

トランスサイトosisによる血管透過型リポソームの開発

学位論文内容の要旨

【背景】

遺伝子治療は従来の低分子薬物では治療が困難な疾患に対しての新しい治療方法として着目されている。遺伝子は血中投与により体内へ輸送されるが、免疫システムによる分解からの回避、標的臓器選択的な輸送、血管から組織実質への移行などが達成すべき目標として挙げられる。これらを達成するためのDDSとしてリポソームやポリマーなどが用いられてきた。しかしナノ粒子の血中投与による実質細胞へのデリバリーを考える上で、血中から組織実質への透過が大きな障壁となる。これまでに肝臓や癌組織においては多くの報告がある。しかしこれらの臓器は特有の血管構造を有するため、高分子の通過が容易となっている。そのためこれらの組織実質へのナノ粒子の輸送は比較的容易であった。一方でその他の臓器では血管内皮細胞間の間隙が4 nm以下とナノ粒子の通過が困難な状態となっており、実質への輸送に対して血管が極めて大きなバリアとなる。

本研究では血管間隙が密な場合にもナノ粒子を血管から実質へ輸送させる技術として、トランスサイトosisにより血管を透過するシステムの構築を試みた。ナノ粒子を血中投与後、血管内皮細胞内をトランスサイトosisさせるためには、まず血流存在下で血管内皮細胞内にナノ粒子を取り込ませる必要がある。本研究ではまず、*in vitro* で培養液灌流下の細胞培養が可能な系を構築し、受容体型の取り込みと静電的作用による取り込みのどちらが細胞内取り込みに有利であるかを比較評価した。続いて *in vitro* でナノ粒子のトランスサイトosis評価が可能な細胞培養系を構築し、トランスサイトosis可能なりポソームの開発、さらにトランスサイトosis可能なりポソームの細胞内動態を評価した。

【結果と考察】

血流の影響を評価すべく、*in vitro* で灌流下細胞培養が可能な系を構築した。この評価系を用い、受容体型の細胞内取り込み様式を示すアデノウィルスと、静電的相互作用により取り込まれるカチオン性脂質と pDNA の凝縮体を添加した培養液を一定時間灌流させ、両者の細胞内取り込みが受ける血流の影響を比較評価した。血流存在下では、両粒子共、1粒子当たりの取り込み確率は1/1000程度に減少した。一方で、ナノ粒子の細胞内取り込み総量は両粒子共にせん断応力の増加に応じて上昇した。両粒子が血流により受ける影響は同程度であり、どちらのベクターも血流の影響に大きな差はないことが示唆された。さらに粒子の通過量の増加により血流の克服が可能であることが示唆され、これまでPEGを粒子に修飾することで血中滞留性が得られることが報告されているため、本課題は十分克服可能であると考え、本研究では細胞内取り込み後のトランスサイトosisに重点を置いた。

従来低分子のトランスサイトosisを評価する際、transwellを用いて *in vitro* 実験を行うが、この評価系が100 nm程度のリポソームのトランスサイトosisの評価に適応可能かを

調べた。低いリポソームの通過率と細胞の単層培養が困難であることから従来の transwell はリポソームのトランスサイトーシス評価には適応できないことが示唆され、これらの問題を同時に解決可能な新規基材であるゼラチン不織布を用いて、新たな評価系構築した。ゼラチン不織布上で細胞を培養した場合には、細胞は単層培養され、細胞間隙には tight junction が形成されていることが示唆され、リポソームの通過率に関しても十分な通過率が得られた。従って新規トランスウェルはナノ粒子のトランスサイトーシスを評価可能であることが示唆された。

構築した新規評価系を用いてリポソームのトランスサイトーシスを誘起可能なリガンドのスクリーニングを行った。当研究室で *in vivo* phage display によって得られた血管集積性の高いペプチドのいくつかを用い、ペプチドをリポソーム表面に、PEG(分子量 2,000)を介して修飾した。マウス脳血管内皮細胞におけるトランスサイトーシス能を評価した結果、LRQRRRL という配列のペプチドを用いた場合、他のペプチドを修飾した場合と比較して有意なトランスサイトーシス量が認められた。さらにこのペプチド配列に対し様々な変更を行い、元の配列と比較評価を行うことでトランスサイトーシスに必要な配列を同定した。

血管内皮細胞をトランスサイトーシス可能な LRQRRRL-PEG 修飾リポソームのトランスサイトーシスに関わる細胞内動態解析を行った。初めに取り込み経路の同定を行った結果、lipid raft 阻害剤である Filipin III 処理した場合に取り込み阻害効果が観られ、さらにトランスサイトーシスも阻害されたことから、リポソームは lipid raft を介した取り込み経路によりトランスサイトーシスされることが示唆された。さらに取り込みに関与する細胞表面分子の同定を行うべく、従来静電的相互作用による取り込みに関わる Heparansulfate Proteoglycan (HSPG) の関与を調べた。HSPG の競合物質であるヘパリンでリポソームを処理した場合、リポソームの細胞内取り込みは大きく阻害された。また従来、静電的相互作用により HSPG を介して取り込まれるカチオン性リポソームで同様の検討を行った結果、HSPG を介さず取り込まれることが示唆された。従ってトランスサイトーシスは、静電的相互作用ではなくリポソームが lipid raft の HSPG との特異的に結合することによる始まる取り込みによって起こることが示唆された。

