

博士論文

論文題目 核酸医薬の実現を目指した生分解性脂質ナノ粒子の開発

氏名 鈴木 裕太

# 博士論文

核酸医薬の実現を目指した  
生分解性脂質ナノ粒子の開発

鈴木 裕太

## 目次

略語表	3
序論	4
RNA 干渉と医薬品応用の歴史	4
核酸送達キャリアの開発	7
第 1 章    IN VIVO で高い遺伝子抑制効果を示す SIRNA-脂質ナノ粒子の開発	10
1.1    イオン化脂質の IN VIVO スクリーニング	10
1.2    高い遺伝子抑制効果を示すイオン化脂質 L021 の同定	12
1.3    同一 PKA を有する L001 および L021 の詳細解析	15
1.4    脂質鎖の最適化	17
1.5    L021-LNP の体内動態	18
1.6    L021-LNP の毒性評価	19
1.7    長期保管安定性試験	20
1.8    考察	21
第 2 章    開発した L021-LNP の物性および取り込みメカニズムの解析	24
2.1    L021-LNP の特性把握	24
2.2    IN VITRO 取り込みにおける APOE の関与	29
2.3    IN VIVO 取り込みにおける APOE の関与	30
2.4    IN VIVO 取り込みにおける LDL 受容体の関与	31
2.5    野生型および APOE 欠損マウスにおける LNP の体内分布	32
2.6    考察	34
第 3 章    げっ歯類・霊長類にて迅速な肝消失を示し毒性を改善した生分解性 LNP の創成	39
3.1    生分解性イオン化脂質 L101 の考案・合成・生物学的評価	39
3.2    細胞内取り込み評価	41
3.3    L101-LNP の体内動態および L101 の生分解性評価	42
3.4    L101-LNP の毒性評価	45
3.5    エステル位置と遺伝子抑制効果	46
3.6    サルにおける評価	47
3.7    サル肝臓中における生分解性の証明	48
3.8    考察	49

結論	53
実験項	54
謝辞	66
論文目録	67
引用文献	68



## 略語表

AST	aspartate aminotransferase
ALT	alanine aminotransferase
ApoE	apolipoprotein E
BSA	bovin serum albumin
BUN	blood urea nitrogen
CAD	corona charged aerosol detector
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMG	dimiristoylglycerol (C14)
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C18)
ED <sub>50</sub>	effective dose 50 (in vivo)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
HPLC	high performance liquid chromatography
IS	internal standard
LDLR	low density lipoprotein Receptor
LNP	lipid nanoparticles
min	minute
MS	mass spectrometry
mRNA	messenger RNA
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	poly acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PDI	polydispersity index
PEG	polyethylene glycol
PK	pharmacokinetics
PLK1	polo-like kinase 1
PLT	platelets
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RBC	red blood cell
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecylsulfonate
siRNA	short interference RNA
SVPD	snake venom phosphodiesterase
T-Bil	Total Bilirubin
TNS	sodium 6-( <i>p</i> -toluidino)-3-naphthalene sulfonate
TTR	transthyretin
v/v	voulume/volume
WBC	white blood cells
wt/wt	weight/weight

## 序論

### RNA 干渉と医薬品応用の歴史

1990 年初頭、異なる 3 つの分野で遺伝子発現を操作しようとする試みがされており、その現象が植物では”co-suppression”<sup>1</sup>、菌では”quelling”<sup>2</sup>、そして線虫では”RNA interference” (RNAi)<sup>3</sup>と呼ばれていた。その後これら全く異なる 3 分野で見いだされた現象が生物種を越えて保存されていることがわかり、さらに 1998 年、外部より意図的に加えた二本鎖 RNA が共通配列を有する対象の messenger RNA (mRNA) を破壊できることが Fire, Mello らにより報告された<sup>4</sup>。詳細なメカニズム研究により、2001 年、哺乳類の細胞において RNAi はわずか 21-23 塩基の短い二本鎖 RNA で引き起こされることが Elbashir, Tuschl らに報告され、この合成核酸は small interfering RNA, すなわち siRNA と名付けられた (Figure 1)<sup>5</sup>。

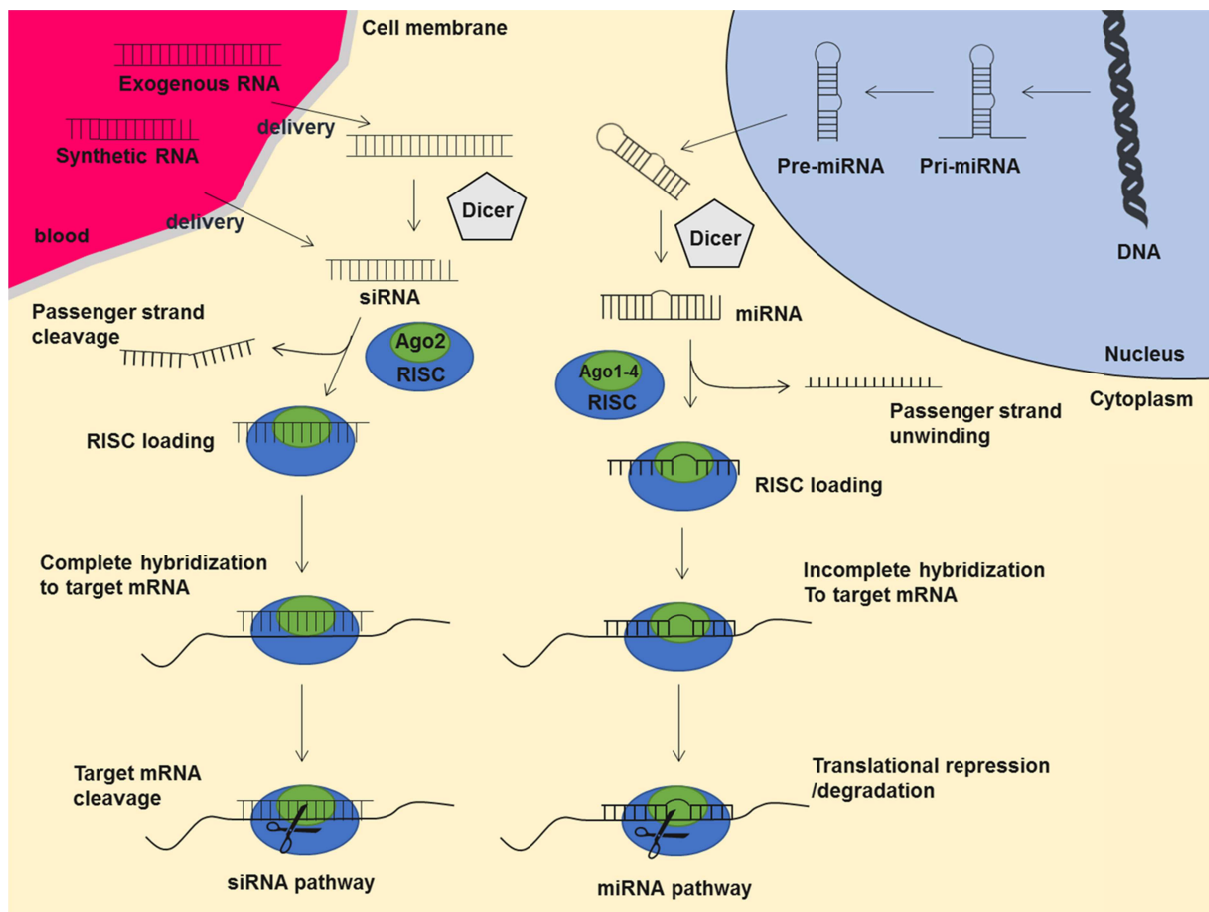


Figure 1 siRNA による RNA 干渉メカニズム。生体内に元来存在する microRNA pathway を利用する。意図的に外部から導入する合成核酸 siRNA の細胞内導入により、標的 mRNA を切断する。現在では標的タンパク質の mRNA 配列から in silico screening

を通じて簡便に効果的な siRNA を設計することができる<sup>6</sup>。siRNA, short interfering RNA; mRNA, messenger RNA.

siRNA は様々な生物に幅広く応用できることから、特定の遺伝子機能を解析する逆遺伝学的手法として急速に発展を遂げた<sup>7</sup>。また siRNA 医薬品は、理論的には内在する全ての疾患原因タンパク質の産生を阻害することができることから、低分子医薬品では困難なタンパク質間相互作用阻害を必要とする転写因子、抗体医薬品では困難な細胞内因子などを狙えうる、すなわち既存の創薬アプローチでは困難な創薬が可能になると期待された<sup>8</sup>。siRNA の発明のわずか3年後である2004年、加齢黄斑変性を適応とした vascular endothelial growth factor, VEGF (血管内皮細胞増殖因子) に対する天然型 siRNA (Cand5; Bevasiranib) を眼内注射する世界初の臨床試験が米 Opko Health 社により実施された<sup>9</sup>。RNAi が急速に発展を遂げた功績をたたえられ、Fire, Mello は2006年にノーベル生理学賞を受賞した<sup>10</sup>。主に遺伝子操作ツールとして利用された RNAi の発見期から、時代は医薬品応用へと舵を切り始めた<sup>11</sup>。当時、高い技術力を保有していた SiRNA 社を Merck 社が US\$1.1B で買収、siRNA の広範かつ独占的な特許群を保有する Alnylam 社に Pfizer 社が US\$300M の投資を行うなど、製薬企業が siRNA 創薬に次々と巨額投資を行い、RNAi 創薬は空前の投資ブームを迎えた (Figure 2)<sup>12</sup>。1990年代から2000年代にかけ急速に発展し、2015年世界医薬品売上ランキング Top10 のうち6品を占めるようになった抗体医薬品 (引用: IMS ジャパン社調べ) に継ぐ新しい創薬モダリティとして siRNA はますます注目を集めていった。

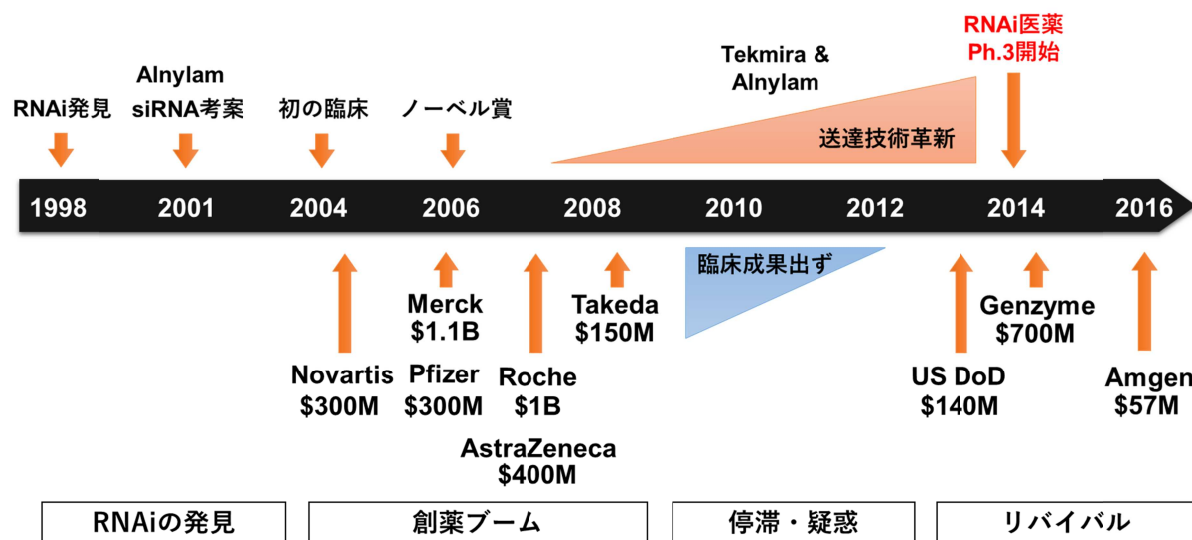


Figure 2 RNA 干渉と医薬品開発の歴史は大きく4つの段階に分けられる。RNAi 現象と RNAi の発見(1998-2004)、siRNA 創薬への期待と製薬企業による創薬ブーム(2005-2008)、相次ぐ臨床試験失敗による siRNA 創薬への疑惑と停滞(2009-2012)、送達技術の躍進に基づくリバイバル(2013-現在)。文献<sup>12</sup>を参考に自作。RNAi, RNA interference.

しかし 2005-2008 年に過熱した投資ブームは、その直後に停滞を迎える<sup>12</sup>。加齢黄斑変性を適応とする siRNA (Acuity/Opko 社の Cand5、Sirna 社の Sirna-027、Quark/Pfizer 社の PF-4523655)<sup>13</sup>、肺感染 RSV ウイルスに対する siRNA (Alnylam 社の ALN-RSV01)<sup>14</sup> など複数の臨床試験が有効性を示さず頓挫し、次第に RNAi 創薬は疑念を持たれ始めた。その根本的な原因は、siRNA の医薬品応用に向けて越えるべき 2 つの大きな課題にあったと考えられている。第 1 の課題は、天然型 siRNA による自然免疫応答であった<sup>15</sup>。初期に行われた臨床試験や非臨床試験において、RNAi に基づく薬効と信じられていたものは、実は天然型 siRNA により引き起こされた自然免疫応答、すなわちアーティファクトであったとされている<sup>16</sup>。その後 Judge らは、2'-OMe RNA 化学修飾により siRNA が Toll-like 受容体認識を免れ、自然免疫応答が回避されると報告した<sup>17-19</sup>。これら siRNA の化学修飾による自然免疫応答回避により、1 つめの課題は比較的早期に解決された。第 2 の課題は「ほとんどの企業はこの越えられない課題のために RNAi 創薬から撤退を余儀なくされた」核酸の細胞内送達であった<sup>20</sup>。siRNA の比較的大きなサイズ (13 kDa)、リン酸バックボーンの負電荷による著しく低い細胞膜透過性、血中ヌクレアーゼによる siRNA の分解などにより、siRNA の細胞内送達は困難を極めた。さらには RNAi 創薬の初期に行われたほとんどの臨床試験は、目や肺などへ直接核酸を打つ局所投与であり、siRNA の全身投与は更に難しい状況であった。当初革命的な創薬モダリティとして注目を集めた siRNA であったが、幅広い疾患に応用し、生体内で作用させる医薬品として実現させるためには、全身投与の細胞内送達技術の開発が必須であった。

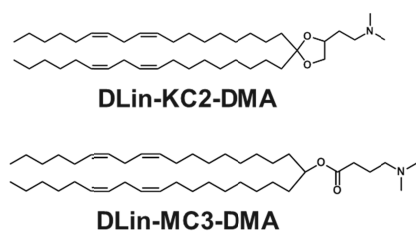
この中で 2006 年、Zimmermann らはヒトに近い動物であるカニクイサルで全身投与可能な siRNA による長期遺伝子抑制効果の研究結果を Nature 誌に発表した<sup>21</sup>。ここで siRNA 送達に用いられたのは脂質ナノ粒子 (Lipid nanoparticles, 以下 LNP) と呼ばれ、後の核酸送達キャリア技術の基礎を築いている<sup>22</sup>。その後 LNP は速やかに臨床応用され、肝がん適応で PLK1 を標的とする TKM-PLK<sup>23</sup>、高コレステロール血症適応で PCSK9 を標的とする ALN-PCSK<sup>24, 25</sup>、エボラ出血熱適応でエボラウイルスを標的とする TKM-Ebola<sup>26</sup> などの複数の臨床研究が開始された。また 2011 年に開始された全身神経疾患 TTR アミロイドーシス適応で TTR を標的とする ALN-TTR02<sup>27</sup> は、2014 年に最終臨床研究段階である Phase 3 に到達した。これら送達技術の飛躍的な進歩を受け、2014 年に Genzyme 社が Alnylam 社に US\$700M、2016 年に Amgen 社が Arrowhead 社に US\$57M の投資を行うなど、2008-2011 年に停滞期を迎えていた RNAi 創薬は、2011 年以降リバイバルフェーズへと転換したと言われている (Figure 2)。2017 年 1 月時点の最新の報告によれば、先の ALN-TTR02 の Phase 2 Open-label extension 結果において、siRNA および LNP の良好な忍容性と、疫学的比較による有望な治療効果が確認され、2017 年度内の NDA 申請を予定していると報告された。以上より、RNAi 現象の発見から、製薬企業による相次ぐ投資ブーム、

度重なる臨床試験失敗による停滞・疑惑、更には核酸送達技術の発展に基づくリバイバルフェーズの約 20 年を経て、今正に siRNA が医薬品になろうとしている。そこで我々は、医薬品化を実現するのに中核となる核酸送達キャリアに着目し、新規技術開発を行うことにした。

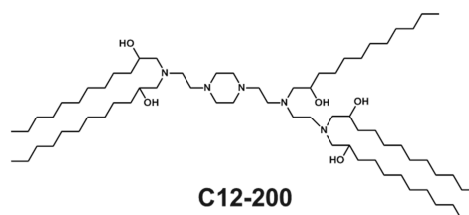
## 核酸送達キャリアの開発

我々の目標は、全身性投与により生体内効果を発現する siRNA 送達キャリアを創成することである。また HBV や HCV などのウイルス性肝炎、TTR アミロイドーシスなどのオーファン疾患、PCSK9 が関与する代謝経路に関わる疾患、あるいは肝細胞がんや肝線維症など、肝臓由来の疾患原因タンパク質の過剰が要因である疾患、または肝臓の回復を目標とする疾患が多いことから、肝標的の送達技術の創成を目標とした。現在までに、ウイルスベクター<sup>28</sup>、化学および酵素安定性を高めた自己送達型 RNA<sup>29</sup>、ペプチド修飾<sup>30</sup>、抗体修飾<sup>31-33</sup>、ポリマー修飾<sup>34</sup>、デンドリマーによるナノ粒子<sup>35</sup>、無機物質によるナノ粒子<sup>36</sup>、ポリマーミセル<sup>37</sup>、リポイドベースの脂質ナノ粒子<sup>38-42</sup>、イオン化脂質ベースの脂質ナノ粒子<sup>21, 43</sup>、など数多くの研究報告がされてきた (Figure 3)。

### Ionizable Lipid



### Lipidoid



### GalNac Ligand

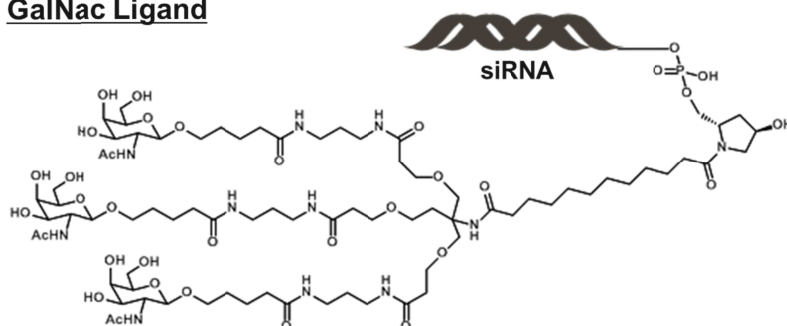


Figure 3 核酸送達技術の例。広く普及している技術として、脂質ナノ粒子を形成させるイオン化脂質およびリポイド、siRNA に標的リガンドのトリアンテナ型 GalNac を修飾した GalNac-siRNA を記した。図中の DLin-MC3-DMA は、2017 年現在 Phase 3 臨床試験中の ALN-TTR02 に用いられている。GalNac-siRNA は ALN-TTRsc, ALN-PCSSc など複数の臨床試験に用いられている。GalNac, N-acetylgalactosamine.

この中でも GalNAc 技術および LNP 技術は、複数のヒト臨床試験で一定の効果と安全性が確認されており、特に発展している技術といえる。GalNAc 技術とは、アジアログライコレセプターを標的とする糖リガンド GalNAc をトリアンテナ化し siRNA に直接修飾したりリガンド修飾型の siRNA である<sup>44, 45</sup>。皮下投与が可能で、投与後肝臓に集積し、アジアログライコレセプターによるエンドサイトーシスにより siRNA を細胞内に取りこんだ後、RNAi を発現する。技術としての課題は、高い投与量に基づくコストと毒性である。

一方、LNP 技術は pKa 7 以下の三級アミンを有する pH 応答型のイオン化脂質を主要とするナノ粒子製剤である (Figure 4)<sup>46</sup>。LNP は、血中 (pH 7.4) の電荷的中性状態から、細胞内に取り込まれたエンドソーム (pH 5.5) 内の正電状態へと表面電荷を変化させる。正に帯電した LNP は、エンドソーム内膜の負電荷リン脂質と相互作用し、ヘキサゴナル II 構造を介して膜融合を起こし、内包した核酸を細胞質へと放出させる (Figure 5)。効率的な細胞内送達には、イオン化脂質の適切な pKa と、ヘキサゴナル II 構造を引き起こしやすい脂質鎖構造が重要だと考えられている。技術としての課題は、イオン化脂質に基づく肝毒性である。

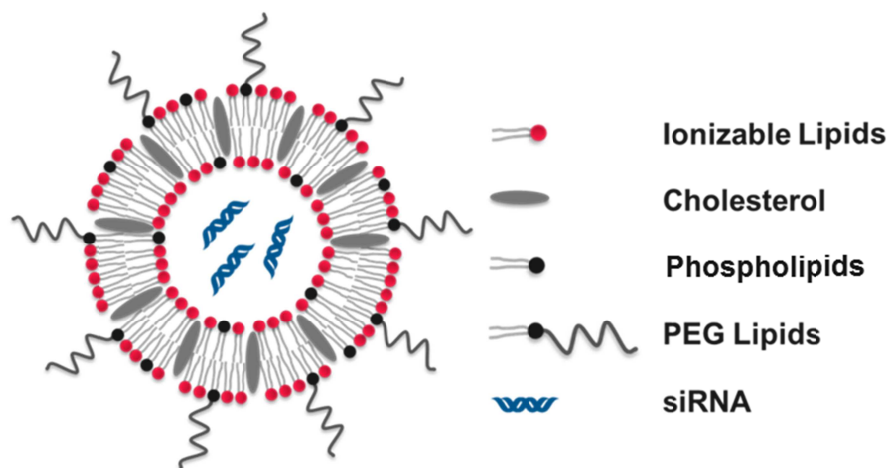


Figure 4 核酸送達キャリア LNP の概念図。pH 応答型イオン化脂質、リン脂質、コレステロール、PEG 脂質および siRNA により直径約 100 nm のナノ粒子が構成される。リン酸バックボーンを負電荷と正に帯電したイオン化脂質の静電的相互作用により、核酸をその内部に内包する。内封核酸は siRNA 以外にも antisense<sup>47</sup>、microRNA<sup>48</sup>、mRNA<sup>49</sup>などを内封することが出来る。LNP, lipid nanoparticles; PEG, polyethylene glycol



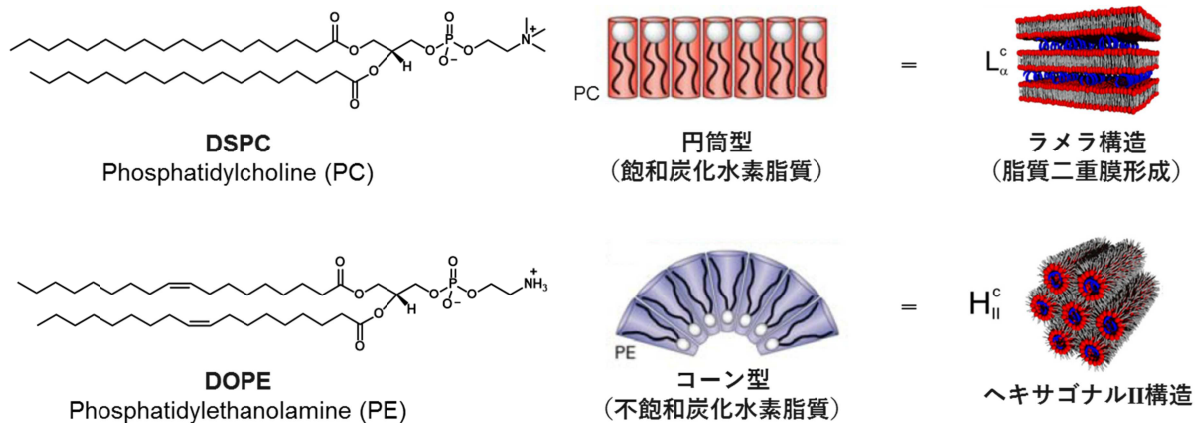


Figure 5 脂質と膜構造。リン脂質には円筒型を取りやすい phosphatidylcholine (PC) およびコーン型を取りやすい phosphatidylethanolamine (PE) がある。本研究で開発するイオン化脂質はコーン型を取りやすい脂質構造を採用している。エンドソームの低 pH 環境下で正に帯電するイオン化脂質と、エンドソーム膜の負電荷リン脂質が静電的に相互作用し、ヘキサゴナル II 構造を介して LNP はエンドソームと膜融合する。膜融合後、LNP 内部に封入されていた siRNA が細胞質へ放出され、RNAi による遺伝子発現抑制を経て、薬効を発現する。代表的な脂質として、1,2-Dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) および 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) の化学構造を示す。

現在までに報告されたイオン化脂質は、生体内に存在するリン脂質と同様に、ほとんどが対称型の脂質鎖構造を有している。一部の報告では、非対称型脂質鎖を有するイオン化脂質が高い遺伝子抑制効果と十分な安全性を示したものの、保管時に粒子が増大し活性が低下する課題があると報告されている<sup>50</sup>。これは脂質の短鎖化により LNP 内のパッキングに関する疎水性相互作用が低下したためと推察された。医薬品開発において、医薬品の有効性、安全性を保つ製造品質管理は極めて重要であり、長期間保管でも安定な LNP を創成する必要がある<sup>51</sup>。LNP の遺伝子抑制効果、安全性だけでなく、保管安定性も含めた総合的な評価を行った報告例はほとんどない。

本学位論文では、非対称型脂質鎖を有するイオン化脂質の開発について報告する。第 1 章では、オリジナルの脂質ライブラリからスクリーニングした新規イオン化脂質の発見と、その保管安定性評価について報告する<sup>52</sup>。第 2 章では、見いだした LNP が生体内で機能するメカニズム解析について報告する<sup>53</sup>。第 3 章では、イオン化脂質によりもたらされる肝毒性に着目し、核酸送達の役目を果たした後に、速やかに生体内から代謝される生分解性脂質ナノ粒子の開発について報告する。

# 第 1 章 IN VIVO で高い遺伝子抑制効果を示す SIRNA-脂質ナノ粒子の開発

## 1.1 イオン化脂質の IN VIVO スクリーニング

In vivo にて高い遺伝子抑制効果を示す LNP を見出すため、Figure 6 に示すイオン化脂質のライブラリを準備した。イオン化脂質は脂質鎖とヘッドグループがコンジュゲートした形である。一般的に脂質鎖には、対称型の脂質鎖が用いられてきたが、本研究では非対称型の構造を考案した<sup>46, 54</sup>。またヘッドグループには、3 級アミンを有し、脂質鎖との接続にアミドあるいはエステルを用いた構造を考案した。これら新規に合成したイオン化脂質のスクリーニングとして、マウス肝実質細胞内の遺伝子抑制を指標とした評価系を用いた。具体的には、血液凝固因子として知られる Factor VII をモデル遺伝子として用いた<sup>46</sup>。Factor VII は肝臓でのみ合成され、血中に分泌されるタンパク質である。血中 Factor VII 濃度は市販のキットにより簡便に測定できることから、Factor VII を標的とする siRNA を用いることで、脂質間の遺伝子抑制効果を比較できる (Figure 7)。

