

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282148

研究課題名(和文) ナノ薬物送達法と核酸医薬を組み合わせた虚血障害の改善を目指す低侵襲性治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel non-invasive therapy for siRNA-induced vasculogenesis using sonoporation techniques, nano-size drug delivery systems

研究代表者

寺本 憲功 (Teramoto, Noriyoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40294912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：我が国の急速な超高齢化と国民生活の欧米化に伴い、相まって発症する生活習慣病を克服することは極めて重要である。その生活習慣病の一つである動脈硬化症が主原因で下肢の血管が狭窄したり、また閉塞して起きる血流障害(閉塞性動脈硬化症・バージャー病等)、それに伴う歩行障害に対してこれまで主に侵襲性の高い治療(ステント等)や外科手術(バイパス手術等)が実施されてきた。本研究ではナノ Drug Delivery Systemsと核酸医薬品を組み合わせ、筋肉内に新生血管を誘導し、側副血行路を形成することで血流障害を克服することを目的とし、この血管新生誘導機序を明らかにし、血管新生に向けた技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Due to an aging population and the increasingly westernized diet of Japanese people, it will be essential to combat the increasing incidence of associated lifestyle-related diseases such as atherosclerosis and type 2 diabetes. For example, it is well known that atherosclerosis produces narrowing of blood vessels in the leg, which may lead to severe symptoms including gangrene. For the medical treatment of impeded blood flow (e.g. arteriosclerosis obliterans, Buerger's disease) both drug treatment and/or invasive surgical interventions (stenting, bypass graft surgery, etc.) are required. Therefore, the aim of the present research project is to establish a novel non-invasive therapy for siRNA-induced vasculogenesis by the use of nano-size drug delivery systems, which is designed to stimulate the collateral circulation in compromised tissues. This technique will also be applicable in organ transplant and regenerative medicine.

研究分野：人間医工学

キーワード：医用システム 低侵襲治療システム 血管新生学 核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNAi : RNA interference) とは約 22 塩基対程度から成る二本鎖 RNA (センス鎖およびアンチセンス鎖による small interfering RNA : siRNA) にて配列特異的に mRNA を分解し、特定遺伝子の発現が選択的に抑制される“ノックダウン”現象である。ヒトゲノムの全塩基配列が明らかとなった現在、塩基配列相補的に作用する siRNA は、ほぼ全ての特定されている遺伝子に対して設計可能で、さらにその標的遺伝子の発現抑制効果は、他の核酸医薬品 (デコイ、アンチセンス、miRNA 等) と比較し、約 10 万倍と高く、そのため siRNA は今後、医薬品への技術転用が強く待ち望まれている。

しかし 今後、siRNA を臨床応用する場合、

### [1] off-target 効果の低減

どのようにして off-target 効果 (siRNA の配列の一部が、部分的に相同性 (ホモロジー) を有する標的遺伝子以外の遺伝子発現を抑制してしまう交差反応) を低減させることが可能なのか、

### [2] 法的規制のクリア

いかに技術使用に伴う占有特許等の法的制限および法的レギュレーションを克服するのか、

### [3] 低侵襲的薬物送達システムの確立

どのような薬物送達法 (Drug Delivery System : DDS) を用いて有効量の siRNA を局所へ送達させることが可能なのか、等が、今後、直ちに克服および解決すべき重要な課題である。

我々は、これまでにナノバブルに超音波を照射し、生じた緩衝波にて外来物質 (薬物、遺伝子ベクターおよび核酸 等) を宿主細胞内へ無侵襲的に導入する、ソノポレーション法 (音響穿孔法) と呼ばれる新規 DDS 技法を確立した。また我々は、バイオベンチャーや試薬会社と共に開発した血管新生を誘導する siRNA を用いることで、上記の [1] および [2] の課題を克服することが可能ではないかと考えた。さらにソノポレーション法と最新アルゴリズムによる siRNA 技術とを組み合わせることでこれまでに無いまったく新しい低侵襲的な末梢血流障害の治療法を確立することが可能であると考えた (課題 [3] の克服に向けて)。

