

炎症治療を目的とした NFκB デコイの細胞選択的ターゲティングシステムの開発

樋口ゆり子, 川上 茂,* 橋田 充

Development of Cell-selective Targeting Systems of NFκB Decoy for Inflammation Therapy

Yuriko HIGUCHI, Shigeru KAWAKAMI,* and Mitsuru HASHIDA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received September 18, 2007)

NFκB regulate several inflammatory related molecules and evoke immune and inflammatory response by several stimuli, therefore inhibition of NFκB activation would be a novel therapeutic strategy. To date, there are many conventional drugs including nonsteroidal or steroidal anti-inflammatory drugs or immune suppressors etc. were known to inhibit NFκB activation, however, several side effects were also reported. Recently, double stranded oligonucleotide including NFκB binding sequence, called NFκB decoy, was developed to prevent NFκB activation, which is powerful tool in a new class of anti-gene strategy for molecular therapy with low side effect. However, NFκB decoy is easily degraded by nuclease and rapidly excreted to urine, therefore it is necessary to develop carrier for NFκB decoy therapy. Here, we shall review delivery system for NFκB decoy and introduce our cell-selective delivery system for NFκB decoy using sugar decorated cationic liposomes.

Key words—NFκB; decoy; targeting; mannosylated liposome; cytokines; inflammation

1. はじめに

炎症や疾患に対する分子レベルでの研究の進展により, 原因分子が次々と明らかにされ, 病態の進行に重要な標的分子の発現抑制又は機能阻害に基づく治療効果増大及び副作用低減を実現する分子標的薬による新規治療法の開発が期待されている. 炎症・疾患時に過剰活性される転写調節因子 NFκB は, 炎症性サイトカイン等の種々の疾患・炎症関連分子の発現を調節しており, 転写抑制により一度に疾患・炎症関連分子の発現抑制効果が得られるため, 免疫疾患治療及び炎症治療の標的分子として注目されている. 近年, NFκB 転写活性抑制に基づく治療薬として NFκB 認識配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチド (NFκB デコイ) が開発された. NFκB デコイは, 過剰活性された NFκB のゲノム DNA への結合を競合阻害することにより NFκB 転写活性

を正常レベルに戻すことが可能である (Fig. 1). しかしながら, 一般的にオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼによる分解や速やかな代謝・排泄, 標的細胞への取り込み不十分等により単独で投与しても治療効果を得るのは困難である. したがって, NFκB

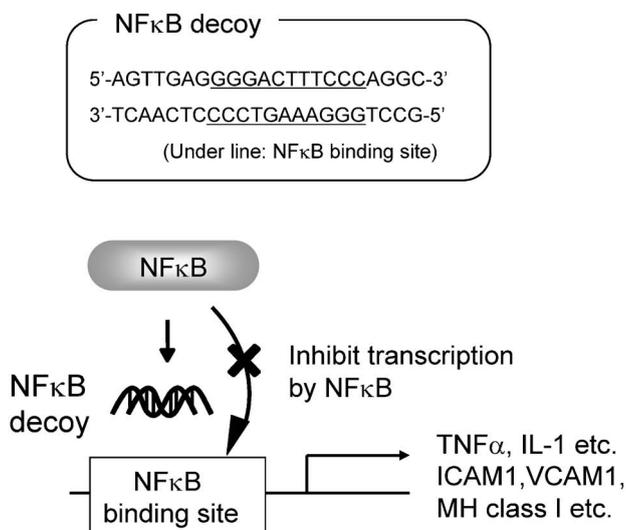


Fig. 1. The Decoy Oligonucleotide Approach to Block the Function of Transcription Factor NFκB

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: kawakami@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム S6 で発表されたものを中心に記述したものである.

デコイによる新規治療法を確立するためには、NF κ B デコイを標的細胞へ送達させるデリバリーシステムの開発が必要である。そこで本稿では、まず NF κ B 活性化と炎症との関係及びオリゴヌクレオチドの体内動態特性、NF κ B デコイのキャリアについて概説するとともに、われわれが開発した NF κ B デコイの細胞選択的送達キャリアによる *in vivo* ターゲティングシステムの評価及び抗炎症効果、さらには、siRNA への応用について論述する。

2. NF κ B と炎症

哺乳類の NF κ B は、5 種類の異なるタンパク質 (p50, p52, p65 (RelA), RelB, c-Rel) からなる homo- 又は hetero-dimer で構成される。その大部分は p50/p65 の homo-dimer であり、通常、I κ B と呼ばれる阻害タンパク質と結合し不活性な状態で細胞質に存在している。^{1,2)} 哺乳類の I κ B family は、I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl-3 が知られており、これらのタンパク質は NF κ B に結合し、NF κ B の核移行シグナルを覆い隠すことにより NF κ B の核移行を阻害、又は、NF κ B 結合部位を覆い隠すことにより NF κ B のゲノム上の認識配列への結合を阻害している。^{1,3)} NF κ B は、リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS)、サイトカイン、活性酸素、紫外線など種々の外来因子により活性化されサイトカイン、接着因子等の炎症関連タンパク質産生を促進する。NF κ B の活性化経路は、4 つに大別される。⁴⁾ 最も一般的な Canonical pathway は、TNF- α , IL-6, LPS 等による I κ B kinase β の活性化に引き続く I κ B の serine 残基のリン酸化による立体構造の変化、lysine 残基のコピキチン化を経て I κ B 分解により、NF κ B の核への移行、転写活性が誘発される。Non-canonical pathway は、NF κ B inducing kinase による I κ B kinase α の活性化により I κ B のリン酸化を経て NF κ B が活性化される。I κ B kinase 非依存的な Atypical pathway は、hypoxia, 過酸化水素及び UV 照射により活性化された Try kinase や casein kinase-II による I κ B の活性化により NF κ B が活性化される。最後に、I κ B kinase 依存的 Atypical pathway は、遺伝子毒性により I κ B kinase 活性化を経て NF κ B が活性化される。

