

《若手研究者紹介》



超高感度の温熱感受性リポソーム製剤の開発と ナノセラノスティクスへの応用

田 上 辰 秋* Tatsuaki Tagami
名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野

1. はじめに

筆者は、研究室に配属されてから博士号を取得後、カナダでのポストドクを経て現在に至るまでリポソームに関連した研究に携わってきた。リポソームは薬物を運ぶためのナノキャリアであり、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の研究対象として長く研究されてきた。リポソームは様々な化合物を表面修飾することができ、また効率的に薬物を封入できるため、リポソームの作成法が考案されて約半世紀が経った今もなお優れたナノキャリアとして研究され続けている。現在もなおリポソーム研究は発展し続けており、将来リポソームはナノメディシンの要として医療機器と併用することで近未来の個別化治療に応用されていくものと期待されている。今回このような寄稿の機会を頂くことができたため、これまで筆者の行ってきたリポソームに関する応用研究について紹介させて頂きたい。

2. カチオニックリポソームを用いた siRNA デリバリーに関する基礎研究 (博士前期課程までの研究内容)

筆者は、徳島大学薬学部薬剤学教室 (現: 薬物動態制御学分野) に際田弘志教授, 石田竜弘准教授指

導のもと、学部3年生から博士後期課程修了まで2003年から2009年までの6年間在籍した。際田研究室ではリポソームを用いたDDSの基礎・応用の研究を全般的に行っており、当時の筆者は文字通り「リポソーム漬」の毎日を送っていたように思う。筆者が配属された当時の研究室のイメージは、みんなで毎日夜遅くまで残って実験をするといった、よい意味で昭和の雰囲気はまだ漂っていた研究室であったと思う。リポソームに関連することであれば、(ある程度は) 自主的に実験をしてもよいという自由な研究風土であった。筆者は、先生方より提示されたいくつかの研究テーマの中から遺伝子デリバリーに対し非常に興味を抱いたため、筆者のリポソーム研究はカチオニックリポソームを用いた核酸デリバリーからスタートした。

筆者は当時から流行していたRNAiに興味を持ち、標的の遺伝子のみを選択的かつ強力にノックダウンすることのできる機能性核酸のsiRNAを将来の核酸医薬品・分子標的薬に見立て、トランスフェクション (siRNAを細胞内導入すること) 効率の高いカチオニックリポソームをスクリーニングしたり、トランスフェクションが細胞内全体の遺伝子発現量にどのような影響を与えるのかについてマイクロアレイを用いて解析したりした¹⁾。この時期の筆者は、与えられた研究テーマからよく脱線して別の実験をしたため、なかなか研究成果がまとまらず、先生方よりお叱りを受け、反省すべきことも多い時期であったが、筆者の中では興味のあることに対し、純粹に一番手を動かして実験をした時期であり、研究者として助走の時期であった。

*2005年徳島大学薬学部薬学科卒業。2009年同大学院にて博士号取得(薬学)。オンタリオ癌研究所(トロント, カナダ)で博士研究員を経て2011年名古屋市立大学薬学部特任講師に着任。好きな言葉: 中庸。趣味: ドライブ, 温泉探訪。連絡先: 〒456-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3-1
E-mail: tagami@phar.nagoya-cu.ac.jp

3. ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームをベースとした siRNA デリバリーにおいて生じる免疫応答が 次回投与の体内動態に与える影響 (博士後期課程の研究内容)

博士後期課程に入ると、筆者は研究者として最も重要なことの一つである論文の書き方のプロセスの大部分を学んだ。すなわち、DDS 分野においてインパクトのあるテーマを考えて研究計画を立てて実験を行い、研究成果をまとめて論文化する手順を学んだ。まさに「言うは易く、行は難し」で、実際はテーマを自分で決定するところから非常に時間がかかってしまった。