これまで国内外において これまで 『ソノ

ポレーション法』と『核酸医薬 siRNA』を組み合わせた研究報告はほとんど無い。

近年、転写因子である低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor : HIF) のサブタイプの一つ、HIF-2 $\alpha$  の新たな制御因子として Int6 が同定された。Int6 はマウス乳がん発症ウイルスの標的遺伝子産物として発がんや血管新生に重要な役割を果たし、HIF-2 $\alpha$  と結合してプロテアソームによる分解を誘導する。一方、Int6 が存在しない場合には HIF-2 $\alpha$  は、局所の酸素濃度とは無関係に hypoxia-related element (HRE : 低酸素関連因子) に対して特異的に作用し、Angiopoetin 1、VEGF、bFGF 等の血管新生関連因子群の転写促進を誘導し、微小血管が新生される (Chen *et al.*, 2007)。すなわち、Int6 は正常血管新生のマスタースイッチの一つであり、Int6 を特異的にノックダウンする siRNA を投与することで Int6 の発現レベルを著しく低減させ、その結果、主に HIF-2 $\alpha$  が HRE に作用することで最終的には血管新生関連因子の転写促進を引き起こすことで新生血管を誘導・産生することが可能ではないかと考えた。

また生活習慣病および喫煙習慣等に起因し、近年、国内で増加している末梢血管の狭窄や閉塞を伴い、間歇性跛行を有する末梢動脈疾患および未だ原因不明の血栓性閉塞性動脈炎 (ビュルガー病) の新たな治療法の確立が急務であると考えられる。現在、既に同疾患に対してステントによる侵襲的血管内治療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療が臨床では行われているが、より簡便かつコンベンショナルな新規治療法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は『血管新生に深く関与する低酸素誘導因子 (HIF-2 $\alpha$  : Hypoxia-Induced Factor-2 $\alpha$ ) を特異的に抑制する制御因子 (Int6)』を siRNA の分子標的とし、これまでに無い全く新しい設計理論に基づいて作成された核酸医薬、『新型 siRNA』を作成することを第一の研究目的とした。次に『新型 siRNA』を本『ハイブリッド型ナノバブル』中に封入し、『ソノポレーション法』にて健常マウスの下肢前脛骨筋に対して低侵襲的に導入し、標的分子である『Int6』のノック

ダウン効果を遺伝子レベルで経時的に観察することを第二の研究目的とした。さらに虚血下肢マウスを作成し、その虚血病態が完成後、虚血下肢筋組織に対して低侵襲的に siRNA 導入し、下肢の機能的回復を指標として新規 siRNA の薬理学的作用を観察することを第三の研究目的とした。

### 3. 研究の方法

まず微小血管を新生・誘導する siRNA をハイブリッド型ナノバブル中に内包させ、体液中でも本 siRNA が分解され難いハイブリッド型ナノバブルを開発・作成した。次に最も効果的に siRNA の導入効率を得るため、LaminA/C タンパク質の発現抑制作用を有する siRNA をハイブリッド型ナノバブル中に内包させ、遺伝子レベルでその発現状態を real-time PCR 法にて検証した（コントロール実験）。さらに微小血管を新生・誘導する siRNA を 3 種類、設計・作成した。これらの siRNA をソノポレーション法にて低侵襲的に健常マウス下肢筋組織内へ導入し（単独もしくは混合状態で）、血管新生誘導因子および Int6 の発現レベルについて経時的に遺伝子レベルにて real-time PCR 法を用い、検証を行った。さらに下肢虚血モデルマウスの作成を行った。

### 4. 研究成果

本研究にて下記的主要な成果が得られた。

(1) ソノポレーション法を用い、下肢前脛骨筋に対して導入するハイブリッド型ナノバブルの開発・完成

キャビテーション気泡の動特性を解明するにはキャビテーション気泡の粒径分布と減衰特性スペクトルの情報が不可欠である。まず水槽実験から超音波照射後のナノバブルの粒径分布を粒度分布測定装置で測定し、次に気泡の音響減衰スペクトルをパルスレシーバーにて測定した。また破壊時の圧力情報を高周波帯域用ハイドロフォンで測定し、離散フーリエ変換（FFT）解析を行った。さらに粒径分布、音響減衰スペクトルおよび FFT 解析を基に Keller-Miksis の気泡モデルからキャビテーション気泡の動特性を求め、ハイブリッド型ナノバブルを開発・作成した。図 1 にその概略図を示した。

