

新規ナノ粒子を用いた皮内 siRNA デリバリーによる皮膚の恒常性維持

長崎大学病院薬剤部

佐々木 均

To advance the therapeutic outcome of the skin disease, small interfering RNA (siRNA) is expected. However, the therapeutic use of siRNA requires a drug-delivery system because unmodified naked siRNA is immediately degraded by nucleases, it penetrates poorly through the plasma membrane, and it induces interferon responses after systemic injection. For safe and effective delivery of siRNA, we developed binary complex based on dendrigraft poly-L-lysine (DGL) and ternary complex which was constructed by addition of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) to binary complex. The siRNA which could knock down the firefly luciferase gene was used as a model siRNA. The complexes were approximately 50-140 nm in particle size. The binary complex showed a cationic surface charge although an anionic surface charge was observed in the ternary complex. The binary complex and the ternary complex showed a significant silencing effect in the mouse melanoma B16-F10 cell expressing luciferase regularly (B16-F10/Luc cells). The binary complex showed significant cytotoxicity and blood agglutination although the ternary complex decreased these toxicities. Furthermore, the ternary complexes showed significantly silencing effects in the tumor-metastasized mice *in vivo*. Thus, we developed the siRNA vector having a potential to become a new nucleic medicine in skin disease therapy.

1. 緒 言

皮膚は人体最大の臓器であり、絶え間ない異化同化を繰り返し、恒常性を保っている。しかし、外来抗原や紫外線などの刺激、表皮の細菌増殖、老化などにより、恒常性が破綻すると、しみ・そばかす、にきび、アレルギー疾患、感染症、膠原病、悪性腫瘍など、様々な疾患が引き起こされる。

近年、これらの疾患の理解が進み、治療標的として遺伝子やタンパク質が同定されている。特に遺伝子量やタンパク量を制御できる small interfering RNA (siRNA) への期待は大きい。しかし、核酸物質は生体内での安定性や持続性に劣り、皮膚透過性や細胞内取り込みが低い。このため、核酸物質を皮膚の標的細胞内へ安全に高効率に導入できる Drug Delivery System (DDS) 技術との組み合わせが有用である。現在、核酸医薬の DDS を目的とした微粒子、高分子および多機能性キャリアなどのベクター開発が活発に行われ、世界的な競争が展開されている。国内外において、導入効率の高いウイルスベクターを用いた研究が主流に行われてきたが、安全性や標的指向性の欠如が問題となっており、臨床応用には至っていない。導入効率の低い非ウイルスベクターにおいては、カチオン性成分が広く用いられてきたが、永年にわたる研究にもかかわらず、未だに実用

化には至っていない。この背景には、不十分な遺伝子発現効率や、血中投与後の細胞毒性や血液毒性などの問題点が挙げられる。

我々は、核酸物質と様々な電荷を持った高分子とを静電的に自己組織化させることで、安全性が高く、高効率に遺伝子を発現できるナノ粒子の構築に成功した(特願2012-501869, PCT/JP2011/054195)。このナノ粒子は表面が負電荷であり、細胞毒性を示さない^{1, 2)}。また、サプリメントや医薬品に使用されている既知の成分により構築しているため、生体適合性および安全性が高く、迅速な臨床応用が可能である。

本研究では、我々が開発した画期的ナノ粒子を用いて、核酸物質を皮膚の標的部位へ安全かつ高効率に送達させることで、RNA干渉を引き起こすことを目的とする。皮膚モデルとして、マウスメラノーマ細胞株B16-F10細胞を用い、遺伝子発現抑制を評価するために、ルシフェラーゼを恒常発現させた細胞株B16-F10/Lucを作製した。核酸物質のモデルとして、核酸物質のDDS研究で汎用されるルシフェラーゼを抑制する siRNA を用い、ナノ粒子を作製した。作製したナノ粒子の細胞取り込み、遺伝子発現抑制および細胞毒性をB16-F10/Luc細胞を用いて評価した。さらに、メラノーマ肺転移モデルマウスを作製し、*in vivo*における有用性についても評価した。

