

平成 31 年 4 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19473

研究課題名(和文)血管突破と内皮細胞質送達DDSの新機軸：迅速リガンド開発とインビボ細胞内動態制御

研究課題名(英文) Development of the nanoDDS platform for the penetration or intracellular delivery: Development of the rapid ligand-identification system and in vivo control of intracellular trafficking

研究代表者

秋田 英万 (Akita, Hidetaka)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：80344472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的リガンドの迅速同定法の開発を進めると共に、血管投与により標的細胞内への核酸の効率的な導入を可能とする新たな脂質様材料の開発を進めた。リガンドの迅速探索法の開発においては、血管内皮細胞の血管側膜に発現している特定の蛋白質の細胞外ドメインをビーズに固定し、本ドメインに結合する抗体をファージライブラリより探索している。また、細胞内における分解性やエンドソーム膜不安定化ユニットを搭載した脂質用材料を開発し、血管投与可能な核酸導入システムとして応用した。本材料は、搭載したsiRNAやmRNAを肝臓に対して効率的に送達できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本方法は、これまで困難であった膜蛋白質の細胞外ドメインに結合する抗体を簡便かつ迅速に同定する方法として、広く応用できる。また、本研究で開発した脂質用材料は中性な核酸搭載ナノ粒子の調製を可能とし、細胞内に取り込まれた後には効率的にエンドソーム脱出をし、さらに自己崩壊することで搭載分子を細胞内に導入できることから、リガンドを搭載することで、様々な受容体を標的とするナノ粒子製剤として発展させることできる。本材料に関しては国際的な供給も開始しており、様々な創剤技術として発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have established a method for the rapid identification of targeting ligand by using a phage display library. Also, we developed a lipid-like materials that can deliver the nucleic acids via intravenous administration. As to the first project, the extracellular domain of membrane-translocating protein was fixed onto the beads, and its binding antibody was identified from the phage library that encoded a randomized domain antibody. In the second project, the lipid-like materials that mounts ternary amine and disulfide bonding as a pH-triggered protonation unit and reductive environment-triggered cleavable unit, respectively was developed as a nucleic acid delivery system. We clarified that an oleic acid is useful for the application via intravenous administration. As one example, the application to the siRNA delivery system was also demonstrated.

研究分野：薬剤学

キーワード：リガンド 脂質様材料 DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

従来のナノ製剤を用いたドラッグデリバリーシステム（DDS）の成功例は、血管内皮細胞の間隙等を介して組織実質側に容易に漏出できる肝臓や癌に限定されていた。この理由として、これら臓器の血管が、ナノ粒子の実質への透過を考える上で有利な構造的特徴を有している点が挙げられる。即ち、直径約 200nm 以下の粒子は、癌新生血管内皮細胞間の大きな間隙（粗な結合）や、肝臓の有窓内皮細胞内に形成されるフェネストラ（窓）を介することで、組織実質へ浸潤することができる。従ってナノ粒子のサイズ制御と血中における安定性を制御すれば、肝臓・癌における実質への輸送は比較的容易に達成される。一方、他の正常組織においては血管内皮細胞同士が密に結合しており、ナノ粒子の組織実質への移行を妨げる絶対的なバリアとなる。従って、次代の DDS 開発には、血管内皮細胞内の動態を制御する技術が不可欠となる。特に、将来、脳などの血管内皮細胞を標的化することを考えた場合、本細胞に特異的に発現している膜蛋白質の細胞外ドメインに対して結合しうるリガンドを探索することが必要である。我々はこれまでも、膜蛋白質を過剰発現する細胞に結合するファージを探索すべく、検討を進めてきたが、洗浄過程が不十分などの理由から、濃縮的にファージを選択することが極めて困難であった。そこで、非特異的な結合を効率的に除きながらも、迅速にリガンドを同定する方法論が必要であるとの考えに至った。

