HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	GALA修飾ナノ粒子の肺血管内皮標的化メカニズム解明と核酸創剤への応用展開［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	楠本, 憲司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第6952号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59262
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kenji_Kusumoto_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　　楠本　憲司

学 位 論 文 題 名

GALA 修飾ナノ粒子の肺血管内皮標的化メカニズム解明と核酸創剤への応用展開

【背景】

肺血管内皮細胞障害は，ガン，急性肺障害，肺高血圧症など致死的な肺疾患と密接に関係することが報告されているため，肺血管内皮細胞への薬物送達はアンメットメディカルニーズ克服のための戦略となり得る．siRNA は低分子薬物と異なり，疾患の要因となる因子を特異的に制御することが可能であり，次世代医薬品として世界中で研究開発が進められている．肺などの連続性血管内皮構造を持つ臓器への静脈内投与による薬物送達は受動的な集積が望めないため，リガンドなどを利用した能動的なターゲット技術が必要となる．さらに，siRNA 送達を実現するためには，前述した体内動態制御に加え，細胞内動態制御も重要となる．

原島研究室では，核酸送達キャリアとして，多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）を開発している．これまでに，MEND の細胞内動態改善素子として，pH 変化に応答して膜融合能を発揮する GALA ペプチドを用いてきた．一方，石塚らは，GALA が肺血管内皮細胞のリガンドとしての機能を兼ね備えていることを発見した．

本研究では，GALA の肺血管内皮標的メカニズムを解明するため，GALA の標的分子同定を行った．次に，核酸創剤としての応用展開を図るために，siRNA を封入した GALA 修飾 MEND（GALA/MEND）による肺ノックダウン効果及び肺転移癌モデルマウスの治療効果を評価した．最後に，GALA/MEND の工業化の可能性を見出すため，エタノール希釈法による GALA/MEND の調製を試みた．

【結果・考察】

GALA-liposome の肺血管内皮細胞標的メカニズムの解明

これまで，GALA が持つ肺リガンド能は，肺集積性を示唆する現象を捉えるだけに留まっていため，そのターゲットメカニズムを明らかにするべく研究を進めた．まず，GALA 修飾リポソーム（GALA-LPs）をマウス尾静脈内投与した際の体内動態を評価した．コントロールとして，一般的な肺標的キャリアであるカチオン性リポソーム（Cation-LPs）も同時に評価した．その結果，Cation-LPs は一過性の肺集積性を示したのに対し，GALA-LPs の肺集積量は投与 5 分後から高い肺集積性を維持し，Cation-LPs と異なる挙動を示した．そこで，GALA-LPs はリガンドを介している可能性を考え，GALA はインフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA2）と同様に末端にシアル酸を持つ糖鎖を認識しているとの仮説を立てた．本仮説を検証するため，ヒト肺血管内皮細胞（HMVEC-L）を用いて，シアル酸糖鎖特異的に結合するレクチン存在下及び非存在下における GALA-LPs の細胞内取り込みを評価した．その結果，レクチン存在下において GALA-LPs の細胞内取り込みは抑制されたが, シアル酸による GALA-LPs の取り込み競合阻害はみられなかった．これらの結果より，GALA-LPs はインフルエンザウイルスと同様に，シアル酸糖鎖配列を認識し，細胞内に取り込まれることが示唆された．

GALA/MEND を用いた siRNA による肺疾患治療応用

これまでに明らかにしたGALAの肺血管内皮標的化機能をsiRNA送達に応用することを試みた．血管内皮細胞のマーカー遺伝子であるCD31を標的とするsiRNA（siCD31）を封入したGALA修飾MEND（GALA/MEND）をマウス尾静脈内投与した時の肺血管内皮ノックダウン効果を評価した．その結果，MEND投与時には，2 mg siRNA/kg以上の投与量で肺におけるノックダウンが観察されたのに対し，GALA/MEND投与時には0.5 mg siRNA/kgで明らかなノックダウンが観察された．しかしながら，MENDは脂質膜組成の一つにカチオン性脂質を用いているため，GALA/MENDも表面電位は正電荷を帯びている．強い正電荷を持つキャリアは血流内で凝集を引き起こすことから，GALA/MENDも凝集が懸念された．そこで，GALA/MENDがマウス肺血管内を流れる様子を生体内リアルタイム共焦点顕微鏡により直接観察した．その結果，MENDはマイクロオーダーの大きな凝集を形成して肺血管内を流れていたのに対し，GALA/MENDは凝集塊の形成なしに肺毛細血管内を流れ，時間と共に徐々に肺に集積する様子が観察された．

次に，GALA/MEND投与による癌治療への応用の可能性を検討した．進行性メラノーマの転移を抑制できることが報告されているsiCD31を封入したGALA/MEND投与によるマウスメラノーマ肺転移モデルの治療を試みた．メラノーマ細胞移植後翌日よりGALA/MEND（1.0 mg siRNA/kg）を3日置きに尾静脈内投与し，移植17日後にマウスより肺を摘出し，腫瘍の進行程度を定量化した．その結果，siCD31 siRNA投与群は，CD31のmRNA発現量がコントロール群と比較して約80%以上抑制され，それに伴い腫瘍増殖がコントロール群と比較して約50%有意に抑制されていた．これらの結果より，siRNA封入GALA/MENDは従来の肺ターゲットキャリアと異なるメカニズムを持ち，肺がん治療への応用の可能性が示された．

siRNA 封入 GALA/MEND 調製におけるエタノール希釈法の有用性

これまでの検討に用いてきたGALA/MENDは，水和法による調製を採用していたが，水和法は脂質薄膜調製時におけるフラスコ容積の制限，脂質水和時における超音波照射エネルギーの不均一性が要因となり，スケールアップが困難とされる製法である．そこで，連続製造が可能であり，工業化に有利なエタノール希釈法によるsiRNA封入GALA/MENDの調製を試みた．その結果，エタノール希釈法により得られたGALA/MENDのサイズは水和法と比較して約1.5倍の粒子（145 nm）が得られた．このGALA/MENDの肺ノックダウン効果を評価した結果，エタノール希釈法調製GALA/MENDは水和法調製時と比較してより高いノックダウン効果を持つことが示された（ED50；約0.17 mg siRNA/kg）．このことから，エタノール希釈法はGALA/MENDの大量製造及び肺送達siRNAキャリアとしての機能改善を可能とする調製方法となり得ることが示された．

【まとめ】

1) 細胞内動態改善素子であるGALAが肺血管内皮標的化能を併せ持つメカニズムとして，GALAが細胞膜表面に発現しているシアル酸糖鎖を認識することを明らかにした．
2) 優れた肺血管内皮細胞ノックダウン効果を持つGALA/MENDは，従来の肺ターゲットキャリアと異なり，血管内の凝集なしに肺をターゲットし，肺転移癌の抑制にも成功したことから，肺疾患治療への応用の可能性が示唆された．
3) GALA/MENDは工業化に有利なエタノール希釈法により調製可能なことを示した．