitalo, P. Hadwiger, M. Jayaraman, M. John, K.N. Jayaprakash, M. Maier, L. Nechev, K.G. Rajeev, T. Read, I. Röhl, J. Soutschek, P. Tan, J. Wong, G. Wang, T. Zimmermann, A. de Fougerolles, H.P. Vornlocher, R. Langer, D.G. Anderson, M. Manoharan, V. Koteliansky, J.D. Horton, K. Fitzgerald, Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11915-11920.
- [23] T. Coelho, D. Adams, A. Silva, P. Lozeron, P.N. Hawkins, T. Mant, J. Perez, J. Chiesa, S. Warrington, E. Tranter, M. Munisamy, R. Falzone, J. Harrop, J. Cehelsky, B.R. Bettencourt, M. Geissler, J.S. Butler, A. Sehgal, R.E. Meyers, Q. Chen, T. Borland, R.M. Hutabarat, V.A. Clausen, R. Alvarez, K. Fitzgerald, C. Gamba-Vitalo, S.V. Nochur, A.K. Vaishnav, D.W. Sah, J.A. Gollob, O.B. Suhr, Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis, *N Engl J Med* 369 (2013) 819-829.
- [24] M. Jayaraman, S.M. Ansell, B.L. Mui, Y.K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J.K. Narayanannair, K.G. Rajeev, I.M. Hafez, A. Akinc, M.A. Maier, M.A. Tracy, P.R. Cullis, T.D. Madden, M. Manoharan, M.J. Hope, Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo, *Angew Chem Int Ed Engl* 51 (2012) 8529-8533.
- [25] K. Fitzgerald, M. Frank-Kamenetsky, S. Shulga-Morskaya, A. Liebow, B.R. Bettencourt, J.E. Sutherland, R.M. Hutabarat, V.A. Clausen, V. Karsten, J. Cehelsky, S.V. Nochur, V. Kotelianski, J. Horton, T. Mant, J. Chiesa, J. Ritter, M. Munisamy, A.K. Vaishnav, J.A. Gollob, A. Simon, Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase

- subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial, *Lancet* 383 (2014) 60-68.
- [26] M.A. Maier, M. Jayaraman, S. Matsuda, J. Liu, S. Barros, W. Querbes, Y.K. Tam, S.M. Ansell, V. Kumar, J. Qin, X. Zhang, Q. Wang, S. Panesar, R. Hutabarat, M. Carioto, J. Hettinger, P. Kandasamy, D. Butler, K.G. Rajeev, B. Pang, K. Charisse, K. Fitzgerald, B.L. Mui, X. Du, P. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, M. Manoharan, A. Akinc, Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics, *Mol Ther* 21 (2013) 1570-1578.
- [27] D.B. Rozema, D.L. Lewis, D.H. Wakefield, S.C. Wong, J.J. Klein, P.L. Roesch, S.L. Bertin, T.W. Reppen, Q. Chu, A.V. Blokhin, J.E. Hagstrom, J.A. Wolff, Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 12982-12987.
- [28] S.C. Wong, J.J. Klein, H.L. Hamilton, Q. Chu, C.L. Frey, V.S. Trubetskoy, J. Hegge, D. Wakefield, D.B. Rozema, D.L. Lewis, Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo, *Nucleic Acid Ther* 22 (2012) 380-390.
- [29] C.I. Wooddell, D.B. Rozema, M. Hossbach, M. John, H.L. Hamilton, Q. Chu, J.O. Hegge, J.J. Klein, D.H. Wakefield, C.E. Oropeza, J. Deckert, I. Roehl, K. Jahn-Hofmann, P. Hadwiger, H.P. Vornlocher, A. McLachlan, D.L. Lewis, Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, *Mol Ther* 21 (2013) 973-985.
- [30] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res* 46 (1986) 6387-6392.
- [31] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS, *J Control Release* 74 (2001) 47-61.
- [32] S. Mishra, P. Webster, M.E. Davis, PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *Eur J Cell Biol* 83 (2004) 97-111.
- [33] I.S. Zuhorn, U. Bakowsky, E. Polushkin, W.H. Visser, M.C. Stuart, J.B.

