細胞内環境応答性材料(ssPalm)が拓くマルチ創剤基盤: 遺伝子 / 核酸デリバリーを中心として

北海道大学大学院 薬学研究院*

田中浩揮*・秋田英万*

Multi-nanoDDS platform based on the intracellular environment-responsive material (ssPalm): Delivery of gene/nucleic acid delivery

Development of the nanotechnologies to control an intracellular trafficking, and release of the cargos are required to open a new-generation of therapeutics using genes or nucleic acids. Quantitative analysis of the intracellular trafficking of lipoplex with adenovirus revealed that the poor post-nuclear delivery events, as well as nuclear delivery process (i.e. transcription and translation) are key processes to be overcome in the conventional cationic carriers. Especially, less effective transcription and translation is most likely due to the poor nuclear decondensation and association between mRNA and cationic carrier, respectively via electrostatic interaction. Also, when the cationic particle was administered intravenously, they formed large aggregates, and then stacked in the lung capillary. Also, *in vivo* gene expression was peaked at 6 h after the transfection, and then rapidly decreased within 2 days. To overcome these drawback, we recently developed a SS-cleavable and pH-activated lipid-like material (ssPalm) to prepare a neutral nanoparticle, that can be charged positive in acidic environment in endosome, and be collapsed in response to the reductive environment in cytoplasm. Since the vitamins have unique physicochemical properties, transport system and physiological function, we employed vitamin A and vitamin E as a hydrophobic scaffold to functionalize the ssPalm particle. When the particle was taken up by endocytosis, the vesicles were transferred to the lysosomal degradation pathway. In this process, endosomal pH gradually decreased. Thus, we design a particle that can detect a slight change of endosomal acidification, and then charged positive for the rapid endosomal escape at earlier stage. Based on this concept, we modified the amine structure so as to allow it to receive protons readily. The particle is a novel nanoDDS platform that can deliver genes, nucleic acids and low-molecular compounds. In this manuscript, we focused on the application of the ssPalm particle as a carrier of DNA and siRNA.

遺伝子・核酸治療用ベクターの開発を考えるうえでは、細胞内における動態やベクターからの解離性を制御することが重要である。筆者らは、エンドソーム内の pH 環境に応じて正に帯電し、さらに細胞質内の還元環境に応じて崩壊する粒子を形成するための脂質様材料として、SS-cleavable and pH-activated lipid-like material(ssPalm)を開発した。本粒子の最大の特徴は、電荷的に中性であるという点にある。本分子の脂溶性足場として各種の脂溶性ビタミン(ビタミン A やビタミン E)を採用し、さらに第三級アミンの分子チューニングを施すことにより、遺伝子や核酸、低分子等さまざまな用途に利用できるナノ DDS プラットフォームへと展開できることが明らかとなってきた。本稿では、遺伝子・核酸デリバリーシステムへの応用例を中心として紹介したい。

Hiroki Tanaka*, Hidetaka Akita*

Keywords: DNA, siRNA, intracellular trafficking, ssPalm, nanoparticle

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

1. はじめに

分子生物学やバイオテクノロジー、さらには、オミクス解析技術の進歩にともない、患者個々に最適な治療法を選択して治療する『個別化医療 (personalized medicine)』の概念が急速に広がりつつある。がんにおける固有の遺伝的情報に基づいたワクチン等は、個別化医療を推進するための技術としてあげられよう。さらに、特定の遺伝子を標的細胞に移入する遺伝子治療や、特定の遺伝子の発現を抑制する核酸治療 (アンチセンス核酸や short interference RNA : siRNA、microRNA : miRNA 等) も、個別化医療を実現するための有力な技術となる。

これらの遺伝子や核酸を医療に応用するためには、核酸分子を目的とする臓器の細胞質まで効率的にデリバリーするための戦略が必要となる (図1)。特に、細胞内動態の観点からは、エンドソーム脱出や細胞質における内封分子の放出過程が、遺伝子や核酸デリバリーの効率を決定づける共通の律速

