

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-222338

(P2010-222338A)

(43) 公開日 平成22年10月7日(2010.10.7)

| (51) Int.Cl.            | F I                | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| A 6 1 K 47/42 (2006.01) | A 6 1 K 47/42      | 4 C 0 7 6   |
| C 0 7 K 7/06 (2006.01)  | C 0 7 K 7/06 Z N A | 4 C 0 8 4   |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 48/00      | 4 H 0 4 5   |

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2009-175811 (P2009-175811)  
 (22) 出願日 平成21年7月7日(2009.7.7)  
 (31) 優先権主張番号 特願2009-45940 (P2009-45940)  
 (32) 優先日 平成21年2月27日(2009.2.27)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(71) 出願人 505043041  
 株式会社スリー・ディー・マトリックス  
 東京都千代田区麴町三丁目2番4号  
 (71) 出願人 503299295  
 落谷 孝広  
 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター築地宿舎218号  
 (72) 発明者 武井 次郎  
 東京都千代田区麴町三丁目2番4号 株式会社スリー・ディー・マトリックス内  
 (72) 発明者 小林 智  
 東京都千代田区麴町三丁目2番4号 株式会社スリー・ディー・マトリックス内

最終頁に続く

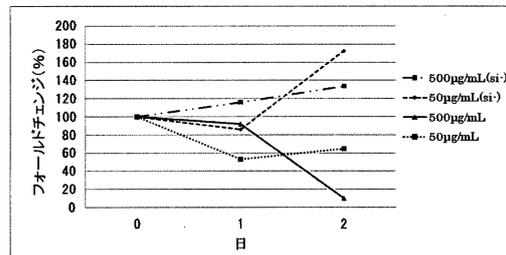
(54) 【発明の名称】 核酸移送担体

(57) 【要約】

【課題】 より毒性の低い、局所投与および全身投与可能で、核酸医薬品の治療患部への到達効率と導入効率を高める臨床応用可能な核酸移送担体を提供する。

【解決手段】 ペプチド界面活性剤を含む核酸移送担体

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ペプチド界面活性剤を含む核酸の移送担体。

## 【請求項 2】

ペプチド界面活性剤が、4～10の親水性アミノ酸からなる頭部及び1又は2の疎水性アミノ酸からなる尾部からなる、請求項1に記載の核酸の移送担体。

## 【請求項 3】

核酸の移送担体が、A A A A A A D又はA A A A A A Kである、請求項1に記載の核酸の移送担体。

## 【請求項 4】

請求項1 - 3のいずれか1項に記載の核酸の移送担体及び核酸を含む、局所投与又は全身投与用医薬品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ペプチド界面活性剤を含む核酸の移送担体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

RNA干渉(RNAi)は、短い2本鎖RNAによって特定遺伝子の発現が抑制される現象で、疾患の治療への応用が期待されている。現在の技術では、small interfering RNA (siRNA)やmicro RNA (miRNA)を核酸医薬として用いる際の移送担体は、カチオン性のリン脂質が主体であるが、その毒性が指摘されている。また、アテロコラーゲンを移送担体に用いる研究も行われているが、その治療効果の向上にはさらなる改善が必要である。

## 【0003】

siRNAをはじめとする核酸医薬の臨床における応用を考慮すると、核酸医薬品の患部への移送担体は、限りなく毒性が低いことが望まれ、また同時に患部までの到達効率や標的遺伝子の抑制効率が高く、かつ全身投与可能な担体の開発が待たれている。

## 【0004】

本発明のペプチド界面活性剤は、Gタンパク質結合レセプターウシロドプシンなどの膜タンパク質を安定させる作用やセルフアセンブリする性質を有することが知られている(非特許文献1及び2)。しかし、核酸の移送担体としての用途はこれまで知られていなかった。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0005】

【非特許文献1】 X Zhao et al., PNAS, Vol. 103, No. 47, 17707-17712

【非特許文献2】 A Nagai et al., J. Nanosci. Nanotechnol. Vol. 7, No. 7, 1-7

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明が解決しようとする課題は、より毒性の低く、患部への到達効率と標的遺伝子の抑制効率が高い臨床応用可能な核酸移送担体を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、驚くべきことに、ペプチド界面活性剤が核酸の移送担体として有用であることを見出し、本発明を完成させた。

## 【0008】

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、下記のとおりである。

[ 1 ] ペプチド界面活性剤を含む核酸の移送担体。

[ 2 ] ペプチド界面活性剤が、4 ~ 10 の親水性アミノ酸からなる頭部及び1又は2の疎水性アミノ酸からなる尾部からなる、[ 1 ] に記載の核酸の移送担体。

