

局所・全身投与による siRNA 治療に貢献する 組織内浸透型 DDS の開発

研究分野 薬 剤 学
紹介教授 瀬田 康生
学位申請者 茨木 ひさ子

【緒論】

近年、核酸医薬は、ペプチド・抗体医薬に続く次世代バイオ医薬品として高い注目を集めている。しかしながら、核酸を治療薬として応用するためには、速やかな酵素分解や低いバイオアベイラビリティ、さらには作用部位である細胞質まで移行することが困難といった問題があるため、これらを改善するための核酸の化学修飾技術が進展している。アンチセンス核酸に続く核酸医薬として、臨床への応用が期待されている 2 本鎖の small interfering RNA (siRNA) は、分子量が大きく棒直な構造であることから、化学修飾技術に加え、脂質ナノ粒子や高分子ミセルに代表される様々な機能性素子を組み合わせた有効かつ副作用の少ない DDS キャリアの開発も必要となる。siRNA の DDS 開発において、標的組織への移行に必要な体内動態制御、標的細胞における細胞内導入やエンドソーム脱出などの細胞内動態制御に着目した研究は数多く報告されている。しかし、近年では、標的組織内の広範囲に高濃度の siRNA を送達させるための「組織内浸透性」が、siRNA を臨床応用へと導く重要なカギとして注目され始めている。本研究では、siRNA の組織内浸透性を向上させる新規打開策として、細胞間結合のひとつである密着結合を可逆的に開口できる機能性ペプチド AT1002 を基盤とした siRNA の局所・全身投与による DDS の開発を目的とした。局所投与では、経皮投与によるアトピー性皮膚炎 (AD) 治療、全身投与では、静脈内投与によるがん治療を標的疾患とした siRNA の組織浸透可能な DDS を開発するため、AT1002 に加えて、当研究室で開発した多機能性ペプチド STR-CH2R4H2C や代表的なキャリアであるリポソームを組み合わせることで複合的に機能を備えた高度な DDS を構築した。

第 1 章 AT1002 による多機能性ペプチド / siRNA 複合体の皮内浸透性の向上とアトピー性皮膚炎に対する局所治療効果

本章では、siRNA の安定性向上と細胞内動態制御可能な多機能性ペプチド STR-CH2R4H2C と、AT1002 による siRNA 組織内浸透ツールとしての有用性評価を目的とし、siRNA / STR-CH2R4H2C 複合体と AT1002 を組み合わせて経皮投与した際のマウス皮膚における皮内浸透性について検討を行った。その結果、siRNA / STR-CH2R4H2C 複合体は AT1002 の併用によって、テープストリップマウス皮膚ならびに AD マウス耳介への顕著に高い皮内浸透性を示した。次に、NF- κ B サブ

ユニットである RelA に対する siRNA (siRelA) の経皮投与による AD 発症耳介に対する治療効果について評価した。その結果、siRNA / STR-CH2R4H2C 複合体は AT1002 の併用により、AD 症状の改善ならびに耳介組織中の炎症性サイトカイン産生を著しく抑制した。よって第 1 章より、AT1002 と STR-CH2R4H2C は、siRNA の皮内浸透性を向上させ、siRNA による局所治療効果を高める有用な DDS ツールとなることが明らかとなった。

第 2 章 組織内浸透性に優れる siRNA 内封リポソームの開発とその皮内浸透性ならびにアトピー性皮膚炎に対する局所治療効果

本章では組織内浸透性に優れた siRNA キャリアの開発を目的とし、経皮投与による皮内浸透性を向上させるリポソームの脂質組成について、表面電荷と柔軟性に焦点を当て探索した。DOPC / Cholesterol をベースとした正電荷、中性電荷、負電荷リポソームと、構造の異なる DOPE / CHEMS リポソーム

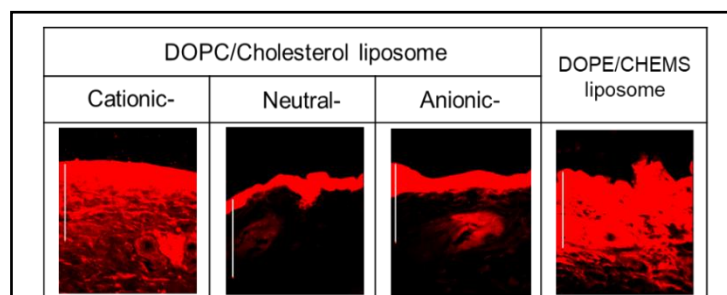


Fig. 1 テープストリップマウスにおける蛍光標識リポソームの皮内浸透性評価 ATTO647 標識脂質含有 DOPC / Cholesterol リポソームならびに DOPE / CHEMS リポソーム溶液 (1 μ mol) をテープストリップマウス腹部に塗布し、10 時間後の皮内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。スケールバー: 100 μ m、倍率: \times 600.

