

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05277

研究課題名（和文）pre-miR-664a搭載ラクトソームによる光依存的なアポトーシス誘導法の開発

研究課題名（英文）Development of light-dependent apoptosis induction by lactosome-loaded pre-miR-664a

研究代表者

渡邊 和則（Watanabe, Kazunori）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・准教授

研究者番号：70602027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アポトーシス誘導法はがん治療において重要視されている。我々が開発した光誘導RNA導入法と、アポトーシスを誘導するpre-miR-664aを組み合わせることで光依存的にアポトーシスを誘導できることを報告している。しかしながら、光誘導RNA導入法はin vivoでの使用が難しい。そこで、in vivoで高い安定性を保つラクトソームにpre-miR-664aと光増感剤を担持させることで、光依存的なアポトーシス誘導法の開発を試みた。その結果、光依存的にアポトーシスを誘導すること、pre-miR-664aを担持させることで光増感剤単独よりも高いアポトーシス誘導効率を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高効率なアポトーシス誘導が可能なpre-miR-664aと光増感剤を担持したラクトソームの開発に成功した。今後、in vivo研究へと発展させていくことで、pre-miR-664aと光増感剤を担持したラクトソームを用いた抗がん剤へと開発していくと考えている。

研究成果の概要（英文）：Apoptosis induction methods are important in cancer therapy. We have reported that the combination of light-induced RNA delivery and pre-miR-664a, which induces apoptosis, can induce apoptosis in a light-dependent manner. However, the light-induced RNA delivery is difficult to use in vivo. Therefore, we attempted to develop a light-dependent apoptosis induction by loading pre-miR-664a and a photosensitizer onto lactosome that maintain high stability in vivo.

As a result, apoptosis was induced in a light-dependent manner by lactosome loaded with pre-miR-664a and a photosensitizer, and lactosome loaded with pre-miR-664a and photosensitizer showed higher apoptosis induction efficiency than those loaded with a photosensitizer alone.

研究分野：生体分子工学

キーワード：pre-miR-664a 光制御 アポトーシス誘導

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物はがん細胞などの異常な細胞をアポトーシスさせることで、個体としての恒常性を維持している。そのため、アポトーシス誘導法はがん治療法開発において重要視されている。例えば、がん治療法でよく利用されている抗がん剤や放射線治療は、がん細胞がアポトーシスを起こすことで退縮・死滅する作用機序になっている。

近年、miRNA がアポトーシスに関与していることが多数報告されている。例えば、miR-504-3p は p53 の発現量を制御することでアポトーシスを制御している (Hu W. et al., Mol. Cell (2011))。申請者らも神経分化に関与する miRNA を探索している過程で (Genes Cells (2018))、新規のアポトーシス誘導 miRNA として、miR-664a-5p の前駆体である pre-miR-664a を発見した (Sci. Rep. (2021))。しかしながら、pre-miR-664a によるアポトーシス誘導機構は不明である。

また我々が開発した光照射した細胞にのみ RNA を輸送することが可能な光誘導 RNA 導入法 (PCDR 法) と pre-miR-664a を組み合わせることで、光に依存したアポトーシス誘導法を開発している (図 1) (Sci. Rep. (2021))。しかしながら、PCDR 法は RNA キャリアとしてタンパク質を用いている。そのため、*in vivo* では RNA キャリアが分解してしまい、光依存的なアポトーシス誘導は困難である。

