

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20962

研究課題名(和文) mRNA導入による生体内アポトーシスシグナル制御とその虚血性疾患治療への展開

研究課題名(英文) In vivo suppression of apoptosis signaling using mRNA therapeutics for the treatment of ischemic diseases

研究代表者

内田 智士(Uchida, Satoshi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教

研究者番号：20710726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性疾患に対して、生存促進因子の遺伝子導入は優れた戦略であり、mRNA医薬は安全性の観点で有望な方法論である。mRNAは投与後、生体内で速やかに酵素分解を受けるが、我々は生体適合性高分子ミセルに内包することでこの課題を克服した。そこで、下肢虚血性疾患のモデルマウスに対して、高分子ミセルを用いて生存促進因子であるmyr-Aktを導入したところ、有意な下肢血流改善効果を認めた。mRNA医薬を用いた生存促進因子導入は虚血性疾患だけでなく、細胞死の亢進が原因となる様々な疾患に対して有望である。

研究成果の概要(英文)：Introduction of pro-survival gene is an attractive strategy for treatment of ischemic diseases, and mRNA therapeutics is a safe and promising methodology for this purpose. While mRNA is subjected to nuclease degradation soon after in vivo delivery, we successfully solved this issue by encapsulating mRNA into biocompatible polyplex micelles. Then, we attempted treatment of hind limb ischemia by delivering mRNA encoding myr-Akt, a pro-survival factor, using polyplex micelles. The treatment resulted in significant recovery of blood flow in mouse hind limb. The mRNA-based pro-survival factor introduction is a promising strategy for the treatment of various diseases accompanying enhanced cell death, including ischemic diseases.

研究分野：遺伝子治療、薬物送達システム

キーワード：mRNA医薬 高分子ミセル 遺伝子治療 アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスの亢進は、虚血性疾患、神経変性疾患をはじめとした数多くの難治性疾患に関与している。抗アポトーシス因子の導入はこれらの疾患に対して有力な戦略となるが、タンパク質の形での投与は、一過的な効果しか得られないほか、技術面や経済的コストの観点からも課題は多い。これに対して、目的の因子を遺伝子の形で導入することで、経済的に安価な手法で持続的な作用が得られることが期待される。従来の遺伝子治療では主に DNA の導入が検討されてきた。しかし、この場合、導入した DNA が偶発的に宿主細胞のゲノムへ挿入される危険性がある。抗アポトーシス因子をコードする DNA を導入する場合、ゲノム挿入された DNA が過剰発現すると、その細胞をがん化させる可能性があり、その臨床応用は現実的ではない。そこで、このような危険性のないメッセンジャー(m)RNAの形での抗アポトーシス因子の導入を着想した。

一方で、mRNA は生体内で速やかな酵素分解を受けるほか、強い免疫原性を有するため、その *in vivo* 導入は困難とされてきた。これに対して、我々は生体適合性ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)で覆われた高分子ナノミセルに mRNA を内包させることで、これらの問題の回避に成功している(図 1, *PLoS One* 2013, 8: e56220)。さらに、*in vivo* 局所投与において、他のポリマーや脂質を用いた mRNA キャリアと比べて、ナノミセルは、安全性、mRNA 導入効率に関して格段に優れた機能を示している。そこで、このナノミセルを用いて抗アポトーシス因子 mRNA を導入することで、難治性疾患の治療を目指した。

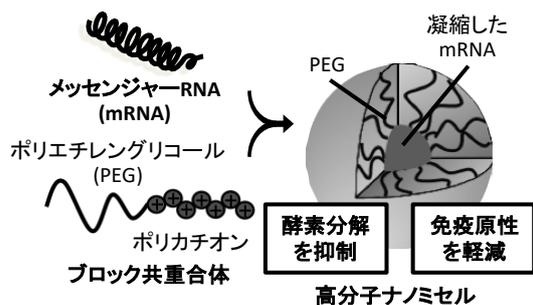


図1 高分子ナノミセル PEG とポリカチオンからなるブロック共重合体と mRNA を混合することで、表面に PEG、中心部分に mRNA を持つ高分子ナノミセルが調製される。

### 2. 研究の目的

以上のような背景に基づいて、本研究では、抗アポトーシス因子 mRNA 搭載ナノミセルを用いた下肢の虚血性疾患治療を目的とした。本疾患はしばしば糖尿病や高血圧といった生活習慣病が原因となり、疼痛、潰瘍、壊疽といった症状のため、生活の質(QOL)が大きく低下する。一方で、既存の治療法では十分な効果が得られず、新たな治療法が求めら

