

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02111

研究課題名(和文)血管新生誘導作用を有する siRNA とナノ薬物送達法による低侵襲性創傷修復法の創成

研究課題名(英文) Low operation by siRNA with angiogenetic inductive action and modal nano drug delivery, initiation of hurt repairing procedure

研究代表者

寺本 憲功 (Teramoto, Noriyoshi)

佐賀大学・その他部局等・理事

研究者番号：40294912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は『血管新生に深く関与する低酸素誘導因子(HIF-2：Hypoxia-Induced Factor-2)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であるsiRNAをソノポレーション法(音響穿孔法)にて皮膚および粘膜の創傷部周辺の宿主細胞内へ低侵襲的に局所導入する。その結果、新しく誘導・形成された微小血行路を介して末梢循環血流が向上し、皮膚や粘膜の創傷治癒過程が著しく改善される過程を組織および動物個体レベルで観察し、創傷治癒期間の大幅な短縮を目指すこれまでに無い画期的な低侵襲性創傷治癒法の創成である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでsiRNAは主にウシ由来のコラーゲンを主成分としたアテロコラーゲンと混和し、局所的に皮膚へ塗布することで投与されてきた。しかし、主成分が輸入ウシ由来の成分であり、ヒトが狂牛病に罹患するリスクを排除できない、異種由来タンパク質のため、重篤なアレルギー反応を引き起こす可能性がある等、現段階では直接、ヒトへ臨床応用することは危険である。一方、ソノポレーション法はヒトへの侵襲性および支障はほとんど無い。

すなわち、本研究はナノ医学の低侵襲遺伝子導入技術を駆使し、siRNA医薬の血管新生に伴う創傷治癒促進に向けた臨床応用への試金石となる基礎的研究である。

研究成果の概要(英文)：This present study is entitled "Hypoxia-Inducible Factor-2 (HIF-2), which is deeply involved in angiogenesis. It targets "a regulator (Int6) that specifically suppresses HIF-2". We've developed a new nucleic acid drug, siRNA, based on an entirely new design theory. Sonoporation (acoustic drilling) is used to minimally invade the host cells around the skin and mucous membrane wounds (local induction). As a result, peripheral circulatory blood flow is improved through newly induced and formed microcirculatory pathways and the skin and mucous membranes. The process of markedly improving the wound healing process is observed at both the tissue and individual animal level, and the wound healing period is measured. It is the creation of an unprecedented minimally invasive wound healing method that aims to significantly reduce the time required for wound healing.

研究分野：ナノ医学

キーワード：核酸医薬品 血管新生 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) 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) にて配列特異的に mRNA を分解し、特定の遺伝子の発現を選択的に抑制する現象である (Fire *et al.* Nature 391, 806-811, 1998)。ヒトゲノムの全塩基配列が明らかとなった現在、塩基配列に対して相補的に作用する siRNA は全ての遺伝子に対して設計可能である。さらに siRNA は標的遺伝子の発現抑制効果がこれまでの他の機能的核酸医薬 (shRNA、miRNA 等) と比べ、約 10 万倍と高く、今後、医薬品への技術転用が期待されている。しかし siRNA を臨床応用する場合、

- (1) どのようにして 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まで抑制してしまう交差反応) を低減させるのか、
- (2) 如何に高度な技術使用に伴う占有特許 (ライセンス) 等の法的制限を克服するのか、
- (3) どのような手法 (薬物送達法 : Drug Delivery System : DDS) を用いて siRNA を効率良くかつ局所へ標的遺伝子発現抑制 (ノックダウン) 効果をもたらすだけの十分な有効量を送達させるのか、等が 今後、克服すべき喫緊かつ不可避的な課題である。

我々はこれらの課題に対して、

- (i) 微小血管新生を誘導する『次世代 RNA/DNA キメラ修飾型 siRNA』をボナック社(株)と共同開発した (上記の課題 (1) および課題 (2) の克服)。
- (ii) 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・核酸・タンパク質等) を宿主細胞内へ低侵襲的かつ局所的に導入する DDS 技法 (『ソノポレーション法』 (音響穿孔法) を確立した (上記の課題 (3) の克服)。

