

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82718

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18070

研究課題名（和文）iPS細胞のin situ作製を実現するRNAレプリコン内包ミセルの開発

研究課題名（英文）Development of RNA replicon-loaded micelles for in situ preparation of iPS cells

研究代表者

宮崎 拓也（Miyazaki, Takuya）

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・「貼るだけ人工臓器」プロジェクト（松元P）・非常勤研究員

研究者番号：80844779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：山中因子導入によるiPS細胞のin situ作製は魅力的な戦略であるが、安全かつ効率的な遺伝子導入方法がまだない。本研究では、ゲノム挿入の危険がなく安全かつ効率的にiPS細胞を誘導できるRNAレプリコンに着目し、高分子ミセルを用いてRNAレプリコンを送達することで、生体内でiPS細胞を作製することを目的とする。具体的には、RNAに親和性の高い柔軟性ポリカチオンによるRNAレプリコンを酵素分解から保護する機能に加え、細胞質への送達のための機能性アミノ酸を搭載した高分子ミセルを開発し、その投与により生体内で標的細胞に山中因子を発現させることで、iPS細胞をin situ誘導する方法を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を用いた細胞治療は難治性疾患の新規治療法として注目されているが、患者由来細胞の摘出や山中因子の導入、iPS細胞の単離といった煩雑な工程が患者様ごとに必要となる。そこで、本研究では、1本の注射剤で安全かつ効率的にiPS細胞を産出する方法を確立した。本研究で得られた成果を特定の疾患に応用することで、臨床応用に向けた開発を進めることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In situ preparation of iPS cells is attractive approach while its in vivo applications have been hampered by low safety and efficacy. Thus, we have developed replicon-loaded polymeric micelles by engineering polycation to protect RNA payload and RNA to avoid genome insertion. Moreover, we have introduced functional amino acids as pendants in the polymers to promote accumulation in cytosol and to accelerate production of Yamanaka factors. In this study, we have developed polymeric micelles translating Yamanaka factors in vivo with high safety and efficacy aimed to in situ production of iPS cells.

研究分野：生体医工学

キーワード：ブロック共重合体 高分子ミセル RNAレプリコン 遺伝子治療 山中因子 iPS細胞 ドラッグデリバリーシステム 核酸医薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ex vivo で山中因子を導入した iPS 細胞を移植する再生医療は、難治性疾患の治療に有望である。現時点で 50 以上の臨床試験が進められ、臨床試験における有用性も実証されている。しかし、患者由来細胞の摘出、山中因子の導入、iPS 細胞の単離といった煩雑な工程が、患者ごとに必要となる。また、これらの工程は、専用の施設で、熟練した技術者が行う必要がため、iPS 細胞による再生医療は世界中でもごく限られた医療機関でしか受けられない。更に、1 件あたり数千万円以上必要となるなど、経済的コストは非常に高い。例えば、1,000 万人以上と推定されるパーキンソン病患者の全てに対して個別化 iPS 細胞治療を行うことは現実的ではなく、現段階で iPS 細胞による再生医療は、標準治療とはなり得ない。

そこで、患者の体内で標的細胞に山中因子を導入することで、iPS 細胞を *in situ* 作製する技術の開発が世界中で進められている。この場合、煩雑な iPS 細胞調製工程が不要となり、コストが軽減でき、あらゆる医療機関での治療も可能となる。しかしながら、DNA の核内導入による iPS 細胞の *in situ* 作製では奇形腫の形成および低い遺伝子導入効率が問題となっている。実際に、DNA 導入ではゲノム DNA への挿入が起こるため、奇形腫の形成によるがん化の危険性が指摘されている。また、核内導入に必要な DNA は細胞分裂の速い一部の細胞種にのみ使用可能であり、細胞分裂の遅い正常細胞への導入は困難であることから、iPS 細胞の作製効率は低い。この問題に対して、核内導入の必要ないメッセンジャー RNA (mRNA) により奇形腫の形成が回避され、分裂の遅い正常細胞への効率的な遺伝子導入ができると期待される。しかし、DNA 導入と比べ mRNA 導入では、タンパク質の発現期間が一過的であり、数週間程度の持続発現が求められる iPS 細胞作製には適さないと考えられる。

