

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04742

研究課題名(和文) 特定の脳細胞選択的に薬剤送達する高分子集合体の開発と脳神経系疾患治療への展開

研究課題名(英文) Development of self-assembled polymeric vehicles selectively delivering drugs to specific brain cells toward treatment of central nervous system diseases

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)に代表される中枢神経系疾患を効果的に治癒するためには、血液脳関門(BBB)と呼ばれる生体内バリアを通過するだけでなく、脳実質部において、標的とする細胞にのみ薬剤を送達することが必要不可欠である。本研究では、生体内での安全性が担保された高分子をビルディングブロックとした核酸医薬を脳の神経細胞に選択的に送達する高分子集合体(PM)を開発した。ADモデルマウスを用いたin vivo実験より標的タンパク質の発現レベルを有意に抑制し、さらに行動試験において空間参照・長期記憶に関する能力を改善することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、有効な治療法が未確立である中枢神経系(CNS)疾患に対して、薬剤送達に基づく分子治療という抜本的解決策を提供するものであり極めて大きな意義を有している。様々な機能分子を中枢系に送達する方法論確立は、CNS疾患に留まらず、脳腫瘍やアミノ酸代謝異常など広範な疾患治療に大きく貢献することが確信される。また高分子/材料設計の観点からは、生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置する仕掛けを創り込むなど、独創性に秀でた生体材料設計プロセスを当該分野にもたらす意義を有していると確信する。

研究成果の概要(英文)：It is essential to deliver drugs not only crossing the blood-brain barrier (BBB) but also only to target cells in the brain parenchyma to effectively treat central nervous system diseases, such as Alzheimer's disease (AD). In this study, we developed polymeric self-assembly (PM) that selectively delivers nucleic acid drugs to neurons in the brain, using polymers that are safe in vivo as building blocks. In vivo experiments using AD model mice showed that the expression level of the target protein was significantly suppressed, and the ability related to spatial reference and long-term memory was successfully improved in behavioral tests.

研究分野：生体材料学

キーワード：薬剤送達システム 脳 高分子 高分子集合体 生体材料 血液脳関門 脳神経系疾患

1. 研究開始当初の背景

先進国を中心に高齢化が進行し、アルツハイマー病(AD)に代表される中枢神経系(CNS)疾患は深刻な社会問題と化している。CNS 治療を困難にしている最大の障壁が血液脳関門(BBB)と呼ばれるバリア機構である。BBB は脳血管内皮細胞を主体に形成される関門組織であり、血管系と脳神経系の物質輸送を制御する機能を担っており、脳の活動に必須な栄養素を選択的に取り込む反面、薬剤の脳への送達を制限している。実際に、臨床で AD 治療薬として最も使用されている Donepezil の脳への集積量は投与量のわずか 0.01%、BBB 通過を指向したペプチド搭載ナノ粒子も 0.05%と、BBB 通過技術開発への期待は高いが既存技術では集積量は低く、十分な治療効果が望めないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は、脳血管内皮細胞中で血糖値に応答して局在量・箇所が変化し、さらに他の受容体・トランスポーターと比べ桁違いに多く局在するグルコーストランスポーター1(GLUT1)に着目した。これまでにグルコースを表層に搭載した高分子集合体を構築し、さらに血糖値の推移を精密制御することで臨床薬の約 600 倍 (6.22%)を脳へ集積させることに成功し、BBB 通過後に一部は脳内細胞(ニューロン、ミクログリア)へ取り込まれることを実証している[1]。また同方法論を用いて siRNA を脳内へ送達し、ニューロンに最も多く局在する遺伝子発現を 30%抑制することに成功している。しかしながら BBB 通過した siRNA のわずか5%しかニューロンへ送達されず、多くは脳間質液中に留まっている、すなわち BBB は通過するが薬剤が標的細胞に送達されず高い薬理活性が得られていないことが分かってきた。これらの結果より効率的な CNS 疾患治療を実現するには、①BBB を効率的に通過し、②脳実質の標的細胞のみに薬剤を送達するといった要件を満たすことが必要不可欠であると着想した。そこで本課題では先行研究で確立したグルコースを表層に搭載した高分子集合体(PA)を基盤技術として、CNS 疾患治療の標的となるニューロンといった「脳実質内の標的細胞」選択的に治療用 siRNA を送達する多機能型高分子集合体を開発し、CNS 疾患の革新的治療法に新しい方法論をもたらすことを目的とした。