我々は既に RNA 配列を修飾した『次世代 RNA/DNA キメラ修飾型 siRNA』(以下、『次世代型 siRNA』と略記します) と『ソノポレーション法』を組み合わせ、マウス骨格筋へ局所導入すると骨格筋中に新生微小血管が誘導されることを発見した (詳細な機序は次頁にて記します)。ま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、我々が開発した本次世代型 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、その結果、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、我々が、これまで行ってきた研究成果をさらに発展させ、これまでに無い全く新しい考えのもと、新規の低侵襲性創傷修復法を確立することが可能である と考えた。

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 : Hypoxia-Induced Factor-2) 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、『次世代 RNA/DNA キメラ修飾型 siRNA』を『新規ハイブリッド・ナノバブル』中に封入し、『ソノポレーション法 (音響穿孔法)』にて本 siRNA を皮膚および粘膜の創傷部周辺の宿主細胞内へ低侵襲的に導入する。その結果、新しく誘導・形成された微小血行路を介して末梢循環血流が向上し、皮膚や粘膜の創傷治癒過程が著しく改善される過程を組織および動物個体レベルで観察し、創傷治癒期間の大幅な短縮を目指す、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する。すなわち、本研究は“安心”かつ“安全”な創傷修復促進の具現化を目指す基礎研究である。

3. 研究の方法

初年度早期に血管新生を誘導する『次世代型 siRNA』をハイブリッド型ナノバブル中に内包さ

せ、体液中でも siRNA が分解され難い、『新規ハイブリッド・ナノバブル』の完成を目指す。超音波による『ソノレーション法』にて『次世代型 siRNA』を低侵襲的に健常マウスの皮下および粘膜下に局所的導入を行い、血管新生関連因子群の発現亢進の有無を遺伝子およびタンパク質レベルで分子生物学的手法にて同定する。また微小新生血管形成についてレーザー血流計を用いた血流測定、血管造影法によるCTスキャン法や組織学的解析を行う。次年度以降は主に創傷モデルマウスを用い、『次世代型 siRNA』導入後の創傷修復効果および癒痕治癒促進効果に関して組織および動物個体レベルで解析を進め、臨床応用への可能性を探る。

平成 29 年度 : 健常マウスの皮下および粘膜下へソノレーション法にて次世代型 siRNA を導入し、その結果、微小新生血管の形成が促進されるか、否か について血管新生関連因子群の発現量の変化に関して 遺伝子およびタンパク質レベル で詳細に解析する。さらにレーザー血流計を用いた血流測定、血管造影法によるCTスキャン法 および 組織学的解析を行う。我々のこれまでの研究において骨格筋組織中に観察された血管新生と同様であるか、否か について詳細に検証した。

平成 30 年度 : 『創傷モデルマウス』を用い、『次世代型 siRNA』導入による創傷修復効果 および癒痕治癒過程について 組織 および 動物個体レベルで解析した。

令和元年度 : 前年度に引き続き、さらに研究を進めた。

4 . 研究成果

(1) ハイブリッド型ナノバブルの調整

平成 29 年度において今回のソノレーション法で用いるハイブリッド型ナノバブルの詳細な調整を行い、本研究で用いるハイブリッド型ナノバブルタイプおよび超音波の条件設定を実施した(東北大学大学院医工学研究科と共同)。またキャビレーションに伴う衝撃圧が強過ぎると合成された短鎖 siRNA の一部の構造破壊が起こる可能性も示唆されており、諸条件を整えながら慎重に行った。様々な核酸配列を有する数多くの siRNA を設計・作製し(ボナック社と共同)。その中からマウス骨格筋培養細胞を用い、ソノレーション法にて低侵襲性導入し、分子生物学的手法を駆使し、特に血管新生作用が強い siRNA 配列を細胞レベルにて選定・決定した。具体的には Int6 を特異的かつ有効にノックダウンし、血管新生誘導因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor、PDGF: Platelet-Derived Growth Factor 等)を誘導する siRNA をスクリーニングを実施し、それらの最大効果を有する siRNA 候補を数種類、選定した(スクリーニングの実施)。

