

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02589

研究課題名（和文）難治性呼吸器疾患に対する新規核酸医薬品の開発

研究課題名（英文）Development of new nucleic acid medicines for intractable respiratory diseases

研究代表者

佐々木 均（SASAKI, Hitoshi）

長崎大学・病院（医学系）・教授

研究者番号：00170689

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：全身投与および経肺投与可能な肺指向性ナノ粒子を基盤とした肺疾患治療薬の開発を行った。pDNAとカチオン性高分子、アニオン性高分子の最適な比率で混合することでナノ粒子を構築できた。ナノ粒子は静脈内投与および経肺投与後、肺で選択的に高い遺伝子発現を示した。さらに、このナノ粒子はsiRNAへも適応することができた。ルシフェラーゼを恒常発現させたマウスメラノーマ細胞にルシフェラーゼに対するsiRNA（siLuc）を内包したナノ粒子を添加した結果、ルシフェラーゼの発現を抑制した。さらに、メラノーマ肺転移モデルマウスにナノ粒子を静脈内投与した結果、コントロールと比較して有意に肺転移を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、全身投与および経肺投与により選択的に送達できるナノ微粒子の調製に成功した。このナノ微粒子はがん細胞にも良好に取り込まれ、遺伝子発現および抑制をすることができるため、肺がんあるいは肺転移がんに対する遺伝子・核酸医薬開発へ応用することが可能である。また、他の肺疾患にも応用が可能であるため、幅広く医療貢献ができる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed gene and nucleic acid medicines for lung disease based on lung-targeted nanoparticles by systemic or pulmonary administration. Nanoparticles could be constructed by optimizing the mixing ratio of pDNA, cationic compound, and anionic compound for self-assembly. Nanoparticles showed high gene expression in lung selectively after intravenous and pulmonary administration. In addition, the nanoparticles were also able to adapt to siRNA. As a result of adding nanoparticles containing siRNA to luciferase to luciferase expressing mouse melanoma cells, it was shown that they suppressed the luciferase expression. Furthermore, as a result of intravenous administration of nanoparticles to melanoma lung metastasis model mice, lung metastasis was significantly suppressed as compared with the control.

研究分野：製剤学、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：遺伝子デリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性呼吸器疾患は、国が調査・研究を強く推進する重点分野で、治療法の開発は喫緊の課題である。呼吸器疾患発症メカニズムでは種々の炎症関連物質が複雑に関与するネットワークを形成しており、治療薬の開発は困難を極めている。また、低分子薬物では全身投与後の肺への分布は極めて少なく、肺での滞留性も悪い。肺の障害に対する経肺投与では肺毒性が問題になり、十分な治療効果があり安全な薬物の開発には限界がある。近年、アンチセンス医薬や siRNA などの核酸医薬が、次世代治療薬として期待されている。核酸医薬は既存医薬品では標的できない分子を特異的に標的化でき、規格化・品質管理が容易で効果が高く、低分子医薬品と抗体医薬品の利点を併せ持つ。核酸医薬を組み合わせ、ネットワークのシグナルやタンパク質を同時に抑制することもできる。しかし、遺伝子・核酸医薬は安定性や膜透過性が極めて低く、細胞内への効率的な送達に難しい。とりわけ難治性呼吸器疾患においては肺選択的な安全な DDS 開発が必須となる。

申請者は、静脈内投与により肺選択的に遺伝子・核酸医薬を送達できるナノ微粒子製剤を開発した。さらに、経肺投与型の安全なナノ微粒子製剤開発にも成功し、血管側および気道側の両方向から肺選択的に遺伝子・核酸医薬を長期作用させる技術を確認した。

2. 研究の目的

研究代表者は、遺伝子・核酸医薬と食品・医薬品成分を、調製条件を制御することにより自己組織化させ、全身投与および経肺投与可能な肺指向性ナノ微粒子製剤のプロトタイプを開発した。本研究ではこの技術を基盤とし、未だ根治治療がない難治性呼吸器疾患に対する新規遺伝子・核酸医薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデル pDNA として、ヒトサイトメガロウイルス(CMV) プロモーターを有し、ホタルルシフェラーゼ (Luc) をコードした pCMV-Luc を用いた。pDNA、カチオン性化合物、アニオン性化合物を様々な比率で混合し、表面がアニオン性のナノ微粒子を構築した。各微粒子の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定し、電子顕微鏡で形態を観察した。また、アガロースゲル電気泳動により複合体の安定性を評価した。

(2) pCMV-Luc を含んだナノ微粒子を静脈内投与し、24 時間後に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺を摘出し、組織中の遺伝子発現量を測定した。