2. 方 法

2.1. ナノ粒子の作製

siRNAとして、ホタルルシフェラーゼを抑制する siRNA (センス鎖: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3', アンチセンス鎖: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAAGdTT-3') および scramble siRNA (センス鎖: 5'-CUUACGCUGUCAU



Maintenance of skin homeostasis by intradermal siRNA delivery using novel nano particles

Hitoshi Sasaki

Department of Hospital Pharmacy,
Nagasaki University Hospital

GAUCGAdTdT-3'、アンチセンス鎖：5'-UCGAUCAUGACAGC GUAAGdTdT-3'を用いた。siRNAと第5世代のdendrigrapt poly-L-lysine (DGL)を様々な電荷比で組み合わせ、siRNA-DGL複合体を調製した。さらに、siRNA-DGL複合体に γ -PGAを様々な電荷比で添加し、siRNA-DGL- γ -PGA複合体を構築した。ポジティブコントロールとしてsiRNA-invivofectamine複合体も作製した。

2. 2. ナノ粒子の製剤学的評価

作製したナノ粒子の粒子径および表面電荷をZetasizer Nano ZS (Malvern 社) で測定した。複合体の安定性を評価するために、アガロース電気泳動を行った。泳動後のゲルは、Gel Doc EZ Systemを用いて観察した。また、透過型電子顕微鏡JEM-1230 (日本電子株式会社) を用いてナノ粒子の形状を観察した。

2. 3. in vitroにおける遺伝子発現抑制の評価

細胞はルシフェラーゼを恒常発現しているマウスメラノーマ細胞株B16-F10/Luc細胞を用いた。B16-F10/Luc細胞を 1×10^4 個播種し、24時間前培養した。その後、siRNAの濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにOPTIMEMI培地で希釈した各ナノ粒子を細胞に添加し、2時間インキュベートした。インキュベート後の細胞を、RPMI1640でさらに22時間培養した。培養後に細胞をlysis bufferで溶解し、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。

2. 4. in vitroにおける細胞毒性

B16-F10/Luc細胞を 3×10^3 個播種し、24時間前培養した。その後、siRNAの濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにOPTIMEMI培地で希釈した各ナノ粒子を細胞に添加し、2時間インキュベートした。インキュベート後の細胞をRPMI1640でさらに22時間培養し、WST-1 assayにより細胞毒性を評価した。

2. 5. メラノーマ肺転移に対する遺伝子抑制効果

C57BL/6NマウスにB16-F10/Luc細胞を 1×10^5 個静脈内投与し、メラノーマ肺転移マウスを作製した。細胞投与後14日目に、siRNA-DGL6- γ -PGA10複合体 (siRNA40 μg) を尾静脈内投与した。複合体投与24時間後 (細胞投与後15日目) に肺を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 結果

3. 1. siRNA-DGL複合体の製剤学的評価

siRNA-DGL複合体の粒子径と表面電荷を測定した。siRNA-DGL複合体は51-90 nmの粒子径、24-44 mVの表面電荷を示した (表1)。複合体の安定性を評価するために電気泳動を行った。Naked siRNAではバンドが確認

された。一方、siRNA-DGL複合体においては、siRNA-DGL2複合体でわずかなsiRNAの流出が観察されたが、その他のsiRNA-DGL複合体ではバンドは確認されなかった (図1)。siRNA-DGL複合体のsiRNA封入率を評価した。siRNA-DGL2複合体の封入率は89.2%であったが、電荷比が増加するにつれて封入率は上昇し、siRNA-DGL4, 6, 8, 10, 12複合体においてはほぼ100%の封入率であった (図2)。さらに、siRNA-DGL6複合体の形状を観察した結果、ゆがんだ球状であることが明らかとなった (図3)。

