

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K12654
研究課題名(和文) アンチmiRNAオリゴ核酸を包埋した生分解性ナノ粒子による下肢慢性動脈閉塞症治療

研究課題名(英文) Treatment of chronic arterial occlusion with biodegradable nanoparticles encapsulating anti-miRNA oligonucleotides

研究代表者
石原 務 (ISHIHARA, Tsutomu)
日本大学・工学部・教授

研究者番号：70349554
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)：本研究では、下肢慢性動脈閉塞症の治療を目指し、血管新生を誘導可能な核酸医薬の創製を試みた。核酸分子としては、アンチmiRNAオリゴ核酸(AMO)に着目し、また、AMOの病変部位への集積性を高めるため、そのキャリアとして生分解性ポリマーからなるナノ粒子を調製した。このナノ粒子は、表面のRGDペプチドを介しAMOを血管内皮細胞に効率良く集積させることができた。血管内皮細胞による創傷治癒試験及びチューブフォーメーション試験から、血管新生誘導能の高い3種のAMOを見だし、さらに、そのAMOを担持したナノ粒子が顕著に血管新生を誘導できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下肢慢性動脈閉塞症は、患肢切断に至るなどQOLは著しく低い。しかし、現在の薬物療法では劇的な改善効果がなく、遺伝子治療薬/核酸医薬のような新たな作用機序に基づく新薬が切望されている。本研究では、既存薬の課題を克服した新たな核酸医薬を作製した。この医薬は、AMOにより血管新生を誘導し、標的細胞(血管内皮細胞)に高い集積性を示す。本成果は、miRNAを標的とした核酸医薬の先駆けとなる可能性を秘めており、学術的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop an oligonucleotide therapeutic that can induce angiogenesis for the treatment of chronic arterial occlusion. Anti-miRNA oligonucleotides (AMO) were selected as nucleic acid molecules, and nanoparticles consisting of biodegradable polymers were prepared as a carrier of AMO to enhance its accumulation in lesion sites. These nanoparticles were able to efficiently accumulate AMO on vascular endothelial cells via RGD peptides on the surfaces. From wound healing assay and tube formation assay using vascular endothelial cells, three types of AMO with high angiogenesis induction ability were screened. Furthermore, it was found that the nanoparticles with AMO could significantly induce angiogenesis.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：ナノ粒子 生分解性ポリマー アンチmiRNAオリゴ核酸 血管新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新たな機序による創薬ストラテジーとして、オリゴ核酸を有効成分とする核酸医薬が注目されている。核酸医薬とは、アンチセンスや siRNA、miRNA などのオリゴ核酸(ODN)を薬物として用い、タンパク質の発現制御を行う医薬品である。しかし、一般に核酸は、細胞に取り込まれにくく分解されやすいため、適切なキャリアの開発が不可欠である。これまでに我々は、生体適合性でかつ生分解性のポリ乳酸(PLA)を基材とし、様々な薬物を封入したナノ粒子を開発してきた。例えば、TNF に対する siRNA を封入したナノ粒子を作製し、関節リウマチに対する核酸医薬としての可能性を模索してきた。このナノ粒子は、ODN を物理的に内包することで、生体環境下でも安定に ODN を保持でき、かつポリマーの加水分解速度に応じ ODN の放出速度を制御できる。また、表面をポリエチレングリコール(PEG)で覆うことで、広義での EPR 効果により炎症組織への集積性を高められる。

