高分子ナノテクノロジーが切り拓く 核酸医薬デリバリー

東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター^{*1)}・東京大学 大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻^{*2)}・ナノ医療イノベーションセンター(iCONM)^{*3)}

宮田完二郎^{*1,2,3)}・内田智士^{*1,3)}・内藤 瑞^{*1)}・片岡一則^{*1,2,3)}

Polymer nanotechnology for nucleic acid delivery

Nucleic acid drugs have a strong therapeutic potential for treatment of many intractable diseases, including cancer. However, their bioavailability seems to be miserable owing to their high susceptibility to enzymatic degradation and negatively charged macromolecular structures that hamper their cellular entry. To overcome these bottlenecks, a variety of delivery vehicles, such as ligand-nucleotide conjugates, lipid nanoparticles, and polymeric nanoparticles, have been developed for successful nucleotide therapeutics. This article describes the design strategies of synthetic block copolymer-based nucleic acid delivery systems, particularly highlighting “smart” polyion complex (PIC) micelles that can exert the desired functions in response to biological microenvironment signals. Also, our recent results related to small interfering RNA (siRNA) and messenger RNA delivery are introduced with details. Notably, the ligand-installed PIC micelle has achieved efficient tumor-targeted siRNA delivery through systemic route, leading to the significant antitumor activity in subcutaneous tumor models.

核酸医薬は、がんをはじめとする多様な難治性疾患の治療薬となり得ることから、その実用化に大きな期待が寄せられている。しかしながら、酵素により容易に代謝され、また細胞膜を透過できないことから核酸のバイオアベイラビリティは非常に低く、その医療応用は困難を極めている。このような状況を打破するために、核酸を標的部位に効率よく運ぶための DDS の開発が世界的に行われている。本稿では、合成高分子材料を基盤とする核酸 DDS の設計指針を、とりわけ細胞内の局所環境に応答して機能発現する“スマート”ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルに注目して説明する。また、siRNA と mRNA デリバリーに関して得られた最近の成果を紹介する。

Kanjiro Miyata^{*1,2,3)}, Satoshi Uchida^{*1,3)}, Mitsuru Naito^{*1)}, Kazunori Kataoka^{*1,2,3)}

Keywords: nucleic acid delivery, polymeric micelle, block copolymer, small interfering RNA (siRNA), messenger RNA (mRNA)

1. はじめに

1970年代後半におけるアンチセンス核酸に関する最初の報告以来^{1,2)}、核酸分子を薬剤として応用することを目指す多くの研究・開発が行われてきた。とりわけ、2000年代初頭にはほ乳類細胞において RNA 干渉を誘導する small interfering RNA

(siRNA)が報告され³⁾、核酸医薬の開発に拍車がかかった。近年においては、micro RNA(miRNA)や long non-coding RNA(lncRNA)など非翻訳性RNAの生物学的機能およびその重要性が明らかになり、核酸医薬の新たな標的(miRNA に関してはそれ自体も核酸医薬)として注目を集めている⁴⁾。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ療法に代表されるように、メッセンジャー RNA(mRNA)の前駆体(pre-mRNA)を標的とするアプローチも期待されており⁵⁾、わが国でも臨床試験が行われている。その一方で、プラスミド

^{*1)} Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

^{*2)} Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

^{*3)} Innovation Center of NanoMedicine(iCONM)

DNA(pDNA)や mRNA を細胞へと導入すれば、生体内で新たに治療用タンパク質を合成することもできる。したがって、図1に示されるように、タンパク質に作用する核酸アプタマーを含めれば、あらゆる生物学的機能が核酸分子によって制御される可能性があり、核酸医薬の潜在能力と汎用性の高さがうかがえる。その一方で、これまでに承認された核酸医薬に目を向けると、アンチセンス核酸としては2つ(エイズ患者のサイトメガロウイルス性網膜炎に対する「ホミビルセン」とホモ型家族性高コレステロール血症に対する「ミポメルセン」)、核酸アプタマーが1つ(加齢黄斑変性症に対する「マクジェン」)の計3つと多くはない。この理由として、核酸医薬以外にも有望な薬剤の開発が進んでいることがもちろんあげられるが、核酸医薬にはバイオアベイラビリティ(ここでは、生体へ投与した核酸分子のうち細胞質などの作用部位に到達した割合、という意味で使用)が低いという大きな課題がある。本稿では、核酸医薬のバイオアベイラビリティを改善するための DDS 設計に関して、特に高分子材料を基盤とするアプローチを中心に紹介する。

