HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝臓非実質細胞を標的とする細胞内動態を考慮したsiRNAキャリアの開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	鳥谷部，尚之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11848号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59252
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoyuki_Toriyabe_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（薬科学）　氏　名　　鳥谷部　尚之

学 位 論 文 題 名

肝臓非実質細胞を標的とする細胞内動態を考慮した siRNA キャリアの開発

肝臓は人体で最大の臓器であり、タンパク質や脂質合成、糖、エネルギーの代謝などの生命維持機能の他に、有害物質などの処理も行っており、生命維持には欠かすことが出来ない。また、肝臓全体の 75 % を除去しても、十数ヶ月で元の大きさにまで回復する他の臓器にはみられない程の自己回復力もある。そして、肝臓は、主に代謝や合成を行う肝臓実質細胞とその他の非実質細胞に分けて考えられている。この非実質細胞は肝類洞内皮細胞、星細胞、ピット細胞、クッパー細胞などに分類されており、老廃物や異物の除去、コラーゲン線維の産生や免疫系に大きく関わっている。

非実質細胞が構成する類洞は、血液を介した肝細胞への生体維持物質の受け渡しを行う場である。そのため、肝臓類洞内皮細胞には他の内皮細胞ではみられない 100 nm 前後の穴のあいた篩板構造（フェネストラ）を有している。肝硬変時には、このようなフェネストラがみられなくなり、さらには血管構造が破断する。肝臓の分子生物学的なサイエンスは血液学や免疫学と比べ遅れているとも言われているが、近年になり、細胞の分離や培養、遺伝学的解析技術の開発が進み、肝臓の発生、分化、再生、病態などのメカニズムが解明されている。特に、肝臓の再生には、内皮細胞と実質細胞との相互作用が重要であるという報告も為されており、肝臓の非実質細胞が注目されつつある。しかし、肝非実質細胞を標的とした肝疾患治療薬の応用例は未だ皆無である。その要因の 1 つには、肝臓非実質細胞に送達可能なキャリアの不足があげられる。

従来､肝臓を標的とするキャリアと言えば､肝実質細胞を標的とする DDS を指すことが殆どであった。肝実質細胞を標的とするキャリア設計は、肝臓類洞内皮細胞にあいたフェネストラを通過可能な 100 nm 以下の小径粒子を調製する、所謂パッシブターゲティングと呼ばれる戦略を取る例が多かった。また、リポソームがアポリポタンパク質などを介して、肝実質細胞へと取り込まれることが報告されており、特段の工夫を施すことなく、静脈内投与されたリポソームは肝実質細胞へ移行することが可能である。一方、肝類洞内皮細胞や星細胞といった非実質細胞においては、このような受動的な送達メカニズムに関する報告は無く、リガンドを介したアクティブターゲティングでの細胞標的が必要となると考えられる。

当研究室では、非ウィルスベクターである MEND（多機能性エンベロープ型ナノ構造体）の開発を進めてきた。MEND は凝縮化した核酸コアを脂質膜で封入した構造をしている。また、脂質膜に機能性素子（PEG、標的化リガンド、膜透過性ペプチド）を修飾することで、体内動態と細胞内動態の両制御を可能とした。核酸の中でも siRNA を搭載した MEND を *in vivo* で機能させる送達システムとするには、標的とする組織へ MEND を送達させる『体内動態の改善』と効率的に作用を発現する『細胞内動態の改善』が不可欠である。本研究では、MEND を用いて肝臓非実質細胞を標的可能とする siRNA キャリアの開発を行うために、下記のアプローチを行った。

第 1 章は、組織標的リガンドを介したアクティブターゲティングを可能とする薬物送達キャリアの構築を行うために、肝類洞内皮細胞に着目した。肝類洞内皮細胞は、類洞を構成する非実質細胞群内でも血管に面していることから容易にキャリアの構築が可能と考えた。肝類洞内皮細胞標的リガンドはヒアル

