

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19921

研究課題名(和文)二重標的Nose-to-Brainミセルによる脳感染神経特異的RNA送達への挑戦

研究課題名(英文)Challenges in dual-targeted nose-to-brain micelles for infected neuron-specific RNA delivery

研究代表者

金沢 貴憲 (KANAZAWA, Takanori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：60434015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が独自に開発したナノ粒子技術(Nose-to-Brainミセル、NtBミセル)を基盤とし、ウイルス脳感染の主要部位である嗅球・脳幹および感染神経細胞にRNA医薬を送達可能なDDSの確立を行った。結果より、わずかな正電荷を示す50 nm以下のNtBミセルが、嗅球・脳幹への送達に適する物性であることを見出した。また、NtBの標的指向化に向けたクリック反応によるリガンド修飾条件を確立した。さらに、ウイルス感染ヒト神経細胞の樹立に成功し、NtBミセルが取り込まれることを明らかとした。以上、本研究より、ウイルスの主要な感染部位および感染神経細胞へ送達可能なナノ粒子技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、高度な設備を持つ限られた機関しか取り扱えないSARS-CoV-2感染ヒト細胞を用いた機能検証から得られる知見は社会的重要度の高いものとなることが期待される。さらに、本研究で開発する脳特定部位(嗅球・脳幹部)の標的細胞に選択的かつ高濃度にRNA医薬を届ける技術は、SARS-CoV-2と同様に、有効な治療薬のない深刻な中枢機能障害を生じる様々な脳感染ウイルスや今後出現する新興ウイルス、さらには、認知・運動等を司る脳特定部位で病態が進行する神経変性疾患に対する治療薬開発にも大きな貢献が見込まれるため、その波及効果は計り知れず、学術的かつ社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, based on the nanoparticle technology (Nose-to-Brain micelles, NtB micelles) originally developed by the principal investigator, we established a DDS that can deliver RNA drugs to the olfactory bulb, brain stem, and infected neurons, which are the main sites of viral brain infection. We found that NtB micelles of less than 50 nm, which exhibit a slight positive charge, are suitable for delivery to the olfactory bulb and brainstem. We also established the conditions for ligand modification by click reaction for target-directed delivery of NtB. Furthermore, we succeeded in establishing virus-infected human neurons and demonstrated that NtB micelles are incorporated into these cells. In summary, this study established a nanoparticle technology that can be delivered to the primary site of viral infection and to infected neurons.

研究分野：薬物送達学

キーワード：Nose-to-Brain ナノ粒子 RNAデリバリー ウイルス脳感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 の新たな問題として、SARS-CoV-2 が末梢から神経経路を介して嗅球・脳幹部より脳内感染して生じる中枢機能障害(感覚・呼吸・認知等)がある[J Exp Med 218:e20202135, 2021]。これらは、重篤化・慢性化するケースも少なくなく、脳感染に対する治療薬の開発は喫緊の課題である。現在承認されているワクチンや抗体療法では、抗体自体の中枢移行性が悪いため、脳内の効果は薄く、現在のところ脳内感染した SARS-CoV-2 そのものを根絶する治療薬はない。

研究代表者はこれまで、鼻腔から神経経路を介する脳への新規ルート(Nose-to-Brain 経路 [Adv Drug Deliv Rev 64:614-28, 2012])にいち早く着目し、ブロックポリマーと膜透過ペプチドを共集合させたミセルの設計により、脳内への高い RNA 送達性を示す Nose-to-Brain 送達ミセル(NtB ミセル)の開発に成功している [Biomaterials 34: 9220-6, 2013]。また、脳感染に対する RNA 治療に展開するには、感染神経細胞への効率的な取り込みが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、“脳感染ウイルス治療に資する RNA 送達技術”の開発を目指し、研究代表者独自の NtB ミセルを、主要な感染部位である嗅球・脳幹部への送達に適する組成・物性に改変するとともに、標的指向化に向けた、NtB ミセルへのリガンド抗体修飾を試みる。また、ヒト神経細胞 SH-SY5Y を用いて、SARS-CoV-2 感染系を樹立し、NtB ミセルの感染神経細胞への取り込みを検証する。

