薬 剤 学, **67** (2), 106–108 (2007)

≪若手研究者紹介≫

NFκB デコイのマクロファージ選択的送達に基づく新規抗炎症治療法の開発

樋 口 ゆ り 子 Yuriko Higuchi
京都大学大学院薬学研究科

1. は じ め に

NFκB デコイは，転写調節因子 NFκB の活性化を抑制することにより，炎症性サイトカインや接着因子などの発現を同時に抑制することが可能であり，ウイルス性肝炎や外科手術時の虚血再灌流障害などの炎症性疾患や，移植時の移植片拒絶や悪性リウマチなどの免疫疾患，がん転移抑制への治療応用が期待されている．ところが，現在，二本鎖のオリゴヌクレオチドである NFκB デコイは，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や速やかな排泄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，免疫担当細胞であるマクロファージや 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．また，臨床応用を考えた時には，特別な医療技術を要せず，患者への負担も比較的少ない静脈内投与による治療法の開発が必要であると考えられる．これまで当研究室では，厳密な基質認識性を有する糖認識レセプターが細胞特異的に発現することから，糖修飾により静脈内投与後の体内動態を制御できることを明らかにしてきた．本稿では，糖修飾を利用し，マクロファージを標的とした細胞選択的な核酸医薬品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法の開発に関する研究について紹介する．

筆者紹介：2000 年 3 月京都大学薬学部薬学科（薬品動態制御学分野）卒業，2002 年 3 月同大学院薬学研究科博士前期課程修了，2005 年 3 月同大学院薬学研究科博士後期課程修了，2005 年 3 月博士（薬学）を取得．2005 年 4 月より同大学院薬品動態制御学分野，博士研究員，現在に至る．2006 年日本薬剤学会 Postdoctoral Presentation Award 受賞．研究のモットー：臨床応用を念頭におきつつ，広く何事にも好奇心を持つ．趣味：ミュージカル観劇，音楽鑑賞，日本舞踊．

2. マンノース修飾カチオン性リポソーム（Man リポソーム）/ NFκB デコイ複合体の物理化学的性質

マウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 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[1]．そこで，マクロファージに高密度に発現することが知られているマンノースレセプターによる認識取り込みを利用した NFκB デコイ送達キャリアの開発を目的にマンノース修飾カチオン性リポソームを調製した．まず，マンノースレセプターにより認識されるリガンドとしてのマンノース，NFκB デコイ上の負電荷と静電的相互により複合体を形成するための正電荷およびリポソームの脂質二重膜に安定に組み込まれるための

アンカーとしてのコレステロールを一分子上に有する機能性脂質 cholesten-5-yloxy-N-(4-[(1-imino-2-Dthiomannosyl-ethyl)-amino] butyl} formamide (Man-C4-chol) を合成した[2]．NFκB デコイの作用点である細胞質への移行促進を目的に pH 感受性脂質 Dioleoylphosphatidylethanolamine（DOPE）と組み合わせた（Man-C4-chol：DOPE = 3：2）．Man リポソームの平均粒子径は 64.6 ± 1.70 nm，表面電荷の指標としてのゼータ電位は 61.4 ± 0.91 mV であった．NFκB デコイと電荷比 1.0：2.3（−：+）で複合体を形成させると，平均粒子径およびゼータ電位はそれぞれ 61.6 ± 1.58 nm および 54.7 ± 0.60 mV であった[2]．また，マンノースレセプターを発現する初代培養腹腔内マクロファージを用いて Man リポソーム/FITC 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 デコイより有意に高い細胞取り込みが認められた．その取り込みは，過剰量の mannan により有意に阻害され，マンノースレセプターを介した取り込みが示唆された．

3. Man リポソーム /NFκB デコイ複合体の静脈内投与後の体内動態

当研究室では，遺伝子の *in vivo* でのデリバリーにおいては，血中成分，とりわけ赤血球，との相互作用が体内動態を左右する重要な要素であることを明らかにしてきた[3]．特にカチオン性リポソームと pDNA の複合体は赤血球と強い凝集をおこし，肺の毛細血管を塞栓することにより静脈内投与後の肺への高い集積および高い遺伝子発現を引き起こすと考えられている．そこで，マウスより採取した赤血球と Man リポソーム/NFκB デコイ複合体を顕微鏡で観察したところ凝集はほとんど認められなかった．次に，静脈内投与後の各臓器への集積を評価したところ，naked［^{32}P］標識 NFκB デコイは血中より速やかに消失し尿中への排泄および腎臓への集積が認められたのに対し，Man リポソーム/［^{32}P］標識 NFκB デコイ複合体は，投与後 5 分で肝臓へ約 80（% of dose/g tissue or ml）の取り込みが認められた[2]．一方，非修飾カチオン性リポソーム/［^{32}P］標識 NFκB デコイ複合体は，肺への高い集積の後，徐々に肝臓への移行が認められたが，移行量は 60（% of dose/g tissue or ml）に及ばなかった[2]．また肝臓内における分布を評価することを目的に，Man リポソーム/［^{32}P］標識 NFκB デコイ複合体を静脈内投与後の肝臓を各細胞画分に分離したところ，免疫担当細胞画分である非実質細胞への高い集積が認められた[2]．