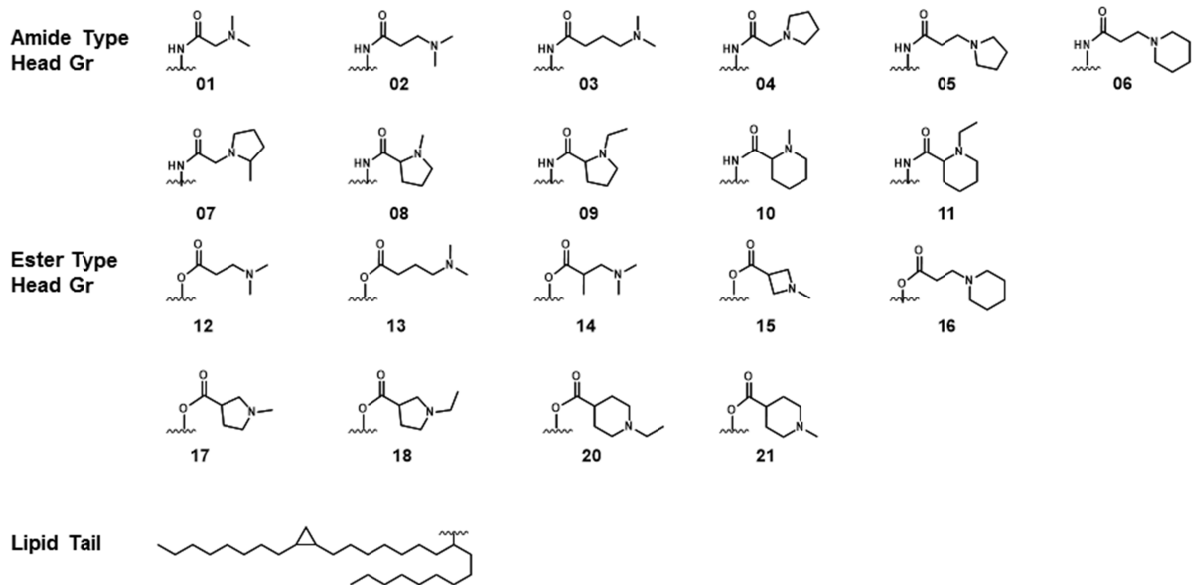


Figure 6 イオン化脂質ライブラリ。ヘッドグループをアミド型、エステル型に分類。ヘッドグループを除いた脂質鎖は、特徴的な非対称型の構造に固定。



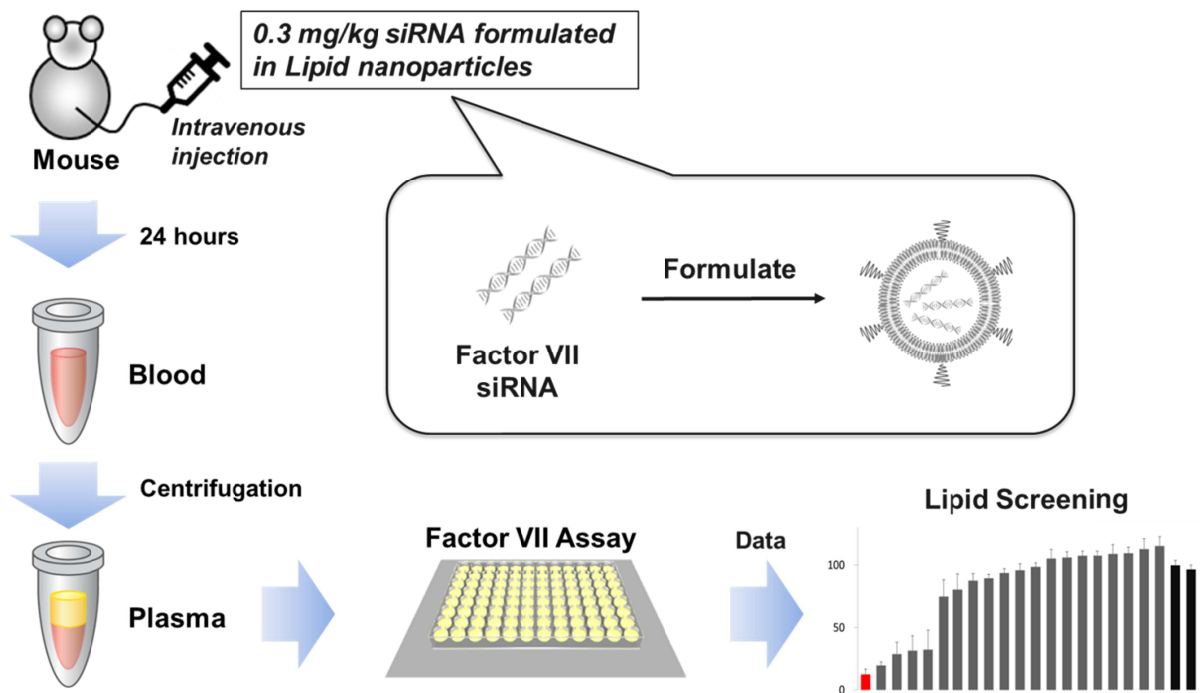


Figure 7 イオン化脂質スクリーニングの概念図 (Factor VII マウスモデル)。血液凝固因子 Factor VII は肝臓特異的に産生され血中に分泌されるタンパク質。Factor VII を標的とする siRNA を、Figure 6 に示す各イオン化脂質を用いてナノ粒子化する。マウスに尾静脈投与し、24 時間後に採血をする。血漿中の Factor VII 濃度を測定することで、脂質間のノックダウン効果の比較を行う。ナノ粒子の調製方法は Figure 14 を参照。以下、LNP の遺伝子抑制効果を測定する本試験を「Factor VII マウスモデル」と称する。

Factor VII siRNA を、イオン化脂質、コレステロール、リン脂質の 1,2-ジステアロイルグリセロール-3-ホスファチジルコリン (以下、DSPC)、分子量 2000 の PEG を有する脂質の PEG-DMG (別名 mPEG2000-DMG) を用いて LNP を調製した。なお脂質構成成分において、イオン化脂質は血中とエンドソーム内の pH 変化に対応して siRNA を細胞内に送達させる役割、DSPC およびコレステロールは PBS 溶媒中および血中において LNP を安定化させる役割、PEG 脂質は粒子間の凝集抑制の役割を持つ。

合成した全てのイオン化脂質は、粒子径が 60-100 nm および siRNA の粒子内部への封入率が 90%以上の良質な LNP を形成した。スクリーニングとして、マウスに 0.3 mg/kg siRNA となるよう各 LNP を尾静脈投与した。投与 24 時間後の血漿中に残存する Factor VII 濃度を指標とし、有望なイオン化脂質をスクリーニングした (Figure 8a)。脂質ライブラリの中で、L017、L021 を含む一部の脂質群は、血中の Factor VII を 50%以上抑制することに成功した。次に遺伝子抑制が Factor VII siRNA に由来することを確認するため、マウスには反応しないヒト polo-like kinase 1, PLK1 遺伝子に対する hPLK1 siRNA を Control siRNA として、高い効果を示した L021 を用い

て LNP 化し、マウスに尾静脈投与した。その結果、PBS 投与群と比較して、血中 Factor VII 濃度の減少は全く見られなかった。これより Factor VII の抑制は、たしかに Factor VII siRNA のオンターゲット効果によることが示された。

LNP の肝実質細胞内への送達は、エンドソーム内の pH が低下するに伴ってイオン化し、LNP とエンドソームが膜融合することによって達成されると報告されている<sup>38, 46, 55</sup>。そこで pH 変化に基づいて蛍光波長が変化する TNS 試薬を用いて、LNP 中におけるイオン化脂質の pKa を測定（以下 TNS assay と呼ぶ）し、遺伝子抑制効果との構造活性相関図を作成した（Figure 8b）。その結果、高い遺伝子抑制効果を示す脂質は pKa 6.0 – 6.6 を示した。興味深いことに、一部のアミド型ヘッドグループを有する脂質群が pKa 6.0 – 6.6 を有しているにもかかわらず、エステル型ヘッドグループを有する脂質群のみが高い活性を示すことが判明した。

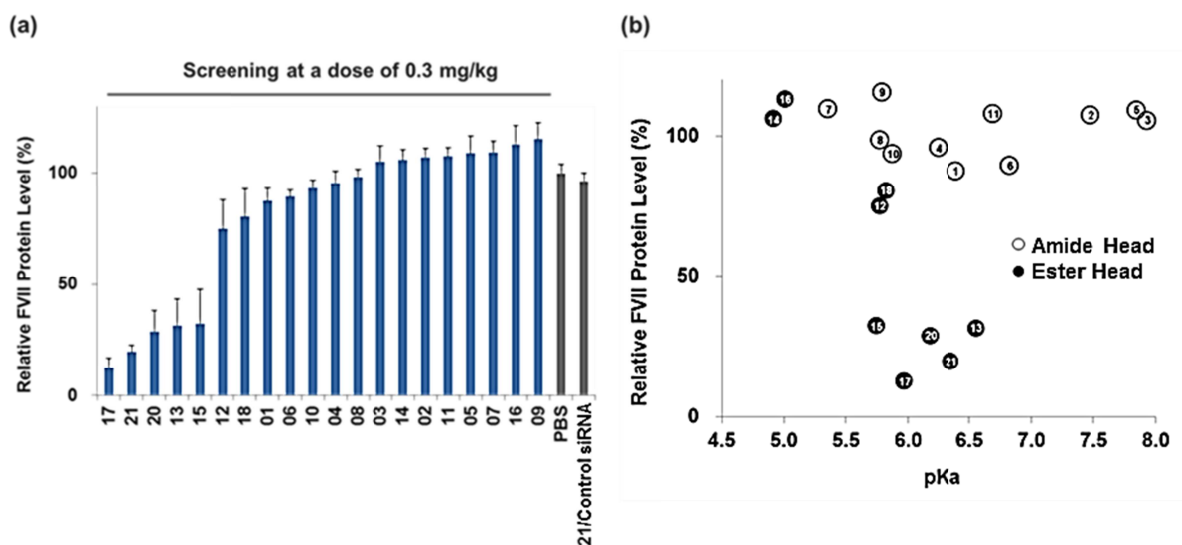


Figure 8 In vivo における遺伝子抑制効果を指標としたイオン化脂質のスクリーニング。(a) Factor VII siRNA と各イオン化脂質を用いて LNP を調製した。C57/BL6 マウス (n=3-4/group) に 0.3 mg/kg siRNA となるよう尾静脈投与した。投与 24 時間後、血漿中の Factor VII 濃度を測定し、PBS 投与群に対する相対濃度を算出した。Control siRNA としてマウスには反応しない hPLK1 siRNA を用いた。(b) pKa と Factor VII ノックダウン効率の相関図。TNS assay によって測定した pKa を横軸、図(a)で得られた Factor VII 相対濃度を縦軸とし、各脂質をプロットした。ヘッドグループの分類として黒丸、エステル型；白丸、アミド型。丸印に記載した番号は Figure 6 に示した脂質を表す。PLK1, polo-like kinase 1.

## 1.2 高い遺伝子抑制効果を示すイオン化脂質 L021 の同定

スクリーニングにより得られた上位 2 脂質の L017、L021 について、投与量依存試験を実施した（Figure 9a）。その結果、投与量依存的に遺伝子が抑制されることが確認され、その 50%抑制効果（Effective Dose 50, ED<sub>50</sub> 値）は約 0.02 mg/kg であった。

この極めて低い値は、現在までに報告されている核酸送達キャリアの中でも、最高レベルである<sup>40,46</sup>。

肝実質細胞の遺伝子抑制効果は、LNPに含まれるPEG脂質の量によって影響を受けることが報告されている<sup>56</sup>。静脈投与後のLNPは、血中のApolipoprotein E (ApoE)が粒子表面に吸着し、肝実質細胞上に高発現しているLow Density Lipoprotein Receptor (LDLR)から取り込まれることが報告されている<sup>57</sup>。粒子凝集抑制のために使用されているPEG脂質が多い場合に、ApoEの粒子表面への吸着が妨げられる結果、肝実質細胞への送達量が減り、結果的に遺伝子抑制効果が減弱すると推察された。そこで更なる遺伝子抑制効果の向上を目指して、L021-LNPのPEG脂質含有量1.5 mol%を、0から1 mol%まで減らしたLNPを調製した (Table 1)。LNPは以下の構成成分として処方した；L021/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG；60/8.5/31.5-x:x, mol/mol。まずPEG脂質を全く含まない場合は、粒子形成直後に凝集し、良質なLNPが形成されなかった。次にPEG脂質を0.25から1 mol%まで変化させたところ、粒子径が96 nmから75 nmのLNPが形成された。いずれもsiRNA封入率が90%を越え、また粒子の均一性を示すpolydispersity index (PDI)が0.20以下であったことから、良質なLNPであることが確認された。次に投与量を0.02 mg/kg siRNAとして遺伝子抑制効果を比較したところ、PEG脂質含有量の減少に伴って、遺伝子抑制効果の向上が確認された (Figure 9b)。

次に5員環ヘッドを有するL017、6員環ヘッドを有するL021のpKaをTNS assayにて測定したところ、それぞれpKa 6.0、pKa 6.4を示した (Figure 9c)。これはイオン化脂質のpKaが6.4の際に、最も遺伝子抑制効果が高いという報告例とほぼ一致した<sup>46</sup>。次にFactor VII siRNAを内包したL021-LNPをマウスに投与後7日間までの遺伝子抑制効果を確認した (Figure 9d)。その結果、0.1 mg/kgという低用量においても少なくとも投与7日後まで標的タンパク質の産出が抑制されていることが確認された。

以上より、新規にスクリーニングした脂質群において、L017、L021によって形成されるLNPは、肝実質細胞の遺伝子を低投与量にて強くかつ長く抑制できることを示した。

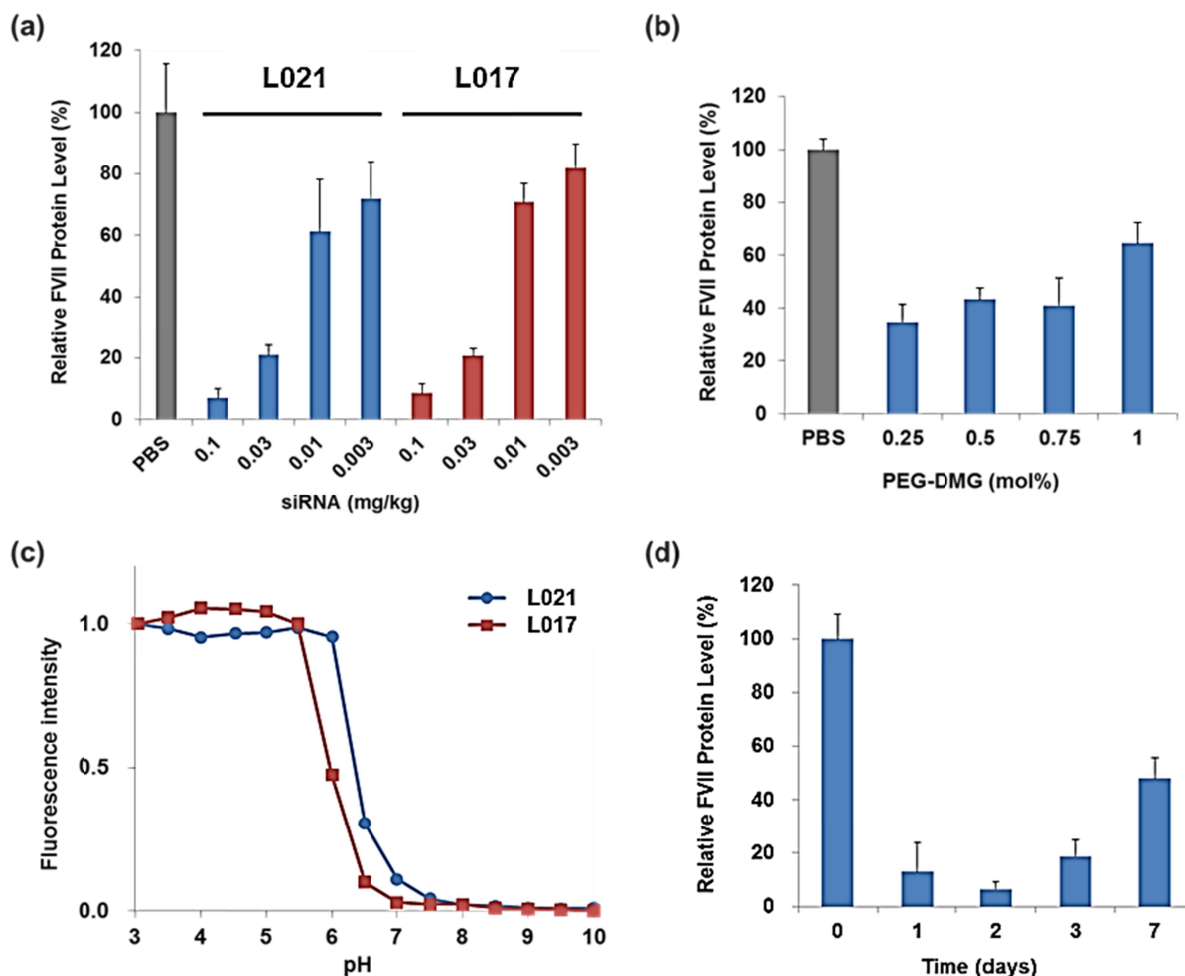


Figure 9 高い遺伝子抑制効果を示すイオン化脂質の解析。(a) L017 および L021 の投与量依存的な遺伝子抑制効果。(b) L021-LNP 中の PEG 脂質の割合が遺伝子抑制効果に与える影響(0.02 mg/kg siRNA 投与)。(c) TNS assay に基づく L017 および L021-LNP の pKa 測定。(d) L021-LNP の遺伝子抑制効果の持続期間。マウス(n=3-4/gourp)に 0.1 mg/kg siRNA となるよう LNP を尾静脈投与後、1, 2, 3 および 7 日後にマウスを屠殺した。未処置群の Factor VII 濃度を 100%として、血漿中の Factor VII 相対濃度を算出した。PEG, polyethylene glycol; TNS, sodium 6-(p-toluidino)-3-naphthalene sulfonate.

**Table 1** LNP 中の PEG 脂質の量が粒子径と siRNA 封入率に与える影響

PEG-DMG (mol%)	0	0.25	0.5	0.75	1
Z-average (nm)	- <sup>a</sup>	96	88	79	75
PdI	-	0.10	0.11	0.14	0.12
siRNA encapsulation	-	>90%	>90%	>90%	>90%

a: LNPs were not formed due to aggregation

### 1.3 同一 pKa を有する L001 および L021 の詳細解析

アミド結合を有する L001 とエステル結合を有する L021 はほぼ同等の pKa 6.4 を有するものの、遺伝子抑制効果に大きな差が見られた (Figure 8b)。その要因を解明すべく、2 脂質について更なる詳細解析を実施した。まず 2 脂質の遺伝子抑制効果を Factor VII マウスモデルにて比較したところ、L021 は  $ED_{50} = 0.02$  mg/kg siRNA、L001 は  $ED_{50} = 0.6$  mg/kg siRNA であり、その差は約 30 倍であった (Figure 10a)。次に LNP の取り込みに関わる ApoE (第二章にて細胞内取り込みに ApoE が関与することを証明した) の吸着量を調べた。L001-LNP および L021-LNP に対して、マウス血清の添加前後の粒子径を測定したところ、どちらの LNP も同程度の粒子径増加が確認された (Figure 10b)。また血清混合後、LNP をサイズ排除クロマトグラフィーで分取後、ウエスタンブロッティングにより LNP に吸着した ApoE を定量したところ、いずれも同程度の ApoE が確認された (Figure 10c)。これより、粒子に吸着する ApoE 量に顕著な差はないことが推察された。次に肝細胞がん株である Huh7 に対し、蛍光色素修飾 siRNA を内封した LNP を添加し、経時的な取り込み量を蛍光顕微鏡観察した (Figure 10d)。その結果、L021-LNP は L001-LNP に比較して優位に顕著な取り込みを示した (Figure 10e)。これより、siRNA の細胞内取り込み量が異なるため、L021-LNP は L001-LNP に比較して、高い活性を示すことが明らかとなった。

L001-LNP および L021-LNP の LNP 上の ApoE 吸着量は同程度であったが、ApoE のトポロジーは異なる可能性がある<sup>58</sup>。すなわち、L021-LNP においては ApoE は LDLR への親和性が高くなるような活性型コンフォメーションを取って吸着し、細胞内取り込み量が増している可能性が考えられる。本件を解明するには、NMR などによる L021-LNP および L001-LNP 上の ApoE の立体構造の解明が鍵となるであろう。一方で、2 つの LNP 上の ApoE のトポロジーも同様である場合は、エンドソーム脱離の点で、L021 はより高い脱離能を有していると考えられる。アミドを有する脂質は、脂質間の膜内水素結合により、より安定な膜を構成すると報告されている<sup>59</sup>。L001 は、pH が低下したエンドソーム内にて崩壊しにくく、結果としてエンドソーム脱離が行われにくいと推察される。

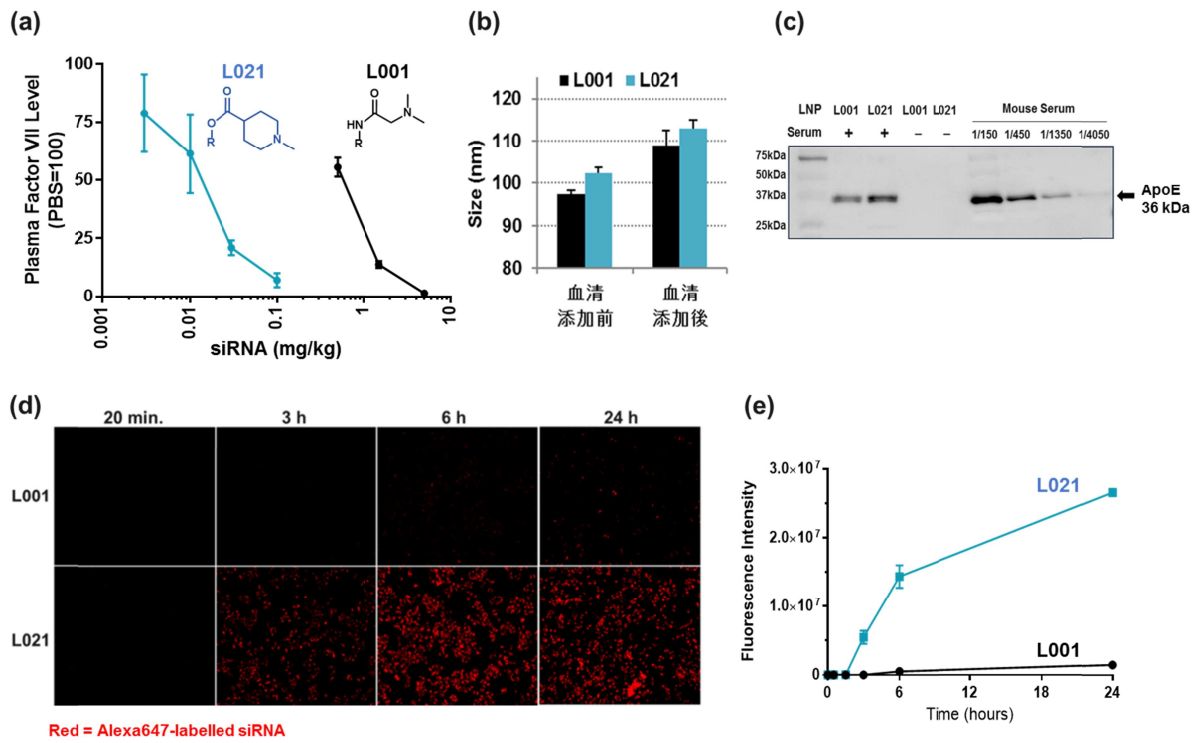


Figure 10 同一の pKa を有する L001 および L021 の比較。(a) Factor VII マウスモデルにおける遺伝子抑制効果。(b) マウス血清添加前後の LNP 粒子径。(c) LNP をサイズ排除クロマトグラフィーで分取後、ウエスタンブロッティングにより LNP に吸着した ApoE を定量。(d) 蛍光色素修飾 siRNA を内封した LNP を Huh7 細胞に添加し、経時的に蛍光顕微鏡観察を実施。(e) 蛍光強度をグラフ化。LNP 構成成分は以下：イオン化脂質/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG = 60/8.5/30/1.5, mol/mol

## 1.4 脂質鎖の最適化

更なる遺伝子抑制効果の向上を目指して、脂質構造の最適化を実施した。合成したイオン化脂質において、アルキル鎖が C9 である部位を Short lipid tail と呼び、アルキル鎖の長さを最適化した (Figure 11a)。Short lipid tail が C7 から C12 を持つイオン化脂質を新規に合成し、それぞれ遺伝子抑制効果を測定した (Figure 11b)。その結果、C8 および C9 において遺伝子抑制効果が最大となることが確認された。これより C9 を有する L021 をリード化合物とし、更なる解析を実施することにした。

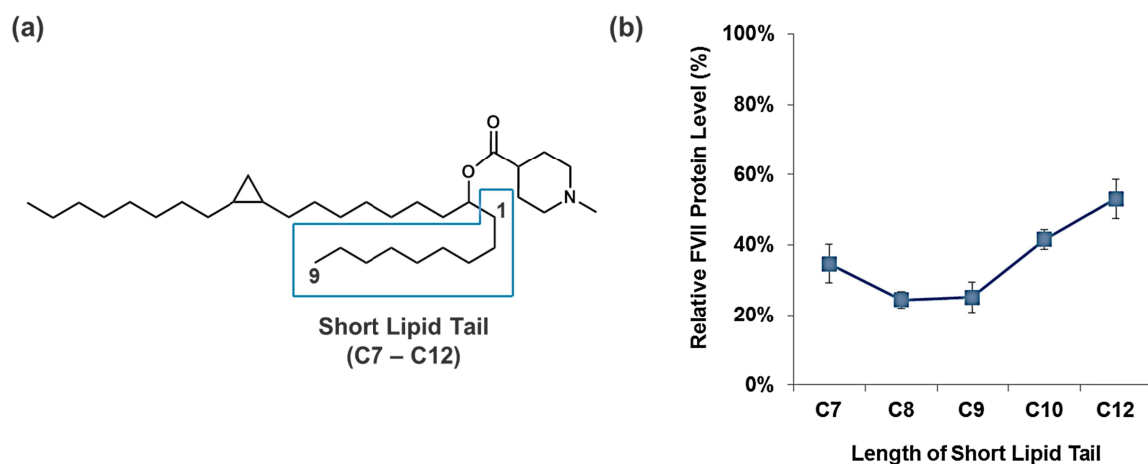


Figure 11 脂質鎖の構造最適化。(a) アルキル鎖を C7 から C12 まで変化させた。図は C9 を持つ L021 (b) Factor VII マウスモデルにおける遺伝子抑制効果。マウス (n=4/group) に 0.1 mg/kg siRNA となるよう LNP を尾静脈投与後、24 時間後にマウスを屠殺した。PBS 投与群の Factor VII 濃度を 100%として、血漿中の Factor VII 相対濃度を算出した。LNP 構成成分は以下：イオン化脂質/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG = 60/8.5/30/1.5, mol/mol

## 1.5 L021-LNP の体内動態

次に L021-LNP のマウス体内動態を測定した。0.1 mg/kg siRNA となるようマウスに LNP を投与した後、4 時間にわたって血漿および肝臓に残存する L021 を HPLC-MS によって測定した。血漿中では投与 1 時間後に投与量の 3% 以下、4 時間後には 1% 以下となり、極めて速やかに全血中から消失することが確認された (Figure 12a)。また、投与量の 64% が約 10 分で肝臓に送達され、1 時間後には 84% が蓄積することが確認された (Figure 12b)。このデータから、LNP が極めて効率よく肝臓へ送達されることが示された。