れている。また、本研究で優れた成果が得られた場合、脳梗塞や心筋梗塞といったその他の難治性疾患への展開も可能である。

本研究では、まず、静水圧の上昇を利用した核酸導入手法であるハイドロダイナミクス法を用いた mRNA の下肢への導入を検討した(図 2)。まず、この手法を用いた際の下肢への mRNA 導入効率を最大にするために、ナノミセル設計の最適化を行った。続いて、最適化されたナノミセルに、抗アポトーシス因子 mRNA を搭載して、下肢虚血モデルマウスに対する治療に取り組んだ。

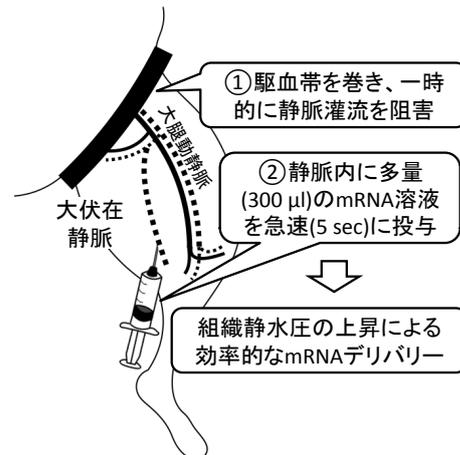


図 2 ハイドロダイナミクス法による下肢への mRNA 導入

ここでは、抗アポトーシス因子として Akt の恒常活性変異体である *myr-akt* を用いた。Akt は抗アポトーシスシグナルを活性化するだけでなく、mTOR シグナルの活性化をはじめとした複合的な作用が期待された。

また、ハイドロダイナミクス法はやや侵襲的な手法であり、将来の臨床応用を目指す上で、より低侵襲な静脈内からの全身投与による治療が望まれる。そこで、全身投与型のナノミセル設計に関しても、研究を開始した。

### 3. 研究の方法

#### (1) mRNA の調製

mRNA はプラスミド DNA (pDNA) の鋳型より、Ambion 社製 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit を用いて *in vitro* 転写により調製した。鋳型として、T7 プロモータ下に、タンパク質コード配列、さらに 120 bp の poly A/T 配列をもつ pDNA を用いることで、120 base の poly A 配列を持つ mRNA を調製した(*Sci Rep.* 2015, 5:15810 参照)。

#### (2) 高分子ナノミセルの調製

PEG と生分解性ポリカチオン (poly[N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamid], PAsp(DET)) からなるブロック共重合体と、mRNA を +/- 電荷比 4 で混合することでナノミセルを調製した。調製したナノミセルの粒径は、動的光散乱法にて 50

nm 程度であった。

(3) レポーター試験による高分子ナノミセル構造の最適化

ルシフェラーゼ(Luc)mRNA を用い、mRNA 投与後の下肢筋肉における Luc 発現量を指標にナノミセル調製条件の最適化を行った。mRNA 10  $\mu\text{g}$  を含むナノミセル溶液をハイドロダイナミクス法により投与し、その後の Luc 発現量を、生きたマウスより発光を観察できる装置(IVIS imaging system)により、経時的に観察した。

(4) 下肢虚血モデルマウスの作製、機能評価

下肢虚血モデルとして、大腿動静脈遠位と浅腹壁動静脈を結紮するモデル(図 3a)と大腿動静脈近位を結紮するモデル(図 3b)を作製した。虚血の程度は、超音波ドップラー法を用いて定量し、患側/健側の血流量比を指標として評価した。2 種類のモデルに関して、図 3b の方法で安定してより強い虚血が誘導できたことから、治療実験でもこの方法を用いた。

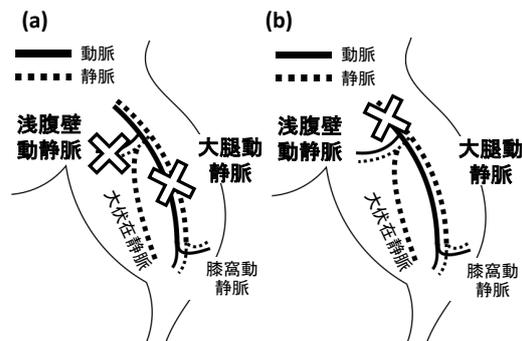


図 3 下肢虚血モデルマウスの作製

(5) 治療実験

myr-akt 発現 mRNA 10  $\mu\text{g}$  を含むナノミセル溶液をハイドロダイナミクス法により投与した。その 1 日後に血管の結紮を行い、その後経時的に虚血の評価を行った。

