

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K20086

研究課題名(和文)3次元培養幹細胞由来の細胞外小胞体を用いた疾患治療因子の探索

研究課題名(英文) Determination of therapeutic factors using extracellular vesicles secreted from 3D-cultured stem cells

研究代表者

内田 智士(Uchida, Satoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20710726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植治療では、分泌する細胞外小胞(EV)が治療に大きな役割を果たしている。そこで、EVに優れた治療因子が含まれているのではないかと考えた。ここで、3次元培養することで細胞の治療機能が向上することから、3次元培養間葉系幹細胞(MSC)が分泌したEVと従来の2次元培養したMSCが分泌したEVを網羅的に比較したところ、抗炎症作用、骨分化誘導作用といった治療作用を持つマイクロRNA(miRNA)が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、細胞移植治療のメカニズム解明に繋がるだけでなく、細胞を使わない再生医療の実現に資する。細胞移植は優れた治療効果を示すものの、経済的コストや安全性に課題を残す。今回、移植細胞が分泌するEVに含まれる、高い治療効果を持つmiRNAを同定することに成功した。このmiRNAを治療薬として用いることで、細胞移植を行うことなく、同等の治療効果が得られる可能性がある。このことで、これまで重篤な疾患が主な対象であった再生医療を、より幅広い疾患へと応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In cell transplantation therapy, extracellular vesicles (EVs) secreted by the cells play significant therapeutic roles. This motivated us to study EVs for determining potent therapeutic factors. We focused on EVs secreted from MSCs in three-dimensional culture, which showed enhanced therapeutic effect compared to MSCs in conventional two-dimensional culture. Comprehensive comparison between EVs secreted from MSCs in two- and three-dimensional culture allowed us to determine various microRNAs possessing therapeutic functionalities, including anti-inflammatory and osteogenetic effects.

研究分野：核酸医薬

キーワード：細胞外小胞 3次元培養 細胞移植治療 再生医療 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

細胞移植治療は、難治性疾患治療の可能性を開き、再生医療の中核をなす手法として注目されている。細胞移植治療の作用メカニズムは、まだ十分には解明されていないが、多くの場合、移植細胞が生体組織に組み込まれ機能するだけでなく、移植細胞からの分泌物が治療へ大きく寄与していることが示唆されている。なかでも近年、エクソソームや微小小胞体(microvesicle, MV)をはじめとした細胞外小胞体(Extracellular vesicle, EV)の重要性が明らかとなっており、実際に、種々の疾患に対して EV を投与するだけで優れた治療効果が得られている[1]。エクソソームはエンドソーム膜より、MV は細胞膜よりそれぞれ出芽し、細胞間シグナル伝達に関わっている。EV は miRNA、mRNA などの核酸やタンパク質を内包しており、これらが、細胞移植における EV の治療メカニズムに関与していることはほぼ確実であるが、具体的な治療因子の同定はほとんど行われていない。ここで、EV の優れた治療作用を鑑みると、EV に含まれる因子を解析することで、疾患治療に重要な役割を果たす因子を発見できるのではないかと考えた。

このような解析の際、EV を分泌する細胞の状態は極めて重要である。従来の細胞移植や EV の研究では、主に単層平面培養した細胞が用いられてきたが、生体内で細胞が存在する環境を考慮すると、3次元細胞培養を行うことでより優れた解析が期待できる。実際に、我々は、微細加工プレートを用いた3次元培養システムの開発、及びその疾患治療への応用に取り組んできた。間葉系幹細胞(MSC)をスフェロイド化することで、様々な治療因子の分泌が促進され、結果的に、マウス脊髄損傷モデルにおいて、MSC スフェロイドの移植が、単層培養 MSC の移植と比べ優れた治療効果を有することを見出した[2]。この論文では、分泌型タンパク質に着目し、メカニズム解析を行ったが、EV が細胞性移植治療において重要な役割を果たしていることを踏まえると、MSC スフェロイド由来の EV は、単層培養由来の EV と比べて優れた治療機能を持ち、それが脊髄損傷治療に寄与したのではないかと想定された。そこで、MSC スフェロイド由来 EV を、単層培養 MSC 由来 EV と比較することで詳細に解析し、疾患治療に関与する治療因子を同定することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、MSC スフェロイド由来 EV を解析することで疾患治療に重要な因子を同定することを目的とした。このような解析は、疾患の病態解明に資するだけでなく、細胞移植のメカニズム解明に繋がるが、この点は実用的な観点でも重要である。例えば、移植細胞の培養条件、移植数や移植の時期、部位などは従来経験的に決められてきたが、メカニズム解明を行うことでより論理的に治療戦略を構築できる。また、移植細胞の品質評価は治療において重要であるが、適切な指標がなく困難であった。本研究で治療に重要な因子が明らかになれば、その定量は品質の良い指標となる。

