

3月27日(木) E会場 パシフィコ横浜会議センター 3F 311+312
大学院生シンポジウムGS3 9:30~11:30

遺伝子治療・核酸医薬品開発における新規 DDS 技術

Novel DDS Technology for Development of Gene Therapy and Nucleic Acid Drug

向井 英史¹, 衛藤 佑介²(¹京都大学大学院薬学研究科, ²大阪大学大学院薬学研究科)

ポストゲノム時代に入り、治療法の開発戦略は大きく変化している。ヒトゲノムシーケンスの解析と DNA マイクロアレイ技術の確立によって遺伝子発現の網羅的解析が可能になったことに伴い、疾患関連遺伝子の同定が急速に進められており、得られた情報に基づく論理的な治療法開発に移行してきている。様々な生体分子の薬理効果が示されているが、特に、遺伝子や核酸は標的とするタンパクを遺伝子発現段階で制御するため、画期的な医薬品になる可能性が期待されている。しかし、生体内での安定性の低さや細胞膜透過性の低さから、遺伝子治療や核酸医薬品の実現において、薬物送達システム(DDS)の開発は最も重要な障壁の1つであり、その利用範囲をいかに広げられるかも DDS の開発にかかっている。また、核酸導入技術は、個体レベルでの遺伝子機能解析、疾患モデルの構築、遺伝子治療効果の検証等、創薬研究の各段階において必要不可欠な基盤技術でもある。

そこで本シンポジウムでは、ウイルスベクターや非ウイルスキャリアを利用したシステムから naked DNA の導入まで、新しい素材、戦略を用いた革新的な核酸 DDS 開発に挑戦している研究を紹介して頂く。議論の時間を多くとり、大学院生同士の意見交換の機会にしたいと考えている。積極的な参加を御願いたい。

GS3-1

標的指向能を有するバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの開発

Development of PEGylated adenovirus vector for cancer gene therapy

○衛藤 佑介¹, 吉岡 靖雄^{1,2}, Ratima Asavatanabodee¹, 水口 裕之^{1,3}, 向 洋平¹, 岡田 直貴¹, 中川 晋作^{1,2}(¹阪大院薬,²阪大 MEI セ,³医薬基盤研)

アデノウイルスベクター (Ad) は、既存のベクターの中で最も高い遺伝子導入効率を有し、高力価のウイルス調製が容易であることから、現在癌遺伝子治療において最も繁用されるベクターシステムである。一方で、Ad を全身投与した場合には高い肝集積性に基づく副作用を誘発するため、全身性の微小転移癌等を標的とした遺伝子治療は困難とされている。従って、Ad の全身投与による効果的な癌遺伝子治療法を構築するためには、Ad の優れた遺伝子発現能を保持しつつ、①肝集積性の抑制、②腫瘍組織移行性の向上、を同時に達成し得るベクター設計が不可欠である。本観点から我々は、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾によって Ad の体内動態制御を可能とする方法論の確立とそれを応用した最適な癌遺伝子治療法の開発を試みてきた。その結果、至適な修飾率を有する PEG 修飾 Ad が、肝集積性の抑制、血中滞留性の延長、さらには EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果に基づく腫瘍組織への集積性及び遺伝子発現活性の増大を同時に達成し得ることを明らかとし、転移癌を標的とした治療検討においてもその有用性を実証した。さらに、PEG 修飾 Ad をより積極的に標的細胞へと送達すべく、癌細胞指向性分子としてトランスフェリン (Tf) を PEG 鎖先端に付与した Tf-PEG 修飾 Ad を創製した。その結果、Tf-PEG 修飾 Ad は、PEG 修飾 Ad と比較して Tf 受容体発現腫瘍細胞に、特異的かつ有意に高い遺伝子発現活性を示すことを明らかとした。以上、本発表では PEG 修飾を基盤とした Ad の体内動態制御と、標的指向性分子を介した腫瘍ターゲティングへの展開について紹介する。

GS3-2

標的化リポソームを用いた腫瘍新生血管選択的 siRNA デリバリーシステムの構築

Construction of siRNA delivery system targeting to angiogenic vessels with targeted liposomes

○畑中 剣太郎¹, 松下 小緒里¹, 鶴田 敦¹, 浅井 知浩¹, 石田 竜弘², 際田 弘志²,
出羽 毅久³, 南後 守³, 奥 直人¹(¹静岡県立大学大学院薬学研究科,²
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部,³名古屋工業大学大学院)

核酸医薬は次世代の医療技術として有望視されており、なかでも標的遺伝子の発現を特異的に抑制する small interfering RNA (siRNA) は、治療応用に関する研究が活発に行われている。これまでに我々は siRNA のベクターとしてポリカチオンを膜修飾したリポソームを開発し、優れた遺伝子ノックダウン効率を示すキャリアの構築に成功した。一方で、がんの増殖や転移に関与する新生血管に親和性を有するペプチドを同定し、がん新生血管を標的としたドラッグデリバリーシステムの構築に成功した。

本研究では腫瘍新生血管選択的 siRNA デリバリーシステムの構築を目的とし、機能性ペプチドおよびポリエチレングリコールを修飾した機能性ポリカチオンリポソームの開発を試みた。リポソームの調製法および siRNA の搭載法について詳細に検討し、*in vitro* において選択的なノックダウン効果を示す標的化ベクターの開発に成功した。治療標的分子としては RNA-induced silencing complex (RISC) の主要構成タンパク質である Argonaute (Ago2) に着目した検討を行った。血管新生時に起こる microRNA (miRNA) 制御システムの破綻を Ago2 ノックダウンによって誘導し、その血管新生抑制効果について検討した。その結果、Ago2 ノックダウンによって血管内皮細胞の増殖および管腔形成の抑制に繋がることが明らかとなった。また他の治療標的分子として、免疫応答制御、細胞増殖および血管の管腔形成などに関与する mammalian target of rapamycin (mTOR) を標的とした siRNA 療法に関する検討結果についても併せて発表する予定である。

