博士(薬学) 畠山浩人

学位論文題名

腫瘍選択的活性化をプログラムした血中投与型多機能性ナノ構造体による腫瘍への遺伝子デリバリーシステムの構築

学位論文内容の要旨

新たな治療法として期待される遺伝子治療において、臨床例の約70%はがん治療である。また、臨床例の多くはウイルスベクターにより実施されているが、死亡例や白血病の誘発が報告され安全性の問題が指摘されている。従って、がんを標的とした高性能かつ安全性に優れた人工ベクターの開発は、がん遺伝子治療の実用化への大きなブレイクスルーとなる。

当研究室では高い活性と安全性に優れた新たな人工遺伝子ベクターとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(Multifunctional envelop-type nano device; MEND)の開発を進めている。MENDは核酸とポリカチオンの複合体をコアとして脂質二重膜によりコートされた構造を有しており、体内および細胞内でのMENDの動態を制御するための様々な機能素子を、コアやエンベロープに修飾することが可能である。

本研究では腫瘍を標的とした、in vivo血中投与型MENDの構築を目的に研究を行った。初めに血中滞留化とEPR（Enhanced permeability and retention）効果による効率的な腫瘍への移行を目的に、MENDに水溶性高分子PEGの修飾を試みた。PEGで覆われたMEND（PEG-MEND）は、血中滞留性は上昇したものの、標的細胞との相互作用が阻害され、in vitro細胞系において遺伝子発現活性が著しく減少した。つまり、PEGは必要であるが邪魔であるという、『PEGのジレンマ』ともいうべき問題が生じた。これは遺伝子や機能性核酸のベクター開発において世界中の研究者が直面している難問である。

そこで、腫瘍特異的に発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）に着目し、腫瘍MMPによって特異的に切断されるPEG脂質誘導体を開発することでPEGのジレンマの解決を試みた。

MMPにより切断されるペプチド配列をPEGとリン脂質であるDOPEに挿入したPEG-ペプチド-DOPE（PPD）を設計した。活性エステル化PEGを重合し、ペプチドN末端と結合させ、ペプチドC末端とDOPE一級アミンとを結合しPPDを合成した。

次に、MMPによって切断が確認されたPPDをMENDに修飾し（PPD-MEND）、

PEG-MEND と比較して遺伝子発現活性が改善されるか否か、in vitro 細胞系、および in vivo 担癌モデルマウスを用いて評価した。

In vitro 細胞系においては、PPD-MEND のルシフェラーゼの発現活性は PEG-MEND に比較して、MMP 依存的な上昇が観察された。またこの上昇は、細胞への取り込み量の増加やエンドソーム脱出の促進といった、PEG の切断に依存した細胞内動態の改善によることが明らかとなった。

In vivo における PPD-MEND の血中滞留性は PEG 未修飾 MEND と比較して有意に上昇していた。また、担癌モデルマウスにおいて、EPR 効果を介した腫瘍への移行が見られた。その結果、PEG-MEND と比較して腫瘍におけるルシフェラーゼ活性が上昇し、PPD-MEND は in vivo においても機能することが示唆された。

しかし、PPD は PEG 修飾ほど血中滞留性を付与することが出来ず、体内動態では PEG-MEND に劣っていた。体内動態と細胞内動態は遺伝子発現活性に直列的に影響するため、両者のバランスを最適化する必要がある。そこで、体内動態の改善を目的として、PEG と PPD を 1:1 で混合修飾した PEG/PPD-MEND による検討を行った。その結果、血中滞留性、腫瘍への移行が促進され、遺伝子発現活性も PPD-MEND より上昇することが明らかとなった。以上の検討を通して、PPD-MEND は戦略通りに PEG のジレンマ解決の機能素子として有用であるとことが示唆された。

最後に核酸医薬として大きな期待が寄せられている siRNA のデリバリーシステムとして PPD-MEND の機能評価を行った。siRNA を封入した MEND の血中滞留性をさらに向上させるために、従来、分子量 2000 であった PEG とは異なる、分子量 5000 の PEG を組み合わせ検討を行った。その結果、PPD を多く含んでいても従来の PEG-MEND と同等の血中滞留性を維持できる PPD-MEND の最適化に成功した。この PPD-MEND を血中投与すると、EPR 効果を介して効率よく腫瘍に蓄積した。また、組織切片の観察により、ほとんどのがん細胞に PPD-MEND が分布していることが明らかとなった。この PPD-MEND を投与後、腫瘍組織においてマーカー遺伝子であるルシフェラーゼの活性を評価したところ、70%以上もの高い効率でノックダウンしていた。PPD-MEND を投与しても、肝毒性やサイトカイン産生といった毒性は見られなかった。さらに、MEND 投与後の脾臓における網羅的な遺伝子発現変動をマイクロアレイで解析したところ、インターフェロンに関わる遺伝子の発現変動が、PEG 未修飾 MEND と比較して PPD-MEND で抑制していた。

