

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12913

研究課題名(和文)血管新生誘導効果を応用したこれまでに無い革新的な低侵襲性創傷修復法の創成

研究課題名(英文) Establishment of novel non-invasive therapy for siRNA-induced wound healing using sonoporation techniques, nano-size drug delivery systems

研究代表者

寺本 憲功 (Teramoto, Noriyoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40294912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナノ Drug Delivery Systems (ソノポレーション法：音響穿孔法) と核酸医薬品を組み合わせ、組織内に微小血管を新たに誘導し、その結果、局所血流循環を向上させることにて創傷治癒を促進することを目的とし、この血管新生誘導機序を明らかにし、血管新生に向けた低侵襲性の基礎的技術を確立することを目的とした。この新たな治療法は創傷治癒のみならず、最新の臓器移植や再生医学にも転用可能であり、国民の健康寿命の延伸に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present research project is to establish a basal knowledge of novel non-invasive therapy for siRNA-induced wound healing using nano-size drug delivery systems (i.e. sonoporation techniques), which is designed to stimulate the collateral circulation in compromised tissues. This technique will also be applicable in not only rapid wound healing but also organ transplant and regenerative medicine. It is generally believed that this novel technique will contribute substantially to the extension of the national healthy life expectancy in Japan near future.

研究分野：人間医工学

キーワード：医用システム 低侵襲治療システム 血管新生学 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

RNAi (RNA interference: RNA 干渉) 効果とは、二本鎖 RNA (センス鎖およびアンチセンス鎖による small interfering RNA: siRNA) による相補的な塩基配列を持つ mRNA が、配列特異的に RNA を分解する現象である。標的とする遺伝子と塩基配列が同じ二本鎖 RNA を細胞内に導入すると、ダイサーと呼ばれる酵素によって分解され、低分子の二本鎖 RNA となる。この短鎖の二本鎖 RNA が、標的遺伝子から合成された mRNA に結合し、その結果、特定の遺伝子発現が、選択的かつ強力に抑制される。

近年、ヒトゲノムの全塩基配列が明らかとなった。その結果、全ての遺伝子に対して塩基特異的かつ相補的に抑制効果を発揮する siRNA が論理的に設計可能となった。また標的遺伝子に対する抑制効果は、従来の核酸医薬 (microRNA や short hairpin RNA: shRNA 等) と比較して約 1 ~ 10 万倍と極めて高く、今後、‘次世代の医薬品’としてその臨床効果が大いに期待され、近年、脚光を帯びてきた。

一方で siRNA を実際に臨床応用する場合、(1) 如何に off-target 効果 (siRNA の配列の一部が部分的にホモロジーを有する標的遺伝子以外の遺伝子発現を抑制してしまう交差反応) を低減させる方法があるのか、(2) どのようにしてその高度な技術使用に伴う占有特許の法的な制限を克服することが可能か、(3) どのような薬物送達法 (DDS: Drug Delivery System) を駆使して siRNA を効果的かつ効率良く局所領域に送達させることが可能か、等が今後、克服すべき課題である。

我々は既に ①微小血管新生を誘導する RNA/DNA キメラ型 siRNA を開発し (上記の課題(1)と(2)を克服)、②ナノバブルに超音波を照射し、生じた緩衝波にて外来物質 (遺伝子ベクター・核酸・タンパク質 等) を宿主細胞内へ低侵襲的かつ局所に導入する DDS 技法 (ソノポレーション法: 音響穿孔法) を確立した (課題(3)の克服)。本 siRNA とソノポレーション法を組み合わせることで局所に強力な血管新生誘導効果をもたらすことを発見した。血管新生は創傷治癒過程の初～中期段階において必須の生体反応であり、我々が開発した siRNA による血管新生誘導効

果を応用することで創傷治癒が促進され、創傷治癒期間が大幅に短縮されるのではないかと考えた。

すなわち、我々はこれまでの研究成果をさらに発展させることでこれまでに無い、全く新しい低侵襲性創傷修復法を確立することが可能ではないかと考えた。またこれまで国内外においてこれまで『ソノポレーション法』と『核酸医薬 siRNA』を組み合わせた研究報告はほとんど無い。

2. 研究の目的

本研究は、『血管新生に深く関与する低酸素誘導因子 (HIF-2 α : Hypoxia-Induced Factor-2 α) を特異的に抑制する制御因子 (Int6)』を標的とし、これまでに全く無い新しい設計理論に基づいて作成した核酸医薬、『RNA/DNA キメラ型 siRNA』を『ハイブリッド型ナノバブル』中に封入し、『ソノポレーション法 (音響穿孔法)』を駆使し、皮膚や粘膜の創傷部周辺へ低侵襲的に本 siRNA を導入し、新生微小血管を誘導させ、その結果、新たに形成された微小血行路を介して皮膚や粘膜の創傷治癒が促進されるか、否かについて遺伝子、組織さらには動物個体レベルにて解析し、創傷治癒の期間の大幅な短縮化が起きるか否かについて、これまでに無い画期的な低侵襲性創傷治癒法の創成を研究目的とした。