3. 2. in vitroにおけるsiRNA-DGL複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL複合体の遺伝子抑制効果をB16-F10/Luc細胞を用いて評価した。ルシフェラーゼを抑制するsiRNA

表1 siRNA-DGL複合体の粒子径と表面電荷

Complexes	Size (nm)	ζ -potential (mV)
siRNA-DGL2	51.3 $\pm$ 34.0	24.5 $\pm$ 1.2
siRNA-DGL4	66.4 $\pm$ 6.5	38.6 $\pm$ 0.2
siRNA-DGL6	89.5 $\pm$ 42.9	41.4 $\pm$ 0.7
siRNA-DGL8	64.6 $\pm$ 9.1	39.3 $\pm$ 0.7
siRNA-DGL10	57.2 $\pm$ 57.0	43.9 $\pm$ 0.5
siRNA-DGL12	59.3 $\pm$ 17.3	39.6 $\pm$ 1.5

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n = 3)

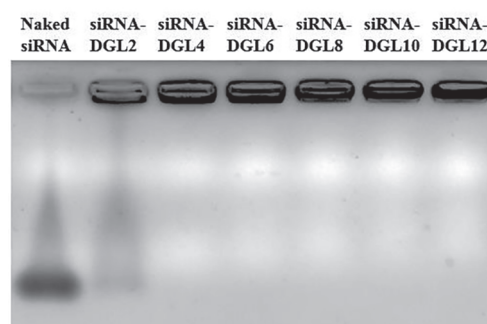


図1 siRNA-DGL複合体の電気泳動

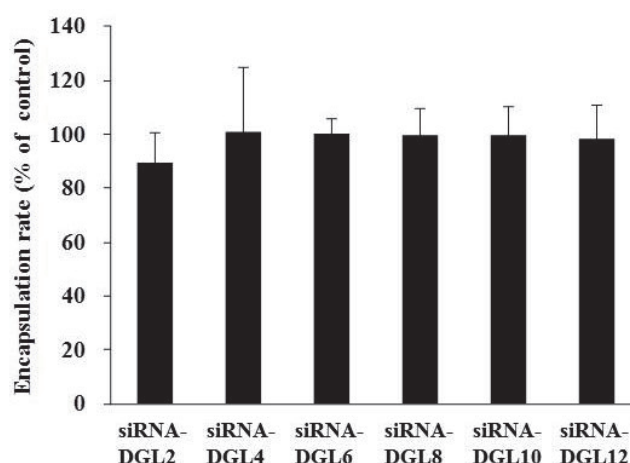


図2 siRNA-DGL複合体の封入率

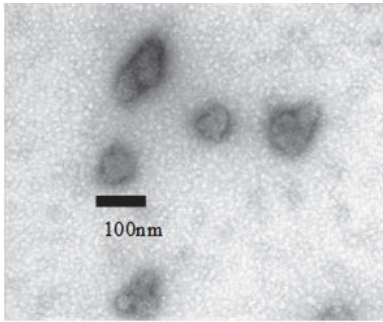


図3 siRNA-DGL 複合体の TEM image

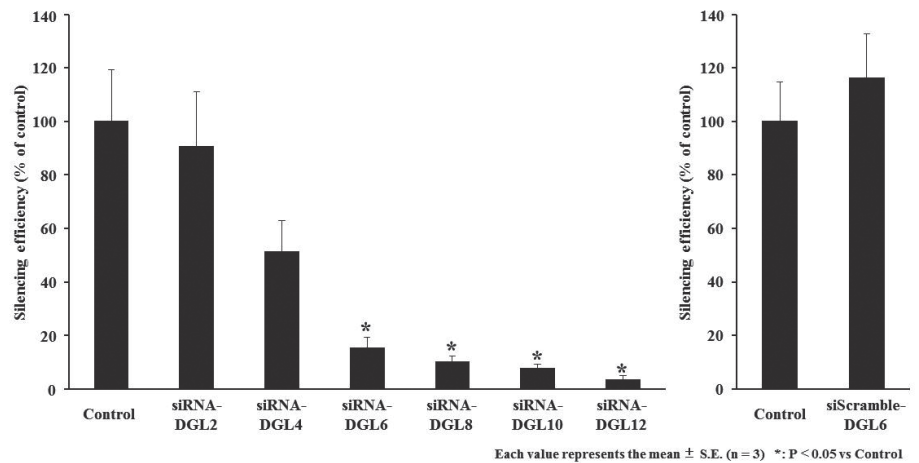


図4 siRNA-DGL 複合体の遺伝子抑制効果

を内包した siRNA-DGL6, 8, 10, 12 複合体は細胞中のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した。一方、スクランブル siRNA を内包した siRNA-DGL 複合体では遺伝子抑制効果を示さなかった(図4)。

3. 3. in vitroにおける siRNA-DGL 複合体の細胞毒性

siRNA-DGL 複合体を B16-F10/Luc 細胞に添加し、細胞生存率を WST-1 assay により測定した。電荷比が 2 および 4 の siRNA-DGL 複合体は細胞毒性を示さなかったが、電荷比が 6 以上の siRNA-DGL6, 8, 10, 12 複合体では有意な細胞毒性が認められた(図5)。

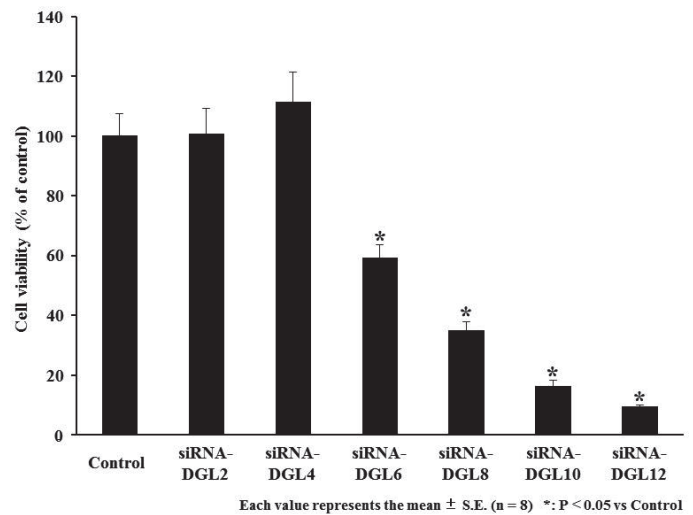


