博　士（生命科学）　石　塚　太　一

学位論文題名

肺血管内皮細胞標的型核酸デリバリーシステムの構築

学位論文内容の要旨

【背景】

近年、従来の薬物治療法では根治が困難な疾患に対する次世代の医薬品として核酸が注目され、実用化に向けた研究が活発に行われている。核酸単独を静脈内投与した場合、血中で速やかに分解・代謝されてしまうことから、核酸を医薬品として実用化するためには、デリバリーシステムの開発が必要となる。これまでに、癌組織や肝臓など特殊な血管構造を有し、受動的な集積を可能とする組織を標的としたシステムは報告されている。しかしながら、能動的な集積を必要とする組織での報告は多くない。そこで、癌組織、肝臓以外の正常組織を標的化するためには、血管内皮細胞を標的化可能なリガンドを搭載したシステムが必要となる。一方、受動的な集積が期待できる組織においても臨床応用へ展開するためには十分な効果が得られていないのが現状であり、組織集積後の細胞内動態を制御する必要があると考えられる。以上のことより、核酸デリバリーシステムの開発を行う上で、体内動態制御と細胞内動態制御の両方の観点からの開発・改良が必須となる。

当研究室では、独自の核酸キャリアとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体(MEND)の開発に取り組んできた。MEND はポリカチオンにより凝縮化したプラスミド DNA や siRNA などの機能性核酸を脂質二重膜で封入した構造を有しており、脂質膜を介して様々な機能性素子を修飾することで、体内動態・細胞内動態の制御が可能である。そのため、この MEND に組織標的化素子を修飾することにより、能動的な組織集積、効率的な核酸の機能発現が可能になると期待される。

本研究では、能動的な集積を必要とするモデル組織として連続性毛細血管を有する肺血管内皮細胞を選択し、肺血管内皮細胞を標的とした核酸デリバリーシステムの構築を試みたので、以下に報告する。

【結果および考察】

1. IRQ ペプチドを基盤とした肺血管内皮細胞標的型遺伝子デリバリーシステムの構築

本研究では、肺血管内皮細胞に高発現しているカベオラに着目し、本エンドサイトーシス経路を認識する IRQ ペプチドを用いて、肺血管内皮細胞を標的とした遺伝子デリバリーシステムの構築を試みた。まず、IRQ ペプチドが肺血管内皮細胞を標的可能であるかを評価するために、中性脂質から構成されたリポソームに IRQ ペプチドを修飾し体内動態を評価した。また、IRQ ペプチドはリポソーム膜状に効率的に提示することを目的として水溶性高分子である PEG をスペーサーとしたペプチド脂質誘導体 (IRQ-PEG-lipid) を合成し

た。その結果、肺に高い集積を示し、IRQ ペプチドが肺血管内皮細胞標的化素子として機能していることが示唆された。次に、IRQ-PEG-lipid を MEND の脂質膜に修飾することで肺血管内皮細胞標的型遺伝子キャリア (IRQ-PEG-MEND) の構築を試みた。しかしながら、IRQ-PEG-MEND は、PEG が及ぼす細胞内動態への影響により、肺での遺伝子発現活性をほとんど示さなかった。そこで、細胞内動態の観点から、IRQ-PEG-lipid の PEG 鎖長や脂肪鎖、DNA コアの凝縮化剤であるポリカチオン、MEND の脂質組成の 1 つであるカチオン性脂質の 4 点を改良した。その結果、段階的な遺伝子発現活性の上昇が認められ、最終的に肺で高い遺伝子発現活性を獲得することに成功した。

2. GALA ペプチドの肺移行性メカニズムの解析

IRQ-PEG-MEND の体内動態解析から、これまでエンドソーム脱出促進を目的として用いられてきた GALA ペプチドに肺移行性があることが明らかとなった。そこで、本研究では、GALA ペプチドで認められた肺移行性メカニズムの解析を行った。まず、血液との相互作用を評価した結果から、GALA ペプチドによる肺移行性には凝集以外のメカニズムが関与していることが示唆された。そこで、血管内皮細胞および非血管内皮細胞に対する細胞取り込みを評価したところ、血管内皮細胞に高い特異性を有することが明らかとなり、また、血管内皮細胞間では取り込みに有意な差がないことが示された。このことから、GALA ペプチドによる肺移行性には、GALA ペプチドの血管内皮細胞標的能および静脈内投与後のファーストパス臓器・血管内皮細胞が豊富に存在する臓器という肺の特徴が関係していることが明らかとなった。また、細胞内取り込み経路や競合阻害の実験から、細胞膜上に GALA を認識する binding site が存在する可能性が示唆された。

3. GALA ペプチドを基盤とした肺血管内皮細胞標的型 siRNA デリバリーシステムの構築

本章では、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、GALA を修飾した MEND (GALA-MEND) が有用であるかを評価した。まず、体内動態および肺での局在を評価した結果から、GALA-MEND が肺血管内皮細胞に効率良く siRNA を送達していることが示された。次に、血管内皮細胞マーカーの 1 つである CD31 を標的として肺でのノックダウン効果を評価したところ、投与量依存的なノックダウンが確認され、ED50 は 0.5 mg/kg 以下と推定された。これは、血管内皮細胞を標的とし、現在臨床試験 P1 を実施中の siRNA キャリアである AtuPLEX (Silence Therapeutics 社) のノックダウン効果を凌駕する結果であり、このことからも GALA-MEND は非常に優れた siRNA キャリアであることが示唆された。