- Engberts, D. Hoekstra, Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency, *Mol Ther* 11 (2005) 801-810.
- [34] K. Remaut, B. Lucas, K. Braeckmans, J. Demeester, S.C. De Smedt, Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides, *J Control Release* 117 (2007) 256-266.
- [35] H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima, Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Gene Ther* 14 (2007) 68-77.
- [36] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma, *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 152-160.
- [37] J. Taberero, G.I. Shapiro, P.M. LoRusso, A. Cervantes, G.K. Schwartz, G.J. Weiss, L. Paz-Ares, D.C. Cho, J.R. Infante, M. Alsina, M.M. Gounder, R. Falzone, J. Harrop, A.C. White, I. Toudjarska, D. Bumcrot, R.E. Meyers, G. Hinkle, N. Svzikapa, R.M. Hutabarat, V.A. Clausen, J. Cehelsky, S.V. Nochur, C. Gamba-Vitalo, A.K. Vaishnav, D.W. Sah, J.A. Gollob, H.A. Burris, First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement, *Cancer Discov* 3 (2013) 406-417.
- [38] M.E. Davis, The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic, *Mol Pharm* 6 (2009) 659-668.
- [39] M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature* 464 (2010) 1067-1070.
- [40] J.E. Zuckerman, C.H. Choi, H. Han, M.E. Davis, Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) 3137-3142.
- [41] C.N. Landen, A. Chavez-Reyes, C. Bucana, R. Schmandt, M.T. Deavers, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery, *Cancer Res* 65

- (2005) 6910-6918.
- [42] L.S. Mangala, V. Zuzel, R. Schmandt, E.S. Leshane, J.B. Halder, G.N. Armaiz-Pena, W.A. Spannuth, T. Tanaka, M.M. Shahzad, Y.G. Lin, A.M. Nick, C.G. Danes, J.W. Lee, N.B. Jennings, P.E. Vivas-Mejia, J.K. Wolf, R.L. Coleman, Z.H. Siddik, G. Lopez-Berestein, S. Lutsenko, A.K. Sood, Therapeutic Targeting of ATP7B in Ovarian Carcinoma, *Clin Cancer Res* 15 (2009) 3770-3780.
- [43] V. Cortez, M. Mann, S. Tekmal, T. Suzuki, N. Miyata, C. Rodriguez-Aguayo, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, R.K. Vadlamudi, Targeting the PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy for breast cancer, *Breast Cancer Res* 14 (2012) R108.
- [44] T. Tanaka, L.S. Mangala, P.E. Vivas-Mejia, R. Nieves-Alicea, A.P. Mann, E. Mora, H.D. Han, M.M. Shahzad, X. Liu, R. Bhavane, J. Gu, J.R. Fakhoury, C. Chiappini, C. Lu, K. Matsuo, B. Godin, R.L. Stone, A.M. Nick, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, M. Ferrari, Sustained small interfering RNA delivery by mesoporous silicon particles, *Cancer Res* 70 (2010) 3687-3696.
- [45] J. Gilleron, W. Querbés, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Koteliansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier, M. Zerial, Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape, *Nat Biotechnol* 31 (2013) 638-646.
- [46] J. Gao, W. Liu, Y. Xia, W. Li, J. Sun, H. Chen, B. Li, D. Zhang, W. Qian, Y. Meng, L. Deng, H. Wang, J. Chen, Y. Guo, The promotion of siRNA delivery to breast cancer overexpressing epidermal growth factor receptor through anti-EGFR antibody conjugation by immunoliposomes, *Biomaterials* 32 (2011) 3459-3470.
- [47] Y. Sakurai, H. Hatakeyama, Y. Sato, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima, Gene silencing via RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system, *Mol Ther* 21 (2013) 1195-1203.
- [48] K. Kogure, R. Moriguchi, K. Sasaki, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima, Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method, *J Control Release* 98 (2004) 317-323.
- [49] K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, Multifunctional envelope-type nano device for non-viral gene delivery: concept and application of Programmed Packaging, *J Control Release* 122 (2007) 246-251.