2. 核酸医薬の DDS に求められる機能

核酸医薬が薬効を発揮するためには、標的となる

分子が存在する場所に到達する必要がある。核酸アプタマーを除くと、核酸医薬の標的分子は細胞の中に存在する。よって、投与から細胞質(遺伝子や pre-mRNA が標的の場合は核)にいたるまでの道のりと、それにとまって必要とされる DDS の機能に関して、図2のようにまとめることができる。生体局所への投与の場合、投与直後より分解酵素にさらされることから、分解酵素から核酸を保護する機能が求められる。次いで、標的とする細胞表面を認識し、内部へと侵入する機能が求められる。この際、負に帯電した高分子である核酸、およびその DDS は単純拡散では細胞膜を透過できないことから、エンドサイトーシスを介した侵入経路が有力となる。したがって、エンドサイトーシスにより細胞に侵入した後、後期エンドソーム(もしくはリソソーム)での分解を回避するために、エンドソームから細胞質へと移行する機能(エンドソーム脱出能)が必要になる。標的分子が核に存在する場合、さらに核膜を突破する機能が求められる。そして、治療効果を得るためには、目的地において標的分子にアクセスできるよう核酸を放出する必要がある。

全身投与の場合、局所投与において必要とされる機能に加えて、血流中を安定に循環する機能(血中滞留性)が特に重要になる。なかでも、アンチセンス核酸や siRNA などの数十塩基からなる核酸医

図1 核酸医薬候補と主な標的

図2 全身投与から標的部位までの道のりと核酸DDSに求められる機能

薬は、その流体力学径が5 nm以下となることから、腎臓の基底膜を通じて容易に排泄されてしまう^{6,7)}。よって、腎排泄を回避するために、粒子径がおおよそ10 nm(分子量で約5万)を超えるようにDDSを設計することが望まれる。その一方で、粒子径を大きくし過ぎると、標的組織内での血管壁の透過性や組織浸透性が低下してしまうことに加え、マクロファージに異物として認識されやすくなる。よって、標的組織に応じて適切な粒子径に調節することが求められる。その1例として、血管壁の透過性が亢進している固形がんを標的とする場合、100 nm以下のナノ粒子が効率よく集積することが報告されている。これは enhanced permeability and retention (EPR) 効果として広く知られているが^{8,9)}、近年、腫瘍組織の特徴に応じて粒子径の上限が異なることが報告されている。これに関して、筆者らのグループで得られた具体例を以下に述べる¹⁰⁾。

がん細胞を取り巻く間質組織が少なく、血管の豊富な大腸がん(C26)モデルに対して30 nm、50 nm、70 nm、100 nmと粒子径の異なる高分子ミセルをそれぞれ静脈投与したところ、粒子径による腫瘍集積性の差は見られず、すべて効果的に腫瘍組織へ

と集積した(投与24時間後において約10 % dose/g tissueで集積)。一方、がん細胞群が厚い間質で覆われた膵臓がん(BxPC3)モデルにおいては、投与24時間後、70 nm以上の高分子ミセルの集積量が4 % dose/g tissue以下であるのに対し、50 nmの高分子ミセルの集積量は6 % dose/g tissue、30 nmの高分子ミセルの集積量は11 % dose/g tissueとなり、粒子径の減少にともない腫瘍集積性は顕著に上昇した。加えて、腫瘍組織内における高分子ミセルの分布を観察すると、粒子径30 nmの高分子ミセルは均一に分布している様子が確認された。これらの知見に基づくと、幅広い腫瘍組織に対して優れた集積性と組織浸透性を得るためには、粒子径<50 nmとなるDDSを設計すればよいことがわかる。

DDSの粒子径に関しては、調製溶液中での粒子径を血流中で維持することも大きな課題である。血流中はタンパク質の濃厚溶液であり、静脈投与されたDDSはさまざまなタンパク質や血球成分と衝突する。その結果、荷電性ないし疎水性構造を有するDDSは、それぞれ反対電荷を有する生体物質ないし疎水性物質に吸着し、不安定化する可能性がある。実際に、ポリリシンやポリエチレンジアミン(PEI)

