

Development of drug delivery system with dendritic poly (L-lysine)

渡部, 和人
Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/21713>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名： 渡部 和人

論文題目： デンドリティックポリリジンを利用した薬物送達法の開発に関する研究

区 分： 甲

論 文 内 容 の 要 旨

薬物の副作用の低減や既存薬の用途拡大を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) は、医療技術として重要である。そのため、様々な機能性の高分子、あるいはリポソームやミセルなどの超分子を薬物の運び屋 (キャリア) として利用するシステムが研究されている。我々は、アミノ酸のリジンを構成単位とする樹状高分子 (デンドリマー) であるデンドリティックポリリジン (KG6) を利用した DDS の開発を進めてきた。これまでに、遺伝子や核酸の送達キャリアとしての有用性を報告している。本論文は、KG6 の *in vivo* における核酸デリバリー、あるいは核磁気共鳴撮像法 (MRI) の造影剤、小分子抗がん剤デリバリー等への適用についての検討結果をまとめたものである。

第2章では、KG6 を利用した肝臓への核酸デリバリーについて検討した。近年、siRNA やアンチセンス、デコイオリゴ核酸などの核酸医薬の臨床応用が進められている。しかしながら、核酸医薬は体内での安定性や細胞内への取り込みの低さから、局所的な投与に制限されている。そこでこれらの問題点を克服するキャリアシステムが望まれている。一方、我々は遺伝子を KG6 と混合して静脈投与すると、効率良く肝臓に集積する事を報告している。この KG6 のキャリアとしての性質は、核酸医薬の肝臓へのデリバリーに適すると考えられる。そこで本研究では、KG6 を用いて肝疾患の改善に機能するデコイ核酸あるいは siRNA を送達し、それぞれの核酸医薬の効果から KG6 の有用性を評価した。まず、肝臓の免疫を司る Kupffer 細胞へのデリバリー能を評価した。エンドトキシン誘発性の劇症肝炎モデルマウスを作成し、KG6 を用いて抗炎症作用を持つ NF κ B デコイ核酸を送達した。抗炎症作用の評価は、肝障害の指標である血中 AST/ALT 値から評価した。その結果、NF κ B デコイ核酸の、配列及び投与量依存的な炎症抑制作用が認められ、KG6 を利用して核酸医薬を Kupffer 細胞にデリバリーできることがわかった。続いて、肝実質細胞に特異的に発現するアポリポプロテイン B (ApoB) を発現抑制する siRNA を投与し、肝実質細胞への送達能を評価した。ApoB はコレステロール代謝に関与するタンパク質であり、発現の抑制によって高コレステロール血症の症状の改善が期待できる。投与後の ApoB の mRNA の変化量をリアルタイム定量 PCR 法で評価した。その結果、ApoB の発現抑制は認められたものの、siRNA の投与量や配列に依存しない発現抑制も認められた。この原因として、siRNA が免疫を司る Kupffer 細胞へも取り込まれ、インターフェロン応答あるいは炎症応答が誘起されたことが考えられる。以上の結果から、KG6 は Kupffer 細胞への核酸医薬のデリバリーに適することがわかった。そして、肝実質細胞へのデリバリーに利用するには、Kupffer 細胞の取り込みを抑制するシステムが必要であることが示唆された。

第3章では KG6 の MRI 造影剤としての利用を検討した。MRI は、非侵襲的で組織透過性の高い画像診断法として広く臨床利用されている。MRI は造影剤を利用することで、興味のある組織の

