

氏名 (生年月日) 板倉祥子 (1984年6月12日)

学位の種類 博士(薬科学)

学位記番号 博薬科 第1号

学位授与の日付 2015年3月21日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 細胞質送達素子を搭載した多段階制御型がん治療ナノDDSの創製

論文審査委員 (主査) 教授 小暮 健太郎

(副査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 中山 祐治

## 論文内容の要旨

### 1. 緒言

がん化学療法において、がん細胞の細胞質へ薬物を効率的に送達可能なドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が求められている。最大限の薬効が期待できる DDS を開発するためには、腫瘍組織への送達に加えて、がん細胞内の動態および薬物放出を精密に制御することにより、薬物の作用部位である細胞質に如何に効率的に薬物を送達するのが重要である。そこで、本研究では、体内動態から細胞における薬物放出までの各過程を制御可能な機能性素子を設計し、それらを DDS に搭載することで、細胞質へ効率的に薬物送達可能ながん治療ナノDDSを構築することを目的とした。

### 2. 細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の細胞質デリバリーシステムの開発

抗体は標的タンパク質に対して特異的に結合することが可能であるため、がん治療においても多くの抗体が、分子標的薬として臨床使用されている。しかし、細胞内へ効率的に抗体を送達可能な DDS が開発されていないために、これまでの抗体医薬品の標的は主に分泌タンパク質や膜タンパク質に限定されている。一方、オミックス解析の進展により、がん治療の標的として有望な多くの細胞内タンパク質が見出されてきたこともあり、これらの機能を制御するために、抗体の簡便な細胞内送達法の開発が望まれている。そこで、私は抗体のFc領域と特異的に結合する protein A 誘導体 (pAd) に細胞膜透過性ポリマー (CPP) を化学修飾させた新規の抗体導入キャリアー (CPP-pAd) を企業との共同研究により開発した。CPP-pAd は抗体と混合するだけで、抗原結合部位を保持した状態で抗体に細胞膜透過性を付与することが可能である。蛍光ラベル化抗体を用いて CPP-pAd による抗体導入活性を市販の抗体導入試薬と比較した結果、顕著に高い導入活性が認められただけでなく、CPP-pAd は細胞質まで抗体を送達可能なことが明らかとなった。また、CPP-pAd を用いて細胞内に導入された抗核膜孔複合体抗体は、その標的部位の核膜へ集積しており、さらに核膜孔を介した NF- $\kappa$ B の核移行を阻害することで細胞機能を抑制することが確認された。したがって、CPP-pAd は、抗体を簡便かつ高効率に細胞内へ送達可能であることが示唆された。

### 3. 体内動態及び細胞内動態制御可能な DDS の開発

CPP-pAd のような細胞膜透過性素子と薬物を連結させた DDS を全身投与型 DDS へ応用するためには、血中で

の安定性の向上や腫瘍への特異的送達のために体内動態制御素子を修飾することが必要である。リポソームは、生体適合性に優れ、標的化素子の修飾も可能であることから全身投与型キャリアーとして有用であると考えられている。現在、がん治療 DDS として、血中滞留性が高く、enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) を利用して腫瘍組織へ集積可能である polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソーム (PEG-lipo) が主に用いられている。しかし、PEG-lipo は細胞内へ取り込まれにくいと、細胞質への薬物送達効率が低いことが課題である。そこで、私は血中滞留性が高いだけでなく、細胞内へ取り込まれやすい新規の DDS を開発するために、リポソームの表面電荷に着目した。すなわち、血中ではリポソームの表面電荷を負電荷にすることで、生体成分との相互作用を回避できるが、腫瘍環境の低 pH に応答して正電荷に反転させることでがん細胞への取り込みが向上するのではないかと考えた。しかし、これまでに腫瘍の微弱低 pH に応答する素子はなかったため、新たに slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP) を設計し、SAPSP をリポソームに修飾することで、微弱低 pH に応答して電荷が反転するリポソーム型 DDS を開発した (SAPSP-lipo)。担がんマウスへ SAPSP-lipo を尾静脈内投与した結果、PEG-lipo と同程度の腫瘍集積性が認められた。さらに、SAPSP-lipo の pH 変化による細胞への取り込みをフローサイトメトリーにより評価したところ、pH 7.4 に比べ、pH 6.5 以下では約 13 倍取り込みが向上した。また、SAPSP-lipo は一部膜融合を介して効率よく細胞質まで送達されることが示唆された。したがって、SAPSP-lipo は高い腫瘍集積性と効率的な細胞質送達が期待できる新規の DDS であることが示された。