また、本研究は細胞移植の効果を代替する新規治療法の開発にも重要である。細胞移植は難治性疾患に対して優れた治療法になる一方で、細胞を採取し、増殖させ、移植するまでの過程には莫大な費用が必要となるほか、移植細胞のがん化など安全面での懸念もある。したがって、その適応は限られてしまう。一方で、本研究で同定した優れた治療因子を、核酸デリバリーなど他の手法で生体へ導入することで治療効果が得られた場合、細胞移植の適応とならない多くの場面で優れた治療法となり得る。さらに、本研究を遂行する中で、疾患治療における EV やスフェロイドに対してより深い基礎的、学術的な知見が得られることも期待された。

3. 研究の方法

(1) MSC スフェロイド由来 EV と単層培養 MSC 由来 EV の治療機能

MSC を播種して3日後に培地を無血清の Opti-MEM に置換し、その後2日間培養した後、培地を回収した。EV の回収は超遠心にて行った。2000g×15min および 12000g×100min にて、細胞残渣など、より大きな成分を取り除いた上で、110000g×200min を2回行い、沈殿物を EV として回収した。EV の物性解析は、ナノサイト(Malvern 社)にて粒子をトラッキングして、ブラウン運動から評価した。機能評価では、インターロイキン(IL)-6 やオステオカルシンの発現は定量 PCR 法で、アルカリホスファターゼ(ALP)の発現は ALP assay kit (Takara)にて行った。

(2) MSC スフェロイド由来 EV と単層培養 MSC 由来 EV に含まれる miRNA の比較 化学物質評価研究機構にて Agilent 社ヒトマイクロアレイにて miRNA 解析を行った。

(3) 同定した miRNA の機能評価

同定した miRNA の抗炎症機能を調べた。その際、炎症反応が生じると NFkB 活性化に応じて secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP)を発現する細胞(Invivogen 社)を用いた。リポ多糖にて炎症を惹起し、同時に miRNA を Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher 社)を用いて投与し、24時間後に SEAP 発現を定量した。

(4) スフェロイド培養条件と EV 産生に関する検証

Sumilon(住友ベークライト社)の低接着性 U 底プレートに対して、様々な数の MSC を播種することで、大きさの異なるスフェロイドを調製した。

4. 研究成果

(1) MSC スフェロイド由来 EV と単層培養 MSC 由来 EV の治療機能

本研究を提案する段階での予備検討で、MSC スフェロイド由来 EV が単層培養 MSC 由来 EV と比べ、より優れた治療機能を示す可能性が示唆されていたが、本研究では、まずより詳細な実験にて、その結果の妥当性を検証した。

ここで、MSC スフェロイドは、径 100 μm の細胞接着面の周りをポリエチレングリコール(PEG)が覆う非接着面が取り囲む微細加工プレートを用いて調製した(図 1)[3]。MSC スフェロイドと単層培養 MSC の培養上清より超遠心を用いて EV を回収し、ナノサイトにてその粒径、個数を評価した。すると、粒径は両群ともほぼ同等であったが、EV 数はスフェロイド群で 1.6 倍多かった。

