HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝臓非実質細胞を標的とする細胞内動態を考慮したsiRNAキャリアの開発
Author(s)	鳥谷部, 尚之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11848号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11848
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59257
Type	doctoral thesis
File Information	Naoyuki_Toriyabe.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

肝臓非実質細胞を標的とする
細胞内動態を考慮した siRNA キャリアの開発

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

鳥谷部　尚之

2015 年　3 月

目次

略語表 1

序章 3

本論

第 1 章「肝類洞内皮細胞を標的とするキャリアの開発」

緒言 8

結果 9

考察 18

第 2 章「細胞内動態制御 siRNA キャリアの開発」

緒言 22

結果 24

考察 33

第 3 章「肝星細胞標的とする肝線維化治療キャリアの開発」

緒言 36

結果 39

考察 48

総括 50

実験材料と機器、試薬調整 52

実験方法 56

参考文献 62

謝辞 63

略語表

本論文では以下の略語を用いた。

BSA	bovine serum albumin
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide Hydrochloride
EC_{50}	median effect concentration
CD31	cluster determinant 31
CD44	cluster determinant 44
DDW	deionized distilled water
Chol-GALA	cholesteryl GALA
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CPP	cell-penetrating peptide
DC6-14	O, O'-ditetradecanoyl-N-(alpha-trimethylammonio-acetyl) diethanolamine chloride
DMEM	DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM
DMF	N, N-Dimethylformamide
DMN	*N*-Nitrosodimethylamine
DMSO	dimethylsufoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPE	1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
g	gravity
H8	octahistidine
HA	hyaluronic acid
HARE	the hyaluronic acid receptor for endocytosis
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
hr	hour
KD	knockdown
Luc	luciferase
MEND	multifunctional envelope-type nano device
min	minute
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weight

NHS	N-Hydroxysulfosuccinimide
PA	phosphatidic acid
PBS	phosphate-buffered saline
PEI	polyethyleneimine
PdI	polydispersity index
PLL	poly-L-lysine
RHAMM	a receptor for hyaluronate-mediated motility
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
rpm	round per minute
r.t.	room temperature
SA	stearylamine
SD	standard deviation
sec	second
siRNA	small interfering RNA
STR-H8	stearylated octahistidine
STR-R8	stearylated octaarginine
$t_{1/2}$	half-life
UV	ultraviolet

序論

肝臓は人体で最大の臓器であり、タンパク質や脂質合成、糖、エネルギーの代謝などの生命維持機能の他に、有害物質などの処理も行っており、生命維持には欠かすことが出来ない。また、肝臓全体の 75 %を除去しても、十数ヶ月で元の大きさにまで回復する他の臓器にはみられない程の自己回復力もある。そして、肝臓は、主に代謝や合成を行う肝臓実質細胞とその他の非実質細胞に分けて考えられている。この非実質細胞は肝類洞内皮細胞、星細胞、ピット細胞、クッパー細胞などに分類されており、肝臓での細胞の構成比や働きは表のようになっている（table 1）。

非実質細胞が構成する類洞は、血液を介した肝細胞への生体維持物質の受け渡しを行う場である。そのため、肝臓類洞内皮細胞には他の内皮細胞ではみられない 100 nm 前後の穴のあいた篩板構造(フェネストラ)を有している[1]。肝硬変時には、このようなフェネストラがみられなくなり、さらには血管構造が破断する[2]。肝臓の分子生物学的なサイエンスは血液学や免疫学と比べ遅れているとも言われているが、近年になり、細胞の分離や培養、遺伝学的解析技術の開発が進み、肝臓の発生、分化、再生、病態などのメカニズムが解明されている。特に、肝臓の再生には、内皮細胞と実質細胞との相互作用が重要であるという報告[3]も為されており、肝臓の非実質細胞が注目されつつある。しかし、肝非実質細胞を標的とした肝疾患治療薬の応用例は未だ皆無である。その要因の 1 つには、肝臓非実質細胞に送達可能なキャリアの不足があげられる。

分類	割合	細胞の種類	主な機能
肝臓実質細胞	6 ～ 8 割	実質細胞 （肝細胞）	糖 タンパク質　代謝 脂質 アルコール 薬物
肝臓非実質細胞	2 ～ 4割	内皮細胞 クッパ-細胞 星細胞 マクロファージ 樹状細胞	老廃物の除去 異物の除去 有害物質の処理 ビタミンＡの貯留 コラーゲン線維の産生

Table 1. 肝臓の細胞と種類

従来、肝臓を標的とするキャリアと言えば、肝実質細胞を標的とする DDS を指すことが殆どであった。肝実質細胞を標的とするキャリア設計は、肝臓類洞内皮細胞にあいたフェネストラを通過可能な 100 nm 以下の小径粒子を調製する、所謂パッシブターゲティングと呼ばれる戦略を取る例が多かった。また、リポソームがアポリポタンパク質などを介して、肝実質細胞へと取り込まれることが報告されており[4]、特段の工夫を施すことなく、静脈内投与されたリポソームは肝実質細胞へ移行することが可能である。一方、肝類洞内皮細胞や星細胞といった非実質細胞においては、このような受動的な送達メカニズムに関する報告は無く、リガンドを介したアクティブターゲティングでの細胞標的が必要となると考えられる。

当研究室では、非ウィルスベクターである MEND（多機能性エンベロープ型ナノ構造体）の開発を進めてきた（fig. 1）。MEND は凝縮化した核酸コアを脂質膜で封入した構造をしている。また、脂質膜に機能性素子（PEG、標的化リガンド、膜透過性ペプチド）を修飾することで、体内動態と細胞内動態の両制御を可能とした[5]。

核酸の中でも siRNA を搭載した MEND を in vivo で機能させる送達システムとするには、標的とする組織へ MEND を送達させる『体内動態の改善』と効率的に作用を発現する『細胞内動態の改善』が不可欠である。本研究では、MEND を用いて肝臓非実質細胞を標的可能とする siRNA キャリアの開発を行うために、下記のアプローチを行った。

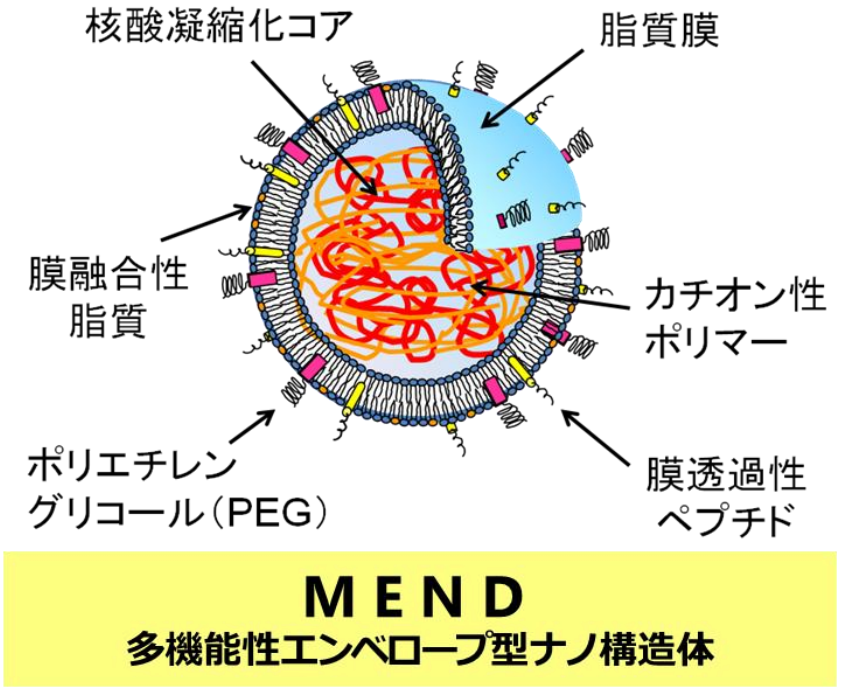


Figure 1. MEND の模式図

第 1 章は、組織標的リガンドを介したアクティブターゲティングを可能とする薬物送達キャリアの構築を行うために、肝類洞内皮細胞に着目した。肝類洞内皮細胞は、類洞を構成する非実質細胞群内でも血管に面していることから容易にキャリアの構築が可能と考えた。肝類洞内皮細胞標的リガンドはヒアルロン酸に注目し、ヒアルロン酸の脂質誘導体を作成した。このヒアルロン酸脂質誘導体を修飾したリポソームを使用して、肝類洞内皮細胞に標的可能なキャリアの開発に取り組んだ。

第 2 章は、キャリアが標的部位に到達後、細胞内で siRNA が効率的に作用させるための細胞内動態に着目した。これまで、MEND はエンドソームから脱出のリポソーム膜の脱被覆化など改良が行われてきた[7]。そこで今回は、エンドソーム脱出後の細胞内動態に注目し、現在よりも効率の良い siRNA キャリアの開発に取り組んだ。

第 3 章は、肝疾患の中でも肝非実質細胞との関係性が明らかになっており、治療薬の開発が進んでいる肝線維化に着目した。肝線維化の悪化した状態は肝硬変と呼ばれ、進行すると肝がん。肝線維化は、組織内にコラーゲン線維が沈着することにより起こる。肝臓を構成する細胞の内、主にコラーゲン線維を産生するのは肝星細胞である。正常時の肝星細胞は、細胞内にビタミン A を貯留する機能も備えていることから、ビタミン A を構造中に持つ脂溶性物質を MEND に組み込みで肝星細胞の標的化が可能であると考えた。そこで、このビタミン A を構造中に含有する MEND に siRNA を搭載することで、肝線維化の治療キャリアの開発に取り組んだ。

第１章

肝類洞内皮細胞を標的とするキャリアの開発

緒言

類洞を構成する細胞群の内、肝類洞内皮細胞は血管壁を形成する。そのため、血液中の薬物送達キャリアは容易に肝類洞内皮細胞を標的可能と考えた。また、肝硬変や線維症、門脈高血圧症などの肝疾患には、下記のようなメカニズムによる肝臓類洞内皮細胞の機能不全がかかわっていることが明らかになっている[8]。肝類洞内皮細胞には、他の血管内皮細胞には見られない、フェネストラという小孔が存在する。しかし、何らかの原因でこの小孔が消失し、リポプロテインが小孔を介して実質細胞へ移行することが難しくなるために、脂質異常症へ進行するとも報告されているこのような類洞内皮特殊な構造は病態とも関連していることが知られている[9]。このように、近年になり、肝類洞内皮細胞と様々な疾患との関係が明らかにされてきており、治療やメカニズムの解明にも、肝類洞内皮細胞標的薬物送達キャリアの開発が重要であると考えられる。

ヒアルロン酸（HA）は、N-アセチル-β-D-グルコサミンとβ-D-グルクロン酸が 1-3 と 1-4 で交互に結合した物質であり、バクテリアから脊椎動物まであらゆる生物に存在している[10]天然起源である非免疫性のアニオン性の生体物質である。そして、人体のヒアルロン酸の体内動態は分子量の大きさにより 2 つに分けられる[11]。分子量の大きいヒアルロン酸リポソーム（～1 MDa）の場合には、リンパ管へ移行し 85 %が分解される。他方、小さな分子量のヒアルロン酸（～100KDa）の場合には、主に肝臓の内皮細胞へ移行した後に分解される。肝臓の類洞内皮細胞上には、CD44[12]や RHAMM[13]、HARE[14]などのヒアルロン酸受容体が存在するため、血中に投与されたヒアルロン酸は肝臓の類洞の内皮細胞に集積する。この性質から、ヒアルロン酸は類洞血管内皮細胞の薬物送達のツールとして利用されている[15]。

薬物送達に標的リガンドを用いる場合は、その受容体との結合などを考慮する必要がある。ただ単純にリポソーム上に提示させれば良いわけではなく、受容体と相互作用する適切な距離・配置などを考慮する必要がある。そのためにも、薬物送達キャリアへのリガンド結合方法や修飾方法は重要な要素である。リポソームはリガンドの脂質誘導体を用いるとリガンドの提示方法や修飾量の変更が簡単にできる点で優れたキャリアである。本章では、ヒアルロン酸をリポソームに対し「静電的相互作用」あるいは「疎水的相互作用」により修飾させた場合の体内動態の違いを評価することにより、ヒアルロン酸のリポソームへの修飾方法がリガンドの標的化能に与える影響を検証した。

結果

1.1 肝臓、初代培養細胞におけるヒアルロン酸の局在の確認

HA が肝臓類洞内皮細胞に集積するか否か確認するため、蛍光で標識した HA を静脈内投与後、肝臓における局在を調べた。Fig. 2 に示したように、投与した HA からシグナルが肝臓切片で確認された。さらに、これらのシグナルの多くが内皮のマーカー遺伝子として知られる CD31 と共局在していた（fig. 2, c)。次に、HA の細胞取り込みをマウスの初代肝臓内皮細胞と初代実質細胞を用いて評価した。HA は肝臓内皮細胞に取り込まれていた（fig. 2, d)。一方、肝臓実質細胞の場合では、シグナルは検出されなかった（fig. 2, e)。従って、HA は実際に肝臓類洞類洞内皮細胞に集積することが示唆された。

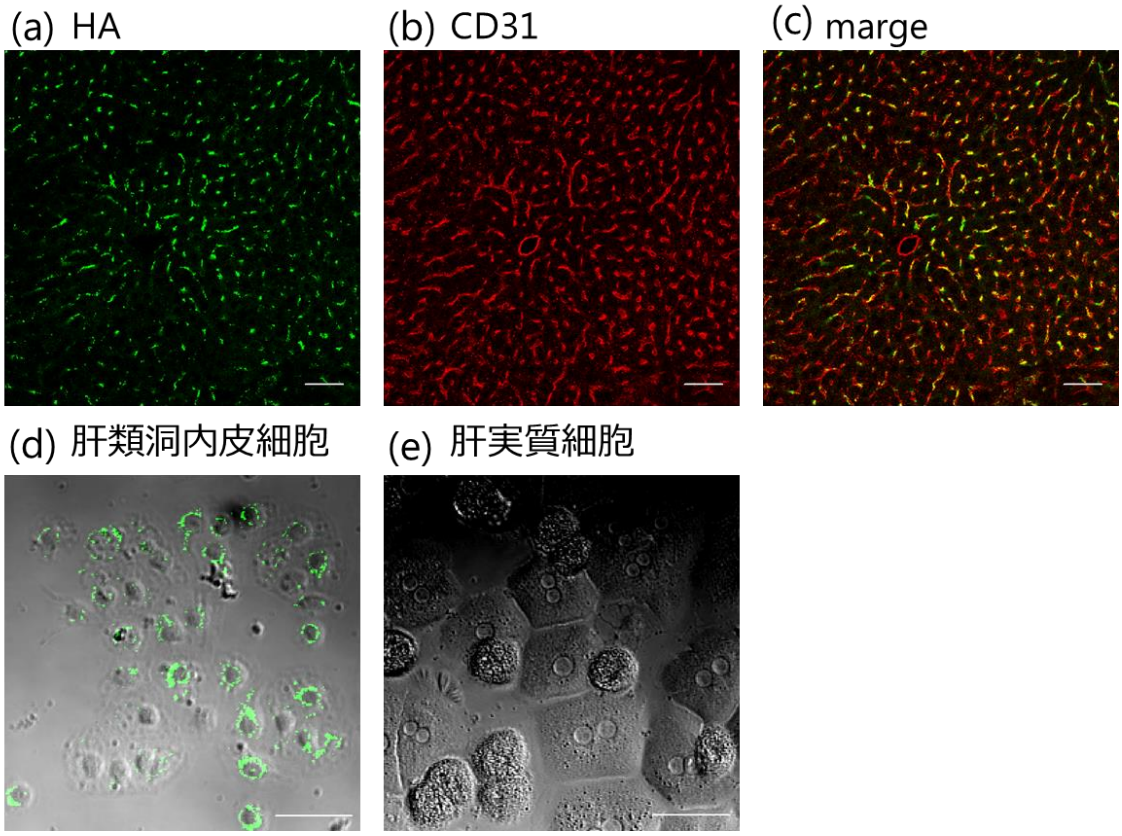


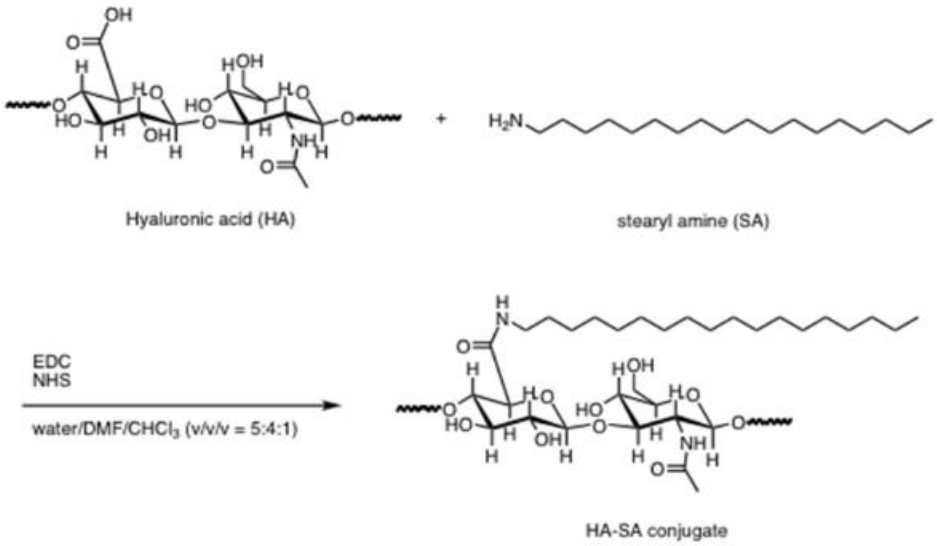
Figure 2. 肝臓、初代培養を用いたヒアルロン酸の局在の確認

蛍光修飾ヒアルロン酸をマウス尾静内投与 1 時間後、肝臓を回収し解析した（a） ～ （c)。（a）緑 : 蛍光（FITC）修飾ヒアルロン酸、（b）赤 : CD31、（c）黄 : HA と CD31 の共局在。初代培養細胞を蛍光修飾ヒアルロン酸で 3 時間処理した（d） ～ （e)。（d）初代肝類洞内皮細胞、（e）肝実質細胞。Bars : 50 μm。

