

## Argonaute2 ノックダウンによる腫瘍新生血管傷害療法の開発

畑中剣太郎, 清水広介, 浅井知浩, 奥 直人\*

### Antineovascular Gene Therapy by Ago2 Knockdown

Kentaro HATANAKA, Kosuke SHIMIZU, Tomohiro ASAI, and Naoto OKU

Department of Medical Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,  
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received July 22, 2008)

Small interfering RNA (siRNA), which induces sequence-dependent gene silencing, has been widely studied. We previously developed polycation liposomes (PCL) as carriers of plasmid DNA and succeeded in showing their potent gene expression efficiency. In the present study, we optimized PCL for siRNA transfection and used it to determine the role of Argonaute2 (Ago2), a main constitution protein of RNA-induced silencing complex (RISC), on angiogenesis. We determined the biological effect of Ago2 knockdown on the angiogenic potential of endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) stimulated with cytokines including vascular endothelial growth factor (VEGF) were used as an *in vitro* angiogenesis model. Our data showed that Ago2 knockdown using polycation liposomal Ago2-siRNA (siAgo2) suppressed indispensable processes of angiogenesis, namely endothelial cell proliferation and tube formation. Furthermore, TUNEL staining indicated that the treatment with siAgo2 increased apoptotic cells in comparison to that with control siRNA. These results might be caused by disorder of microRNA system. Next, we attempted to construct systemic siRNA delivery system targeting to angiogenic vessels. Synthetic siRNA was incorporated in polycation liposomes modified with polyethyleneglycol (PEG) and the functional peptide on their surface. Peptide-modified liposomes enhanced cellular uptake of siRNA in comparison with non-modified liposomes. Thus APRPG-modified liposomal siAgo2 may be useful for tumor treatment.

**Key words**—Argonaute2; angiogenesis; small interfering RNA (siRNA); microRNA system; polycation liposome

### 1. はじめに

プラスミド DNA, アンチセンスオリゴヌクレオチド, small interfering RNA (siRNA) などの核酸は次世代の医薬品シーズとして有望視されている。中でも siRNA は, わずか 20 数塩基対の二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) であるが, 標的遺伝子の発現を強力かつ特異的に抑制する機能を有する。これは RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) と呼ばれる現象でその特異性と効果から, これまで治療困難だった様々な疾患への治療応用に向けて研究が活発に行われている。特に遺伝子異常疾患であるがんにおいては, 有用な遺伝子治療法の 1 つとして注目されている。これまで RNAi による

治療法の研究例としては, がん細胞で発現が亢進している分子や特異的に発現している分子,<sup>1)</sup>あるいはアポトーシスに関与する分子<sup>2)</sup>を標的としたものが挙げられる。しかしながら, がんには様々な分子が関与しており 1 つの分子を狙った方法では, 高い治療効果が得られないというのが現状である。われわれは, 様々な分子の発現を制御している Argonaute2 (Ago2) を標的分子とし, がんの治療応用の可能性を探った。本稿では, がんにおいて必須の器官である新生血管内皮細胞の Ago2 をノックダウンし, 血管内皮細胞の増殖阻害, アポトーシス誘導, 管腔形成抑制などのパラメーターを解析し, 腫瘍新生血管傷害療法への応用を目指した研究について紹介する。

### 2. miRNA システムと血管新生

RNAi は転写後遺伝子サイレンシング (post-transcriptional gene silencing; PTGS) に含まれるため, 安全な遺伝子治療の実現が可能であると考えら

静岡県立大学大学院薬学研究科医薬生命化学講座  
(〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1)

\*e-mail: d7209@u-shizuoka-ken.ac.jp

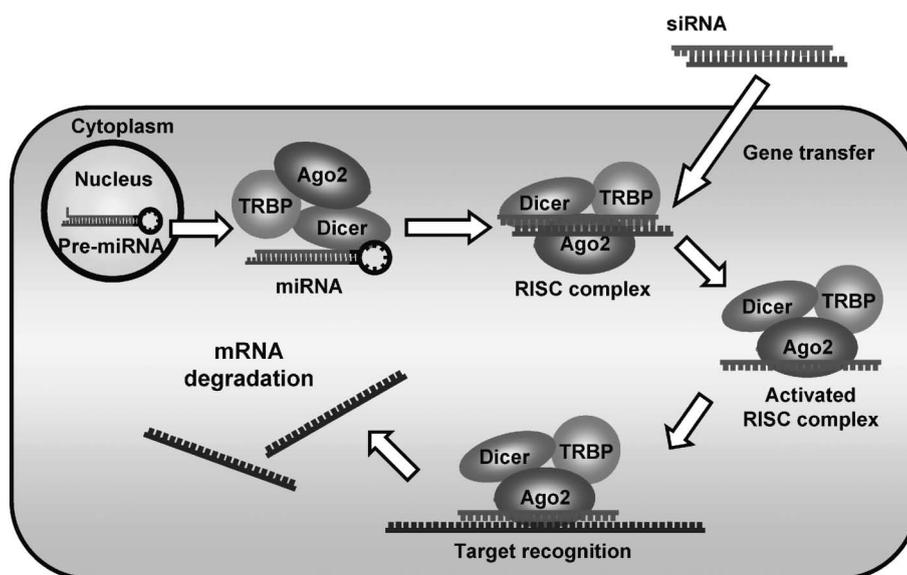
本総説は, 日本薬学会第 128 年会シンポジウム GS3 で発表したものを中心に記述したものである。