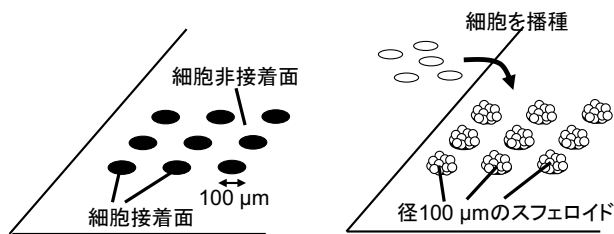


図1 微細加工プレートを用いたスフェロイド作製

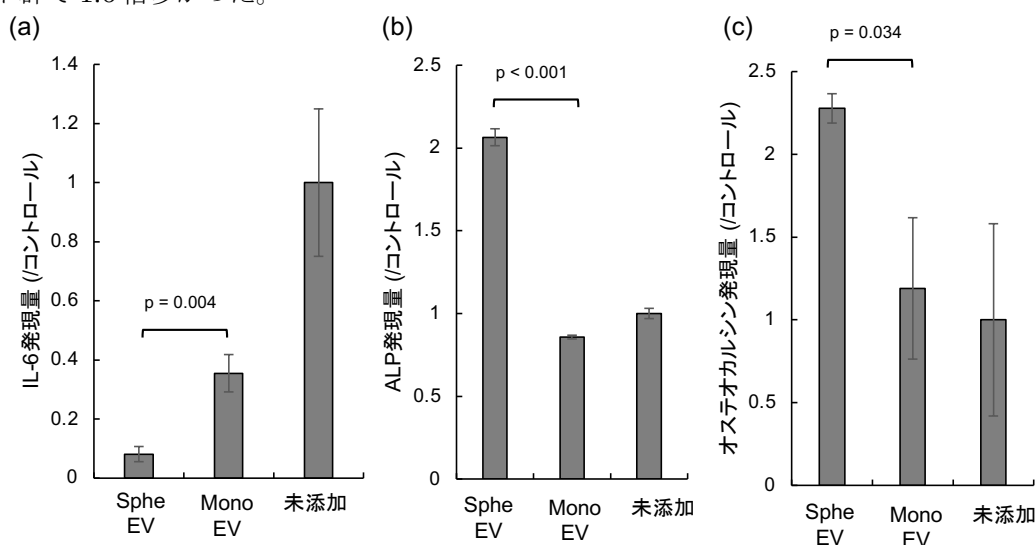


図2 MSCスフェロイド由来EV (Sphe EV)と単層培養MSC由来EV (Mono EV)の機能評価。(a) 抗炎症作用。(b, c)骨分化誘導作用。

次に、単層培養した MSC に対して、炎症因子である腫瘍壊死因子(TNF)- α と MSC 由来 EV を添加し、その後の MSC における炎症反応をインターロイキン(IL)-6 の産生を評価した。すると、スフェロイド由来 EV、単層培養由来 EV 共に抗炎症作用を示したが、スフェロイド由来 EV の方がより強い効果が得られた(図 2a)。

さらに、骨分化誘導能を調べた。ここで、ラット骨欠損部に対して、MSC スフェロイドを移植した場合の方が、単層培養 MSC を移植した場合と比べ、有意に骨分化が促進されることを報告しており[4]、MSC スフェロイド由来の EV が優れた骨分化誘導能を有することが期待された。単層培養した MSC に対して、スフェロイド由来 EV、単層培養由来 EV を週 1 回添加した。2 週間後に骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の発現を調べたところ、スフェロイド由来 EV で、未処置群や、単層培養由来 EV 添加群と比べ高い ALP 産生が観られた(図 2b)。さらに、4 週間後に、より特異的な骨分化マーカーであるオステオカルシンの発現を調べたところ、同様に、スフェロイド由来 EV で、未処置群や、単層培養由来 EV 添加群と比べ高いオステオカルシン発現誘導が観られた(図 2c)。

以上のように、MSC スフェロイド由来 EV で、単層培養 MSC 由来 EV と比べ高い抗炎症作用や、骨分化誘導能が得られた。これは、本研究の基盤をなす成果である。

(2) MSC スフェロイド由来 EV と単層培養 MSC 由来 EV に含まれる miRNA の比較

次に、MSC スフェロイドおよび単層培養 MSC の培養上清を用いて miRNA 解析を行った(図 3)。スフェロイド群で発現が上昇したものとスフェロイド群でのみ発現が観られたものが 80 種類あった。過去の文献からその機能を調べたところ、生存、細胞死に関わるもの、炎症を抑制するもの、骨分化を誘導するものが観られた。逆に、単層培養群で発現が上昇したものと単層培養群でのみ発現が観られたものが 26 種類あり、生存、細胞死に関わるもの、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)を抑制し、分化を抑制するものが観られた。この結果は、MSC スフェロイド由来 EV で、単層培養 MSC 由来 EV と比べ高い抗炎症作用や、骨分化誘導能が得られる

という図2の結果と矛盾しない。また、発現量が高く、更にスフェロイドと単層培養で大きく発現量が異なる miRNA の中で、論文レベルでの報告のない miRNA も多数あった。これらの因子は疾患治療に重要な役割を果たす可能性が高く、我々の戦略が新たな治療因子を発見する方法論として有用であることも示された。