(3) pCMV-Luc を含んだナノ微粒子を経肺投与し、24 時間後に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺を摘出し、組織中の遺伝子発現量を測定した。

(4) ルシフェラーゼに対する siRNA (siLuc)、カチオン性化合物、アニオン性化合物を様々な比率で混合し、表面がアニオン性のナノ微粒子を構築した。各微粒子の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定し、電子顕微鏡で形態を観察した。また、アガロースゲル電気泳動により複合体の安定性を評価した。

(5) ルシフェラーゼ恒常発現マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 細胞 (B16-F10/Luc) に蛍光標識した siRNA を含んだナノ微粒子をトランスフェクションを行い、細胞取り込みを評価した。また、siLuc を含んだナノ微粒子を用いて遺伝子発現抑制効果を評価した。

(6) がんの増殖に関与しているタンパク質に対する siRNA とカチオン性化合物、アニオン性化合物を組み合わせナノ微粒子を調製し、マウスメラノーマ細胞株に対する各タンパク質の抑制効果を *in vitro* で評価した。また、ナノ微粒子の毒性を WST-8 により評価した。

(7) B16-F10/Luc をマウスの尾静脈より投与し、メラノーマ肺転移モデルマウスを作製した。モデルマウスに 5% 糖液 (コントロール) naked siRNA、siRNA を含んだナノ微粒子、scramble siRNA (効果のない siRNA) を含んだナノ微粒子を投与し、肺転移抑制効果を *in vivo* imaging で評価した。

4. 研究成果

pDNA とカチオン性化合物、アニオン性化合物を様々な比率で混合させた結果、ナノサイズの微粒子を構築できる最適な比率を見出すことができた。調製したナノ微粒子の粒子径と表面電荷をゼータサイザーで測定した結果、粒子径約 100 nm のアニオン性微粒子を形成していることが明らかになった。さらに電子顕微鏡により球状であることが確認できた。電気泳動により安定性を評価した結果、pDNA の放出は認められず、安定に pDNA を内包していることが示された。

pCMVLuc を内包したナノ微粒子製剤をマウスへ尾静脈内投与後の、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現を測定した結果、肺において選択的に遺伝子発現を示した(図1)。また、in vivo imaging においても、肺での発現が観察された。

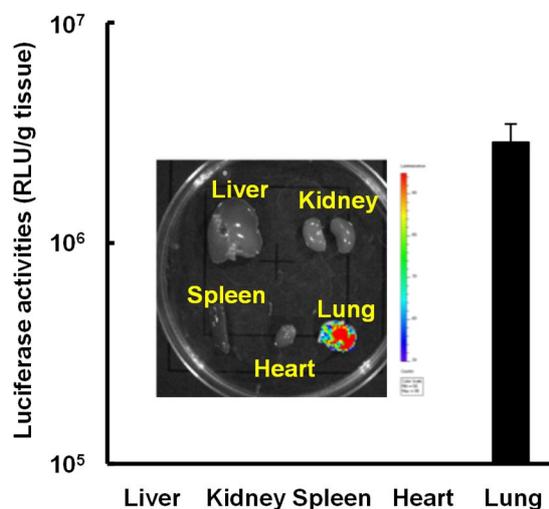


図1 ナノ微粒子製剤をマウスへ尾静脈内投与後の各臓器における遺伝子発現

さらに、pCMV-Luc を内包したナノ微粒子製剤をマウスへ経肺投与後の、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現を測定した結果、肺において選択的に遺伝子発現を示した(図2)。

