

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15642

研究課題名（和文）DDSを応用した脳組織へのmRNA導入と脳神経保護・機能改善治療への展開

研究課題名（英文）mRNA medicine for neuroprotection after cerebral ischemic attack

研究代表者

位高 啓史（ITAKA, Keiji）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60292926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞そのものを標的として、虚血からの神経保護さらに障害を受けた神経機能の回復を可能とする治療を目指して、mRNA医薬の応用を試みた。mRNA医薬は、mRNAを体内に直接投与して、mRNAによってコードされたタンパク質を標的細胞で発現させることによって治療を行う、新しいタイプの医薬品である。脳梗塞モデル動物に対して、神経栄養因子をコードしたmRNAを投与することによって、神経細胞死を減少させ、神経機能を改善させる治療効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度傷害されると回復が難しい脳虚血疾患に対して、mRNA医薬を用いた新しい治療法の可能性が提示された。特に脳虚血発症後2日後に薬剤投与されても、有意な神経細胞死抑制する治療効果が得られたことは、従来の薬物ではできない画期的な治療に繋がる可能性がある。mRNA医薬は世界的に研究開発が活発化している新しい核酸医薬の一種だが、今後さらに治療効果や安全性についての検証が進められ、我が国発のmRNA医薬実用化に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：For treating brain ischemic attack, mRNA medicine, a new type nucleic acid medicine for introducing therapeutic proteins which are encoded by the mRNA, was investigated for neuroprotective therapy on the neural cells. By administering mRNA encoding brain-derived neurotrophic factor into the model animals of global brain ischemia, the therapeutic effects of decreased cell death and preserved neurological functions were obtained, demonstrating the feasibility of mRNA medicine for the treatment of brain diseases.

研究分野：遺伝子核酸医薬、DDS、バイオマテリアル

キーワード：脳虚血 mRNA医薬 神経保護 DDS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の75%を占める虚血性疾患の治療薬を開発することは急務である。脳虚血の治療薬は、抗血小板薬や抗凝固薬などの、疾患原因である血栓を溶解すること・閉塞血管を開通することを目的とした薬剤が臨床応用されている。しかし、疾患の本質である神経細胞を標的とした治療戦略は極めて限られている。臨床において閉塞血管の開通により治療効果が得られるのは、疾患発症から数時間の超急性期に限られるため、治療が奏功し、十分な効果が得られる患者はごく一握りでしかない。このため神経細胞そのものを標的として、虚血からの神経保護さらに障害を受けた神経機能の回復を可能とする治療が強く求められている。

この実現のためには、神経細胞に直接アプローチし、シグナルなど細胞内メカニズムを制御する薬剤が必要である。本研究は、これを可能とする新しいバイオ医薬品として、人工的に合成した mRNA を体内へ送達して、目的とするタンパク質を発現させる mRNA 医薬品の応用を着想したものである。mRNA 医薬品は、タンパク質そのものの投与、またはプラスミド DNA (pDNA) による投与と比べて、効率、標的細胞・組織に制約が少ないこと、そしてゲノム挿入変異リスクが無いことによる安全性など、種々の利点を持つ。

研究代表者らは遺伝子核酸分子の DDS 研究を通じて、DNA、RNA などの核酸分子を生体内に安全かつ効率よく送達するナノミセル型キャリアの基本設計を確立し、主にプラスミド DNA を用いて、種々の難治性疾患・外傷の治療に向けた POC を取得してきた。本研究は、mRNA 医薬品という過去に例の無いユニークなアプローチによって、新しい脳障害の治療実現を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳神経細胞に対する mRNA 送達法確立および脳疾患治療応用に向けた proof of concept (POC) 取得である。脳疾患モデルとして脳虚血に焦点を当て、mRNA 送達によって脳内に発現させた治療タンパクが、神経保護治療として有効に機能することを実証し、mRNA 医薬品を用いた脳障害からの再生治療実現を最終的な目標と位置づけた。

3. 研究の方法

(1) 脳虚血モデルラットの確立

本研究では、ラット全脳虚血モデルを用いた。脳底での血管結紮により一過性の高度虚血傷害を与えるモデルで、特に海馬 CA1 ニューロンが虚血から2日間ほどの猶予を以て緩徐に細胞死に至る。この遅発性神経細胞死モデル動物作成条件を検討し確立した。

