

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07733

研究課題名(和文) 超急性期脳梗塞に対する脂質ライガンド結合型ヘテロ核酸による経静脈的病態制御薬開発

研究課題名(英文) Lipid-conjugated Heteroduplex oligonucleotide administration for ischemic stroke in the hyperacute phase

研究代表者

石橋 哲 (Satoru, Ishibashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：30533369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA/RNAヘテロ核酸(HDO)という独自技術は、脳梗塞病巣部位に送達できれば虚血病態を改善させることが可能である。我々は脳梗塞超急性期における病変部位で脂質受容体の発現が亢進し、虚血部位への物質送達に関与していることを見出した。そこで、HDOに脂質ライガンドを結合し、薬剤が脂質受容体介在性に脳実質内へ細胞内輸送されることが可能だという仮説を立て検証した。マウス脳梗塞モデルに対し同薬剤を投与したところ、脳梗塞病変では非虚血側よりも有意に薬剤送達効果が高く、優れた標的遺伝子抑制効果並びに脳梗塞表現型の変化が確認された。脂質ライガンド結合HDOは脳梗塞超急性期の遺伝子制御技術として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞後の病態や治療標的となる遺伝子は解明されつつあるも、急性期に投与可能な有効な薬剤開発が実現できていない。脳血流の減少やBBBによるバリア機能により、脳梗塞病変への薬剤送達が困難なことが課題であった。脂質ライガンド結合HDO技術は、この課題を克服することができ脳梗塞急性期治療の遺伝子制御ツールとして臨床応用されることが期待される。我々の技術は、経静脈的投与により投与が可能であることは合併症予防の観点からも非常に優れているといえる。

研究成果の概要(英文)：Antisense oligonucleotide (ASO) is a major tool used for silencing pathogenic genes. For stroke in the hyperacute stage, however, the ability of ASO to regulate genes is limited by its poor delivery to the ischemic brain owing to sudden occlusion of the supplying artery. Here we show that, in a mouse model of permanent ischemic stroke, lipid-ligand conjugated DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide (lipid-HDO) was unexpectedly delivered 9.6 times more efficiently to the ischemic area of the brain than to the contralateral non-ischemic brain and achieved robust gene knockdown and change of stroke phenotype. This delivery to neurons was mediated via receptor-mediated transcytosis by lipoprotein receptors in brain endothelial cells, the expression of which was significantly upregulated after ischemia. This study provides proof-of-concept that lipid-HDO is a promising gene-silencing technology for stroke treatment in the hyperacute stage.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳血管障害 核酸医薬 動物モデル 薬剤送達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は世界的にも主な死因の一つであり長期にわたる後遺症を残す疾病である。血栓溶解療法などの再開通治療の恩恵を受ける症例はごく一部に限られており、さらなる治療選択肢が広がることが期待されている。脳梗塞後の病態や治療標的となる遺伝子は解明されつつあるも、急性期に投与可能な有効な薬剤開発が実現できていない。脳血流の減少や BBB によるバリア機能により、脳梗塞病変への薬剤送達が困難なことが課題である。

分子が BBB を通過し脳実質内へ到達する経路には transcellular pathway と paracellular pathway が知られている。Paracellular を構成するタイトジャンクションのバリア機能は脳梗塞発症後 24 時間以降に破綻するため、この間までは BBB のバリア機能が保たれる。一方、paracellular pathway は、脳梗塞発症後超急性期である 3-12 時間の間に活性化することが知られている。我々はこれまで、脳梗塞モデルマウスの超急性期において、脳梗塞部位の脳血管内皮細胞と神経細胞で paracellular pathway に関わる脂質受容体 (low-density lipoprotein receptor: LDLR, scavenger receptor class B member 1:SRB1, LDLR-related protein 1 :LRP1) の発現が亢進していることを確認した。このため脂質ライガンドの応用は、脳梗塞超急性期に脳虚血病変への薬剤送達に有用な可能性がある。

