

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19045

研究課題名(和文) アポトーシス細胞模倣遺伝子キャリアを用いた骨粗鬆症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Osteoporosis Treatment Nano-vehicles via Apoptotic Cell Inspired Materials

研究代表者

中川 泰宏 (Nakagawa, Yasuhiro)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：90831264

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)：関節リウマチ(RA)は近年よく見られる自己免疫疾患であり、発症部位での軟骨や骨の粗鬆化に加え、全身性の骨粗鬆症を誘発することが知られている。RAでは炎症部位で産生されるTNF- α やIL-10などの炎症性サイトカインが破骨細胞の分化成熟を誘導することで骨・関節の破壊が進行する。本研究では、アポトーシス細胞がホスファチジルセリンの露出を介して周囲の炎症環境を抑制することに着目し、抗炎症活性を有した高分子ミセル型mRNAキャリアを考案した。シェル部のアポトーシス細胞模倣高分子がマクロファージの発現型をM2型に誘導すると同時に、IL-2産生誘導mRNAをマクロファージに送達する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子を利用した現在のドラッグデリバリーシステム(DDS)では、薬剤とキャリアに明確な役割分担がされており、高分子材料はキャリアとしてのみ使用されてきた。本研究では、薬剤を送達する高分子ミセルの外層に抗炎症機能を有するアポトーシス細胞模倣ポリマーを用いることにより、生理学的機能を持ったDDSキャリアの開発を目指すものである。この機能性DDSキャリアを用いて、後期高齢化の進んだ日本においてニーズの高いリウマチ・骨粗鬆症治療法を構築することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease that in recent years has been known to induce systemic osteoporosis. destruction of bones and joints progresses. In this study, we focused on the fact that apoptotic cells suppress the surrounding inflammatory environment through the exposure of phosphatidylserine, and devised a polymeric micellar mRNA carrier with anti-inflammatory activity. The apoptotic cell-mimetic polymer in the shell part induces the expression type of macrophages to M2 type and simultaneously delivers IL-2 production-inducing mRNA to macrophages.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：骨粗鬆症 IL2 ホスファチジルセリン アポトーシス細胞 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

後期高齢化が進む現代日本において、平均寿命と健康寿命の乖離が問題になっており、その根本的原因が運動器症候群(ロコモ：ロコモティブシンドローム)であることが報告されている。ロコモ進行の一因として、骨粗鬆症やそれに伴う骨折が報告されているが、これは単に栄養・運動不足が原因となるだけでなく、関節リウマチ(RA)に起因することも広く知られ始めている。RA はよく見られる自己免疫性の疾患であり、発症部位での軟骨や骨の粗鬆化に加え、全身性の骨粗鬆症を誘発することが知られている。RA では炎症部位で産生される TNF- α や IL-10 などの炎症性サイトカインが破骨細胞の分化成熟を誘導することで骨・関節の破壊が進行する。加えてこれらの炎症性サイトカインは血流によって全身に行き渡るため、RA 発症部位以外での骨組織の粗鬆化が誘引される。これらの炎症性サイトカイン産生・破骨細胞の分化誘導を担っているのがそれぞれ炎症性の発現型に分極した M1 型マクロファージと、Th17 や T_H17 型の T 細胞であり、抗体を用いた炎症性サイトカイン阻害治療が実施されている。しかしながら抗体を用いた治療法はコストが高く、治療対象者が多い疾病に対する適用は医療費負担の増加につながるため、より効率的な治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、アポトーシス細胞を模倣した抗炎症活性部位、生体適合性ブロック、核酸担持ブロックからなるジブロック共重合体を設計した。これに、T 細胞を免疫抑制的に傾けるタンパク質をコードした mRNA との複合体を作成し、材料と核酸医薬の両面から慢性炎症を抑制することを目指す。これまでに、水溶性のアポトーシス細胞模倣高分子を用いた抗炎症活性は報告されているが、粒子状に加工した高分子材料で抗炎症活性を確認している例は無い。本研究の独自性は、薬剤を送達する担体である高分子材料自体が生理活性(抗炎症活性)を有している点であり、材料による抗炎症治療と、mRNA を用いた抗炎症治療を同時に行うことができるシステムを構築することである。