NF κ B に発現を支配されるタンパク質の多くは、サイトカイン、接着分子、ケモカイン等、炎症・疾患に関与する分子である。^{5,6)} 一方、それらのタンパ

ク質の中には、T 細胞、B 細胞やマクロファージ等の造血機能や恒常性維持に関連するものもあり、rel/p65 ダブルノックアウトマウスでは赤血球減少やマクロファージのアポトーシス等が観察され肝臓壊死により死亡することが報告された。⁷⁾ 同様に、p65/p50 ダブルノックアウトマウスでも肝臓壊死による死亡、⁸⁾ p52/p50 ダブルノックアウトマウスで骨破壊、⁹⁾ relB/p50 ダブルノックアウトマウスでは 4 週齢以内での死亡が確認された。¹⁰⁾ このように NF κ B は、外来刺激により活性化され炎症関連分子の発現を促進する一方で、細胞機能の維持においても重要な役割を果たしている。

3. NF κ B 活性化抑制法

NF κ B の活性化抑制法には、阻害タンパク質 I κ B あるいは NF κ B 自体を標的とした方法に大別される。I κ B を標的とした方法には、I κ B 分解抑制または I κ B 補充により NF κ B 活性化を抑制する方法が挙げられる (Table 1)。I κ B は、活性化された I κ B kinase による I κ B のリン酸化により分解が促進されるため、I κ B kinase の抑制が NF κ B 活性化抑制の有効な方法となり得る。I κ B kinase 活性化阻害効果が報告されているものには、アスピリンやサルチル酸等の非ステロイド性抗炎症剤、^{11,12)} Methotrexate¹³⁾ や Piceatannol¹⁴⁾ 等の低分子化合物が挙げられる。しかしながら非ステロイド性抗炎症薬により NF κ B 活性化抑制効果を得るためには、高濃度の化合物が必要であるため、NF κ B 阻害剤として用いるときには副作用の誘発が懸念される。^{11,12)} また、20S proteasome 阻害により I κ B の分解抑制効果があると報告されているものに、Cyclosporin A¹⁵⁾ や FK506¹⁶⁾ 等の免疫抑制剤が挙げられる。さらに、I κ B 機能亢進により NF κ B 活性化抑制するものには、ステロイド性抗炎症薬がある。¹⁷⁾ しかしながらこれらの免疫抑制剤やステロイド性抗炎症薬は NF κ B 活性化抑制及び他の分子機構に基づく強い薬理効果を有すると同時に、過剰抑制による免疫系異常や核内レセ



樋口ゆり子

京都大学大学院薬学研究科研究員。京都市出身。京都大学薬学部卒業、同大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士(薬学)を取得。2005年4月より同大学院薬品動態制御学分野(橋田充教授)、博士研究員、現在に至る。2006年日本薬学会 Postdoctoral Presentation Award 受賞。

Table 1. Inhibition of NF κ B Activation by Various Compounds

Target	Mechanism	Drugs	References
I κ B	Inhibition of I κ B kinase	Aspirin, salicylic acid, Metotrexate, Piceatannol, <i>etc.</i>	11, 12, 13, 14, 18, 19
	Inhibition of Proteasome	Cyclosporin A, FK506, <i>etc.</i>	15, 16
	Upregulatory of I κ B	Glucocorticoids, <i>etc.</i>	17
	Increase of I κ B	I κ B coded adenovirus <i>etc.</i>	20, 21
NF κ B	Inhibition of NF κ B binding	NF κ B decoy	22

プターによる認識異常による重篤な副作用が誘発されることが知られている。これらの既存の低分子化合物に加え、近年 I κ B kinase 阻害薬として創薬された薬剤もあるが、その安全性に関しては今後の検討が待たれる。^{18,19)} 一方、I κ B 補充による NF κ B 活性化抑制法には、ウイルスを用いた I κ B 強制発現が挙げられるが、ウイルス性ベクター自身の病原性獲得の危険性や免疫反応が問題となる。^{20,21)}

近年、NF κ B 自体を標的とした NF κ B 活性化抑制法として NF κ B デコイが開発された。NF κ B デコイは、9-10 塩基対からなる NF κ B 認識配列を含む二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドであり、活性化された NF κ B が NF κ B デコイと結合し、ゲノム上の NF κ B 認識部位への結合を競合阻害することにより NF κ B の転写活性を正常レベルに戻す。²²⁾ したがって、NF κ B デコイを用いた NF κ B 活性化抑制法は、NF κ B 自体を標的とするため活性化経路非依存的に NF κ B 活性化抑制が可能であり、また、NF κ B 認識配列依存的な選択性の高い方法である。また既にわが国では、転写調節因子 E2F 認識配列を有する E2F デコイのヒトへの投与が実施され、²³⁾ NF κ B デコイもアトピー性皮膚炎治療薬として臨床開発が進められている。

デコイ法以外に、標的タンパク質の発現を抑制する方法としてアンチセンス DNA や siRNA などの核酸医薬品を用いた標的分子発現抑制法がある。しかしながら、NF κ B を標的とした炎症や免疫疾患に対する治療法への応用を考えると、NF κ B 自体の発現抑制による細胞機能維持への影響が懸念される。さらに、siRNA に関しては、哺乳類の免疫担当細

