

## アテロコラーゲン siRNA 導入技術の RNAi 医薬への応用

本間 紀美,<sup>a,b</sup> 竹下文隆,<sup>a</sup> 落谷 孝広<sup>\*,a</sup>

## Application of Atelocollagen-mediated siRNA Delivery for RNAi Therapies

Kimi HONMA,<sup>a,b</sup> Fumitaka TAKESHITA,<sup>a</sup> and Takahiro OCHIYA<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup>Section for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan, and <sup>b</sup>Koken Bioscience Inst., KOKEN Co., Ltd., 2-13-10 Ukima, Kita-ku, Tokyo 115-0051, Japan

(Received January 5, 2007)

RNAi has rapidly become a powerful tool for drug target discovery and validation in an *in vitro* culture system and, consequently, interest is rapidly growing for extension of its application to *in vivo* systems, such as animal disease models and human therapeutics. Novel treatments and drug discovery in pre-clinical studies based on RNAi are currently targeting a wide range of diseases, including viral infections and cancers by the local administration of synthetic small interfering RNA (siRNA) that target local lesions. Recently, specific methods for the systemic administration of siRNAs have been reported to treat non-human primates or a cancer metastasis model. *In vivo* siRNA-delivery technology is a key hurdle to the successful therapeutic application of RNAi. This article reviews the non-viral delivery system of atelocollagen for siRNA, which could be useful for functional screening of the genes *in vitro* and *in vivo*, and will provide a foundation for further development of RNAi therapeutics.

**Key words**—RNAi; siRNA; atelocollagen; delivery

## 1. はじめに

RNA 干渉 (RNAi) は、植物でみつかった転写後遺伝子サイレンシング (post-transcriptional gene silencing; PTGS) あるいは、ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (viral-induced gene silencing; VIGS) という現象を手掛かりとして発見された。RNAi が線虫で初めて見出されたのは、1998 年のことであるが、相ついで、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエなど様々な種で確認され、さらに哺乳類においても RNAi が報告された。RNAi は、生物学や医学の研究に大きなインパクトを与えたと同時に、バイオ医療の新星として大いに注目されていることは、2006 年のノーベル医学生理学賞の受賞でも示されている。創薬においては、RNAi が遺伝子発現抑制による強力な解析ツールとして、新規治療標的の同定のために使用されている。また、医療においては、

siRNA (small interfering RNA) の患部への局所投与による、加齢黄斑変性症の治療が臨床試験段階にあるほか、感染症、がんを始めとした多くの疾患への適用が検討されている。近年、siRNA の全身投与によっても、霊長類における成功や、<sup>1)</sup> 転移性がんモデルでの成功が報告されており、<sup>2)</sup> 臨床応用への期待が高まっている。

本総説では、われわれが開発したアテロコラーゲンによる siRNA 導入技術を中心に、アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる新規分子標的探索のためのユニークな解析手法、医療への応用も期待される生体への siRNA デリバリー方法について概説する。

## 2. RNAi

RNAi とは 2 本鎖 RNA (dsRNA) によって引き起こされる配列特異的な遺伝子発現抑制の現象である。生体内に導入された dsRNA は、RNase III ファミリーに属する Dicer と呼ばれる酵素により、3'末端側に 2 塩基の突出を持つ 21 塩基の dsRNA である siRNA (short interfering RNA) にプロセッシングされる。siRNA は RNA-ヌクレアーゼ複合体

<sup>a</sup>国立がんセンター研究所がん転移研究室 (〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1), <sup>b</sup>榊高研 高研バイオサイエンス研究所 (〒115-0051 北区浮間 2-13-10)

\*e-mail: tochiya@ncc.go.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S2 で発表したものを中心に記述したものである。

である RISC (RNA induced silencing complex) によって 2 本鎖がときほぐされたのちにアンチセンス鎖が取り込まれて、そのアンチセンス鎖に相補的な配列を持つ RNA を選択的に分解する。

