

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03843

研究課題名（和文）心不全に特化した超音波応答性ナノバブルの開発と疾患治療システムの構築

研究課題名（英文）Development of ultrasound-responsive nanobubbles specialized on heart failure and construction of a disease treatment system

研究代表者

根岸 洋一（NEGISHI, YOICHI）

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50286978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年、心不全病態解析により創薬ターゲットが明確になりつつあり、核酸医薬療法が注目されている。しかしながら、その有用なDDSが喫緊の課題とされている。本研究では、心不全に伴う線維化抑制能を有するmiRNAを搭載した超音波応答性ナノバブルを作製し、薬剤誘発性慢性心不全モデルマウスの心臓に治療用miRNAを送達導入することに成功した。実際にナノバブルと治療用超音波照射の併用により、miRNA導入した心不全モデル心臓では線維化関連因子や炎症関連因子の発現抑制が認められた。よって本ナノバブルによるmiRNA送達・導入システムは、心不全治療における有用な一手段となると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤誘発性慢性心不全モデルマウスを利用した治療研究において、超音波応答性ナノバブルにより、線維化抑制能を有するmiRNAを心臓へと送達させ、実際に機能発現したという結果は、他の循環器疾患治療にも適用可能と考えられる。多様なmiRNAや再生関連因子などのmRNAを組み合わせることで治療効率を向上でき、がん治療や再生医療分野における新たな治療システム開発に発展する可能性を秘めている。本研究結果は、超音波診断造影能を有するナノバブルを用いることで、疾患部位の診断と治療の一体化システム（セラノスティクス）の構築に繋がっており、学術的及び社会的にも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, analysis of heart failure pathology has clarified the targets for drug discovery, and nucleic acid drug therapy has been attracting attention. However, the useful DDS is an urgent issue. In this study, we developed ultrasound-responsive nanobubbles loaded with miRNAs that have the ability to inhibit fibrosis associated with heart failure, and successfully delivered therapeutic miRNAs into the hearts of mouse model of drug-induced chronic heart failure. In fact, the combination of nanobubbles and therapeutic ultrasound irradiation suppressed the expression of fibrosis- and inflammation-related factors in the miRNA-transfected hearts of heart failure models. Therefore, this nanobubble miRNA delivery system is expected to be a useful tool in the treatment of heart failure.

研究分野：超音波DDS

キーワード：ナノバブル 超音波 心不全

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えたわが国では、心不全の激増が懸念されている。心臓の収縮機能が著しく低下する心不全では、心筋細胞が広範囲に損傷すると線維芽細胞に置き換わり、心臓の収縮能力が低下する。現在、治療には薬物療法や外科手術が行われており、重症患者には心臓移植以外に根本的な治療はないと考えられているが、汎用性の観点から普及は難しい。一方、近年、心不全の各病態（心肥大、線維化、心筋アポトーシスなど）の分子病態が解明されるにつれ、創薬標的が同定されるに至り、汎用性の高い新たな核酸医薬療法に期待が寄せられている。これまでに申請者らは、ポリエチレングリコール修飾リポソーム (PEG-リポソーム) に注目し、PEG-リポソームに超音波造影ガス (C3F8) を封入したナノバブルを開発し、新規の薬物・遺伝子導入ツールとなること、また、超音波造影が可能であることを示してきた。そこで心不全治療に特化した核酸医薬を搭載したナノバブルを作製し、これを心不全モデル動物への全身投与を行い、炎症・組織傷害により血管透過性が高まっている心筋病変部へと送達させる。次いで集積性を診断用超音波イメージングで描出しつつ、体外からの治療用超音波照射を行うことで、全身循環を介した非侵襲的な心筋への選択的核酸導入も可能となり、有用性の高い超音波セラノスティクスシステムの構築が可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、微小気泡の一つとして開発してきた超音波診断造影と薬物・遺伝子導入を可能とするナノバブルに、心不全治療のための核酸医薬を搭載したナノバブルの開発を目指す。心不全に伴う病態を改善させ、非侵襲的な核酸医薬を含有する超音波応答性ナノバブルの開発と心不全治療システムの基盤構築を目指す。心不全モデルにおける治療効果を踏まえ、超音波セラノスティクスの可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 超音波応答性ナノバブルの作製

基本脂質として、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG)、1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、DSPE-PEG2000 を用いた。これらを逆相蒸発法 (REV 法) にてリポソームを調製した。Extruder を用いて粒子径を約 140 nm サイズに調製した。その後、pore size 0.45 μm のシリンジフィルターを用いて、ろ過滅菌を行ったものを実験に用いた。これを密閉ガラスバイアルに注入した後に、超音波造影ガス (パーフルオロプロパンガス: C3F8) を充填した。これを、パス型ソニケーターを用いて超音波処理し、超音波応答性ナノバブルを作製した。粒子径の測定は、Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd)、Aggregate Sizer (島津) を使用した。筋選択的リポソームは、DSPE-PEG-A2G802 をポストインサクション法により、調製し上記の方法にてバブル化した。