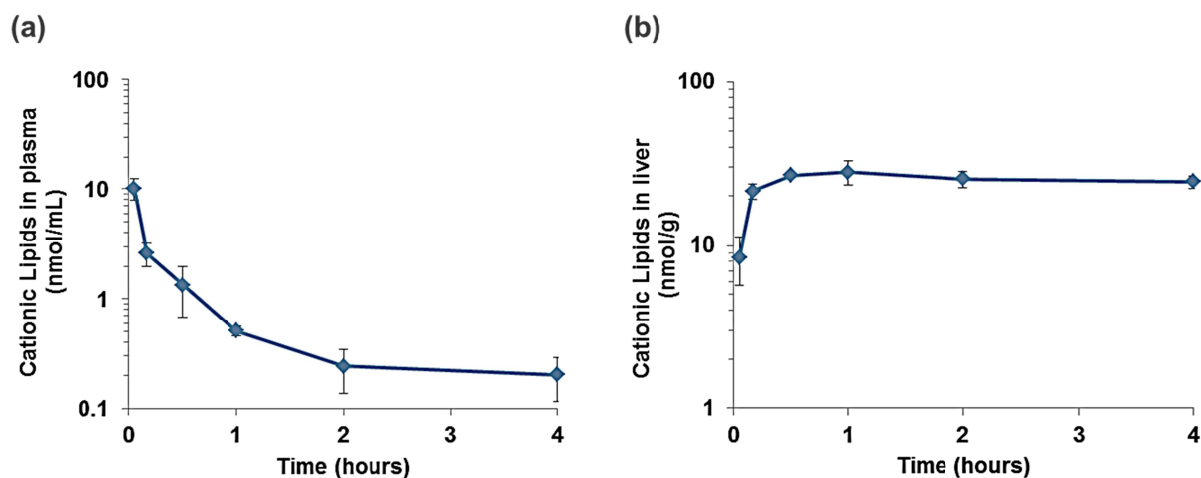


Figure 12 血漿中および肝臓中の L021 濃度推移。マウス (n=4/group) に 0.1 mg/kg siRNA となるよう L021-LNP を尾静脈投与後、0.05, 0.17, 0.5, 1, 2 および 4 時間後にマウスを屠殺した。実験項に記載の方法に従って、血漿および肝臓に残存する L021 を測定した。



## 1.6 L021-LNP の毒性評価

医薬品は有効性と安全性の両面が重要であり、とりわけ siRNA の送達を補助するキャリアは、カチオン性素材の生体タンパク質への非特異吸着により毒性が生じやすいことから、安全性評価が極めて重要となる<sup>60</sup>。また先に得られた結果から、LNP の 80%以上が肝臓へ集積し、かつ細胞内タンパク質への非特異吸着が予想されることから、肝毒性が懸念としてあげられた。そこで siRNA を含有する L021-LNP の毒性評価を実施した。LNP の毒性評価では、齧歯類の中で最も低用量で毒性が表れることが報告されているラットを使用した<sup>61</sup>。なお我々の研究でも、マウスよりもラットが低用量で毒性が表れることを確認している。siRNA のオンターゲット効果に基づく毒性の懸念を考慮して、ヒトのみに反応する hPLK1 siRNA を用いた。すなわちラットにとっては、いずれの遺伝子も抑制しない control siRNA となる。なお LNP は siRNA の負電荷とイオン化脂質の正電荷の静電的相互作用によって形成されるため、siRNA なしでは粒子が形成されない。すなわち siRNA を含まない LNP 単独での毒性評価はできない。

ラット (n=3/group) に PBS あるいは LNP を 1 または 2 mg/kg siRNA となるよう尾静脈投与し、24 時間後に採血を実施した。毒性評価として血液検査 (生化学、血液学) および状態観察を行った (Table 2)。その結果、ED<sub>50</sub> 値である 0.02 mg/kg の 100 倍である 2 mg/kg siRNA 投与時において、PBS 投与群と比較して、肝臓毒性を示す AST, ALT のわずかな上昇を認めたものの、総合して顕著なパラメータ変化は確認されなかった。また状態観察においても、PBS 投与群と比較して、顕著な変化は確認されなかった。これより、新規に開発した L021-LNP は、in vivo において十分な安全性を有することが示された。

**Table 2** ラット単回投与毒性評価と血液検査

Dose <sup>a</sup>	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	WBC 10 <sup>3</sup> /μL	RBC 10 <sup>6</sup> /μL	Hemoglobin g/dL	PLT 10 <sup>3</sup> /μL
–	105 ± 20	44 ± 4	17.0 ± 1.5	8.5 ± 1.4	6.3 ± 0.3	12.2 ± 0.4	994 ± 14
1 mg/kg	99 ± 8	44 ± 1	18.2 ± 3.0	7.2 ± 2.8	5.9 ± 0.4	11.8 ± 0.6	922 ± 6
2 mg/kg	148 ± 22	70 ± 8	16.8 ± 0.5	7.7 ± 0.5	6.4 ± 0.0	12.7 ± 0.3	940 ± 62

a: Non-targeting hPLK1 siRNA was used. Sprague-Dawley rats (n=3/group) were intravenously administered L021- LNPs at dose of 1 or 2 mg/kg siRNA. Blood samples were taken 24 hours after administration. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; PLT, platelets. The lipid composition used was L021/DSPC/cholesterol/PEG-DMG (mol ratios 60:8.5:30:1.5).

## 1.7 長期保管安定性試験

医薬品応用を考慮するにあたって、製剤の長期保管安定性は極めて重要な項目である<sup>62</sup>。一般的に注射剤は、製造直後（品質保証期間は、工場の製造初日から計算）から各病院への流通と患者への投与までを考慮すると、冷蔵あるいは室温にて最低で1年、好ましくは2年の品質保証期間が望まれる。そこでリード検体であるL021-LNPの長期保管試験を実施した。LNPはPBS（pH7.4）とし、ガラスバイアルに入れ、冷所に保管、各タイムポイントに品質評価を実施した。

L021-LNPの長期保管安定性結果をTable 3に示す。その結果、L021-LNPは約60nmの粒子径、0.10以下のPDI、90%以上の封入率を30ヶ月にわたって保つことが確認された（Table 3）。またsiRNAのHPLC解析においても、顕著な分解は確認されなかった。これよりL021-LNPは、医薬品として十分な長期保管安定性を示すことが確認された。

**Table 3 L021-LNPの長期保管安定性試験**

Stability Test <sup>a</sup> (months)	0	2	6	12	18	24	30
Z-average (nm)	57	64	64	66	65	68	66
Polydispersity Index	0.09	0.03	0.04	0.02	0.05	0.06	0.09
siRNA encapsulation	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%

<sup>a</sup> Storage Conditions: 4C, PBS solvent, Glass vial with closed cap

一般的に抗体医薬品やリポソーム医薬品は、保管中の凝集の懸念があり、粒子径は重要な品質管理項目となる<sup>63, 64</sup>。またLNPにおいても、非対称型のイオン化脂質を含む場合は、長期保管中に粒子径が増大することが報告されている<sup>50</sup>。そこでL021-LNPだけでなく、L001-LNPの長期保管安定性試験を、別日に調製した各2ロットずつ実施した。その結果、L021-LNPは2ロット共、18ヶ月にわたって良好な保管安定性を示したのに対し、L001-LNPは経時的に粒子径が増大し、保管安定性に優れなかった（Figure 13）。2つのLNPの安定性における差を調べるため、LNP中に含まれる各脂質成分の分解をHPLC-UV-CADにより解析した。L001およびL021はそれぞれアミド結合、エステル結合を持つため、保管安定性試験中の化学分解により、保管安定性に影響を与えているかもしれない。しかしながらCAD解析の結果、いずれの脂質成分も保管前と保管後に変化はなく、イオン化脂質の化学的分解も確認されなかった。これより粒子の不安定化は、各脂質成分の化学的分解によるものではないと推察された。

以上より、L021-LNPは2年にわたって十分な保管安定性を示すことが確認された。

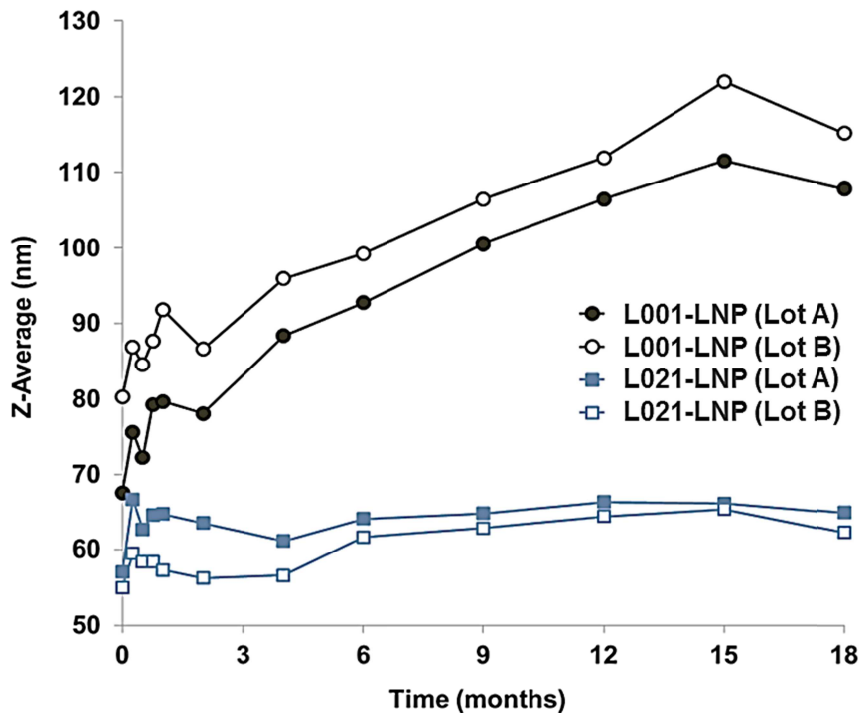


Figure 13 LNP の長期保管における粒子径変化。L001-LNP および L021-LNP の PBS 溶液をガラスバイアルに入れ、18 ヶ月間冷蔵保管し、各タイムポイントにて粒子径を測定した。再現性を確認するため、各 2 ロットを調製した。PBS, phosphate buffered saline.

### 1.8 考察

LNP は核酸医薬品の実現を可能とする有望な核酸送達キャリアである<sup>25, 27</sup>。実際に *in vivo* にて応用可能なキャリアが求められており、そのデザインには *in vivo* における効果を考慮することが不可欠である。*In vitro* にて最適化したキャリアが *in vivo* では全く効果を示さないことが報告されている<sup>65</sup>。これは *In vitro* での支配的なファクターが細胞内取り込みとエンドソーム脱出過程であるのに対し、*In vivo* の支配的なファクターが体内動態であるためである。長時間にわたって細胞とキャリアを接触させてトランスフェクションさせる *in vitro* では、*in vivo* を想定できないことから、本研究においても *in vivo* をスクリーニング系として用いた。Factor VII マウスモデルは、血中 Factor VII が安価な市販のキットで素早く測定可能（数万円/kit、1 時間/assay）であること、および Factor VII が肝臓のみで産生されることから、利便性の高いスクリーニング系である<sup>46</sup>。本研究においても、合成した脂質群を含む LNP に Factor VII siRNA を封入し、遺伝子抑制効果を指標に脂質間の優劣を評価した。その結果、pKa が 6.0 – 6.6 付近の一部脂質に高い遺伝子抑制効果が確認された。しかしながら興味深いことに、同一の pKa を保有していながら、アミド型ヘッドではなくエステル型ヘッドを有する脂質群のみに高い活性を示すことが判明した。ヘッドグループ構造のみが異なり、その他脂質構造や LNP 構成成分は同一であることから、pKa 以外に遺伝子抑制効果に影響を与える要因があることが明らかとなった。

また L001 および L021 の詳細な比較試験から、その要因が ApoE の吸着量であるとは考えにくく、内在化効率や、エンドソーム離脱過程にあると推察された。

既報では、イオン化脂質の脂質鎖に含まれるエステルがマウス肝細胞内で速やかに分解されることが報告されている<sup>66</sup>。従って、エステル型ヘッドを有するイオン化脂質が細胞内で分解し、内包された siRNA が効率良くエンドソームから細胞内へ脱出している可能性が考えられた。効率的な siRNA のエンドソームからの脱出は、核酸送達において最も重要な因子と考えられている<sup>67,68</sup>。そこで L021 のヘッドグループにおけるエステルが分解するか確認するため、L021 単体あるいは L021 を含む LNP を、マウス血清中あるいはマウス肝臓ホモジネートに添加し、37°C にて静置した。しかしながら、24 時間にわたって分解は全く確認されなかった。これよりエステルの化学的分解では、エステル型ヘッドを有するイオン化脂質群の高い遺伝子抑制効果を説明できないことが判明した。Andrew らは、金ナノ粒子上に修飾したアミド結合を介するアルカンチオール単層の運動性が、アミド結合間の水素結合により抑制されることを報告している<sup>59</sup>。Aimin らは、4 級アンモニウムにより構成される界面活性剤の粒子内において、アミド結合間の水素結合が働いていることを証明している<sup>69</sup>。これより、アミド型ヘッドを有するイオン化脂質を含む LNP は、粒子内のアミド結合間の水素結合により、強固に粒子状態を保つことが考えられた。この結果、エンドソームから細胞質への siRNA の放出が不十分となり、遺伝子抑制効果が弱まったのかもしれない。

LNP 構成成分の検討により、PEG 脂質は粒子の凝集抑制に不可欠であること、ならびに PEG 脂質を減らすことによって遺伝子抑制効果がわずかに高まることが示された (Table 1)。投与された LNP は、肝臓内皮細胞のシヌソイド構造を通過して肝実質細胞近傍へ送達される。Wisse らはシヌソイド構造がマウスにて 141 nm、ヒトにて 107 nm であることを報告している<sup>70</sup>。同じく Gindy らは、140 nm を越える粒子径を持つ LNP は、遺伝子抑制効果が著しく低い傾向にあることを報告している<sup>50</sup>。我々の LNP は PEG 脂質が少ない 0.25 % においても粒子径が 100 nm 以下となった。マウス肝臓内皮細胞のシヌソイド構造を効果的に通過し、肝実質細胞内に取り込まれていると推察される。

LNP の長期保管安定性は、医薬品応用において極めて重要である。非対称型の脂質鎖を有するイオン化脂質を含む LNP は、Ostwald ripening メカニズムを通じて、粒子径が経時的に増加することが報告されている<sup>50</sup>。同様に、L001-LNP は長期間にわたって徐々に粒子径が増大した。それとは対照的に L021-LNP が 2 年にわたって良好な安定性を示したことは興味深い。非対称型イオン化脂質(ex. C18, C9 lipid tail chain)は、従来の対称型イオン化脂質(ex. C18, C18 lipid tail chain)に比べて、アルキル数が少なく、LNP 内で脂質-脂質間の疎水的相互作用が少ないことが報告されている<sup>50</sup>。従って、LNP 内の疎水的相互作用が高い脂質を選択し、Ostwald ripening を減少させることで、粒子安定性が向上されると期待される。本研究で実施した L001 および L021 の保管安定性試験では、イオン化脂質以外は全て同一条件である。従っ

て、L021 の環状型ヘッドグループである N-メチルピペリジンが、LNP 内の脂質-脂質間相互作用を強くし、長期の粒子安定性に寄与したと推察された。

我々は Factor VII マウスモデルを通じて、新規非対称型イオン化脂質 L021 を見いだした。L021-LNP は、高い遺伝子抑制効果 ( $ED_{50} = 0.02 \text{ mg/kg}$ )、十分に高い忍容性 ( $ED_{50}$  値の 100 倍以上)、2 年にわたる長期安定性を示した。また投与後、血中より速やかに消失するとともに、肝臓へ効率的に集積 (投与 1 時間後に投与量の 80% 以上) した。Jayaraman らの報告した脂質 DLin-MC3-DMA ( $ED_{50} < 0.03 \text{ mg/kg}$ ) を含む LNP は、ALN-TTR02 という第三相臨床試験が行われている<sup>71</sup>。処方成分や実験条件は異なるものの、我々の得られたデータから L021-LNP は有望な核酸送達キャリアと考えられた。L021-LNP の肝関連疾患への医薬品応用が期待される。

## 第 2 章 開発した L021-LNP の物性および取り込みメカニズムの解析

### 2.1 L021-LNP の特性把握

第 1 章にて新規に合成した非対称型イオン化脂質 L021 は、低用量にて肝実質細胞内の標的遺伝子を抑制できる有望な核酸送達キャリアである。本章では L021-LNP の特性把握を行うことにした。基本処方として、L021/DSPC/cholesterol/PEG-DMG = 60/8.5/30/1.5, mol/mol、および siRNA/Total lipid = 0.06 (wt/wt)となるよう LNP を構築した。LNP は既報に従って、粒子沈殿を利用した 2 液混合により調製した (Figure 14)<sup>72</sup>。すなわち脂質をエタノールに、siRNA を pH 4.0 の酢酸ナトリウム緩衝液に溶解した。一定速度で溶液を押し出すことが可能なシリンジポンプを用いて、エタノール：緩衝液=3：1 の液速度で混合し、25%エタノールを含む LNP を得た。この際、緩衝液 pH 4.0 のため pKa 6.4 の L021 は正に帯電しており、siRNA の負電荷と相互作用し、脂質および siRNA の溶解度が急速に下がることにより、siRNA を内部に内包した状態の粒子が沈殿、急速形成する<sup>73</sup>。混合後、透析により PBS (pH 7.4) に溶媒置換をすることで、LNP を得た。

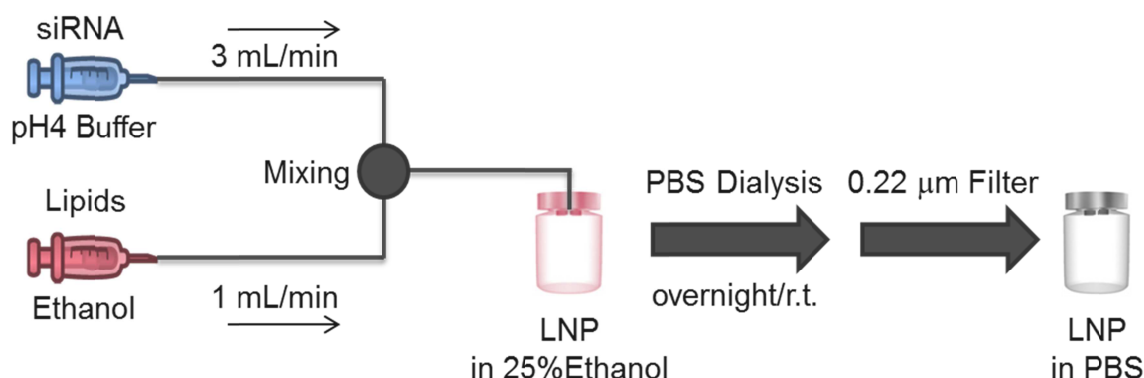


Figure 14 LNP の調製概念図。脂質をエタノールに溶解、siRNA を緩衝液に溶解する。シリンジポンプを用いてエタノール溶液および siRNA 溶液を 3:1 の速度で送液・混合することで、均一な粒子を連続で形成することが可能となる。混合溶液を PBS に溶媒置換し、0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過滅菌することで、LNP 溶液が得られる。LNP 処方; L021/DSPC/cholesterol/PEG-DMG = 60/8.5/30/1.5, mol/mol、siRNA/Total lipid = 0.06 (wt/wt). DSPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (C18); DMG, dimiristoylglycerol (C14).

LNP において、粒子径、粒子の均一性を示す分散指数 PDI および siRNA の封入率は重要な製剤特性となる。粒子が 140 nm を越えた場合、活性が減弱することから、粒子径が制御された均一な粒子を得ることは重要である<sup>50</sup>。RNA に対する蛍光色素 Ribogreen を用いて siRNA 封入率を測定したところ、L021-LNP は siRNA を内部に 90%以上内包することが確認された。またその動的光散乱法により測定した粒子径は 65 nm、PDI は 0.05 を示し、極めて均一な粒子であることが示唆された (Figure 15a)。次に LNP の生体試料中の安定性を推定するため、実験直前にマウスより採

取した新鮮な血清に、siRNA 単体、ならびに siRNA を内包した LNP を混合した。37°C にて 8 時間まで静置し、各タイムポイントにて siRNA の分解量を調べるため native PAGE 解析を行った (Figure 15b)。その結果、siRNA 単体の場合は経時的に分解が確認されたのに対し、siRNA を LNP に内包した場合は分解が確認されなかった。これより LNP は siRNA を血中成分から、ほぼ完全に保護していることが推察された。さらに pH を変化させた際の LNP の表面電荷の測定を行ったところ、Z 電位は -2 mV (pH 7.5) から +23 mV (pH 3.5) となった (Figure 15c)。これは LNP が血中では中性である一方で、エンドソーム内の酸性環境下では正電荷であることが示された。最後に LNP の膜融合能を確認するため、赤血球を用いた溶血試験を実施した<sup>54</sup>。赤血球の細胞膜をエンドソーム内膜と見立てており、LNP が膜融合を起こした場合は赤血球が溶血し溶液が赤く染まる試験法である。実験間の再現性を保つため、補体価を測定する CH50 測定キットに付属する赤血球を用いた。siRNA を内包する LNP と混合し 37°C にて 2 時間静置した。遠心後、上澄みの溶液の吸光度を測定し、界面活性剤 Triton X-100 を用いて完全溶血させた赤血球を 100% Hemolysis とすることで、各 pH における溶血率を算出した (Figure 15d)。その結果、pH 7.5 から pH 6.5 においては溶血がおこらず、pH 6.5 から pH 5.0 にかけて、LNP の濃度依存的に高い溶血が起きた。これは、pKa 6.4 を示した L021 に対し、カチオン化した LNP が膜融合能を持つことを示している。これらの結果は、L021-LNP が投与部位 (腕の静脈) から到達部位 (肝実質細胞細胞内) までの pH 変化 (血中 pH 7.4 – エンドソーム pH 5) に応答し、siRNA を細胞内に送達していることが示唆された。

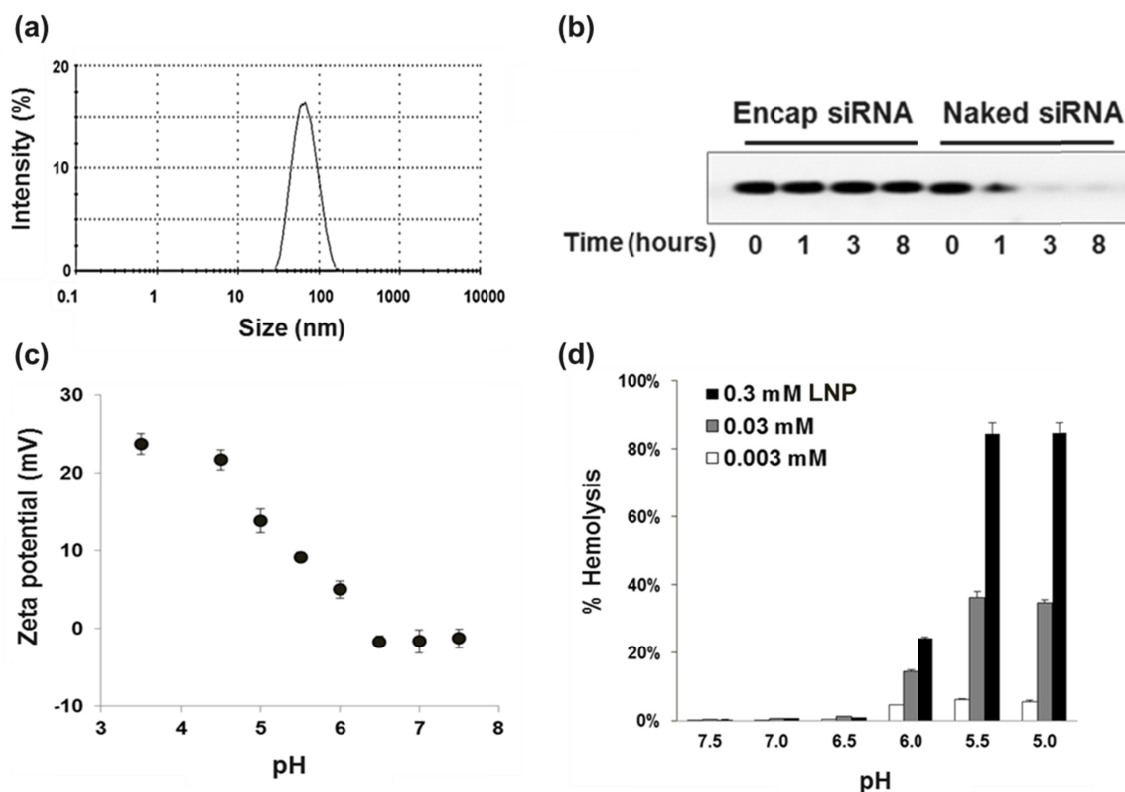


Figure 15 L021-LNP の特性把握。(a) L021 の動的光散乱法に基づく粒子径、(b) siRNA 単体および siRNA を内包する LNP のマウス血清中の安定性。siRNA (7.5  $\mu$ M)、95%マウス血清となるように混合し、37°C にて静置した。各タイムポイントにて分取し、15% native PAGE にて電気泳動し、SYBR Green II にて染色した。(c) pH 変化と Z 電位。(d) pH 変化と溶血率。LNP と赤血球を混合し、37°C、2 時間静置した。遠心後、上澄みの吸光度を測定し、界面活性剤 Triton X-100 を用いて完全溶血させた場合を溶血率 100% とすることで、相対的な溶血率を算出した。PAGE, poly acrylamide gel electrophoresis

約 100 nm の直径を有するナノ医薬品では、その内部に抗がん剤などの低分子化合物を封入したリポソーム製剤が広く知られており、例えば再発卵巣癌を適応とするドキシソルビシン封入リポソーム Doxil® (FDA 承認 1995 年)<sup>74</sup>、急性リンパ性白血病を適応とするビンクリスチン封入リポソーム Marqibo® (FDA 承認 2012 年)<sup>75</sup>、すい臓癌を適応とするイリノテカン封入リポソーム Onivyde® (FDA 承認 2015 年)<sup>76</sup> など数多くの医薬品が上市されている<sup>77</sup>。また筆者が所属するグループでは、自社創成の抗がん剤であるエリブリンを内包したエリブリンリポソームを開発しており、現在臨床試験中である<sup>78</sup>。リポソームを形成する脂質二重膜の内部には水相があり、この水相に低分子化合物が溶解している。一方、Leung らは、<sup>31</sup>P NMR を用いて LNP 中の siRNA の運動性が乏しいことを明らかにした<sup>79</sup>。これより Leung らは、LNP は従来型のリポソームと異なり内部に水相を持たず、また電子顕微鏡の観察から、電子密度が高い内部構造を持つことを報告した (Figure 16)。



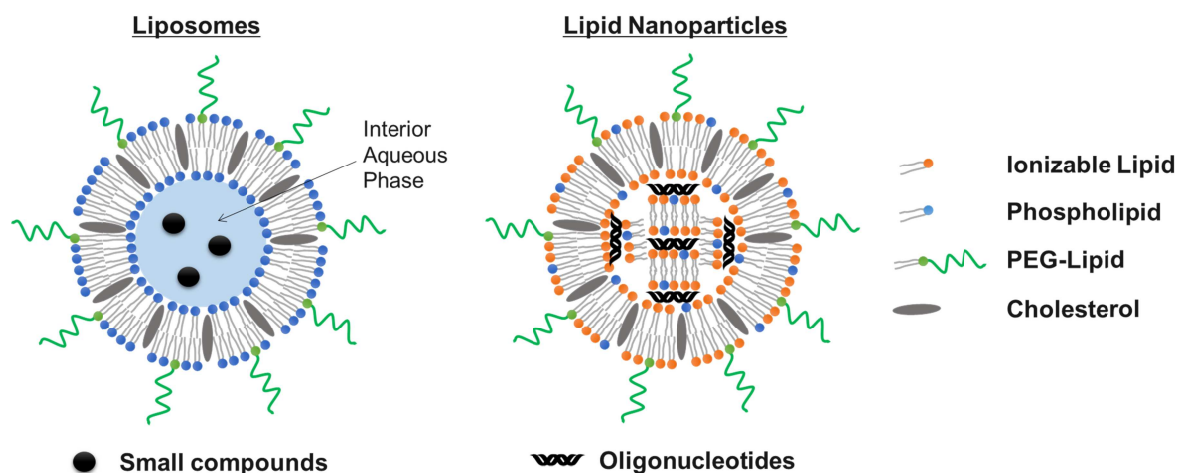


Figure 16 低分子薬物封入リポソーム(左)と核酸封入脂質ナノ粒子(右)の概念図。リポソームは脂質二重膜により構成され、その内部に水相を有し、低分子薬物が溶解あるいは結晶化している。一方脂質ナノ粒子は核酸の負電荷とイオン化脂質の正電荷により凝集しており、その内部に水相を持たないと報告された<sup>79</sup>。リポソームは主にリン脂質、コレステロール、(必要に応じて)PEG 脂質および低分子化合物で構成される。LNP はイオン化脂質、リン脂質、コレステロール、PEG 脂質および核酸で構成される。