RNAi は、以下の理由により、急速に普及し、核酸医薬としての実用化に期待が集まっている。siRNA は、1) 標的遺伝子に対する高い特異性を持つ、2) リスクに取り込まれた 1 本鎖 RNA は使い捨てではなく、連続して標的遺伝子を攻撃するため、毒性の生じ難いごく微量で確実な抑制効果を生む、3) 確実に標的遺伝子の発現を抑制し得る siRNA のデザインが、簡単なソフトによる検索で、誰にでも簡単に行える。この RNAi に先行して進んでいたのが同じ核酸医薬として開発されていたアンチセンス医薬である。しかし、副作用を上回るほどの有効性を示す臨床上的結果が得られず、最終的な承認に届かなかった例が多い。RNAi 医薬は、その抑制の確かさから、アンチセンス医薬に比べ、実用化において優位であると考えられている。一方で、その研究の歴史が浅いゆえに、メカニズムを完全に解明できたとは言えず、思わぬ副作用を招くことがないように、臨床応用には慎重さが求められるのも事実である。

RNAi 医薬が実用化されるまでに残された課題の 1 つは、siRNA のデリバリー方法である。siRNA のデリバリーについては、動物個体レベルでも既に多くの試みがなされている。例えばマウスの尾静脈から合成 siRNA を体重の 10% もの大量の PBS 溶液で数秒の短時間で注入するハイドロダイナミックス導入法で、動物の肝細胞への siRNA の導入に成功したとの報告がある。しかし、このような生体のホメオスタシスを無視した方法はヒトには到底適応できるものではない。また、ウイルスベクターに siRNA を組み込んで、動物個体に投与し siRNA を発現させる方法も開発されているが、まだ、臨床応用可能な方法は確立されていない。リポソーム製剤も siRNA 用に開発が進んでおり、霊長類における成功など、有望な成果も得られているが、アンチセンス医薬のデリバリーで問題になった、副作用については未知数である。われわれは、導入効率のみならず安全面でも優れる siRNA のデリバリーを指向し、アテロコラーゲンによる siRNA 導入技術の開発を進めている。以下に、アテロコラーゲンによる

siRNA デリバリーの有用性と課題について考察する。

### 3. アテロコラーゲン

アテロコラーゲン (Atelocollagen, ㈱高研) は、ウシ真皮の I 型コラーゲンを由来とするバイオマテリアルである。コラーゲン分子は、N-, C- 両末端にコラーゲンの主要抗原部位であるテロペプチドを有する。アテロコラーゲンは、そのテロペプチドを、ペプシン処理により除去した分子である。したがって、アテロコラーゲンは、免疫原性が極めて低く、生体適合性が高いバイオマテリアルである。それゆえ、長年医療分野で使用されてきたほか、DDS の基材としての応用研究も進められている。

### 4. アテロコラーゲンによる siRNA デリバリー

アテロコラーゲンによる核酸導入技術は、落谷らによって初めて発見された。<sup>3)</sup>以降、プラスミド DNA、アデノウィルスベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA などが、アテロコラーゲンを導入担体とすることで、培養細胞及び生体に導入できることが報告されている。<sup>4-12)</sup>

生理的条件において、アテロコラーゲンは正電荷、siRNA などの核酸は負電荷を帯びるため、アテロコラーゲンと核酸の両者は、静電氣的に結合し複合体を形成する。アテロコラーゲンと核酸の複合体の形状は、主にアテロコラーゲンの濃度によって規定され、アテロコラーゲンの濃度の上昇とともに、粒子状から繊維状に変化する。<sup>4)</sup>アテロコラーゲンと核酸の複合体の形状は、デリバリーの効率に大きく影響し、デリバリー対象に応じて、適切な形状が存在する。われわれは、核酸デリバリーの際のアテロコラーゲン濃度を、培養細胞においては 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、生体における局所投与では 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、全身投与では 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に設定しており、良好な結果を得ている。

アテロコラーゲンと複合体化した核酸は、ヌクレアーゼによる分解を免れ、組織や細胞内に効率よく送達される。<sup>3,10)</sup>アテロコラーゲンと核酸のコンプレックスはエンドサイトーシスにより、細胞内に取り込まれると推定されている。siRNA は、RNase によって分解されてしまうため、いかに分解を防ぎ完全な分子状態を保つか、デリバリーの成否を決定付ける大きなポイントである。アテロコラーゲンと複合体を形成している siRNA は、血清及び生体組

織内で安定に保持されることが明らかとなっており、<sup>10)</sup> アテロコラーゲン分子がヌクレアーゼの siRNA への接触をブロックしていると考えられている。

