

氏名（本籍）	いばらき ひさこ 茨木 ひさ子（山形県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 362 号
学位授与の日付	令和元年 7 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 瀬田 康生 教授 根岸 洋一 教授 井上 勝央 教授 野口 雅久

論文内容の要旨

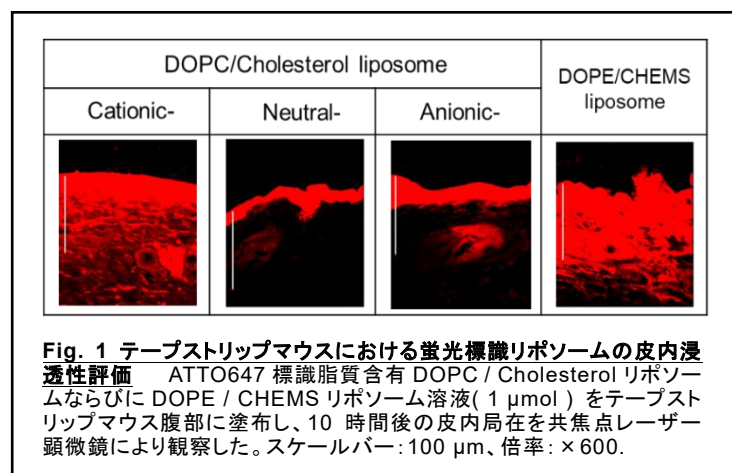
近年、核酸医薬は、ペプチド・抗体医薬に続く次世代バイオ医薬品として高い注目を集めている。しかしながら、核酸を治療薬として応用するためには、速やかな酵素分解や低いバイオアベイラビリティ、さらには作用部位である細胞質まで移行することが困難といった問題があるため、これらを改善するための核酸の化学修飾技術が進展している。アンチセンス核酸に続く核酸医薬として、臨床への応用が期待されている 2 本鎖の **small interfering RNA**（**siRNA**）は、分子量が大きく棒直な構造であることから、化学修飾技術に加え、脂質ナノ粒子や高分子ミセルに代表される様々な機能性素子を組み合わせた有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 (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。

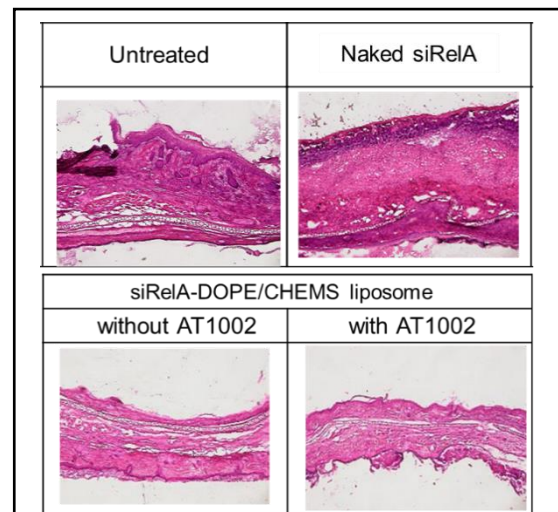
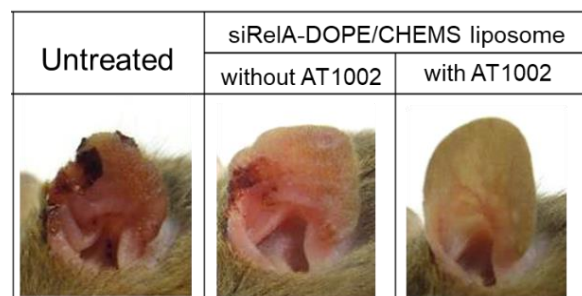


