



Title	ナノ粒子の物性解析に基づいた環境感受性脂質様物質の分子設計と高次集合体化 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	田中, 浩揮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12737号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65320
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Tanaka_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 田 中 浩 揮

学 位 論 文 題 名

ナノ粒子の物性解析に基づいた環境感受性脂質様物質の分子設計と高次集合体化

近年、医薬品のカテゴリーは従来の低分子化合物からタンパク質や核酸といった生体高分子へ拡大しつつある。なかでも核酸は、機能的タンパク質の補充を目的とする遺伝子治療（pDNA・mRNA）や、細胞が有する核酸の機能調節を目的とする核酸医薬品（siRNA・miRNA・アンチセンス DNA）が、従来の医薬品では根治の難しい疾患に対する治療法として期待されている。核酸は高度に水溶性であるため膜透過性に乏しく、生体内において分解されやすいため、作用部位である細胞内へ辿り着くためには、動態を制御するための核酸キャリアを必要とする。核酸キャリアはウイルスキャリアと人工キャリアに大別されるが、現在進行中の臨床試験は、その 70%がウイルスキャリアにより占められている。これは人工キャリアと比較してウイルスキャリアの核酸導入効率が優れているためである。しかしながら一方で、レトロウイルスベクターの宿主遺伝子への組み込みを原因とする白血病のように、ウイルスキャリアは致命的な副作用を起こす懸念がある。このため、より高活性かつ安全性の高い人工遺伝子キャリアの開発が急務となっている。

従来型遺伝子キャリアは多くがカチオン性材料を主成分としてきた。これはカチオン性材料が、1. アニオン性ポリマーである核酸と容易に相互作用し数百ナノメートル程度の複合体を形成する 2. 細胞膜表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンなどと相互作用し核酸の細胞内導入効率を劇的に向上させる 3. 負電荷エンドソーム膜と相互作用し核酸の分解系からの回避を促進する、といった利点を持つためである。しかし近年、カチオン性材料との静電的な相互作用が、核酸がキャリアから放出され転写される過程と、転写により産生された mRNA が翻訳される過程を阻害し、核酸が核へ移行した後の過程に対する律速段階と成ることが明らかとなってきた。

これらの知見を踏まえ当研究室では環境感受性脂質様物質 SS-cleavable proton-activated lipid-like material (ssPalm) を開発してきた。ssPalm は膜構造の形成を担う脂溶性足場、pH 感受性を担う第三級アミン、細胞内崩壊性を担うジスルフィド結合の 3 ユニットを有する機能性分子である。第三級アミンにより形成される中性のキャリア表面は、上記に挙げた静電的な非特異的相互作用を回避可能とする一方、エンドソーム内 pH に感受して荷電することで、エンドソーム促進作用のみを有効に利用することが出来る。またジスルフィド結合は細胞内還元環境で開裂して膜構造の不安定化を起こし、核酸の積極的な放出と転写の促進を達成可能とする。これら pH 感受性脂質の機能は、遺伝子キャリアの体内・細胞内動態や核酸の送達効率により実証されてきた。しかしながら ssPalm などの pH 感受性脂質から形成されるナノ粒子の物性に関する詳細な研究は、脂質により構成されるリポソームなどに比べ乏しく、特に核酸が存在しない条件における中性粒子の物性はほとんど明らかとなっていない。

本研究の第一章では pH 感受性脂質からなるナノ粒子の物性を詳細に調べるべく、蛍光

色素を用いた物性解析を実施した。初めに ssPalm とリン脂質、コレステロールおよびポリエチレングリコール修飾脂質（PEG 脂質）を混合し Lipid-Nano-Droplet（LNDssPalm）を開発した。LNDssPalm は 30 nm 程度の粒子径を持ち中性条件下においても 192 時間以上安定であった。まず pH 感受性に着目し、粒子界面と内部の物性を調べた。粒子内部は環境に依らず常に流動的であることが明らかとなった一方、粒子界面は中性環境では疎水的な表面を形成するが、酸性化に伴い親水的かつ流動的な表面へ変化することが明らかとなった。界面及び内部の流動性から示唆される通り、LNDssPalm は酸性条件下においてのみ負電荷脂質膜との顕著な膜融合性を示した。次に ssPalm のジスルフィド結合に着目し、その開裂速度について解析した。還元を感受し蛍光波長が変化するプローブ ssPalm Pyrene（ssPalmP）を開発し、開裂反応速度を解析した結果、LNDssPalm 中のジスルフィド結合は細胞内還元剤グルタチオンにより 20 分以内に開裂されることが明らかとなった。さらに、この開裂により ssPalm の臨界ミセル形成濃度が 4 倍に上昇することが明らかとなった。上記の結果は ssPalm が薬物の『細胞質送達に適した pH 感受性』と、『細胞内薬物放出に適した崩壊性』を有することを粒子物性の観点から実証するものである。

本研究の第二章では、第一章で開発した LNDssPalm の低分子薬物技術への応用を試みた。LNDssPalm のエンドソーム脱出能と細胞内崩壊能は低分子医薬品の送達においても有用と考えられる。このためモデル薬物を搭載し担癌モデルマウスへ投与した際の体内動態について検討を行った。その結果、LNDssPalm は顕著な血中滞留性を示し、時間を経るに従って腫瘍選択的に集積することが明らかとなった。さらに LNDssPalm はその微小な粒子径から腫瘍内に広く浸透可能であることが示唆された。粒子は血中滞留性示す一方、薬物自身の血中滞留性は著しく低く、血中で漏出していることが示唆された。これは薬物の疎水性が不十分なためであり、水オクタノール分配係数の対数（cLogP）を 9 以上とすることで、薬物を粒子に保持した状態で血中を滞留させられることを明らかとした。最後にトポイソメラーゼ阻害剤を腫瘍へ送達し、副作用の低減と抗腫瘍効果を得ることに成功した。

本研究の第三章では、第一章で開発した LNDssPalm を構成要素として含む階層性構造体の開発を行った。遺伝子キャリアの更なる動態制御には、体内動態と細胞内動態を制御するための機能性素子の利用が必須である。従来型遺伝子キャリアは全ての機能性素子が同一表面に修飾される問題点を有する。本章では事前に作成したナノ粒子を複合体として組み上げる方法を用いて、階層性を持つ構造体 Nano-sized Satellite-type Organized Lipid nanoparticle Assembly（Nano-SOLA）を開発した。複合体形成にはオリゴ DNA の二本鎖形成を利用した。オリゴ DNA 修飾粒子をアニーリングさせて作成した Nano-SOLA の物性解析を行い、本複合体がオリゴ DNA の二本鎖形成を駆動力とし物理的に結合した均一な粒子集団であることを確認した。Nano-SOLA の最外部にリガンドを修飾し細胞内取り込み量を解析したところ、複合体化された複数の粒子が、単一の構造体として細胞に認識されることが明らかとなった。

以上本研究では LNDssPalm の物性解析と低分子医薬品送達への応用、ならびに階層性複合体の構築を行った。