

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19909

研究課題名（和文）核酸抗体と量子ドットから挑む脳DDS機能拡張型ナノ医薬の創製と見える化

研究課題名（英文）Development of visualized nano-DDS agents targeting brain by RNA aptamers and quantum dots

研究代表者

高橋 理貴（Takahashi, Masaki）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：00549529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳薬剤送達（脳DDS）を実現するアプタマー分子の創製と蛍光分子標識によるその視覚的評価法の確立に取り組んだ。その結果、脳へのDDS戦略実現の有力標的であるトランスフェリン受容体やインスリン受容体に対するアプタマー分子の創出に成功したことから、標識する蛍光物質（Alexaや量子ドット）について検証した後、マウスに投与しin vivoイメージング装置で観察した。その結果、live imagingでは頭部での蛍光検出は困難であったが、脳組織切片では蛍光が観察できたことから、合目的なアプタマーが創製できたこと、live imagingには更なる工夫が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、安全性や特異性が高い核酸医薬「RNAアプタマー」を用いて、社会的な創薬ニーズの高い薬剤を脳へ送達する分子創製やその評価技術構築に取り組んだ。その中で、残念ながら蛍光物質を活かしたin vivoイメージングは修飾分子合成の課題などで目標を達成することができなかったが、その一方で、創製したアプタマーが脳組織に移行していることを示すデータを得ることができた。従って、薬剤脳送達に必要な輸送体となるアプタマーが得られており、今後さらなる検証により、創薬領域で需要の高い安全かつ効果的な脳DDS技術の実現に一步近づけたものと考えている。

研究成果の概要（英文）：We worked on the generation of aptamer molecules for brain drug delivery (brain DDS) and the establishment of a method for their visual evaluation by employing fluorescent molecular labelling. We consequently succeeded in generating aptamer molecules targeting the transferrin receptors (TfR) and insulin receptors (IR), which are promising targets for the brain-DDS strategy, and then verifying the fluorescent substances (Alexa and quantum dots) to be labelled, they were administered to mice and observed using in vivo imaging equipment. As a result, it was difficult to detect fluorescence in the head in live imaging, but fluorescence could be observed in brain tissue sections, indicating that intended aptamers could be created and that further work is needed for establishing live imaging technologies.

研究分野：核酸創薬科学

キーワード：アプタマー 薬剤送達 脳

## 1. 研究開始当初の背景

神経疾患に対する医薬開発は、高齢化社会においてニーズが高まり続ける一方、開発研究は盛んでありながらも社会実装・医薬品化は停滞している。その要因として、疾患関連分子を阻害・分解する治療分子の開発に比べ、それらを患部である脳へ送達する薬剤送達技術(DDS)の開発研究が進んでいない事があげられる。これまでに治療分子として、加齢性や遺伝性の病因遺伝子をノックダウンするようなアンチセンスや siRNA などの核酸分子が革新的医薬として高い期待を持って数多く開発され、多数の論文報告や特許技術が創出されてきた。新たな医薬品として期待される一方、それらを安全かつ効率的に脳へ到達させる血液脳関門 (BBB) 透過技術の開発は停滞している状況にある。これまで脳 DDS 実現のために、ウイルスや脂質粒子などを使用したキャリア介在性輸送 (Carrier-mediated transcytosis, CMT)、脳関門に存在する受容体を介した受容体介在性輸送 (Receptor-mediated transcytosis, RMT)、プラス電荷を利用・付与した接着介在性輸送 (Adsorptive-mediated transcytosis, AMT)などを利用した技術開発が登場してきている。近年、脂質ナノ粒子による CMT を基盤に、MRI と脳の特定位位に集束超音波を照射し任意の選択的脳部位へ薬剤を輸送する新たな複合的 DDS 技術も開発されている。また実用化・実績の点では、RMT を基盤とした脳 DDS 医薬 (IZCARGO, JCR Pharmaceuticals 社、ムコ多糖症 II 型に対する承認薬)は上市実績があり、RMT を狙った DDS 戦略は重要かつ現実的であることを印象付けた。さらには CMT や RMT の両者に着目した技術 (抗トランスフェリン受容体が付加されたリポソーム)についても開発が進んでいる。このように技術戦略の多様化が進む一方、副作用や安全性、効率などが課題となり開発分子や技術が使用できるケースは限定的であり、種々の医薬を脳へ送達する技術や分子のプラットフォーム化には至っていない。これまでの経験や技術を基盤として、安全性や効率、実現可能性が高い開発戦略の構築によって、汎用性の高い脳 DDS 分子の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、安全性と実現可能性を両立した新規の汎用的脳 DDS 分子を開発するため、これまでに実績のある RMT に基づく脳 DDS 戦略の利活用とリスク (副作用) の最小化を、RMT 標的受容体に対する核酸抗体「RNA アプタマー」の創製によってその実現を目指す。具体的にはトランスフェリン受容体 (Transferrin receptor; TfR)、インスリン受容体 (Insulin receptor; IR)に対する高親和性アプタマーを、蓄積性や免疫原性の極めて低い安全な DDS 分子として開発し、その有効性を *in vivo* で検証することを目的とする。また次世代蛍光分子量子ドットの活用による *in vivo* 視覚化手法の向上を目指した評価実験、核酸医薬を仮想送達分子として用いる有効性評価によって新規脳 DDS 戦略の構築への挑戦を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1) アプタマーのスクリーニング (SELEX 法)の実施 :