当時、研究室では ABC 現象 (PEG 修飾リポソームを投与した場合、次回投与した PEG 修飾リポソームの血中滞留性が著しく低下してしまう現象) をメインテーマとして取り扱っていた。ABC 現象は、初回投与された PEG 修飾リポソームに対して PEG に対する抗体 (anti-PEG IgM) が分泌されるため、次回投与された PEG 修飾リポソームの PEG 鎖に anti-PEG IgM が特異的に結合し、体内動態を悪くする現象であることまで突き止めていた。そういった研究の流れもあり、筆者は「機能性核酸である siRNA をリポソームに封入して投与した場合、非タンパク抗原である PEG に対する抗体産生や体内動態にどのように影響を与えるのか」について検討を始めた。

筆者は免疫学の教科書を開き、抗体産生細胞である B 細胞に関する知識を学んだり、非タンパク抗原に関して報告されている文献を集めたりすることから始めた。それと同時にマウスの脾臓から免疫担当細胞を単離してフローサイトメトリーで解析したり、抗体やサイトカイン分泌量を ELISA で定量したりするという実験を繰り返し行った。免疫の分野は非常に奥が深く、教科書や文献から得た知識を自分の研究に当てはめるまでに時間がかかったが、これらの研究内容は非常に新鮮であり魅力的だったので、毎日前向きにこつこつ研究を行った。

検討の結果、anti-PEG IgM 抗体の分泌量は、特殊な配列モチーフを持つ siRNA を封入した場合に特に増大することが分かった。これらの anti-PEG IgM 分泌量の増大は先に述べた ABC 現象を強力に誘導

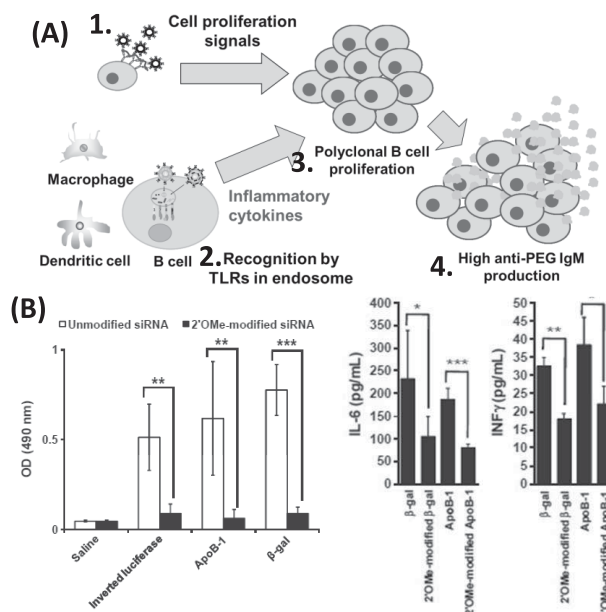


図 1 (A) siRNA を含む PEG 修飾ナノキャリアを投与した場合に産生される PEG に対する抗体の増幅メカニズム. 1. ナノキャリア表面に修飾された PEG が脾臓 B 細胞によって認識され、PEG に対する抗体 (anti-PEG IgM) が産生されるが、2. 各種免疫担当細胞内にもナノキャリアは取り込まれ、siRNA は TLR に認識されるため、各種免疫応答が生じる. 3. その刺激は B 細胞のポリクローナルな細胞増殖を促し、最終的に anti-PEG IgM の分泌増大を導く (仮説). (B) 化学修飾 siRNA による anti-PEG IgM 分泌量抑制効果および炎症性サイトカインの分泌抑制効果 (ELISA). siRNA のリボース骨格を 2'-O メチル化することで TLR と siRNA との親和性をなくすことのできるため、免疫応答の大幅な軽減につながった。

する可能性があり、体内動態に深く影響する可能性が示唆された。その後、文献調査によりこの核酸による抗体分泌増強作用 (免疫アジュバント効果) は、自然免疫を制御するツール様受容体 (TLR) のシグナル伝達経路を刺激するため引き起こされるものであり、図 1A に示すように非タンパク抗原である PEG においても同様にあてはまるかもしれないという仮説を立てた。本当に TLR 経路を介しているかどうかを検討するために、TLR 経路を大幅に遮断することのできる化学修飾 siRNA (核酸のリボース骨格の 2' 水酸基をメチルで化学修飾した siRNA) を設計して投与を行った。その結果、anti-PEG IgM の分泌は筆者が実験で用いたどの配列のものにおいてもすべて大幅に抑制されることが分かった (図 1B)。さらに TLR 経路の遮断は炎症性サイトカインの分泌を抑制した。これらの結果は、筆者の後輩が TLR 経

