

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19923

研究課題名（和文）精密設計ペプチドを用いた細胞外DNAのin situ PEG被覆による抗炎症治療

研究課題名（英文）In situ PEGylation of extracellular DNA using functional peptides for anti-inflammatory therapy

研究代表者

内田 智士（Uchida, Satoshi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：20710726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性疾患において、炎症により傷害を受けた細胞からDNAやRNAといった核酸が放出され、それが自然免疫受容体に認識されることで、炎症をさらに増悪させ、組織を傷害することが課題であった。本研究では、PEG化されたオリゴペプチドを用いることで、安全にこれらの核酸分子を捕捉し、炎症反応を軽減することに成功した。実際に、炎症モデルマウスにPEG化オリゴペプチドを投与したところ、炎症によるマウスの死亡を防ぐことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のバイオ医薬品は特定の標的タンパク質と相互作用し機能するが、そのために複雑な構造が必要となり、経済的コストが課題となる。これに対して、本研究の手法は、物理化学的に原因物質を除去するというコンセプトであり、単純な設計が可能である。本研究では、炎症性疾患に対する安全かつ効果的な治療法を開発しただけでなく、新たな薬剤設計のコンセプトを提唱したことが学術的意義である。そのことが、薬剤のコストダウンにつながる点が社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：In inflammatory diseases, DNA and RNA released from the damaged cells stimulate innate immune receptors, exacerbating inflammation and damaging tissues. The DNA and RNA are called damage-associated molecular patterns (DAMPs). Our study have developed PEGylated oligopeptides to capture DAMPs to alleviate the inflammation in a safe manner. Indeed, PEGylated oligopeptides successfully rescued the model mice of inflammation from death.

研究分野：核酸医薬

キーワード：ダメージ関連分子パターン ペプチド ポリエチレングリコール 炎症

1. 研究開始当初の背景

炎症組織では、炎症によって傷害を受けた細胞から、DNA や RNA 等の核酸が放出され、その核酸が他の細胞の自然免疫受容体に認識されることで、さらなる炎症反応が誘発される。このように傷害を受けた細胞から放出され、自然免疫を活性化させる物質のことを **damage associated molecular patterns (DAMPs)** と呼ばれる。DAMPs は様々な炎症性疾患の病態に深く関与しており、正のサイクルによる炎症の増悪が組織傷害を引き起こしている。近年では、新型コロナウイルス感染症に伴う肺炎においても DAMPs が重要な役割を果たしていることも報告された¹。

炎症を制御する手法として、ステロイド等の免疫抑制剤が一般的である。しかし、免疫を抑制することに伴う病態への影響のほか、様々な副作用が懸念される。特に慢性炎症疾患に対するステロイドの断続的な投与の是非は、大きな課題である。近年は、インターロイキン 6、腫瘍壊死因子(TNF) α といった炎症性サイトカインに対する抗体医薬も実用化されている。しかし、抗体医薬は経済的に高価であるほか、抗体は分子量が大きく炎症組織に十分に浸透しないことも想定される。

これらの課題に対して、DAMPs を物理化学的に吸着して除去する方法が検討されてきた。実際に、正に帯電したナノ粒子を投与し DAMPs を除去する方法が報告され、関節リウマチ、敗血症などの疾患モデルに対して、優れた効果を示している^{2,3}。しかし、ナノ医薬品の領域において、正に帯電した粒子が、生体内で組織傷害、毒性を示すことが、広く知られている⁴。すなわち、安全な方法で、DAMPs を吸着する方法論が求められていた。

この課題に対して、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を用いて DAMPs を捕捉することを着想した(図 1)。このブロック共重合体は、我々が DNA や mRNA といった核酸を送達するために用いてきたものである⁵。mRNA 送達の研究では、このブロック共重合体で mRNA を被覆することで、自然免疫受容体 Toll 様受容体による mRNA 認識を回避でき、mRNA 投与後の炎症反応を軽減できることを報告している⁶。この研究では、ブロック共重合体であらかじめ核酸を被覆してから投与したが、今回の研究では、その代わりに、核酸が存在する環境に対してブロック共重合体を後から添加しても、同様に核酸に対する自然免疫応答を回避できるのではないかと考えた。ブロック共重合体は、すでに大動物にて安全性が確立されているほか、臨床試験に進んでいるものもあり、安全な DAMPs 捕捉法として期待される^{7,8}。