GS3-3

癌治療に向けた siRNA 含有長期徐放性マイクロスフェアの粒子設計

Preparation of biodegradable long-term sustained release microspheres including siRNA for tumor therapy

○豊島 功正¹, 村田 直之¹, 清水 竜也¹, 高島 由季¹, 岡田 弘晃¹(¹東京薬大薬)

近年、次世代の薬物治療の手段として核酸医薬の研究開発が進められており、中でも small interfering RNA (siRNA) は、高い治療効果が期待でき、注目されている。悪性腫瘍の成長において血管新生は必要不可欠であり、これには血管内皮増殖因子 VEGF が大きく関与する。siRNA を用いて VEGF の産生を遺伝子レベルで抑制し、血管新生を腫瘍発生の初期段階から持続的に抑制することが出来れば、高い腫瘍増殖抑制効果が得られると考えられる。しかし、siRNA 溶液の担癌マウスへの単回投与(i.t.)による抑制効果は一過性であったため、生分解性ポリマーであるポリ乳酸グリコール酸を用いて、w/o/w 液中乾燥法により、siRNA 封入長期徐放性マイクロスフェアを調製した。注射剤に適用できる平均粒子径約 40 μ m の粒子が得られ、カチオン性キャリアとともに封入することで、高効率で siRNA を封入することに成功した。この粒子は *in vitro* 放出試験において、1ヶ月にわたり siRNA を放出し続けることが確認され、担癌マウスへの単回投与(i.t.)により、約 1ヶ月間の腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、アポトーシス阻害因子に対する siRNA を併用することで、より高い抗腫瘍効果が得られた。現在は、脳腫瘍への適用を検討している。本デリバリーシステムは、siRNA の効果を十分に活かすことのできる有効なシステムであり、癌以外にも様々な疾患に応用できると考えている。本シンポジウムでは、これまでの研究成果を報告する。

GS3-4

腎臓プレスポレーション法による新規核酸導入システムの開発 Development of a novel nucleic acid transfection system based on renal press-poration method

○向井 英史¹, 川上 茂¹, 橋田 充¹(¹京大院薬)

生体内核酸導入技術は、今後の生物医学研究及び難治性疾患に対する遺伝子治療や核酸医薬品開発に重要な基盤技術であり、生体内の様々な部位を標的とした導入システム開発が急務である。腎臓は糖尿病性腎症、急性、慢性腎不全及び腎癌等、根治療法の無い疾患が多く存在し、医療上重要な臓器であるにも関わらず、これまでに開発された多くのウイルス及び非ウイルス型の核酸導入システムでは導入効率は低い。これは、腎臓の毛細血管が基底膜を有し、高分子物質の透過性が低いため標的である組織側に対し直接到達することができないことが原因である。

我々は腎臓に軽く1秒間、圧(プレス)を加えることで効率的に遺伝子及び siRNA を導入可能であることを見出した(“プレスポレーション法”)。本方法はウイルスベクターや非ウイルスキャリアを用いない核酸水溶液の導入であるため、免疫応答に起因する毒性はなく安全性が高いと考えられ、導入時において腎機能低下を引き起こさないことを確認した。また、腎臓へ直接注射した場合、核酸導入は注射部位に限局されるが、本方法は腎臓全体へ導入できるという特長を有する。以上、腎臓プレスポレーション法は、簡便かつ安全に腎臓全体へ効率的に核酸導入でき、創薬研究・医療用に汎用的に利用可能な生体内核酸導入法であると考えている。

GS3-5

非ウイルスベクターにおける核内動態制御の重要性 Importance of the intranuclear dispositions of exogenous DNA for non-viral gene delivery

○落合 浩史^{1,2}, 原島 秀吉^{1,2}, 紙谷 浩之^{1,2}
(¹北大院薬, ²CREST・JST)

非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療においては、外来 DNA を細胞核へ送達し、安定に発現させる必要がある。我々の研究室では多機能性エンベロープ形ナノ構造体 (MEND) の開発に成功し、体内動態・細胞内動態の各素過程を戦略的に突破し、核内へ効率的に核酸を送達するキャリアーの基盤を築いている。さらに近年、これまでほとんど明らかにされていなかった外来 DNA の『核内動態』の解明に着手し、非ウイルスベクターが核内動態に大きな課題を残していることを明らかとした。本シンポジウムでは、外来 DNA の核内動態について、我々の研究成果を含めて概説したい。

核内動態の解析に当たっては、plasmid DNA (pDNA) の純粋な挙動を知る目的で、hydrodynamics 法を用いた *in vivo* での解析を試みた。その結果、pDNA が核内到達後に強い転写抑制 (silencing) を受けることを見出し、silencing が DNA のメチル化やヒストン蛋白質との相互作用非依存的に生じることを明かした。このことから、pDNA がウイルスや染色体 DNA とは全く異なる核内動態を示す可能性が示唆される。また、hydrodynamics 法という投与方法自体によって pDNA の発現が大きく亢進することを示し、非ウイルスベクターの設計において、自らの DNA の活性を高め、維持するための核内動態制御システムの開発が必要であることを提唱した。これらの成果が、遺伝子・核酸医薬のための DDS 開発の一助となることを願っている。