

学位論文題名

がん治療を目指した腫瘍実質細胞、および腫瘍血管内皮細胞へのsiRNAデリバリーシステムの構築

学位論文内容の要旨

現在本邦において最も多くの人を死に至らしめているのがんであり、様々な治療法の開発が進められているが、未だその根絶には至っていない。現在難治性疾患に対する新規治療分子として small interfering RNA (siRNA) が注目を集めている。siRNA は、自身と相補的な配列を有する mRNA と結合・分解することで、その遺伝子の発現を抑制することから、病態の原因となる遺伝子が明らかながんなどの疾患においては、特に有効な治療法になり得ると期待されている。しかしながら、siRNA は生体内で不安定であることからそのままの投与による腫瘍組織への移行は期待できないため、投与した部位から腫瘍細胞まで siRNA の動態を厳密に制御するシステムの開発が必要となる。この問題を解決するために当研究室では多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発を進めている。

体内を長時間滞留可能な高分子が受動的に腫瘍組織へと蓄積していく現象は enhanced permeability and retention (EPR) 効果と呼ばれる。siRNA キャリアをポリエチレングリコール (PEG) で修飾することで、血中を滞留可能になることが知られており、多くのグループがこの現象を利用して腫瘍組織へのパッシブターゲティングに取り組んでいる。通常 siRNA キャリアは細胞との高い相互作用を期待して強いカチオン性を帯びているが、PEG はこのカチオン性を覆い隠してしまうために細胞内への取り込みが大幅に低下してしまう。また、PEG 修飾は脂質膜の安定化にも寄与するために、その後のエンドソームからの脱出効率も著しく減弱してしまう。この 2 つの効果による活性の減弱は PEG 修飾を用いて腫瘍への送達を行う際には必ず解決しなければならない問題である。そこで、本研究では siRNA キャリアのエンドソーム脱出能力を向上させることで、siRNA を効率的に送達しがん治療を成し遂げることを目的とした。

初めに、pH 応答性膜融合ペプチドによるエンドソーム脱出の促進を検討した。GALA と呼ばれるオリゴペプチドは、配列内のグルタミン酸がプロトン化されることでその構造が α -helix へと変化し疎水性が高まった結果膜融合を促進することが知られている。すなわち GALA で表面を修飾した MEND は、酸性環境である後期エンドソームに移行した際に構造変化を起こした GALA が MEND とエンドソーム膜同士の融合を促進し、内封物の送達効率を向上させることが期待される。修飾による MEND の体内動態への影響を考慮し、配列の一部を削除した GALA (short GALA; shGALA) の設計も同時に行った。トランスフェクションの結果、通常 GALA と shGALA を修飾した MEND は、in vitro 培養細胞において同程度のノックダウン活性を有している一方で、静脈内投与した後の血中濃度では shGALA を修飾した MEND において 3 倍程度高い血中濃度が得られた。が明らかとなった。その際の細胞内取り込み量は同等程度であったものの、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) によ

る観察の結果、shGALAにより siRNA のエンドソーム脱出が促進されている様子が観察された。また、静脈内投与した後の血中濃度では shGALA を修飾した MEND において 3 倍程度高い血中濃度が得られた。最後に shGALA の修飾が *in vivo* 腫瘍においても有効であるかを評価するために、ヒト線維芽細胞由来 HT1080 細胞を皮下に移植することで作製した担癌マウスに siRNA 封入 shGALA 修飾 MEND を投与した。その結果、shGALA の修飾量依存的にノックダウンの向上が認められたことから、shGALA 修飾によるエンドソーム脱出の促進は *in vivo* においても有用であることが明らかとなった。

次に、pH 応答性脂質 YSK05 を用いた静脈内投与型 siRNA デリバリーシステムの構築を試みた。本カチオン性脂質は当研究室の佐藤により設計・合成されたカチオン性脂質であり、その強いエンドソーム膜との融合活性により、YSK05 を含む MEND (YSK-MEND) は *in vitro* において非常に強いノックダウン活性を示すこと、また腫瘍への局所投与によりノックダウンが可能であることも報告されている。そこで、YSK-MEND の静脈内投与による siRNA デリバリーの構築について検討を行った。本検討においては、現在有効な治療薬の開発が遅れている腎細胞がん由来の OS-RC-2 細胞をモデルとして用いている。PEG を修飾した YSK-MEND (YSK/PEG-MEND) において、4 mg/kg で OS-RC-2 移植マウスに投与することで mRNA・タンパク質の両者において RNAi を介したノックダウンが認められた。そこで、次のがん治療について検討をした。治療用 siRNA としては、がん細胞選択的なアポトーシスを引き起こすと言われている polo-like kinase 1 (*PLK1*) を用いた。しかしながら、*in vivo* においては si-*PLK1* 投与によるがん成長の抑制は認められず、現在の遺伝子の選定・siRNA デリバリーシステムを用いても、siRNA 単独によるがん治療は困難であると考え、低分子の抗がん剤との併用を試みた。OS-RC-2 細胞は、一般的な抗腫瘍薬のドキソルビシン (DOX) に耐性のがんである。複数のがん種において、*PLK1* の発現抑制下では DOX の耐性が減弱するという報告がある。本細胞においても同様の作用が起こるか評価したところ、si-*PLK1* を添加により 50% の細胞を殺す DOX 濃度 EC₅₀ が 10~30 倍程度低下することが明らかとなった。実際に *in vivo* において DOX と si-*PLK1* の同時投与を行ったところ、腫瘍の成長が抑制される傾向が認められた。

