

Development of nucleic acid therapeutics based on the control of their intracellular distribution (細胞内動態制御を基盤とした核酸医薬品開発に関する研究)

京都大学医学部附属病院 薬剤部

梅村圭祐

Keisuke Umemura

1. はじめに

筆者は日本医療薬学会の2023年度Postdoctoral Awardを受賞させて頂いた。このような魅力ある賞を授かることができ大変光栄に思うとともに、今後一層研究に真摯に取り組みさらなる成長を目指して参りたい。筆者は学部4回生の研究室配属から大学院博士課程を通じて、高倉喜信先生が主宰されていた京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野において、生物薬剤学を基盤とした核酸医薬のドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究に従事し、本年3月に学位を取得した。本内容は第2章で詳しく紹介する。また大学院博士課程に進学するのと同じタイミングで京都大学医学部附属病院薬剤部に薬剤師レジデントとして入職し、病院薬剤師として臨床現場のスキルを習得した。2年間の薬剤師レジデント修了後に呼吸器外科病棟の専任薬剤師となり、その中で肺移植患者の薬物動態制御に関する症例報告を執筆する機会を得たので、第3章で概説する。これらの研究を遂行する中で自分自身が学んだことや臨床薬剤師として研究に取り組む意義についても述べてみたい。

2. 核酸医薬のDDS

近年、核酸医薬品が新規医薬品モダリティとして注目されるようになってきた。世界で初めて核酸医薬品が承認されたのは1998年のことで、後天性免疫不全症候群(AIDS)に伴うサイトメガ

ロウイルス性網膜炎治療のために開発されたアンチセンス医薬品Vitraveneであった。その後、アプタマーや非メチル化CpG DNA、siRNA等の開発が進んできた。一般に核酸は生体内の分解酵素により容易に分解を受ける上に、水溶性の高分子であるため膜透過性が低く、特に細胞内で作用を期待する核酸医薬品はこれらの障壁を克服するためのデリバリー技術が必須である。¹⁾

我々のグループは、複数のオリゴデオキシヌクレオチドを組み合わせて作ることができるナノメートルサイズの構造化核酸であるpolypod-like nanostructured DNA (polypodna)を用いた研究を行ってきた。Polypodnaはオリゴヌクレオチドの組み合わせ方によって様々な本数の足(pod)を持つ構造化核酸を作製することができる(図1)。我々は、polypodnaがマクロファージや樹状細胞に効率よく取り込まれること、さらに免疫賦活能のある非メチル化CpG DNAをpolypodnaの中に組み込むことで、これらの免疫細胞を効率的に活性化させることができることを報告してきた。^{2,3)}しかしながら、このような効率的な細胞取り込みのメカニズムは不明であったため、このメカニズム解明に取り組むことが筆者にとって最初の研究テーマとなった。

DNAの細胞取り込みには、負電荷分子の細胞取り込みを担うマクロファージスカベンジャーレセプター-1(MSR1)が関与することが既に明ら

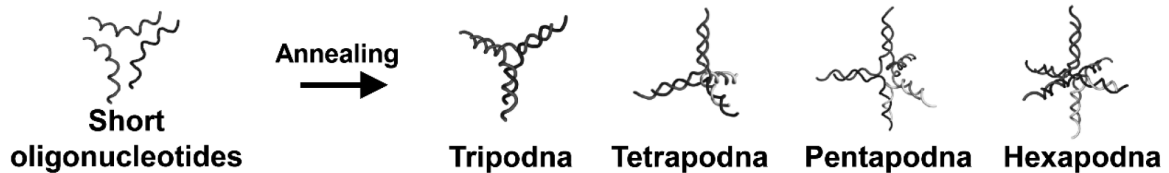


図1 Polypodna の概念図. 組み合わせるオリゴヌクレオチドの本数, 配列を工夫することで, 3本足 (tripodna), 4本足 (tetrapodna), 5本足 (pentapodna), 6本足 (hexapodna) のナノ構造化核酸を作製することができる.

かとなっていた. そこで, polypodna の効率的な細胞取り込みのうち, MSR1 はどの程度関与するかを明らかにすることとした. マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に足の数の異なる polypodna を添加した後に, 各種 polypodna が MSR1 にどの程度結合しているかを評価したところ, 足の数が増加するとともに MSR1 への結合量が増加した. 次に, MSR1 を発現しない細胞に MSR1 を発現させると, 足の数の増加に伴って細胞取り込み量が増加した. 逆に MSR1 を発現する細胞から MSR1 をノックアウトすると, 足の数の増加に伴って細胞取り込み量が減少した. さらに, 非メチル化 CpG DNA を含む polypodna を MSR1 ノックアウト細胞に添加すると, サイトカイン産生がほとんど消失するという結果が得られた. これらの結果から, polypodna が効率よく免疫細胞に取り込まれるメカニズムとして, MSR1 が主要な役割を果たしていることを示す結果が得られた. すなわち, 足の数が多くなるにつれて polypodna の MSR1 への結合が増加し, 細胞取り込み量およびその後のサイトカイン産生が増加すると結論付けた.⁴⁾ 研究に取り掛かった当初は MSR1 以外の受容体が数多く関与しているのではないかと予想していたが, 結局のところ古くから研究されている MSR1 が主要な取り込み受容体であるという結果で, 先は長かろうと思っていた登山道に突如山頂が現れたような感覚であった.