1.2 ステアリルアミン化ヒアルロン酸（HA-SA）の合成と特徴

HA は D-グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンが―1，3 と―1，4 グリコシド結合した直鎖状のポリマーである。fig. 3 に HA とステアリルアミン（SA）の合成過程を示した。D-グルクロン酸由来のカルボン酸と SA のアミノ基をアミド結合により結合させ、HA-SA を合成した。この際、D-グルクロン酸由来のカルボン酸の活性化の為に、N-（3-Dimethylaminopropyl）-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride （EDC） と N-Hydroxysuccinimide（NHS）を 1 等量添加している。反応を終えた後、HA-SA 溶液の透析を行い精製し、^{1}H NMR で同定した。合成後の HA-SA（fig. 3, b, 2）は、合成前の HA（free-HA）（fig. 3, b, 1）では見られなかった SA のメチレン（CH3（C**H2**）16CH2NH2）のシグナルが確認された。また、HA の N-アセチル基（NHCO**CH3**）と SA のメチレン基のシグナルより SA の導入率を算出した。その結果、今回使用した HA-SA は HA 1 分子中に SA を 18%導入されていることが明らかとなった。

(a)



(b) NMR

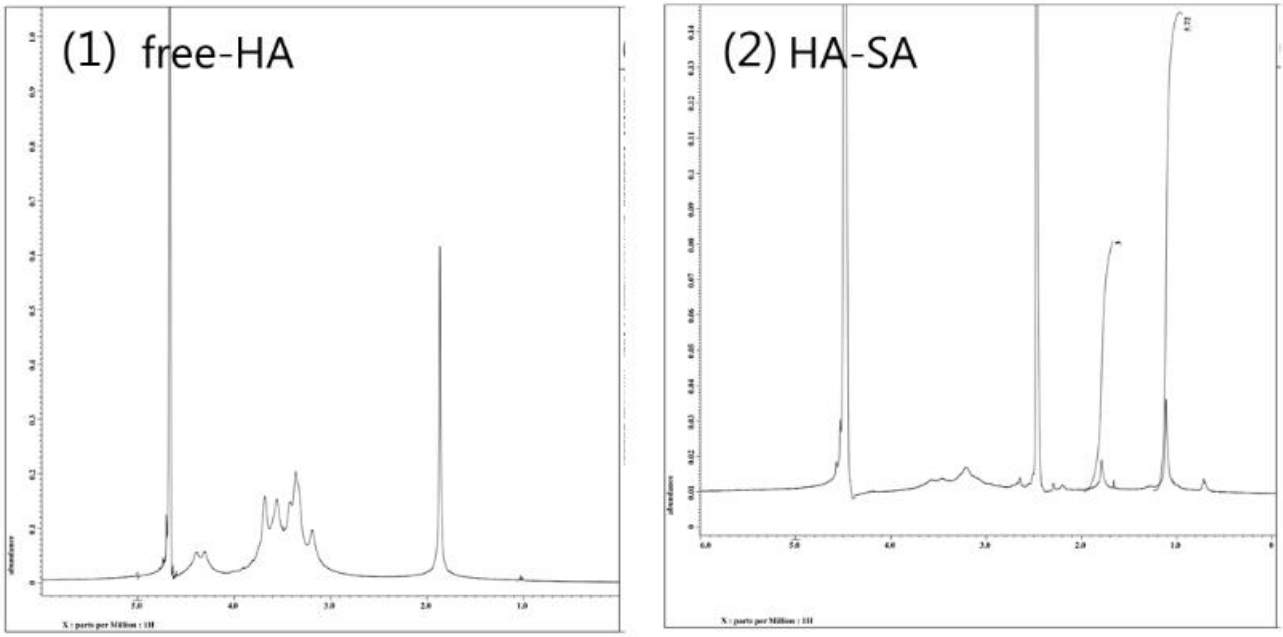


Figure 3. HA-SA 合成経路と合成品の NMR 測定結果

（a）HA-SA は、HA に SA を EDC を使用し結合した。

（b）NMR の合成結果、（1）合成前 HA（2）HA-SA。

1.3 ヒアルロン酸修飾リポソームの物性

Fig. 4 にリポソームの模式図を示した。赤色はリポソームの脂質膜を表し、青色は HA を表した。DC6-14/DOPE/chol=40/30/30 の脂質組成からなるリポソームを調製した。カチオン性脂質である DC6-14 を含むため、リポソームの表面が正に帯電した。 このリポソームを用いることで、静電的相互作用を介した free-HA 修飾リポソーム（fig. 4, a）と疎水性相互作用を介した HA-SA 修飾リポソーム（fig. 4, b）を得た。Table 2 に 2 種類のヒアルロン酸を修飾したリポソームの物性を示した。どちらの方法でヒアルロン酸をリポソーム表面に結合させた場合も、ヒアルロン酸の修飾量依存的に粒子径が増大する傾向が認められた。また、リポソームの表面電位を表すゼータ電位についても修飾量依存的に低下する傾向が見られた。このために、ヒアルロン酸のリポソーム表面に修飾が示唆された。

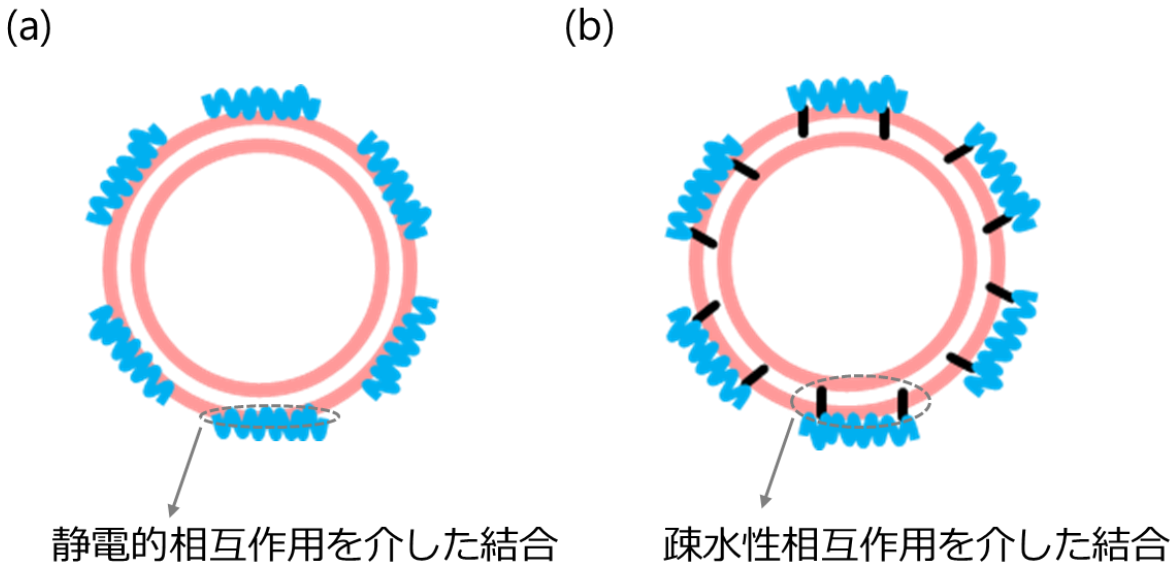


Figure 4. リポソームの模式図

（a）free-HA 修飾リポソーム、（b）HA-SA 修飾リポソーム

(a) free-HA修飾リポソーム

HA 修飾量	粒子径 (nm)	ζ電位 (mV)	PdI
0 mol%	108±18	40±12	0.31±0.12
0.1 mol%	177±18	29±6.0	0.40±0.26
1.0 mol%	227±5.4	-23±4.3	0.18±0.07

(b) HA-SA修飾リポソーム

HA-SA 修飾量	粒子径 (nm)	ζ電位 (mV)	PdI
0 mol%	119±20	57±10	0.46±0.05
0.1 mol%	159±15	42±12	0.35±0.01
1.0 mol%	254±19	-28±1	0.26±0.04

Table 2. リポソームの物性

1.4 ヒアルロン酸修飾リポソームの体内分布

リポソームを放射性同位体（^{3}H-CHD）で標識し、リポソームを尾静脈内投与後 10 分の肝臓と肺のリポソームの集積量を放射活性で評価した。free-HA 修飾リポソーム投与群は、未修飾リポソーム（0 mol%）投与群に比較し、肝臓でのリポソームの集積量は有意に低下した（fig. 5, a)。一方、肺でのリポソームの集積量は有意な差がなかった（fig. 5, b)。HA-SA 修飾リポソーム投与群は、HA-SA を 1 mol%修飾したリポソーム投与群が未修飾リポソーム投与群に比べ、肝臓でのリポソームの集積量が 40 %以上上昇した（fig. 5, c)。反対に、肺でのリポソームの集積量は有意に減少した（fig. 5, d)。

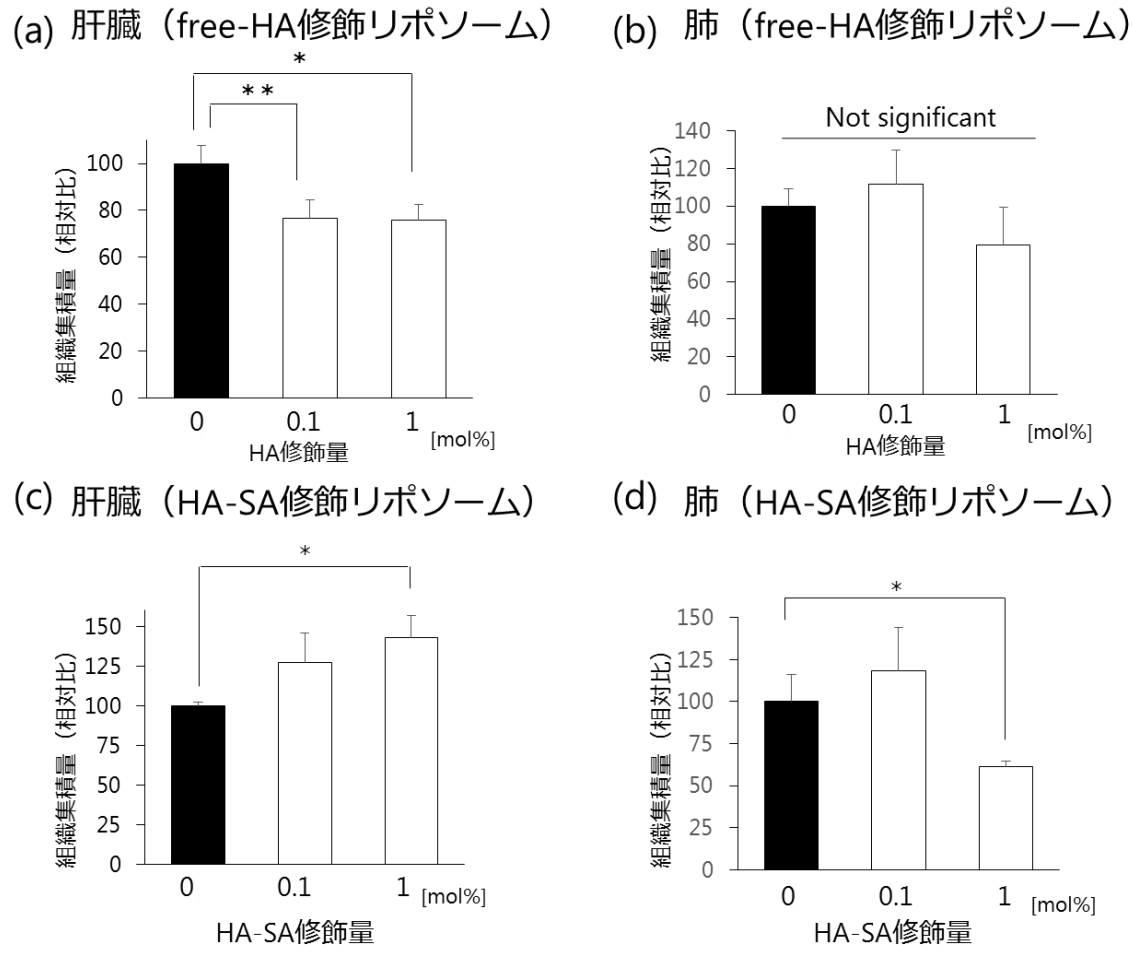


Figure 5. 臓器におけるリポソームの集積量

放射性同位体（^{3}H-CHE）標識した free-HA 修飾リポソームをマウス静脈内投与 10 分後の（a）肝臓と（b）肺での集積量。HA-SA 修飾リポソームを投与した場合の（c）肝臓と（d）肺での集積量。(Mean ± S.D.、n = 3、one-way ANOVA、* : $p<0.05$、** : $p<0.01$)

1.5 HA-SA 修飾リポソームの経時的集積量の変化

HA-SA 修飾（5 mol%）リポソームの肝臓と肺の集積量の経時的変化（リポソーム投与後 3 分から 30 分）を放射性同位体で標識したリポソームの放射活性で評価した。HA-SA 修飾リポソームの肝臓での集積量は、未修飾リポソームに比べ、投与後 3 分で有意に増加した（fig. 6, a）。一方で、肺でのリポソームの集積量は 3 分から 30 分で有意に減少した（fig. 6, b）。

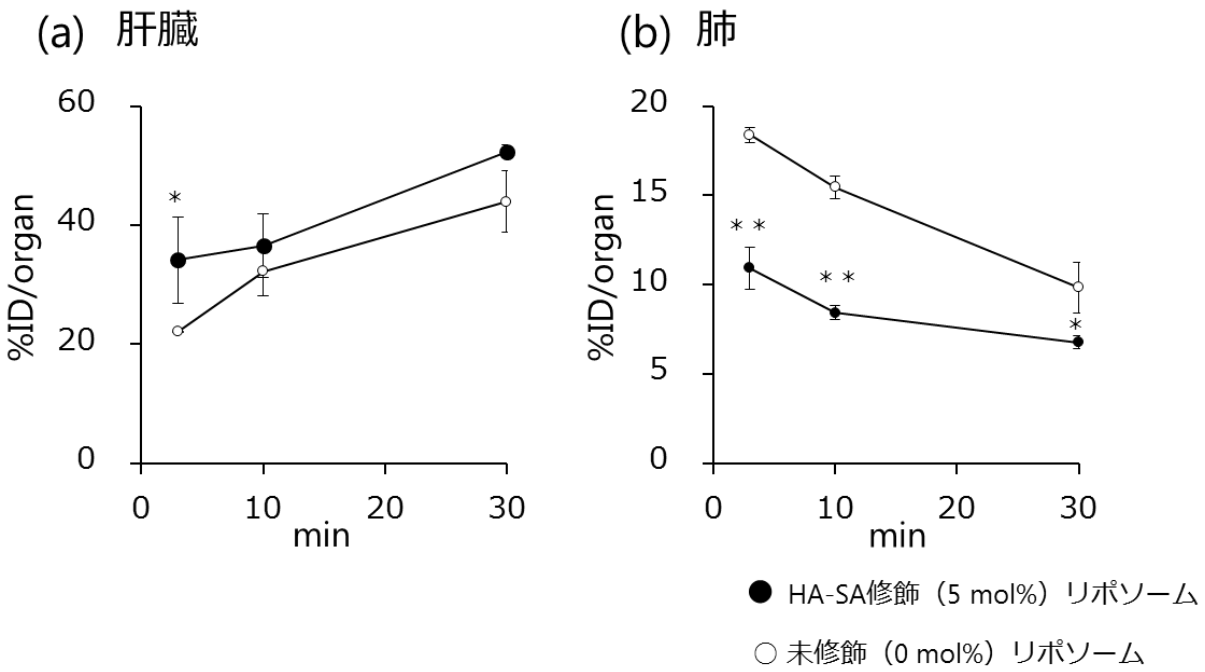


Figure 6. 時間経過による HA-SA 修飾リポソームの集積量

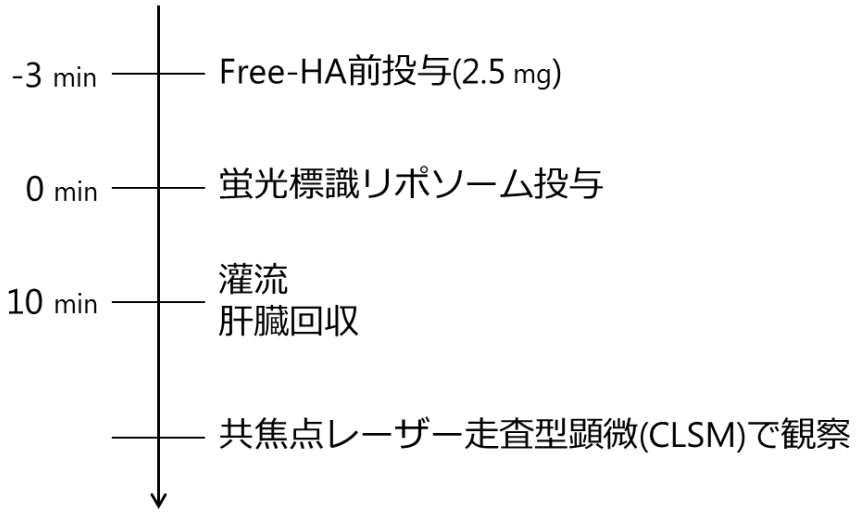
放射性同位体（^{3}H-CHE）標識した HA-SA 修飾リポソームをマウス静脈内投与後の臓器の集積量。経過時間は 3 分、10 分、30 分。○：未修飾リポソーム、●：HA-SA 修飾リポソーム。（a）肝臓と（b）肺。（Mean ± S.D.、n＝3、one-way ANOVA、*：$p<0.05$、**：$p<0.01$）