[ 3 ] 核酸の移送担体が、A A A A A A D 又は A A A A A A K である、[ 1 ] に記載の核酸の移送担体。

[ 4 ] 上記 [ 1 ] - [ 3 ] のいずれか1に記載の核酸の移送担体及び核酸を含む、局所投与又は全身投与用医薬品。

【発明の効果】

【0009】

本発明の核酸移送担体は、より毒性が低く、局所投与及び全身投与が可能であり、核酸医薬品の治療患部への到達効率と導入効率を高めることができるという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ペプチド界面活性剤による siRNA の局所投与における遺伝子発現抑制効果の確認である。「si -」はペプチド界面活性剤に siRNA を加えなかった実験群を意味し、その他の群にはペプチド界面活性剤に siRNA を添加している。

【図2】ペプチド界面活性剤による siRNA の全身投与における遺伝子発現抑制効果の確認である。「si -」はペプチド界面活性剤に siRNA を加えなかった実験群を意味し、その他の群にはペプチド界面活性剤に siRNA を添加している。

【図3】ペプチド界面活性剤による siRNA の局所投与における腫瘍細胞増殖抑制効果の確認である。

【図4】ペプチド界面活性剤による siRNA の局所投与における腫瘍細胞増殖遺伝子の抑制効果の確認である。

【図5】ペプチド界面活性剤による siRNA の全身投与における腫瘍細胞増殖抑制効果の確認である。

【図6】血清中 GOT 濃度である。

【図7】血清中 GPT 濃度である。

【図8】血清中インターフェロンアルファ濃度である。

【図9】血清中インターフェロンガンマ濃度である。

【図10】血清中 MCP - 1 濃度である。

【図11】血清中インターロイキン12濃度である。

【図12】血清中インターロイキン6濃度である。

【図13】血清中ケモカイン濃度である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明において、ペプチド界面活性剤とは、6 ~ 10 個のアミノ酸残基を含むものであり、その長さは、約 2 ~ 3 nm であり、従来の界面活性剤、たとえば、n - ドデシル - D - マルトシド (DM) や オクチル - D - グルコシド (OG) と同様の特性を示す。

【0012】

本発明のペプチド界面活性剤は、好ましくは、4 ~ 10 の親水性アミノ酸からなる頭部及び1又は2の疎水性アミノ酸からなる尾部からなる。

【0013】

より具体的には、GGGGDD (G4D2)、GGGGGGD (G6D)、GGGGGGDD (G6D2)、GGGGGGGGD (G8D)、GGGGGGGGDD (G8D2)、GGGGGGGGGGD (G10D)、GGGGKK (G4K2)、GGGGGGK (G6K)、GGGGGGKK (G6K2)、GGGGGGGGK (G8K)、GGGGGGGGGGK (G8K2)、GGGGGGGGGGGGK (G10K)、GGGGGGGGGGGGKK (G10K2)、GGGGGGGGGGGGDD (G10D2)、AAAA DD (A4D2)、AAAAAAD (A6D)、AAAAAADDD (A6D2)、AAAAAAA

10

20

30

40

50

AD(A8D)、AAAAAAAAADD(A8D2)、AAAAAAAAAAD(A10D)、AAAAAAAAAAD(A10D2)、AAAAKK(A4K2)、AAAAAAK(A6K)、AAAAAAKK(A6K2)、AAAAAAAK(A8K)、AAAAAAKK(A8K2)、AAAAAAAK(A10K)、AAAAAAKK(A10K2)、VVVVDD(V4D2)、VVVVVD(V6D)、VVVVVDD(V6D2)、VVVVVVVD(V8D)、VVVVVVDD(V8D2)、VVVVVVVD(V10D)、VVVVVVDD(V10D2)、VVVVKK(V4K2)、VVVVVK(V6K)、VVVVKK(V6K2)、VVVVVK(V8K)、VVVVKK(V8K2)、VVVVVK(V10K)、VVVVVK(V10K2)、LLLLDD(L4D2)、LLLLLD(L6D)、LLLLLDD(L6D2)、LLLLLLD(L8D)、LLLLLLDD(L8D2)、LLLLLLLLLDD(L10D2)、LLLLKK(L4K2)、LLLLLK(L6K)、又はLLLLLK(L6K2)、LLLLLLK(L8K)、LLLLLLKK(L8K2)、LLLLLLLK(L10K)、LLLLLLKK(L10K2)を挙げることができるが、中でも、AAAAAD(A6D)又はAAAAAK(A6K)が好ましく、AAAAAK(A6K)が特に好ましい。

10

## 【0014】

ペプチド界面活性剤の製造法は、固相合成法もしくは液層合成法によって合成される。当該ペプチドは人工合成可能であるため、生体由来物質を含まず、感染リスクの心配がない。

20

## 【0015】

本発明において、核酸移送担体とは、siRNA等のポリヌクレオチドや遺伝子を、生体の意図する組織への移送、遺伝子導入する際に用い、その到達効率と導入効率を高めることができる組成物をいう。

## 【実施例1】

## 【0016】

マウス局所投与モデルにおけるRNAi効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する腫瘍細胞を持つマウスにルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNAとペプチド界面活性剤を混合した溶液を腫瘍へ直接注射し、siRNAの導入と遺伝子抑制効果をルシフェラーゼ発光のイメージングで解析したところ、siRNA/ペプチド界面活性剤混合液による遺伝子抑制効果を確認した。