図5 siRNA-DGL 複合体の細胞毒性

3. 4. siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の製剤学的評価

siRNA-DGL6 複合体に様々な電荷比で γ-PGA を添加し、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体を調製し、粒子径と表面電荷を測定した(表2)。その結果、siRNA-DGL6-γ-PGA6 では凝集がみられ粒子径の測定ができなかったが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は 64-140 nm の粒子径を示した。また、γ-PGA の添加量に比例して、表面電荷は低下し、電荷比が 6 以上で負電荷となった。複合体の安定性を評価するために電気泳動を行った。siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体でわずかな siRNA の流出が観察されたが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体ではバンドは確認されなかった(図6)。次に siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の siRNA 封入率を評価した。siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体の封入率は 76.8% とやや低かったが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は 85% 以上の高い封入率を示した(図7)。また、siRNA-DGL6-γ-PGA10 複合体の形状を観察した結果、約 100 nm の球状のナノ粒子が観察された(図8)。

表2 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の粒子径と表面電荷

Complexes	Size (nm)	ζ-potential (mV)
siRNA-DGL6-γ-PGA4	139.2 ± 13.1	38.2 ± 0.5
siRNA-DGL6-γ-PGA6	n.d.	-5.9 ± 1.1
siRNA-DGL6-γ-PGA8	64.6 ± 13.3	-20.8 ± 0.7
siRNA-DGL6-γ-PGA10	117.1 ± 29.1	-35.1 ± 1.0
siRNA-DGL6-γ-PGA12	106.0 ± 56.1	-37.1 ± 1.3