胞に発現する Toll like receptor (TLR) family の中でも siRNA の配列非依存的に一本鎖 RNA を認識する TLR3 又は、siRNA の配列依存的に認識する TLR7 及び 8 により IFN 産生誘発することが報告され、^{24,25)} 炎症や免疫疾患治療への応用には十分な注意が必要である。

4. NF κ B デコイのターゲティングシステム

オリゴヌクレオチドを医薬品として生体に適用する際には、基本的な体内動態を考慮した DDS の設計が必要である。体内動態を評価するときにはオリゴヌクレオチドを核酸より構成される高分子物質として捉えることが可能である。そこでわれわれがこれまでに蓄積してきたタンパク質医薬品の DDS 開発における経験及び情報の蓄積に基づき、²⁶⁾ オリゴヌクレオチドの投与後の各臓器への移行について検討を行った。

オリゴヌクレオチドはマウスへ静脈内投与後、血中より速やかに消失するとともに並行してヌクレアーゼにより分解を受けることが示された。²⁷⁾ この分解速度は、マウスの血液を用いた *in vitro* 実験の結果から予測されるよりもはるかに速く血中以外のコンパートメントに存在するヌクレアーゼによる分解を受ける可能性が示唆される。そこで次に、分解の影響を無視できる投与初期のデータにたいして薬物速度論的解析を行ったところ、オリゴヌクレオチドは糸球体ろ過速度に近い速度で尿中に排泄されることが明らかとなった。²⁷⁾

二本鎖オリゴヌクレオチドの NF κ B デコイ (分子量約 13000) は、ポリアニオンの性質を有するため、アニオン性である細胞表面との電荷反発により細胞への取り込みは制限されていると考えられている。また、血中へ投与後は、ヌクレアーゼによる分解及び糸球体ろ過により血中から速やかに消失すると考えられる。実際に naked NF κ B デコイを静脈内投与したところ、速やかに血中から消失し、腎臓への集積は 30 (% of dose/g tissue) である一方、他の臓器への集積はほとんど認められなかった。²⁸⁾ したがって NF κ B デコイを医薬品として利用するには、NF κ B デコイの体内動態特性を考慮し標的組織または標的細胞へ NF κ B デコイを導入させる *in vivo* ターゲティングシステムの開発が必要である (Table 2)。

Desmet らは、naked NF κ B デコイを気管内挿管

Table 2. Non-carrier or Carrier Mediated NF κ B Transfer

Non-carrier mediated transfer	Target tissues or cells	Administration route	References
Naked NF κ B decoy solution	Lung	Intratracheal instillation	29
	Bowel	Intrarectal administration	30
Stent	Artery	Local administration	31
Gel sheet	Aorta	Local administration	32,33
Ultrasound-Microbubble	Artery	Local administration	34
Carrier mediated transfer	Target tissues or cells	Administration route	References
HVJ liposomes	Lung	Intravenous administration	35
	Liver	Intraportal administration	37
	Bowel	Intrarectal administration	38
	Kidney	Local administration	39
	Artery	Local administration	40
Cationic liposomes	Lung	Intranasal administration	41
	Kidney	Local administration	42
Mannosylated cationic liposome	Macrophages, Dendritic cells, Kupffer cells	Intravenous administration	28
Fucosylated cationic liposomes	Kupffer cells	Intravenous administration	59

投与し OVA 活性化 NF κ B が抑制されることを EMSA 法により確認している.²⁹⁾ また, De Vry らは, naked NF κ B デコイ溶液をマウスの直腸へ直接投与することにより腸炎の抑制ができたと報告している.³⁰⁾ 大谷らは, 心筋梗塞や狭心症のバルーン療法に用いる血管拡張用カテーテル (ステント) に naked NF κ B デコイをコーティングし, ウサギの大動脈に挿入したところ, 血管内皮細胞の異常増殖を抑制し, バルーン療法による大動脈の血管再狭窄が抑制できたと報告している.³¹⁾ 三宅らは, アテローム性動脈硬化症の治療を目的に, hydroxypropyl cellulose と polyethylene glycol よりなる構成されたポリマーシートに naked NF κ B デコイを分散させ外科的にウサギ又はラットの動脈瘤部位へ貼り付けることによりマクロファージからのサイトカイン産生抑制及び動脈硬化予防効果が得られたと報告している.^{32,33)} また, 物理刺激を利用した方法として, マイクロバブルの超音波照射により発生するジェット流を利用し naked NF κ B を動脈の炎症部位に導入し血管再狭窄抑制効果が得られた報告例が挙げられる.³⁴⁾

一方, キャリアを用いた方法として, 松田らは, 膜融合性リポソーム Hemagglutinating Virus of

Japan (HVJ) リポソームに NF κ B デコイを封入し, 静脈内投与により肺の炎症抑制効果が得られたと報告している.³⁵⁾ HVJ リポソームは, 静脈内投与後, 肺, 脾臓, 及び腎臓への集積が認められたが, その他の臓器への集積は認められないという以前の報告とよく一致するものである.³⁶⁾ 一方, HVJ リポソームの門脈内投与による肝炎抑制,³⁷⁾ 直腸内投与による腸炎抑制,³⁸⁾ カニニューレによる腎臓への局所投与による TNF- α 誘発性炎症性サイトカイン及び接着分子発現抑制,³⁹⁾ カニニューレを用いた高圧処理による冠動脈血管内皮及び平滑筋への局所投与による虚血誘発性アポトーシス抑制⁴⁰⁾などの投与経路の工夫により薬理効果を発揮させた報告もなされている. また, カチオン性脂質 GL67 と NF κ B デコイ複合体の鼻腔直接投与による肺での炎症抑制⁴¹⁾ 及び 2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane と cholesterol よりなるカチオン性リポソームと NF κ B デコイ複合体の腎臓への局所投与による腎虚血再灌流傷害抑制⁴²⁾の報告が挙げられる. 以上, NF κ B デコイを用いた抗炎症治療を実現するためには, naked NF κ B デコイの局所投与, 又は, カチオン性, HVJ リポソームとの組み合わせにより取り込み過程が改善されている.