2. 研究の目的

我々はこれまで、DNA/RNA ヘテロ核酸(HDO)という、主鎖 DNA 鎖と相補的な RNA 鎖からなる新規の人工機能核酸の独自技術を開発している。本研究では、HDO に脂質ライガンドを結合することで、脳梗塞の病態下でも HDO が受容体介在性に血液中から脳実質内へ細胞内輸送されることが可能だという仮説を立てた。超急性期脳梗塞マウスモデルに脂質ライガンド結合 HDO を経静脈投与し、脳梗塞病変部位への薬剤送達効果・遺伝子抑制効果・治療効果を確認する proof of concept を目的とした。

3. 研究の方法

マウスの中大脳動脈を焼灼し Permanent Middle Artery Occlusion (pMCAO)モデルを作成し、モデル作成直後または 3 時間後に phosphate-buffered saline (PBS: control)、ASO、HDO、トコフェロール結合 HDO(Toc-HDO)、コレステロール結合 HDQ(Cho-HDO)、shuffle Toc-HDO を経静脈的に 50 mg/kg で投与した。薬剤投与 3 日後に、脳梗塞中心部、並びに対側の脳をサンプリングし、遺伝子抑制効果を定量的 RT-PCR で検討した。また、薬剤送達の評価のため、蛍光色素で標識した脂質ライガンド結合型 HDO を投与し、虚血部位への送達分布を共焦点顕微鏡で観察し、さらに、マルチプレートリーダーによる蛍光強度の定量を行った。hybridization-based ELISA (HELISA) による HDO 濃度定量も実施した。さらに、標的遺伝子抑制に伴う表現型変化の評価のため、脳梗塞体積や血管新生の程度を評価した。なお、本研究では、哺乳類にユビキタスに発現し、脳梗塞病変では発現が亢進し脳保護的に作用することが知られている long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript1 (MALAT-1)を標的とした核酸を使用した。

4. 研究成果

pMCAO モデル作成後に核酸を経静脈的に投与した 3 日後の評価では、Toc-HDO 投与群と Cho-HDO 投与群で脳梗塞病変における高い遺伝子抑制効果を認めた。非病変部では、Cho-HDO 投与群のみ有意な遺伝子抑制効果を示した。このことから脂質ライガンド結合 HDO のうち、Toc-HDO は病変部位選択的遺伝子抑制効果を示すと考えられた。Toc-HDO 投与による用量依存性効果も確認された。なお、Toc-HDO 投与に伴う副作用は血液検査や病理組織評価では確認されなかった。

次に、薬剤送達効果の評価のためマルチプレートリーダーで蛍光付き Toc-HDO シグナル TECAN による蛍光強度の定量をしたところ、Toc-HDO は、脳梗塞部位において非病変部と比較して著明な送達効果を認めた。また、脳梗塞部位への薬剤送達は ASO と比較しても優れた結果であった。HELISA においても同様に、虚血部位により多くの薬剤が送達される結果だった。共焦点顕微鏡にて観察をしたところ、蛍光付き Toc-HDO シグナルは脳梗塞部位の血管内皮細胞 (CD31 陽性細胞) と、神経細胞 (NeuN 陽性細胞) と一致した分布が確認された。

脳梗塞超急性期において、LDLR、SRB1、LRP1 などの脂質受容体の発現は特に 6 時間後に脳

梗塞部位で対側に比較して明らかに亢進していた。組織評価では、LDLR 並びに SRB1 陽性シグナルは脳梗塞病変の血管内皮と、LRP1 は神経細胞と一致して分布していた。LDLR ノックアウト (KO) マウスでは Toc-HDO の脳梗塞病変での遺伝子抑制効果が減弱した結果も併せて、脂質受容体が Toc-HDO の薬剤送達に関与していることが示唆された。

MALAT-1 遺伝子抑制に伴う、脳梗塞の表現型の評価を行ったところ、Toc-HDO 投与群では、PBS 群に比較して脳梗塞巣サイズの拡大、脳血流低下、神経症状の悪化が見られた。血管面積も小さく、神経細胞変性指標シグナル (FJ-C) も多い結果だった。

MALAT-1 標的 Toc-HDO 投与後の脳梗塞部位の mRNA プロファイルをマイクロアレイで評価したところ、炎症やアポトーシス、血管新生抑制に関与する mRNA の発現の亢進が認められ、脳梗塞表現型の悪化に寄与している可能性が示唆された。