Each value represents the mean ± S.D. (n = 3)

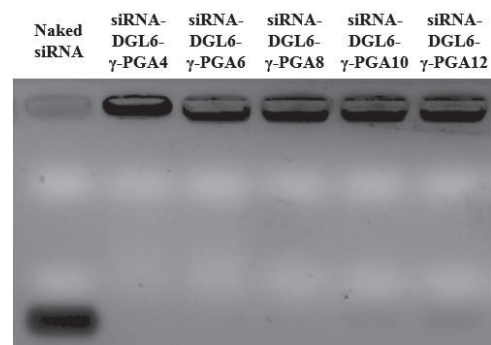


図6 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の電気泳動

3. 5. in vitroにおける siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果を

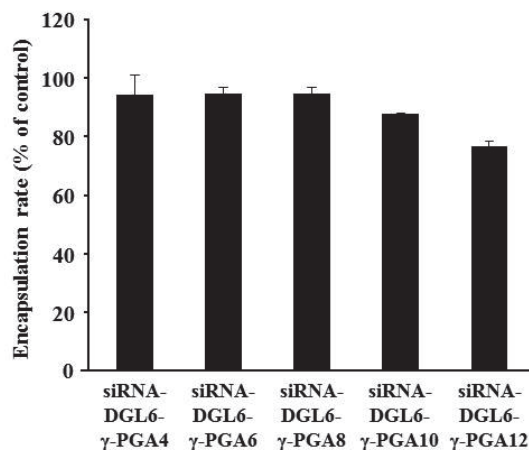


図7 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の封入率

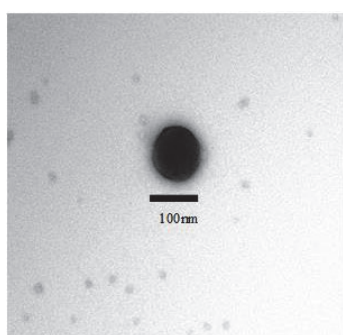


図8 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の TEM image

B16-F10/Luc細胞を用いて評価した。ルシフェラーゼを抑制するsiRNAを内包したsiRNA-DGL6-γ-PGA複合体の遺伝子抑制効果はsiRNA-DGL6複合体と同程度であり、B16-F10/Luc細胞中のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した(図9)。