路ノックアウトマウスを用いて追実験をすることでさらに裏付けられた。これらの実験で得られた知見は、効率的な siRNA のデリバリーシステムの設計に有用な情報になると筆者は考えている。これらのデータを論文化し、投稿してアクセプトされるまでに時間がかかったが先生方のおかげでなんとか論文を発表することができた²⁾。

4. 海外でポスドクになった経緯

筆者は海外でポスドクをすることを希望していたため、博士後期課程3年目に入ってから関連の分野や自分の行きたい分野の研究室を PubMed で探し、自分のカバーレターと履歴書と論文をそれぞれ封筒に入れひたすら送った。100 通送ることを目標とし、約 50 通をまずエアメールで送り、残りの 50 通はさすがに疲れたので E メールで送って返事を待った。10 件ほどレスポンスがあり、最終的に 1 件だけインタビューにこぎつけ、電話でインタビューをしたものの、1 週間後にノーと返事を頂いた。

そういったわけで数カ月たっても成果が出ず、夏休みに入り途方にくれてどうしようかとしょげていた。そのとき、石田先生から、知り合いの権威の先生の所でポスドクをしていた方がカナダのトロントで独立し、新しくラボを開くことになり、ちょうどポスドクを探していることを教えて頂いた。そこで応募してみたらどうかということで、試しに応募したところインタビューをして頂き、その後、諸先生方の推薦状も頂き、晴れて博士研究員として雇って頂くことになった。

あとで雇った理由を聞くと、以前に参加した国際学会で彼のポスターに関していくつか筆者が質問をしていたことをどうやら覚えていてくれていたらしく、またリポソームの基本的技術を習得しているといった理由で、「とりあえず」オープニングスタッフとして雇って頂けたようである。

海外でポスドクとして働くことが奇跡的に決定してからは、秋からすぐラボで働くことになり、そのための様々な準備に追われた。博士課程を修了させるために博士論文を必死で作成し、博士論文発表のための準備や就労ビザの申請手続きや民間の研究振興財団の申請を行った。周りの人には渡航の準備を手伝ってもらった。この時期に関する約 1 カ月間の記憶はあまりない。全ての用事を済ませ、渡航の準備をし、就労ビザが取れ、そして研究室の人たちに送り出してもらって、筆者はトロント行きの飛行機に乗り込んだ。トロント到着前のアナウンスを聞き、飛行機の窓から見えるトロント市内の夜景を見て(さながら電子回路のようである)、そして異国に来たのだと認識したとき、これから始まる海外での生活に対し、急に不安になったことを覚えている。

5. 超高感度の温熱感受性リポソーム製剤の開発と ナノセラノスティクスへの応用 (博士研究員の研究内容)

カナダ、オンタリオ州の州都であるトロント市は、通称モザイク都市と呼ばれ、100 カ国以上の人々が同時に暮らす人種のるつぼであり、北米地域で最も経済成長が盛んな都市の一つに挙げられている。

(A)



(B)



図 2 (A) OICR 正面玄関。経済特区である MaRS スクエア内に OICR はある。(B) MaRS スクエア内部。外観と違い近代的である。OICR 以外にも他の製薬企業や研究所がある。

Ontario Institute for Cancer Research (OICR, オンタリオ癌研究所, 図2)は, そのトロント市に拠点を構えており, OICRの周辺にはトロント大学や大病院群, そして国会議事堂などの行政の拠点が隣接しており, まさにトロント市街の中心地に位置していた。