(3) 同定した miRNA の機能評価

(2) にてスフェロイド群で高発現した2種類の miRNA (miR125b-1, miR146b) の抗炎症作用を評価した。ここでは、LPS を用いて培養マクロファージを活性化させ、そこに miR125b-1 と miR146b を添加した。すると、一方のみを添加しても、抗炎症作用が観られたが、両方ともを添加することで、その作用が増強した(図4)。

miRNA アレイにて同定した治療因子が実際に機能することが示された。

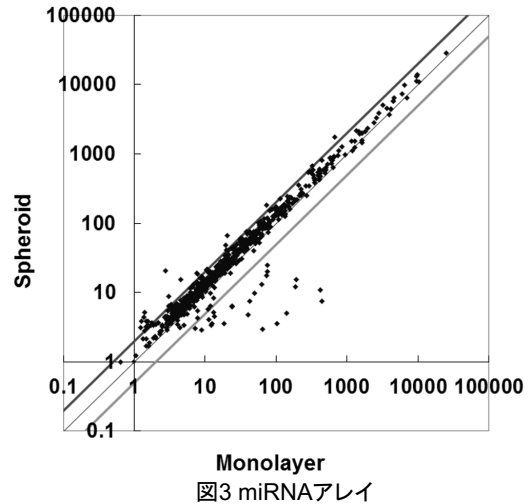


図3 miRNAアレイ

(4) スフェロイド培養条件と EV 産生に関する検証

最後に、スフェロイド培養条件と EV 産生に関する検証も行った。低接着性 U 底培養プレートに対して、細胞数を変えて播種することで、様々な大きさのスフェロイドを調製した(図5a)。大きさが約 400 μm, 700 μm, 900 μm のスフェロイドが調製された。そこから産生される EV の大きさ、個数を調べたところ、スフェロイドのサイズが大きくなるにつれて、EV の大きさが小さくなり、さらに 1 細胞あたりの EV 産生数も低下することが明らかとなった(図5b,c)。スフェロイド内部の細胞壊死などが、EV 産生機能に影響している可能性がある。

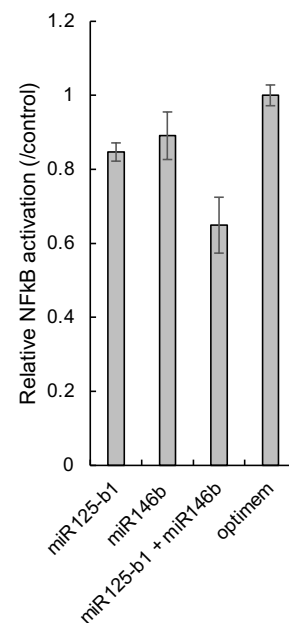


図4 同定したmiRNAの抗炎症作用

(5) まとめ、将来展望

本研究では、細胞移植治療の効果に大きく関与する EV を解析することで、治療因子の同定し、さらには同定した因子の疾患治療への可能性を検証した。その際、MSC スフェロイドが単層培養 MSC と比べ、細胞移植において優れた機能を示していたことから、MSC スフェロイドと単層培養 MSC が産生する EV の違いに着目した。実際に、MSC スフェロイド由来 EV で、単層培養 MSC 由来 EV と比べ、より効率的な抗炎症作用や、骨分化誘導能が得られた(図2)。そこで、それぞれの EV に含まれる miRNA の違いを miRNA アレイにて評価したところ、炎症反応や骨分化誘導に関わる様々な miRNA が同定された(図3)。そこで同定された因子は実際に抗炎症機能を示した(図4)。この一連の結果は、スフェロイド

由来 EV と単層培養由来 EV を比較することで新たな治療因子を同定できる可能性を示しており、今後、骨分化や炎症反応以外の機能の検証や、MSC 以外の細胞種での検証等にも発展できる汎用的な手法である。特に、今回、発現量が多いものの機能解析がこれまで行われてこなかったような miRNA も多数同定された点は、特筆すべきであり、新たな治療因子の探索手法としての可能性も示された。

