

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590251

研究課題名 (和文) 長時間作用型核酸医薬(リボン型デコイ)の開発と有効性の検討

研究課題名 (英文) Development of novel therapeutic approach for aneurysm using decoy oligodeoxynucleotide with a ribbon-shaped circular structure.

研究代表者

三宅 隆 (MIYAKE TAKASHI)

大阪大学 連合小児発達学研究所 寄附講座特任助教

研究者番号：40219746

研究成果の概要 (和文)：

デコイ断端を環状に閉鎖したリボン型デコイは生体内での安定性が高く、NFκB と Ets をブロックするリボン型キメラデコイは、従来型のデコイでは効果のなかった腹腔内投与によって、ラット動脈瘤の進展を予防した。その主なメカニズムはマクロファージの機能の制御で、蛋白分解酵素群の分泌を有意に抑制していた。また、リボン型デコイに改良を加えたハイブリット型デコイの静脈投与ではマウス動脈瘤の縮小効果を認め、全身投与による治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We modified decoy oligodeoxynucleotide (ODN) against NFκB and ets, to a ribbon-shaped circular structure, to increase its stability for systemic administration. Intraperitoneal administration of ribbon-type decoy ODNs (R-ODNs) was performed in an elastase-induced rat aneurysm model. Treatment with chimeric R-ODN significantly inhibited aortic dilatation accompanied by a reduction of secretion of several proteases from macrophages. In contrast, conventional phosphorothioate decoy ODN failed to prevent aneurysm formation. In addition, we investigated the effect of intravenous injection of modified R-ODN against NFκB in a mouse aneurysm model. Treatment with modified R-ODN showed a tendency to decrease the size of AAA. Further modification of the decoy strategy would provide a means of less invasive molecular therapy for human AAA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：核酸医薬、動脈瘤、デコイ

## 1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬の分野では核酸医薬を使った新しい治療方法の確立が、抗体療法の次世代の治療薬として注目を集めている。そのなかで、デコイ療法は転写因子の機能をブロックすることによって、病態に関連した一連の遺伝子群の発現を調節する方法である。抗体医薬やアンチセンスが病態に関与した1種類の蛋白活性を抑制するのに対して、デコイ核酸医薬は複数の関連因子の産生を効率よく抑制する事が出来るため適切な用量・投与方法を設定できれば、より有効な治療効果を得ることが可能である。米国で行われた臨床研究では、ひとつの転写因子だけの阻害では十分な治療効果が得られなかったが、我々は複数の転写因子をコントロールするキメラデコイを開発してきた。しかし核酸医薬は生体内で急速に分解されるため、作用時間が短く、局所投与が必要なことが問題であった。通常の薬剤のように静脈内投与や経口投与といった全身投与によって治療の継続が可能な核酸医薬開発が期待されるようになってきている。しかし、核酸医薬の作用時間をコントロールする様々な検討が行われているが、未だに有効な手段は得られていない。

## 2. 研究の目的

デコイの生体内での安定性を高めるため、デコイ断端を環状に閉鎖することで分解を遅らせ長時間の作用が期待できるリボン型デコイの研究開発を行う。動物実験では動脈瘤モデルを使い低侵襲治療法である腹腔内投与の有効性を検討する。さらにリボン型デコイのS化や配列・構造を改良したインテリジェント型核酸医薬の開発を行い、その有効性を細胞培養実験および動物実験で確認する。この研究ではデコイの作用時間・効果コントロールし静脈投与も可能な汎用性高い核酸医薬を作り出し、次世代の分子療法の確立を目指す。

### Consensus sequences

NFκB binding sites: **GGGATTTC**CC  
ets binding sites: **GGAA**

### Structure of decoy ODN

#### Conventional double-stranded chimeric decoy ODN

5'-ACCGGAAGTATGAGGGATTTCCTCC-3'  
3'-TGGCCTTCATACTCCCTAAAGGGAGG-5'

#### Ribbon-type chimeric decoy ODN

A ACCGGAAGTATGAGGGATTTCCTCC A A  
A TGGCCTTCATACTCCCTAAAGGGAGG A A

## 3. 研究の方法

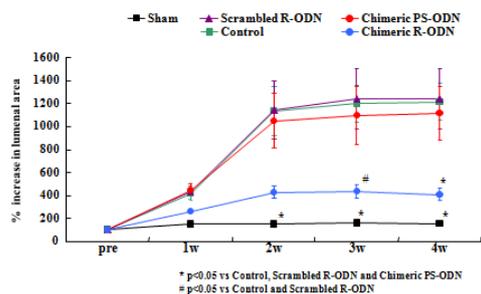
(1) ラット大動脈瘤モデルにおけるリボン型NFκB/Etsキメラデコイの効果の検討：これまでの研究で治療効果を確認しているNFκBとEtsの結合活性を阻害するキメラデコイのリボン型を作成して、エラストラーゼで誘発するラット動脈瘤モデルで有効性を検討する。

(2) マウス大動脈瘤モデルを使った改良型リボンデコイの効果の検討：デコイの静脈内投与を可能にするため、リボン型デコイの改良を行う。リボン型デコイは部分的なS化によって、ヌクレアーゼへの耐性を高め、毒性を低下させる可能性が高い。S化のバリエーションと共に、いくつかの修飾を加えたインテリジェント型デコイなど数種類のデコイを作成し、in vitroの系で選別する。候補デコイの静脈内投与における有効性をApoEノックアウトマウスにアンジオテンシンIIを持続投与して作成する動脈瘤モデルで検討する。