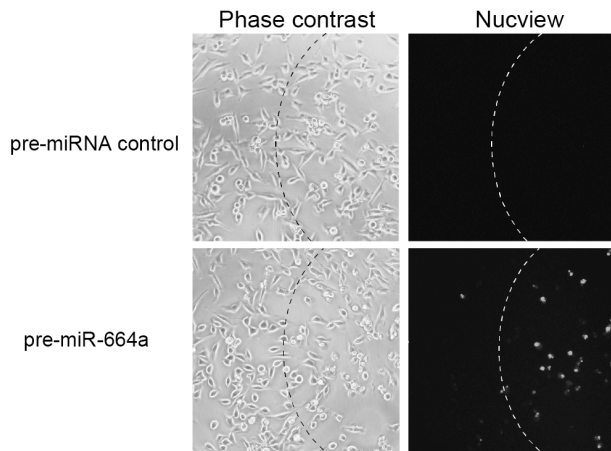


図 1 pre-miR-664a と光誘導 RNA 導入法を用いた光照射部位特異的なアポトーシス誘導

1 日目に破線の右側のみ光照射することで pre-miRNA を導入。2 日目に Nucview を用いてアポトーシスを検出。

2. 研究の目的

本研究では、pre-miR-664a によるアポトーシス誘導機構を明らかにすることを目的とした。また、申請者らが開発した *in vivo* で高い安定性を持つラクトソーム (申請者ら、Sci. Technol. Adv. Mater. (2016), J. Pharm. Sci. (2021)) に pre-miR-664a を担持した光増感剤@pre-miR-664a@ラクトソームを開発し、*in vivo* での光依存的なアポトーシス誘導を試みた。

3. 研究の方法

pre-miR-664a によるアポトーシス誘導機構を明らかにするために、pre-miR-664a を導入した細胞における mRNA の発現変化をマイクロアレイ解析および定量 PCR を用いて明らかにした。

青色の光により励起される光増感剤 (青)、pre-miR-664a、細胞膜透過性ペプチドである L7-EB1 を担持したラクトソームである光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームの調製を行った。また、近赤外光により励起される光増感剤 (近)、pre-miR-664a、L7-EB1 を担持したラクトソームである光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームの調製も行った。次に、調製したラクトソームを用いて光依存的なアポトーシス誘導が起こるのか、pre-miR-664a によって高効率のアポトーシス誘導が起こるのか、アポトーシス検出試薬を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) pre-miR-664a の標的 mRNA の同定

マイクロアレイ解析により、pre-miR-664a を細胞に導入することで発現変動する mRNA を明らかにした。特に、アポトーシスに関与する遺伝子、細胞周期に関与する遺伝子を複数同定した。次に、マイクロアレイ解析で発現変動した mRNA の発現量をマイクロアレイよりも定量性の高い定量 PCR を用いて検証した。その結果、アポトーシスや細胞周期に関与しており、pre-miR-664a 導入により発現変動した mRNA として、5 つの遺伝子を同定した。現在、これらの mRNA がアポトーシスに関与しているのか検証している。

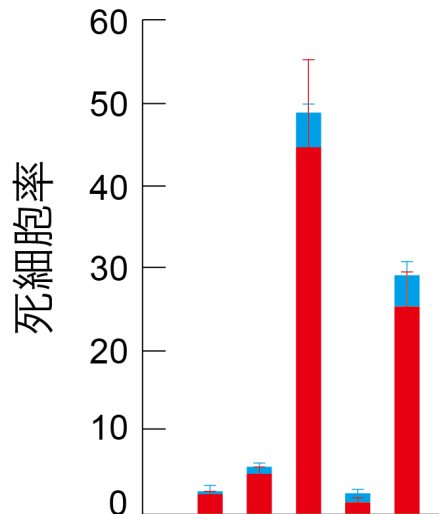
(2) 光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームを用いた光依存的なアポトーシス誘導

光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームを調製後、光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームの粒径およびゼータ電位を測定した。その結果、粒径は約 30 nm、ゼータ電位は約 10

mV であった。粒径が 10-200 nm 程度のナノ粒子は、enhanced permeability retention effect (EPR 効果)で腫瘍への蓄積が起こりやすくなることが報告されている。また、ナノ粒子が正電荷の場合、細胞への取り込み効率が高まることが知られている。光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームは 200 nm 以下で正電荷のため、EPR 効果を介して腫瘍に蓄積し、細胞へ取り込まれやすいと考えられる。

