

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	血管新生を誘導する siRNA とナノ薬物送達法による革新的な低侵襲性治療法の創成
研究機関・部局・職名	佐賀大学・医学部・教授
氏名	寺本 憲功

**【研究目的】**

本プログラム研究は『血管新生に深く関与する転写因子 (HIF-2 $\alpha$ ) を特異的に抑制する制御因子 (Int6)』を標的とした『siRNA』を『ハイブリッド型ナノバブル』中に封入し、『音響穿孔法 (ソノポレーション法)』を用いて虚血下肢筋組織に対して低侵襲的に siRNA 導入を行い、微小血管を局所的に新生・誘導させ、その結果、新たに形成された副側血行路にて末梢血流障害の改善を目指す、画期的な低侵襲性治療法の創成を目的としている。siRNA を臨床応用する場合、① 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を有する標的遺伝子以外の遺伝子発現を抑制する交差反応) を低減させるか、② いかにしてその技術使用に伴う占有特許等の法的制限 (実施権・特許権・ライセンス等) を克服するのか、③ どのような Drug Delivery System (DDS: 薬物送達システム) 手法 を用いて siRNA を局所へ送達させるか、等が今後、解決すべき課題である。

本研究の特色は 1) 血管新生に深く関与する転写因子 (HIF-2 $\alpha$ ) を特異的に抑制する制御因子 (Int6) を標的とした RNA/DNA キメラ型 siRNA を用いる点、2) 体液中のエンドヌクレアーゼにて本 siRNA が分解されぬようにハイブリッド型ナノバブル中に封入する点、3) ソノポレーション法にて低侵襲的に下肢虚血筋肉組織内に導入させる点、4) 虚血病態モデルラットを用いて本キメラ型 siRNA による血管新生の誘導効果を明らかにし、同時に歩行障害が改善されたか否かについて動物運動試験にて解明する点である。

**【総合評価】**

<input type="checkbox"/>	特に優れた成果が得られている
<input type="checkbox"/>	優れた成果が得られている
<input type="radio"/>	一定の成果が得られている
<input type="checkbox"/>	十分な成果が得られていない

**【所見】**

① 総合所見

当初の目的の一部が達成された。

本研究課題は HIF2a を抑制する int6 を抑制標的に選んだ点、DDS の点でナノバブ

ル（エンドヌクレアーゼによる分解防ぐ）、ソノポレーション法（低侵襲に transfection）を利用している点が特徴である。また実臨床で患者 QOL を大きく低下させる動脈閉塞性疾患に注目した点も評価できる。本研究課題では、血管誘導分子の同定や、ソノポレーション法による細胞内導入法の条件設定等に時間を要したが、これまでに血管新生誘導因子を誘導する siRNA をスクリーニングして、実際にその siRNA の血管新生に対する有効性を動物実験で確認している。しかし、本研究課題で最も重要な点は、生体の虚血環境での siRNA の有効性である。その点虚血動物モデルへの投与はまだ行われていないため、今後その効果を評価する必要がある。臨床的にさらに重要な点は、虚血環境での siRNA による血管新生が、実際に機能に及ぼす影響を明らかにすることである。これは、行動実験で評価する予定となっているが、これらの虚血環境下での siRNA の効果に関しては、本研究課題では未だ解析が行われなかった。現時点で siRNA 配列の決定、in vivo での transfection 手技を確立している点は評価できるが、治療モデルでの有用性間で結びついていない。

研究実施体制は十分な研究員が募集できなかった点が問題であろう。マネジメントはおおむね適切であり、助成金の執行状況は問題ない。

## ② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

( 全て達成された ・  一部達成された ・  達成されなかった)

平成 2 2 年度および 2 3 年度はソノポレーション法で用いるハイブリッド型ナノバブルの調整を行い、本研究で用いるハイブリッド型ナノバブルの条件設定を完了した（東北大学大学院 医工学研究科と共同）。平成 2 3 年度および 2 4 年度は血管新生作用を有すると考えられる核酸配列を有する数多くの siRNA を設計・作製し（ボナック社と共同）、その中から分子生物学的手法（RT-PCR 法、ウエスタンブロット法等）にてラット骨格筋培養細胞を用い、ソノポレーション法で低侵襲性導入し、特に血管新生作用が強い siRNA 配列を細胞レベルにて確認・決定した。具体的には Int6 を特異的にノックダウンし、血管新生誘導因子（VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor、PDGF: Platelet-Derived Growth Factor 等）を誘導する siRNA をスクリーニングし、最大効果を有する siRNA 候補を数種類、選定した（*in vitro* 系でのスクリーニング過程の完了）。また平成 2 4 年度は研究者らが強力な血管新生効果を有すると確認した核酸配列の数種類の siRNA をラット初代培養骨格筋細胞に低侵襲性に細胞内導入し、分子生物学的手法（RT-PCR 法、ウエスタンブロット法等）を用いて再評価し、Int6 のノックダウン効果、またそれに伴う血管新生誘導因子（VEGF:、PDGF 等）の誘導性が最も強力であると確認された siRNA の候補を最終的に 1 つに絞り、動物実験に移行した。*in vivo* 動物実験の移行に伴い、ソノポレーション法の諸条件（超音波の出力量、候補周波数、超音波の照射時間、ナノバブルと核酸との混合比率等）を決定するため、GFP 遺伝子をソノポレーション法にて健常ラットの下肢筋肉（骨格筋）組織に導入し、その GFP 発光量および GFP タンパク質量を評価基準とし、動物実験での予備的条件設定を行い、最終的にその基準値を決定した。また同時にルシフェラーゼを搭載したベクターをマウスにソノポレーション法にて下肢筋肉（骨格筋）組