と pDNA の間で静電相互作用を介して形成されたナノ粒子(ポリイオンコンプレックス、PIC)は、緩衝液中では粒子径約100 nm であったが、マウスへの尾静脈投与後、血小板などの吸着を通じてマイクロメートルオーダーの凝集体を形成する様子が観察されている¹¹⁾。このような血液成分との非特異的な相互作用を抑制し、投与前の DDS サイズを維持するためには、非イオン性かつ親水性の DDS 表面を構築する方法論が有効である。その具体例として、ポリエチレングリコール(PEG)で DDS 表面を覆う“PEG 化”が広く検討されている。一方、DDS の PEG 化により、血液成分との非特異的な相互作用のみならず、標的細胞への侵入効率も低下してしまう問題(PEG ジレンマ)が生じる。このジレンマを解決するために、PEG の先端に標的細胞表面に特異的に結合するリガンド分子を導入する方法論(アクティブターゲティング)や生体内の局所環境に応答して構造が変化する(例えば腫瘍組織内で PEG が切れる)“スマート DDS”の開発が大きな注目を集めている¹²⁾。

3. 高分子材料を基盤とする核酸 DDS

上述の機能を満たし得る核酸 DDS の1つとして、1990年代初頭より高分子材料が広く検討されてきた。これは、カチオン性高分子と核酸の単純混合(静電相互作用)により、粒子径が100 nm 前後となる PIC を簡便に調製できるからである。この PIC 形成を通じて、分解酵素に対する核酸の安定性は飛躍的に上昇する。また PIC は、核酸の負電荷を中和することで、負に帯電した細胞膜への吸着を介したエンドサイトーシスを促進する。一方、当初の課題は、エンドソーム脱出能と血清タンパク質を含む生理環境中での安定性であった。前者に対しては、1990年代なかばの PEI によるプロトンスポンジ効果の報告以来¹³⁾、酸解離定数(pK_a)の低いアミノ基を含む多様なカチオン性高分子が設計されてきた。このプロトンスポンジ効果は、細胞外(pH7.4)で脱プロトン化していたアミノ基が後期エンドソーム内(pH ~5.5)でプロトン化し、それにともなう対イオンの流入およびイオン浸透圧の上昇によりエンドソーム

が不安定化する、というメカニズムである¹³⁾。このイオン浸透圧の上昇に加え、正電荷密度が増加したカチオン性高分子がエンドソーム膜と直接相互作用し、不安定化させるという膜傷害メカニズムも提案されている¹²⁾。いずれのメカニズムにおいても、カチオン性高分子に含まれるアミノ基の pK_a の調節が肝であるといえよう。生理環境中での安定性に対しては、2項で述べたように PEG 化が非常に有効である。筆者らのグループは、PEG とカチオン性ポリアミノ酸のブロック共重合体を合成することで、世界に先駆けて PEG 化 PIC (PIC ミセル) を構築することに成功し¹⁴⁻¹⁶⁾、核酸 DDS としての機能化を推進してきた¹²⁾。これらの知見を踏まえ、以下では筆者らが開発してきたスマートミセルの設計指針および最近の成果を述べる。

3-1. スマートミセルの設計

図3に示すように、PEG とカチオン性高分子のブロック共重合体と核酸を水溶液中で混合することで、PIC コアの周囲を PEG が覆うミセル構造体を得られる。このミセル構造により、核酸は酵素分解や非特異的なタンパク質吸着を回避することができる。一方、治療効果を得るためには、目的地でミセル内部より核酸を放出する必要がある。静電相互作用を介して形成される PIC ミセルからの核酸の放出は、内在性のアニオン性高分子(例えば mRNA や miRNA) との対イオン交換により生じると考えられる。このため、全身投与を介した核酸デリバリーでは、高密度のアニオン性糖タンパクを含む腎臓の基底膜などが PIC ミセルの血中滞留性を低下させる大きな障害となる¹⁷⁾。静電相互作用のみを駆動力とした場合、アニオン性高分子との対イオン交換を回避することは困難である。そこで、新たな駆動力として、ステアロイル基やコレステロール基などの疎水基を PIC コア(カチオン性ポリアミノ酸の側鎖ないし核酸の末端)に導入することで、疎水性相互作用を介して安定化することができる¹⁸⁻²⁰⁾。