本研究の学術的な研究目的の特色として、(1) 血管新生に深く関与する転写因子 (HIF-2 α) と特異的に反応する制御因子 (Int6) を標的とした RNA/DNA キメラ型 siRNA を用いる点、(2) 本キメラ型 siRNA が体液中のエンドヌクレアーゼで分解されぬようにハイブリッド型ナノバブルを作成し、ソノポレーション法にて低侵襲的に皮膚・粘膜下に導入する点、(3) 創傷モデルマウスを用いて本キメラ型 siRNA が有する血管新生誘導効果にて創傷治癒期間が短縮されたか、否かについて動物個体レベルで明らかにする点である。

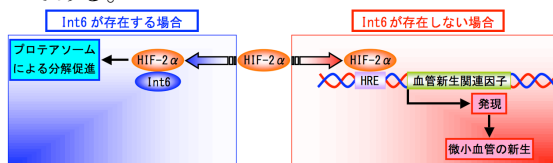


図1 『HIF-2 α 抑制因子 Int6』を標的分子とした血管新生誘導

3. 研究の方法

本キメラ型 siRNA が体液中で分解されぬように脂質二重膜中に封入し、かつナノ気泡を内包した独創的なナノバブルを作成した（ハイブリッド型ナノバブル：図2を御参照下さい）。さらにそのバブルがどのように健常マウス個体中で分布しているか、そのリシファラーゼ蛍光の強度を測定し、侵襲効果を測定した。その後、健常マウスの皮下および粘膜下へ上記バブルと本キメラ型 siRNA の混和液を注射し、その後、ソノポレーション法にて導入を行い、血管新生関連因子群（Angiopoietin 1、VEGF、bFGF 等）の発現を遺伝子・タンパク質レベルで分子生物学的手法（real-time PCR、Western blotting 法 等）にて解明した。

4. 研究成果

本研究にて主に下記の研究成果を得ることが出来た。

(I) ソノポレーション法を用いて導入するハイブリッド型ナノバブルの開発・完成

キャビテーション気泡の動特性を解明するにはキャビテーション気泡の粒径分布と減衰特性スペクトルの情報が不可欠である。まず水槽実験から超音波照射後のナノバブルの粒径分布を粒度分布測定装置で測定し、次に気泡の音響減衰スペクトルをパルスレーザーにて測定した。また破壊時の圧力情報を高周波帯域用ハイドロフォンで測定し、離散フーリエ変換（FFT）解析を行った。さらに粒径分布、音響減衰スペクトルおよび FFT 解析を基に Keller-Miksis の気泡モデルからキャビテーション気泡の動特性を求め、ハイブリッド型ナノバブルを開発・作成した。下図にその概略を記した（図1）。

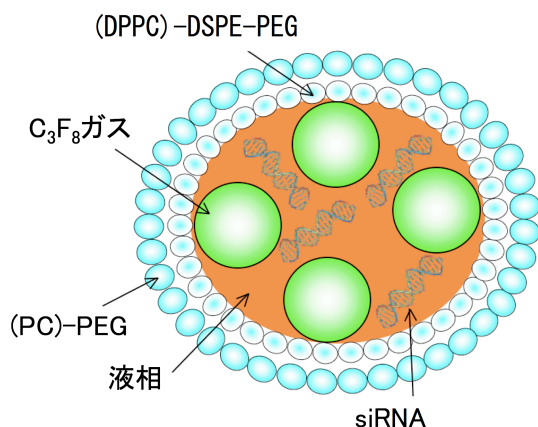
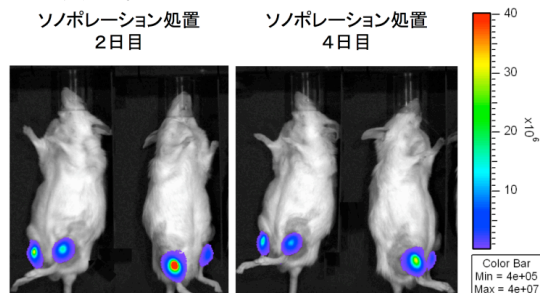


