

## 《若手研究者紹介》



## ドラッグデリバリーシステムを利用した新規がん治療技術の開発

安 藤 英 紀\* Hidenori Ando

徳島大学大学院医歯薬学研究部

## 1. はじめに

私は薬剤学領域の中でも、薬物を標的部位へと送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術を応用した新規がん治療技術の開発研究を行っている。執筆時点において、本領域に足を踏み入れて4年足らずの研究者としてまだまだ未熟者の私であるが、伝統ある薬剤学会誌に執筆する機会を得たので、本稿では「研究者」を志すことになった経緯と、これまで遂行した DDS 研究について紹介させて頂きたい。

## 2. DDS との出会い

私が薬学の道に進むことを志した動機は、高校生のときに漠然とあった「がんを治す特效薬を開発したい」という思いからであった。その背景として、母方の祖父母をがんで亡くしたことが大きく、看病をしていた母親の気苦労と葬儀での泣き崩れる姿が自分の頭の中に強烈に焼き付いており、そんな苦しみ・悲しみを少しでも和らげてあげたいという思いから、薬学研究の道を目指した。静岡出身であるため、実家から通える静岡県立大学・薬学部に入學し

たが、修士修了までは何となく学生生活を過ごしていた。部活に入り、空き時間にはバイトをし、テストは一夜漬けで乗り切るといふ、いわゆる「学生」であった。そんな中、自分が「研究者」としての道を歩み始めたのは修士課程2年で就職活動をしているときであった。運良く薬学4年制最後の年に入学した私は、学部4年を終えてから薬剤師免許を取得し、周りが修士課程に進学するのと同じように修士課程に進学した。当時は研究内容にこだわらず研究室を選択したため、研究室生活の中でどこか研究に対する物足りなさを感じていた。そんなモヤモヤした気持ちのまま就職活動をしていたため、当然のことながら就職活動は難航した。そんな中、既に博士課程に進学することを決めていた同期に触発されたこともあり、自分の満足するまで研究をしようといふ一念発起して博士課程への進学を決意した。そこでお世話になったのが、DDS 研究を基盤とした様々な疾患治療戦略の構築を行っている奥直人教授の医薬生命化学教室である。

ある日、博士課程からの転属を奥先生にお願いするため、緊張しながら教授室に入り博士課程としての受入れをお願いした。どんなことを言われるのだろうと不安であったが、奥先生が最初におっしゃった一言が「うん、いいよ。」であった。奥先生に対して多少怖いイメージ (完全に偏見であるが) を持っていた自分にはあっけにとられたが、そんな気さくで人徳のある奥先生の下で研究をしたいという思いはよりいっそう強くなり、この研究室で精一杯研究に励もうと決意した。これが私の「研究者」人生の最初の転機となったことは言うまでもない。

\*2011年静岡県立大学・生物薬品化学教室・修士課程を修了後、同大学・医薬生命化学教室・博士課程に進学。2013年 The 5th Asian Arden Conference にて Poster Awards を受賞。同年博士課程を修了、その際に静岡県立大学学長賞 (成績優秀者賞) を受賞。同年 徳島大学大学院 HBS 研究部・がんと代謝学分野 (現大学院医歯薬学研究部・がん細胞と代謝学分野)・特任助教に着任 (薬物動態制御学分野・助教兼任)。2014年第39回製剤・創剤セミナーにて Postdoctoral Presentation Award を受賞。連絡先: 〒770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78-1 E-mail: h.ando@tokushima-u.ac.jp

### 3. 大学院博士課程

上述のように、奥先生の研究室では DDS, 特にリポソーム工学を用いた難治性疾患治療薬の開発に特化した研究を行っており、低分子化合物から抗体、核酸といったバイオ医薬品に至るまで様々なエフェクター分子を標的部へと送達する研究を行っている。その中でも私は、標的遺伝子の発現を特異的に抑制することが可能な新規医薬品候補化合物である核酸に魅了され、これを用いた新規がん治療薬の開発を自らのテーマとして選んだ。博士課程からの転属であったため、研究内容や実験手技のほとんどが今まで経験したことのないことであり、新しい知識や技術を一から学び直すことに大変さを感じる一方で、同時に充実感・やりがいも感じる事ができた。

