

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18379

研究課題名(和文)筋組織への効果的な薬物送達を目指した分子設計および薬物輸送システムの構築

研究課題名(英文)Fabrication of drug delivery systems targeting muscle tissues

研究代表者

内藤 瑞(Naito, Mitsuru)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：50755329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、一般的に、薬物送達効率が極めて低いとされている全身の筋組織(骨格筋および心筋)に、核酸医薬などの次世代中分子医薬品を送達することを目的として、分子サイズを精密制御した薬物送達システムの開発を行った。その結果、10~20nmの水溶性分子が、10 nm以下の分子と比べて腎排泄が抑制され、また、20 nm以上の分子と比べて筋組織への浸透性が亢進していることが確認され、筋組織への薬物送達システムのプラットフォームとして有用であることが実証された。さらに、開発した薬物送達システムに核酸医薬を搭載したところ、核酸医薬単独と比べて約6倍の集積効率を示すことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度の筋疾患は運動機能や心肺機能の著しい低下を伴い、致死性の高い疾患であり、アンメットメディカルニーズとして治療方法の開発が強く求められている。本研究は、筋疾患に対する新たな治療戦略を提案するものであり、社会的意義は極めて高いものである。また、近年の抗体医薬や核酸医薬などの中分子医薬の研究開発に伴い、中分子医薬品の体内分布における体系的な研究が求められている。この点において、本研究は中分子医薬品の分子サイズ域を網羅するサイズの分子の体内動態分布を明らかにするものであり、薬理的に今後の医薬品開発において極めて重要な知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：In this grant program, I fabricated a muscular tissues (skeletal muscle and heart muscle) targeted oligonucleotide delivery system by precisely modulating molecular hydrodynamic diameter of the delivery system. As a result, I successfully I confirmed that newly synthesized hydrophilic polymers with 10 to 15 nm in diameter showed both suppressed kidney elimination compared with below that with 10 nm in diameter and enhanced extravasation into muscular tissues compared with over 15 nm in diameter. These results indicates that the newly synthesized size-tuning system is a promising platform for muscular targeted drug delivery. Moreover, I loaded oligonucleotide therapeutics (siRNA) to the delivery system with sub-20 nm in diameter, and the siRNA-loaded delivery system demonstrated 6 times high accumulation amount compared with naked siRNA.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：薬物送達システム 核酸医薬 筋疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の特定の組織へと選択的に薬物を送達するシステム(DDS)は、薬物送達効率が低い組織に対する治療効果の改善や、副作用や薬剤投与量の軽減が期待されるとして、国内外で山間に研究開発が行われている。特に、固形がんや肝臓を標的としたDDSの注目度は高く、抗がん剤や核酸医薬のDDSが広く研究されている。一方、現状のDDSの標的組織は固形がんや肝臓に限定されており、それ以外の臓器に対しては有効な薬物送達の方法論が確立されていなかった。中でも、心筋や骨格筋といった筋組織は、体重の40%を占める人体で最も大きい組織でありながら、血流中へと投与した薬剤の組織への移行効率は低く、筋組織を標的とした有効なDDSは報告されていなかった。さらに、重篤な筋疾患は自発的な運動機能や心肺機能が制限されることから、極めて致死性の高い重篤な状態を呈することが多い。このため、筋組織を標的とした薬物送達技術の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、全身へと筋組織への薬物送達効率を改善しうる送達技術の開発を行った。さらに、遺伝性の筋疾患である筋ジストロフィー症疾患治療を目指し、治療用核酸医薬の筋組織への送達効率の改善を行った。

3. 研究の方法

本研究では、送達システムの分子サイズの精密制御に基づく薬物動態制御を行うことで、筋組織への薬物送達効率の改善を試みた。具体的には、まず、薬物送達システムの担体として、ポリエチレングリコールを側鎖に有するグラフト型高分子を設計し、組織深部への浸透性が期待される30nm以下の分子サイズを精密制御した合成高分子を合成した。続いて、種々の分子サイズを有する合成高分子をモデル動物(マウス)へと静脈内へ投与し、体内の主要な臓器間の動態分布を評価した。さらに、筋組織へと優れた集積性を示した分子サイズ域の核酸医薬送達キャリアを2種類調製し、機能の評価した。1つ目はサイズを任意に調節可能であり、かつ、治療用の核酸医薬を化学結合によってコンジュゲートしたサイズ制御型の核酸送達システムである。もう一方は、分子サイズは~20nmに固定されているが、核酸医薬を静電的に搭載したポリイオンコンプレックス型の微小な核酸送達システムである。各々の送達システムに対して、筋組織への核酸医薬の集積性および標的遺伝子発現の抑制効率を核酸医薬単独投与と比較することで、筋組織を標的とした薬物送達システムの分子設計および核酸医薬送達システムとして有用性を検証した。