(2) アニオン性脂質含有ナノバブルへのカチオン性ポリマーコーティング

調製したアニオン性脂質含有ナノバブル (脂質濃度: 1 mg/mL) にカチオン性ポリマーを、全量に対しナノバブル: ポリマー = 2: 1 (60 μl : 30 μl) となるようにして添加後、室温にて 3 分静置することでカチオン性ポリマーコーティングナノバブルとした。

(3) 遺伝子・核酸搭載カチオン性ポリマーコーティングナノバブル

調製したカチオン性ポリマーコーティングナノバブルに、CMV プロモーター制御下で Luciferase を発現する pcDNA3-luc を加え、タッピングにて混合し、プラスミド DNA (pDNA) 搭載型のナノバブルを調製した。また、同様の方法で線維化を抑制すると報告されている miRNA (miR-146a) を搭載した。ナノバブルの遺伝子導入能の評価においては、正常マウスあるいは心不全モデルマウスに尾静脈内投与し、治療用超音波照射後 (Frequency: 1 kHz, Intensity: 1-3 W/cm²)、その 24 時間後に照射心筋組織を回収し、ホモジネート後にルシフェラーゼ活性を測定した。なお本研究におけるすべての動物実験に関しては、各所属機関における指針に基づき、東京薬科大学動物実験委員会などに申請し、承認を受けている。

(4) 心不全モデルマウスの作製

薬剤誘発性の慢性心不全モデルを作製するために、はじめに Alzet Pump にイソプロテレノールを充填したものを C57BL6/J マウス雄 8 週齢の背部皮下に麻酔下で埋め込んだ。10 日目に心臓を摘出し、ホルマリン固定を行った後にマツソントリクローム染色により、組織標本作製した。その後、顕微鏡 (BZ-X700, キーエンス) にて線維化 (コラーゲンの沈着) の観察を行った。

(5) 心不全モデルマウスにおける診断用超音波造影能の評価

上述の方法で調製した miRNA (miR-146a) を搭載したナノバブルを、イソプロテレノール誘発性心不全モデルマウスに対し、静脈内投与し、超音波診断造影装置 (12 MHz) にて心エコーを観察

した。本実験は麻酔下で実施した。その後のエコー画像を ImageJ にて Region of Intensity (ROI) を数値化した。また、正常マウスに対しても同様に miRNA 搭載ナノバブルを投与し、その後の心エコー画像を心不全モデルと比較した。

(6) 心不全モデルマウスへの miR-146a 導入効率と、それに伴う関連因子変動の評価

miRNA 搭載ナノバブルをイソプロテレノール誘発性心不全モデルマウスに対し、静脈内投与し、イトー UST-770 (伊藤超短波) を用いて治療用超音波照射後 (Frequency: 1 kHz, Intensity: 1-3 W/cm²)、その 24 時間後に組織を回収し、RNA 抽出、cDNA 合成後に Real-Time PCR (THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix) を行った。miR-146a 導入効率は、RNU6 (内在性コントロール) にて標準化した。また、線維化関連因子として、TypeI collagen、TGF- β 1、炎症関連因子として TNF α 、TRAF6、IFN γ の mRNA 発現を GAPDH で標準化して評価した。microRNA の検出においては TaqMan 法にて解析した。

4. 研究成果

核酸・遺伝子搭載を可能とするナノバブルの調製と機能性評価

中性脂質およびアニオン性脂質の含有量を変化させたナノバブルを作製し、これらをマウスへの全身投与後に診断用超音波造影装置を用いて、心エコーを指標にナノバブルの生体内安定性を評価した。その結果、中性脂質含有ナノバブルと比較して、アニオン性脂質含有ナノバブルにおいて高い安定性が示された。さらに蛍光標識した筋選択的ペプチド修飾リポソームを用いてナノバブルを作製し、筋細胞との相互作用性を蛍光顕微鏡にて評価したところ、未修飾あるいはスクランブルペプチド修飾ナノバブルと比較して、筋選択的ペプチド修飾ナノバブルにおいて顕著な細胞相互作用性を示した。つぎに遺伝子搭載ナノバブルの作製検討では、アニオン性脂質含有ナノバブルにカチオン性ポリマーを 2 種類、表面コートしたところ、蛍光修飾プラスミド DNA (pDNA) の搭載が可能となることから FACS 解析により示された。次にマウス心臓への超音波遺伝子導入を実施した。アニオン性脂質含有ナノバブルにカチオン性ナノバブルに表面コートし、ルシフェラーゼをコードした pDNA を添加して遺伝子搭載ナノバブルとした。これを尾静脈内投与後に心臓への治療用超音波を照射し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を指標に導入効率を評価した。結果として低い音圧では十分な導入活性を認めなかったのに対し、高い音圧強度では、非超音波照射群と比較して、5-10 倍以上の発現上昇を示した。さらに作製した心不全モデルマウスに対しても同様の pDNA 導入実験を行ったところ、その超音波併用による発現上昇傾向を示したことから、今後は、筋選択的ペプチド修飾ナノバブルへの遺伝子搭載を最適化することで、さらなる導入効率の向上が可能となるものと思われる。以上より、ナノバブルと治療用超音波を併用した心臓への遺伝子導入システムの有用性が示されことから、カチオン性ポリマーコーティングナノバブル、心臓への治療用超音波照射条件を心不全治療実験に用いた。