### 5. アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイ

ヒトゲノム解読後、遺伝子発現解析により、疾患や分化、発生など様々な生命現象に関する膨大な遺伝子発現情報をもたらされ、創薬においても、遺伝子の機能を細胞レベルで解析するファンクショナルゲノミクスの重要性が増しているのは言うまでもない。RNAi による Loss of function の解析手法は、ファンクショナルゲノミクスのための強力なツールである。われわれは、RNAi による遺伝子機能解析及び siRNA 医薬のスクリーニングに、アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイを使用している。<sup>4,11,13,14)</sup> アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイとは、アテロコラーゲンによる核酸導入技術を、培養細胞へのハイスループットトランスフェクションに応用したシステムである。

従来、遺伝子導入は、あらかじめ細胞を培養しておき、そこに核酸と遺伝子導入試薬の混合物を専事調製し添加する、あるいはウイルスベクターを作製し感染させることで行われてきた。しかし、多検体の遺伝子を導入するのは、多大な時間と労力を要する。そこで開発されたのが、リバーストランスフェクションに基づくトランスフェクションアレイ技術である。リバーストランスフェクションは、あらかじめ導入可能な状態の核酸を基板上にアレイ化しておき、そこに細胞を播種して、細胞内に取り込ませる方法である。トランスフェクションアレイは、2001 年にわれわれの研究グループと MIT の Sabatini ら 2 つのグループが発表して以来、<sup>15)</sup> 複数のグループが類似のシステムを考案している。

アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイは、アテロコラーゲンと siRNA のコンプレックスがマルチウェルプレートのウェルにコーティングされており、そこに細胞を播種、培養すると、細胞中に siRNA がトランスフェクションされる。あらかじめアテロコラーゲンと多検体の核酸とのコンプレックスを、96 穴や 384 穴などのマルチウェルプレートの各ウェルにアレイ化しておけば、多検体の siRNA を短時間で同時にトランスフェクションす

ることができる。さらに、培養終了後、既存の解析装置や各種測定試薬を使用して細胞機能解析を行うことで、ハイスループットな遺伝子機能解析が可能となる (Fig. 1)。

今までの遺伝子機能解析では、発現解析により同定された多検体の遺伝子をデータベース検索し、期待される機能を持つ少数の遺伝子に選抜した上で、その機能を解析するということが行われてきた。しかし、この方法では選抜されなかった他大多数の遺伝子について、機能を解明することはできない。また、期待される機能を持つ遺伝子に始めから絞り込んでしまえば、他の遺伝子の持つ新規機能や新規

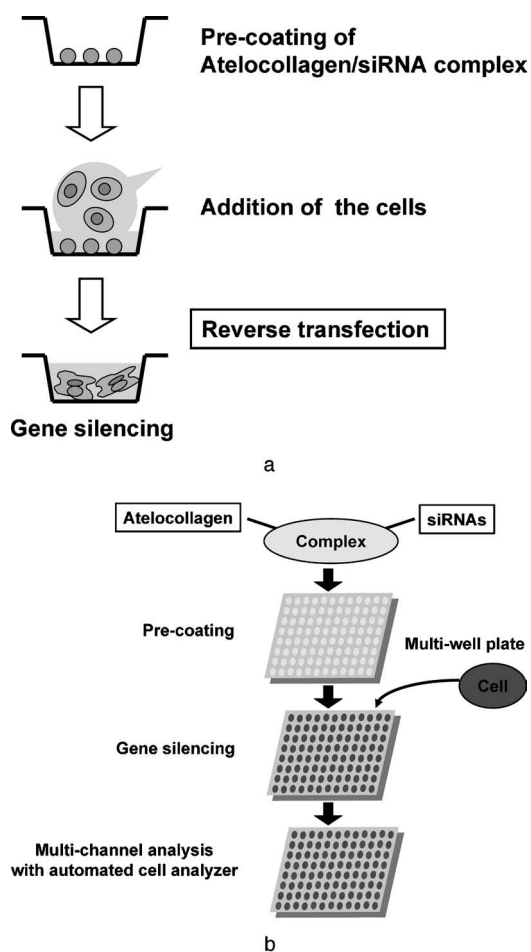


Fig. 1. Atelocollagen Based-cell Transfection Array

a: Principle of atelocollagen-based RNAi cell transfection array. Atelocollagen and siRNA complexes are pre-coated on a cell culture plate. The cells are added to the plate and then cells uptake the siRNAs by reverse transfection. Finally, RNAi-mediated gene silencing is induced in the cells. b: High-throughput Screening of Gene Function. The siRNA/atelocollagen complexes are arrayed and pre-coated on multi-well plates. The cells are plated into the siRNA/atelocollagen-complex pre-coated plates. After that, the effects of the downregulation of genes are evaluated with automated cell analyzer. Many genes function can be identified in a short time by atelocollagen-based cell transfection array.