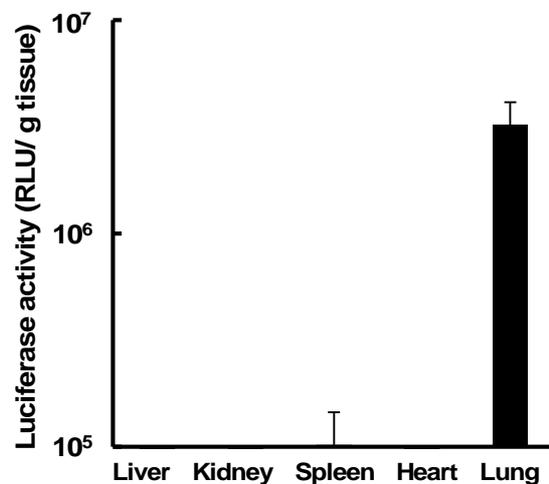


図2 ナノ微粒子製剤をマウスへ経肺投与後の各臓器における遺伝子発現

次に、このナノ微粒子を small interfering RNA (siRNA) へ応用した。pDNA と比較して分子量が小さく静電的結合力が弱いため、全く同様の方法では調製ができなかったが、調製条件を整理して siRNA とカチオン性化合物、アニオン性化合物を自己組織化させることでナノサイズの製剤を調製することができた。調製した製剤は粒子径約 100nm のアニオン性微粒子であった。また、電気泳動を行った結果、siRNA が微粒子内に内包されているのが確認でき、電子顕微鏡で球状の形態であることが観察できた。ルシフェラーゼを恒常発現させたマウスメラノーマ細胞株 (B16-F10/Luc) を作成し、蛍光標識した siRNA を含んだナノ微粒子を用いて微粒子の取り込みを評価した結果、naked の siRNA は細胞に取り込まれなかったのに対し、ナノ微粒子は高効率に細胞に取り込まれていた(図3)。また、siLuc を含んだナノ微粒子を用いて遺伝子抑制を評価した。その結果、高い遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかになった。また、この微粒子は細胞毒性や血液毒性も示さなかった。さらに、この微粒子に蛍光標識した siRNA を含んだナノ微粒子をマウスに尾静脈内投与し、臓器中の遺伝子分布を評価した結果、肺において高い分布を示した。また、経肺投与後の臓器中遺伝子分布の評価も行った。その結果、経肺投与においても肺に選択的に遺伝子を集積できることが示された。

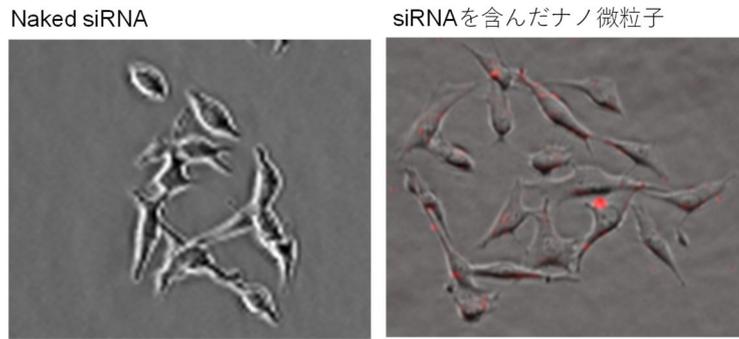


図 3 siRNA を含んだナノ微粒子の細胞内取り込み

最後に、メラノーマ肺転移モデルマウスを用いて、がんの増殖に関与しているタンパク質に対する siRNA を含んだナノ微粒子の肺転移抑制効果を調べた。Control、naked siRNA、scramble siRNA ナノ微粒子を投与されたマウスでは肺での発光が観察されたのに対し、siRNA 内包ナノ微粒子を投与されたマウスでは肺での発光がほとんど観察されなかった。摘出した肺においても siRNA 内包ナノ微粒子を投与されたマウスではメラノーマ細胞が観察されなかったが、その他の群では多くのメラノーマ細胞が認められた。また、このナノ微粒子は血液毒性も示さなかった。

