

## 《若手研究者紹介》

健康・医療に貢献する真の製剤・DDS 技術の  
開発を目指して

金 沢 貴 憲\* Takanori Kanazawa  
東京薬科大学薬学部製剤設計学教室

## 1. はじめに

「おもしろいことやろう！」

これは、私が東京薬科大学3年次の研究室訪問のときに、製剤設計学教室の教授であった岡田弘晃先生（現東京薬科大学名誉教授、岡田 DDS 研究所所長）からかけられたお言葉である。当時、未知の世界であった卒論研究に対して漠然とした不安感を抱いていた私にとって、研究って面白いものなんだという驚きとともに、まだ行くかどうか決めていない学生に、入って来る前提で話されたその強引さに魅力を感じ、この先生の下で研究がしてみたいと思ったのを今も覚えている。ただ、そのときはそれから13年も続けることになるとは夢にも思っていなかった。そもそも大のドラマ好きだった福岡生まれの私は、ドラマの舞台となるが多かった東京での一人暮らしにあこがれて上京しただけである。卒業後は、地元に戻ろうと考えており、東京薬科大学はあくまでも一時的な滞在場所としての認識でしかなかった。話した時の印象があまりに強烈であった岡田先生に興味を持ち調べてみると、武田薬品工業で25年ほど研究開発に携わり、ブロックバスターである長期徐放性注射剤、リュープリンの初期開発を手掛けた方であることが分かり、配属が正式に決

\*2006年東京薬科大学大学院博士前期課程修了, 2006年東京薬科大学薬学部助手, 2011年助教, 2010年博士(薬学)取得. 2014年4月~2015年3月米国マサチューセッツ州ノースイースタン大学(Torchilin教授)客員助教, 受賞歴: 日本薬剤学会第21年会最優秀発表者賞, 第38回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 他, モットー: 毎日楽しく生きる. 連絡先: 〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1  
E-mail: kanazawa@toyaku.ac.jp

まっから、この先生の下でどんな研究ができるのだろうかという小さい頃の遠足の前日のようなワクワクドキドキの興奮が体中を駆けめぐっていた。

## 2. 卒論生時代の経験

3年次の後期試験後の春休みから、修士2年生の先輩の下で卒論研究が始まった。先輩は、非ウイルス性の遺伝子ベクターであるカチオン性ナノ粒子の開発を行っており、前半では、スプレードライ装置を用いて様々な条件で調製したカチオン性ナノ粒子の粒子径やゼータ電位、電気泳動によるプラスミドDNAとの複合体形成能、細胞を用いた遺伝子発現効率の定量などを一緒に行った。後半からは動物への遺伝子導入実験が始まることとなった。当時の製剤設計学教室では、動物を使った実験はほとんど行われておらず、他の研究室に投与のコツや方法を聞きながら習得した。数十匹のマウスへ投与したのち、摘出した臓器のホモジナイズ液中の遺伝子発現を測定するというものであるため、摘出とホモジナイズの作業に膨大な時間を必要とし、徹夜で実験することもたびたびあった。ただ、きついと感じたことは一度もなかった。はた目には大変そうに見えていたようだが、当時の私は、1年間携わったナノ粒子が動物に投与するとどんな結果になるのか本当に知りたくて知りたくて日々実験に夢中になっていた。実際に動物での遺伝子発現が得られ、それら一連の研究成果が論文となったときの感動は今も忘れることができない。

卒論研究を通して、実験だけでなく、夜中の待ち時間で、先輩ににんにくがたっぷり入ったラーメンや大盛りのとんかつ定食をおごってもらったり、朝

まで気になる論文を互いに持ち寄り研究の話を交わしたりする毎日は、これまで経験したことのない充実したものであった。研究の楽しさを教えてくれたのは、まぎれもなくこのときの先輩であり、今も感謝の気持ちでいっぱいである。

研究室のゼミや飲み会で岡田先生の話聞く機会が増えるにつれて、私の研究への思いは大きくなっていった。いつも「出口（薬を実際に使用する患者さん）を考えた、医療現場に真に必要なとされる創薬研究をしなければならない。」と熱く語っておられるのを聞いて、先生の下でもっと研究がしたいと強く感じていた私は、当然のように大学院に進学した。進学の相談をしたときに、「面倒見たる。大学院に来ればもっとおもしろいことできるぞ」と言っていた岡田先生が私に与えてくれた研究テーマは、“HIVを標的とした粘膜DNAワクチンの開発”であった。当初はこの壮大なテーマに、出口をイメージすることは全くできなかったが、とにかく教授について行こうという思いで粘膜免疫やDNAワクチンに関する資料や論文を読みまくることから始めた。

