



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of a novel active targeting system for siRNA delivery to liver sinusoidal endothelial cell in vivo [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Akhter, Afsana
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11117号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53833
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Afsana_Akhter_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 Afsana Akhter

審査担当者	主 査	教 授	原 島 秀 吉	（薬学研究院）
	副 査	教 授	菅 原 満	（薬学研究院）
	副 査	准教授	秋 田 英 万	（薬学研究院）
	副 査	准教授	武 隈 洋	（薬学研究院）

学 位 論 文 題 名

Development of a novel active targeting system for siRNA delivery
to liver sinusoidal endothelial cell in vivo

肝臓類洞内皮細胞への siRNA 送達を目的とした
革新的な能動的標的化システムの構築

博士学位論文審査等の結果について（報告）

肝臓は多彩な機能を有する臓器である。とりわけ肝硬変に代表される肝臓の不可逆的な変質は肝不全や消化管出血などを引き起こす致死的な疾患であり、有効な治療法の確立が望まれている。肝臓は Kupffer 細胞、星細胞、そして肝臓血管類洞内皮細胞などの複数の細胞から構成される臓器である。近年、肝臓実質細胞だけではなく、その他の細胞群と有機的に関与し合うことで前述の非可逆的疾患が惹起されると報告されている。中でも、血管類洞内皮細胞は肝臓の線維化や血管の変性を介して肝硬変病態の進行の支配的な要因になっていることから、近年注目されている。こうした学術的知見を背景として、Afsana Akhter 氏は肝臓類洞内皮細胞への選択的な薬物送達を目指し、脂質二重膜から成るリポソームを肝臓血管類洞内皮細胞へと移行させるための新規標的リガンドの探索、そしてリポソーム型核酸デリバリーシステムの開発を行うことで、肝臓類洞内皮細胞を標的とした能動的標的化核酸送達システムの構築を目的とした。

初めに Afsana Akhter 氏はリガンドの同定と機能評価を行った。生体内で脂質運搬を行うアポリポタンパク質 ApoB-100 内の受容体との結合を担う RLTRKRGLK (3359-3367) 配列に着目した。上記のペプチドでリポソームを修飾するために、リポソームへのアンカー部となる脂肪酸にリンカーの役割を果たすポリエチレングリコール (PEG) が挿入し、PEG の逆側の末端に CGGRLTRKRGLK ペプチドをマレイミド結合させた RLTR-PEG 誘導体の合成を行った。また、ペプチド配列を逆向きにしたペプチド CGGKLGRKRTLRL を結合させた KLGR-PEG の合成も同時に行い、機能評価を行った。初めに、細胞への取り込み量増大効果を蛍光標識したリポソームを細胞に取り込ませることで行っている。肝実質細胞と肝臓類洞内皮細胞を用いた in vitro の実

験では、どちらの細胞においてもリガンド PEG の修飾によって有意に取り込みが増加する傾向が認められた。しかしながら、リガンド修飾リポソームを *in vivo* の健常マウスに投与した結果、肝臓実質細胞には全く集積せず肝臓類洞内皮細胞にのみ集積するという興味深い知見が得られている。また、放射性同位体でリポソームを標識し、定量的な移行量を調べた結果 RLTR-PEG よりもむしろ KLGR-PEG の修飾により高い集積が認められていた。これらの結果より、KLGR-PEG を肝臓類洞内皮細胞の新規リガンドとして見出したことを報告している。

次に、siRNA デリバリーシステムとの組み合わせについての検討を行っている。siRNA を脂質二重膜に内封した構造を有する MEND を KLGR-PEG リガンドで修飾し、内皮細胞マーカーである TIE2 遺伝子を標的として *in vivo* ノックダウン実験を行った。リガンドの修飾濃度を種々変化させてマウスに投与したところ、脂質量に対して 0.5 mol% という低濃度で修飾した際に最も高い活性が得られ、これ以上の濃度ではノックダウン効率が悪化することを見出している。また、血管内皮細胞でのノックダウン効果は他の臓器の血管内皮細胞では認められなかった。さらに、前述のリポソームを用いた結果と同様に肝臓実質細胞ではノックダウン効果は認められず、肝臓類洞内皮細胞特異的な siRNA デリバリーシステムであることが示されている。次にこの結果が細胞内取り込み過程に起因するとの作業仮説を立て、阻害剤を用いて検討を行っている。その結果、0.5 mol% のリガンドで修飾した状態では、肝臓類洞内皮細胞においてのみマクロピノサイトーシスが誘起されていることを見出した。また、興味深いことに肝臓実質細胞ではリガンド修飾リポソームを添加してもこの経路による取り込みは見られず、クラスリン介在性エンドサイトーシスによる取り込みが行われていた。以上の結果から、Afsana Akhter 氏は、リガンドの修飾により細胞内取り込み経路が変化し、標的の肝臓類洞内皮細胞のみに siRNA を送達することが可能であったと結論づけている。

以上、Afsana Akhter 氏は、肝臓類洞内皮細胞を標的化する新規リガンドの探索に成功し、また本リガンドを用いた siRNA のアクティブターゲティングシステムの構築に成功した。本論文により創製されたデリバリーシステムは、病態進行の原因遺伝子に対する siRNA と組み合わせることでこれまで治療不可能だった不可逆的疾患の新規治療法の構築に繋がりうるという点で非常に有意義な知見である。したがって Afsana Akhter 氏は、北海道大学博士(薬科学)の学位を授与される資格があるものと認める。