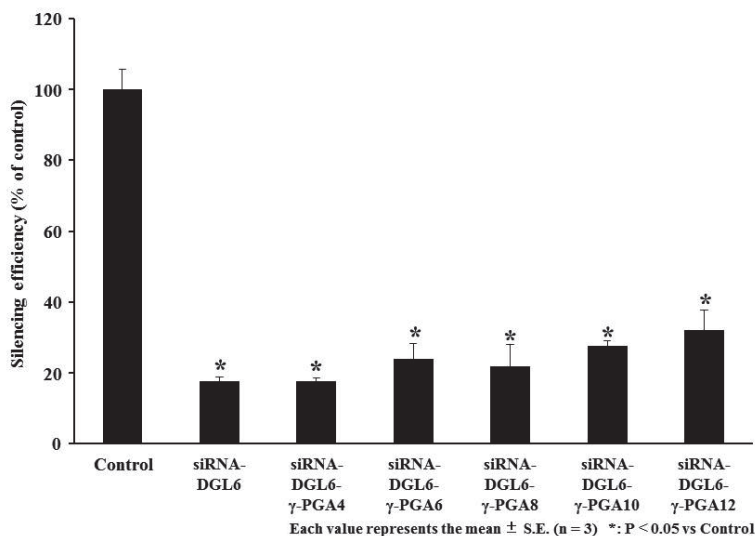


図9 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果

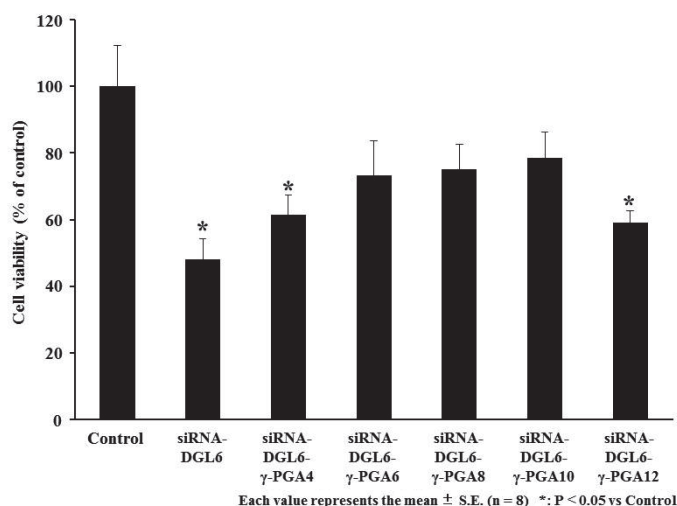


図10 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の細胞毒性

3. 6. in vitroにおけるsiRNA-DGL6-γ-PGA複合体の細胞毒性

siRNA-DGL6-γ-PGA複合体をB16-F10/Luc細胞に添加し、細胞生存率をWST-1 assayにより測定した。siRNA-DGL6-γ-PGA4複合体とsiRNA-DGL6-γ-PGA12複合体ではsiRNA-DGL6複合体と同様にコントロールと比較して有意な細胞毒性を示した。一方、siRNA-DGL6-γ-PGA6, 8, 10複合体においては、高い細胞生存率が認められた(図10)。

3. 7. 赤血球凝集試験

siRNA-DGL6複合体とsiRNA-DGL6-γ-PGA10複合体の血液毒性を赤血球凝集試験により評価した。siRNA-DGL6複合体は凝集を示したが、siRNA-DGL6-γ-PGA10複合体は凝集を示さなかった(図11)。

3. 8. メラノーマ肺転移に対するsiRNA-DGL6-γ-PGA10複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL6-γ-PGA10複合体をメラノーマ肺転移モデ

ルマウスに尾静脈内投与し、in vivoにおける遺伝子抑制効果を評価した。コントロールとして5%糖液を投与し、ポジティブコントロールとしてsiRNA-invivofectamine複合体を投与した。Naked siRNAおよびスクランブルsiRNAを内包したsiRNA-DGL6-γ-PGA10複合体では、遺伝子抑制効果を示さなかった。一方、ルシフェラーゼを抑制するsiRNAを内包したsiRNA-DGL6-γ-PGA10複合体はsiRNA-invivofectamine複合体に匹敵する高い遺伝子抑制効果を示した(図12)。

4. 考 察

デンドリマーは、中心から規則的に分枝した構造を持つ樹状高分子であり、分岐度が高い、対称性が良い、分子構造と分子量の分布を持たないといったユニークな特徴を有しており、遺伝子ベクターとしての有用性が報告されている³⁻⁵⁾。今回使用したDGLはアミノ酸であるリジンだけで

