

学 位 論 文 題 名

ENHANCED CELLULAR UPTAKE AND CONTROLLED  
INTRACELLULAR TRAFFICKING OF LIPOSOMES  
VIA MODIFICATION WITH AN OCTAARGININE  
PEPTIDE FOR DRUG AND GENE DELIVERY

(オクタアルギニン修飾リポソームによる薬物および  
遺伝子の細胞内動態制御システムの創製)

学位論文内容の要旨

Gene therapy is a promising new approach for treating a variety of genetic and acquired diseases. While viral vectors are highly efficient for gene therapy, their use is associated with high toxicity and immunogenicity. Synthetic or nonviral vectors are attractive alternatives to viral vectors because of their non-immunogenicity and low acute toxicity. Despite the high promise of nonviral vectors, their main disadvantage is the low transfection efficiency compared to viral vectors.

Several biological barriers limit the efficiency of nonviral vectors and most of the currently available vectors incorporate some functional devices to avoid some of these barriers. However, these systems remain inefficient compared to viral vectors, which have an intrinsic ability to avoid all the barriers. Then a key step for successful nonviral gene delivery is to assemble multiple functional devices into a single nano system so that each device can work at the correct place and time according to a program to avoid all the barriers. A proceeding step is to design smart functional devices to work according to a rational strategy for avoiding all the barriers.

In this study, a novel functional device, the octaarginine (R8) peptide, is presented. Decoration of liposomes with R8 dramatically enhanced their cellular uptake. In addition, by optimizing the density of the peptide as well as its topology, the liposomes could be internalized via clathrin-independent pathways, which improved the intracellular trafficking through avoiding lysosomal degradation. The R8 peptide enabled the liposomes to partially escape from the endocytic compartment and to migrate and bind to the nuclear envelope.

These results point out to the importance for optimizing the conditions of using the peptide to not only enhance the cellular uptake but also to improve the intracellular trafficking of its cargos.

A methodology based on mimicking an envelope-type virus was used to assemble multiple functional devices into a single nano-system. The DNA of interest was first condensed with a polycation for protection against degradation and the core was then covered with a lipid envelope, which can be modified by multiple functional devices for achieving maximum activities. The system was modified with the R8 peptide and was further optimized by helper lipids for improving the intracellular trafficking. As a result, this multifunctional envelope-type nano device (MEND) produced comparable transfection activities to adenovirus *in vitro* with a remarkable low cytotoxicity. The system had a relatively small diameter and could transfect the cells even in the presence of serum, which are two important prerequisites for *in vivo* gene delivery. In contrast to the commercially available transfection reagents, the *in vivo* gene delivery was successful after a single topical application of R8-MEND. In addition, the combination of R8 and the targeting ligand transferrin produced a sterically stabilized particle with exceptionally high cellular uptake. These results collectively indicate that the R8-MEND system is a highly promising, efficient and safe nonviral vector for use in gene therapy.

The results presented in this study showed that the high activity of the MEND system is attributed mainly to their improved intracellular trafficking leading to an enhanced nuclear delivery. The change of the entry route mediated by the proper use of the R8 peptide was essential for this improvement. This study pointed out to the importance of controlling the topology and optimizing the density of the functional devices to achieve maximum activities. Further improvement in the system particularly for systemic administration is expected to bring the dream of gene therapy to reality.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	教授	鈴木利治
副査	助教授	紙谷浩之
副査	助教授	松岡一郎

学位論文題名

## ENHANCED CELLULAR UPTAKE AND CONTROLLED INTRACELLULAR TRAFFICKING OF LIPOSOMES VIA MODIFICATION WITH AN OCTAARGININE PEPTIDE FOR DRUG AND GENE DELIVERY

(オクタアルギニン修飾リポソームによる薬物および  
遺伝子の細胞内動態制御システムの創製)