段階となり得る。これらのデリバリー技術に関しては、世界中で熾烈な競争が繰り広げられてきた。例えば、Arbutus Biopharma社 (前身は Tekmira Pharmaceuticals 社) が独自に開発している脂質型ナノ粒子 stable nucleic acid-lipid particles (SNALP)¹⁾ や、Alnylam Pharmaceuticals と Massachusetts Institute of Technology (MIT) が共同開発した lipopeptide²⁾ 等が代表例としてあげられる。一方、遺伝子治療においては、永年にわたりその有用性が期待されていたものの、臨床開発の成功例は皆無であった。しかし、2012年、欧州医薬品庁 (European Medicinal Agency : EMA) は、先進国で初となる遺伝子治療薬として Glybera[®] を承認した³⁾。本薬はウイルスベクターを基に開発したものであるが、この歴史的な出来事は科学コミュニティーに再度、遺伝子治療の重要性を認識させるきっかけをあたえるものとなろう。

このような時代背景のなかで、筆者らは『国産』の DDS 材料として、独自の脂質様材料 (SS-cleavable

図1 遺伝子・核酸デリバリーを開発するうえで乗り越えるべき生体膜バリア

and pH-activated lipid-like materials : ssPalm)を開発した。本分子は、もともとは遺伝子デリバリー用の技術として開発を進めてきたものである。近年、本材料に分子チューニングを施すことで、siRNAデリバリー技術へと展開することに成功している。本稿では、これらの開発の経緯や今後の展開について述べさせていただく。

一方、これらナノ医薬の実用化を促進するためには、システムの開発だけでなく、レギュラトリーサイエンス研究も同時に進める必要がある。2014年の日本DDS学会機関誌(7月号)に、紹介されているように⁴⁾、ナノ医薬品における評価基準の策定は国際的にも重要視されている。平成24年度(2012年度)より開始された、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業において、北海道大学が中心機関となり「がん、ナノテクノロジー」分野でレギュラトリーサイエンス研究を開始している。筆者も脂質ナノ粒子グループの一員として、評価系の確立を行うとともに、レギュラトリーサイエンス研究の議論に参加させていただいている。本プロジェクトでは、その成果の1つとして「リポソーム製剤の化学、製造、および品質管理に関する素案」を作成し、ホームページで公開した。粒度分布や表面電位、封入率、放出特性等は、リポソーム製剤やミセル製剤を含むさまざまなナノ医薬品でも評価される共通項目である一方で、脂質の流動性等に関しては、リポソーム特有の評価項目となろう。本稿では、簡単ではあるが、リポソーム製剤等で用いることが可能な、物理化学的特性の蛍光を用いた評価法についても ssPalm 粒子を例に紹介したい。

2. 細胞内動態と体内動態の観点からの従来ベクターの課題点

1987年に Felgner らによって遺伝子導入に関する報告がはじめてなされてから今日にいたるまで、多くの種類のカチオン性材料(リポソームやポリマー)がベクターとして用いられている。これは、カチオン性材料が負電荷ポリマーとしての特性を有する核酸と容易にナノサイズの静電的複合体を形成できるという特性に起因する。また、正に帯電され

たナノ粒子は、細胞表面のヘパラン硫酸等と静電的な相互作用を介して結合することにより、高い細胞内取り込みが期待できる点からも極めて合目的なデザインといえる。しかし、永年の開発にもかかわらず、カチオン性材料を用いた遺伝子治療の実用化は行われていない。したがって、これまでの戦略とは一線を画する、新たなベクター開発の戦略が必要といえよう。本章ではまず、これまでに報告されている、あるいは、筆者ら自身の研究から得られた、カチオン性材料の問題点について *in vivo* に投与した場合と *in vitro* 培養細胞に導入した場合に分けて考えたい。

in vitro 血中投与においては、大きく分けて3点の課題があげられる。1点目は、血中投与されたカチオン性材料(あるいはカチオン性粒子)が赤血球や血小板と凝集体を形成する点である^{5~7)}。この結果、肺等の毛細血管が閉塞し、深刻な毒性が引き起こされる。また、それとともに起こる、肺組織への非特異的な遺伝子発現も問題となる。2点目として、遺伝子発現の持続性が非常に短い点があげられる。カチオン性リポソームやポリカチオンとのコンプレックスを血中に投与した際には、6時間頃に発現が最も高くなるものの、その後急速に消失し、2~3日目にはバックグラウンドレベルにまで落ちることが明らかとなっている⁸⁾。3点目として、サイトカインの産生を惹起する点があげられる。投与する材料にも大きく依存するが、IL-12やTNF α 、IFN γ 等の一過的な産生が認められることが報告されている⁸⁾。