3. 研究の方法

まず、mRNA キャリアとなる PS-PEG-P(GE[Trp])、及び PEG-(GE[Trp])の合成を行った。ヘテロ二官能性 PEG(アジド基、水酸基)に対して *tert*-Butyl Glycidyl Ether のアニオン重合、*tert*-Butyl 基を脱保護し、カルボジイミド系縮合剤で Fmoc-Trp を縮合し、Azide-PEG-(GE[Fmoc-Trp])を得た。PS-DBCO を合成し、クリック反応を行うことで PS-PEG-(GE[Fmoc-Trp])を合成し、PS 基の保護基である Boc 基と Trp の保護基である Fmoc 基をそれぞれ脱保護することで、PS-PEG-P(GE[Trp])を合成した。

合成した PS-PEG-P(GE[Trp])と IL-2 mRNA を混合することで、IL-2 mRNA ミセルの合成を検討し、同時にマウスマクロファージ RAW264.7 に対するトランスフェクション試験を行った。

4. 研究成果

mRNA キャリアとなる PS-PEG-P(GE[Trp])、及び PEG-(GE[Trp])の合成検討を行った。PS-PEG-P(GE[Trp])を合成するためには前駆体である PS(Boc/*t*-Bu)-P(BnGE)の Bn 基を脱保護する必要があるが(図 1)、Bn 基の脱保護条件である Pd/C 触媒を用いた接触還元法を試した所、脱保護反応が進行しなかった。これは PS 基中に存在するリンが触媒毒として作用することで Pd/C を失活させてしまうためであると考え、HBr を用いた酸加水分解条件における Bn 基の脱保護反応を行った所、PS 基も脱離してしまうという結果を得た。そこで、これまで作製した合成経路を 1 から設計し直し、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)-アジド間のクリックケミストリーを用いた合成経路を検討中である。また、PS 基を含有しない mRNA 担持ポリマーとして、THP-PEG-P(GE[Trp])を合成した。

作製した THP-PEG-P(GE[Trp])と IL-2 mRNA を用いた高分子ミセルを作製した。mRNA 由来のアニオンと高分子由来のカチオンを HEPES 中で任意の比率で混和した所、アニオン/カチオン比が 3 以上の時優れた mRNA 内包ミセルが作製可能であるということが明らかとなった。特に、アニオン/カチオン比が 3 のときに DLS 測定にて短鋒性の高い均質な mRNA 内包ミセルが形成できていることを確認した。