れている。siRNA は細胞質でマルチコンポーネントの RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) を形成し、アンチセンス鎖に相補的な配列を有する mRNA を Ago2 が切断することによって遺伝子の発現を抑制する。<sup>3)</sup> Ago2 は RISC コンポーネントの 1 つであり、mRNA を切断する酵素として働くことから、遺伝子発現調節機構において中核を担うタンパク質であると考えられている。また、Ago2 は siRNA だけでなく、細胞内で microRNA (miRNA) による遺伝子発現制御に関与している (Fig. 1)。miRNA は植物や動物のゲノムにコードされており、siRNA と同様に特異的な mRNA に結合し、翻訳の調節や遺伝子発現の制御に関与している。ヒトゲノム解析結果によれば、1 万種以上の miRNA が発現している可能性があり、ヒト遺伝子の 1/3 が miRNA の標的となる可能性が報告されている。<sup>4)</sup> 近年、多数の miRNA が同定され、その作用機構も明らかとなってきた。また、様々な疾患と miRNA 発現異常との関連性が報告されるようになった。特に、がんと miRNA の研究は盛んに行われており、がん遺伝子である ras<sup>5)</sup> やアポトーシス関連遺伝子である bcl-2 を調節している miRNA が発見されたことから、<sup>6)</sup> miRNA は新しいがん治療標的として注目されつつある。これらの機能性 RNA は Ago2 を含む RISC を

介して細胞の表現系を調節している。事実、RISC コンポーネントの 1 つである Dicer はマウスの発達に必須のタンパク質であり、また、血管新生においては miRNA が重要な働きを担っていることが報告されている。<sup>7)</sup> さらには、血管新生に関与する miRNA として miR-221、miR-222 などが近年同定され、miRNA の重要性が示唆されている。<sup>8)</sup> つまり、miRNA システムは血管新生と密接に関与しているといえる。しかしながら、血管新生における Ago2 の寄与についてはこれまで検討がなされていない。そこで本研究では、血管内皮細胞の Ago2 をノックダウンすることにより、血管新生における Ago2 の寄与について検討した。

### 3. siRNA 導入キャリアーの最適化

siRNA による治療応用を視野に入れた場合、臨床に応用可能な導入キャリアーの開発が必須となる。そのためには、生体内環境において高い RNAi 効果を有するキャリアーは必要不可欠となる。これまで、非ウイルスベクターであるリポソームを用いて、安全で効率的な遺伝子導入キャリアーの構築を行ってきた。リポソームは生体成分から構成されているため免疫原性や毒性が低く、生体内分解性であり安全であるという利点を有する一方、遺伝子導入効率が低いという問題点がある。この問題点を解決するため、われわれはリポソーム表面にポリカチオ



RNAi: RNA interference; siRNA: short-interfering RNA; Ago2: Argonaute2; TRBP: TAR RNA binding protein; RISC: RNA-induced silencing complex

Fig. 1. Role of Argonaute2 on RNA Interference

ンを修飾した polycation liposomes (PCLs) の開発を行ってきた。これまでにインビトロ及びインビボにおいてプラスミド DNA の導入効率を評価し、Fig. 2 に示すようなセチルポリエチレンイミン (cetyl-PEI) を膜修飾した PCLs が細胞への遺伝子導入効率に優れたキャリアーであることを報告してきた。さらに、インビボにおいても遺伝子発現が認められ、遺伝子導入キャリアーとして有用であることを明らかにした。<sup>9)</sup>

プラスミド DNA での高い遺伝子発現能を有する PCLs だが、siRNA は 20 数塩基対の短い dsRNA であるためプラスミド DNA と同様に高効率な遺伝子導入が可能であるかは不明であった。siRNA のノックダウンを実現するには、第 1 に細胞質内に siRNA を送達できること (細胞内導入)、第 2 にエンドソームから脱出し RISC に取り込まれること (細胞内動態制御) が必要である。そこで、siRNA の細胞内導入効率及び siRNA によるノックダウン効率の点から PCLs の組成及び導入条件の検討を行った。はじめに、ヒト繊維芽肉腫細胞 (HT1080 細胞) を用いて PCLs の評価を行い、次に腫瘍新生血管内皮細胞モデルとしてサイトカインで刺激したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVECs) を用いて siRNA 導入キャリアーとしての有用性を検討した。キャリアーはコレステロール含有及び非含有 cetyl-PEI 修飾 PCLs を用いて、Nitrogen/Phosphorus 比 (N/P 比) 18-24 の条件でトランスフェクションを行った。

細胞内導入効率の評価を目的として 6-fluorescein-6-carboxamido hexanoate (FAM) で蛍光標識した

siRNA (FAM-siRNA) を HT1080 細胞に添加し、4 時間後の細胞内の蛍光強度によって測定した結果、コレステロールを含む PCLs において N/P 比が 24 の条件で最も高い siRNA 導入効率を示した。また、簡便にノックダウン効果の評価するため緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein; EGFP) を恒常的に発現するように構築したヒト繊維芽肉腫細胞 (EGFP/HT1080 細胞) に EGFP に対する siRNA (siEGFP) を用いてノックダウン効率を検討した。siRNA 導入効率の検討同様、N/P 比が 24 の条件においてコレステロールを含んだ PCLs が、高いノックダウン効率を示した (data not shown)。そのノックダウン効率は遺伝子導入試薬であるリポフェクトアミン 2000 (LipofectAMINE; LFA2K) と比較して同程度であり、約 55% のノックダウン効率を示した。また、PCLs の細胞毒性は確認されなかった。