また、人工ベクターの問題点として、ウイルスベクターと比較した際に発現効率が低いことがあげられる。筆者らは、カチオン性リポプレックスとアデノウイルス間の細胞内動態を比較した結果、両者の間には数千倍にもわたる発現効率の差があり、また、その差は、エンドソーム脱出や核移行等の細胞内動態では説明できないことを明らかとした。この結果は、両者の発現効率の差が、細胞内動態よりも、むしろ核に移行した後の過程(転写・翻訳)に起因するということを意味する(図2左)。同様の結果は、他の種類のリポソームやポリカチオンを用いた遺伝子導入時でも得られている^{9,10)}。さらにそのメ

カニズムに関して詳細に解析した結果、転写に関しては、核内における核酸のベクターからの解離が悪いことが両者の差の要因であることが示唆された。一方、翻訳過程においては、カチオン性ベクターと mRNA の静電的相互作用が翻訳過程を阻害する要因となることが示唆されている¹¹⁾。

3. 細胞内環境応答的に帯電・崩壊する 中性ナノ粒子の開発～ssPalm材料のコンセプト

上記「2. 細胞内動態と体内動態の観点からの従来ベクターの課題点」において、筆者らは、カチオン性材料が血球成分と凝集体を形成するリスクをとまなうことや、導入したい核酸、さらには細胞内の mRNA と相互作用して転写・翻訳過程を抑制する可能性があることを述べた。これらの問題点を解決するために筆者らは、カチオン性成分を極力排除した電荷的に『中性』なナノ粒子を基盤とした遺伝子・核酸ベクターへと発想を転換した。

一方、ナノ粒子は一般にエンドサイトーシスのような小胞輸送系によって取り込まれるため、内封分子を細胞質、さらには核まで送達させるためには、エンドソーム膜を破壊あるいは膜融合等によって突破する戦略が必須となる。この際、ナノ粒子がエンドソーム膜と相互作用するうえでは、表面の正電荷が極めて有用な駆動力となる。エンドソーム内部の pH はその成熟過程に依存して低くなる。具体的には、生理的条件の pH7.4 に対して、初期エンドソームで 6.0～6.2、後期エンドソームで 5.0～5.5、ライソソームで 4.5～5.0 程度と考えられている¹²⁾。そこで、本ナノ粒子は、エンドソーム内の低 pH 環境に応答して正に耐電し、静電的相互作用によりエンドソーム膜を不安定化できるようにデザインされている(図2右)。

また、上記のように、核酸が細胞内で解離する過程がその発現(転写)の効率を決定する重要な要素となりうる¹¹⁾。現に、筆者らが所属する研究室では、核酸とポリカチオンとの静電的複合体が脂質ナノ粒

図2 カチオン性材料を基盤とした遺伝子デリバリー用ナノ粒子の細胞内動態の観点からの問題点(左)と ssPalm を基盤とした新たな細胞内制御技術(右)

図3 ssPalm材料の構造とナノ粒子の模式図

子に内封された多機能性エンベロープ型ナノ構造体¹³⁾を開発してきたが、この脂質膜の枚数を減らすことにより、核酸の細胞内における解離が促進し、発現活性が劇的に高まることを見出している¹⁴⁾。また、siRNAを内封した多機能性エンベロープ型ナノ構造体に関しても、siRNAの細胞質における放出性を高めた設計を施すことにより、より効率的なノックダウン活性を発揮させることに成功している¹⁵⁾。これらの過去の経験を踏まえ、今回筆者らは、細胞質に移行後、還元環境に応答して速やかに自己分解し、内封分子を放出できる中性のナノ粒子をデザインした(図2右)。

このような低pH環境に応答して帯電し、細胞質における還元環境下において崩壊するナノ粒子を具現化するために開発された脂質様材料がssPalmである(図3)¹⁶⁾。本分子は2本の脂溶性基(第1世代ではミリスチン酸)と2つの第三級アミンを有し、そ

