

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03017

研究課題名(和文) 神経細胞を標的としたmRNA送達システム確立と難治神経疾患・外傷治療への応用

研究課題名(英文) Development of mRNA medicine for treatment of neural diseases and injury

研究代表者

位高 啓史 (ITAKA, Keiji)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60292926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA医薬は、mRNAを体内に直接投与して、mRNAによってコードされたタンパク質を標的細胞で発現させることによって治療を行う、新しいタイプの医薬品である。本研究では、このmRNA医薬の重要な適応である神経疾患・外傷に焦点を当て、mRNA分子やその送達法の最適化、疾患外傷モデル動物に対する治療実験を行った。その結果、アルツハイマー病などの脳疾患、脊髄損傷に対するmRNA投与による治療効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNA医薬は世界的に研究開発が活発化しており、近い将来の実用化が期待される。従来と異なる作用機序により、多くの難治疾患治療や再生医療への応用が研究されている。本研究は特に神経疾患外傷へのmRNA医薬応用に関わる先駆的な研究と位置づけられ、脳におけるmRNA投与による治療効果など、世界で初めての成果も得られている。今後さらに治療効果や安全性についての検証が進められ、我が国発のmRNA医薬実用化に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：mRNA medicine is a new type nucleic acid medicine, by administering mRNA directly into the body. In this study, we evaluated the feasibility of mRNA medicine for treatment of neural diseases and injury. The study was done by optimization of mRNA molecule structure and its DDS, and the evaluation of the therapeutic effects using model animals of neural diseases and injury. The effects of mRNA medicine were obtained in the animal models of Alzheimer disease and spinal cord injury.

研究分野：遺伝子核酸医薬、DDS、バイオマテリアル

キーワード：mRNA 送達システム 神経疾患 脊髄損傷

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

### 1. 研究開始当初の背景

人工的に合成した mRNA の体内への送達は、細胞機能・分化を制御する目的のタンパク・ペプチドを標的細胞へ供給する治療手段として有力で、タンパクそのものの投与、またはプラスミド DNA (pDNA) による投与と比べて、効率、標的細胞・組織に制約が少ないこと、そしてゲノム挿入変異リスクが無いことによる安全性など、種々の利点を持つ。しかし、培養細胞への mRNA 細胞内導入は古くからあるにもかかわらず、生体内 mRNA 送達は現在でも成功例は非常に少なく、その理由として、DNA と比べても mRNA が極めて不安定な物質であること、また mRNA は強い免疫原性を持ち、非自己の mRNA は生体内で免疫反応を引き起こしてしまうことが挙げられた。また外部から投与された mRNA の細胞内挙動も未解明の点が多く、効率よいタンパク質産生に向けては、まだ多くの課題が残る状況であった。

研究代表者らは遺伝子核酸分子の DDS 研究を通じて、DNA、RNA などの核酸分子を生体内に安全かつ効率よく送達するナノミセル型キャリアの基本設計を確立し、主にプラスミド DNA を用いて、種々の難治性疾患・外傷の治療に向けた POC を取得してきた。一方、広範な臨床応用の観点から、DNA 以上に mRNA はさらに大きな可能性を持つことに着目し、本研究申請の数年前より DDS の mRNA 生体内送達への最適化を進め、これを用いた疾患治療応用へ向けた検討を開始していた。mRNA は原理的に標的とする細胞種を選ばないが、特に細胞分裂しない細胞に投与可能であることは、DNA と比べた大きなアドバンテージとなる。そのような非分裂細胞として代表的なものである神経細胞を、本研究の標的として設定した。

### 2. 研究の目的

本研究では、この mRNA 生体内送達による疾患・外傷治療の実現、すなわち mRNA 医薬の実用化を最終目標として、特に神経細胞・組織を標的とした mRNA 送達を可能とするシステム開発・最適化と、疾患・外傷モデル動物を用いた POC 確立を行うことを目的とした。神経細胞への安全かつ効率的な mRNA 送達を達成し、難治性の神経疾患・外傷への治療戦略を提示することを本研究期間の目標とした。