本研究では、開発する核酸医薬の標的疾患として下肢慢性動脈閉鎖症を選定した。この疾患は進行すると間歇性跛行や患肢切断に至り、QOL が著しく低い。カテーテル治療やバイパス術など外科手術による治療が行われているが、より簡便で確実な薬物療法への期待は大きい。しかし、現在臨床で使われているプロスタグランジンなどの血管拡張薬や抗血小板薬には、劇的に症状を改善する効果はなく、新たな機序に基づく医薬品開発が切望されている。その有力候補が血管新生療法である。低分子薬やタンパク質医薬を用いた臨床試験例もあるが、特に注目されているのが遺伝子の発現制御に基づく遺伝子治療薬/核酸医薬である。2019 年に条件/期限付で承認された遺伝子治療薬コラテジェンは HGF 遺伝子を含むプラスミド DNA からなり、筋肉内注射すると細胞内で HGF が発現され血管新生を誘導する。この医薬品は、「人工的な遺伝子発現制御による血管新生が、下肢慢性動脈閉塞症の治療に有効である」ことを初めてヒトで実証した。しかし、この医薬品は、キャリアを用いていないため、DNA の細胞内導入効率は高くない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が確立した基盤技術を活用することで、下肢慢性動脈閉塞症に高い治療効果を示す核酸医薬の創製を目標とした。具体的には、病変部位の血管内皮細胞に ODN を効率的に運搬し血管新生を誘導するため、ODN のキャリアとして 2 種類の PLA ナノ粒子を作製した。一つはイオン相互作用を介し ODN を表面に結合させたナノ粒子(結合型ナノ粒子)であり、もう一つは ODN を内部に封入したナノ粒子(封入型ナノ粒子)である。封入型ナノ粒子では、その表面に PEG 鎖を配することで貪食細胞への取り込みを抑制し、さらに PEG 鎖末端にリガンドを配することで、血管内皮細胞へのアクティブターゲティングを目指した。一方、ODN の種類としては、miRNA に対し相補的な配列を有する Anti-miRNA ODN(AMO)に着目した。一般に、一つの miRNA は複数の遺伝子発現制御に関わることが知られる。よって、AMO により miRNA の働きを制御できれば、単一の遺伝子を導入する場合より高い薬理効果を得られる可能性がある。本研究では、培養細胞を用いた血管新生モデル試験により、血管新生を効果的に誘導する AMO のスクリーニングを実施した。さらに、PLA ナノ粒子を作製し、その血管新生誘導能を評価した。

3. 研究の方法

はじめに、ナノ粒子の基材となるポリマーを合成した。末端がチオール基とヒドロキシ基の PEG(SH-PEG-OH)にジチオジピリジンを経由して、ピリジリルジスルフィド基(Pyds)を修飾した Pyds-PEG-OH を得た。このポリマーとオクチル酸スズの存在下でラクチドを開環重合することで、PEG と PLA からなるブロック共重合体(Pyds-PEG-PLA)を得た。一方、片末端にカルボキシ基を有する PLA-C と塩基性基を有する化合物(エチレンジアミンなど)を縮合剤と共に反応させることで、片末端に塩基性基を導入した PLA-N1 を合成した。合成したポリマーは、¹H-NMR 解析、およびカルボキシ基、アミノ基の検出試薬(アントリルジアゾメタン:ADAM、トリニトロベンゼンスルホン酸:TNBS)との反応物の GPC 分析(TSKgel G3000H XL カラム)により評価した。

ナノ粒子はバッチ式溶媒拡散法により調製した。結合型ナノ粒子は、PLA を溶解した DMSO を純水に滴下することで調製した。封入型ナノ粒子は、PLA および Pyds-PEG-PLA、AMO を溶解した DMSO を純水に滴下することで調製した。さらに、このナノ粒子懸濁液に、システインと RGD 配列を有する環状ペプチド(RGD ペプチド)を添加することで、リガンド分子をナノ粒子表面に修飾した。

AMO の薬理効果は、HUEhT 細胞(不死化ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用い、血管新生のモデル試験として知られる創傷治癒試験(スクラッチ試験)およびチューブフォーメーション(管形成)試験により評価した。創傷治癒試験では、試験物質と 3 日間インキュベート処理したコンフルエントの細胞単層に、木箸にて直線状に引っ掻き、模擬的な創傷となるギャップ(溝)をつくった。その直後と 6 時間後の写真からギャップ幅の変化を測定した。チューブフォーメーション試験では、細胞と試験物質を 3 日間インキュベートした後、トリプシンにより細胞を回収した。その細胞をマトリゲル上に 7000cells/well で播種し、4 時間後に写真撮影した。この画像を Tube Formation FastTrack AI Image Analysis により解析した。