また、これまで申請者は、*in vivo* 核酸送達システムとして、ssPalm 粒子を開発してきた。ssPalm 分子は 2 本の疎水性足場を介して核酸を内封する『電荷的に中性』なりポソーム状の膜を形成するため、高い生体適合性が発揮される点を最大の特徴とする。また ssPalm は、内封分子を細胞質へ放出するためにデザインされた 2 種の細胞内環境応答ユニットを搭載する。

- 1) **第三級アミン：** 酸性環境に応じたプロトン化により正に帯電し、エンドソーム膜の不安定化を誘起する
- 2) **ジスルフィド結合：** 細胞質内の還元環境に応じて切断されることでナノ粒子の崩壊を誘起する

ssPalm は、世界の競合材料の中でも『電荷的に中性なナノ粒子の形成能』と『エンドソーム脱出能』、『自己崩壊能』を一分子内に集約した世界初の特許技術である。また、調製条件を最適化することで、様々なサイズのナノ粒子を調製できることも偶然明らかとしている。

本材料は、*in vivo* で機能する核酸 (siRNA) キャリアとして開発が進められてきたが、その活性は、近年、世界初の siRNA 医薬として承認された ONPATRO において用いられている技術と比較して効率が劣っていた。

以上の背景に基づき、迅速なスクリーニング法の新規開拓により同定される一本鎖抗体を用いた血管内皮標的化と、ssPalm 粒子の改良を伴う細胞内動態・放出制御能の追求により、従来の DDS 技術とは一線を画す新機能と汎用性、さらには効率を兼ね備えた世界唯一の技術を開発したいと考えた。

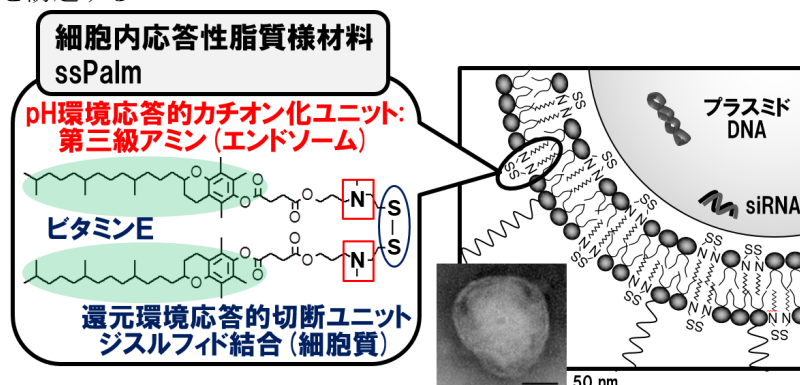


図 1: ssPalm の構造とコンセプト (ビタミン E 足場型 ssPalm の構造を示す)

2. 研究の目的

本研究では、申請者の特許技術である細胞内環境応答性脂質様材料 (ss-cleavable pH-activated lipid like material: ssPalm) から形成されるナノ粒子のユニークな特徴である、『細胞質内への分子放出能』と、『自由なサイズ変換能』を活かし、新規バイオ工学や有機分解反応の新原理を開拓しながら 2 つの技術を開発する。

1. 血管内皮細胞上の蛋白質に対するリガンドの迅速スクリーニング系の開発

従来では困難であったトランスポーターの細胞外ドメインに結合するリガンドを Human Domain Antibody ファージライブラリーより *in vitro* で迅速かつ簡便にスクリーニングするシステムを開発する。

2. 細胞内環境応答的に生体膜を突破し超崩壊するネオ ssPalm 粒子の開発

血液中では安定的に存在しながらも、細胞質内に導入後には、ナノ粒子内という分子が濃縮された反応場を利用して『超崩壊性』を発揮し、mRNA を細胞質に放出できるネオ ssPalm 分子を開発する。

