

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：37107

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22972

研究課題名（和文）ゲノム編集RNA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 non-viral vector to realize treatment of hereditary disease using genome editing RNA technology

研究代表者

有馬 英俊（Hidetoshi, Arima）

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50260964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、非ウイルスベクターを用いて、CRISPR mRNAとガイドRNAの三元複合体を肝細胞に導入し、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（TTR-FAP）の根治療法の開発を目指すものである。PAMAM dendrimersに肝細胞へのターゲティングリガンドおよびエンドソーム脱出促進化合物を結合させたGN-PaCを合成し、mRNAとの複合体を作成し、高い遺伝子発現効率を確認した。また、肝細胞特異的にmRNAを導入することで、副作用のリスクを低減し、TTR-FAPの治療効果を示唆した。この技術は他の肝臓由来の遺伝性疾患にも応用可能であり、遺伝子治療の新たな道を拓く可能性を有する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、CRISPR/Cas9技術と非ウイルスベクターを用いた遺伝性難病治療法の開発を目的としており、学術的には、従来のウイルスベクターと比較し、安全性および効率性に優れた肝臓特異的治療法を提案し、遺伝子編集技術の新たな応用可能性を示すものである。社会的意義としては、家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）などの難治性疾患に対する根治療法が期待され、患者およびその家族のQOL向上、医療費削減、並びに患者負担の軽減に寄与する可能性がある。本研究の成果が実現すれば、FAPにとどまらず、肝臓由来の広範な疾患に対する根治療法を提供し得る「夢の治療薬」の創出に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a curative therapy for transthyretin-type familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) by introducing a ternary complex of CRISPR mRNA and guide RNA into hepatocytes using a non-viral vector. We synthesized GN-PaC, PAMAM dendrimers conjugated with a targeting ligand for hepatocytes and an endosome escape-promoting compound, and formed complexes with mRNA, confirming its high gene expression efficiency. The hepatocyte-specific mRNA delivery also reduced the risk of side effects, suggesting the therapeutic potential of TTR-FAP. This technology can be applied to other genetic diseases of liver origin and has the potential to open up new avenues for gene therapy.

研究分野：薬剤学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR mRNA 非ウイルスベクター PAMAM dendrimers シクロデキストリン 肝臓ターゲティング トランスサイレチン アミロイドポリニューロパチー

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患は、その根治療法が確立されていないため、患者およびその家族にとって大きな課題となっている。特に、トランスサイレチン (**TTR**) 型家族性アミロイドポリニューロパチー (**TTR-FAP**) は、肝臓で産生される **TTR** というタンパク質が変異し、全身の神経系や臓器にアミロイドと呼ばれる異常な繊維状構造を形成し、重篤な神経症状や臓器不全を引き起こす遺伝性疾患である。この疾患は進行性であり、治療が遅れると患者の生活の質を著しく低下させ、最終的には生命を脅かす。

現在、**TTR-FAP** の治療法としては、肝臓移植や特定の薬剤治療が一般的である。肝臓移植は、変異した **TTR** の産生を抑制するために有効であるが、ドナー不足や移植後の免疫抑制療法による合併症などの課題が存在する。また、薬剤治療としては、**TTR** 四量体安定化剤や **RNA** 干渉薬 (**siRNA**) などが使用されているが、これらの薬剤は高額であり、生涯にわたる投与が必要である。さらに、これらの治療法は根治療法ではなく、症状の進行を遅らせることしかできない。

このような背景から、根治的な治療法の開発が求められている。特に、近年注目されているゲノム編集技術は、遺伝子の変異を直接修正することで根治療法を実現する可能性がある。**CRISPR/Cas9** システムはその代表的な技術であり、高い精度で特定の遺伝子を切断・修正することができる。しかし、**CRISPR/Cas9** 技術を臨床応用するためには、効率的かつ安全に体内の特定の細胞に遺伝子編集ツールを導入する手段が必要である。

従来、遺伝子治療にはウイルスベクターが主に使用されてきたが、ウイルスベクターは免疫反応や遺伝子挿入による安全性の問題が指摘されている。そこで、我々は非ウイルスベクターに注目した。非ウイルスベクターは、ウイルスを使用しないため、安全性が高く、かつ体内での安定性やターゲティングの改善が期待される。特に、我々が開発した肝実質細胞に薬剤をターゲティング可能なリガンド修飾ポリアミドアミン (**PAMAM**) デンドリマー/シクロデキストリン結合体 (**GN-PaC**) は、肝実質細胞特異的に遺伝子を導入する能力があり、**TTR-FAP** の治療において非常に有望である。

