

## 論文の内容の要旨

論文題目 筋組織への核酸送達キャリア構築に向けた  
ブロック共重合体及び核酸の化学構造設計と機能評価

氏名 茶谷 洋行

核酸医薬は、疾患部位の標的遺伝子発現を選択的に制御可能なバイオ医薬として、難病への適用が期待されている。投与された核酸分子の速やかな酵素分解が実用化に向けた大きな課題であったが、化学修飾核酸や脂質ナノ粒子への封入技術の発展により、small interfering RNA (siRNA) などのオリゴ核酸が近年相次いで臨床にて承認されている。これまでに承認された核酸医薬の多くは肝臓への効率的な送達を達成している一方で、肝臓(および排泄経路である腎臓)以外の臓器・組織に対する集積量は低いことから、肝臓以外の組織(例えば中枢系、心臓、骨格筋、腫瘍など)へ核酸医薬を効率的に送達するシステムが求められている。特に、筋原性疾患は核酸医薬の大きな標的であり開発候補品も多く存在するが、核酸医薬単体を投与した時の筋組織への送達効率が非常に低いことが課題となっている。核酸医薬が筋組織へ到達するまでの生体バリアとしては、1) 腎排泄(10 nm以下を排泄)、2) 細網内皮系による代謝(主に100 nm以上の粒子や異物を貪食)、3) 連続血管内皮バリア(内皮細胞同士が密着し、高分子透過性が非常に低いが、20 nm程度の小穴が存在)が想定される。これらを回避、あるいは突破して筋組織へと核酸医薬を送達するためには、10-20 nmのサイズに設計された生体適合性に優れた高分子キャリアが有望と考えられる。

負に帯電した核酸医薬は、ポリエチレングリコール(PEG)とカチオン性高分子とのブロック共重合体との間で、粒径数十ナノメートルのポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルを形成することから、核酸送達キャリアとして広く研究されてきた。さらに、PICミセルは最小単位のPIC(ユニットPIC)の二次会合体であり、近年、siRNAとPEG-poly(L-lysine)(PEG-PLys)から調製されたPICは幅広い濃度域で二次会合体を形成せず、単分散なユニットPICを形成することが明らかとなった。特に分岐型PEGとPLysのブロック共重合体(bPEG-PLys)とsiRNAは、既存のナノ粒子製剤(約100 nm)よりも大幅に小さい約18 nmのユニットPICを形成し、厚い間質で覆われた難治がんの腫瘍深部へとsiRNAを送達することに成功している。このユニットPICは、2分子のbPEG-PLysと1分子のsiRNAから形成され、過剰なbPEG-PLys存在下で顕著に高い血中

滞留性を示すことがわかっているが、ブロック共重合体と核酸の化学構造を系統的に変化させた場合のユニットPICの構造、安定性、および体内動態に与える影響は明らかになっていない。そこで本研究では、ユニットPICの構成成分であるブロック共重合体及び核酸の化学構造を精密設計し、形成されたユニットPICの構造と安定性を明らかにすることとした。さらに、得られた（あるいは最適化された）ユニットPICの筋組織への核酸送達キャリアとしての応用可能性を検証した。

まず、カチオン性ブロック共重合体の正電荷数がユニットPICの構造と血中での安定性に与える影響を明らかにするため、様々な重合度のPLys鎖を持つbPEG-PLysを合成し、siRNAとの間でPICを調製した後に構造解析と血中滞留性評価を実施した。siRNAの負電荷数(-40)に対し、その1/4, 1/3, 1/2, 1, 2倍に相当する10, 13, 20, 40, 80の重合度のPLys鎖を持つbPEG-PLysを合成した。一連のbPEG-PLysとsiRNAを様々な混合比(PLys側鎖アミノ基(N)と核酸リン酸基(P)の比; N/P比)で混合し、PICを調製した。蛍光相関分光法(FCS)と流動場分離法(FFF)により調製されたPICの構造を解析した結果、N/P = 1において[bPEG-PLys会合数, siRNA会合数] = [3, 1], [2, 1], [1, 1], [1, 2]となるユニットPICが、PLys重合度10, 13と20, 40, 80のbPEG-PLysの場合にそれぞれ形成され、そのサイズは15-20 nmであった。PLys重合度10および13においては、siRNAとの電荷中和が完全には起きておらず、これはPIC中のPEG鎖同士の立体反発や短いPLysとsiRNAの静電相互作用が弱いことが原因と考えられる。これらのユニットPICをマウスに静脈投与した際の血中滞留性を評価した結果、Lys重合度20のbPEG-PLysを用いたユニットPICの滞留性が最も高かった。さらに、先行研究と同様に過剰なbPEG-PLys存在下、すなわちN/P=10で調製したユニットPICの血中滞留性は、N/P=1と比較して顕著に高く、特に最も短いPLys重合度10の場合が最も高い滞留性を示した。これは、PLys重合度が短いほどbPEG-PLysが安定に血流中を滞留し、動的平衡に基づいてユニットPICを安定化しているものと考えられ、実際にbPEG-PLysの血中滞留性はPLys鎖が短いほど高かった。しかしながら、過剰なbPEG-PLysが血中を滞留し続けると実用上の問題となることが想定されるため、N/P = 1で最も優れた血中滞留性を示したPLys重合度20のbPEG-PLysを以降の評価に用いることとした。