これらのスクリーニングの結果を基に、siAgo2 を HUVECs に導入し siRNA 導入効率、mRNA レベル・タンパク質発現レベルにおける Ago2 ノックダウン効果を検討した。siRNA 導入効率を検討した結果、HT1080 細胞と比較して HUVECs において高い導入効率を示した [Fig. 3(A)]。RT-PCR によりノックダウン効率を測定した結果、Fig. 3(B) に示すように導入 8 時間後から特異的な Ago2 発現抑制効果が得られ、24 時間後に最大の抑制効果を確認した。また、ハウスキーピング遺伝子の 1 つである Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) においても特異的な発現抑制効果が観察された。さらにウェスタンブロッティングを行った結果、導入 48, 72 時間後において特異的な Ago2, GAPDH の発現抑制効果が得られたことから、PCLs はプラスミド DNA だけでなく siRNA の導入にも有用なキャリアーであることが示唆された (Fig. 3C)。高効率なノックダウン効果は、PCLs が有する高いプロトンポンジ効果によってエンドソームから脱出し、細胞質に効率よく移行しているためと考えられる。プロトンポンジ効果はエンドソーム内において PEI がプロトンを吸収し、エンドソーム内に塩化物イオンを集積させることで浸透圧の急上昇を引き起こし、結果的にエンドソーム膜を破壊させる効果である。<sup>10)</sup> PCLs 表面には cetyl-PEI に基づく多くのアミノ基が存在するため、同効

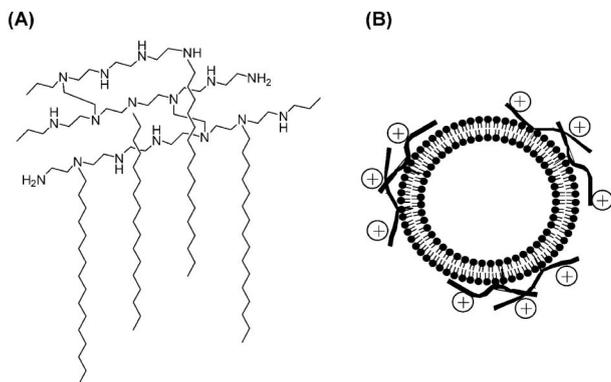


Fig. 2. (A) Structure of Cetyl-PEI, (B) Schematic Diagrams of Polycation Liposomes