4. 研究成果

血管新生に関わる 8 種の miRNA は論文調査により選定した。それらに相補的な配列を有する S 化体あるいは locked nucleic acid(LNA)の AMO は、委託合成により入手した。なお、本研究で用いた AMO は、その標的となる miRNA の名称(番号)とそれに続く AMO の組成(S 化体 : S、LNA : L)にて表記した。S 化体の 8 種の AMO を HUEhT 細胞の創傷治癒試験に供したところ、92aS、21S、221S にて高い創傷治癒効果が認められ、中でも 92aS が最も高かった。そこで、同配列の LNA である 92aL と比較したところ、92aS の方が高い効果を示した。さらに、これらの AMO を用いて、チューブフォーメーション試験を実施した。総チューブ長、平均チューブ長、ループ数、ループ面積、分岐数にて、92aS および 221S が、コントロール配列の S 化体(conS)よりも効果が高く、また、92aS の方が 92aL より高い効果を示した。以上より、今回試験した AMO の中では、92aS が最も血管新生を誘導できる AMO であることが明らかになった。

次に、ナノ粒子の基材となる PLA を合成し GPC 解析した。ADAM との反応物を分析すると、PLA-C に比べ PLA-N1 にて、PLA の溶出時間中出现する ADAM 由来の吸収ピークの面積が減少した。この結果から、エチレンジアミンの修飾率は 93%と算出された。一方、TNBS との反応物では、PLA-N1 にて、TNBS 由来の吸収ピークが PLA の溶出時間中出现した。よって、PLA-N1 は、1 級アミノ基が片末端に導入されていることがわかった。一方、¹H-NMR 解析から、Pyds-PEG-PLA の Pyds 基の修飾率は 70%と算出された。

PLA-N1 を用い作製した結合型ナノ粒子の粒子径は 24nm であった。蛍光ラベルしたオリゴ核酸(conF)の HUEhT 細胞への取り込みを蛍光顕微鏡により観察したところ、conF 単独ではほとんど細胞に取り込まれなかったのに対し、conF とナノ粒子の混合物(conF に対するナノ粒子の重量比が 100 となるように混合)では、細胞への取り込みが増大した。よって、このナノ粒子は conF の細胞内移行性を高められることがわかった。

一方、Pyds-PEG-PLA と PLA-N1、ODN から調製したナノ粒子に RGD ペプチドを添加することで、ODN を封入し、かつ RGD ペプチドを表面に修飾したナノ粒子(封入型ナノ粒子)を得た。その粒子径は 100~200 nm 程度で、ODN の封入率はおおよそ 2%だった。HUEhT 細胞への取り込みを評価したところ、conF のみや RGD ペプチド未修飾ナノ粒子と比べ、conF を封入した RGD ペプチド修飾ナノ粒子では顕著な取り込みがみとめられた。さらに、培地中に RGD ペプチドを共添加すると、この取り込みが抑制されたことから、このナノ粒子は、HUEhT 細胞上のインテグリンを介し細胞に取り込まれたことが示唆された(図 1)。

続いて、ODN と結合型ナノ粒子の混合物、あるいは ODN を封入した RGD ペプチド修飾ナノ粒子を用い、HUEhT 細胞の血管新生促進能を評価した。創傷治癒試験を実施したところ、92aS と結合型ナノ粒子の混合物および 92aS 封入ナノ粒子の方が、conS を含有するナノ粒子より、ギャップ幅が狭く創傷治癒効果が高いことがわかった。また、92aS を封入したナノ粒子のうち、RGD を修飾したナノ粒子の方が、未修飾のナノ粒子より高い効果を示した。一方、92aS を単独で添加した場合でも、同等の効果が確認できた。さらに、チューブフォーメーション試験を実施した(図 2、表 1)。総チューブ長、平均チューブ長、ループ数、分岐数にて、92aS と結合型ナノ粒子の混合物および 92aS 封入ナノ粒子の方が、conS を含有するナノ粒子より高い効果を示した。