## 4. 研究成果

(1) 動脈瘤の発症・進展に関与する転写因子NFκBとEtsに対するリボン型デコイを合成し、マクロファージ系の細胞を使い、蛋白分解酵素であるマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) の分泌抑制効果を検討した。リボン型デコイと従来型デコイは共に MMP-2とMMP-9の分泌を抑制したが、リボン型デコイは従来型に比べ有意に強力なMMP-9抑制効果を示した。次にリボン型デコイを使った動脈瘤の低侵襲治療法として、腹腔内投与による治療効果をラット動脈瘤モデルで検討した。従来型デコイ群では効果が見られなかったが、リボン型デコイ群はコントロール群と比較して有意に動脈瘤の進展を抑制した。病理検査では弾性繊維の破壊を抑制しており、そのメカニズムはマクロファージの浸潤は抑制しないが、マクロファージが分泌するMMP-9の活性を抑制した。またその他の蛋白分解酵素であるMMP-12、カゼプシンB、カゼプシンKの蛋白発現も抑制しており、マクロファージの機能を制御していると考えられた。従来型デコイは侵襲を伴う局所投与が必要であったが、リボン型デコイは腹腔内投与で治療効果が得られ、新しい低侵襲治療法となる可能性が示された。

Time course of aortic size



(2) 静脈内投与によるデコイ療法の確立を目指して、リボン型デコイに部分S化を加え、より効果が強く生体内で安定した改良型リボン型デコイの合成を行った。この部分S化リボン型デコイの静脈投与の有効性はApoE欠損マウスにアンジオテンシンIIを持続皮下投与して作成するマウス腹部動脈瘤モデルで検討した。動脈瘤の形成後(アンジオテンシンII投与4週後)に1mg/Kgの部分S化リボン型デコイを1日おきに計3回静脈内投与した。投与後4週目の超音波検査では動脈瘤の縮小効果を認めたが、有意な変化は得られなかった。

この結果をもとに、リボン型デコイをベースとして生体内での安定性を高めたスペイサー型NFκBデコイとDDS機能を持ったNFκBデコイ封入ナノ粒子を新規開発したので、その有効性を検討した。デコイ封入ナノ粒子は、ヒト単球系のTHP-1細胞と血管平滑筋細胞のNFκB活性を低用量で低下させ、サイトカイン・ケモカインの産生を有意に抑制した。この培養実験では特殊な導入方法が不要であり、生体での高い導入効率が期待された。また動物実験では部分S化リボン型デコイと同じマウス動脈瘤モデルを使い、動脈瘤が形成される4週後から新規デコイの静脈投与を週1回行った。コントロール群の血管径は拡張したままだが、治療群は1週間毎に約10%の瘤径の減少が観察された。また静脈内投与された新規デコイは血管外膜側と周囲組織に浸潤したマクロファージに導入されており、肝臓、腎臓そして肺にも蛍光シグナルを認めている。

本研究開発ではデコイの改良によって動脈瘤の縮小効果が確認された。臨床では、拡大の始まっている小径の動脈瘤症例が対象となるため、日常の診療で行える静脈投与によって縮小効果を持つデコイ療法の確立は大きな意義を持っている。しかし、デコイの全身投与では、標的とした病変・臓器以外にもデコイの導入が起こるので、副作用の発生

が懸念される。さらに、デコイの改良を重ね、病的血管への特異性を付与できれば、新しい治療法になると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Miyake T, Aoki M, et al. Systemic Administration of Ribbon-type Decoy Oligodeoxynucleotide Against Nuclear Factor κB and Ets Prevents Abdominal Aortic Aneurysm in Rat Model. *Molecular Therapy*. 19;181-187;2011. 査読有。

② Miyake T, Morishita R. Pharmacological treatment of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovascular Research*. 83;436-443;2009. 査読有。

[学会発表] (計3件)

① Miyake T, et al. Intra-peritoneal Application of Ribbon-type Decoy Oligodeoxynucleotides against NFκB and ets Prevents Aneurysm Foemation in Rats. 23<sup>rd</sup> scientific meeting of the international society of hypertension. 2010/09 /29. Vancouver, Canada.

② 三宅 隆 他。核酸医薬を用いた腹部大動脈瘤の低侵襲治療。第109回日本外科学会定期学術集会、2009年4月4日福岡国際会議場(福岡)。

③ Miyake T, et al. Inhibition of aneurysm development by intra-peritoneal application of ribbon-type decoy oligodeoxynucleotide against nuclear factor-κB and ets in a rat model. *American Heart Association*. 2008/11/09. New Orleans, USA.

[図書] (計1件)

① 三宅 隆、森下竜一。中外医学社、Annual Review 2011 循環器、2011、324-330。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 隆 (MIYAKE TAKASHI)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究科・  
寄附講座特任助教

研究者番号：40219746

(2) 研究分担者

谷山 義明 (TANIYAMA YOSHIAKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授

研究者番号：60372611

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：