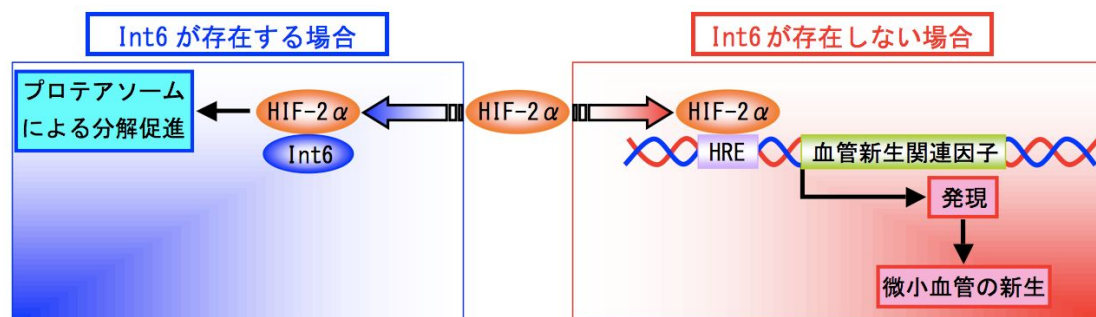
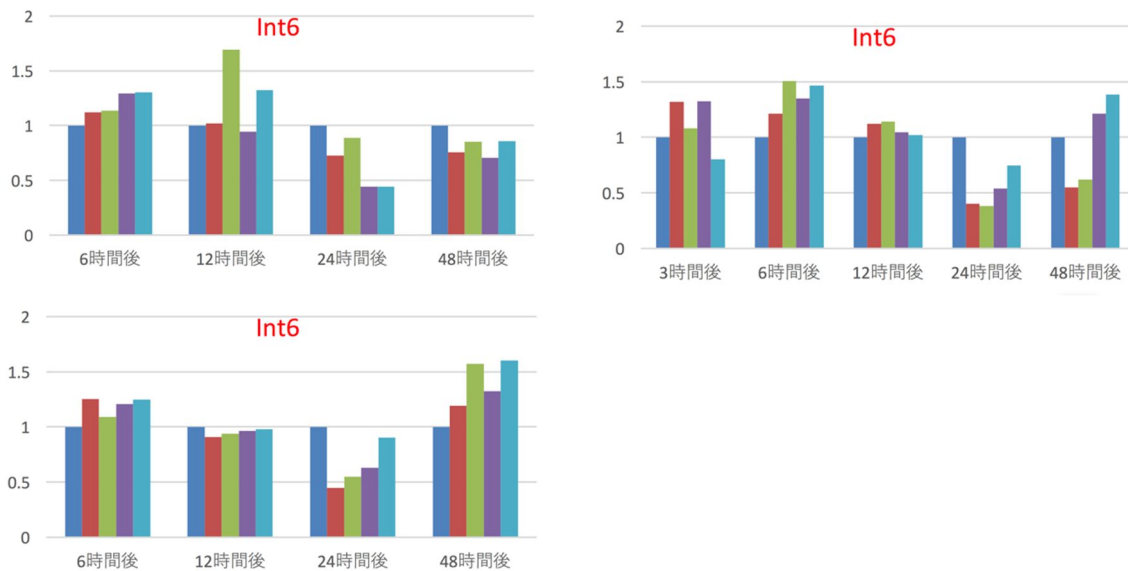