カ rilル・イク ラミ 修 士 の 学 位 論 文 は、オクタアルギニン (R 8) 修飾リポソームの細胞内取り込みと細胞内動態のメカニズム解明に基づく新規人工遺伝子デリバリーシステムの開発を目的とした研究に関する論文である。従来の人工遺伝子デリバリーシステム開発研究は、既存もしくは新規化合物 (主に合成高分子) とプラスミド DNA (pDNA) の単純な複合体を培養細胞に添加して得られるマーカー遺伝子発現活性を指標にして、ランダムスクリーニング的に行われてきた。多くの人工遺伝子デリバリーシステム開発研究者の興味は、最終的な遺伝子発現活性のみであり、それに至るプロセス、すなわち細胞への取り込みメカニズムや細胞内動態などは、ほとんど無視されてきた。そのため、ウイルス性遺伝子デリバリーシステムに比して、格段に低い遺伝子送達能の原因は解明されない状態であった。ところが、カ rilル 修 士 は、これまでの人工遺伝子デリバリーシステム開発研究において重要視されていなかった細胞取り込みメカニズムと細胞内動態の解明に着目し、他者と異なる視点から人工遺伝子デリバリーシステム開発に取り組んだ。既にカ rilル 修 士 は、修 士 課 程 において従来型の人工遺伝子デリバリーシステムであるポリカチオン (オクタアルギニンペプチド (R 8) 及びステアリル化 R 8 (STR-R8)) とプラスミド DNA 複合体の取り込みメカニズムと細胞内動態解析を行い、単独の R 8 ペプチド (細胞

膜透過性ペプチドとして知られている)のメカニズムとR8/pDNA複合体およびSTR-R8/pDNA複合体のものとが、全く異なることを見出し、R8ペプチドのトポロジーをコントロールすることが人工遺伝子デリバリーシステムの取り込みと、その後の動態に重要であることを発見していた。この発見は、R8ペプチドに限定されるものではなく、広く一般の人工遺伝子デリバリーシステム開発に通じるものであり、彼の研究によりメカニズム解明の重要性が示されたわけである。この発見を踏まえて、カ ril 修士は博士課程の研究主題として表面にR8ペプチドを提示することにより自由度を高めたR8修飾リボソームを構築し、その細胞取り込みメカニズムに特化して研究を行った。これまでも、R8ペプチドをはじめとする種々の細胞膜透過ペプチド単独やタンパク質に修飾したものの取り込みメカニズムに関する研究は数多く行われているが、通常よく知られているクラスリン介在性エンドサイトーシスであるとする説と、リソソームと融合しないと考えられているマクロピノサイトーシスであるとする説に分かれ、明確な答えは得られていなかった。ところが、カ ril 修士は、R8ペプチドのリボソーム表面への修飾密度の違いによって、取り込みメカニズムと細胞内動態全く異なることを見出した。すなわち、細胞表面と接触するペプチドの密度によって両説のメカニズムを取り得るのである。この発見は、彼の鋭い洞察力によるものであり、これまで議論の分かれていた問題に明快な結論を下したものである。またこの発見は、彼も述べているように、デリバリーシステムの細胞内運命を制御できる点において画期的であり、遺伝子のみならず低分子薬物をも含むDDS研究と医療への応用を飛躍的に促進させ得るものであろう。さらにカ ril 修士は、メカニズム解析研究から得られた知見を元に、従来の人工遺伝子デリバリーシステムの概念を打破する新しいタイプの遺伝子デリバリーシステムであるR8-MENDを構築し、驚くべきことにアデノウイルスと同等の遺伝子発現活性を得ることに成功している。さらに、*in vivo*への応用として、皮膚（毛孔）への適用を試み、毛髪（毛幹）への遺伝子導入に世界で始めて成功している。これらの成果は、彼のメカニズムに重点を置いた人工遺伝子デリバリーシステム開発研究が、正しかったことを物語っている。すなわち、カ ril 修士は、多くの研究者とは異なる視点（メカニズム解析）からシステム開発研究を行い、優れた人工遺伝子デリバリーシステムを創出することに成功したわけである。これらのことから、カ ril 修士は、既存のアプローチに囚われることなく独自の観点から研究を展開させ、さらに基礎研究の成果を応用研究にまで発展させ得る優れた研究能力を有していると思われ、本学位論文は博士の学位を授与するに値するものであると評価した。