3. 研究の方法

生体への安全性が担保されたポリエチレングリコール(PEG)-ポリアミノ酸をセグメントとする荷電性のブロック共重合体を基盤高分子とし、合目的々に「環境応答性」、「標的指向性」、「siRNA 担持性」といった各種機能を導入し、治療用 siRNA を封入した多機能型高分子集合体 (siRNA@PA)を構築する。サイズや形状、siRNA 担持性といった基礎物性評価に加え、試験官レベルで環境応答性評価を実施する。また各種初代培養細胞(脳血管内皮細胞、ニューロン)や、より in vivo に近い培養切片を用いて標的指向性に関する詳細な検討を行う。上記の各種機能の発現が確認でき次第、マウスに静脈投与を行い、体内動態(血中循環性、BBB 通過能、標的細胞への取り込みなど)を評価する。最後に AD モデルマウスに対する治療効果を、RNA 活性の定量と行動試験により評価する。

4. 研究成果

(1) 高分子集合体を形成する種々のブロック共重合体の合成: 標的の異なる PA を形成する高分子は賦与する機能も異なるが、共通して親水性セグメントに生体適合性の高い PEG、カチオン性セグメントに siRNA 担持能、エンドソーム脱出能、生分解性を有するアスパラギン酸側鎖にジアミノエタン基を導入した PAsp(DET)を用いた。またニューロンを標的化するために、PEG の α 末端に BBB 通過用のグルコースリガンド(Gluc)に加え、ニューロンに局在する GLT を認識するグルタミン酸誘導体リガンド(GluD)を導入したブロック共重合体をそれぞれ合成した。ここで脳実質部は血液中より還元環境である点に着目し、BBB 通過後 1st リガンド(Gluc)が還元環境に応答して脱離し、2nd リガンド(GluD)のみが表層に露出させるために、Gluc を担持したブロック共重合体には、PEG とカチオンセグメント間に還元環境下で開裂するジスルフィド結合(-SS-)を導入した Gluc-PEG-SS-PAsp(DET)を合成した。またそれぞれの荷電性セグメントの一部のユニットには PA の安定化に寄与する安定化ユニットを導入した。それぞれの合成ステップにおいて核磁気共鳴、高速液体クロマトグラフィーで測定し、所望の重合度、単峰性の分子量分布を有する高分子であることを確認し、安定化ユニットの導入量についても添加量によって精密に制御可能であることを確認した。

(2) siRNA@PA の構築と基礎物性評価: 合成した種々の高分子と siRNA を任意割合で混合し PA を調製した。動的光散乱測定(DLS)より直径が 42 nm で単分散性の高いナノ粒子であることを確認し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察よりミセル状の PA であることを確認した。続いて siRNA@PA を 50%FBS 下で 30 分間インキュベートし安定性を評価した。その結果、安定化ユニットを導入することで安定性が約 70 倍向上することを確認した。また蛍光標識した siRNA を同様の方法で

封入し、蛍光相関分光法(FCS)を用いて封入された siRNA 量を算出したところ、1 粒子辺り約 15 分子の siRNA を搭載していることを確認した。同様の FCS 測定をグルタチオン濃度(i) 0.1 mM(血液中を模倣)と(ii) 3 mM(脳実質を模倣)で行い拡散時間を比較したところ、(ii)では未封入と近い拡散時間を示した。これらの結果は siRNA が PA 内に格納され、脳内環境において PA が解離し、封入した siRNA が放出されることを支持する結果である。上記の基礎的な物性評価より、血液中では安定に siRNA をコアに保持し、脳内環境に反応してリリースするといった相反する機能を PA 内に創り込むことに成功した。

(3) デュアルリガンドを搭載した siRNA@PA の標的指向性評価: ここで調製した PA の表層には BBB を通過する(GLUT1 を標的化)ための Gluc リガンドとニューロン選択的に取り込まれる(GLT の標的化)ための GluD リガンドを搭載している。表層に存在するそれぞれのリガンドの認識能を評価するために、MDA-MB231 (GLUT1 を発現)、初代培養神経細胞(GLT を発現)を用いた細胞取り込み試験を行った。まず Gluc(+)を表層に搭載している PA は Gluc(-)と比較して MDA-MB231 への細胞取り込み量が高く、さらに GLUT1 との阻害剤と共培養することでその取り込み量が減少したことから、siRNA@PA 表層の Gluc リガンドを介して細胞内に取り込まれていることを確認した。また siRNA@PA を上記の脳内を模倣した環境で 30 分インキュベート後に、初代培養神経細胞に播種したところ、Gluc(+)および GluD(-)と比較して取り込み量が向上した。これらの結果は当初の目的通り、必要な箇所ですべてのリガンド分子が表層に露出していることを支持する結果である。