筆者は, Principal Investigator (PI)である Shyh-Dar Li 博士の指導のもと, 現地のポスドクとともにラボのオープニングスタッフとして働くことになった。Li 博士は, siRNA デリバリーの分野を切り開いた第一人者であり, リポソームを構成成分とした siRNA ナノキャリアである, siRNA 封入脂質ナノ粒子 (LPD) の開発を行い, 固形癌や転移癌に対する全身性投与のターゲティングを成功させたことで知られている。OICR に移動してからは, リポソーム以外にも他のポリマーベースの薬物ナノキャリアの開発も行っている。

筆者は学生時代に引き続き, リポソームを用いた DDS の研究を継続して行うことになった。筆者に与えられたテーマは, 現在最も開発が進んでいる温熱感受性リポソーム製剤である ThermoDOX[®] (Celsion, 日本ではヤクルトが販売権, Phase III) よりも優れたリポソーム製剤を開発するというものであった。具体的なシーズは彼が探してくるので, それを実践して検証するといういわゆる当たり実験を最

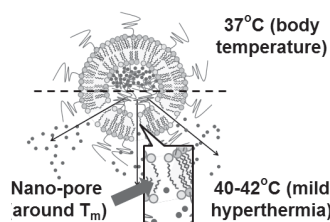
初に何度も繰り返した。その中から, PEG 系界面活性剤 (Brij や Myrj など) をリポソーム組成中にたった数モル % 含有させるだけで温熱感受性が高くなり, 薬物を放出するというを発見した³⁾。そこで市販されていてすぐ手に入る PEG 系界面活性剤を順にスクリーニングし, それらの中から, 体温中 (37~38°C) では応答せず, 40~42°C 付近になると著しく薬物放出をすることのできる超高感度のリポソーム製剤 (HaT: Hyperthermia-activated-cyto-toxic) を開発した (図3)。検討の結果 HaT は ThermoDOX よりも薬物放出速度 (温熱感受性), 腫瘍組織への薬物送達量, 抗腫瘍効果のいずれにおいても優れており, 当初の目標は達成できた⁴⁾。

次の段階として, 筆者は HaT リポソームをナノセラノスティクスに応用する研究を行った。ナノセラノスティクス (Nano-Thera-Nostics) とはナノメディシン (Nanomedicine) と治療 (Therapy) と診断 (Diagnostics) を統合した治療様式を指す造語である。具体的に筆者の場合は, ①医療機器 (超音波) を用いて腫瘍患部を加熱し, ②ナノキャリアである HaT リポソームから腫瘍へ放出される薬物を医療診断機器 (MRI) でモニターし, ③その薬物の分布・送達量を定量解析することで, 実際の治療効果を予測するシステムの研究を行った (図4)。OICR は周辺の大病院群やトロント大学のネットワークを利用

(A) Most advanced formulation:

ThermoDOX (Phase III, Celsion (Yakult))

• Composition: DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀=86/10/4 (molar ratio)



(B) Our formulation:

HaT (Hyperthermia-activated CytoToxic)

• Composition: DPPC/Brij78=96/4 (molar ratio)

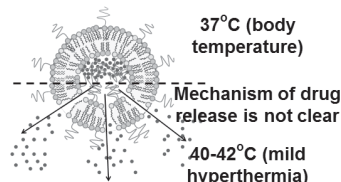
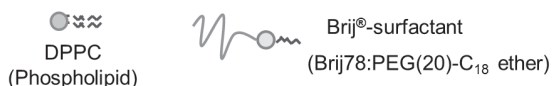


図3 (A) 現在最も開発が進んでいる温熱感受性リポソーム製剤 (ThermoDOX) と (B) 筆者らのグループが開発した新規温熱感受性リポソーム製剤 (HaT)。ThermoDOX は DPPC, MSPC, PEG-lipid の3種類からなるが, 我々の開発した HaT リポソームは, よりシンプルな2種類の構成成分からなる。PEG系界面活性剤である Brij シリーズの価格は脂質の数千分の1であるため, HaTの方が安価である。検討の結果, HaTの方が温熱感受性, 腫瘍への薬物送達量, 抗腫瘍効果の点で優れていることが分かった。