れらが互いにジスルフィド結合により架橋された構造を有する(ssPalmM)。本分子は、2本の脂溶性足場を介して他の脂質とともに膜を形成することができる。さらに、ssPalmには、2種の細胞内環境応答ユニットである『第三級アミン』と『ジスルフィド結合』が搭載されている。生理的pH環境下において電荷的に中性である本分子は、エンドソーム内の低pH環境下では第三級アミンがプロトン化を受けて正に帯電し、エンドソーム膜の突破の駆動力となる。また、細胞質においては、還元環境に応じてジスルフィド結合が切断される。この際、2本の脂溶性足場を持つ分子が、1本足型分子に変換されるため、膜の安定化作用が弱まるために膜構造が崩壊する。さまざまな検討より、細胞質内を模した還元環境(10 mM グルタチオン)において、20分以内に粒子内のジスルフィド結合が開裂することを見出している。実際、ジスルフィド結合を分解性のない炭素

結合に置換した分子(ccPalm)を用いて調製した粒子と、ssPalmを用いて調製した粒子間で細胞内動態を比較すると、ssPalm粒子のほうが有意に核酸の放出性が高い結果が得られている¹⁶⁾。

さらに、筆者らは、第2世代分子として、脂溶性ビタミン(vitamin A, vitamin E)を足場として有するssPalm(ssPalmA, ssPalmE)を開発している(図3)。脂溶性ビタミンは、種に特有の「物性」「輸送特性」「生物学的機能」を有する。これらの生理活性材料をssPalm構造内に採用することで、粒子の安定性や動態(細胞標的化能や細胞内動態)、生物学的作用等の新機能を付加することが可能となる。例えば、ビタミンEは、他の分子種と比較して脂溶性が高い。疎水性相互作用がナノ粒子形成の駆動力であることを考えると、目的に応じて適切な脂溶性足場を選択することにより、ナノ粒子の安定性を調節することが可能となると期待できる。また、ssPalmAを用いて調製した粒子は、ssPalmM粒子と比較して効率的に核周辺に集積することを明らかにしている。その結果、ssPalmA粒子は、ssPalmM粒子と比較して高い遺伝子導入効果を発揮することを見出した(図4左)。さらに、ssPalmA粒子の高い遺伝子発現活性や核への集積は、遺伝子導入時にレチノイン酸をメディウムに加えておくことにより阻害されたことから(図4右)、ssPalmA粒子は内因性の核輸送系により認識されることが示唆されている。現在、ビタミンの有する生物学的作用にも着目した技術開発を行っている。

4. ssPalm粒子のキャラクタリゼーション

核酸は一般的に生体内において容易に分解を受け、その活性を失う。そのため、生体内における酵素的分解からの保護能は、遺伝子・核酸ベクターに必要とされる機能の1つである¹⁷⁾。すなわち、搭載された核酸の封入率は、その活性を考慮するうえで極めて重要なパラメーターとなる。

核酸の内封率を測定する方法の1つとして、電気泳動があげられる。ssPalmのような中性核酸ベクターの場合、粒子の表面電荷は中性に近い場合、電気泳動により、アガロースゲル中を移動しない。一方、粒子に搭載されていない遊離型の核酸は負電荷を帯びているため、これらはアガロースゲル泳動により容易に分離される。一方、ssPalm粒子に内封された核酸に関しても、界面活性剤等(1% SDS等)で破壊することにより、すべてを遊離させることができる。粒子の破壊前後におけるそれぞれのバンド強度を測定することにより内封率が決定される。電気泳動法を用いることにより核酸の安定性もバンド強度として定量できるため、調製時の条件や長期保存の影響を見積もることができる。また、同様に、血漿中における安定性評価等にも応用可能である。

別の方法として、核酸へのインターカレーションに応答して発色する蛍光分子を用いる方法がある。例えば筆者らは、プラスミドDNAやsiRNAの封入率を測定する際には、それぞれピコグリーンあるいはリボグリーンを用いている。すなわち、内封さ

図4 ビタミンA足場型ssPalmナノ粒子の遺伝子導入活性とレチノイン酸による阻害効果

れている核酸にはインターカレーターが挿入されないで、封入されていない核酸の量を反映する値となる。一方、0.1% Triton X100等の界面活性剤で粒子を破壊した後の蛍光はサンプル中の核酸の総量を示す指標となる。ただし、界面活性剤の有無により、蛍光の相対強度が変わることも多いので、界面活性剤の有無で別々に検量線を書く必要があることは注意すべき点としてあげられる。特に静脈内投与型製剤を開発するうえでは、高い封入率を誇る製剤を用いることが前提となることから、極めて重要な情報となろう。複数の方法に基づいた多面的な評価が必要であると考えている。