30

## 【0017】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列：Ac-AAAAAAK-NH<sub>2</sub>、Celtek社製

・ペプチド界面活性剤濃度

2濃度：50μg/mL、500μg/mL

・ルシフェラーゼ遺伝子抑制siRNA

Luciferase GL3 siRNA (B-Bridge International, Inc社製)

40

・ルシフェリン

ルシフェリン1g(Wako)をダルベッコPBS(Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>不含)66.7mLに溶解し、0.2μmシリンジフィルター(Minisart)を通して滅菌した。シリンジフィルターを通して直接遮光チューブに分注し、-80(-20)で保存した。

・ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞

PC-3M-luc-C6(Xenogen, Alameda社)

## 【0018】

<方法>

50

・腫瘍モデルマウスの作成

PC-3M-luc-C6細胞を10%FBS(Equitech-Bio, Kerrville)含有Eagle's MEM培地(Invitrogen)にて37、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。PC-3M-luc-C6細胞をトリプシン処理で回収し、ダルベッコPBS(Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含)に懸濁、9週齢の雄ヌードマウス(CLEA Japan, Osaka)の皮下に3×10<sup>6</sup>細胞/200μlを26G注射針にて移植し、腫瘍マウスを作成した。

・siRNA/ペプチド界面活性剤の調製

Luciferase GL3 siRNA 50μg (PBS(-) 100μLに溶解)とペプチド界面活性剤を等量混合し(最終投与量が1匹あたり200μLになるよう調製)、室温にて20分間、低速で回転混和した。

10

・投与

試験群には、siRNA/ペプチド界面活性剤混合液を腫瘍部位あたりに200μl投与した。一方、コントロール群はペプチド界面活性剤(50μg/mLと500μg/mL)のみを200μl投与した。

・In vivoイメージング

ルシフェリン投与前に動物の体重を測定し、ルシフェリン溶液(15mg/mL)を150mg/kgで26G注射針(テルモ社)にて腹腔内投与した。ルシフェリン投与から10分後、IVIS Imaging System(Xenogen)にてイメージングした。イメージングデータはLIVINGIMAGE 2.51ソフトウェア(Xenogen)にて解析した。ルシフェラーゼ発光イメージングは、siRNA投与直前をday 0として、day 0よりday 2までを行い、発光量の変化をsiRNAの抑制効果とした。

20

【0019】

<結果>

結果を図1に示した。コントロール群(ペプチド界面活性剤のみ)では投与後にルシフェラーゼ発光量が増加しているが、試験群では発光量が減弱していた。このことから、siRNAをペプチド界面活性剤と混合することで腫瘍細胞へのsiRNA導入が促進され、遺伝子発現が抑制されると考えられた。

30

【実施例2】

【0020】

マウス全身投与モデルにおけるRNAi効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する腫瘍を持つマウスにルシフェラーゼ遺伝子抑制siRNAとペプチド界面活性剤を混合した溶液を尾静脈から投与し、siRNAの導入と遺伝子抑制効果をルシフェラーゼ発光のイメージングで解析したところ、siRNA/ペプチド界面活性剤混合液による遺伝子抑制効果を確認した。

【0021】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列: Ac-A A A A A A K-NH<sub>2</sub>、Celtek社製

40

・ペプチド界面活性剤濃度

2濃度: 50.0、500.0μg/mL

・ルシフェラーゼ遺伝子抑制siRNA

Luciferase GL3 siRNA (B-Bridge International, Inc社製)

・ルシフェリン

ルシフェリン1g(Wako)をダルベッコPBS(Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含)66.7mLに溶解し、0.2μmシリンジフィルター(Minisart)を通して滅菌した。シリンジフィルターを通して直接遮光チューブに分注し、-80(-20)で保存した。

50

・ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞

PC-3M-luc-C6 (Xenogen, Alameda社)

【0022】

<方法>

・腫瘍モデルマウスの作成

PC-3M-luc-C6細胞を10%FBS (Equitech-Bio, Kerrville)含有Eagle's MEM培地 (Invitrogen)にて37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養。PC-3M-luc-C6細胞をトリプシン処理で回収し、ダルベッコPBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>不含)に懸濁、9週齢の雄ヌードマウス (CLEA Japan, Osaka)の皮下に1.25×10<sup>6</sup>細胞/200μlで26G注射針にて移植。

10

・siRNA/ペプチド界面活性剤の調製

Luciferase GL3 siRNA 50μg (PBS(-)100μLに溶解)とペプチド界面活性剤を等量混合し(最終投与量が1匹あたり200μLになるよう調製)、室温にて20分間、低速で回転混和した。

・投与

試験群はsiRNA/ペプチド界面活性剤混合液をマウス尾静脈より27G注射針(テルモ社製)にて200μl投与した。コントロール群はペプチド界面活性剤(500μ/ml)のみを200μl投与した。

