

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15315

研究課題名(和文) 肺血管標的型多機能性エンベロープナノ構造体を用いた難治性肺疾患治療の挑戦

研究課題名(英文) Challenge for treatment of refractory lung diseases using a multifunctional envelope-type nanodevice that targets the lung endothelium

研究代表者

西村 正治 (Nishimura, Masaharu)

北海道大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：00208224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1 siRNA封入GALA-MEND投与による肺組織特異的Keap1 mRNAのノックダウンを試みたが、肺選択的かつ効率良い導入はできなかった。そこで、GALA-MENDの肺移行性の機能を向上させるために、GALAをPEG化することを試みたところ、PEG化したGALA-MENDはより良好な肺血管内皮細胞への移行を示した。この改良型GALA-MENDは今後の研究開発に有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tried to knockdown lung tissue specific Keap1 mRNA using GALA-MEND containing Keap1 siRNA, but it was difficult to achieve its knockdown with good efficiency and specificity to the lung tissue. Then, we tried to improve the function of GALA-MEND by PEGylation. As a result, PEGylated GALA-MEND showed better accumulation to lung endothelial cells. This improved GALA-MEND is thought to be promising for future research.

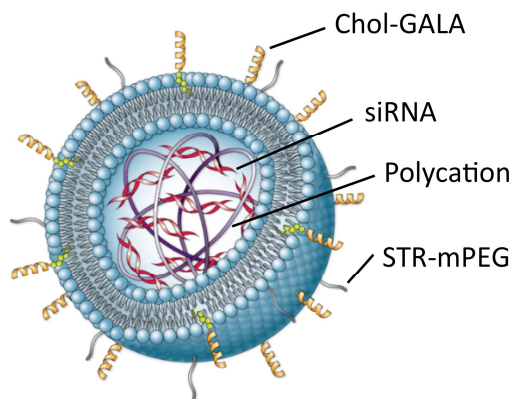
研究分野：呼吸器内科学

キーワード：核酸医薬 多機能性エンベロープナノ構造体 siRNA

1. 研究開始当初の背景

昨今の高齢化社会における代表的呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患(以下 COPD)は全世界での主要な死因の一つであり、また有病率や死亡率が現時点のみならず将来に渡っても上昇し続けると予測されている。さらに特発性肺線維症を代表とする特発性間質性肺炎には未だ有効な治療法が存在しない。これらの難治性肺疾患は患者の QOL や生命予後に影響するのみに留まらず、医療経済の観点からも社会的な脅威となっているが、いずれも根本的な治療法は未だ存在しない。これらの病態において、酸化ストレスは中心的な役割を担っていると考えられており、中でも幅広い抗酸化酵素遺伝子発現を制御する転写因子 Nrf2 が治療標的として注目されている。申請者は COPD 患者において Nrf2 の発現が低下していることを報告している (Suzuki M, et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2008)。さらに、Nrf2 欠損マウスは肺気腫モデルマウスならびに肺線維症モデルマウスにおいて、野生型と比較してより重症な肺病変を生じることが報告されている (Rangasamy T, et al. J Clin Invest 2004, Cho HY, et al. FASEB J 2004)。

北海道大学薬学研究院の秋田らは、GALA と称されるオリゴペプチドで修飾された多機能性エンベロープナノ構造体 (GALA-MEND) を静脈投与した場合、肺血管内皮細胞のアシル酸末端糖鎖を認識して結合し、細胞内に取り込まれることを明らかにした。また siRNA が封入された GALA-MEND (下図) の投与により、肺の血管内皮細胞における特定の遺伝子発現抑制が可能であることを報告した (Kusumoto K, et al. ACS Nano 2013)。



2. 研究の目的

Nrf2 は定常状態では細胞質内で Keap1 と結合し、核移行が阻害され分解されるが、酸化ストレス状態では Keap1 による抑制機構は解除され、Nrf2 は核に移行して抗酸化酵素などの防御遺伝子発現を誘導する。そこで本研究では、Keap1 siRNA 封入 GALA-MEND 投与による Nrf2 系のさらなる活性化を通して、COPD ならびに肺線維症における酸化ストレス状