#### 4. 細胞内で効率的に薬物放出可能な DDS の開発

SAPSP-lipo のようなリポソーム型 DDS の場合、リポソームからの薬物放出が非効率的であるために、送達薬物の利用率が低く、最大限の薬効発現が得られない。そのために、がん細胞において、特異的かつ速やかに薬物を放出可能な DDS の開発が期待されている。そこで、私は細胞膜プロテアーゼである  $\gamma$ -セクレターゼが、がん細胞において高い活性を有することに着目し、 $\gamma$ -セクレターゼによって切断されるペプチド liposomal membrane disturbance peptide (LMDP) をリポソーム膜に組み込むことで (LMDP-lipo)、細胞に取り込まれる時にリポソーム膜構造が乱れ、内封薬物が放出するのではないかと考えた。LMDP-lipo はプロテアーゼ存在下で、LMDP の切断および内封カルセインの漏出が認められた。また、培養細胞においても、細胞内に内封カルセインの放出が観察され、この放出はプロテアーゼ阻害剤によって抑制された。さらに、エンドサイトーシス阻害剤存在下でも細胞内への放出が認められた。したがって、LMDP-lipo はがん細胞の形質膜上に存在する  $\gamma$ -セクレターゼに応答して内封薬物を放出可能であることが示唆された。さらに、がん治療用内封薬物として核酸医薬に着目した。リポソーム型 DDS へ siRNA などの核酸医薬を封入するためには、siRNA を正電荷ポリマーで凝縮することが主要な方法の 1 つである。しかし、このような凝集体は強力な静電的相互作用のため、細胞質での凝集体からの siRNA 放出効率が低いことが課題である。そこで、私はこの課題を解決するために、pH 変化に応答して電荷が反転する SAPSP を siRNA の凝縮剤に利用することを発想した。酸性条件下で正電荷を有する SAPSP を siRNA と混合し、凝集体を構築した結果、細胞質 pH (pH 7.4) において、SAPSP が負電荷へ反転することで、静電的相互作用が減弱し、効率的に siRNA が放出されることが示された。さらに、SAPSP と siRNA の凝集体をリポソーム内へ封入した結果、凝縮剤として正電荷ペプチドを利用した場合に比べて、RNAi 効果が増強された。したがって、LMDP、SAPSP を用いることで、細胞内に低分子薬物や核酸を効率的に放出可能であることが示唆された。

#### 5. 総括

本研究では、がん細胞の細胞質へ薬物を効率的に送達するために、新たに設計した膜透過性ポリマーや腫瘍環境応答性素子 SAPSP、LMDP を利用したがん治療 DDS を開発した。これらは、DDS キャリアーの体内動態から薬物放出の各過程における障壁を多段階的に突破することで、薬効発現が向上することが示唆された。近年、特異的な抗がん効果を示す核酸や抗体などを細胞質へ効率的に送達可能な DDS 開発が急務の中で、多段階的に特

異的かつ効率的な送達が可能ならこれらの機能性素子を組み合わせた DDS の開発は、副作用の少ないがん治療システムの開発に大きく貢献すると考えられる。

## 審査の結果の要旨

申請者は本学位論文において、効率的ながん化学療法確立を目指して、体内動態から細胞における薬物放出までの各過程を制御可能な機能性素子を設計し、それらを搭載した薬物送達システム (DDS) の構築と機能性を評価検討している。

第一章では、「細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の細胞質デリバリーシステムの開発」を目指し、抗体に結合する proteinA 誘導体 (pAd) と細胞膜透過性ポリマー (CPP) からなる新規抗体導入キャリアー (CPP-pAd) の開発に成功している。CPP-pAd は、抗体に細胞膜透過性を付与可能であり、細胞質まで抗体を送達可能であった。さらに、CPP-pAdにより細胞内に導入された抗体が標的部位に集積するとともに細胞機能性を制御したことから、CPP-pAd が抗体を簡便かつ高効率に細胞内へ送達可能であることが示唆されている。

第二章では、「体内動態および細胞内動態制御可能な DDS」開発を目指し、「リポソーム表面電荷は、血中では負電荷であれば生体成分との相互作用を回避できるが、腫瘍環境低 pH では正電荷に反転することで細胞取り込みが向上するのではないか」という仮説を立て、独自のペプチド SAPSP を設計し、微弱低 pH に応答して電荷が反転する SAPSP-lipo を開発した。担がんマウスへの尾静脈内投与において PEG-lipo と同程度の腫瘍集積性が認められ、さらに細胞取り込みが pH7.4 に比べて pH6.5 以下において著しく向上した。また、取り込みメカニズムへの膜融合の関与も明らかにしている。これらの知見から、SAPSP-lipo は、高い腫瘍集積性と効率的細胞質送達が期待できる新規 DDS であることが示されている。

第三章では、「細胞内で効率的に薬物放出可能な DDS」開発を目指し、「 $\gamma$ -セクレターゼ切断ペプチド LMDP を組み込んだリポソーム (LMDP-lipo) は、細胞取り込み時にリポソーム膜構造が乱れ、内封薬物が細胞質に放出されるのではないか」という仮説を立て、検証を行っている。LMDP-lipo によりがん細胞内への封入薬物放出が観察され、プロテアーゼ阻害剤によって抑制されたこと、エンドサイトーシス阻害剤存在下でも細胞内放出が認められたことから、LMDP-lipo はがん細胞膜  $\gamma$ -セクレターゼに応答して内封薬物を放出可能な新規の DDS であることが示されている。

以上、申請者は本研究において、独自のアプローチによって、がん細胞の細胞質へ薬物を効率的に送達するためのユニークな膜透過性ポリマー・腫瘍環境応答性素子 SAPSP・細胞膜プロテアーゼ応答性素子 LMDP を開発し、それらを用いた新規がん治療用 DDS の構築に成功している。これらの知見は、画期的ながん治療法へと発展する可能性を有した貴重な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士 (薬科学) の学位論文としての価値を有するものと判断する。