遺伝子を突止めることはできない。やはり、発現解析により同定された多検体の遺伝子すべてについて、網羅的な遺伝子機能解析をすることが必要である。アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイは、網羅的な遺伝子機能解析を可能とする有力なシステムである。アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイで選ばれた有望な遺伝子については、次項より解説する。アテロコラーゲンによる生体への siRNA デリバリーで検証し、有力な分子標的となり得るものを同定することができる。アテロコラーゲン siRNA 導入技術を駆使した、*in vitro*, *in vivo* の解析は、新規分子標的を探索するための強力な戦略であるといえる (Fig. 2)。

#### 6. 生体への siRNA デリバリー—局所投与—

アテロコラーゲンを導入担体とする siRNA の局所投与は、担がんマウスに対して、腫瘍に直接 siRNA とアテロコラーゲンの複合体を投与することで、複数の研究グループが良好な結果を得ている (Table 1)。われわれは、マウスの皮下に移植したメラノーマや精巣に移植した腫瘍に対し、アテロコラーゲンをを用いて siRNA を投与した結果、標的遺伝子の発現抑制を認め、RNAi 効果を確認した。<sup>10)</sup> また、siRNA をアテロコラーゲンとともに複合体化することで、siRNA 単独で投与した場合よりも、RNAi 効果が持続し、より高い腫瘍増殖抑制効果を示すことを見出した。さらに、武井らは、ヌードマウスの皮下に移植したヒト前立腺がん細胞に対して、VEGF に対する siRNA とアテロコラーゲンの複合体を投与し、腫瘍の増殖を顕著に抑制できることを報告した。<sup>16)</sup> その機序として、アテロコラーゲンとの複合体の形成により、細胞への取り込み効率が高まるとともに、siRNA の半減期が延長されることが示されている。

#### 7. 生体への siRNA デリバリー—全身投与—

アテロコラーゲンを導入担体とする siRNA の全身投与の有効性は、腫瘍の骨転移モデルで確かめられている。<sup>2)</sup> われわれは、ヒト前立腺がん細胞を、ヌードマウスの左心室に移植して骨転移モデルを作製し、尾静脈投与によって siRNA とアテロコラーゲン複合体が、骨を含めた全身の転移巣へとデリバリーされるかを検討した。siRNA 単独投与では標的遺伝子産物の抑制効果は 40% 以下であるのに対し、siRNA とアテロコラーゲンの複合体の投与では、90% 以上の抑制効果を認めた。この結果は、骨

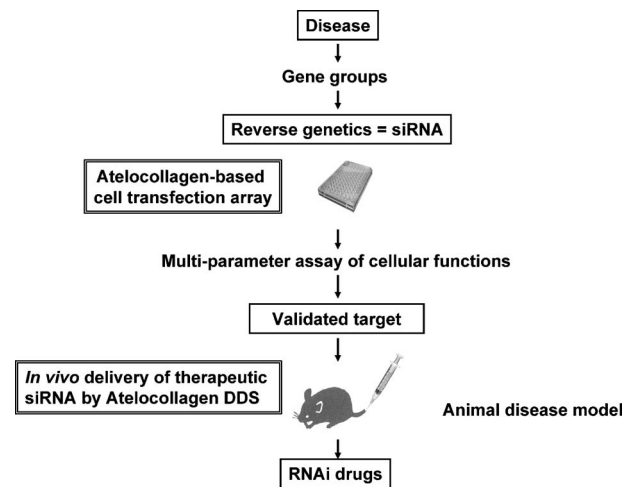


Fig. 2. The Strategy for the Target Validation of Druggable Genes by an Atelocollagen-based siRNA Delivery *In vitro* and *In vivo*

The Based on information about gene groups (several hundred in a pool) that possess altered expression levels (increased) in diseases as detected by microarray analyses of clinical samples, we synthesize siRNAs against genes. These siRNA molecules are screened using an atelocollagen-based cell transfection array on target culture cells (a cell line), and then identified the siRNAs that induce the desired activities, such as apoptosis, cell proliferation, or infiltration. Next, we use atelocollagen DDS to deliver these candidate siRNAs into animals that serve as models of diseases. Finally, drug actions are examined to identify the druggable molecules that can be clinically applied to humans.

