HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 新規pH応答性脂質を用いた肝臓標的型siRNAキャリアの開発と肝疾患治療への応用［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 佐藤, 悠介 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 甲第11416号 |
| Issue Date | 2014-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/55766 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Yusuke_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏名　佐藤　悠介

学位論文題目

# 新規 pH 応答性脂質を用いた肝臓標的型 siRNA キャリアの開発と肝疾患治療への応用

RNA 干渉（RNAi）が発見されて以降、short interference RNA（siRNA）は今日の分子生物学に欠かせないツールとなるに留まらず、低分子化合物や抗体医薬に代わる次世代医薬としての応用が期待されている。しかし、siRNA は親水性高分子であり、細胞膜を透過することができず、また、生体内では酵素的分解や腎排泄により速やかに排除される。そのため、siRNA を医薬として応用するためには優れた drug delivery system（DDS）の開発が極めて重要である。そのため、世界中で siRNA キャリアの開発研究が行われており、現在いくつかのキャリアが臨床試験に進行している。その中で米国ベンチャー企業の Alnylam pharmaceuticals 社は pH 応答性カチオン性脂質 MC3 を開発することで、肝臓において優れた遺伝子ノックダウン活性を有するリポソーム型 siRNA キャリアを構築した。現在、家族性アミロイド多発ニューロパシーや家族性高コレステロール血症に対する臨床試験を進行し、siRNA 医薬の上市に最も近い技術であると言われている。

一方、筆者が所属する薬剤分子設計学研究室では、siRNA キャリアとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）の開発研究を行っている。MEND は脂質膜で siRNA を内封した構造を有している。また、筆者は pH 応答性脂質 YSK05 を開発し、YSK05 を脂質組成に含む MEND（YSK05-MEND）が in vitro 培養細胞において既存のカチオン性脂質を含む MEND や市販のトランスフェクション試薬と比較して優れた遺伝子ノックダウン活性を有することを明らかにしている。本研究では、YSK05-MEND を基盤とした肝臓への siRNA 送達システムの開発と Hepatitis C virus（HCV）治療への応用性を検証した。さらに、強いアンメットメディカルニーズの存在するがんを標的とした siRNA 送達キャリアを構築し、がん組織特有の構造と siRNA の送達効率との関わりを明らかにすることを目的とした。

第 1 章ではまず、YSK05-MEND の脂質組成を *in vivo* 肝臓において最適化することで遺伝子ノックダウン活性の向上を試みた。最適化により、活性を 10 倍程度向上させることに成功し、最適組成 YSK05-MEND はノックダウンの $ED_{50}$ で 0.06 mg/kg を示した。また、YSK05-MEND の保存条件を検討することで調製から 2 週間程度活性を保持させることに成功した。HCV に対する siRNA（siHCV）を封入した YSK05-MEND を用い、HCV 慢性肝炎発症マウスにおける治療効果を評価したところ、siHCV 投与マウスの肝臓組織の正常

化が観察された。さらに、HCV 持続感染マウスにおける HCV 抑制効果を評価したところ、2 週間に渡って血中 HCV の 90%程度の抑制が観察された。

第 2 章では、脂質膜 p*K*a が siRNA キャリアの動態や活性に与える影響について検証を行った。その際、互いに様々な脂質膜 p*K*a を示す脂質 A シリーズおよび脂質 B シリーズを開発した。脂質 A-MEND や脂質 B-MEND はその脂質膜 p*K*a に応じて異なるノックダウン活性を示し、p*K*a 6.45 が最も高い活性を示した。更に、脂質 A は前述の MC3 と同程度の高い膜融合活性を有しており、肝臓におけるノックダウン活性も MC3 と同等であった（$ED_{50}$: 0.015 mg/kg）。また、脂質膜 p*K*a の上昇につれて、MEND の肝臓内局在が肝実質細胞から肝類洞血管内皮細胞（LSEC）へ大きく変化することが明らかとなった。また、LSEC において脂質膜 p*K*a 上昇に依存的して遺伝子ノックダウン活性が大きく上昇することが明らかとなった。また、脂質 A-MEND は LSEC 上の内皮リパーゼにより不活性化されることが示唆され、脂質 A-MEND が肝実質細胞特異的なキャリアであることが明らかとなった。一方、脂質膜 p*K*a の高い MEND は LSEC に選択性の高いキャリアであることが明らかとなった。

第 3 章では、肝臓標的型 YSK05-MEND を基盤として血中滞留化することで固形がん標的型 YSK05-MEND を構築した。様々ながん細胞をマウス皮下に移植することで作成したがんモデルにおける YSK05-MEND の遺伝子ノックダウン効率を評価したところ、宇電子ノックダウンの誘起が容易なモデルと困難なモデルが存在した。これらのがんモデルにおける各種マーカー遺伝子発現量を比較評価したところ、後者のモデルでは血管内皮細胞当たりのペリサイトの割合やコラーゲン量が多いことが示唆された。YDK05-MEND のがん組織内分布を観察した結果、特に後者のモデルにおいてヘテロな分布が観察され、がん間質の存在が YSK05-MEND の組織内浸透性を制約していることが示唆された。粒子径の小さな YSK05-MEND を構築し、同様の組織内分布を観察した結果、がん組織全体に均一的に分布しており、さらに、標的がん細胞への取り込み量の均一化や上昇が認められた。これより、ナノ粒子による siRNA のがん組織への送達において、ナノ粒子を小型化することは極めて重要であることが明らかとなった。そこで、マイクロ流路を用いた小型 YSK05-MEND の調製を試み、それに成功した。しかしながら、小型化することで肝臓における遺伝子ノックダウン活性が著しく減少することが明らかとなり、がん組織においても遺伝子ノックダウンは認められなかった。以上より、がん組織における遺伝子ノックダウンを達成する上で、キャリアのがん組織内分布の乏しさが原因であること、また、それは豊富ながん間質の存在による物理的なバリアによること、さらに、キャリアを小型化することでその分布が大幅に改善可能であることを明らかとした。一方で、小型キャリアの遺伝子ノックダウン活性は乏しいことが新たな課題として浮上した。