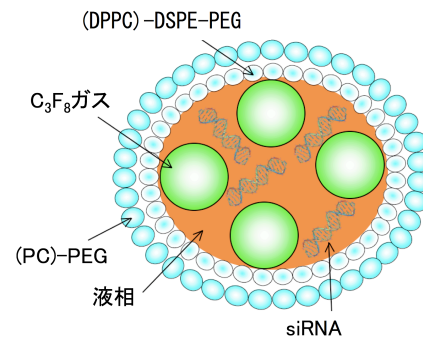


図1 ハイブリッド型ナノバブルの概略図

(2) LaminA/C タンパク質の発現抑制作用を有する siRNA を用いて本実験系のノックダウン効果の検証

siRNA 導入条件を設定するため、生体内にユビキタスに存在する LaminA/C タンパク質をコードする LaminA/C 遺伝子の特異的に抑制する siRNA を作成した。本 siRNA を『ハイブリッド型ナノバブル』中に封入し、『ソノポレーション法』にてマウス前脛骨筋に導入した。一定時間後（1、3、6、9、12、24、48および72時間後）に PBS のみの結果（コントロール）と比較し、前脛骨筋を摘出し、前脛骨筋における LaminA/C 遺伝子のノックダウン効果を real-time PCR 法にて遺伝子レベルで量的に解析した。その結果、投与後、24時間後において全ての濃度の siRNA 投与にて LaminA/C 遺伝子の発現が減弱しており、『ソノポレーション法』による siRNA 導入条件を決定した（図 2）。

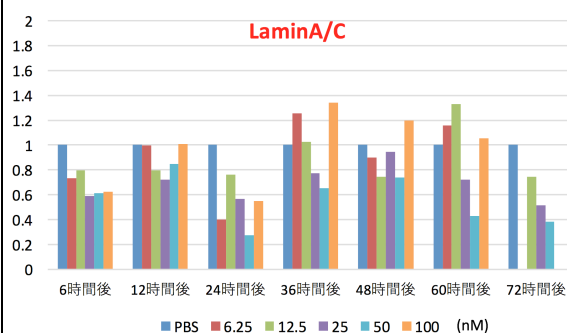
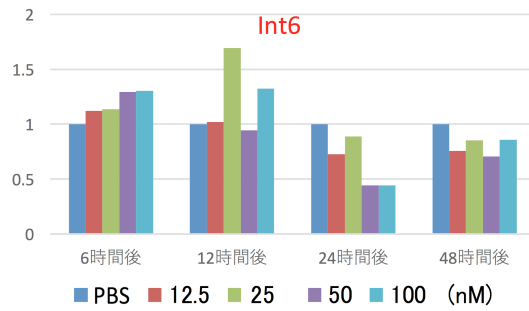


図2 LaminA/C 遺伝子発現の抑制効率

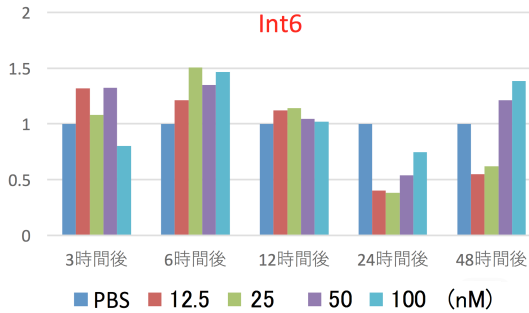
(3) 各 siRNA（#1、#2 および #3）単独投与による Int6 ノックダウン効果の検証

Int6 を特異的に抑制する 3 種類の siRNA（#1、#2 および #3）を合成・作成し、各々の siRNA をマウス前脛骨筋に単独導入後、Int6 の抑制効果を遺伝子レベルでの量的発現を計測した（図 3）。