【まとめ】

1. 肺血管内皮細胞標的素子として IRQ ペプチドを見出し、細胞内動態の観点からキャリアの改良を加えた結果、段階的な遺伝子発現活性の上昇が認められ、肺で高い遺伝子発現活性を有する遺伝子デリバリーシステム構築に成功した。
2. GALA の肺移行性メカニズムを明らかにすると共に、GALA-MEND を siRNA キャリアとして応用した結果、肺で効率的なノックダウンを可能とする siRNA デリバリーシステムの構築に成功した。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　原　島　秀　吉

副　査　教　授　井　関　　健

副　査　准教授　秋　田　英　万

副　査　准教授　山　口　浩　明

学位論文題名

肺血管内皮細胞標的型核酸デリバリーシステムの構築

分子生物学の飛躍的な発展に伴い、ヒトゲノムの全貌のみならずその変異と疾患の関連が次々に明らかとなる中で、遺伝子の本体である「核酸」が次世代の医薬品として注目を浴び、臨床応用に向け活発な研究が行われている。しかし、核酸単独を静脈内投与した場合、血中で速やかに分解・代謝されやすく、分子量が大きいため細胞膜透過性も低い。そのため、核酸を医薬品として実用化するためには、核酸を標的となる細胞に送り届け、効率良く機能させるためのデリバリーシステムが必要となる。これまでに、癌組織や肝臓といった特殊な血管構造を有し受動的な集積が可能となる組織を標的としたシステムの報告は数多くなされているものの、能動的な集積を必要とする組織への報告例は少ない。よって、核酸の臨床応用範囲の拡大を目指す上でもこのような組織へのデリバリーシステムが必要不可欠となる。

石塚太一君は、能動的な集積を必要とするモデル組織として連続性毛細血管を有する肺血管内皮細胞を選択し、肺血管内皮細胞を標的とした核酸デリバリーシステムの構築を目指し研究を行った。第一章では、肺血管内皮細胞に高発現しているカベオラに着目し、本エンドサイトーシス経路を認識可能な IRQ ペプチド (IRQRRRRR) を基盤としたデリバリーシステムの構築を行った。まず、IRQ ペプチドが肺血管内皮細胞を標的可能であるかについて評価を行った。IRQ ペプチドを効率的に Liposome 表面に提示することを目的として PEG 脂質誘導体を用いて評価を行った結果、IRQ ペプチドに肺への特異性が高いことが明らかとし、本ペプチドが肺血管内皮細胞標的化素子として機能している可能性が示唆している。次に、IRQ ペプチドを多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) に修飾することで、肺血管内皮細胞標的型 MEND (IRQ-PEG-MEND) の構築を試みている。しかしながら、トポロジーコントロールを目的とした PEG が原因となり、IRQ-PEG-MEND は十分な遺伝子発現活性を示さないことが明らかとなっている。そこで、この問題を解決すべく、細胞内動態の観点から IRQ-PEG-MEND に 4 点の改良を加えた結果、段階的な遺伝子発現活性の上昇が確認され最終的に肺で非常に高い遺伝子発現活性を有する IRQ-PEG-MEND を構築することに成功している。

第二章では、IRQ ペプチドに代わる新規肺血管内皮細胞標的化素子として GALA を見出し、GALA の肺血管内皮細胞標的メカニズムの解析を行っている。まず、血液成分との相互作用を評価した結果、凝集以外のメカニズムの関与が示唆されたが、血管内皮細胞、非血管内皮細胞を用いて細胞への取り込みを評価した結果、GALA の取り込みは血管内皮細胞に特異性が高く、また血管内皮細胞間には有意な差が認められないことが示されている。以上の結果より、GALA による肺血管内皮細胞標的能は、GALA の血管内皮細胞標的能および血中投与後のファーストパス臓器・血管内皮細胞が豊富に存在する臓器という肺の特徴が関係していることを明らかとしている。さらに、細胞内動態解析や競合阻害の実験の結果、細胞膜上に GALA を認識する binding site が存在することが示唆しており、本結果は、GALA にエンドソーム脱出促進以外の機能が存在することが示したはじめての研究である。

第三章では、本 GALA 修飾粒子を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に応用している。まず、体内動態や肺での局在を評価した結果、GALA-MEND が効率良く肺血管内皮細胞に siRNA を送達できていることが示している。そこで、血管内皮細胞に発現

している CD31 を標的としてノックダウン効果を評価し結果、肺において投与量依存的な（ED50 は 0.5 mg/kg 以下）ノックダウンを見出すことに成功している。これは、血管内皮細胞を標的として現在臨床試験を実施している siRNA キャリアである AtuPLEX を凌駕する結果であり、このことからも GALA-MEND の非常に優れた siRNA キャリアであることを実証している。

以上、石塚太一君は、遺伝子、siRNA の双方で有用な肺血管内皮細胞標的型のデリバリーシステムの構築に成功しており、本研究は、遺伝子治療や核酸医薬など 21 世紀にその実現が期待されている革新的医療の実現に大きく貢献するものと確信する。よって、彼は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。