RMT に基づく DDS の有力標的となる受容体「TfR」と「IR」のリコンビナントタンパク質を標的としたアプタマーのスクリーニング SELEX 法を実施した。ハイスループットシーケンサーとバイオインフォマティクス (FASTAptamer 等)によって、標的タンパク質に結合していると思われる候補配列の解読と絞り込みをおこなった。

### 3-2) アプタマー結合活性評価と最適化:

表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance; SPR) によってアプタマーと各受容体 (TfR, IR) との相互作用を速度論的に解析した。この際に、アプタマーと標的受容体との結合のみならず、各受容体の内在性リガンドとの結合阻害性を確認することで、可能な限

り内在性リガンド/受容体の生理機能に影響を与えぬようリガンド阻害活性の無いもしくは低いアプタマーを選別した。結合アッセイはアプタマーをセンサーチップに固相化し受容体のリコンビナントタンパク質をアナライトとする評価系、内在性リガンドに対する競合性アッセイはセンサーチップに内在性リガンド(トランスフェリン、インスリン)を固相化し受容体とアプタマーの混和溶液をアナライトとする評価系を確立し実施した。

各受容体に結合し、内在性リガンドとの相互作用に干渉しない(し難い)アプタマーについては、結合に関与するコアシーケンスを絞り込み短鎖化する等、配列の最適化を実施した。

### 3-3) 蛍光標識アプタマーの合成:

短鎖化したアプタマーに対して量子ドット(Qdot)の末端標識を行った(Qdot™705 ITC™ Carboxyl Quantum Dots)。量子ドットは受託合成サービスがないため、市販の標識キットを購入し標識した。標識法としては、3'末端にアミノ基修飾を施したアプタマーを受託化学合成で入手し、アミノカップリングを介し量子ドットを付加することとした。また比較対照として、従来の汎用的蛍光分子である Alexa670 を末端標識したアプタマーを核酸合成会社にて受託合成し入手した。

### 3-4) in vivo 評価:

蛍光標識アプタマーをマウスに投与し in vivo イメージング装置による評価を行った。具体的には、標識アプタマー (10 mg/kg b.w) をヌードマウスに腹腔内投与し3時間後に IVIS imaging system により in vivo ライブイメージングに供した。その後、各種主要臓器を採材し、各臓器を同装置にてイメージングを行った。

## 4. 研究成果

### 4-1) アプタマーのスクリーニング (SELEX 法) の実施:

TfR と IR のリコンビナントタンパク質をそれぞれビーズに固相化し、SELEX 法を実施した。結合候補分子の配列はハイスループットシーケンサーで解読(100万リード程度)の後、バイオインフォマティクス in silico 解析によって候補分子を絞り込んだ。in silico 解析は FASTAptamer を用いて、6塩基違いの配列を同一クラスターとして、クラスター内でリード数最頻値の配列を各クラスターの代表配列として各受容体に対して10種以上選出した。

### 4-2) アプタマー結合活性評価:

それら配列を SPR 解析にてリコンビナント TfR と IR に対する相互作用を確認した結果、それぞれ強く結合する分子を複数同定することができた。それらの中から各受容体に対して結合活性が高く配列的特徴が異なる分子を数種絞り込み、最適化(短鎖化)を実施した。最適化アプタマーに対しても応用に SPR 解析にて結合活性および内在性リガンドとの競合性を評価した。その結果、TfR に対しては、全長約80塩基の長さから約40塩基前後まで結合活性を失わないコアシーケンスを同定することができ、親和性の指標となり乖離定数 KD 値は約100PM と極めて高かった。また内在性リガンドと受容体との結合に対して、本アプタマーは干渉しなかった。しかし、動物種間の交差性においてはマウスのリコンビナントタンパク質 (rmTfR) には結合せずヒト (rhTfR) 特異的に結合することが明らかとなった。

IR に対しては、全長約80塩基の長さから約30塩基前後まで結合活性を失わないコアシーケンスを同定することができ、親和性の指標となり乖離定数 KD 値は約0.2 pM と極めて高い数値であった。内在性リガンドと受容体との結合に対して、本アプタマーは高濃度処理時(受容体の2倍濃度)に約3-4割ほど競合阻害することが分かった。動物種間の交差性についてはヒト (rhIR) に加え、マウスのリコンビナントタンパク質(rmIR)とも rhIR と同程度に強く結合することが分かった。これらの結果を受け、以降の実験は、IR に対して同定し最適化を行い、マウス交差性がある抗 IR アプタマーを用いて実施することとした。