しかしながら、このアプローチの欠点として、過度の安定化により目的地での核酸放出までもが妨げられることがあげられる。細胞外での安定化と細胞質での核酸放出という二律背反的な要求を満たすた

図3 核酸と機能性ブロック共重合体の間で形成されるスマートミセル

めには、前述のように、生体内局所環境に対する応答性を賦与すればよい。細胞外と細胞質で異なる代表的な生体条件として、酸化還元ポテンシャルがあげられる。これは、生体内で還元剤として働くグルタチオン濃度が、血流中に比べ、細胞質では百倍以上濃度が高いことに由来する²¹⁾。よって、還元環境で開裂するジスルフィド(SS)架橋をPICコア(カチオン性ポリアミノ酸の間)に施すと、細胞外での架橋による安定化と細胞質での架橋の開裂による核酸の放出が可能となる^{22,23)}。このSS架橋アプローチは、比較的分子量の大きな核酸(例えば pDNA)に対しては非常に効果が高く、PIC ミセルの血中滞留性の向上に大きく貢献する一方で、siRNA に対しては十分な効果を示さなかった²⁴⁾。この理由として、siRNA のように小さく剛直な分子の場合、PIC

コアの架橋ネットワーク構造の編み目をすり抜けてしまう可能性が考えられた。そこで、PIC コア内でポリアミノ酸鎖と siRNA を直接コンジュゲートする方法論が考案されている。例えば、チオール(SH)基修飾 siRNA とチオール基修飾ポリアミノ酸の間でSS結合を形成させる DDS が報告されている^{25,26)}。これに対して、筆者らは天然型の核酸構造に着目し、SH 基修飾 siRNA のような修飾型核酸を用いない架橋形成にチャレンジしたので以下に説明する。siRNA は3'末端にリボースに由来する *cis*-ジオール構造を有する。この *cis*-ジオール構造は、4価のボロン酸とエステルを形成することが知られている。よって、ポリアミノ酸の側鎖にボロン酸を導入することで、PIC コア内にてポリアミノ酸と siRNA との間でボロン酸エステル架橋を構築す

ることができる。言い換えれば、天然型の siRNA 自体が PIC コアの架橋剤として機能するのである。このボロン酸エステルは、*cis*-ジオール構造を含むアデノシン三リン酸(ATP)と置き換わることがわかっており、細胞外の低ATP環境(~ 0.5 mM)での PIC ミセル安定化と細胞内の高ATP環境(~ 5 mM)での siRNA 放出が実現されている²⁷⁾。

前述のように、核酸DDSにおいてはエンドソーム脱出能も非常に重要な機能である。エンドソーム脱出能を有する代表的なカチオン性高分子である PEI は、培養細胞に対して優れた核酸導入効率を示す一方で、細胞毒性を惹起する問題があった。この PEI の細胞毒性は、その高い正電荷数/密度によって細胞膜や細胞内オルガネラに非特異的に吸着し、傷害を与えるためと考えられている²⁸⁾。これに対して筆者らは、アミノ基のプロトン化率を調節することでカチオン性高分子の正電荷数/密度が最適化され、高効率なエンドソーム脱出と低い細胞毒性が実現できるのではないかと考えた。すなわち、細胞外や細胞質環境(pH ~ 7)ではプロトン化率が低い一方で、エンドソーム内酸性環境(pH ~ 5.5)ではプロトン化率を大幅に増大させるカチオン性ポリアミノ酸の設計に取り組んだ。まず、PEI を構成するアミノエタンユニット($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$)のプロトン化挙動に注目したところ、繰り返し数(もしくは重合度)を小さくかつ偶数にすることで、プロトン化率が劇的に増大することに気づいた。具体的には、pH7.4と5.5の間での PEI(繰り返し数500)のプロトン化率変化が約10%と算出されたのに対し、繰り返し数2および4のアミノエタンのプロトン化率変化はそれぞれ31%および17%となった。そこで、これらのアミノエタン構造をポリアミノ酸側鎖に導入したところ、PEI と比較して、同等以上の核酸デリバリー効率を維持しながらもその細胞毒性を劇的に低下することが明らかになった^{29,30)}。このアミノエタン構造を有するポリアミノ酸に関して、主鎖としてポリアスパラギンを選択すると、中性および塩基性条件下で酵素などを必要とせず自己触媒反応により Day オーダーで分解することが見出されており³¹⁾、頻回投与による蓄積毒性を大幅に低減することが期