### 3. HIVを標的とした粘膜DNAワクチンの開発

経粘膜DNAワクチンは体液性および細胞性免疫ばかりでなく、粘膜局所での免疫を誘導できるため、粘膜を感染の入り口としている様々なウイルス感染に対して現在も大きな期待が寄せられている。効果的な経粘膜DNAワクチン効果を得るためには、免疫関連細胞が豊富に存在する粘膜組織に抗原遺伝子を発現させることが重要であるものの、分子量が数百万もある抗原遺伝子を粘膜内へ送り込むことはとても困難であった。はじめに、ナノ粒子や市販の遺伝子導入試薬を用いて粘膜に遺伝子導入してみたが、遺伝子発現は全く観察されなかった。そこで、岡田先生からの提案で、経皮デリバリーで用いられていたエレクトロポレーション法を用いて粘膜への遺伝子導入を試みることにした。その結果、粘膜内で遺伝子発現が認められ、さらに腔粘膜への導入を行う際にマウスの性周期に着目したところ、性周期によって粘膜上皮層の厚さが変化し、上皮層が最も薄くなる発情期に遺伝子導入することで遺伝子発現効率が最も向上することを見出した(図1)。これにより、遺伝子の粘膜デリバリーのポイントとして粘膜上皮層の突破が重要であることが分かった。ま

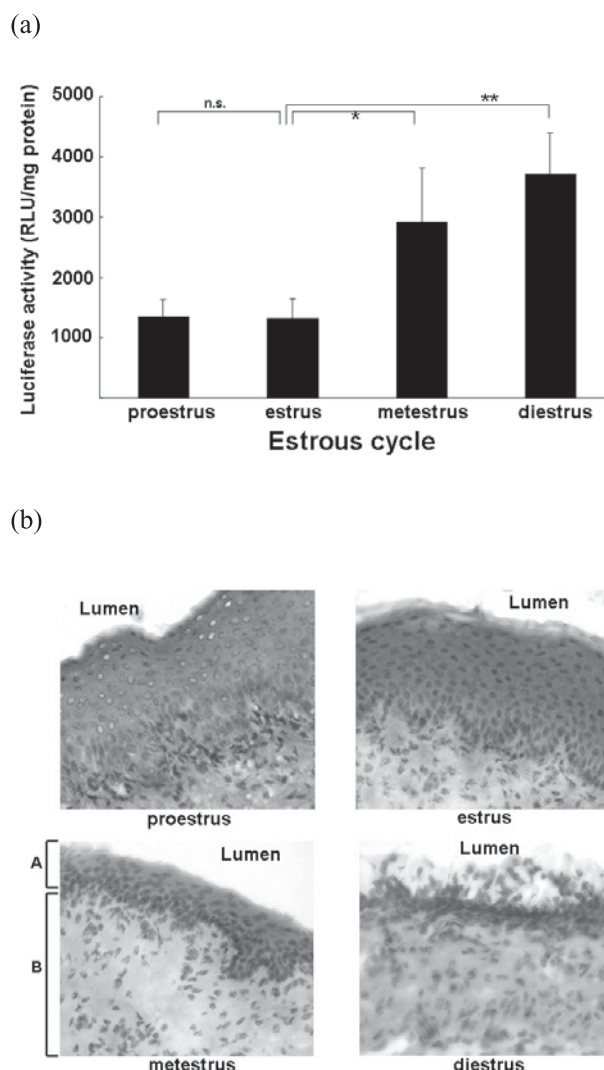


図1 腔粘膜への遺伝子導入効率における性周期の影響 (a) と各性周期の腔粘膜組織切片のHE染色図 (b) A: 粘膜上皮層, B: 粘膜固有層, Lumen: 腔腔。

たこのとき、本方法を用いて腔粘膜に効率的に遺伝子発現させることで、皮内免疫や経鼻免疫に比べて、腔局所での抗原特異的IgA抗体産生および支配リンパ節である鼠径リンパ節細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を有意に亢進することを明らかとした。ここまでの実験結果は運良く大学院1年生次に出すことができ、これらの知見について、薬学会、DDS学会、国際学会で発表することができた。

