

## 《若手研究者紹介》



## siRNA 組織内浸透型 DDS の構築

茨 木 ひさ子\* Hisako Ibaraki

東京薬科大学 薬学部 製剤設計学教室

## 1. はじめに

臨床現場で働く薬剤師になるべく上京したが、現在東京薬科大学薬学部製剤設計学教室の助手となり、想像だにしていなかった大学教員として研究に勤しんでいる。今回本コラムの執筆にあたり、尊敬する先生・研究者の皆様のバックナンバーを読みながら、果たして筆者の記事にどれだけの人が興味を持って下さるのかと、いささか心配ではあるが、大変貴重な機会を頂いたのでこれまでの過程と経験、考えたこと、研究内容について振り返り、ご紹介させて頂きたい。

## 2. 研究の道に進むまで

高校生の時分、ひとつの物質が新しい物質に生まれ変わり、その性質まで変わるといふ化学の魅力に取りつかれ、化学の勉強を続けたいと思っていた。一方で、幼い頃から将来は医療に携わる職業に就きたいという思いもあって、そのどちらも叶えられる薬学部への進学を決めた。山形県酒田市の田舎で生まれ育ち、都会生活を夢見ていた当時 18 歳の筆者の目に留まった薬学部は、東京薬科大学。「東京」と

名がつけば、ドラマで見るとようなキャンパスライフが待っていると信じて疑わなかった。晴れて入学が決まったものの、東京ならばどこに行っても右に進めば歌舞伎町、左に進めばスクランブル交差点、まっすぐ進めば銀座のような街並みが広がっていると思いついていた当時の筆者にとって、東京薬科大学（八王子市）の自然豊かな情景に愕然としたことが忘れられない。しかしこの不純な動機による大学選択は決して間違いではなく、日本一の薬学生数を誇る本学で学生生活を過ごせたことは、多様な人々と価値観に触れ、常識や既成概念に捉われないメンタルを育むことができたと思う。事実、昔から変わり者であった筆者も違和感なく生きることができ、どんな個性をも認めてくれる優しい土壌があった。

今の自分があるのは、3 年次の研究室配属がターニングポイントになったことに他ならない。せっかくなら薬学部にはかない学問分野として「薬剤学」の研究室に進もうと漠然と考えてはいたものの、決めかねていた。そんなときに出会ったのは、当時、当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、株式会社岡田 DDS 研究所所長）だった。先生の授業は本当にエネルギーで、「製剤は創薬の出口、一番患者さんのことを考えながら研究できる」「患者さんに優しい製剤を」、といつも熱く語って下さったことが印象的で、さらにこの製剤はどんなところが面白くて新しいのか、ということ毎週の授業で語って下さった。そんな先生の言葉とお人柄に惹かれて、翌年はご退官のため直接のご指導は受けられないとは承知しながらも、製剤設計学教室への配属を希望した。先生の研究室を調べてみると、授業で受けた製剤・粉体工学だけでなく、あ

\*2014 年 3 月東京薬科大学薬学部医療薬物薬学科卒業、2014 年 4 月東京薬科大学薬学部製剤設計学教室助手に着任、2019 年 7 月博士（薬学）取得。受賞歴：第 28 回 DDS カンファレンス Postdoctoral Presentation Award 2019、第 4 回日本 RNAi 研究会・第 9 回日本細胞外小胞学会優秀口頭発表賞、第 20 回創剤フォーラム若手研究会最優秀ポスター発表賞（プラチナ賞）等。好きな言葉：人間万事塞翁が馬、ケセラセラ。趣味：旅行とお酒。連絡先：〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1 E-mail: ibaraki@toyaku.ac.jp

らゆる投与経路による核酸医薬 DDS 等, 研究内容は多岐にわたり, 合成から細胞・動物実験, 製剤化の一連が経験できることにも魅力を感じた. また加えて言うならば, 筆者はテスト勉強は一夜漬け, 授業は主に代返, というような特に何を頑張る訳でもないダメ大学生であったが, 一念発起し, 研究とはどんなものとはわからないながらも卒論研究には力を入れようと決心しており, 数ある研究室の中でも実験量が各段に多いという噂を聞き, ここなら図らずとも自分を高め成長できる環境があるのではないかと考えたことも一因となる.

