

FAP 治療を企図した dendrimer/分岐 β -シクロデキストリン結合体に関する研究：
遺伝子・siRNA キャリアおよびアミロイド線維形成抑制剤としての応用

生命薬科学専攻 医療薬学講座 (製剤設計学分野) 安野 貴幸

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、遺伝的変異が生じたトランスサイレチン (TTR) が不溶性のアミロイドを形成し、種々の臓器に沈着する遺伝性アミロイドーシスである。近年、アミロイドーシスの新規治療法として、プラスミド DNA (pDNA) を用いた遺伝子治療や short hairpin RNA (shRNA) あるいは small interfering RNA (siRNA) を用いた核酸医薬治療が注目されている。我々はこれまで、Starburst[®] polyamidoamine (PAMAM) dendrimer (dendrimer) と α -シクロデキストリン (α -CyD) との結合体 (α -CDE) が、遺伝子や siRNA キャリアとして有用であることを報告した。しかし、dendrimer と CyD 誘導体との結合体を遺伝子や siRNA キャリアとして応用した報告は皆無である。

一方、当研究室では、各種 CyD 誘導体の中で、分岐 β -CyDs が様々なタンパク質製剤の凝集体形成を著しく抑制することを報告した。また、dendrimer に関してもタンパク質凝集体形成抑制効果を示す報告があることから、dendrimer/分岐 β -CyDs 結合体はタンパク質の凝集体形成抑制効果を有する可能性が考えられる。

そこで本研究では、分岐 β -CyDs の中で、dendrimer と反応性に優れ、安全性の高いグルクロニルグルコシル β -CyD (GUG- β -CyD) と dendrimer (generation : G2) との結合体 (GUG- β -CDEs) を新規に構築し、pDNA および TTR siRNA (siTTR) キャリアならびに TTR のアミロイド線維形成抑制剤としての有用性を評価し、遺伝子・siRNA デリバリーおよびアミロイド線維形成抑制効果の二重作用の可能性について検討した。以下に本研究で得られた主な知見を要約する。

- 1) dendrimer と GUG- β -CyD を種々のモル比で反応させ、GUG- β -CyD 置換度 (DS) の異なる 4 種類の GUG- β -CDEs (DS 1.2, 1.8, 2.5, 4.5) を新規に調製した。このうち、A549 細胞および RAW264.7 細胞における遺伝子導入効率は、GUG- β -CDE (DS 1.8) が最も高く、 α -CDE (DS 1.2) および β -CDE (DS 1.3) よりも有意に高い値を示した。また、GUG- β -CDE (DS 1.8)/pDNA 複合体の細胞障害性は、polyethyleneimine (PEI) 複合体よりも極めて低かった。
- 2) GUG- β -CDE (DS 1.8)/pDNA 複合体溶液をマウス尾静脈内に投与後 12 時間において、特に腎臓、肝臓および脾臓で高い遺伝子発現が認められた。またその発現効率は、 α -CDE (DS 1.2) および β -CDE (DS 1.3) 複合体よりも、腎臓において有意に高い値を示した。さらに、本複合体をマウス尾静脈内に投与後 12 時間における血液生化学的パラメータはほとんど変化しなかった。

- 3) GUG- β -CDE (DS 1.8)/pDNA 複合体は、 α -CDE (DS 1.2) および β -CDE (DS 1.3) 複合体よりもエンドソームエスケープ能、核移行能および pDNA 解離能に優れていたことから、これらの要因が GUG- β -CDE (DS 1.8) の高い遺伝子導入効率に寄与することが示唆された。
- 4) HepG2 細胞において、GUG- β -CDEs (DS 1.8、2.5、3.0、5.0) と siTTR との複合体の中で、GUG- β -CDE (DS 1.8) 複合体が最も高い TTR 産生抑制効果を示した。さらにその効果は、 α -CDE (DS 1.1) および β -CDE (DS 1.2) 複合体よりも有意に高く、LipofectamineTM2000 複合体と同等であった。また、GUG- β -CDE (DS 1.8)/siTTR 複合体の細胞障害性は、LipofectamineTM2000 複合体よりも極めて低かった。
- 5) GUG- β -CDE (DS 1.8)/siTTR 複合体をマウス尾静脈内に投与後 48 時間における肝臓内 TTR mRNA の発現量は約 10% 低下した。また、本複合体をマウス尾静脈内に投与後 48 時間における血液生化学的パラメータはほとんど変化しなかった。
- 6) GUG- β -CDE (DS 1.8)/siTTR 複合体は、 α -CDE (DS 1.1) および β -CDE (DS 1.3) 複合体よりもエンドソームエスケープ能および siTTR 解離能に優れていたことから、これらの要因が GUG- β -CDE (DS 1.8)/siTTR 複合体の TTR 産生抑制効果に寄与する可能性が示唆された。
- 7) GUG- β -CyD は TTR 分子中のトリプトファン残基などの芳香族アミノ酸と相互作用することにより、TTR のアミロイド線維形成を持続的に抑制することが示唆された。また、GUG- β -CyD は、異型 TTR トランスジェニックラットの結腸におけるアミロイド沈着を抑制すること、また、安全性に優れることが示された。
- 8) デンドリマーは GUG- β -CyD と比較して低濃度で TTR のアミロイド線維形成を持続的に抑制し、その抑制メカニズムは GUG- β -CyD と異なる可能性が示唆された。
- 9) GUG- β -CDE (DS 1.8) は、デンドリマーと同程度の TTR アミロイド線維形成抑制効果を有し、かつデンドリマーよりも生体適合性に優れることが示唆された。

以上述べたように、GUG- β -CDE (DS 1.8) は、高効率かつ安全性に優れた遺伝子および siRNA 導入用キャリアであることが示唆された。また、GUG- β -CDE (DS 1.8) 自身も TTR のアミロイド産生抑制作用を有することが示された。このように、GUG- β -CDE (DS 1.8) を用いることにより、FAP に対する遺伝子または siRNA を用いた効果および GUG- β -CDE (DS 1.8) 自身のアミロイド線維形成抑制効果の二重作用による独創的かつ有効な FAP 治療薬の設計が期待できる。本研究で得られた知見は、新規 FAP 治療法を開発する上で有用な基礎的資料になるものと考えられる。