4. 研究成果

まず、筋組織へと集積可能な分子サイズを評価するため、組織深部への浸透性が期待される30nm以下の薬物送達システムの担体として、水溶性の生体適合性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を側鎖に有するグラフト型高分子を合成した(図1)。主鎖には生体分子のアミノ酸の重合体であるポリアスパラギン(重合度100)を使用した。グラフト型高分子の側鎖には、PEGの分子量(2,000, 5,000, 12,000, 20,000, 40,000)および導入するPEGの本数を制御しながら導入し、分子サイズの制御を行った。合成したグラフト型高分子の分子サイズ(流体力学直径)は、蛍光相関分光法をもちいて、グラフト型高分子へと導入した蛍光色素の水溶液中の運動を解析することで算出した。その結果、導入したPEGの合計分子量(~100,000 Da)に応じて分子サイズ5~25nmの間で1nmピッチで極めて精密に制御可能であることが確認された(図2)。この結果は、1本鎖のPEGよりもより高密度にPEGが充填されていることを示しており、精密なサイズ制御に加え、生体内で高いステルス性を示すことが期待される。また、この分子のサイズ域は、生体内のたんぱく質や抗体などの生体中分子のサイズ域をカバーしており、次世代医薬品の薬物動態を評価する上でのモデル分子としても利用可能である。特に、近年、抗体医薬や核酸医薬などの中分子医薬品の開発が盛んに進められており、汎用性の高いモデル分子として期待される。

次に、合成したグラフト型高分子をモデル動物(マウス、C57/BL6J)の体内へと尾静脈より投与し、6時間、24時間、48時間、96時間、192時間後の血液残存量および主要臓器(肝臓・腎臓・脾臓・心臓・肺・大腿四頭筋)への集積量を組織内の蛍光強度から評価した。その結果、分子サイズが10nm以下の分子は血中からの消失速度が速く、6時間後には血

