

令和元年6月5日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15322

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた遺伝性難病治療を実現する非ウイルスベクターの開発

研究課題名(英文)Development of a non-viral vector to realize hereditary intractable disease treatment using genome editing technology

研究代表者

有馬 英俊 (ARIMA, HIDETOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：50260964

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文): 肝臓の遺伝子疾患であるATTR-FAPに対する根治療法としてのゲノム編集技術の開発を目的に、肝実質細胞特異的キャリアであるラクトース修飾 dendriマー/シクロデキストリン結合体(Lac-CDE)を用いて、ゲノム編集DNA(TTR-pDNA)の肝臓特異的な送達を試みた。その結果、TTR-pDNA/Lac-CDE複合体は肝細胞に効率よく取り込まれ、ゲノム編集を介してTTR遺伝子の発現を顕著に抑制した。健常マウスに静脈内投与後、Lac-CDE複合体は肝臓へ集積した。これらの結果から、TTR-pDNA/Lac-CDE複合体はゲノム編集技術に基づくATTR-FAPの治療薬シーズとしての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓は様々な難治性疾患の原因臓器であり、その多くが遺伝子変異により発症する。肝臓の遺伝子疾患の一つであるATTR-FAPに対する根治療法としてのゲノム編集技術の開発を目的に、肝臓特異的遺伝子キャリア(Lac-CDE)を用いて、その疾患の原因遺伝子であるトランスサイレチン遺伝子に対するゲノム編集DNA(TTR-pDNA)の肝臓特異的な送達を試みた。その結果、Lac-CDEはTTR-pDNAを肝実質細胞に選択的に導入し、ゲノム編集を介して、TTR遺伝子の発現を抑制する可能性が示された。したがって、TTR-pDNA/Lac-CDE複合体は、ATTR-FAPの根治療法への道を開くことが期待される。

研究成果の概要(英文): To develop a genome editing technology as a curative medicine for transthyretin-type familial amyloid polyneuropathy (ATTR-FAP), a genetic disease of the liver, the attempt of liver-specific delivery of genome editing plasmid DNA (TTR-pDNA) has been made by complexation with lactosylated PAMAM dendrimer/cyclodextrin conjugates (Lac-CDE), a liver-specific gene carrier. As a result, TTR-pDNA/Lac-CDE complex was efficiently taken up by the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and the expression of TTR gene was significantly suppressed. TTR-pDNA/Lac-CDE complex was able to induce TTR knockout via genome editing. After intravenous administration to healthy mice, pDNA/Lac-CDE complex accumulated in the liver. These results suggested that TTR-pDNA/Lac-CDE complex has potential as a therapeutic drug seed for ATTR-FAP treatment based on genome editing technology.

研究分野: 応用薬理 薬物送達学 製剤学

キーワード: ゲノム編集 家族性アミロイドポリニューロパチー シクロデキストリン dendriマー 結合体 トランスサイレチン CRISPR/Cas9システム 肝臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー (ATTR - FAP) は肝臓で産生される血清タンパク質トランスサイレチン (TTR) の多くの変異体により形成されたアミロイド線維が全身諸臓器に沈着する遺伝性疾患であり、厚生労働省特定疾患にも指定されている。ATTR-FAP 治療として、肝臓移植の有効性は報告されているが、深刻なドナー不足や患者の心的肉体的負担の大きさなど課題も多い。2011 年 EU で認可された FAP 治療薬 Tafamidis は、適用患者が限定され、かつ年間の薬剤費は高額である。また、研究開始当時臨床試験中で 2018 年 FDA によって認可された ATTR - FAP に対する核酸医薬 patisiran も、高額かつ生涯に渡る投薬が必須のため、患者・国の負担は極めて大きく、これらの欠点を改善した新規治療薬の開発が切望されている。一方、2013 年 CRISPR/Cas9 DNA を用いた新規ゲノム編集技術が開発された。また 2015 年、F.A. Ran らはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた *in vivo* ゲノム編集技術に関して初めて報告し、治療薬としての可能性が示された。しかし *in vivo* 投与において、ウイルスベクターの使用への不安が完全に払拭されていないことから、より安全なキャリアの開発が必要である。これまで我々はシクロデキストリン (CyD) を基盤分子とする非ウイルスベクターを多数構築してきた。特に遺伝子・核酸医薬キャリアとして dendrimer- α -シクロデキストリン結合体 (α -CDE) を独自に開発した。また最近我々は、高効率かつ安全な肝実質細胞特異的遺伝子・siRNA 用キャリアとしてのラクトシル化 α -CDE (Lac- α -CDE) および PEG 修飾ラクトシル化 α -CDE (PEG-L α C) が TTR に対する siRNA (TTR-siRNA) と複合体を形成することにより、TTR の肝臓中レベルを低下させることを明らかにした。なお、研究成果の概要では Lac- α -CDE および PEG-L α C の 2 種を総称して、Lac-CDE と記した。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓の遺伝子疾患 (難病) である ATTR-FAP に対する根治療法としての *in vivo* ゲノム編集技術の開発を目指す。すなわち、申請者らが開発した肝実質細胞特異的キャリアである Lac- α -CDE および PEG-L α C を用いて TTR に対するゲノム編集用 CRISPR プラスミド DNA (TTR-pDNA) を肝臓に特異的に送達することで、異型 FAP のノックアウトを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TTR-pDNA の調製