1.6 HA-SA 修飾リポソームの肝臓での局在解析

HA-SA 修飾リポソームの肝臓での局在を調べるために、蛍光で標識したリポソームを尾静脈内投与後、肝臓を共焦点レーザースキャン顕微鏡（CLSM）により観察を行った。HA-SA 修飾リポソーム（1 mol%）は未修飾リポソームに比べ血管の構造上に集積していた（fig. 7 a, b）。

さらに、HA-SA 修飾リポソームが肝類洞内皮細胞の HA 受容体による細胞取り込みを評価するため、CLSM を用いて評価した。リポソーム投与前に、free-HA 水溶液を大量に尾静脈から投与した（下図参照）。未修飾リポソーム投与群では、free-HA 水溶液前投与無し・有りにかかわらず、分布パターンにほとんど変化がみられなかった（fig. 7 a, c）。しかし、HA-SA 修飾リポソーム投与群では、free-HA 水溶液前投与後のリポソームのシグナルは減少した（fig. 7 b, d）。

顕微鏡観察による実験過程



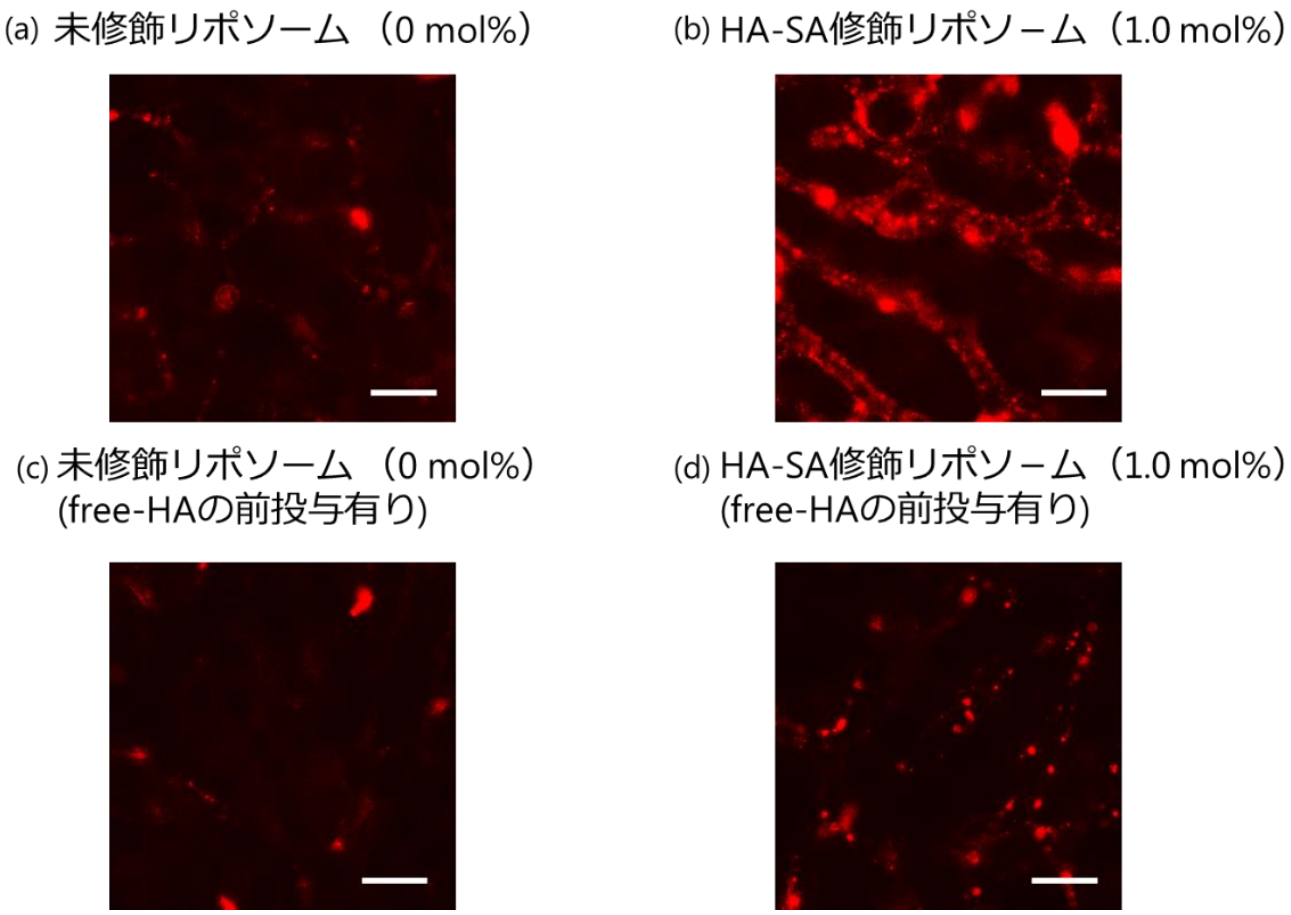


Figure 7. 肝臓におけるリポソームの局在評価

過剰の free-HA（2.5 mg/mouse）をマウスに投与 3 分後、蛍光標識（Rhodamine-DOPE）した HA-SA 修飾リポソームを投与した。10 分後に肝臓を観察して臓器表面を CLSM で観察した。Bars：50 μm

考察

はじめに、静脈内投与した蛍光標識 HA は肝類洞内皮細胞に集積した（fig. 2 a)。また、初代培養肝類洞内皮細胞は蛍光標識 HA を吸収した（fig. 2 d)。これらの結果は、肝類洞内皮細胞が *in vitro* と *in vivo* で HA を取り込むことを示唆した。そのため、HA には肝類洞内皮細胞標的の可能性があることが示唆された。

次に、リポソームに疎水性相互作用を介した修飾を行うための HA 誘導体の合成を行い、ヒアルロン酸のグルクロン酸のカルボン酸に対して SA を反応させることで、アミド結合を介して長鎖アルキル基を付加した。今回使用した HA-SA は HA 1 分子中に SA を 18 %導入したが、水—DMF—$CHCl_3$ 溶媒中で SA や EDC、NHS の量を制御することで、様々な SA の導入率の違う HA-SA を合成した。導入率が 50 %を越えた HA-SA はほとんど水に溶解しなかった。これは、HA に長鎖アルキル基を付加する際、HA の溶解性に関わっているカルボキシ基を失っていることが大きな原因であると示唆された。さらに、100 %SA を導入した HA-SA が得られた。しかし、これは多くの溶媒（水や DMF、クロロホルム）に対して溶解しないために扱いにくく、リポソームへの修飾も不可能であった。今回の場合、リポソームへの修飾などを考慮しても、18 %の導入率で十分であると考えた。

HA-SA をリポソームと混ぜ合わせたとき、総脂質量に対して 1 mol%の修飾量は 1 リポソームの表面を覆うのに十分と考えられた。それ以上の量をリポソームに修飾しても、ζ 電位は低下しなかったからである（data not shown)。また、粒子径も 200 nm 以上となりフェネストラの通過を低下させ、肝臓実質細胞への移行性が低下すると考えられた。Free-HA を修飾したリポソームのζ 電位も同様の傾向を示した。

しかし、両者の肝臓での集積分布は違った。我々は静電的相互作用を介した free-HA 修飾リポソームは未修飾リポソームよりも肝類洞内皮細胞に集積すると考えた。しかし、結果は予想した結果とは異なり、肝臓での free-HA 修飾リポソームの集積量は、free-HA 修飾量依存的に減少した（fig. 5 a)。この結果はリポソーム表面の free-HA とリポソームが血液中で安定しておらず、肝類洞内皮細胞までリポソーム自体を送達出来なかったため、肝臓での集積量の減少に繋がったと考えられた。それに対し、リポソームと疎水相互作用を介したヒアルロン酸の修飾方法は、肝臓でのリポソームの集積量は増加した（fig. 5 c)。この結果から、free-HA と比較し、血流でもリポソーム表面にヒアルロン酸が保持されていると考えられた。また、リポソーム表面でのリガンドのトポロジ

ーをコントロールにも有効に関わっているのではないかと考えられた。

今回合成した HA-SA はリポソームと混ぜ合わせ、インキュベーションすることで修飾可能である。これまでの報告で、HA 修飾リポソーム作成には多くの反応過程と長い時間を要し、かつ HA 修飾量の調整は難しいと報告されている[16]。HA-SA は脂質部分とリポソームとが疎水性相互作用により結合することで、簡単にリポソームに修飾可能である。さらに、我々はステアリルアミンの脂質にアンカー作用を期待した。これまでに、ステアリルアミンと結合したペプチド（STR-R8）でリポソーム表面を修飾することで、細胞取り込みの機構が変化することが報告されている[17]。このことはステアリルアミンがリポソーム表面に HA を保持することだけではなく、リガンドとしての機能も保持が可能ということを示唆している。

顕微鏡観察の結果から、HA-SA 修飾リポソームは血管の構造上に集積していることが確認され、HA の前投与を行うと集積が減少した（fig. 7 b,d）。肝類洞内皮細胞の HA 受容体によりリポソームが取り込まれたことが示唆された。しかし、前投与後もリポソームのシグナルが観察された。これは、クッパー細胞などのマクロファージによる取り込みと示唆された。望月らは分離した内皮細胞に比べて 1/3 位の能力であるが、クッパー細胞も HA を取り込むことを報告している。また、PEG はリポソームと血液の間に水和層を作ることで、リポソームを保護する作用が報告されている[18]。今後は、PEG などをリポソームに修飾させることで、クッパー細胞などへの取り込みを抑制したキャリアの改良を行いたい。

第 2 章

細胞内動態制御 siRNA キャリアの開発

緒言

siRNA を細胞内に非ウィルスベクターで導入する際、一般的に fig. 8 で示したような過程を通過し効果を発現する。具体的には siRNA を搭載したキャリアはエンドサイトーシスで細胞に取り込まれ、エンドソームを脱出することで細胞内に siRNA が放出される。放出された siRNA はベクターと解離した後、RISC と結合し、siRNA と相補的な配列を有する mRNA を抑制する RNA 干渉[19]を引き起こす。当研究室で開発されている MEND においても同じ過程を経ていると考えられている。また、50 %の遺伝子発現を抑制するのに必要な RISC に取り込まれる siRNA 量は、44 千分子と推定されている[20]。このことから、RISC を形成する siRNA の量を増大させる戦略は、siRNA を効率的に機能させるために重要となると考えられる。

当研究室では、キャリアが細胞に取り込まれてから、RISC に取り込まれるまでの複数の過程を克服する試みを行ってきた。例えば、当研究室では pH 感受性膜融合性ペプチドである GALA を導入することで、エンドソーム脱出を促進することに成功した[21]。また、脱被覆化の最適化についても報告している。これまでの、siRNA 封入リポソームは単純水和法により作成していることから、膜枚数が制御できず siRNA を覆う脂質膜が過剰となっていることが問題となっていた。当研究室の秋田らは、SUV と pDNA コアを混合することで pDNA を覆っている脂質膜の枚数を 2 枚に制御する $MEND_{SUV}$ 法という技術の開発に成功している[22]。これにより、内封した核酸が脂質膜から脱被覆する過程を制御することが可能になった。更なる改良のために、私は MEND のコア粒子から siRNA が乖離する、いわば”脱凝縮”の過程に着目した。このコア粒子は、MEND に効率的に封入可能にする一方で、細胞質中ではポリカチオンと核酸が解離せず、効果が減弱している可能性が示唆された。コア粒子がエンドソームまでは siRNA と強固に結合するものの、細胞質に放出されると脱凝縮のしやすい性質を持つコア粒子を調製できれば、さらなる高活性の $MEND_{SUV}$ が形成できるのではないかと考えた（fig. 8）。このために、コア粒子の細胞室へ移行した際に、コア粒子を形成するポリカチオンに pH に応答するポリカチオンを使用することを考えた。塩基性アミノ酸であるヒスチジンは等電点が 7.59 であるために、酸性溶液ではカチオン性に帯電するが、中性溶液では中性になり帯電しなくなる。そこで、従来 siRNA のパッケージングに使用してきたステアリル化オクタアルギニン（STR-R8）から、ヒスチジンを用いたステアリル化オクタヒスチジン（STR-H8）をパッケージング剤として用いることとした。すなわち、siRNA

コアの調製する際の溶液の pH を酸性に調製することで、siRNA が効率的にパッケージングされる一方で、siRNA コアが細胞質に放出された際には、STR-H8 の正電荷が失われ、効率的にコア粒子の崩壊が起こることを期待した。本章では、キャリアの細胞内動態に着目し、pH 応答性ポリカチオンを用いた siRNA キャリアの開発を目指した。

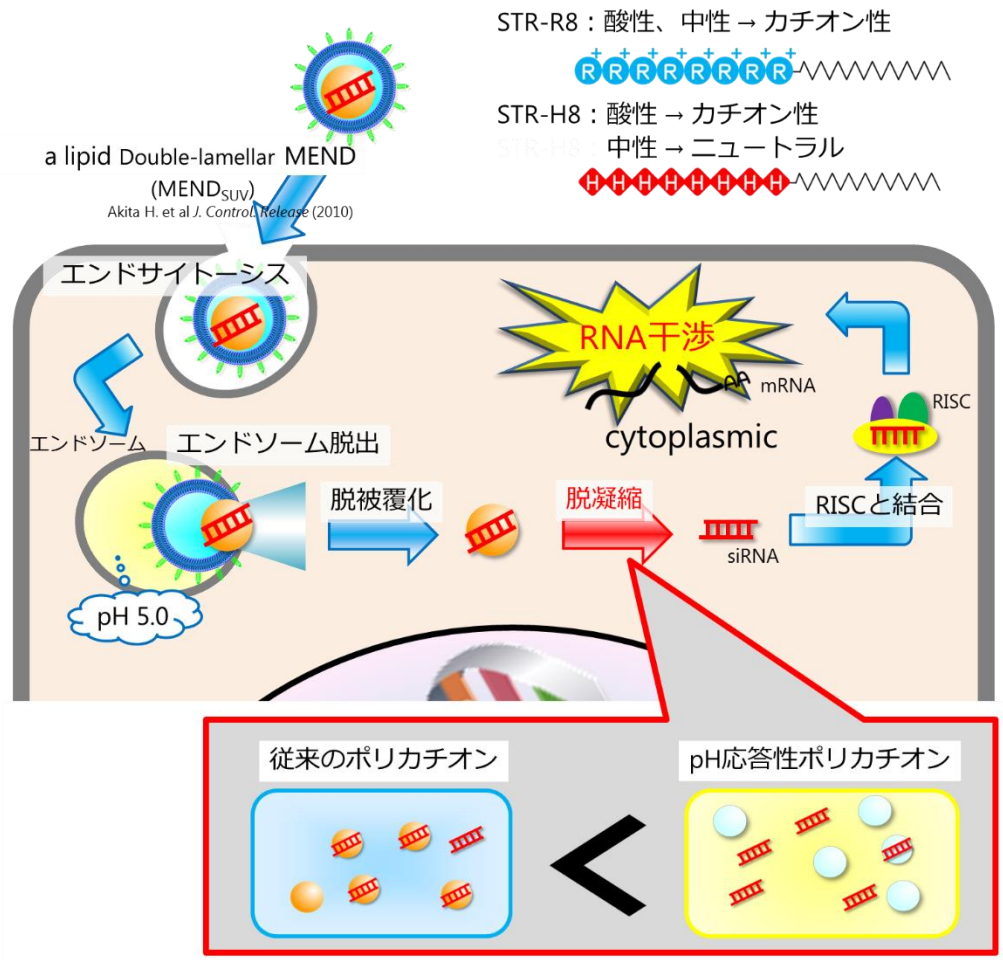


Figure 8. siRNA の細胞内動態と pH 応答性ポリカチオンによる戦略

結果

2.1 MEND の物性評価

コア粒子及び MEND の粒子径、ζ 電位、PdI を測定した。コアの状態では粒子径では STR-R8/siRNA コアの方が STR-H8/siRNA コアに比べて小さいものの、PdI やζ 電位には違いがみられなかった（table 3. a)。このコアを脂質膜で封入した MEND にすると、粒子径、PdI、ζ 電位は両者に違いはみられなかった（table 3. b)。また、この MEND を使用時の pH = 7.4 にバッファーを変化させたときの、粒子径、PdI、電位と siRNA の封入率を測定した（table 3. c)。この場合、作成時の MEND と同様にポリカチオンの種類による違いはみられなかった。また、siRNA の MEND 内部への封入率は 8 割から 9 割と高かった。以上より、MEND はポリカチオンによる違いで粒子径、PdI、ζ 電位に差はなく、今回新たに用いた STR-H8 でも、STR-R8 を用いた場合と同様の高い封入率効率と同様の物性が得られることが明らかとなった。

