

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19562

研究課題名（和文）敗血症患者の脾臓マクロファージをターゲットとした、新規核酸医薬開発

研究課題名（英文）The development of nucleic acid therapeutic against sepsis targeting splenic macrophage

研究代表者

安田 宜成（Yasuda, Yoshinari）

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60432259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症治療に関し、現在までに我々はNF- $\kappa$ Bを負に制御するmiR-146aに着目し、マウスモデルに於いてmiR-146a発現ベクターをPEIと共に投与することで、脾臓マクロファージに取り込まれ、急性期のサイトカインストームを抑制し、生存率の改善に寄与することを確認している。今回mature-miR-146aを脾臓に直接投与することで臓器障害を軽減できることを見出したが、生存率の改善には至らなかった。人工核酸を用いたin vitro 実験に於いてサイトカイン分泌の抑制が確認され、今後投与経路や投与核酸を調整することで、より効果の高い治療プラットフォームを開発する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は致死率が高く、従来からの補液による循環の維持、抗生剤治療を超える治療法の開発が遅れ、救命率の改善が停滞している疾患である。敗血症の病態を見直し、新しい切り口からの治療法開発が望まれる状況にあるが、我々はかねてより、敗血症におけるToll like receptor (TLR)を介したNF- $\kappa$ Bの活性化に着目しており、このシグナルを負に抑制する治療法開発に取り組んできた。核酸医薬開発は細胞治療と比較し、安価で一つのプラットフォームの開発で様々な疾患に対応できるというメリットが有る。今回マイクロRNAベースの核酸医薬開発で、今までとは異なる切り口で敗血症治療が進む可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We have been involved in nucleic acid therapeutics using miR-146a expression vector for severe sepsis mice model. When introduced miR-146a expression vector with PEI, they are transfected into splenic macrophages and suppress cytokine storm and contribute to improve better survival. This time, we injected mature miR-146a directly into mice spleen. It improved organ damage but did not survival rate. In vitro study, we confirm our artificial nucleic acid suppress cytokine production. Now we are developing better therapeutic platform.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA 人工核酸 敗血症 脾臓

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は世界的に見ても罹患率、致死率が共に高く、またそれ故様々な治療介入のトライアルがなされてきているが、従来からの補液による循環の維持、抗生剤治療を超える治療法の開発が遅れ、救命率の改善が停滞している疾患である。敗血症の病態を見直し、新しい切り口からの治療法開発が望まれる状況にある。

(2) 我々がかねてより、敗血症における Toll like receptor (TLR) を介した NF- $\kappa$ B の活性化に着目しており、このシグナルを負に抑制する治療法開発に取り組んできた。我々は昨今、同経路を抑制するのに最も適した因子として、miR-146a を選定し、その発現 Plasmid と、Polyethylenimine (PEI) を共投与することで、脾臓マクロファージに選択的に miR-146a を発現させ、サイトカインストームを抑制し、マウス敗血症モデルにおける生存率の改善に成功した。ただしこの手法では、マウスに遺伝子導入を行うことになり、このままの形では臨床応用に昇華させることは困難である。

(3) 近年 iPS 細胞や MSC といった細胞治療が脚光をあびているが、一方で合成、大量生産が比較的安価な核酸医薬も次世代の薬剤開発として注目を浴びている。核酸医薬の大きな魅力として、一つのプラットフォームを開発すれば、疾患に応じて効果が期待される核酸を載せ替えることで、様々な病態に対応できる点である。microRNA (miRNA) は、アンチセンス医薬、人工核酸と異なり、本来生体内に備わった自然の RNA 干渉機構であり、治療応用が期待される一方で、RNase 耐性や目的臓器への delivery の問題など、超えなければならない問題もある。

### 2. 研究の目的

(1) 敗血症治療における新たな治療ターゲットとして、脾臓マクロファージを提唱し、それを対象としたドラッグデリバリーシステム (DDS)、及び投与経路、手技を含めた核酸導入の方法論を検証する。

(2) ヌクレアーゼ耐性を高めた人工核酸の効果を、in vitro の系において検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウス作成

敗血症マウスモデルとして、盲腸結紮先行 (cecal ligation puncture; CLP) モデル及び、LPS モデルの作成。

(2) DDS および、投与経路の検証

mature miR-146a を PEI を DDS として用い、マウス脾臓へ直接注射投与

mature miR-146a をリポソームを DDS として、経静脈的投与

(3) 人工核酸の効果判定

RAW264.7 cell に様々に修飾した人工核酸 (miR-146a) に対し、事前にリポフェクションを行う。その後 LPS にて刺激し、上清中の IL-6 および TNF- $\alpha$  を測定する。

### 4. 研究成果

(1) miR-146a 脾臓直接投与による生体内挙動

予備実験として、線虫由来の Cel-miR-39 を PEI と共に全身投与した場合、脾臓に直接注射投与した場合の、投与した核酸の動向について qPCR を用いて解析をした。全身投与した場合は肺に最も多く集積し、次いで肝臓、脾臓と行った網内系に認められた。

一方脾臓直接注射投与した場合は、期待されたとおり脾臓に有意に強く蓄積し、多臓器には取り込みが最小限で済んだ。(図1) また、取り込みした脾臓から F4/80 陽性マクロファージ、及び陰性細胞を免疫学的に選択的に回収した所、投与した核酸はマクロファージに強く取り込まれていることがわかった。(図2)