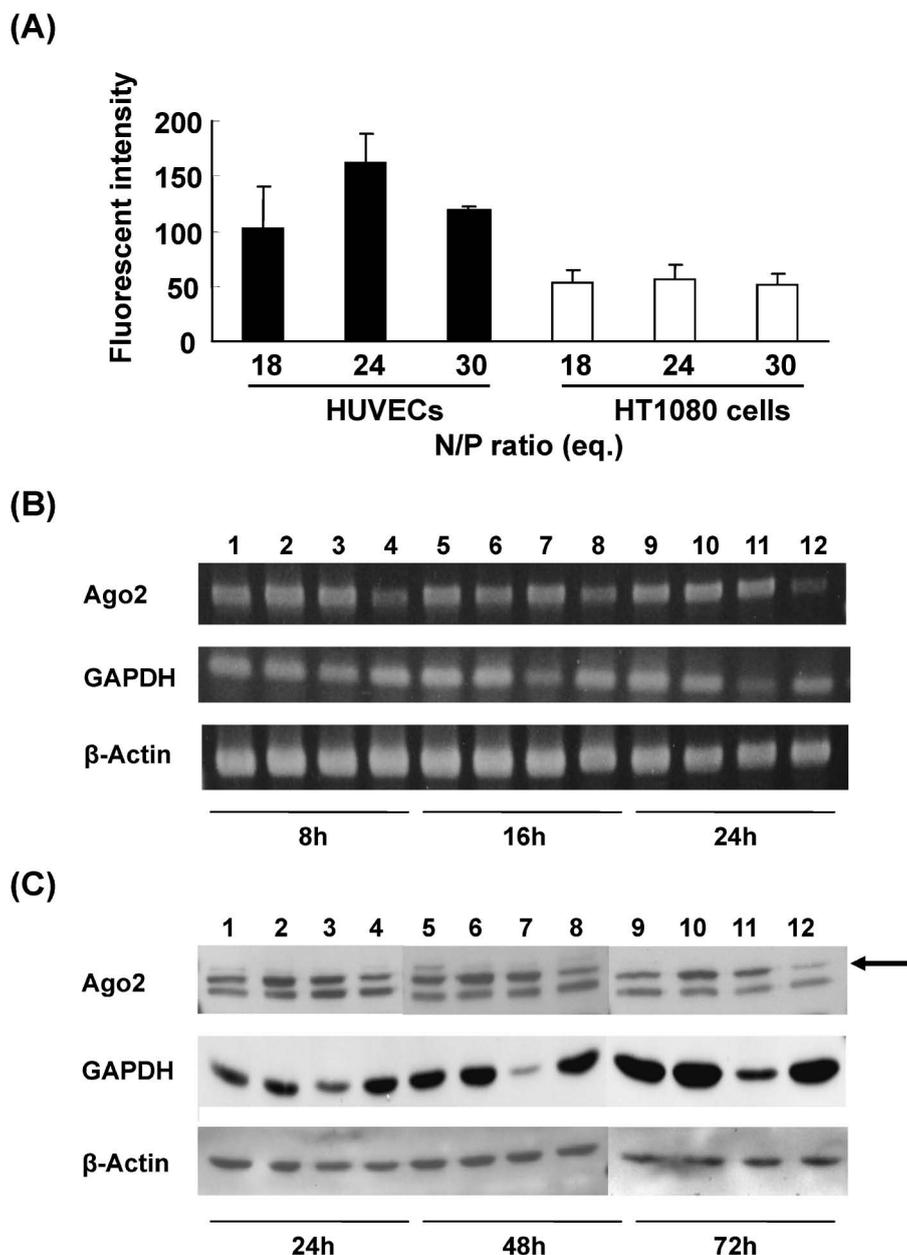


Fig. 3. Ago2 knockdown in HUVECs

(A) Uptake amounts of siRNA into the cells were determined as follows: HUVECs or HT1080 cells were incubated with polycation liposomes/FAM-labeled siRNA complexes at 37°C for 4 h and lysed. Then, fluorescent intensity of FAM and protein amount were determined. Uptake of siRNA in HUVECs are shown as black bars, and that in HT1080 cells are shown as white bars. (B) RT-PCR was performed by using HUVECs transfected with siAgo2 or siGAPDH. Lanes 1, 5, and 9: control without siRNA, lanes 2, 6 and 10: siEGFP used as a non-silencing control, lanes 3, 7 and 11: siGAPDH used as a control siRNA, and lanes 4, 8 and 12: siAgo2. (C) Western blotting was performed by using HUVECs transfected with siAgo2 or siGAPDH. Cell extracts were prepared at 24, 48 or 72 h post-transfection. Arrow shows the location of Ago2 protein. Lanes 1, 5, and 9: control without siRNA, lanes 2, 6 and 10: siEGFP used as a non-silencing control, lanes 3, 7 and 11: siGAPDH used as a control siRNA; and lanes 4, 8 and 12, siAgo2.

果を発揮すると考えられる。したがって、上述した siRNA ノックダウンの実現に必要な細胞内導入、細胞内動態制御を兼ね備えた有用なキャリアーであると考えられる。

#### 4. 血管内皮細胞 Ago2 ノックダウンによる効果

先に述べたが miR-221, miR-222 などの miRNA が血管新生において重要な役割を果たしていること

が報告されている。<sup>8)</sup> 本研究では、Ago2 ノックダウンによって miR-221, miR-222 を含む miRNA の遺伝子発現調節機構を障害することにより、血管内皮細胞にどのような影響が及ぶかを分子生物学的観点並びに治療応用の観点から検討した。miRNA は標的 mRNA の安定性及び転写効率を調節しているほか、分化、増殖、アポトーシスの調節にも関与する

と報告されている。そこで、Ago2 ノックダウンによるアポトーシス誘導及び細胞増殖能の変化を追った。PCLs を用いて siAgo2 を HUVECs に導入し、MTT assay によって細胞増殖試験を実施した結果、siAgo2 導入細胞では、siEGFP 導入細胞と比較して、導入 24 時間後から有意に細胞増殖が抑制された [Fig. 4(A)]. さらに、TUNEL 染色法によりアポトーシス誘導効果を検討した結果、siAgo2 導入 HUVECs では、コントロールとして用いた siEGFP 導入細胞と比較してアポトーシス細胞の増加がみら

れた [Fig. 4(B)]. このアポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーにより求めた結果、72 時間後において siEGFP 導入細胞では 34% であったのに対し、siAgo2 導入細胞では 77% で約 2 倍の高いアポトーシス誘導効率を示した。これらの結果は Ago2 ノックダウンによって細胞の miRNA システムが障害され、結果的にアポトーシスを誘導、有意な細胞増殖抑制効果を誘引したと考えられる。

