

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06672

研究課題名（和文）超分子を用いた疾患および標的組織選択的かつ全身投与可能なゲノム編集技術の構築

研究課題名（英文）Construction of disease- and target-tissue-selective and systemically-administrable genome editing technology using supramolecules

研究代表者

本山 敬一（Motoyama, Keiichi）

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・教授

研究者番号：50515608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、Cas9タンパク質とsgRNAの複合体(Cas9 RNP)をあらかじめ形成させ、細胞内に直接導入するゲノム編集が試みられている。そこで我々は次世代型Cas9 RNPキャリアとして、ポリロタキサン(PRX)という超分子素材に注目した。本研究では、Cas9 RNPキャリアとしてのNH2-PRXについて、構造最適化を行った。その結果、細胞内でエンドソーム脱出効果およびCas9 RNPのリリース能を獲得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NH2-PRXは、混合するだけでアミノ基が回転・移動しながらCas9 RNPのアニオン性部位と相互作用することで、非常に高効率にトポジカルな複合体を形成し、従来のキャリアと比較して、Cas9 RNPの安定性と細胞膜透過性を劇的に向上させることが可能である。本研究の最終目標は、全身投与で高効率かつ安全に、ゲノム編集を誘導可能なキャリアシステムを構築し、様々な遺伝性疾患に対する究極の根治療法を開発することである。

研究成果の概要（英文）：Recently, genome editing in which a Cas9 protein/sgRNA complex (Cas9 RNP) is pre-formed and introduced directly into cells has been attempted. Therefore, we focused on a supramolecular material called polyrotaxane (PRX) as a next-generation Cas9 RNP carrier. In this study, we performed structural optimization of NH2-PRX as a Cas9 RNP carrier. As a result, we succeeded in obtaining endosomal escape effect and Cas9 RNP release ability in cells.

研究分野：製剤設計学

キーワード：ゲノム編集 ロタキサン 超分子 シクロデキストリン

## 1. 研究開始当初の背景

In vivo ゲノム編集がアデノ随伴ウイルスベクターを用いることで誘導可能であると 2015 年 Nature 誌に報告されたが、安全性に優れる非ウイルスベクターで眼組織のゲノム編集に成功した事例はほとんどない。本研究では、極めてチャレンジングな試みとして、安全かつ高効率で全身投与可能な in vivo ゲノム編集技術の構築を行い、疾患に応じて組織特異的な方法を構築する。すなわち、申請者らが開発した非ウイルスベクターであるアミノ化ポリロタキサン (NH<sub>2</sub>-PRX) を用いて、Cas9/sgRNA 複合体 (Cas9 RNP) を疾患に応じて標的組織特異的にゲノム編集分子を送達可能な基盤技術を構築する。

## 2. 研究の目的

申請者は、唯一無二の Cas9 RNP 専用キャリアの開発を目的として、アミノ化 PRX (NH<sub>2</sub>-PRX) の Cas9 RNP キャリアとしての可能性を評価した。また、様々な構造・分子量を有する 9 種類の従来のカチオン性ポリマー (アミノ基の運動性が低い) との比較検討を行うことで、NH<sub>2</sub>-PRX の有用性の証明を試みた。さらに、細胞内へのデリバリーだけでなく、細胞内動態を制御し、高効率なゲノム編集を誘導するため、NH<sub>2</sub>-PRX の高機能化を行い、最高水準の Cas9 RNP キャリアの開発に挑戦した。

現在までに報告されている Cas9 RNP のデリバリーキャリアの中で、Cas9 RNP の複雑な立体構造に対応したものは皆無である。本研究で構築する NH<sub>2</sub>-PRX は、混合するだけでアミノ基が回転・移動しながら Cas9 RNP のアニオン性部位と相互作用することで、非常に高効率にトポロジカルな複合体を形成し、従来キャリアと比較して、Cas9 RNP の安定性と細胞膜透過性を劇的に向上させることが可能である。さらに、エンドキャップを外すと、PRX が崩壊し、Cas9 RNP との相互作用が減弱するという特性を活かして、細胞外では安定に、一方細胞内では Cas9 RNP を放出可能な、先駆的かつインテリジェントな Cas9 RNP キャリアシステムを構築可能である。

## 3. 研究の方法

ロタキサン (PRX) の動的な特性に着目し、混合するだけで Cas9 RNP のかたちや電荷密度を認識して変形する NH<sub>2</sub>-PRX の開発に挑戦した。NH<sub>2</sub>-PRX は、空間的ミスマッチを解消しながら Cas9 RNP と高効率に相互作用し、強固な複合体を形成することが期待できる。まず、環状分子に a-CyD、軸分子に PEG (20 kDa)、エンドキャップにアダマンタンを用いて PRX を調製した後、a-CyD の水酸基に 1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethane (BAEE) を修飾し、BAEE-PRX; amino-PRX (1<sup>st</sup> generation; 1G) とした。Amino-PRX (1G) は、a-CyD が回転・移動しながら、Cas9 RNP 中の sgRNA および酸性アミノ酸残基へアミノ基を提示し、混合するだけで簡便かつ高効率に Cas9 RNP と相互作用可能なことが期待される。この仮説を証

明するためのコントロールポリマーとして、アミノ基の運動性が低い BAEE 修飾デキストラン (BAEE-DEX) および一般的なカチオン性ポリマーとの比較検討を行い、amino-PRX (1G) が Cas9 RNP と高効率に相互作用可能であるか検討した。さらに、PRX に修飾するアミノ基の最適化や細胞内分解性官能基の導入を試み、細胞内環境に応答した多段階変形機能 (エンドソーム脱出能、Cas9 RNP 放出能、生体内分解能) を搭載させ、高機能化した。