心不全モデルマウスにおける miRNA 搭載ナノバブルの安定性

はじめに慢性心不全モデルマウスを作製するために、イソプロテレノールを 40-160 mg/kg/day となるように充填した浸透圧ポンプをマウス背部に埋め込み、10 日後に摘出後に標本作製した。線維化の指標としてコラーゲン沈着をマッソントリクロームにて染色し、顕微鏡観察したところ、イソプロテレノールの投与量依存的な線維化領域の増大が確認できた。次に治療用核酸医薬の導入実験に先立って、超音波造影ガスを内封したナノバブルの静脈内投与後の全身循環における安定性を診断用超音波造影装置にて評価した。結果として、正常マウスにカチオン性ポリマーコーティングナノバブルに miRNA (miR-146a) を搭載し、これを投与した後に心エコー画像を取得したところ、15 分間以上の安定な全身循環が示された。この結果は、miR-146a のナノバブルへの搭載の有無に関わらず、全身循環における安定性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、ナノバブルへのカチオン性ポリマーの表面コーティングの有無に関わらず、造影効果に変化を認めず、コーティングによる安定性への影響はほとんど無いことも確認した。次に薬物誘発性心不全モデルマウスに対し、miR-146a 搭載ナノバブルを投与したところ、造影輝度が 1-2 分で最高到達点を迎え、急激に下降する傾向を示していた。この理由としては、イソプロテレノールが交感神経を刺激することで心拍数を増加させたことで全身循環におけるナノバブルの安定性に影響したためと考えられる。しかしながら治療用超音波照射により導入実験を行う場合には、ナノバブルの投与直後に行うことから、このナノバブルの安定性が保たれていれば十分であると考えられた。正常マウスと心不全モデルマウスにおけるナノバブル投与後の造影時間の相違が生じるという知見は、造影持続時間を経過観察することで、病態における心機能診断する一つの指標となりうるものと期待される。

心不全モデルマウスへの miRNA 搭載ナノバブルによる超音波デリバリーシステム

心不全モデルマウスへの miR-146a 搭載型ナノバブルと超音波照射併用による導入効果について検討した。イソプロテレノール充填ポンプを背部に埋め込み 4 日後に、miR-146a 搭載型ナノバブルを静脈内投与し、治療用超音波照射 (照射条件: Frequency: 1 kHz, Intensity: 1-3 W/cm²) した。24 時間後に心臓を回収し、miR-146a の導入効率を Real-Time PCR (TaqMan 法) にて調べた。その結果、治療用超音波非照射群と比較して、照射群において導入効率の上昇が確認され、それは照射時間に依存して高くなる傾向を示していた。さらにイソプロテレノールの投与 4 日

目であるが、線維化の指標である TypeI collagen の発現についても調べたところ、治療用超音波非照射群と比較して、照射群において発現レベルが 50% 近く減少することが明らかとなった。次にイソプロテレノール充填ポンプを背部に埋め込み 10 日後の慢性心不全モデルを対象に、miRNA の導入実験を行った。miR-146a 搭載型ナノバブルと超音波照射併用による導入は、イソプロテレノール投与の 4 日と 7 日目の 2 回行った。結果として、miR-146a の導入量の検討では、未処理群と比較して miR-146a 搭載型ナノバブル+超音波照射併用群で miR-146a 量が上昇する傾向が示された。さらに TypeI collagen の発現についても調べたところ、非照射群と比較して、照射群において発現レベルの減少傾向が認められた。また、線維化関連因子である TGF- β 1 では軽微な抑制を示していた。炎症関連因子として TNF α 、TRAF6、IFN γ についても調べたところ、これら因子のすべてで同様に照射群において減少する傾向が示された。今後、完全に慢性心不全となった状態からの治療介入で線維化を制御できるか、さらには治療効果の持続性についても検討を加えていく必要があると考えられる。今回得られた線維化および炎症抑制効果は、血管周囲の構成細胞に miRNA が導入されて、様々な因子の発現制御に寄与したことを想定しているが、さらなる送達と治療効率向上のためには、導入直後の miRNA の組織内動態についても詳細に明らかにしていくことが重要である。また、今回治療用核酸として用いたものは、線維化抑制に働くことから、心不全に伴い破綻した心筋細胞や血管を再生することは困難である。それゆえ、血管形成機能を有する他の miRNA や例えば HGF のような再生関連因子の mRNA あるいは発現プラスミド DNA などと組み合わせることで、心不全の進行抑制と破綻組織の再生を行える治療システムの構築、さらにはナノバブルの超音波造影能を融合させることで有用性の高い超音波セラノスティクスシステムの構築が可能となるものと期待できる。