配属され, 高島由季先生(現当教室准教授)のご指導のもと与えられた卒論研究テーマは「ナノキャリアによる経皮薬物デリバリー」. 角質層の有無や投与部位がナノキャリア経皮投与後に皮内透過性へ与える影響, 低分子・高分子薬物の差異について検討し, 後に助手になってからの研究基盤となった. 学生時代を通じて非常に自由度高く実験させて頂いたお陰で, 自分自身の力で調べ考え行動しなければ何事も進まないのだということを学んだ. また筆者は6年制3期生であり, 授業や病院・薬局実習によりどうしても実験時間に制約を受けた. このことから当時はいかに無駄を省き効率的に実験して結果を出すかに注力していたように思う. ただ, 今振り返ればこの時筆者がやっていたことは, 少なくとも論文を調べ計画し実行, 結果を解析・考察し改善, というPDCAサイクルを回すことはできていたが, 実験内容としては言われたことをやみくもに行っていたに過ぎず, 「研究」というよりも, ひたすらに手を動かして実験することが楽しい! はやく結果が知りたい! という気持ちがすべてだったように感じる. こんな粗削りな研究生活を送っていた一方で, 研究室の同期は皆実験が好きで, そんな皆を見ているのも好きで, 切磋琢磨できる同期との出会いと充実した日々は一生の糧と財産となり, 出会いに感謝している.

さて, 卒論発表会が迫った2013年夏のある日, 「研究室の助手として残らないか」というオファーを頂いた. まさに青天の霹靂であった. 研究能力的にも人間的にも圧倒的に力不足であることは間違いなく, 非常に悩んだが, お給料を貰いながら好きな実験を続けられることに加えて, 大学教員とはどんなものなのかという好奇心と, 元々楽観的な性格なこ

とも相まって, せっかくのチャンスだしやってみよう, 何とかなるだろうと考え, 運とタイミングにご縁を感じてアカデミックの道に進むことに決めた. 安易な決断に途中何度か後悔したことは紛れもない事実ではあるが, 重要なことは「何を選択するのか」ではなく, 「選択したことに対してどうやって道を拓くのか, どう生きるかを前向きに考え実行する」ことなのだ, 後に今の筆者は実感している. 大きな不安と少しの期待でいっぱいだったが, 本学初の6年制薬学部出身教員となり, 助手としての研究生活が始まった.

### 3. ペプチドを基盤とした siRNA の皮内浸透性向上とアトピー性皮膚炎治療効果

siRNA を始めとする核酸デリバリーという根幹部分の研究内容は現在に至るまで変わらないが, 研究生活が始まって間もない頃は, 網膜・角膜疾患や腎臓疾患, 皮膚疾患, がん, リポソーム, ミセル等, 研究テーマがコロコロと変わった. 回り道をしてこれまでの時間は何だったのだろう, と思うこともあったが, 逆に考えれば様々な内容に対して勉強し理解と知見を深め, あらゆる実験手技にも対応することができた貴重な経験となり, 教員となって学生に教える際にも非常に役立っている.

助手になって2年目, 当時助教であった金沢貴憲先生(現静岡県立大学薬学部准教授)にご指導を仰ぐこととなり, 「siRNA の組織内浸透性を制御する DDS 開発」(後に博士學位論文となった)に専念することとなった. この出来事が筆者の研究人生を大きく変えたと思う. 金沢先生には, 結果報告をする際, なぜこのような計画を立てたのか, なぜそう考えたのか, そこから何が分かったか, それをどう今後に繋げるのか, というひとつひとつの道筋を, 必ず先生ご自身の考えや意見を言う前に, まず筆者に一通り問いかけ, そのあとでご指摘やご意見, 今後のアイデアやご助言を下さり, 常に論理的な思考ができるよう導いて頂いた. また先生は, いつも面白いこと, 新しいことにアンテナを張っておられ, 筆者の勉強不足でディスカッションにさえ及ばないことも多々あり, 悔しくて論文を読み漁った日々が懐かしい. 時にサボり癖が否めない筆者であるが, どんな時でも諦めずに継続的に研究に没頭することができ, 何よりアカデミアは楽しいものであると実

