

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	多段階的な細胞内・核内動態精密制御機能を搭載した多重コーティング型ナノ粒子の創製
研究機関・部局・職名	北海道大学 ・ 大学院薬学研究院 ・ 准教授
氏名	秋田 英万

【研究目的】

これまで遺伝子ベクターとしては、カチオン性材料（リポソームやポリマー）との静電的複合体が広く用いられてきたが、未だにそれらの実用化には至っていない。この背景には、遺伝子発現効率が不十分であることや、血中投与後の高い凝集性あるいは細胞毒性などの問題点が挙げられる。また、これまで申請者が行なってきた、ウイルスとカチオン性材料ベクター間の細胞内動態比較の結果によると、従来ベクターの低い遺伝子導入効率の要因は、遺伝子が核に送達した後の核内転写・翻訳過程にあることを見出している。

本研究では、遺伝子が脂質膜に『内封』されたナノ構造体を基盤技術とし、『膜構造の多重化』、『体内動態/細胞内動態制御用の素子・材料の開発』、『核内動態制御を目的とした遺伝子・ポリカチオンコア粒子の改良』という3つの観点から研究を進めながら、従来技術（カチオン性材料との静電的複合体）の能力を凌駕する、あるいは、従来技術では成し得なかった新たな機能を発揮する遺伝子導入技術を開発することを目的とする。具体的な達成目標としては、（1）DNA ワクチン技術の創出に向けた樹状細胞への *ex vivo* 遺伝子導入技術、（2）*in vivo* 血中投与を可能とする癌・肝臓標的型遺伝子デリバリーシステムの開発、（3）正常臓器血管内皮を超えて実質細胞へ送達するための血管透過型デリバリーシステムの構築が挙げられる。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は、種々の機能を搭載し DDS に応用する多重膜ナノ粒子を創製することを目的として計画・遂行され、予定された3つの機能、①DNA ワクチン技術、②癌・肝臓標的型遺伝子デリバリー、③血管透過型デリバリーシステム、の各要素技術において、目的とする機能発現の物質開発を行い非常に優れた成果を挙げている。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題の最終目標は、種々の機能を搭載した多重コーティング型ナノ粒子を創製することにある。これまでの研究は、MEND に搭載する機能の研究が主となっており、これに関しては、樹状細胞への遺伝子導入・癌/肝臓を標的とした遺伝子導入、の何れにおいても、有用で非常に優れた研究成果が得られている。

DNA ワクチン技術の創出については、エンドソーム膜と核膜との融合に最適化された脂質膜により形成される多重膜型粒子に対して、さらに新規に開発された膜融合性ペプチド (KALA) のステアリン酸誘導体 (STR-KALA) を新規に開発し、多重膜型ナノ粒子に搭載した。さらには核内動態制御の戦略として、遺伝子を微粒子化する際のカチオン成分を最小限に抑えて転写を効率化すると共に、プラスミド DNA 配列 (プロモーター等) の最適化をおこなった。その結果、培養樹状細胞において高い抗原提示能と抗腫瘍効果を得るのに十分な遺伝子発現を得ることに成功している。

癌・肝臓標的型遺伝子デリバリーシステムに関しては、分子内に2本の脂肪酸ユニットと2つの三級アミンを有し、さらにそれがジスルフィド結合により架橋された脂質様サーファクタント (**SS-cleavable pH-activated lipid-like material; ssPalm**) を新規に開発し、国内だけではなく国際特許出願を行った。本研究においてはさらに、ssPalm の脂溶性足場を脂溶性ビタミン (ビタミンA、ビタミンE) に置換した第二世代型材料についても開発した。ビタミンAに置き換えた材料 (ssPalmA) から形成されるナノ粒子は、ビタミンAの細胞内輸送系により認識されて能動的に核輸送が達成できることを見出している。一方、粒子表面に水溶性ポリマーを修飾することにより、血中滞留性の向上や、それにとまなう腫瘍組織への遺伝子送達量の増大を確認した。

血管透過型デリバリーシステムに関して、アミノ酸配列を系統的に改変したペプチドを各種設計し、これらを修飾したリポソームの脳毛細血管内皮細胞単層を透過する活性を比較することで、トランスサイトーシス経路を標的するためのペプチドの最小単位を同定することに成功した。また、本リポソームは血管内皮細胞内に対して、従来のクラスリン介在性経路とは異なる経路により取り込まれ、リソソーム分解経路から回避可能であることを見出した。一以上、本項目に関して、所期の目的を達成できたと言える。