以上より、本研究では、培養細胞を用いた 2 つの血管新生モデル試験から miRNA92a に相補的な S 化体(92aS)が最も血管新生促進効果があることを見出した。また、92aS 結合型ナノ粒子あるいは 92aS 封入ナノ粒子でも、血管新生を誘導できることが明らかになったが、92aS を単独で添加した場合と比べ、その効果に顕著な優位性はみとめられなかった。しかしながら、封入型ナノ粒子は全身投与によるアクティブターゲティングが期待できることから、臨床応用の際には QOL の低下を防ぎ多くの AMO を血管内皮細胞に送達できると考えられる。

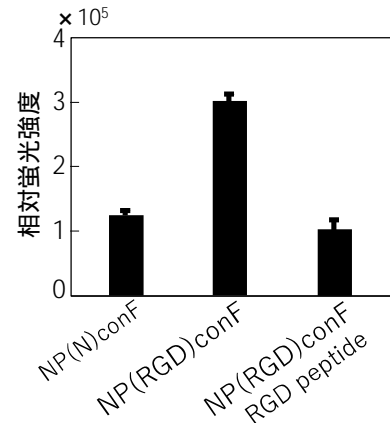


図 1 RGD ペプチド修飾ナノ粒子の HUEhT 細胞への取り込み

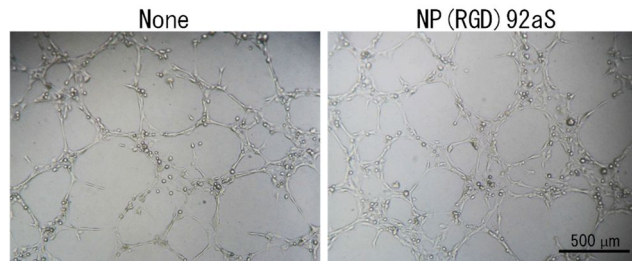


図 2 HUEhT 細胞のチューブ形成

表 1 AMO による HUEhT 細胞のチューブ形成誘導

AMO	総チューブ長(μm)	平均チューブ長(μm)	ループ数	分岐数
None	14450	688	21	57
conS	14970	651	23	57
92aS	15640	505	31	70
NP/conS	14800	569	26	65
NP/92aS	15430	429	36	70
NP(RGD)conS	14510	605	24	65
NP(RGD)92aS	18170	478	38	80

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口天志、山本真大、山田賢伸、室野井実紀、伊藤悟、石原務
2. 発表標題 機能性ポリ乳酸ナノ粒子の調製とその核酸医薬への応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口天志、山本真大、山田賢伸、室野井実紀、伊藤悟、石原務
2. 発表標題 RGDペプチドを修飾したポリ乳酸ナノ粒子の調製とその核酸医薬への応用
3. 学会等名 2022年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本真大、田口天志、室野井実紀、内野智裕、石原務
2. 発表標題 骨ターゲティングを目指したペプチド修飾ポリ乳酸ナノ粒子の開発
3. 学会等名 2022年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原務
2. 発表標題 Biodegradable polymer nanoparticles for drug delivery
3. 学会等名 2021年度化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 室野井実紀、宮下侑子、伊藤悟、安田京磨、石原務
2. 発表標題 ペプチドを表面に修飾した機能性ポリ乳酸ナノ粒子の作製
3. 学会等名 2021年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤悟、佐藤佳純、佐藤仁美、石原務
2. 発表標題 オリゴ核酸を封入したポリ乳酸ナノ粒子の開発
3. 学会等名 2020高分子学会東北支部研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田京磨、吉田拓弥、石原務
2. 発表標題 薬物放出速度制御とターゲティング能を有するポリ乳酸ナノ粒子の作製
3. 学会等名 2020高分子学会東北支部研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：石原務 他110名、技術情報協会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 新規モダリティ医薬品のための新しいDDS技術と製剤化	

〔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
---------	---------