20

・In vivoイメージング

ルシフェリン投与前に動物の体重を測定し、ルシフェリン溶液(15mg/ml)を150mg/kgで26G注射針(テルモ社)にて腹腔内投与した。ルシフェリン投与から10分後、IVIS Imaging System (Xenogen)にてイメージングした。イメージングデータはLIVINGIMAGE 2.51ソフトウェア(Xenogen)にて解析した。ルシフェラーゼ発光イメージングは、siRNA投与直前をday 0として、day 0よりday 2までを行い、発光量の変化をsiRNAの抑制効果とした。

【0023】

<結果>

結果を図2に示した。コントロール群(界面活性剤のみ)では投与後2日目でルシフェラーゼ発光量が増加しているが、試験群では発光量が減弱した。このことから、siRNAをペプチド界面活性剤に混合して全身投与すると、腫瘍細胞へのsiRNA導入がペプチド界面活性剤によって促進され、遺伝子発現が抑制されると考えられた。

30

【実施例3】

【0024】

マウス局所投与モデルにおけるRNAi効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する腫瘍細胞を持つマウスに細胞増殖抑制効果をもつsiRNAとペプチド界面活性剤を混合した溶液を腫瘍へ直接注射し、細胞増殖抑制効果を腫瘍サイズ計測により解析したところ、siRNA/ペプチド界面活性剤混合液による細胞増殖抑制効果を確認した。

40

【0025】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列: Ac-A A A A A A K-NH<sub>2</sub>、Celtex社製

・ペプチド界面活性剤濃度

500μg/ml

・腫瘍細胞抑制siRNA

EZH2 siRNA (Sigma社製)

・ネガティブコントロールsiRNA

AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN社)

50

製)

・ルシフェリン

ルシフェリン 1 g (Wako) をダルベッコ PBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含) 66.7 mL に溶解し、0.2 μm シリンジフィルター (Minisart) を通して滅菌した。シリンジフィルターを通して直接遮光チューブに分注し、-80 (-20) で保存。

・ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞

PC-3M-luc-C6 (Xenogen, Alameda 社)

【0026】

<方法>

10

・腫瘍モデルマウスの作成

PC-3M-luc-C6 細胞を 10% FBS (Equitech-Bio, Kerrville) 含有 Eagle's MEM 培地 (Invitrogen) にて 37、5% CO<sub>2</sub> 下で培養する。PC-3M-luc-C6 細胞をトリプシン処理で回収し、ダルベッコ PBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含) に懸濁、9 週齢の雄ヌードマウス (CLEA Japan, Osaka) の皮下に 2 × 10<sup>6</sup> 細胞 / 200 μl を 26G 注射針にて移植し、腫瘍マウスを作成する。

・siRNA / ペプチド界面活性剤の調製

siRNA 25 μg とペプチド界面活性剤を等量ずつ混合 (最終量を 1 匹あたり 200 μL) し、室温にて 20 分間、低速で回転混和した。

20

・投与

試験群には、EZH2 siRNA / ペプチド界面活性剤混合液を腫瘍部位あたりに 200 μl 投与した。一方、コントロール群は All Stars Negative Control siRNA / ペプチド界面活性剤混合液を腫瘍あたり 200 μl 投与した。投与は day 0, day 4, day 8 の 3 回投与とした。

・腫瘍サイズの計測

デジタルノギスによる短径、長径、高さ計測を siRNA 投与直前を day 0 とし、day 0, day 4, day 8 に行い、腫瘍サイズ (三辺の積) の変化を腫瘍細胞増殖抑制効果とした。

30

【0027】

<結果>

結果を図 3 に示した。コントロール群では投与後 day 4, day 8 と腫瘍サイズが増加しているが、試験群では腫瘍サイズが減少していた。このことから、siRNA をペプチド界面活性剤と混合することで腫瘍細胞への siRNA 導入が促進され、腫瘍細胞の増殖が抑制されると考えられた。

【実施例 4】

【0028】

マウス局所投与モデルにおける RNAi 効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する腫瘍細胞を持つマウスに腫瘍成長抑制効果をもつ siRNA とペプチド界面活性剤を混合した溶液を腫瘍へ直接注射し、標的遺伝子の mRNA 量を定量 PCR により解析したところ、siRNA / ペプチド界面活性剤混合液による標的遺伝子の抑制効果が確認された。

40

【0029】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列: Ac-AAAAAAK-NH<sub>2</sub>、Celtek 社製

・ペプチド界面活性剤濃度

500 μg / mL

・腫瘍成長抑制 siRNA

EZH2 siRNA (Sigma 社製)

50

- ・ネガティブコントロール *siRNA*

All Stars Negative Control *siRNA* (QIAGEN社製)

- ・ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞

PC-3M-luc-C6 (Xenogen, Alameda社)

【0030】

<方法>

- ・腫瘍モデルマウスの作成

PC-3M-luc-C6細胞を10%FBS (Equitech-Bio, Kerrville)含有Eagle's MEM培地 (Invitrogen)にて37、5%CO<sub>2</sub>下で培養する。PC-3M-luc-C6細胞をトリプシン処理で回収し、ダルベッコPBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>不含)に懸濁、9週齢の雄ヌードマウス (CLEA Japan, Osaka)の皮下に2×10<sup>6</sup>細胞/200μlを26G注射針にて移植し、腫瘍マウスを作成する。

