

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 裕太

鈴木裕太は核酸送達の研究に関して、以下 3 章によって構成される博士論文を執筆した。

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した。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 lipid nanoparticle (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。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した。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、それに伴っ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 欠損マウスで遺伝子抑制効率が 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

[別紙 2]

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。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。

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、速やかに代謝される次世代型LNPの開発について報告した。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。

上記の通り、鈴木は、核酸創薬を実現可能とする送達技術として、新規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、肝臓の標的遺伝子を1ヶ月以上抑制が可能であった。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。

以上、開発されたデリバリー基材は核酸医薬の実現を可能にするものであり、本研究は、薬学の研究に大きく貢献した。よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。