3. 研究の方法

(1) 嗅球・脳幹部における標的遺伝子抑制効果を発揮する NtB ミセル物性の探索

NtB ミセルは、PEG-PCL ブロックポリマー溶液 (THF 溶媒) とステアリン酸修飾塩基性ペプチド溶液 (水系溶媒) を、ガラス製の iLiNP 型マイクロ流体デバイス (MF) を用いて混合後透析することで調製した。様々な物性の NtB ミセルは、分子量の異なる PEG-PCL ブロックコポリマーとペプチドを様々な組成比を用いて調製した。次に、調製した様々な物性の NtB ミセルにハウスキーピング遺伝子標的アンチセンスオリゴ核酸 (Malat-1 標的 ASO) を搭載し、マウス経鼻投与後の主要なウイルス脳感染部位である嗅球・脳幹部を含む脳内各領域における標的遺伝子発現を、RT-qPCR により解析した。

(2) リガンド抗体修飾による標的化 NtB ミセルの作製

NtB ミセルへの抗体リガンド修飾は、断片化抗体のクリック反応により行った。アジド化 PEG-PCL ブロックポリマーを様々な比率で配合したアジド化 NtB ミセルをマイクロ流体デバイス法により調製し、物性を評価した。次に、リガンド抗体をペプシン処理した F(ab')₂ を DTT で還元後、maleimide-DBCO (Dibenzocyclooctyne) を添加し、DBCO 化 Fab' を得た。得られた DBCO 化 Fab' をゲルろ過によって精製後、濃度や温度条件を変えた種々の反応条件で、アジド化 NtB ミセルとクリック反応を行った。反応後、SDS-PAGE とタンパク定量により、各条件の修飾効率を算出した。

(3) SARS-CoV-2 感染神経細胞の作製と NtB ミセルの細胞内取り込み評価：SARS-CoV-2 感染細胞を用いる実験は、P3 の高度病原体実験施設を有する東京薬科大学で行った。はじめに、一般的な SARS-CoV-2 の感染・培養・分離に用いられる VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて SARS-CoV-2 感染実験を行った。感染の評価として、感染 24 時間後の顕微鏡観察による細胞変性効果 (CPE) を確認した。次に、神経細胞 SH-SY5Y への SARS-CoV-2 感染実験を行った。はじめに、レチノイン酸処理により、神経細胞へ分化させたのち、SARS-CoV-2 を暴露し、細胞内のウイルスゲノム量を測定した。次に、NtB ミセルの細胞取り込みを評価した。

4. 研究成果

はじめに、本研究で標的とする嗅球・脳幹部への送達に適した NtB ミセルの物性を明らかとするため、様々な物性のナノ粒子の組成・調製条件を検討した。分子量の異なる PEG-PCL ブロックコポリマーとペプチドを様々な組成比で共集合させた NtB ミセルをマイクロ流体デバイス法 (MF) により調製し、物性を評価した。結果より、MF により調製した NtB ミセルは、ポリマー/ペプチド組成比および MF 条件である流速比が粒子径とその多分散指数 (PDI) に影響を及ぼすことが示された。一方、ゼータ電位はいずれの分子量のブロックポリマーにおいても、MF 条件よりもポリマー/ペプチド組成比が影響を及ぼすことを明らかとした。

次に、MF により調製した粒子径およびゼータ電位の異なる数種類の NtB ミセルに Malat1 標的 siRNA を搭載し、マウスへ経鼻投与した際の脳内 Malat1 遺伝子発現解析を行った。粒子径について検討した結果、80 nm と 30 nm を比較したところ、嗅球・脳幹部における Malat-1 発現抑制効果において両者に有意な差は見られなかった。電荷がほぼ中性の N/P 比 5 の NtB ミセル (MF-N/P 5) に比べて、わずかな正電荷を示す N/P10 の NtB ミセル (MF-N/P 10) が、嗅球・脳幹部を