血管形成はシグナルを受けた血管内皮細胞の活性化から始まり、増殖、遊走、浸潤、及び管腔形成の

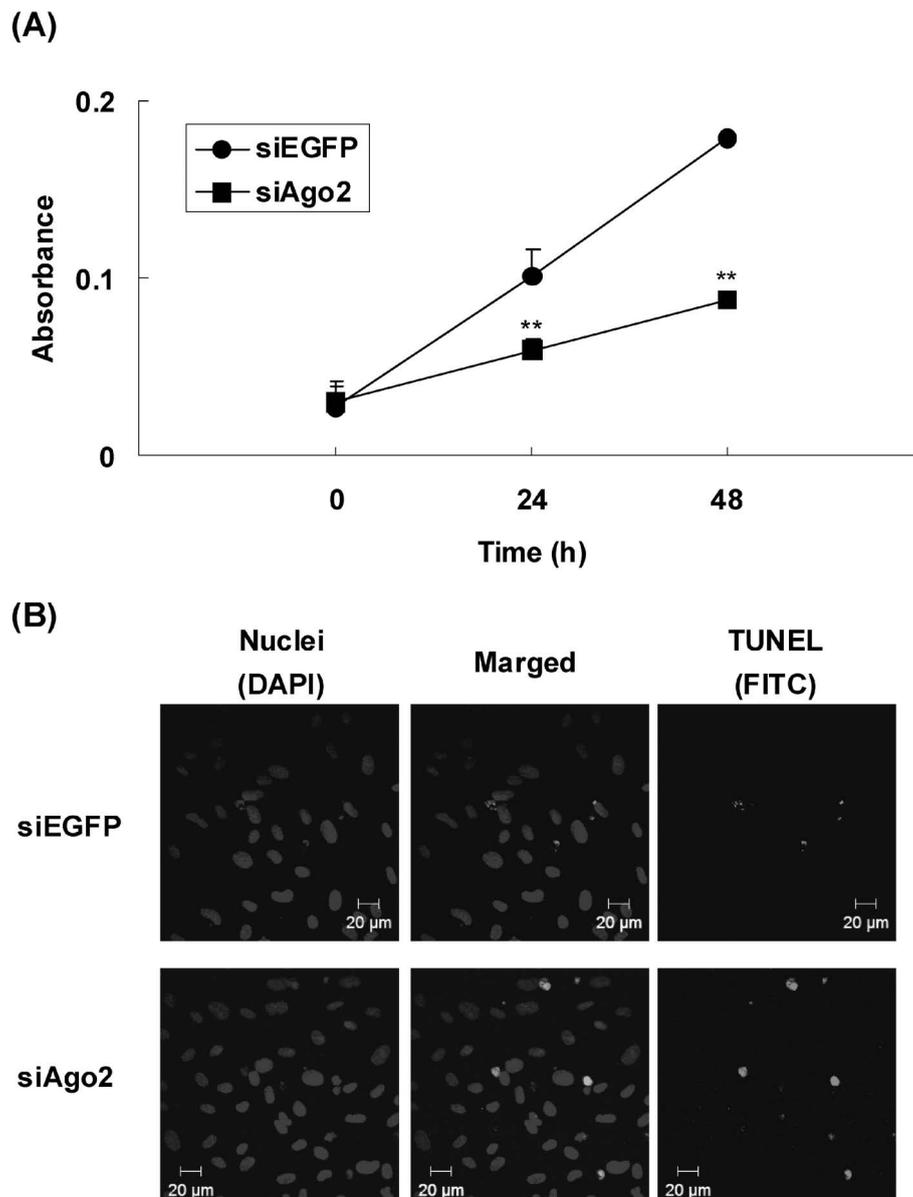


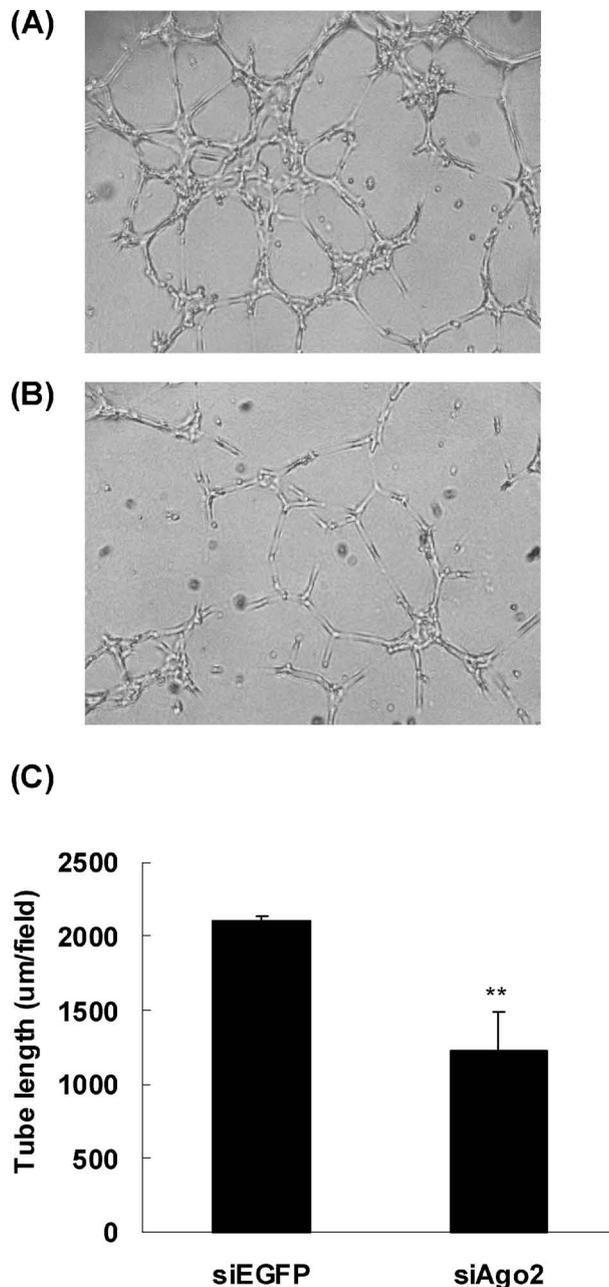
Fig. 4. Influence of Ago2 Knockdown on the Growth of HUVECs

(A) At 0, 24, and 48 h post transfection, a modified MTT assay was performed with HUVECs transfected with siAgo2 (squares) or siEGFP (circles) complexed with polycation liposomes. Data show the absorbance with S.D. bars. Significant differences from siEGFP groups are indicated (\*\* $p < 0.01$ ). (B) Apoptosis of HUVECs transfected with siAgo2/polycation liposomes complexes were determined by TUNEL staining at 48 h post-transfection. The nuclei were stained with DAPI (blue). Apoptotic cells (FITC, green) were observed under an LSM510 META confocal Laser-Scanning-Microscope. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

プロセスを経て構築される。これまで、Ago2 ノックダウンにより細胞増殖抑制、アポトーシス誘導を促す現象を示した。次に、われわれは、血管形成に必要なプロセスの1つである管腔形成への影響を Tube formation assay によって確認した。HUVECs に siEGFP あるいは siAgo2 を導入し、48 時間後に生細胞を回収してマトリゲル上に播き、6 時間後に管腔形成の様子を顕微鏡下で観察した。その結果、siEGFP 導入細胞では管腔が形成されているのに対し、[Fig. 5 (A)], siAgo2 導入細胞では管腔形成の抑制が顕著にみられた [Fig. 5 (B)].<sup>11)</sup> また、管腔の長さを測定し、その合計を field 当たりに換算して管腔形成抑制効果を評価したところ、siEGFP 導入細胞に対して約 60% の抑制効果を示した [Fig. 5 (C)]. これらの結果、Ago2 ノックダウンは血管形成に必要な各プロセスに抑制的な影響を与えることが明らかとなった。以上より、Ago2 を標的分子とした siRNA を用いることにより、がん治療に応用できる可能性が示唆された。

