

論文の内容の要旨

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

【序章】

核酸医薬は、ターゲットに対する特異性が高いこと、抗体を含むバイオロジクスに比較して製造コストが安いこと、創薬プラットフォームが確立すれば臨床開発までの期間が短縮できることがメリットとして挙げられ、抗体に次ぐ次世代の分子標的治療薬として期待が高まっている。核酸医薬の中でも、RNA干渉(RNAi)により標的遺伝子の発現を抑制する21-23塩基の短い二本鎖RNA、small interfering RNA (siRNA)は、理論的には全ての疾患原因タンパク質の産生を強烈に阻害することができる。従って低分子医薬品では困難なタンパク-タンパク阻害、抗体医薬品では困難な細胞内因子などを含めた幅広い標的を対象とすることができ、今まで開発不可能であった難治性疾患治療薬の創出が期待できる。

核酸の作用点は核内や細胞質内にあり、siRNAの場合は、細胞質内へ送達しなければならない。しかし核酸のリン酸ジエステル結合に由来する負電荷により、siRNAは細胞膜透過性に乏しい。また血中または細胞内ヌクレアーゼによる分解の懸念もある。従って、全身投与性の医薬品として開発するためには送達キャリアの技術革新が必須であった。医薬品用途に開発するキャリアの目標として、品質管理が容易であること(ウイルスベクターを用いない、数年間の品質保証が可能)、十分な安全域を持ちin vivoで投与できることを目指した。

非ウイルス性の核酸送達手段としては、a) 化学安定性を RNA に付与して核酸(すなわち naked siRNA)のまま投与する、b) ペプチド・抗体・糖・ポリマーなどのリガンドを RNA 末端に修飾させ(すなわち siRNA with Ligand)投与する、c) デンドリマー・無機物質・ポリマー様脂質・イオン化脂質を用いナノ粒子を形成させ(すなわち siRNA with nanoparticles)投与する 方法等が報告されてきた。その中でもイオン化脂質を用いる脂質ナノ粒子、Lipid nanoparticles (以下 LNP)は、リン

酸ジエステル結合の負電荷と、イオン化脂質の正帯電化による静電的相互作用により、核酸をその内部に内包し、外部環境から保護することが可能なナノ粒子である(図 1)。

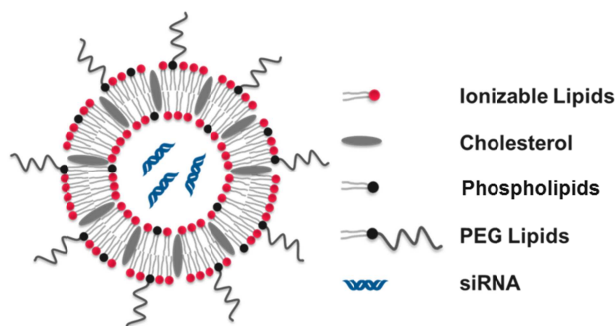


図 1 核酸送達キャリアである脂質ナノ粒子(Lipid nanoparticles, LNP)の概念図。

【第 1 章】

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、ナノ粒子の保管安定性評価について報告する(図 2)。ナノ粒子は体内動態の影響が極めて大きいため、*in vitro* ではなく、*in vivo* にて効果的な脂質を見いだすことにした。また報告例の少ない非対称型の脂質鎖を有するイオン化脂質に焦点を絞ってライブラリを準備した。マウス肝実質細胞のみから産生され血中に分泌される血液凝固第 7 因子(Factor VII)を標的とする siRNA をモデル化合物とし、合成したイオン化脂質を用いて LNP を形成させた。各 LNP をマウスに尾静脈投与し、血中 Factor VII 濃度を指標にスクリーニングした結果、顕著な効果を示す新規脂質 L021 を発見した。