中心に脳内全体で *Malat1* 発現を抑制することを見出した (図 1)。

次に、NtB ミセルの標的指向化を目的として、ミセル表面への抗体リガンド修飾をクリック反応を用いて行った。はじめに、クリック反応に必要な NtB ミセルのアジド化を行った。マイクロ流体デバイスを用いて、アジド化 PEG-PCL ブロックポリマーを様々な割合で配合して NtB ミセルの調製を試み、物性 (平均粒子径、ゼータ電位、多分散指数 (PDI)) を評価した (図 2)。

その結果、配合比最大 50% まではアジド化により共集合化ナノ粒子の物性は変化しないことを確認した。一方で、75%、100% とすると、粒子径、ゼータ電位、PDI のいずれにおいても顕著な増大が認められた。そこで、アジド化 PEG-PCL ブロックポリマーの配合比を 50% として、リガンド抗体修飾を行うこととした。その結果、アジド化 PEG-PCL ブロックポリマーを 50% 配合したアジド化共集合化ナノ粒子に DBCO 化した Fab' 抗体を添加しクリック反応による修飾を試みたところ、最大 80% 程度の抗体修飾効率が確認され、抗体修飾共集合化ナノ粒子の調製に成功した。

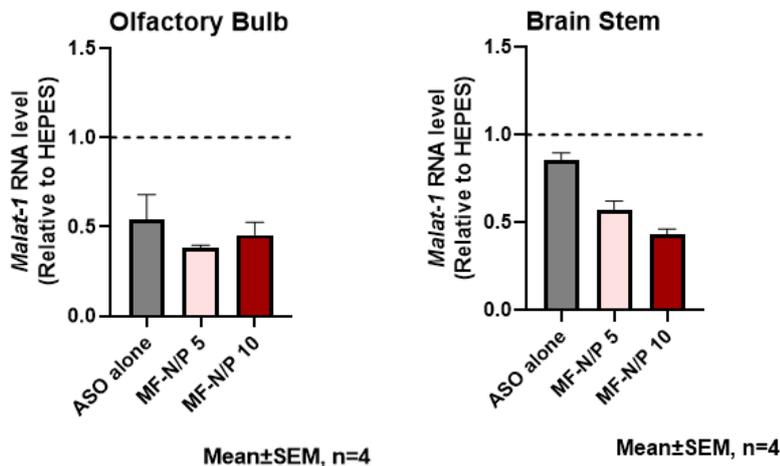


図 1 電荷の異なる *Malat-1* 標的 ASO 搭載 NtB ミセル経鼻投与後の嗅球 (左)、脳幹部 (右) における遺伝子発現抑制効果。

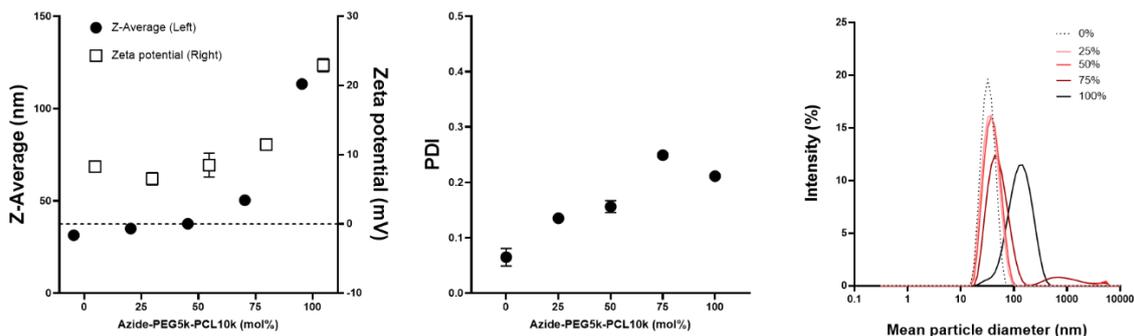


図 2 アジド化 PEG-PCL ブロックポリマーの配合比の異なるアジド化 NtB ミセルの物性結果。(左) 平均粒子径とゼータ電位、(中央) 多分散指数 (PDI)、(右) 粒度分布