一方で、脂質で構成される複合体は、その脂質成分および成分含量比によって、ディスク型、二重膜型、多重膜型、ミセルなど様々な高次構造を取ることが広く知られている<sup>80</sup>。非対称型脂質鎖を有する L021 は、Leung らが用いている対称型脂質鎖をもつイオン化脂質 DLin-KC2-DMA と全く異なるため、どのような高次構造を構成しているか推定することにした (Figure 17)。



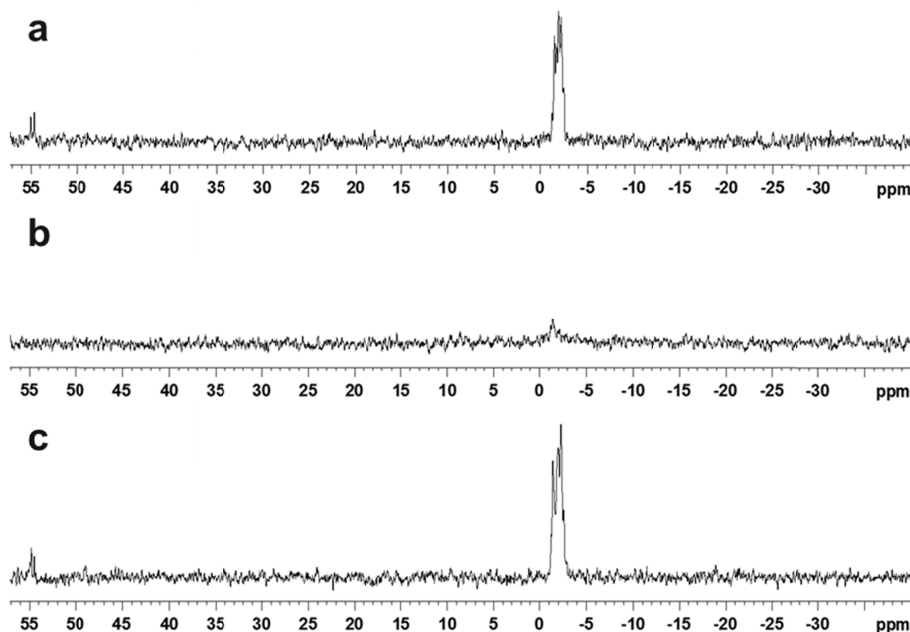


Figure 18  $^{31}\text{P}$  NMR による LNP の内部構造推定。(a) siRNA 単体の  $^{31}\text{P}$  NMR シグナル (Factor VII siRNA)。(b) LNP に内包された siRNA の  $^{31}\text{P}$  NMR シグナル。LNP はリン脂質 DSPC の  $^{31}\text{P}$  NMR シグナルの影響を省くため、リン脂質の DSPC を除いて調製した L021/cholesterol/PEG-DMG (60/38.5/1.5, mol/mol)。(c) LNP に界面活性剤 1% Triton X-100 した  $^{31}\text{P}$  NMR シグナル。LNP は崩壊し siRNA が完全にリリースされる。LNP 内では siRNA の動きが遅くイオン化脂質により強固に固定されていることが示唆される。

## 2.2 IN VITRO 取り込みにおける ApoE の関与

リポソーム製剤はその粒子表面に ApoE が吸着し、ApoE 関与の細胞内取り込みをすることが知られている<sup>81</sup>。対称型イオン化脂質 DLinc-KC2-DMA を用いた LNP でも同様に、ApoE が細胞内取り込みに関与することが報告されている<sup>66</sup>。一方で、リピドイドと呼ばれるカチオン性脂質 C12-200 (Figure 3) は、L021 と同様の高い遺伝子抑制効果を示すが、その主な取り込み経路は ApoE に依存しないマクロピノサイトーシスであると報告されている<sup>66, 82</sup>。ナノ粒子によりその取り込み経路が異なることが報告されていることから、L021 の取り込み経路を調べることにした。

まず細胞内取り込みへの ApoE の関与を確認するため、ApoE を発現しない HeLa 細胞および発現する Huh7 細胞の 2 株を準備した。蛍光色素である Alexa 647 を修飾した siRNA を内包した L021-LNP に、human recombinant ApoE を混合し、細胞に添加した。培養 1 時間後、PBS 洗浄、細胞固定、核染色を行い、蛍光顕微鏡により細胞を観察した (Figure 19)。HeLa 細胞では、ApoE 添加なしでは siRNA の蛍光 (赤色) はほぼ確認されなかったが、ApoE 添加により蛍光値が大幅に増加し、細胞内への取り込み促進が確認された。一方 Huh7 細胞では、ApoE の添加有無にかかわらず、

一定の蛍光値が確認された。これより、ApoE は LNP の細胞内取り込みに関与していることが示唆された。

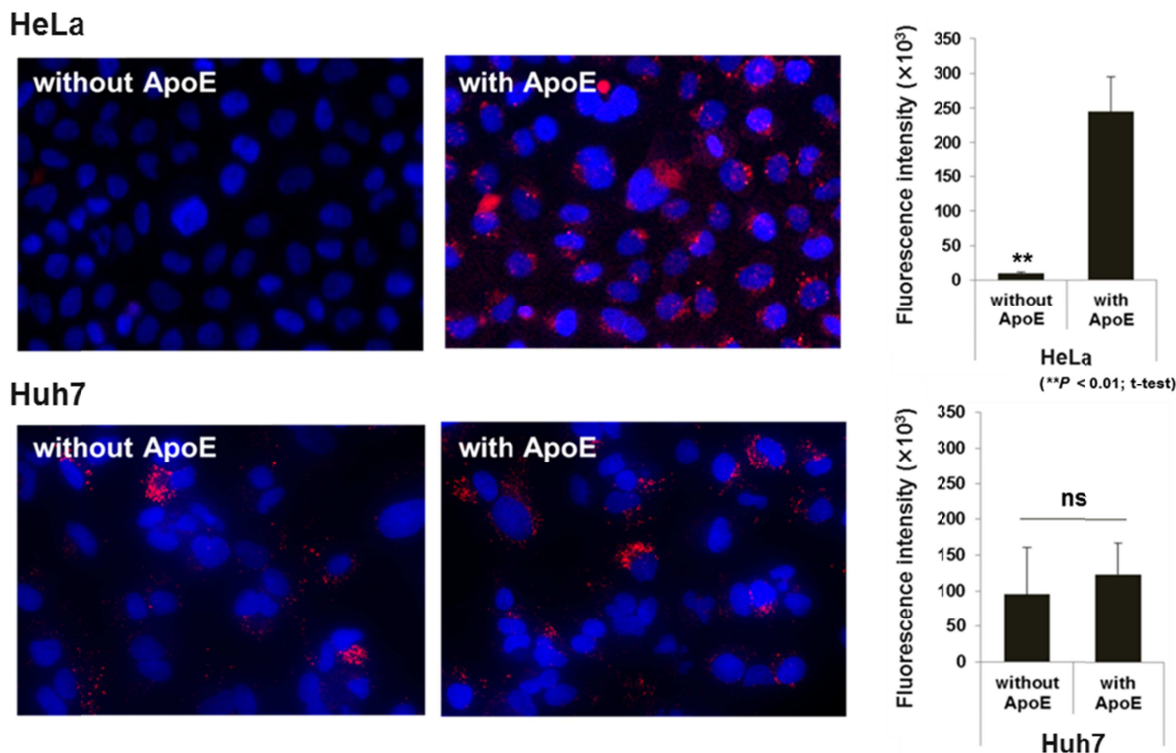


Figure 19 ApoE は LNP の in vitro 取り込みを促進する。蛍光色素 Alexa 647 を修飾した siRNA を LNP に内封し、HeLa および Huh7 細胞株に対して、20 nM siRNA, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ApoE(または ApoE なし)となるよう 37°C にて 1 時間培養した。PBS 洗浄後、4%PFA による細胞固定、Hoechst による核染色(青)を行い、蛍光観察を実施した。siRNA 由来の蛍光強度(赤)は少なくとも 3 視野以上の平均値( $\pm\text{SD}$ )として算出した。ApoE, apolipoprotein E; PFA, paraformaldehyde; ns, not significant

### 2.3 IN VIVO 取り込みにおける ApoE の関与

次に L021-LNP の in vivo における取り込みに関与する因子を調べた。In vitro 試験で明らかになったように、ApoE は in vivo 取り込みにおいても主要な因子であることが推察される。In vivo における ApoE の寄与を確認するため、自然発症 ApoE 欠損マウスを準備した。Factor VII siRNA を封入した LNP を、野生型マウスおよび ApoE 欠損マウスに尾静脈投与した。投与 24 時間後に採血をし、血清中の Factor VII 濃度を、PBS 投与群を 100%として算出した (Figure 20a)。第 1 章の結果と一致して、野生型マウスに対して、L021-LNP は投与量依存的な遺伝子抑制効果を示した ( $\text{ED}_{50} = 0.02 \text{ mg}/\text{kg}$ )。対照的に ApoE 欠損マウスでは L021-LNP は遺伝子抑制効果の劇的な減弱が見られた。 $\text{ED}_{50}$  値は 0.6  $\text{mg}/\text{kg}$  であり、野生型の 1/30 に減弱した。次に減弱した遺伝子抑制効果が本来内在する ApoE の欠損が原因であることを確認

するため、投与前に LNP に ApoE を外添加した状態で検体投与することにより、遺伝子抑制効果が回復するか確認した。LNP に ApoE を濃度依存的（最終的にマウスに投与した ApoE 量を mg/kg として換算して図に示した）に外添加し、37°C にて 5 分静置後、0.1 mg/kg siRNA 投与量にて ApoE 欠損マウスに投与した。その結果、ApoE の外添加濃度依存的に、遺伝子抑制効果が回復した（Figure 20b）。これら結果から、ApoE が LNP の肝実質細胞への効率的な取り込みに極めて重要な因子であることが明らかとなった。

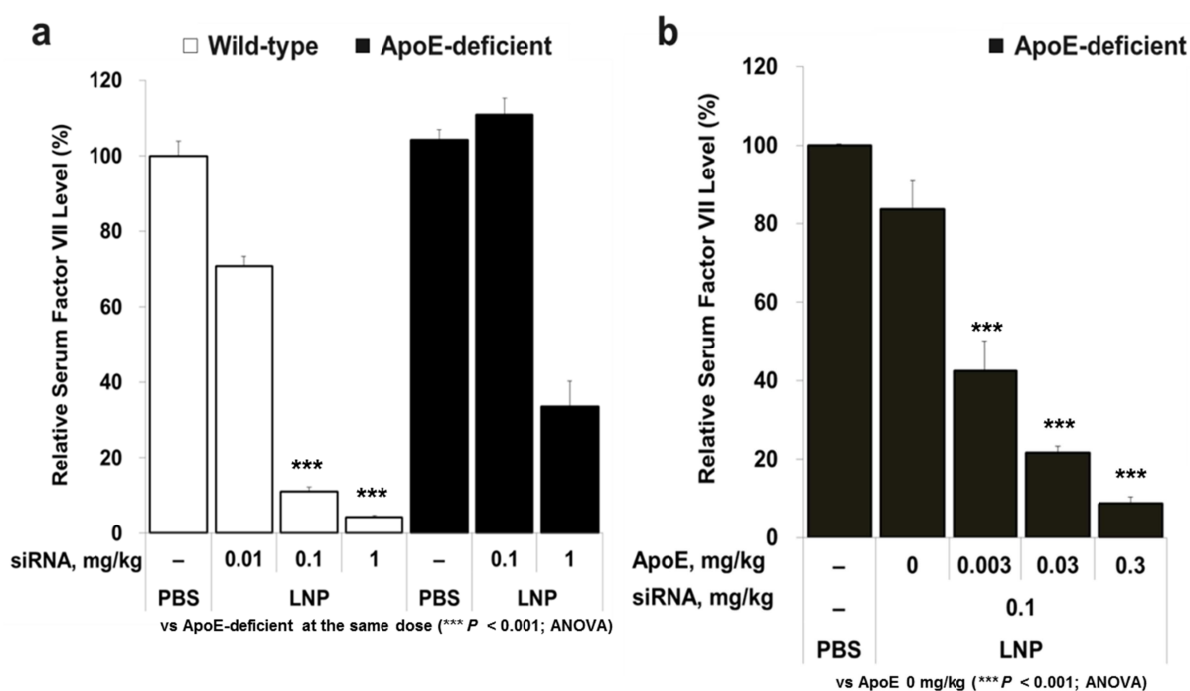


Figure 20 ApoE は LNP の in vivo 取り込みを促進する。(a) 野生型および ApoE 欠損マウスにおける Factor VII の遺伝子抑制効果。マウス (n=3/group) に Factor VII siRNA を封入した LNP を siRNA 投与量依存的に尾静脈投与した。投与 24 時間後、血漿中の Factor VII 濃度を測定し、PBS 投与群に対する相対濃度を算出した。(b) ApoE を外添加することにより ApoE 欠損マウスにおける遺伝子抑制効果の回復。LNP に ApoE を濃度依存的に外添加し、37°C にて 5 分静置後、ApoE 欠損マウス (n=3/group) に 0.1 mg/kg siRNA とするよう尾静脈投与した。

## 2.4 IN VIVO 取り込みにおける LDL 受容体の関与

ApoE の取り込みには low-density lipoprotein 受容体（以下 LDLR）を主として、複数の受容体が関与している。Akinc らは、イオン化脂質を含む LNP が LDLR 経路で取り込まれると LDLR 欠損マウスを用いて示した<sup>66</sup>。遺伝子改変マウスである LDLR 欠損マウスは日本で入手困難であることから、代替手段として野生型マウスの LDLR を一過性に低減させることにした。前処置として、control siRNA または LDLR siRNA を封入した LNP を、0.5 mg/kg siRNA とするよう野生型マウスに尾静

脈投与した (Figure 21a)。投与 96 時間後、マウスに Factor VII siRNA を封入した LNP を 0.02, 0.1 mg/kg siRNA となるよう投与した。その結果、control siRNA 前処置群では、通常取りに高い遺伝子抑制効果が確認されたのに対し、LDLR siRNA 前処置群では、遺伝子抑制効果が劇的に減弱した (Figure 21b)。処置後のマウス肝臓中の LDLR mRNA 発現量を確認したところ、LDLR siRNA 投与群はコントロール群に比べて LDLR mRNA 発現量が減弱していた (Figure 21c)。これより、肝実質細胞上の LDLR 数は減少していたと推察される。これらの結果から、LDLR は L021-LNP の in vivo 取り込みにおいて重要な因子であることが確認された。

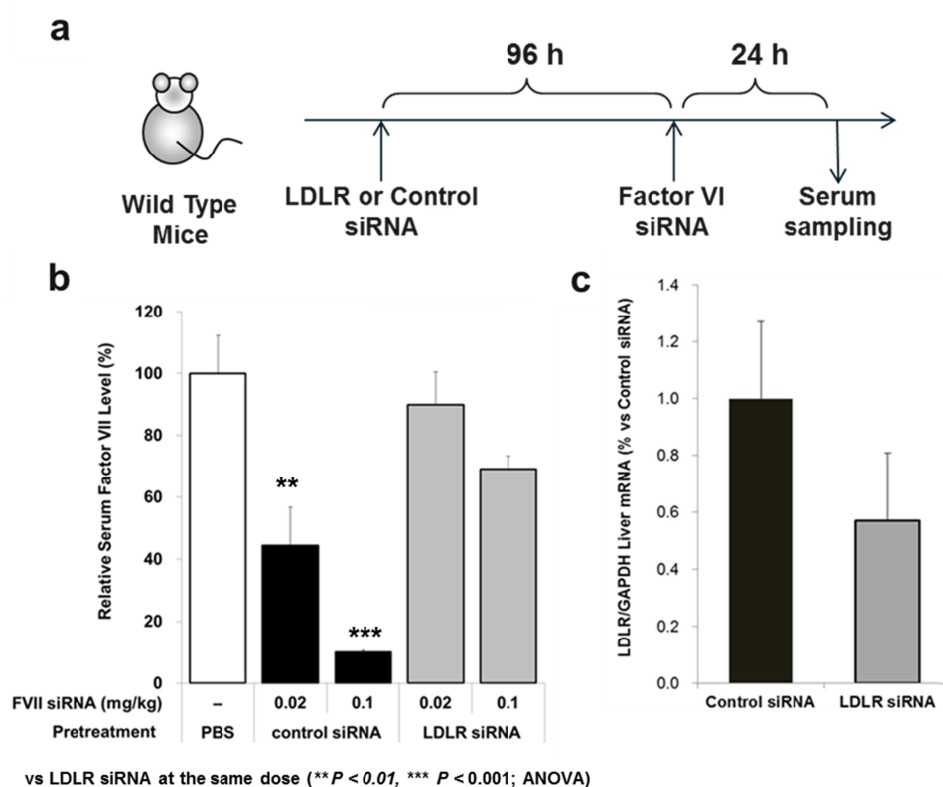


Figure 21 LDLR の減少は LNP の in vivo における取り込みを減弱させる。(a) 野生型マウス ( $n=3/\text{group}$ ) に control siRNA (i.e. Luciferase siRNA) または LDLR siRNA を封入した LNP を 0.5 mg/kg siRNA として尾静脈投与した。投与 96 時間後、マウスに Factor VII siRNA を封入した LNP を 0.02, 0.1 mg/kg siRNA となるよう投与した。24 時間後、血漿中の Factor VII 濃度を測定し、PBS 投与群に対する相対濃度を算出した。(b) control siRNA または LDLR siRNA 投与 96 時間後におけるマウス肝臓中の LDLR mRNA 発現量の比較。LDLR, low-density lipoprotein receptor.

## 2.5 野生型および ApoE 欠損マウスにおける LNP の体内分布

In vitro および In vivo の取り込み経路解析により、ApoE および LDLR は重要な因子であることが明らかとなった。しかし内在する ApoE が、LNP の体内分布全体を変



化させているのか、あるいは局所的に肝実質細胞への取り込みを促進させているのかは不明である。そこで siRNA の体内分布を確認するため、蛍光色素を修飾した siRNA を用いてイメージング解析 (IVIS imaging) を実施した。まず、siRNA 単体および siRNA を封入した LNP を野生型マウスに投与した。投与 30 分後、マウスから主要臓器を採材し、蛍光強度に基づく siRNA の分布を調べた。その結果、siRNA 単体でマウスに投与した場合はほとんどが腎臓に集積した一方で、siRNA を LNP に内封した場合は肝臓に集積した (Figure 22)。この結果から、LNP は本来の siRNA の体内動態を劇的に変化させ、siRNA を肝臓へ送達することが示された。

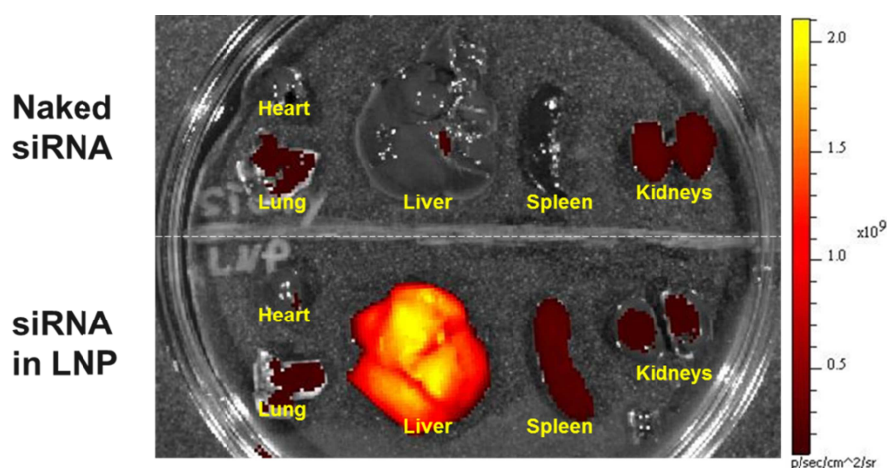


Figure 22 蛍光色素を修飾した siRNA の体内分布。siRNA 単体または siRNA を封入した LNP を野生型マウスに 0.1 mg/kg siRNA になるよう尾静脈投与した。投与 30 分後、主要臓器(心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)を取り出し、蛍光イメージングを実施した。

次に ApoE が体内分布に与える影響を調べるため、野生型マウスおよび ApoE 欠損マウスにおける siRNA の体内分布、体内動態を比較した。siRNA を封入した LNP を投与した 15 分および 120 分後に、主要臓器を採材し、蛍光イメージングを行った。その結果、ApoE 欠損マウスでは野生型に比べて肝臓への集積が少ないことが判明した。各臓器をホモジナイズし蛍光強度を定量したところ、ApoE 欠損マウスは野生型にくらべて約 1/5 の蛍光強度を示した (Figure 23a)。興味深いことに、野生型と ApoE 欠損型の脾臓においては 15 分および 120 分共に同程度の蛍光強度が確認された。また投与後 120 分までの各タイムポイントにおいて、siRNA の血中 PK を測定したところ、ApoE 欠損マウスでは siRNA の血中半減期が延長した (Figure 23b)。最後に野生型マウスにおける肝臓内の細胞分布を確認したところ、LNP は非実質細胞に比べ肝実質細胞へより多く集積することが確認された (Figure 23c)。

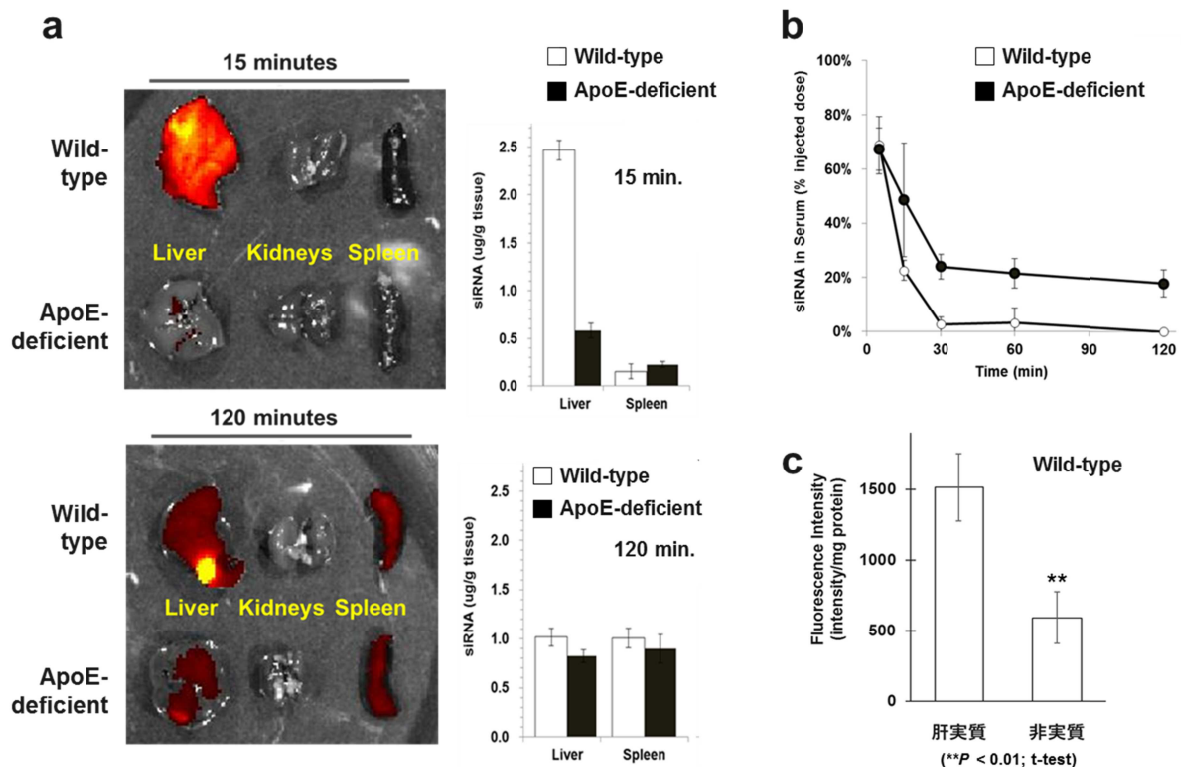


Figure 23 ApoE は in vivo 体内動態および体内分布に強い影響を与える。(a) 野生型および ApoE 欠損マウスに蛍光色素を修飾した siRNA を封入した LNP を 0.1 mg/kg siRNA にて尾静脈投与した。投与 15 分および 120 分後、肝臓、脾臓、腎臓を採材し、蛍光イメージングを実施した。また各臓器ホモジネート中の蛍光強度を示した。(b) siRNA の血中濃度推移。野生型および ApoE 欠損マウス(n=3/group)に蛍光 siRNA を封入した LNP を 0.1 mg/kg siRNA にて尾静脈投与後、5, 15, 30, 60, 120 分後にマウスを屠殺し、血液採取した。蛍光強度はプレートリーダーにより測定した。各ポイントは平均値±SD を示す。(c) siRNA の肝実質および非実質細胞分布。蛍光 siRNA を封入した LNP を投与 30 分後、肝臓のコラゲナーゼ還流・遠心分離により肝実質と非実質細胞を採取。単位タンパク質量あたりの蛍光強度を測定。

## 2.6 考察

第 2 章では L021-LNP のメカニズム解析を実施した。LNP の内部構造を推定するため、 $^{31}\text{P}$  NMR により siRNA の運動性を観察した。Alex らは対称型イオン化脂質である DLin-KC2-DMA を含む LNP は、電子顕微鏡観察から電子密度が高い核を内部に有すこと、ならびに  $^{31}\text{P}$  NMR 観察から LNP に内包された siRNA の運動性が低いことを報告している<sup>79</sup>。同様に L021-LNP に関しても、LNP 内の siRNA の運動性が低いことが確認された。DLin-KC2-DMA と L021 はアルキル鎖の長さが大きくことなっているものの、siRNA を内封する LNP の内部構造は似ていることが示唆された。



LNP を調製する際の pH は極めて重要であり、プラスミド DNA 封入 LNP 調製時の封入率に大きな影響を与えることが報告されている<sup>83</sup>。この結果は LNP の高次構造には、静電的相互作用が重要であることを示唆している。

LNP の細胞内取り込みとエンドソーム脱出に関しては複数の報告例がある<sup>57, 84, 85</sup>。本研究で我々は L021-LNP の取り込みに ApoE および LDLR が重要な働きをしていることを明らかにした。血中の ApoE 濃度はヒトおよびマウスにおいて、50 – 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であることが報告されている<sup>86, 87</sup>。ApoE 欠損マウス (i.e. 体重 20 g、血清 1 mL) に 0.3 mg/kg ApoE を投与した場合、血中 ApoE は一過性に  $> 6 \mu\text{g}/\text{mL}$  となる。ApoE 欠損マウスに ApoE を 0.3 mg/kg にて外添加した際、Factor VII の遺伝子抑制効果が回復したことから、一過性に生じた血中 ApoE 濃度により、肝実質細胞への送達が十分に達成されたと思われる。

リポソームは肝実質細胞だけでなく、肝臓に存在するマクロファージである Kupffer 細胞へも取り込まれることが報告されている<sup>81</sup>。Novobrantseva らは、対称型イオン化脂質 DLin-KC2-DMA を含む LNP は Kupffer 細胞へも送達され、マクロファージ特異的に発現している CD11b の遺伝子抑制を報告している<sup>88</sup>。実際に我々の結果においても、非実質細胞へも LNP が送達されていることが確認された。本報告は L021-LNP の肝実質細胞への応用のみに限られるが、それ以外の細胞への核酸送達について鋭意研究中である。