これらの課題に対して、核内導入の必要がなく自己複製により持続的な遺伝子発現が可能な RNA レプリコンに着目し、生体内に送達することで iPS 細胞を *in situ* 作製することを着想した。この場合、煩雑な iPS 細胞調製工程が不要となり、コストが軽減できる。また、DNA を使用しないことから、奇形腫の形成もなく、非分裂細胞への遺伝子導入も可能となる。さらに、mRNA 導入と比べ RNA レプリコン導入では、自己複製によりタンパク質を持続的に発現することに加え、レプリコン 1 分子で 4 種類の山中因子を同時に発現できることから、同一細胞内に 4 種類の山中因子の導入が可能となり、iPS 細胞の作製効率が大幅に向上すると想定される。実際に、RNA レプリコン導入により *in vitro* 環境で iPS 細胞の作製に成功した例も存在する。しかし、RNA レプリコンの生体応用に関して、生体内で急速な酵素分解を受けるほか、細胞へほとんど取り込まれないため、ナノキャリアを用いて分解から保護し、標的細胞に取り込ませる必要がある。これに対して、RNA との親和性の高い柔軟なポリカチオンを基盤として、mRNA 内包高分子ミセルを開発することで、生体内での mRNA 送達活性を飛躍的に向上させた。さらに、RNA レプリコンを内包し、生体内に送達する技術も有する。

本研究では、RNA レプリコンを内包できるナノキャリアを用いて、生体内の標的細胞で効率的に山中因子を発現させることで、奇形腫形成を回避しながら *in situ* 再生医療を奏功させることはできないか、が核心をなす問いであり、柔軟なポリカチオンおよびミセル設計に関する優れた技術を基盤として、この課題に取り組む (図 1) 。

2. 研究の目的

本研究では、安全かつ効率的な RNA レプリコン送達システムを開発することで、生体内で iPS 細胞を作製することを目的とする。iPS 細胞を移植する再生医療は、その有用性が臨床で実証された一方で、経済的コストや煩雑な iPS 細胞調製工程が障害となり、標準治療とはなり得ない。本研究は、この課題を克服する上で、極めて重要である。レプリコン送達による生体内 iPS 細胞作製が実現することで、現在患者ごとのオーダーメイドだった再生医療を、将来的に世界中で応用が可能な治療にすることができる。本研究で、以下 4 点の革新的成果が期待される。(1) 煩雑で高い経済的コストを要する *ex vivo* での iPS 細胞の GMP 製造を回避できる。(2) ミセルは保存、輸送が容易で、随時供給可能である。(3) 他の遺伝子治療と比べレプリコンは、ゲノム挿入の危険がなく、臨床応用可能な安全性を有する。(4) RNA の配列を変えるだけで、将来的にはがん、感染症にとどまらず幅広い疾患に対する新たな治療コンセプトの構築に繋がる。これまでレプリコンを用いて生体内で iPS 細胞を作製した報告はなく、独自性は極めて高い。また、DNA で iPS 細胞を作製した例もあるが、奇形腫の形成や低い遺伝子導入効率が障壁となり臨床応用は非現実的である。本研究では、将来的に臨床応用可能な方法で iPS 細胞を *in situ* 作製する点が特長である。レプリコンを用いた生体内での山中因子の導入が行われてこなかったのは、技術的に困難であったためと想定される。この課題に、革新的な技術基盤を用いて取り組む。