### 5. miRNA システムへの影響

Ago2 をノックダウンすることによって HUVECs のアポトーシスを誘導し、細胞増殖、管腔形成を抑制することが明らかとなった。これらの現象は、miRNA システムで重要な役割を担う Ago2 がノックダウンされることにより、RISC を介した遺伝子発現調節機構の異常につながった可能性が考えられる。そこで、多種の細胞で恒常的に発現している miRNA の1つである miR-16 に着目し、Ago2 ノックダウンによる細胞内 miRNA 量の変化を RT-PCR により解析した。RNAi は細胞質内で起こる現象であるため、核内の RNA には影響を及ぼさないと考えられる。そこで、RNA スプライシングなどの多様な働きを有する核内低分子 RNA (small nuclear RNA; snRNA) の1つである U6 snRNA によって miR-16 の発現量を補正し、未処理の細胞に対する相対的な量として評価した。その結果、siEGFP 導入細胞と比較して導入 24 時間後から有意に miR-16 の発現が減少し、導入 48 時間後には顕著に miR-16 の発現量が減少した [Fig. 6(A), (B)]. miRNA の発現量が減少した理由としては、Ago2 をノックダウンすることによって RISC 全体の機能を低下させたものと考えられる。そのため、RISC 構成成分の1つである Dicer の miRNA の前駆体から成熟体に



**Fig. 5. Inhibition of Tube Formation by Ago2 Knockdown**  
 Tube formation assay was performed with HUVECs transfected with Ago2/polycation complexes. The transfected cells were collected at 48 h post-transfection and incubation on Matrigel for 6 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Photomicrographs show the tube formation of HUVECs transfected with siEGFP (A) or siAgo2 (B). Scale bars represent 20 μm (C). The length of tubes was calculated by using the software Image J. Significant difference from siEGFP group is indicated (\*\**p* < 0.05).

変化させる機能も低下し、細胞内 miRNA レベルが減少した可能性が考えられる。つまり、Ago2 ノックダウンは RISC 機能の低下及び mRNA 切断の抑制を介して細胞内 miRNA システムの制御に異常を来したと考えられる。

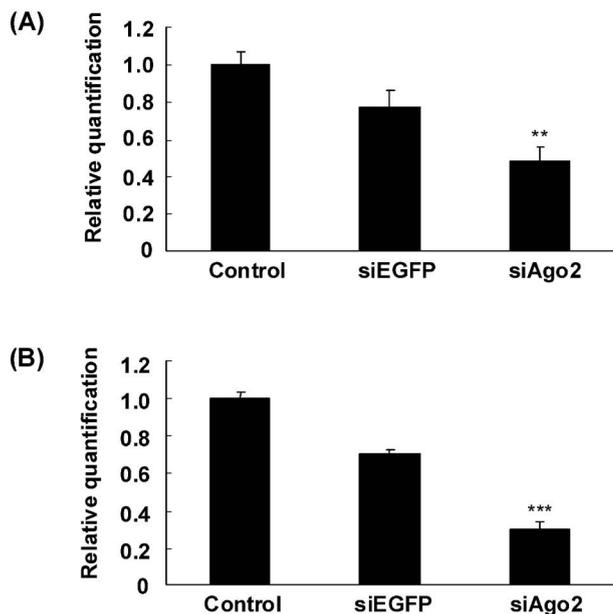


Fig. 6. Reduction of miR-16 Expression in HUVECs by Ago2 Knockdown

RT-PCR was performed by using HUVECs transfected with siAgo2. Total RNAs were isolated at 24 h (A) or 48 h (B) post transfection, reverse transcribed, and reacted using miR-16 or U6 snRNA primer set. Data show relative quantification of miR-16 normalized by U6 snRNA amount. siEGFP was used as a non-silencing control. Significant difference from siEGFP group is indicated (\*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ).

## 6. 腫瘍新生血管傷害療法への応用

腫瘍新生血管はがん細胞に酸素や栄養を供給し、組織の維持・成長に必須な器官であるとともに、血行性転移にも関与している。現在、新しいがん治療法として新生血管阻害剤が医薬品として上市され、いくつもの化合物が臨床試験の段階に進んでいる。これらは、血管新生過程に関与するサイトカインの機能を特異的に阻害し、酸素や栄養の供給を遮断することでがん細胞にアポトーシスを引き起こす。<sup>12)</sup> 腫瘍新生血管障害療法は、DDS技術を駆使して薬物を新生血管内皮細胞に直接送達し、がんの治療を目指す治療法を指す。がんの血管内皮細胞数は、がん細胞の1-10%程度しかがん細胞に存在しないとされているため、がん細胞より血管内皮細胞を標的とした方が効率的であると考えられる。また、直接的に作用することで血管形成過程の段階を問わず抗腫瘍効果が得られること、より少ない薬剤で大きな治療効果を生むこと、多くのがん種に対して有効であるなど、従来のがん治療法に比べ大きなアドバンテージを有している。

