

《様式B》

研究テーマ	「Cold tumor に集積する核酸ナノメディシンの開発」		
研究責任者	所属機関名	愛知工業大学 工学部 応用化学科	
	官職又は役職	講師	
	氏名	宮本 寛子	メールアドレス n-miyamoto@aitech.ac.jp
共同研究者	所属機関名	岐阜医療科学大学	
	官職又は役職	助教	
	氏名	小縣 綾	

(令和4年度募集) 第35回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は免疫細胞の介入(とりわけキラーT細胞)が乏しい“Cold Tumor”では薬効が得られないことが大きな課題である。放射線療法やアジュバントによって免疫細胞の活性化による“Hot Tumor”への改変が検討されているが副作用や医療費の負担が懸念される。申請者は免疫細胞の介在に関わらずがん細胞死を誘導する腫瘍抑制型マイクロ RNA-143(miR-143)の核酸医薬の開発に着目している。miR-143は、がんの悪性に関与するRASとそのネットワークを多角的に抑制することでアポトーシスを誘導する。しかし、核酸医薬は腫瘍組織へ集積させる有用なドラッグデリバリーシステム(DDS)の欠如が実用化の大きな課題である。従来用いられる脂質ナノ粒子(LNP)は投与量の90%が肝臓へ集積し腫瘍への集積は1%未満が現状であることから腫瘍集積は困難とされる。

申請者は、miR-143を化学修飾することで核酸のみでナノ粒子(RION)を形成する技術を開発した。核酸が自己組織化するRIONの特徴は、分子を核酸自動合成機にて合成でき、自己組織化に関しては核酸が塩基対を形成しかつ骨格の電荷の相互作用によって核酸の電荷が打ち消されて自己集合し(内側が核酸で外側に構造分散分子が位置する)、一方で、環境のpH変化に伴い自己集合が解消されることで核酸医薬をリリースすることである。さらにRIONは肝臓への集積は低く腫瘍へ高く集積する特徴を有する。しかしなぜRIONは腫瘍集積を向上したかそのメカニズムは明らかになっていない。

本研究では腫瘍集積の向上を目指して腫瘍集積メカニズムを検討した。血中内での安定性は、物性解析から検討した。Exvivoイメージングよりマウスの尾静脈投与

後 1 時間にて RION は腫瘍に集積することを見出した。本成果は未だ困難とされる核酸医薬による癌治療の戦略の確立を前進し LNP の問題点を克服した DDS 技術の創出が期待される。

本研究に関連する基本知財は 2021 年時点に出願済み⁽¹⁾で産業技術としての実用化の可能性はある。知財に関する周辺技術の知財出願については 2 件^{(2),(3)}行っており実用化を視野に入れた展開を実施している。

[知財一覧]

(1)

発明の名称：人工核酸、およびそれを用いた核酸の送達方法

出願番号：特願 2021-075651、特願 2022-026023

国際出願番号：PCT/JP2022/019343

発明者：宮本 寛子

出願人：国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

出願日：2021 年 04 月 28 日、出願国：米国・欧州・中国・オーストラリア・日本、状況：公開

(2)

発明の名称：薬物送達組成物

出願番号：特願 2023-82728

発明者：宮本 寛子・赤尾幸博・北出幸夫

出願人：国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

出願日：2023 年 5 月 19 日、出願国：日本、状況：出願

(3)

発明の名称：核酸送達用構造体、核酸送達用構造体の製造方法、及び医薬

出願番号：特願 2024-68941

発明者：宮本 寛子

出願人：国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

出願日：2024 年 4 月 22 日、出願国：日本、状況：出願

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

過去 40 年間、腫瘍集積のためのナノ粒子の開発は Enhanced permeability and retention(EPR)効果におけるナノ粒子の透過性と集積の向上のために、主に内皮細胞間の隙間を通過するのに適したナノ粒子のサイズ(10-100 nm)の設計が重要とされている。腫瘍集積を指向した多くの研究においてナノ粒子のサイズを制御が検討されたが、ナノ粒子の集積は投与量1%未満が限界であった。そのようななか、2020年に Chan らは、ナノ粒子のサイズに加え投与個数の投与量閾値($TTN > 10^{12}$)が腫瘍集積に重要であることを提案している。