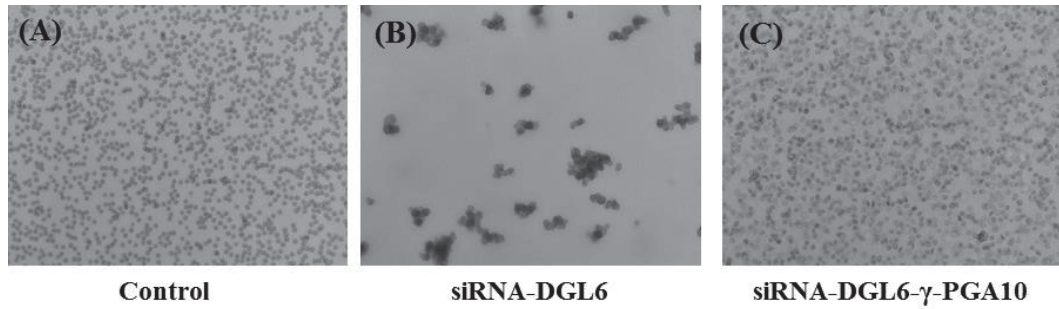


図 11 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の赤血球凝集

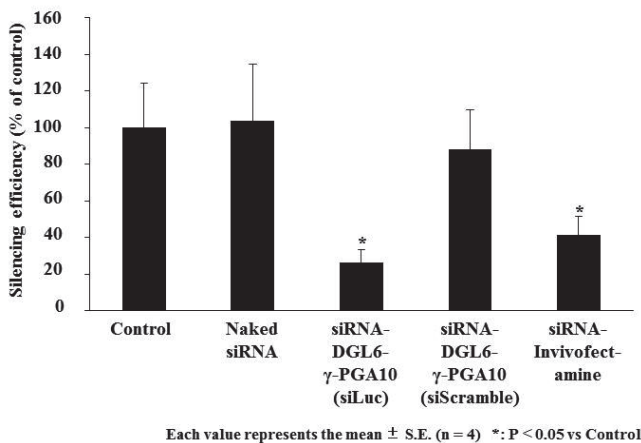


図 12 メラノーマ肺転移に対する siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果

構築された dendrimer 構造を有する新規カチオン性高分子であるため、生体適合性に優れており、臨床使用も期待できる。そこで本研究では DGL をコアとした siRNA ベクターの開発を行った。

まず、siRNA-DGL 複合体の製剤学的評価を行った。DGL の直径は 16 nm であり、siRNA と様々な電荷比で自己組織化することで粒子径 100 nm 以下のナノ粒子を形成した。また、粒子からの siRNA の流出がほとんどなかったことから、siRNA がナノ粒子に内包されていることが示唆された。さらに、siRNA-DGL6 複合体の TEM においても 100 nm 程度のナノ粒子であることが確認できた。

DGL の電荷比が 6 以上の複合体で B16-F10/Luc のルシフェラーゼ活性を抑制することができた。カチオン性複合体はアニオン性に帯電している細胞表面との相互作用により細胞取り込みが促進される。また、DGL は高い pH 緩衝能を有することが報告されている²⁾。そのため、エンドソーム脱出が促進されたことも高い遺伝子抑制効果を示した一因であると考えられる。一方で、カチオン性化合物はこの細胞表面との直接的な相互作用、あるいはカチオン性化合物の存在下で形成される活性酸素種 (ROS) によって、間接的に細胞傷害を引き起こすことが報告されている⁶⁾。実際、siRNA に対する DGL の電荷比が増加するにつれて細胞毒性も大きくなった。さらに、カチオン性化合物は生体

内において負電荷を帯びている血清タンパクや赤血球と結合し、凝集することも知られている。したがって、遺伝子ベクターを臨床応用するためには、このようなカチオン性由来の毒性を排除することが重要である。

カチオン性複合体の細胞毒性を克服するための有用な手段の 1 つとして、カチオン性化合物にアニオン性化合物を添加することが挙げられる。アニオン性化合物はカチオン性化合物と比較して、細胞膜の破壊が少なく、ミトコンドリアやリソソームへの損傷が弱いことが報告されている⁷⁾。我々は以前、様々なアニオン性化合物をスクリーニングした結果、γ-PGA がカチオン性化合物の毒性を軽減できることを見出した^{1, 2)}。γ-PGA は非免疫原性で炎症反応を引き起こさない生体適合性に優れた生体分解型の高分子である⁸⁾。そこで、高い遺伝子抑制効果と比較的低い細胞毒性を示した siRNA-DGL6 複合体に様々な量の γ-PGA を添加し、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の調製を試みた。