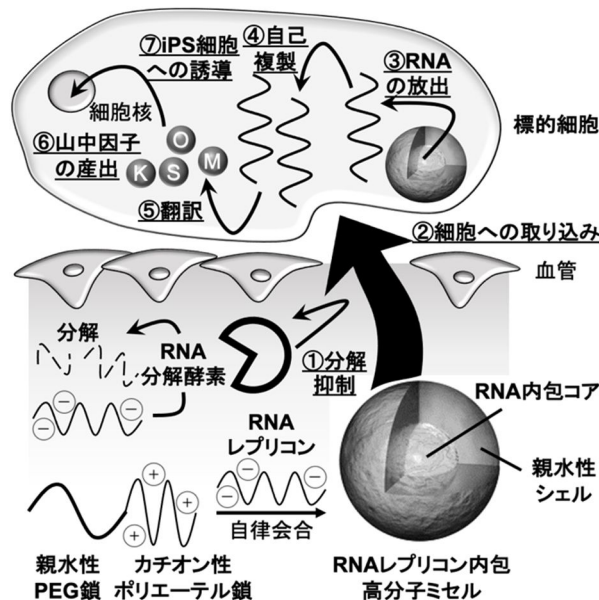


図1 本研究で実施するRNAレプリコン内包高分子ミセルによる生体内での山中因子の産出およびiPS細胞への誘導

3. 研究の方法

(1) 多機能型 RNA レプリコン内包ミセルの設計と最適化

ミセルはポリエチレングリコール (PEG) とポリカチオンからなるブロック共重合体と RNA レプリコンを水中で混合することで得られ、凝縮したレプリコンの周りを PEG が覆う構造をとる。RNA に親和性の高い柔軟なポリカチオンを開発することで、mRNA 送達活性を飛躍的に向上させたが、今回そのシステムを発展させる (図 2)。具体的には、柔軟性ポリカチオンの側鎖構造に様々な機能性アミノ酸を生分解性エステル結合を介してポリマーに結合させ、最適化のためのライブラリーを作成する。例えば、トリプトファンは π - π 相互作用で RNA 塩基に強く結合し、ヒスチジンはミセルのエンドソーム脱出を促進し、システインはポリマー間をジスルフィド架橋でミセルを安定化させる。合成したポリマーとレプリコンからミセルを調製し、粒径を動的光散乱法や透過型電子顕微鏡法にて決定する。続いて、GFP レプリコンをレポーターとして用い、様々な組成のミセルのマウス胚由来繊維芽細胞へのレプリコン導入効率を *in vitro* で評価する。GFP が導入された細胞の割合や、GFP 発現の持続期間をフローサイトメーター (FCM) で調べることで有望なミセル設計を見出す。

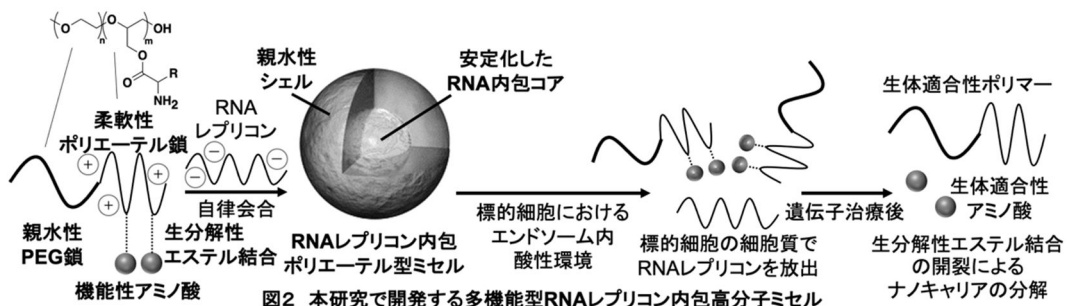


図2 本研究で開発する多機能型RNAレプリコン内包高分子ミセル

(2) 培養細胞と実験動物を用いた機能評価

有望な設計を用いて山中因子のレプリコンを導入し、抗体染色後に FCM で、山中因子陽性細胞の割合を経時的に評価する。山中因子発現後、定量 PCR で幹細胞マーカーの発現を確認する。続いて、調製した iPS 細胞の分化能を、FCM で外胚葉・中胚葉・内胚葉マーカーを定量することで評価する。調製した iPS 細胞を免疫不全マウスに皮下投与し、切片観察で奇形種の形成の有無を確認する。安全性が確認された後、蛍光標識されたミセルを全身投与し、全身での臓器分布の評価や GFP レプリコンを用いたタンパク質発現活性の定量を行う。さらに、山中因子のレプリコン内包ミセル投与後の各臓器における山中因子・幹細胞マーカーの発現を ELISA で定量し、切片観察で外胚葉・中胚葉・内胚葉・奇形腫の形成を確認する。