③ 研究の成果

・ これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・ 当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究の成果である ssPalm 材料や、本材料から調製されるナノ粒子、さらにはその表面に搭載させる素子は、その分子バリエーションの選択や、修飾する機能性素子との組み合わせにより、(1) 樹状細胞への遺伝子導入・活性化を介した DNA ワクチ

ン技術、(2) 静脈内投与による遺伝子・核酸デリバリーなど、極めて幅広い用途に用いることができる、薬物送達用技術のプラットフォームである。

(1) に関して、元来、樹状細胞に対して遺伝子を導入することは極めて困難であり、これまでウイルスベクターを用いた方法や、外部からの電気刺激を利用した方法などが用いられてきた。特に、ウイルスは、樹状細胞に対して高い遺伝子導入が可能であるだけでなく、同時に樹状細胞を活性化する能力を兼ね備えていることから、DNAワクチン用遺伝子導入技術として高い機能性を有する。しかし、これらは、高レベルな拡散防止措置を施した研究施設や、特殊な装置が必要であるという問題点がある。また、従来のワクチン製剤においては、抗原に加えて様々な金属性の免疫活性化物質（アルミ等）が添加されている。近年の子宮頸がんワクチン等において、これらが生体内に毒性を示すことが報告されていることから、その利用が問題視され始めている。本研究において基盤とするナノ粒子は、『免疫担当細胞への遺伝子導入』と『免疫活性化』を同時に達成するウイルスベクターのメリットを、全て有機人工材料のみで再現する世界発の技術である。生体内直接投与により、従来型の市販ベクターを用いた場合と比較しても極めて高い細胞性免疫を誘起できることを見いだしていることから、医療・畜産分野に幅広く応用可能なナノワクチンであり先進性・革新性・優位性がある。

(2) に関しても、ssPalmから形成される粒子は、従来のカチオン性材料を用いた人工遺伝子ベクターの問題点であった、1. 血中における凝集体形成と非特異的な肺移行、2. サイトカイン産生、3. 発現持続性の低さを全て解消できる点で、先進性や有意性がある。特質すべき点として、本 ssPalm 材料から形成されるナノ粒子は、その材料自身が多機能性を有しており、当初想定していた多重膜型ナノ粒子のような複雑な構造をとらなくても目的を達成できたことが挙げられる。今後の医療等への応用を考える上では、単純な構造で従来技術を超える機能を得たという点は重要な成果である。

ssPalm は、従来とは逆転した発想から生み出されたユニークな物質であり、カチオン性ベクターでは実現できなかった非凝集性や長時間の発現持続性などの優れた特性を発揮している。このため、大きなものといえないが、ssPalm の開発はブレークスルーであると考えられる。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

先に挙げた①、②、③の各項目に関する研究結果は、何れもその分野における高レベルの研究成果であり、各分野の進展に寄与するものである。KALA MEND によるスイッチ効果などは、その機構解明を通して関連の薄い他分野の研究発展に寄与する可能性もあり、また新たな効果の発見につながる可能性もある。ssPalm は日油から随時提供予定とのことであり、分野を超えた新奇な応用も期待される。

血管透過型デリバリーシステムでのトランスサイトーシス経路の標識化も有用なもので、社会の要請も高い関連する分野の進展に寄与するものと評価される。

DDS には非常に多様な要素技術が内包されており、DDS は統合的な技術となっている。そのために DDS の研究成果は、医療目的が中心ではあるが、より広い分野へイン

パクトを与え得るものとなっている。このため、本研究の成果は、DDS と細胞内動態制御機能を組み合わせた癌治療、と言う直接的な目的を通じて社会に貢献するものであるが、また様々な機能性物質の開発を通して、新物質創製の面から社会に新たな寄与をもたらすことも期待される。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究計画については、研究の進展に伴い、研究計画を柔軟にかつ適切に変更され、追加されていると判断できる。実施体制については、9～11人体制で、構成にも問題はない。マネジメント：設備機器および消耗物品の購入は研究計画に沿ったものと判断される。准教授として、多くの修士、学部学生の研究指導も調和のとれたものである。助成金については、人件費、会議費に偏ることなく有効に資されている。設備購入も研究推進に役立つものであり適切である。指摘事項については、適切に推進されている。応用面でのがん、肝臓への精力的な研究対応によって大きな成果をあげることが出来ている。

論文発表も国際誌に数多く着実に行われている。専門家向けへの発信を精力的に行われている。5件の特許出願(すべて出願中、うち3つはPCT出願)をおこなっており、特許取得作業も順調である。国民との科学技術対話については、北海道大学の広報活動の中で、中核的な役割を担っており、精力的に行われた。