学会発表で受けた質問の中で特に多かったのは、“エレクトロポレーションを粘膜に適用するのは安全なのか?”であった。そこで次に、エレクトロポレーション法に代わる簡便で効果的な遺伝子導入方法として、インスリンの自己注射デバイスとして皮下や筋肉注射に用いられていた針無し注射器に着目

した。針無し注射器は非侵襲的かつ簡便で投与組織に広範囲に薬液を送達できること、また、針を用いないことから針刺し事故を防げることなど、HIV ワクチンデバイスとして有望であると考えた。そこで、島津製作所と共同で、粘膜投与用針無し注射器を開発し、粘膜 DNA ワクチンデバイスとしての可能性についてウサギを用いて検討した。その結果、粘膜投与用針無し注射器を用いてウサギ腔粘膜に遺伝子を導入することで、従来のシリンジ注射器に比べて、局所の遺伝子発現を有意に増大させることに成功した。また、この針無し注射器を用いてウサギの腔粘膜に抗原遺伝子を投与した結果、通常の針による注射器に比べて、腔分泌液中の IgA 抗体価および血球由来リンパ球での IFN- $\gamma$  mRNA 量が有意に増大し、針無し注射器の粘膜ワクチンデバイスとしての有用性が示された。大学院時代から 7, 8 年かけて行った本研究結果によって、日本薬剤学会第 21 年会最優秀発表者賞や第 39 回製剤セミナーの Postdoctoral Presentation Award などを受賞することができた。

テーマを聞いたときはどうしたらよいか全く分からない手探りなスタートで、多くの壁におち当たりながら不格好に進めた研究であったが、今では、この研究と共に成長できたと心から思える、そして愛着のある私の自慢の研究成果である<sup>1)</sup>。

#### 4. アレルギー疾患・がん治療に向けた siRNA 製剤・DDS 技術の開発

博士課程に行く決めていた修士 2 年生の冬、突然岡田先生に部屋へ来るように呼び出された。この流れは、確実に怒られるなあと思いながら、部屋に入ると、「来年から研究室の助手をやってみないか?」という驚きの打診だった。お金を払って博士課程に行くよりも、給料をもらいながら研究ができる! という単純な考えで (実際そんなに甘いものではないことがすぐに分かったが)、研究室の助手としての人生がスタートした。はじめは、大学院時代のテーマを続けていたが、徐々に、数名の修士課程の学生を受け持つ機会をもらえ、2 つの研究テーマを新たにスタートさせた。当時遺伝子に代わる新たな薬として大きな注目を浴びていた siRNA によるアンメットメディカルニーズ領域の疾患治療を大きなテーマとし、標的疾患としてアトピー性皮膚炎とがんを選択した。アトピー性皮膚炎は、大学院時代にや

っていた局所デリバリーや免疫系実験の経験を生かせるのではないかと考えてのもので、一方、がん疾患に対しては今までやったことのなかった、遺伝子・核酸の全身デリバリーに挑戦したいという強い思いからスタートさせた。

アトピー性皮膚炎は慢性炎症と深く関わるアレルギー疾患の一つであり、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が関与している。そのため、これら炎症性サイトカインに関わる因子は、アレルギー・自己免疫疾患治療薬開発における創薬ターゲットとして期待されている。なかでも炎症性サイトカインの転写因子である NF- $\kappa$ B は、すでにデコイ核酸の標的因子として有効性を発揮しており、これを標的とした siRNA を用いれば治療効果までを評価できるのではと考え、NF- $\kappa$ B のサブユニットの一つである RelA に対する siRNA (siRelA) を治療核酸としたアトピー性皮膚炎治療システムの構築をテーマとした。論文調査やいくつかの予備検討の結果、アトピー性皮膚炎治療効果を得るには、粘膜ワクチン同様に、免疫担当細胞が豊富に存在する表皮下や真皮に核酸を送り届ける必要があることが分かってきた。しかしながら、皮膚は、表皮の角質層と顆粒層の細胞間のタイトジャンクションから形成される強力なバリア機能を有しているため、siRNA 単独投与では効果が期待できない。そこで、siRNA の皮内デリバリー法として、岡田先生、高島由季先生 (現東京薬科大学薬学部准教授) が当時 siRNA キャリアの新しい素材として着目していた機能性オリゴペプチドを利用できないかと考え、可逆的にタイトジャンクションを開口するペプチドである AT1002 と siRNA の投与後の安定性と細胞導入能が期待できる細胞透過性ペプチド Tat を利用した新しい siRNA 皮内送達システムを構築した。その結果、naked siRNA に比較して、機能性ペプチドを用いることで皮内深部まで siRNA を送達可能であることを見出した。さらに、この siRNA 皮内送達システムを用いて siRelA をアトピー性皮膚炎発症マウス耳介へ適用した結果、強力な治療効果を発揮することを明らかとした<sup>2)</sup>。次に、本システムを保持した塗り薬タイプの siRNA 製剤開発を目指し、創傷治療のドレッシングや細胞増殖の足場として医薬分野への応用が期待されている、絹タンパク質の構成成分セリシンを基剤とした siRelA 含有ハイドロゲルを開発し