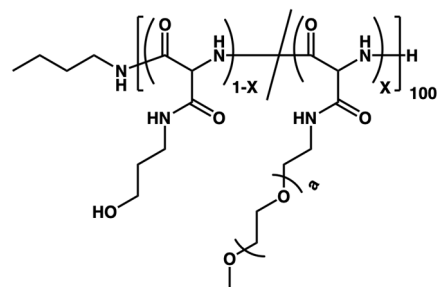


図1. グラフト型高分子の構造式

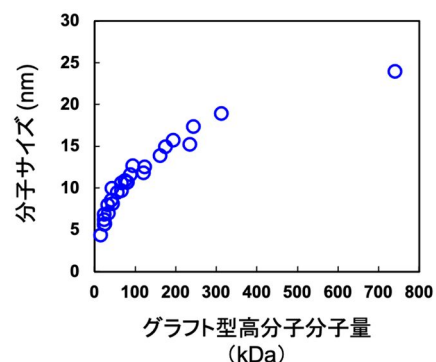


図2. グラフト型高分子の分子サイズ制御

中残存量は50%以下であった。この結果は、10 nm以下のグラフト型高分子は、腎臓から体外へと速やかに排出されていることを示唆している。他方、10 nm以上の分子サイズのグラフト型高分子では、13 nmの血中半減期が約48時間、19および24 nmが96時間と血中からの消失速度が抑えられており、腎排泄による消失が抑制されたためと考えられる。各グラフト型高分子の筋組織への集積量を比較したところ、13 nmのグラフト型高分子の集積量がどのタイムポイントにおいても高いことが確認され、192時間までのAUCで比較すると、筋組織への集積量は13 nmが最大であり、次いで24 nm、19 nmのグラフト型高分子の順であった(図3)。また、本研究の非標的組織である肝臓に関しては、流体力学系の増大とともにAUCが増大することが確認された。この結果は、肝臓内の細網内皮系に貪食されたものと考えられる。以上の結果から、直径13 nmを中心とした分子サイズ域の水溶性高分子は、腎排泄による血中から消失、および、肝臓を始めとする非標的組織への集積が相対的に低く、標的である筋組織への集積効率が増大されることが実証された。実際に、核酸医薬と同等の分子サイズである~6 nmのグラフト型高分子と比較すると、13 nmのグラフト型高分子の筋組織への集積量は7倍程度増大した。これまでは、筋組織は比較的に薬物送達効率の低い臓器として考えられており、筋組織への効率的な薬物送達は困難と考えられてきた。この点において、本研究結果は、薬物動態学的に新たな知見であり、今後の中分子医薬品の開発や、筋組織を標的とする薬物送達システムを開発する上で必要な基礎的な知見となる。

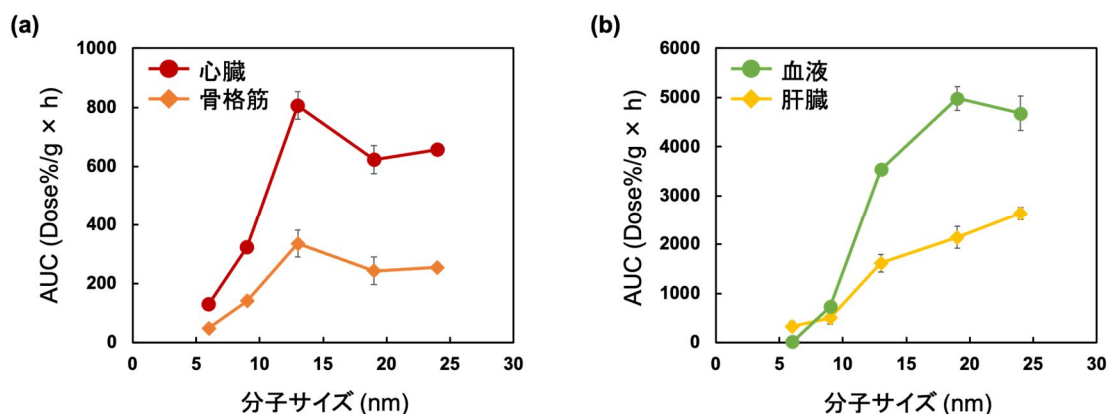


図3. 各分子サイズのグラフト型高分子の組織へのAUC比較
(a) 心臓および骨格筋 (b) 血液および肝臓

次いで、筋疾患への核酸医薬送達を目指し、筋組織へと浸透可能な核酸医薬デリバリーシステムへの展開を検討した。ここではまず、当研究グループで開発を進めていた直径18 nmの極微小なポリイオンコンプレックス型の核酸医薬送達システム(uPIC)を利用した。uPICは核酸医薬1分子と、カチオン鎖とPEG鎖のブロック共重合体2分子から構成され、uPICの分子サイズは筋組織への集積が期待される~20 nmの分子サイズ域であることから、筋組織への核酸医薬送達が期待される。まず、uPICの血中滞留性の改善を目的として、核酸医薬へと化学修飾を施し、血中滞留性の測定を行なった。その結果、天然型RNAのsiRNAを搭載したuPICと比べ、RNA鎖に化学修飾を加えたsiRNAを搭載したuPICの場合、血中半減期が約7倍の4時間まで増大することが確認された。この結果は、血中の分解酵素による分解が抑制された結果、より安定なuPICが形成されたためと考えられる。次いで、化学修飾型siRNAを搭載したuPICをマウス尾静脈から全身に投与し、72時間後の筋組織への集積量および標的mRNAの抑制効率を評価した。その結果、核酸医薬単体と比べ、uPIC投与では6倍以上の筋組織への集積が認められ、骨格筋・心筋・横隔膜の筋組織においてuPIC投与群で有意な標的mRNAのノックダウンが確認された(図4)。この結果は、これまで有効な薬物送達システムが存在しなかった骨格筋疾患治療に対し、新たな治療戦略を提案するものである。現在、筋疾患モデルを用いた治療検証を実施中である。