U6-gRNA/CMV-Cas9-GFP plasmid のクローニングサイトに異型 TTR 遺伝子のエクソン 2 および 4 に対する合成オリゴを挿入することにより、異型 TTR をノックアウトするための 4 種の TTR-pDNA を調製した。合成オリゴ核酸の挿入の確認は制限酵素処理後、電気泳動により行った。

(2) 置換度の異なる Lac- α -CDE および PEG-L α C の調製と評価

Lac- α -CDE は α -CyD/PAMAM dendrimer-結合体 (α -CDE)、ラクトース-水和物およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムをホウ酸緩衝液に溶解させ、3 時間攪拌して調製した。なお、反応溶液中のラクトース-水和物の濃度を変化させることにより、ラクトース置換度が 1, 3, 4, 6 の 4 種の Lac- α -CDE を調製した。一方、PEG-L α C は得られた Lac- α -CDE (ラクトース置換度 1)、活性化 PEG (MW 2170)、EDC および NHS をホウ酸緩衝液に溶解後、室温で 2 時間攪拌して調製した。なお、反応溶液中の活性化 PEG の濃度を変化させることにより、PEG 置換度が 2, 4, 6 の 3 種の PEG-L α C を調製した。Lac- α -CDE および PEG-Lac- α -CDE はゲル濾過および HPLC 法にて精製した。

(3) TTR-pDNA と Lac- α -CDE および PEG-L α C との複合体の調製と物性評価

TTR-pDNA/Lac- α -CDE 複合体および TTR-pDNA/PEG-L α C 複合体は、HBSS 緩衝液中で TTR-pDNA と各キャリアを 15 分混合することにより調製した。複合体形成の確認は電気泳動により行った。複合体の物理化学的性質は粒子径および ζ -電位を測定することにより評価した。

(4) 細胞導入

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に TTR-pDNA/Lac- α -CDE 複合体および TTR-pDNA/PEG-L α C 複合体をトランスフェクション 48 時間後、細胞上清中に放出された TTR を ELISA により、24 時間後の細胞中の mRNA をリアルタイム PCR により定量した。また、TTR-pDNA/トリメチルローダミン修飾 Lac- α -CDE 複合体および TTR pDNA/トリメチルローダミン修飾 PEG-L α C 複合体を適用後、3 時間後の細胞中の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。また、トランスフェクション後、ゲノム編集が行われた否かは、Surveyor nuclease assay および T7 エンドヌクレアーゼ I (T7EI) アッセイにより確認した。また安全性の観点から、HepG2 細胞にトランスフェクション後の細胞毒性を WST-8 法により検討した。

(5) 健常マウスを用いた *in vivo* 評価

健常マウスにルシフェラーゼ遺伝子をコードする pDNA と Lac- α -CDE および PEG-P α C との複合体を静脈内投与後の各種臓器中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターを用いて定量し、臓器移行性について評価した。また、静脈内投与後の安全性を血液生化学検査値により評価した。

4 . 研究成果

(1) TTR-pDNA の構築

U6-gRNA/CMV-Cas9-GFP plasmid のクローニングサイトに TTR 遺伝子のエクソン 2 または 4 に対する合成オリゴをそれぞれ挿入し、4 種の TTR-pDNA の調製に成功した。

(2) 置換度の異なる Lac- α -CDE および PEG-L α C の調製と評価

ラクトース置換度の異なる 4 種の Lac- α -CDE の調製に成功した。次に、これら 4 種の Lac- α -CDE の TTR-pDNA の HepG2 細胞内への導入効率を比較したところ、置換度 1 の Lac- α -CDE が最も高い値を示した。この置換度 1 の Lac- α -CDE に PEG の置換度が異なる 3 種の PEG-L α C を調製し、それらの HepG2 細胞内への遺伝子導入効率を比較したところ、置換度 2 の PEG-L α C の遺伝子導入効率が最も高値を示した。これらのことから、以下の研究ではラクトース置換度 1 の Lac- α -CDE および PEG 置換度 2 の PEG-L α C を用いて検討を行った。

(3) TTR-pDNA と Lac- α -CDE および PEG-L α C との複合体の調製と物性評価

電気泳動移動度の変化から、Lac- α -CDE および PEG-L α C は、TTR-pDNA とチャージ比 5(carrier/pDNA)以上で複合体を形成することが示された。また、トランスフェクション実験で用いたチャージ比 50(carrier/pDNA)の条件下、Lac- α -CDE 複合体の粒子径、PDI、ゼータ電位はそれぞれ 140 nm, 0.39 および 37 mV であった。また、PEG-L α C 複合体では、それぞれ 230 nm, 0.41, 26 mV であった。以上の結果から、Lac- α -CDE および PEG-L α C は TTR-pDNA と複合体を形成するが、複合体の物理化学的性質は僅かに異なることが示唆された。