LNP のエンドソーム脱出に関して、我々は L021-LNP が設計した通りに pH 変化に応じて役割を果たしていることを明らかにした。溶血試験結果から、50%溶血を達成する pH は高濃度 LNP で pH 5.8、低濃度 LNP で pH 6.4 であった。この結果は第 1 章で測定した蛍光色素を用いる TNS assay における L021 の pKa 値が 6.4 であったことと一致している。pH 変化に応じた Z 電位の結果も加味すれば、pH 6.4 以下では正に帯電した LNP が、エンドソーム内膜の負電荷リン脂質と相互作用し、非二重膜構造をし膜破壊を起こすと推察される。これに対して、pH 7.4 付近では LNP は中性であり、血中タンパク質と非特異的な相互作用をしにくいと推察された。

LNP 化した蛍光核酸は、ほぼ肝臓・脾臓に分布した。マウス各組織における LDLR mRNA の発現解析を行ったところ、肝臓と同程度に、肺、腸にも発現していることが確認された (Figure 24)。発現量から考えれば、LNP は肺や腸にも分布すると考えられるが、実質的には肝臓および脾臓への分布に限られた (Figure 22)。直径約 100 nm のナノ粒子は、血管内皮細胞に間隙がある毛細血管の類洞血管 (シヌソイド) が見られる肝臓、脾臓、骨髄、がん組織などへ分布しやすいことが知られている<sup>89</sup>。投与した L021-LNP はシヌソイドを通過し肝実質細胞の近傍に分布した後に、ApoE/LDLR 経路で取り込まれたと推察される<sup>50</sup>。一方で、同様に LDLR を発現する肺などへは、粒子径の影響で毛細血管を通過せず、細胞の近傍に到達できないため、細胞内へ分布しなかったと推察された。

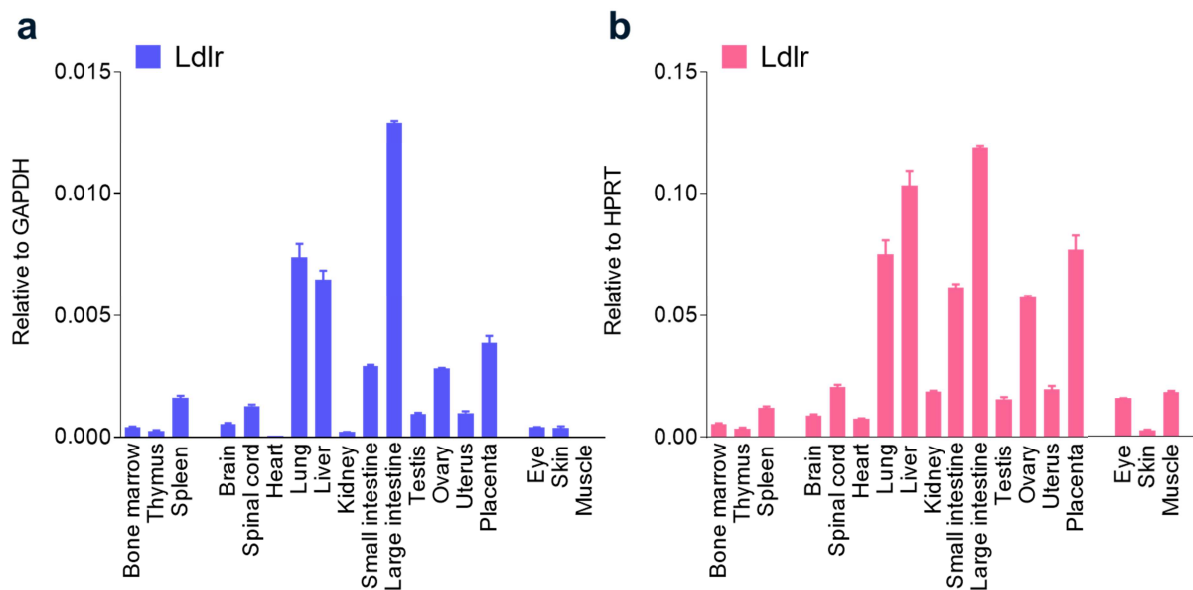


Figure 24 各マウス組織における LDLR 発現解析。ハウスキーピング遺伝子として(a) GAPDH, (b) hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) の2種類を用いた。

また一方で、LNP の体内分布は、ApoE 欠損マウスおよび野生型マウスにおいて全く異なることが判明した。ApoE はカイロミクロン、VLDL、HDL に見られ、VLDL およびカイロミクロンの LDLR 経路の取り込みに主要な役割をしている<sup>90</sup>。内在する ApoE が血中のリポタンパク質と相互作用し運搬するように、ApoE は効率的に L021-LNP を肝実質細胞へ送達する役割を果たしていると推察される。従って、ApoE が欠損している状態では、肝実質細胞へ運搬・消失が減るため、LNP に内封された siRNA の血中半減期が延長し、また遺伝子抑制効果が減弱したと考えられる。Judge らは、がんの増殖に関わる PLK1 遺伝子に対する hPLK1 siRNA を封入した LNP が、肝細胞由来の皮下腫瘍マウスモデルにて効果を示すことを報告している<sup>23</sup>。第1章および第2章に示すように、LNP は投与量の大半が肝臓へ分布するため、マウスの背部に移植する皮下腫瘍への分布は起こりにくいと推察される。そこで Judge らは、通常用いる脂質鎖 C14 の PEG 脂質に比べて、疎水性相互作用により LNP から脱離しにくい C18 を有する PEG 脂質を LNP に修飾し血中半減期を延長させることで、高い抗腫瘍効果をもたらした。我々の研究結果からも、皮下腫瘍モデルにおける高い効果は、PEG 脂質が LNP 表面を囲い ApoE が吸着しにくくなったことに起因すると考えられる。抑制された ApoE の吸着が LNP の血中半減期の延長につながり、皮下腫瘍へ LNP が近接する機会が増えたものと考えられる。同様に Kumar らは、多量の PEG 脂質による LNP の表面修飾により、補体や抗体が非特異的に付着することで誘発されるサイトカイン上昇が抑えられること、ならびに肝実質細胞の遺伝子抑制効果が減弱することを報告した<sup>91</sup>。これらの発見は、ApoE の LNP 表面への吸着を制御することで、LNP の体内動態が変えられることを示唆している。

我々が開発した L021 はその脂質鎖に不飽和結合を含まない (Figure 17)。一方で、既報の DLinc-KC2-DMA や DLin-MC3-DMA を含むほとんどのイオン化脂質は複数の不飽和結合を含む。脂質鎖中の不飽和結合は、膜融合時のヘキサゴナル II 構造を取るのに重要であり、その数や位置は遺伝子抑制効果に大きな影響を与えることが報告されている (Figure 5)<sup>92</sup>。不飽和結合を複数含む脂肪酸の長期保管中における酸化は、LNP のエンドソーム離脱能に悪影響を及ぼすことから、厳しく品質管理がされるべきである<sup>51</sup>。それゆえに不飽和結合を持たない新規脂質 L021 は、酸化のリスクがないため、堅牢な開発研究が可能になるであろう。

以上より第 2 章では、L021-LNP の構造や取り込みメカニズムについて詳細な検討を実施した。非対称型イオン化脂質の L021 は不飽和結合も持たず今までの脂質と全く異なった化学構造をもちながらも、得られた LNP は既報のそれらと同様のメカニズムで遺伝子抑制効果を示すことが示唆された。また内在する ApoE が LNP を肝臓へ標的化させることから、ApoE と LNP の相互作用を適切に調節することで、肝以外への送達が可能になることが推察された。我々の詳細なメカニズム検討が、今後の更なる LNP の進歩につながることを期待される。得られた知見を Figure 25 にまとめた。

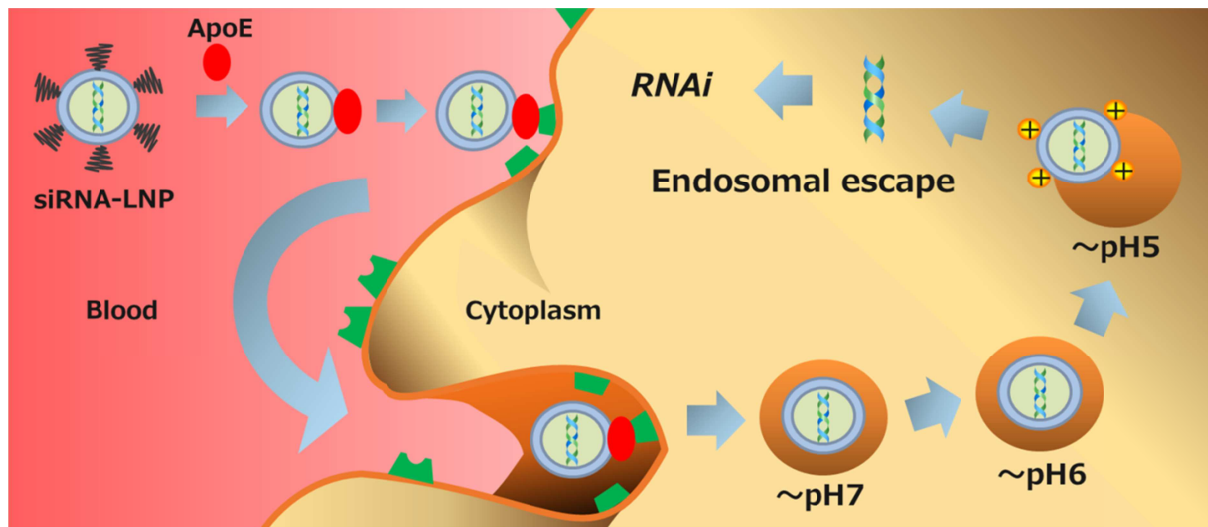


Figure 25 L201-LNP の生体内投与後から RNAi を発現するまでの概念図。LNP は直径約 100 nm の均一な粒子であり、核酸を内包している。その内部では核酸の運動性は低く、内水相を持たないと推察される。静脈投与された LNP は血中で核酸をヌクレアーゼから保護している。血中で粒子表面に ApoE が吸着し、肝実質細胞表面の LDLR を経由してエンドサイトーシスされる。エンドソームの pH が低下するにつれて pKa 6.4 を有する L201 がイオン化し、正に帯電する。エンドソーム内膜の負電荷を有するリン脂質と正に帯電した L201 が相互作用する。L201 の高い膜融合能により、内封した核酸を細胞質に放出する。核酸が siRNA の場合は、RNA 干渉を通じて長期間の遺伝子抑制効果を発現する。RNAi, RNA interference; LNP, lipid nanoparticles; ApoE, apolipoprotein E; LDLR, low-density lipoprotein receptor.

### 第3章 げっ歯類・霊長類にて迅速な肝消失を示し毒性を改善した生分解性 LNP の創成

#### 3.1 生分解性イオン化脂質 L101 の考案・合成・生物学的評価

今までに数  $\mu\text{g}/\text{kg}$  siRNA オーダーにおいても *in vivo* において高い遺伝子抑制効果を持つキャリアが数多く報告されている<sup>38-40, 43, 54</sup>。しかしながら、少なからずキャリアは生体に対して毒性をもたらすため、遺伝子抑制効果の向上が治療指数の拡大につながるには限らない。イオン化脂質に基づく核酸送達キャリアの主な毒性は肝毒性であり、イオン化脂質が生体内タンパク質に非特異吸着を起こすことに起因するといわれている<sup>61</sup>。近年では、イオン化脂質 L319<sup>66</sup>、リポイド 503O13<sup>42</sup>、 dendriマー 5A2-SC8<sup>93</sup> など、生分解性を持たせることで速やかな代謝性を示し、安全性を向上させた報告例がある。そこで我々は第2章までに得られた L021 をベースに、遺伝子抑制効果を保ちつつ、さらに安全性を向上させた脂質ナノ粒子の開発に着手した<sup>52, 53</sup>。

エステルは生分解性を有する機能性材料に広く使われる化学修飾である。それはエステルが生理条件下で化学的に比較的安定であるのに対し、組織や細胞内に含まれるエステラーゼやリパーゼにより加水分解されやすいためである<sup>94, 95</sup>。核酸送達分野においても、エステルを適切な位置に入れ込むことにより、遺伝子抑制効果を保ちつつ生体内の消失速度を高めた報告例がある<sup>42, 66, 93</sup>。我々は L021 の脂質構造をベースとし、脂質鎖にエステルを含む新規脂質 L101 を考案した (Figure 26a)。L021 は脂質鎖に膜融合時のヘキサゴナル II 構造への転換を促進する不飽和結合の代替としてシクロプロピル環を有するが、その位置にエステルを置き換える構造とした。まず L101 が siRNA を内包する LNP を形成するか試験した。処方では L021-LNP と同様に、L101/DSPC/cholesterol/PEG-DMG = 60/8.5/30/1.5, mol/mol ならびに siRNA/Total Lipid = 0.06, wt/wt となるように LNP を調製した<sup>72</sup>。その結果、LNP は粒子径 70 nm、PDI 0.10、siRNA 封入率 90%以上の良好な粒子を形成した (Figure 26b)。次に蛍光色素による TNS assay を実施したところ、pKa 6.2 であることが判明した (Figure 26c)。

次に L101-LNP が siRNA を内封し保護ができるか確認するため、LNP を 3'-エキソヌクレアーゼ活性を有する snake venom phosphodiesterase (SVPD) と 37°C で混合し、一定時間後に siRNA の残量を PAGE 解析した<sup>96</sup> (Figure 26d)。siRNA 単体の場合、SVPD により siRNA は速やかに分解した (lane 1, 2)。一方で siRNA を L101-LNP に内封した場合、siRNA の分解は確認されなかった (lane 3, 4)。また LNP を界面活性剤で崩壊させ siRNA を放出させたところ、SVPD により siRNA は分解した (lane 5, 6)。これより、LNP はエキソヌクレアーゼから siRNA を保護することが可能であることが示された。

LNP の重要な特質である良好な粒子形成および siRNA の保護機能が確認されたため、次に LNP の遺伝子抑制効果を評価した。Factor VII マウスモデルを用いて評価した

ところ、投与量依存的に肝実質細胞内の標的遺伝子を抑制することが判明した (Figure 26e)。その抑制効果を示す ED<sub>50</sub> 値は 0.02 mg/kg であった。また単回投与時の遺伝子抑制効果の持続時間を評価した。コントロールとして hPLK1 を標的とする siRNA を用い、1 mg/kg siRNA として投与したところ、血清中の Factor VII 濃度は全く変化しなかった (Figure 26f)。一方で Factor VII siRNA を 0.1 および 1 mg/kg siRNA として投与したところ、投与後 2 週間にわたって遺伝子を抑制しその後ベースラインに戻った。

以上より、エステルを有する L101 およびその LNP は、特異的かつ顕著な遺伝子抑制をもたらすことが判明した。これより、siRNA を含有する L101-LNP の in vivo 活性および物理化学的な性質は、L021-LNP とほぼ同様であることが示唆された。

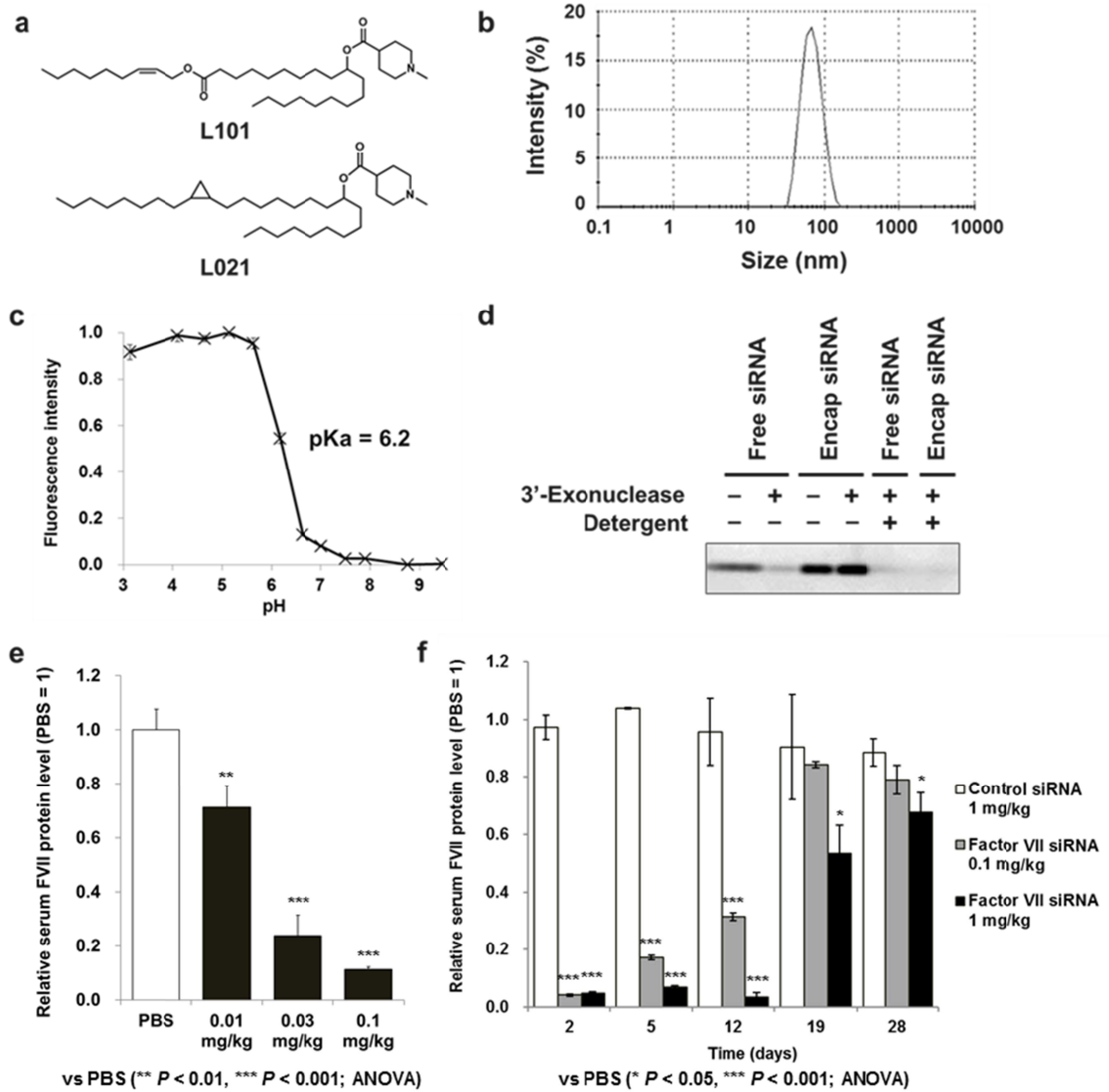


Figure 26 新規脂質 L101 の構造と特性評価。(a) L101 の化学構造, エステルを脂質鎖に有する。(b) L101-LNP の光動的散乱法による粒子径測定。(c) 蛍光色素 TNS による L101-LNP の各 pH における蛍光値変化。(d) siRNA のヌクレアーゼに対する安定性評価。(e) 投与量依存的な遺伝子抑制効果。マウス(n=3/group)に Factor VII siRNA を封入した LNP を 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg siRNA として投与し、24 時間後の血清中の Factor VII 濃度を測定した。(f) 長期遺伝子抑制効果。マウス(n=3/group)に Factor VII siRNA または Control siRNA(hPLK1)を封入した LNP を 0.1, 1 mg/kg siRNA として投与し、2-28 日後の血清中の Factor VII 濃度を測定した。

### 3.2 細胞内取り込み評価

L101-LNP の細胞内取り込みを、蛍光修飾 siRNA を用いて観察した。肝細胞由来の Huh7 細胞に LNP 化した siRNA を 20 nM となるように添加した。37°C, 30 分間培養した後、PBS で洗浄し蛍光顕微鏡にて観察を行ったところ、細胞内に赤色の蛍光が見られた、L101-LNP が細胞内に取り込まれることが確認された (Figure 27a)。次に siRNA を添加した直後から氷上で 30 分間静置し観察を行ったところ、蛍光は確認されなかった (Figure 27b)。細胞温度を下げれば ATP 産生が抑制され受容体経由のエンドサイトーシスは抑制されるが、実際に取り込みが抑制された。これは第 2 章の結果に基づけば、L101-LNP も同様にエンドサイトーシスにより取り込まれていることが推察される。37°C の細胞培養を 4 時間まで延長したところ、更に赤色の蛍光値が増すことが観察された (Figure 27c)。さらに細胞内のライソソーム内部を染色可能な LysoTracker 試薬を用い、siRNA のエンドソーム脱出を確認した<sup>97</sup>。siRNA の赤色およびライソソームの緑色が重なる黄色がほぼ確認されないことから、ほとんどの siRNA が、エンドソームがライソソームになる前に脱出をしていることが示唆された (Figure 27d)。これらの細胞観察により、L101-LNP が受容体経由のエンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞質に siRNA が効率的に放出されていることが示唆された。



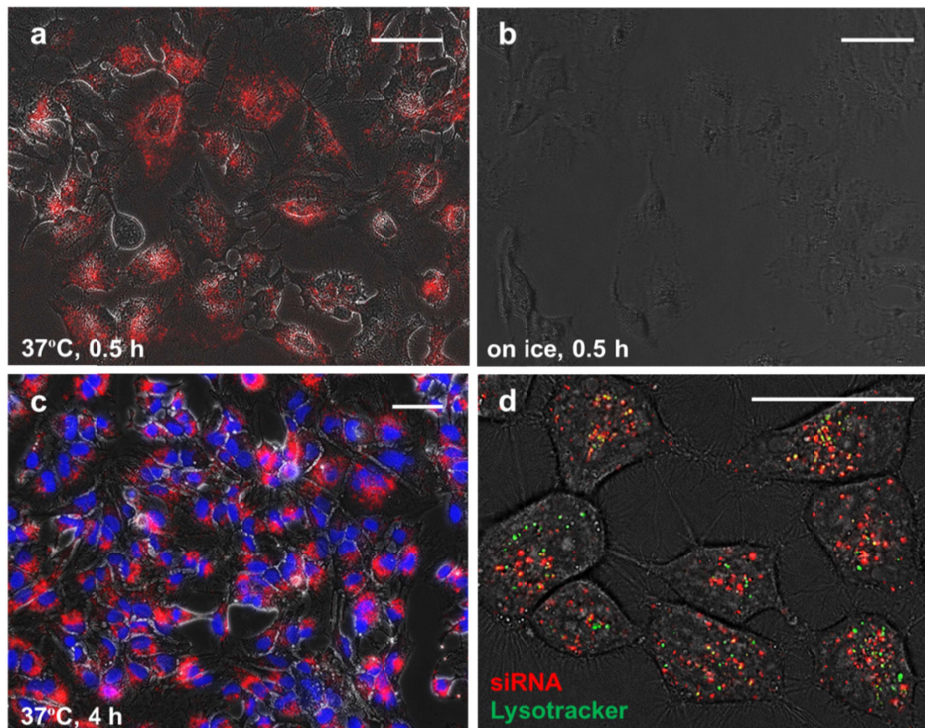


Figure 27 L101-LNP の in vitro 細胞内取り込み試験。肝細胞由来の Huh7 細胞に蛍光色素 Alexa 647 を修飾した siRNA (赤色) を 20 nM となるよう処理した。(a) 37 °C, 30 分間。(b) 氷上, 30 分間。(c) 37 °C, 4 時間。Hoechst による核染色 (青色) を実施。(d) 37 °C, 4 時間および LysoTracker によるライソソーム染色 (緑色) を観察。Bar = 10  $\mu$ m

### 3.3 L101-LNP の体内動態および L101 の生分解性評価

L101 の脂質構造が速やかな代謝をもたらすか確認するため、マウス PK 試験を実施した。コントロールの hPLK1 siRNA を封入した LNP をマウスに 0.1 mg/kg siRNA として投与後、4 時間後までの各タイムポイントにて血清中および肝臓中に含まれるイオン化脂質を LC-MS にて定量した。血中からは L101 が速やかに消失し、その半減期は 10 分以下であった (Figure 28a)。肝臓中では投与 30 分後に最大濃度となり、投与 4 時間後にはわずか投与量の 0.4 % しか検出されなかった (Figure 28b)。これは L021 が投与 4 時間後に投与量の約 60% が肝臓に残存するのと対照的であった。これらの PK 試験結果は、L101 が肝臓から極めて速やかに代謝されることを示している。



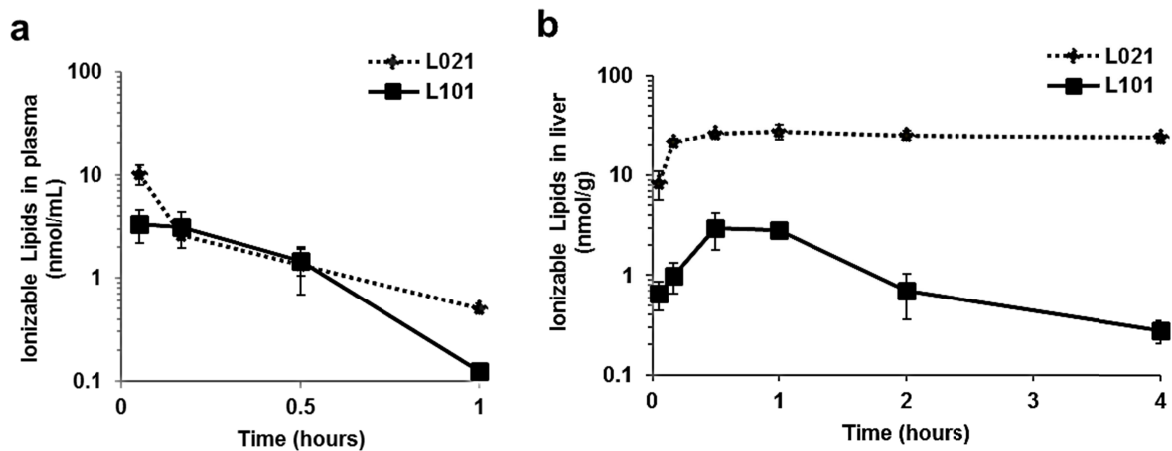


Figure 28 L101-LNP のマウス PK 試験。0.1 mg/kg siRNA としてマウスに単回静脈投与し、0.05, 0.17, 0.5, 1 時間後の血中、および 4 時間後までの肝臓中の L101 濃度を LC-MS にて測定した。各ポイントは平均値 $\pm$ SD (n=4)、破線は L021-LNP の PK を示す。PK, pharmacokinetics.