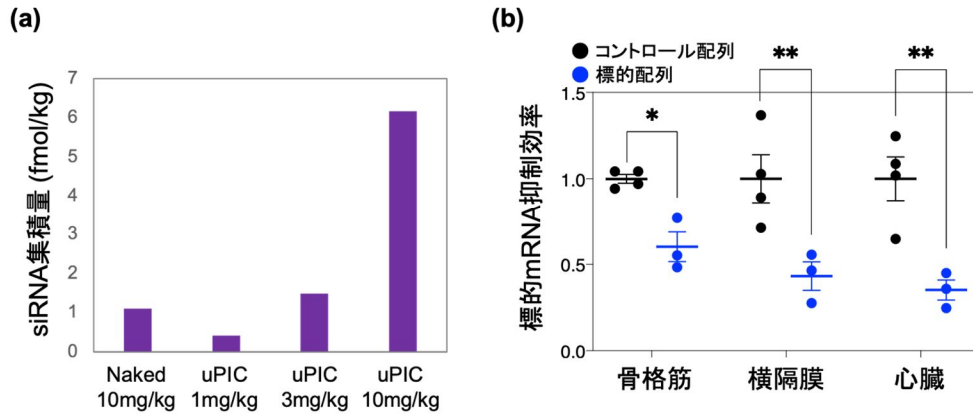


図4 . (a) 核酸医薬単体および uPIC の骨格筋への集積量
 (b) 骨格筋、横隔膜および心臓の標的 mRNA の uPIC によるノックダウン効率 (10 mg/kg)

