

令和元年6月12日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07128

研究課題名（和文）脳特異的な核酸搭載ナノバブルと超音波照射併用による脳血管障害治療システムの開発

研究課題名（英文）Development of brain-targeting nucleic acids-loaded nanobubbles for the therapy of cerebrovascular accident in combination with ultrasound

研究代表者

高橋 葉子（遠藤葉子）（Endo-Takahashi, Yoko）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30453806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳血管障害の診断・治療ツールへの応用を目指し、標的指向性と核酸搭載能を有する微小気泡（ナノバブル）の開発を行った。カチオン性脂質の利用による核酸搭載と、ペプチド修飾による脳血管内皮細胞との相互作用が可能なナノバブルの調製に成功した。In vivoにおける安定性、標的指向性、核酸導入効果の向上を図るため、生体内安定性の高さを確認しているアニオン性脂質含有ナノバブルへの核酸搭載法の開発に着手した。ナノバブル表面の多糖類コーティングにより、表面電位の反転と核酸搭載が可能となり、超音波との併用による細胞内核酸導入効果、in vivoにおける造影効果を有する新たなナノバブルの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、アニオン性脂質含有ナノバブルへの核酸搭載法を新たに開発した。これは生体内で安定なアニオン性ナノバブルへ負電荷を有する核酸の搭載を可能とするものである。ナノバブルの生体内安定性が増大することは、in vivoにおける超音波造影効果の持続はもちろん、導入の駆動力となるナノバブルが安定に存在することで、導入効果の向上が可能となる。また本法は、核酸に限らず、遺伝子や負電荷を有する治療用分子のデリバリーツールとしても適用可能となることから、その対象疾患も広く汎用性の高い製剤開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to prepare nucleic acid-loaded and brain-targeting nanobubbles (NBs) modified with Angiopep-2 (Ang2) peptide. Ang2 is expected to be a useful ligand for the efficient delivery of nanocarriers to the brain. We showed that nucleic acid-loaded cationic NBs modified with Ang2 interacted with brain-derived endothelial cells. To enhance the stability, targeting ability, and transfection effect in vivo, we attempted nucleic acid loading to anionic NBs which is already showed the stability in vivo. It was cleared that zeta potential of anionic NBs was inverted to positive by cationic polysaccharide coating and polysaccharide-coated NBs could load nucleic acids onto the surface. Furthermore, polysaccharide-coated NBs could deliver miRNA into cells with ultrasonic irradiation and polysaccharide coating had no effect on the ultrasound contrast ability. Our polysaccharide-coated NBs could be an effective diagnostic and therapeutic tools.

研究分野：薬剤学DDS分野

キーワード：リボソーム 超音波 miRNA 脳標的ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い、脳血管障害やアルツハイマーといった脳疾患の増加が懸念されている。特に脳血管障害は、我が国での死亡原因として悪性新生物、心疾患に次いで第3位となっており、有用な治療薬の開発が期待されている。新規治療法の1つとして、遺伝子治療の研究も盛んに進められている。しかしながら脳には、血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) が存在するため、脳への薬物移行が制限されており、それが脳への遺伝子デリバリーの大きな問題点となっている。それゆえ、脳への効率的な遺伝子デリバリーを可能とする有用な DDS キャリアーの開発が切望されている。