以上の検討から、PPD-MEND は血中投与後 in vivo 腫瘍において効率よく機能し、また安全性にも優れたデリバリーシステムであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　原　島　秀　吉
副　査　教　授　松　田　　彰
副　査　准教授　紙　谷　浩　之
副　査　准教授　南　川　典　昭

学位論文題名

腫瘍選択的活性化をプログラムした血中投与型多機能性ナノ構造体による腫瘍への遺伝子デリバリーシステムの構築

新たな治療法として期待される遺伝子治療において、臨床例の約 70%はがん治療である。また、臨床例の多くはウイルスベクターにより実施されているが、死亡例や白血病の誘発が報告され安全性の問題が指摘されている。従って、がんを標的とした高性能かつ安全性に優れた人工ベクターの開発は、がん遺伝子治療の実用化への大きなブレイクスルーとなる。当研究室では高い活性と安全性に優れた新たな人工遺伝子ベクターとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(Multifunctional envelop-type nano device; MEND)の開発を進めている。MEND は核酸とポリカチオンの複合体をコアとして脂質二重膜によりコートされた構造を有しており、体内および細胞内での MEND の動態を制御するための様々な機能素子を、コアやエンベロープに修飾することが可能である。

本学位論文では腫瘍を標的とした、in vivo 血中投与型 MEND の構築を目的に研究を行った。初めに、血中滞留化と EPR（Enhanced permeability and retention）効果による効率的な腫瘍への移行を目的に、MEND に水溶性高分子 PEG の修飾を試みた。PEG で覆われた MEND（PEG-MEND）は、血中滞留性は上昇したが、in vitro 細胞系において遺伝子発現活性が著しく減少した。つまり、PEG は必要であるが邪魔であるという、『PEG のジレンマ』ともいうべき問題が生じた。これは遺伝子や機能性核酸のベクター開発において世界中の研究者が直面している難問である。

そこで畠山は、腫瘍特異的に発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ

（MMP）に着目し、腫瘍 MMP によって特異的に切断される PEG 脂質誘導体を開発することで PEG のジレンマの解決を試みた。MMP により切断されるペプチド配列を PEG とリン脂質である DOPE に挿入した PEG-ペプチド-DOPE（PPD）の設計と合成に成功した。

次に、MEND を PPD 修飾し（PPD-MEND）、PEG-MEND と比較して遺伝子発現活性が改善されるか否か、in vitro 細胞系、および in vivo 担癌モデルマウスを用いて検討した。In vitro 細胞系では、PPD-MEND のルシフェラーゼの発現活性は PEG-MEND に比較して、MMP 依存的に上昇した。またこの上昇は、PEG の切断に依存した細胞内動態の改善によることが明らかとなった。In vivo における PPD-MEND の血中滞留性は PEG 未修飾 MEND と比較して有意に上昇し、EPR 効果を介した腫瘍への移行が見られた。その結果、PEG-MEND と比較して腫瘍におけるルシフェラーゼ活性が上昇し、PPD-MEND は in vivo においても機能することが示唆された。

しかし、PPD は PEG 修飾ほど血中滞留性を付与することが出来ず、体内動態では PEG-MEND に劣っていた。体内動態と細胞内動態は遺伝子発現活性に直列的に影響するため、両者のバランスを最適化する必要がある。そこで、体内動態の改善を目的として、PEG と PPD を 1:1 で混合修飾した PEG/PPD-MEND による検討を行った。その結果、血中滞留性、腫瘍への移行が促進され、遺伝子発現活性も PPD-MEND より上昇することを明らかとした。

最後に核酸医薬として大きな期待が寄せられている siRNA のデリバリーシステムとして PPD-MEND が有用であるか検討した。血中滞留性のさらなる向上を目的に、異なる分子量の PEG の組み合わせを調べ、PPD を多く含んでいても従来の PEG-MEND と同等の血中滞留性を維持できる PPD-MEND の最適化に成功した。この PPD-MEND を血中投与すると、EPR 効果を介して効率よく腫瘍に蓄積し、多くの腫瘍細胞に PPD-MEND が分布していることが明らかとなった。また、腫瘍組織においてマーカー遺伝子であるルシフェラーゼの活性を、70％以上もの高い効率でノックダウンしていた。一方、PPD-MEND を投与しても、肝毒性やサイトカイン産生といった毒性は見られなかった。また、脾臓における遺伝子発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析したところ、インターフェロンに関わる遺伝子の発現変動が、PEG 未修飾 MEND と比較して PPD-MEND で抑制していた。

本研究において構築された PPD-MEND は血中投与後 in vivo 腫瘍において効率よく機能し、また安全性にも優れたデリバリーシステムであり、独創性と新規性において、学位論文に値すると判断する。