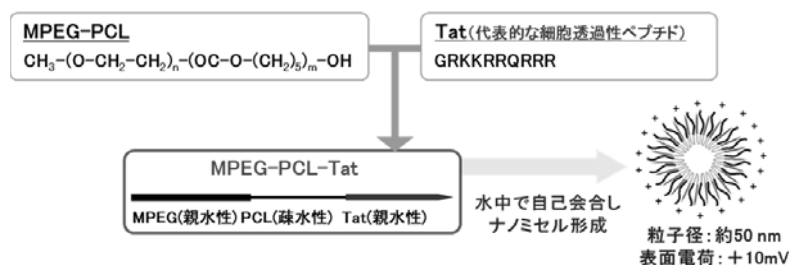


図2 機能性ペプチド修飾ブロック共重合体のミセル構造

た。その結果、本来の siRelA 活性に加え、セリシン  
 ハイドロゲルによる皮膚保護効果と抗炎症効果を発  
 揮することで、非常に優れた治療効果を示した。ま  
 た、このハイドロゲルはセリシンの濃度を調整する  
 ことで内包する薬物放出をコントロールできること  
 から、関節内滞留型の徐放性 siRelA 含有ハイドロゲ  
 ルを開発し関節炎モデル動物に投与した結果、発症  
 率、関節部の肥厚、臨床スコアを顕著に抑制した。  
 このように皮膚や関節内への核酸の局所投与製剤の  
 調製に成功し、これら研究に関していくつか特許を  
 取得することもできた。

がんを標的とした全身投与用の核酸キャリアの開  
 発では、抗がん作用を持つ siRNA の静脈投与後の体  
 内動態のみならず、腫瘍組織到達後の腫瘍細胞内  
 の細胞内動態を向上できるキャリアが必要である。  
 そこで、体内動態、なかでも血中滞留性および EPR  
 (enhanced permeation and retention) 効果による  
 腫瘍選択的送達性の付与を目的とし、水中で容易に  
 ナノサイズのみセルを形成する methoxy poly(eth-  
 ylene glycol)/polycaprolactone) diblock copolymers  
 (MPEG-PCL ブロックポリマー) を選択した。さら  
 に、このポリマーに細胞内動態の向上を期待して、  
 前述の細胞透過性ペプチドである Tat を修飾した  
 MPEG-PCL-Tat の合成を行い、その機能を評価し  
 た。その結果、MPEG-PCL-Tat は水中で容易にナ  
 ノサイズのみセルを形成し、その表面に PEG 鎖と  
 Tat ペプチドを配位していることが分かった(図2)。  
 これにより、表面に存在する PEG 鎖と Tat ペプ  
 チドの両機能を発揮することで、静脈投与後の血中滞  
 留性や EPR 効果による腫瘍集積性の向上だけでな  
 く、細胞実験においても高い siRNA の細胞内導入効  
 率、サイレンシング効果を示す核酸キャリアの開発  
 に成功した<sup>3)</sup>。そこで次に、キャリアの細胞内動態  
 をさらに向上させることを目的として、新しい機能

性ペプチドの設計を試みた。新しい機能性ペプチド  
 は、細胞内導入能に関与するアルギニンとエンドソ  
 ーム脱出に関与するプロトンスポンジ効果を持った  
 ヒスチジンの両端にチオール基を持つシステインを  
 配置させることで、細胞外ではジスルフィド架橋に  
 より安定な核酸との複合体を形成させ、腫瘍組織内・  
 細胞質内の還元環境下ではジスルフィド架橋が容易  
 に切断されて複合体から核酸を放出させることが可  
 能となる。この多機能性ペプチドを Tat に代わるペ  
 プチドとして、MPEG-PCL ブロックポリマーに結  
 合させた多機能性ペプチド修飾 MPEG-PCL を同様  
 に評価したところ、siRNA の細胞内動態およびマウ  
 スへの静脈投与後の体内動態は向上し、血管新生因  
 子に対する siRNA の腫瘍増殖抑制効果を増大させ  
 ることに成功した。さらに、本キャリアを利用して、  
 関節炎リウマチや潰瘍性大腸炎モデルマウスに  
 siRelA を静脈投与することで、優れた治療効果を示  
 すことも明らかとした。現在、これまでの知見をも  
 とに全身作用をする経口投与用核酸製剤の開発に着  
 手している。