4. Man リポソーム /NFκB デコイ複合体による肝炎治療

エンドトキシン誘発性肝疾患においては，マクロファージや Kupffer 細胞などの免疫担当細胞による炎症性サイトカイン産生が肝障害を引き起こす重要な役割を果たしている．そこで LPS 投与により作成したエンドトキシン誘発性肝疾患モデルマウスに対する Man リポソーム/NFκB デコイ複合体による炎症抑制効果について検討した．LPS 誘発性肝障害マウスに対し，Man リポソーム/NFκB デコイ複合体を静脈内投与したところ，対照の naked NFκB 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，血清中のサイトカイン（TNFα, IFNγ, IL1 β）の有意な抑制効果が認められた[2]．また，Man リポソームと NFκB 結合配列を含まない random デコイとの複合体を静脈内投与しても炎症性サイトカインの産生抑制効果は得られなかったことより，サイトカイン産生抑制効果がデコイの配列に依存することが確認された[2]．さらに，肝障害の指標として血清中の aspartate aminotransferase（AST），alanine aminotransferase（ALT）量を測定したところ，Man リポソーム/NFκB デコイ複合体の投与により，naked NFκB デコイに比べ有意な減少が認められた[2]．さらに，これらの炎症抑制効果のメカニズムを明らかにするために，肝臓細胞の核内の活性化 NFκB 量を測定したところ，LPS 誘発性肝障害マウスにおいて，マンノース修飾リポソーム複合体投与により有意な活性化 NFκB 量の減少が認められた[2]．従って，Man リポソーム複合体による肝障害抑制効果が NFκB デコイによる NFκB の活性化抑制に基づくものであることが確認された．以上，Man リポソームの開発により，NFκB デコイの静脈内投与によるマンノース認識を介したマクロファージ選択的な送達を実現し，LPS 誘発性肝疾患マウスにおける炎症性サイトカインの産生抑制および肝障害抑制効果を得ることに成功した．

5. 他の標的細胞への応用

Kupffer細胞に特異的に発現するフコースレセプターによるフコースの選択的な認識取り込みを利用し，よりKupffer細胞選択的な送達を目的に，新たにフコース修飾カチオン性リポソーム（Fucリポソーム）を調製した[4]．Fucリポソーム/NFκBデコイ複合体の静脈内投与により，NFκBデコイの速やかで高い肝臓への集積が認められ，Manリポソームを用いた場合に比べより高く肝非実質細胞へ取り込まれていることが確認された[4]．また，ガドリニウムクロライドの前投与によりKupffer細胞の取り込みを抑制したところ，ガドリニウム非投与群に比べ有意な肝臓への集積抑制が認められた[4]．これにより，Fucリポソーム/NFκBデコイ複合体の取り込みおけるKupffer細胞の関与が確認された．さらに，LPS誘発性肝疾患マウスに対して，Fucリポソーム/NFκBデコイ複合体の静脈内投与により，血清中の炎症性サイトカイン濃度およびALT·AST濃度の減少が認められた．肝臓細胞核内の活性化NFκB量の減少も認められた[4]．また，我々はリポソームのみならず，エマルション製剤にマンノースおよびフコース修飾を施すことにより，各標的細胞へターゲティングが可能であることも明らかにしており[5]，デコイとは異なる物性を有する薬物に関しても細胞選択的送達が可能であると考えている．

肝実質細胞には，ガラクトースを選択的に認識するアシアロ糖タンパク質レセプターが高発現していることが知られており，これまでにガラクトース修飾により高分子やプラスミドDNAの実質細胞への選択的送達が可能であることを報告してきた．近年，siRNAとガラクトース修飾カチオン性リポソーム（Galリポソーム）の複合体の静脈内投与により肝実質細胞に特異的に発現するタンパク質の発現抑制効果が得られることも明らかにした[6]．

以上より，リガンド修飾を標的細胞に合わせて変えることにより，静脈内投与により核酸医薬品の体内動態を制御し細胞選択的な送達を実現することができると考えられる．

6. おわりに

本稿では，糖修飾カチオン性リポソームを用いた，静脈内投与によるNFκBデコイの細胞選択的送達に基づく肝障害治療への応用を中心に紹介させていただいた．以上の結果は，NFκBを標的とした種々の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，我々は他の炎症・疾患についての適用に関して，現在検討を進めている．また，本研究において開発した糖修飾カチオン性リポソームは，NFκBデコイのみならず，他の核酸医薬品へも応用可能であり，核酸医薬品を用いた静脈内投与による治療法開発へ大いに貢献するものと考えられる．

本研究に際して終始ご懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました京都大学・橋田　充教授に衷心より深甚なる謝意を表します．また，終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都大学・山下富義助教授，京都大学・川上　茂助手に謹んで深く感謝の意を表します．

引用文献

1) Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, Intracellular distribution of NFκB decoy and its inhibitory effect on TNFα production by LPS stimulated RAW 264. 7 cells, *J. Control. Release*, **107**, 373–382 (2005).
2) Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Oka, Y. Yabe, F. Yamashita, M. Hashida, Intravenous administration of mannosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes effectively prevent LPS-induced cytokine production in a murine liver failure model, *FEBS Lett.*, **580**, 3706–3714 (2006).
3) S. Fumoto, S. Kawakami, K. Shigeta, Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida, Interaction with blood components plays a crucial role in asialoglycoprotein receptor-mediated *in vivo* gene transfer by galactosylated lipoplex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 484–493 (2005).
4) Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, The potential role of fucosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease, *Biomaterials*, **28**, 532–539 (2007).
5) W. Yeeprae, S. Kawakami, Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida, Biodistribution characteristics of mannosylated and fucosylated O/W emulsions in mice, *J. Drug Target.*, **13**, 479–487 (2005).
6) A. Sato, M. Takagi, A. Shimamoto, S. Kawakami, M. Hashida, Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice, *Biomaterials*, **28**, 1434–1442 (2007).