



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	田中, 浩揮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/65321
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Tanaka_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

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。近年、従来型カチオン性遺伝子キャリアは生体内の核酸と静電的に相互作用することにより、転写や翻訳といった遺伝子の核移行後過程を阻害す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。DPH による定常状態異方性を用いて解析した結果、粒子内部は 20℃～65℃の範囲で常に流動的であることが明らかとなった。一方 Laurdan の GP 値を用いて解析した粒子界面は中性環境では水が排除された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。さらに、弱酸性領域においては GP 値が二相性を示し、疎水性界面が親水的になった後、再度疎水的に変化するという特異な性質を有することを見出した。本変化は吸熱を伴っており、現在までに報告がないことから pH 感受性脂質に特有の物性であると考えられる。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ジチオスレイトールにより 2 分以内、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 16.3 μM から 77 μM 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。単癌モデルマウスとして 4T1 乳がん細胞皮下移植モデルを使用した。LNDssPalm は顕著な血中滞留性を示し、投与初期において肺や腎臓に検出されるものの経時的に減少し、脾臓、肝臓、腫瘍に経時的に集積する様子が確認された。平均蛍光強度は腫瘍で最も大きかったことから腫瘍選択的な集積性を持つことが示唆された。さらに、腫瘍切片の顕微鏡画像を用い、ピクセル強度のばらつきを定量したところ、LNDssPalm の Coefficient of Variance 従来型リポソームに比べ小さく、腫瘍内に広く浸透可能であることが示唆された。粒子は血中滞留性を示す一方、薬物自身の血中滞留性は著しく低く、血中では一時間以内に完全に消失する様子が確認された。これは薬物の疎水性が不十分なためであり、薬物分子の構造を改変し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、薬物単剤と比較し副作用の低減とマウス大腸がん由来細胞 CT26 の皮下移植モデルに対して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、複合体化しない粒子混合物ではそれぞれの粒子が独立した挙動を示す一方で、複合体化された場合は、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 の細胞内動態制御に関する粒子物性の観点からの実証』、『LNDssPalm の腫瘍選択的な集積性と腫瘍内分布』ならびに『脂質ナノ粒子と DNA ナノテクノロジーを組み合わせた階層性構造体 Nano-SOLA の開発』を達成した。