3. 研究の方法

1. 血管内皮細胞上の蛋白質に対するリガンドの迅速スクリーニング系の開発

血管内皮細胞の血管側膜に発現している蛋白質 (GLUT1) の細胞外ドメインを標的とした 1 本鎖抗体の探索を試みた。①マウスとヒトの間で細胞外ドメインの配列がほぼ保存されている、

②糖鎖修飾がない、③特殊な2次構造をとらないという3つの条件を満たす細胞外ドメイン(15アミノ酸)を環状化ペプチドとして提示したビーズを抗原とし、ファージライブラリの中から高親和性株をセレクションした。本抗原修飾ビーズの直径は100 μm程度であり、孔径5 μmのフィルターを透過することはできない。従って、シリンジを用いたフィルターろ過により洗浄することで、簡便にペプチドに結合するファージのみを選択した(1stパニング)。

また、本結合ファージを回収し、さらに増殖させた上で、再度、抗原結合ビーズに対して結合するファージをセレクションした。これらの作業を2回繰り返すことで、抗原結合ファージを濃縮した(2nd、3rdパニング)。

濃縮されたファージに関して、96サンプルシーケンスをおこない、同一配列もつクローンを4種選択し、リガンドの候補とした。

これらのファージの標的蛋白質への結合性を評価するために、GLUT1が高発現しているヒト由来(HepG2)及び、低発現細胞株(HEK)への結合を比較した。また、本標的蛋白質の高発現細胞に対してGLUT1に対するsiRNAを導入した細胞株を樹立し、その結合性を評価した。

2. 細胞内環境応答的に生体膜を突破し超崩壊するネオ ssPalm 粒子の開発

これまで我々は、産生環境に応答してα-ヘリクス構造をとる GALA ペプチドが肺血管内皮細胞への標的化リガンドとして機能することを見出してきた。本研究では、GALA ペプチドの肺血管内皮細胞に対する標的化能を更に改良すべく、PEG 鎖を介して GALA を修飾したリポソーム(GALA-PEG リポソーム)のヒト由来肺血管内皮細胞(HMVEC-L)に対する取り込み、及び *in vivo* における肺蓄積性を評価した。また、ビタミンEを脂溶性足場として有する ssPalm(ssPalmE-P4C2)を用いて siRNA 搭載ナノ粒子を調製した。本粒子に対して PEG を介して GALA を修飾し、静脈内投与後の血管内皮細胞マーカーCD31の遺伝子ノックダウン効率を解析した。

また、核酸を搭載した ssPalmE ナノ粒子の静脈内投与や皮下投与などの結果より、これらの粒子が極めて免疫活性化能に優れることを見出した。そこで、より安全性の高い静脈内投与型ナノ粒子の創成を目指し、抗炎症型の ssPalm の探索を目指した。

4. 研究成果

1. 血管内皮細胞上の蛋白質に対するリガンドの迅速スクリーニング系の開発

ファージライブラリの中から、ビーズ上に環状に固定化された GLUT1 の細胞外ドメインに結合するファージを単離した。1~2ラウンド目までのセレクションでは、ファージの濃縮はかかっていたが、3ラウンド目のセレクションにおいては、結合ファージの劇的な増加が認められた(図2)。これらのファージを単離し、96クローンのシーケンスをおこなった結果、4種類の配列が高頻度に認められた。これらの4つのファージを単離し、

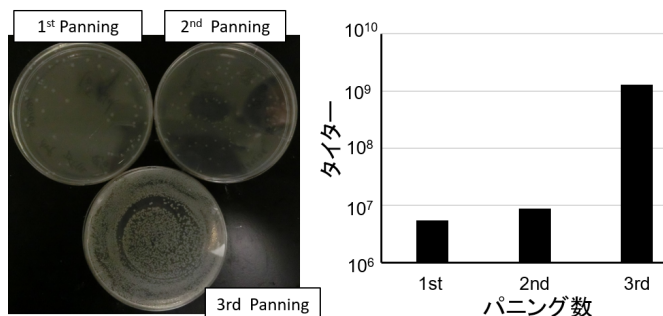


図2: ファージライブラリーを用いた GLUT1 の細胞外ドメイン結合型ファージの探索

GLUT1 高発現細胞(HepG2)及び低発現細胞(HEK)の間で結合性を比較した。その結果、頻度の高かった2種のファージにおいて、GLUT1の発現量に応答したファージの結合能が認められた。