最後に、SARS-CoV-2 ウイルス感染細胞の作製と共集合化ナノ粒子の取り込み評価を行った。はじめに代表的な SARS-CoV-2 ウイルス感染モデルである VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて感染実験を行ったところ、暴露 24 時間後において細胞中でのウイルス感染・増殖による細胞変性効果 (CPE) が観察され、感染細胞の作製に成功した (図 3)。

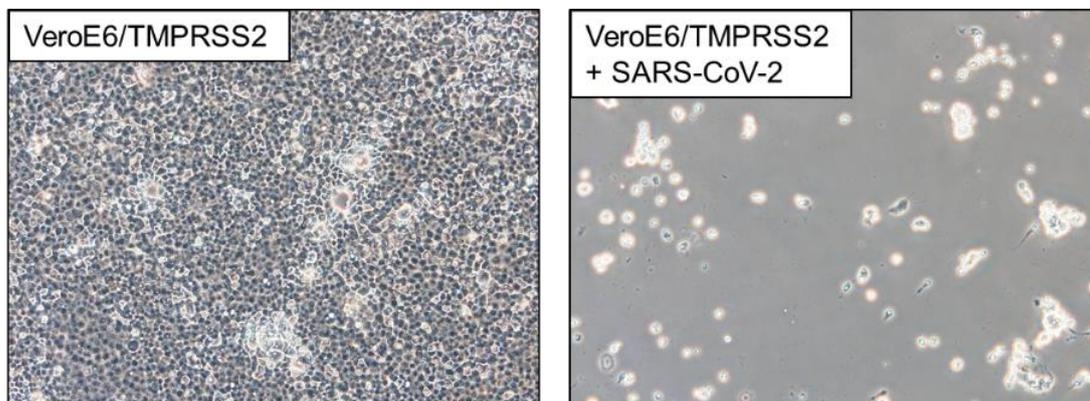


図 3 VeroE6/TMPRSS2 細胞の観察結果。(左) 非感染、(右) SARS-CoV-2 ウイルス感染 24 時間後。

そこで次に、レチノイン酸処理により分化させたヒト神経細胞 (dSH-SY5Y) への SARS-Co-V2 ウイルス感染を試みた。その結果、細胞内のウイルスゲノム量は増大し、感染が確認できた (図 4)。一方で、細胞変性効果 (CPE) は見られなかったことから、ウイルス感染条件や分化条件を最適化させる必要がある。さらに、感染・未感染の VeroE6/TMPRSS2 細胞およびヒト神経細胞への共集合化ナノ粒子の取り込みを観察したところ、いずれの細胞にも優れた取り込みを示した (図 4)。