(4) siRNA@PM の体内動態評価: 蛍光標識 siRNA を封入した PA をマウス尾静脈より投与し、血中循環性、BBB 通過性を *in vivo* 共焦点顕微鏡で評価した。まず血中循環性に関しては、安定化ユニットなしで血中半減期($t_{1/2}$)は約 10 分なのに対し、安定化ユニットを導入することで $t_{1/2}=45$ 分まで向上した。また過去の報告にならって血糖制御を行い脳内観察を行ったところ、PA が BBB を通過して脳内へ移行する様子が確認できた。血糖制御(+/-)と PA 表層における Gluc(+/-)における脳集積性を評価したところ、血糖制御(-)/Gluc(-)の場合 0.1 %dose/g-brain だったのに対し、血糖制御(+)/Gluc(+) にすることで 2.8 %dose/g-brain (約 30 倍)まで向上した(図(a))。また脳組織切片を共焦点顕微鏡で観察したところ、GluD(-)と比べ GluD(+)⁺の siRNA@PA のニューロンへの取り込み向上が確認された。

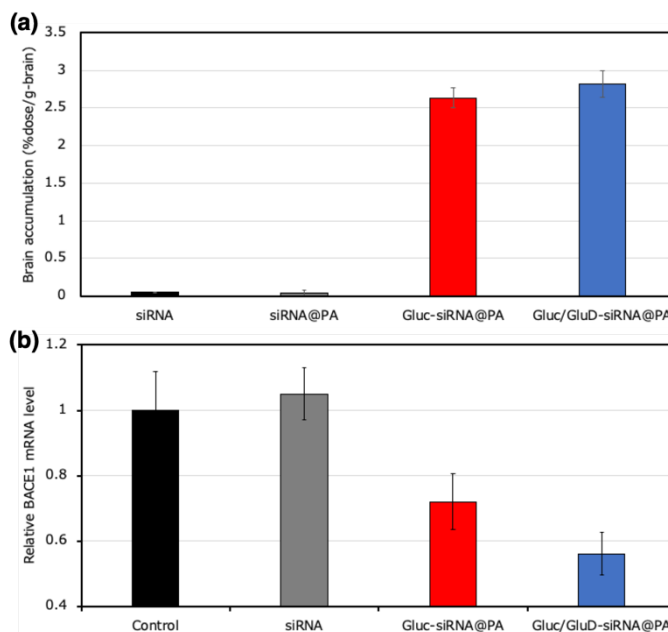


図. siRNA@PM の動態・機能評価試験: (a) 脳集積性、(b) BACE1 のノックダウン効率

(5) AD モデルマウスを用いた siRNA@PA の機能評価試験: 治療効果試験を実施するにあたり、本研究では、AD の疾患原因物質の一つとして考えられるアミロイド β (A β) を産生する β -セクレターゼ 1 (BACE1) をノックダウンする配列の siRNA を用いた。 *in vivo* における RNA 活性を定量 PCR 法にて評価した。まず naked siRNA では Control

群と比較して優位なノックダウンを確認されなかったのに対し、表層に Gluc リガンドのみが搭載されている siRNA@PA では約 20%ノックダウンすることに成功した。さらに Gluc リガンドに加え、GluD リガンドを搭載したシステムでは単回投与で 40%をノックダウンすることに成功した。これらの結果は脳に核酸医薬を送達するだけでなく、BBB 通過後に脳内の標的細胞に送り込む機能を付与した効果であり、本課題で提案した「脳実質内の標的細胞選択的に治療用 siRNA を送達する PM を開発し、CNS 疾患の革新的治療法に新しい方法論をもたらす」といった目的の実現の可能性を示唆する結果である。

<引用文献>

[1] Anraku Y. et al, Crossing the BBB: Glycemic control boosts glucosylated nanocarrier transport into brain. *Nature Communications* 8, 1001 (2017).