さらに、GLUT1の発現をノックダウンした HepG2 細胞において、上記2種のうち、1種のファージの結合性が低下した。このことから、本ファージが標的として想定した GLUT1 への結合性を有していることを見出した。また、本ファージは、脳切片において GLUT1 が高発現している血管内皮細胞にも結合することから、脳への標的化リガンドとして機能しうることが示唆された。

2. 細胞内環境応答的に生体膜を突破し超崩壊するネオ ssPalm 粒子の開発

リガンドのナノ粒子表面に対する修飾が肺血管内皮細胞への標的化能に及ぼす影響を解析すべく、GALA リポソームと GALA-PEG リポソームの HMVEC-L への取り込みを FACS によって評価した。その結果、GALA リポソームにおいては、Chol-GALA の修飾量が1%程度で最高になるのに対し、GALA-PEG リポソームにお

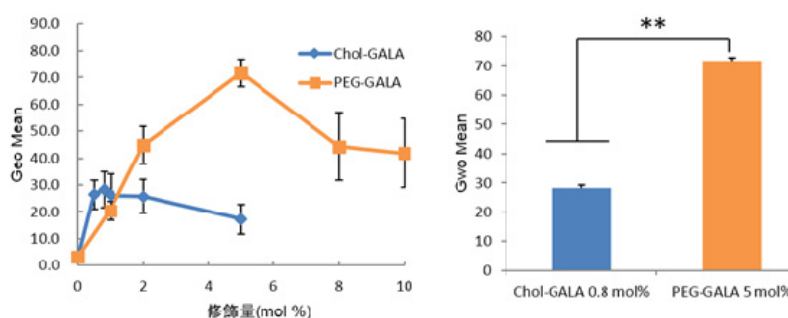


図3: GALA のナノ粒子表面への修飾方法がナノ粒子の *In vitro* 肺血管内皮細胞および肺組織への蓄積に及ぼす影響

いては、修飾量依存的に取り込みが増えることが明らかとなった。さらに各リポソームの取り込みが最高になった時点において、GALA-PEG リポソームのほうがより効率的に取り込まれるこ

とが明らかとなった^{論文4}。

肺組織におけるリポソームの分布を共焦点レーザー顕微鏡により評価した。各種リポソームを投与した後、1時間後に肺組織を灌流した後に評価を行なっている。リポソームを投与していないマウスや、PEGリポソームにおいては、リポソーム由来のシグナルは観察されなかった。一方、従来のGALAリポソームにおいては、肺への蓄積が認められた。また、そのリポソーム由来のシグナルは血管内皮細胞由来のシグナルとほとんど共局在していた。一方、PEGの先端にGALAを修飾したGALA-PEGリポソームにおいては、GALAリポソームと比較してより多くのリポソームが肺組織に認められた。

我々はこれまで、脂溶性足場としてビタミンEを採用したssPalm(ssPalmE)が、pH依存的な高い膜破壊効果を有することを明らかとしている。そこで本研究では、ssPalmEを脂質膜構成成分として搭載したナノ粒子を開発し、本粒子の表面に対してGALAをPEG脂質を介して修飾した。その結果、GALA未修飾粒子と比較して、GALAを修飾した場合、低い投与量で内皮細胞マーカーであるCD31の遺伝子をノックダウンできることを見いだした^{論文4}。

