

氏名	樋口 裕子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第575号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	フコース修飾カチオン性リポソームを用いたNFκB デコイの Kupffer 細胞選択的送達に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 乾 賢一

論文内容の要旨

近年、アンチセンス DNA, siRNA やデコイなどオリゴヌクレオチド医薬品を用いた遺伝子治療が注目されている。中でも NFκB デコイは、炎症性疾患や免疫疾患への治療が期待されているが、現在、局所投与では効果があるものの、静脈内投与では酵素分解などのため標的細胞に十分量の NFκB デコイが到達せず治療効果は得られない。したがって、NFκB デコイを用いた効果的な全身レベルでの治療法を確立するためには、治療の標的となる細胞、例えば、全身性サイトカイン産生細胞である Kupffer 細胞に対する細胞選択的なデリバリーシステムの開発が不可欠であると考えられる。Kupffer 細胞を治療標的とする場合は、厳密な基質認識性を有するフコースレセプターが Kupffer 細胞特異的に発現することから、フコース修飾を利用した細胞選択的な遺伝子導入キャリアを開発することにより、NFκB デコイの静脈内投与による治療が可能になると考えられる。そこで著者は、NFκB デコイに対する Kupffer 細胞選択的な送達法の開発を目的として、フコース修飾コレステロール誘導体 (Fuc-C4-Chol) を合成し、フコース修飾カチオン性リポソームの製剤設計を行うとともに、その機能を *in vitro*, *in vivo* 実験において系統的に評価した。

I. 培養細胞におけるフコース修飾カチオン性リポソームを用いた NFκB デコイの Kupffer 細胞選択的送達の評価

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞を用いて、FITC 標識 NFκB デコイの細胞内分布の LPS 刺激による変化を観察したところ、naked FITC 標識 NFκB デコイは LPS 刺激の有無にかかわらず大部分が細胞質に分布し、核への移行はほとんど認められなかった。次に、カチオン性リポソーム/rhodamine 標識 NFκB デコイ複合体の細胞内分布ならびに取り込み特性を検討したところ、naked NFκB デコイの場合と比べ有意な取り込み量の増加がみられ、またその大部分が細胞質に分布した。次に、NFκB デコイの薬理効果の指標として LPS 誘発性 TNFα 産生に対する抑制効果を評価したところ、カチオン性リポソーム製剤において有意な抑制が認められ、リポソーム製剤がキャリアシステムとして有効であること、ならびに NFκB デコイの作用点が細胞質であることが示唆された。また、フコースレセプターを発現する初代培養 Kupffer 細胞を用いてフコース修飾リポソーム/[³²P]標識 NFκB デコイ複合体の細胞への取り込みを評価した結果、対照の naked NFκB デコイおよびカチオン性リポソーム複合体より有意に高い細胞取り込みが示された。また、その取り込みは、過剰量のフコース、ガラクトース、マンノース修飾牛血清アルブミン存在下において有意に阻害されたことから、フコースレセプターを介した取り込みの関与が示唆された。

II. *In vivo* におけるフコース修飾カチオン性リポソーム/NFκB デコイ複合体の Kupffer 細胞選択的送達とエンドトキシン誘発性肝疾患に対する治療効果の評価

前章において、フコース修飾リポソーム/NFκB デコイ複合体が Kupffer 細胞特異的に発現するフコースレセプターを介して効率よく取り込まれることが *in vitro* において明らかとなったので、本章では *in vivo* においてフコース修飾リポソーム/NFκB デコイ複合体の静脈内投与による Kupffer 細胞選択的な送達および炎症抑制効果について検討した。静脈内投与後、フコース修飾リポソーム/[³²P]標識 NFκB デコイ複合体は、対照の naked NFκB デコイおよびカチオン性リポソーム