(a) コア粒子の物性（pH = 4.0 ）

	粒子径（nm）	ζ 電位（mV）	PdI
STR-H8コア	124±8	0.17±0.01	15±2
STR-R8コア	57±4	0.22±0.03	11±1

(b) MENDの物性（pH = 4.0 ）

	粒子径（nm）	ζ 電位（mV）	PdI
$MEND_{STR\text{-}H8コア}$	146±6	0.13±0.01	53±2
$MEND_{STR\text{-}R8コア}$	189±45	0.14±0.05	57±4

(c) MENDの物性（pH = 7.4 ）

	粒子径（nm）	ζ 電位（mV）	PdI	siRNA封入率（%）
$MEND_{STR\text{-}H8コア}$	176±6	35±4	0.17±0.02	91±2
$MEND_{STR\text{-}R8コア}$	224±60	38±4	0.25±0.13	80±9

Table 3. 酸性・中性溶液におけるコア粒子、MEND の物性

2.2 コア粒子からの siRNA の放出率

siRNA とポリカチオン（STR-R8 または STR-H8）からなるコア粒子からの siRNA の放出率を測定した。RNA に特異的にインターカレートすることで蛍光を発する、蛍光プローブの RiboGreen を使用した。コア粒子から siRNA が解離することで、解離した siRNA と RiboGreen が結合することで蛍光を発する。縦軸は、溶液中に存在する全量の Free siRNA の蛍光強度を基準（=1）とした際の各サンプルの蛍光強度を表しており、解離した siRNA の割合を示していると考えられる。pH=5（酸性）のとき、STR-R8/siRNA コアの蛍光強度は 0.020、STR-H8/siRNA コアの蛍光強度は 0.026 であり（fig. 9 a）siRNA は殆どがコアとして存在していることが示唆された。pH=7.4（中性）のとき、STR-R8/siRNA コアの蛍光強度は 0.0077 と酸性条件時と同様にほとんど検出されなかったのに対し、STR-H8/siRNA コアの蛍光強度は 0.42 と siRNA の解離を大幅に改善した（fig. 9 b）。

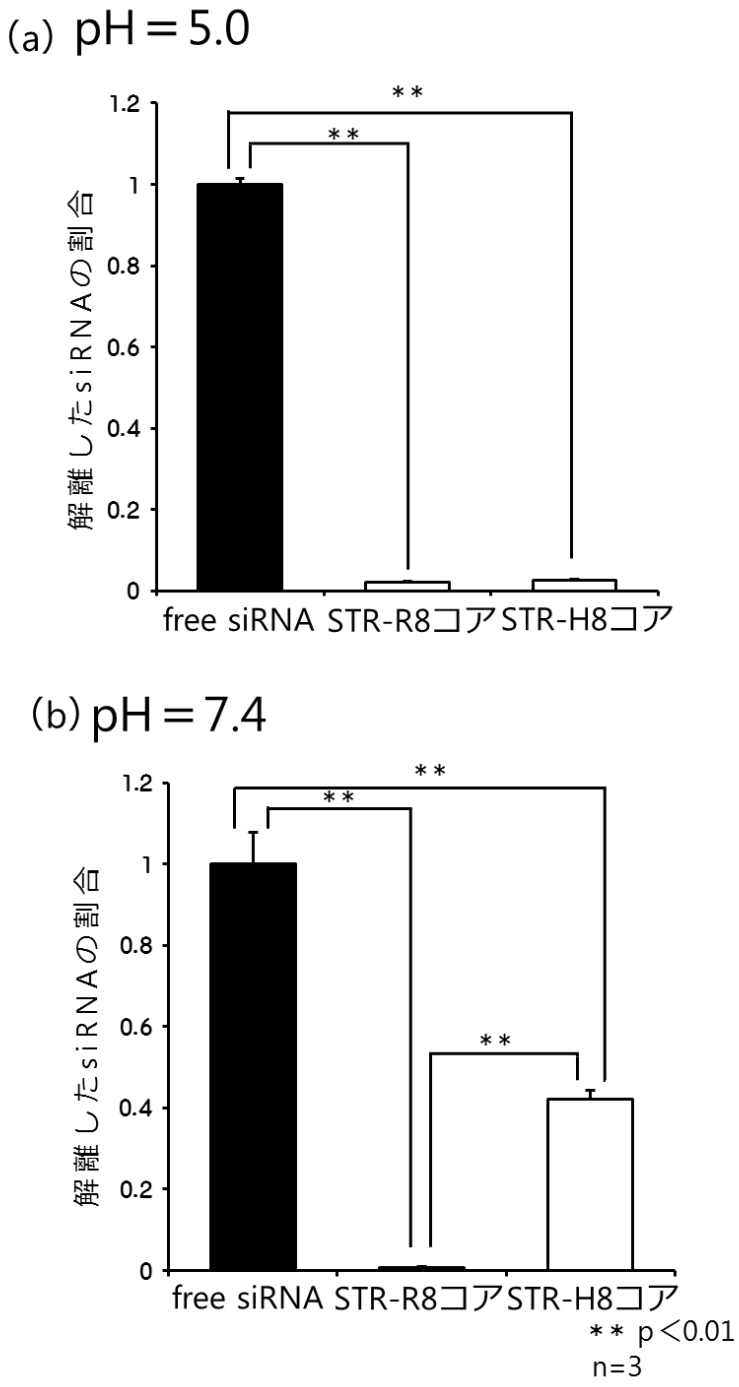


Figure 9. 酸性、中性溶液中におけるポリカチオンと siRNA の結合

pH の違う溶液中の STR-R8 コア粒子と STR-H8 コア粒子からの siRNA の解離度合いを測定した。(a) pH = 5.0 の溶液中におけるコア粒子から解離した siRNA の割合、(b) pH = 7.4 の溶液の場合。 (Mean ± S.D.、n = 3、one-way ANOVA、＊＊：$p<0.01$)

2.3 細胞内の siRNA の取り込み評価

HeLa－GL3 細胞への取り込みを、FACS を用いて MEND に内封した Cy3 で蛍光標識した siRNA の蛍光強度を測定した。両ポリカチオンの違いによる MEND の細胞内取り込みに大きな違いはなかった（fig. 10）。

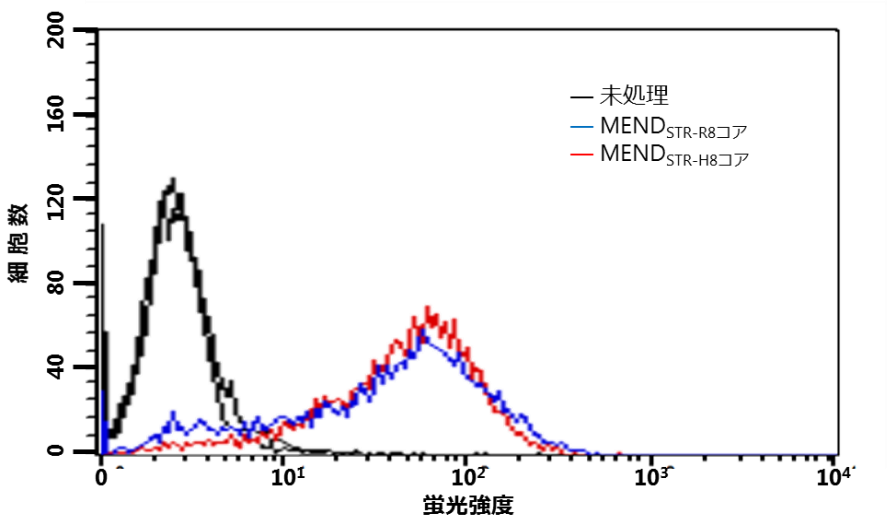


Figure 10. FACS による $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$ と $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$ の細胞取り込み評価

蛍光標識（Cy3）した siRNA を MEND（50 nM）に細胞に投与し、蛍光強度をプロットした。赤： $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$、緑：$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$、黒：未処理の細胞群

2.4 顕微鏡による細胞質内観察

中性溶液での siRNA の STR-H8 コアからの速やかな解離が、細胞質中においても同様に起こるのか否かを検証するために、細胞質内での siRNA の分布を、CLSM で観察し、siRNA の細胞質内の拡散率を評価した。

$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群では、siRNA が細胞質内で、ドット状に観察されたのに対し、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群では、siRNA が細胞内で拡散している様子が観察された（fig. 11）。

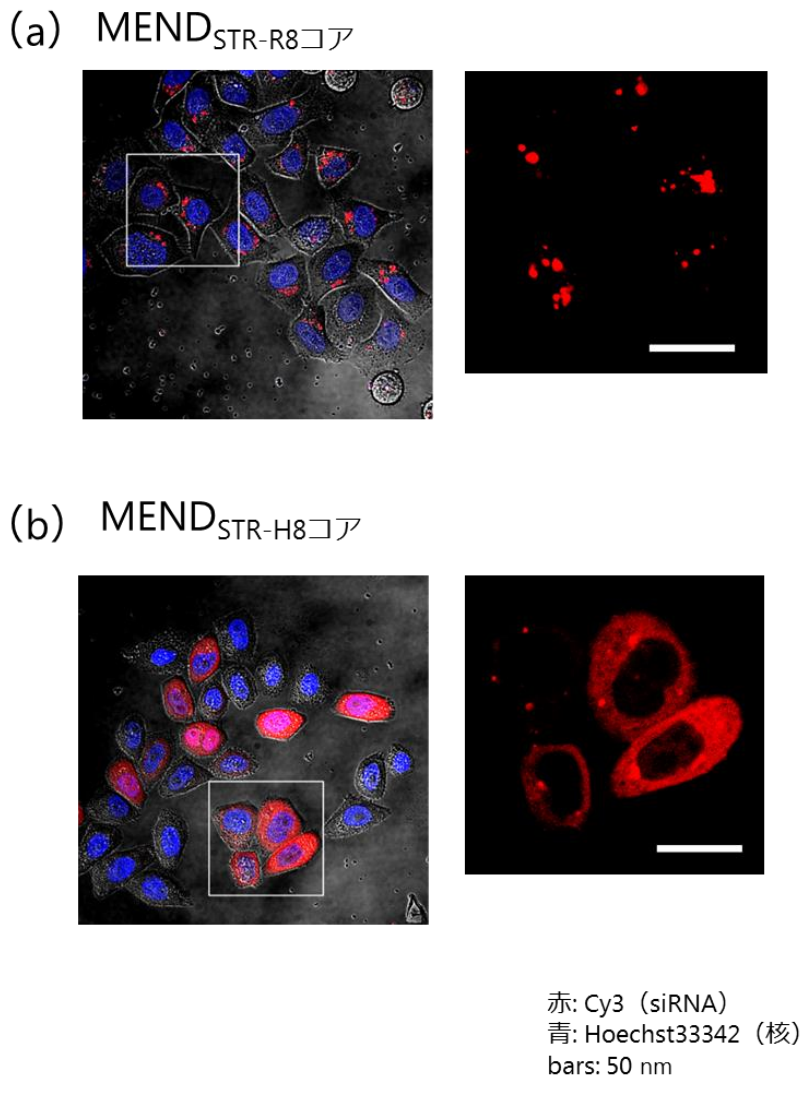


Figure 11. 細胞質中における siRNA の様子

細胞と MEND を 1 時間インキュベーションし、投与 3 時間後 CLSM で観察した。(a) $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$投与群、(b) $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$投与群。赤：蛍光標識（Cy3）した siRNA、青：核、bars：50 μm。

2.5 拡散率の算出結果

顕微鏡により得られた複数枚の画像を Image Pro Plus（ver. 7.0）というソフトで解析することにより、各細胞の細胞質内での siRNA の拡散率を算出した。拡散率は細胞 1 分子中の面積に対する、赤色の siRNA の面積の割合とした（fig. 12）。$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群の拡散率が平均 4 %だったのに対し、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の方は 23 %だった。これは、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の方が $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群よりも、5.8 倍、細胞質中で siRNA を拡散していることが示唆された。

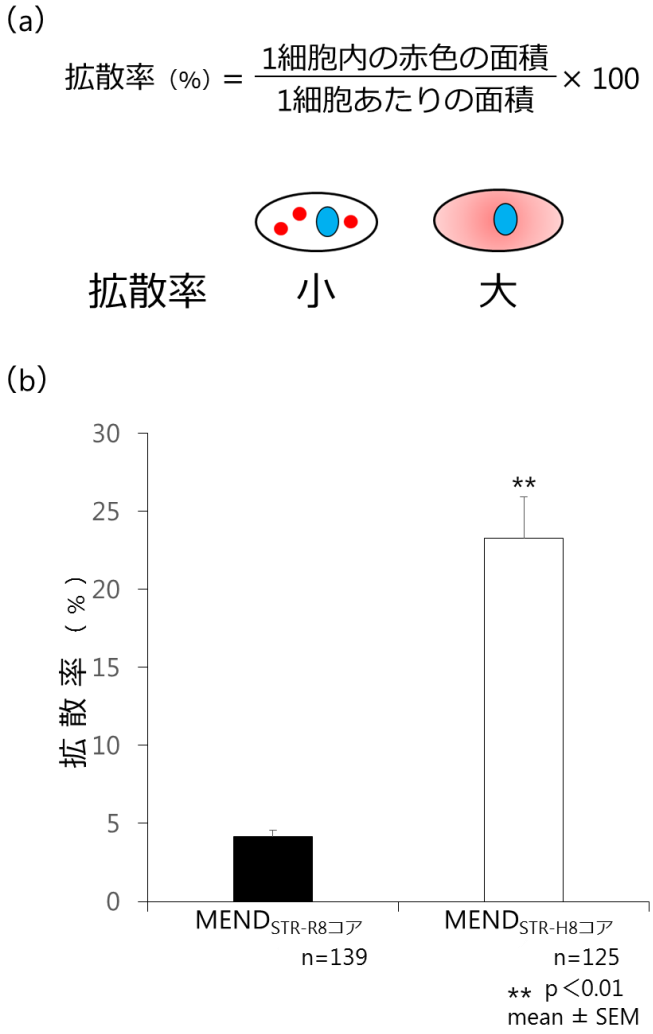


Figure 12. 細胞質内における STR-H8 コア粒子と STR-R8 コア粒子の siRNA の拡散率

細胞質内における siRNA の放出率を算出した。(a) 算出率の計算方法や模式図を示した。拡散率は細胞質内における siRNA（赤）の面積を細胞質の面積で除した割合、(b) siRNA の拡散率。黒：$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$投与群（n = 139）、白：$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$投与群（n = 125）。（Mean ± SEM、＊＊：$p<0.01$）

2.6 ルシフェラーゼ遺伝子抑制効果の経時的評価

細胞質内における siRNA の解離が短時間における MEND の活性を評価するため、ルシフェラーゼに対する siRNA を搭載した MEND を HeLa 細胞ルシフェラーゼ安定発現株（HeLa－GL3）にトランスフェクション（siRNA 濃度 50 nM）し、投与後 6、12、24 時間におけるルシフェラーゼの遺伝子抑制効果を評価した。どの時間においても、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の方が、$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群よりも有意に遺伝子抑制効果が高かった（fig. 13）。

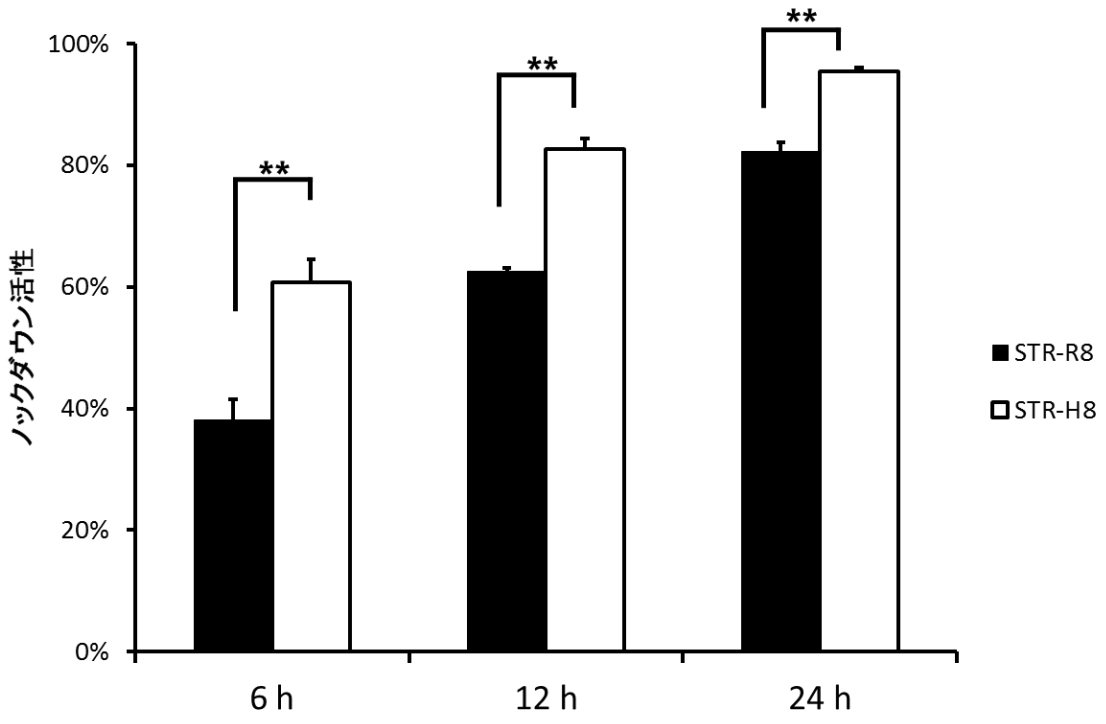


Figure 13. $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$投与群と $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$投与群の経時的遺伝子抑制効果