また、粒子の機能を考えるうえでは、粒子としての物理化学的特性を理解する必要がある。特に、エンドソーム脱出を考えた場合、粒子としての見かけのpKa値(プロトンの受け取りやすさ)や膜の流動性(膜融合能)は重要なパラメーターとなる。見かけのpKaは負電荷蛍光色素であるp-Toluidino-2-naphthalenesulfonic acid(TNS)を用いて求められる¹⁸⁾。TNSは水溶液中において消光状態にあるが、酸性条件下で正に荷電した脂質膜と静電的に相互作用し、疎水部へ挿入されることで強い蛍光を示す。TNSの蛍光を異なるpHで測定することで粒子表面の荷電状態をモニタリングでき、50%荷電率を示すpHが、見かけのpKaとなる。pH3.0~10.0の範囲で粒子とTNS(終濃度0.06 mM)を混合し、蛍光(Ex321/Em447)を測定する。例えば、ssPalmからなる粒子のpKaは6.2であり、エンドソームの成熟化にともなうpH変化に対応した荷電状態の変化が得られることが確認できる¹⁶⁾。

また、粒子の表面が持つ重要な性質として、極性があげられる。界面の極性は蛍光色素Laurdanを用いることで求めることができる¹⁹⁾。界面の極性は、脂質膜とタンパク質との相互作用と関係しており、体内動態に深く関わると考えられる²⁰⁾。界面の性質に加えて、疎水領域の環境もまた、組成や分子構造の影響を受ける。リン脂質からなる脂質膜が主相転移温度以上で呈する液晶相は、アシル鎖が融解した状態であり、膜の流動性が上昇していることが知られている。脂質膜の融合は脂質膜の流動性を必要とすることから²¹⁾、遺伝子ベクターの細胞

内動態制御に特に重要である。脂質膜の流動性は、Diphenylhexatriene(DPH)を用いた定常状態における蛍光偏光解消によって求めることができる。脂溶性棒状分子であるDPHを偏光で励起すると、遷移モーメントが偏光の振動方向と近い分子が選択的に励起される(選択励起)。選択励起されたDPH分子から得られる蛍光はそれ自体も偏光しているが、その度合いは蛍光寿命の間にDPHが脂質膜内で回転拡散した分だけ減少する。この減少の具合から流動性や構造的柔軟性についての情報が得られる。ssPalm粒子の脂質アシル鎖部位は温度変化に対して急激な変化は示さず、リン脂質の液晶相と同程度の流動性を示した。また、pHの影響は見られなかったため、TNSアッセイにより示されたpH感受性は界面に限定されていることが明らかとなった。蛍光色素を用いた脂質膜物性評価法は、昔ながらの方法ではあるが、昨今、生体内環境応答性をうたうナノ製剤が次々と開発されている状況で、改めてその評価系の重要性に目を向けるべきであろう。

5. 遺伝子デリバリー技術としてのssPalm

HT1080細胞に対して*in vitro*で遺伝子導入した結果、中性のssPalm粒子は、既存のカチオン性脂質を用いて調製した粒子と比較して取り込み効率が低いにもかかわらず、同程度の遺伝子発現を示すことが明らかとなった¹⁶⁾。これは、細胞内動態の観点からssPalm粒子が優れていることを示唆するものである。また、遺伝子導入した後のタンパク質量を指標として毒性評価を行った結果、市販の遺伝子導入試薬や、カチオン性脂質を用いた場合と比較して、ssPalmMから形成されるナノ粒子に関しては極めて毒性が低いことを確認している¹⁶⁾。加えて、ジスルフィド結合を炭素結合に置き換えることで細胞内における分解性を消失させたccPalmを用いて粒子を形成した場合、高い細胞毒性が認められたことは興味深い点である。このことから、ssPalm分子の細胞内における高い分解性が粒子の毒性を回避するうえで重要な鍵を握ると考えられる。細胞毒性の低さは、本粒子の*in vivo*応用を考えるうえで極めて重要な特徴であろう。