また、我々はこれまで、抗原をコードするDNAをssPalmEから形成されたナノ粒子に搭載した場合、DNA内にコードした抗原情報特異的な免疫活性化を示すことや、抗腫瘍効果を発揮する結果を得ていた^{論文2}。DNAのみでなく、RNAを搭載したssPalmE粒子においても、サイトカインが産生される傾向があることを見出している^{論文3}。これらのことを踏まえると、静脈内投与あるいは局所投与により目的の蛋白質を補充する、あるいは、ノックダウンするためのmRNA/siRNA搭載粒子を開発するためには、炎症を抑制する新たなssPalm分子の設計が必要であるという考えに至った。そこで、潰瘍性大腸炎モデルマウス(DSS腸炎)を用いて生体適合性に優れた脂質足場の探索を行った。種々の脂肪酸を有するssPalm粒子を本モデルマウスに投与し炎症の程度を評価したところ、オレイン酸を足場に有するssPalm0が、体重減少や大腸短縮を最も強く抑制した。そこで、エンドソーム内におけるpH環境に応答して正に帯電するユニットである第三級アミン構造を改変したssPalm0-P4C2を合成し、mRNAを搭載したところ、ssPalm0-P4C2はssPalm0に比べ十倍以上高い核酸送達効率を示すことが明らかとなった^{論文1}。

折しも我々は、ssPalmの分子内に含まれるジスルフィド結合が還元剤と反応すると、粒子の内部にチオールが濃縮され、脂肪酸のエステル結合に求核攻撃する反応する現象を見出した。そこで我々は、チオールによる攻撃を受けやすいフェニルエステルを第三級アミンと脂溶性足場構造の間のリンカーに組み込んだ新規脂質様材料(ssPalm0-Ph-P4C2)を開発しmRNA送達への応用を試みた。ssPalm0-Ph-P4C2はインビトロにおいてssPalm0-P4C2に比べ8.5倍以上高い遺伝子発現活性を示すことが明らかとなった。またssPalm0-Ph-P4C2を尾静脈投与した際の肝臓における遺伝子は発現活性を評価したところ、ssPalm0-P4C2に比べ約60倍の効率を示した。さらに、ssPalm0-Ph-P4C2はssPalm0-P4C2のみならず、市販のトランスフェクション試薬であるTransITや、近年世界初のsiRNA医薬として承認されたONPATROにおいて使われているDLin-MC3-DMAと比較し有意に高い活性を示した。以上、ssPalm0-Ph-P4C2は生体適合性に優れたオレイン酸足場と自己分解性リンカーを併せ持つ分子であり、in vivoにおける高い核酸導入活性と安全性を兼ね備えるキャリアである^{特許1,2}。

本分子から形成されるナノ粒子に対して、1.において同定された抗体をはじめとする様々なリガンドとして搭載することにより、血管内皮に対して効率的に核酸を届けるナノDDS技術が創成できると期待される。

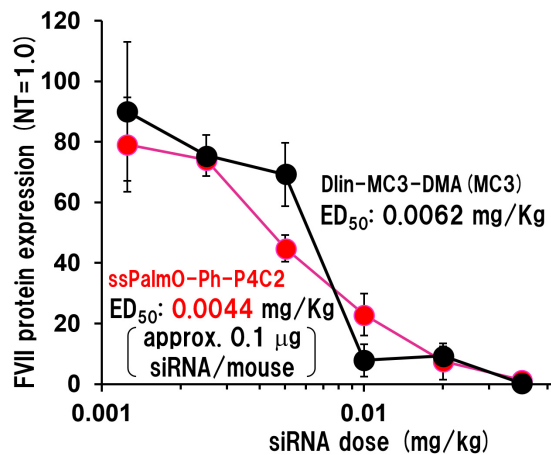


図4: フェニルエステルをリンカー構造に搭載したオレイン酸足場型ssPalmによる肝臓へのsiRNAデリバリー; DLin-MC3-DMAとの比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. Tanaka H, Watanabe A, Konishi M, Nakai Y, Yoshioka H, Ohkawara T, Takeda H, Harashima H, **Akita H.**
The delivery of mRNA to colon inflammatory lesions by lipid-nano-particles containing environmentally-sensitive lipid-like materials with oleic acid scaffolds.
Heliyon. 4(12):e00959 (2018) doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00959.
2. Togashi R, Tanaka H, Nakamura S, Yokota H, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Harashima H, **Akita H.**
A hepatic pdNA delivery system based on an intracellular environment sensitive vitamin E-scaffold lipid-like material with the aid of an anti-inflammatory drug.