「よし、やるぞ!」と意気込んでいた矢先、グローバル COE プログラムのアメリカ・オハイオ州立大学への 45 日間の短期留学の機会をいただいた。当然、留学中は研究することができず、少しでも研究成果を出したいと焦っていた時期であったので苦渋の決断であったが、奥先生や浅井講師(現准教授)の勧めもあって留学を決断した。今になって思うが、この短期留学は自分の「研究者」人生にとって必要不可欠な経験であったと確信している。この留学は語学力向上が中心のカリキュラムが組まれており、午前中は英語での講義で英語の基本的な文法・会話力・発音・ネイティブの独特な言い回し等を学んだ。また、英語でのプレゼンテーションスキル向上のための講義もあり、英語でのプレゼンや質疑応答の仕方もここで学ぶことができた。また留学期間の最後には、英語を第 2 言語とするクラスの生徒に対して、英語で実際の研究プレゼンテーションも行った。午後は基本的に自由行動で学内外を探索するものであった。ただ幸運なことに、留学生一人一人に対してオハイオ州立大学の学生が語学パートナーとして選ばれており、アメリカの文化や大学生活、価値観等、様々なことを学ぶことができた。週末にはバーベキューやキャンプ、ラフティング、ホームステイなど様々なアクティビティがあり、充実した留学期間を送ることができた。特に、アメリカのピザが美味しく、一緒に留学した同期と毎晩のようにピザを買ってきて、お酒を飲みながら色々な話をしたのは良い思い出である。本留学を通じ、英語で話すことに抵



図 1 オハイオ州立大学での同期との記念撮影

抗が無くなったのは自分にとってとても大きな成果であり、また将来的に 1, 2 年の長期留学をすることに対する強い思いも芽生えた(図 1)。

短期留学を終え、研究室に戻ってからが実質的な研究生活のスタートであった。多くの博士課程学生がそうであるように、昼夜を問わず土日祝日まで研究に没頭した。私が選んだ研究テーマは、先に紹介した核酸の中でも特に最近注目されている microRNA のがん治療応用である。microRNA は生体内に普遍的に存在する 20 塩基程度の small RNA であり、自身と配列相補的な塩基配列を有する遺伝子の UTR 領域(翻訳には直接関係しない領域)に結合することで、その遺伝子の翻訳を抑制することができる機能性 RNA である。特に、腫瘍の増殖や悪性化、転移等にこの microRNA が深く関与していることが報告されており、腫瘍の増殖を抑制する方向に傾ける microRNA を腫瘍に送達することで、腫瘍の増殖抑制効果が期待できる。また近年、細胞から分泌される脂質二重膜の閉鎖小胞であるエクソソームに microRNA が内封されていることも報告されており、エクソソームを介した細胞間シグナル伝達における microRNA の役割に関する多くの研究が成されている。さらに、がん細胞から血液に分泌されたエクソソーム中の特異的 microRNA を検出することで、がんを早期発見することができる診断薬としての有用性に関する多くの報告がされており、臨床でもその応用可能性が期待されているなど、現在がん領域において microRNA が非常に高い注目を集めている。次節では、博士課程在学中に遂行した microRNA を用いたがん治療応用に関する研究内容について紹介