## 5. 脳・中枢神経疾患を標的とした非侵襲的な 脳への薬物送達システムの開発

助手になって3年目、岡田先生の主催する製剤設  
 計学教室は大学院生17人という大所帯となってい  
 た。それに伴い、テーマを増やすこととなった私は  
 新たなテーマとして、固形がんへのデリバリーがで  
 きるのなら脳腫瘍へもデリバリーできるのではない  
 かという単純な着想のもと、脳への DDS 研究を始  
 めた。もちろん、脳・中枢神経系には、アンメッ  
 トメディカルニーズ領域の疾患が多く、うまくいけ  
 ば多くの疾患治療に応用できる研究になるのではと  
 いう期待もあった。当時すでに脳室内に神経膠腫を植  
 えるモデルラットの作製技術を確立していた尾間哲

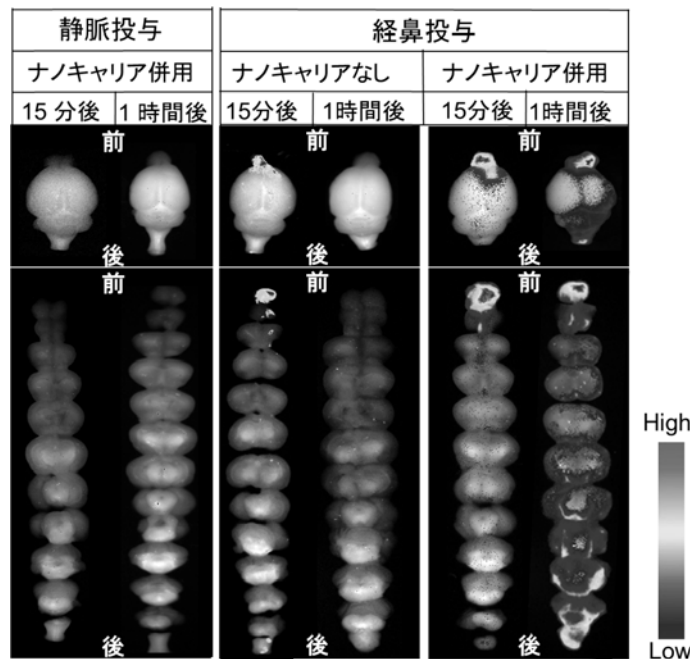


図3 ラットへの蛍光標識 siRNA 投与後の脳内分布

也先生（現名古屋市立大学薬学部教授）から手技を学び、蛍光標識した MPEG-PCL-Tat キャリアを静脈投与した際の腫瘍組織への移行性を検討した。その結果、当初の期待とかけ離れ、蛍光はほとんど観察できず治療効果を発揮するに至らないことが示された。その理由として、血液脳関門の存在により脳への送達制限されていることは明らかであった。血液脳関門の突破に何か良い方法はないか模索し続けたところ、幹細胞を経鼻投与することで脳へ送り込むことができるという論文にたどり着いた。これが突破口になるのではと、経鼻投与による脳への薬物送達について調べてみると鼻から脳へは鼻粘膜上皮層から嗅神経、三叉神経を通り脳の入り口となる嗅球や脳幹へつながる経路が報告されており、低分子薬物だけでなく、ペプチドやタンパクなどを脳へ送り込んだ論文を発見することができた。さらに、鼻から脳への薬物移行のバリアとして鼻粘膜上皮層の突破が重要であること、バイオ薬物であれば粘膜での安定性が問題となっていることも分かってきた。そこで、低侵襲性かつ効果的な脳送達システムの構築を目的とし、この経鼻投与に加え、鼻粘膜上皮透過性の向上と薬物保持能を期待して前述の MPEG-PCL-Tat を組み合わせた脳への薬物送達システムを構築し、はじめに蛍光物質の脳移行性を評価することにした。その結果、経鼻投与と MPEG-

