

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 曾 宮 正 晴

論 文 題 目

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

(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)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	Andrés D. Maturana
委 員	名古屋大学教授	中 野 秀 雄
委 員	名古屋大学教授	松 田 幹
委 員	名古屋大学助教	新 美 友 章
委 員	大阪大学教授	黒 田 俊 一

核酸医薬は、低分子化合物や抗体などの従来医薬品とは異なる作用点を持つことから、これまで治療が困難であった疾患に対する有効な医薬基盤技術として注目されている。特に、様々な疾患の発症機構に関与する遺伝子の発現を特異的かつ強力に抑制することが出来る short interfering RNA (siRNA) は、最も有望な核酸医薬として期待されている。しかしながら、核酸医薬として臨床で使用されているものは僅かであり、その実用化の最も大きな障害は、核酸医薬を標的疾患部位へ送り届けるドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術が未熟な点にある。特に siRNA は体内で非常に分解されやすく、さらに標的細胞の細胞質まで送達されないと効果を発揮しないため、siRNA 送達用 DDS ナノキャリアの開発が喫緊の課題となっている。

これまでに、B型肝炎ウイルス (HBV) のヒト肝臓細胞特異的な感染機構を担う表面抗原 L タンパク質を提示する DDS ナノキャリアである、パイオナノカプセル (BNC) が開発されてきた。BNC は HBV と同様にヒト肝臓細胞へ特異的に吸着し、侵入することができる。さらに BNC は、薬物を内封したリポソーム (LP) と複合体を形成させることで、LP に内封した薬物をヒト肝臓細胞へ特異的に送達することができることから、siRNA 送達用 DDS ナノキャリアとして期待されていた。

1. BNC の膜融合活性の解析

一般的にウイルスの初期感染プロセスには、宿主細胞の細胞膜を突破し、ウイルスゲノムを細胞質へ放出する機構が必要である。HBV には、宿主細胞の細胞膜と融合する活性が存在すると考えられたので、BNC をモデルとして、二重蛍光標識 LP との膜融合を蛍光共鳴エネルギー移動を指標にして解析した。その結果、BNC に酸性 pH に依存した膜融合活性が存在することを見出した。また、L タンパク質由来化学合成ペプチドを提示した LP を用いて同様の解析を行ったところ、同膜融合活性が L タンパク質 N 末端側の 16 アミノ酸残基 (NPLGFFPDHQLDPAFG) に存在し、特に連続する 2 つのフェニルアラニン残基が重要であることを示した。さらに、BNC と LP との膜融合によって相互の膜構造が破壊され、BNC 内部の物質が放出されることを示した。以上の結果は、BNC が細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれた後、後期エンドソームの酸性 pH 環境下において L タンパク質の膜融合活性が増強され、膜融合と膜破壊を誘導し、BNC 内部の物質が細胞質内に放出されることを強く示唆しており、HBV の初期感染プロセスにおける脱殻機構の一端を明らかにしている。

2. BNC-LP 複合体の細胞内動態の解析

BNC は細胞膜と融合することにより内封物を細胞質へ放出することが示唆されたため、BNC-LP 複合体の内封物の細胞内動態を解析した。そこで、同複合体に蛍光ビーズや金ナノ粒子を内封し、ヒト肝臓細胞内に取り込ませた後、共焦点レーザー顕微

鏡や透過型電子顕微鏡によって観察した結果、BNC-LP 複合体が細胞内へクラスリン依存性エンドサイトーシスによって効率的に取り込まれ、さらに一部の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を示した。前述の酸性 pH 依存的な BNC の膜融合活性による内封物放出機構により、BNC-LP 複合体も同様に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を証明した。

3. BNC-LP 複合体への siRNA 搭載法の開発

BNC-LP 複合体がヒト肝臓細胞の細胞質へ内封物を送達できることを示したが、アニオン性 LP から構成される本複合体に、siRNA を効率的に内封する技術が存在しなかった。カチオン性 LP への siRNA 内封は非常に簡便であるが、細胞毒性や生体内安定性に問題があり、BNC-LP 複合体にカチオン性 LP を使用することは臨床応用の観点から困難であった。そこで、中性やアニオン性の脂質を含むエタノール溶液を、siRNA とカルシウムを含むバッファーに滴下することによって、siRNA が高濃度に内封された均一な非カチオン性 LP が形成されることを見出した。本 siRNA 内封法は、LP 重量あたりの内封量が 10%程度で、最高でも 1%程度の従来法よりもはるかに高効率であり、有害な溶媒を使用せずに単純な操作だけで大量の siRNA 内封 LP を作製できた。本法により siRNA を内封した BNC-LP 複合体は、ヒト肝臓細胞において siRNA を細胞質内に送達し、標的遺伝子の発現を 50%程度抑制した。以上の結果は、新しい非カチオン性 LP 内部への高効率 siRNA 内封法の開発、および BNC-LP 複合体による siRNA のヒト肝臓細胞特異的送達技術の開発に成功したことを示している。

本研究により、HBV の初期感染プロセスの中でも重要と考えられている、細胞膜との相互作用機構および HBV の脱殻機構の一端が明らかにされた。また、両機構により BNC や BNC-LP 複合体が内封物を標的細胞の細胞質へ送達する機構も明らかにされた。本研究により開発された非カチオン性 LP への高効率 siRNA 内封法、および BNC-LP 複合体による siRNA のヒト肝臓細胞特異的送達技術は、siRNA の臨床応用を加速させるものである。したがって、本審査委員会は、これらの研究業績は博士（農学）の学位を授与するに充分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。