今回、スフェロイド由来 EV と単層培養由来 EV の機能が全く異なることが示されたが(図2)、この点は細胞の状態が

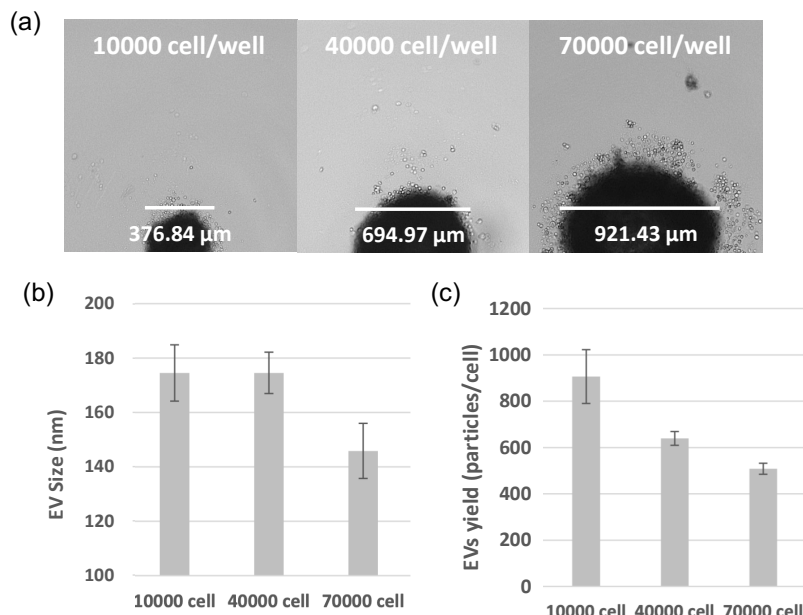


図5 MSCスフェロイド培養条件のEV産生への影響。(a) 細胞播種数を変えることで、様々な大きさのスフェロイドを調製。(b, c) EV産生への影響。

EV の機能に反映されることを示している。実際に、スフェロイドの大きさを変えるだけでも、産生される EV の大きさや数に影響した(図 5)。このことは、移植に用いる細胞の品質管理に、EV を用いることができる可能性も示している。特に近年、miRNA 解析技術が進歩したことを踏まえると、簡便かつ効果的な評価による品質管理が期待される。

図 4 では、同定した miRNA が、治療機能を示したが、このことは、細胞移植と同等の効果を他のモダリティにおいて得られる可能性を示している。細胞移植は、一部の疾患に対して非常に大きな効果が期待される反面で、経済的コストが高いこと、品質管理が難しいこと、さらに移植した細胞の体内での挙動が予測できず、意図しない副反応を生じる可能性があることなど課題も大きい。したがって、より多くの疾患において再生医療を実現するためには、細胞移植から学び、細胞を使わない治療方法を開発する必要がある。今回、細胞移植の機能を miRNA で実現したことは、この戦略の proof of concept となる。なお、miRNA のような核酸医薬を治療に用いるためには、その送達システムが必要となるが、我々はその開発に多くの知見を有する[5, 6]。そこで、今後、今回得られた知見を独自の核酸送達技術と融合することで、細胞を用いない汎用性に優れた再生医療を実現したい。