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 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Suzuki, Y. Miura, Y. Mochida, T. Miyazaki, K. Toh, Y. Anraku, V. Melo, X. Liu, T. Ishii, O. Nagano, H. Saka, H. Cabral, K. Kataoka	4. 巻 301
2. 論文標題 Glucose transporter 1-mediated vascular translocation of nanomedicines enhances accumulation and efficacy in solid tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 28-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2019.02.021	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 該当する
1. 著者名 B. -S. Kim, S. Chuanoi, T. Suma, Y. Anraku, K. Hayashi, M. Naito, H. -J. Kim, I. C. Kwon, K. Miyata, A. Kishimura, K. Kataoka	4. 巻 141
2. 論文標題 Self-assembly of siRNA/PEG-b-cationer at integer molar ratio into 100 nm-sized vesicular polyion complexes (siRNAsomes) for RNAi and codelivery of cargo macromolecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 3699-3709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b13641	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 該当する
1. 著者名 W. Ke, J. Li, F. Mohammed, Y. Wang, K. Tou, X. Liu, P. Wen, H. Kinoh, Y. Anraku, H. Chen, K. Kataoka, Z. Ge	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic polymersome nanoreactors with tumor-specific activable cascade reactions for cooperative cancer therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 2357-2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.8b09082	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 該当する
1. 著者名 M. Suhara, Y. Miura, H. Cabral, D. Akagi, Y. Anraku, A. Kishimura, M. Sano, T. Miyazaki, N. Nakamura, A. Nishiyama, K. Kataoka, H. Koyama, K. Hoshina	4. 巻 286
2. 論文標題 Targeting ability of self-assembled nanomedicines in rat acute limb ischemia model is affected by size	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 394-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2018.07.049	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 該当する

1. 著者名 Anraku Y., Kuwahara H., Fukusato Y., Mizoguchi A., Ishii T., Nitta K., Matsumoto Y., Toh K., Miyata K., Uchida S., Nishina K., Osada K., Itaka K., Nishiyama N., Mizusawa H., Yamasoba T., Yokota T., Kataoka K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Only Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00952-3	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13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 「難治性疾患の治療/診断を指向したナノマシンの創製 ~脳神経系疾患の革新的治療技術の開発~」
3. 学会等名 新化学技術推進協会 ライフサイエンス技術部会 材料分科会 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 ほったらかしで健康になる? -体内ナノマシンによる医療革命-
3. 学会等名 科学未来館 トークセッション (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安楽泰孝、桑原宏哉、横田隆徳、片岡一則
2. 発表標題 グルコース濃度に応答して血中から脳内に薬剤を届ける高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第67回 高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 難治性疾患の治療/診断を指向したナノマシンの創製 ~脳神経系疾患の革新的治療技術の開発~
3. 学会等名 第15回Tonomachi Cafe (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 難治性脳神経系疾患の治療を指向した薬剤送達システムの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊拓也、安楽泰孝、福島重人、片岡一則
2. 発表標題 脳実質内でのターゲティングを可能とするデュアルリガンド搭載型高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村乃理子、安楽泰孝、渡邊拓也、福島重人、藤加珠子、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 高分子ミセル表層に装着したリガンド分子と標的受容体との相互作用解析
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村直人、安楽泰孝、吉永直人、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 活性酸素種に反応して開裂する抗酸化剤内包高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村直人、吉永直人、安楽泰孝、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 酸化ストレス環境に反応して開裂する抗酸化剤内包高分子ミセルの構築
3. 学会等名 第70回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村直人、吉永直人、安楽泰孝、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 活性酸素種を引き金とする抗酸化剤放出型高分子ミセルの創製
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安楽泰孝、桑原宏哉、横田隆徳、片岡一則
2. 発表標題 難治性脳神経系疾患の治療を指向した高分子ミセルの構築
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村乃理子、安楽泰孝、福島重人、藤加珠子、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 血液脳関門の突破を指向した高分子ミセル表層のリガンド分子と標的トランスポーターの相互作用解析
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村直人、吉永直人、安楽泰孝、H. Cabral、片岡一則
2. 発表標題 酸化ストレス環境に応答する高分子ミセル型ROSスカベンジャーの開発
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井平伊、安楽泰孝、他85名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 アルツハイマー病発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院バイオエンジニアリング専攻 カブラル研 http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp 東京大学大学院工学系研究科 カブラル研究室 http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------