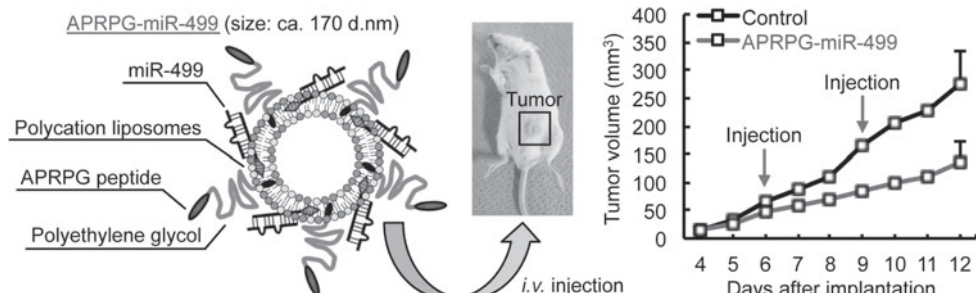


図2 APRPG-miR-499 の模式図と静脈内投与後の制がん効果

させて頂く。

#### 4. microRNA 全身送達による新規がん治療戦略の構築

先にも述べたように、microRNA はがん細胞でも発現が認められており、腫瘍の成長に深く関与している。本研究では、その中でも腫瘍血管新生に着眼し、これに抑制的に働く microRNA の全身投与による腫瘍増殖抑制を試みた。まず始めに、microRNA による標的遺伝子抑制効果を誘導するためには細胞内への microRNA 送達が必要不可欠であることから、機能性ポリカチオンリポソームである Tetra-ethylenepentamine-based polycation liposomes (TEPA-PCL) を用い、microRNA 送達技術の確立を試みた。TEPA-PCL を用いた microRNA の細胞内送達はそれまで報告はなかったが、同様に標的遺伝子抑制効果を誘導する合成 RNA である small interfering RNA (siRNA) の細胞内導入、およびがん治療応用に関しては以前に報告していた<sup>1,2)</sup>ことから、microRNA でも応用可能であると判断し、これを用いた。モデル microRNA として、血管新生抑制を誘導することが既に報告されていた miR-92a と TEPA-PCL を混和したところ、粒子径が約 200 nm、表面電荷が約 12 mV (中性 pH) のナノ複合体の調製に成功した。この miR-92a/TEPA-PCL 複合体をヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) に導入したところ、標的である複数の遺伝子の発現抑制を誘導することを明らかにし、miR-92a に起因する血管新生抑制効果も認められ、microRNA 送達技術を確立した<sup>3,4)</sup>。

次に、miR-92a に比べがん治療への有効性が高いと考えられる miR-499 を用い、miR-499 全身送達によるがん治療評価を行った。miR-499 は、がん悪性化に関与する虚血および低酸素環境下での発現変

化が報告されている microRNA であり、同環境下での特異的なシグナル制御が期待できる。また、miR-499 の標的シグナルである Wnt 経路やカルシニューリン経路は、血管内皮細胞およびがん細胞において、統合的に血管新生や細胞増殖を制御する重要なシグナル経路であり、これらを抑制することにより血管新生抑制およびがん細胞増殖抑制を介した高いがん治療効果が期待できる。In vitro において、miR-499/TEPA-PCL 複合体を HUVECs に導入したところ、有意な血管新生抑制効果が認められ、マウス結腸がん細胞である Colon26 NL-17 に導入したところ、血管新生促進因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF) の顕著な分泌抑制が見られた。さらに、Colon26 NL-17 の有意な増殖抑制効果も認められた。次に In vivo への応用を考慮し、全身投与後の血中滞留性を向上させるポリエチレングリコール (PEG) を miR-499/TEPA-PCL 表面に修飾し、さらに腫瘍血管内皮細胞および種々のがん細胞に高発現している VEGF receptor-1 (VEGFR1) に親和性を有する Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (APRPG) ペプチドを PEG の先端に結合させた APRPG-PEG 修飾 miR-499/TEPA-PCL 複合体 (APRPG-miR-499) を作製した。APRPG-miR-499 の粒子径は約 170 nm、表面電荷はほぼ中性で、全身投与可能な中性電荷のナノ複合体の調製に成功した。この APRPG-miR-499 を放射標識し、Colon26 NL-17 を皮下移植した担がんマウスに静脈内投与したところ、腫瘍への高い集積が認められた。また、蛍光標識 miR-499 を用い、腫瘍内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、腫瘍血管およびがん細胞の双方への miR-499 集積が観察された。腫瘍における標的遺伝子の発現抑制効果を検討した結果、APRPG-miR-499 投与によって miR-499 標的遺伝子の顕著な発現抑制が認められ、さらにこれら分子によって発現が調節される



図3 オーストリアの学会での記念撮影

VEGFも強く抑制することを明らかとした。がん治療評価として、APRPG-miR-499投与による腫瘍増殖抑制効果を検討したところ、対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制が認められ、また体重減少は認められなかった。これらより、APRPG-miR-499の全身投与による統合的がん治療が可能であることを示した(図2)<sup>5)</sup>。

#### 5. ポスドク(特任助教)として

研究に没頭した博士課程3年間において、筆頭著者として自分が中心となって遂行した論文を3報発表するに至った。その原動力としてももちろん学術的探究心・知的好奇心が根底にあるのは間違いないが、学術振興会の特別研究員(DC1およびDC2)として採択されていなかったため、借用していた奨学金の全額返済免除を勝ち取ることがモチベーションになっていたことも否定はしない。その甲斐あってか、博士課程在学中で13回の国内学会発表、5回の国際学会発表をこなし、国際学会ではポスター賞を受賞することもできた。結果として、奨学金の全額返済免除を受けることができ、静岡県立大学学長賞(博士課程終了時の成績優秀者に送られる賞)も頂くことができた。

さらにもう一つ、自分の「研究者」人生の次の転機となる人物と出会う。それが、現在所属している徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・石