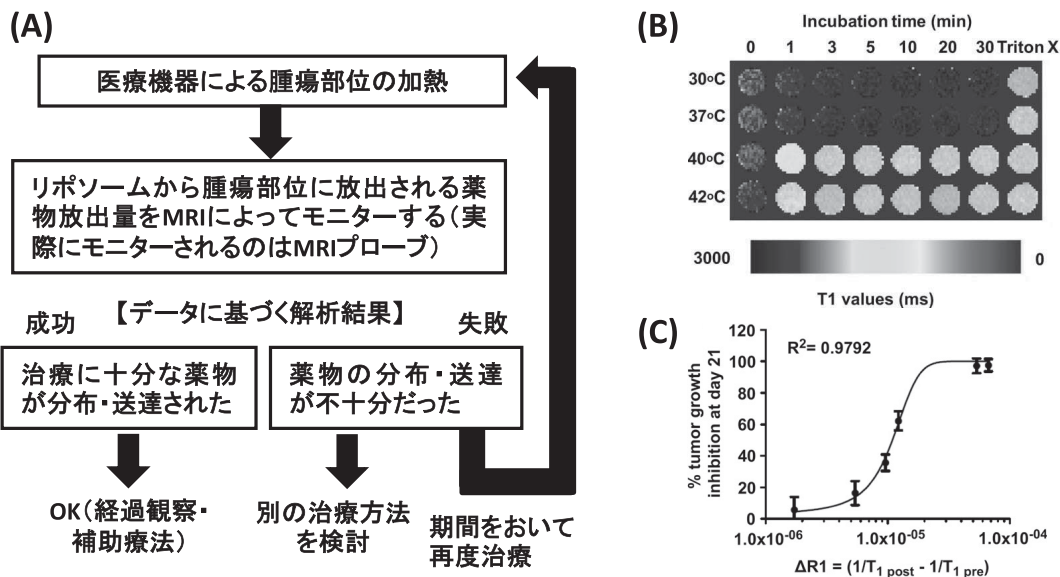


図4 (A) 温熱感受性リポソームと医療機器によるナノセラノスティックスの模式図. 治療に必要な薬物量・分布に関するデータ(症例数)があると, 腫瘍組織へ送達された薬物量・分布を評価するだけで, ある程度の治療効果を予測することができ, 次の対策(投与計画)を考案することができるため有効である. (B) 各温度における HaT リポソームから放出される MRI プローブの定量 (T_1 マップ). (C) 治療効果(縦軸)と腫瘍組織への MRI プローブ送達量(横軸)との相関曲線.

できたため, MRI, CT や PET などの医療機器や多光子共焦点顕微鏡などの先端機器を用いて十分な研究環境で研究することができた. 筆者は開発した HaT リポソーム内に MRI プローブと治療薬物(ドキシソルビシン, DOX) の放出挙動をそれぞれ定量評価した. MRI プローブと DOX の放出挙動は *in vitro*, *in vivo* ともに類似しており, これらの高い相関性を利用して, 次に腫瘍内に送達された薬物量とその治療効果がよく相関している実験系を構築した⁵⁾.

腫瘍の構造は複雑かつ不均一であるため, 薬物の腫瘍内分布も均一ではない. それゆえ治療効果も個人差が非常に大きいため, 患者ごとに合わせた治療が必要になってくる. HaT リポソームをナノセラノスティックスに応用した一連の研究成果は, 近未来の癌の個別化治療に応用される際, 有用な情報になるのではないかと筆者は考えている.

6. 海外でポスドクをすることの意義

海外で働くということは筆者にとって, 研究者としても一人の人間としてもまさにターニングポイントであり, 精神的にかなり鍛えられ, 経験値を積むことができたと思う. 研究成果を出すだけであれば日本でした方がよかったのではないかと, また DDS

分野では欧米と同じ, もしくは日本の方がずっと進んでいる技術もあるので, そこまでして海外に行く必要はあるのかと思った時期もあったが, 結果的にプラスになったと考えている.