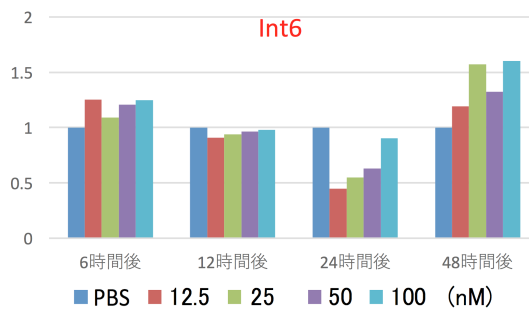
① #1 投与时



② #2 投与时



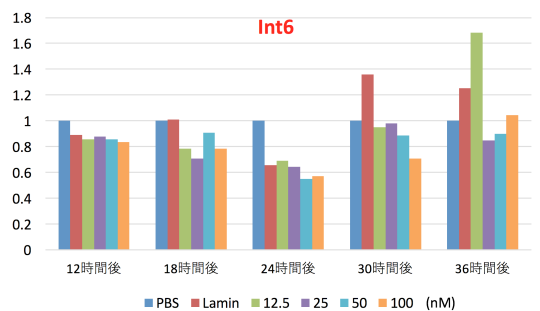
③ #3 投与时



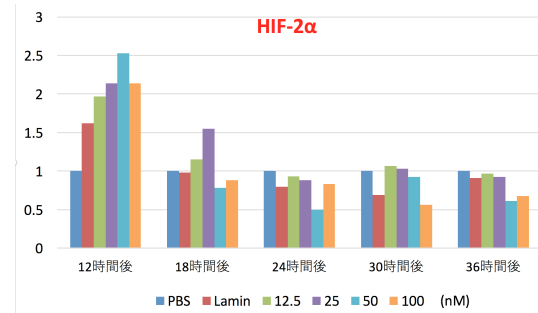
全ての種類の siRNA 投与後、24 時間後において Int6 の発現レベルは減弱していた。特に #2 の抑制効果が高かった。

(4) 3 種類の siRNA を混合した条件での Int6 ノックダウン効果の検証

3 種類の siRNA (#1、#2 および #3) を混合させ、3 種類の siRNA が共存した条件下で同様にマウス前脛骨筋に導入し、Int6 の抑制効果を遺伝子レベルでの量的発現の抑制率を計測した (図 4)。



また同様に HIF-2 $\alpha$  の抑制効果を遺伝子レベルでの量的発現の抑制率を計測した (図 5)。



3 種類の siRNA を 50 nM 投与时、24 時間後、HIF-2 $\alpha$  の発現率が約 50% に半減していた。

(5) 下肢虚血モデルマウスの作成

Kochi T *et al.* (2013) らの報告に基づき、下肢虚血モデルマウスを作成し、下肢虚血状態を作り出すことに成功した。

我々が提案しているソノポレーション法を用いた血管新生作用を有する siRNA 導入療法は既存の治療法に比べて

① 宿主に対して低侵襲性である点、② 宿主の免疫性に関わらず何度でも繰り返し投与可能である点、③ スtent のように留置禁忌部位が無い、④ 副作用がほとんど無い、という多くの優れた臨床的な特性を有すると考えられる。

さらに近年、臓器移植法が改正され、『臓器移植』という概念そのものも国民意識に深く浸透し、国民生活においても広く認知されるようになってきた。また『iPS 細胞を用いた様々な国家的規模の再生医学研究プロジェクト』も展開しており、自己細胞を利用した再生医療も臨床実用化段階まで進んできた。一方で『臓器移植』や『再生医療』も最終的には高度な侵襲性の高い外科的処置を伴い、患者に対してどれだけ外科的侵襲を軽減出来るかが、先駆的な医療技術の質が成功を左右する。我々が提案している本手法は微小血管の新生誘導にて栄養血行路が創成されるという観点から創傷治癒過程での大幅な治療期間の短縮が期待され、『臓器移植』および『再生医学』の外科的療法において極めて有効な補助的療法 (アジュバント療法) としても臨床医学へ技術転用が可能であり、国民に対して低侵襲的医療を提供する波及効果をもたらすと考えられる。今後、本研究内容・課題をさらに加速化させ、原著英文論文にまとめる計画である。