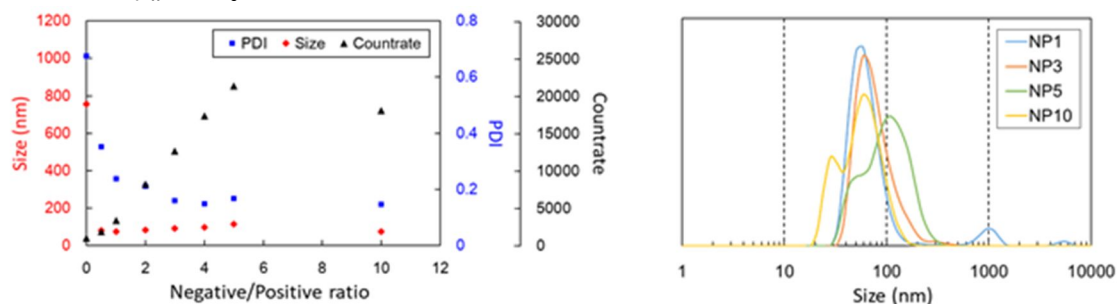


図 1. mRNA 内包ミセルの作製

作製した IL-2 mRNA 内包ミセルにおいて、マクロファージ由来細胞株 RAW264.7 に対するトランスフェクション効率を評価したが、mRNA 内包ミセルによる IL-2 産生は確認できなかった。原因としてマクロファージにおける細胞質移行が不十分であることを示唆する結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Irawan Vincent, Kajiwara Daichi, Nakagawa Yasuhiro, Ikoma Toshiyuki	4. 巻 291
2. 論文標題 Fabrication of mechanically robust bilayer membranes of hydroxyapatite/collagen composites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 129514 ~ 129514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2021.129514	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 Agarwal Tarun, Chiesa Irene, Presutti Dario, Irawan Vincent, Vajanthri Kiran Yellappa, Costantini Marco, Nakagawa Yasuhiro, Tan Sheri-Ann, Makvandi Pooyan, Zare Ehsan Nazarzadeh, Sharifi Esmaeel, De Maria Carmelo, Ikoma Toshiyuki, Maiti Tapas Kumar	4. 巻 123
2. 論文標題 Recent advances in bioprinting technologies for engineering different cartilage-based tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112005 ~ 112005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112005	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 Huang George Lo, Tao Anqi, Miyazaki Takuya, Khan Thahomina, Hong Taehun, Nakagawa Yasuhiro, Cabral Horacio	4. 巻 9
2. 論文標題 PEG-Poly(1-Methyl-L-Tryptophan)-Based Polymeric Micelles as Enzymatically Activated Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 719 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano9050719	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuta Kurashina and Yasuhiro Nakagawa
2. 発表標題 Building practical training in department of materials science and engineering through remote teaching
3. 学会等名 Irago 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taehun Hong, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Yasuhiro Nakagawa, Eger Rigte BOONSTRA, Koji Kyoko, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral.
2. 発表標題 ホスホコリンを用いたミトコンドリアターゲットイングリガンドの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜野 凌平, 崎村 直登, 中川 泰宏, 生駒 俊之, 野崎 浩佑, 三浦 宏之,
2. 発表標題 アパタイト形成能をもつ 三次元造形アルミナ-生体活性ガラス-レジン複合体の作製
3. 学会等名 6 大学連携プロジェクト 第5回公開討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川 泰宏, 守矢 恒司, 田中 利明, 生駒 俊之,
2. 発表標題 核酸医薬の効率の送達を目指した中空水酸アパタイトナノ粒子の作製と評価
3. 学会等名 MRM Forum 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Tachihara, Yasuhiro Nakagawa, Anqi Tao, Huang George, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Quader Sabina, 安楽 泰孝, 片岡 一則, Horacio Cabral
2. 発表標題 難治性膵臓癌を標的としたホストゲスト相互作用を介した環状中分子担持型pH応答性高分子ミセルの開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会 2020 年度関東ブロック発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石栄 智貴, 中川 泰宏, 生駒 俊之,
2. 発表標題 放射線治療のためのリン酸ハフニウム化合物の合成
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会 2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuhan Liu, Yasuhiro Nakagawa, Toshiyuki Ikoma
2. 発表標題 Adsorption of Phosphate-Based Polymer on Silver-Hydroxyapatite Microparticles
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会 2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 會田 雄大, 中川 泰宏, 生駒 俊之,
2. 発表標題 アゾ化合物を修飾したシリカ被覆星形Au - Agナノ粒子の作製
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会 2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Nakagawa, Takuya Miyazaki, Federico Perche, Chantal Pichon, Horacio Cabra
2. 発表標題 Development of Polymeric Micelle-based Efficient Delivery System for Self-amplifying Replicon RNA
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立原 義宏、宮崎 拓也、クォーダー サピナ、中川 泰宏、安楽 泰孝、片岡 一則、オラシオ カブラル
2. 発表標題 ホストゲスト相互作用を介した環状化合物パリノマイシンの送達に向けたpH応答性高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立原 義宏、宮崎 拓也、クォーダー サピナ、中川 泰宏、安楽 泰孝、片岡 一則、オラシオ カブラル
2. 発表標題 ホストゲスト相互作用を利用した環状化合物担持型pH応答性高分子ミセルの開発
3. 学会等名 TEIJIN MIRAI FORUM 2020,
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 中川泰宏, 荏原充宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 糖応答型スマートポリマーを用いた人工レクチンの開発	

1. 著者名 中川泰宏, 荏原充宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 非蛋白性合成レクチンを用いた糖認識バイオマテリアル	

1. 著者名 中川泰宏、荏原充宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 非蛋白性合成レクチンを用いた糖認識バイオマテリアル	

1. 著者名 中川泰宏、荏原充宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一般社団法人 日本人工臓器学会	5. 総ページ数 4
3. 書名 抗炎症性を有する新たなバイオマテリアル開発	

〔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
---------	---------