また、PEG はナノ医薬品において汎用される優れた生体材料であるものの、近年、抗 PEG 抗体の影響が懸念されている⁹。抗 PEG 抗体は、PEG 化されたナノ医薬品の排泄を促進するほか、COVID-19 ワクチンでは、アナフィラキシーの原因になったとも推測されている。この課題に対して、ポリサルコシン(pSar)やポリエチルオキサゾリン(pEtOx)といった PEG の代替材料の研究も進められている(図 2)。しかし、核酸被覆におけるそれらの機能は十分に解明されておらず、今後の検証が必要である。

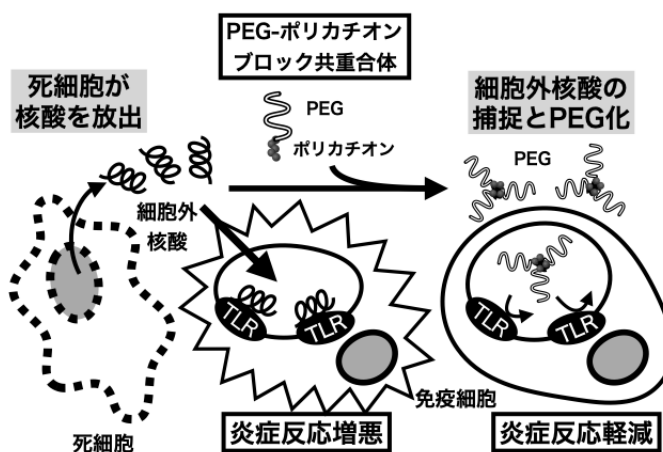


図 1. 本研究のコンセプト。細胞外に放出された核酸等の DAMPs を、PEG ポリカチオンブロック共重合体を用いて捕捉することで、炎症反応を軽減させる。

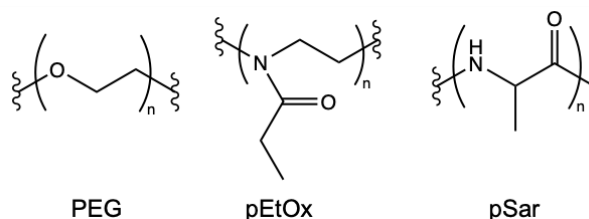


図 2. PEG の代替材料

2. 研究の目的

【テーマ 1】 DAMPs を捕捉するための材料として、PEG-ポリカチオンブロック共重合体が有用であることを実証する。

【テーマ 2】 核酸捕捉における PEG の代替材料の効果を実証する。

3. 研究の方法

【テーマ 1】種々の PEG-ポリカチオンブロック共重合体を合成した。生物学的活性評価では、培養細胞やマウスに対して、CpG オリゴヌクレオチドや poly IC (RNA) といった炎症を惹起する核酸を前投与し、その後に PEG-ポリカチオンブロック共重合体を投与した。炎症反応やマウスの生存を指標にその効果を評価した。

【テーマ 2】核酸の被覆材料の評価を行う際、核酸に対して結合する被覆材料の量が厳密に制御されている必要がある。従来、核酸と結合する高分子や脂質に対して PEG 等を結合させる方法が検討されていたが、この方法では被覆材料の量の精密制御が難しい。そこで、PEG 等被覆材料を結合させた相補鎖 RNA オリゴヌクレオチドを、RNA にハイブリダイズする方法を検討した(図 3)¹⁰。その後、ポリカチオンを添加し、培養細胞、動物での評価を行った。

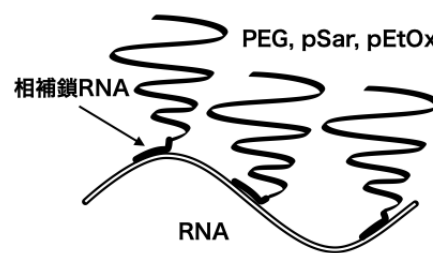


図 3. 相補鎖 RNA を用いた RNA の定量的被覆。RNA 同士のハイブリダイゼーションを利用することで、RNA に結合する被覆材料の量を精密に調整できる。

4. 研究成果

【テーマ 1】マウスに対して、poly IC (RNA) を前投与し、その後に PEG-ポリカチオンブロック共重合体を投与した。すると、前投与を行っていないマウスは、強い炎症反応によりほぼ全て死亡したのに対して、前投与によりほぼ全てのマウスが生存するという予想外の劇的な効果を得ることに成功した。なお、投与に用いた PEG-ポリカチオンブロック共重合体は、動物に対する安全性が確立されたものである。このように、安全な方法で DAMPs を吸着することに成功し、本研究の主目的を達成した。