撮像が可能であるが、感度が低いため、高濃度の MRI 造影剤の投与を必要とする。ここで、MRI 造影剤は、デンドリマーなどの高分子に修飾すると、分子当たりの造影能が向上することが知られている（高分子効果）。また、MRI の感度を向上させるシステムとして、オーバーハウザー効果 MRI（OMRI）が研究されている。OMRI は、装置の普及率の低さから、未だ造影剤となるニトロキシルラジカルを高分子に担持させて送達した報告はない。一方で、MRI 造影剤を撮像対象の組織特異的にデリバリーする手法も求められている。これに関しては、我々の研究グループは、ポリエチレングリコール（PEG）を修飾した KG6（PEG-KG6）が静脈投与後に効率良く腫瘍に集積することを報告している。以上の研究背景から、本研究ではニトロキシルラジカルを修飾した PEG-KG6 を作成し、高分子効果と OMRI のシグナル増強効果の相乗効果によって、高感度な MRI 撮像が可能で造影剤の開発を目指した。しかし、ニトロキシルラジカル修飾位置及び修飾量を変化させて OMRI 測定した結果、いずれの PEG-KG6 誘導体もニトロキシルラジカル単体の造影能に及ばなかった。原因として、高分子効果と OMRI のシグナル増強効果を高めるファクターが相反する事が明らかとなった。そこで、PEG-KG6 にニトロキシルラジカル修飾すると OMRI 造影能が低下することを利用し、腫瘍環境で PEG-KG6 からニトロキシルラジカルが放出されて造影能が OFF/ON 変化する、刺激応答性造影剤を開発した。腫瘍特異的に発現するウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ（uPA）で切断される基質ペプチドを介して、ニトロキシルラジカルを PEG-KG6 に修飾し、腫瘍特異的 OMRI 造影剤を作製した。uPA と同じ部分で基質ペプチドを切断するトリプシンで処理し、OMRI 造影能を評価したところ、シグナルの酵素応答的な OFF/ON 変化が認められた。しかしながら、その OMRI 造影能はニトロキシルラジカル単体に及ばなかった。ニトロキシルラジカルに結合した断片ペプチドが、運動性を低下させたと考えられる。切断後のニトロキシルラジカルの運動性が高く保たれる結合様式を利用することが、高い造影能を持つ組織特異的な OMRI 造影剤の設計に重要であることが明らかとなった。

第 4 章では、オルソゴナル合成を利用した KG6 の高機能化について検討した。デンドリマーは、オルソゴナル合成を適用することで、異方性の付与や官能基間距離の厳密な調節が可能であり、機能性 DDS キャリアとして有用と考えられる。そこで、KG6 からのオルソゴナルな世代伸長を試みた。 α 位を Boc 基、 ϵ 位を tfa 基で保護したリジンを利用して、デンドリティックポリリジンの α 位選択的な世代伸長を達成した。作成した KG6 誘導体は、 α 位が分子表面の物性を、 ϵ 位が分子内部の物性を決定する構造体と考えられた。そこで、 α 位選択的に PEG を修飾し、内部に小分子を担持できる単分子ミセル（PEG- K_n -KG6, $n = 1 \sim 3$ ）を作製した。分子内部の ϵ 位にカチオン性のアミノ基を持つ PEG- K_n -KG6 と 21 残基の 2 本鎖 DNA（dsDNA）の混合物の物性を評価したところ、dsDNA は PEG- K_n -KG6 に内包された事が示唆された。PEG- K_n -KG6 は、30 nm 程度の粒径を持ち、表面が PEG で覆われた構造である。よって、静脈投与後に Kupffer 細胞の取り込みを回避して肝実質細胞に蓄積すると考えられる。つまり、肝実質細胞への核酸医薬のデリバリーに利用できると考えられる。また、PEG- K_n -KG6 は、先に報告した PEG-KG6 と同様の腫瘍集積性を持つと期待できる。そこで、PEG- K_n -KG6 の ϵ アミノ基にカルボキシル基を導入し、配位結合によって抗がん剤のシスプラチン（CDDP）を担持させた。白金原子を定量して担持量を評価したところ、最も担持量の多い誘導体で 15 wt% の CDDP の担持が認められた。この担持量は、担がんマウスの抗がん効果を報告した先行研究のデリバリーシステムに匹敵する。したがって、今後の *in vivo* での腫瘍集積性の評価や抗がん効果の検討が期待できる。

本研究の一連の成果は、デンドリティックポリリジンに限らず、種々のデンドリマーを利用した核酸医薬、造影剤、抗がん剤の DDS の開発の一助となる知見と考えられる。