Polypodna は上述のように, 非メチル化 CpG DNA を効率的に細胞内へデリバリーするためのキャリアとして使用できる. 非メチル化 CpG DNA はマクロファージ等の免疫細胞のエンドソームに発現する Toll-like receptor 9 (TLR9) に認識されることで炎症性サイトカイン産生を誘導することから, ワクチンアジュバントやがん免疫療法にお

ける治療薬として注目されている.^{5,6)} しかしながら核酸はエンドサイトーシスにより取り込まれた後は徐々に分解を受ける. 我々は非メチル化 CpG DNA のさらなる作用増強化を目指し, エンドソーム内で核酸をゲル化させることで分解を遅延させる方法を検討した. そこで我々は i-モチーフと呼ばれる核酸配列に注目した. i-モチーフは非ワトソン-クリック塩基対の一つで, 連続するシトシンから構成され pH 5 程度の弱酸性条件になるとシトシンとプロトン化シトシンが塩基対を形成する. マテリアルサイエンスの領域では i-モチーフを介して酸性条件でハイドロゲル化する核酸が報告されており,⁷⁾ これを CpG DNA へ応用しようと考えた. 初めは polypodna に i-モチーフを組み込んだがハイドロゲルを得るのが困難であったため, $\Phi 29$ ポリメラーゼという酵素により得られる 1 万塩基長以上の長鎖一本鎖 DNA (long single-stranded DNA, lssDNA) に i-モチーフおよび CpG DNA を組み込んで検討を進めた. このようにして得られた lssDNA は酸性条件下でハイドロゲルを形成し, i-モチーフのない lssDNA と比較して *in vitro* および *in vivo* ともに CpG DNA の作用増強化に成功した (図 2).⁸⁾

我々はさらに, エンドソームを超えて lssDNA を細胞質へデリバリーする技術を開発している (投稿論文は査読中). 細胞質には細胞質 DNA センサーと呼ばれる受容体が存在し, stimulator of interferon genes (STING) と呼ばれるタンパク質を介して 1 型インターフェロン産生を誘導することから, がんや感染症治療薬のターゲットとして注目されている. エンドソームを不安定化させる作用のある GALA ペプチドを lssDNA に搭載することで, lssDNA の細胞質デリバリー, 1 型インターフェロンの産生促進に成功した.

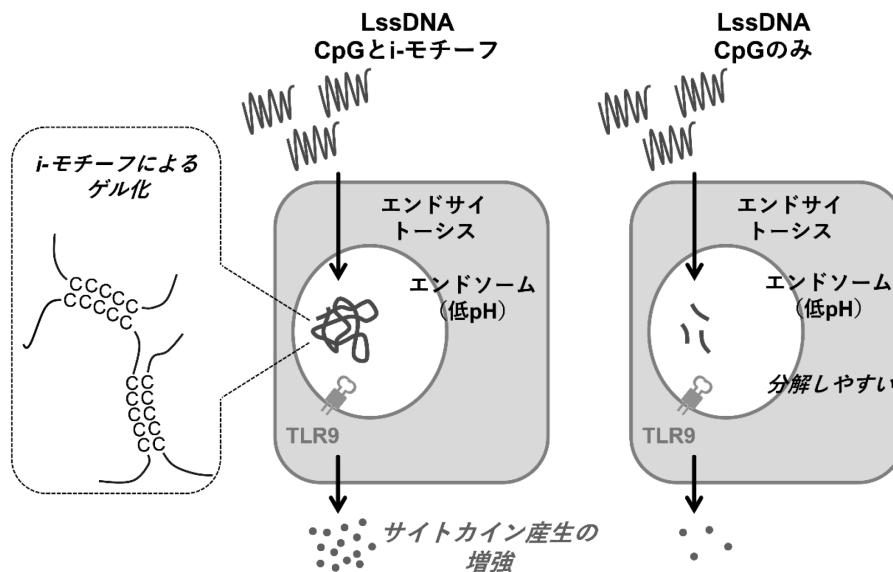


図2 i-モチーフを利用したCpG DNAの作用増強化. LssDNAにi-モチーフを組み込むことで、酸性条件下でのゲル化をさせ、エンドソーム内での分解を抑制したと考えられる。