図2 ハイブリッド型ナノバブルの概略図

(II) 健常マウスに対して in vivo 条件下で

のソノポレーションを用いた低侵襲性ナノDDS法の確立

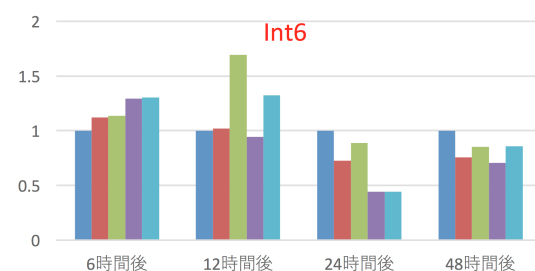


ルシファラーゼ アッセイ法を用いてマウス前頸骨筋（骨格筋）に対して音響穿孔法による導入効率の最も適切な条件設定を行った（図3）。

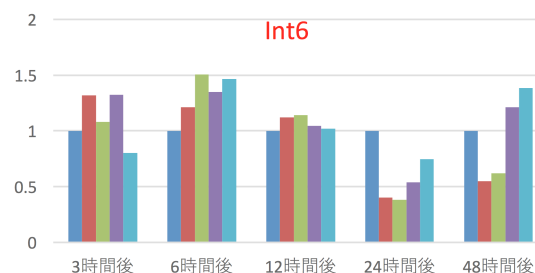
(III) 各 siRNA（#1、#2 および #3）単独投与による Int6 ノックダウン効果の検証

Int6 を特異的に抑制する 3 種類の siRNA（#1、#2 および #3）を合成・作成し、各々の siRNA をマウス前脛骨筋に単独導入後、Int6 の抑制効果を遺伝子レベルでの量的発現を real-timePCR 法にて計測した（下図の図4）。

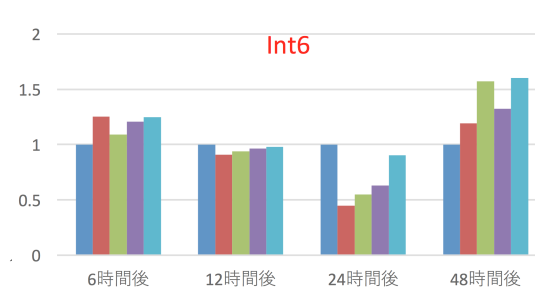
① #1 単独投与時



② #2 単独投与時



③ #3 単独投与時



全ての種類の siRNA 投与後、24 時間後において Int6 の発現レベルは減弱していた。特に #2 の抑制効果が高かった。これらの結果から創傷治癒に効果を有すると考えられ、今後、創傷治癒過程改善に向けた動物実験を行い、原著英文論文にまとめる計画である。

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 3 件)

- ① Takahara K, Yamamoto T, Uchida K, Zhu HL, Shibata A, Inai T, Noguchi M, Yotsu-Yamashita M, Teramoto N
Effects of 4,9-anhydrotetrodotoxin on voltage-gated Na⁺ channels of mouse vas deferens myocytes and recombinant Na_v1.6 channels.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 査読有, 2018, 391(5), 489-499.
DOI : 10.1007/s00210-018-1476-6.

- ② Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N
ZD0947, a sulphonylurea receptor modulator, detects functional sulphonylurea receptor subunits in murine vascular smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channels.
European Journal of Pharmacology, 査読有, 2017, 800, 34-39.
DOI : 10.1016/j.ejphar.2017.02.023.

- ③ Mori K, Yamashita Y, Teramoto N
ZD0947, a novel and potent ATP-sensitive K⁺ channel opener, on smooth muscle-type ATP-sensitive K⁺ channels.
European Journal of Pharmacology, 査読有, 2016, 791, 773-779.
DOI : 10.1016/j.ejphar.2016.09.038.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N
Actions of ZD0947 on the activity of ATP-sensitive K⁺ channels in murine vascular smooth muscles.

第 90 回 日本薬理学会年会 (長崎市)
Journal of Pharmacological Sciences, 2017, 133(3) : Supplement S138, 2-O-49.

- ② Teramoto N, Yamamoto T, Uchida K, Inai T, Yamashita-Yotsu M
Effects of 4,9-anhydroTTX on voltage-gated Na⁺ channels expressed in murine vas deferens myocytes.
第 90 回 日本薬理学会年会 (長崎市)
Journal of Pharmacological Sciences, 2017, 133(3) : Supplement S115, 1-O-37.

- ③ 寺本 憲功
糖尿病の薬理/臨床薬理: 新たな血糖調節メカニズムの解明と Precision Medicine へのロードマップ
第 90 回 日本薬理学会年会 (長崎市)
Journal of Pharmacological Sciences, 2017, 133(3) : Supplement 2-JSC.

- ④ 寺本 憲功
膵 β 細胞における ATP 感受性 K⁺ チャネルの分子レベルでの新たな修飾機序 ~K_{ATP} チャネルに魅せられた 20 年~
第 166 回 内分泌セミナー (東京), 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 憲功 (Teramoto Noriyoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号 : 4 0 2 9 4 9 1 2

(2) 研究分担者

山本 格士 (Yamamoto Tadashi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 8 0 7 6 2 1 8 7