

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

Human hepatocyte-targeted cytoplasmic delivery of siRNA  
using bio-nanocapsule-liposome complexes

論文題目 (バイオナノカプセル-リポソーム複合体によるヒト肝臓細胞  
特異的細胞質内 siRNA 送達法の開発)

氏名 曾宮 正晴

## 論文内容の要旨

薬物を必要な量だけ、必要な場所へ、必要なタイミングで送達し、薬の副作用を減らして治療効果を高めるドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発するため、これまでに、B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面抗原である L タンパク質を提示した中空ナノ粒子であるバイオナノカプセル (BNC) を用いる、HBV 由来ヒト肝臓細胞特異的感染機構を有する DDS ナノキャリアの開発が行われてきた。また、この BNC を様々な薬物や遺伝子を大量に内封することのできるリポソーム (LP) と複合体化させることで、LP に HBV 由来の感染能を付与させることができる。しかしながら、BNC や BNC-LP 複合体がどのようにヒト肝臓細胞を認識し、同細胞内へ侵入して挙動するのかは、これまで明らかではなかった。特に、BNC や BNC-LP 複合体が標的細胞内へ薬物を送達する過程において、BNC が細胞膜と相互作用する必要があることから、BNC の L タンパク質が BNC 膜と細胞膜との膜融合を促進すると考えられた。

### 1. BNC の膜融合活性の解析と膜融合ドメインの同定

BNC と脂質二重膜との相互作用を解析するために、細胞膜のモデルとして LP を用いた。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 条件下の二種類の蛍光色素を提示する LP に BNC を加えた結果、低 pH 条件において FRET 効果が緩和され、BNC の膜融合活性が明らかとなった。また、BNC と LP との膜融合に伴い、双方の脂質二重膜構造が破壊されていることも明らかとなった。これらの結果より、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた BNC は、エンドソーム内の pH 低下に伴って膜融合活性が増強され、エンドソーム膜と融合した後、エンドソーム膜と BNC 膜の不安定化を誘発して、内封物質を細胞質内へ放出すると示唆された。さらに BNC の L タンパク質の N 末端側に位置する pre-S1 領域に膜融合ドメインが存在することを明らかにし、欠失変異体解析により pre-S1 領域の 9 ~ 24 番目のアミノ酸配列

(NPLGFFPDHQLDPAFG)、特に 13、14 番目の連続したフェニルアラニン残基が膜融合活性の中心であることを突き止めた。

## 2. BNC-LP 複合体の細胞内動態の解析

BNC が低 pH 依存性の膜融合活性を有することが明らかにされたので、実際に細胞内における BNC および BNC-LP 複合体の内封物が細胞質へ送達されているのかを検証した。ナノサイズの蛍光ビーズや金ナノ粒子を内封した BNC-LP 複合体を作製し、標的細胞であるヒト肝臓由来細胞株 Huh7 への取り込みを、共焦点レーザー顕微鏡や電子顕微鏡により解析した。その結果、BNC-LP 複合体はクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって効率的に細胞内へ取り込まれ、その後内封物がエンドソームやライソソームから細胞質へ移行していることが明らかとなった。つまり、BNC-LP 複合体は HBV と同様の機構によって、標的細胞内へ特異的に取り込まれ、エンドサイトーシス経路を介して低 pH 環境に曝露された後、エンドソーム膜と融合し、内封物を細胞質へ送達できる DDS ナノキャリアであることが強く示唆された。以上の知見は、BNC および BNC-LP 複合体が薬物の細胞質送達用ナノキャリアとして有効であるという実用的な観点からだけでなく、いまだ全容が解明されていない HBV の生活環、特に感染初期の現象の解明というウイルス学的な観点からも重要であると考えられる。

## 3. 非カチオン性 LP への siRNA 内封法の確立

Short interfering RNA (siRNA) は、病気の原因となる遺伝子の発現を特異的かつ強力に抑制できるため、世界中の製薬企業が次世代の医薬品として精力的に研究開発を進めているが、現在までに臨床試験を完了して実用化されたものは存在しない。siRNA の実用化において最も大きな課題は、siRNA に最適化した DDS が完成されていない点にある。具体的には、siRNA は細胞質で RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれた後、標的のメッセンジャー RNA を分解することで遺伝子発現の抑制を行うが、siRNA 自身は水溶性が高く分子量が大きいため、単独では細胞膜を透過することができない。したがって、siRNA を標的細胞の細胞質へ効率的に送達する DDS ナノキャリアの開発が待たれている。そこで、ヒト肝臓細胞の細胞質へ内封物を特異的に送達できる DDS ナノキャリアであることが示された BNC-LP 複合体を siRNA の送達に応用した。一方、従来 siRNA 送達用 DDS ナノキャリアとして、アニオン性の siRNA と静電的に相互作用して効率的に内封可能で、容易に細胞内へ取り込まれて siRNA の細胞質送達が可能なカチオン性 LP が繁用されてきた。しかしながら、カチオン性に由来する細胞毒性や生体内での安定性の低さが実用化の障害となっていた。そこで、非カチオン性 LP が有望と考えられたが、非カチオン性 LP と siRNA が静電的に反発するため、同 LP 内部への効率的な siRNA 内封法が皆無であった。種々の検討を重ねた結果、非カチオン性 LP をカルシウムイオンとエタノールの存在下で siRNA と混合すると、siRNA が非常に効率よく

内封されることを見出した。従来法では非カチオン性 LP への siRNA 内封量は、LP の脂質重量あたり最大でも 1%程度であったが、本法では最大 10%程度の siRNA が内封可能であった。さらに、LP 形成と siRNA 内封を同時に行うように siRNA 内封法を改良することで、LP 作製に必要な毒性の高い有機溶媒を使用することなく、大量の siRNA 内封非カチオン性 LP を単純な工程で作製できるようになった。

#### 4. BNC-LP 複合体によるヒト肝臓細胞への siRNA 特異的送達

siRNA 内封非カチオン性 LP を BNC と融合させ、各種培養細胞への siRNA 送達効率を評価したところ、siRNA 内封 BNC-LP 複合体は、BNC の標的細胞であるヒト肝臓細胞株 Huh7 へ特異的に取り込まれ、siRNA を細胞質へ送達した。また、内封した siRNA によって標的遺伝子の発現を最大 50%程度まで抑制した。さらに、作製した siRNA 内封非カチオン性 LP は、非常に高い細胞毒性を示すカチオン性 LP とは対照的に、高濃度においても細胞への毒性が全く認められなかったことから、当初の目的通り、細胞毒性が極めて低い siRNA 送達用 DDS ナノキャリアの開発に成功したと考えられた。また、siRNA 内封非カチオン性 LP は、その表面に高分子のポリエチレングリコールやその他の標的化用リガンドを化学的に修飾することが可能であるため、BNC を用いたヒト肝臓細胞への siRNA 送達だけでなく、その他の任意の組織や細胞への siRNA 送達技術へ転用できる可能性がある。以上の結果は、安全性の高い BNC-LP 複合体が siRNA をヒト肝臓細胞へ特異的に送達する技術の開発に成功したことを示している。本技術によって、肝臓の遺伝子発現の異常によって生じる家族性高コレステロール血症等の代謝異常性疾患や、肝臓への HBV 感染によって引き起こされる B 型肝炎等の各種ウイルスに起因する感染性疾患に対して、siRNA 適用が可能となることが期待される。