続いて細胞内取り込み後の動態を解析した。リポソーム及び初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームをそれぞれのマーカーで蛍光標識し、細胞にリポソームを取り込ませ蛍光顕微鏡で観察した結果、リポソームはいずれの小胞とも共局在が認められなかった。従ってリポソームは細胞内取り込み後、従来の動態とは異なりエンドソーム系への移行が認められないことが示唆された。一方、非血管内皮細胞で同様の検討を行った場合、従来のナノ粒子の細胞内動態と同様にリポソームはエンドソーム、リソソームへの移行が認められた。従ってリポソームは血管内皮細胞特異的な細胞内動態を受けトランスサイトーシスされることが示唆された。

【まとめ】

灌流下細胞培養系を構築し、受容体型と静電的相互作用型の両取り込み様式の間で細胞内取り込みが血流により受ける影響は差が無いことが示唆された。リポソームのトランスサイトーシスを評価可能な新規トランスウェル細胞培養系を構築した。リポソームの血管内皮細胞透過を可能とするペプチドの同定に成功した。血管透過型リポソームが lipid raft 上の HSPG を介して血管内皮細胞内に取り込まれ、エンドソームーリソソーム系への移行を回避し、トランスサイトーシスされていることを明らかにした。

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	准教授	山本融
副査	准教授	紙谷浩之

学位論文題名

トランスサイトosisによる血管透過型リポソームの開発

遺伝子治療は従来の低分子薬物では治療が困難な疾患に対しての新しい治療方法として着目されている。遺伝子は血中投与により体内へ輸送されるが、体内には様々な防御系があり、これらを克服するための DDS としてリポソームやポリマーなどが用いられてきた。これらナノ粒子のデリバリーを考える上の大きな障壁として、血中から組織実質への透過が挙げられる。これまでに肝臓や癌組織においては成功例の報告があるが、両組織は特有の血管構造を有するため、高分子の通過が容易となっている。そのため組織実質へのナノ粒子の輸送は比較的容易であった。一方で他の臓器では血管内皮細胞間の間隙が 4 nm 以下とナノ粒子の通過が困難な状態となっており、実質への輸送に対して血管が極めて大きな障壁となる。藤原君は、本問題を解決すべく、トランスサイトosisによる血管透過システムの構築を試みてきた。

初めにナノ粒子が血管内皮細胞内をトランスサイトosisされるために、血流存在下の血管内皮へのナノ粒子の取り込みを評価した。*in vitro* で培養液灌流下の細胞培養が可能な系を構築し、受容体型取り込み様式を示すアデノウィルスと、静電的相互作用により取り込まれるカチオン性脂質と pDNA の凝縮体のどちらが細胞内取り込みに有利であるかを比較評価した。血流存在下では、両粒子共 1 粒子当たりの取り込み確率は 1/1000 程度に減少した。一方で、ナノ粒子の取り込み総量は両粒子共にせん断応力の増加に応じて上昇した。両粒子が血流により受ける影響は同程度であり、大きな差はないことが示唆された。さらに粒子の通過量の増加により血流の克服が可能であることが示唆され、これまで PEG を粒子に修飾することで血中滞留性が得られることが報告されているため、本課題は十分克服可能であると考え、細胞内取り込み後のトランスサイトosis過程の制御を行うための研究に主眼を移している。

従来低分子のトランスサイトosisを評価する際、トランスウェルという特殊な培養系を用いて *in vitro* 実験を行うが、この評価系は細胞培養とリポソーム通過率の面から 100 nm 程度のリポソームのトランスサイトosisの評価に不適であった。藤原君はこれらの問題を新規基材であるゼラチン不織布を用いることでこの問題を解決できることを見出し、新

規素材のトランスウェルチャンバーを開発した。ゼラチン不織布上では細胞は単層培養され、リボソームの通過率に関しても十分な通過率が得られるから、本トランスウェルはナノ粒子のトランスサイトシスを評価可能であることが示唆された。

本評価系を用い、リボソームのトランスサイトシスを誘起可能なリガンドのスクリーニングを行った。当研究室で得られている血管集積性の高いペプチドのいくつかを PEG を介してリボソーム表面に修飾した。脳毛細血管内皮由来細胞 (MBEC4 細胞) において、LRQRRRL 配列のペプチドを修飾した場合にトランスサイトシスが認められた。さらにこのペプチド配列に対し様々な変更を行い、元の配列と比較評価を行うことでトランスサイトシスに必要な配列を同定した。続いてトランスサイトシス可能なリボソームのトランスサイトシスに関わる細胞内動態メカニズムの解析を行った。取り込み阻害剤を用いて取り込み経路の同定を行った結果、リボソームは lipid raft を介して取り込まれ、トランスサイトシスされることが示唆された。また取り込みに関与する細胞表面分子の同定を行うべく、ヘパリンを用いた阻害剤実験を行った結果、取り込み阻害が観察されたことから、リボソームは lipid raft のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合することにより取り込まれていることが示唆された。続いて細胞内取り込み後の動態を解析した。リボソーム及び初期・後期エンドソーム、リソソームをマーカーで蛍光標識し、細胞にリボソームを取り込ませ蛍光顕微鏡で観察した結果、リボソームはいずれの小胞とも共局在が認められなかった。従ってリボソームは細胞内取り込み後、エンドソーム系への移行が認められないことが示唆された。

以上、藤原君は、またリボソームのトランスサイトシスを評価可能な細胞培養系を構築し、リボソームの血管内皮細胞透過性を可能とするペプチドの同定に成功した。さらに血管透過型リボソームが lipid raft 上の HSPG を介して血管内皮細胞内に取り込まれ、エンドソームーリソソーム系への移行を回避し、トランスサイトシスされていることを明らかにした。トランスサイトシス経路を積極的に標的化可能なペプチドはこれまで知られておらず、彼の研究は将来、組織実質細胞への輸送を行うための鍵となる技術と考えられる。本業績は博士号取得を行ううえで、十分な研究結果であると考えられる。