待されている。

さらに、PIC ミセルにおいては PEG ジレンマの克服に向けた標的指向性の賦与も重要である。導入すべきリガンド分子は標的とする細胞に応じて多様化するが、大きく分類すると低分子、ペプチド、およびタンパク質(抗体なども含む)や核酸アプタマーに分けられる。低分子リガンドの代表的な例としては、肝細胞(アシアロ糖タンパク質受容体)と結合するラクトースおよび *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、がん細胞(シアル酸)と結合するボロン酸があげられる。ペプチドリガンドとしては、脳・神経細胞(アセチルコリン受容体)と結合する RVG ペプチドやがん細胞($\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン受容体)と結合する RGD ペプチドがあげられる。タンパク質リガンドとしてはトランスフェリンが古くから検討されており、がん細胞の能動的ターゲティングに加えて³²⁾、脳血液脳関門を突破して脳実質細胞まで核酸をデリバリーできる可能性が示唆されている³³⁾。これらのリガンド分子はそれぞれ1分子でも標的分子に結合するが、PIC ミセルなどのナノ粒子表面に導入することで、多価結合となることも考慮しておく必要がある。すなわち、ナノ粒子を用いて多価結合にすることで、単体での結合がそれほど強くないリガンド分子であっても、その結合定数を桁で増加させることが可能である。逆に、抗体のように単体で十分な結合定数を有するリガンドの場合は、ナノ粒子当たり1~2分子のリガンドで有意なアクティブターゲティング能が得られることも示されている³⁴⁾。また、単純なりガンド密度のみならず、リガンドが結合した PEG の運動性もアクティブターゲティングに大きく影響すると考えられる。実際に、単一分子量の PEG(例えば分子量11,000)にラクトースリガンドを導入した PEG 化ナノ粒子では標的分子との十分な結合は見られなかったが、この系に分子量の小さい PEG(例えば分子量5,000)をブレンドしたところ、標的分子に対する結合能が飛躍的に増加した。これは、短い PEG がフィラー分子として作用することで一種のスペーサー効果が生まれ、リガンドが導入された長い方の PEG の運動性が増大したためと説明される³⁵⁾。

3-2. siRNA デリバリーへの展開

現在進行中の臨床試験を鑑みると、肝臓と固形がんが siRNA デリバリーの標的として注目されている。肝臓に対しては、アニオン性脂質である dilinoleylmethyl-4-dimethylaminobutyrate (DLin-MC3-DMA) を主な構成成分とする脂質ナノ粒子 (LNP) および 3 分子の GalNAc と siRNA のコンジュゲートが臨床第 3 相試験まで進んでいる³⁶⁾。固形がん治療に対しては、シクロデキストリンポリマーとトランスフェリンリガンドを組み合わせたナノ粒子や LNP を用いた臨床試験が開始されたが、肝臓と比べると、固形がんへの siRNA デリバリーに関しては改善の余地が大きいことが報告されている^{36,37)}。

筆者らは、全身投与を介して固形がんへと siRNA をデリバリーするために、環状 RGD リガンドを搭載した PIC ミセルを開発した。これにより、上述のインテグリン受容体を過剰発現していることで知られる皮下移植子宮頸がん (HeLa) モデルや皮下移植肺がん (A549) モデルに対して効果的に siRNA をデリバリーできることが確認された。さらに、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその 2 型受容体 (VEGF-R2) に対する siRNA、ないし polo-like kinase1 (PLK1) に対する siRNA を封入することで、腫瘍組織における有意な RNAi 活性および抗腫瘍効果を得ることに成功した (図 4)^{38,39)}。一方、環状 RGD リガンドを導入しなかった PIC ミセルでは有意な RNAi 活性が見られなかったことから、アクティブターゲティング能の重要性が示唆された。また、培養細胞を用いた実験では、環状 RGD リガンドにより PIC ミセルの細胞内への移行が促進される様子が観察されたことから、環状 RGD リガンドはがん細胞表面に結合するだけでなく、エンドサイトーシスを誘起していることも示唆された。本システムに関しては現在、転移がんや脳腫瘍など治療困難な腫瘍モデルを克服すべく、研究を進めている。