これまでに当研究室では、生体適合性、血中安定性、滞留性に優れているポリエチレングリコール修飾リポソーム (PEG-リポソーム) に超音波造影ガスを封入したナノバブル (Nanobubbles; NBs) を開発し、超音波照射を併用することで動物組織への遺伝子導入に成功している。更に、負電荷を持つ核酸の搭載を可能とするカチオン性脂質含有ナノバブルを開発し、pDNA や miRNA の全身投与型 DDS キャリアーとしての有用性を報告してきた。また近年、造影剤 (マイクロバブル) の投与と脳組織への集束超音波照射を併用することで、BBB を一時的に開口し、薬物送達が可能であることが報告され、臨床応用も開始されている。我々が開発してきた核酸搭載カチオン性ナノバブルへ脳組織集積性を付与することで、超音波照射との併用による効率的な脳への核酸デリバリーツールになり得ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題申請時において、脳への移行性が報告されている Angiopep-2 ペプチド修飾ナノバブルの開発に成功しており、pDNA の搭載が可能であること、脳組織における超音波造影効果と遺伝子導入効果の増強が可能であることを明らかとしていた。また、これまでのカチオン性脂質含有ナノバブルの研究において、搭載分子が pDNA、あるいは低分子核酸 (siRNA や miRNA) とするかで最適組成が異なる可能性があることも確認していた。そこで本研究では、脳血管障害治療用の候補核酸としていた miRNA の搭載に適した Angiopep-2 ペプチド修飾ナノバブルの調製を目的とした。miRNA の搭載と脳への標的指向性の両者を有するナノバブルの開発に続き、集束超音波との併用による脳への miRNA デリバリー効果の解析、さらには脳梗塞モデルマウスにおける本ナノバブルの集積性評価と治療効果の評価に繋げることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 核酸搭載ペプチド修飾ナノバブルの調製

カチオン性脂質含有ナノバブルの調製

基本脂質に DSPC、カチオン性脂質 DSDAP、さらに PEG 脂質として DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe、あるいは鎖長の異なる DSPE-PEG₇₅₀-OMe を使用し、種々の組成、調製溶媒で REV 法によりリポソームを調製した。また、細胞との相互作用、あるいは *in vivo* における組織集積性を評価する際には、蛍光脂質として DiI を含有させたりポソームを調製した。調製した各リポソームに超音波造影ガス (パーフルオロプロパン) を封入することで、ペプチド未修飾ナノバブル (PEG-NBs) とした。その粒子径およびゼータ電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

ペプチド修飾ナノバブルの調製

ペプチドを修飾する際には、脂質の他に DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal を使用し、PEG 鎖末端のマレイミド基とペプチド末端のシステインを反応させ、ペプチド修飾リポソームを調製後、余剰のペプチドはゲルろ過または透析にて除去した。また反応の終了は TLC により確認した。修飾ペプチドとして、脳組織への集積性が報告されている Angiopep-2、コントロールペプチドとして Angiopep-7 を用いた。ペプチド修飾リポソーム (Ang2-lipo、Ang7-lipo) に、上述と同様に超音波造影ガスを封入することでペプチド修飾ナノバブル (Ang2-NBs、Ang7-NBs) とした。

アニオン性脂質含有ナノバブルの調製と多糖類コーティング

アニオン性脂質 DPPG、PEG 脂質として DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe を使用し、REV 法によりリポソームを調製した。調製したリポソームに超音波造影ガス (パーフルオロプロパン) を封入してナノバブルとし、攪拌下で多糖類の一種であるメチルグリコールキトサン (MGC) を添加することで、多糖類コーティングナノバブル (MGC-NBs) とした。その粒子径およびゼータ電位は、NICOMP 380ZLS およびゼータサイザー ナノ ZSP を用いて測定した。

ナノバブルと核酸の相互作用

各種ナノバブルに FITC 標識 miRNA を添加、混合後、調製 Buffer で希釈し、フローサイトメトリーにより評価した。

(2) ナノバブルの超音波造影効果

リポソームへの造影ガス封入確認 (*in vitro* における超音波造影効果)

ナノバブルの懸濁液を 6 well プレートに添加し、超音波造影装置 (50 MHz, B-mode) (NP60R-UBM; NEPA GENE, CO. LTD) を用いてナノバブルの超音波イメージングを行うことで、ガスの封入・保持を評価した。

In vivo におけるナノバブルの超音波造影効果

超音波造影剤としての有用性について検討するため、ICR マウス（5 週齢、 ）の尾静脈より各種ナノバブルを投与し、超音波診断装置 Aplio（東芝）を用いて心臓の超音波イメージングを行った。