- ・*siRNA*/ペプチド界面活性剤の調製

*siRNA* 25μgとペプチド界面活性剤を等量ずつ混合 (最終量を1匹あたり200μL)し、室温にて20分間、低速で回転混和した。

- ・投与

試験群には、EZH2 *siRNA*/ペプチド界面活性剤混合液を腫瘍部位あたりに200μl投与した。一方、コントロール群はAll Stars Negative Control *siRNA*/ペプチド界面活性剤混合液を腫瘍あたり200μl投与した。投与は3日間の連続投与とした。

- ・組織の固定・保存

試験群及びコントロール群の腫瘍はday 6に摘出し、液体窒素にて保存し、使用時まで-80にて冷凍保存した。

- ・RNA抽出

腫瘍をホモジナイズし、ISOGEN (ニッポンジーン社製)を用いてRNAを抽出した。

- ・cDNAの合成

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with RNase Inhibitor (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて*siRNA*をcDNAに逆転写した。

- ・リアルタイムPCR

Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (インビトロジェン社製)とTaqman Probe (アプライドバイオシステムズ社製)を用いてEZH2を標的とし、GAPDHを内部標準としてApplied Biosystems 7700リアルタイムPCRシステムによって定量解析を行った。

【0031】

<結果>

結果を図4に示した。コントロール群のEZH2 mRNA発現量を1とした際の試験群のEZH2 mRNA発現量が0.53であった。このことから、*siRNA*をペプチド界面活性剤と混合することで腫瘍細胞における標的遺伝子抑制効果が確認された。

【実施例5】

【0032】

マウス全身投与モデルにおけるRNAi効果の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を発現する腫瘍を尾静脈投与したマウスに腫瘍成長抑制効果をもつ*siRNA*とペプチド界面活性剤を混合した溶液を尾静脈から投与し、全身性のがん転移抑制効果をルシフェラーゼ発光のイメージングにより解析したところ、*siRNA*/ペプチド界面活性剤混合液による全身性のがん転移抑制効果を確認した。

【0033】

10

20

30

40

50

## &lt; 材料 &gt;

## ・ペプチド界面活性剤

配列：Ac - A A A A A A K - NH<sub>2</sub>、Celtek社製

## ・ペプチド界面活性剤濃度

500.0 μg/mL

## ・腫瘍増殖抑制 siRNA

EZH2 siRNA (Sigma社製)

KIF11 siRNA (Ambion社製)

## ・ネガティブコントロール siRNA

AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN社製) 10

## ・ルシフェリン

ルシフェリン 1g (Wako) をダルベッコPBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含) 66.7 mL に溶解し、0.2 μm シリンジフィルター (Minisart) を通して滅菌した。シリンジフィルターを通して直接遮光チューブに分注し、-80 (-20) で保存。

## ・ルシフェラーゼ遺伝子発現腫瘍細胞

PC-3M-luc-C6 (Xenogen, Alameda社)

## 【0034】

## &lt; 方法 &gt;

## ・腫瘍モデルマウスの作成

PC-3M-luc-C6細胞を10% FBS (Equitech-Bio, Kerrville) 含有 Eagle's MEM 培地 (Invitrogen) にて37、5% CO<sub>2</sub> 下で培養。PC-3M-luc-C6細胞をトリプシン処理で回収し、ダルベッコPBS (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 不含) に懸濁、9週齢の雄スキッドマウス (CLEA Japan, Osaka) の尾静脈に2 × 10<sup>6</sup> 細胞 / 200 μl で26G注射針にて移植。

## ・siRNA / ペプチド界面活性剤の調製

各 siRNA 50 μg とペプチド界面活性剤を等量ずつ混合 (最終量を1匹あたり200 μL) し、室温にて20分間、低速で回転混和した。 30

## ・投与

試験群はEZH2 siRNA またはKIF11 siRNA / ペプチド界面活性剤混合液をマウス尾静脈より27G注射針 (テルモ社製) にて200 μl 投与した。コントロール群はAllStars Negative Control siRNA / ペプチド界面活性剤混合液を尾静脈より27G注射針 (テルモ社製) にて200 μl 投与した。

## ・In vivo イメージング

ルシフェリン投与前に動物の体重を測定し、ルシフェリン溶液 (15 mg/mL) を150 mg/kg で26G注射針 (テルモ社) にて腹腔内投与した。ルシフェリン投与から10分後、IVIS Imaging System (Xenogen) にてイメージングした。イメージングデータはLIVING IMAGE 2.51ソフトウェア (Xenogen) にて解析した。ルシフェラーゼ発光イメージングは、siRNA 投与直前をday 0 として、day 0, day 9, day 12, day 15 までを行い、発光量の変化を腫瘍細胞抑制とした。 40