3-3. mRNA デリバリーへの展開

核酸医薬の治療応用では、上記の siRNA のように標的タンパク質の発現を低下させるだけでなく、DNA や mRNA を用いることで、生体へタンパク

図4 皮下移植子宮頸がんモデルに対する環状 RGD リガンド搭載 PIC ミセルの抗腫瘍効果 (*: $P < 0.05$)

質を供給することもできる。タンパク質を直接導入する場合と比べて、核酸では持続的な効果が得られ、また経済的に安価であることが期待される。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療では安全性が懸念されるため、pDNA や mRNA といった核酸を、ウイルスを用いずに導入する DDS が盛んに検討されてきた。とりわけ mRNA は、pDNA と違った以下のような特徴を持ち、近年注目を集めてきている。

- ①ホストゲノムへ偶発的に挿入される可能性がない。DNA のゲノム挿入は内因性遺伝子の予期せぬ活性化、不活性化を招くだけでなく、導入した遺伝子自体の発現が制御困難になる危険性がある。これに対して、導入 mRNA からのタンパク質発現は一過性である。
- ②非分裂細胞に対する導入効率が相対的に高い。これは、細胞分裂により核膜が消失した場合を除いて、核酸の核移行の効率は非常に低く、pDNA の非分裂細胞に対する導入が難しい一方で、mRNA デリバリーでは核移行の必要がないためである。

①の特徴を活かした応用法として、iPS 細胞の樹立やゲノム編集があげられる。iPS 細胞の樹立に用いる山中 4 因子の 1 つにがん遺伝子 c-Myc があるが、c-Myc 発現 DNA がホストゲノムへ挿入される

と、iPS細胞のがん化を招く危険性がある。これに対して、mRNAを用いることで、安全なiPS細胞を樹立できる⁴⁰⁾。また、近年zinc finger nuclease、TAL effector nuclease およびCRISPR/Cas9といった配列特異的DNA切断酵素を用いたゲノム編集技術が注目されている。これらの酵素が長期間発現すると、配列非特異的なゲノム切断が増加するため、一過性の発現を示すmRNAを用いたゲノム編集が盛んに検討されている⁴¹⁾。

②の特徴に関して、生体内の大多数の細胞は非分裂細胞であり、mRNAデリバリーの*in vivo*応用が期待される。実際に、mRNAを用いたがんワクチンは、1990年代より検討されており、すでに臨床治験に進んでいる⁴²⁾。一方で、mRNAには以下のような問題があり、ワクチン以外の*in vivo*応用は進んでいない。まず、mRNAはToll様受容体

(Toll like receptor、TLR)などのパターン認識受容体(pattern recognition receptor、PRR)に認識されて、自然免疫反応を惹起してしまう。これは炎症の惹起が必要なワクチンにおいては優れた性質となるが、その他の治療では副作用の原因となる。また、mRNAは生体内で速やかに酵素分解されてしまうため、その投与法は、皮下投与や筋肉内投与などに限られていた。

これに対して、mRNAの塩基の一部を、5メチルシチジン、2チオウリジン、シュードウリジンなど化学修飾された塩基に置換することで、PRR認識が回避され、優れたタンパク質発現が得られることが報告された^{43,44)}。結果的に、肺サーファクタント欠損症、喘息、心筋梗塞といったさまざまな疾患の動物モデルに対して、治療効果が得られるようになった⁴⁴⁻⁴⁶⁾。しかし、筆者らが化学修飾のスク

図5 *In vivo* mRNA デリバリーのための戦略

リーニングを行った際、化学修飾による酵素分解抑制作用は弱く、また修飾塩基の種類や組成によっては mRNA からのタンパク質翻訳効率が著しく低下することを見出した⁴⁷⁾。さらに mRNA 単独(naked mRNA)だけではエンドソーム脱出能もないことから、化学修飾に加えて mRNA のバイオアベイラビリティの向上を目的とした DDS 設計が必要となる(図5)。

そこで筆者らは、mRNA を封入した PIC ミセルの応用を検討した。まず、*in vitro* における検討で、PIC ミセルへの封入により、mRNA の酵素耐性が飛躍的に向上したほか、mRNA の化学修飾を行わない場合でも、その免疫原性は著しく抑制された⁴⁸⁾。後者に関して、mRNA はエンドソーム膜上の TLR3 / 7 / 8 に認識されることで強い炎症反応を示すが、TLR 恒常発現細胞を用いた実験では、ミセル表面の PEG の立体反発効果により mRNA と TLR の結合が阻害されることが強く示唆された(図5)。