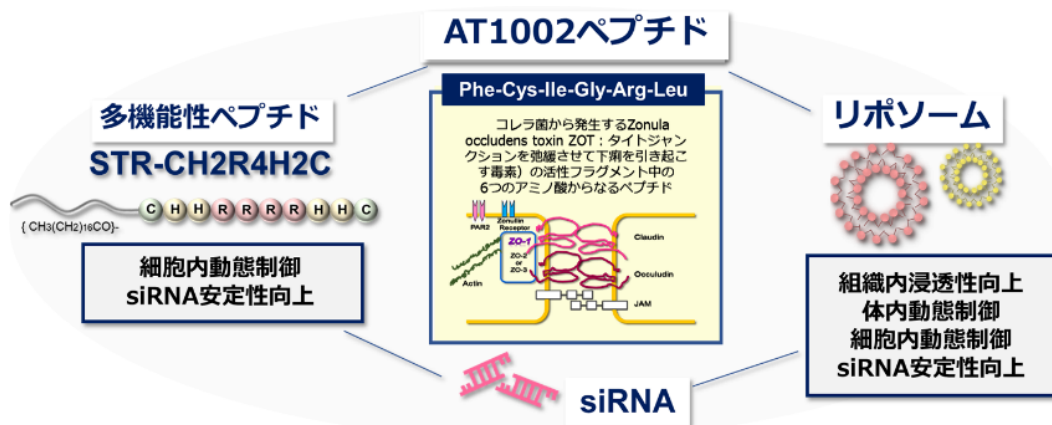


図1 siRNA 組織内浸透型 DDS の構築

感することができたのは、先生の厳しいご指導と叱咤激励のお陰に他ならず、感謝してもしきれない。常にがむしゃらに目標を持つこと、自分らしくいること、研究成果を淀みなく発信すること、様々な経験を積むことの重要性、いかに自らを成長させていくかを教えて頂いた。

研究内容に話を移すと、創薬モダリティとして注目される核酸医薬、その中でも RNAi 現象を利用し極めて低濃度で効果を発揮する siRNA を疾患治療に応用するためには、その生体内安定性の低さ故、DDS が必要不可欠である。これまでに、体内動態や細胞内動態を制御する報告は数あるが、標的部到達後の組織内浸透性向上に着目した知見は乏しかった。そこで siRNA の組織内浸透型 DDS の構築を目的として、初めに機能性ペプチドを用いて、経皮投与による siRNA 皮内浸透性向上に向けて取り組んだ。当教室ではかねてより、角質層と共に皮膚バリアとなる顆粒層のタイトジャンクションを開口可能なペプチド、AT1002 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ていた。しかしながら、より高い治療効果を得るためには siRNA の細胞内導入・エンドソーム脱出・細胞質内における放出性を有するキャリアが必要になると考えた。そこで、当教室で開発した細胞内動態制御ペプチド STR-CH2R4H2C と、AT1002 の併用投与による siRNA の組織内浸透性とアトピー性皮膚炎治療効果を評価することにした。その結果、siRNA/STR-CH2R4H2C 複合体に AT1002 を併用し経皮投与することで、健常マウス皮膚ならびにアトピー性皮膚炎モデルマウス耳介において顕著な皮内浸透性を示

すことを確認した<sup>1)</sup>。さらに、アトピー性皮膚炎発症に深く関与する NF- $\kappa$ B のサブユニットである RelA に対する siRNA (siRelA) を本システムに適用しアトピー性皮膚炎モデルマウスの耳介に頻回経皮投与したところ、症状の改善、耳介組織中の炎症性サイトカイン産生を著しく抑制したことを明らかにした<sup>2)</sup>。これらの内容をまとめた筆者の第 1 報目となる論文がアクセプトされたときの喜びは忘れられない。日々の研究成果が未来永劫論文として残り、全世界の人々に共有できるアカデミックの研究者は何て素晴らしい仕事なのだろうと思った覚えがある。同時にこの頃から、世界の誰も発見していない未知の事柄を探求する研究の面白さに魅了されていたように記憶している。また DDS 研究は、いかに患者さんの QOL や利便性を考えるかという実に優しい学問だと体得していた。学会発表の機会も増えていった。学生時の学会発表では、お恥ずかしい話であるが、いかに己の無知さを晒さず恥をかかずに乗り切るかを重視していた。しかし主体的に研究するようになれば、発表は第三者に研究を批評頂き、新たな視点やアイデアを頂戴する絶好の機会であるのだ、という認識に変化したのがこの頃である。

#### 4. 皮内浸透性に優れたリポソーム特性の探索と開発

STR-CH2R4H2C はアルギニン由来の正電荷を有することから、長期間の使用においては皮膚毒性の観点から懸念が残っていた。より安全性が高く、より安定な状態で皮内深部へ浸透可能な DDS キャリアとして、筆者はリポソームに着目した(図 1)。本邦においては化粧品分野に応用されてはいるもの