5. 遺伝子・核酸医薬品の細胞選択的ターゲティングシステムの開発

臨床応用においては、特別な外科処置技術を必要とする局所投与に比べ、静脈内投与法が簡便で有効な方法であると考えられる。そこでわれわれは、NFκB デコイの細胞選択的ターゲティングシステムの開発を行った。NFκB デコイの標的細胞は、炎症及び疾患時に NFκB の過剰活性化によりサイトカインを産生するマクロファージや樹状細胞である。したがって、マクロファージや樹状細胞など免疫担当細胞へのターゲティングシステムの開発には、それらの細胞に固有に発現し、比較的厳密な基質認識性を有するマンノースレセプターによる糖鎖認識機構の利用が有効であると考えられる。

これまでに、マンノースレセプター認識を介したマクロファージ及び樹状細胞への選択的な取り込み促進を目的に、マンノース修飾タンパク質^{43,44)}、マンノース修飾リポソーム^{45,46)}及びエマルジョン^{47,48)}を開発してきた。また、糖修飾リポソームやエマルジョンにおいては、高密度な糖修飾により効率的なレセプターへの認識を示し、高い細胞内取り込みを示すことを明らかにした。^{48,49)}

そこで、遺伝子・核酸医薬品のマクロファージ選択的送達キャリアの開発を目的に、マンノースレセプターにより認識されるリガンドとしてのマンノース、NFκB デコイ上の負電荷と静電的相互により複合体を形成するための正電荷及びリポソームの脂質二重膜に安定に組み込まれるためのアンカーとしてのコレステロールを有する機能性脂質 cholesten-5-yloxy-N-{4-[(1-imino-2-D-thiomannosyl-ethyl)-amino] butyl} formamide (Man-C4-Chol) を合成した。⁵⁰⁾ Man-C4-Chol は、正電荷とリガンドを有し、リポソーム表面に正電荷とリガンドを同時に修飾するため、高密度なマンノース修飾が可能である。また、NFκB デコイの作用点である細胞質への移行促進を目的に pH 感受性脂質 dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) と組み合わせ NFκB デコイの活性部位である細胞質内へのターゲティングを可能とする、マンノース修飾カチオン性リポソーム (Man リポソーム) を調製した。²⁸⁾

プラスミド DNA と糖修飾カチオン性リポソームの複合体の体内動態及び遺伝子発現を規定する重要な因子には、粒子径及び電荷が挙げられる。⁵¹⁻⁵³⁾ そ

こで得られた情報を基に、NFκB デコイと Man リポソームを電荷比 - : + = 1.0 : 2.3 で調製したところ、Man リポソーム/NFκB デコイ複合体の平均粒子径は約 61 nm と十分にナノ粒子化されていることが確認できた。²⁸⁾ マンノースレセプターを発現する初代培養腹腔内マクロファージを用いて Man リポソーム/NFκB デコイ複合体の細胞取り込みを評価した結果、対照の NFκB デコイ単独、カチオン性リポソーム複合体の場合より有意に高い細胞取り込みが認められた。また、過剰量のマンナンにより有意に細胞取り込みが阻害され、マンノースレセプターを介した介在性エンドサイトーシスが示唆された。^{54,55)}

次に、マウスへの静脈内投与後の各臓器への集積を評価したところ、³²P] NFκB デコイ単独の場合、血中より速やかに消失し尿中への排泄及び腎臓への集積が認められたのに対し、⁵⁶⁾ Man リポソーム/³²P] NFκB デコイ複合体は、投与後 5 分で肝臓へ約 80 (% of dose/g tissue or ml) の集積が認められた (Fig. 2)。²⁸⁾ また、Man リポソーム/³²P] 標識 NFκB デコイ複合体を静脈内投与後の肝臓を各細胞画分に分離したところ、マンノースレセプターを発現する類洞血管内皮細胞、Kupffer 細胞が多数存在する肝非実質細胞画分への高い集積が認められた。²⁸⁾ 以上、Man リポソームが NFκB デコイの免疫担当細胞選択的送達に有効なキャリアとなり得ることが明らかとなった。

6. NFκB デコイの細胞選択的ターゲティングシステムに基づく抗炎症療法の評価

エンドトキシン誘発性肝疾患においては、マクロファージ、樹状細胞、Kupffer 細胞等、免疫担当細胞による炎症性サイトカイン産生が肝障害を引き起こすことが知られている。LPS 誘発性肝障害マウスに対し、Man リポソーム/NFκB デコイ複合体を静脈内投与したところ、血清中のサイトカイン (TNFα, IFNγ, IL1β) の有意な抑制効果が認められた (Fig. 3)。²⁸⁾ 一方、NFκB デコイ単独、NFκB デコイ/ガラクトース修飾リポソーム (Gal リポソーム) 複合体、カチオン性リポソーム複合体では、有意な抑制効果は認められなかった。また、Man リポソームと NFκB 結合配列を含まない random デコイとの複合体を静脈内投与した場合においても炎症性サイトカインの産生抑制効果は得られ