我々の研究は、**CRISPR mRNA** とガイド **RNA** を **GN-PaC** を用いて肝実質細胞に導入し、**TTR-FAP** の原因となる変異遺伝子を直接修正することを目指している。このアプローチは、核内での遺伝子発現が不要であり、細胞核膜を突破する必要がないため、従来の **DNA** ベースの遺伝子編集技術よりも高い効率と安全性が期待できる。また、肝実質細胞特異的な遺伝子導入が可能であるため、副作用のリスクも低減される。

研究開始当初の課題として、**CRISPR mRNA** およびガイド **RNA** の高効率な合成と **GN-PaC** との安定な複合体形成、そしてこれら複合体の肝実質細胞への高効率な導入が挙げられる。これらの課題を克服することで、**TTR-FAP** の根治療法の確立が可能となり、さらには他の肝臓由来の遺伝性疾患に対する治療法の開発にも応用できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に開発した非ウイルスベクターである肝実質細胞にターゲティング可能な **GN-PaC** を用いて、**CRISPR mRNA** とガイド **RNA** の三元複合体を肝実質細胞に導入し、**TTR-FAP** の根治療法を実現することである (**Fig. 1**)。この方法は、従来のウイルスベクターを使用せず、安全性の高い非ウイルスベクターを使用することで、免疫反応や遺伝子挿入による安全性の問題を回避し、高い効率で遺伝子編集を行うことを目指している。さらに、**GN-PaC** は肝実質細胞特異的に遺伝子を導入するため、副作用のリスクを低減し、**CRISPR** 技術により変異遺伝子を直接修正することで、**TTR-FAP** の根本的な治療を目指す。これにより、**TTR-FAP** だけでなく、他の肝臓由来の遺伝性疾患に対する新たな治療法の開発にも寄与することを目的としている。

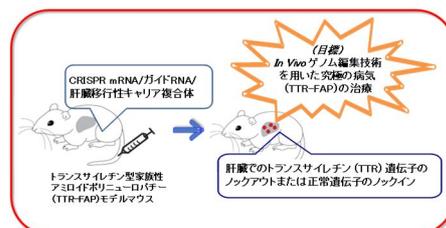


Fig. 1 本研究の目的

3. 研究の方法

(1) **GN-PaC** の合成：**TTR-FAP** の標的細胞である肝細胞の細胞膜上に発現しているアシアロ糖タンパク質受容体への結合および肝細胞内に受容体介在性エンドサイトーシスにより取り込まれた後のエンドソームからの脱出促進を期待して、**PAMAM** デンドリマー (**G3**, **G4**) にラクトースおよび α -シクロデキストリン (α -**CD**) を結合した **GN-PaC(G3, G4)** の合成を行った。 α -**CD** をトシル化後、**PAMAM** デンドリマー (**G3, G4**) とともに **DMSO** に溶解し、**65** で **24** 時間攪拌後、反応物をゲルろ過後、精製した。得られたデンドリマー/シクロデキストリン結合体、ラクトース 1 水和物とシアノ水素化ホウ素ナトリウムをホウ酸緩衝液に溶解後、室温で **3** 時間攪拌した。得られた反応物をゲルろ過後、精製し **GN-PaC** を得た。

(2) **FLuc mRNA** の調製：モデル mRNA として **Firefly luciferase mRNA** を使用した。pCMV-

Luc プラスミド DNA から Transcription Kit を用いて、*in vitro* で mRNA 転写を行った後、mRNA の 3' 末端に poly A を付加した。polyA 付加 mRNA の調製は、変性アガロースゲル電気泳動にて確認した。

(3) mRNA/GN-PaC 複合体の調製と物理化学性質の確認：HBSS に溶解した種々の濃度の GN-PaC に、TE に溶解した FLuc mRNA を添加し、15 分間室温でインキュベートし、複合体を調製した。本反応液に、重層用試薬を添加し、非変性アガロース電気泳動を行った。複合体の物理化学的性質として粒子径、 ζ -電位を測定した。

(4) mRNA/GN-PaC 複合体の培養細胞への mRNA 導入効率：細胞プレートで培養した HepG2 細胞（ヒト肝がん由来細胞）および HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来細胞、コントロール細胞）に FLuc mRNA/GN-PaC 複合体を含む溶液を添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。その後、血清を添加し、さらに 24 時間インキュベートした。インキュベート終了後の細胞を洗浄後、細胞抽出液を調製し、その抽出液中のルシフェラーゼ活性およびタンパク質の定量を行った。また、インキュベーション後の細胞生存率を測定した。