4. 研究成果

(1) ナノミセル調製条件の最適化

ルシフェラーゼ(Luc)mRNA を用い、mRNA 投与後の下肢筋肉における Luc 発現量を指標にナノミセル調製条件の最適化を行った。まず、分子量が 12k, 23k, 42k の PEG を持つナノミセルを調製し PEG 鎖長に関する検討を行った。すると、長鎖 PEG を用いた場合に高い発現が得られた。このメカニズムに関して、PEG 鎖を伸長することで、ヌクレアーゼの結合による mRNA 酵素分解や、他のアニオン分子の結合によるナノミセルの解離を防ぐ機能が向上したためであると想定された。以降 42k PEG のナノミセルを用いた。

続いて、ブロック共重合体と mRNA の混合比についても検討した。すると  $\pm$  比の増加に伴って、Luc 発現量も増加した。一方で、 $\pm$  比を増加することで、カチオン性ポリマー

に起因する組織傷害性も増加するため、以降  $\pm$  比 4 の組成のナノミセルを用いた。また、このナノミセルから得られる Luc 発現量は、mRNA 単体投与を行った場合や、市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンを用いた場合と比べ 10 倍以上高く、ナノミセルを用いることで *in vivo* 局所投与において優れた mRNA 導入効率を得られることが明らかとなった。

また、Luc 発現の持続性に関して、その発現量を経時的に観察することで評価した。すると、1 週間程度にわたって持続することが明らかとなった。この結果は、効果の持続性の観点で、mRNA 導入がタンパク質の直接投与と比べて優れた方法論であることを示唆している。

(2) 下肢虚血モデルマウスに対する治療実験

次に下肢虚血モデルマウスに対する治療実験を行った。myr-akt 発現 mRNA を投与した群と、バッファーを投与した群において、患側/健側の血流量比を指標として、虚血の程度を評価した。すると、いずれの群でも経時的な血流量の回復が観られたものの、myr-akt mRNA 投与群で、虚血 1 日後、7 日後においてより強い血流量の回復効果を確認した(図 4)。虚血後の様々な細胞種の細胞死が抑制された結果、血流量が維持されたものと想定された。

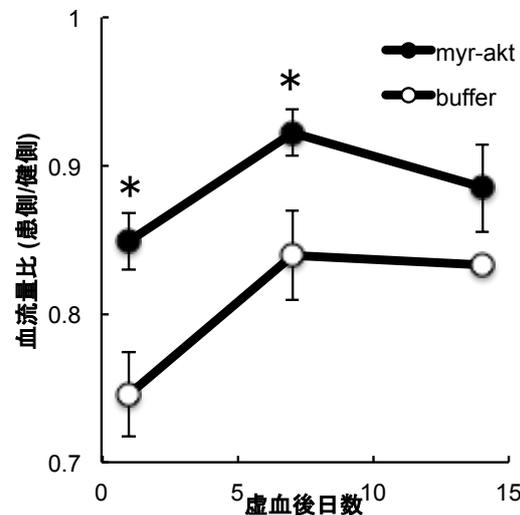


図 4 myr-akt mRNA 導入後の下肢血流量 超音波ドップラー法にて血流量を測定し、患側/健側の血流量比を示した。\*  $< 0.05$

(3) 全身投与型 mRNA 搭載ナノミセルの設計

以上のように抗アポトーシス因子 mRNA を用いることで、下肢虚血に対して治療効果が得られることが明らかとなったが、ここで用いたハイドロダイナミクス法はやや侵襲的な方法である。将来の臨床応用を目指す上では、より低侵襲な静脈内からの全身投与に

よる治療が望まれる。局所投与では投与したナノミセルは速やかに標的細胞に到達するが、全身投与の場合は、標的細胞に到達するまでの間、血液中での mRNA の酵素分解を防ぐ必要がある。したがって、全身投与では局所投与の場合と比べて、より安定な高分子ミセルを設計する必要がある。

そこで、全身投与型のナノミセル設計に関して以下 2 つの戦略で取り組んだ(図 5)。(戦略 1) ブロック共重合体のポリカチオン部分に関して、これまでポリアスパラギン酸側鎖にアミノエチレンが 2 回繰り返した構造を持つ PAsp(DET) を用いていたが、その繰り返し数が 3, 4 回のものも合わせて検討した。(戦略 2) ブロック共重合体の  $\omega$  末端にコレステロール(Chol)基を修飾することで、疎水性相互採用によりナノミセルコアを安定化させた。