3. 肺移植後に使用する抗真菌薬イトラコナゾールの吸収改善

肺移植では免疫抑制療法と感染予防の両立が必要で、移植後に緻密な薬物治療が必要となる。肺は外界と接する臓器であり感染症のリスクにさらされやすい上に、免疫細胞が豊富に存在する影響で拒絶反応のリスクも高いと言われている。肺移植後に注意すべき感染症の一つに真菌感染症があり、これを予防するために抗真菌薬イトラコナゾールが当施設では使用される。イトラコナゾールにはカプセル剤、錠剤、内用液の3種類の剤形が存在する。イトラコナゾールは脂溶性の高い弱塩基性薬物であるため、カプセル剤および錠剤を吸収するためには胃酸による溶解過程が必要となる。これを改善したのが内用液で、溶解補助剤としてヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンが使用され、バイオアベイラビリティが向上している。このため通常イトラコナゾール内用液が用いられている。

筆者が呼吸器外科病棟の専任薬剤師となり、肺移植患者の薬物治療を担当するようになって間もない頃、ある困難な事例に遭遇した。イトラコナゾール内用液は特有の苦味を有しており、これに伴う嘔吐によってイトラコナゾールが継続困難な症例を経験した。真菌予防はポリコナゾールへ切

り替えられたものの、肝障害によりこちらも継続困難で、イトラコナゾール錠剤へとさらに切り替えられた。しかしながらバイオアベイラビリティが低いことから予防効果を保証できるイトラコナゾール血中濃度に到達しない状態が続いた（当施設ではイトラコナゾールのTDMを実施している）。イトラコナゾール錠剤のバイオアベイラビリティを向上させる方法として酸性飲料であるコーラとともに服用する方法が報告されているが、⁹⁾我々は飲料が健康へ与える影響を考慮して天然の果実由来であるレモン果汁を含む飲料で服用することを提案した。この結果イトラコナゾールの血中濃度は上昇し、真菌感染症の発症もなく経過することができた。¹⁰⁾

この症例報告を通して薬剤師がチーム医療に参画し、診療に貢献していくことの重要性を、身をもって体感することができた。薬学的な背景知識を持つ薬剤師であったからこそこの提案を生むことができたと思う。逆に呼吸器外科医や感染症医の先生方からそれぞれのご専門内容の指導やフィードバックを頂けたことは大変貴重なことであった。臨床現場で仕事をしていると、答えの全く分からない問題に直面することが多々あり、薬剤師としてまた研究者として、これらの問題に取り組み続けねばならないと痛感している。

謝辞

本研究の遂行にあたり多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました高倉喜信先生（京都大学副学長・白眉センター長）、西川元也先生（東京理科大学薬学部教授）、高橋有己先生（京都大学大学院薬学研究科准教授）、河本佑介先生（京都大学大学院薬学研究科助教）に厚く御礼申し上げます。また熱心なる研究指導に加えて、薬剤師として勤務しながら大学院生のキャリアを歩むことをお許しくださった松原和夫先生（和歌山県立医科大学薬学部教授）、寺田智祐先生（京都大学大学院医学研究科・薬学研究科教授、同附属病院薬剤部部長）、米澤淳先生（慶應義塾大学薬学部教授）に衷心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Juliano RL, The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**, 6518-6548.
- 2) Mohri K, Nishikawa M, Takahashi N, *et al.*, Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory CpG motifs to immune cells, *ACS Nano*, 2012, **6**, 5931-5940.
- 3) Uno S, Nishikawa M, Mohri K, *et al.*, Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA, *Nanomedicine*, 2014, **10**, 765-774.
- 4) Umemura K, Ohtsuki S, Nagaoka M, *et al.*, Critical contribution of macrophage scavenger receptor 1 to the uptake of nanostructured DNA by immune cells, *Nanomedicine*, 2021, **34**, 102386.
- 5) Bode C, Zhao G, Steinhagen F, *et al.*, CpG DNA as a vaccine adjuvant, *Expert Rev Vaccines*, 2011, **10**, 499-511.
- 6) Ribas A, Medina T, Kirkwood JM, *et al.*, Overcoming PD-1 Blockade Resistance with CpG-A Toll-Like Receptor 9 Agonist Vidutolimod in Patients with Metastatic Melanoma, *Cancer Discov*, 2021, **11**, 2998-3007.
- 7) Dong Y, Yang Z, Liu D, DNA nanotechnology based on i-motif structures, *Acc Chem Res*, 2014, **47**, 1853-1860.
- 8) Oda W, Umemura K, Ito K, *et al.*, Development of potent unmethylated CpG DNA hydrogel by introducing i-motifs into long single-stranded DNA, *Int J Pharm*, 2023, **646**, 123438.
- 9) Jaruratanasirikul S, Kleepkaew A, Influence of an acidic beverage (Coca-Cola) on the absorption of itraconazole, *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **52**, 235-237.
- 10) Umemura K, Katada Y, Nakagawa S, *et al.*, Improved absorption of itraconazole tablet by co-administration with lemon beverages in a lung transplant recipient: A case report, *J Infect Chemother*, 2022, **28**, 1203-1207.