次いで、サイズ制御型の核酸医薬送達システムとして、グラフト型高分子に対して直接 siRNA を化学的に結合するキャリア設計を行なった。ここでは、10 nm と 15 nm のグラフト型高分子に対して化学修飾 siRNA をコンジュゲートとした。siRNA のコンジュゲートには、アジド基とジベンゾシクロオクチン基のカッパーフリークリックケミストリーを利用し、水中でコンジュゲーションを行なった。反応後、限外濾過により未反応の siRNA を除去し、精製を行なった。その結果、グラフト型高分子 1 本あたり 5~7 本の siRNA が導入されていることが確認された。この siRNA を導入したサイズ制御型の核酸医薬送達システムをマウスの尾静脈から血中に投与し、血中内の残存量を傾向強度から算出したところ、核酸医薬単体の血中半減期は 30 分以内であったのに対し、コンジュゲート体はそれぞれ、10 nm が 4 時間、15 nm が 8.5 時間と血中半減期の大幅な延長に成功した。現在はサイズ制御型核酸医薬送達システムにおいてもマウスを用いた治療効果を検証中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshinaga Naoto, Cho Eol, Koji Kyoko, Mochida Yuki, Naito Mitsuru, Osada Kensuke, Kataoka Kazunori, Cabral Horacio, Uchida Satoshi	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 Angewandte Chemie International Edition	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 Kim Beob Soo, Kim Hyun Jin, Osawa Shigehito, Hayashi Kotaro, Toh Kazuko, Naito Mitsuru, Min Hyun Su, Yi Yu, Kwon Ick Chan, Kataoka Kazunori, Miyata Kanjiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Dually Stabilized Triblock Copolymer Micelles with Hydrophilic Shell and Hydrophobic Interlayer for Systemic Antisense Oligonucleotide Delivery to Solid Tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 5770 ~ 5780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.9b00384	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 Kim Beob Soo, Osawa Shigehito, Naito Mitsuru, Ogura Satomi, Kamegawa Rimpei, Ishida Hiroki, Kim Hyun Jin, Uchida Satoshi, Miyata Kanjiro	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 2019年
3. 雑誌名 Advanced Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1900123 ~ 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 Min Hyun Su, Kim Hyun Jin, Naito Mitsuru, Ogura Satomi, Toh Kazuko, Hayashi Kotaro, Kim Beob Soo, Fukushima Shigeto, Anraku Yasutaka, Miyata Kanjiro, Kataoka Kazunori	4. 巻 59
2. 論文標題 Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood-Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8173 ~ 8180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201914751	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 Naito Mitsuru, Otsu Yuta, Kamegawa Rimpei, Hayashi Kotaro, Uchida Satoshi, Kim Hyun Jin, Miyata Kanjiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Tunable nonenzymatic 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 Science and Technology of Advanced Materials	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 Yi Yu, Kim Hyun Jin, Zheng Meng, Mi Peng, Naito Mitsuru, Kim Beob Soo, Min Hyun Su, Hayashi Kotaro, Perche Federico, Toh Kazuko, Liu Xueying, Mochida Yuki, Kinoh Hiroaki, Cabral Horacio, Miyata Kanjiro, Kataoka Kazunori	4. 巻 295
2. 論文標題 Glucose-linked sub-50-nm unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles for targeted siRNA delivery to glucose transporter 1-overexpressing breast cancer stem-like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 268 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2019.01.006	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, Uchida Satoshi, Naito Mitsuru, Osada Kensuke, Cabral Horacio, Kataoka Kazunori	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 Min Hyun Su, Kim Hyun Jin, Ahn Jooyeon, Naito Mitsuru, Hayashi Kotaro, Toh Kazuko, Kim Beob Soo, Matsumura Yasuhiro, Kwon Ick Chan, Miyata Kanjiro, Kataoka Kazunori	4. 巻 19
2. 論文標題 Tuned Density of Anti-Tissue Factor Antibody Fragment onto siRNA-Loaded Polyion Complex Micelles for Optimizing Targetability into Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 2320 ~ 2329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b00507	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 内藤瑞、茶谷洋行、Kim BeobSoo、藤加珠子、宮田完二郎
2. 発表標題 化学修飾核酸を内包したPICミセルの血中安定性評価
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 宮島健、内藤瑞、松元亮、宮原裕二、宮田完二郎
2. 発表標題 ピリジルポロン酸とがん細胞表面のシアル酸との特異的な結合を利用したポリマー型リガンドの開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 HOGREL Adrien、内藤瑞、亀川凜平、片島拓弥、KIM HyunJin、松元亮、宮田完二郎
2. 発表標題 動的結合点をもつ高分子ゲルからのナノ粒子の徐放性評価
3. 学会等名 第31回高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuru Naito, Yuta Otsu, Rimpei Kamegawa, Kotaro Hayashi, Satoshi Uchida, Hyun Jin Kim, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Tunable non-enzymatic degradable N-substituted polyaspartamide for enhanced mRNA delivery
3. 学会等名 19th Symposium for Gene Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Naito, Yuta Otsu, Rimpei Kamegawa, Kotaro Hayashi, Satoshi Uchida, Hyun Jin Kim, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Non-enzymatically degradable poly(amino acid) derivatives for mRNA delivery
3. 学会等名 European Polymer Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Naito, Yuta Otsu, Rimpei Kamegawa, Kotaro Hayashi, Satoshi Uchida, Hyun Jin Kim, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Responsivity of siRNA-loaded phenylboronate-functionalized polyion complex (PIC) micelles against biomolecules
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Naito, Naoto Yoshinaga, Takehiko Ishii, Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 ATP-responsive polyion complex micelles for intracellular delivery of siRNA and pDNA
3. 学会等名 The 15th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤 瑞、吉永 直人、石井 武彦、松元 亮、宮原 裕二、宮田 完二郎、片岡 一則
2. 発表標題 ATP応答性高分子ミセルによる細胞質内へのsiRNAデリバリー技術の開発
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤 瑞、吉永 直人、石井 武彦、松元 亮、宮原 裕二、宮田 完二郎、片岡 一則
2. 発表標題 細胞質内へのsiRNA送達を目指したATP応答性高分子ミセルの開発
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 内藤 瑞、吉永 直人、石井 武彦、松元 亮、宮原 裕二、宮田 完二郎、片岡 一則
2. 発表標題 Fabrication of intracellular ATP-responsive polyion complex micelles
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 内藤 瑞、吉永 直人、松元 亮、宮原 裕二、宮田 完二郎、片岡 一則
2. 発表標題 細胞内へのsiRNA送達を目指したATP応答性高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第13回ナノバイオ・メディカル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大津裕太、亀川凜平、林光太郎、内田智士、Kim HyunJin、宮田完二郎
2. 発表標題 生分解性ポリカチオンの設計およびmRNA送達システムへの展開
3. 学会等名 第28回インテリジェント・ナノ材料研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuru Naito, Naoto Yoshinaga, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Fabrication of Intracellular ATP-responsive plynion complex micelles for smart nucleotide therapeutics delivery
3. 学会等名 2018 Fall Meeting of the korean society for Bioaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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