先行研究より、我々は敗血症治療の新しいターゲットとして、脾臓マクロファージを提唱している。脾臓直接投与によって、他臓器に取り込まれないことから、副作用を最小限化して、より強い効果が期待される事が示唆された。

(2) マウス CLP モデルにおける miR-146a 脾臓直接投与の効果

マウス CLP モデルを作成し、作成直後に脾臓へ mature miR-146a 投与を行った。図3に示すように、miR-146a 脾臓直接投与群において、コントロール (スクランブル配列) と比較し、臓器障害の指標は改善が見られた。一方で、CLP 後の生存率に関しては、むしろ

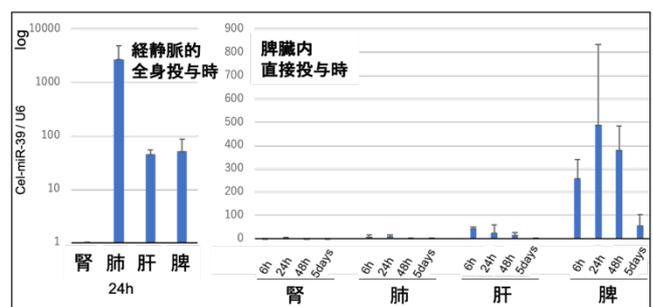


図1

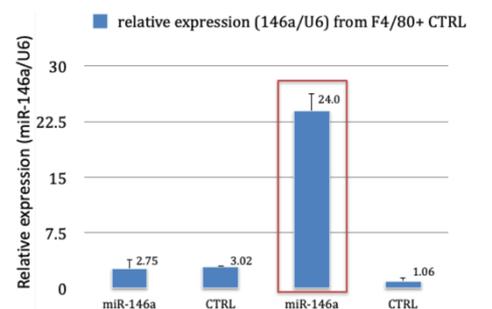


図2

増悪するといった反対の効果が確認された。これは miR-146a の潜在的な治療効果が示されているが、投与タイミングにより敗血症発症初期の miR-146a による過剰な免疫抑制がおきた場合は、むしろ生存率の悪化につながった可能性も考えられた。

(3) マウス LPS 投与による敗血症モデルにおける、リボソームを DDS とした miR-146a 投与の治療効果

次に、敗血症モデル及び DDS を変更し、LPS 投与による敗血症惹起直後にリボソームを DDS として用いて miR-146a を眼窩静注した。結果、今回行った条件においては、生存率に優位な差を見出すことが出来なかった。

先行研究では、CLP 作成 1 週間前に miR-146a 発現ベクターを投与していたことから、今回の投与方法、投与経路では効果を見出すまでの時間が不足していたことも検証された。

(4) 人工核酸を用いた miR-146a (mimic) による in vitro 実験

miR-146a は NF- $\kappa$ B 経路を抑制的に作用するため、LPS 刺激によるサイトカイン分泌抑制を引き起こすことが知られている。今回、様々に人工核酸にて改変した<化合物 1-6>における、サイトカイン分泌抑制効果を試したが、概ね IL6 (図 4) 及び TNF- $\alpha$  (data not shown) 分泌を抑制したが、注目すべき点は、天然の mature miR-146a よりも効果が高い人工核酸が認められたことである。これは人工核酸のほうが、mRNA のターゲットの配列により強固に結合する事が原因として推測される。

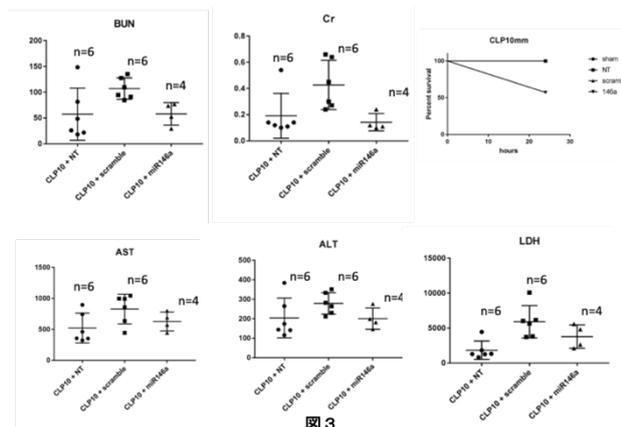


図 3

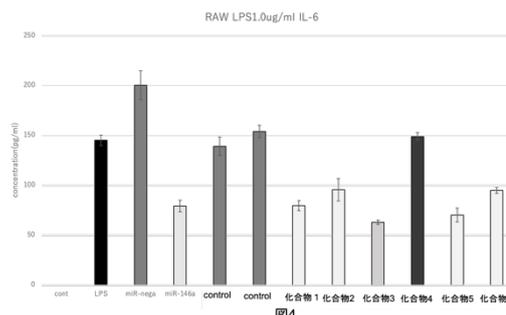


図 4

以上より、マウス敗血症モデルにおいては、治療核酸の脾臓直接投与にて臓器障害の軽減は確認されたが、生存率の改善には至らなかった。今回確認した人工核酸は in vitro で mature miRNA を凌ぐ効果が認められ、今後 in vitro の系において検証結果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funahashi Yoshio, Kato Noritoshi, Masuda Tomohiro, Nishio Fumitoshi, Kitai Hiroki, Ishimoto Takuji, Kosugi Tomoki, Tsuboi Naotake, Matsuda Naoyuki, Maruyama Shoichi, Kadomatsu Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 miR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0190-4	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	加藤 規利  (Kato Noritoshi)  (90716052)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師    (13901)	