また、血中における粒子の安定性も *in vivo* 応用を考えるうえで有用なパラメーターである。核酸分子そのものや、ポリカチオンとの静電的複合体においては、90% マウス血清中で速やかに(1時間以内に)分解される。一方、いったん ssPalm 粒子内に封入すると、同条件下においても核酸は少なくとも24時間にわたり安定に保持されることを見出している(図5)¹⁶⁾。さらに、電荷的に中性であるという特徴は、「2. 細胞内動態と体内動態の観点からの従来ベクターの課題点」であげたような、血中投与時の血管閉塞を回避できる点でも極めて有用である。実際、蛍光ラベル化された ssPalmM 粒子を血中に投与し、*in vivo* リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡により肝臓中における動的挙動を解析した結果、本粒子は凝集することなく、極めて分散した状態で血液中を流れることを明らかとしている²²⁾。以上の点から、本粒子は、*in vitro*(*ex vivo*)における遺伝子導入への適応のみならず、血中投与型製剤として広く応用できると期待できる。

ssPalmM 粒子を血中に投与した場合、本粒子は10分以内という極めて早い時間で効率的に肝臓中に蓄積する。また、本粒子に対して、免疫応答性を有する CpG 配列をすべて除去した遺伝子を搭載した場合、2週間にわたり、肝臓特異的な遺伝子発現が得られる(図6)。このような長期にわたる、肝臓

図5 裸の DNA あるいは ssPalm 内封型 DNA のマウス血清中における安定性

特異的な遺伝子導入効率は、中性な ssPalm 粒子を用いることで得られるユニークな特性であると考えられる。また、現在、さらなる分子の改良により、遺伝子導入効率を劇的に高めることに成功している。

リポソーム製剤においては、表面へのポリエチレングリコール(PEG)修飾により血中滞留性を増強させることで、腫瘍中へナノ粒子を蓄積させることができることが知られている。これは、腫瘍の新生血管の間隙が正常血管と比較して粗であるため

図6 ssPalm 内封型 DNA を静脈内投与した際の肝臓における遺伝子発現

図7 DNA内封型ssPalm粒子を静脈内投与した際のがんにおける遺伝子発現と可溶性VEGF(sFlt-1)発現プラスミド導入時の抗腫瘍活性

に、ナノ粒子が優先的に腫瘍に蓄積するという原理 (Enhanced Permeability and Retention: EPR) に基づくものである。一方で筆者らは、過剰の PEG の表面修飾は、粒子の細胞への取り込み過程やエンドソーム脱出過程を阻害するという『PEG のジレンマ』の問題を報告している²³⁾。特に、従来のカチオン性粒子の血中滞留性を向上させるためには、総脂質量の 15 mol% にもおよぶ高密度の PEG 修飾が必要となることが明らかとなっており²⁴⁾、細胞内動態の観点から極めて大きなデメリットとなる。『PEG のジレンマ』を解決するためには、体内動態を維持するために必要な最小限の PEG 修飾量を見出す必要がある。リボソームと同様、ssPalmM 粒子に対して PEG を修飾することにより、血中滞留性が向上することが明らかとなった。特に、15 mol% の PEG が修飾されたカチオン性ナノ粒子と同程度の血中滞留性を得るために必要な PEG 量は、ssPalm 粒子の場合 5 mol% で十分であることが明らかとなった。このことから、中性粒子の利用は、PEG のジレンマを解決するうえでも極めて有用な戦略であることが示唆される。また、PEG の長さを分子量 2000 のものから 5000 へと増加させることにより、さらに高い血中滞留性が得られることが明らかとなった²⁵⁾ (図7左)。

さらに、本粒子に対してプラスミド DNA を搭載した場合、ヒト腎細胞がんモデルマウスにおいて腫瘍特異的な遺伝子発現が得られることを実証している (図7右)。また、本粒子に搭載するプラスミ

ド DNA に対して新生血管を阻害するタンパク質 (可溶性 VEGF レセプター) をコードした場合、特に ssPalmE を用いた際に高い抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった (図7中央)²⁵⁾。したがって、がん治療を目的としたデリバリー技術を開発するうえでは、ssPalmE が最も効果的であると考えられる。導入した遺伝子の効果と、ベクター自身の持つ生物学的効果をあわせることにより、新しい疾患治療法が確立できると考えている。