また、腫瘍新生血管の脆弱性に基づく enhanced

permeability and retention (EPR) 効果依存的な従来の腫瘍標的化機構による治療効果は腫瘍血管密度の影響を受ける。これに対し腫瘍新生血管への標的化は、血流に面した血管内皮細胞を標的にしているため、EPR 効果への依存が少ない。さらに、長期血中滞留能を付与できれば、新生血管を標的としたアクティブターゲティングと EPR 効果によるパッシブターゲティングの両効果を得ることができ、相加的・相乗的に高い腫瘍効果を実現できる可能性を秘めている。

本研究では Ago2 を RNAi の標的分子とすることにより、腫瘍新生血管傷害療法のコンセプトへの応用を試みた。腫瘍新生血管傷害療法の高い治療効果、多種のがんに対して有効であるという利点に加え、さらに siRNA の利点である特異性が高く活性が強いサイレング効果による全身性副作用の軽減も兼ね備えた画期的ながん治療技術になり得る可能性がある。

このコンセプトに基づき、腫瘍新生血管標的化キャリアーの構築を検討した。しかし、生体適合性が高く、生体内分解性の観点からも優れていると考えられているリポソームであっても、生体にとっては異物であり、生体内投与後は様々なメカニズムによって排除される。<sup>13)</sup> 生体内で安定に遺伝子発現可能な PCLs においても、初回通過臓器への集積や、肝臓・脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system; RES) に取り込まれるといったメカニズムを完全には回避できない。<sup>14)</sup> この問題を解決するために、これまでに様々な試みが行われてきた。例えば、代表的な方法として親水性高分子であるポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) をリポソーム表面に修飾することによって細網内皮系による捕獲を回避させる方法が挙げられる。腫瘍新生血管への効率のよい siRNA デリバリーを達成するには、やはりリポソームの表面物性の設計及び表面改質が重要となる。リポソームへのペプチドの表面修飾は、リポソームに機能付与する有効な手段の1つである。これまでに、われわれは腫瘍新生血管を標的とする実用的な低分子リガンドを得るために、ファージディスプレイペプチドライブラリーを用いて標的化ペプチドを探索した。がん細胞ではなく新生血管を認識するペプチド発現ファージを回収するため、背部皮下法により作成した腫瘍新生血管

モデルマウスを用い、インビボバイオパニングを行った。<sup>15,16)</sup> この手法により新生血管部位に集積するファージのスクリーニングを行った結果、Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) 配列を見い出した。APRPG 配列を有するペプチドは、がんの種類やマウスの種類を問わずにがん病巣に集積し、抗腫瘍効果を示すことを明らかにしている。<sup>17,18)</sup>

そこで、長期血中滞留性と腫瘍新生血管標的化能をリポソームに付与するため、PEG に APRPG ペプチドを結合させた脂質 (APRPG-PEG) を PCLs に組み込み、全身投与可能な腫瘍新生血管標的化リポソーム (APRPG-PEG 修飾 PCLs) を設計した。このようなキャリアを開発することにより、腫瘍新生血管部位への選択的な siRNA デリバリーを目指した。

### 7. 腫瘍新生血管標的化リポソームの構築

siRNA を効果的に腫瘍新生血管に送達させるためには、ベクターが血清存在下で安定に存在し、効率的に siRNA を導入して RNAi を引き起こすことが重要になる。一般にカチオン性のキャリアーは血清や生体由来タンパク質と相互作用すると凝集を引き起こす。そのためインビボにおける安定性が低く、長期血中滞留性が得られない。これに起因するリポソーム表面電荷のカチオンを PEG (2000) で被覆することで血中での安定性を確保することとした。全脂質に対して PEG 及び APRPG-PEG を 0-20% 修飾した PCLs においてゼータ電位を測定した。PEG 未修飾 PCLs のゼータ電位が 43 mV を示す一方、PEG, APRPG-PEG 修飾 PCLs では各々 13 mV, 20 mV を示しゼータ電位が減少した。さらに、両リポソームを血清 50% 存在下において 37°C でインキュベーションした結果、PCLs の凝集はみられなかった (data not shown)。これより血中での安定性を保持した PCLs が構築できたと考えられる。PEG の修飾率が高くなった理由としては、PEI の分子量が大きく、PEG の分子量 2000 では完全に被覆できないため PEG 修飾の効果が得られ難いのではないかと考えられる。

一方、遺伝子導入効率はリポソーム表面に PEG を修飾することで、細胞膜との静電的相互作用が低下し減弱することが報告されている。<sup>19)</sup> しかしながら、真核細胞は自身の細胞膜の一部を飲作用に係わるエンドサイトーシス小胞として常時取り込んでい

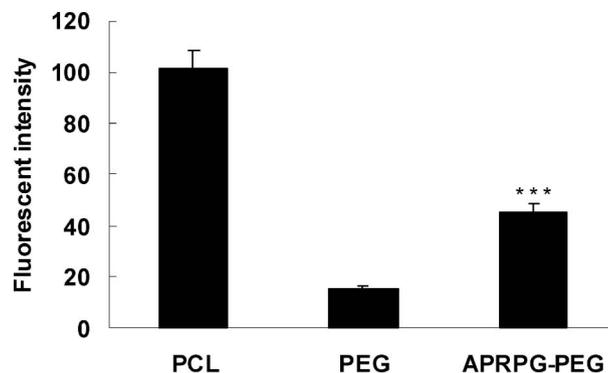


Fig. 7. Uptake Amount of siRNA Transfected Using PEG- or APRPG-PEG-modified Polycation Liposomes (PCLs) into HUVECs

FAM-labeled siRNA was transfected with PCLs, DSPE-MPEG-modified PCLs, or DSPE-PEG-APRPG-modified PCLs at 37°C for 4 h. After these cells were lysed, fluorescent intensity of FAM was measured and corrected by a protein amount. PEG indicates 20% DSPE-MPEG-modified PCLs, APRPG indicates 20% DSPE-PEG-APRPG-modified PCLs. Significant difference from PEG group is indicated (\*\* $p < 0.01$ )

