

微弱電流薬物送達システムによる体内臓器への核酸医薬新規送達法

研究代表者

小暮健太郎 徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授

共同研究者

田中 保 徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授

福田達也 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教



1. 研究の背景と達成目標

微弱電流による非侵襲的皮内薬物送達法イオントフォoresis (IP) の体内臓器疾患治療への応用展開を目指して、培養細胞への siRNA 送達による標的遺伝子発現制御、さらに実験動物の肝臓等の体内臓器への siRNA の IP による特異的遺伝子の発現制御システムの確立を目指した。IP は、皮膚への微弱電流の印加により、イオン性分子を皮内に送達する技術であるが、従来親水性高分子（分子量 10,000 以上）には適用困難とされてきた。しかし、研究代表者は siRNA 等の高分子の IP に世界で初めて成功しており、微弱電流により皮膚細胞間隙が開裂し高分子が透過すること、さらに高分子が細胞に取り込まれ細胞質にまで到達することを世界で初めて発見している。この IP は、皮膚のみならず体内臓器に適用可能であろうと仮説を立て、肝臓等への IP 適用の可能性検証が本研究の狙いである。

本研究の達成目標は、①微弱電流によるマウス培養肝細胞中への siRNA 送達と RNAi 効果の検証、②マウス体内臓器への IP による siRNA 臓器内送達と特異的遺伝子の発現抑制の確認、③IP によるマウス病態体内臓器への治療用 siRNA 送達と疾患治療への展開である。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・微弱電流によって蛍光標識核酸が培養肝臓細胞中に導入されることを確認した。さらに、抗 ApoB siRNA を用い、微弱電流によって肝臓細胞中に送達し、標的遺伝子 mRNA 量を著しく減少させることに成功した。
- ・IP によって肝臓・腎臓・膵臓内への蛍光標識核酸の送達に成功した。また、siRNA の IP によって、各臓器における標的遺伝子の発現制御に成功した。
- ・肝線維症モデルに対する抗 HSP47 siRNA の IP、脂肪肝モデルに対する抗 Resistin siRNA の IP に成功し、各遺伝子の有意な発現抑制に成功した。

本成果は、これまで血液を介した投与のみが考えられてきた核酸医薬について、IP を駆使することで直接標的臓器細胞内に核酸医薬を投与できる可能性を示したことで、新しい疾患治療法を提案できたと考えている。すなわち、本成果によって治療の選択肢が増えることで、国民の医療福祉の向上に貢献できると期待される。また、微弱電流という物理刺激によって、生体の生理機能が変化することが明らかとなったことで、意図的に生理機能を制御する技術として微弱電流が有効であることが示された。

3. 研究成果

培養肝臓細胞 HepG2 に対して、蛍光標識核酸存在下で微弱電流処理 (0.34mA/cm²、15 分間) を行った結果、細胞内に核酸が導入されることを、共焦点レーザー顕微鏡観察によって確認した。さらに、肝臓細胞特有の遺伝子である ApoB に対する siRNA 存在下で HepG2 細胞を微弱電流処理した後、Real-time PCR 法によって mRNA 量を定量した結果、ApoB mRNA 量を著しく減少させることに成功した。さらに、蛍光標識核酸を用いた IP (0.34mA/cm²、1 時間) を当初計画の肝臓、および新たに腎臓と膵臓を対象として行った後、組織切片について共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、各臓器内に核酸が送達されていることを確認した (図 1 a)。肝臓は肝臓特異的遺伝子 ApoB、腎臓は慢性腎臓病に関与する遺伝子 Nox4、膵臓は膵臓の発生に必須の転写因子 PDX-1 を標的遺伝子として設定し、それに対する siRNA