## 【0035】

## &lt; 結果 &gt;

結果を図5に示した。コントロール群 (界面活性剤のみ) では投与後6日目よりルシフェラーゼ発光量の増加が確認されるが、試験群ではルシフェラーゼ発光量の増加は確認されなかった。このことから、siRNA をペプチド界面活性剤に混合して全身投与すると、腫瘍細胞へのsiRNA 導入がペプチド界面活性剤によって促進され、全身性のがん転移が抑制されると考えられた。 50

## 【実施例 6】

## 【0036】

界面活性剤ペプチドの肝機能に与える影響についての検討

正常マウスに siRNA / 界面活性剤ペプチド混合液を尾静脈投与し、血清中の GOT , GPT 濃度を測定し、肝毒性がないことを確認した。

## 【0037】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列：Ac - A A A A A A K - NH<sub>2</sub>、Celtek 社製

・ペプチド界面活性剤濃度

500.0 μg / mL

・siRNA

All Stars Negative Control siRNA (QIAGEN 社製)

Poly (I : C) (Sigma 社製)

## 【0038】

<方法>

・siRNA / ペプチド界面活性剤の調製

各 siRNA 50 μg とペプチド界面活性剤を等量ずつ混合 (最終量を 1 匹あたり 200 μL) し、室温にて 20 分間、低速で回転混和した。

・サンプル調整

9 週齢の雄 ICR マウス (CLEA Japan, Osaka) の尾静脈に siRNA / ペプチド界面活性剤混合 27 G 注射針 (テルモ社製) にて 200 μl 投与し、6 時間後に腹部大静脈より採血した。1000 × g で 15 分間の遠心分離により血清を分離した。

・測定

富士ドライケム (富士フィルム社製) により GOT , GPT を測定した。

## 【0039】

<結果>

結果を図 6、図 7 に示した。試験群では血清中 GOT 値と GPT 値は正常値を示した。このことから siRNA とペプチド界面活性剤の混合液を全身投与しても肝機能は変わらず、肝毒性がないことが明らかとなった。

## 【実施例 7】

## 【0040】

界面活性剤ペプチドによる免疫応答性の検討

正常マウスに siRNA / 界面活性剤ペプチド混合液を尾静脈投与し、ELISA 法により血清中のインターフェロンアルファ、インターフェロンガンマ、MCP - 1、インターロイキン 12、インターロイキン 6、ケモカイン濃度を測定し、免疫応答性がないことを確認した。

## 【0041】

<材料>

・ペプチド界面活性剤

配列：Ac - A A A A A A K - NH<sub>2</sub>、Celtek 社製

・ペプチド界面活性剤濃度

500.0 μg / mL

・siRNA

All Stars Negative Control siRNA (QIAGEN 社製)

## 【0042】

<方法>

・siRNA / ペプチド界面活性剤の調製

10

20

30

40

50

各 siRNA 50 μg とペプチド界面活性剤を等量ずつ混合（最終量を 1 匹あたり 200 μL）し、室温にて 20 分間、低速で回転混和した。

・サンプル調整

9 週齢の雄 ICR マウス（CLEA Japan, Osaka）の尾静脈に siRNA / ペプチド界面活性剤混合 27 G 注射針（テルモ社製）にて 200 μl 投与し、6 時間後に腹部大静脈より採血した。1000 × g で 15 分間の遠心分離により血清を分離した。

・測定

Procarta Cytokine Assay (Panomics) によりインターフェロンアルファ、インターフェロンガンマ、MCP-1、インターロイキン 12、インターロイキン 6、ケモカイン濃度を測定した。

10

【0043】

< 結果 >

結果を図 8、図 9、図 10、図 11、図 12、図 13 に示した。コントロール群（非投与群）と試験群を比較し血清中インターフェロンアルファ、インターフェロンガンマ、MCP-1、インターロイキン 12、インターロイキン 6、ケモカイン濃度に差は認められなかった。このことから siRNA とペプチド界面活性剤の混合液を全身投与しても免疫応答反応が惹起されないことが明らかとなった。

【0044】

< 総合考察 >

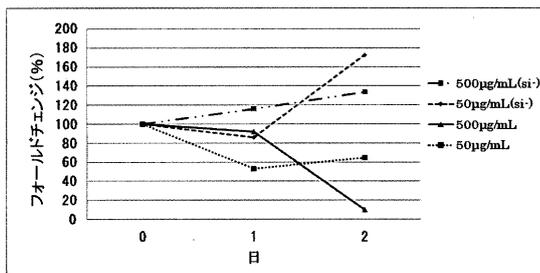
実施例 1 と実施例 2 と結果を併せ、ペプチド界面活性剤が、局所投与及び全身投与の両方で siRNA による遺伝子発現抑制に有用であると考えられた。