次に、光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームによるアポトーシス誘導効率を検証した。光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームに含まれる光増感剤 (青) は、光照射により活性酸素を生成するため、光照射により一定のアポトーシス誘導が起こると考えている。そこで、光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームに加えて、非標的 pre-miRNA である pre-miR-control を担持した光増感剤 (青) @pre-miR-control@ラクトソームの調製も行なった。

光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームは光照射がない時にはほとんど細胞死が誘導されないが、光照射により大きく細胞死誘導効率が上昇した (図 2)。光増感剤 (青) @pre-miR-control@ラクトソームの場合、光照射がない時には光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームと同様に細胞死がほとんど誘導されなかった。一方、光照射することで細胞死が誘導されたが、光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームよりも細胞死誘導効率が低かった。このことから、光増感剤 (青) だけで細胞死を誘導することができるが、pre-miR-664a を担持することでさらに細胞死誘導効率が上がる、つまり pre-miR-664a による相乗効果が示された。



光	-	-	+	-	+
pre-miR-664a	-	+	+	-	-
pre-miR-control	-	-	-	+	+
-pre-miRNA	+	-	-	-	-

図 2 光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームによる細胞死誘導
赤色はアポトーシス検出試薬で染色された細胞、水色は細胞死検出試薬で染色された細胞

(3) 光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームを用いた光依存的なアポトーシス誘導

光増感剤 (青) @pre-miR-664a@ラクトソームで用いる青色の励起光は、生体組織透過性が低いことが問題となっている。そのため、生体組織透過性が高い近赤外光を用いたナノ粒子の開発が行われている。我々も、近赤外光により励起される光増感剤 (近) をラクトソームに担持した光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームの調製を試みた。その結果、光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームおよび光増感剤 (近) @pre-miR-control@ラクトソームの調製に成功した。次に、光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームの粒径、ゼータ電位を測定したところ、粒径は約 40 nm、ゼータ電位は約 20 mV であった。このことから、光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームは EPR 効果を介して腫瘍に蓄積し、細胞へ取り込まれやすいと考えられる。

光増感剤 (近) は、近赤外光照射により発熱し、43°C 以上になることで細胞死を誘導することが報告されている。そこで、光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームが、近赤外光のエネルギー依存的に発熱するのか検証した (図 3)。その結果、ラクトソームがない場合、温度上昇は起こらなかった。また、光増感剤 (近) を担持していないラクトソームを用いた場合、わずかに温度上昇が起こっていた。一方、光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームは近赤外光のエネルギーに依存して発熱しており、10 度以上温度上昇が起こっていた。このことから、近赤外光照射により光増感剤 (近) が発熱することで細胞死を誘導することが期待された。

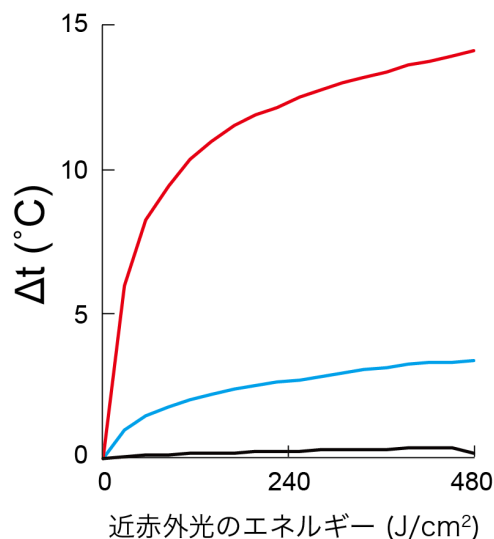


図 3 光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソームによる温度上昇
赤色：光増感剤 (近) @pre-miR-664a@ラクトソーム、水色：pre-miR-664a@ラクトソーム、黒色：ラクトソームなし