#### 4 . 研究成果

本研究では、PRX の動的な特性に着目し、混合するだけで Cas9 RNP のかたちや電荷密度を認識して変形・相互作用する新規 Cas9 RNP キャリアを構築した。さらに、PRX に修飾するアミノ基の最適化や細胞内分解性官能基の導入を施し、細胞内環境に応答した多段階変形機能 (エンドソーム脱出能、Cas9 RNP 放出能、生体内分解能) を搭載させ、高機能化した。すなわち、様々な細胞内環境に応じて適宜に変形し、Cas9 RNP を高効率にデリバリー可能な多段階変形型超分子キャリア (amino-PRX (5G)) を構築した。以下に、本研究で得られた知見を要約する。

- 1) PRX に BAEE を修飾してアミノ化した BAEE-PRX; amino-PRX (1G) を構築した。  
Amino-PRX (1G) は、アミノ基の運動性が低い従来のカチオン性ポリマーと比較して、効率良く安定な Cas9 RNP 複合体を形成可能であり、非常に優れた細胞内デリバリー能を示した。
- 2) 修飾アミノ基を最適化して、エンドソーム膜破壊能を有する DET-PRX; amino-PRX (2G) を構築した。Amino-PRX (2G) は、エンドソーム内環境における DET のジプロトン化と -CyD の回転による動的なエンドソーム膜との相互作用により、Cas9 RNP のエンドソーム脱出能を促進させ、優れたゲノム編集効果を誘導可能であった。
- 3) 細胞内における Cas9 RNP リリース能を付与するため、エンドキャップ-軸分子間に様々な細胞内分解結合を有する DET-PRXs; amino-PRXs (3G) を構築した。合成収率、細胞外における安定性および生体適合性の観点から、カルバメート結合が優れていたが、Cas9 RNP のリリース能を付与するには至らなかった。
- 4) Carbamate-PRX に Cys を修飾し、アミノ基脱離型の amino-PRX (4G) を構築した。Amino-PRX (2G) を混合し、Cas9 RNP 複合体のゲノム編集効果を評価したが十分な効果を示さなかった。
- 5) DET および細胞内分解性アミノ基である Cys を 1:1 のモル比で同一の Carbamate-

PRX に修飾した Cys-DET-PRX; amino-PRX (5G) を構築した。Amino-PRX (5G) は、細胞外環境において安定であり、一方で細胞質内において Cas9 RNP をリリース可能であった結果、極めて高効率なゲノム編集効果を誘導可能であった。さらに、CRISPRMAX との比較検討を行った結果、amino-PRX (5G) は、in vitro において CRISPRMAX と同等以上、さらに in vivo においては、CRISPRMAX よりも高効率にゲノム編集を誘導可能であった。

- 6) Amino-PRX (5G) は、Cas9 RNP のかたちや電荷密度、細胞内環境に応じて適宜に変形することで、Cas9 RNP を核へデリバリー可能なキャリアとして機能することが示唆された。さらに、エンドキャップ-軸分子間のカルバメート結合が CES による分解を受けるため、生体適合性に優れる可能性が示唆された。

以上の結果より、amino-PRX (5G) は、Cas9 RNP のかたちや細胞内環境に応じて変形することで、Cas9 RNP を効率良くデリバリーし、高いゲノム編集効果を誘導可能な Cas9 RNP キャリアとして有用であることが示唆された。特に、本キャリアは簡便に使用でき、CRISPRMAX と同等以上の Cas9 RNP デリバリー能を示すことから、今後 Cas9 RNP キャリアのグローバルスタンダードとして期待される。さらに、amino-PRX (5G) は、薬物のかたちや電荷密度を認知して変形できることから、Cas9 RNP だけではなく、他のアニオン性薬物（遺伝子・核酸医薬、タンパク質性薬物など）の細胞内導入用キャリアとしても適用可能なことが期待される。詳細は割愛するが、実際、amino-PRX (5G) が市販の核酸導入用試薬である Lipofectamine2000 よりも効率的に siRNA をデリバリー可能である結果、高い RNAi 効果を有することを確認している。以上、本研究結果より、amino-PRX (5G) が簡便かつ高効率な Cas9 RNP 導入キャリアとして有用なことが示唆された。今後リガンド修飾した系の構築を進め、疾患に応じて組織特異的に送達可能な基盤技術を構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片之坂麗奈、田原春徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 変幻自在ポリマーによるゲノム編集分子細胞内デリバリーの機構解明
3. 学会等名 第38回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片之坂麗奈、田原春徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 変幻自在ポリマーによるゲノム編集分子の細胞内導入と機能解明
3. 学会等名 フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田原春徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 自律的な多段階変形特性によりゲノム編集分子の高効率な搭載・デリバリーを可能にするアミノ化シクロデキストリンポリロタキサン構築
3. 学会等名 第 37 回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原春 徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 自律的な変形を介して Cas9 RNP を搭載・デリバリーする超分子ナノソフトロボットの開発
3. 学会等名 第 37 回日本 DDS 学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原春 徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 自律的な多段階変形を介して高効率にゲノム編集分子を搭載・デリバリー可能な超分子ナノソフトロボットの構築
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第 6 回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原春 徹、木原拓也、小野寺理沙子、本山敬一、東 大志
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 の高効率なデリバリーを可能にする多段階変形型超分子ナノソフトロボットの構築
3. 学会等名 日本薬剤学会 第 36 年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部 製剤設計学分野 <a href="http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html">http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------