<引用文献>

- [1] S. Rani, A.E. Ryan, M.D. Griffin, T. Ritter, Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications, *Mol. Ther.*, 23 812-823 (2015).
- [2] S. Uchida, K. Hayakawa, T. Ogata, S. Tanaka, K. Kataoka, K. Itaka, Treatment of spinal cord injury by an advanced cell transplantation technology using brain-derived neurotrophic factor-transfected mesenchymal stem cell spheroids, *Biomaterials*, 109 1-11 (2016).
- [3] H. Otsuka, A. Hirano, Y. Nagasaki, T. Okano, Y. Horiike, K. Kataoka, Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface, *ChemBiochem*, 5 850-855 (2004).
- [4] K. Yanagihara, S. Uchida, S. Ohba, K. Kataoka, K. Itaka, Treatment of Bone Defects by Transplantation of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cell Spheroids, *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 9 358-366 (2018).
- [5] S. Uchida, K. Kataoka, Design concepts of polyplex micelles for in vivo therapeutic delivery of plasmid DNA and messenger RNA, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 107 978-990 (2019).
- [6] S. Uchida, F. Perche, C. Pichon, H. Cabral, Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery, *Mol. Pharm.*, 17 3654-3684 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 25件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 A. Dirisala, S. Uchida, K. Toh, J. Li, S. Osawa, T. A. Tockary, X. Liu, S. Abbasi, K. Hayashi, Y. Mochida, S. Fukushima, H. Kinoh, K. Osada, K. Kataoka	4. 巻 6
2. 論文標題 Transient stealth coating of liver sinusoidal wall by anchoring two-armed PEG for retargeting nanomedicines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances_	6. 最初と最後の頁 eabb8133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abb8133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 K. Koji, N. Yoshinaga, Y. Mochida, T. Hong, T. Miyazaki, K. Kataoka, K. Osada, H. Cabral, S. Uchida	4. 巻 261
2. 論文標題 Bundling of mRNA strands inside polyion complexes improves mRNA delivery efficiency in vitro and in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2020.120332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Miyazaki, S. Uchida, H. Hatano, Y. Miyahara, A. Matsumoto, H. Cabral	4. 巻 140
2. 論文標題 Guanidine-phosphate interactions stabilize polyion complex micelles based on flexible cationomers to improve mRNA delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. Polym. J.	6. 最初と最後の頁 110028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eurpolymj.2020.110028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Miyazaki, S. Uchida, S. Nagatoishi, K. Koji, T. Hong, S. Fukushima, K. Tsumoto, K. Ishihara, K. Kataoka, H. Cabral	4. 巻 9
2. 論文標題 Polymeric Nanocarriers with Controlled Chain Flexibility Boost mRNA Delivery In Vivo through Enhanced Structural Fastening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Healthc Mater	6. 最初と最後の頁 e2000538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adhm.202000538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Uchida, F. Perche, C. Pichon, H. Cabral	4. 巻 17
2. 論文標題 Nanomedicine-Based Approaches for mRNA Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Pharm._	6. 最初と最後の頁 3654-3684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 S. Uchida, K. Yanagihara, A. Matsui, K. Kataoka, K. Itaka	4. 巻 11
2. 論文標題 mRNA as a Tool for Gene Transfection in 3D Cell Culture for Future Regenerative Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11040426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Ueki, S. Uchida, N. Kanda, N. Yamada, A. Ueki, M. Akiyama, K. Toh, H. Cabral, S. Sando	4. 巻 6
2. 論文標題 A chemically unmodified agonistic DNA with growth factor functionality for in vivo therapeutic application	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances_	6. 最初と最後の頁 eaay2801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay2801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Abbasi, S. Uchida, K. Toh, T.A. Tockary, A. Dirisala, K. Hayashi, S. Fukushima, K. Kataoka	4. 巻 332
2. 論文標題 Co-encapsulation of Cas9 mRNA and guide RNA in polyplex micelles enables genome editing in mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 260-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2021.02.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Fukushima, S. Uchida, H. Imai, H. Nakatomi, K. Kataoka, N. Saito, K. Itaka	4. 巻 270
2. 論文標題 Treatment of ischemic neuronal death by introducing brain-derived neurotrophic factor mRNA using polyplex nanomicelle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2021.120681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 N. Yoshinaga, S. Uchida, A. Dirisala, M. Naito, K. Osada, H. Cabral, K. Kataoka	4. 巻 330
2. 論文標題 mRNA loading into ATP-responsive polyplex micelles with optimal density of phenylboronate ester crosslinking to balance robustness in the biological milieu and intracellular translational efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 317-328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.12.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 B. S. Kim, S. Osawa, M. Naito, S. Ogura, R. Kamegawa, H. Ishida, H. J. Kim, S. Uchida, K. Miyata	4. 巻 3
2. 論文標題 A 50-nm-Sized Micellar Assembly of Thermoresponsive Polymer-Antisense Oligonucleotide Conjugates for Enhanced Gene Knockdown in Lung Cancer by Intratracheal Administration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1900123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adtp.201900123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. A. Tockary, W. Foo, A. Dirisala, Q. Chen, S. Uchida, S. Osawa, Y. Mochida, X. Liu, H. Kinoh, H. Cabral, K. Osada, K. Kataoka	4. 巻 13