HeLa－GL3 細胞に対し $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$と $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$を 3 時間暴露後（siRNA 濃度 : 50 nM）、6 時間、12 時間、24 時間後の遺伝子抑制効果を測定した。（Mean ± S.D.、n = 4、＊＊ : $p<0.01$）

2.7 ルシフェラーゼ遺伝子抑制効果の用量依存性評価

$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群と $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群の用量依存性の評価を行うために、種々の siRNA 濃度で MEND を細胞に暴露した際のルシフェラーゼ遺伝子抑制効果を評価した。また、MEND の血清に対する影響も評価するため、トランスフェクション時、メディウムに血清を入れない場合と入れた場合の評価を行った。両者の MEND とも用量依存性は見られ、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の用量–反応曲線は $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群のよりも、左に大きくシフトしていた（fig. 14 a, b）。また、50 %の遺伝子抑制効果を誘起するのに必要な濃度 EC_{50} を SigmaPlot（ver. 12.3）によって算出した（table 4）。血清（–）場合は $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群が 6.50 nM、$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群が 24.12 nM であった。また、血清（＋）場合は $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群が 14.17 nM、$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群が 32.15 nM であった。

	$MEND_{STR\text{-}H8コア}$	$MEND_{STR\text{-}R8コア}$
血清(—)	6.50 nM	24.12 nM
血清(＋)	14.17 nM	32.15 nM

Table 4. MEND の EC_{50}

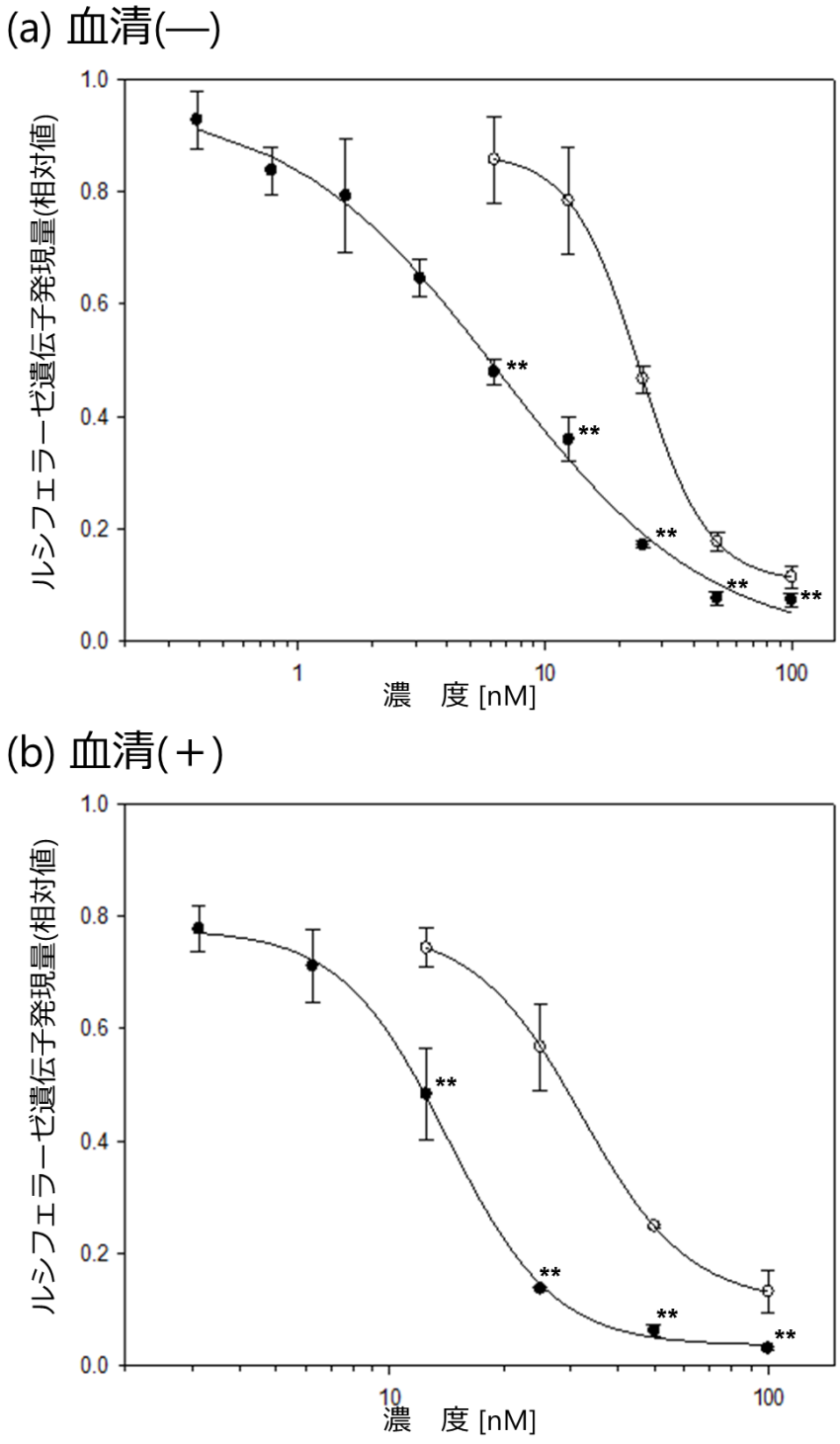


Figure 14. MEND の用量依存性評価

$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$と $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$との用量依存的な遺伝子抑制効果を評価した。HeLa－GL3 細胞に MEND を 3 時間暴露させ、細胞培養液を交換し 24 時間後のルシフェラーゼ活性を評価した。(a) 細胞培養液中血清無し、(b) 細胞培養液中血清有り。　(Mean ± S.D.、n = 4、＊＊：$p<0.01$)

考察

STR-H8/siRNA コアと STR-R8/siRNA コアにおける、ポリカチオンと siRNA 解離度合いを検証するため、蛍光強度を測定し評価した。STR-R8/siRNA コアの溶液を pH = 5.0 から pH = 7.4 へと変化させたが、相対蛍光強度に大きな変化が見られなかった。このことより、STR-R8 は溶液が酸性または中性の場合、siRNA と強固な凝集体が形成されていることが示唆された。それに比べ、STR-H8 においては、溶液の pH を中性にすること（5 → 7.4）で siRNA が 1 %から 42 %へ変化した。ことから、中性溶液で STR-H8 と siRNA の結合が低下したことが示唆された。このことより、siRNA の解離は細胞質内で十分行われていると思われた。顕微鏡の画像（fig. 11）はこの現象を表していると考えている。MEND$_{\text{STR-H8 コア}}$群は、細胞質中に siRNA の解離を促進したために、細胞質中で siRNA のシグナルが拡散しているように観察された。MEND$_{\text{STR-R8 コア}}$群においても、STR-R8 コア粒子からの siRNA 解離現象は起こると考えているが、解離した siRNA の量が少なく極僅かなため、シグナルが検出されず、細胞質内での STR-R8 コア粒子がドット状に観察されたと考えている。

短時間における MEND の活性を評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA で遺伝子抑制効果の評価より、6、12、24 時間後の活性は、どの場合においても、MEND$_{\text{STR-H8 コア}}$群の方が MEND$_{\text{STR-R8 コア}}$群に比べて高かった（fig. 13）。しかし、6 時間では MEND$_{\text{STR-H8 コア}}$群の方が MEND$_{\text{STR-R8 コア}}$群に比べ、遺伝子抑制効果が 61 %高かった。このことは、STR-H8/siRNA コアが細胞質に出ることにより、STR-H8 の電荷が中性になり早期の段階から siRNA がコア粒子から解離しやすくなったためと考えられたが、24 時間後では 15 %と遺伝子抑制効果の差が縮まった。STR-R8/siRNA コアも、siRNA の脱凝縮が進み、細胞質内の siRNA が増加したことが考えられた。しかしながら、トランスフェクション後 24 時間でも、MENDSTR-H8 コア群の方が有意に高活性であった。よって、細胞質内では解離した siRNA が多い方の活性が高くなることが示唆された。

MEND$_{\text{STR-H8 コア}}$群と MEN$_{\text{DSTR-R8 コア}}$群の用量依存性を 24 時間後における遺伝子抑制効果により評価した。さらには、MEND に及ぼす血清の影響も検討した。MEND$_{\text{STR-H8 コア}}$群の場合、血清を入れることで EC_{50} が 6.50 nM から 14.17 nM へと大幅に減弱した。それに対し、MEND$_{\text{STR-R8 コア}}$群では EC_{50} は 24.12 nM から 32.15 nM へと大きな変化がみられなかった（fig. 14）。このことから、両者における律速段階の違いが示唆

された。Felgner らはカチオン性のキャリアを使用する際、血清をメディウム中に加えることで効果が劇的に低下することを報告している[23]。$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の場合、このキャリアの電位はカチオン性を示していることから、キャリアと血清との静電的相互作用により細胞取り込みが低下したことが活性の低下に繋がったと考えられた。$MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群の場合も、同様に細胞取り込みは低下したと考えられる。しかし、$MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群に比べ活性の減弱は小さい。つまり $MEND_{STR\text{-}R8\ コア}$群の場合、律速段階は細胞取り込みではなく、STR-R8 と siRNA の解離であることが示唆された。このことからも、pH 応答性のポリカチオンの STR-H8 に比べ、ポリカチオンの STR-R8 は siRNA との細胞質での解離は悪いと考えられる。今後、さらなる高活性のキャリア開発には $MEND_{STR\text{-}H8\ コア}$群の律速段階となる、MEND の血清に対する影響を軽減する必要性があることが示唆された

ポリカチオンの使用を STR-R8 から STR-H8 へ変えることで、試験管内で評価したコア粒子からの siRNA の解離が 40 倍改善したにもかかわらず、*in vitro* で評価した EC_{50} においては 3.7 倍しか活性の向上がみられなかった。このことは、細胞質内で siRNA とキャリアが解離した後、siRNA が作用を発現するまでの過程において、他の律速段階がある示唆している。考えられる要因としては、コアと解離した siRNA が RISC に取り込まれる過程などである。今後、キャリア以外にも siRNA 自体の改良を行うことで、細胞質に放出された後の RISC を形成する過程を改善することで、より優れた siRNA 送達能が実現可能であると考えている。

また、当研究室の秋田らによって開発された、脱被覆化を向上させた $MEND_{SUV}$ の EC_{50} が 10 nM 程度であった[7]。今回 pH 応答性ポリカチオンを使用することで、同一条件ではないが 6.50 nM へ活性を向上することに成功した。これまでにも、ヒスチジンと核酸との複合体を形成させた報告[24]はあるものの、細胞質内での核酸の解離を目的とした例はなかった。本章で得られた知見は、siRNA のキャリアからの解離が律速となることを示す初めての報告であると考えられ、今後のキャリア開発に大きく貢献することが期待される。

第 3 章

肝星細胞標的とする肝線維化治療キャリアの開発

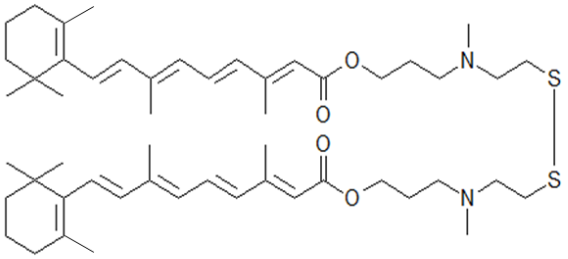
緒言

肝臓は「沈黙の臓器」と呼ばれるほど、重傷になるまで自覚症状がない臓器であると言われている。そのため、ウイルスやアルコールなどの障害を受け続けると慢性肝炎を発症する。そのうち 3 割は肝硬変へと進行し、日本全国で 50 万人いると言われ、このまま悪化すると肝がんへと進行する。肝硬変は肝線維化の重篤な症状であり、この線維化を直接治療する薬剤は現在もなく、早期の開発が望まれている疾患の一つである。代替療法として肝炎の治療が行われるが、インターフェロンなどの登場によりウイルス性の肝炎は治療されている一方で、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）などの疾患に対する薬剤はなく、線維化の原因となる肝炎の治療方法は限定的である。

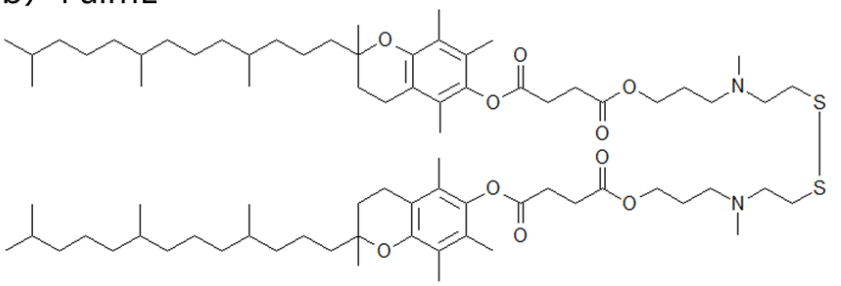
一般に肝線維化は肝臓組織内に異常に沈着したコラーゲン線維が原因とされている。ウイルスや毒で肝細胞は傷つき、傷ついた肝細胞はマクロファージなどに除去される。除去された部分を補うために、コラーゲン線維で埋められる。慢性な障害（慢性肝炎）が肝臓を持続的に傷つけ、肝細胞の破壊と修復を繰り返すが、修復が追いつかなくなるため、コラーゲン線維が組織内に大量に作られる。つまり、肝線維化治療において、肝臓組織内でコラーゲン線維を除去することが重要であると考えられる。

今回注目したのが、肝星細胞である。肝星細胞は、肝臓においてコラーゲンを産生する線維化の責任細胞と言われている[25]。また、肝星細胞はコラーゲンの産生ばかりでなく、分解の機能を有しており、肝硬変時のコラーゲンのバランスの維持に非常に重要な役割を果たしている[26]。今回、線維化治療では、肝星細胞によるコラーゲンの産生のみを siRNA を用い抑制し、肝臓に沈着したコラーゲン線維を分解する戦略を考えた。前章までに得られた知見を基に、構造内にリガンド機能と pH 応答性を有する脂質様物質を用いた。当研究室の秋田らは、酸性環境と細胞内還元的環境に応答して活性化を受ける脂質様物質 Palm（ss-cleavable Proton-Activated Lipid-like Material）の開発に成功している[27]。さらに、本章では Palm の足場として脂溶性ビタミンであるビタミン A を骨格内に有する PalmA 脂質を用いた（fig. 15 a）。肝星細胞は体内で多くのビタミン A を貯留する細胞と呼ばれており、ビタミン A を含有する PalmA を MEND 化することにより、肝星細胞への薬物送達キャリアが創製可能であると期待される。PalmA の対照としてビタミン E、あるいはミリスチン酸を足場に持つ PalmE、PalmM（fig. 15 b, c）を用い、3 種類の siRNA の MEND 化を行った。

（a）PalmA



（b）PalmE



（a）PalmM

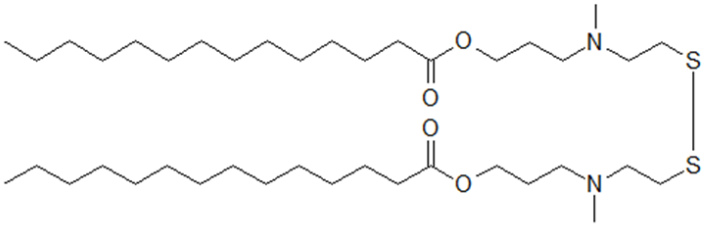


Figure 15. Plam 脂質

（a）PalmA、（b）PalmE、（c）PalmM

本章では、肝星細胞に送達する薬物送達キャリアを用い、コラーゲンの産生を特異的に抑制させる戦略（fig. 16）を立て検証を行った。四塩化炭素の持続的投与により作成した肝線維化モデルマウスに対して、コラーゲン（col）1a1 に対する siRNA を含む 3 種類の MEND を投与し、遺伝子抑制効果を測定した。その結果、0.5 mg/kg において PalmA においてのみ有意な抑制効果が認められた。また、HSC の培養細胞株を用いて 3 種類の MEND の肝星細胞への細胞内取り込みを評価した。その結果、PalmM、E と比較して PalmA では肝星細胞株に、より多く取り込まれることが明らかとなった。