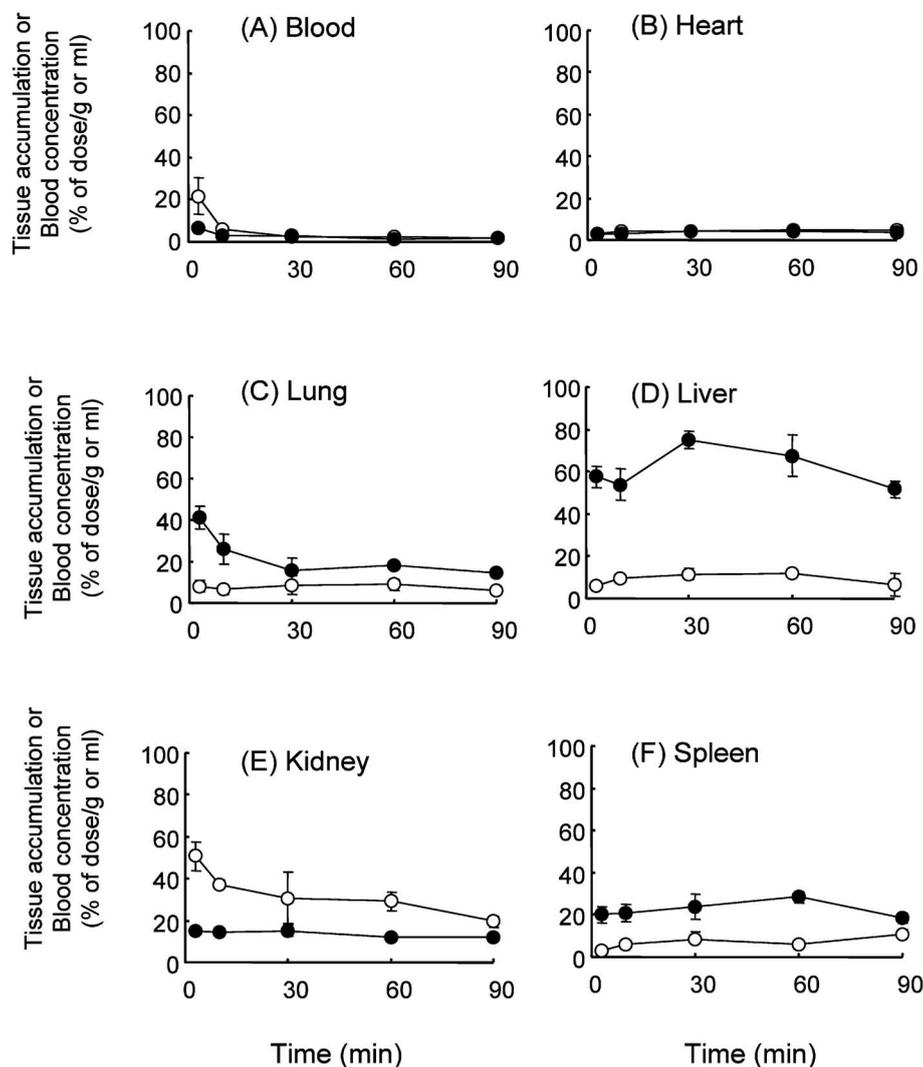


Fig. 2. Blood Concentration and Tissue Accumulation of $[^{32}\text{P}]$ Naked $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy (○), and Man-liposome/ $[^{32}\text{P}]$ $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy Complex (●) after Intravenous Injection into Mice

$[^{32}\text{P}]$ $\text{NF}\kappa\text{B}$ decoy was complexed with mannosylated liposomes or cationic liposomes at a charge ratio of 2.3 : 1.0 (+ : -). Radioactivity was determined in blood, liver, lung, spleen, kidney, heart, muscle and urine after 1, 5, 10, 30 and 60 min. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$).

なかった (Fig. 3).²⁸⁾ さらに、肝障害の指標として血清中の aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 量を測定したところ、Man リポソーム複合体の投与により、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ単独の場合に比べ有意な減少が認められた。²⁸⁾ さらに、肝臓細胞の核内の活性化 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 量を測定したところ、LPS 誘発性肝障害マウスにおいて、Man リポソーム複合体投与により有意な活性化 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 量の減少が認められた (Fig. 4).²⁸⁾ これらの知見は、静脈内投与された Man リポソーム複合体はマンノースレセプター介在性エンドサイトーシスにより免疫担当細胞へ効率的に取り込まれ、活性化 $\text{NF}\kappa\text{B}$ に特異的に結合することにより、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活

性化を阻害し、肝障害を抑制したことを示唆している。

肝臓に存在する Kupffer 細胞は、体内の組織内マクロファージの約 90% を占め、肝炎、肝線維化、がん肝転移に加え免疫疾患においても重要な役割を果たすことが知られている。⁵⁷⁾ したがって、Kupffer 細胞選択的 $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ送達によりサイトカインなどの炎症関連分子の抑制を実現することは種々の疾患炎症治療になり得ると考えられる。Kupffer 細胞には、フコースを認識するフコースレセプターが特異的に発現していることが知られており、Kupffer 細胞選択的送達に有効なりガンド候補である。