PCL-Tat を併用することで、静脈投与に比べ有意に高い脳移行性を発揮し、鼻粘膜からの薬物の血中への漏出を減少させることも明らかとした。次に、神経腫瘍モデルラットを作製し、カンプトテシンを封入した MPEG-PCL-Tat ミセルを経鼻投与した結果、未治療の神経腫瘍モデルラットや静脈投与群に比べ有意な延命効果を示した。さらに、蛍光標識した siRNA を MPEG-PCL-Tat を用いてラットに経鼻投与したところ、静脈投与や naked siRNA の経鼻投与に比べ、脳内の広範囲で蛍光が観察され（図3）、経鼻投与と MPEG-PCL-Tat を併用した脳への薬物送達システムが低分子だけでなく核酸においても有効であることを見出した<sup>4,5)</sup>。現在、本システムの虚血性脳疾患やアルツハイマー病治療への応用ならびに、より高効率な脳への高分子送達システムを構築するため、鼻から脳への高分子の移行機構の解明に取り組んでいる。このように、血液脳関門を介さず非侵襲的に治療薬を脳へと送り込める可能性を示した本研究は、根治法のない脳・中枢神経疾患に対する効果的な薬物治療法の開発に貢献できるものと期待される。現在、静脈投与による脳疾患部位への DDS 技術開発についても研究を始めている。

## 6. 終わりに

今回、自分のこれまでの研究生活について思いつ

くまみに書かせていただいた。この13年間、思い通りに進んだ研究はほとんどないが、どの研究もあきらめずに最後までやりきってきた根性だけが唯一の誇りである。小さなころから飽きっぽい性格の自分がアカデミック研究者としてこれまで充実した楽しい日々を過ごせたのは、研究の面白さや奥深さに取りつかれているのはもちろんであるが、これまで一緒にやってきた学生たちが自分と同じように研究を心から楽しんでいる姿を見るのがやめられなかったことも理由の一つである。また、幸運にも私の周りには、見本となるアカデミック研究者の先輩方がたくさんいたことも大きかった。特に、大学生時代から私を温かく見守りながら、壁にぶち当たったときや間違った方向に行きそうなときは、愛情をもってアドバイスしてくれる高島由季先生、尾関哲也先生には、これまで何度ご飯をごちそうになったか分からないことも含め、感謝してもしきれないご恩がある。また、数多くの同世代薬剤系研究者ともつながりを持つことができた。彼らとの交流は自分の研究者人生の大きなモチベーションとなっている。ここでは挙げきれなかったが、他にも多大な影響を与えてくれたカッコいい諸先輩方がたくさんおり、今、自分が薬剤系研究者としてなんとか歩んでいけるのも、このような周りのすばらしい先輩方・同世代・後輩の皆さまのおかげであることは間違いない。そして、このようなすばらしい世界に飛び込ませてくれた岡田先生に改めて感謝申し上げたい。皆様へのご恩を返すためにも、人の健康・医療に貢献でき

る真の製剤・DDS技術の開発を達成すべく今後も覚悟をもって日々精進していきたい。

最後にこのような貴重な執筆の機会をいただきました薬剤学編集委員の皆様にご心より感謝申し上げます。

#### 引用文献

- 1) T. Kanazawa, H. Okada, Delivery strategies for developing vaginal DNA vaccine combining cell-penetrating peptide and jet injection: Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals: Biology, Challenges and Strategies, J. Neves and B. Sarmiento, eds., Springer Science + Business Media, New York, 2014, pp. 367–378.
- 2) T. Uchida, T. Kanazawa, M. Kawai, Y. Takashima, H. Okada, Therapeutic effects on atopic dermatitis by anti-RelA short interfering RNA combined with functional peptides Tat and AT1002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **338**, 443–450 (2011).
- 3) T. Kanazawa, K. Sugawara, K. Tanaka, Y. Takashima, H. Okada, Suppression of tumor growth by systemic delivery of anti-VEGF siRNA with cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL nanomicelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 470–477 (2012).
- 4) T. Kanazawa, H. Taki, K. Tanaka, Y. Takashima, H. Okada, Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration, *Pharm. Res.*, **28**, 2130–2139 (2011).
- 5) T. Kanazawa, F. Akiyama, S. Kakizaki, Y. Takashima, Y. Seta, Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nano-micelles, *Biomaterials*, **34**, 9220–9226 (2013).