<引用文献>

- ① Chen L, Uchida K, Endler A, Shibasaki F, Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (17), 12707–12716.
  - ② Kochi T, Imai Y, Takeda A, Watanabe Y, Mori S, Tachi M, Kodama T, Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models. *PLoS One*, 2013, 8 (12), e84047.
5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕 (計 8 件)
- ① Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N, ZD0947, a sulphonylurea receptor modulator, detects functional sulphonylurea receptor subunits in murine vascular smooth muscle ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 800, 2017, 34–39. DOI:10.1016/j.ejphar.2017.02.023
  - ② Mori K, Yamashita Y, Teramoto N, ZD0947, a novel and potent ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener, on smooth muscle-type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 791, 2016, 773–779. DOI:10.1016/j.ejphar.2016.09.038
  - ③ Yamamoto T, Takahara K, Inai T, Node K, Teramoto N, Molecular analysis of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits expressed in mouse portal vein. *Vascular Pharmacology*, 査読有, 2015, 75, 29–39. DOI:10.1016/j.vph.2015.06.018
  - ④ Teramoto N, Yotsu-Yamashita M, Selective blocking effects of 4,9-anhydrotetrodotoxin, purified from a crude mixture of tetrodotoxin analogues, on Na<sub>v</sub>1.6 channels and its chemical aspects. *Marine Drugs*, 査読有, 2015, 13 (2), 984–995. DOI:10.3390/md13020984
  - ⑤ Nomura M, Zhu HL, Wang L, Hasuzawa N, Takayanagi R, Teramoto N, Activation of activin type IB receptor signals in pancreatic β cells leads to defective insulin secretion through the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2014, 450 (1), 440–446. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.141
  - ⑥ Sidaway P, Teramoto N, L-type Ca<sup>2+</sup> channel sparklets revealed by TIRF microscope in mouse urinary bladder smooth muscle. *PLoS One*, 査読有, 2014, 9 (4), e93803. DOI:10.1371/journal.pone.0093803
  - ⑦ Iwasa K, Zhu HL, Shibata A, Maehara Y, Teramoto N, Molecular analysis of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits expressed in mouse vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, 査読有, 171 (1), 2014, 145–157. DOI:10.1111/bph.12437
  - ⑧ Nomura M, Zhu HL, Wang L, Takayanagi R, Teramoto N, SMAD2 disruption in mouse pancreatic beta cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetologia*, 査読有, 57 (1), 2014, 157–166. DOI:10.1007/s00125-013-3062-2
- 〔学会発表〕 (計 8 件)
- ① Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N, Actions of ZD0947 on the activity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in murine vascular smooth muscles. 第90回日本薬理学会年会(長崎), *Journal of Pharmacological Sciences*, 2017, in press.
  - ② Yamamoto T, Uchida K, Inai T, Yotsu-Yamashita M, Teramoto N, Effects of 4,9-anhydrotTX on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels expressed in murine vas deferens myocytes. 第90回日本薬理学会年会(長崎), *Journal of Pharmacological Sciences*, 2017, in press.
  - ③ 寺本 憲功, 膵β細胞におけるATP感受性K<sup>+</sup>チャネル

の分子レベルでの新たな修飾機序.  
～K<sub>ATP</sub>チャネルに魅せられた20年～  
朝日生命成人病研究所分泌セミナー  
(東京), 2016.

- ④ Yamamoto T, Teramoto N,  
Molecular analysis of ATP-sensitive K<sup>+</sup>  
channel subunits expressed in mouse  
portal vein.  
第89回 日本薬理学会 年会 (横浜),  
Journal of Pharmacological Sciences,  
130 (3), 2016, Supplement S99, 1-0-15.
- ⑤ 山本 格士, 寺本 憲功,  
マウス門脈における血管平滑筋型 ATP 感  
受性 K<sup>+</sup>チャネルサブユニットの分子生物  
学的解析.  
第68回 日本薬理学会 西南部会 (下関),  
2015.
- ⑥ Teramoto N, Sidaway P,  
L-type Ca<sup>2+</sup> channel sparklets revealed  
by TIRF microscopy in mouse urinary  
bladder smooth muscle.  
第88回 日本薬理学会 年会 (名古屋),  
Journal of Pharmacological Sciences,  
128 (3), 2015, Supplement 03H-5-2.
- ⑦ 寺本 憲功, 野村 政壽,  
マウス膵 β 細胞においてアクチビン 1B  
受容体シグナル活性は ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャ  
ネルの減弱化を介してインスリン分泌を  
抑制する.  
第67回 日本薬理学会 西南部会 (北九州),  
2014.
- ⑧ 寺本 憲功,  
細胞内シグナル応答の可視化.  
第59回 日本口腔外科学会総会・学術大会  
(幕張), 2014.

[その他]

ホームページ 等

[http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top\\_Page.html](http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺本 憲功 (Teramoto Noriyoshi)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号: 40294912

### (2) 研究分担者

小玉 哲也 (Kodama Tetsuya)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号: 40271986

山本 格士 (Yamamoto Tadashi)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号: 80762187