ム (負電荷) の 4 種を薄膜法により調製した。はじめに、調製したリポソームの柔軟性を評価した結果、DOPC / Cholesterol リポソームでは、表面電荷の差異は柔軟性に影響しなかった。一方で、DOPE / CHEMS リポソームは DOPC / Cholesterol リポソームに比較して膜透過時間が有意に速かったことから、高い柔軟性が示唆された。次に、テープストリップマウスならびにヒト 3 次元培養表皮モデルにおける皮内浸透性を評価した。その結果、DOPC / Cholesterol リポソームにおいては、正電荷が最も高く、次いで負電荷、中性電荷となった。また柔軟性の高い DOPE / CHEMS リポソームは、正電荷 DOPC / Cholesterol リポソームと同等の結果を示した (Fig.1)。さらに、免疫細胞への細胞毒性と皮膚刺激性を検討したところ、正電荷リポソームにおいてのみ、細

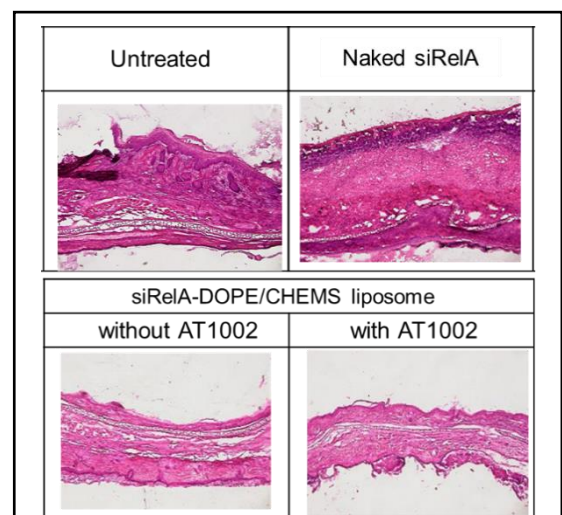
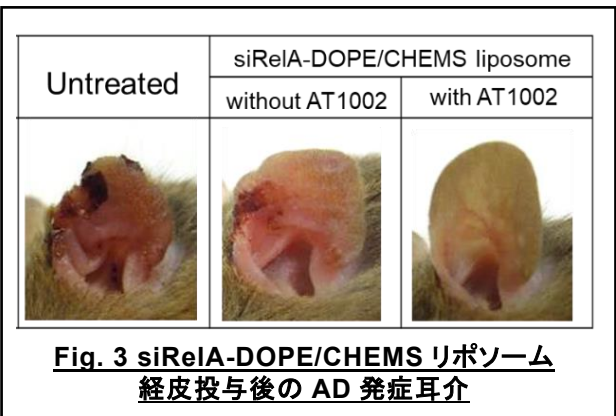


Fig. 2 経皮投与後の組織学的検討 siRelA を経皮投与し、15 日目における耳介の肥厚 (H & E 染色) を光学顕微鏡により観察した。倍率: \times 10

胞毒性と皮膚刺激性が示された。よって、柔軟性を有し、細胞毒性のない DOPE / CHEMS リポソームを皮内浸透型 siRNA キャリアとした。続いて、SUV fusion 法により siRNA を内封させた DOPE / CHEMS リポソーム (siRNA-DOPE / CHEMS リポソーム) を調製し、その経皮投与型 siRNA キャリアとしての有用性について検討した。その結果、siRNA-DOPE / CHEMS リポソームは、免疫細胞への細胞毒性と皮膚刺激性を示すことなく、免疫細胞内への高い siRNA 導入効率を示した。また、siRNA-DOPE / CHEMS リポソームは、テープストリップならびに AD モデルマウス皮膚において高い皮内浸透性を示した。さらに、siRNA-DOPE / CHEMS リポソームに、AT1002 を併用することで、皮内浸透性は向上した。最後に、AD 治療効果を評価した結果、siRelA-DOPE / CHEMS リポソームに AT1002 を組み合わせることで、AD 発症部位である耳介中の RelA 発現を抑制し、炎症性サイトカインの産生、肥満細胞の浸潤、耳介の肥厚、臨床スコアといった AD 症状を顕著に改善した (Fig. 2,3)。よって第 2 章より、柔軟性を有する負電荷の DOPE / CHEMS リポソームは、局所投与における siRNA の皮内浸透性に優れた DDS キャリアであり、AT1002 と併用することでさらに向上することが明らかとなった。