20

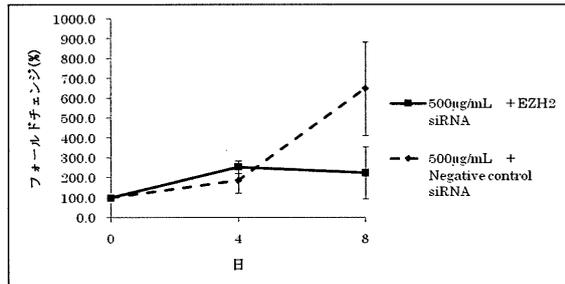
実施例 3 と実施例 4、実施例 5 の結果を併せ、ペプチド界面活性剤が、局所投与及び全身投与の両方で siRNA による腫瘍細胞増殖抑制に有用であると考えられた。

実施例 6 と実施例 7 の結果を併せ、ペプチド界面活性剤は肝毒性がなく、免疫反応を惹起しないことから生体に安全な核酸移送担体であると考えられた。

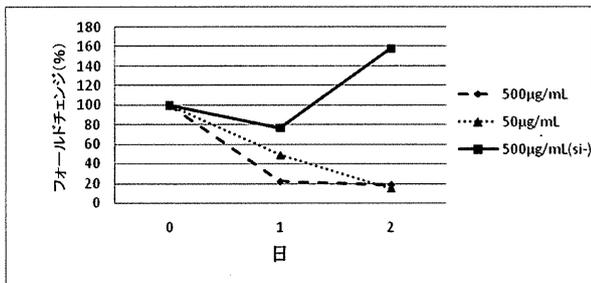
【図 1】



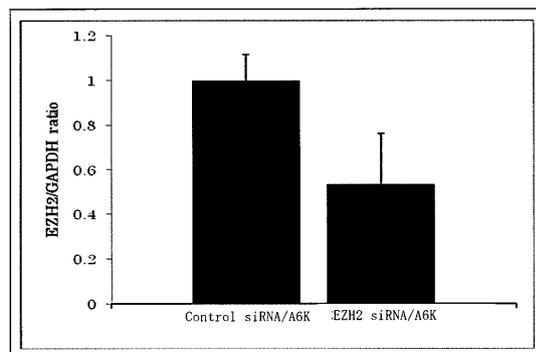
【図 3】



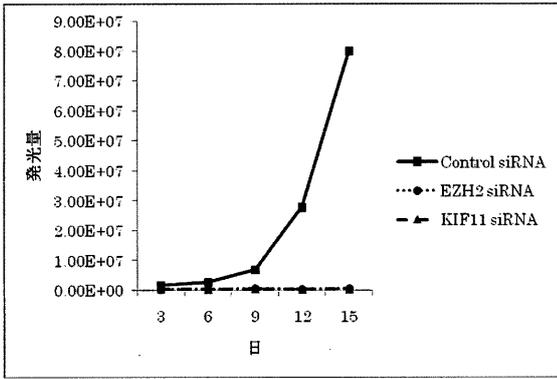
【図 2】



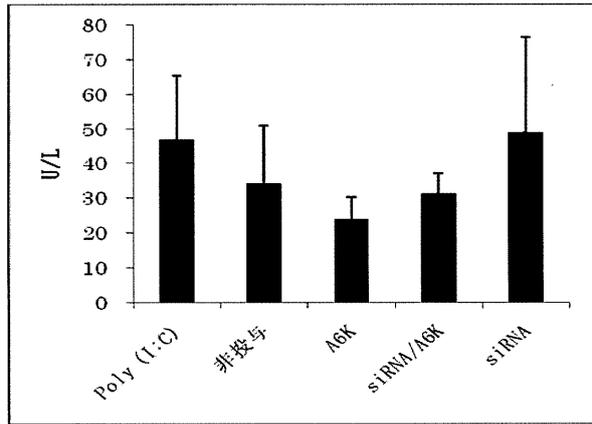
【図 4】



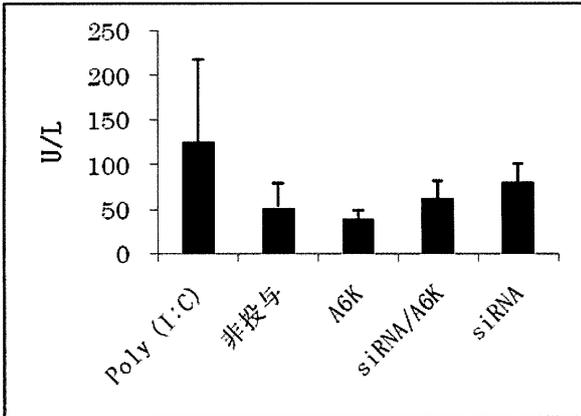
【图 5】



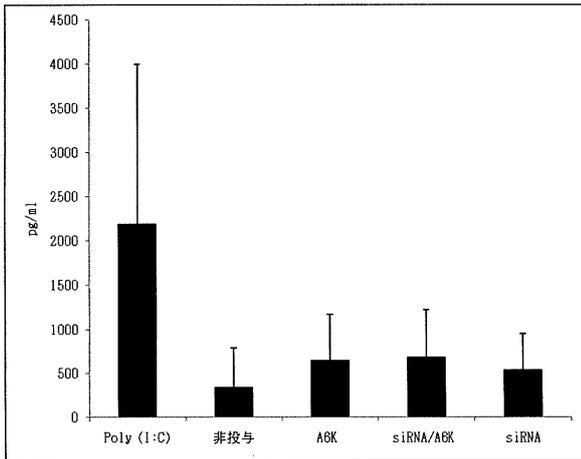
【图 7】



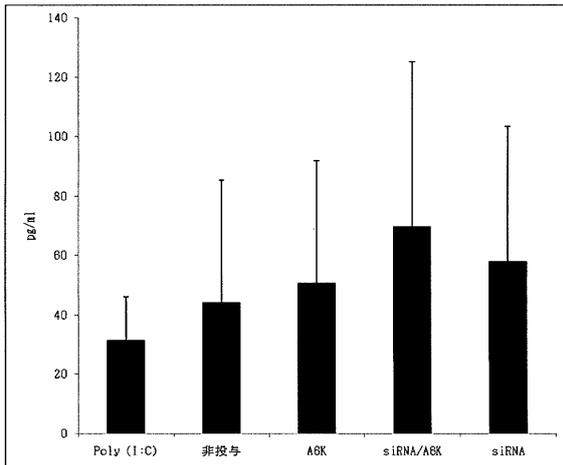