6. 核酸デリバリー技術への展開

siRNA が薬効を発揮する部位が細胞質であることを考えると、細胞質への高い分子送達能と崩壊性を兼ね備えた ssPalm 粒子は siRNA のデリバリー技術として極めて有用であると考えられる。筆者らは、ナノ粒子の臓器移行が最も容易である肝臓を標的とした核酸送達システムを開発しながら、核酸の *in vivo* におけるデリバリーに最適な ssPalm 分子を同定してきた。第一に、siRNA のデリバリーを考えるうえで最適な脂溶性足場を同定したいと考えた。siRNA を ssPalmM、ssPalmA、ssPalmE から形成されたナノ粒子に搭載し、尾静脈より投与した結果、ビタミン E を足場とする分子において最も効率的な siRNA の肝臓への移行と、肝臓実質細胞に特異的に発現するタンパク質 (第Ⅶ因子) に対する遺伝子ノックダウンが認められた²⁶⁾。長鎖の DNA と比較して、約 20 bp 程度の siRNA のパッケージングを

考慮するうえでは、膜構造を安定化するための強力な駆動力が重要であろう。ビタミンEは、構成する炭素数がミリスチン酸より多く、LogP値が高いため、より効率的なsiRNAのパッケージングと血液中における安定性が獲得できたのではないかと考えている。さらに最近、ssPalmEから形成される粒子がssPalmMから形成される粒子と比較して顕著に肝臓に取り込まれることが明らかとなった。ssPalmE粒子の肝臓への取り込みは、ApoEのノックアウトマウスにおいて減少することから、中性リポソームやSNALP等の粒子と同様、粒子が血中においてApoEと結合し、LDL受容体等を介して能動的に取り込まれることが強く示唆される²⁶⁾。加えて、LDL受容体が発現しているアストロサイト細胞に対してssPalmM粒子はApoE依存的な取り込みが認められないのに対し、ssPalmE粒子は顕著に取り込みが増えることが示されている²⁷⁾。その一方で、両粒子へのApoEの結合自身には有意な差が認められない。これらのことから、ApoEが結合したssPalmE粒子は、ssPalmM粒子と比較して質的にLDL受容体のリガンドとして認識されやすいリポタンパク質様の構造をとるものと考えている。

核酸デリバリーにおいて、細胞内動態の観点からは、エンドソーム脱出効率を強化することが極めて重要な課題となる。Jawaramanらは、SNALPの遺

伝子のノックダウン活性を高めるうえで最適な見かけのpKa値(6.2~6.5付近)が存在することを報告している¹⁾。ssPalm粒子においても、pKa値の最適化がその活性に極めて重要であろうと考え、筆者らは第三級アミン構造のチューニングを図った。エンドソームは、初期エンドソームからリソソームに移行するにつれて、徐々にpHが減少する。そこで、このpHの微小変化を敏感に感知し、正に帯電できるように工夫を施した(図8左)。具体的には、従来のssPalmEの第三級アミン構造を、ピペリジン骨格に固定することで、安定的にプロトン化を受けられるようにした。また、第三級アミンの部位をナノ粒子表面から遠ざけた場合に、よりプロトン化を受けやすくなると考え、ピペリジン骨格とビタミンE間の距離を系統的に変化させた。その結果、従来のssPalmEと比較して低投与量で高い遺伝子ノックダウン効果を示すssPalmE-P4-C2を同定することに成功した²⁶⁾。また、siRNAと脂質の量比の最適化や、化学修飾型siRNAの導入により、遺伝子ノックダウン効率がさらに高まり、1匹のマウスあたり1 µg以下のsiRNAを投与することで50%以上の遺伝子ノックダウン効果が得られることが明らかとなっている(図8右)。

現在では、siRNAだけではなく、各種の核酸分子をデリバリーするシステムへと発展させるべく、

図8 ビタミンE足場型ssPalmを基にした第三級アミンの分子チューニングとsiRNA内封型ssPalmを静脈内投与した際の肝臓における遺伝子ノックダウン効果

研究開発を進めている。特に筆者らは、ssPalm を基盤とした DNA ワクチン用製剤や新たなメカニズムに基づくアジュバント製剤の開発も進めている。近年がん治療において、抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体等を用いた、免疫チェックポイント阻害療法が顕著な有効性を示すことが明らかとなっている。がん免疫療法は今後、がん治療の方向性を大きく変えることとなろう。一方、これら抗体療法が効かない患者もいることは事実であり、その原因の究明が急ピッチで進んでいる。ssPalm を基盤とし、新たな腫瘍免疫の制御技術を確立することで、がん免疫療法のさらなる奏効率の向上に貢献したいと考えている。