Fig. 2 経皮投与後の組織学的検討

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: ×10



**Fig. 3 siRelA-DOPE/CHEMS リポソーム
経皮投与後の AD 発症耳介**

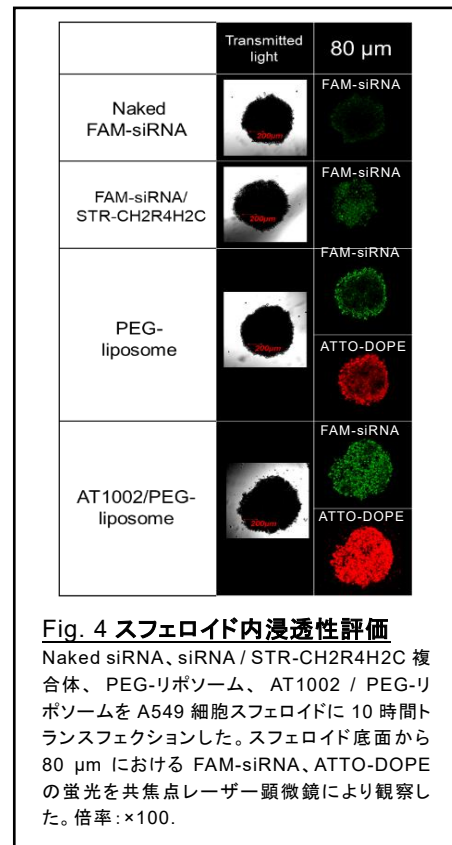
第 3 章 AT1002 修飾 siRNA 内封組織内浸透型リポソームの開発と全身投与によるがん治療への応用

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。

【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)

論文審査の結果の要旨

茨木ひさ子氏の博士学位申請論文は、核酸医薬である 2 本鎖の small interfering RNA (siRNA) を治療薬として応用するための薬物送達システム (DDS) 開発に関するものである。核酸医薬には、速やかな酵素による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。これらを改善するため、脂質ナノ粒子や高分子ミセルに代表される様々な DDS キャリアの開発が行われている。近年では、標的組織内の広範囲に高濃度の核酸を送達させるための「組織内浸透性」が注目されている。本論文では、細胞間結合のひとつである密着結合 (TJ) を可逆的に開口できる機能性ペプチド AT1002 と柔軟な膜を持つリポソームを用いることで組織内浸透性を向上させた局所・全身投与型の siRNA DDS の開発を 3 章に分けて論じている。

第 1 章では、核酸の安定性向上と細胞内動態制御のために機能性ペプチド STR-CH2R4H2C と TJ 開口ペプチド AT1002 との 2 つのペプチドを併用して経皮投与した際の皮内浸透性とアトピー性皮膚炎 (AD) 治療効果について論じている。siRNA/STR-CH2R4H2C 複合体と AT1002 を併用させて塗布した結果、AD マウス耳介への顕著に高い皮内浸透性と有意な AD 症状の改善を確認している。

第 2 章では、DDS キャリアとしてのリポソームの表面電荷と膜の柔軟性が経皮投与による組織浸透性に与える影響を検討した。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、柔軟な膜構造を持つ DOPE/CHEMS リポソーム (負電荷) の 4 種のリポソームを調製した。さらに、各リポソームに siRNA を内封させ、AT1002 を併用した際の AD 治療効果を検討した。表面電荷に関しては正電荷が最も浸透性が高く、次いで負電荷、中性電荷であった。DOPE/CHEMS リポソームは正電荷リポソームと同等の高い浸透性を示した。安全性の観点から負電荷でかつ柔軟性を有する DOPE/CHEMS リポソームを選択した。siRNA を STR-CH2R4H2C との複合体として内封した DOPE/CHEMS リポソーム (siRNA-DOPE/CHEMS リポソーム) を調製し、AT1002 を併用した際には、その皮内浸透性と AD 治療効果はさらに向上した。

第 3 章では、体内動態を考慮して AT1002 をリポソーム表面に修飾させて一体型とした AT1002 修飾 siRNA 内封リポソームの検討をした。さらに、がん治療を目指して、A549 細胞スフェロイドにおけるスフェロイド浸透性、A549 細胞担がんマウスにおける腫瘍集積性と腫瘍内分布を観察している。AT1002 修飾 siRNA 内封リポソームの高い腫瘍集積性と腫瘍内への広範囲な siRNA 分布が観察され、腫瘍内浸透性向上が示された。

以上、本論文では、AT1002 ペプチドと DOPE/CHEMS リポソームを組み合わせることで、局所投与ならび全身投与いずれにおいても優れた核酸の組織浸透性向上が示されている。さらに組織浸透性の向上により、効率的な核酸治療が実現できることが示唆された。これらの結果から、組織浸透性をはじめとして、体内動態・細胞内動態をも改善できる核酸治療に向けた多機能性 DDS キャリアを構築できた。本申請論文は組織浸透性とリポソーム膜の柔軟性という新たなアプローチによる核酸治療に繋がる重要な手がかりを提供するものと高く評価できる。したがって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として相応しいものと判断する。