96　細胞内超崩壊性ネオssPalmの開発と癌免疫治療への応用	秋田　英万

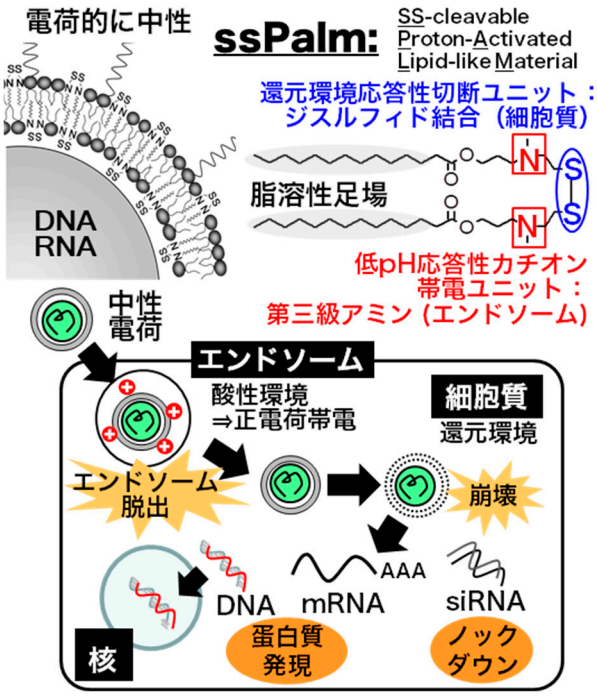
【目的】特定の遺伝子を標的細胞に移入する遺伝子治療や、特定の遺伝子の発現を抑制する核酸治療（アンチセンス核酸や short interference RNA：siRNA など）は、個別化医療や癌免疫医療を実現するための有力な技術になると期待される。遺伝子や核酸を『くすり』として実用化するためには、標的となる疾患臓器に届くだけでなく、細胞内の特定の細胞内小器官まで分子を送達するためのナノサイズに制御された『ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）』の開発が不可欠である。本研究では、我々が独自に開発したナノ材料である細胞内環境応答性脂質様物質（SS-cleavable and pH-Activated and Lipid-like Materials：ssPalm）を進化させ、下記の 3 つの基盤技術の開発を目指した。

1. 癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化する DNA／RNA ワクチン・アジュバント開発
2. 個別化医療を実現する免疫を活性化しにくい *in vivo* 核酸導入技術の開発
3. 安価な抗炎症薬の送達により抑制的な腫瘍内免疫環境を『リセット』する癌治療戦略の確立

【方法】ssPalm は、2 本の脂溶性足場を有する脂質様材料であるが、その親水性基には、エンドソーム内の酸性環境に応答してプロトン化を受けて正に帯電しうる第三級アミン構造と、細胞質内の還元環境に応答して切断されるジスルフィド結合を有する。本研究では、これらのユニットのうち、脂溶性足場に改良を加えながら、免疫を活性化する粒子と抗炎症性の粒子の開発を進めた。また、親水性基と親油基の間のリンカーについても改良した。

【結果】ビタミンＥを足場とした ssPalmE 粒子において、核酸と組み合わせた際に高い免疫活性化が認められた。本粒子に抗原をコードした DNA や mRNA を搭載することにより、抗原特異的な細胞傷害性Ｔ細胞の活性化が認められた。一方、潰瘍性大腸炎モデルを用いた検討により、オレイン酸を足場とした ssPalmO において、抗炎症性の効果が認められた。そこで、蛋白の補充あるいは、特定の遺伝子をノックダウンするための静脈内投与型 mRNA／siRNA キャリアを開発すべく、ssPalmO の分子改良をおこなった。細胞内の還元環境に応答して酸性されるチオール基が反応しうるリンカーを ssPalmO 分子内に組み込んだ結果、さらに ssPalm 分子の自己分解性が向上し、肝臓における mRNA および siRNA の導入効率が劇的に改善した。さらに、ssPalm の低分子キャリアとしての有用性を検証すべく、抗炎症薬を搭載した ssPalm 粒子を開発した。本粒子を静脈内投与した場合、抗腫瘍効果が認められた。