次に、光増感剤（近）@pre-miR-664a@ラクトソームによるアポトーシス誘導効率を検証した。図3より、近赤外光照射により光増感剤（近）が発熱するため、一定のアポトーシス誘導が起こると考えられた。そこでまず、光増感剤（近）@pre-miR-control@ラクトソームが細胞死を誘導するのか検証したところ、約40%の細胞死誘導効率であった。これは光増感剤（近）が発熱することで細胞死が誘導されたと考えられる。一方、光増感剤（近）@pre-miR-664a@ラクトソームは約90%の高い細胞死誘導効率であった。このことから、光増感剤（近）だけで細胞死を誘導することができるが、pre-miR-664aを担持することで高い細胞死誘導効率を示す、つまり pre-miR-664aによる相乗効果が示された。

以上より、*in vitro* で光依存的に高いアポトーシス誘導効率を示す光増感剤（近）@pre-miR-664a@ラクトソームの開発に成功した。しかしながら、初期目的である *in vivo* での光依存的なアポトーシス誘導を検証することができていないため、今後の課題となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hakim Taufik F N, Watanabe Kazunori, Fujimoto Shomu, Kitamatsu Mizuki, Ohtsuki Takashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Self-assembly of Peptide Amphiphiles with Alkyl Groups for siRNA Delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 815～818
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.230302	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 Ikawa Yuka, Wakai Takuya, Funahashi Hiroaki, Soe Tet Htut, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Photo-dependent cytosolic delivery of shRNA into a single blastomere in a mouse embryo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-40361-9	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 該当する
1. 著者名 Thu Myat, Yanai Kouta, Shigeto Hajime, Yamamura Shohei, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 148
2. 論文標題 FRET probe for detecting two mutations in one <i>EGFR</i> mRNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2626～2632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3AN00554B	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 Sumi Nanako, Nagahiro Shota, Nakata Eiji, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Ultrasound-dependent RNAi using TatU1A-rose bengal conjugate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128767～128767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2022.128767	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 Bando Akinari、Watanabe Kazunori、Ohtsuki Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Photochemical internalizationに基づく光依存的細胞質内RNA導入法の副作用低減	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine	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) 10.2530/jslsm.jslsm-44_0004	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 Tabara Kentaro、Watanabe Kazunori、Shigeto Hajime、Yamamura Shohei、Kishi Takamasa、Kitamatsu Mizuki、Ohtsuki Takashi	4. 巻 51
2. 論文標題 Fluorophore-PNA-Quencher/Quencher-DNA probe for miRNA detection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128359 ~ 128359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128359	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 Watanabe Kazunori、Nawachi Tomoko、Okutani Ruriko、Ohtsuki Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Photocontrolled apoptosis induction using precursor miR-664a and an RNA carrier-conjugated with photosensitizer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94249-7	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 -

1. 著者名 Watanabe Kazunori、Ohtsuki Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Inhibition of HSF1 and SAFB Granule Formation Enhances Apoptosis Induced by Heat Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4982 ~ 4982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094982	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 -

1. 著者名 Lim Melissa Siaw Han, Nishiyama Yuki, Ohtsuki Takashi, Watanabe Kazunori, Kobuchi Hirotsugu, Kobayashi Kazuko, Matsuura Eiji	4. 巻 110
2. 論文標題 Lactosome-Conjugated siRNA Nanoparticles for Photo-Enhanced Gene Silencing in Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2021.01.026	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 Zhou Shengli, Watanabe Kazunori, Koide Seiichiro, Kitamatsu Mizuki, Ohtsuki Takashi	4. 巻 36
2. 論文標題 Minimization of apoptosis-inducing CPP-Bim peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127811 ~ 127811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127811	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