- J Control Release. 279:262-270 (2018) doi: 10.1016/j.jconrel.2018.04.022.
3. Tanaka H, Nakatani T, Furihata T, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Harashima H, **Akita H**.
In Vivo Introduction of mRNA Encapsulated in Lipid Nanoparticles to Brain Neuronal Cells and Astrocytes via Intracerebroventricular Administration. Mol Pharm. 15(5):2060-2067 (2018) doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01084.
 4. Santiwarangkool S, **Akita H**, Nakatani T, Kusumoto K, Kimura H, Suzuki M, Nishimura M, Sato Y, Harashima H.
PEGylation of the GALA Peptide Enhances the Lung-Targeting Activity of Nanocarriers That Contain Encapsulated siRNA.
J Pharm Sci. 106(9):2420-2427 (2017). doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.075.

[学会発表] (計 42 件)

- ① Jessica Anndita, Naho Tateshita, Hiroki Tanaka, Naoya Miura, Yu Sakurai, Kota Tange, Yuta Nakai, Hiroki Yoshioka, **Hidetaka Akita**. Development of RNA vaccine platform based on an intracellular environment-responsive lipid like material with vitamin E-scaffold 日本薬学会 第139年会 2019年3月20-23日 幕張メッセ (千葉)
- ② 白根大貴, 田中浩揮, 櫻井遊, 丹下耕太, 中井悠太, 吉岡宏樹, **秋田英万** 凍結乾燥ワンプット法を用いたsiRNA搭載ナノ粒子の開発 日本薬学会 第139年会 2019年3月20-23日 幕張メッセ (千葉)
- ③ Hiroki Tanaka, Manami Konishi, Nae Takada, Tatsunari Takahashi, Yuta Nakai, Kota Tange, Hiroki Yoshioka, Shinya Tamagawa, **Hidetaka Akita**. Cytoplasmic delivery of exogenous IVT-mRNA using self-degradable lipid-like material. 第20回武田科学振興財団生命科学シンポジウム RNAネオバイオロジー 2019年2月1-2日 武田薬品研修所 (大阪)
- ④ **Hidetaka Akita**. Intracellular environment-responsive material (ssPalm), as a technology for the DNA/RNA-based immune-engineering 2018年10月16日THE 12th SUGIYAMA LABORATORY (RIKEN) OPEN SYMPOSIUM 理化学研究所 (横浜)
- ⑤ **Hidetaka Akita** Development of DNA/RNA vaccine platform based on the intracellular environment-responsive lipid-like material 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月27日 大阪国際会議場
- ⑥ Naho Tateshita, **Hidetaka Akita**. Development of mRNA nanocarriers based on environment-responsive materials for the application to cancer vaccines. 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月27日 大阪国際会議場
- ⑦ 小西真奈美, 田中浩揮, 高橋達也, 高田奈依, 中井悠太, 丹下耕太, 吉岡宏樹, 玉川晋也, **秋田英万** 細胞内環境応答性脂質様材料を基盤とするin vivoメッセンジャーRNA送達システムの開発 第12回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2018年9月15-16日 北海道大学
- ⑧ Hiroki Tanaka, Manami Konishi, Nae Takata, Tatsunari, Takahashi, Yuta Nakai, Hiroki Yoshioka, **Hidetaka Akita**. Development of self-hydrolyzable lipid-like material equipped with environment sensing motifs. 18th Symposium for Gene, Design and Delivery. 28 July. 2018 Kitakyusyu
- ⑨ **秋田英万** 細胞内環境応答性材料ssPalmを基盤とした遺伝子・核酸デリバリーとイムノエンジニアリングへの応用 第27回 日本癌転移学会 学術集会・総会 2018年7月19日 ホテルメルパルク横浜
- ⑩ 高田奈依, 田中浩揮, 高橋達成, 小西真奈美, 中井悠太, 丹下耕太, 吉岡宏樹, 玉川晋也, **秋田英万** 還元環境依存的な粒子内分解機構を搭載した自己崩壊型RNA送達システムの開発 日本核酸医薬学会第4回年会 2018年7月9-11日 九州大学医学部百年講堂
- ⑪ 白根大貴, 田中浩揮, 丹下耕太, 中井悠太, 吉岡宏樹, **秋田英万** 凍結乾燥ワンプット法によるsiRNA搭載型中性脂質ナノ粒子の開発と機能評価 第34回日本DDS学会学術集会 2018年6月21-22日 長崎ブリックホール
- ⑫ 白根大貴, 田中浩揮, 吉岡宏樹, 丹下耕太, 中井悠太, **秋田英万** ワンプット調製法を用いた siRNA 搭載型中性脂質ナノ粒子の開発 日本薬学会第138年会 2018年3月27日 金沢
- ⑬ **秋田英万**, 田中浩揮 細胞内における動態制御・崩壊を考慮した脂質様材料の開発とその物性および機能評価 シンポジウム 「ナノDDS製剤の特性解析とその分析評価技術」 日本薬学会第138年会 2018年3月28日 金沢市アートホール
- ⑭ 田中浩揮, **秋田英万** 環境応答性脂質様材料を基盤とする外来mRNA導入技術の設計と開発 「人工RNAによる生体機能制御への挑戦」 日本薬学会第138年会 シンポジウム 2018年3月28日 大原学園金沢校
- ⑮ **秋田英万** 環境応答性材料が拓くナノDDS: DNA/RNA創剤基盤としてのssPalmを中心として nano tech 2018 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 2018年2月14日 東京