細胞内環境応答性脂質様材料（ssPalm）の構造と概念



96. 細胞内超崩壊性ネオ ssPalm の開発と癌免疫治療への応用

秋田　英万

千葉大学 大学院薬学研究院 薬物学研究室

Key words：ナノ粒子，細胞内環境，RNA，ワクチン，脂質

緒　言

個々の患者レベルでゲノム情報解析し、治療や投薬プロトコルに生かす『個別化医療（Precision Medicine）』の概念が急速に広がりつつある。大手の IT 企業も巻き込みながら、ヒトゲノムのビッグデータの保存・解析技術が進展すると共に、癌免疫療法への適応に資するネオ抗原や、癌の進展を抑制するための治療標的が急速に同定されるであろう。特定の遺伝子を標的細胞に移入する遺伝子治療や、特定の遺伝子の発現を抑制する核酸治療（アンチセンス核酸や short interference RNA：siRNA など）は、個別化医療や癌免疫医療を実現するための有力な技術になると期待される。遺伝子や核酸を『くすり』として実用化するためには、標的となる疾患臓器に届くだけでなく、細胞内の特定の細胞内小器官まで分子を送達するためのナノサイズに制御された『ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）』の開発が不可欠である。

一方、腫瘍組織内は免疫が抑制された環境であり、長年にわたり癌免疫療法の実用化を妨げてきた。近年、この負の免疫制御機構を阻害する免疫チェックポイント抗体（抗 CTLA-4 や抗 PD-1 抗体）の有効性がヒトにおいて認められたことより、癌免疫療法は外科、放射線、化学療法と並ぶ癌治療法へと変貌を遂げた。しかし、これら抗体の臨床応用においては、①奏効率が 20%程度に留まることや、②価格が極めて高額であり国の医療費に大きな負担がかかる（> 3,000 万円／年）という 2 つの問題点がある。これら問題点を包括的に解決するためには、『1. 多様な癌抗原に対して特異的に細胞性免疫を活性化するワクチン技術』の開発や、『2. PD-1 抗体の機能を代替あるいは増強できる安価な低分子薬物療法』の確立が急務である。

本研究では、我々が独自に開発したナノ材料である細胞内環境応答性脂質様物質（SS-cleavable and pH-Activated and Lipid-like Materials: ssPalm）［1］を進化させ、下記の 3 つの基盤技術の開発を目指している。

1. 癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化する DNA／RNA ワクチン・アジュバント開発
2. 個別化医療を実現する免疫を活性化しにくい *in vivo* 核酸導入技術の開発
3. 安価な抗炎症薬の送達により抑制的な腫瘍内免疫環境を『リセット』する癌治療戦略の確立

方法および結果

1. 癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化する DNA／RNA ワクチン・アジュバント開発

我々はこれまで、脂溶性足場としてビタミン E を採用した細胞内環境応答性脂質（ssPalmE）を開発してきた。本材料から形成されるナノ粒子に DNA を搭載し、静脈内投与した場合、肝臓において極めて高い遺伝子発現が得られたが、同時に高いサイトカインの産生が認められた［2］。同様のサイトカイン産生は、mRNA を搭載した ssPalmE ナノ粒子を脳室内に投与した際にも認められている［3］。本知見に基づき、抗原をコードした DNA を搭載した ssPalmE 粒子のアジュバントとしての機能を解析した。DNA を搭載した ssPalmE 粒子を皮下に投与した際、本粒子が効率的にリンパ節内に移行し、マクロファージに速やかに取り込まれることを見出した（図 1）。また、本粒子をマクロファージ由来細胞に作用させた際、高いサイトカイン誘導能が発揮されることを見出した STING／TBK1 経路の阻害により本サイトカイン産生が抑制されることから、細胞質内 DNA センサーが本免疫活性化に関与することが示された。本粒子を PD-1 抗体と共にマウスに投与することにより、それぞれの単独投与群と比較しても高い抗腫瘍効果が得られた［4］。