ロン酸に注目し、ヒアルロン酸の脂質誘導体 HA-SA を作成した。この HA-SA を修飾したリポソームを使用して、肝類洞内皮細胞に標的可能なキャリアの開発に取り組んだ。HA-SA 修飾リポソームの肝臓集積性や局在を評価した。局在では、蛍光脂質標識したリポソームをマウスへ投与し、肝臓組織表面を共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）で観察した。未修飾リポソームを投与した画像に比べ、HA-SA 修飾リポソームを投与した写真は血管構造状に集積している様子が確認された。HA-SA 修飾リポソームが肝臓血管内皮細胞のヒアルロン酸受容体で認識されていることが示唆され、今回合成を行ったヒアルロン酸脂質誘導体(HA-SA)を修飾したリポソームは肝臓への集積性を促進し、類洞内皮細胞へ集積可能なキャリアの開発に成功した（Toriyabe *et al.*, *Biol Bull Pharm*,2011）。

第 2 章は、キャリアが標的部位に到達後、細胞内で siRNA が効率的に作用させるための細胞内動態に着目した。これまで、MEND はエンドソームから脱出のリポソーム膜の脱被覆化など改良が行われてきた。そこで今回は、エンドソーム脱出後の細胞内動態に注目し、現在よりも効率の良い siRNA キャリアの開発に取り組んだ。そのため、従来 siRNA とのコア粒子作成凝縮化剤として使用されていたステアリルオクタアルギニン（STR-R8）に対し、ステアリルオクタヒスチジン（STR-H8）を設計した。ヒスチジンは等電点が 7.59 のため、酸性溶液と中性溶液で電化が変化する。siRNA コアの調製する際の溶液の pH を酸性に調製することで、siRNA が効率的にパッケージングされる一方で、siRNA コアが細胞質に放出された際には、STR-H8 の正電荷が失われ、効率的にコア粒子の崩壊が起こることを期待した。これらのコア粒子を封入した MEND（$MEND_{STR\text{-}H8\ core}$、$MEND_{STR\text{-}R8\ core}$）の活性の評価を *in vitro* で行った。活性は、$MEND_{STR\text{-}R8\ core}$ の場合、ED_{50}: 24.1 nM であったのに対し、$MEND_{STR\text{-}H8\ core}$ の場合、ED_{50}: 6.5 nM であり、約 3.7 倍向上した。CLSM を用い siRNA の細胞内での局在を評価した。$MEND_{STR\text{-}R8\ core}$ は細胞質内で siRNA が凝集体のままで観察されたのに対し、$MEND_{STR\text{-}H8\ core}$ は siRNA が“細胞質”に拡散することが、CLSM による siRNA の局在評価により明らかになった。pH 応答性の素子を入れたことにより、細胞内動態を有意に改善した。（Toriyabe *et al.*, *Biomaterials* 2013）。

第 3 章では、HSC（肝星細胞）を標的とした薬物送達キャリアの開発を行った。肝疾患の中でも肝臓の線維化は、重症化により肝硬変を経て肝がんへと移行する、有効な治療薬がない、などの点から特に新規治療法の構築が望まれている。HSC はコラーゲンの過剰な産生を介して肝線維化に寄与していると言われている。前章までに得られた知見を基に、構造内にリガンド機能と pH 応答性を有する脂質様物質を用いた。当研究室の秋田らは、酸性環境と細胞内還元的環境に応答して活性化を受ける脂質様物質 Palm の開発に成功している。さらに、本章では Palm の足場として脂溶性ビタミンであるビタミン A を骨格内に有する PalmA 脂質を用いた。HSC は体内で多くのビタミン A を貯留する細胞と呼ばれており、ビタミン A を含有する PalmA を粒子化することにより、HSC への薬物送達キャリアが創製可能であると期待される。PalmA の対照としてビタミン E、あるいはミリスチン酸を足場に持つ PalmE、PalmM を用い、3 種類の siRNA ナノ粒子化を行った。四塩化炭素の持続的投与により作成した肝線維化モデルマウスに対して、コラーゲン 1a1 に対する siRNA を含む 3 種類のナノ粒子を投与し、遺伝子抑制効果を測定した。その結果、0.5 mg/kg において PalmA においてのみ有意な抑制効果が認められた。また、HSC の培養細胞株を用いて 3 種類のナノ粒子の HSC への細胞内取り込みを評価した。その結果、PalmM、E と比較して PalmA では HSC 細胞株に、より多く取り込まれることが明らかとなった。今後、肝線維化モデルマウスを用いた治療実験への展開が期待される。

以上より、リガンドを用いた体内動態、および薬物の細胞内動態を制御可能な、肝非実質細胞への siRNA 送達キャリアの創製に成功した。