2. 論文標題 Single-stranded DNA-packaged polyplex micelle as adeno-associated-virus-inspired compact vector to systemically target stroma-rich pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 12732-12742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.9b04676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 S. T. Crowley, Y. Fukushima, S. Uchida, K. Kataoka, K. Itaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Enhancement of motor function 1 recovery after spinal cord injury in mice by delivery of brain derived neurotrophic factor mRNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 465-476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 N. Yoshinaga, E. Cho, K. Koji, Y. Mochida, M. Naito, K. Osada, K. Kataoka, H. Cabral, S. Uchida	4. 巻 58
2. 論文標題 Bundling mRNA strands to prepare nano-assemblies with enhanced stability towards RNase for in vivo delivery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 11360-11363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201905203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Watanabe, K. Hayashi, K. Toh, H. J. Kim, X. Liu, H. Chaya, S. Fukushima, K. Katsushima, Y. Kondo, S. Uchida, S. Ogura, T. Nomoto, H. Takemoto, H. Cabral, H. Kinoh, H. Tanaka, M. R. Kano, Y. Matsumoto, H. Fukuhara, S. Uchida, M. Nangaku, K. Osada, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka	4. 巻 10
2. 論文標題 In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationomers to target cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09856-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 S. Kurimoto, N. Yoshinaga, K. Igarashi, Y. Matsumoto, H. Cabral, S. Uchida	4. 巻 24
2. 論文標題 PEG-oligoRNA hybridization of mRNA for developing sterically stable lipid nanoparticles toward in vivo administration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24071303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 C. -Y. Lin, S. T. Crowley, S. Uchida, Y. Komaki, K. Kataoka, K. Itaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Treatment of intervertebral disk disease by administration of messenger RNA encoding a cartilage-anabolic transcription factor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 162-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 S. Uchida, K. Kataoka	4. 巻 107
2. 論文標題 Design concepts of polyplex micelles for in vivo therapeutic delivery of plasmid DNA and messenger RNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biomed. Mater. Res. A	6. 最初と最後の頁 978-990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Dirisala, S. Uchida, T. A. Tockary, N. Yoshinaga, J. Li, S. Osawa, L. Gorantla, S. Fukushima, K. Osada, K. Kataoka	4. 巻 27
2. 論文標題 Precise tuning of disulfide crosslinking in mRNA polyplex micelles for optimizing extracellular and intracellular nuclease tolerability.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Drug Target.	6. 最初と最後の頁 670-680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2018.1550646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 M. Naito, Y. Otsu, R. Kamegawa, K. Hayashi, S. Uchida, H. -J. Kim, K. Miyata	4. 巻 20
2. 論文標題 Tunable non-enzymatic degradability of N-substituted polyaspartamide main chain by amine protonation and alkyl spacer length in side chains for enhanced messenger RNA transfection efficiency.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Technol. Adv. Mater.	6. 最初と最後の頁 105-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2019.1569818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 N. Yoshinaga, S. Uchida, M. Naito, K. Osada, H. Cabral, K. Kataoka	4. 巻 197
2. 論文標題 Induced packaging of mRNA into polyplex micelles by regulated hybridization with a small number of cholesteryl RNA oligonucleotides directed enhanced in vivo transfection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 255-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2019.01.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Matsui, S. Uchida, A. Hayashi, K. Kataoka, K. Itaka	4. 巻 285
2. 論文標題 Prolonged engraftment of transplanted hepatocytes in the liver by transient pro-survival factor supplementation using ex vivo mRNA transfection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2018.06.033	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Yanagihara, S. Uchida, S. Oba, K. Kataoka, K. Itaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Treatment of bone defects by transplantation of genetically modified mesenchymal stem cell spheroids.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Methods Clin. Dev.	6. 最初と最後の頁 358-366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2018.04.006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Satoshi, Yoshinaga Naoto, Yanagihara Kayoko, Yuba Eiji, Kataoka Kazunori, Itaka Keiji	4. 巻 150
2. 論文標題 Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 162 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2017.09.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshinaga Naoto, Ishii Takehiko, Naito Mitsuru, Endo Taisuke, Uchida Satoshi, Cabral Horacio, Osada Kensuke, Kataoka Kazunori	4. 巻 139