搭載した DNA に抗原をコードすることにより、DNA ワクチン技術へと応用した。ルシフェラーゼ遺伝子をコードした DNA を ssPalmE 粒子に搭載して皮下投与した結果、裸の DNA あるいは市販の正電荷脂質を基盤とした遺伝子導入試薬を投与した際と比較して、高い遺伝子発現活性が認められた。また、モデル抗原である Ovalbumin（OVA）をコードする遺伝子を内封した粒子を免疫し、7 日後の細胞傷害性 T 細胞（CTL）活性を測定した。裸の DNA あるいは Lipofectamine2000 群では、CTL 活性は極めて低いものであった。一方、ssPalmE では 90%ほどの高い CTL 活性を誘起することが明らかとなった。

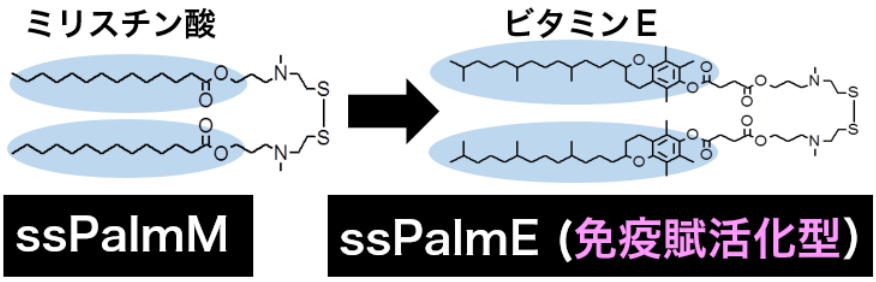


図 1. ビタミン E 足場型 ssPalm の構造
ミリスチン酸を足場とする ssPalm（ssPalmM）の脂溶性足場構造をビタミン E に置換した ssPalm は、遺伝子を搭載することにより免疫賦活化能を獲得する

さらに、ssPalmE 分子を mRNA の送達技術として応用した。樹状細胞への取り込み促進素子（α ヘリックス構造を有する正電荷ペプチド : KALA）［5］を表面修飾した脂質粒子を用いて、マウス骨髄由来樹状細胞に対して mRNA を *ex vivo* で導入した。その結果、比較対象として用いたミリスチン足場型 ssPalmM と比較して、ビタミン E 足場型 ssPalmE では効率的な蛋白質の発現と、同時に高いサイトカインの産生が認められることも明らかとした。これらの高い mRNA 導入能と免疫活性化能に伴い、*ex vivo* で抗原をコードした mRNA を導入した樹状細胞を免疫することで高い抗原特異的 CTL 活性が認められた。上記の結果より、ビタミン E 足場型 ssPalm が RNA ワクチンの基盤技術としても有用であることが示された。抗原をコードした mRNA を ssPalmE に内封し、皮下に直接投与した結果、0.5 μg 以下の mRNA を 1 回投与しただけで抗原特異的な CTL 活性が認められた。このような強い活性は、従来から使われてきた正電荷脂質では得られないことから、ssPalmE を基盤とした RNA ワクチン技術は従来技術としても高い進歩性があると考えられる。

2. 個別化医療を実現する免疫を活性化しにくい *in vivo* 核酸導入技術の開発

上記の結果より、ビタミン E 足場型 ssPalm は核酸と組み合わせることにより強い免疫活性化効果が得られることが明らかとなった。従って、蛋白質を補充する、あるいは特定の遺伝子をノックダウンすることを目的とした核酸導入技術を開発する上では、免疫を活性化しない新たな ssPalm 分子を設計し直す必要性が生じた。そこで、ssPalm の細胞内における崩壊性をさらに高めるため、リンカー構造に着目して分子を設計した。

炎症部位は血管透過性が亢進しているため、血中を循環するナノ粒子が漏出しやすい環境にあると言われている。潰瘍性大腸炎マウスモデルの炎症部位に集積しやすいサイズを同定し［6］、本サイズに制御した様々な脂溶性足場型 ssPalm 粒子を投与した。その結果、オレイン酸足場型 ssPalm 粒子を投与した際に、大腸炎が最も抑制される傾向が認められた［7］（図 2）。そこで、静脈内投与あるいは、局所投与による核酸導入用の ssPalm として、オレイン酸を足場とした ssPalmO をシード化合物とした開発を進めた。