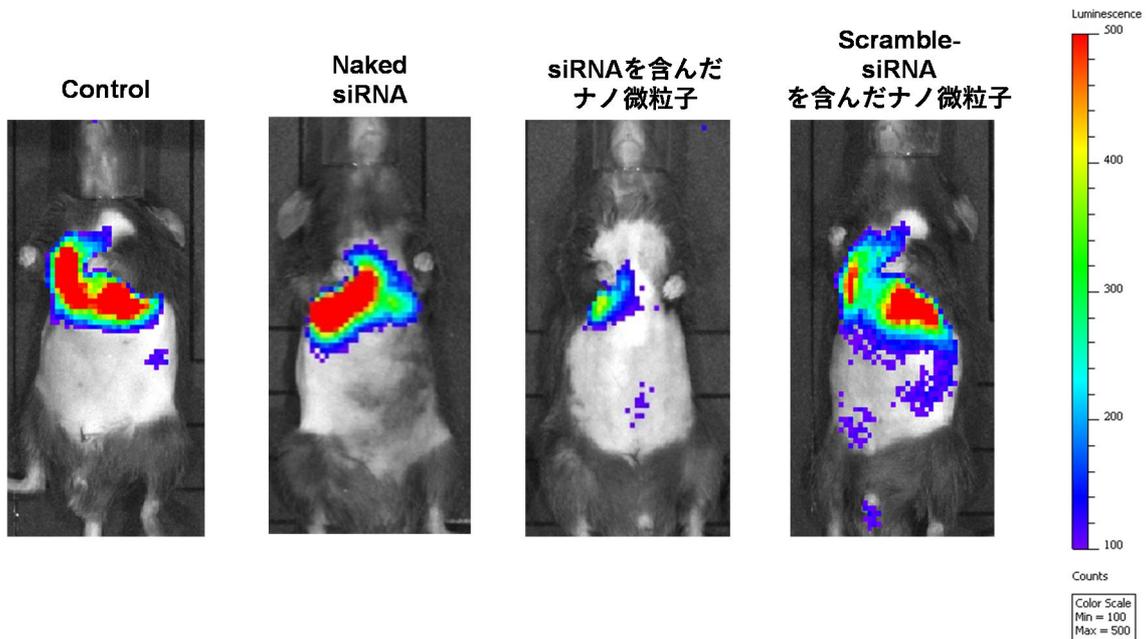


図 4 ナノ微粒子を尾静脈内投与後のメラノーマ肺転移モデルマウスに対する肺転移抑制効果

本研究により、全身投与および経肺投与により選択的に送達できるナノ微粒子の調製に成功した。このナノ微粒子はがん細胞にも良好に取り込まれ、遺伝子発現および抑制をすることができるため、肺がんあるいは肺転移がんに対する遺伝子・核酸医薬開発へ応用することが可能である。今後、他の肺疾患にも応用していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kodama Y, Hanamura H, Muro T, Nakagawa H, Kurosaki T, Nakamura T, Kitahara T, Kawakami S, Nakashima M, Sasaki H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Gene delivery system of pDNA using the blood glycoprotein fetuin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 604-609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1061186X.2017.1405425	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 Kodama Y, Nishigaki W, Nakamura T, Fumoto S, Nishida K, Kurosaki T, Nakagawa H, Kitahara T, Muro T, Sasaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Splenic Delivery System of pDNA through Complexes Electrostatically Constructed with Protamine and Chondroitin Sulfate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 342-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-00667	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 Kodama Y, Noda R, Sato K, Harasawa H, Kurosaki T, Nakagawa H, Nakamura T, Kitahara T, Muro T, Sasaki H	4. 巻 41
2. 論文標題 Methotrexate-Coated Complexes of Plasmid DNA and Polyethylenimine for Gene Delivery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1537-1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00144	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 Kodama Y, Nakashima M, Nagahara T, Oyama N, Hashizume J, Nakagawa H, Harasawa H, Muro T, Kurosaki T, Yamashita C, Hashida M, Kitahara T, Sasaki H, Kawakami S, Nakamura T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a DNA Vaccine for Melanoma Metastasis by Inhalation Based on an Analysis of Transgene Expression Characteristics of Naked pDNA and a Ternary Complex in Mouse Lung Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12060540	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 Hamada E, Kurosaki T, Hashizume J, Harasawa H, Nakagawa H, Nakamura T, Kodama Y, Sasaki H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Anionic Complex with Efficient Expression and Good Safety Profile for mRNA Delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010126	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸田 由佳理, 兒玉 幸修, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 大腸がん腹膜播種に対するMDM2-siRNA複合体の有効性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝 由香莉, 兒玉 幸修, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 c-Myc-siRNA三重複合体によるメラノーマ増殖抑制に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大倉 真生, 兒玉 幸修, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 大腸がん腹膜播種に対するVEGF-siRNAナノ粒子の開発
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 柿木 優希, 兒玉 幸修, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 生体分解型siRNAベクターの構築と有用性評価
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 岡田 明莉, 兒玉 幸修, 北原 隆志, 佐々木 均
2. 発表標題 VEGF-siRNA複合体によるメラノーマ肺転移の抑制
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 黒崎 友亮, 兒玉 幸修, 中川 博雄, 中村 忠博, 大山 要, 中嶋 幹郎, 川上 茂, 佐々木 均
2. 発表標題 静電的相互作用を基盤としたaptamer被膜型遺伝子ベクターの開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱田 英里, 黒崎 友亮, 兒玉 幸修, 室 高広, 中村 忠博, 佐々木 均
2. 発表標題 RNAワクチン開発を目的としたmRNA内包三元複合体の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 肺指向性薬物送達体	発明者 佐々木均、兒玉幸修、川上茂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-098677	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 経肺投与用薬物送達体	発明者 佐々木均、兒玉幸修、川上茂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-099112	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	中村 忠博 (NAKAMURA Tadahiro) (60882199)	長崎大学・病院(医学系)・技術職員 (17301)	
研究分担者	川上 茂 (KAWAKAMI Shigeru) (20322307)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301)	
研究分担者	山下 親正 (YAMASHITA Chikamasa) (30622188)	東京理科大学・薬学部薬学科・教授 (32660)	
研究分担者	黒崎 友亮 (KUROSAKI Tomoaki) (00582016)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教 (17301)	
研究分担者	室 高広 (MURO Takahiro) (10832834)	長崎大学・病院(医学系)・技術職員 (17301)	

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
---------	---------