ここまでの検討において、腫瘍実質に siRNA をデリバリーすることで一定の治療効果を挙げることに成功した。更なる治療効果を得るために、腫瘍の血管内皮細胞に着目した。腫瘍は自身の成長に必要な酸素・栄養の供給のために血管新生を起こしており、その阻害はがんの成長を抑制することが知られている。そこで、腫瘍新生血管に発現している $\alpha v \beta_3$ integrin に対して強い親和性を持つ RGD ペプチドをリガンドとし、アクティブターゲティングシステムの開発に着手した。RGD で修飾した YSK-MEND (RGD-MEND) を OS-RC-2 移植担癌マウスに対して RGD-MEND を投与し、その後の腫瘍内の局在を CLSM とフローサイトメーターを用いて評価した。その結果、腫瘍の血管内皮細胞へと選択的に移行している様子が観察された。また、RGD-MEND に血管内皮細胞のマーカー遺伝子である *Cd31* に対する siRNA を封入し、静脈内投与を行ったところ投与量依存的なノックダウンが認められた。以上の結果より、血管新生に関わる遺伝子をノックダウンすることによって、血管新生の抑制を介したがん治療への応用が期待される。

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	秋田	英万
副査	准教授	市川	聡

学位論文題名

がん治療を目指した腫瘍実質細胞、および腫瘍血管内皮細胞へのsiRNAデリバリーシステムの構築

博士学位論文審査等の結果について（報告）

近年、small interference RNA (siRNA)に代表される機能性核酸は、次世代の医薬品として従来の医薬品では治療が難しい悪性腫瘍を含む難治性疾患の治療への応用に期待が高まっている。しかし、機能性核酸自体は臓器標的性や細胞透過性などが乏しく、疾患部位への局所投与を除き、全身投与では十分な効果が得られない場合が多い。従って、臨床応用には、標的組織へ効率よく機能性核酸を送達可能なドラッグデリバリーシステムの開発が必要不可欠である。本論文は、このような核酸医薬の現状において、リポソーム型核酸送達システムである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multifunctional Envelope-type Nano Device; MEND) による固形腫瘍への全身投与型 DDS の開発により、核酸医薬による癌治療を目的とした研究である。全身投与後のがん組織へ送達するには、水溶性高分子 PEG で MEND を覆い (PEG-MEND)、長時間血中で滞留させ、enhanced permeability and retention (EPR) 効果によってがん組織へ蓄積させる方法が一般的である。しかし、この PEG 修飾は MEND のがん細胞認識の減弱、エンドソーム脱出の阻害により、核酸は細胞内に有効な形で送達されず、機能が発揮できないという問題が生じる。著者はこの問題の解決と効率的ながん組織への核酸送達によって、癌治療へ応用可能な核酸送達システムの構築を試みている。

第一章では、30 残基からなる pH 応答性膜融合ペプチド GALA に着目した。細胞系の実験から GALA 修飾することで PEG-MEND のエンドソーム脱出は大きく改善され siRNA によるノックダウン活性は大きく向上した。しかし、GALA 修飾により PEG-MEND の血中滞留性は大きく低下した。そこで著者は、GALA の機能を保持したままアミノ酸数を 22 残基と短縮した short version GALA (shGALA) を考案した。shGALA 修飾した PEG-MEND は血中滞留性が損なわれることなく、EPR 効果でがん組織に蓄積し、がん細胞に取り込まれた後のエンドソーム脱出の促進によりがん組織中におけるノックダウン活性を大きく改善することに成功し、細胞内動態の改善が in vivo がん組織における活性の向上に有用であることを見出した。

第二章では、異なるアプローチとして当研究室の佐藤らによって開発された pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を組み込んだ YSK05-MEND の全身投与によるがん組織への siRNA 送達を試みた。従来のカチオン性脂質から成る MEND と異なり生理的条件化で中性を示す YSK05-MEND は血中滞留性を獲得するために必要な PEG 修飾量が低く抑えられることを見出した。また封入した核酸は脂質膜と同様の体内動態を示すこと核酸と脂質膜を ^{32}P と ^3H で二重標識することで、RNAi 効果が確実に誘起されていることを 5'RACE

法を用いることで証明した。これにより、薬剤耐性がん組織中の標的遺伝子を抑制可能な YSK05-MEND の構築に成功した。また標的遺伝子のノックダウンによりドキソルピシンへの感受性が向上し、薬剤耐性癌において Doxil の抗腫瘍効果を向上させることに成功し、本システムは siRNA のがん治療へ有用であることを示した。

一方、がん細胞自身ではなく、血管新生を阻害し栄養や酸素の供給を遮断、成長を抑制する血管新生阻害療法は大きな期待が寄せられている。しかし、消化管出血などの重篤な副作用の問題もクローズアップされており、効果の増大と副作用軽減の観点から、腫瘍血管へ特異的に薬物を送達可能なキャリア開発は重要な課題といえる。そこで第三章において著者は YSK05-MEND に腫瘍血管内皮細胞を選択的に認識するリガンド分子を搭載した標的型 YSK05-MEND の構築を試みた。がん組織の新生血管選択的な siRNA の送達と標的分子のノックダウンを可能とし、また非常に強力な抗腫瘍効果を誘起することにも成功した。

これを要するに、著者は、がん組織への効率的な機能性核酸の送達を実証し、核酸医薬の癌治療への臨床応用に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。