4. 研究成果

(1) 多機能型 RNA レプリコン内包ミセルの設計と最適化

¹H-NMR 法および GPC 法より、分子量分布の狭いポリマーの形成を確認した。ここで、トリ

プトファン、ヒスチジンおよびシステインの導入も確認した。また、DLS 法および透過型電子顕微鏡法より、粒径分布の狭い 50 nm サイズのミセルの形成を確認した。続いて、GFP レプリコンをレポーターとして用い、マウス胚由来繊維芽細胞へのレプリコン導入効率を *in vitro* で評価したところ、トリプトファン、ヒスチジンおよびシステインの導入率の増大によりレプリコン導入効率が向上することを確認した。また、最も導入効率が高い組成において GFP 発現の持続時間が最大化し、導入 1 週間後も発現が持続することを確認した。

(2) 培養細胞と実験動物を用いた機能評価

導入効率が高い複数のポリマーに山中因子レプリコンを導入し、マウス胚由来繊維芽細胞へのレプリコン導入効率を *in vitro* で評価したところ、GFP レプリコンの場合と同様にトリプトファン、ヒスチジンおよびシステインの導入率の増大によりレプリコン導入効率が向上することを確認した。また、山中因子の発現効率の増大とともに幹細胞マーカーの発現量が向上し、iPS 細胞に効率的に誘導できることを確認した。ここで、調製した iPS 細胞を免疫不全マウスに移植しても奇形腫が形成されないことを確認した。その後、Cy5 標識されたポリマーと GFP レプリコンからなるミセルを全身投与し、全身での臓器分布を確認したところ、肝臓や腎臓において Cy5 および GFP が確認されたことから、今後の試験については肝臓および腎臓を主要な標的組織とした。そこで、山中因子レプリコンからなるミセルを全身投与し、肝臓および腎臓の切片観察を行ったところ、外胚葉や中胚葉、内胚葉の形成が確認された一方で、奇形腫の形成は確認されなかった。よって、開発したミセルを用いることで肝臓や腎臓において iPS 細胞の *in situ* 作製ができることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oda Hiroko, Nagamatsu Takeshi, Schust Danny J, Cabral Horacio, Miyazaki Takuya, Iriyama Takayuki, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Recombinant Thrombomodulin Attenuates Preeclamptic Symptoms by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endoctr/bqaa248	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 Miyazaki Takuya, Khan Thahomina, Tachihara Yoshihiro, Itoh Michiko, Miyazawa Taiki, Suganami Takayoshi, Miyahara Yuji, Cabral Horacio, Matsumoto Akira	4. 巻 4
2. 論文標題 Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 6647 ~ 6651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.1c00383	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 Martin John D., Miyazaki Takuya, Cabral Horacio	4. 巻 13
2. 論文標題 Remodeling tumor microenvironment with nanomedicines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wnan.1730	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 Oda Hiroko, Nagamatsu Takeshi, Cabral Horacio, Miyazaki Takuya, Iriyama Takayuki, Kawana Kei, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 111
2. 論文標題 Thrombomodulin promotes placental function by up-regulating placental growth factor via inhibition of high-mobility-group box 1 and hypoxia-inducible factor 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2021.06.002	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 Hong Taehun, Miyazaki Takuya, Matsumoto Akira, Koji Kyoko, Miyahara Yuji, Anraku Yasutaka, Cabral Horacio	4. 巻 7
2. 論文標題 Phosphorylcholine-Installed Nanocarriers Target Pancreatic Cancer Cells through the Phospholipid Transfer Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 4439 ~ 4445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c00730	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 Yang Wenqian, Miyazaki Takuya, Chen Pengwen, Hong Taehun, Naito Mitsuru, Miyahara Yuji, Matsumoto Akira, Kataoka Kazunori, Miyata Kanjiro, Cabral Horacio	4. 巻 22
2. 論文標題 Block cationer with flexible cationic segment enhances complexation with siRNA and the delivery performance in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 850 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2021.1976055	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 Chen Siyuan, Miyazaki Takuya, Itoh Michiko, Matsumoto Hiroko, Moro-oka Yuki, Tanaka Miyako, Miyahara Yuji, Suganami Takayoshi, Matsumoto Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 A Porous Reservoir-Backed Boronate Gel Microneedle for Efficient Skin Penetration and Sustained Glucose-Responsive Insulin Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 74 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels8020074	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 宮崎拓也, 内田智士, カブラルオラシオ
