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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 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

	主　査	教　授	原　島　秀　吉
審査担当者	副　査	教　授	松　田　彰
	副　査	准教授	市　川　聡
	副　査	准教授	秋　田　英　万

学 位 論 文 題 名

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

Short interference RNA（siRNA）は細胞質中の RNA-induced silencing complex と複合体を形成することで、その塩基配列に相補的な messenger RNA（mRNA）を切断し、翻訳を阻害することで遺伝子発現を抑制可能な機能性核酸である。また、理論的にほぼ全ての遺伝子を標的可能であることや、分子設計・合成が迅速に行うことが可能であることなどから、近年、がん・感染症などの難治性疾患や希少疾患を対象とした siRNA 医薬の臨床試験が開始されている。siRNA は生体内においてヌクレアーゼによる分解や腎排泄により速やかに体内から排除されるため、それ単独で薬効を発揮することは非常に難しい。そのため、siRNA 医薬の実現のためには、siRNA を目的の組織、目的の細胞、さらにその細胞質中に効率的に送達可能なキャリア開発が必要不可欠であり、様々な種類のキャリア開発研究が世界中で行われている。その中で、リポソームは *in vivo* siRNA 送達に関して最も研究が進んでいるキャリアの一つである。リポソーム等のナノ粒子はエンドサイトーシス経路によって細胞に取り込まれるため、内封 siRNA を細胞質中に送達するためにはエンドソーム脱出過程が重要である。エンドソーム膜は負電荷を帯びているため、エンドソーム脱出効率の上昇を目的としてカチオン性リポソームがよく用いられている。しかし、カチオン性リポソームを血中に投与すると、血漿タンパク質と非特異的に相互作用し、細網内皮系によって血中から排除され、標的組織への移行性に乏しい。このことから、血中（pH~7.4）では中性を示す一方、エンドソーム内（pH<6.5）ではカチオン性に変化する pH 応答性リポソームは、この問題を解決する有用な戦略であると考えられている。

佐藤氏は新規 pH 応答性脂質 YSK05 を開発し、*in vitro* 培養細胞やがん組織への局所投与において、YSK05-MEND が従来のカチオン性 MEND よりも siRNA の導入効率に優れていることを実証した。さらに、YSK05-MEND の脂質組成を *in vivo* において最適化を行うために、標的遺伝子を肝実質細胞特異的遺伝子である第Ⅶ凝固因子（FVII）とし、YSK05/Chol（70/30, モル比）の組成比で最大のノックダウン活性を示すことを見出した。最適化された YSK05-MEND の ED_{50} はタンパク質レベルで 0.06 mg/kg を示し、基準組成の YSK05-MEND と比較して約 10 倍の活性上昇に成功した。また、最適化された YSK05-MEND をマウスに 1 mg/kg で静脈内投与後の遺伝子ノックダウンの持続性を評価したところ、投与から 14 日後まで有意な抑制効果が認められた。

YSK05-MEND の C 型肝炎治療薬としての有用性を評価するために、東京都医学総合研

究所・感染制御プロジェクトの小原道道法らと連携し、HCV に対する強力な siRNA 配列（siHCV）を YSK05-MEND に搭載し、C 型肝炎治療の可能性を検証した。初めに、HCV 慢性炎症発症モデルマウスにおける慢性炎症改善効果を評価した。その結果、1 mg/kg で 2 日置きに 2 回静脈内投与し、2 回目の投与から 2 日後における肝臓の病理組織像を観察したところ、非治療群では炎症細胞の浸潤が多く認められる一方、治療群ではそれがほぼ見られず、肝臓組織の正常化が認められた。さらに、ヒト肝臓キメラマウスを用いた HCV 持続感染マウスにおける HCV 抑制効果においても siHCV 投与によって血漿中 HCV ゲノム RNA 量が 14 日間に渡って 90%程度抑制することに成功した。また、YSK05-MEND の連投による肝毒性や体重減少は認められなかった。以上の結果より、YSK05-MEND の新規 HCV 治療薬としての応用可能性が示唆された。

YSK05-MEND の課題点として、Alnylam 社の MC3 と比較して活性がまだ低い点が挙げられた。また、YSK05-MEND は調製から 4 週間後にはノックダウン活性が顕著に減少し、保存安定性にも乏しい。そこで、これらの課題点を全て克服し得る新規 pH 応答性脂質の開発を行った。改良型 YSK-MEND（脂質 A-MEND）は脂質膜 pKa を 5.70 から 6.80 の範囲で様々に調節可能で、肝実質細胞におけるノックダウン活性の pKa 依存性を評価したところ、pKa 6.45 が最適な値であった。最適な pKa を有する脂質 A-MEND は、ED_{50} で 0.015 mg/kg を示し、YSK05-MEND と比較して約 4 倍強力であり、また、脂質 A の代わりに MC3 を用いた MEND と同等の高い活性を有していることも明らかとなった。さらに、脂質 A-MEND を ED_{50} の約 100 倍の投与量（1 mg/kg）で静脈内投与してから 24 時間後における肝毒性を評価したところ、毒性は観察されなかった。これらの結果から、脂質 A-MEND は、安全かつ高い効率で肝実質細胞に siRNA を送達できることが示された。

以上、本学位論文は、siRNA を静脈内投与によって肝臓、特に、実質細胞へ効率的に siRNA を送達し、遺伝子発現活性を抑制することにより、安全で有効な核酸医薬の実現に大きく貢献する Breakthrough Technology の創製に成功した。

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