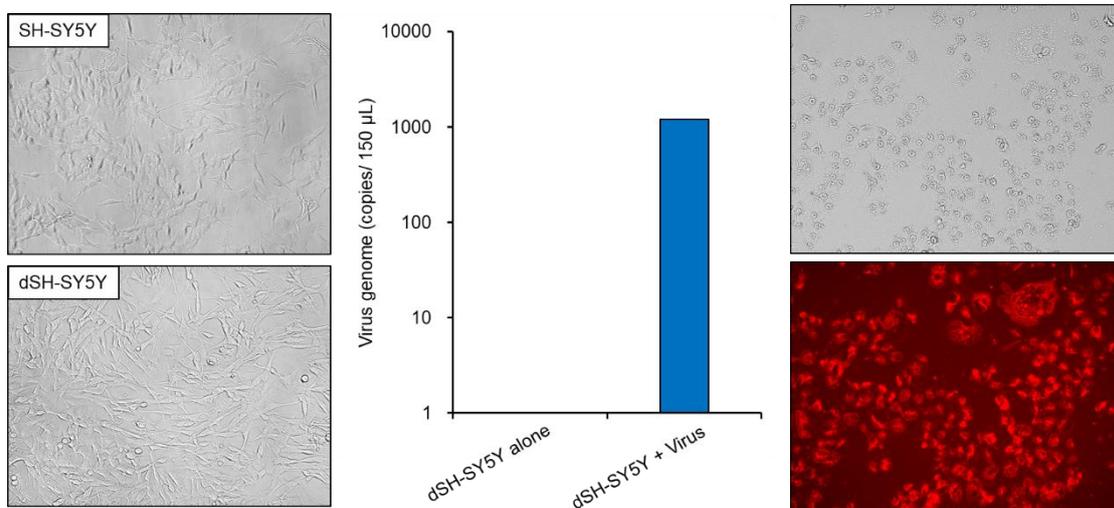


図 4 (左)ヒト神経細胞の形態観察結果、(中央)分化神経細胞への SARS-Co-V2 ウイルス感染による細胞内ウイルスゲノム量、(右)細胞内への赤色蛍光標識 NtB ミセルの取り込みの観察

以上、本研究により、SARS-Co-V2 ウイルス感染の主要部位である嗅球・脳幹部および感染神経細胞へ送達可能なナノ粒子技術 (NtB ミセル) を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi Kurano, Takanori Kanazawa, Shingo Iioka, Hiromu Kondo, Yasuhiro Kosuge, Toyofumi Suzuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Intranasal Administration of N-acetyl-L-cysteine Combined with Cell-Penetrating Peptide-Modified Polymer Nanomicelles as a Potential Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2590 ~ 2590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14122590	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 Takanori Kanazawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell Penetrating Peptide Conjugated Polymer Micelle for pDNA/siRNA Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Penetrating Peptides: Design, Development and Applications	6. 最初と最後の頁 285 ~ 313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9783527835997.ch16	査読の有無 無
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 Takanori Kanazawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Nose-to-brain delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymeric Micelles for Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 479 ~ 496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-323-89868-3.00027-6	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金沢貴憲
2. 発表標題 核酸医薬におけるDDSと非侵襲的投与ルート役割
3. 学会等名 第24回インターフェックスジャパン（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金沢貴憲
2. 発表標題 核酸医薬の新たな投与部位・生体内送達ルートに着目した新規ナノDDSの開拓
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金沢貴憲
2. 発表標題 ニューモダリティ創薬の鍵を握る経鼻DDSの現状と展望
3. 学会等名 立命館大学創剤・製剤技術研究コンソーシアム 2022年度第3回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takanori Kanazawa
2. 発表標題 CNS-targeted nanoDDS based on the nose-to-brain route、 Brand-New Technologies to Open Up the Future of Drug Development
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金沢貴憲
2. 発表標題 Nose-to-BrainナノDDSの開発と脳・脊髄疾患治療への応用
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金沢貴憲
2. 発表標題 中枢を標的とする経鼻投与型ナノDDSの開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木駿典、金沢貴憲、吉田圭輝、飯岡真吾、照喜名孝之、東頭二郎、近藤啓
2. 発表標題 マイクロ流体デバイス法による各種ブロックコポリマーナノ粒子の調製と物性および脳内移行性の評価
3. 学会等名 第47回製剤・創剤セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯岡真吾、金沢貴憲、吉田圭輝、青木駿典、照喜名孝之、東頭二郎、真栄城正寿、渡慶次学、近藤啓
2. 発表標題 PEGおよびPCL鎖分子量の異なるPEG-PCLブロックコポリマーからなるナノ粒子の物性およびNose-to-Brain移行性
3. 学会等名 PEGおよびPCL鎖分子量の異なるPEG-PCLブロックコポリマーからなるナノ粒子の物性およびNose-to-Brain移行性
4. 発表年 2022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	宮田 完二郎 (MIYATA Kanjiro) (50436523)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中南 秀将 (NAKAMINAMI Hidemasa) (20548515)	東京薬科大学・薬学部・教授 (32659)	

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