筆者にとって海外に行ってよかったと思ったことを主に2点挙げると, まず①色々な人と出会う機会に恵まれたことを挙げたい. 特にボスである Li 博士は, 筆者がカナダに来た時点でまだ30代前半であり, 非常に若い PI であった. そのため筆者は, 彼を通して研究に対する考え方, 英語論文に関してブラッシュアップすることができただけでなく, どのように周囲と連携して研究計画を進めていくのか, そしてどのように研究室を大きくしていくのか, ということを間近に学ぶことができた. ポスドクから独立するためにどうしたらいいのか, 常に考えるよう彼から指導された.

次に②海外を通じて日本のことを知ることができたことを挙げたい. 1年以上海外で暮らすことによって筆者が実際に知り得たことは, カナダの風景の美しさや多民族性だけではなく, 海外の人が日本人に対してどのように思っているのか, 日本が今どのような立場にいるのかということだった. トロントはアメリカ大陸の東側に位置しているために日本人の人口が比較的少なく, 日本から移民してきた人の

(A)



(B)



図5 (A)筆者がよく行った Tim Hortons. カナダで最大のコーヒーショップ. (B)Jタウン(日本人街)はトロントの郊外にあり, 中心部から, 地下鉄とバスで乗りついで1時間以上かかる. 自動車メーカーであるトヨタに隣接している.

苦勞を窺い知ることができた(図5). 人の親切やありがたみをカナダに行くことによって感じる事ができた.

研究成果の発表に関しては, 特許申請手続きが完了するまで論文が投稿できなかったため, 悶々とした日々が続いたが, 筆者がカナダに渡って約1年後に米国特許商標庁に申請の手続きが終了し, ようやく研究成果を形にすることができた. その後研究内容を順番に学術雑誌に投稿し, 論文発表することができた³⁻⁵⁾. そのようなときに縁あって, 現在の就職先を紹介して頂いた.

7. おわりに

筆者は, 現在の職場である名古屋市立大学薬学部の特任講師として着任し, 尾関哲也教授の指導のもと, 様々なナノキャリアや粉体を取り扱うこととなった. リポソームのみをこれまで常に取り扱ってきた筆者にとって, 粉体の結晶性を評価したり, 製剤試験法を行ったりすることは, 類似の分野とはいえ, ほとんど取り扱ったことのない内容で戸惑うこともあったが, 最近になってようやく慣れてきたと思う. また, 製薬企業の人と接する機会が非常に増え, アカデミック側として粉体をサイエンスすることの重要性を実感するようになった. またポストドクとは違い教育の割合が多くを占めるため, 大学の教

員として大学・学生にどのように貢献していくかということも問われるようになり, 研究と教育のバランスを保ちつつ, 自分の研究に対し日々努力精進していかなければならないと考えている.

引用文献

- 1) T. Tagami, K. Hirose, J.M. Barichello, T. Ishida, H. Kiwada, Global gene expression profiling in cultured cells is strongly influenced by treatment with siRNA-cationic liposome complexes, *Pharm. Res.*, **25** (11), 2457–2504 (2008).
- 2) T. Tagami, Y. Uehara, N. Moriyoshi, T. Ishida, H. Kiwada, Anti-PEG IgM production by siRNA encapsulated in a PEGylated lipid nanocarrier is dependent on the sequence of the siRNA, *J. Control. Release*, **151** (2), 149–154 (2011).
- 3) T. Tagami, M.J. Ernsting, S.D. Li, Optimization of a novel and improved thermosensitive liposome formulated with DPPC and Brij surfactant using a robust in vitro system, *J. Control. Release*, **154** (3), 290–297 (2011).
- 4) T. Tagami, M.J. Ernsting, S.D. Li, Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin, *J. Control. Release*, **152** (2), 303–309 (2011).
- 5) T. Tagami, W.D. Foltz, M.J. Ernsting, C.M. Lee, I.F. Tannock, J. May, S.D. Li, MRI monitoring of intratumoral drug delivery and prediction of the therapeutic effect with a multifunctional thermosensitive liposome, *Biomaterials*, **32** (27), 6570–6578 (2011).