続いて、このミセルをマウスおよびラットの脳脊髄液に投与することで、中枢神経系への mRNA デリバリーを行った⁴⁸⁾。すると、PIC ミセルは、市販のカチオン性脂質・ポリマーや、mRNA 単独(naked mRNA)の投与と比べて効率的なタンパク質発現を誘導し、その発現は1週間近くにわたり持続した。また、中枢神経系は血液脳関門により異物の侵入から隔離された組織であるため、投与システムの安全性がとりわけ重要となる。そこで mRNA 投与後の脳組織における炎症性サイトカイン、1型インターフェロンの産生を調べたところ、PIC ミセルでは naked mRNA と比べて、炎症反応が有意に軽減されていた。

さらに、本システムは複数の疾患モデル動物に対して優れた治療効果を示している。まず薬剤誘発性嗅神経障害モデルマウスに対して、脳神経栄養因子(brain derived neurotrophic factor、BDNF)発現 mRNA の点鼻投与による治療を試みた⁴⁹⁾。鼻粘膜組織中で、治療標的となる嗅神経細胞の終末が豊富に存在する粘膜固有層は、おもに非分裂細胞にて構成されている。mRNA はその粘膜固有層に対して優れた導入効率を示し、結果的に嗅組織の機能的

かつ組織学的な再生が促進された。次に、劇症肝炎モデルマウスに対して、mRNA のハイドロダイナミクス投与による治療を試みた⁵⁰⁾。当疾患は肝細胞のアポトーシスが病態に深く関与しているが、抗アポトーシス因子(Bcl2)発現 mRNA を投与することでそのアポトーシスが顕著に抑制された。抗アポトーシス因子の導入は、ゲノム挿入の危険性がある DNA では発がんの危険性があるため、mRNA ならではの治療法といえる。以上のように、PIC ミセルを用いることで mRNA のバイオアベイラビリティが向上し、さまざまな疾患に対する治療が可能となった。

今後疾患治療へ応用するうえで、バイオアベイラビリティのさらなる向上が必要と考え、培養細胞を用いた *in vitro* 研究に立ち返り、PIC ミセルの新たな分子設計にも取り組んでいる。上記の *in vivo* 研究では、ブロック共重合体のポリアミノ酸部分として、前述のアミノエタン構造が2回繰り返された側鎖構造を持つポリアスパラギン誘導体(PAsp (DET)と命名)を用いているが、これまでに筆者らはその繰り返し数が1回から4回のを開発している³⁰⁾。これらを mRNA 導入に用いたところ、繰り返し数が奇数(1、3)回のものでは細胞内外での mRNA の酵素耐性が高かった一方で、繰り返し数が偶数(2、4)回のものでは mRNA エンドソーム脱出効率が高いという特徴を示した⁵¹⁾。結果として、培養細胞への投与の際、1日後までは偶数のもので、奇数のものより優れたタンパク質発現効率が得られた一方で、それ以後の発現の持続性に関しては、細胞内での mRNA の安定化効果の高い奇数のものの方が優れていた。今後の治療応用に当たっては、治療目的に合致した発現特性を持つポリマーの選択が必要となる。また、今回の結果は、エンドソーム脱出能と mRNA 安定化効果の両方を兼ね備えたシステムを構築する際の優れた設計指針となる。

4. おわりに

核酸 DDS の開発は、ある意味では、単体では薬にはならないものを薬にする試みであり、その実用化は容易ではないかもしれない。しかしながら、核

酸医薬とその DDS の魅力は、一度方法論が確立されれば、核酸の配列を変えるだけで治療標的を変えることができる汎用性の高さであろう。とりわけ希少疾患治療において、この恩恵が期待される。現在、筆者らの研究室では、血液脳関門を高効率で突破(ト

ランスサイトーシス)するリガンド搭載PIC ミセルや線維性の脾臓がん組織の深部まで到達可能な最小サイズの核酸DDS の開発が進んでいる。これらの技術が核酸DDS 開発の新たなブレイクスルーとなることを筆者らは期待する。