ビッグサイト

- ⑯ 田中浩揮、渡辺綾香、丹下耕太、中井悠太、原島秀吉、**秋田英万** 炎症大腸に対するナノ粒子核酸送達システムの開発 核酸医薬学会第3回年会 2017年7月12～14日 札幌
- ⑰ **秋田英万** 細胞内環境応答性脂質様材料ssPalmが拓くマルチ創剤基盤 第33回日本DDS学会学術集会 2017年7月7日 京都
- ⑱ **秋田英万** 細胞への効率的デリバリー機能を有する脂質系材料:核酸医薬への応用を中心として バイオ医薬品開発最前線 2017 御茶ノ水 2017年6月6日
- ⑲ **Hidetaka Akita**, Intracellular environment- responsive lipid like material as a multi-nanoDDS platform. FIP PSWC2017 6th Pharmaceutical Sciences World Congress. May 22. 2017 Stockholm

〔図書〕(計1件)

秋田 英万、丸善出版、ドラッグキャリア設計入門～DDS からナノマシンまで～ (片岡一則、原島秀吉 編) 3.2節、5.5節、6.1節 2019

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

1. 名称:細胞内動態を改善した新規カチオン性脂質

発明者:**秋田英万**、田中浩揮、高田奈依、高橋達也、小西真奈美、丹下耕太、吉岡宏樹、中井悠太

権利者:千葉大学、日油株式会社

種類:特願

番号:2018-060764

出願年:2018年

国内外の別:国内

2. 名称:細胞内動態を改善した新規カチオン性脂質

発明者:**秋田英万**、田中浩揮、高田奈依、高橋達也、小西真奈美、丹下耕太、吉岡宏樹、中井悠太

権利者:千葉大学、日油株式会社

種類:PCT

番号:PCT/JP2019/012302

出願年:2019年

国内外の別:国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakubutu/index.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。