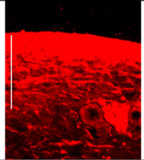
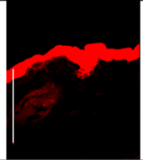
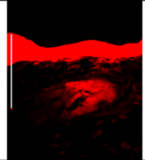
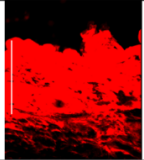
正電荷 リポソーム	中性電荷 リポソーム	負電荷 リポソーム	DOPE/CHEMS リポソーム
54.5 ± 1.3 mV	-4.6 ± 2.5 mV	-58.7 ± 4.2 mV	-52.4 ± 0.5 mV
			

図2 マウス皮膚における各蛍光標識リポソーム投与10時間後の皮内浸透性評価

の、深部への皮内浸透を向上させるリポソームの表面特性について、網羅的な解析を行った報告はわずかである。そこで初期検討としてリポソームの表面電荷と柔軟性に焦点を当てた。表面電荷を正電荷、中性電荷、負電荷に制御した DOPC リポソームと、構造の異なるリポソームとして DOPE/CHEMS リポソームを調製し、表面電荷と柔軟性の差異による皮内浸透性への影響を比較検討した。この際リポソームの柔軟性の評価方法を思案した。原子間力顕微鏡等を使わずとも簡便に評価できる方法がなかなか見つからず苦労したが、日常的に使用していたエクストルーダーによる膜透過時間の測定による評価系を思いついた。その結果、DOPE/CHEMS リポソームは、DOPC リポソームと比較して、有意に膜透過時間が短く、フレキシブルな構造をしていることが示唆された。マウス皮膚への浸透性は、正電荷が最も高く、次いで負電荷、中性電荷の順となり、DOPE/CHEMS リポソームは正電荷リポソームと同等の高い皮内浸透性を確認し、皮内浸透性における表面電荷と柔軟性の寄与を見出した(図2)。本研究内容の大部分を実際に実験したのは、助手となって3年目に筆者に初めて直属として付いた1人の学生さんである。学生には誰しも夢があり、教員は夢を叶えるためのサポートをする責任がある。初めての学生への研究指導に対するプレッシャーに苛まれたことは間違いないが、膨大な実験量を行い常に努力する姿に筆者自身も鼓舞され刺激を受けたことは言うまでもない。本研究成果が論文化<sup>3)</sup>されたときは、初めて自らテーマを立ち上げ、学生を指導し、研究と学生指導の双方の楽しさと大変さを実感でき、喜びもひとしおだった。加えて、本研究成果が基となって科研費が採択されたときには、ここに至るまでの努力が報われたようで大変に嬉しく、当時学位を持っ

ていなかったが、研究者としての第一歩が踏み出せたかな、という自信に繋がった。

ここまでで得られた知見を基に、柔軟性と高い皮内浸透性を有する DOPE/CHEMS リポソームを皮内浸透型キャリアとして選択した。DOPE/CHEMS リポソームと同様に皮内浸透性が高かった正電荷リポソームは、細胞毒性と皮膚刺激性を示し、皮膚適応には懸念があったためである。次に、siRNA 内封 DOPE/CHEMS リポソームを調製すべく、細胞内動態制御のため siRNA 単独ではなく、STR-CH2R4H2C との複合体として内封させる設計にした。この結果、リポソームとすることで STR-CH2R4H2C の毒性を軽減できることを明らかにでき、DDS キャリアの形状をリポソームとすることの意義を確かめた。siRelA 内封 DOPE/CHEMS リポソームをアトピー性皮膚炎発症マウスの耳介へ投与したところ、耳介中の炎症性サイトカインの産生、肥満細胞の浸潤、耳介の肥厚、臨床スコアといったアトピー性皮膚炎症状を顕著に改善した。加えて AT1002 の併用投与により皮内浸透性ならびに治療効果が向上であることを明らかにした<sup>4)</sup>。