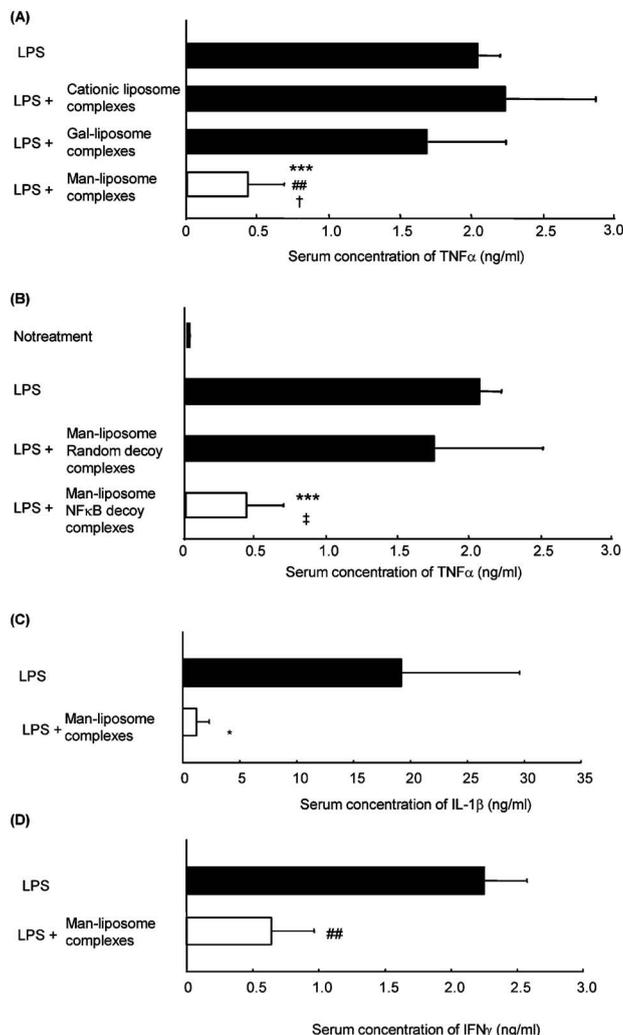


Fig. 3. Inhibitory Effect on the Production of $\text{TNF}\alpha$ by $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy Complexed with Several Kinds of Liposomes (A), $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy or Random Decoy Complexed with Man-liposome (B), Inhibitory Effect of Man-liposome/ $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy on $\text{IL-1}\beta$ (C) and $\text{IFN}\gamma$ (D)

Serum concentration of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and $\text{IFN}\gamma$ were determined by ELISA. One min after intravenous administration of LPS, $\text{NF}\kappa\text{B}$ decoy or random decoy complexed with several kind of liposomes were intravenously injected into mice. Blood was collected from the vena cava at 1 h ($\text{TNF}\alpha$), 3 h ($\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$). Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$). Significant difference *** $p<0.001$ v.s. (LPS), ** $p<0.01$ v.s. (LPS+Cationic liposome complexes), * $p<0.05$ v.s. (LPS+Gal-liposome complexes), † $p<0.05$ v.s. (LPS+Man-liposome/random decoy complex). [Reprinted from Ref. 22] with permission from Elsevier].

フコース修飾タンパク質⁵⁸⁾をマウスに投与後、肝臓への高い集積が認められ、さらに肝細胞内分布評価及びガドリニウムクロライド前処理による肝集積減少より、フコース修飾体が Kupffer 細胞へ効率よく取り込まれていることを明らかにした。したがって、フコースレセプターによる認識取り込みが Kupffer 細胞選択的送達の有効な方法論であることが確認された。そこで $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイの Kupffer 細胞

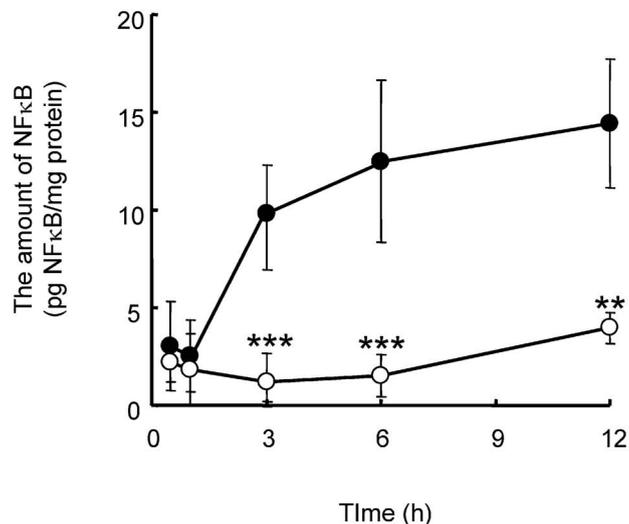


Fig. 4. Inhibitory effect of Man-liposome/ $\text{NF}\kappa\text{B}$ Decoy Complex on $\text{NF}\kappa\text{B}$ Activation in the Nuclei

One min after intravenous administration of LPS, Man-liposome/ $\text{NF}\kappa\text{B}$ decoy complex ($30\ \mu\text{g}/\text{mouse}$) (●) or 5% dextrose (○) was intravenously injected into mice. Liver was excised at 0.5, 1, 3, 6, 12 h and nuclear protein was extracted. Each value represents the mean \pm S.D. ($n=3$). Significant difference *** $p<0.001$, ** $p<0.01$. [Reprinted from Ref. 22] with permission from Elsevier].