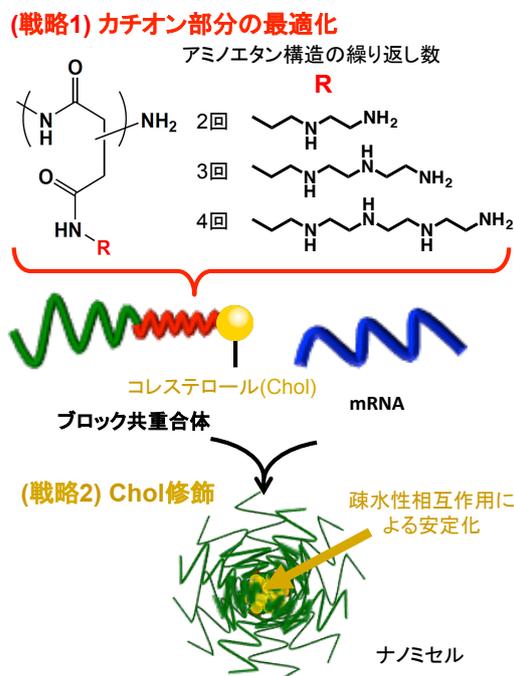


図 5 mRNA 全身投与のための高分子ナノミセルの安定化戦略

まず、血清中での酵素分解を定量 PCR 法にて検討したところ、カチオン部分に関して繰り返し数が 2 回のものとは比べて、3, 4 回のもので酵素耐性の向上を認めた。また、Chol 基修飾により酵素耐性はさらに向上した。次に、繰り返し数 4 回のものに関して、マウス尾静脈より投与し、2.5 分後の血液中での mRNA 残存量を調べたところ、Chol 基を修飾していないナノミセルでも、mRNA 単体と比べ 1,500 倍程度血中残存量が増加した(図 6)。さらに、Chol 基を修飾したものでは、未修飾の場合と比べて、3 倍以上 mRNA 残存量が向上した。このように全身投与においても、高い血中安定性を示すナノミセルの開発に成功した。なお、この mRNA 搭載ナノミセルを用いて、膵臓がん皮下移植モデルマウス

の治療にも成功したことから、本システムで疾患治療に十分な量のタンパク質発現が得られることが分かった(*Biomaterials* 2016, 82: 221-228)。これまで技術的に困難とされていた mRNA 全身投与による疾患治療に成功した世界に先駆けた報告である。

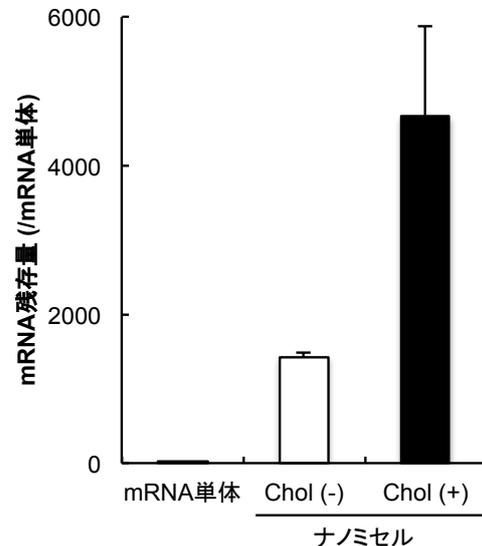


図 6 mRNA 全身投与後の血中滞留性 2.5 分後に血中に残存している mRNA 量を定量 PCR 法にて測定

今後は、このような全身投与型の mRNA 搭載ナノミセルを、下肢虚血をはじめとした虚血性疾患へと応用する予定である。虚血部位では組織傷害に伴い、血管透過性が亢進しているため、ナノ粒子が選択的に集積することが知られており、mRNA 搭載ナノミセルも患部へ集積することが期待される。さらに、ナノミセル表面に患部へ特異的に結合するリガンドを搭載することで、集積性をさらに向上できる可能性もある。