図 1 『HIF-2 抑制因子 Int6』を標的分子とした血管新生誘導

(2) 有効なノックダウン効果を示す siRNA ストランドの検索

次年度は我々が強力な血管新生効果を有すると確認した核酸配列の数種類の siRNA をマウス初

代培養骨格筋細胞に低侵襲性に細胞内導入し、分子生物学的手法 (RT-PCR 法、ウエスタンブロット法等) を用いて再評価し、Int6 のノックダウン効果、またそれに伴う血管新生誘導因子 (VEGF、PDGF 等) の誘導性が最も強力であると確認された siRNA の候補を最終的に 1 つに絞り、動物実験に移行した。



動物実験の移行に伴い、ソノポレーション法の諸条件 (超音波の出力量、候補周波数、超音波の照射時間、ナノバブルと核酸との混合比率 等) を決定するため、GFP 遺伝子をソノポレーション法にて健常マウスの下肢筋肉 (骨格筋) 組織に導入し、その GFP 発光量および GFP タンパク質量を評価基準とし、動物実験での予備的条件設定を行い、最終的にその基準値を決定した。また同時にルシフェラーゼを搭載したベクターをマウスにソノポレーション法にて下肢筋肉 (骨格筋) 組織に低侵襲性に導入し、その後、2日後、4日後の各々の日にルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェリン発光量を計測した。ルシフェリン発光量を目安にソノポレーション法による導入効率、実験条件設定の適正化を行った。その実験条件下で健常マウスの前頸骨筋 (骨格筋組織) に対し、本 siRNA をソノポレーション法にて導入すると 血管新生誘導因子 (VEGF、PDGF) の誘導性が遺伝子およびタンパク質レベルで明らかとなった。また 血管造影法にて健常ラット下肢に新生血管の形成が確認された。さらに レーザー光によるアルタイム血流画像化装置にて本 siRNA をソノポレーション法にて細胞内導入した領域の血流動態が上昇していることも明らかとなった。すなわち、健常ラットの下肢筋肉 (骨格筋) 組織において細胞レベルと同様に Int6 のノックダウン効果にて血管新生作用を有することが、動物個体レベルでも示唆された。

現在、創傷病態モデルの作製に時間を要しており、創傷病態マウスモデルが完成後、直ちに創傷病態マウスモデルを用い、今後、有効な siRNA ストランドの選定を開始する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Uchida K, Nomura M, Yamamoto T, Ogawa Y, TERAMOTO N. Eur J Pharmacol	4. 巻 471
2. 論文標題 Rab8a is involved in membrane trafficking of Kir6.2 in the MIN6 insulinoma cell line.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 877-887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-018-02252-1	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 Takahara K, Yamamoto T, Uchida K, Zhu HL, Shibata A, Inai T, Noguchi M, Yotsu-Yamashita M, TERAMOTO N.	4. 巻 391
2. 論文標題 Effects of 4,9-anhydrotetrodotoxin on voltage-gated Na ⁺ channels of mouse vas deferens myocytes and recombinant Nav1.6 channels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology	6. 最初と最後の頁 489-499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00210-018-1476-6.	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 Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, TERAMOTO N.	4. 巻 800
2. 論文標題 ZD0947, a sulphonylurea receptor modulator, detects functional sulphonylurea receptor subunits in murine vascular smooth muscle ATP-sensitive K ⁺ channels.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2017.02.023.	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 Kato S, Shirai Y, Sakamoto M, Mori S, Kodama T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Use of a lymphatic drug delivery system and sonoporation to target malignant metastatic breast cancer cells proliferating in the marginal sinuses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49386-5	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 Sukhbaatar A, Sakamoto M, Mori S, Kodama T	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysis of tumor vascularization in a mouse model of metastatic lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52144-2	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学 医学部 薬理学 http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html

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	稲井 哲一郎 (INAI Tetsuichiro) (00264044)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授 (37114)	
研究分担者	小玉 哲也 (KODAMA Tetsuya) (40271986)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	山本 格士 (YAMAMOTO Takashi) (80762187)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	