選択的送達を目的に、フコース修飾カチオン性リポソーム (Fuc リポソーム) を調製した。Fuc リポソーム/ ^{32}P $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ複合体は、静脈内投与後、5分で肝臓へ約 80 (% of dose/g tissue or ml) という高い集積が認められた。また、その肝集積はガドリニウムクロライドの前処理による有意な抑制を受けた。⁵⁹⁾ さらに、Fuc リポソーム/ ^{32}P 標識 $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ複合体の静脈内投与後の肝臓内分布を評価したところ、Man リポソーム複合体の場合 (肝非実質細胞/肝実質細胞=2.6) に比べ Fuc リポソーム複合体 (肝非実質細胞/肝実質細胞=4.5) の場合の方が約 2 倍高い非実質細胞への取り込みが確認された。⁵⁹⁾ さらに、LPS 誘発性肝炎モデルに Fuc リポソーム/ $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ複合体を静脈内投与したところ、有意な肝臓内 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性化抑制、サイトカイン産生抑制、並びに肝炎抑制効果が認められた。⁵⁹⁾ これらの知見は、静脈内投与された Fuc リポソーム/ $\text{NF}\kappa\text{B}$ デコイ複合体の高い Kupffer 細胞への取り込みによる肝炎抑制効果を示唆するものである。

7. おわりに

分子生物学の著しい進展に伴い、疾患の分子機構が明らかになるとともに、特に、核酸医薬品を用いた標的遺伝子発現制御に基づく難治性疾患治療が期待されている。しかしながら、核酸医薬品を用いた

治療法確立には、治療の対象となる標的細胞内への特異的ターゲティングシステムの開発が必要である。今回、NF κ B デコイに関して免疫担当細胞への細胞選択的ターゲティングシステムによる抗炎症治療を報告した。われわれが開発したターゲティングシステムは、静電的相互作用に基づく複合体形成化を基盤としているため、ポリアニオンとしての物理化学的特性を有するアンチセンス DNA や siRNA 等、様々な核酸医薬品への応用も可能であると考えられる。最近われわれは、ガラクトース修飾リポソームを用いた siRNA の肝臓実質細胞へのターゲティングによる遺伝子ノックダウン効果を報告した。⁶⁰ 今回紹介した NF κ B デコイの免疫担当細胞への細胞選択的ターゲティングシステムが次世代の分子標的療法実現の一助となることを期待する。

REFERENCES

- 1) Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G., *Oncogene*, **25**, 6706–6716 (2006).
- 2) Gilmore T. D., *Oncogene*, **25**, 6680–6684 (2006).
- 3) Scheidereit C., *Oncogene*, **25**, 6685–6705 (2006).
- 4) Perkins N. D., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62 (2007).
- 5) Grossmann M., Metcalf D., Merryfull J., Beg A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 11848–11853 (1999).
- 6) Horwitz B. H., Scott M. L., Cherry S. R., Bronson R. T., Baltimore D., *Immunity*, **6**, 765–772 (1997).
- 7) Iotsova V., Caamano J., Loy J., Yang Y., Lewin A., Bravo R., *Nat. Med.*, **3**, 1285–1289 (1997).
- 8) Weih F., Durham S. K., Barton D. S., Sha W. C., Baltimore D., Bravo R., *J. Exp. Med.*, **185**, 1359–1370 (1997).
- 9) Yin M. J., Yamamoto Y., Gaynor R. B., *Nature*, **396**, 77–80 (1998).
- 10) Yamamoto Y., Gaynor R. B., *J. Clin. Invest.*, **107**, 135–142 (2001).
- 11) Majumdar S., Aggarwal B. B., *J. Immunol.*, **167**, 2911–2920 (2001).
- 12) Ashikawa K., Majumdar S., Banerjee S., Bharti A. C., Shishodia S., Aggarwal B. B., *J. Immunol.*, **169**, 6490–6497 (2002).
- 13) Marienfeld R., Neumann M., Chuvpilo S., Escher C., Kneitz B., Avots A., Schimpl A., Serfling E., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1601–1609 (1997).
- 14) Zhang Y., Sun X., Muraoka K., Ikeda A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 34657–34662 (1999).
- 15) De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G., *J. Neuroimmunol.*, **109**, 16–22 (2000).
- 16) Fleming J. A., Lightcap E. S., Sadis S., Thoroddsen V., Bulawa C. E., Blackman R. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 1461–1466 (2002).
- 17) Burke J. R., Pattoli M. A., Gregor K. R., Brassil P. J., MacMaster J. F., McIntyre K. W., Yang X., Iotsova V. S., Clarke W., Strnad J., Qiu Y., Zusi F. C., *J. Biol. Chem.*, **278**, 1450–1456 (2003).
- 18) Foxwell B., Browne K., Bondeson J., Clarke C., de Martin R., Brennan F., Feldmann M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8211–8215 (1998).
- 19) Mi J., Li Z. Y., Ni S., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 1343–1352 (2001).
- 20) Breuss J. M., Cejna M., Bergmeister H., Kadl A., Baumgartl G., Steurer S., Xu Z., Koshelnick Y., Lipp J., De Martin R., Losert U., Lammer J., Binder B. R., *Circulation*, **105**, 633–638 (2002).
- 21) Suetsugu H., Iimuro Y., Uehara T., Nishio T., Harada N., Yoshida M., Hatano E., Son G., Fujimoto J., Yamaoka Y., *Gut*, **54**, 835–842 (2005).
- 22) Morishita R., Sugimoto T., Aoki M., Kida I., Tomita N., Moriguchi A., Maeda K., Sawa Y., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., *Nat. Med.* **3**, 894–899 (1997).
- 23) Morishita R., Tomita N., Kaneda Y., Ogihara T., *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 139–146 (2004).
- 24) Marques J. T., Williams B. R., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1399–1405 (2005).
- 25) Kawakami S., Hashida M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 142–151 (2007).
- 26) Takakura Y., Hashida M., *Pharm. Res.*, **13**, 820–831 (1996).
- 27) Miyao T., Takakura Y., Akiyama T., Yoneda F., Sezaki H., Hashida M., *Antisense Res. Dev.*, **5**, 115–121 (1995).