#### (4) 結論

本研究では、最適化されたナノミセルに抗アポトーシス因子 mRNA を搭載し、ハイドロダイナミクス法によりマウス下肢へ投与することで、下肢虚血疾患に対して治療効果を得ることに成功した。また、それと並行して、mRNA 全身投与型ナノミセルの開発にも成功したことから、今後、このシステムを下肢虚血疾患へと応用することで、より低侵襲な方法での治療が可能となり、将来の臨床応用へ展開できることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. **S. Uchida**, N. Yoshinaga, K. Yanagihara, E. Yuba, K. Kataoka, K. Itaka, Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly a sequences for effective vaccination. *Biomaterials* 150 162-170 (2018) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.033)
2. N. Yoshinaga, T. Ishii, M. Naito, T. Endo, **S. Uchida**, H. Cabral, K. Osada, K. Kataoka, Polyplex micelles with phenylboronate/gluconamide crosslinking in the core exerting promoted gene transfection through spatiotemporal responsiveness to intracellular pH and ATP concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 139 (51) 18567-18575 (2017) (DOI: 10.1021/jacs.7b08816)
3. Y. Anraku, H. Kuwahara, Y. Fukusato, A. Mizoguchi, T. Ishii, K. Nitta, Y. Matsumoto, K. Toh, K. Miyata, **S. Uchida**, K. Nishina, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, H. Mizusawa, T. Yamasoba, T. Yokota, K. Kataoka, Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nat. Commun.* 8 1001 (2017) (DOI: 10.1038/s41467-017-00952-3)
4. D.-J. Lee, E. Kessel, T. Lehto, X. Liu, N. Yoshinaga, K. Padari, Y.-C. Chen, S. Kempter, **S. Uchida**, J. O. Rädler, M. Pooga, M.-T. Sheu, K. Kataoka, E. Wagner, Systemic delivery of folate-PEG siRNA lipopolyplexes with enhanced intracellular stability for in vivo gene silencing in leukemia. *Bioconjugate Chem.* 28 (9) 2393-2409 (2017) (DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00383)
5. F. Perche, **S. Uchida**, H. Akiba, C.-Y. Lin, M. Ikegami, A. Dirisala, T. Nakashima, K. Itaka, K. Tsumoto, K. Kataoka, Improved brain expression of anti-amyloid  $\beta$  scFv by complexation of mRNA including a secretion sequence with PEG-based block cationer. *Curr. Alzheimer Res.* 14 (3) 295-302 (2017) (DOI: 10.2174/1567205013666161108110031)
6. Q. Chen, K. Osada, Z. Ge, **S. Uchida**, T. A. Tockary, A. Dirisala, A. Matsui, K. Toh, K. M. Takeda, X. Liu, T. Nomoto, T. Ishii, M. Oba, Y. Matsumoto, K. Kataoka, Polyplex micelle installing intracellular self-processing functionalities without free cationers for safe and efficient systemic gene therapy through tumor vasculature targeting. *Biomaterials* 113 253-265 (2016) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.042)
7. **S. Uchida**, K. Hayakawa, T. Ogata, S. Tanaka, K. Kataoka, K. Itaka, Treatment of spinal cord injury by an advanced cell transplantation technology using brain-derived neurotrophic factor-transfected mesenchymal stem cell spheroids. *Biomaterials* 109 1-11 (2016) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.007)
8. C.-Y. Lin, F. Perche, M. Ikegami, **S. Uchida**, K. Kataoka, K. Itaka, Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles. *J. Control. Release* 235 268-275 (2016) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.001)
9. **S. Uchida**, H. Kinoh, T. Ishii, A. Matsui, T. A. Tockary, K. M. Takeda, H. Uchida, K. Osada, K. Itaka, K. Kataoka, Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials* 82 221-228 (2016) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.031)
10. H. Uchida, K. Itaka, **S. Uchida**, T. Ishii, T. Suma, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Synthetic polyamines to regulate mRNA translation through the preservative binding of eukaryotic initiation factor 4E to the cap structure. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (5) 1478-1481 (2016) (DOI: 10.1021/jacs.5b11726)
11. H. Aini, K. Itaka, A. Fujisawa, H. Uchida, **S. Uchida**, S. Fukushima, K. Kataoka, T. Saito, U. -I. Chung, S. Ohba, Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci. Rep.* 6 18743 (2016) (DOI: 10.1038/srep18743)
12. A. Matsui, **S. Uchida (co-first)**, T. Ishii, K. Itaka, K. Kataoka, Messenger RNA-based therapeutics for the treatment of apoptosis-associated diseases. *Sci. Rep.* 5 15810 (2015) (DOI: 10.1038/srep15810)
13. Y. Li, K. Osada, Q. Chen, T. A. Tockary, A. Dirisala, K. M. Takeda, **S. Uchida**, K. Nagata, K. Itaka, K. Kataoka, Toroidal packaging of pDNA into block ionomer micelles exerting promoted in vivo gene expression. *Biomacromolecules* 16 (9) 2664-2671 (2015) (DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00491)
14. T. Okuda, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, T. Ishii, **S. Uchida**, K. Itaka, K. Kataoka, H. Okamoto, Development of biodegradable polycation-based inhalable dry gene