（3）ペプチド修飾リポソーム、ナノバブルの標的指向性評価

細胞との相互作用評価

脳血管内皮細胞（bEnd.3 細胞）に対し、Ang2-lipo、Ang7-lipo を反応させ、蛍光顕微鏡により評価した。

脳組織への集積性評価

ICR マウス（5 週齢、 ）の尾静脈より各ナノバブルを投与し、10 分後、脳・肺・心臓・肝臓・脾臓を回収し、*in vivo* イメージング装置（Maestro）により解析を行った。

（4）MGC-NBs による miRNA 細胞内導入効果

ヒト子宮頸がん上皮細胞（HeLa）への miRNA（miR-126）の導入を行った。48well プレートに HeLa を播種し、1 日培養後、miRNA 搭載 MGC-NBs を 10% FCS 含有培地で希釈、混合し、各 well に添加した。その後、速やかに超音波照射（Frequency: 2 MHz, Duty: 50%, Burst rate: 2.0 Hz, Intensity: 2.0 W/cm², Time: 10 sec.）（SONOPORE KTAC-3000; NEPA GENE, CO. LTD）を行った。無血清培地にて細胞を 2 回洗浄し、余剰のナノバブルと miRNA を除去した。2 日間培養後に細胞を回収し、リアルタイム PCR により細胞内の miR-126 レベルについて検討した。導入に伴う細胞傷害性について、Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

4. 研究成果

（1）pDNA の搭載と脳組織への集積の両者を可能とすることを明らかとした Ang2-NBs（DSPC:DSDAP:PEG₂₀₀₀:PEG-Mal=79:15:2:4、Ang2 ペプチド 4 mol%修飾）に対し、pDNA と同様に miRNA の搭載を試みたところ、カチオン性脂質 DSDAP の有無による搭載量の増大は認められなかった。これは pDNA と miRNA の分子サイズ、有する電荷の違いによるものと

考えられた。そこでナノバブルの調製溶媒をイオン強度の低いものへと変更した。それに伴い、これまでの組成においては凝集が認められたことから、脂質組成比、ペプチド修飾率を変更し、さらに精製（遊離ペプチド除去）方法も変更することで、安定性の高いペプチド修飾リポソーム（DSPC:DSDAP:PEG₂₀₀₀:PEG₇₅₀:PEG-Mal=77:15:2:3:3、Ang2 ペプチド 3 mol%修飾）の調製に成功した。本リポソームと bEnd.3 細胞との相互作用を評価したところ、Ang2-リポソームにおいて相互作用の増大が認められた（図1）。そこで各リポソームへ超音波造影ガスの封入を試み、*in vitro* における超音波造影効果の評価したところ、ペプチド修飾の影響は認められず、いずれも造影能を有することが示唆された。さらに、蛍光標識 miRNA との相互作用性をフローサイトメトリーにて評価したところ、カチオン性脂質 DSDAP による搭載量の増大が認められた（図2）。以上の結果より、miRNA 搭載に適したペプチド修飾ナノバブルの開発に成功した。そこで、本 NBs の *in vivo* における脳組織への集積性を評価したところ、Ang2 ペプチド修飾による集積性の増大は認められなかった。これまでの検討から、ペプチド修飾率が 4mol%あるいは 6mol% においては脳への集積が認められていたこ

ことから、ペプチド修飾率が一定以上必要と考えられた。しかしながら、カチオン性脂質含有ナノバブルは、ガスの保持において安定性が低く、また組成によっては調製時に凝集しやすいことを明らかとしており、脂質組成や調製溶媒の変更には制限があり、ナノバブルの安定性、造影ガスの保持能、核酸搭載能等を維持しつつ、標的指向性の向上を図ることは困難であることが示唆された。

（2）これまでに、アニオン性脂質含有ナノバブルは、生体内での安定性が高く、その造影効果が高いことを明らかとしている。このアニオン性脂質含有ナノバブルへの核酸搭載が可能となれば、より安定かつ効果的な超音波造影ツールおよび核酸導入ツールとなることが期待される。また、安定性の高いナノバブルを用いることで、標的指向性の付与において、種々の調製