- [50] Y. Hayashi, J. Yamauchi, I.A. Khalil, K. Kajimoto, H. Akita, H. Harashima, Cell penetrating peptide-mediated systemic siRNA delivery to the liver, *Int J Pharm* 419 (2011) 308-313.
- [51] Y. Hayashi, Y. Noguchi, H. Harashima, Non-linear pharmacokinetics of octaarginine-modified lipid nanoparticles: barriers from in vitro to in vivo, *J Control Release* 161 (2012) 757-762.
- [52] A.L. Bailey, P.R. Cullis, Modulation of membrane fusion by asymmetric transbilayer distributions of amino lipids, *Biochemistry* 33 (1994) 12573-12580.
- [53] N. Maurer, K.F. Wong, H. Stark, L. Louie, D. McIntosh, T. Wong, P. Scherrer, S.C. Semple, P.R. Cullis, Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes, *Biophys J* 80 (2001) 2310-2326.
- [54] S.C. Semple, S.K. Klimuk, T.O. Harasym, N. Dos Santos, S.M. Ansell, K.F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P.R. Cullis, M.J. Hope, P. Scherrer, Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures, *Biochim Biophys Acta* 1510 (2001) 152-166.
- [55] Y. Sato, H. Hatakeyama, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima, [Development of an efficient short interference RNA (siRNA) delivery system with a new pH-sensitive cationic lipid], *Yakugaku Zasshi* 132 (2012) 1355-1363.
- [56] Y. Sato, H. Hatakeyama, Y. Sakurai, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima, A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo, *J Control Release* 163 (2012) 267-276.
- [57] Y. Sakurai, H. Hatakeyama, Y. Sato, M. Hyodo, H. Akita, N. Ohga, K. Hida, H. Harashima, RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system, *J Control Release* 173 (2014) 110-118.
- [58] A.L. Bailey, P.R. Cullis, Membrane fusion with cationic liposomes: effects of target membrane lipid composition, *Biochemistry* 36 (1997) 1628-1634.
- [59] C. Mold, Effect of membrane phospholipids on activation of the alternative complement pathway, *J Immunol* 143 (1989) 1663-1668.
- [60] S.K. Law, N.A. Lichtenberg, R.P. Levine, Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces, *J Immunol* 123 (1979) 1388-1394.

- [61] B.F. Tack, R.A. Harrison, J. Janatova, M.L. Thomas, J.W. Prahl, Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 5764-5768.
- [62] R.B. Sim, T.M. Twose, D.S. Paterson, E. Sim, The covalent-binding reaction of complement component C3, *Biochem J* 193 (1981) 115-127.
- [63] F. Sakurai, T. Nishioka, H. Saito, T. Baba, A. Okuda, O. Matsumoto, T. Taga, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid, *Gene Ther* 8 (2001) 677-686.
- [64] J. Senior, G. Gregoriadis, Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components, *Life Sci* 30 (1982) 2123-2136.
- [65] S.C. Semple, A. Chonn, P.R. Cullis, Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes, *Biochemistry* 35 (1996) 2521-2525.
- [66] A. Schroeder, C.G. Levins, C. Cortez, R. Langer, D.G. Anderson, Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery, *J Intern Med* 267 (2010) 9-21.
- [67] J.J. Wheeler, L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R.W. Graham, Y.P. Zhang, M.J. Hope, P. Scherrer, P.R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization, *Gene Ther* 6 (1999) 271-281.
- [68] K.W. Mok, A.M. Lam, P.R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: factors influencing plasmid entrapment and transfection properties, *Biochim Biophys Acta* 1419 (1999) 137-150.
- [69] K.T. Love, K.P. Mahon, C.G. Levins, K.A. Whitehead, W. Querbes, J.R. Dorkin, J. Qin, W. Cantley, L.L. Qin, T. Racie, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Yip, R. Alvarez, D.W. Sah, A. de Fougères, K. Fitzgerald, V. Kotliansky, A. Akinc, R. Langer, D.G. Anderson, Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 1864-1869.
- [70] A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E.S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S.A. Bacallado, D.N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougères, J.R. Dorkin, K. Narayanannair Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Kotliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K.G. Rajeev, D.W. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H.P. Vornlocher, T.S. Zimmermann, R. Langer, D.G. Anderson, A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of