第 3 章 AT1002 修飾 siRNA 内封組織内浸透型リポソームの開発と全身投与によるがん治療への応用

本章では、組織浸透型 siRNA 内封リポソームの全身投与によるがん治療への応用を目的として、AT1002 を PEG-リポソーム表面に修飾し一体型とした AT1002 修飾 siRNA 内封 PEG-リポソーム (AT1002 / PEG-リポソーム) を開発した。AT1002 / PEG-リポソームは、SUV fusion 法により得られた siRNA 内封 PEG-リポソームに AT1002 をポストインサクションすることで作製した。AT1002 / PEG-リポソームは、高い siRNA 内封率を示し、全身投与による EPR 効果が期待できる粒子径と表面電位を示した。次に、A549 細胞から作製したスフェロイド培養系における AT1002 / PEG-リポソームの siRNA 浸透性に及ぼす AT1002 と PEG の修飾率の影響を検討した結果、siRNA 浸透性は AT1002 の修飾率の増大に伴い向上し、PEG 修飾率の増大に伴い低下した。さらに、PEG と AT1002 の修飾率を最適化した AT1002 / PEG-リポソームの siRNA 浸透性について検討した結果、スフェロイド内深部 (80 μm) の広範囲に siRNA の強い蛍光が観察された。このとき、

Naked siRNA や AT1002 未修飾の PEG-リポソームはスフェロイド表層に siRNA の蛍光がわずかに観察されるのみであった (Fig. 4)。A549 細胞担がんマウスにおける AT1002 / PEG-リポソームの静脈内投与後の蛍光標識 siRNA 腫瘍集積性を *in vivo* イメージング装置で観察した結果、PEG-リポソームと比較して高い腫瘍への集積を示した。このとき、腫瘍深部領域の組織切片を観察したところ、腫瘍組織の広範囲に siRNA の蛍光が観察された。最後に、polo-like kinase 1 (PLK-1) に対する siRNA を内封した AT1002 / PEG-リポソームを静脈内投与した結果、腫瘍の増大を顕著に抑制した。以上より、AT1002 / PEG-リポソームは、全身投与によって腫瘍組織に集積後、腫瘍組織の広範囲に浸透することで優れた治療効果を発揮する有用な siRNA キャリアとなることが明らかとなった。

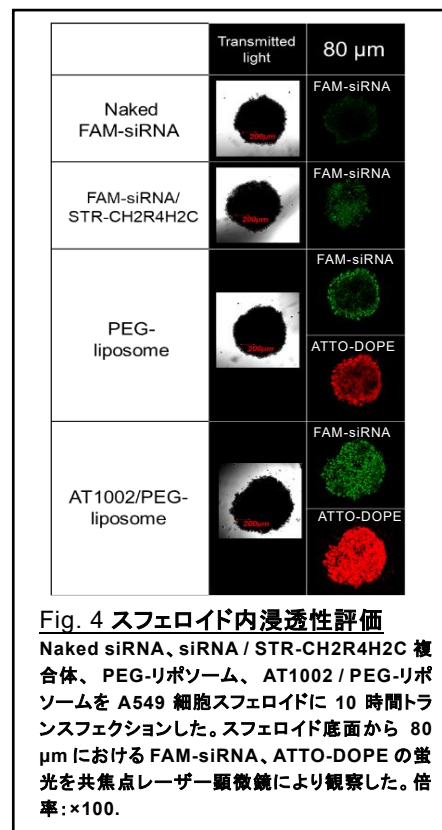


Fig. 4 スフェロイド内浸透性評価
Naked siRNA, siRNA / STR-CH2R4H2C 複合体、PEG-リポソーム、AT1002 / PEG-リポソームを A549 細胞スフェロイドに 10 時間トランスフェクションした。スフェロイド底面から 80 μm における FAM-siRNA、ATTO-DOPE の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。倍率: ×100.

【総括】

本研究では、組織内浸透性という新たな概念に基づいて、siRNA の局所・全身投与に有効な組織内浸透型 DDS の開発に成功した。タイトジャンクション開口ペプチド AT1002 に、多機能性ペプチド STR-CH2R4H2C や組織内浸透性の高い柔軟な構造を持つ DOPE / CHEMS リポソームを組み合わせることで、局所投与だけでなく全身投与においても siRNA の標的組織内浸透性が大きく向上し、それに伴い siRNA による疾患治療効果を著しく高めることを明らかとした。現在のところ、siRNA による皮膚疾患治療ならびにがん治療の報告は少なく、組織内浸透性に着目した本研究による新たな知見は、難治性疾患に対する siRNA の臨床応用に繋がる重要な手がかりを提供するものと考えている。今後は、本研究で得られた組織内浸透型 DDS を基盤として、現在有効な DDS が確立されていない siRNA 医薬に応用していきたい。

【研究成果の掲載誌】

- 1) *Molecules*. **21**, E1279. (2016), 2) *International Journal of Pharmaceutics*. **542**, 213-220 (2018), 3) *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **50**, 155-162 (2019), 4) *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **42**, 1216-1225 (2019)