

全身性および限局性アミロイドーシス治療を企図した分岐 β -シクロデキストリン修飾 dendrimer/short hairpin RNA 発現ベクター複合体の有用性評価

医療薬学専攻 ドラッグデリバリーコース 製剤設計学分野 井上 雅理

アミロイドーシスは、1) 原因タンパク質の産生、2) 立体構造変化による線維性タンパク質凝集体 (アミロイド) の形成、3) アミロイドの組織沈着の病態過程を経て機能障害を引き起こす疾患である。アミロイドーシスは、全身性ならびに限局性のアミロイドーシスに大別され、それぞれの代表疾患として、肝細胞から産生される点変異型トランスサイレチン (TTR) タンパク質の多臓器蓄積を特徴とする TTR アミロイドーシス、また、神経細胞から分泌されるアミロイド β ($A\beta$) ペプチドの脳内蓄積を特徴とするアルツハイマー病 (AD) が挙げられる。上述のアミロイドーシスに対して、現行の治療法および臨床試験段階の医薬品候補は、病態の単一過程のみを標的としており、他の病態過程を止めることができない。一方で、病態の単一過程のみを標的としても効果は限定されるため、治療標的の異なる薬剤を組み合わせる必要があると考えられている。しかし、同時に複数の病態過程に効果を発揮する治療薬は、現在のところ存在しない。このように、アミロイドーシス治療には、多段階のメカニズムを持つ新しい戦略や治療薬が期待されている。

我々はこれまで、Starburst[®] polyamidoamine dendrimer (dendrimer) が、静電的相互作用および水素結合を介して、点変異型 TTR (TTR V30M) のアミロイド形成阻害および既に形成されたアミロイドに対するブレイク効果の二段階の治療効果を示すことを報告した。また、我々は、dendrimer とグルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン (GUG- β -CyD) との結合体 (CDE) が、GUG- β -CyD のエンドソーム脱出促進効果により、遺伝子・核酸医薬を肝細胞内へ高効率に送達するのみならず、核酸タンパク質複合体も神経細胞へ送達可能なことを報告した。また、GUG- β -CyD 自身が TTR の芳香族アミノ酸残基と疎水性相互作用することで、TTR のアミロイド形成を抑制することも報告した。したがって、CDE と遺伝子・核酸医薬を組み合わせることで、1) 原因タンパク質の産生抑制、2) アミロイド形成阻害、3) アミロイドブレイクの 3 種の薬効を発揮し、全身性アミロイドーシス (TTR アミロイドーシス) および限局性アミロイドーシス (AD) に対する多段階の治療薬として有用である可能性がある。そこで本研究では、細胞内に安定して核酸医薬を発現可能な short hairpin RNA 発現ベクター (shRNA) を用いて、CDE と shRNA との複合体 (CDE/shRNA) を調製し、TTR アミロイドーシスおよび AD に対する CDE/shRNA の治療効果を評価することにより、多段階標的型の全身性および限局性アミロイドーシスの治療薬開発を目指した。以下に本研究で得られた知見を要約する。

【第 1 章】 TTR アミロイドーシスに対する CDE/TTR shRNA (CDE/shTTR)

- 1) ヒト肝がん由来 HepG2 細胞において、CDE/shTTR は、チャージ比依存的に TTR 産生を抑制することが示唆された。また、CDE/shTTR は、 ζ -電位依存的な TTR V30M アミロイド形成阻害効果ならびに TTR V30M アミロイドブレイク効果を発揮し、ヒト神経芽種由来 SH-SY5Y 細胞において、TTR V30M アミロイドの細胞毒性を減弱させることが示唆された。
- 2) TTR アミロイドーシス病態モデル (ヒト TTR V30M トランスジェニック (Tg) ラット) において、CDE/shTTR の尾静脈内投与は、肝臓の TTR 産生量を減少させ、血清 TTR 濃度を低下させることが示唆された。CDE/shTTR は、TTR V30M Tg ラットの結腸における TTR 沈着を阻害することに加えて、すでに沈着した TTR 量を減少させることが示唆された。
- 3) CDE/shTTR の繰り返し静脈内投与は、薬効を示す濃度域において、体重変化および肝・腎機能に対して、顕著な有害事象を惹起しなかった。

【第 2 章】 AD に対する CDE/A β production enzyme shRNA (CDE/shBACE1)

- 1) マウス神経芽腫由来 Neuro-2a 細胞において、CDE/shBACE1 は、*BACE1* mRNA 発現を有意に抑制した。また、CDE/shBACE1 は、A β 42 に対するアミロイド形成阻害およびアミロイドブレイク効果を発揮し、Neuro-2a 細胞において、A β 42 アミロイドの細胞毒性を減弱させることが示唆された。
- 2) AD モデルマウス (*App*^{NL-G-F} ノックインマウス) において、CDE/shBACE1 の脳室内投与は、脳内 BACE1 発現量を減少させることが示唆された。また、CDE/shBACE1 は、脳内 A β 42 沈着を阻害することに加えて、すでに沈着した A β 42 量を減少させることが示唆された。さらに、CDE/shBACE1 は、同マウスの認知機能の低下を防止することが示唆された。
- 3) CDE/shBACE1 の繰り返し脳室内投与は、体重変化、組織重量変化および脳内炎症性サイトカインに対して、顕著な有害事象を惹起しなかった。

以上の知見より、CDE/shTTR は、TTR アミロイドーシスに対して、TTR 産生抑制、TTR アミロイド形成阻害およびアミロイドブレイクの三重効果を示すことで、*in vivo* において、TTR の沈着を阻害するのみならず、TTR 沈着量を減少させることが示唆された。また、CDE/shBACE1 は、TTR と同様に、A β に対する三重効果を示し、AD モデルマウスの認知機能の低下を防止したことから、AD 治療薬として有用であることが示唆された。本研究で得られた知見は、全身性および限局性アミロイドーシスの病態進行における各過程を多段階に阻害する新規アミロイドーシス治療法を開発する上で、有用な基礎的資料になりうるものと考えられる。