

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07673

研究課題名(和文) 腫瘍組織におけるmicroRNA阻害を可能とするペプチドリガンド搭載LNPの開発

研究課題名(英文) Development of peptide-ligand modified LNP for microRNA inhibition in tumor tissues.

研究代表者

原口 健 (Haraguchi, Takeshi)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任准教授

研究者番号：10549455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特定のmicroRNAを効果的にかつ特異的に阻害する修飾核酸分子「Super-S-TuD」を封入したLNP(lipid Nanoparticle)にアクティブターゲティング能を付与する技術として、Super-S-TuD封入LNPの表層に簡便にリガンド分子を修飾する方法を確立した。リガンド修飾LNPは非修飾LNPと比して、がん細胞への高い核酸導入効率を示し、かつ非修飾LNPと同様に高い血中滞留性および腫瘍組織への集積性を示した。本成果により、腫瘍組織への送達に適した体内動態特性を損なわずに、がん細胞への導入効率を高めたリガンド分子修飾Super-S-TuD封入LNPの作製が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、Super-S-TuD封入LNPの表層にリガンド分子を修飾してがん細胞へのSuper-S-TuDの導入効率を高めることが可能となった。この技術を基盤として腫瘍組織においてmiRNAを阻害する方法論を完成させることで、腫瘍において発現が異常亢進するmiRNAについてIn Vivo試験による機能解析、治療標的としてのmiRNAの探索・評価を行うことが可能となる。そして新たな核酸医薬モダリティの社会実装へとつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop tumor tissue targeted lipid nanoparticles (LNP) encapsulated with Super-S-TuD, a modified nucleic acid molecule that effectively and specifically inhibits a specific microRNA, we established a simple method to modify the surface layer of Super-S-TuD-encapsulated LNP with a ligand molecule in this study. LNP modified with ligand molecule by this method showed higher transfection efficiency into cancer cells than unmodified LNP. Furthermore, this ligand molecule modified LNP showed high blood retention and accumulation in tumor tissues as well as unmodified LNP. This method enables the preparation of ligand molecule modified Super-S-TuD-encapsulated LNP which has enhanced delivery efficiency into cancer cells and suitable pharmacokinetics for delivery into tumor tissues.

研究分野：microRNA

キーワード：核酸医薬 DDS LNP アクティブターゲティング 腫瘍 microRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 上市している核酸医薬品、臨床試験下の開発中の核酸医薬が多数報告されるなど、核酸医薬品の開発が進められていた。しかしその多くは肝臓を標的としたものであり、核酸医薬の適用をがんへと広げるために、腫瘍組織への核酸分子を送達する技術の開発が望まれていた。

(2) 我々はこれまでに独自の二次構造を持ち、特定の microRNA を効果的にかつ特異的に阻害する修飾核酸分子「Super-S-TuD」を開発してきた。さらに我々は標的 microRNA を特異的かつ高効率に阻害する修飾核酸分子「Super-S-TuD」を腫瘍組織へ送達する技術の開発を目指し、Super-S-TuD 封入 LNP (Lipid Nanoparticle) の開発を行ってきた。

### 2. 研究の目的

Super-S-TuD 封入 LNP は血中滞留性・腫瘍組織集積性に優れており、かつ高いエンドソーム脱出能、細胞質での核酸放出能を有している。そこで、腫瘍細胞への結合能を有するリガンド分子を探索し、その分子を LNP の表層に修飾することにより、標的とする腫瘍細胞へ能動的に結合して取り込まれる「アクティブターゲティング」能を付与することができる。これにより腫瘍組織への導入効率を向上することを目指して、本研究を開始した。

### 3. 研究の方法

(1) 先端に官能基を有する PEG 化脂質を LNP に搭載する方法として、リガンド分子を結合した PEG 化脂質を LNP へと挿入する post-insertion 法と、PEG 先端に反応基を有する PEG 化脂質を加えて LNP を調製した後にリガンド分子を結合する pre-mixed 法を検討した。リガンド分子として R8 ペプチド分子を検討に用いた。アッセイ系として肺がん細胞株である H358 細胞に miRNA 阻害活性を測定できるレポーター遺伝子を導入した細胞を用いた。リガンド分子修飾 LNP をレポーター細胞に投与し、核酸導入効率を評価した。

(2) pre-mixed 法を用いて種々のリガンド分子の修飾の効果の検証を試みた。それぞれのリガンド分子修飾 LNP をレポーター細胞に投与し、miRNA 阻害活性を指標に核酸導入効率の評価を行った。

(3) リガンド分子の修飾による血中滞留性・腫瘍組織集積性といった体内動態への影響を検討した。リガンド分子を修飾した LNP を担癌マウスモデルに静脈投与し、血中滞留性・腫瘍組織集積性を解析した。

### 4. 研究成果

(1) Super-S-TuD 封入 LNP の表層にリガンド分子を修飾する方法を検討した結果、pre-mixed 法を用いることにより簡便に LNP の表層に修飾できることが示された。この結合がリガンド分子と LNP の電荷的な結合ではなく、LNP 表層の PEG 分子先端に配した官能基に依存したものであるかを調べるために、蛍光標識 R8 ペプチドを用いた結合実験を行ったところ、官能基付加 PEG 化脂質を含む LNP とのみ結合が確認された。この方法により R8 ペプチドを修飾した LNP は従来の非修飾 LNP と比して顕著な核酸導入効率の上昇が見られた。これにより LNP 表層にリガンド分子を修飾する方法の有効性が示された。

(2) 種々のリガンド分子を修飾した LNP の核酸導入効率を評価した結果、R8 ペプチドの修飾により、複数の細胞株に対して顕著な核酸導入効率の上昇が見られた。また cRGD 分子の修飾 LNP

は有効ながん細胞株と有効でない細胞株が見られた。さらに R8 ペプチドおよび cRGD 分子について、修飾量の検討を行ったところ、R8 ペプチドおよび cRGD 分子の有効な修飾量が明らかとなり、また修飾量過多により LNP が凝集して沈殿してしまうことが判明した。

(3) リガンド分子の修飾による血中滞留性・腫瘍組織集積性といった体内動態への影響を評価するために、R8 ペプチド、cRGD 分子を修飾した LNP を担癌マウスモデルに静脈投与し、血中滞留性・腫瘍組織集積性を解析した結果、R8 ペプチドを修飾した LNP は高い血中滞留性を示したが、R8 ペプチドおよび cRGD 分子について二重修飾した LNP は血中滞留性の低下が見られた。しかし腫瘍組織への集積は両者ともに高かった。

以上により、細胞への導入効率を高めつつも、血中滞留性・腫瘍組織集積性が高いリガンド分子修飾 LNP を調製できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 千葉大学真菌医学研究センター RNA制御治療学共同研究部門 <a href="http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/haraguchi.html">http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/haraguchi.html</a>
--

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