### 4-3) 蛍光標識アプタマーの合成:

上記の抗 IR アプタマーに対して蛍光標識を行った。Alexa670 標識については核酸合成時

に末端付加したため 1 対 1 対応で付加した分子を合成・入手した。量子ドットについてはアミノ基を末端修飾した抗 IR アプタマーを化学合成し、これに対して蛍光標識を行った (Qdot™ 705 ITKTM Carboxyl Quantum Dots)。その結果、量子ドットの標識効率が 50%程度であり、そこから未反応を除去のため限外濾過カラムで用いて精製した結果、量子ドット標識核酸は元の 10 分の 1 程度の量となった。In vivo 投与を定期的に行うには現実的ではないと考え、量子ドット標識と精製に関してはオリゴ核酸合成会社と協議し、受託合成を行っていただけるよう調整することとした。この結果を踏まえ、以下の in vivo 実験は Alexa670 標識分子での評価系に的を絞る方向で軌道修正し実験を行った。

#### 4-4) in vivo 評価:

Alexa670 標識した抗 IR アプタマーをヌードマウスに投与(10mg/kg bw, i.p) し、3 時間後に IVIS imaging system にてライブイメージングを行った。その結果、腹部の肝臓や腎臓で高輝度な蛍光が確認されたが、頭部では明確な蛍光は確認できなかった。そのため、脳に加え腹部の主要臓器を採材し、ペトリディッシュに並べ同装置で観察した結果、腹腔内臓器のみならず脳組織においても蛍光が観察できた。更に未固定脳組織をプレインスライサーにて切片化し、同様に観察した結果、脳組織全体に蛍光シグナルが確認できた (図 1)。

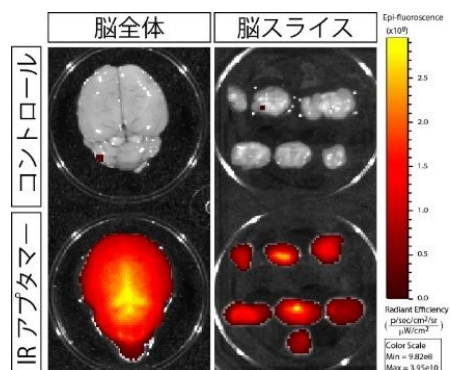


図 1 . IVIS imaging system を用いた脳組織蛍光イメージ

以上のことから我々が開発した抗 IR アプタマーが脳組織へ移行している可能性は期待でき、今後の詳細な解析によって神経細胞へ分子が移行しているか検証していきたい。また、予定していた核酸医薬を仮想送達薬物として実験については、量子ドットの標識や精製、受託合成の可能性を探る活動により実施に至らなかった。その一方で、本研究の根幹となる TfR と IR に対するアプタマーの探索研究と最適化、特徴づけを充実させ in vivo 評価を行うに値するアプタマー分子の造り込みに注力する方針に切り替え、これに成功したため、今後も引き続き開発アプタマー (抗ヒト TfR アプタマー、抗ヒト/マウス IR アプタマー) の知財確保と脳 DDS 戦略の有効性評価を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takahashi Masaki, Hashimoto Yoshifumi, Nakamura Yoshikazu	4. 巻 29
2. 論文標題 Anti-TGF- 1 aptamer enhances therapeutic effect of tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, on non-small cell lung cancer in xenograft model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 969 ~ 978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2022.06.001	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 後藤寛、天野亮、一ノ瀬顕子、道下瑛陽、浜田道昭、中村義一、高橋理貴
2. 発表標題 チクングニアウイルス中和RNAアプタマー作用機序解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野亮、道下 瑛陽、中野 涼太、一ノ瀬顕子、芳賀 和美、Meng Ling Moi、浜田道昭、中村義一、高橋理貴
2. 発表標題 VLP-SELEXとin silico解析によるデングウイルス中和アプタマーの創製と有効性評価
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Amano, Akiya Michishita, Ryota Nakano, Akiko Ichinose, Kazumi Haga, Meng Ling Moi, Michiaki Hamada, Yoshikazu Nakamura, Masaki Takahashi
2. 発表標題 Generation of an RNA aptamer neutralizing dengue viruses by SELEX method targeting virus-like particles and advanced in silico analyses
3. 学会等名 第50回国際核酸化学シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤寛、天野亮、浜田道昭、中村義一、高橋理貴
2. 発表標題 チクングニアウイルス侵入抑制RNAアプタマー性状解析
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Takahashi, Ryo Amano, Kaku Goto, Akiya Michishita, Akiko Ichinose, Kazumi Haga, Meng Ling Moi, Michiaki Hamada, Yoshikazu Nakamura
2. 発表標題 Generation of virus-neutralizing aptamers by VLP-SELEX
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Takahashi, Ryo Amano, Kaku Goto, Akiya Michishita, Akiko Ichinose, Kazumi Haga, Meng Ling Moi, Michiaki Hamada, Yoshikazu Nakamura
2. 発表標題 VLP-SELEX generates virus-neutralizing aptamers
3. 学会等名 第8回日本核酸医薬学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルスセロタイプ9に対するアプタマー及びその使用	発明者 高橋理貴、天野亮、 中村義一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-040542	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 フラビウイルスに対するアプタマー及びその使用	発明者 高橋理貴、天野亮、 モイメンリン、浜田 道昭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-054689	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------