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_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（薬科学）　　氏　名　　鳥 谷 部　　尚 之

	主　査	教　授	原 島 秀 吉
審査担当者	副　査	教　授	井 関　　健
	副　査	准教授	秋 田 英 万
	副　査	講　師	小 林 正 紀

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

近年、肝疾患における非実質細胞の役割が明らかになりつつある。しかしながら、こうした知見の蓄積にも関わらず、非実質細胞に存在する分子を標的とした薬物は臨床開発に至っていない。これは、非実質細胞に薬物を送達可能なキャリアの構築が進んでいないことが一因であると考えられている。このような現状において、本論文では薬物送達キャリアに非実質細胞を認識するための標的化リガンドを結合させることで、非実質細胞への能動的ターゲティングを可能とするシステムの構築を目的としている。

著者は、初めに、血流と接しており、アクティブターゲティングが容易であると考えられる肝血管類洞内皮細胞に対する薬物送達キャリアの構築に着手している。ターゲティングするためのリガンドとしてはヒアルロン酸（HA）を用いている。従来の報告ではHAを単純な静電気相互作用によりリポソーム表面に修飾させていたが、著者はHAの脂質誘導体を用いることで、より強固にリポソーム表面に担持され得るとの仮説を立て、HAのステアリルアミン誘導体（HA-SA）の合成に着手している。HA-SAを修飾したリポソームと通常のHAを修飾したリポソームをマウスに尾静脈内投与したところ、HA-SAの修飾により肝臓への移行量が上昇していた。一方で、HAを修飾した場合には肝臓への移行量は上昇しなかった。更に顕微鏡観察により、HA-SAリポソームの肝臓内の局在を評価したところ、静脈脈内投与したHA-SAリポソームが肝血管類洞内皮細胞と共局在している様子が認められた。この検討から、リガンドの脂質誘導体化することで効率的な能動的ターゲティングが可能であることを示した。

次に、肝疾患を治療するための治療用分子として短鎖の核酸であるsiRNAを選択し、送達の効率化に関わる検討を行っている。siRNAは低分子とは異なる性質を有していることから、ドラッグデリバリーシステムが必要となる。ここで、著者は、核酸を効率よく搭載するために用いられるカチオン性物質の存在によりsiRNAの活性が妨げられていると仮説を立てている。これを克服するために、pH応答的にsiRNAを解離するシステムの構築を行っている。従来siRNAの搭載に用いられてきたアルギニン重合体に替えて、生理的条件下では正電荷を帯びないヒスチジンの重合体を設計した。その結果、ステアリル化したヒスチジンの8重合体（STR-H8）により凝縮化したsiRNAコアは、ステアリル化したアルギニンの8重合体（STR-R8）により凝縮化したsiRNAコアと比較して、pHが中性の際に効率的にコア構造が崩壊することを明らかとしている。実際に、このコアの効率的な解離がsiRNAの遺伝子抑制活性に及ぼす影響を調べた。その結果、STR-H8コアでは細胞にsiRNAキャリアを添加して早い時間からノックダウン活性が得られていることに加えて、遺伝子の発現を50%抑制するのに必要なsiRNA量がおよそ四分の一にまで低下していることが明らかとなった。これらの結果は、siRNAの解離段階がsiRNA送達において律速段階になり得ること

を示唆するものである。

最後に、著者は上記で得られた知見を基に、pH 応答性とリガンド能を一つの脂質構造体内に併せ持つキャリアの構築を行っている。ここでは標的細胞を、肝線維化に重要な役割を果たしている肝星細胞としている。肝星細胞のビタミン A を貯留する性質を利用し、著者はビタミン A を足場構造として有し、親水基が pH 応答性を持つ 3 級アミンで構成された SS-cleavable proton-activated lipid-like material (PalmA) を用いている。著者はまず、四塩化炭素の連続投与によるマウス肝線維化モデルを作製した。作製したモデルマウスに対して、siRNA を搭載した PalmA ナノ粒子を肝線維化モデルマウスに投与したところ、肝星細胞特異的マーカーの遺伝子発現抑制効果が認められた。また、肝線維化の指標であるコラーゲンタンパク質の発現抑制を、肝切片の免疫染色によって観察した結果、PalmA ナノ粒子の投与によりコラーゲン繊維が減少していた。このことから、pH 応答性とリガンド能を併せ持つ脂質構造体は体内動態・細胞内動態の制御を介して、非実質細胞に効率的に siRNA 送達可能であることが示唆された。

以上、一連の研究を通して著者は肝非実質細胞である肝類洞内皮細胞、並びに肝星細胞に対して、効率的に siRNA を導入可能なキャリアの構築に成功した。これらの成果は今後の非実質細胞を標的とした薬物療法の確立に大きく貢献できるものと考えられる。

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。