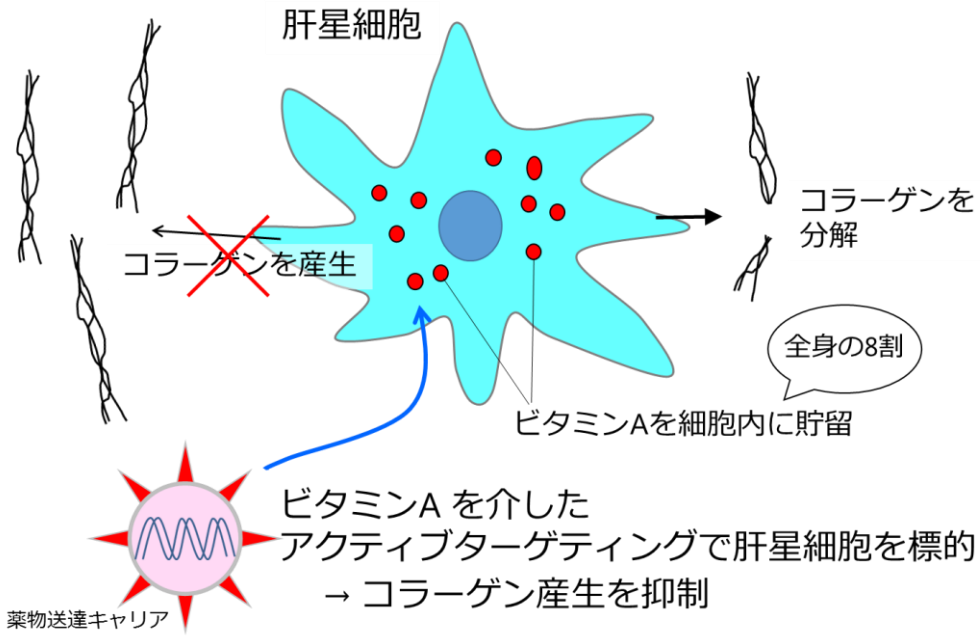


Figure 16. 線維化治療の戦略

結果

3.1 肝線維化モデルマウスの作成

肝線維化の誘導を行った。20 % CCl_4 溶液を腹腔内投与し、2 回/週、3 週間行った（fig. 17）。線維化の誘導後の肝臓と健康なマウスの肝臓の病理画像と mRNA の発現量の比較を行った。病理染色はシリウスレッド染色を行った。シリウスレッド染色はコラーゲン線維を赤色に染色するが、健康マウスでは観察されなかった（fig. 17 b）。線維化モデルでは、中心静脈付近に赤色のコラーゲン線維が確認された（fig. 17 c）。mRNA 発現量比では、col 1a1（Ⅰ型コラーゲン）、HSP47（コラーゲン特異的分子シャペロン）、TGF-β1（トランスフォーミング増殖因子）、α-SMA（α平滑筋アクチン）の 4 種類を比較した（fig. 17 d-g）。健康体マウスの肝臓でのそれぞれの mRNA の発現量を基準（=1）とした。線維化モデルの mRNA は、col1a1 が 22.8、HSP47 が 2.68、TGF-β1 が 1.53、α-SMA が 1.52 であった。4 種類の因子の中でも col1a1、HSP47、TGF-β1 の 3 因子は健康体マウスに比較し、有意に高かった。

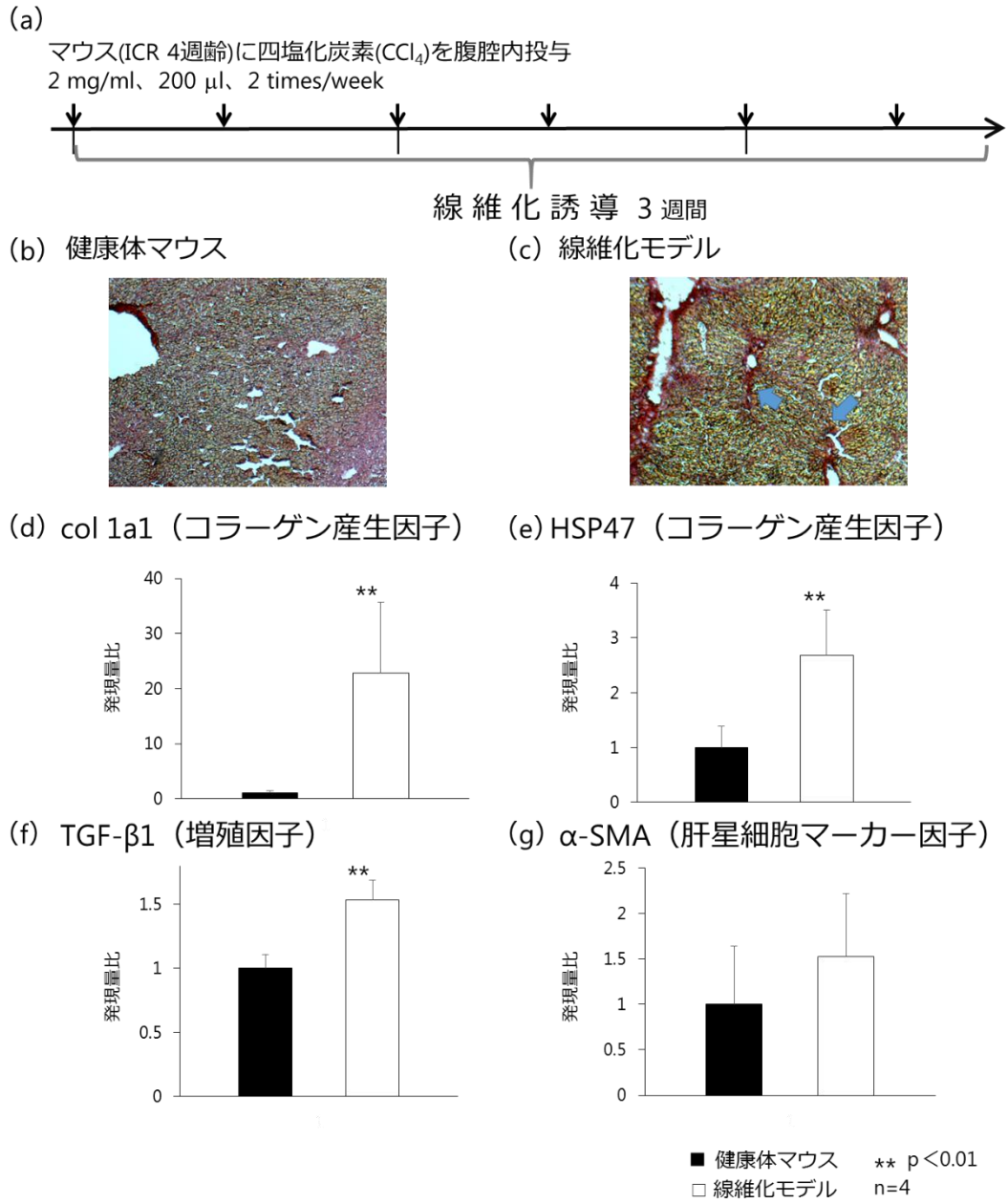


Figure 17. 線維化モデルの作成

四塩化炭素（CCl_4）連続投与により線維化モデルの作成を行った。（a）線維化モデル作成スケジュール。シリウスレッド染色による病理切片、(b) 健康体マウス、(c) 線維化モデル。線維化モデルと健康体マウスの mRNA の発現量比を比較した（d） ～ (g)。(d) col 1a1、(e) HSP47、(f) TGF-β1 、(g) α-SMA。(Mean ± S.D.、n = 4、＊＊：p<0.01）

3.2 Palm-MEND の物性

今回、新規脂溶性物質の側鎖構造が違う 3 種類の PalmA、PalmE、PalmM を用いて siRNA を内封した MEND の物性を測定した（table 5)。PalmE-MEND と PalmM-MEND の粒子径は 160 nm 程度であった。PalmA-MEND の粒子径は 180 nm だった。これらの粒子のζ 電位は-5 mV 前後であった。siRNA の封入率は 90 %以上であった。siRNA の回収率に関しては、PalmE-MEND と PalmM-MEND の 70 %前後であったのに対し、PalmA-MEND は 90 %であった。

	粒子径 (nm)	PdI	ζ電位 (mV)	siRNA封入率 (%)	siRNA回収率 (%)
PalmA	180	0.141	-3.4	90	90
PalmE	165	0.127	-8.3	93	66
PalmM	160	0.125	-5.2	92	76

Table 5. Palm-MEND の物性

3.3 Palm-MEND 遺伝子抑制効果

PalmA、PalmE、PalmM のそれぞれ脂質を組み込んだ MEND に col1a1 に対する siRNA を封入し、線維化モデルに尾静脈内投与した。マウス体重比に対する siRNA が 3.0 mg/kg と 0.5 mg/kg で MEND を投与し、col1a1 の遺伝子抑制効果を測定した。3.0 mg/kg で投与した際、どの MEND 投与群も有意に遺伝子を抑制した（fig. 18 a）。中でも PalmA-MEND 投与群で一番抑制効果が高い傾向を示した。0.5 mg/kg で投与した際、PalmE-MEND と PalmM-MEND 投与群では、遺伝子抑制効果は見られなかったが、PalmA-MEND 投与群で有意に抑制した（fig. 18 b）。

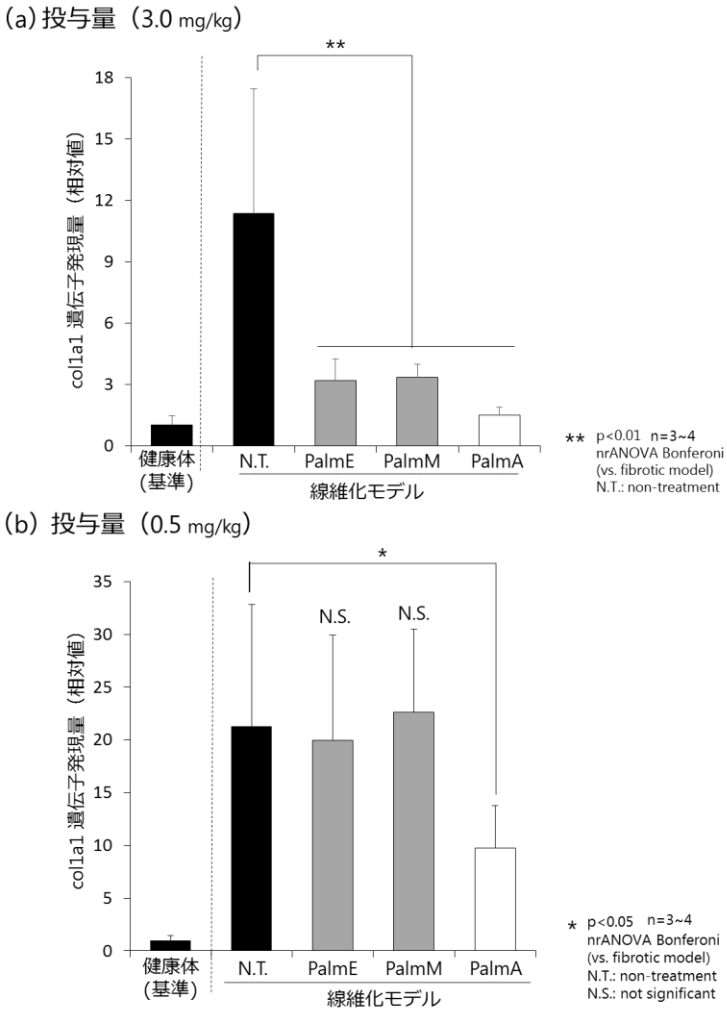


Figure 18. Palm-MEND 投与による遺伝子抑制効果

3 種類の Palm-MEND 投与による遺伝子抑制効果を評価した。（a）siRNA の投与量が 3.0 mg/kg の場合、（b）0.5 mg/kg の場合。（Mean ± S.D.、n = 3～4、* : p<0.05、** : p<0.01）

3.4 リポソームの細胞内取り込み評価

Palm の違いによる MEND の遺伝子抑制効果の違いを説明するために、ヒト肝実質細胞由来 HepG2 細胞とヒト星細胞由来 LI-90 細胞を用いて、それぞれの Palm を組み込んだ蛍光標識したリポソームの細胞への取り込み量を FACS で評価した。HepG2 細胞では、PalmM-リポソーム投与群に比べ、PalmE-と PalmA-リポソーム投与群は、有意に蛍光強度が高かった（fig. 19 a)。この蛍光強度の分布を Geo mean 値で比較したところ、PalmM-リポソームで 140 前後であったのに対し、PalmE-リポソームで 600、PalmM-リポソーム 630 であった（table 6)。LI-90 細胞では、PalmA-リポソーム投与群は PalmE-リポソーム投与群や PalmM-リポソーム投与群の取り込みはほとんど変わらないように見えた（fig. 19 b)。一方で、Geo mean 値を見ると PalmM-リポソーム投与群が 20.6、PalmE-リポソーム投与群が 24.2、PalmA-リポソーム投与群が 30.6 であり、PalmA-リポソーム投与群が他の投与群と比較し、有意に値が高かった（table 6)。

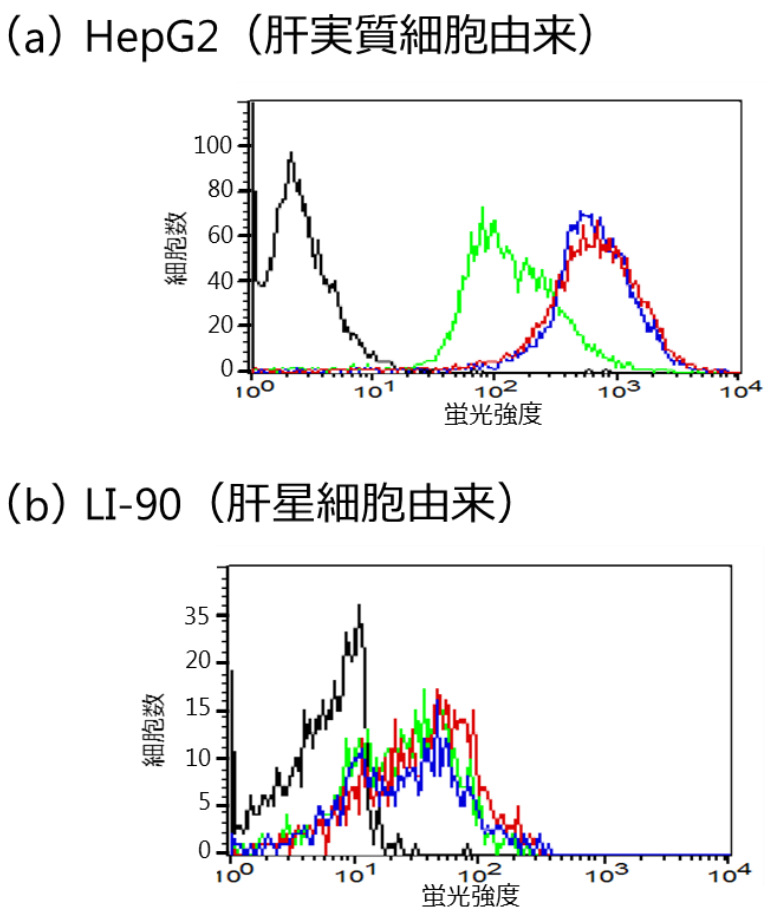


Figure 19. FACS による 3 種類の Palm-リポソームの細胞取り込み評価

蛍光標識（DiD）した 3 種類の Palm-リポソームに 2 種類の細胞に投与し、蛍光強度をプロットした。(a) HepG2（肝実質細胞由来)、(b) LI-90（肝星細胞由来)。赤：PalmA-リポソーム、青：PalmE-リポソーム、緑：PalmM-リポソーム、黒：未処理の細胞群。

	NT	PalmE	PalmM	PalmA
HepG2	2.4±0.19	603±61	144±44	633±70
LI-90	5.72±0.38	24.2±3.4	20.6±3.9	30.6±2.3

Table 6. FACS で測定した GeoMean 値（n = 3）

3.5 PalmA-MEND 投与による容量依存性による遺伝子抑制効果

PalmA-MEND の遺伝子抑制効果を確かめるために、siRNA がマウス体重比 0.25 ～ 2.0 mg/kg で MEND を投与した。投与量が増加するにつれ遺伝子抑制効果は高まった。投与量が 0.25 mg/kg のとき、線維化モデルに対して遺伝子を 40 %抑制することに成功した。投与量 2.0 mg/kg のとき、80 %遺伝子を抑制した（fig. 20）。