(2) mRNA の投与方法

mRNA の送達は、研究代表者らが先行研究で確立したナノミセル型キャリア (PEG-PAAspDET/mRNA) を用いた。これはポリエチレングリコール (PEG) とポリアミン部分で成るブロック共重合体と mRNA との自律会合により形成され、周囲を PEG で覆われた二層構造の内核に mRNA を保持することにより、生理的環境での高い mRNA 保持能、さらに環境応答機能を持たせたポリアミンにより、細胞質内での効率よい mRNA 放出が可能となる。既に脊髄くも膜下腔への mRNA 内包ナノミセル型キャリアの投与により、髄液中をキャリアが分布することにより、大脳から腰髄にかけて広範に mRNA がコードするタンパク質の発現が得られることが分かっている。

本研究では、海馬近傍の側脳室内への脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNA 搭載キャリア投与を行う計画とし、そのためのキャリア調製条件を、レポータータンパク発現 mRNA を用いた予備実験で検討し、条件最適化した。

(3) 脳虚血後神経保護効果の評価法

脳神経保護効果の評価は免疫組織学的に行う計画とし、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど神経組織を構成する各細胞の抗体を用いた免疫組織学的染色手技を検討し、確立した。

(4) 神経機能改善の評価法確立

上述のようにラット全脳虚血モデルは海馬の神経障害を誘導するが、この海馬が司る短期記憶力の機能評価を行うため、Y 迷路を用いた行動試験を計画し、その評価法を確立した。

4. 研究成果

(1) BDNF mRNA 投与による神経保護効果

ラット側脳室内への BDNF mRNA の投与により、以下の成果を得た。

- ・ BDNF mRNA を投与したあと、脳組織中の BDNF 量を ELISA で測定すると、内在性 BDNF 発現と比べ、2 倍以上に及ぶ高い値が約 2 日に渡って得られた。
- ・ 梗塞部位の組織学的評価で、BDNF mRNA を梗塞発症翌日から 2 日おきに計 3 回投与し、発症

後6日で免疫組織学的評価を行うと、mRNA投与群の生存神経細胞(ニューロン)数は正常動物の最大60%まで回復する神経保護効果が得られた。

・mRNAを梗塞発症後のタイミングを変えて1回投与する評価を行うと、梗塞発症直後にmRNAを投与する場合より、発症後2日経過後に投与する方が高い神経細胞死抑制効果が得られた。

・BDNF mRNAを梗塞発症後2日目、5日目の二度投与を行うことにより、その後3週に渡り細胞死の進行は抑制され、永続的な治療効果が得られたと判断された。

(2) 神経機能評価

上記の梗塞発症後2日目、5日目の二度のBDNF mRNA投与後、3週後にY迷路を用いた行動試験により短期記憶力を評価すると、治療群で有意に高い率での正常行動が観察され、mRNA投与により神経機能改善の治療効果が得られたと考えられた。

(3) mRNAの標的細胞の同定

投与したmRNAの標的となっている細胞を免疫組織学的に検索すると、mRNAは主にアストロサイトで発現しており、ニューロンではむしろほとんど発現は観察されなかった。オリゴデンドロサイトでも発現はわずかであった。

本治療の目的は神経細胞(=ニューロン)の細胞死を抑制することであるが、mRNAは直接ニューロンには入らず、ニューロン周囲を支持する細胞であるアストロサイトでBDNFを強く発現していた。アストロサイトは本来の生理的役割として、ニューロンを含めた神経組織の恒常性維持に資するが、BDNF mRNAによってこのアストロサイトの生理的機能がさらに活性化されることによって、ニューロン細胞死抑制の効果が繋がっているものと考察された。注目すべき結果として、梗塞発症直後のBDNF mRNA投与でなく、2日後の投与によってより高い神経細胞死抑制効果が観察されており、上記のアストロサイトを介した作用機序とも深く関連するものと考えられる。

上記結果は現在国際学術誌へ投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

位高啓史. mRNA医薬の研究開発動向と将来展望. 医薬ジャーナル 55(2): 627-632, 2019 査読無

位高啓史、福島雄大. mRNA医薬を用いた脳神経疾患の治療戦略. バイオマテリアル - 生体材料 - 36-3: 220-223, 2018 査読無

位高啓史. メッセンジャーRNA医薬を実現するDDS開発と疾患治療への応用 Drug Delivery System (DDS) 31(4): 343-351, 2016 査読無

Itaka K. Development of mRNA-based therapeutics. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2016;148(4):190-196. 査読無

Itaka K. Introduction to Special Issue: A New Paradigm of Gene Therapy. Pharmaceutics 8(1), 1; 2016. doi:10.3390/pharmaceutics8010001 Editorial 査読有

[学会発表](計23件)