田竜弘准教授(現大学院医歯薬学研究部・教授)である。石田先生は、核酸を含むナノキャリア製剤の体内動態解析の第一人者であり、核酸医薬の臨床応用を視野に入れた実用的な研究を推進している。石田先生と初めてお会いしたのは、2012年10月にオーストリアで開催された国際学会「Oligonucleotide Delivery: Biology, Engineering and Development Conference」である(図3)。当時、博士課程2年の私にとって海外での国際学会参加は初めてであり、学会前から緊張していたのを覚えている。当時所属していた静岡県立大学からの参加は浅井先生と私の2人であり、同じホテルに石田先生も宿泊されることになっていた。チェックインした次の日の朝、1人で朝食を食べていると、ふざけた口調で「May I have a seat?」と尋ねて来る人がおり、それが石田先生との最初の出会いであった。朝食後は3人でオーストリアの中心都市であるウィーンを観光し、列車とタクシーを使って学会会場である山奥の古城へと向かった。この学会は会場と宿泊先が一緒であり、ほぼ缶詰状態で学会参加者全員が会期中を共に過ごした。朝9時から夕方17時まで一日中講演があるものの、その後はディナー、ワインテイasting、バーでの飲み会等の様々な催しも企画され、会期中は飽きることなく有意義な研究報告を聞くことができた。また、日本人大学院生の参加が自分だけということもあり、学会を通じて石田先生とも親しく



話をさせて頂くことができた。その際、石田先生が奥先生と懇意なこともあり、博士課程終了後の受入を伺ったところ、その場で受入れ可能との返事を頂いた。まさに、物事が進むのはタイミングだと改めて実感した。

その後、2014年4月から石田先生が教授を務める徳島大学大学院医歯薬学研究部・がん細胞と代謝学分野・特任助教（薬物動態制御学分野・助教兼任）として働かせて頂いている。現在の研究テーマは「DDS 製剤の体内投与による難治性がん治療法の開発とその臨床応用」および「細胞間シグナル伝達ベシクル：エキソソームの機能解析と治療応用」である。企業との共同研究講座の所属であるため、研究内容の詳細は現状では開示できないが、自分が今まで培ってきた核酸送達技術に関する基礎的知識・技術と、石田先生の下で学ぶ臨床に向けた研究開発のノウハウを融合させることで、真に製剤開発を意識した基礎研究とその臨床応用までの過程を構築できる、自分の理想とする「研究者」を目指すことができると確信している。

## 6. おわりに

本稿では、DDS との出会いから「研究者」を志してそれに向かう経緯、および自分が遂行してきた DDS 研究について紹介させて頂いた。しかしキャリアは未だ浅く、まだ DDS 領域に足を踏み入れたばかりである。今後様々な出会いや経験、そして DDS 研究に対する強い探究心・好奇心をもって、自分自身が理想とする「研究者」となるため、さらに成長していきたいと考えている。また、自分が遂行してきた、またこれから遂行していく DDS 研究の成果が、革新的ながん治療の実現のための一助となるこ

とを期待すると共に、闘病生活に苦しむがん患者さんにとって福音となることを切望する。

最後となりますが、このような寄稿の機会を与えて下さいました薬剤学編集委員の皆様方に深く感謝すると共に、DDS 研究を遂行する上で多大なる御指導・御鞭撻の程を賜りました静岡県立大学・奥直人教授、ポスドクとして研究室に招いて下さり、研究者としてのノウハウを幅広く御教授下さっている徳島大学・石田竜弘教授、そして今まで常に支えてくれた家族に、心の底から御礼致します。

## 引用文献

- 1) T. Asai, S. Matsushita, E. Kenjo, T. Tsuzuku, N. Yonenaga, H. Koide, K. Hatanaka, T. Dewa, M. Nango, N. Maeda, H. Kikuchi, N. Oku, Dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine-based liposomes for systemic siRNA delivery, *Bioconjugate Chem.*, **22**, 429–435 (2011).
- 2) H. Koide, T. Asai, K. Furuya, T. Tsuzuku, H. Kato, T. Dewa, M. Nango, N. Maeda, N. Oku, Inhibition of Akt (ser473) phosphorylation and rapamycin-resistant cell growth by knockdown of mammalian target of rapamycin with small interfering RNA in vascular endothelial growth factor receptor-1-targeting vector, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 602–608 (2011).
- 3) H. Ando, A. Okamoto, M. Yokota, K. Shimizu, T. Asai, T. Dewa, N. Oku, Development of a miR-92a delivery system for anti-angiogenesis-based cancer therapy, *J. Gene Med.*, **15**, 20–27 (2013).
- 4) H. Ando, A. Okamoto, M. Yokota, T. Asai, T. Dewa, N. Oku, Polycation liposomes as a vector for potential intracellular delivery of microRNA, *J. Gene Med.*, **15**, 375–383 (2013).
- 5) H. Ando, T. Asai, H. Koide, A. Okamoto, N. Maeda, K. Tomita, T. Dewa, T. Minamino, N. Oku, Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499, *J. Controlled Release*, **181**, 32–39 (2014).