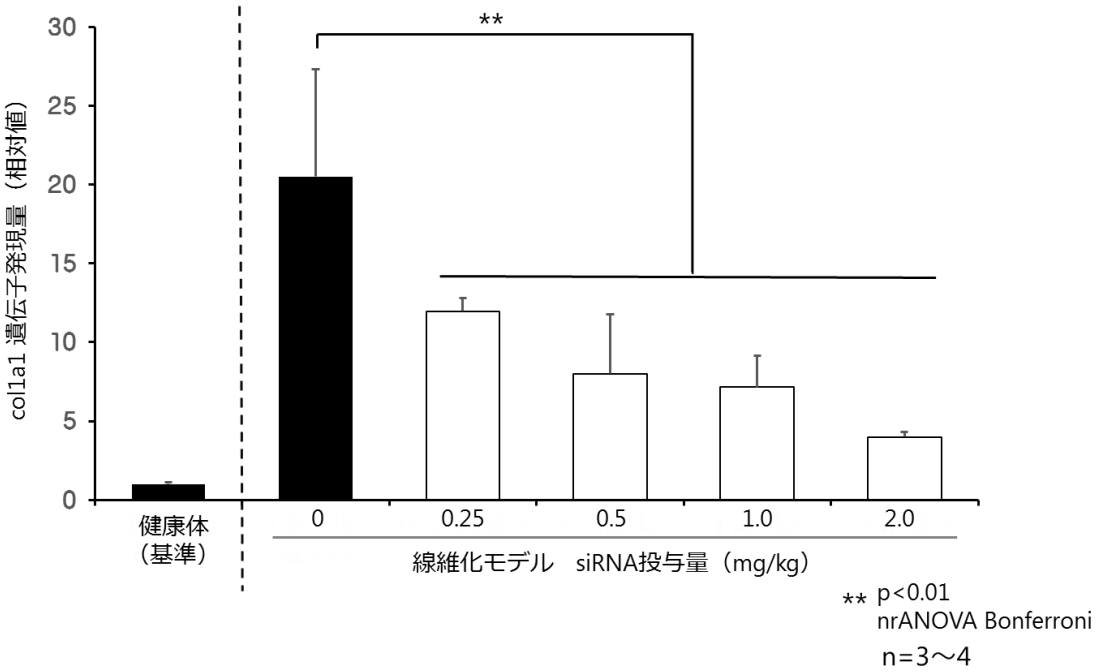


Figure 20. PalmA-MEND 投与による用量依存性の遺伝子抑制効果

PalmA-MEND を投与し、遺伝子抑制効果を評価した。siRNA の投与量は 0 ～ 2.0 mg/kg で行った。（Mean ± S.D.、n = 3 ～ 4、＊＊：p<0.01）

3.6 肝臓組織中のコラーゲン

PalmA-MEND 投与後、遺伝子抑制効果が肝臓組織内でのコラーゲンを抑制するか否かを検討するため、MEND 投与後肝臓を回収し、組織のコラーゲンの様子を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。健康体マウスにおいても血管構造上にコラーゲンのシグナルが観察されたが、線維化モデルでは中心静脈周辺にコラーゲンの集積が観察された（fig. 21 b)。MEND 投与後 24 時間で、中心静脈周の辺コラーゲン集積は消失した(fig. 21 c)。さらに MEND 投与 72 時間後、肝臓組織全体でコラーゲンを抑制していた(fig. 21 d)。

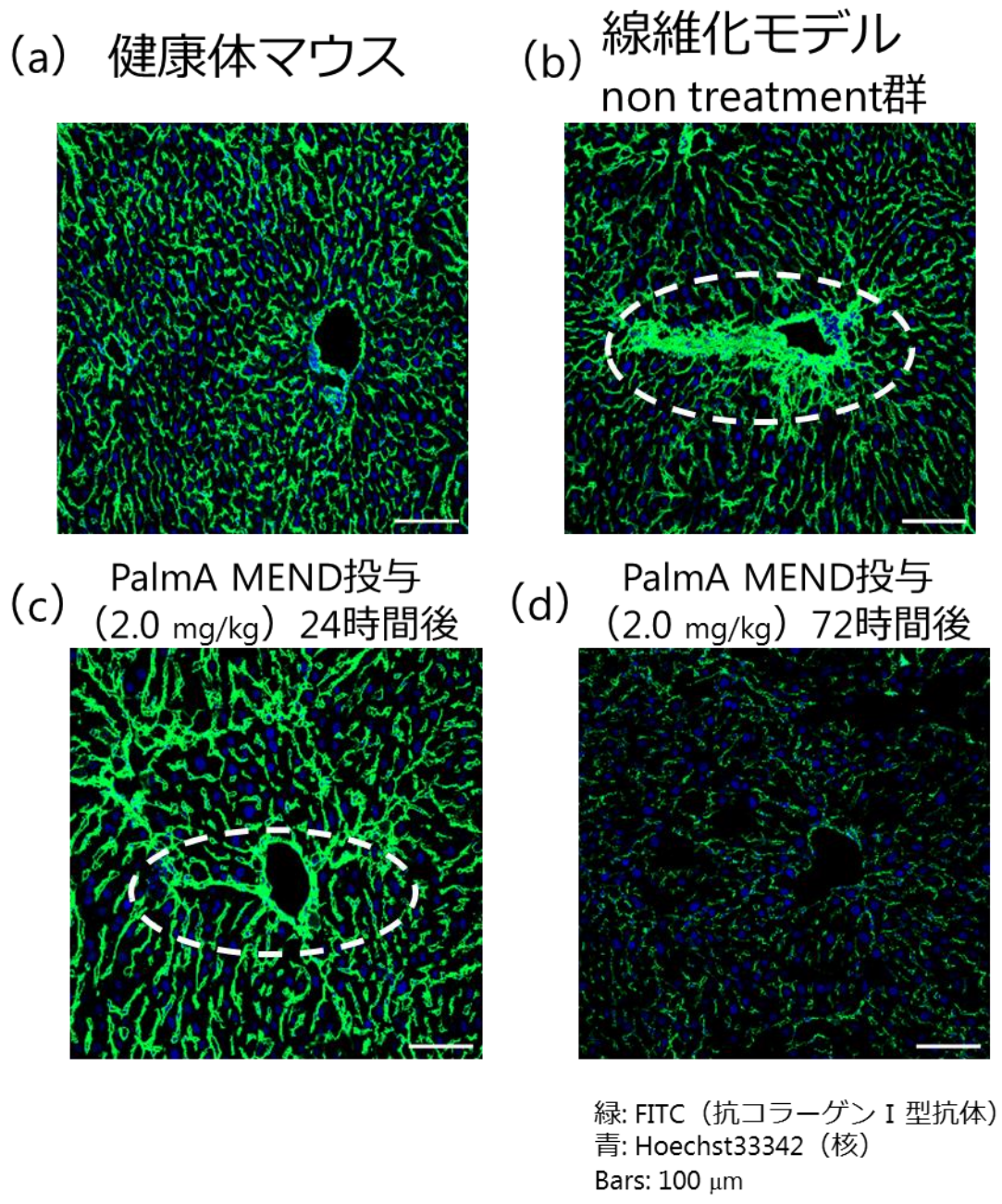


Figure 21. PalmA-MEND 投与による肝臓内コラーゲン

肝臓組織中のコラーゲンを抗体染色し、CLSM で観察した。(a) 健康体マウス、(b) 線維化モデル（non treatment 群）、(c) PalmA-MEND 投与 24 時間後、(d) PalmA-MEND 投与 72 時間後。緑 : 抗コラーゲン I 型抗体、青 : 核、Bars : 100 μm。

考察

肝線維化を誘導する上でいくつかの方法が報告されている[28]が、その多くは実験動物にラットを用いており、マウスの例は少ない。この中でも、今回は CCl_4 を使用した。20 % CCl_4 溶液を腹腔内投与し、2 回/週、3 週間行った結果、病理染色や線維化関連因子の mRNA の発現量比でも増加が見られ、線維化の誘導に成功したと考えられた。DMN による肝線維化の誘導も試みたが、病理染色で線維化の傾向は示されたが、線維化関連因子の mRNA の発現量比に上昇傾向は見られたものの有意な差はなかった。調べた線維化関連因子の中でも col1a1 は、3 本鎖からなるコラーゲン線維を構成する I 型コラーゲンを産生するタンパク質に関連した mRNA である。α-SMA は肝星細胞のマーカー遺伝子であり、線維化で肝星細胞は活性化を受け増殖すると言われており、今回の mRNA の発現は有意な差はなかったが、線維化誘導で 1.52 倍上昇した。このことからも、線維化がおこり肝星細胞が増殖したためと示唆された。他の HSP47 と TGF-β1 は、これまで線維化の治療に多く取り組まれている因子でもあり、今回線維化の誘導でもこれらの因子が有意に上昇したことから、線維化モデルの作成に成功したと示唆された。

側鎖構造の違う PalmA、PalmE、PalmM で作成した MEND の物性はほとんど違いがなかった。PalmA-MEND の siRNA の回収率が 90 %と他の MEND に比べ高かったのは、PalmA-MEND の粒子径が、他の MEND の粒子径に比べ 1 割くらい大きかったために MEND 自体の体積が増加し、内封出来る空間が増えたために siRNA の回収率が高かったのではないかと考えられた。

これらの MEND を使用し遺伝子の抑制効果を測定した。中でも PalmA-MEND の遺伝子抑制効果が高く、抑制のために標的した col1a1 はコラーゲンを産生する因子であり、肝臓組織内では肝星細胞特異的に発現している。PalmA-MEND 以外の MEND も静脈内投与により星細胞を初めとする肝臓組織内に分布していると考えられるが、遺伝子抑制効果は PalmA-MEND よりも低かったことから、肝星細胞への移行性が低いことが原因ではないかということが示唆された。肝星細胞はビタミン A を細胞にため込むことが知られており、これまでもリポソーム表面にビタミン A を塗し、星細胞の標的の上昇に寄与させた例が報告されている[29]。しかし、PalmA-MEND は、MEND のリポソーム膜を構成する脂溶性物質 PalmA の足場構造にあるビタミン A が取り込みに寄与した可能性が示唆された。

この Palm の足場構造の違いが細胞の取り込みに影響を与えるか否かを検討するため、次に細胞の取り込みを in vitro 系で評価した。ヒト肝実質細胞由来 HepG2 細胞を用いた Palm-リポソームの細胞内取り込みは、PalmE-と PalmA-リポソーム投与群が高かった。これまで、当研究室での検討より in vivo での肝実質細胞特異的な内因性因子の mRNA の抑制に PalmA-MEND がほとんど出来なかったのに対し、PalmE-MEND では十分な抑制に成功した。この結果から、肝実質細胞への移行性が PalmA と PalmE で同様であっても、in vivo での効果の差には側鎖構造の違いが影響を与えることが示唆された。ヒト星細胞由来 LI-90 細胞の取り込みは、Goe mean 値の比較で PalmA-リポソーム投与群が他投与群に比較し優位に高かった。この結果から、in vivo での PalmA-MEND 投与での高い遺伝子抑制効果は、肝星細胞によく取り込まれたため効果が現れたのではないかと思われた。

PalmA-MEND 投与による用量依存的に遺伝子抑制効果がみられた。このことからも、MEND の遺伝子抑制効果が MEND などの投与による免疫反応で抑制された訳ではなく、siRNA が機能し標的 mRNA が抑制されたのだと推測された。今後は、他の方法により mRNA が抑制されたか否かを検討する必要があると思われた。また、肝臓組織中のコラーゲンの観察から、コラーゲン線維の低下が見受けられた。おそらく、PalmA-MEND 投与により、siRNA がコラーゲンの産生を抑制したために、見かけ上コラーゲンの分解が亢進したことが示唆された。

今後は、線維化に対する PalmA-MEND を用いた長期的な治療を施すことで、組織に沈着したコラーゲン線維の分解だけではなく、組織形態の回復までするのではないかと思い、取り組んでみたい課題と考えている。

総括

- **HA-SA修飾キャリアにより、アクティブターゲティングを可能**
- **pH応答性STR-H8を用いて、siRNAの遺伝子抑制を促進**
- **PalmAを使用し、線維化を抑制することに成功**

第 1 章では、HA-SA 修飾リポソームにより、肝類洞内皮細胞のアクティブターゲティングを可能とした。しかしながら、当初予想していた siRNA などの核酸送達は不可能であった。これは、核酸を内封したリポソームを作成後、リポソームに HA-SA を修飾したところ、リポソームは沈殿した。HA が凝縮化材として働いていることが考えられたため、リポソームの脂質の変更や HA-SA に使用する HA の分子量の変更などによりリポソームの沈殿を回避したものを作成したが、効果は得られなかった。ヒアルロン酸がスカベンジャー受容体で取り込まれ、分解系に移行してしまい細胞質までの核酸の到達が難しいことなどが考えられた。しかし、低分子の送達では、問題なく肝類洞内皮細胞送達を可能にしたものもある。リポソームに搭載しやすい脂溶性が高い物質の有用性が高い。また、この脂溶性の高い物質は HA-SA の SA 部分に性質が似ていることなどから、HA との融合体の作成も可能である。この HA の融合体は肝類洞内皮細胞を標的とした治療薬として、現在 筑波大学 医学部 消化器外科と共同で研究を進めている。

第 2 章では、pH 応答性の STR-H8 を用いることで、R8-GALA-MEND による siRNA の遺伝子抑制効果を促進した。これは、従来使用していたポリカチオンと比較し、約 4 倍もの改善ではあるが、試験管内で行った siRNA の解離実験の結果は 55 倍と大きくかけ離れた。また、これらのシステムを *in vivo* へと応用したが、遺伝子抑制効果は新規 pH 応答性 STR-H8 と従来型ポリカチオン STR-R8 で差はなかった。これらのことより、現在 siRNA のキャリア開発における優先性は、標的細胞までの送達性と到達後の細胞質への移行性であると考えられるが、今回私が行った研究はこれらの研究が進んだあと突き当たるであろう送達された siRNA の質と言う問題で重要な考え方になると確信する。

第 3 章では、PalmA を使用することで、線維化モデルマウスにおいて肝星細胞が過剰に産生した線維化を抑制することに成功した。今回使用した PalmA は、分子構造中に肝星細胞標的リガンドであるビタミン A の構造を有し、かつ 3 級アミンを持つことから pH 応答し電化を変化する。これらのことは、第 1 章で行ったリガンドを介した送達研究と第 2 章で行った pH 応答性素子を介した siRNA 送達技術をわずかながら反映されている。さらに

今回、肝星細胞が産生したコラーゲン線維を特異的に抑制することで線維化の改善傾向が示された。今後は、長期間治療を続けることでより線維化の完治が期待される。

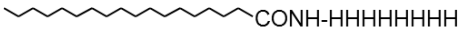
以上本研究を通し、肝類洞内皮細胞や肝星細胞と言った肝非実質細胞へと薬物送達キャリアを標的とすることに成功した。また、pH 応答性素子である STR-H8 や PalmA を使用することで、siRNA の細胞内動態を改善し、遺伝子抑制効果を向上させた。今後、肝硬変などの難治性疾患に対する新しい治療法の確立に大きく貢献できると確信している。

実験材料と機器，試薬調製

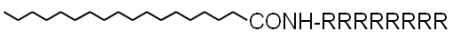
1. 実験材料

脂質

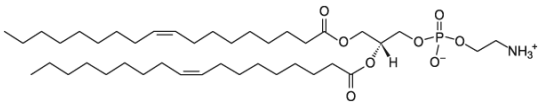
STR-H8



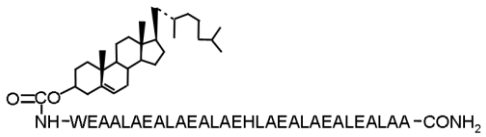
STR-R8　　倉敷紡績



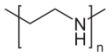
DOPE　　AVANTI POLAR LIPIDS



Chol-GALA　　倉敷紡績



PEI (mw 10,000)　　和光純薬工業



EtOH　　ナカライテスク

緩衝液

HEPES　　DOJINDO

PBS (-)　　TAKARA

Heparin Sodium (130 units/mg)　　和光純薬工業

siRNA

luc

Sense: 5’-GCG CUG CUG GUG CCA ACC CTT-3’

Anti-sense: 5’-GGG UUG GCA CCA GCA GCG CTT-3’

細胞培養

DMEM	GIBCO
FBS	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
2.5% トリプシン溶液	Invitrigen
EDTA	DOJINDO

実験動物

C57BL/6 (6 週齢, ♀)	三協ラボサービス
ICR (3-10 週齢, ♂)	三協ラボサービス

その他

クロロホルム	和光純薬工業
イソプロパノール	和光純薬工業
四塩化炭素	和光純薬工業
オリーブ油	和光純薬工業
Glycogen Solution	ナカライテスク
Triton X-100	SIGMA ALDRICH
Ultrapure Distilled Water	GIBCO
ジエチルエーテル	和光純薬工業
遠心管（15/50 mL)	Greiner bio-one
Dome-cap PCR tube	Axygen
8 連 PCR tube	Thermo Scientific
1.5 mL tube	WATSON
2 mL tube	SIGMA ALDRICH
Reporter Lysis Buffer	promega
Luciferase Assay System (E4550)	promega
RiboGreen (R11491)	*In vitro*gen
ヒアルロン酸(平均分子量 60 万)	

2. 実験機器

測定機器

Zeta sizer (Nano-ZS)	Malvern
吸光光度計 (DU-700)	Beckman
Nano Drop (ND-1000)	Thermo Scientific
Real-time 定量的 PCR (Mx3000P QPCR System)	Agilent Technologies

細胞培養

細胞培養用ディッシュ (10 cm)	BD Falcon
CELL SCRAPER	IWAKI
クリーンベンチ (MCV-710ATS)	SANYO
クリーンベンチ (NS-13B)	BIOLABO
クリーンベンチ (VG-1304L)	AIRTECH
自動炭酸ガス細胞培養装置 (BNA-111)	ESPEC
自動炭酸ガス細胞培養装置	SANYO
自動炭酸ガス細胞培養装置	NAPCO
オートクレーブ (BS-235)	TOMY