### 3. 研究の方法

研究の枠組みとして、(1)投与する mRNA の精製・構造最適化、(2)mRNA を生体内の投与する DDS の改良・最適化、(3)疾患外傷モデル動物への投与と治療効果検証、の3点からなる。以下の研究成果欄に、それぞれの研究の方法も含めて概略を記述する。

### 4. 研究成果

#### (1)mRNA 精製・構造最適化

mRNA 医薬の臨床応用に向けた問題点として、mRNA の持つ免疫原性の制御は重要な課題である。Pseudouridine など修飾核酸を用いることによって mRNA による炎症惹起を制御できることは知られているが、種々の修飾プロトコルが報告される中で、その最適な条件は不明であった。培養細胞を用いて、諸文献で報告される種々のプロトコルによって精製された mRNA のタンパク質翻訳効率、炎症惹起を網羅的に検討した。その結果、修飾核酸によって全般として mRNA からの炎症惹起は制御されるが、標的細胞、核酸配列、またその投与方法によってさえ、核酸修飾の与える影響は大きく異なることが明らかとなった。すなわち、mRNA 核酸修飾については、適応毎の条件最適化が重要であることが明らかとなった(文献 1)。

また関連研究として、二本鎖 mRNA が高い免疫原性を持つことに着目し、mRNA 3' 末端のポリ A 鎖部分を選択的に二本鎖構造とすることにより、mRNA からのタンパク質能、免疫誘導能を両立させたシステムを開発した(文献 13)。これは特に mRNA ワクチンへの応用が期待される。

#### (2) DDS

mRNA 送達に用いる DDS として、生体適合性ポリマーである P[Asp(DET)] およびその類縁体である P[Asp(TET)]、P[Asp(TEP)] の合成、機能評価を先行研究にて進め、ポリマーと mRNA の会合および細胞内エンドソーム脱出能を制御することにより、mRNA からのタンパク質翻訳の時間的制御が可能となることを示していた。本研究ではさらにこれらポリマーと会合した mRNA の、タンパク質翻訳因子との結合を解析し、タンパク質翻訳効率との相関を明らかとした。送達された mRNA からのタンパク質翻訳を最大化するための DDS 設計に重要な指針となる成果が得られた(文献 6)。

#### (3) 疾患外傷モデル動物への投与と治療効果検証

神経系疾患外傷を中心に mRNA の投与と実験を行い、その治療効果を検証した

mRNA 脳室内投与による脳疾患治療

脊髄くも膜下腔の髄液中へのナノミセル型キャリア内包 mRNA の投与を行った先行研究にヒントを得て、mRNA への脳室内への投与を行った。実験はラットを頭部固定装置に設置し、開頭

後第3脳室に mRNA 溶液を 6 $\mu$ l 緩徐に注入した。GFP mRNA を用いた評価で、脳室周囲の神経細胞に広範にタンパク質発現が得られていることを組織学的に確認した。またアルツハイマー病の原因物質として知られるベータアミロイドを分解する酵素であるネプリライシンを発現する mRNA を投与したところ、脳内でのベータアミロイド蓄積量を減少させる効果が得られた(文献 8)。また、同様の手法で抗ベータアミロイド抗体外部から脳内へ mRNA を投与して、脳内での抗体産生が得られることを確認した(文献 12)。生理的に機能するタンパク質が産生されることを示した世界初の報告であり、mRNA 医薬の脳神経疾患への応用に向けた重要な POC となった。

#### 脊髄損傷に対する mRNA 投与

成人の脊髄は一度器質的に損傷を受けると、自律的な回復は難しい。研究代表者らは先行研究で脳由来神経栄養因子(BDNF)を発現するプラスミド DNA をラットおよびマウス脊髄損傷モデルの損傷部位に投与して、有意な運動機能早期回復を確認していたが、これをさらに mRNA に展開した。これまでに得られた成果は以下の通りである。

- ・レポータータンパク発現 mRNA を精製し、調製条件を最適化したナノミセル型キャリア(PEG-PAAspDET/mRNA)を用いて脊髄実質注を行うと、3日目にピークとなる持続的なタンパク発現が確認された。

- ・脳由来神経栄養因子(BDNF)を発現する mRNA を精製し、脊髄損傷モデルマウスの損傷部位へ投与後、下肢の運動機能をマウス歩行解析装置(Catwalk)にて解析すると、投与後数日から無治療群と比べて有意な歩行機能改善の効果が観察された。