L101 の速やかな肝臓からの代謝が、脂質鎖のエステルに起因するものか調べるため、脂質鎖にエステルを有さない脂質を LNP に内部標準 (Internal Standard, IS 脂質) として組み入れた LNP を調製し、マウス PK 試験を実施した (Figure 29a)。LNP 処方では L101/IS/DSPC/cholesterol/PEG-DMG = 30/30/8.5/30/1.5 (mol%) として調製した。HPLC-CAD 解析により LNP 内に等量の L101, IS が含まれていることを確認した (Figure 30a)。コントロールの hPLK1 siRNA を封入した LNP を 0.1 mg/kg siRNA として静脈投与し、血中および肝臓中の脂質濃度を測定した。血中では、L101 および IS はほぼ同等の速度で消失したこと、肝臓へほぼ等量を送達されたと推察された (Figure 29b)。一方で、肝臓中の L101 および IS の消失速度は全く異なる結果を示した (Figure 29c)。すなわち、L101 は肝臓から速やかに消失したのに対し、IS は投与 120 分後までほぼ消失されなかった。投与 120 分後では、L101 は IS の 1/100 以下の残存量であった。さらには、L101 の脂質鎖のエステルが加水分解した代謝物が質量分析により検出された (Figure 30b)。これら結果から、エステルを有する L101 が、エステルを有しない内部標準脂質に比べて極めて速やかに代謝されることが示された。

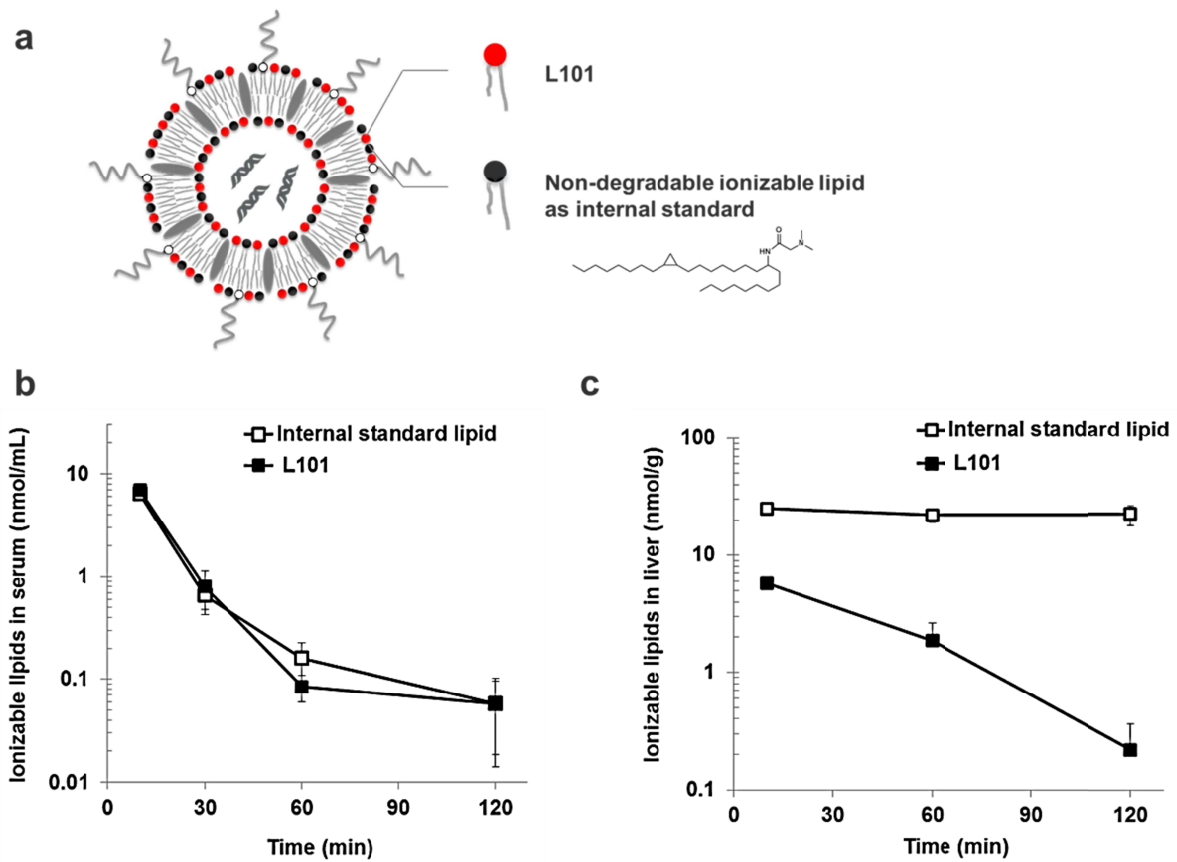


Figure 29 L101 の肝臓中における速やかな代謝。(a) 実験の概念図。エステル構造を有さない非分解性脂質を内部標準物質としてナノ粒子に組み込むことで、L101 の相対的な分解速度を調べる。L101/IS/DSPC/cholesterol/PEG-DMG = 30/30/8.5/30/1.5 (mol%) として LNP を調製した。0.1 mg/kg siRNA としてマウスに尾静脈投与後、10, 30, 60, 120 分後に血清および肝臓を採取した。(b) 血清中の脂質濃度, (c) 肝臓中の脂質濃度。各ポイントは平均値 $\pm$ SD(n=4)を示す。IS, internal standard.

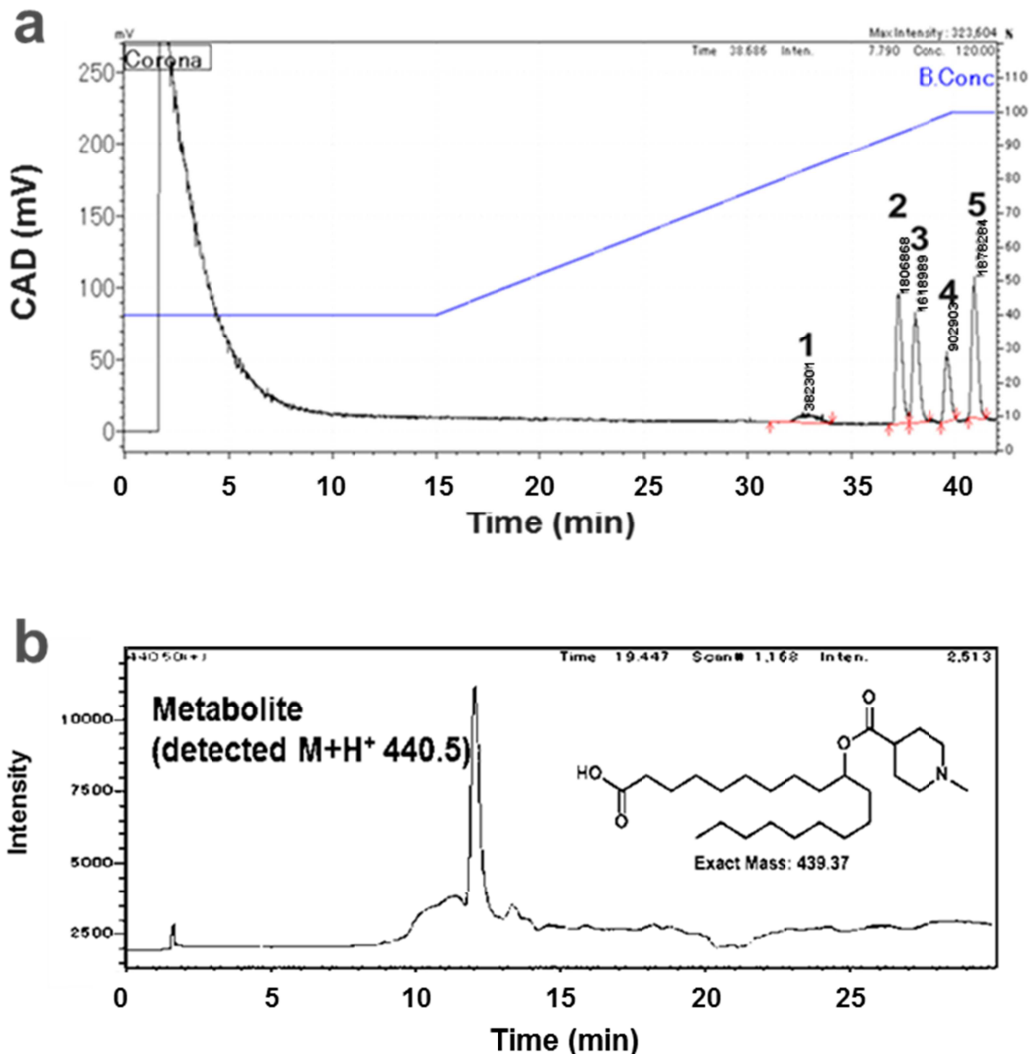


Figure 30 各脂質成分の HPLC による解析。(a) L101 および IS を含む LNP の CAD 解析。Peak 1, PEG-DMG; peak 2, L101; peak 3; DSPC; peak 4, cholesterol; peak 5 IS lipid. 解析条件、溶媒 A: isopropanol/10 mM ammonium acetate = 10/90 (v/v), 溶媒 B: isopropanol/10 mM ammonium acetate = 95/5 (v/v) at 60 °C with a flow rate of 0.30 mL/min. 青線は溶媒 B のグラジエントカーブを示す。(b) L101 代謝物の検出。ESI-MS の Selected ion monitoring (SIM) モードを用いた。解析条件、溶媒 A: isopropanol/10 mM ammonium acetate = 10/90 (v/v), 溶媒 B: isopropanol/10 mM ammonium acetate = 95/5 (v/v) at 60 °C with a flow rate of 0.30 mL/min. Exact MS 439.37, found 440.5 [M+H<sup>+</sup>]. CAD, corona charged aerosol detector.

### 3.4 L101-LNP の毒性評価

L101 の肝臓中の速やかな代謝が忍容性の向上に寄与するか確認するため、ラット単回投与毒性試験を実施した。特定の遺伝子抑制によるオンターゲット効果の影響を

避けるため、ラットに対しては反応性を示さない hPLK1 siRNA を用いた。SD ラット (n=3) に対して、L101-LNP を 1, 2, 4, 8, 16 mg/kg siRNA となるよう尾静脈投与し、24 時間後の状態変化および血中の各種バイオマーカーを測定した (Table 4)。その結果、PBS 投与群と比較して、L101-LNP は 16 mg/kg siRNA まで、肝毒性の指標である AST/ALT 上昇を示さず、極めて高い忍容性を示した。またその他顕著な生化学パラメータの変化は見られなかった。これらのデータは、L101-LNP が安全で、広い治療指数 (Therapeutic Index、マウス ED<sub>50</sub> 値 0.02 mg/kg の 800 倍) を有することを示している。

**Table 4** L101-LNP のラット単回投与毒性評価と血液検査

siRNA dose (mg/kg) <sup>a</sup>	AST (U/L)	ALT (U/L)	T-Bil (mg/dL)	BUN (mg/dL)	WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	Hemoglobin (g/dL)	PLT (10 <sup>3</sup> /μL)
PBS	105 ± 20	44 ± 4	0.03 ± 0.01	17.0 ± 1.5	8.5 ± 1.4	6.3 ± 0.3	12.2 ± 0.4	994 ± 14
1	78 ± 4	37 ± 5	0.03 ± 0.01	17.6 ± 0.4	7.2 ± 1.1	6.3 ± 0.1	12.5 ± 0.3	890 ± 74
2	96 ± 19	38 ± 4	0.03 ± 0.01	18.3 ± 0.9	7.7 ± 1.6	6.2 ± 0.2	12.2 ± 0.2	899 ± 95
4	101 ± 22	39 ± 7	0.03 ± 0.01	14.9 ± 2.7	7.6 ± 0.4	6.4 ± 0.3	12.4 ± 0.5	928 ± 47
8	114 ± 13	43 ± 2	0.03 ± 0	16.9 ± 1.7	8.3 ± 0.7	6.2 ± 0.1	12.3 ± 0.2	928 ± 75
16	145 ± 9	46 ± 6	0.04 ± 0.01	16.1 ± 2.0	11.2 ± 3.1	6.1 ± 0.1	12.3 ± 0.3	910 ± 93

<sup>a</sup> a siRNA targeting human PLK1, which is not cross-reactive with rodents. Sprague-Dawley rats (n=3/group) received PBS or 1, 2, 4, 8 and 16 mg/kg L101-LNPs in a single intravenous injection (based on siRNA weight). Serum samples were collected 24 h post-injection. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-Bil, Total Bilirubin; BUN, blood urea nitrogen; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; PLT, platelets.

### 3.5 エステル位置と遺伝子抑制効果

次にエステル位置について検討した。エステルと脂質鎖の結合部からカルボニル基までのリンカー長を変えた脂質を合成した (Figure 31a)。それらを用いた LNP を調製し、Factor VII マウスモデルにて遺伝子抑制効果を確認した。その結果、C8-C12 はほぼ同等であったが、それよりも短い C6 あるいは長い C12 の場合は、遺伝子抑制効果が減弱した (Figure 31b)。これより、脂質鎖中のエステル結合は最適な位置が存在することが明らかとなった。

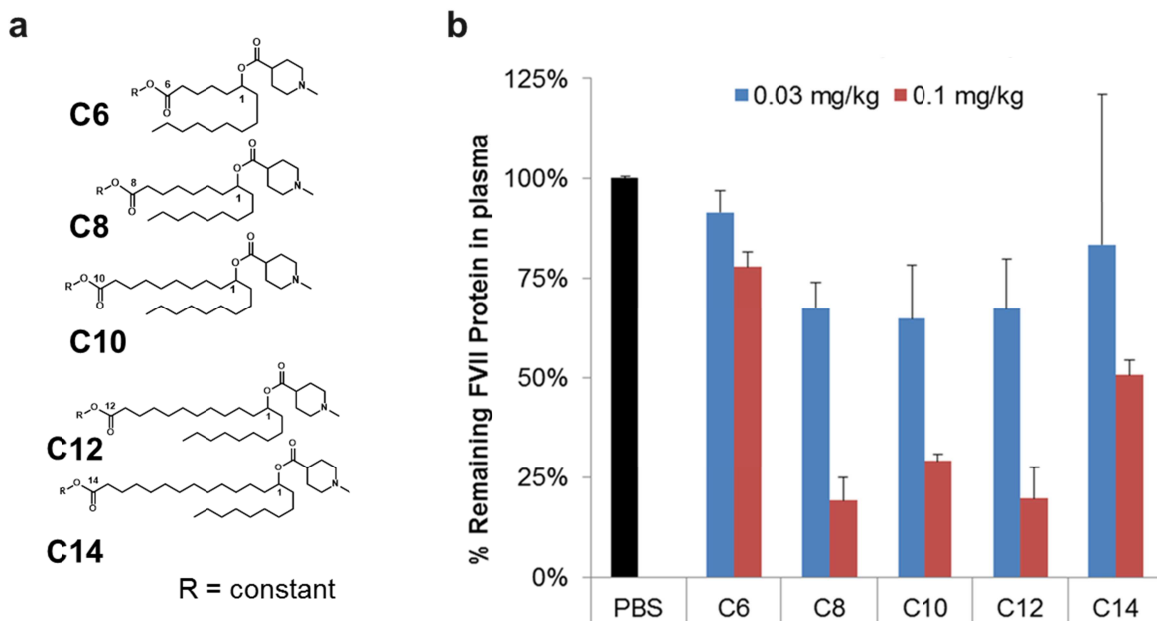


Figure 31 生分解性脂質におけるエステル結合の位置が遺伝子抑制効果に与える影響。(a) 化合物ライブラリ。(b) 遺伝子抑制効果。マウス(n=3/group)に Factor VII siRNA を封入した LNP を 0.03, 0.1 mg/kg siRNA として投与し、24 時間後の血清中の Factor VII 濃度を測定した。

### 3.6 サルにおける評価

RNAi に基づく遺伝子抑制効果とその持続時間は、サル-ヒト間で極めて類似することが示されており、RNAi ではサルが最もヒトに近い動物モデルであるとされている<sup>27</sup>。従ってサルにおける siRNA 送達キャリアの評価は、ヒト臨床応用を想定する上で極めて重要な意味を持つ。そこで我々は、proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)を標的とする siRNA をモデル核酸とした評価を実施した。

PCSK9 は主に肝実質細胞から血中に分泌されるタンパク質であり、肝実質細胞表面の LDLR 数の調節に関わっている<sup>98</sup>。PCSK9 が結合した LDLR はエンドサイトーシスを受け、エンドソーム中で LDLR が分解されること、および PCSK9 の過剰発現により LDLR 数が減少し、結果として血漿 LDL コレステロール値が上昇するメカニズムが明らかとなっている<sup>99</sup>。2003 年に常染色体優性の高コレステロール血症が PCSK9 変異に起因することを発見した報告<sup>100, 101</sup>のわずか 10 年後に、PCSK9 遺伝子の変異による家族性高コレステロール血症を適応とした抗体医薬品が誕生している<sup>102</sup>。一方、抗体医薬などのバイオリジクス（生物学的製剤）は細胞を用いるバイオプラントで生産され、製造コストが高く、しばしば高額医療による経済的負担が懸念されている。それゆえ、低分子医薬品と同様に化学合成に基づく大量生産が可能な核酸医薬は、抗体医薬に替わる合成バイオリジクスとして期待されている<sup>103</sup>。また近年、siRNA による PCSK9 産生阻害剤の臨床試験結果では、効果的に LDL コ

レステロールを低下されることが報告された<sup>25</sup>。そこで本検討においても PCSK9 siRNA を用いて PCSK9 発現抑制および薬理的効果としての LDL コレステロール変化の評価を実施した。

PCSK9 siRNA または control siRNA を封入した LNP を、0.3 mg/kg siRNA としてカニクイザル (n=2-3, オス, 6-9 歳, 平均 4 kg) に単回静脈投与し、投与後 60 日まで採血を実施し、血中の PCSK9 濃度および LDL コレステロール濃度を測定した。投与 2 日前および投与直前の平均値を 100% とし、その後の相対濃度を算出した。その結果、投与 1 日後から 90% 以上の PCSK9 濃度の低下が見られ、またその低下効果は約 1 ヶ月間にわたって継続した (Figure 32a)。また速やかに血清中の LDL コレステロールが最大約 50% 減少した (Figure 32b)。さらには control siRNA 投与群では PCSK9 および LDL コレステロールの減少は確認されなかった。抗 PCSK9 抗体は、承認された用法用量において患者のコレステロール濃度を 40-60% 低下させることができるため、本結果の siRNA による阻害効果も十分に高いことが予想された。以上より、開発した生分解性 LNP がサルで効果的に働くことが明確に示された。

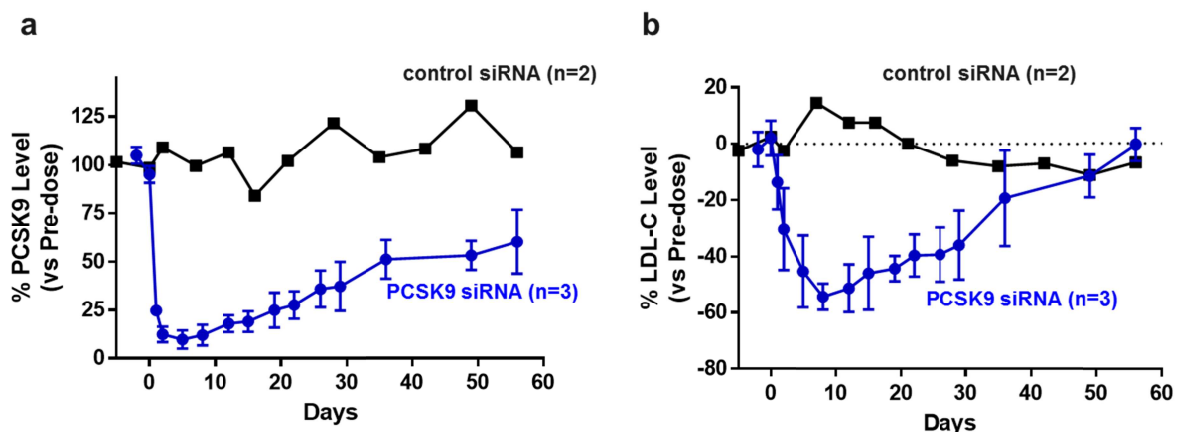


Figure 32 サル単回投与試験により PCSK9 および LDL コレステロール低下が確認された。(a) 血清中 PCSK9 濃度推移。(b) 血清中 LDL コレステロール濃度推移。カニクイザル (n=2-3) に PCSK siRNA (青線) および control siRNA (黒線) を封入した LNP を 0.3 mg/kg siRNA として単回静脈投与し、投与後 60 日まで採血を実施した。投与前の濃度から相対濃度を算出した。各ポイントは平均値±SD を示す。

### 3.7 サル肝臓中における生分解性の証明

脂質代謝や肝実質細胞内の酵素活性の種差により、生分解性脂質の代謝能が異なる可能性がある。各種による血清中脂質プロファイル調べた報告では、異常脂質血症の動物モデルとして、サルがヒトに最も近い種であることが明らかにされている<sup>104</sup>。更には肝臓の解剖学に関する報告では、カニクイザルの肝臓が、霊長類の中でも最もヒトの肝臓に類似していることが報告されている<sup>105</sup>。我々の知る限りでは、カニクイザル肝臓中における核酸送達用キャリアの消失について調べた報告例はな

い。開発したイオン化脂質の相対的な消失速度を調べるため、Figure 29 と同様の試験を実施した。カニクイザルに LNP を 0.1 mg/kg siRNA として静脈投与後、0.17, 1, 2 時間後に採血を実施した。血中 PK を評価したところ、生分解性脂質と非分解性の Internal standard Lipid が同速度で消失したことから、ほぼ等量が肝臓へ送達されたと推察された (Figure 33a)。次に投与 24 時間後にサル肝臓の 4 葉から合計 5 サンプルを採取し、残存する脂質濃度を測定した。その結果、Internal standard Lipid は投与量の 60% が残存していたのに対し、生分解性脂質は投与量のわずか 5% の残存であった (Figure 33b)。さらには定量された脂質残存量が 5 箇所においてほぼ等量であったことから、LNP が血管を通じて肝臓全体へ均一に分布していることが判明した。この生分解性脂質の相対的に速い消失は、カニクイザル肝臓中における生分解性を示している。

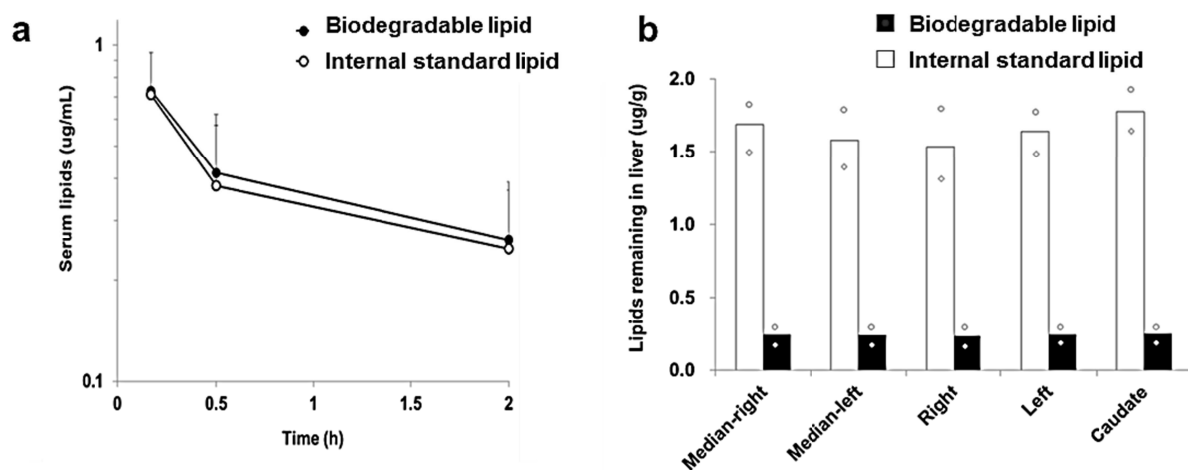


Figure 33 サルにおける生分解性脂質の速やかな消失。カニクイザル (n=2) に LNP を 0.1 mg/kg siRNA として静脈投与し、投与 0.17, 0.5, 2 時間後に採血および 24 時間後に肝臓を採取した。(a) 血清中のイオン化脂質濃度推移。(b) 肝臓中のイオン化脂質濃度。各シンボル(丸印および菱形)は各個体の値を表し、バーは 2 頭の平均値を示す。肝臓サンプルは 4 葉(中央、右、左、背面)から計 5 カ所(最も大きい中央の葉からは左右の 2 カ所)から採取し、ホモジネートとした後、LC-MS により脂質残存量を測定した。

### 3.8 考察

本章では、非対称型イオン化脂質に生分解性を付与した新規脂質とその LNP の開発について報告した。エステルは生分解性のバイオマテリアルに幅広く用いられており、その概念を LNP に応用した<sup>94</sup>。合成した L101 は LNP の粒子形成また遺伝子抑制効果を損なわなかった。核酸送達の過程において、イオン化脂質はヘキサゴナル II 構造(非二重膜層)の形成をエンドソーム内で促進させることで、エンドソームから細胞質への核酸送達を達成する<sup>43</sup>。脂質鎖への適切なオレフィン化学修飾は、シリンダー型からコーン型へと脂質鎖を転換させ、ヘキサゴナル II 構造を取りやすくさせる<sup>66</sup>。L101-LNP は Huh7 細胞で効率的にエンドソーム離脱を示し、また in

vivo で高い遺伝子抑制効果を示した。従って、脂質鎖のエステルは、効果的にヘキサゴナル II 構造への転換を促していると推察された。また高い遺伝子抑制効果を示すための最適なエステルの位置が存在することが明らかとなり、適切な脂質デザインが必要であることが判明した。

マウス PK 試験の結果、L101 は血中および肝臓中から速やかに消失することが明らかとなった。L101 は脂質鎖にエステルを有さない内部標準脂質に比べて、極めて速やかな肝代謝を示した。具体的には、投与 2 時間後には、投与量の<0.7%以下の L101 が検出されたのに対し、約 70%の内部標準脂質が検出された。さらには、エステルが加水分解した代謝物が質量分析により検出された。興味深いことに、ヘッドグループのエステル加水分解は、すべての試験において観察されなかった。この現象は L021 でも同様であった。これより、三級アミンを有する環状型ヘッド構造は、酵素による加水分解を受けにくいと推察された。ヘッドグループをつなぐエステルからアルキルが分岐する構造の立体障害により、酵素の接近が妨げられているのかもしれない<sup>106</sup>。

ヒト肝臓中における L101 の加水分解速度を推定するため、市販の冷凍保存された肝 S9 を用いた *in vitro* 代謝評価を実施した。様々な試験条件で実験をしたものの、L101 の分解は全く検出されなかった。さらには同様に市販の冷凍保存されたマウス S9 を用いた場合も、分解は検出されなかった。次に、マウス肝臓を採取して作成した新鮮な肝ホモジネートを用いて *in vitro* 代謝評価を実施した (Figure 34)。その結果、経時的な L101 の分解、および L101 の脂質鎖中のエステルが加水分解されたカルボン酸の代謝物 (構造は Figure 30b 参照) の増加が確認された。また新鮮なマウス血清を用いたところ、L101 の分解は検出されなかった。これらの結果から、L101 は血中のエステラーゼにより加水分解は受けず、細胞内において高い酵素活性を保つ肝細胞内の代謝酵素、例えばライソソーム中のリパーゼなどにより、加水分解を受けることが示唆された。



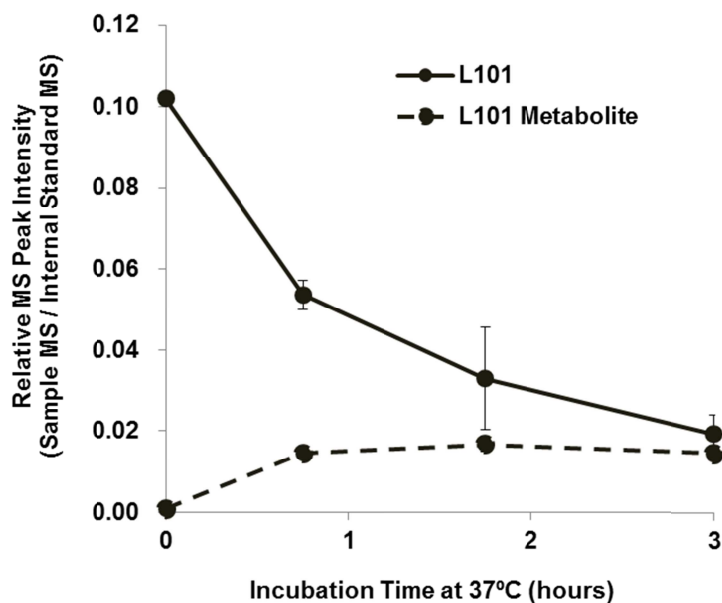


Figure 34 新鮮なマウス肝ホモジネートを用いた *in vitro* 代謝評価。マウスを屠殺後、2時間以内に PBS を用いて肝ホモジネートを準備した。肝ホモジネートに L101 を添加し、0、0.75、1.75、3 時間後に冷えたアセトニトリルおよびイソプロパノールの混合溶液 (50/50, v/v) と混ぜ反応をクエンチさせた。遠心後、上澄み溶液を HPLC-MS 解析した。