複合体に比べ、有意に高く肝臓へ集積した。また Kupffer 細胞への取り込みを確認するため、Kupffer 細胞に障害を与える $GdCl_3$ を前投与したところ、フコース修飾リポソーム複合体の肝臓への集積が有意に減少した。次に、フコース修飾リポソーム複合体によるエンドトキシン誘発性肝疾患に対する治療効果の可能性を探ることを目的に、LPS 肝疾患マウスを用いて血清中に産生された $TNF\alpha$ 量を指標に治療効果を評価した。LPS 誘発性肝疾患マウスに対し、フコース修飾リポソーム/NF κ B デコイ複合体を静脈内投与したところ、対照の naked NF κ B デコイ、ガラクトース修飾リポソーム複合体、マンノース修飾リポソーム複合体、カチオン性リポソーム複合体と比べ、血清中 $TNF\alpha$ 量の有意な抑制効果が認められた。また、本治療実験に用いたマウスの肝臓の核内 NF κ B 量を EMSA 法により評価したところ、有意な核内 NF κ B 量の増加抑制が認められ、フコース修飾リポソーム/NF κ B デコイ複合体による NF κ B の活性化抑制が確認された。

以上、フコース修飾カチオン性リポソームの開発により、NF κ B デコイの静脈内投与によるフコース認識を介した Kupffer 細胞選択的な送達を実現し、LPS 誘発性肝疾患マウスにおける $TNF\alpha$ の産生抑制効果を得ることに成功した。以上の結果は、NF κ B を標的とした炎症性疾患や免疫疾患に対する治療の実現に向けて有用な基礎的知見を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、オリゴヌクレオチド医薬品を用いた遺伝子治療が注目され、中でも NF κ B デコイは炎症性疾患や免疫疾患治療への応用が期待されているが、局所投与では効果があるものの、静脈内投与では酵素分解などのため標的細胞に十分量の NF κ B デコイが到達せず治療効果は得られない。したがって、治療の標的となる細胞、例えば全身性サイトカイン産生細胞である Kupffer 細胞に対する細胞選択的なデリバリーシステムの開発が強く望まれる。申請者は、NF κ B デコイに対する Kupffer 細胞選択的な送達法の開発を目的として、フコース修飾コレステロール誘導体 (Fuc-C4-Chol) を利用したフコース修飾カチオン性リポソームの製剤設計を行い、その機能を *in vitro*, *in vivo* 実験において系統的に評価した。

In vitro において、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に加えた naked FITC 標識 NF κ B デコイは、LPS 刺激の有無にかかわらず大部分が細胞質に分布し核への移行はほとんど認められなかった。カチオン性リポソーム/rhodamine 標識 NF κ B デコイ複合体の場合は、有意な取り込み量の増加と、同様の細胞質への分布がみられた。次に、NF κ B デコイの薬理効果の指標として、LPS 誘発性 $TNF\alpha$ 産生に対する抑制効果を評価した結果、カチオン性リポソーム製剤が有効であり、NF κ B デコイの作用点が細胞質であることも示唆された。さらに、フコースレセプターを持つ初代培養 Kupffer 細胞を用いてフコース修飾リポソーム/[^{32}P]標識 NF κ B デコイ複合体の細胞への取り込みを評価した結果、有意に高い細胞取り込みが示されフコースレセプターを介した取り込みが示唆された。

次に、フコース修飾リポソーム/NF κ B デコイ複合体のマウス静脈内投与による Kupffer 細胞選択的な送達および炎症抑制効果について検討した結果、フコース修飾リポソーム/[^{32}P]標識 NF κ B デコイ複合体は、対照の naked NF κ B デコイおよびカチオン性リポソーム複合体に比べ有意に高く肝臓へ集積し、他方、Kupffer 細胞に障害を与える $GdCl_3$ の前投与により有意に減少した。また、エンドトキシン誘発性肝疾患に対する治療効果の可能性を探るため、LPS 誘発性肝疾患マウスに対しフコース修飾リポソーム/NF κ B デコイ複合体を静脈内投与したところ、対照の naked NF κ B デコイやガラクトース及びマンノース修飾リポソーム複合体等と比べ、血清中 $TNF\alpha$ 量の有意な抑制効果が認められた。さらに、マウスの肝臓核内 NF κ B 量の有意な増加抑制が認められ、NF κ B の活性化抑制が確認された。

以上、フコース修飾カチオン性リポソームにより、*in vivo* における NF κ B デコイの Kupffer 細胞選択的な送達を実現し、LPS 誘発性肝疾患マウスにおける $TNF\alpha$ の産生抑制効果を得ることに成功した。本結果は、NF κ B を標的とした炎症性疾患や免疫疾患に対する治療の実現に向けて有用な基礎的知見を与えるものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月2日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。