- ・BDNF mRNA の脊髄損傷モデルマウスの損傷部位へ投与において、標的細胞を組織学的に解析したところ、アストロサイト、オリゴデンドロサイトいずれも BDNF 陽性を示し、mRNA は複数の細胞種に広く導入されることが示唆された。

- ・ルクソールファストブルー(LFB)染色により髄鞘の評価を行うと、無治療群と比べ、BDNF mRNA 投与群では、有髄線維が有意に多く保たれていることが観察された。

- ・mRNA 投与後の損傷部位でのサイトカイン産生を評価すると、mRNA 投与群ではややサイトカイン産生が増加する傾向があった。本研究では mRNA として天然型を用いたが、将来的にはより免疫原性の低い修飾 mRNA の使用が相応しいと考えられた。

以上の成果は現在国際学術誌に投稿し、査読中である。

また上記と関連して、歩行解析装置(Catwalk)から得られる 100 を超えるパラメータをデータ解析し、マウス歩行機能を経時的に評価する新しい手法を確立した(文献 15)。従来の一般的な歩行機能解析手法である Basso Mouse Scale と比べて、マウス運動機能をより客観的・定量的に評価できる手法として、種々の応用が期待される。

また関連研究として、脊髄損傷モデルマウスに対して、研究代表者らが独自に開発した細胞凝集塊(スフェロイド)培養・移植システムを用いて、BDNF を遺伝子導入した間葉系幹細胞(MSC)スフェロイドの損傷部位への移植による治療実験を行い、治療効果を確認した(文献 7)。MSC からの種々の成長因子、栄養因子、サイトカイン等の液性因子産生がスフェロイド化によって亢進し、脊髄損傷部位での神経保護効果に寄与していることを明らかとした。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 19 件)

Lin CY, Crowley S, Uchida S, Komaki Y, Kataoka K, Itaka K. Treatment of intervertebral disk disease by administration of messenger RNA encoding a cartilage-anabolic transcription factor. *Mol Ther Nucleic Acids* 16: 162-171, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.012> 査読有

位高啓史. mRNA 医薬の研究開発動向と将来展望. *医薬ジャーナル* 55(2): 627-632, 2019 査読無

位高啓史、福島雄大. mRNA 医薬を用いた脳神経疾患の治療戦略. *バイオマテリアル - 生体材料* - 36-3: 220-223, 2018 査読無

Matsui A, Uchida S, Hayashi A, Kataoka K, Itaka K. Prolonged engraftment of transplanted hepatocytes in the liver by transient pro-survival factor supplementation using ex vivo mRNA transfection. *J Control Release*.285:1-11,2018. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.06.033. 査読有

Crowley S, Kataoka K, Itaka K. Combined CatWalk Index: an improved method to measure mouse motor function using the automated gait analysis system. *BMC Research Notes*11:263, 2018 <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3374-x> 査読有

Anraku Y, Kuwahara H, Fukusato Y, Mizoguchi A, Ishii T, Nitta K, Matsumoto Y, Toh K, Miyata K, Uchida S, Nishina K, Osada K, Itaka K, Nishiyama N, Mizusawa H, Yamasoba T, Yokota T, Kataoka K. Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nature Communications* 8: 1001, 2017 doi:10.1038/s41467-017-00952-3 査読有

Uchida S, Yoshinaga N, Yanagihara K, Yuba E, Kataoka K, Itaka K. Designing

immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination. *Biomaterials*. 2018 Jan;150:162-170. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.033 査読有

Perche F, Uchida S, Akiba H, Lin CY, Ikegami M, Dirisala A, Nakashima T, Itaka K, Tsumoto K, Kataoka K. Improved Brain Expression of Anti-Amyloid scFv by Complexation of mRNA Including a Secretion Sequence with PEG-based Block Cationer. *Curr Alzheimer Res*. 2017;14(3):295-302. doi: 10.2174/1567205013666161108110031. 査読有

位高啓史. メッセンジャーRNA 医薬を実現する DDS 開発と疾患治療への応用 *Drug Delivery System (DDS)* 31 (4): 343-351, 2016 査読無