次に、これまで核酸送達キャリアの研究において注目されてこなかった核酸化学構造がPICに与える影響を評価するため、種々の化学修飾核酸を含むsiRNAを封入したユニットPICを調製した。具体的には、天然型核酸(リボースがホスホジエステル(PO)結合で連結された構造)のみで構成されたsiRNA、リン酸基のPO結合に関与しない酸素原子の1つを硫黄原子に変換したPS修飾siRNA、リボースに2'-fluoroないし2'-O-methylを導入したF/OMe修飾siRNA、さらに全ての化学修飾核酸を含むPS/F/OMe修飾siRNAを用いて、ユニットPICの構造解析、酵素耐性及び血中滞留性を評価した。4つのsiRNAはいずれも2分子のbPEG-PLysと1分子のsiRNAから成る2:1ユニットPICを形成することがFCSとFFFから確認された。酵素耐性評価の結果より、PS修飾構造は一定の酵素耐性効果を示した一方で、F/OMe修飾構造は酵素分解を全く受けず、ユニットPICの構造も維持されることが示された。N/P = 1においてユニットPICの血中滞留性を

比較したところ、天然型siRNAと比較して、いずれの化学修飾siRNA封入ユニットPICも顕著な血中滞留性の向上を示した。これらの結果より、化学修飾核酸によってsiRNAの構造（あるいは負電荷数）を保持することがユニットPICの血中安定性向上に寄与することが示唆された。また、酵素耐性が不完全なPS修飾siRNA封入ユニットPICの血中滞留性も高かったことから、PSがPOと比べてPLys鎖と強く静電相互作用する可能性が示唆された。一本鎖PS修飾核酸において、天然型核酸よりもイオン結合性が高いことが分かっていることから、siRNAにおいてもPS修飾がPLys鎖との結合を増強したと考えられる。

これまでの結果を踏まえ、化学修飾siRNAを封入した2:1ユニットPICを用いて筋組織へのsiRNA送達能を検証した。まず、それぞれ蛍光標識したbPEG-PLysとF/OMe修飾siRNAから調製したユニットPICが筋組織に集積する様子を生体内共焦点顕微鏡にて経時的に観察し、血管から漏出したbPEG-PLysとsiRNAがそれぞれ骨格筋へと分布することを確認した。続いて、ユニットPICによる筋組織へのsiRNA送達能を評価するため、ハウスキーピング遺伝子の一つであるhypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) を標的とするF/OMe修飾siRNAを封入したユニットPICをN/P=1にて調製し、マウスに静脈投与して3日後の各臓器のsiRNAの集積量とHPRTの発現量を定量PCRにて測定した。ユニットPIC投与群はsiRNA単体投与群と比較して骨格筋及び心臓でのsiRNAの集積量がそれぞれ約2倍と5倍となり、ユニットPIC投与群のみでHPRTの発現抑制が認められた。さらに、筋組織血管内皮の透過性が亢進していると考えられる筋ジストロフィー疾患モデルマウス (*mdx*マウス) にて同様の評価を実施した。siRNA単体投与群では、正常マウスと同程度のsiRNA集積量であった一方で、ユニットPIC投与群ではsiRNA単体と比べて10倍以上の効率で骨格筋に集積することが明らかになった。これらの結果より、F/OMe修飾siRNA封入ユニットPICは筋疾患への核酸送達キャリアとして有望であることが示された。

以上、本研究ではブロック共重合体の重合度（正電荷数）調節によりユニットPICの構造と安定性を制御できることを明らかにすると共に、核酸化学構造設計によりユニットPICの血中動態を大幅に改善し、筋組織へ核酸医薬を効率的に送達するキャリアの創出に成功した。