(4) TTR-pDNA と Lac- α -CDE および PEG-L α C との複合体の細胞導入

TTR-pDNA/Lac- α -CDE 複合体および TTR-pDNA/PEG-L α C 複合体を HepG2 細胞にトランスフェクション後、これら複合体は細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体を介して細胞内に取り込

まれることが示された。またトランスフェクション 24 時間後、蛍光顕微鏡にて細胞内分布を観察したところ、これら複合体は細胞内だけでなく核内にも移行することが示された。さらに、トランスフェクション 48 時間後において、細胞上清中に放出された TTR タンパク質を ELISA で定量した結果、いずれの複合体も TTR タンパク質を約 20%まで低下させた。加えて、トランスフェクション 24 時間後の TTR mRNA もいずれの場合も約 40%低下させた。また上記のいずれの条件においても細胞障害性は認められなかった。これらの結果から、Lac- α -CDE 複合体および PEG-L α C 複合体は、HepG2 細胞において、TTR mRNA 発現および TTR タンパク質の発現を顕著に抑制し、またそれらの抑制効果は、Lac- α -CDE 複合体および PEG-L α C 複合体間において差異はないことが示唆された

TTR-pDNA/Lac- α -CDE 複合体および TTR-pDNA/PEG-L α C 複合体を HepG2 細胞にトランスフェクション後のゲノム編集を Surveyor nuclease assay を用いて検討した。未処理群およびコントロール pDNA 複合体処理群では TTR ゲノムに対する PCR 増幅産物のみが観察されたが、Lac- α -CDE 複合体および PEG-L α C 複合体処理群では Surveyor nuclease による分解物が確認された。また、同様な結果が T7 エンドヌクレアーゼ I (T7EI) アッセイにおいても確認された。これらのことから、Lac- α -CDE 複合体および PEG-L α C 複合体は、TTR 遺伝子に対するゲノム編集を誘導することが示唆された。

(5) pDNA/Lac- α -CDE 複合体および pDNA/PEG-L α C 複合体の *in vivo* 遺伝子導入効果

Lac- α -CDE 複合体および PEG-L α C 複合体を健常マウスの尾静脈に投与 12 時間後の各種臓器におけるルシフェラーゼ遺伝子発現量を定量した。全臓器での総遺伝子発現量に対する肝臓での遺伝子発現の割合は、PEG-L α C 複合体の方が α -CDE 複合体および Lac- α -CDE 複合体に比べて有意に高く、また、脾臓における遺伝子発現の割合は著しく低かった。これらのことから、PEG-L α C 複合体は、 α -CDE 複合体および Lac- α -CDE 複合体に比べて、肝臓特異的に遺伝子導入可能なことが示唆された。今後、ATTR-FAP モデルトランスジェニック (Tg) マウスを用いて、*in vivo* ゲノム編集効果について検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Arima H, Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K. Recent advances in cyclodextrin delivery techniques. *Expert Opin Drug Deliv* 12(9), 1425-1441, 2016.
- (2) Arima H, Motoyama K, Higashi T. Potential Use of Cyclodextrins as Drug Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients. *Chem Pharm Bull* 65(4), 341-348, 2017.
- (3) Arima H, Motoyama K, Higashi T. Potential therapeutic application of dendrimer/cyclodextrin conjugates with targeting ligands as advanced carriers for gene and oligonucleotide drugs. *Ther Deliv* 8(4), 215-232, 2017.
- (4) Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K, Jono H, Ando Y, Arima H. In vitro and in vivo siRNA delivery to hepatocyte utilizing ternary complexation of lactosylated dendrimer/cyclodextrin conjugates, siRNA and low-molecular-weight sacran. *Int J Biol Macromol*. 107(Pt A), 1113-1121, 2018.
- (5) Higashi T, Iohara D, Motoyama K, Arima H. Supramolecular Pharmaceutical Sciences: A Novel Concept Combining Pharmaceutical Sciences and Supramolecular Chemistry with a Focus on Cyclodextrin-Based Supermolecules. *Chem Pharm Bull* 66(3), 207-216, 2018.

〔学会発表〕(計1件)

田原春 徹、小野寺理紗子、東 大志、本山敬一、有馬英俊、シクロデキストリン/デンドリマ
ー結合体による神経細胞への Cas9/sgRNA 複合体デリバリー、日本薬学会第 139 年会、2019.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本山敬一

ローマ字氏名：Motoyama Keiichi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：生命科学研究部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50515608

研究分担者氏名：東 大志

ローマ字氏名：Higashi Taishi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院先導機構

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20613409

(2)研究協力者

研究協力者氏名：林 祐也

ローマ字氏名：Hayashi Yuya

研究協力者氏名：田原春 徹

ローマ字氏名：Taharabaru Toru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。