- RNAi therapeutics, *Nat Biotechnol* 26 (2008) 561-569.
- [71] A. Koornneef, P. Maczuga, R. van Logtenstein, F. Borel, B. Blits, T. Ritsema, S. van Deventer, H. Petry, P. Konstantinova, Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma cholesterol in mice, *Mol Ther* 19 (2011) 731-740.
- [72] M. Tadin-Strapps, L.B. Peterson, A.M. Cumiskey, R.L. Rosa, V.H. Mendoza, J. Castro-Perez, O. Puig, L. Zhang, W.R. Strapps, S. Yendluri, L. Andrews, V. Pickering, J. Rice, L. Luo, Z. Chen, S. Tep, B. Ason, E.P. Somers, A.B. Sachs, S.R. Bartz, J. Tian, J. Chin, B.K. Hubbard, K.K. Wong, L.J. Mitnaul, siRNA-induced liver ApoB knockdown lowers serum LDL-cholesterol in a mouse model with human-like serum lipids, *J Lipid Res* 52 (2011) 1084-1097.
- [73] J. Zhang, H. Fan, D.A. Levorse, L.S. Crocker, Ionization behavior of amino lipids for siRNA delivery: determination of ionization constants, SAR, and the impact of lipid pKa on cationic lipid-biomembrane interactions, *Langmuir* 27 (2011) 1907-1914.
- [74] J. Heyes, L. Palmer, K. Bremner, I. MacLachlan, Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J Control Release* 107 (2005) 276-287.
- [75] M. Motavaf, S. Safari, S.M. Alavian, Therapeutic potential of RNA interference: a new molecular approach to antiviral treatment for hepatitis C, *J Viral Hepat* 19 (2012) 757-765.
- [76] S. Sekiguchi, K. Kimura, T. Chiyo, T. Ohtsuki, Y. Tobita, Y. Tokunaga, F. Yasui, K. Tsukiyama-Kohara, T. Wakita, T. Tanaka, M. Miyasaka, K. Mizuno, Y. Hayashi, T. Hishima, K. Matsushima, M. Kohara, Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver, *PLoS One* 7 (2012) e51656.
- [77] D.F. Mercer, D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, J.R. Lakey, D.L. Tyrrell, N.M. Kneteman, Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers, *Nat Med* 7 (2001) 927-933.
- [78] D.G. Davis, Phosphorous nuclear magnetic resonance in egg yolk lecithin: field dependent line widths and phosphate group mobility, *Biochem Biophys Res Commun* 49 (1972) 1492-1497.
- [79] P.R. Cullis, Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle

- membranes: effects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions, *FEBS Lett* 70 (1976) 223-228.
- [80] P.R. Cullis, B. de Kruijff, Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes, *Biochim Biophys Acta* 559 (1979) 399-420.
- [81] B. De Kruijff, P.R. Cullis, G.K. Radda, Outside-inside distributions and sizes of mixed phosphatidylcholine-cholesterol vesicles, *Biochim Biophys Acta* 436 (1976) 729-740.
- [82] I.M. Hafez, N. Maurer, P.R. Cullis, On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids, *Gene Ther* 8 (2001) 1188-1196.
- [83] M. Jaye, K.J. Lynch, J. Krawiec, D. Marchadier, C. Maugeais, K. Doan, V. South, D. Amin, M. Perrone, D.J. Rader, A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism, *Nat Genet* 21 (1999) 424-428.
- [84] I.V. Fuki, N. Blanchard, W. Jin, D.H. Marchadier, J.S. Millar, J.M. Glick, D.J. Rader, Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway, *J Biol Chem* 278 (2003) 34331-34338.
- [85] T. Yasuda, T. Ishida, D.J. Rader, Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis, *Circ J* 74 (2010) 2263-2270.
- [86] K.B. Goodman, M.J. Bury, M. Cheung, M.A. Cichy-Knight, S.E. Dowdell, A.K. Dunn, D. Lee, J.A. Lieby, M.L. Moore, D.A. Scherzer, D. Sha, D.P. Suarez, D.J. Murphy, M.R. Harpel, E.S. Manas, D.E. McNulty, R.S. Annan, R.E. Matico, B.K. Schwartz, J.J. Trill, T.D. Sweitzer, D.Y. Wang, P.M. Keller, J.A. Krawiec, M.C. Jaye, Discovery of potent, selective sulfonylfuran urea endothelial lipase inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 19 (2009) 27-30.
- [87] D.B. Rozema, K. Ekena, D.L. Lewis, A.G. Loomis, J.A. Wolff, Endosomolysis by masking of a membrane-active agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules, *Bioconjug Chem* 14 (2003) 51-57.
- [88] D.L. Knook, E.C. Sleyster, Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content, *Biochem Biophys Res Commun* 96 (1980) 250-257.
- [89] R. Li, A. Oteiza, K.K. Sørensen, P. McCourt, R. Olsen, B. Smedsrød, D. Svistounov, Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300 (2011) G71-81.