態の改善を導き、病態の治療を目指すことを目的とする。

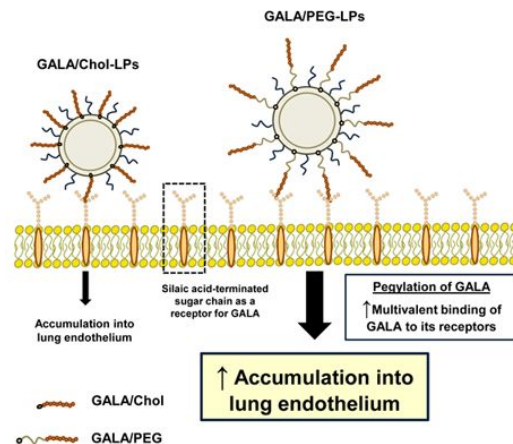
3. 研究の方法

(1) Keap1 siRNA 封入 GALA-MEND 投与による肺組織特異的 Keap 1 ノックダウンの解析

Nrf2 の抑制因子である Keap1 に対する 3 種類の siRNA あるいは control siRNA を封入した GALA-MEND を作成し、C57BL/6 マウスの尾静脈より 0.2mg/kg の濃度で静脈投与した。その 24 時間後にマウスを安楽死させ、肺および肝臓を摘出した。両組織より RNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて Keap1 mRNA の発現を定量した。

(2) ポリエチレングリコール (PEG) 化 GALA-MEND 投与の解析

上記 1 の検討で肺組織における標的遺伝子のノックダウン効率がおもわしくなかったため、GALA を PEG 化することで (GALA/PEG₂₀₀₀、下図)、肺組織移行性が向上するかを検討することとした。



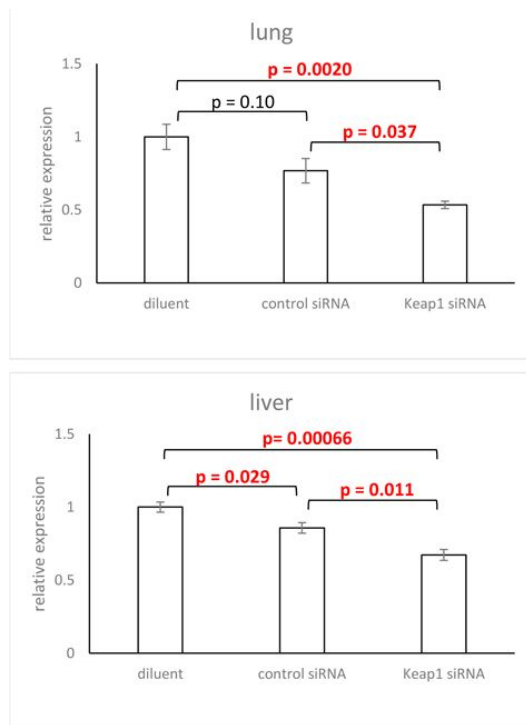
従来の cholesteryl GALA (GALA/Chol) で修飾したリポソームと GALA/PEG₂₀₀₀ で修飾した DiI ラベルのリポソームを作成し、C57BL/6 マウスの尾静脈より 26.4 μmol of lipid/kg の濃度で静脈投与した。1 時間後に安楽死させ、肺組織切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、GALA/PEG₂₀₀₀-MEND に血管内皮細胞マーカーである CD31 に対する siRNA を封入し C57BL/6 マウスの尾静脈より投与し、24 時間後の遺伝子ノックダウン効率を検討した。

4. 研究成果

(1) Keap1 siRNA 封入 GALA-MEND 投与による肺組織特異的 Keap 1 ノックダウンの解析

Keap1 siRNA 封入 GALA-MEND 投与により、肺組織における Keap1 mRNA は RT-PCR による定量で統計学的有意に低下していたが、その低下の程度は顕著とは言えず、また肝臓でも

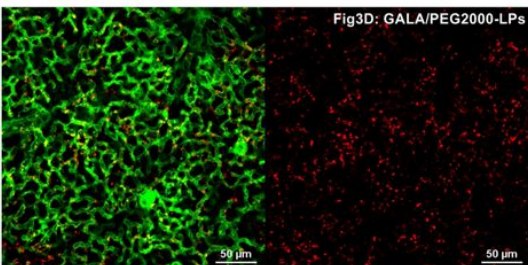
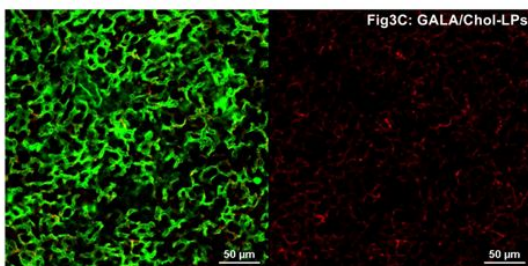
程度は弱いものの Keap1 mRNA 発現の低下が認められ、さらに肝臓においてはコントロール siRNA 投与でも Keap1 mRNA 発現の低下が認められ、肺組織選択的かつ強力な遺伝子ノックダウンに成功しているとは言いがたい状況であった(下図)。