2. 論文標題 Polyplex Micelles with Phenylboronate/Gluconamide Cross-Linking in the Core Exerting Promoted Gene Transfection through Spatiotemporal Responsivity to Intracellular pH and ATP Concentration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18567 ~ 18575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b08816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anraku Y., Kuwahara H., Fukusato Y., Mizoguchi A., Ishii T., Nitta K., Matsumoto Y., Toh K., Miyata K., Uchida S., Nishina K., Osada K., Itaka K., Nishiyama N., Mizusawa H., Yamasoba T., Yokota T., Kataoka K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00952-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Dian-Jang, Kessel Eva, Lehto Taavi, Liu Xueying, Yoshinaga Naoto, Padari K?rt, Chen Ying-Chen, Kempter Susanne, Uchida Satoshi, R?dler Joachim O., Pooga Margus, Sheu Ming-Thau, Kataoka Kazunori, Wagner Ernst	4. 巻 28
2. 論文標題 Systemic Delivery of Folate-PEG siRNA Lipopolyplexes with Enhanced Intracellular Stability for In Vivo Gene Silencing in Leukemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioconjugate chemistry	6. 最初と最後の頁 2393 ~ 2409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.7b00383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 メッセンジャーRNAのCOVID-19ワクチンへの応用とその後の展望
3. 学会等名 2020年度 医療産業イノベーションフォーラム, (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 新型コロナウイルスや未来のパンデミックに対するmRNAナノワクチンの開発
3. 学会等名 第7回COINSシンポジウム ~小さく寄り添い大きく守る、未来の医療はすぐそこに~ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 RNAオリゴマーを用いたmRNA修飾法の開発とmRNA送達、ワクチンへの展開
3. 学会等名 核酸医薬シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Uchida, K. Koji, N. Yoshinaga, Y. Mochida, T. Hong, H. Cabral
2. 発表標題 mRNA bundling inside polyion complexes for their physical and biological stabilization
3. 学会等名 8th International mRNA Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Uchida
2. 発表標題 mRNA nanomachine for treating rare genetic disorders
3. 学会等名 India-Japan Webinar on "Rare Genetic Disorders" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 RNA構造に着目したメッセンジャーRNA 医薬の機能化
3. 学会等名 第69回 高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 DNA、mRNAのex vivo導入による細胞治療の効果向上
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Uchida, N. Yoshinaga, E. Cho, K. Koji, K. Kataoka, H. Cabral
2. 発表標題 Preparation of nanoassemblies from several mRNA strands for enhancing nuclease stability.
3. 学会等名 International Symposium on Biomedical Materials for Drug/Gene Delivery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Uchida
2. 発表標題 Development of mRNA polyplex micelles through engineering polymers and mRNA for in vivo therapeutic applications
3. 学会等名 IBS CNM Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S. Uchida, N. Yoshinaga, H. Cabral, K. Kataoka
2. 発表標題 Stabilization of mRNA polyplex micelles for in vivo delivery by engineering mRNA
3. 学会等名 2nd G' L'owing Polymer Symposium in KANTO
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 智士、吉永 直人、趙 オル、小路 恭子、長田 健介、片岡 一則、Horacio Cabral
2. 発表標題 複数のmRNA鎖を束ねることで生体内酵素分解を抑制させたmRNAナノ集合体の開発
3. 学会等名 第41回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Uchida
2. 発表標題 Nanoengineering mRNA through short RNA hybridization for biomedical application
3. 学会等名 1st Thailand-Australia-Japan Joint Research Meeting on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 智士、吉永 直人、趙 オル、小路 恭子、長田 健介、片岡 一則、Horacio Cabral
2. 発表標題 複数のmRNA鎖を束ねたナノ集合体の開発と生体内投与
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 智士、吉永 直人、趙 オル、小路 恭子、長田 健介、片岡 一則、Horacio Cabral
2. 発表標題 複数のmRNA鎖からなるナノ集合体を用いたmRNA安定化とその生体内投与
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Uchida, N. Yoshinaga, H. Cabral, K. Kataoka
2. 発表標題 Hybridization of mRNA with a small number of short cholesteryl RNA oligonucleotides for tight mRNA packaging to polyplex micelles.
3. 学会等名 19th Smposium for gene design and delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 智士、吉永 直人、長田 健介、位高 啓史、Horacio Cabral、片岡 一則
2. 発表標題 標題 コレステロール修飾相補鎖RNAを用いたmRNA搭載高分子ミセル安定化
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田 智士、位高 啓史、片岡 一則
2. 発表標題 免疫賦活化アジュバント機能一体型 2本鎖mRNAワクチン
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 高分子ミセルを用いた メッセージャー(m)RNA医薬の送達と 疾患治療への展開
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Uchida, Keiji Itaka, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Therapeutic application of mRNA delivery using polyplex micelles
3. 学会等名 Finland-Japan Workshop: The next generation medical engineering in biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Uchida, Keiji Itaka, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Incorporation of Immunostimulatory Property to Messenger RNA Molecule by Hybridizing RNA to Poly A Sequence for Effective Vaccination
3. 学会等名 21st annual meeting ASGCT (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田智士
2. 発表標題 高分子ミセルを用いたメッセージャーRNAデリバリー
3. 学会等名 理研シンポジウム：理研/iCONM/物材研 医工学ネットワーク (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田 智士、吉永 直人、柳原 歌代子、弓場 奨司、位高 啓史、片岡 一則
2. 発表標題 免疫賦活化能を向上させた2本鎖メッセンジャーRNAワクチンの開発
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田 智士、F. Perche、秋葉 宏樹、位高 啓史、津本 浩平、片岡 一則
2. 発表標題 mRNA搭載ナノミセルを用いた抗アミロイド 単鎖抗体導入によるアルツハイマー病治療
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田 智士、F. Perche、秋葉 宏樹、位高 啓史、津本 浩平、片岡 一則
2. 発表標題 抗アミロイド 単鎖抗体発現mRNA搭載ナノミセルを用いたアルツハイマー病治療
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ゲノム編集用ミセル	発明者 片岡 一則、内田 智士、アッパシ サエド	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-113434	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ

<http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp/suchida.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------