mRNA 内封 LNP とナノバブルの併用による mRNA デリバリーの検討

イオン化脂質を利用してルシフェラーゼ mRNA を内封した LNP を作製した。さらに筋指向性ペプチド (A2G80) を表面修飾した A2G80-LNP を作製した。これをナノバブルとともに筋ジストロフィーモデルマウスへと静脈内投与し、筋組織への治療用超音波を照射後にルシフェラーゼ発現を調べたところ、A2G80 修飾による発現上昇を認めなかった。一方で、mRNA 内封 LNP をナノバブルとともに筋ジストロフィーモデルマウスへと静脈内投与し、心臓への治療用超音波を照射したところ、顕著な心筋での発現上昇を認めた。よって、ナノバブルと超音波照射との併用法は、心不全モデルにおいても LNP を介した mRNA デリバリーにおいて有用な増強システムとなりうるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木愛理、板谷祐紀、濱田圭祐、中島康介、三浦 剛、吉川大和、濱野展人、高橋葉子、田中浩揮、秋田英万、野水基義、根岸洋一
2. 発表標題 筋ジストロフィー治療に向けた筋組織指向型mRNA封入脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木愛理、板谷祐紀、濱田圭祐、中島康介、三浦 剛、吉川大和、濱野展人、高橋葉子、田中浩揮、秋田英万、野水基義、根岸洋一
2. 発表標題 筋ターゲティング型mRNA封入脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第66回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木愛理、板谷祐紀、濱田圭祐、中島康介、三浦 剛、吉川大和、濱野展人、高橋葉子、田中浩揮、秋田英万、野水基義、根岸洋一
2. 発表標題 ジストログリカン親和性ペプチドを介した筋ターゲティング型脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 創剤フォーラム第27回若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 超音波応答性核酸・遺伝子デリバリーを可能とするセラノスティクスシステムの開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 核酸・遺伝子デリバリーを可能とする超音波応答性ナノバブルの開発とその応用
3. 学会等名 BioJapan 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根岸洋一
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルによる核酸・遺伝子デリバリーシステムの開発
3. 学会等名 バイオファーマ オンラインカンファレンス 2021 Spring (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下敦斗、山口泰暉、中澤佳菜子、高橋葉子、根岸洋一
2. 発表標題 miRNA-146a搭載ナノバブルと超音波を利用した心不全治療システム構築に向けた基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋葉子、根岸洋一
2. 発表標題 多様なモダリティの生体内バリア突破を可能とする超音波応答性ナノバブルの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮澤つぐみ、中山航史朗、佐々木愛理、竹下敦斗、中澤佳菜子、細井悠暉、田中浩揮、秋田英万、高橋葉子、根岸洋一
2. 発表標題 LNPと超音波応答性ナノバブル併用による骨格筋・心筋選択的なmRNAデリバリーシステムの構築
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山口泰暉、高橋葉子、鈴木章平、根岸洋一
2. 発表標題 キトサンオリゴ糖を利用した遺伝子搭載ナノバブルの調製と超音波併用遺伝子デリバリーシステムの開発
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第22回シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔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	吉川 大和 (Kikkawa Yamato) (20274227)	東京薬科大学・薬学部・准教授 (32659)	
研究分担者	高橋 葉子 (遠藤葉子) (Takahashi Yoko) (30453806)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	
研究分担者	濱野 展人 (Hamano Nobuhito) (80708397)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	竹下 敦斗 (Takeshita Atsuto)	東京薬科大学・薬学部・学部生	
研究協力者	山口 泰暉 (Yamaguchi Taiki)	東京薬科大学・薬学部・博士課程大学院生	
研究協力者	杉田 英謙 (Sugita Hidemasa)	東京薬科大学・薬学部・学部生	
研究協力者	佐々木 愛理 (Sasaki Eri)	東京薬科大学・薬学部・博士課程大学院生	
研究協力者	宮澤 つぐみ (Miyazawa Tsugumi)	東京薬科大学・薬学部・学部生	
研究協力者	中山 航史郎 (Nakayama Koshiro)	東京薬科大学・薬学部・学部生	
研究協力者	中澤 佳菜子 (Nakazawa Kanako)	東京薬科大学・薬学部・学部生	

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