(2) ポリエチレングリコール (PEG) 化 GALA-MEND 投与の解析

PEG 化 GALA の肺組織集積に関する検討

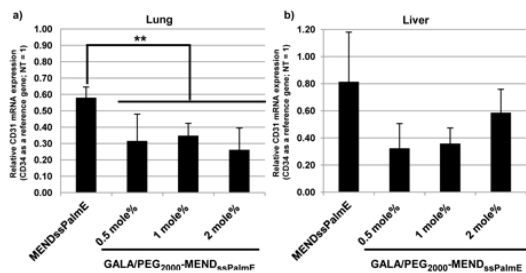
GALA/PEG₂₀₀₀ で修飾したリポソームは従来の GALA/Chol で修飾したリポソームと比較して投与 1 時間後の肺組織への集積が顕著に増加していた(下図)。



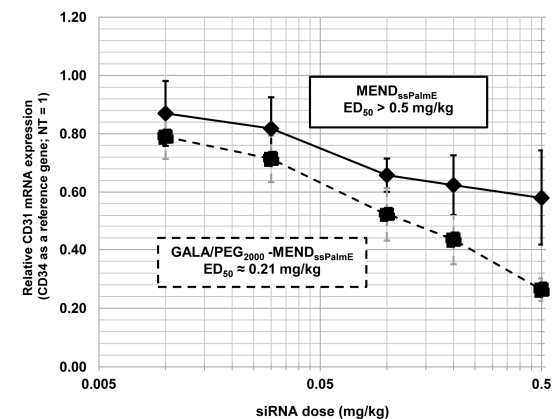
上: GALA/Chol-リポソーム (赤)
下: GALA/PEG₂₀₀₀-リポソーム (赤)
緑は肺内の血管

GALA/PEG₂₀₀₀-MEND の遺伝子ノックダウン効果の検討

CD31 siRNA 封入 GALA/PEG₂₀₀₀-MEND の投与 (0.5 mg siRNA/kg) により、0.5 mol%、1 mol%、2 mol% の濃度のいずれも投与 24 時間後の肺組織において有意に CD31 mRNA 発現は抑制された。一方で肝臓では 2 mol% の濃度では CD31 mRNA 発現は抑制されなかった(下図)。よって、2 mol% の GALA/PEG₂₀₀₀-MEND 濃度が肺組織により特異的に効果がある条件と考えられた。



さらに、2 mol% の GALA/PEG₂₀₀₀-MEND 濃度を用いた際に、標的遺伝子の発現低下は GALA/PEG₂₀₀₀ 非修飾の MEND と比較して優れており、siRNA 濃度と用量依存関係が認められた(下図)。



以上より、当初の目的であった Keap1 siRNA による肺組織における Nrf2 活性化は未だ達成できていないが、GALA を PEG 化することにより効果的に肺組織特異的に siRNA を送達する技術の基盤を確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計1件)

Santiwarangkool S, Akita H, Nakatani T, Kusumoto K, Kimura H, Suzuki M, Nishimura M, Sato Y, Harashima H, PEGylation of GALA peptide enhances the lung-targeting activity of nanocarriers that contain encapsulated siRNA, J Pharm Sci, in press, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.075>、査読有

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 正治 (NISHIMURA, Masaharu)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00208224

(2) 研究分担者

鈴木 雅 (SUZUKI, Masaru)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10374290

(3) 連携研究者

秋田 英万 (AKITA, Hidetaka)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：80344472

(4) 研究協力者

木村 裕樹 (KIMURA, Hiroki)
北海道大学・大学院医学研究科・学術研究員

Sarochin Santiwarangkool
(SANTIWARANGKOOL, Sarochin)
北海道大学・大学院薬学研究院・大学院生