これまでの RION の構造解析からは、粒子径が直径 70 nm で -4.44mV の表面電荷であることが明らかになっている。本結果は、会合体の表面はオリゴ PEG 鎖が配置することを示唆している。クライオ TEM での測定を実施し、条件検討の末、球状のナノ粒子像の取得に成功した (図 1)。

蛍光修飾 RION をマウスの尾静脈に投与後、経時的に血液を回収し血清中の蛍光量を測定し半減期から血清耐性 $t_{1/2}$ を評価した (図 2)。比較対象は天然の核酸の 2 本鎖からなる Naked とした。その結果、RION の $t_{1/2}$ は 6 時間であることが算出された。Naked の半減期は 0.4 時間であったことから、RION は Naked の約 15 倍高い血中安定性であることが明らかとなった。

肝臓集積には、血清内のタンパクによるナノ粒子の表面修飾が知られている。特に、肝臓集積性の高い脂質ナノ粒子 (LNP) は、脂質運搬タンパク質の ApoE と相互作用し、肝臓上に発現する受容体 (LDLR) の認識が報告されている。したがっ

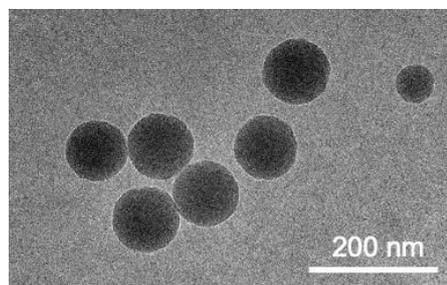


図 1. クライオ TEM 像

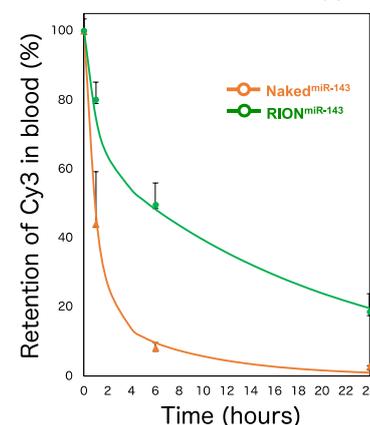


図 2. 血中滞留性

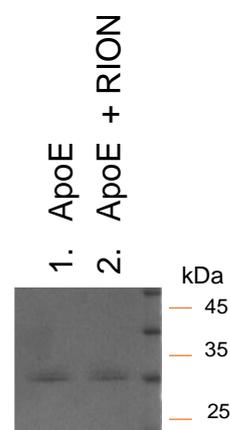


図 3. ApoE と RION の相互作用

て、RION の肝臓集積の低下は、ApoE との相互作用の低下による LDLR の認識能の低下を想定し、ApoE との相互作用を評価した (図 3)。リコンビナント ApoE タンパク質と RION をリン酸緩衝液 (pH 7.4) の 37°C でインキュベートした後、ApoE のタンパク量を非還元 SDS-PAGE にて評価した。その結果、RION とインキュベート後も ApoE の量は変化がなかった。したがって、肝臓への集積性の低さは、RION と ApoE の相互作用は弱く、LDLR を介した取り込みがないこと、また、表面電荷が負であることが、タンパク質との特異的な吸着を軽減したと考察する。

免疫細胞からの認識は、免疫原性や血中滞留性の律速となることが懸念されるため、免疫細胞からの認識の有無を評価した (図 4)。

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に Cy5 修飾 RION を添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。その結果、RAW264.7 細胞株には Cy5 に由来する蛍光は観察されなかった。一方で、がん細胞株では Cy5 に由来する蛍光が観察された。したがって、RION は免疫細胞からの認識は回避するが、がん細胞には認識され、取り込まれることが明らかとなった。本結果は、血中滞留性の向上や免疫原性を誘導しない可能性を示唆しており、RION の安全性と機能性が見出された。

RION の会合状態を解析し会合数を算出した。その結果、RION 中の会合数は AS 鎖と S 鎖が 70 と 350 だった。担がんモデルマウスを用いて投与個数の投与量閾値 (TTN > 10¹²) 以上