今後、炎症性核酸の前投与ではなく、より臨床における病態に即したモデルでの検証が必要である。その際、炎症組織へのブロック共重合体の移行性も課題となる。このような課題に加え、生体内での滞留性、核酸捕捉の効率性といった様々なパラメーターが本戦略に重要となる。現在、そのパラメーターの詳細な検証を行っている。

【テーマ 2】RNA 被覆材料として、PEG、pSar、pEtOx の詳細な比較を行った。ここでは、被覆した RNA とポリカチオンの複合体を用いて、他の分子の吸着を RNA 試験管内で評価する試験(ステルス性の評価)、細胞への取り込みの評価、生体内での分布の評価を行った。これら 3 者で違いを認め、PEG の代替材料の機能が PEG と全く同一ではないことが示された。DAMPs 被覆材料として、PEG の代替材料を用いる上での基盤となる知見を得ることに成功した。

結論として、PEG-ポリカチオンブロック共重合体を用いることで、安全な方法で DAMPs を除去することに成功し、本研究の主目的を達成した。この手法の医薬品開発における重要性も特筆すべきである。リコンビナントタンパク質や抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬品の成功を受け、薬剤設計は複雑化の一途を辿っている。これらの薬剤は、生体内で特定の物質と特異的な相互作用を示すため、副反応を回避したまま優れた効果が得られる。一方で、複雑な設計ゆえに、経済的コストの問題は大きい。今回、生物学的な特異的相互作用ではなく、物理化学的な吸着に着目することで、単純な設計で優れた抗炎症効果を得ることに成功した。その設計を工夫することで、副反応の問題も回避している。このように新たなメカニズムに基づく単純な薬剤設計は、複雑化の一途を辿る現在の薬剤開発に一石を投じるものである。

参考文献

- 1 Strich, J. R. *et al.* Fostamatinib Inhibits Neutrophils Extracellular Traps Induced by COVID-19 Patient Plasma: A Potential Therapeutic. *The Journal of Infectious Diseases* **223**, 981-984 (2020).
- 2 Peng, B. *et al.* Tuned Cationic Dendronized Polymer: Molecular Scavenger for Rheumatoid Arthritis Treatment. *Angew Chem Int Ed Engl* **58**, 4254-4258 (2019).
- 3 Shi, C. *et al.* A nanotrap improves survival in severe sepsis by attenuating hyperinflammation. *Nature Commun.* **11**, 3384 (2020).
- 4 Uchida, S. *et al.* PEGylated polyplex with optimized PEG shielding enhances gene introduction in lungs by minimizing inflammatory responses. *Mol. Ther.* **20**, 1196-1203 (2012).
- 5 Uchida, S. & Kataoka, K. Design concepts of polyplex micelles for in vivo therapeutic delivery of plasmid DNA and messenger RNA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **107**, 978-990 (2019).
- 6 Uchida, S. *et al.* In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One* **8**, e56220 (2013).
- 7 Ohgidani, M. *et al.* Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal

- administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys. *J. Control. Release* **167**, 238-247 (2013).
- 8 Watanabe, S. *et al.* In vivo rendezvous of small nucleic acid drugs with charge-matched block cationomers to target cancers. *Nature Communications* **10**, 1894 (2019).
- 9 Chen, B. M., Cheng, T. L. & Roffler, S. R. Polyethylene Glycol Immunogenicity: Theoretical, Clinical, and Practical Aspects of Anti-Polyethylene Glycol Antibodies. *ACS Nano* **15**, 14022-14048 (2021).
- 10 Yoshinaga, N. *et al.* PEGylation of mRNA by Hybridization of Complementary PEG-RNA Oligonucleotides Stabilizes mRNA without Using Cationic Materials. *Pharmaceutics* **13**, 800 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 S. Uchida	4. 巻 14
2. 論文標題 Delivery Systems of Plasmid DNA and Messenger RNA for Advanced Therapies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14040810	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 A. Dirisala, S. Uchida, J. Li, J.F.R. Van Guyse, K. Hayashi, S.V.C. Vummaleti, S. Kaur, Y. Mochida, S. Fukushima, K. Kataoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Effective mRNA Protection by Poly(l-ornithine) Synergizes with Endosomal Escape Functionality of a Charge-Conversion Polymer toward Maximizing mRNA Introduction Efficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromol. Rapid Commun.	6. 最初と最後の頁 e2100754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/marc.202100754	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 Y. Nakagawa, J. Lee, Y. Liu, S. Abbasi, T. Hong, H. Cabral, S. Uchida, M. Ebara	4. 巻 11
2. 論文標題 Microglial Immunoregulation by Apoptotic Cellular Membrane Mimetic Polymeric Particles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Macro Lett.	6. 最初と最後の頁 270-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.1c00643	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 H. Yokoo, M. Oba, S. Uchida	4. 巻 14
2. 論文標題 Cell-Penetrating Peptides: Emerging Tools for mRNA Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14010078	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 N. Yoshinaga, S. Uchida, A. Dirisala, M. Naito, K. Koji, K. Osada, H. Cabral, K. Kataoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Bridging mRNA and Polycation Using RNA Oligonucleotide Derivatives Improves the Robustness of Polyplex Micelles for Efficient mRNA Delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Healthc Mater	6. 最初と最後の頁 e2102016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202102016	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 N. Yoshinaga, M. Naito, Y. Tachihara, E. Boonstra, K. Osada, H. Cabral, S. Uchida	4. 巻 13
2. 論文標題 PEGylation of mRNA by Hybridization of Complementary PEG-RNA Oligonucleotides Stabilizes mRNA without Using Cationic Materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13060800	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 S. Uchida, Y. Yamaberi, M. Tanaka, M. Oba	4. 巻 13
2. 論文標題 A helix foldamer oligopeptide improves intracellular stability and prolongs protein expression of the delivered mRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 18941-18946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NR03600A	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 J. Li, Z. Ge, K. Toh, X. Liu, A. Dirisala, W. Ke, P. Wen, H. Zhou, Z. Wang, S. Xiao, J.F.R. Van Guyse, T.A. Tockary, J. Xie, D. Gonzalez-Carter, H. Kinoh, S. Uchida, Y. Anraku, K. Kataoka	4. 巻 33
2. 論文標題 Enzymatically Transformable Polymersome-Based Nanotherapeutics to Eliminate Minimal Relapsable Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv. Mater.	6. 最初と最後の頁 2105254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adma.202105254	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 R. Kanegawa, M. Naito, S. Uchida, H.J. Kim, B.S. Kim, K. Miyata	4. 巻 4
2. 論文標題 Bioinspired Silicification of mRNA-Loaded Polyion Complexes for Macrophage-Targeted mRNA Delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 7790-7799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbm.1c00704	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 E. Boonstra, H. Hatano, Y. Miyahara, S. Uchida, T. Goda, H. Cabral	4. 巻 9
2. 論文標題 A proton/macromolecule-sensing approach distinguishes changes in biological membrane permeability during polymer/lipid-based nucleic acid delivery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4298-4302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1TB00645B	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 S. Abbasi, S. Uchida	4. 巻 13
2. 論文標題 Multifunctional Immunoadjuvants for Use in Minimalist Nucleic Acid Vaccines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13050644	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 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 生体適合性高分子を基盤とした遺伝子治療とmRNA創薬
3. 学会等名 日経バイオテクセミナー 遺伝子治療が抱える課題と新展開(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 mRNAワクチンの基礎から最前線まで
3. 学会等名 第56回緑膿菌感染症研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 RNA architectonicsを基盤としたmRNA送達とワクチン
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第16回若手研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 SDGsとバイオマテリアル
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 2本鎖PEG-オリゴリシンを用いた肝類洞壁一過的コーティングによるナノ医薬品の体内動態制御
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 内田 智士
2. 発表標題 COVID-19に対するmRNAワクチン開発の動向と独自の取り組み
3. 学会等名 JAACT2021日本動物細胞工学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 智士
2. 発表標題 mRNA医薬、遺伝子治療薬の全身投与に向けた取り組み
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchida S, Abbasi S, Kataoka K
2. 発表標題 Polyplex micelles co-loading Cas9 mRNA and single guide RNA exhibit efficient genome editing in the mouse brain
3. 学会等名 9th International mRNA Health Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchida S, Yoshinaga N, Koji K, Cabral H
2. 発表標題 Assembling Several mRNA Strands for Facilitating mRNA Delivery with and without Using Carriers.
3. 学会等名 24th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田智士, A. Dirisala, 籾加珠子, 長田健介, 片岡一則
2. 発表標題 2本鎖PEGを用いた肝類洞内皮一過的コーティングによる遺伝子治療薬の標的組織集積性向上
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホームページ(日本語) https://kpu-m.medchem.jp/uchida.html ホームページ(英語) https://kpu-m.medchem.jp/uchida_en.html</p>
--

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	大庭 誠 (Oba Makoto) (20396716)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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