るため、細胞との親和性が高めることが可能な APRPG ペプチドを修飾したりポソームは PEG 修飾による細胞内導入能低下という課題を回避できると考えられる。そこで、PEG, APRPG-PEG を修飾した PCLs による siRNA の取り込み量を調べた。Figure 7 に示すように、APRPG-PEG 修飾 PCLs (APRPG-PEG PCLs) の siRNA 導入効率は未修飾 PCLs (PCLs) に対して約半分に低下したが、PEG 修飾 PCLs (PEG PCLs) に対しては約 2.5 倍であり、siRNA 導入効率を有意に向上した。APRPG-PEG の修飾によって腫瘍新生血管標的化、長期血中滞留性、細胞内導入などの細胞内・体内動態制御が達成できることが示唆された。

### 8. おわりに

以上紹介したように、腫瘍新生血管内皮細胞の Ago2 ノックダウンによりがんの生存に必要な血管新生を抑制可能なことを明らかにした。そして、siRNA のキャリアーとして腫瘍新生血管標的化リポソームを開発し、がん治療への応用の可能性を示した。Ago2 を治療標的とした腫瘍新生血管傷害療法の有用性、腫瘍新生血管標的化 siRNA 導入ベクターの開発は、いずれもまだ検討すべき点が残されているが、将来的には両者を融合することによって、RNAi による腫瘍新生血管傷害療法になり得る可能性がある。われわれはがん治療に効果的な治療標的分子を見出し、その効果を十分に発揮できる

DDS 技術の確立, そして遺伝子治療の実現に向けて医療に貢献したいと考えている.

**謝辞** 本研究の共同研究者である際田弘志先生 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授) 並びに石田竜弘先生 (同准教授), 及び研究に携わって頂きました静岡県立大学医薬生命化学教室員の皆様に深く感謝申し上げます. また cetyl-PEI の合成及びご協力を頂きました南後 守先生 (名古屋工業大学工学部教授), 出羽毅久先生 (同講師) に厚く感謝いたします. また, PEG 脂質, APRPG-PEG 脂質の合成を頂きました前田典之先生 [日本精化㈱] に深く感謝いたします.

#### REFERENCES

- Zhu H., Liang Z. Y., Ren X. Y., Liu T. H., *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 293–294 (2006).
- Oltersdorf T., Elmore S. W., Shoemaker A. R., Armstrong R. C., Augeri D.J., Belli B. A., Bruncko M., Deckwerth T. L., Dinges J., Hajduk P. J., Joseph M. K., Kitada S., Korsmeyer S. J., Kunzer A. R., Letai A., Li C., Mitten M. J., Nettesheim D.G., Ng S., Nimmer P. M., O'Connor J. M., Oleksijew A., Petros A. M., Reed J. C., Shen W., Tahir S. K., Thompson C. B., Tomaselli K. J., Wang B., Wendt M. D., Zhang H., Fesik S.W., Rosenberg S. H., *Nature*, **435**, 677–681 (2005).
- Rand T.A., Petersen S., Du F., Wang X., *Cell*, **123**, 543–545 (2005).
- Dykxhoorn D. M., Novina C. D., Sharp P. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 457–467 (2003).
- Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K. L., Brown D., Slack F., *Cell*, **120**, 635–647 (2005).
- Voorhoeve P. M., Sage C. L., Schrier M., Gillis A.J.M., Stoop H., Nagel R., Liu Y.-P., Duijse J. V., Drost J., Griekspoor A., Zlotorynski E., Yabuta N., Vita G. D., Nojima H., Looijenga L. H. J., Agami R., *Cell*, **124**, 1169–1181 (2006).
- Yang W. J., Yang D. D., Na S., Sandusky G. E., Zhang Q., Zhao G., *J. Biol. Chem.*, **280**, 9330–9335 (2005).
- Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A., Hammond S., Alberto G., *Blood*, **108**, 3068–3071 (2006).
- Matsuura M., Yamazaki Y., Sugiyama M., Kondo M., Ori H., Nango M., Oku N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1612**, 136–143 (2003).
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7297–7301 (1995).
- Asai T., Suzuki Y., Matsushita S., Yonezawa S., Yokota J., Katanasaka Y., Ishida T., Dewa T., Kiwada H., Nanngo M., Oku N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243–248 (2008).
- Carmeliet P., *Nat. Med.*, **9**, 653–660 (2003).
- Cullis P., Chonn A., Semple S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 3–17 (1998).
- Harashima H., Matsuo H., Kiwada H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 61–79 (1998).
- Zurita A. J., Arap W., Pasqualini R., *J. Control. Release*, **91**, 183–186 (2003).
- Trepel M., Arap W., Pasqualini R., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 399–404 (2002).
- Oku N., Asai T., Watanabe K., Kuromi K., Nagatsuka M., Kurohane K., Kikkawa H., Ogino K., Tanaka M., Ishikawa D., Tsukada H., Momose M., Nakayama J., Taki T., *Oncogene*, **21**, 2662–2669 (2002).
- Asai T., Miyazawa S., Maeda N., Hatanaka K., Katanasaka Y., Shimizu K., Shuto S., Oku N., *Cancer Sci.*, **99**, 1029–1033 (2008).
- Ogris M., Walker G., Blessing T., Kircheis R., Wolschek M., Wagner E., *J. Control. Release*, **91**, 173–181 (2003).