Itaka K. Development of mRNA-based therapeutics. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2016;148(4):190-196. 査読無

Itaka K. Introduction to Special Issue: A New Paradigm of Gene Therapy. *Pharmaceutics* 8(1), 1; 2016. doi:10.3390/pharmaceutics8010001 Editorial 査読有

Lin CY, Perche F, Ikegami M, Uchida S, Kataoka K, Itaka K. 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*. 235:268-75, 2016 doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.001 査読有

Uchida S, Hayakawa K, Ogata T, Tanaka S, Kataoka K, Itaka K. 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. 査読有

Uchida H, Itaka K, Uchida S, Ishii T, Suma T, Miyata K, Oba M, Nishiyama N, Kataoka K. 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):1478-81, 2016 DOI: 10.1021/jacs.5b11726 査読有

Uchida S, Kinoh H, Ishii T, Matsui A, Tockary TA, Takeda KM, Uchida H, Osada K, Itaka K, Kataoka K. Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials*. 82:221-8, 2016 doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.031 査読有

Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung U, Ohba S. 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 査読有

位高啓史, 片岡一則. ナノ DDS の再生医療への展開: mRNA デリバリーによる生体内細胞制御. *細胞工学* 34 (10) 946-951, 2015 査読無

Matsui A, Uchida S, Ishii T, Itaka K, Kataoka K. Messenger RNA-based therapeutics for the treatment of apoptosis-associated diseases. *Sci Rep*. 5:15810, 2015 doi: 10.1038/srep15810. 査読有

Uchida S, Kataoka K, Itaka K. Screening of mRNA Chemical Modification to Maximize Protein Expression with Reduced Immunogenicity. *Pharmaceutics*. 7(3):137-51, 2015 doi: 10.3390/pharmaceutics7030137 査読有

[学会発表](計 29件)

Keiji Itaka. mRNA medicine as a new paradigm of gene therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 6th International mRNA Health Conference. 2018.11.13

Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 3rd International Symposium on Biomedical Engineering 2018.11.8

位高啓史. mRNA 医薬を用いた脳神経疾患治療. 第 37 回日本認知症学会学術集会(シンポジウム 28 認知症に対する核酸医薬の基礎と臨床) 2018.10.14

位高啓史. mRNA が生み出すパラダイムシフト~新たな核酸医薬品開発に向けて~. 第 24 回創剤フォーラム若手研究会(研究会テーマ:創剤研究の未開拓領域・認知症治療薬開発への課題と挑戦) 2018.9.22

Keiji Itaka, Shinsuke Ohba, Satoshi Uchida, Ung-il Chung, Kazunori Kataoka. mRNA-based therapy for cartilage degeneration diseases. 5th TERMIS World Congress 2018.9.5

位高啓史. mRNA 医薬の研究開発動向. 日本核酸医薬学会第 4 回年会 2018.7.10

Samuel Crowley, 内田智士、片岡一則、位高啓史. Treatment of spinal cord injury by injection of therapeutic mRNA-containing nanomicelles. 第 34 回日本 DDS 学会学術集会 2018.6.21

- Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine. 2018.5.26
- Samuel Crowley, Kazunori Kataoka, Keiji Itaka. Enhancement of motor function recovery in mice by delivery of mRNA nanomicelles encoding brain derived neurotrophic factor. 3rd Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (JUFBI 2018) 2018.5.11
- 内田智士, 吉永直人, 柳原歌代子, 弓場奨司, 位高啓史, 片岡一則. 免疫賦活化能を向上させた 2 本鎖メッセンジャーRNA ワクチンの開発. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 2017.11.20
- Keiji Itaka. mRNA-based therapy for intractable diseases and regenerative medicine. 5th International mRNA Health Conference. 2017.11.1
- 位高啓史. mRNA-based therapeutics for intractable diseases and regenerative medicine. 第 23 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2017.7.21
- 内田智士, Federico Perche, 秋葉宏樹, 位高啓史, 津本浩平, 片岡一則. mRNA 搭載ナノミセルを用いた抗アミロイド 単鎖抗体導入によるアルツハイマー病治療. 日本核酸医薬学会第 3 回年会 2017.7.13
- Samuel T. Crowley, Satoshi Uchida, Kazunori Kataoka, Keiji Itaka. Nonviral Delivery of BDNF mRNA Polyplex Improves Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. ASGCT 20th Annual Meeting, 2017.5.12
- Keiji Itaka. mRNA-based therapeutics for intractable diseases and regenerative medicine. TIDES: Oligonucleotide&Peptide Therapeutics 2017.5.1
- Keiji Itaka. mRNA delivery using nano drug delivery systems for intractable diseases and regenerative medicine. Emerging Therapeutics Summit (ETS '16) 2016.11.25
- Keiji Itaka, Chin-Yu Lin, Satoshi Uchida, Kazunori Kataoka. Intracerebral Administration of mRNA for Treating Brain Diseases: An Animal Study for Augmenting Clearance of Beta-Amyloid Using Nprilysin mRNA. 4th International mRNA Conference, 2016.11.2
- 位高啓史. mRNA 医薬品の開発と治療応用に向けた戦略 mRNA-based therapeutics for treating various diseases. 日本薬物動態学会第 31 回会年会 2016.10.15
- 位高啓史. メッセンジャーRNA 医薬を実現する DDS 開発と疾患治療への応用. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016.7.1
- Keiji Itaka. mRNA delivery using nano drug delivery systems for intractable diseases and regenerative medicine. Ireland-Japan Biomaterials & Tissue Engineering Meeting. 2016. 6.23
- 21 Keiji Itaka. mRNA-based therapeutics using nanoDDS for intractable diseases and serious injury. 日米爆傷フォーラム JUFBI 2016 (Japan-US Forum on Blast Injury 2016) 2016.6.14
- 22 位高啓史. ナノ DDS を用いた mRNA デリバリーとその応用. 第 63 回日本実験動物学会総会 (大会) 2016.5.19
- 23 位高啓史. 新しいバイオ医薬品としてのメッセンジャーRNA の可能性. 第 15 回国際バイオテクノロジー展 (BIOTech2016) 2016.5.13
- 24 位高啓史, Hailati Aini, 内田寛邦, 内田智士, 鄭雄一, 大庭伸介, 片岡一則. 転写因子 mRNA の関節内投与による変形性関節症治療 A disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment by introducing mRNA encoding cartilage-anabolic transcription factor. 日本核酸医薬学会 第 1 回年会、2015.12.1
- 25 Keiji Itaka, Hailati Aini, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung, Kazunori Kataoka. A disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment by introducing mRNA encoding cartilage-anabolic transcription factor. 3rd International mRNA Health Conference. 2015.11.14
- 26 位高啓史, 片岡一則. メッセンジャーRNA デリバリーによる運動感覚機能再建. 日本化学会, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、2015.10.13
- 27 位高啓史. 新しいバイオ医薬品としての mRNA. GE Life Sciences Day 2015. 2015.7.24
- 28 位高啓史, 内田智士, 片岡一則. メッセンジャーRNA を用いた新しい遺伝子治療と再生医療への応用. 第 31 回日本 DDS 学会学術集会 2015.7.3
- 29 Keiji Itaka, Miyuki Baba, Hirokuni Uchida, Satoshi Uchida, Kazunori Kataoka. Treating neurological disorders by in vivo mRNA introduction using polyplex nanomicelles. Biomaterials International 2015. 2015.6.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：mRNAを効率よく生体内に送達できるポリイオンコンプレックス並びにこれを用いた関節症の治療薬および治療法  
発明者：位高啓史，大庭伸介，鄭雄一，片岡一則  
権利者：位高啓史  
種類：特許  
番号：特願 2015-151564  
出願年：2015 年  
国内外の別： 国内

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：国立大学法人東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-252488  
出願年：2016 年  
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：国立大学法人東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-252487  
出願年：2016 年  
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ <http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/biofunctions/biofunctions-j.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：緒方徹

ローマ字氏名：OGATA Toru

所属研究機関名：国立障害者リハビリテーションセンター（研究所）

部局名：障害者健康増進・スポーツ科学支援センター

職名：センター長

研究者番号（8桁）：00392192

研究分担者氏名：小牧裕司

ローマ字氏名：KOMAKI Yuji

所属研究機関名：公益財団法人実験動物中央研究所

部局名：実験動物研究部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：10548499

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。