以上のように、組織内浸透性という新規コンセプトに基づいて、siRNA の局所投与に有効な組織内浸透型 DDS を構築し、組織内浸透性向上により治療効果が向上できることを明確にした。2018年に世界初の siRNA 医薬 Patisiran が上市され、核酸医薬の中でも siRNA の存在感が増している昨今、難治性疾患に対する siRNA の臨床応用に繋がる大きな手がかりを提供するものと期待している。現在は、がん細胞間のタイトジャンクションに着目し、AT1002 ペプチドと siRNA 内封 DOPE/CHEMS リポソームを組み合わせて、全身投与可能な新規腫瘍内 siRNA 浸透型 DDS の開発について研究を進めている。

これらの研究成果によって、博士の学位、第28回 DDSカンファレンス Postdoctoral Presentation Award 2019、第4回日本 RNAi 研究会・第9回日本細胞外小胞学会優秀口頭発表賞を受賞することができた。患者さんと医療へ貢献できる DDS 研究を志し頑張っている、辛く苦しい日々が99%を占めた。だが限界を迎えそうになったときには、ふと待ち構えていたかのように突然結果が出たり、受賞、助成金の獲得、論文のアクセプトがあった。これがどれだけモチベーションへと繋がったかわからない。

当たり前で誰しもそうかもしれないが、筆者の研究生生活はまさにその繰り返しだったように思う。

## 5. お わ り に

東京オリンピックを間近に控える2020年春、筆者の研究生生活がスタートしてからちょうど10年目を迎える。この間当時の画期的な発見や研究、新薬であったものは後に一般的なものとなる循環を体感した。この節目となる年に、これまでの研究生生活を顧みる機会を頂いたことに感謝している。しかしこれといった凄いエピソードも無いので、何を書けば良いか苦心し、筆は進まず、結局駄文となってしまい申し訳ない限りである。

これまでに何度も挫けたが、失敗から学び、すべての経験は自分を成長させ、血となり肉となり骨となった。今の学生さんは、「いかに楽をするか、いかに失敗しないで、負荷をかけずに物事を進めるか」、に価値を置きすぎている。そして何事にも答えはすぐに見つかり、誰かが当たり前のように教えてくれるものだと勘違いしている(ように見える)。それを全面から否定するつもりはないが、筆者がそうであったように、努力や苦勞は必ずや誰かが見て評価してくれ、努力やチャレンジを続けた結果の些細なきっかけで人生は変わる、そして物事は考え次第でいくらでも良い方向に変わるのだ。人間万事塞翁が馬、何が正解なんてわからない、だからこそ一步一步目の前のことに対して自分の頭で考えて懸命に取り組めば必然と道は拓くと信じている。

学生時代から改善しつつあるものの未だコミュ障の筆者であるが、周りの人々との出会いに恵まれたことはこれ以上ない幸運なことであった。当教室教

授瀬田康生先生、当教室に入るきっかけを下さった岡田弘晃先生、どんな時も愛情深く温かく支えて下さった高島由季先生と金沢貴憲先生に心より感謝するとともに、いつもお世話になっている先生方、先輩、同期、学生と友人の皆さん、家族にこの場をお借りして御礼申し上げます。研究者としても大学教員としてもまだまだ若輩者であるが、これまでの経験に一層の努力を重ねて、皆様のご指導を頂きながら医療の未来に貢献し、患者さんに本当に必要とされるDDS研究をして、必要とされる人間となれるよう精進して参りたい。

最後に、このような貴重な執筆の機会を与えて下さいました薬剤学編集委員の皆様、深謝申し上げます。

## 引 用 文 献

- 1) H. Ibaraki, T. Kanazawa, Y. Takashima, H. Okada, Y. Seta, Development of an innovative intradermal siRNA delivery system using a combination of a functional stearylated cytoplasm-responsive peptide and a tight junction-opening peptide, *Molecules*, **21**, E1279 (2016).
- 2) H. Ibaraki, T. Kanazawa, Y. Takashima, H. Okada, Y. Seta, Transdermal anti-nuclear kappaB siRNA therapy for atopic dermatitis using a combination of two kinds of functional oligopeptide, *Int. J. Pharm.*, **542**, 213–220. (2018).
- 3) H. Ibaraki, T. Kanazawa, C. Oogi, Y. Takashima, Y. Seta, Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, **50**, 155–162 (2019).
- 4) H. Ibaraki, T. Kanazawa, T. Kurano, C. Oogi, Y. Takashima, Y. Seta, Anti-RelA siRNA-encapsulated flexible liposome with tight junction-opening peptide as a non-invasive topical therapeutic for atopic dermatitis, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1216–1225 (2019).