遠心

小型遠心機 (CHIBITAN-R)	Millipore
低速冷却遠心機 (LX-125)	TOMY
微量高速冷却遠心機 (MZ-200)	TOMY

その他

Thermal Cycler (Applied Biosystems 2720)	Applied Biosystems
脂質薄膜調製用試験管 (P12-M)	日電理化硝子株式会社
アップライト型長低温槽 (Ultima-II)	REVCO
卓上型冷却トラップ装置 (UT-1000)	EYELA
ダイヤフラム型真空ポンプ (DIVAC 1.2 L)	EYELA
卓上型超音波洗浄機 (AU-25C)	アイワ医科工業
マルチヒーター (MH-36)	WAKAMORI

ボルテックスミキサー (Vortex GENIE2)	Scientific Industries
pH メーター (Docu-pH Meter)	satorius
ホモジェナイザー (POLYTRON)	KINEMATICA
Enspire 2300 Multilabel Reader	PerkinElmer

3. 試薬調製 (4°C で保存)

x1 PBS (—)溶液

PBS タブレット 1 錠/100 mL を DDW に溶解し，高圧蒸気滅菌をした。

0.25% Trypsin/0.02%　EDTA 溶液

PBS (—) 90 mL に EDTA・2Na・2H_2O 20 mg を溶解し，高圧蒸気滅菌した後，2.5 % Trypsin 溶液 10 mL を加えた。

細胞培養液

DMEM 450 mL に対し，非働化 FBS 50 mL，Penicillin/Streptomycin (100x) 5 mL を加えた。

10 mM HEPES Buffer (pH 7.4)

HEPES 2.383 g を滅菌水で溶解し，5 N NaOH 水溶液を用いて pH 7.4 に合わせた後，1 L にメスアップした。その後，フィルター濾過した。

40 unit/mL Heparin PBS

PBS タブレット 5 錠，130 unit/mg Heparin Sodium 153.85 mg を滅菌水 500 mL に溶解した。

実験方法

ステアリルアミノ化ヒアルロン酸の調製

ヒアルロン酸、EDC、NHS を、以下の濃度になるよう DDW に溶解させた。ヒアルロン酸（2 mg/mL）を 5 ml に、EDC（100 mg/mL）を 95.85 μL、NHS（100 mg/mL）を 57.535 μL 加えよくかき混ぜた。そこにステアリルアミン（25 mg/mL）67.378 μL 加え、55 ℃で撹拌し 24 時間反応させた。透析操作を行い、EDC、NHS、未結合のステリルアミンの除去を行った。^{1}H NMR で測定し、ステアリルアミンの導入率を求めた。コンセントレーターを用い、本品を乾燥させ、収量を測定した。

リポソームの調製

DC6-14、DOPE、コレステロールの脂質を 5 mM になるように適切な溶媒に溶かした。組成 DC6-14/DOPE/chol=40/30/30 になり、総脂質量が 0.55 mM なるように、試験管に測りとった。デシケータで減圧することで、溶媒を完全に飛ばした後、適量の 10 mM HEPES バッファーを加え、バス型ソニケーターで超音波処理をし、リポソームを調製した。ヒアルロン酸修飾はリポソームの脂質濃度に対して、モル濃度で添加した。また、それぞれ調整された溶液は HEPES バッファーを加え、ボリュームを揃えた。

RI、蛍光修飾リポソーム

RI 修飾リポソーム調製の場合、組成 DC6-14/DOPE/chol=40/30/30 からなる脂質溶媒を試験管に測りとる際、 [^{3}H]-CHE を一定量加え、リポソームを調製した。蛍光修飾リポソーム調製の場合、RI 修飾と同様に試験管に測りとる際、Rhodamine-DOPE を 1 mol%加え、リポソームを調製した。

マウスへのリポソームの投与

マウス（ICR オス 4 週齢）の尾静脈から、調整したリポソーム溶液 400 μL/mouse 注射した。

サンプルの回収、放射活性の測定

各測定の時間に麻酔後、血液、肝臓を回収した。血液 20 μL、肝臓約 0.2 g を測定に用いた。マウスの全血液量は、体重（g）×73 μL とした。バイアルにサンプルとソルエ

ン約 2 mL を加え、一晩 50 ℃で加温した。過酸化水素を 150 μL×2 回加え、HIONIC-FLOUR 10 mL 加え、よくかき混ぜた。1 日、4℃で保存した後、液体シンチレーションカウンターで ^{3}H を測定した。

サンプルの回収と組織の染色

リポソームの投与後 10 分、マウス頸椎を脱臼し、肝臓を回収した。その際、ヘパリン PBS 溶液で十分に肝臓組織中を洗い流した。肝臓を小さく切り、染色液（10 mM HEPES バッファー 500 μL、ヘキスト 33342 20 μL、FITC-isolectin 20 μL）に氷中で浸した。約 1 時間染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察を行った。

2 章

siRNA 封入 MEND の調製

コア粒子の調製

siRNA 溶液(0.1 mg/mL) とポリカチオン溶液(STR-R8：0.17 mg/mL、STR-H8：0.15 mg/ml)の濃度を 10 mM HEPES buffer（pH=4.0）で用意した。用意した、ポリカチオン溶液 60 μL を撹拌しながら siRNA 溶液 30 μL を滴下しコア溶液(N/P＝5.5)を調製した。

SUV の調製

ガラス試験管に DOPE/PA/chol-GALA＝70/20/1 からなる脂質薄膜を調製し、10 mM HEPES buffer（pH=4.0）で脂質濃度が 0.55 mM になるように添加後、室温で 10 分間水和させた。バス型ソニケーターで超音波処理後、プローブ型のソニケーターで 10 分間超音波処理を行った。これをマイクロチューブに移し、遠心操作（15000 rpm、25 ℃、5 分）を行い、上清をマイクロチューブに移し替えた。この操作を 3 回繰り返し、混合したチタンなどを除去し、SUV 溶液とした。

MEND の調製

SUV 溶液：コア溶液＝2:1 になるように混合し、10 分放置することで D-MEND とした。最後に、STR-R8 溶液を脂質モル濃度の 10 %添加し、室温に 30 分間以上放置した。最終濃度（siRNA）は 11.1 mg/L に調製した。粒子径、ζ 電位は zetasizer で測定し

た。

細胞培養

細胞は HeLa 細胞（ルシフェラーゼ安定発現系：HeLa―GL3），培養皿は 10 cm 細胞培養皿，培地は DMEM （FBS＋, Penicillin/Streptomycin＋）を用いて培養した。$4x10^5$ cells/dish で 2 日間培養後，培地を除去し，PBS（―）6mL で洗浄後，0.25% Trypsin-0.02% EDTA PBS 2 mL を加え, 数分反応させた。細胞がはがれたのを確認し，medium 8 mL を加え懸濁し，この細胞懸濁液を遠心管に移して 25°C・1000 rpm で 5 分間遠心した。その後，上清を除去し，培地を加え希釈しセルカウントをした。再播種は $4x10^5$ cells/dish で行い，37°C・5% CO_2 環境下で培養した。

in vitro 実験 （トランスフェクション）

トランスフェクションの 24 時間前に，96 well plate に HeLa 細胞を $5x10^3$ cells / 100 μL ずつ播種し，37°C・5% CO_2 で培養した。

チューブに培地，PBS (―)，MEND を入れて，各 siRNA 濃度のサンプルを調製した。96 well plate の培地を除去し，PBS （―）で洗浄後，サンプルを 100 μL/well ずつ入れ、培養した。3 時間後、PBS（―）で洗浄後、培地を 100 μL/well ずつ入れ所定の時間まで培養した。

細胞のノックダウン評価

luciferase 1000 assay System（promega, E4550）の添付文書の推奨プロトコールに従って行った。具体的には、サンプルの回収時間に，培地を除去し、PBS (―) で洗浄後、lysis buffer（promega）を 100 μL /well で入れて，-80℃で 30 分以上放置した。サンプルの凍結溶解後、luciferase 1000 assay System の溶液を 100μL 加え吸光光度計（検出波長 556 nm）で測定した。用量―反応曲線および EC50 の算出は SigmaPlot for Windows Version 12.0（Systat Software, Inc.）を使った。

siRNA release における RiboGreen assay

pH5.5、7.4 の HEPES バッファー で、RiboGreen 試薬を 200 倍希釈した。測定サンプルはそれぞれの HEPES バッファーで 100 倍に希釈後（最終濃度 999 μg/L)、この希釈液と同量の RiboGreen 溶液をよく攪拌（shaking incubator SI-300 ASONE　650

rpm 5min）後、吸光光度計（励起波長 495 nm　反射波長 525 nm）により測定した。

siRNA の封入率の算出

HEPES バッファー（pH7.4）915μL に対して、1mg/mL デキストラン硫酸 80μl・RiboGreen 5μL 溶解させた（A 液）。HEPES バッファー（pH7.4）875μL に対して、1mg/mL デキストラン硫酸 80μL・10% TritonX-100 40μl・RiboGreen 5μL 溶解させた（B 液）。測定のサンプルを同量の PBS（—）と混ぜ合わせた後、HEPES バッファーで 100 倍（最終濃度 55.5 μg/L）に希釈した。この希釈液 50μL と A 液または B 液 50μL 加え、よく攪拌後吸光光度計により測定した。封入率はこの蛍光強度から下記の計算式で算出した。

$$\text{封入率}(\%) = 1 - \frac{\text{A 液の蛍光強度}}{\text{B 液の蛍光強度}}$$

3 章

Plam-MEND 調製

10 mM HEPES Buffer(pH 4.0(酸性)、pH(7.4))を用意した。siRNA、プロタミンをそれぞれ、濃度が 2 mg/ml になるように DDW で溶解した。これらの溶液から siRNA が 75 μg 分、プロタミンは siRNA に対して NP=1.2 になるように、それぞれ別々のエッペンに測り取り、酸性 HEPES Buffer で 250 μl まで、メスアップした。この siRNA 溶液をよく攪拌させながら、プロタミン溶液を滴下して入れた。これをコア粒子溶液とし、このコアの粒子径やζ－電位は酸性 HEPES Buffer で測定した。脂質溶液を用意した。PlamA、DOPE、chol は濃度 5 mM、PEG2k-DMG は濃度 1 mM になるようにエタノールで溶解した。これらを PlamA／DOPE／chol／PEG＝39.6／39.6／52.8／19.8 (μl)(モル比 30/30/40/3)使用し、全量が 400 μl になるまで、エタノールで嵩ましした。この脂質溶液を撹拌しながら、先程のコア粒子溶液を 400 μl 滴下後、直ちに酸性 HEPES Buffer を 2.4 ml 加え、よく攪拌した。この溶液をアミコン(予め酸性 HEPES Buffer 1.8 ml 投入)で限外濾過を行った(1000g、30℃、7 分くらい)。遠心後、下のチューブに出た液は捨て、フィルター部に残った溶液に中性 HEPES Buffer を 4.5 ml 加え、遠心(1000g、30℃、12 分くらい)した。フィルター部に残った液を MEND 溶液とし、別の容器に回収し、用量が 4000 μl になるまで、中性 HEPES Buffer を加えた。粒子径、ζ-電位、siRNA 濃度を測定した。

肝線維化モデルマウスの作成

四塩化炭素（CCl_4）をオリーブ油で希釈し、20 %CCl_4 溶液を得た。この溶液を ICR マウスに 200 μl、2 回/週のスケジュールで腹腔内に投与した。これを 3 週間続け、肝線維化モデルマウスとした。

RT-PCR、KD の測定

逆転写反応は High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystem）を使用した。2ug の RNA 9uL と 2×RT buffer 10uL を加えて 19uL にした後に、65℃ 5min で熱変性をかけた。そして 4℃に急冷して 20×Enzyme 1uL を加えた。次に 25℃ 5min (ランダムプライマーのアニーリング)、42℃ 60min(逆転写反応)、95℃ 5min(酵素の失活)、4℃ 5min(急冷)のサイクルで cDNA を合成した。Realtime-PCR 反応には合成した cDNA 溶液を２０倍希釈したものを使用した。SYBR Green（TOYOBO）を使用した。

また、ΔΔCt 方を用い、Actβを基準とし、それぞれの遺伝子を計測した。

組織切片の作成

回収した組織は 4%PFA に 1 時間浸した。その後、組織を 20%スクロース溶液に移し、4℃で 1 晩放置した。適当な大きさに裁断した組織を　O.T.C. compound で包埋し、ブロック片を作成した。

蛍光顕微鏡の場合

ブロック片をクライオスタットで厚さ 10 μm にスライスした。このスライスをスライドガラスに貼り付け、4℃でしばらく放置した。PBS で洗浄後、1.5%BSA PBS 溶液でブロッキング後(室温)、Anti-Fibroblast 抗体(200 倍希釈、4℃、1 晩)後、適切な 2 次抗体で処理した。Hoechst33342(200 倍希釈、室温、1 時間)で染色した。

病理組織切片の観察

ブロック片をクライオスタットで厚さ 8 μm にスライスした。このスライスをスライドガラスに貼り付け、4℃でしばらく放置した。染色はそれぞれの染色液に適当な時間浸し、染色した。また、マウントの際、ソフトマウント(wako)を使用した。

参考文献

[1] Bard S. et al. *Biochem. J.* **266**, 313-327 (1990)

[2] TAMAKI S. et al GASTROLOGY (1996)

[3] Pathology of the Liver FOURTH EDITION 2002

[4] Kawasaki T. et al. *J Hepatol.* **53**, 648-54 (2010)

[5] Kogure K., et al. *J Control Release*, **98**, 317-323 (2004)

[6] Nakamura Y., et al. *J Control Release*, **119**, 360-367 (2007)

[7] Akita H. et al. *J Control Release*,

[7] Thabut D., et al. *J Hepatol*, **53**, 976-80 (2010)

[8] Cheluvappa R., et al. *Int J Infect Dis.*, **14**, e857-67 (2010).

[9] Fraser JR., et al. *J Intern Med.*, **242**, 27-33 (1997).

[10] Fraser JR., et al. *J Intern Med.*, **242**, 27-33 (1997)

[11] Weigel PH., et al. **1572**, 341-63 (2002)

[12] Aruffo A., et al. *Cell*, **61** 1303-13 (1990)

[13] Hardwick C., et al. *J Cell Biol.*, **117** 1343-50 (1992)

[14] Zhou B., et al. *J Biol Chem.*, **275** 37733-41 (2000)

[15] Oh E. *et al. J. Controlled Release* **141** 2-12 (2010)

[16] Petros RA., et al. *Nat Rev Drug Discov.*, **9** 615-27 (2010)

[17] Yerushalmi N., et la. *Arch Biochem Biophys.*, **349** 21-6 (1998)

[18] Khalil IA., et al. *J Biol Chem.*, **281** 3544-51 (2006)

[19] Ishiwata H., et al. *J Control Release*, **69**, 139-48 (2000)

[20] Kim JK., et al. J. Pharm Pharmacol., **55** 453-60 (2003)

[21] Fire A. et al. *Nature* **391** 806-811 (1998)

[22] Wei J. *Mol Pharmacol.* **79** 953-63 (2011)

[23] Felgner PL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417(1987)

[24] Akita H., et al. *J Control Release*, **143**, 311-7 (2010)

[25] Tanaka K., et al. *Int J Pharm.*, **398**, 219-24 (2010)

謝辞

本研究を従事する機会を与えていただき、また、本研究を遂行するにあたり様々な面でのご指導、ご鞭撻を賜りました、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・原島秀吉先生に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導・ご教示と有益なるご助言、ならびにご理解を頂きました、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・櫻井遊先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益なるご助言や多くの励ましのお言葉を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室　准教授・秋田英万先生、助教・山田勇磨先生、中村孝司先生、同未来創剤学研究室　特任准教授・梶本和昭先生、同特任助教・佐藤悠介先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご教示と有益なるご助言を頂きました、兵藤守先生、畠山浩人先生、林泰弘先生に深く感謝いたします。

本論文を審査して頂き、貴重な意見を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院　臨床薬物動態学研究室　教授・井関健先生、講師・小林正紀先生に深く感謝いたします。

5 年間の研究を通し、研究に協力を頂きましたキユーピー株式会社 関係者の皆様ならび筑波大学 医学部 消化器外科の皆様に深く心より感謝いたします。

肝臓グループとして所属して研究を始めた私に様々なご指導やご助言を頂き、共に研究を行ってきた Afsana Akhter 博士、山内順修士、水野諒一学士、野口裕生修士、末光永里奈学士に心より感謝いたします。

医歯棟、1 研そして新棟で共に楽しい生活を送って頂きました、北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室ならびに未来創剤学研究室の皆様に心より感謝いたします。

特に同期としてこの 5 年間を同研究室で生活を共にし、ご指導やご助言を頂いた北海道大学大学院薬学研究院　薬剤分子設計学研究室　藁科翔太修士に心より感謝いたします。

有益なご意見やご助言、励まし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及び未来創剤学研究室のご卒業された先輩、後輩の皆様に感謝いたします。

最後になりましたが、これまで私を支えてくださった家族、友人に心から感謝いたします。