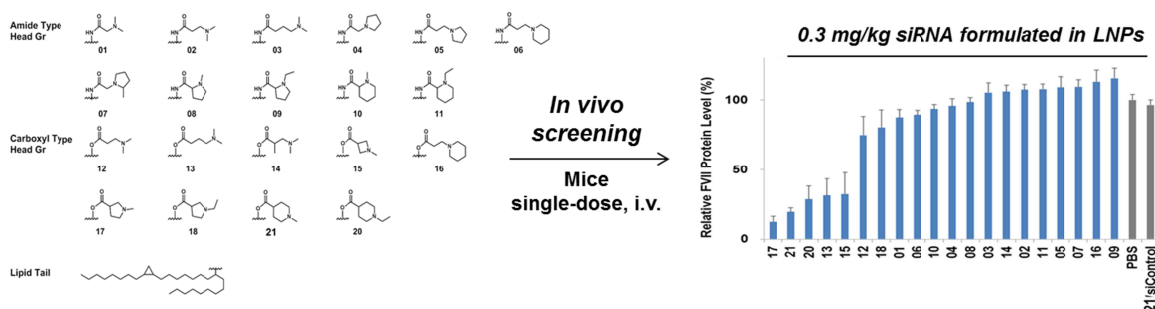


図 2 *In vivo screening* によるイオン化脂質 L021 の発見。脂質鎖を固定し、第 3 級アミンを有するヘッド部位をアミド型、エステル型に分類して合成展開を実施。ランダム配列 siRNA および PBS 投与群と比較して有意に標的遺伝子を抑制する脂質の発見に至った。

構造活性相関解析の結果、脂質が pKa 6.4 付近を有すること、およびヘッド構造部がアミドではなくエステルであることが高い送達効率に寄与することが判明した。L021-LNP は、投与量依存的な遺伝子抑制効果(ED₅₀ 値 0.02 mg/kg siRNA)、また 1 週間以上の持続的な抑制効果を示した。マウス体内動態を測定したところ、L021 は血中半減期 10 分以下の速やかな消失を示し、また肝臓へ約 15 分後に投与量の約 8 割が蓄積した。ラット単回投与毒性試験では、2 mg/kg siRNA までの忍容性(ED₅₀ 値の 100 倍)を示した。さらにナノ粒子の長期保管安定性試験を実施したところ、ライブ

ラリ中の一部脂質では経時的な粒子径増大を示したのに対し、L021-LNP は 2 年間にわたって粒子径を一定に保った。以上より、L021-LNP は活性、安全性、品質いずれの面でも秀逸な性質を示したことから、有望な送達キャリアと考えられた。

【第 2 章】

第 2 章では、見いだした LNP の物性評価および取り込みメカニズム解析について報告する。LNP はその脂質構造により取り込み経路が異なることが知られており、L021 は既報のイオン化脂質とは異なる非対称型脂質構造を有することから、メカニズム解明は重要であった。最初に LNP の物性評価を実施した。LNP の siRNA 保護能を確認するため、マウス血清中の安定性を調べた。siRNA 単体は速やかな分解を示したのに対し、LNP 化した siRNA は約 8 時間にわたって分解が確認されなかったことから、LNP が siRNA を完全に保護していることが示唆された。各 pH におけるナノ粒子の表面電荷測定、および LNP の膜融合能を評価する赤血球を用いた溶血試験の結果、pKa 6.4 を示す L021-LNP は、血中の中性 pH 環境 (pH 7.4) からエンドソーム内の低 pH 環境 (pH 5.5) 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。次にマウス投与後の LNP が肝実質細胞へ取り込まれるメカニズム解析を実施した。野生型および ApoE 欠損マウスにおける遺伝子抑制効果の比較試験では、ApoE 欠損マウスで遺伝抑制効率が 1/30 に低下した。また ApoE を LNP に外添加した後、ApoE 欠損マウスに投与すると、ApoE の外添加量に応じて遺伝子抑制効果が回復した。野生型マウスに LDL 受容体を標的とする siRNA の前処置した後に LNP を投与すると、遺伝子抑制効果が低下した。野生型および ApoE 欠損マウスにおける LNP の体内動態を確認したところ、ApoE 欠損マウスでは肝臓への集積量が低下した。これらを通じて、**図 3** に示すメカニズムにより、細胞内に取り込まれることが示唆された。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が判明し、安全に臨床応用されることが期待された。