織に低侵襲性に導入し、その後、2日後、4日後の各々の日にルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェリン発光を計測した。ルシフェリン発光量を目安にソノポレーション法による導入効率、実験条件設定の適正化を行った。その実験条件下で健常ラットの前頸骨筋（骨格筋組織）に対し、本 siRNA をソノポレーション法にて導入すると① 血管新生誘導因子（VEGF、PDGF）の誘導性が遺伝子およびタンパク質レベルで明らかとなった。また② 血管造影法にて健常ラット下肢に新生血管の形成が確認された。さらに③ レーザー光によるアルタイム血流画像化装置にて本 siRNA をソノポレーション法にて細胞内導入した領域の血流動態が上昇していることも明らかとなった。すなわち、健常ラットの下肢筋肉（骨格筋）組織において細胞レベルと同様に Int6 のノックダウン効果にて血管新生作用を有することが、細胞レベル（*in vitro*系）同様、動物個体レベル（*in vivo*系実験）でも示唆された。一方、動物個体間で血管新生の有効性のばらつきが大きかったため、全ての実験系の実験条件（ナノバブルの品質、C3F8 ガスの効率、超音波プローブの音響効果等）を再確認した。また現在、従来の siRNA を脱塩精製後、さらに HPLC 精製を行い精製の手間をかけ、純度の高い siRNA を再作成し、その効果については未だ検討の段階である。

### ③ 研究の成果

- ・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が（ある ・ ない）
- ・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が（創出された ・ 創出されなかった）
- ・当初の目的の他に得られた成果が（ある ・ ない）

血管新生に関与する転写因子を特異的に反応する制御因子を標的とした siRNA を、医工学研究科との共同研究により開発し、それをソノコーポレーション法により組織内に導入して、新生微小血管を誘導しようとする一連のアプローチに関しては先進性がある。本研究成果の先進性は、‘次世代の医薬品’と近年、着目されている核酸医薬である siRNA を用い、低侵襲性ナノ薬物送達法である音響穿孔法にて骨格筋組織内に導入し、Int6 遺伝子をノックダウンさせ、骨格筋において新生微小血管を誘導すると考えられる血管新生遺伝子を活発化させ、微小血管を誘導させたことである。

また本研究の優位性は、（1）血管新生に深く関与する転写因子（HIF-2 $\alpha$ ）と特異的に反応する制御因子（Int6）を標的とした siRNA を用い、（2）本 siRNA が体液中のエンドヌクレアーゼで分解されぬようにハイブリッド・ナノバブルを作成し、ソノポレーション法にて低侵襲的に下肢筋肉組織内に導入させ血管新生の誘導効果を明らかにした点である。

さらに、本 siRNA は独自のアルゴリズムによって開発された新規の核酸配列であるため、今後、占有特許取得へ向け、準備がされている。

**④ 研究成果の効果**

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
( 見込まれる ・ 見込まれない )

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
( 見込まれる ・ 見込まれない )

in vivo でのマイクロバルブ、ソノポレーションを用いた in vivo での治療モデルを確立することは、今後の RNA 創薬の分野進展に寄与することが期待できる。血管閉塞性疾患は近年増加しており、健常組織の血流を改善させる新規治療法の開発は実臨床において切望されている。本研究では血管新生を促進することにより虚血に対する治療を目的としているが、一方、血管新生が促進されることにより栄養血行路も確保される可能性があり、創傷治癒に影響を与える可能性が考えられる。従って、創傷治癒が重要となる様々な外科的治療（再生医療など）に対しても本研究結果は影響を与える可能性がある。生活習慣病は患者の生活の質に重大な影響を与えるのみではなく、国の医療費にも多大な影響を与えており、現在の社会的な問題ともなっている。生活習慣病の中には動脈硬化症や末梢閉塞性動脈疾患などが含まれるが、現在、これらの疾患に対しては有効な治療法が確立していない。本研究課題により、これらの生活習慣病に対する有効な治療法が確立されれば、罹患数の多い生活習慣病に対する新規治療法として非常に重要な役割を果たすことになる。

**⑤ 研究実施マネジメントの状況**

・適切なマネジメントが ( 行われた ・ 行われなかった )

おおむね適切にマネジメントされている。

ただ、研究員の採用は計画どおりに進んでいない。

研究課題の成果として論文 6 件、全国学会、会議等で発表 23 件がある。知的財産の取得はないが、本研究腕の siRNA は独自のアルゴリズムによって開発された新規の核酸配列であるため、今後、占有特許出願が期待される。新聞・一般雑誌の掲載は 5 件ある。

医療関係者、学生に対して siRNA を用いた核酸創薬に関する研究成果を発表して毎年数件の実績がある。