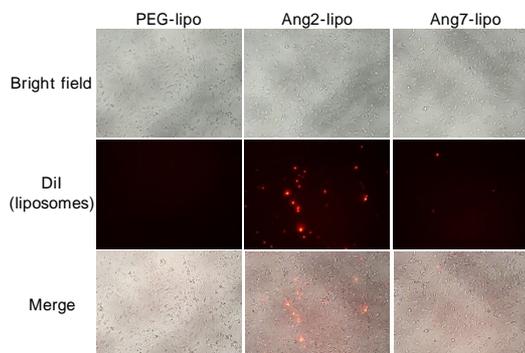


図1. ペプチド修飾リポソームと脳血管内皮細胞の相互作用性評価

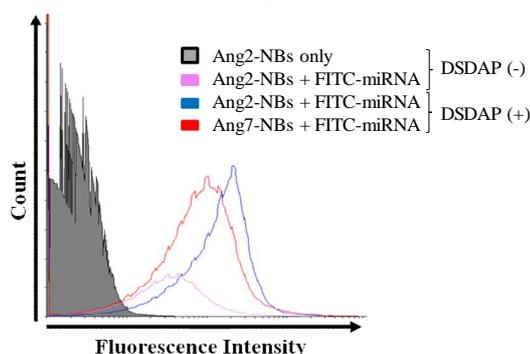


図2. ペプチド修飾NBsとmiRNAの相互作用性評価

条件での検討による最適化が可能と考えられる。そこではじめに、アニオン性脂質含有ナノバブル(DPPG:PEG₂₀₀₀=92:8)表面への核酸搭載を可能とするため、多糖類 MGC での表面コーティングを試みた。攪拌下でナノバブルへ MGC を添加したところ、MGC 濃度が一定以上において表面電位が負から正へと反転することが明らかとなった。また、表面電位の反転に伴い、miRNA との相互作用が可能となることが示された。さらに、超音波照射との併用による低侵襲的な細胞内導入効果、*in vivo*における超音波造影効果が認められた。これらの効果に MGC の有無による顕著な差は認められず、ナノバブルへの MGC コーティングによる超音波への応答性に影響がないことも示唆された。

以上、生体内で安定なアニオン性脂質含有ナノバブルへの新たな核酸搭載法に着手し、miRNA 搭載能、miRNA の細胞内導入効果、および *in vivo*における超音波造影効果を有するナノバブルの開発に繋げることができた。しかしながら、本研究期間内においては、本ナノバブルへの Angiopep-2 ペプチド修飾による脳組織への集積性評価、*in vivo*における miRNA 導入効果、脳梗塞モデルを用いた治療効果の検討までは着手できなかった。Angiopep-2 が結合する LRP-1 は、脳梗塞部位周辺で発現が増強することも報告されている。今後上述の検討を進めることで、本研究において開発した新規ナノバブルの脳血管障害治療システムにおける有用性評価に繋がるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Endo-Takahashi Y, Maruyama K, Negishi Y, Nucleic acid delivery system by the combination of lipid bubbles and ultrasound, *Curr. Pharm. Des.*, 査読有, 24, 2018, 2673-2677, doi: 10.2174/1381612824666180807122759

高橋葉子、根岸洋一、鈴木亮、丸山一雄、リピッドバブルと超音波併用による遺伝子・核酸導入、超音波テクノ、査読無、3-4月号、2018、60-64、<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021511902>

〔学会発表〕(計 2 件)

Kota Ono, Yoko Endo-Takahashi, Kiyosumi Saito, Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi, Development of methyl glycol chitosan-coated nanobubbles with the ability to load nucleic acids, 19th Symposium for Gene・Design and Delivery, 2019年, Chiba

高橋葉子、齋藤聖純、濱野展人、根岸洋一、多糖類コーティングを利用した核酸搭載ナノバブルの開発、日本薬学会第139年会、2019年、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：齋藤 聖純

ローマ字氏名：SAITO, Kiyosumi

研究協力者氏名：小野 滉太

ローマ字氏名：ONO, Kota

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、研究者個人に帰属されます。