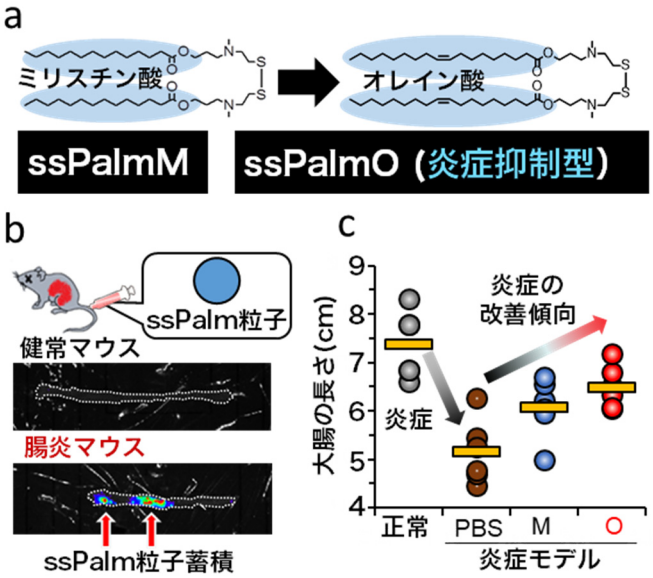


図 2. オレイン酸足場型 ssPalm の構造と大腸炎モデルマウス投与時の効果

a) ミリスチン酸足場型 ssPalm（ssPalmM）とオレイン酸足場型 ssPalm（ssPalmO）の構造

b) ssPalmM から形成されるナノ粒子の炎症部位への集積

c) ナノ粒子投与が炎症大腸に及ぼす影響

細胞内還元環境においてジスルフィド結合が開裂するという ssPalm のユニークな分子特性を生かし、さらなる自己崩壊性を付与する分子設計を施した。特に、還元環境下で生じるチオール基によって粒子内で求核攻撃を受けるリンカーとして、フェニルエステルを導入した第 3 世代 ssPalm（ssPalmO-Phe-P4C2）を創製した。その結果、遺伝子ノックダウン効率が劇的に向上し、ONPATTRO™（patisiran®）の主成分となる競合技術（DLin-MC3-DMA）を比較対象としても、同程度の siRNA 導入効率を示した。また、特筆すべき点として、ssPalmO-Phe-P4C2 は DLin-MC3-DMA と比較して安全性も高い。これは、化学構造的に ssPalmO-Phe-P4C2 は DLin-MC3-DMA よりも生分解性が高いことが要因と考えられる。以上、本材料は、世界トップクラスの性能と安全性を誇る DDS 材料として様々な用途に展開できると期待できる。

3. 低分子送達による腫瘍内免疫環境制御

ssPalm は核酸を搭載しない場合において、内水層を有しない脂質ドロップ構造をとることを明らかとした。本微小粒子を低分子デリバリーへと応用すべく、その界面物性、内部物性、環境応答性について、Laurdan や DPH などの蛍光分子を用いて定量的に解析を行った。ssPalm 粒子は生理的条件下において、水の侵入を排除した安定な粒子を形成することが示された。一方、酸性条件下では、脂質膜のパッキングが緩み極性が上昇することが明らかとなった。一方、粒子の内部について、蛍光色素 DPH の定常状態異方性を用いて流動性を解析したところ、粒子内部は温度や pH といった外部環境の影響を受けず、常に流動的であることが示唆された［8］。

また、4MU パルミチン酸エステルを搭載したナノ粒子を調製し、10 mM グルタチオン存在下における搭載薬物の放出をはかることで、細胞内還元環境応答的な薬物放出能を評価した。また、搭載した脂溶性薬物が、還元環境下において速やかに放出されることも明らかとなった。これらの結果は、ssPalm 粒子が細胞外では安定的に存在し、細胞内に取り込まれた後には表面が不安定化し、最終的に崩壊することで薬物を細胞内に放出することを示唆する結果である。