Table 1. *In vivo* Delivery of siRNAs by Atelocollagen

Therapeutic model (Cell lines)	Implanted site (Target organs)	Route	Target genes	References
Prostate cancer (PC-3)	s.c.	<i>i.t.</i>	VEGF	16
Germ-cell tumor (NEC8)	Testis	<i>i.t.</i>	FGF-4	10
Prostate cancer (PC-3M-Luc)	Bone metastasis	<i>i.v.</i>	EZH2, p110a	2
Prostate cancer (PC-3)	s.c.	<i>i.t.</i>	midkine	17
Cervical cancer	s.c.	<i>i.t.</i>	HPV18 (E6 & E7)	18
Head and neck squamous cell carcinoma (SAS)	s.c.	<i>i.t.</i>	EGFR	19

s.c.: subcutaneous, *i.v.*: intravenous, *i.t.*: intratumoral.

転移巣をターゲットとした全身性のデリバリーにも、アテロコラーゲンが適用可能であることを示している。また、前立腺がんの悪性度に関与する2つの遺伝子、EZH2とp110 $\alpha$ に対するsiRNAのアテロコラーゲンによるデリバリーは、骨転移腫瘍の増殖を顕著に抑制することも確認した。さらに、アテロコラーゲンによるsiRNAのデリバリーは、インターフェロンやインターロイキンなどの有害な反応を惹起せず、その安全性が示された。

#### 8. アテロコラーゲン siRNA デリバリーシステムの課題

生体への核酸デリバリーにおけるキーポイントの1つはいかに正常部位への影響を少なくして、標的とする病巣部にのみ核酸を送達するかである。アテロコラーゲン DDS による siRNA の全身投与では、先の骨転移モデルマウスにおいて、骨転移腫瘍部位と同時に、正常の他の臓器へも siRNA がデリバリーされることが確認された。<sup>2)</sup> また、正常の動物に全身性に投与すると、複合体である siRNA の動態は、多くの臓器に分布する結果となり、標的性や目立った臓器指向性はなさそうである。アテロコラーゲン DDS による全身性投与方法もヒトへの応用に関してはまだ越えるべき大きな壁があるといえる。

一方で、担がんマウスへのアテロコラーゲン siRNA の全身性投与では、同じ動物の腫瘍部位への siRNA の到達度は、正常な肝臓と比較して、およそ 1.7—2.2 倍であった。この腫瘍への siRNA の到達度の違いは 1986 年に前田らによって見いだされた EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect) によって一部説明することが可能かもしれない。<sup>20)</sup> EPR 効果とは、がん組織にある新生血管は正常組織の血管に比べて、血管壁組織の構築性が悪く、物質透過性が高いため、サイズの比較的大きな高分子化合物がより多くがん組織に透過・移行する。さらに、がん組織ではリンパ管による高分子化合物の回収機構が不完全であると考えられるため、高分子化合物はがん組織内に滞留し易くなる効果のことである。実際、アテロコラーゲンを用いた siRNA デリバリーによる遺伝子発現の抑制効果は、正常組織よりもがん組織で大きいことが確認されている。この EPR 効果の発見により、固形がんに対するターゲティング研究は大きく変化した。従来、がん細胞への薬物のターゲティングの研究

開発は、これまでがん細胞に特異的に発現している抗原との抗体反応を利用し薬剤をがんのみに集積させようとするアクティブターゲティングの原理に基づいて行われてきた。しかし、標的とするがん抗原に類似の抗原が血液中及び他の正常細胞表面に存在するため、標的部位に薬物を薬効の出る一定濃度以上に集積できないという問題があった。EPR 効果を利用した、がん細胞に血中の薬物を取り込ませるパッシブターゲティングは、この問題を克服する手掛かりとなるかもしれない。アテロコラーゲン DDS と EPR 効果の関係を検討することには、がん治療への応用に向けて、大きな意味を持つと考えられる。

#### 9. おわりに

本稿では、アテロコラーゲンによる siRNA 導入技術が、アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる新規分子標的探索に応用されること、生体への siRNA デリバリーに有用であることを述べた。しかし、アテロコラーゲンと siRNA 複合体の細胞内への取り込み過程や RNAi 効果の長期維持に関する分子レベルでの解明、生体における標的性の向上など、重要な課題も残されている。また、siRNA と並んで RNAi 創薬として、注目されているのが microRNA (miRNA) である。miRNA は翻訳レベルでタンパク質の発現を制御しているとされ、ヒトでは 500 種類以上の miRNA が同定されている。miRNA の発現異常が、がんなどの疾患に関与することが明らかとなってきた。この miRNA に関しても、それらが制御する疾患の解明や治療への糸口として、アテロコラーゲンによるデリバリーの応用が有効かも知れない。われわれは、これらの課題を解決し、アテロコラーゲンによる核酸デリバリーが、導入効率と安全性の高い DDS として、医療分野で実用化されることを目指している。