の投与個数 (3.4 × 10¹⁶ 個/shot) における動態を観察した。その結果、マウス尾静脈より 1 時間後に腫瘍への集積が観察された (図 5 右 a)。DDS の実用化には生体に安全な材料であることが必須である。そこで、尾静脈投与後の血清を回収し肝毒性指標 (AST/ALT/ALP) を生化学的に評価した。その結果、コントロール (PBS) 1/1/1 に対して Onpatro-Like LNP は 4.6/1.8/1.3 で RION は 0.7/1/0.7 であった。LNP はいずれの数

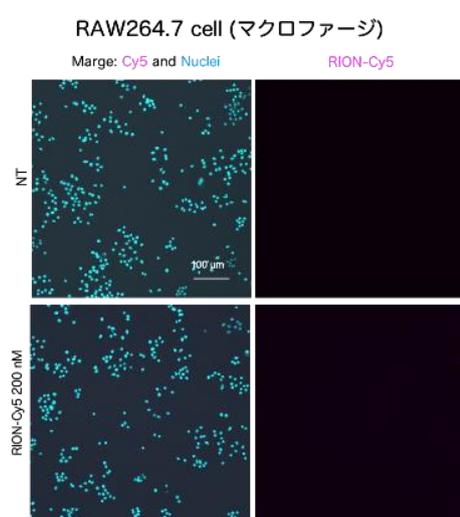


図 4. 免疫細胞認識

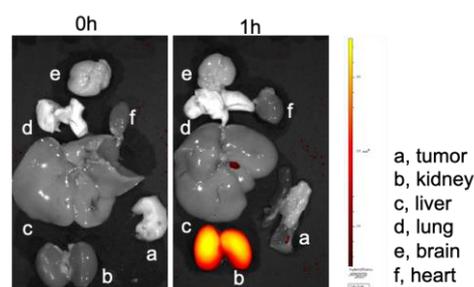


図 5. Ex vivo イメージング解析

値もコントロールを上回り肝毒性が誘導されることがわかった。一方で、RION はコントロールと同等かそれ以下の値であったことから肝毒性は誘導されず生体に安全な材料であることが明らかになった。

本研究では核酸医薬が未だ困難とする腫瘍集積に関して新規 DDS 技術の RION を用いて検討した。新たな指標である TTN に着目し腫瘍集積を観察したところ閾値以上の投与個数で腫瘍集積が観察された。本成果は今後の核酸医薬による癌治療の戦略に関して重要な知見を得た。本助成による支援に深く感謝する。

[受賞]

2023 年度 日本化学会東海支部奨励賞、 公益社団法人日本化学会東海支部、2023 年 8 月 24 日

[論文]

Miyamoto, N., Sugito, N., Kitade, Y., and, Akao, Y., Growth inhibition of RAS-mutated hematopoietic tumor cells using glucose-attached reversibly ionic oligonucleotide-based nanoparticles caging chemically modified microRNA143-3p. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2023, 88, 104902.

[学会発表]

1. 宮本 寛子、他、新規な送達技術 RION を用いた KRAS 変異血液がんにおける化学修飾 miR143#12 の機能解析、日本がん分子標的治療学会、2023 年 6 月 21 日-6 月 23 日、ポスター発表
2. **Miyamoto Noriko**, Matsuno H., Nanoparticle RION; Best Solution for Tumor Targeting Delivery of RNA Medicines, *CRS2023*, Las Vegas (US), July 24-28, 2023, Poster presentation.
3. **Miyamoto Noriko**, Kitade Yukio, Anti-tumor nucleic acid delivery to the tumor site by RION of nucleic acid nanoparticle, *OTS2023*, Barcelona (SP), Oct. 24-28, 2023, Poster presentation
4. 宮本 寛子・北出 幸夫、自己組織化核酸ナノ粒子の創製による難治性がん治療への挑戦、第 54 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2023 年 11 月 12

日、口頭発表

5. **Miyamoto Noriko**, Kitade Yukio, Self-Assembly Sugar Derivative-Linked Nucleic Acid Nanoparticle for Nucleic Acid Medicine Delivery, *MRS2024*, Seattle (US), Apr. 22-27, 2024, Poster presentation

[講演]

宮本寛子, 腫瘍治療のための核酸医薬用 DDS ナノ粒子 RION の開発, CPHI2024, 東京ビックサイト, 2024年4月18日

(4 ページ/5 ページ)