γ-PGA の濃度依存的に siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の表面電荷は低下し、siRNA に対する γ-PGA の電荷比が 6 以上で siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の表面電荷はアニオン性を示した。一方、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の粒子径は siRNA-DGL 複合体とほぼ同じであった。また、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体からの siRNA の流出はほとんどなく、siRNA が安定に内包されていることが示唆された。しかしながら、siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体においては、siRNA の放出が確認された。硫酸ヘパリンなどの一部のアニオン性高分子はカチオン性複合体の静電的結合を崩壊し、siRNA の安定性を損なうことが知られている。そのため、siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体では、大量の γ-PGA と DGL との静電的相互作用により siRNA が部分的に放出されたと考えられる。

一般に、アニオン性複合体は細胞表面との相互作用が減少することによって、細胞取り込みが低下する。しかしながら、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は表面電荷がアニオン性に関わらず、カチオン性の siRNA-DGL6 複合体に匹敵する高い遺伝子抑制効果を示した。これらの結果は γ-PGA 被膜型複合体が γ-PGA に特異的な受容体を介してエネルギー依存的に取り込まれたという以前の報告に一致

するものであった。また、siRNA-DGL6- γ -PGA 複合体は siRNA-DGL6 複合体で認められた細胞毒性および血液毒性を軽減することができた。したがって、生体内へ投与後に血栓や塞栓を生じる可能性がなく、in vivo においても安全に投与できる可能性が示された。

そこで、siRNA-DGL6- γ -PGA 複合体の in vivo における有用性を、メラノーマ肺転移モデルマウスを用いて評価した。その結果、siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体は siRNA-invivofectamine 複合体に匹敵する遺伝子抑制効果を示した。一方で、スクランブル siRNA を内包した siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体では遺伝子抑制効果を示さなかったことから、siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体の効果は毒性によるものや off-target によるものではなく、複合体により効率的に siRNA をメラノーマ細胞へ導入できた結果であることが示唆された。

5. 総 括

本研究では、siRNA と DGL および γ -PGA を自己組織化させることで siRNA-DGL- γ -PGA 複合体を作製することに成功した。siRNA-DGL- γ -PGA 複合体は皮膚がんであるメラノーマ細胞株において、細胞毒性を示すことなく、高い遺伝子抑制効果を示した。さらに、メラノーマ肺転移モデルマウスに siRNA-DGL- γ -PGA 複合体を静脈内投与した結果、in vivo においても遺伝子抑制効果を示した。したがって、siRNA-DGL- γ -PGA 複合体は皮膚に対して安全かつ高効率に siRNA を送達させることで、RNA 干渉を制御できる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Niidome T, Kodama Y, Nakagawa H, To H, Sasaki H, : Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials.*, 30, 2846-2853, 2009.
- 2) Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H, : Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery, *Eur J Pharm Biopharm.*, 87, 472-479, 2014.
- 3) Petit MW, Griffiths P, Ferruti P, Richardson SC, : Poly(amidoamine) polymers: soluble linear amphiphilic drug-delivery systems for genes, proteins, and oligonucleotides, *Ther Deliv.*, 2, 907-917, 2011.
- 4) Wang M, Hu H, Sun Y, Qiu L, Zhang J, Guan G, Zhao X, Qiao M, Cheng L, Cheng L, Chen D, : A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan - PAMAM-plasmid DNA complexes for cancer cell targeting, *Biomaterials.*, 34, 10120-10132, 2013.
- 5) Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L, : PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing, *Chem Commun.*, 22, 2362-2364, 2006.
- 6) Hui Yi Xue, Shimeng Liu, Ho Lun Wong, : Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine, *Nanomedicine (Lond.)*, 9, 295-312, 2014.
- 7) Fröhlich E, : The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int J Nanomedicine.*, 7, 5577-5591, 2012.
- 8) Ye H, Jin L, Hu R, Yi Z, Li J, Wu Y, Xi X, Wu Z, : Poly(gamma, L-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice, *Biomaterials.*, 27, 5958-5965, 2006.