文献

- 1) Paterson BM, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4370-4374 (1977).
- 2) Zamecnik PC, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 280-284 (1978).
- 3) Elbashir SM, *et al*, *Nature* 411, 494-498 (2001).
- 4) Wahlestedt C, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 433-446 (2012).
- 5) Kole R, *et al*, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 125-140 (2012).
- 6) Seymour LW, *et al*, *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 1341-1358 (1987).
- 7) Choi HS, *et al*, *Nat. Biotechnol.* 25, 1165-1170 (2007).
- 8) Matsumura Y, *et al*, *Cancer Res.* 46, 6387-6392 (1986).
- 9) Maeda H, *et al*, *J. Control. Release* 65, 271-284 (2000).
- 10) Cabral H, *et al*, *Nat. Nanotechnol.* 6, 815-823 (2011).
- 11) Nomoto T, *et al*, *J. Control. Release* 151, 104-109 (2011).
- 12) Miyata K, *et al*, *Chem. Soc. Rev.* 41, 2562-2574 (2012).
- 13) Boussif O, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7297-7301 (1995).
- 14) Harada A, *et al*, *Macromolecules* 28, 5294-5299 (1995).
- 15) Kataoka K, *et al*, *Macromolecules* 29, 8556-8557 (1996).
- 16) Katayose S, *et al*, *Bioconjugate Chem.* 8, 702-707 (1997).
- 17) Zuckerman JE, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3137-3142 (2012).
- 18) Kim HJ, *et al*, *J. Control. Release* 145, 141-148 (2010).
- 19) Kim HJ, *et al*, *J. Drug Target.* 20, 33-42 (2012).
- 20) Oe Y, *et al*, *Biomaterials* 35, 7887-7895 (2014).
- 21) Saito G, *et al*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 199-215 (2003).
- 22) Kakizawa Y, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 11247-11248 (1999).
- 23) Miyata K, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2355-2361 (2004).
- 24) Christie JR, *et al*, *Biomacromolecules* 12, 3174-3185 (2011).
- 25) Rozema DB, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12982-12987 (2007).
- 26) Takemoto H, *et al*, *Biomaterials* 31, 8097-8105 (2010).
- 27) Naito M, *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 10751-10755 (2012).
- 28) Moghimi SM, *et al*, *Mol. Ther.* 11, 990-995 (2005).
- 29) Miyata K, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16287-16294 (2008).
- 30) Uchida H, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 133, 15524-15532 (2011).
- 31) Itaka K, *et al*, *Biomaterials* 31, 3707-3714 (2010).
- 32) Wagner E, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3410-3414 (1990).
- 33) Wiley DT, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8662-8667 (2013).
- 34) Ahn JY, *et al*, *Biomaterials* 39, 23-30 (2015).
- 35) Ishii T, *et al*, *Chem. Commun. in press* (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cc/c5cc06661a#divAbstract>). (最終閲覧日: 2015年12月21日)
- 36) Wittrup A, *et al*, *Nat. Rev. Genet.* 16, 543-552 (2015).
- 37) Zuckerman JE, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11449-11454 (2014).
- 38) Christie RJ, *et al*, *ACS Nano* 6, 5174-5189 (2012).
- 39) Kim HJ, *et al*, *Drug Deliv. Transl. Res.* 4, 50-60 (2014).
- 40) Warren L, *et al*, *Cell Stem Cell* 7, 618-30 (2010).
- 41) Hwang WY, *et al*, *Nat Biotechnol.* 31, 227-9 (2013).
- 42) Weide B, *et al*, *J Immunother.* 31, 180-8 (2008).
- 43) Kariko K, *et al*, *Immunity* 23, 165-75 (2005).
- 44) Kormann MS, *et al*, *Nat Biotechnol.* 29, 154-7 (2011).
- 45) Mays LE, *et al*, *J Clin Invest.* 123, 1216-28 (2013).
- 46) Zangi L, *et al*, *Nat Biotechnol.* 31, 898-907 (2013).
- 47) Uchida S, *et al*, *Pharmaceutics* 7, 137-51 (2015).
- 48) Uchida S, *et al*, *PLoS One.* 8, e56220 (2013).
- 49) Baba M, *et al*, *J Control Release.* 201, 41-8 (2015).
- 50) Matsui A, *et al*, *Scientific reports.* 5, 15810 (2015).
- 51) Uchida H, *et al*, *J Am Chem Soc.* 136, 12396-405 (2014).