【图 6】



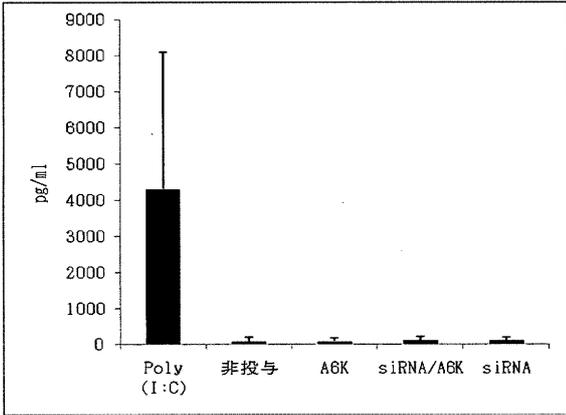
【图 8】



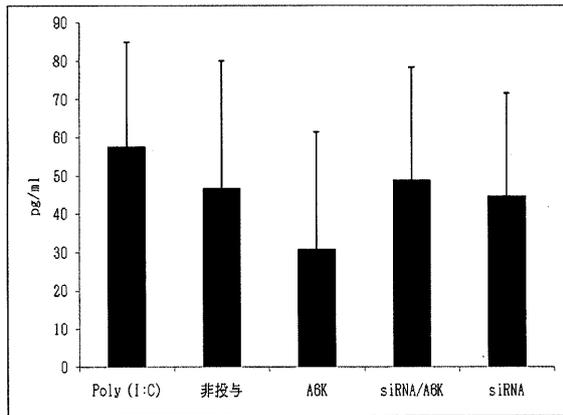
【图 9】



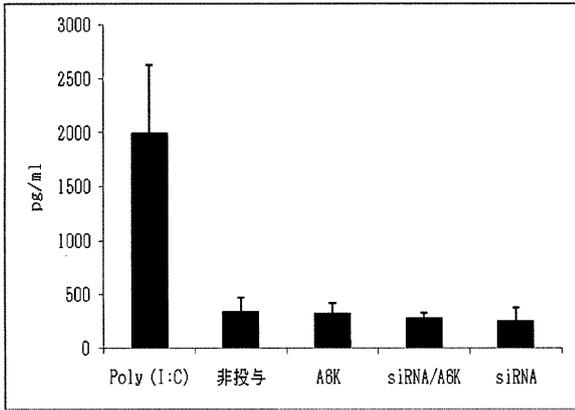
【 図 1 0 】



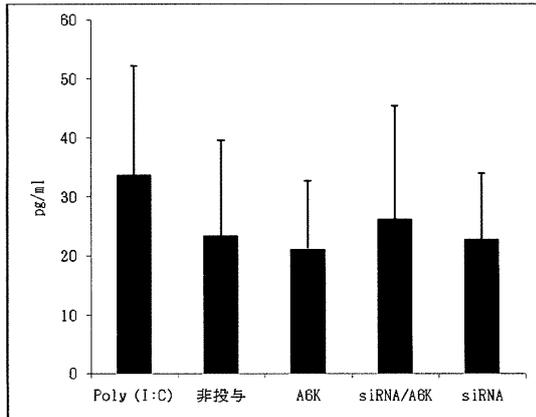
【 図 1 2 】



【 図 1 1 】



【 図 1 3 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 落谷 孝広

東京都千代田区築地5丁目1番1号 国立がんセンター築地宿舎218号

(72)発明者 竹下 文隆

東京都世田谷区大蔵二丁目11番2号

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA95 BB11 BB13 CC27 DD01N EE41N FF34 FF67 GG44

4C084 AA03 BA35 MA05 MA17 MA66 NA06 NA12 NA13 ZB262

4H045 AA10 BA14 EA20