腫瘍組織内における炎症環境を矯正すべく、ssPalm を用いた抗炎症薬搭載ナノ粒子の開発をすすめた。代表的なステロイド性抗炎症薬であるデキサメタゾン Dexamethazone の脂質誘導体（Dexamethasone cholesteryl hemisuccinate：DexCHEMS）を搭載し、大腸がん細胞 CT26 を皮下移植した担がんモデルマウスに対し、尾静脈投与した結果、抗腫瘍効果が認められた。また、このような抗腫瘍効果は、免疫不全マウスでは認められなかったことから、免疫応答が本抗腫瘍効果に関与することが考えられる。

考　察

本研究では、ssPalm 分子の疎水性足場を変えることにより。免疫活性化型の核酸送達システムや、逆に抗炎症型の核酸送達システムができることを見いだした。前者は、DNA／RNA ワクチン・アジュバントとしての基盤技術になると考えられる。後者は、蛋白の補充あるいは特定の遺伝子発現を抑制する基盤技術になる。ビタミンＥを足場とすることでなぜ、免疫活性型のナノ粒子ができるかについては、今後、オミクス解析などにより明らかとしたいと考えている。

また、一連の研究を進める上で、ssPalm 分子は、核酸のみでなく、低分子のデリバリー技術へと応用できることも見出した。特に今回、抗炎症薬を投与することにより抗腫瘍効果が得られたという結果は、生体内、さらには腫瘍組織内の免疫応答を制御する癌治療戦略である点で、従来の抗癌剤搭載ナノ粒子を用いた癌治療戦略とは一線を画すものである。本研究で得られた抗腫瘍効果の作用機構に関しては、今後明らかとしなければならない。特に、ナノ粒子の体内動態と抗腫瘍効果の関係を明らかとすることで、本薬の機能作用部位（臓器）を明らかとできると考えられる。

以上、本研究において我々は、ssPalm を用いた免疫活性化および、腫瘍内免疫の矯正を可能とする技術ができたと考えている。今後、これらの粒子を併用した際の抗腫瘍効果についても明らかとしたいと考えている。

文　献

1） Tanaka H, Sato Y, Harashima H, Akita H. Cellular environment-responsive nanomaterials for use in gene and siRNA delivery: molecular design for biomembrane destabilization and intracellular collapse. Expert Opin Drug Deliv. 2016 Jul;13(7):1015-27. doi: 10.1517/17425247.2016.1154531.

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. 2018 Jun 10;279:262-270. 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. 2018 15(5):2060-2067. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01084.

4） Kawai M, Nakamura T, Miura N, Maeta M, Tanaka H, Ueda K, Higashi K, Moribe K, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Harashima H, Akita H. DNA-loaded nano-adjuvant formed with a vitamin E-scaffold intracellular environmentally-responsive lipid-like material for cancer immunotherapy. Nanomedicine. 2018 Nov;14(8):2587-2597. doi: 10.1016/j.nano.2018.08.006.

5） Miura N, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Harashima H, Akita H. Identification and Evaluation of the Minimum Unit of a KALA Peptide Required for Gene Delivery and Immune Activation. J Pharm Sci. 2017 Oct;106(10):3113-3119. doi: 10.1016/j.xphs.2017.05.014.

6） Watanabe A, Tanaka H, Sakurai Y, Tange K, Nakai Y, Ohkawara T, Takeda H, Harashima H, Akita H.Effect of particle size on their accumulation in an inflammatory lesion in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model. Int J Pharm. 2016 Jul 25;509(1-2):118-122. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.043. Epub 2016 May 24.

7） 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. 2018 Dec 3;4(12):e00959. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00959.

8） Tanaka H, Oasa S, Kinjo M, Tange K, Nakai Y, Harashima H, Akita H. Temperature and pH sensitivity of a stabilized self-nanoemulsion formed using an ionizable lipid-like material via an oil-to-surfactant transition. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017 Mar 1;151:95-101. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.020. Epub 2016 Nov 18.