- [90] K.K. Sørensen, P. McCourt, T. Berg, C. Crossley, D. Le Couteur, K. Wake, B. Smedsrød, The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303 (2012) R1217-1230.
- [91] S. Magnusson, T. Berg, Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells, *Biochem J* 257 (1989) 651-656.
- [92] K.C. Yu, C. David, S. Kadambi, A. Stahl, K. Hirata, T. Ishida, T. Quertermous, A.D. Cooper, S.Y. Choi, Endothelial lipase is synthesized by hepatic and aorta endothelial cells and its expression is altered in apoE-deficient mice, *J Lipid Res* 45 (2004) 1614-1623.
- [93] L. Tang, J. Yang, W. Liu, X. Tang, J. Chen, D. Zhao, M. Wang, F. Xu, Y. Lu, B. Liu, Q. Sun, L. Zhang, F. He, Liver sinusoidal endothelial cell lectin, LSEctin, negatively regulates hepatic T-cell immune response, *Gastroenterology* 137 (2009) 1498-1508.e1491-1495.
- [94] B. Arteta, N. Lasuen, A. Lopategi, B. Sveinbjörnsson, B. Smedsrød, F. Vidal-Vanaclocha, Colon carcinoma cell interaction with liver sinusoidal endothelium inhibits organ-specific antitumor immunity through interleukin-1-induced mannose receptor in mice, *Hepatology* 51 (2010) 2172-2182.
- [95] J.H. Senior, K.R. Trimble, R. Maskiewicz, Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo, *Biochim Biophys Acta* 1070 (1991) 173-179.
- [96] P.R. Cullis, A. Chonn, S.C. Semple, Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo, *Adv Drug Deliv Rev* 32 (1998) 3-17.
- [97] W. Zhao, S. Zhuang, X.R. Qi, Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes, *Int J Nanomedicine* 6 (2011) 3087-3098.
- [98] K. Strebhardt, A. Ullrich, Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer* 6 (2006) 321-330.
- [99] K. Strebhardt, Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* 9 (2010) 643-660.
- [100] S. Paget, The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889, *Cancer Metastasis Rev* 8 (1989) 98-101.
- [101] J.A. Joyce, J.W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, *Nat*

- Rev Cancer 9 (2009) 239-252.
- [102] D. von Tell, A. Armulik, C. Betsholtz, Pericytes and vascular stability, *Exp Cell Res* 312 (2006) 623-629.
- [103] M.G. Ozawa, V.J. Yao, Y.H. Chantry, P. Troncoso, A. Uemura, A.S. Varner, I.M. Kasman, R. Pasqualini, W. Arap, D.M. McDonald, Angiogenesis with pericyte abnormalities in a transgenic model of prostate carcinoma, *Cancer* 104 (2005) 2104-2115.
- [104] L. Zhang, H. Nishihara, M.R. Kano, Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability, *Biol Pharm Bull* 35 (2012) 761-766.
- [105] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat Nanotechnol* 6 (2011) 815-823.
- [106] P.A. Netti, D.A. Berk, M.A. Swartz, A.J. Grodzinsky, R.K. Jain, Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors, *Cancer Res* 60 (2000) 2497-2503.
- [107] C.J. Whatcott, H. Han, R.G. Posner, G. Hostetter, D.D. Von Hoff, Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look, *Cancer Discov* 1 (2011) 291-296.
- [108] L. Eikenes, M. Tari, I. Tufto, O.S. Bruland, C. de Lange Davies, Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts, *Br J Cancer* 93 (2005) 81-88.
- [109] S. Huo, H. Ma, K. Huang, J. Liu, T. Wei, S. Jin, J. Zhang, S. He, X.J. Liang, Superior penetration and retention behavior of 50 nm gold nanoparticles in tumors, *Cancer Res* 73 (2013) 319-330.
- [110] V.P. Chauhan, T. Stylianopoulos, J.D. Martin, Z. Popović, O. Chen, W.S. Kamoun, M.G. Bawendi, D. Fukumura, R.K. Jain, Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner, *Nat Nanotechnol* 7 (2012) 383-388.
- [111] H. Lee, H. Fonge, B. Hoang, R.M. Reilly, C. Allen, The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm* 7 (2010) 1195-1208.
- [112] S. Batzri, E.D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochim Biophys Acta* 298 (1973) 1015-1019.