を用いて各臓器の IP を実施した。IP 後に、各臓器の mRNA を回収し、Real-time PCR 法によって mRNA を定量した結果、すべての遺伝子において mRNA 量が減少しており、IP による体内臓器の遺伝子発現制御に成功した (図 1 b)。さらに、疾患モデルとして、四塩化炭素を投与することで肝繊維症を誘発したマウス肝臓および肥満モデルマウスの肝臓を用い、肝繊維症の発症に関与する遺伝子 HSP47 および脂肪肝発症に関与する遺伝子 Resistin を治療標的遺伝子として設定し、それぞれに対する siRNA を用いて疾患モデル肝臓の IP を実施した。その結果、HSP47 遺伝子および Resistin 遺伝子の発現量を有意に抑制することに成功した。しかしながら、肝線維症等の疾患モデルに対する治療用 siRNA の IP 投与による治療効果も検討したが、十分な効果を得るに至っていない。その原因として、単回投与による治療対象遺伝子の一過的な抑制では不十分であると考え、現在引き続き投与回数等の条件の最適化を続けている。これらの検討によって、治療効果も得られるのではないかと期待している。

4. 今後の展開

今後、治療用 siRNA を用いた本方法によるモデル疾患を対象とした検討を継続し、確実な治療効果が得たいと考えている。治療効果が得られた後、腹腔鏡の専門医等に相談することで、ヒトへの応用に繋がるよう展開したいと考えている。また、本研究成果は、従来物理的機構によると思われていた IP が組織・細胞生理機能を変化させること、さらには皮膚にしか適用できないと思われていた IP が、新規の医薬品投与技術として体内臓器にも適用できる可能性を示したことにより、新たな治療法や研究領域の提案に繋がると期待している。

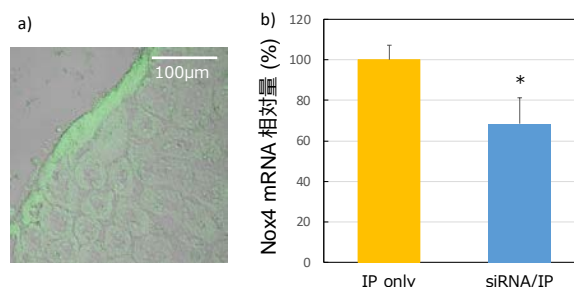


図 1. IP による核酸医薬の腎臓組織内送達
a) 蛍光標識核酸の腎臓組織内分布、b) siRNA の IP による Nox4 遺伝子 mRNA 量の抑制

5. 発表実績

[学会発表]

- ・小暮健太郎、他. 微弱電流誘導性エンドサイトーシスによる siRNA の細胞内送達と肝細胞遺伝子発現制御. 日本核酸医薬学会第 3 回年会 (札幌, 2017).
- ・賀川真夕子、他. 微弱電流処理による siRNA の細胞内送達と肝細胞遺伝子発現制御. 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (徳島, 2017).
- ・賀川真夕子、他. イオントフォレシスによる肝臓への核酸医薬送達. 日本薬学会 138 年会 (金沢, 2018).
- ・虎尾 祐、他. 微弱電流による特殊なエンドサイトーシスを介した体内臓器細胞への高分子送達. 日本膜学会 40 年会 (東京, 2018).
- ・田中太智、他. 腎臓疾患治療を目指したイオントフォレシスによる核酸医薬の腎臓内送達. 日本薬剤学会第 33 年会 (静岡, 2018).
- ・小暮健太郎、他. 微弱電流処理による体内臓器細胞への siRNA の送達. 日本核酸医薬学会第 4 回年会 (博多, 2018).
- ・森日向子、他. 膵臓疾患治療を目指した微弱電流による核酸医薬の膵臓内送達. 第 18 回遺伝子・デリバリー研究会第 18 回夏期セミナー (小倉, 2018).
- ・Mori H, 他. Delivery of nucleic acid medicines into pancreas by faint electricity for treatment of pancreatic diseases. 18th Symposium for Gene・Design and Delivery. (Kitakyusyu, Japan, 2018).

[学術講演]

- ・小暮健太郎、他. 微弱電流による核酸医薬の細胞内送達. 第 26 回 DDS カンファランス (静岡, 2017).
- ・小暮健太郎、他. 循環血流を介さない体内臓器への薬物送達. 日本薬学会第 139 年会 (千葉, 2019). (招待講演)

※本研究成果について、現在論文準備中