生分解性 LNP の技術基盤を更に発展させるために、L101 の分解とエンドソーム離脱のタイムコースを推定することは重要である。エンドソーム離脱前に L101 が完全に分解する場合は遺伝子抑制効果がなくなると考えられるが、L101 による長期的な遺伝子抑制効果から、十分量の siRNA が細胞質に放出されていたと推察される。Wittrup らは、LNP による siRNA 送達は、エンドサイトーシス後の 5-15 分以内のアーリーエンドソームの状態から起こると報告している<sup>85</sup>。またマウス肝臓内の L101 の代謝は、少なくとも投与後 10 分の時点で生じていた (Figure 29c)。さらには L021 と L101 は同等の ED<sub>50</sub> 値を有していたことから、L101 は速やかにエンドソーム離脱を促した後、ライソソームあるいは細胞質において極めて速やかな代謝を受けると推察された。

ラット単回投与毒性試験から、L101 が 16 mg/kg siRNA、すなわちマウス ED<sub>50</sub> 値の 800 倍もの高い忍容性を示すことが明らかとなった。Barros らは、臨床試験に用いられたことのある DLinDMA を含む LNP の最大投与可能量 (MTD) は、ラットにおいて 3 mg/kg siRNA であり、投与量制限毒性は肝毒性であったと報告している<sup>61</sup>。また同時に Barros らは、LNP の毒性が封入された siRNA の種類に依らなかったことを報告している<sup>61</sup>。投与量漸増試験において L101 は AST/ALT 上昇を起こさなかったことは、L101 の速やかな肝代謝に起因するものと推察された。

生分解性 LNP のサルにおける評価では、わずか 0.3 mg/kg siRNA を単回投与した後に、約 1 ヶ月にわたる血清 PCSK9 および LDL コレステロールの減少が確認された。

重要なことに、生分解性脂質はサルにおいても速やかな肝消失を示した。脂質は肝臓全体に等しく分布しており、またその消失速度も同じであった。開発した生分解性 LNP は広い治療指数を持つことから、高い投与量や長い治療期間を要する疾患への適用が期待される。

以上より第 3 章では、第 2 章までに得られた知見を活かして、更なる治療指数の拡大を目指した生分解性脂質の開発を報告した。生分解性脂質はヒト臨床応用を予測する上で最も重要なサルにおいて、顕著で長期間持続する遺伝子抑制効果および薬力学的効果を示した。さらには脂質がサル肝臓内で速やかに消失することを明らかにした。

## 結論

本研究では、肝臓への効率的な siRNA 送達を可能にする LNP の開発と、その取り込みメカニズムの研究、さらには生分解性を付与させ治療指数を広げた生分解性 LNP の開発を行った。

第 1 章では、Factor VII マウスモデルを用いてイオン化脂質のライブラリからスクリーニングを実施し、高い遺伝子抑制効果を達成する L021 を見いだした。その遺伝子抑制効果は ED<sub>50</sub> 値で 0.02 mg/kg siRNA を示し、ラットにおいて 2 mg/kg siRNA (ED<sub>50</sub> 値の 100 倍) までの十分な忍容性を示した。アミド結合を有する L001 およびエステル結合を有する L021 は同一の pKa を有するものの、ED<sub>50</sub> 値に 30 倍の差が見られたが、その差は LNP の細胞内取り込み量にあることを示した。また長期保管安定性試験では、L021-LNP は冷蔵保管で 2 年にわたる安定性を示し、その環状ヘッド構造が粒子安定性に寄与することを明らかにした。

第 2 章では、L021-LNP の特性把握を実施した。L021-LNP は pKa 6.4 を示し、血中の中性 pH 環境からエンドソーム内の低 pH 環境において表面電荷が中性から正へと変化し、それに応じて膜融合能が増すことが判明した。<sup>31</sup>P NMR 解析により、ナノ粒子内部における siRNA の運動性が低いことから、siRNA とイオン化脂質が静電的相互作用により内部でコンプレックスを構築していることが推察された。ApoE 欠損マウスと野生型マウスの比較試験、また LDLR を標的とする siRNA の前処置投与試験を通じて、L021-LNP が ApoE および LDLR を介して肝実質細胞に取り込まれることが明らかとなった。本研究を通じて L021-LNP は現在臨床試験で用いられている LNP と同様の構造およびメカニズムで細胞内へ取り込まれることを明らかにした。

第 3 章では、脂質鎖にエステルを修飾した生分解性イオン化脂質の合成および生物学的評価を実施した。生分解性脂質 L101 は、L021 から化学構造的に大きな変化があるにもかかわらず、良好な粒子形成および遺伝子抑制効果 (ED<sub>50</sub> 値 0.02 mg/kg) を示した。マウス体内動態試験から、L101 は血中および肝臓から速やかに消失することが明らかとなった。また速やかな肝代謝が、エステルの加水分解によることを LC-MS 解析により明らかにした。ラット単回投与毒性試験から、16 mg/kg siRNA までの極めて高い忍容性 (ED<sub>50</sub> 値の 800 倍) が示された。さらにサル試験において、0.3 mg/kg の PCSK9 siRNA を静脈投与したところ、最大 90% 以上の遺伝子抑制効果を示し、その抑制効果は約 1 ヶ月にわたって持続した。重要なことに、薬理学的効果を示す LDL コレステロール値が 50% の低下を示したことから、siRNA の PCSK9 阻害剤として十分な有用性を示した。さらにはサル肝臓中で脂質が加水分解されることが示された。

本研究で得られた知見および技術が、実際の siRNA 医薬開発につながることを期待される。

## 実験項

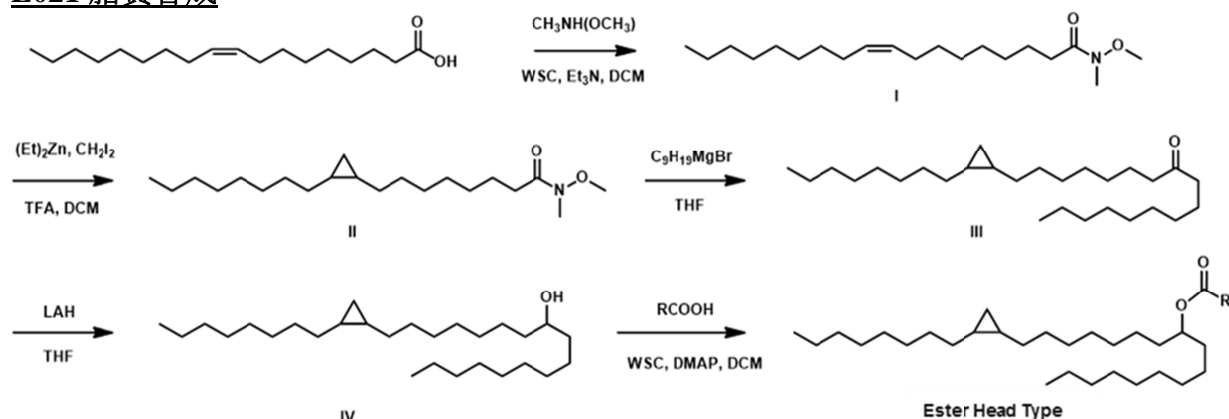
### 研究資材

本研究で用いた研究資材を下記に記す。各イオン化脂質は相互薬工(Tokyo, Japan)または自社(Tokyo, Japan)、1,2-ジステアロイルグリセロール-3-ホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロールは日本精化 (Osaka, Japan); PEG-DMG (Cat. No. GM-020) は日油 (Tokyo, Japan); 酢酸ナトリウム、リン酸緩衝液粉末、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、トリス、グリシン、エチレンジアミン四酢酸、グリセロール、Triton X-100、エタノール、スキムミルク粉末、細胞培養液 DMEM (Cat. No. 041-29775)、Collagenase Type X (Cat. No. 035-17861) は和光(Tokyo, Japan); ソムノペンチルは共立製薬(Tokyo, Japan)、フォーレン吸入麻酔液(有効成分：イソフルラン)はアッヴィ合弁会社(Tokyo, Japan)、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎児血清、Liver perfusion medium (Cat No. 17701-038)はサーモフィッシャー(MA, USA); PAGE 用プレキャストゲル(Cat. No. 2331750)は ATTO (Tokyo, Japan); キシレンシアノール(Cat. No. 366-21)はナカライテスク (Kyoto, Japan); 6-(パラ-トルイジノ)-2-ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩(Cat. No. T9792)、ヘビ由来ホスホジエステラーゼ(Cat. No. P3243) はシグマアルドリッチ (MO, USA); SYBR Green II (Cat. No. 5771A) はタカラバイオ (Shiga, Tokyo); Hoechst 33342 (Cat. No. H342) は同仁堂 (Kumamoto, Japan); Alexa Fluor 647 NHS エステル (Cat. No. A20106), LysoTracker Green DND-26 (Cat. No. L7526) はモレキュラプローブ(MA, USA); 各 siRNA はジーンデザイン (Osaka, Japan); CircuLex Human PCSK9 ELISA Kit (Cat No CY-8079) は CircuLex (Nagano, Japan); Biophen FVII assay kit (Cat. No. 221304) は Anlara (OH, USA); UltraPure DNase/RNase-Free distilled water (Cat. No. 10977-015)、the Quant-iT Ribogreen RNA assay kit (Cat. No. R11491)、Zymax Rabbit anti-Sheep IgG(H+L) HRP (Cat No. 81-8620) はインビトロジェン(MA, USA); SDS PAGE 用泳動バッファー 10xTG-SDS (Cat No. NXV-BUF5) および SDS PAGE 用プレキャストゲル 10-20%/18W XV PANTERA GEL (Cat No. NXV-398HP) はディー・アール・シー (Tokyo, Japan); Anti-Apolipoprotein E Goat pAb (Cat No. 178479)はメルクミリポア (Darmstadt, Germany); Precision Plus Dual color (Cat No. 161-0374)はバイオラッド (Tokyo, Japan); ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cat No. PRN2232)、Sephacryl CL-4B (Cat No. 17015001)は GE ヘルスケア (IL, USA); 透析膜 100 kD Float-A-Lyzer G2 (Cat. No. G235035) はスペクトラム研究所 (CA, USA); 少量採血容器キャピジェクト血清用 (Cat. No. 2757414) はテルモ (Tokyo, Japan); マウスおよびヒト肝 S9 はゼノテック (Kansas, USA); BALB/c マウス, C57BL/6 マウス, C.KOR/Stm Slc-Apoeshl マウス, Sprague-Dawley ラット は日本 SLC (Shizuoka, Japan); カニクイサルは Hainan Jingang Biotech (Hainan, China); シリンジポンプ KDS-200 は KD scientific (MA, USA); Zeta Sizer はマルバーン (Worcestershire, UK); HPLC 装置は島津製作所 (Kyoto, Japan); Corona Charged Aerosol Detector はサーモフィッシャー (MA, USA); Hitachi 7180 clinical analyzer は日立 (Tokyo, Japan); ADVIA 120 hematology system はシーメンス (Bayern, Germany); 蛍光顕微鏡 BZ-X710 はキーエンス (Tokyo, Japan); IVIS imaging

system および 96well 蛍光プレートリーダーWallac 1420 ARVO は PerkinElmer (MA, USA); およびイメージアナライザー LAS-4000 は富士フィルム (Tokyo, Japan).

## 実験方法

### L021 脂質合成



**化合物 I** オレイン酸 (75.0 g、265.5 mmol) を塩化メチレン (531.0 mL) に溶かした溶液中に、WSC (101.8 g、531.1 mmol)、トリエチルアミン (53.7 g、531.1 mmol)、N,O-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩 (51.8 g、531.1 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で 5 回洗浄後、1M 水酸化ナトリウム水溶液で 1 度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。得られた未精製の化合物 I (88.9 g) は精製を行わずに次のステップへ用いた。

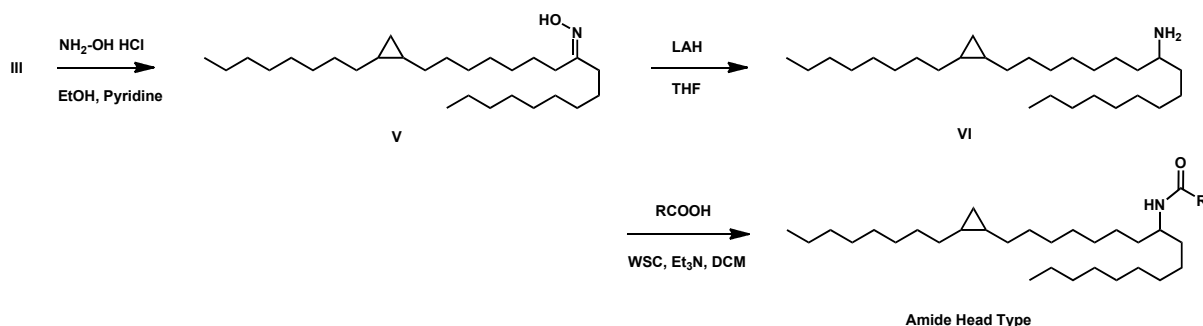
**化合物 II** ジエチル亜鉛 (764.9 mL、764.9 mmol [1M 溶液]) を塩化メチレン (1416.5 mL) に溶かし、 $0^\circ\text{C}$  まで冷却した。その溶液に TFA (87.2 g、764.9 mmol) をゆっくり滴下した。ジヨードメタン (204.9 g、764.9 mmol) を加え、 $0^\circ\text{C}$  のまま 30 分攪拌した。この溶液に粗生成物 1 (83.0 g、255.0 mmol) を加え、室温まで昇温し 1 時間攪拌した。反応終了を確認した後に反応を塩化アンモニウム (300 mL) でクエンチした。分液して得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 II (73.0 g) を得た。

**化合物 III** 化合物 II (17.0 g、50.1 mmol) を THF (100 mL) に溶かし、1M のノニルマグネシウムブロミド (100 mL、100 mmol) を窒素雰囲気下室温で滴下した。1 時間攪拌し、反応の終了を確認した後に十分量の塩化アンモニウム水溶液を加えて反応をクエンチした。反応溶液を水洗し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 III (11.7 g) を得た。

**化合物 IV** 得られた化合物 III (25.0 g、61.5 mmol) をテトラヒドロフラン (123 mL) に溶かした溶液中に、水素化リチウムアルミニウム (2.3 g、61.5 mmol) を添加し、

一時間加熱還流した。反応終了を確認した後に、反応系中に水 (2.3 mL)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (2.3 mL)、水 (6.9 mL) の順にゆっくり加え反応をクエンチした。この溶液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 IV を得た。

**エステル型ヘッドグループを有するイオン化脂質** 得られた化合物 IV (0.5 g、1.22 mmol) を塩化メチレン (4.9 mL) に溶かした溶液中に、WSC (0.47 g、2.45 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.03 g、0.24 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 (0.35 g、2.45 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で 5 回洗浄後、1N 水酸化ナトリウム水溶液で 1 度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、各イオン化脂質を得た。

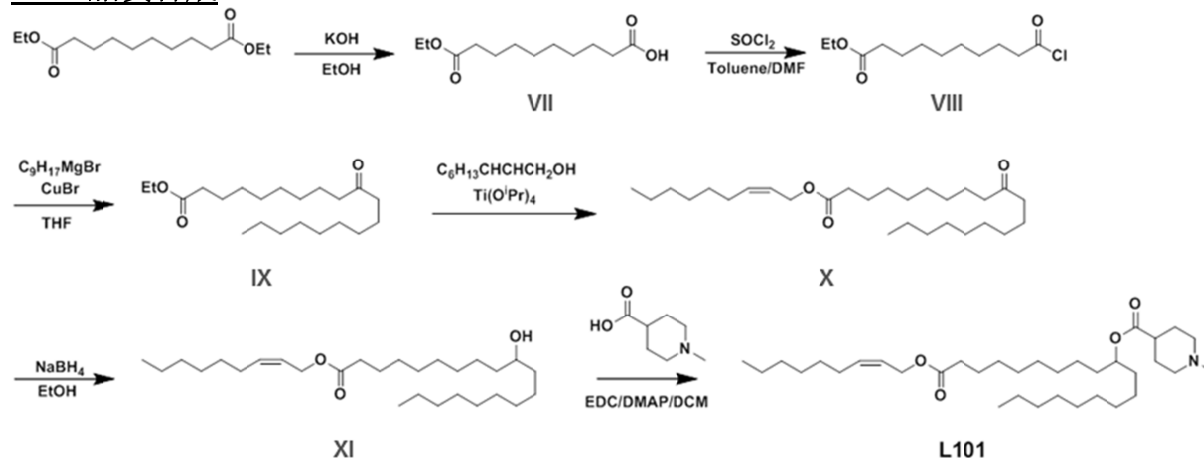


**化合物 V** 化合物 III (11.0 g、27.0 mmol) をエタノール (108 mL) に溶かした溶液中に、ヒドロキシアミン塩酸塩 (2.4 g、35.1 mmol)、ピリジン (18.0 mL) を添加し、室温で一晩攪拌した。反応溶液を濃縮し、酢酸エチルで抽出、水洗し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 V (10.8 g) を得た。

**化合物 VI** 得られた化合物 V (10.0 g、23.7 mmol) を THF (237 mL) に溶かし、0°C に冷却した。その溶液に水素化リチウムアルミニウム (0.9 g、23.7 mmol) を添加し、1 時間加熱還流した。反応終了を確認した後に、反応系中に水 (0.9 mL)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (0.9 mL)、水 (2.7 mL) の順にゆっくり加え反応をクエンチした。この溶液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 VI (5.5 g) を得た。

**アミドヘッドグループを有するイオン化脂質** 得られた化合物 VI (0.5 g、1.23 mmol) を塩化メチレン (4.9 mL) に溶かした溶液中に、WSC (0.47 g、2.45 mmol)、トリエチルアミン (0.25 g、2.45 mmol)、N,N-ジメチルグリシン (0.25 g、2.45 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で 5 回洗浄後、1N 水酸化ナトリウム水溶液で 1 度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、各イオン化脂質を得た。

## L101 脂質合成



**化合物 VII** セバシン酸ジメチル (200 g、868.4 mmol) をエタノール (868 mL) に溶かした溶液を 0°C まで冷却した。その溶液に水酸化カリウム (48.7 g、868.4 mmol) のエタノール (300 mL) 溶液を滴下し、滴下後 0°C で 12 時間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルと水を加え、未反応物を有機層に抽出することで除去した。水層を塩酸にて酸性にし、酢酸エチルを加えて目的物を抽出した。有機層を水、食塩水で洗浄し、濃縮した。化合物 **VII** (150.3g) は精製を行わずに次のステップへ用いた。

**化合物 VIII** 化合物 **VII** (50.0 g、231.2 mmol) と触媒量の DMF (23 mL) との懸濁液に、塩化チオニル (41.3 g、346.8 mmol) を滴下した。反応終了後、塩化チオニルを減圧下留去した後、蒸留精製し、化合物 **VIII** (25.8 g) を得た。

**化合物 IX** 塩化亜鉛 (2.7 g、20.1 mmol) を THF (61 mL) に溶解させ、-78°C まで冷却した。この溶液に 1M のノニルマグネシウムブロミド (40.2 mL、40.2 mmol) を窒素雰囲気下 -78°C で滴下した。滴下後 0°C まで昇温し 30 分攪拌した後、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (0.58 mg、0.5 mmol) を投下し、化合物 **VIII** (5.0 g、20.1 mmol) を滴下した。0°C で更に 1 時間攪拌した後に 1M 塩酸水溶液を加えてクエンチした。反応溶液より析出物をろ別し、ろ液を酢酸エチルで抽出し有機層を水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 **IX** (5.0 g) を得た。

**化合物 X** 化合物 **IX** (2.0 g、5.9 mmol)、2-ノネノール (4.2 g、29.4 mmol)、チタニウムテトラプロポキシド (0.2 g、0.6 mmol) の混合液を攪拌しながら、外浴を 110°C まで昇温した。出てくる留出液を除きながら攪拌を続け、留出が見えなくなった時点を反応終点として冷却後水を加えてクエンチした。反応液を酢酸エチルで抽出し水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 **X** (2.6 g) を得た。

化合物 **XI** 化合物 **X** (1.0 g, 2.3 mmol) をエタノール (23 mL) に溶かした溶液中に、水素化ホウ素ナトリウム (0.087 g, 2.3 mmol) を添加し、10 分間反応させた。反応終了後 1N 塩酸でクエンチした。酢酸エチルで抽出し、水、食塩水で洗浄後、有機層を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、化合物 **XI** (0.8 g) を得た。

**L101** 化合物 **XI** (0.8 g, 1.8 mmol) を塩化メチレン (7 mL) に溶かした溶液中に、WSC (0.7 g, 3.7 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.04 g, 0.4 mmol)、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸 (0.5 g, 3.7 mmol) を添加した。室温で翌日まで攪拌した後、水を加え、有機層を分液した。有機層を水で 5 回洗浄後、1N 水酸化ナトリウム水溶液で 1 度洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、**L101** (0.12 g) を得た。

### 各イオン化脂質の同定

#### **L001**

ESI-MS calcd. 492.5, found (M+H) 493.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.84 (1H, d), 3.88 (1H, dd), 2.93 (2H, s), 2.29 (6H, s), 1.64 (1H, m), 1.49 (2H, m), 1.27 (39H, m), 0.89 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L002**

ESI-MS calcd. 506.5, found (M+H) 507.5, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.84 (1H, d), 3.88 (1H, dd), 2.93 (2H, s), 2.29 (6H, s), 1.64 (1H, m), 1.49 (2H, m), 1.27 (41H, m), 0.89 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L003**

ESI-MS calcd. 520.5, found (M+H) 521.5, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.06 (1H, d), 3.88 (1H, dd), 2.28 (4H, m), 2.21 (6H, s), 1.78 (2H, q), 1.64 (4H, s), 1.27 (40H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L004**

ESI-MS calcd. 518.5, found (M+H) 519.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.90 (1H, tt), 2.59 (4H, m), 2.17 (3H, s), 1.80 (4H, m), 1.61 (2H, m), 1.48 (2H, m), 1.36 (8H, m), 1.27 (37H, m), 1.14-1.12 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L005**

ESI-MS calcd. 532.5, found (M+H) 533.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.90 (1H, tt), 3.02 (2H, t), 2.84 (4H, m), 2.54 (2H, t), 1.89 (4H, s), 1.48 (2H, m), 1.36 (8H, m), 1.27 (33H, m), 1.14-1.12 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L006**

ESI-MS calcd. 546.6, found (M+H) 547.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.86 (1H, tt), 2.54 (2H, t), 2.42 (2H, m), 2.34 (2H, t), 1.58 (8H, m), 1.46 (4H, m), 1.36 (8H, m), 1.27 (35H, m), 1.14-1.12 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L007**



ESI-MS calcd. 532.5, found (M+H) 533.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.90 (1H, tt), 3.30 (1H, d), 3.07 (1H, ddd), 2.89 (1H, d), 2.53 (1H, ddd), 2.29 (1H, ddd), 1.95 (1H, m), 1.75 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.46 (2H, m), 1.36 (8H, m), 1.27 (35H, m), 1.14-1.12 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L008**

ESI-MS calcd. 518.5, found (M+H) 519.7, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.99 (1H, d), 3.85 (1H, m), 3.07 (1H, m), 2.85 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.33 (2H, m), 2.23 (1H, m), 1.76 (4H, m), 1.47 (4H, m), 1.26-1.25 (36H, m), 1.12 (3H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

#### **L009**

ESI-MS calcd. 532.5, found (M+H) 533.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.17 (1H, d), 3.84 (1H, m), 3.16 (1H, t), 3.00 (1H, dd), 2.64 (1H, ddd), 2.47 (1H, ddd), 2.27 (1H, ddd), 2.15 (1H, ddd), 1.76 (4H, m), 1.47 (2H, m), 1.26-1.25 (40H, m), 1.12 (3H, m), 1.06 (4H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

#### **L010**

ESI-MS calcd. 532.5, found (M+H) 533.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.28 (1H, d), 3.88 (1H, m), 2.89 (1H, d), 2.42 (1H, dd), 2.21 (3H, s), 2.00 (2H, m), 1.72 (2H, m), 1.49 (4H, m), 1.26-1.25 (40H, m), 1.12 (3H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

#### **L011**

ESI-MS calcd. 546.6, found (M+H) 547.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.88 (1H, m), 2.89 (1H, m), 2.85 (1H, m), 2.48 (3H, s), 1.89 (1H, m), 1.76 (2H, m), 1.63 (2H, m), 1.47 (2H, m), 1.26-1.25 (42H, m), 1.12 (6H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

#### **L012**

ESI-MS calcd. 507.5, found (M+H) 508.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.88 (1H, q), 2.61 (2H, dd), 2.45 (2H, dd), 2.24 (6H, s), 1.51 (4H, m), 1.34 (6H, m), 1.27 (32H, m), 1.13 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L013**

ESI-MS calcd. 521.5, found (M+H) 522.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.87 (1H, q), 2.31 (4H, m), 2.21 (6H, s), 2.17 (1H, s), 1.80 (2H, m), 1.61 (1H, s), 1.50 (2H, d), 1.37 (6H, m), 1.27 (32H, m), 1.14 (2H, m), 0.87 (6H, dd), 0.64 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

#### **L014**

ESI-MS calcd. 521.5, found (M+H) 522.6 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.88 (1H, tt), 2.62 (2H, ddd), 2.23 (1H, ddd), 2.22 (6H, s), 2.18 (1H, d), 1.97 (1H, d), 1.50 (4H, m), 1.36 (8H, m), 1.27 (31H, m), 1.14-1.12 (2H, m), 0.88 (6H, m), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, dd), -0.34 (1H, dd).

#### **L015**

ESI-MS calcd. 505.5, found (M+H) 506.5, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.88 (1H, d), 3.56 (2H, m), 3.26 (3H, m), 2.31 (3H, s), 1.76 (1H, m), 1.51 (4H, m), 1.36-1.25 (40H, m), 1.12 (3H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L016**

ESI-MS calcd. 547.5, found (M+H) 548.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.87 (1H, q), 3.59 (2H, m), 2.66 (2H, t), 2.48 (2H, t), 2.39 (2H, m), 1.58 (4H, m), 1.49 (4H, m), 1.43-1.27 (38H, m), 1.13 (4H, m), 0.88 (6H, dd), 0.64 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L017**

ESI-MS calcd. 519.5, found (M+H) 520.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.85 (1H, ddd), 3.03 (1H, t), 2.87 (1H, t), 2.64 (1H, dd), 2.59 (1H, dd), 2.47 (1H, d), 2.35 (3H, s), 2.09 (2H, ddd), 1.50 (4H, m), 1.36-1.25 (37H, m), 1.12 (3H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L018**

ESI-MS calcd. 533.5, found (M+H) 534.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.86 (1H, ddd), 3.00 (2H, m), 2.73 (1H, dd), 2.54 (2H, dd), 2.47 (2H, ddd), 2.08 (2H, m), 1.50 (5H, m), 1.36-1.25 (36H, m), 1.12 (6H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L020**

ESI-MS calcd. 547.5, found (M+H) 548.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.88 (1H, ddd), 2.90 (2H, d), 2.49 (2H, dd), 2.27 (1H, m), 1.98 (4H, m), 1.78 (2H, m), 1.49 (4H, m), 1.36-1.25 (37H, m), 1.12 (6H, m), 0.87 (6H, m), 0.62 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L021**

ESI-MS calcd. 533.5, found (M+H) 534.6, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.87 (1H, q), 2.81 (2H, d), 2.26 (3H, s), 2.23 (1H, m), 1.98 (2H, t), 1.93 (2H, d), 1.80 (2H, m), 1.50 (4H, m), 1.37 (6H, m), 1.27 (32H, m), 1.13 (2H, s), 0.87 (6H, dd), 0.64 (2H, dd), 0.55 (1H, m), -0.34 (1H, dd).

### **L101**

ESI-MS calcd 563.5, found (M+H) 564.5 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.32 (2H, m), 4.88 (1H, tt), 4.06 (2H, t), 2.81 (2H, d), 2.28 (6H, m), 2.03 (8H, m), 1.90 (2H, m), 1.81 (2H, m), 1.61 (4H, m), 1.49 (4H, m), 1.36 (5H, m), 1.27 (21H, m), 0.88 (6H, m).