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前本隼玖、渡邊和則、位高啓史、大槻高史
2. 発表標題 光増感剤と核酸キャリアの併用による光依存的mRNAデリバリー法
3. 学会等名 第45回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taufik F.N. Hakim, Kazunori Watanabe, Mizuki Kitamatsu, Takashi Ohtsuki
2. 発表標題 Development and Characterization of Novel Peptide Amphiphiles for siRNA Delivery
3. 学会等名 第七回日本核酸医薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 周聖力、今井律子、三木裕紀子、近藤杏菜、中川大、河合憲康、堤内要、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 腫瘍特異的ペプチドを用いた磁気温熱療法に向けた薬剤送達法の開発
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷優治、大槻高史、渡邊和則
2. 発表標題 温熱依存的に形成されるSAFB顆粒形成に関与するカルシウムイオンシグナル伝達機構解明
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊和則、小笠原悠人、大槻高史
2. 発表標題 HSF1の液-液相分離機構と翻訳後修飾との関係性について
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊和則、岩城香菜子、篠原里菜、安田奈緒、甲斐健太郎、大槻高史
2. 発表標題 熱ストレスに依存した開始tRNA分解に関与するXrn1, Xrn2活性化機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉原桃香, 大槻高史, 渡邊和則
2. 発表標題 腫瘍特異性の付加とアポトーシス誘導効率を向上させた光温熱剤の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本麻衣, 大槻高史, 松浦栄次, 渡邊和則
2. 発表標題 pre-miR-664a搭載ラクトソームを用いた光依存的なアポトーシス誘導法の開発
3. 学会等名 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中七星, 渡邊和則, 小淵浩嗣, 久保貴紀, 松浦栄次, 大槻高史
2. 発表標題 効率的なsiRNAの光依存的細胞内送達能を持つ生分解性ナノキャリアの開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井川優風, 若井拓哉, 舟橋弘晃, 渡邊和則, 大槻高史
2. 発表標題 哺乳動物における初期胚発生の光制御法の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本理恵、梅本裕介、長房すすか、高橋昭久、井尻憲一、大槻高史、渡邊和則
2. 発表標題 温熱による開始tRNA分解と細胞周期依存的な翻訳抑制の関係性について
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 HSF1、SASFB顆粒形成の抑制は温熱によるアポトーシスを増強する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東晃成、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 PCI法の副作用を減らす試み
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東晃成、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 光化学的内在化法の副作用の低減
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Tabara, Kazunori Watanabe, Hajime Shigeto, Shohei Yamamura, Takamasa Kishi, Mizuki Kitamatsu, Takashi Ohtsuki
2. 発表標題 Fluorophore-PNA-Quencher/Quencher-DNA probe for RNA detection
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田陸、平川和貴、島田尚鷹、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 RNA分解を検出する蛍光寿命プローブ
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角菜々子、渡邊和則、阿部由佳、北松瑞生、大槻高史
2. 発表標題 細胞内への物質輸送のためPCI分子素子の開発
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原健太郎、大槻高史、渡邊和則、北松瑞生、重藤元、山村昌平、岸高稚
2. 発表標題 miRNA検出のための新規PNA/DNAプローブの設計開発
3. 学会等名 日本化学会中四国支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林達哉、中山真伍、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 細胞内還元環境下でCPPが離脱するCPP融合タンパク質の開発
3. 学会等名 日本化学会中四国支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 的野 恭平, 井上 歩実, 岡田 真実, 山本 理紗子, 大槻 高史, 渡邊 和則
2. 発表標題 温熱依存的なSAFB顆粒形成はmTORC1が関与している
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊和則、縄稚朋子、奥谷瑠璃子、大槻高史
2. 発表標題 pre-miR-664aとPCDR法を組み合わせた光依存的なアポトーシス誘導法
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原健太郎、渡邊和則、重藤元、山村昌平、岸高稚、北松瑞生、大槻高史
2. 発表標題 miRNA検出のための新規PNA/DNAプローブの設計開発
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 周聖力、渡邊和則、小出誠一朗、北松瑞生、大槻高史
2. 発表標題 アポトーシス誘導性CPP-Bimペプチドの最小化
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊和則、的野恭平、大槻高史
2. 発表標題 相分離を介した核内ストレス顆粒の形成は温熱抵抗性に関与している
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会（招待講演）
4. 発表年 2021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

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