- 28) Higuchi Y., Kawakami S., Oka M., Yabe Y., Yamashita F., Hashida M., *FEBS Lett.*, **580**, 3706–3714 (2006).
- 29) Desmet C., Gosset P., Pajak B., Cataldo D., Bentires-Alj M., Lekeux P., Bureau F., *J. Immunol.*, **173**, 5766–5775 (2004).
- 30) De Vry C. G., Prasad S., Komuves L., Lorenzana C., Parham C., Le T., Adda S., Hoffman J., Kahoud N., Garlapati R., Shyamsundar R., Mai K., Zhang J., Muchamuel T., Dajee M., Schryver B., McEvoy L.M., Ehrhardt R.O., *Gut*, **56**, 524–533 (2007).
- 31) Ohtani K., Egashira K., Nakano K., Zhao G., Funakoshi K., Ihara Y., Kimura S., Tominaga R., Morishita R., Sunagawa K., *Circulation*, **114**, 2773–2779 (2006).
- 32) Miyake T., Aoki M., Nakashima H., Kawasaki T., Oishi M., Kataoka K., Tanemoto K., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R., *Gene Ther.*, **13**, 695–704 (2006).
- 33) Nakashima H., Aoki M., Miyake T., Kawasaki T., Iwai M., Jo N., Oishi M., Kataoka K., Ohgi S., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R., *Circulation*, **109**, 132–138 (2004).
- 34) Inagaki H., Suzuki J., Ogawa M., Taniyama Y., Morishita R., Isobe M., *J. Vasc. Res.*, **43**, 12–18 (2006).
- 35) Matsuda N., Hattori Y., Jesmin S., Gando S., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1018–1025 (2005).
- 36) Yoshida M., Yamamoto N., Uehara T., Terao R., Nitta T., Harada N., Hatano E., Iimuro Y., Yamaoka Y., *Eur. Surg. Res.*, **34**, 251–259 (2002).
- 37) Ogushi I., Iimuro Y., Seki E., Son G., Hirano T., Hada T., Tsutsui H., Nakanishi K., Morishita R., Kaneda Y., Fujimoto J., *Hepatology*, **38**, 335–344 (2003).
- 38) Fichtner-Feigl S., Fuss I. J., Preiss J. C., Strober W., Kitani A., *J. Clin. Invest.*, **115**, 3057–3071 (2005).
- 39) Tomita N., Morishita R., Tomita S., Gibbons G. H., Zhang L., Horiuchi M., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., Dzau V. J., *Gene Ther.*, **7**, 1326–1332 (2000).
- 40) Matsushita H., Morishita R., Nata T., Aoki M., Nakagami H., Taniyama Y., Yamamoto K., Higaki J., Yasufumi K., Ogihara T., *Circ. Res.*, **86**, 974–981 (2000).
- 41) Griesenbach U., Cassidy R. L., Cain R. J., duBois R. M., Geddes D. M., Alton E. W., *Gene Ther.*, **9**, 1109–1115 (2002).
- 42) Cao C. C., Ding X. Q., Ou Z. L., Liu C. F., Li P., Wang L., Zhu C.F., *Kidney Int.*, **65**, 834–845 (2004).
- 43) Fujita T., Furitsu H., Nishikawa M., Takakura Y., Sezaki H., Hashida M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 191–196 (1992).
- 44) Ogawara K., Hasegawa S., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M., *J. Drug Target.*, **6**, 349–360 (1999).
- 45) Kawakami S., Wong J., Sato A., Hattori Y., Yamashita F., Hashida M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1524**, 258–265 (2000).
- 46) Opanasopit P., Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Nishikawa M., Hashida M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1511**, 134–145 (2001).
- 47) Yeeprae W., Kawakami S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target.*, **13**, 479–487 (2005).
- 48) Yeeprae W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **114**, 193–201 (2006).
- 49) Managit C., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **107**, 373–382 (2005).
- 50) Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.*, **7**, 292–299 (2000).
- 51) Hashida M., Kawakami S., Yamashita F., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 871–880 (2005).
- 52) Kawakami S., Hattori Y., Lu Y., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *Pharmazie*, **59**, 405–408 (2004).
- 53) Higuchi Y., Kawakami S., Fumoto S., Yamashita F., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1521–1523 (2006).
- 54) Sato A., Kawakami S., Yamada M., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target.*, **9**, 201–207 (2001).
- 55) Hattori Y., Suzuki S., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **108**, 484–495 (2005).
- 56) Higuchi Y., Kawakami S., Oka M., Yamashita F., Hashida M., *Pharmazie*, **61**, 144–147 (2006).
- 57) Kuiper J., Brouwer A., Knook D. L., van Ber-

- kel T. J. C., "The Liver Biology and Pathobiology," 3rd ed., Raven Press New York. (2001), 791–818.
- 58) Opanasopit P., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., *J. Drug Target.*, **9**, 341–351 (2001).
- 59) Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 532–539 (2007).
- 60) Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Kawakami S., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 1434–1442 (2007).