2. 発表標題 効率的なmRNA送達に向けた柔軟性高分子の開発
3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Pengwen Chen, Taehun Hong, Horacio Cabral
2. 発表標題 Influence of PEG-Polycation Chain Flexibility on the Assembly of siRNA into Polyion Complexes
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taehun Hong, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Pengwen Chen, Keita Masuda, Yasuhiro Nakagawa, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral
2. 発表標題 Phosphorylcholine-installed polymers target pancreatic tumors through their exacerbated lipid metabolism
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎拓也
2. 発表標題 妊娠期の化学療法に向けたナノ医薬の開発
3. 学会等名 Life Science Connect 2021 ニッチを攻める研究者ピッチコンテスト (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元亮, 宮崎拓也, カーンタホミナ, 宮澤大樹, カブラルオラシオ, 宮原裕二
2. 発表標題 ボロン酸を生体対話の基盤とした「はたらく高分子」
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元亮, Chen Siyuan, 宮崎拓也, 伊藤美智子, Kevin Barthelmes, 松本裕子, 金井紗綾香, 池原清, 諸岡由佳, 木村 真一郎, 田中都, 菅波孝祥, 宮原裕二
2. 発表標題 高分子ゲルの階層的エンジニアリングによる持続型マイクロニードルデバイスの開発
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎拓也
2. 発表標題 炎症性サイトカインの安全性と有効性を高めるpH応答性プロドラッグの開発
3. 学会等名 第28回次世代医工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Masuda, Motohiro Kojima, Hironobu Yanagie, Hiroyuki Takahashi, Takuya Miyazaki, Horacio Cabral
2. 発表標題 Gd203 Nanoparticles for Effective Image-Guided Neutron Capture Therapy (oral)
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Satoshi Uchida, Wenqian Yang
2. 発表標題 Enhanced mRNA Delivery by Polyion Complex Micelles from Flexible Block Ionomers
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Masuda, Motohiro Kojima, Hironobu Yanagie, Hiroyuki Takahashi, Takuya Miyazaki, Horacio Cabral
2. 発表標題 Gd203 Nanoparticles for Effective Image-Guided Neutron Capture Therapy (poster)
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Yu Matsumoto, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Direct Visualization of Drug Activation Facilitates Safe and Effective Nano-Delivery of a Highly Potent Anticancer Drug
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎拓也, BARTHELMES Kevin, 池原清, 宮原裕二, 松元亮
2. 発表標題 力学的強度と薬剤放出能を両立させるスマートゲル内包多孔質マイクロニードルの設計と評価
3. 学会等名 第33回 高分子ゲル研究討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎拓也
2. 発表標題 難治性疾患で苦しむ世界中の患者さんに治療用タンパク質を届ける高分子ミセルの開発
3. 学会等名 化学・材料インキュベーション研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 薬剤送達デバイスおよびその製造方法	発明者 宮崎拓也, ケヴィン バーテルメス, 池原 清, 松元亮	権利者 地方独立行政法 人神奈川県立産 業技術総合研究
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-144286	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 薬剤送達デバイスおよびその製造方法	発明者 宮崎拓也, 伊藤美智 子, 松本裕子, 金井 紗綾香, 松元亮	権利者 地方独立行政法 人神奈川県立産 業技術総合研究
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-144273	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 ニコチンアミド内包ミセル、及びニコチンアミド内包ミセルを含む妊娠高血圧症候群治療 用組成物	発明者 宮崎拓也, オラシオ カブラル, 川島直也	権利者 国立大学法人東 京大学、株式會 社あすか製薬
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/037453	出願年 2021年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 輸送担体を用いた環状化合物の送達	発明者 宮崎拓也, カブラル オラシオ	権利者 国立大学法人東 京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開03892334	出願年 2021年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 サイトカイン内包高分子ミセル	発明者 Takuya Miyazaki, Horacio Cabral	権利者 国立大学法人東 京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-002782	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 ポリグリセロール、該ポリグリセロールを含む複合ゲル組成物、該複合組成物を含む薬剤 送達マイクロニードルおよびそれらの製造方法	発明者 宮崎拓也, 松元亮	権利者 地方独立行政法 人神奈川県立産 業技術総合研究
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/000981	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------