Keiji Itaka. mRNA medicine as a new paradigm of gene therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 6th International mRNA Health Conference. 2018.11.13

Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 3rd International Symposium on Biomedical Engineering 2018.11.8

位高啓史. mRNA医薬を用いた脳神経疾患治療. 第37回日本認知症学会学術集会(シンポジウム28 認知症に対する核酸医薬の基礎と臨床) 2018.10.14

位高啓史. mRNAが生み出すパラダイムシフト~新たな核酸医薬品開発に向けて~. 第24回創剤フォーラム若手研究会(研究会テーマ:創剤研究の未開拓領域・認知症治療薬開発への課題と挑戦) 2018.9.22

位高啓史. mRNA医薬の研究開発動向. 日本核酸医薬学会第4回年会 2018.7.10

Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine. 2018.5.26

Fukushima Y, Imai H, Uchida S, Nakatomi H, Kataoka K, Itaka K, Saito N. BDNF mRNA delivery using biocompatible nanomicellar carrier treats delayed neuronal death via enhanced neuroprotective effects of astrocytes. Neuroscience 2017, 2017.11.12

Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 5th International mRNA Health Conference. 2017.11.1

位高啓史. mRNA-based therapeutics for intractable diseases and regenerative medicine. 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2017.7.21

福島雄大, 今井英明, 内田智士, 中富浩文, 片岡一則, 位高啓史, 斉藤延人 mRNA-based

therapy for ischemic neuronal death: Enhanced neuroprotective effects of astrocytes by BDNF mRNA. 第 40 回神経科学大会、2017.7.20

福島雄大, 内田智士, 今井英明, 中富浩文, 片岡一則, 斉藤延人, 位高啓史. 中枢神経虚血性疾患に対する mRNA 遺伝子治療: BDNF mRNA による神経保護治療、日本核酸医薬学会第 3 回年会 2017.7.13

福島雄大, 内田智士, 今井英明, 中富浩文, 片岡一則, 斉藤延人, 位高啓史. 虚血性脳神経疾患に対する mRNA 投与による神経保護治療、第 33 回日本 DDS 学会学術集会 2017.7.6

福島雄大, 内田智士, 今井英明, 中富浩文, 片岡一則, 斉藤延人, 位高啓史. mRNA 投与による虚血性脳神経疾患に対する神経保護治療. 遺伝子・デリバリー研究会第 17 回シンポジウム 2017.5.27

Keiji Itaka. mRNA-based therapeutics for intractable diseases and regenerative medicine. TIDES: Oligonucleotide&Peptide Therapeutics 2017.5.1

Yuta Fukushima, Satoshi Uchida, Hideaki Imai, Kazunori Kataoka, Nobuhito Saito, Keiji Itaka. mRNA-based therapy for cerebral ischemia -Enhanced neuroprotective effects of astrocytes by BDNF mRNA-. The 2nd Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury JUFBI 2017, 2017.4.16

Yuta Fukushima, Hideaki Imai, Satoshi Uchida, Hirofumi Nakatomi, Kazunori Kataoka, Keiji Itaka, Nobuhito Saito. Transient BDNF introduction therapy against delayed neuronal death in hippocampal CA1 neurons using biocompatible nanomicellar mRNA carrier. 28th Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, 2017.4.2

Keiji Itaka. mRNA delivery using nano drug delivery systems for intractable diseases and regenerative medicine. Emerging Therapeutics Summit (ETS '16) 2016.11.25

位高啓史. mRNA 医薬品の開発と治療応用に向けた戦略 mRNA-based therapeutics for treating various diseases. 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.15

位高啓史. メッセージーRNA 医薬を実現する DDS 開発と疾患治療への応用. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016.7.1

Keiji Itaka. mRNA delivery using nano drug delivery systems for intractable diseases and regenerative medicine. Ireland-Japan Biomaterials & Tissue Engineering Meeting. 2016. 6.23

21 Keiji Itaka. mRNA-based therapeutics using nanoDDS for intractable diseases and serious injury. 日米爆傷フォーラム JUFBI 2016 (Japan-US Forum on Blast Injury 2016) 2016.6.14

22 位高啓史. ナノ DDS を用いた mRNA デリバリーとその応用. 第 63 回日本実験動物学会総会 (大会) 2016.5.19

23 位高啓史. 新しいバイオ医薬品としてのメッセージーRNA の可能性. 第 15 回国際バイオテクノロジー展 (BIOTech2016) 2016.5.13

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/biofunctions/biofunctions-j.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 今井英明

ローマ字氏名: IMAI Hideaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。