(5) 健常マウスを用いた *in vivo* 実験：CRISPR mRNA/ガイド RNA/GN-PaC 複合体を静脈内投与し、肝臓における TTR mRNA の発現を qPCR で、血中 TTR タンパク質量を ELISA で定量する。

(6) FAP トランスジェニックモデルマウスを用いた *in vivo* 実験：CRISPR mRNA およびガイド RNA の体内動態、ゲノム編集のオンターゲットおよびオフターゲット効果、治療効果（遺伝子発現や病態改善）および安全性を評価する。また、遺伝子編集の正確性と効果を評価するために、サザンブロットおよび次世代シーケンサーを用いて、標的臓器（肝実質細胞）および非標的臓器（肺、膵臓、腎臓、心臓、小腸）を解析する。

4. 研究成果

本研究は、申請者が開発した非ウイルスベクターである GN-PaC を用いて、CRISPR mRNA およびガイド RNA との三元複合体を作成し、TTR-FAP の根治療法を目指したものである。研究は以下のように進展した。

(1) 肝実質細胞特異的な RNA キャリアとして、PAMAM デンドリマー（G3, G4）に -CD とラクトースを結合させた GN-PaC を構築した。GN-PaC として、PAMAM デンドリマー（G3）に -CD 1 分子、ラクトース 1 分子が結合した GN-PaC (G3) および PAMAM デンドリマー（G4）に -CD 1 分子、ラクトース 2 分子が結合した GN-PaC (G4) (Fig. 2) を得た。

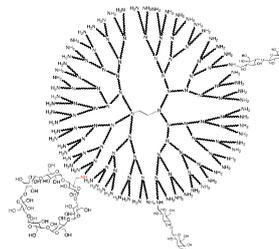


Fig. 2 GN-PaC (G4)の化学構造（推定）

(2) レポーター遺伝子として mRNA の細胞導入能を比較したところ、Cap0 構造を有する mRNA (FLuc mRNA) に比べて、Cap1 構造を有する Fluc mRNA (CleanCap Flux mRNA) の遺伝子発現効率が約 30 倍高いことが示された。このことから、以後 Cap1 構造を有する CleanCap Flux mRNA を使用した。

(3) GN-PaC と CleanCap Flux mRNA との複合体形成について検討した。まず、PAMAM デンドリマー (G3)、PAMAM デンドリマー (G3)、GN-PaC (G3) および GN-PaC (G4) と CleanCap Flux mRNA との複合体形成をアガロース電気泳動により確認したところ、PAMAM デンドリマー (G3) と PAMAM デンドリマー (G4) はチャージ比 (N/P) 比 0.5 以上で完全に複合体を形成した。同様に、GN-PaC (G3) と GN-PaC (G4) も N/P 比 0.5 以上で複合体を形成した。このことから、GN-PaC (G3) と GN-PaC (G4) は PAMAM デンドリマーと同様な CleanCap Flux mRNA との複合体形成能を有することが示唆された。その理由として、GN-PaC (G3) と GN-PaC (G4) の -CD とラクトースの置換度が低かったためと推察される。また、N/P 比 100 で形成した PAMAM デンドリマー (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、約 20 mV のゼータ電位を示し、粒子径は約 1300 nm であった。一方、N/P 比 100 で形成した GN-PaC (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、約 20 mV のゼータ電位を示し、粒子径は約 780 nm であった。また、N/P 比 200 で形成した PAMAM デンドリマー (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、約 19 mV のゼータ電位を示し、粒子径は約 1080 nm であった。一方、N/P 比 200 で形成した GN-PaC (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、約 18 mV のゼータ電位を示し、粒子径は約 920 nm であった。このことより、GN-PaC (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、PAMAM デンドリマー/CleanCap Flux mRNA 複合体と類似した物理化学的性質を有するが、粒子サイズが小さいことが示された。ただし、肝臓の類洞内皮細胞の間隙は約 100 nm であることが知られているため、今後、GN-PaC (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体の粒子径を小さくすることが必要である。

(4) FLuc mRNA/GN-PaC 複合体の培養細胞への CleanCap Flux mRNA の導入効率を検討した。N/P 比 100 で形成した PAMAM デンドリマー (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、PAMAM デンドリマー (G4)/CleanCap Flux mRNA 複合体よりも HepG2 細胞及び HeLa 細胞の両細胞において、高い遺伝子発現を示した。これは、PAMAM デンドリマー (G4)/CleanCap Flux mRNA 複合体の細胞障害性が高いことに起因すると推察される。また、HepG2 細胞において、N/P 比 200 の条件下、GN-PaC (G3)/CleanCap Flux mRNA 複合体は、PAMAM デンド