Toc-HDO は脳梗塞病変選択的に薬剤送達されることが示された。脳梗塞超急性期では、脳梗塞中心部の脳血流は正常領域と比較して 90% 程度低下すると言われている。薬剤送達効率は血流減少に伴い低下することが報告されているが、我々の研究結果では脳梗塞領域への Toc-HDO の薬剤送達が健常側と比較して有意に高いことを発見した。同様の現象は、ナノサイズリポソームなど脂質粒子の薬剤キャリアーを有する薬剤でも確認されている。経静脈的に投与された ASO は血中で血清アルブミンに結合するのに対し、Toc-HDO は生理的ビタミン E 同様に血中のリポタンパク質である HDL や LDL に結合し脂質受容体を介して細胞内に取り込まれる。LDLR、LRP1、SBR1 は脳梗塞急性期に脳梗塞領域の血管内皮や脳神経細胞で著明に発現が亢進し、LDLR KO マウスを使用した脳梗塞モデルでは Toc-HDO の脳梗塞病変での遺伝子抑制効果が野生型と比較して明らかに低下することも確認された。Toc-HDO は脳梗塞急性期には脂質受容体介在性 transcellular pathways を介して虚血病変に送達されること、特に脳梗塞部位での LDLR の発現亢進が関わっていることが示唆された。なお、Cho-HDO が病変部位のみならず非虚血病変でも高い遺伝子抑制効果を示した点は、脂質受容体による transcellular pathway 以外の送達経路が関わっている可能性がある。

核酸医薬は脊髄筋萎縮症などに実際臨床応用され始めているが、投与経路は髄腔内である。脳梗塞急性期の患者では、プラスミノーゲンアクチベーターや抗血小板薬などを投与した場合髄腔内投与は出血のリスクが高まり禁忌となる。我々の技術は、経静脈的投与により投与が可能であることは合併症予防の観点からも非常に優れているといえる。

脳梗塞急性期に、脂質ライガンド結合 HDO を経静脈的に投与することで、脳梗塞病変に選択的に薬剤が送達され、高い遺伝子抑制効果を示すことが確認された。これにより、脳梗塞の表現型も変化させることが確認できた。脂質ライガンド結合 HDO 技術は、脳梗塞急性期治療の遺伝子制御ツールとして臨床応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki Motohiro, Ishibashi Satoru, Iwasawa Eri, Oguma Takahiro, Saito Yasuhiro, Li Fuying, Otsu Shinichi, Ichinose Keiko, Yoshioka Kotaro, Nagata Tetsuya, Yokota Takanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Effective silencing of miR-126 after ischemic stroke by means of intravenous - tocopherol?conjugated heteroduplex oligonucleotide in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93666-y	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 Sugita Y, Nichida Y, Ishibashi S, Yokota T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Convexity subarachnoid hemorrhage soon after starting a direct oral anticoagulant in 2 patients with acute infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis.	6. 最初と最後の頁 105216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105216. Epub 2020 Aug 12.	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 Iwase R, Ishiguro T, Fujita K, Ishibashi S, Yokota T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Dupilumab for atopic dermatitis, a possible risk factor of juvenile ischemic stroke: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis.	6. 最初と最後の頁 104763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104763. Epub 2020 Apr 4.	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 Sekiguchi T, Ishibashi S, Sasame J, Mukae JI, Noda K, Tanaka H, Yamamoto K, Takemoto Y, Kumagai J, Yokota	4. 巻 412
2. 論文標題 Recurrent stroke due to quasi-moyamoya disease associated with POEMS syndrome: An autopsy case	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 116738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2020.116738	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木基弘
2. 発表標題 脳梗塞におけるヘテロ二本鎖核酸による脳血管内皮細胞特異的microRNAの制御
3. 学会等名 日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李 富瑩
2. 発表標題 脳梗塞超急性期モデルマウスにおけるヘテロ核酸の虚血部位選択的デリバリー並びに遺伝子抑制効果
3. 学会等名 日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒 太郎
2. 発表標題 多発性脳梗塞、椎骨動脈解離、両側内頸動脈瘤など多彩な病変を呈した新規COL4A2変異が疑われた一例
3. 学会等名 日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoru Ishibashi
2. 発表標題 Therapeutic strategies promoting collateral circulation
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	石黒 太郎 (Ishiguro Taro) (20748587)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (12602)	

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