



Title	自然免疫応答制御を考慮した遺伝子送達システムの開発と癌治療への応用 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	富樫, 亮平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12279号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62163
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryohei_Togashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 富樫 亮平

学 位 論 文 題 名

自然免疫応答制御を考慮した遺伝子送達システムの開発と癌治療への応用

DNA や siRNA 等の核酸分子は従来の低分子化合物では不可能であった分子を治療標的として利用可能であることから、次世代の医薬品として注目を集めている。一方で、核酸分子は生体内において不安定であり容易に分解・排泄を受ける点や、その親水性高分子という物理的特性から細胞膜透過性に欠しく、機能発揮の場である細胞内のオルガネラへの導入が困難であるといった問題点を抱えている。そのため、その実用化の為に生体内での分解から核酸分子を保護しつつ標的細胞内へと送り届けるための送達システムの開発が必要不可欠となる。当研究室では優れた非ウイルスベクターの開発を目指し、独自の脂質ナノ粒子を用いた核酸送達システムである MEND (Multifunctional envelope-type nano device) の研究開発を進めてきた。本粒子は核酸分子が脂質膜により被覆された構造を有しており、生体内においても核酸を安定して保持することを可能としている。また、独自開発された pH 応答性脂質を構成成分として用いている点も重要なポイントであり、この性質により血中等の生理的 pH 環境下 (pH7.4) においては電荷を帯びず、血中成分との静電的相互作用を介した非特異的な結合の回避が可能となる。一方、細胞に取り込まれた後はエンドソーム内酸性化 (pH5-6) に伴い脂質膜が正に荷電し、負電荷を有する細胞膜との相互作用を駆動力としてエンドソームを脱出する事が可能となる。更に近年では新たな pH 応答性機能素子として ssPalm (SS-cleavable and pH-activated lipid-like material) の開発を行ってきた。これまでに疎水性部にミリスチン酸構造を含む第一世代 ssPalm である ssPalmM を用いた肝臓への遺伝子送達による持続的な外来遺伝子発現の誘導や、疎水性部にビタミン E 構造を有する第二世代 ssPalm である ssPalmE、およびその親水性部構造を改変した ssPalmE-P4-C2 を用いた肝臓への siRNA 送達による高効率な遺伝子発現抑制といった成果を報告しており、本素材が有望な in vivo 核酸送達ツールである事を示してきた。本研究ではこうした ssPalm の応用例のうち、DNA 送達に焦点を当て、ssPalm を用いた in vivo 遺伝子送達システムの更なる性能向上と、疾患治療への応用を目的としている。

肝臓標的型 DNA 搭載ナノ粒子の性能向上及び自然免疫応答の抑制をめざした改良

既に肝臓への遺伝子送達例を報告している ssPalmM 粒子を基準とし、脂質組成の改変による肝臓標的型遺伝子送達システムの更なる活性向上を目指した。疎水性部構造及び親水性部構造を改変した新規 ssPalm を用いた組成を検討した結果、ベンチマークとなる ssPalmM 粒子と比較して肝臓における遺伝子発現活性を 100 倍以上向上させる事に成功した。また、改良後の粒子は高い肝臓移行性並びに鋭敏な pH 応答性を示し、これらの変化が遺伝子発現活性の大幅な向上に寄与したと考えられた。しかしその一方で、改良型粒子は投与時に血中 ALT/AST 値の上昇やサイトカイン濃度の増加等を誘導し、炎症反応を引き起こす事も明らかとなった。また、これらの反応は DNA 未搭載粒子投与時、並びに薬剤処理によるマクロ

ファージ枯渇時には大きく抑制されたことから、DNA 搭載粒子が免疫細胞によって取り込まれ、細胞内 DNA センサー系を活性化させた結果、免疫応答が引き起こされたと考えられた。更に、抗炎症剤であるデキサメタゾンの脂質誘導体を粒子へ搭載することにより炎症反応の抑制並びに遺伝子発現活性の増強にも成功し、デキサメタゾンと DNA 搭載ナノ粒子の併用の有用性を示した。

DNA 搭載ナノ粒子による自然免疫活性化の癌治療への応用

次に、DNA 搭載ナノ粒子による免疫系活性化の癌治療への応用を試みた。癌組織は歪な血管形成や免疫抑制細胞の遊走等によって抗腫瘍免疫が抑制され、癌細胞の成長を助長する環境へと改変されている。こうした環境を抗腫瘍免疫優位な環境へと矯正する事が出来れば、宿主本来の免疫系を利用した効果的な癌治療へと繋げる事が可能となる。そこで、DNA 搭載ナノ粒子の投与による免疫系活性化と、送達遺伝子発現産物による免疫抑制解除を組み合わせた癌治療を試みた。疎水性部構造を改変した新たな ssPalm を用いることで癌組織へ DNA を効率的に送達可能な粒子を調製し、マウス乳癌由来癌細胞株 4T1 細胞を皮下移植した担癌マウスに尾静脈内投与した際の腫瘍成長抑制効果を検証した。その結果、タンパク質をコードしていない non coding DNA を送達した場合においてもある程度の腫瘍成長抑制効果が示された。また、DNA 搭載ナノ粒子の投与は発現産物の種類・有無に依らず腫瘍内 I 型 IFN 発現量の亢進に寄与する事が示された。これらの結果により、DNA 搭載ナノ粒子自体による免疫活性化を介した抗腫瘍効果が示唆された。更に、PGE2 の異化代謝酵素である 15PGDH DNA を送達した場合においてはより強力な腫瘍成長抑制効果が示され、また、腫瘍内 PGE2 量の減少傾向も観察された。PGE2 は癌細胞のアポトーシス抑制や血管新生亢進、抗腫瘍免疫抑制等に関与する因子であり、15PGDH DNA 投与群は PGE2 が代謝されることによりこれらの機能が減弱した結果、より強力な腫瘍成長抑制効果が示されたと考えられる。更に、免疫機構への影響を検証するための一つに指標として、骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC、myeloid derived suppressor cells）に着目した。MDSC は骨髄由来の未成熟な免疫細胞群の総称であり、腫瘍由来の PGE2 や GM-CSF、S100A8/A9 などによりその分化や遊走が促進され、脾臓やリンパ節、腫瘍において免疫細胞の機能抑制や腫瘍内血管新生亢進などを介して癌細胞の成長や転移に寄与する。本実験で用いたマウス乳癌由来癌細胞株 4T1 細胞は MDSC の誘導能が極めて高いことが報告されており、実際に naïve マウス及び 4T1 癌細胞皮下移植マウス（PBS 投与群）の脾臓中細胞に占める MDSC、そして抗腫瘍免疫に関わる CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより測定した結果、担癌状態のマウスでは MDSC 数の増加、及び CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞数の減少が観察された。一方、15PGDH DNA 投与群においては PBS 投与群と比較して脾臓細胞中に占める中 MDSC の割合の減少及び CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の割合の増加が観察された。以上の結果より、15PGDH DNA 搭載粒子の投与は MDSC の脾臓における免疫抑制機能の減弱にも有用であることが示された。

総括

本研究では、肝臓を標的とした遺伝子送達システムの大幅な活性向上に成功した。また、投与時の炎症反応への搭載 DNA の関与の可能性を示し、抗炎症剤の併用が炎症反応の抑制及び遺伝子発現活性向上の両面において有望な戦略である事を明らかにした。更に、癌組織を標的とした遺伝子送達により腫瘍成長の抑制、並びに免疫抑制細胞の機能抑制に成功した。