- [113] I.V. Zhigaltsev, N. Belliveau, I. Hafez, A.K. Leung, J. Huft, C. Hansen, P.R. Cullis, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing, *Langmuir* 28 (2012) 3633-3640.
- [114] N.M. Belliveau, J. Huft, P.J. Lin, S. Chen, A.K. Leung, T.J. Leaver, A.W. Wild, J.B. Lee, R.J. Taylor, Y.K. Tam, C.L. Hansen, P.R. Cullis, Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA, *Mol Ther Nucleic Acids* 1 (2012) e37.
- [115] A. Jahn, W.N. Vreeland, D.L. DeVoe, L.E. Locascio, M. Gaitan, Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size, *Langmuir* 23 (2007) 6289-6293.
- [116] A. Jahn, S.M. Stavis, J.S. Hong, W.N. Vreeland, D.L. DeVoe, M. Gaitan, Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles, *ACS Nano* 4 (2010) 2077-2087.
- [117] D. van Swaay, A. deMello, Microfluidic methods for forming liposomes, *Lab Chip* 13 (2013) 752-767.
- [118] A.D. Stroock, S.K. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H.A. Stone, G.M. Whitesides, Chaotic mixer for microchannels, *Science* 295 (2002) 647-651.
- [119] J.B. Lee, K. Zhang, Y.Y. Tam, Y.K. Tam, N.M. Belliveau, V.Y. Sung, P.J. Lin, E. LeBlanc, M.A. Ciufolini, P.S. Rennie, P.R. Cullis, Lipid nanoparticle siRNA systems for silencing the androgen receptor in human prostate cancer in vivo, *Int J Cancer* 131 (2012) E781-790.
- [120] M.M. Shahzad, L.S. Mangala, H.D. Han, C. Lu, J. Bottsford-Miller, M. Nishimura, E.M. Mora, J.W. Lee, R.L. Stone, C.V. Pecot, D. Thanapparasr, J.W. Roh, P. Gaur, M.P. Nair, Y.Y. Park, N. Sabnis, M.T. Deavers, J.S. Lee, L.M. Ellis, G. Lopez-Berestein, W.J. McConathy, L. Prokai, A.G. Lacko, A.K. Sood, Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles, *Neoplasia* 13 (2011) 309-319.
- [121] C. Glass, R.C. Pittman, M. Civen, D. Steinberg, Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro, *J Biol Chem* 260 (1985) 744-750.
- [122] R. Kozyraki, J. Fyfe, M. Kristiansen, C. Gerdes, C. Jacobsen, S. Cui, E.I. Christensen, M. Aminoff, A. de la Chapelle, R. Krahe, P.J. Verroust, S.K. Moestrup, The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-

- affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein, *Nat Med* 5 (1999) 656-661.
- [123] E.I. Christensen, P.J. Verroust, R. Nielsen, Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule, *Pflugers Arch* 458 (2009) 1039-1048.
- [124] M. Juweid, R. Neumann, C. Paik, M.J. Perez-Bacete, J. Sato, W. van Osdol, J.N. Weinstein, Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier, *Cancer Res* 52 (1992) 5144-5153.
- [125] J.N. Weinstein, R.R. Eger, D.G. Covell, C.D. Black, J. Mulshine, J.A. Carrasquillo, S.M. Larson, A.M. Keenan, The pharmacology of monoclonal antibodies, *Ann N Y Acad Sci* 507 (1987) 199-210.
- [126] K. Fujimori, D.G. Covell, J.E. Fletcher, J.N. Weinstein, Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂, and Fab in tumors, *Cancer Res* 49 (1989) 5656-5663.
- [127] O. Lieleg, R.M. Baumgärtel, A.R. Bausch, Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass, *Biophys J* 97 (2009) 1569-1577.
- [128] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, S.E. Day, D.E. Hu, J.H. Ardenkjaer-Larsen, R. Zandt, P.R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M.H. Lerche, K.M. Brindle, Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate, *Nature* 453 (2008) 940-943.
- [129] O. Trédan, C.M. Galmarini, K. Patel, I.F. Tannock, Drug resistance and the solid tumor microenvironment, *J Natl Cancer Inst* 99 (2007) 1441-1454.
- [130] P. Vaupel, Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology, *Semin Radiat Oncol* 14 (2004) 198-206.
- [131] K. Sou, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida, Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles, *Bioconjug Chem* 11 (2000) 372-379.
- [132] A.K. Leung, I.M. Hafez, S. Baoukina, N.M. Belliveau, I.V. Zhigaltsev, E. Afshinmanesh, D.P. Tieleman, C.L. Hansen, M.J. Hope, P.R. Cullis, Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core, *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 116 (2012) 18440-18450.
- [133] Y.Y. Tam, S. Chen, P.R. Cullis, Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery, *Pharmaceutics* 5 (2013) 498-507.