## **Lipid nanoparticles (LNP)の調製**

siRNA は pH 4.0 に調製した 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液に溶解した。イオン化脂質、DSPC、コレステロールおよび PEG-DMG は、モル比 60/8.5/30/1.5 として、エタノールに溶解した。siRNA および総脂質の質量比は 0.06 (wt/wt)となるように LNP を調製した。siRNA 水溶液および脂質エタノール溶液をシリンジに充填した。シリンジポンプを用いて、siRNA およびエタノールの送液速度を 3 mL/min および 1 mL/min として混合した。得られた 25%のエタノールを含む混合溶液は、透析チューブ (100 kD) を用いて、pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) に終夜透析した。透析後、LNP 溶液を 0.22 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌し、実験に用いた。

## **粒子径・封入率・Z 電位・pKa の測定**

粒子径および PDI は動的光散乱法に基づく Zeta Sizer (Malvern 社製) を用いて測定した。LNP は PBS または生理食塩水にて 10 – 100 倍希釈して粒子径測定を実施した。siRNA の LNP への封入率 (Encapsulation efficiency, EE %) は、全 siRNA 濃度 (Total)

および内包されていない siRNA 濃度 (Free) を、蛍光色素を用いた Quant-iT Rigoreen RNA assay kit で測定し、以下の式に従って算出した:  $EE (\%) = (1 - \text{free siRNA concentration} / \text{total siRNA concentration}) \times 100$ 。LNP 中のイオン化脂質の pKa は、pH に応答して異なる蛍光波長を発する TNS 試薬を用い、既報に従って測定した<sup>72</sup>。

### HPLC を用いた脂質成分の測定

LNP 中に含まれる各脂質成分濃度は、逆相 HPLC により、以下の条件にて測定した。なお一部の脂質成分は UV 吸収が弱いため、UV 検出器の後方に Corona Charged Aerosol Detector (CAD) を直列につなげ測定した。

カラム	YMC-Triart C18 (75×2.0mm, 3 μm particle size)
移動相 A	water with 0.1% ammonium acetate
移動相 B	isopropanol with 0.1% ammonium acetate
送液速度	0.30 mL/min
カラム温度	60°C
グラジエント	B (30%, 0 min) → B (100%, 25 min)
検出器	UV at 215 nm and CAD

### HPLC を用いた siRNA の測定

LNP 溶液に含まれる全 siRNA 濃度 (Total) は、逆相 HPLC により、以下の条件にて測定した。サンプルの前処理として、LNP を界面活性剤の 2% TritonX-100 により 2-5 倍希釈し、内包される siRNA を全て放出させた後、HPLC 測定を実施した。

カラム	XBridge BEH C18 (75×4.6 mm, 2.5 μm particle size)
移動相 A	water with 100 mM hexafluoro-2-propanol and 8.6 mM triethylamine
移動相 B	methanol
送液速度	1.0 mL/min
カラム温度	60°C
グラジエント	B (5%, 0 min) → B (30%, 17 min)
検出器	UV at 260 nm

### スクレアーゼ耐性試験 (Snake venom phosphodiesterase (SVPD) assay)

Free siRNA (1 μM) あるいは LNP に内包された siRNA を、SVPD (2 U/μL) を含む NaCl (100 mM)、MgCl<sub>2</sub> (15 mM)、Tris-HCl (40 mM, pH 8.5) 溶媒に加え 37 °C にて静置した。各タイムポイントにて、等量の EDTA (50 mM) を加えることで反応をクエンチした。ローディングバッファー (glycerol (10%), Triton X-100 (0.5%), xylene cyanol (0.02%)) をクエンチした溶液に加え、Native PAGE の電気泳動 (15 % gel, 20 mA, 30 minutes) をした。ゲルを SYBR Green II により染色し、LAS-4000 imaging analyzer にて siRNA の残存量を画像解析した。

### 溶血試験 (Hemolysis assay)

ヒツジ赤血球(Red blood cells, RBC) 懸濁液は、市販の CH50 assay kit に含まれるものを用いた。96 well plate に対し、RBC (100  $\mu$ L)を加え、総脂質濃度 0.6, 0.06 および 0.006 mM となるよう LNP (100  $\mu$ L, 10 mM HEPES, 130 mM NaCl, pH 5.0-7.5) を加えた。100% 溶血として、RBC(100  $\mu$ L)に界面活性剤である 1% Triton X-100(100  $\mu$ L)を加えた。0% 溶血として、RBC(100  $\mu$ L)に生理食塩水(100  $\mu$ L)を加えた。37°C, 2 時間静置した後、プレートを遠心 (4°C, 400g, 5 minutes) し、上澄みを別途準備した 96 well plate に移した。吸光度 (405 nm) をプレートリーダーにて測定し、溶血割合を下式に従って算出した : Hemolysis (%) = [1 - (sample O.D. - 0% Hemolysis O.D.)/(100% Hemolysis O.D. - 0% Hemolysis O.D.)]  $\times$  100

### **<sup>31</sup>P NMR 試験**

リン脂質である DSPC 由来の <sup>31</sup>P シグナルを避けるため、siRNA を含む LNP を以下の割合で調製した : L021/cholesterol/PEG-DMG = 60/38.5/1.5, mol/mol。総脂質濃度 20 mM の LNP に重水を等量加えて、測定溶液とした。プロトンデカップル <sup>31</sup>P NMR スペクトルは、Bruker AV 400 (162 MHz)にて取得した。50000 scan に対応する Free induction decays (FID)を、6.6  $\mu$ s, 30° pulse, 1 sec interpulse delay, 65 kHz spectral width にて取得した。サンプル温度調整は Bruker BCU 05 temperature unit を用いて、25°C にて測定した。

### **LDLR 発現解析**

市販のマウス一般組織 (日本ジェネティクス社, Cat No. GSMDP-10) に対して、マウス LDLR、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH および hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) の TaqMan<sup>®</sup> プローブ (Applied Biosystems 社) を用いたリアルタイム PCR アッセイにて、遺伝子発現解析を行った。

### **LNP に吸着した ApoE の定量**

0.10 mg/mL siRNA を含有する L001-LNP または L021-LNP 100  $\mu$ L を、新鮮なマウス血清 100  $\mu$ L と混合し、60 分間静置した。サイズ排除クロマトグラフィー-Sepharose CL-4B を用いて LNP を分取した。SDS-PAGE を行い、上述の抗 mouse ApoE 抗体を用いて約 34 kDa の ApoE を検出することで、LNP に吸着した ApoE を定量した。

### **細胞取り込み試験**

Huh7 および HeLa はエーザイ保有の細胞株を使用した。培養液にペニシリン、ストレプトマイシン、ウシ血清を含む DMEM を用いた。

**L001 および L021-LNP の取り込み量観察** Huh7  $1 \times 10^4$  個の細胞を 96 well プレートに添加した翌日、蛍光色素 Alexa 647 (赤色) を修飾した siRNA を含む LNP を終濃度 20 nM siRNA となるように加えた。添加後、0.3, 3, 6, 24 時間後に細胞を PBS 洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察した。また蛍光強度は、付属のソフトウェアを用いて、少なくとも 3 視野の平均蛍光強度を算出した。

**ApoE 添加による取り込み量変化の確認** Huh7 および HeLa  $1 \times 10^4$  個の細胞を 96 well プレートに添加した翌日、蛍光色素 Alexa 647 (赤色) を修飾した siRNA を含む LNP を終濃度 20 nM siRNA となるように加えた。ApoE 添加実験では、Human recombinant apoE (1  $\mu$ g/mL) を LNP と 37°C, 5 分間混合した後に使用した。一定時間後に、細胞を 4% Paraformaldehyde にて固定化、Hoechst (青色) にて細胞核を染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。また蛍光強度は、付属のソフトウェアを用いて、少なくとも 3 視野の平均蛍光強度を算出した。

**エンドソーム脱出の確認** Huh7  $1 \times 10^4$  個の細胞を 96 well プレートに添加した翌日、蛍光色素 Alexa 647 (赤色) を修飾した siRNA を含む LNP を終濃度 20 nM siRNA となるように加えた。エンドサイトーシスの確認実験では、37°C または氷上で 30 分間培養した後、細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。エンドソーム脱出の確認実験では、LysoTracker (75  $\mu$ M、緑色) を加えて 37°C, 15 分間培養した後、PBS にて洗浄、Hoechst (青色) にて核染色し、蛍光観察した。

### **動物試験**

**Factor VII マウスモデル** C57BL/6 マウス、BALB/c マウスまたは ICR マウス (n=3-4/group) に、PBS あるいは Factor VII siRNA を含む LNP を、各投与量、10 mL/kg volume にて尾静脈投与した。投与後、各タイムポイントにて採血および採材を実施した。血清中、あるいはクエン酸処理した血漿中の Factor VII 濃度は、Biophen FVII assay kit により測定した。PBS 投与群 (あるいは無処置群) の Factor VII 濃度を 100% とし、各検体の相対 Factor VII 濃度を算出した。また Apo E 欠損マウスとして C.KOR/Stm Slc-Apoe<sup>sh1</sup> マウスを用いた。ApoE を外添加する試験では、LNP に所定量の recombinant human apoE を加え 37°C にて 5 分間静置させた後に、マウスに投与した。

**ラット単回投与毒性試験** Sprague-Dawley (SD) ラット (n=3/group) に、PBS あるいは hPLK1 siRNA を含む LNP を、各投与量にて尾静脈投与した。投与後、各タイムポイントにて採血および採材を実施した。生化学試験として、AST および ALT を Hitachi 7180 clinical analyzer にて測定した。

**マウス体内動態試験** マウス (n=3/group) に、hPLK1 siRNA、または蛍光色素である Alexa 647 を修飾した siRNA を含む LNP を、0.1 mg/kg siRNA、10 mL/kg volume にて尾静脈投与した。投与後、各タイムポイントにて採血および採材を実施した。血漿中、肝臓中に含まれるイオン化脂質濃度を下記の方法にて測定した。また蛍光 siRNA の場合は、96 well plate reader を用いて得られた蛍光強度から siRNA 濃度を算出した。

**マウス体内分布試験** 野生型または ApoE 欠損マウス (n=3/group) に、Alexa 647 を修飾した siRNA を含む LNP を、0.1 mg/kg siRNA にて尾静脈投与した。投与後、各

タイムポイントにて採血および採材を実施した。各臓器をシャーレに移し、IVIS imaging (Excitation/Emission = 600nm/660nm) を実施した。

**マウス肝臓内細胞分布** Alexa 488 を修飾した siRNA を含む LNP をマウス (n=3) に 4 mg/kg siRNA にて尾静脈投与した。投与 30 分後、10 倍希釈したソムノペンチル 250  $\mu$ L を腹腔内投与して麻酔した。開腹後、24G の留置針を用いて門脈からカニューレーションした。37C に温めた Liver perfusion medium を用いて 2 mL/min, 10 分間マウス肝臓を還流 (下大静脈を切断) した後、100 unit/mL コラゲナーゼおよび 10 mM HEPES を含む DMEM を用いて 2 mL/min, 10 分間還流した。肝臓を氷上のシャーレに取り出し、生理食塩水 5 mL を入れ、肝臓をほぐすことで肝細胞懸濁液を得た。次に得られた懸濁液を 100  $\mu$ m セルストレイナーでろ過し、ろ液を 50g, 3 分間遠心した。上澄み 5mL を非実質細胞懸濁液とし、沈殿に 5mL の生理食塩水を加えて実質細胞懸濁液とした。懸濁液 150  $\mu$ L と等量の 1% TritonX-100 を含む TE buffer (pH 7.5) を加えて細胞をライシスし、溶解液を 96 well plate に入れ、蛍光強度を測定した。なお PBS を投与したマウスに同様の処置を施し、ブランクとすることで蛍光値を算出した。

**サル試験** カニクイザル (n=2-3) に、PCSK9 siRNA および control siRNA を含む LNP を、0.3 mg/kg siRNA として、2.5 mL/kg の投与量、1-2 分間にて静脈投与した。投与後各タイムポイントにて約 1 mL の採血を実施した。市販の CircuLex Human PCSK9 ELISA kit を用いて、血清中の PCSK9 濃度を測定した。また血清中の LDL コレステロールは、Hitach 7180 clinical analyzer にて測定した。肝臓のサンプル採取は、麻酔下にて行い、脂質定量を LC-MS にて実施した。

#### マウス血中および肝臓中におけるイオン化脂質の測定 (PK 測定)

LNP をマウスに投与後、各タイムポイントにて採血および採材を実施した。全てのサンプルは採取後、測定まで -80  $^{\circ}$ C に保管した。血漿は血液採取後、遠心分離することにより入手した。肝臓は重量を測定し、PBS (1:9, weight/volume) にて希釈し、ホモジネートした。血漿および肝臓ホモジネート (40  $\mu$ L) に対し、質量測定の内部標準として L008 (500 ng/mL) を含むアセトニトリル/イソプロパノール混合液 (160  $\mu$ L, 1:1, v/v) を加え、徐タンパク質処理を行った。遠心 (12000 g, 10 分) した後、上澄みをバイアルに移した。試料中のイオン化脂質濃度は以下の条件にて測定した。

カラム	XBridge BEH C18 (75 $\times$ 4.6 mm, 2.5 $\mu$ m particle size)
移動相	acetonitrile/isopropanol/10 mM ammonium acetate = 45/45/10 (v/v/v)
送液速度	0.3 mL/min (isocratic)
カラム温度	60 $^{\circ}$ C
検出器	ESI-MS, Single ion monitoring (SIM) mode
質量値[M+H <sup>+</sup> ]	L021 as 534.5, L101 as 564.5, L001 as 493.6, L008 as 519.7

## siRNA 配列

siRNA	Sense [5'-3']	Antisense [5'-3']
Factor VII siRNA	GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT
hPLK1 siRNA	AGAuCACCCuCCUuAAAUuAUU	UAUUUAAgGAGGGUGAUuCUU U
Luciferase siRNA	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT
LDLR siRNA	CAGAAGUCGACACUGUACUdTdT	AGUACAGUGUCGACUUCUGdTdT
Alexa Fluor-labelled siRNA	AcAuGAAGcAGcACGACuUdTsdT	AAGUCGUGCUGCUUcAUGUdTsdT-aminoC6 linker-Alexa

N = RNA, dN = DNA, n =2'-OMe RNA, Nf=2'-F RNA, s=phosphorothioated. All of the oligonucleotides used in this study have previously been reported elsewhere.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親身での的確なご指導・ご鞭撻ならびに激励を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 楠原 洋之教授に心から感謝の意を表します。

多大なるお時間を割いていただき、的確かつ有益なご指導・ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 船津 高志教授、同研究科 浦野 泰照教授、同研究科 加藤 大准教授、東京大学医学部附属病院 薬剤部 高田 龍平講師に深く御礼申し上げます。

リポソーム製剤全般に関する深い知識に基づくご指導ならびに多岐にわたる心強いサポートを賜りましたエーザイ株式会社 菊池 寛先生、日頃の親身で活発な議論を通じてご指導を賜りました同 石原 比呂之先生に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者として、脂質ナノ粒子の概念、調製方法、動物評価、生物学的評価など懇切丁寧にご指導を賜りましたエーザイ株式会社 兵頭 健治先生、分析評価全般の的確なご指導を賜りました同 山本 栄一先生、常日頃から活発な議論を通じてご助言を賜りました、同 鈴木 卓也先生、実際の医薬品応用に向けてご指導を賜りました同 高橋 良典先生、同 元井 崇太郎先生に深く感謝致します。

また長期に渡って脂質合成全般にご協力くださいました相互薬工株式会社 田中陽平先生、ならびに相互薬工株式会社の関係者皆様に深く感謝致します。

最後に有益な御助言を頂きましたエーザイ株式会社の諸先輩、同輩の皆様に深く感謝致します。

鈴木 裕太



## 論文目録

1. **siRNA-lipid nanoparticles with long-term storage stability facilitate potent gene-silencing in vivo**  
Y. Suzuki, K. Hyodo, Y. Tanaka, H. Ishihara  
*J Control Release* **220**, 44-50 (2015)
2. **Structure, activity and uptake mechanism of siRNA-lipid nanoparticles with an asymmetric ionizable lipid**  
Y. Suzuki, H. Ishihara  
*Int J Pharm* **510**, 350-358 (2016)
3. **Biodegradable lipid nanoparticles induce a prolonged RNA interference-mediated protein knockdown and show rapid hepatic clearance in mice and nonhuman primates**  
Y. Suzuki, K. Hyodo, T. Suzuki, Y. Tanaka, H. Kikuchi, H. Ishihara  
*Int J Pharm* **519**, 34-43 (2017)

## 引用文献

1. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289 (1990).
2. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* **6**, 3343-3353 (1992).
3. Guo, S. & Kemphues, K.J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620 (1995).
4. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
5. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
6. Bramsen, J.B. & Kjems, J. Development of Therapeutic-Grade Small Interfering RNAs by Chemical Engineering. *Front Genet* **3**, 154 (2012).
7. Cullen, B.R. RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* **3**, 597-599 (2002).
8. Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 318-329 (2004).
9. Garba, A.O. & Mousa, S.A. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmol Eye Dis* **2**, 75-83 (2010).
10. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/lists/year/index.html?year=2006&images=yes](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/lists/year/index.html?year=2006&images=yes).  
*Webpage on Nobel Prize* (2006).
11. Bumcrot, D., Manoharan, M., Kotliansky, V. & Sah, D.W. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* **2**, 711-719 (2006).
12. Haussecker, D. The Business of RNAi Therapeutics in 2012. *Mol Ther Nucleic Acids* **1**, e8 (2012).
13. Shen, J. et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* **13**, 225-234 (2006).

14. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. & Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* **11**, 50-55 (2005).
15. Chai, L.Y., Netea, M.G., Vonk, A.G. & Kullberg, B.J. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol* **47**, 227-236 (2009).
16. Whitehead, K.A., Dahlman, J.E., Langer, R.S. & Anderson, D.G. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2**, 77-96 (2011).
17. Judge, A.D. et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* **23**, 457-462 (2005).
18. Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C. & MacLachlan, I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* **13**, 494-505 (2006).
19. Judge, A. & MacLachlan, I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* **19**, 111-124 (2008).
20. Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 129-138 (2009).
21. Zimmermann, T.S. et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111-114 (2006).
22. Leung, A.K., Tam, Y.Y. & Cullis, P.R. Lipid nanoparticles for short interfering RNA delivery. *Adv Genet* **88**, 71-110 (2014).
23. Judge, A.D. et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* **119**, 661-673 (2009).
24. Frank-Kamenetsky, M. et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11915-11920 (2008).
25. Fitzgerald, K. et al. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* **383**, 60-68 (2014).

26. Thi, E.P. et al. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-Makona-infected nonhuman primates. *Nature* **521**, 362-365 (2015).
27. Coelho, T. et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* **369**, 819-829 (2013).
28. Waehler, R., Russell, S.J. & Curiel, D.T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **8**, 573-587 (2007).
29. Hickerson, R.P. et al. Use of Self-Delivery siRNAs to Inhibit Gene Expression in an Organotypic Pachyonychia Congenita Model. *J Invest Dermatol* **131**, 1037-1044 (2011).
30. Boisguerin, P. et al. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev* (2015).
31. Schneider, B. et al. Targeted siRNA Delivery and mRNA Knockdown Mediated by Bispecific Digoxigenin-binding Antibodies. *Mol Ther Nucleic Acids* **1**, e46 (2012).
32. Cuellar, T.L. et al. Systematic evaluation of antibody-mediated siRNA delivery using an industrial platform of THIOMAB-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res* **43**, 1189-1203 (2015).
33. Sugo, T. et al. Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles. *J Control Release* **237**, 1-13 (2016).
34. Rozema, D.B. et al. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12982-12987 (2007).
35. Chahal, J.S. et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E4133-4142 (2016).
36. Rosi, N.L. et al. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* **312**, 1027-1030 (2006).
37. Nuhn, L. et al. Size-dependent knockdown potential of siRNA-loaded cationic nanohydrogel particles. *Biomacromolecules* **15**, 4111-4121 (2014).
38. Akinc, A. et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol* **26**, 561-569 (2008).

39. Love, K.T. et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1864-1869 (2010).
40. Dong, Y. et al. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3955-3960 (2014).
41. Dahlman, J.E. et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nanotechnol* **9**, 648-655 (2014).
42. Whitehead, K.A. et al. Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity. *Nat Commun* **5**, 4277 (2014).
43. Semple, S.C. et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol* **28**, 172-176 (2010).
44. Nair, J.K. et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc* **136**, 16958-16961 (2014).
45. Sehgal, A. et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med* **21**, 492-497 (2015).
46. Jayaraman, M. et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 8529-8533 (2012).
47. Prakash, T.P. et al. Lipid nanoparticles improve activity of single-stranded siRNA and gapmer antisense oligonucleotides in animals. *ACS Chem Biol* **8**, 1402-1406 (2013).
48. Daige, C.L. et al. Systemic delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer. *Mol Cancer Ther* **13**, 2352-2360 (2014).
49. Thess, A. et al. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther* **23**, 1456-1464 (2015).
50. Gindy, M.E. et al. Stabilization of Ostwald ripening in low molecular weight amino lipid nanoparticles for systemic delivery of siRNA therapeutics. *Mol Pharm* **11**, 4143-4153 (2014).

51. Gindy, M.E., Leone, A.M. & Cunningham, J.J. Challenges in the pharmaceutical development of lipid-based short interfering ribonucleic acid therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* **9**, 171-182 (2012).
52. Suzuki, Y., Hyodo, K., Tanaka, Y. & Ishihara, H. siRNA-lipid nanoparticles with long-term storage stability facilitate potent gene-silencing in vivo. *J Control Release* **220**, 44-50 (2015).
53. Suzuki, Y. & Ishihara, H. Structure, activity and uptake mechanism of siRNA-lipid nanoparticles with an asymmetric ionizable lipid. *Int J Pharm* **510**, 350-358 (2016).
54. Sato, Y. et al. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J Control Release* **163**, 267-276 (2012).
55. Alabi, C.A. et al. Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12881-12886 (2013).
56. Mui, B.L. et al. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e139 (2013).
57. Akinc, A. et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther* **18**, 1357-1364 (2010).
58. Chen, J., Li, Q. & Wang, J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14813-14818 (2011).
59. Boal, A.K. & Rotello, V.M. Intra- and Intermonolayer Hydrogen Bonding in Amide-Functionalized Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. *Langmuir* **16**, 9527-9532 (2000).
60. Xue, H.Y., Liu, S. & Wong, H.L. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* **9**, 295-312 (2014).
61. Barros, S.A. & Gollob, J.A. Safety profile of RNAi nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 1730-1737 (2012).
62. Huynh-Ba, K. Handbook of stability testing in pharmaceutical development : regulations, methodologies, and best practices. (Springer, New York; 2009).

63. Ickenstein, L.M., Sandstrom, M.C., Mayer, L.D. & Edwards, K. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 171-180 (2006).
64. Wagner, A. et al. GMP production of liposomes--a new industrial approach. *J Liposome Res* **16**, 311-319 (2006).
65. Whitehead, K.A. et al. In vitro-in vivo translation of lipid nanoparticles for hepatocellular siRNA delivery. *ACS Nano* **6**, 6922-6929 (2012).
66. Maier, M.A. et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther* **21**, 1570-1578 (2013).
67. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G. & Haisma, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release* **151**, 220-228 (2011).
68. Dominska, M. & Dykxhoorn, D.M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* **123**, 1183-1189 (2010).
69. Ge, A. et al. Effect of Functional Group on the Monolayer Structures of Biodegradable Quaternary Ammonium Surfactants. *Langmuir* **29**, 14411-14420 (2013).
70. Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P. & De Geest, B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther* **15**, 1193-1199 (2008).
71. Suhr, O.B. et al. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet J Rare Dis* **10**, 109 (2015).
72. Walsh, C. et al. Microfluidic-based manufacture of siRNA-lipid nanoparticles for therapeutic applications. *Methods Mol Biol* **1141**, 109-120 (2014).
73. Gindy, M.E. et al. Mechanism of macromolecular structure evolution in self-assembled lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Langmuir* **30**, 4613-4622 (2014).
74. Barenholz, Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* **160**, 117-134 (2012).

75. Silverman, J.A. & Deitcher, S.R. Marqibo(R) (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**, 555-564 (2013).
76. Wang-Gillam, A. et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **387**, 545-557 (2016).
77. Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J. & Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res* (2016).
78. Yu, Y. et al. Characterization of the pharmacokinetics of a liposomal formulation of eribulin mesylate (E7389) in mice. *Int J Pharm* **443**, 9-16 (2013).
79. Leung, A.K. et al. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **116**, 18440-18450 (2012).
80. Johnsson, M. & Edwards, K. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. *Biophys J* **85**, 3839-3847 (2003).
81. Yan, X. et al. The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 57-62 (2005).
82. Wang, Y. & Huang, L. A window onto siRNA delivery. *Nat Biotechnol* **31**, 611-612 (2013).
83. Jeffs, L.B. et al. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm Res* **22**, 362-372 (2005).
84. Bisgaier, C.L., Siebenkas, M.V. & Williams, K.J. Effects of apolipoproteins A-IV and A-I on the uptake of phospholipid liposomes by hepatocytes. *J Biol Chem* **264**, 862-866 (1989).
85. Wittrup, A. et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* **33**, 870-876 (2015).
86. Mahley, R.W. & Innerarity, T.L. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **737**, 197-222 (1983).



87. Lusis, A.J., Taylor, B.A., Quon, D., Zollman, S. & LeBoeuf, R.C. Genetic factors controlling structure and expression of apolipoproteins B and E in mice. *J Biol Chem* **262**, 7594-7604 (1987).
88. Novobrantseva, T.I. et al. Systemic RNAi-mediated Gene Silencing in Nonhuman Primate and Rodent Myeloid Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* **1**, e4 (2012).
89. Immordino, M.L., Dosio, F. & Cattel, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine* **1**, 297-315 (2006).
90. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
91. Kumar, V. et al. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**, e210 (2014).
92. Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. & MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release* **107**, 276-287 (2005).
93. Zhou, K. et al. Modular degradable dendrimers enable small RNAs to extend survival in an aggressive liver cancer model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 520-525 (2016).
94. Luten, J., van Nostrum, C.F., De Smedt, S.C. & Hennink, W.E. Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery. *J Control Release* **126**, 97-110 (2008).
95. Jere, D. et al. Degradable polyethylenimines as DNA and small interfering RNA carriers. *Expert Opin Drug Deliv* **6**, 827-834 (2009).
96. Kel In, A.V. et al. Structural Basis of Duplex Thermodynamic Stability and Enhanced Nuclease Resistance of 5'-C-Methyl Pyrimidine-Modified Oligonucleotides. *J Org Chem* **81**, 2261-2279 (2016).
97. Shi, B. & Abrams, M. Technologies for investigating the physiological barriers to efficient lipid nanoparticle-siRNA delivery. *J Histochem Cytochem* **61**, 407-420 (2013).

98. Lagace, T.A. et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* **116**, 2995-3005 (2006).
99. Maxwell, K.N., Fisher, E.A. & Breslow, J.L. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2069-2074 (2005).
100. Seidah, N.G. et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 928-933 (2003).
101. Abifadel, M. et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* **34**, 154-156 (2003).
102. Desai, N.R. et al. AMG145, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin kexin type 9, significantly reduces lipoprotein(a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LDL-C Assessment with Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 Monoclonal Antibody Inhibition Combined with Statin Therapy (LAPLACE)-Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 57 trial. *Circulation* **128**, 962-969 (2013).
103. 知財動向班, 特. 特許出願技術動向調査報告書 核酸医薬. (2015).
104. Yin, W. et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J Lipid Res* **53**, 51-65 (2012).
105. Vons, C. et al. First description of the surgical anatomy of the cynomolgus monkey liver. *Am J Primatol* **71**, 400-408 (2009).
106. Testa, B. & Mayer, J.M. in *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism* 419-534 (Verlag Helvetica Chimica Acta, 2006).