- powders by spray freeze drying. *Pharmaceutics* 7 (3) 233-254 (2015) (DOI: 10.3390/pharmaceutics7030233)
15. K. Itaka, **S. Uchida**, A. Matsui, K. Yanagihara, M. Ikegami, T. Endo, T. Ishii, K. Kataoka, Gene transfection toward spheroid cells on micropatterned culture plates for genetically-modified cell transplantation. *JOVE* 101 e52384 (2015) (DOI: 10.3791/52384)
  16. **S. Uchida**, K. Kataoka, K. Itaka, Screening of mRNA chemical modification to maximize protein expression with reduced immunogenicity. *Pharmaceutics* 7 (3) 137-151 (2015) (DOI: 10.3390/pharmaceutics7030137)

[学会発表] (計 8 件)

1. **内田智士** 高分子ミセルを用いたメッセンジャーRNA デリバリー 理研シンポジウム:理研/iCONM/物材研 医工学ネットワーク 平成29年12月12日 神奈川県川崎市 (招待講演)
2. **内田智士**、宮田完二郎、片岡一則 ブロック共重合体ミセル、核酸内包ナノ粒子の品質評価 日本核酸医薬学会第2回年会 平成28年11月16日 東京都葛飾区 (招待講演)
3. **S. Uchida**, H. Kinoh, T. Ishii, A. Matsui, H. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka. Development of polyplex nanomicelles for systemic messenger RNA delivery targeting pancreatic cancer. Gordon Research Conference (Drug Carriers in Medicine & Biology) 平成28年8月8日 Waterville Valley, NH, USA
4. **内田智士**、喜納宏昭、石井武彦、内田寛邦、松井秋倫、位高啓史、片岡一則 コレステロール修飾ナノミセルを用いた mRNA 全身投与による膵臓がん治療 第32回日本 DDS 学会学術集会 平成28年6月30日 静岡県静岡市
5. **S. Uchida**, H. Kinoh, T. Ishii, A. Matsui, T. A. Tockary, K. M. Takeda, H. Uchida, K. Osada, K. Itaka, K. Kataoka Anti-angiogenic therapy for pancreatic cancer by systemic delivery of messenger RNA using polyplex nanomicelle. ASGCT 19th Annual Meeting 平成28年5月6日 Washington, DC, USA
6. **内田智士**、喜納宏昭、石井武彦、松井秋倫、位高啓史、片岡一則 mRNA の全身投与に向けた高分子ナノミセルの開発と膵臓がん治療への応用 第37回日本バイオマテリアル学会大会 平成27年11月9日 京都府京都市
7. **S. Uchida**, A. Matsui, K. Kataoka, K. Itaka. Messenger RNA-based therapy for an apoptosis-related disease in the liver. ESGCT Congress 2015 平成27年9月17

日 Helsinki, Finland

8. **S. Uchida**, A. Matsui, K. Itaka, K. Kataoka. Messenger RNA (mRNA)-based gene therapy for introducing anti-apoptotic factor. ASGCT 18th Annual Meeting 平成29年5月15日 New Orleans, LA, USA

[図書] (計 1 件)

1. **内田智士**、位高啓史、片岡一則 高分子ナノミセルを用いた生体への in vivo mRNA デリバリー トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学 *MOOK30* 号 今、着実に実り始めた遺伝子治療—最新研究と今後の展開 金田安史 編 株式会社メディカルドゥ 大阪 119-124 (2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: mRNA輸送担体の安定化方法  
発明者: **内田 智士**, 片岡 一則, 吉永 直人, 位高 啓史  
権利者: 東京大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-252488  
出願年月日: 平成28年12月27日  
国内外の別: 国内

名称: mRNAワクチン  
発明者: **内田 智士**, 位高 啓史, 片岡 一則  
権利者: 東京大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-252487  
出願年月日: 平成28年12月27日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
<https://researchmap.jp/suchida/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 智士 (UCHIDA, Satoshi)  
東京大学・大学院工学系研究科・特任助教  
研究者番号: 20710726