

京都大学	博士（薬学）	氏名	平井 勇祐
論文題目	タンパク質のサイトゾル送達を可能とする脂質ナノ粒子の調製		
<p>タンパク質は、その生体における多彩な効果から、種々の疾患に対しての貴重な医薬品シーズであり、現在の医療において重要な役割を担う。しかしながら、タンパク質は親水性の高分子であり、細胞膜を透過することができない。このため、タンパク質医薬品の機能発現の場は細胞外に限局されている。タンパク質を細胞内に送達可能なDrug Delivery System (DDS) の確立は、タンパク質医薬品の適用範囲を細胞外から細胞内にまで拡大でき、新薬創出を加速すると期待される。</p> <p>細胞内分子を標的とするタンパク質だけでなく、サイトゾルに送達されなければ機能を発揮できない高分子として核酸医薬が挙げられる。近年、small interfering RNA (siRNA) 送達によるRNA干渉誘導治療薬として、トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーの治療薬であるONPATRO™、またSARS-CoV-2に対するmRNAワクチン製剤であるComirnaty™、Spikevax™が臨床応用された。これら核酸のサイトゾル送達を可能とするDDS技術は、Lipid Nanoparticle (LNP) 技術である。LNPの主要構成脂質はpH応答性脂質で、これは酸性溶液中で親水基が正に荷電するため、負電荷高分子である核酸との混合により、静電的相互作用を介してLNP内に核酸を高効率に内封できる。また、LNPは低pH環境下で細胞膜傷害活性を示す特徴から、高いエンドソーム脱出能を発揮し、核酸分子をサイトゾルにまで送達可能な優れたDDS技術である。一方では、タンパク質は必ずしも負の表面電荷を有しておらず、核酸送達のために開発されたLNP技術をそのままタンパク質の送達に適用することは難しいと考えられてきた。そこで、本研究では、LNP技術を用いてタンパク質をサイトゾルに送達することを目的とし、タンパク質の表面電荷を負に調整することで、負電荷化タンパク質を内封するLNPを調製し、そのサイトゾルへの送達能について検討した。</p> <p>第一章では、siRNAの細胞内送達を可能とするpH応答性脂質の1種であるcharge-reversible脂質を用いて、負電荷タンパク質を内封するLNPの調製を行った。モデルタンパク質として、表面電荷を負に調整した組み換え緑色蛍光タンパク質である(-30)GFPを選択し、(-30)GFPのN末端に核移行配列 (NLS) を付加したNLS-(-30)GFPを作製した。NLS-(-30)GFPとcharge-reversible脂質を含む脂質を適切な混合比で混ぜ合わせることで、粒子径200 nm以下の多重膜構造を有するLNPの調製に成功した。調製したLNPを細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡によるNLS-(-30)GFPの核内局在を観察することでサイトゾルへのタンパク質送達能を評価した。その結果、NLS-(-30)GFPと脂質との混合比を調整することにより、NLS-(-30)GFPをサイトゾルにまで送達できることが明らかとなった。つまり、核酸医薬のDDS製剤として頻用されるLNP技術は、負電荷</p>			

タンパク質の細胞内送達にも応用できる可能性が示された。

第二章では、細胞内分子を標的とする抗体を内封化した脂質ナノ粒子の調製を行った。抗体（IgG）は、分子標的薬として有用であり、細胞外標的分子の活性を阻害する重要なタンパク質医薬である。つまり、IgGを細胞内に導入可能なLNP技術の確立は市場価値が非常に高い。しかし、IgGの等電点は塩基性側であるため、LNP調製を行う際の酸性溶液中で負に帯電しておらず、内封化が困難であると予想された。そこで、IgGと負電荷添加剤を酸性溶液中で混合することで、IgGの表面電荷を負に調整し、これを脂質パッケージングすることで、IgGを内封するLNPが調製できると考えた。抗体のサイトゾル送達を向上させるため、pH応答性脂質としては、還元環境依存的に自己分解するSS-cleavable and pH-responsible lipid COATSOME SS-OP（SS-OP）を選択した。SS-OPを用いた抗体内封脂質ナノ粒子を細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡による抗体分子の局在を観察した結果、サイトゾルにまで抗体が送達されていることが確認された。さらに、抗GFP抗体または抗核膜孔複合体抗体をLNPにより細胞内導入したところ、抗体がサイトゾル内で標的分子を認識していることが確認された。つまり、本手法によるLNP技術は、機能を保持した抗体をサイトゾルにまで送達できることが明らかとなった。

以上のことから、RNA医薬に代表されるLNP技術は、表面電荷の調節を行うことによってタンパク質のサイトゾル送達技術としても応用可能であり、今後の医薬ニーズを解消するタンパク質のサイトゾル送達DDS技術の一つとしての展開性が示唆された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

種々の疾患の治療に対して、抗体をはじめとするタンパク質の適用が期待されるが、親水性の高分子であるタンパク質は細胞膜を透過しない。タンパク質を細胞内に送達可能なDrug Delivery System (DDS) の確立は、タンパク質医薬品の適用可能性をより拡張すると期待される。核酸の細胞内送達手段として種々のLipid Nanoparticle (LNP) 技術が開発されてきているが、タンパク質は必ずしも負の表面電荷を有しておらず、核酸送達のために開発されたLNP技術をそのままタンパク質の送達に適用することは難しい。本研究では、本研究では、LNP技術を用いてタンパク質をサイトゾルに送達することを目的とし、タンパク質の表面電荷を負に調整することを通してタンパク質を内包するLNPを調製し、そのサイトゾルへの送達能について検討した。第一章では、siRNAの細胞内送達を可能とするpH応答性脂質であるcharge-reversible脂質を用いて負電荷タンパク質を内包するLNPの調製を行い、モデルタンパク質(-30)GFPを効果的にサイトゾルに送達出来ることを示した。第二章ではpH応答性脂質としてSS-OPを選択し、細胞内分子を標的とする抗体(IgG)を負電荷添加剤とを酸性溶液中で混合することで、IgGの分子認識能を保持しつつこれを内包するLNPが調製できることを確認した。以上の結果により、表面電荷の調節を行うことによって、タンパク質のサイトゾル送達にLNP技術を適用可能であることが示された。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年2月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 令和5年6月23日以降