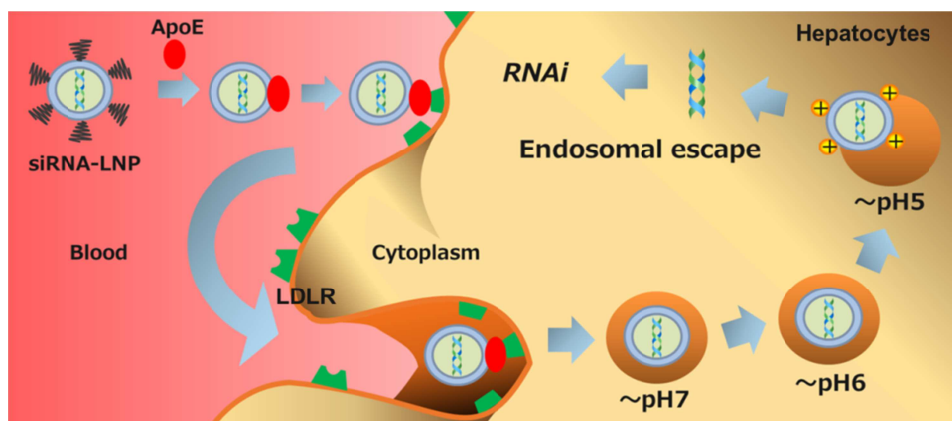


図 3 L021-LNP の遺伝子抑制効果の発現メカニズム。血中に投与した LNP に ApoE が吸着し、肝実質細胞表面上の LDL 受容体によりエンドサイトーシスされる。エンドソーム内の pH 減少に伴ってイオン化脂質が正に帯電、細胞内膜と融合し、siRNA を細胞質へ放出。siRNA は長期に渡って標的遺伝子に RNA 干渉を引き起こし、任意の標的タンパク質の産生を阻害する。

【第3章】

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次世代型 LNP の開発について報告する(図4)。生分解性を付与することを目的とし、L021 のシクロプロピル環をエステル結合へと変換した L101 を創成し、各評価を実施した。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、良好なナノ粒子形成およびin vivo 遺伝子抑制効果 (Factor VII Mouse Model; ED₅₀ 値 0.02 mg/kg) を示した。マウス体内動態を測定したところ、L021 に比較して L101 は血中だけでなく、肝臓からも速やかに消失することが明らかとなった。また採材したマウス肝臓ホモジネートの LC-MS 解析により、L101 のエステル加水分解代謝物が確認された。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 (ED₅₀ 値の 800 倍) が示された。最後に、得られた生分解性 LNP を高次動物であるカンクイサルに投与した。先行グループの第1相臨床試験結果から、RNAi に基づく血中標的タンパク質の減弱推移がヒト-サル間で極めて類似することが報告されており、サルにおける LNP の効果実証は、ヒト臨床応用の可能性を示す重要な試験となる。そこで近年、高コレステロール血症治療薬として承認された抗 PCSK9 抗体の代替品となりうる PCSK9 siRNA をモデル化合物 (PCSK9 は肝臓で合成) として用いた。LNP 化した 0.3 mg/kg 相当の PCSK9 siRNA をサルに静脈投与し、投与後2ヶ月にわたって経時的に採血を実施した。その結果、最大90%以上の血中 PCSK9 抑制効果を示し、抑制効果は約1ヶ月にわたって持続した。さらに薬理学的効果を示す LDL コレステロール値が約50%の低下を示した。またサル肝臓中においても、生分解性脂質が速やかに代謝されていることが LC-MS 解析により示された。

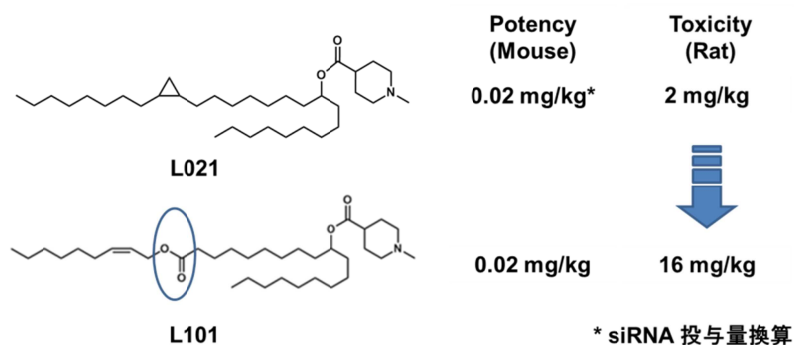


図4 生分解性脂質 L101 の開発の考案。遺伝子抑制効率および単回投与毒性試験の結果を併記。送達効率を維持しつつ、安全域の向上に成功した。

【結論】

核酸創薬を実現可能とする送達技術、脂質ナノ粒子の開発に成功した。開発したナノ粒子は核酸をヌクレアーゼから保護し、ほぼ完全に核酸を内部に封入することができる。また製剤として長期間保存可能で、安全に投与でき、単回静脈投与にて標的遺伝子を1ヶ月以上抑制が可能である。本技術の応用により、未だ満たされない難治性疾患治療薬の創出が期待される。