**謝辞** 本研究成果は、国立がんセンター研究所がん転移研究室、榎高研、大日本住友製薬の共同研究による。

#### REFERENCES

- 1) Zimmermann T. S., Lee A. C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M. N., Harborth J., Heyes J. A., Jeffs L. B., John

- M., Judge A. D., Lam K., McClintock K., Nechev L. V., Palmer L. R., Racie T., Rohl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A. J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliensky V., Manoharan M., Vornlocher H. P., MacLachlan I., *Nature*, **441**, 11–14 (2006).
- 2) Takeshita F., Minakuchi Y., Nagahara S., Honma K., Sasaki H., Hirai K., Teratani T., Namatame N., Yamamoto Y., Hanai K., Kato T., Sano A., Ochiya T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 12177–12182 (2005).
  - 3) Ochiya T., Takahama Y., Nagahara S., Sumita Y., Hisada A., Itoh H., Nagai Y., Terada M., *Nat. Med.*, **5**, 707–710 (1999).
  - 4) Honma K., Ochiya T., Nagahara S., Sano A., Yamamoto H., Hirai K., Aso Y., Terada M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 1075–1081 (2001).
  - 5) Ochiya T., Nagahara S., Sano A., Itoh H., Terada M., *Curr. Gene Ther.*, **1**, 31–52 (2001).
  - 6) Hirai K., Sasaki H., Sakamoto H., Takeshita F., Asano K., Kubota Y., Ochiya T., Terada M., *J. Gene Med.*, **5**, 951–957 (2003).
  - 7) Sano A., Maeda M., Nagahara S., Ochiya T., Honma K., Itoh H., Miyata T., Fujioka K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1651–1677 (2003).
  - 8) Nakamura M., Ando Y., Nagahara S., Sano A., Ochiya T., Maeda S., Kawaji T., Ogawa M., Hirata A., Terazaki H., Haraoka K., Tanihara H., Ueda M., Uchino M., Yamamura K., *Gene Ther.*, **11**, 838–846 (2004).
  - 9) Hanai K., Kurokawa T., Minakuchi Y., Maeda M., Nagahara S., Miyata T., Ochiya T., Sano A., *Hum. Gene Ther.*, **15**, 263–272 (2004).
  - 10) Minakuchi Y., Takeshita F., Kosaka N., Sasaki H., Yamamoto Y., Kouno M., Honma K., Nagahara S., Hanai K., Sano A., Kato T., Terada M., Ochiya T., *Nucleic Acids Res.*, **32**, e109 (2004).
  - 11) Honma K., Miyata T., Ochiya T., *Curr. Drug Discov. Technol.*, **1**, 287–294 (2004).
  - 12) Takeshita F., Ochiya T., *Cancer Sci.*, **97**, 689–696 (2006).
  - 13) Saito S., Honma K., Kita-Matsuo H., Ochiya T., Kato K., *Physiol. Genomics*, **22**, 8–13 (2005).
  - 14) Kurokawa Y., Honma K., Takemasa I., Nakamori S., Kita-Matsuo H., Motoori M., Nagano H., Dono K., Ochiya T., Monden M., Kato K., *Int. J. Oncol.*, **28**, 383–391 (2006).
  - 15) Ziauddin J., Sabatini D. M., *Nature*, **411**, 107–110 (2001).
  - 16) Takei Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatsu T., *Cancer Res.*, **64**, 3365–3370 (2004).
  - 17) Takei Y., Kadomatsu K., Goto T., Muramatsu T., *Cancer*, **107**, 864–873 (2006).
  - 18) Fujii T., Saito M., Iwasaki E., Ochiya T., Takei Y., Hayashi S., Ono A., Hirao N., Nakamura M., Kubushiro K., Tsukazaki K., Aoki D., *Int. J. Oncol.*, **29**, 541–548 (2006).
  - 19) Nozawa H., Tadakuma T., Ono T., Sato M., Hiroi S., Masumoto K., Sato Y., *Cancer Sci.*, **97**, 1115–1124 (2006).
  - 20) Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., *J. Control. Release*, **65**, 271–284 (2000).