7. おわりに

以上、本稿では、核酸送達技術としての ssPalm について紹介した。特に、『電荷的に中性』であるという特徴は、これまでのカチオン性材料ベクターの多くの問題点を解決できることが見出されつつある。今後も、本材料をマルチ創剤基盤とした DDS 研究を展開したいと考えている。今回は核酸にフォーカスを絞ったために割愛したが、最近、筆者らは、ssPalm が核酸非存在下において他の脂質とともに自己会合し、従来のリボソームとは異なる内水相を持たない微小なナノ粒子を形成することを見出している。本粒子は、調製する際の条件を変えることで、同一組成で30 nm から200 nm 程度まで自由にサイズを変えることができる。粒子内部には難

水溶性の薬物を封入可能であることや、ssPalm の特徴である細胞内分解性を加味すると、本技術は難水溶性薬物の細胞質内への送達技術としても新たな用途が見出せると期待している。

本材料は現在、日油株式会社より販売を開始している。筆者らは、今後も ssPalm の有用性や応用例、さらに製剤原理を開発し、論文投稿や学会発表、企業への橋渡しを行っていく予定であるが、これらの研究を見ていただきながら、皆様の独自の技術と自由に組み合わせて利用いただけたら幸いである。現在、海外の企業を中心に、さまざまな応用面で本材料の評価も進んでおり、良好な結果も得られている。本材料の応用が、今後ますます、国内外で広がることを願ってやまない。

謝辞

本研究で紹介した研究を遂行するにあたり、北海道大学大学院薬学研究院 原島秀吉教授より数多くのフィードバックをいただきました。また、ssPalm に関しては、日油株式会社と共同で開発されたものであります。この場を借りて、心より感謝申し上げます。

本稿の一部の研究内容はおもに、内閣府「最先端・次世代研究開発支援プログラム(LR001)」、JSPS 科研費(15H01806)の助成を受けて得られたものです。また、本稿で紹介したナノ粒子の評価法の一部は、厚生労働省「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」の支援を賜り得られたものです。ここに深謝いたします。

文献

- 1) Jayaraman M et al.: Angew Chem Int Ed Engl(2012)51: 8529-8533
- 2) Dong Y et al.: Proc Natl Acad Sci U S A(2014)111: 3955-3960
- 3) Flemming A: Nat Rev Drug Discov(2012)11: 664
- 4) 原島秀吉 et al.: Drug Delivery System(2014)29: 217-225
- 5) Ogris M et al.: Gene Ther(1999)6: 595-605
- 6) Sakurai F et al.: Eur J Pharm Biopharm(2001)52: 165-172
- 7) Nomoto T et al.: J Control Release(2011)151: 104-109
- 8) Kawakami S et al.: J Pharmacol Exp Ther(2006)317: 1382-1390
- 9) Varga CM et al.: Gene Ther(2005)12: 1023-1032
- 10) Cohen RN et al.: J Control Release(2009)135: 166-174
- 11) Hama S et al.: Nucleic Acids Res(2007)35: 1533-1543
- 12) Canton I et al.: Chem Soc Rev(2012)41: 2718-2739
- 13) Kogure K et al.: Adv Drug Deliv Rev(2008)60: 559-571
- 14) Masuda T et al.: Biomaterials(2009)30: 4806-4814
- 15) Akita H et al.: J Control Release(2010)143: 311-317
- 16) Akita H et al.: Adv Healthc Mater(2013)2: 1120-1125
- 17) Scholz C et al.: J Control Release(2012)161: 554-565
- 18) Bailey AL et al.: Biochemistry(1994)33: 12573-12580
- 19) Parisio G et al.: J Phys Chem B(2011)115: 9980-9989
- 20) Lauraeus S et al.: Biochim Biophys Acta(1998)1373: 147-162
- 21) Poste G et al.: Ann N Y Acad Sci(1978)308: 164-184
- 22) Ukawa M et al.: Adv Healthc Mater(2014)3: 1222-1229
- 23) Hatakeyama H et al.: Biol Pharm Bull(2013)36: 892-899
- 24) Hatakeyama H et al.: Gene Ther(2007)14: 68-77
- 25) Akita H et al.: J Control Release(2015)200: 97-105
- 26) Akita H et al.: ACS Biomater Sci Eng.(2015)1: 834-844
- 27) Akita H et al.: Int J Pharm(2015)490: 142-145