リマー (**G3**)/**CleanCap Flux mRNA** 複合体よりも高い遺伝子発現を示した。このことから、**GN-PaC (G3)**は、コントロール細胞に比べて肝細胞中で効率よく **mRNA** を発現することが示唆された。また、この遺伝子発現に、複合体調製時の希釈溶媒の種類の影響を受けることが示唆された。**(5, 6)** 肝臓の遺伝子疾患に対する根治療法の確立に向けた成果を得るため、健常マウスおよび **FAP** トランスジェニックモデルマウスを用いて、**CRISPR mRNA** およびガイド **RNA** の体内動態、ゲノム編集のオンターゲットおよびオフターゲット効果、治療効果（遺伝子発現および病態改善）、および安全性を評価する計画を立てたが、研究を実施することはできなかった。

本研究により、**GN-PaC (G3)**と **GN-PaC (G4)**は肝実質細胞に対して **mRNA** 導入能を有することが示唆されたことから、肝臓特異的非ウイルスベクターを用いた **CRISPR** ゲノム編集技術の可能性が示され、今後、**TTR-FAP** の根本的な治療法としての応用が期待される。さらに、この技術は他の肝臓由来の遺伝性疾患にも応用可能であり、遺伝子治療の新たな道を切り拓くことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shigeru Kawakami, Hidetoshi Arima	4. 巻 46
2. 論文標題 Gene and Oligonucleotide Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 100462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masamichi Inoue, Kyosuke Muta, Ahmed Fouad Abdelwahab Mohammed, Risako Onodera, Taishi Higashi, Kenta Ouchi, Mitsuharu Ueda, Yukio Ando, Hidetoshi Arima, Hirofumi Jono, Keiichi Motoyama	4. 巻 45
2. 論文標題 Feasibility Study of Dendrimer-Based TTR-CRISPR pDNA Polyplex for Ocular Amyloidosis in Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1660-1668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masamichi Inoue, Taishi Higashi, Yuya Hayashi, Risako Onodera, Kazuya Fujisawa, Toru Taharabaru, Ryoma Yokoyama, Kenta Ouchi, Yohei Misumi, Mitsuharu Ueda, Yasuteru Inoue, Mineyuki Mizuguchi, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Yukio Ando, Hidetoshi Arima, Keiichi Motoyama, Hirofumi Jono	4. 巻 14
2. 論文標題 Multifunctional Therapeutic Cyclodextrin-Appended Dendrimer Complex for Treatment of Systemic and Localized Amyloidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Appl Mater Interfaces	6. 最初と最後の頁 40599-40611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmi.2c09913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aiko Sakai, Yuki Yamashita, Shogo Misumi, Naoki Kishimoto, Risako Onodera, Taishi Higashi, Hidetoshi Arima, Keiichi Motoyama	4. 巻 13
2. 論文標題 Nanoparticles of folic acid-methyl-β-cyclodextrin (FA-MβCD)/adamantane-albumin exhibit enhanced antitumor activity compared with FA-MβCD alone	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 233-245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yusei Yamada, Toru Miwa, Masaki Nakashima, Aina Shirakawa, Akira Ishii, Nanami Namba, Yuki Kondo, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Keiichi Motoyama, Taishi Higashi, Hidetoshi Arima, Yoichi Ishitsuka et al.	4. 巻 155
2. 論文標題 Fine-tuned cholesterol solubilizer, mono-6-O- α -D-maltosyl- β -cyclodextrin, ameliorates experimental Niemann-Pick disease type C without hearing loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 113698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidetoshi Arima	4. 巻 13
2. 論文標題 Twenty Years of Research on Cyclodextrin Conjugates with PAMAM Dendrimers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13050697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 秦 萌花、大山 将大、山本 剛史、北岸 宏亮、川上 茂、有馬 英俊、山吉 麻子
2. 発表標題 化学修飾デンドリマーを用いたmRNA医薬の細胞内デリバリー
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有馬 英俊
2. 発表標題 製剤・創剤における人工知能の利活用
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有馬 英俊
2. 発表標題 -シクロデキストリン及びその誘導体の複合体形成自由エネルギーの機械学習による簡易予測
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 有馬 英俊
2. 発表標題 核酸医薬DDS入門
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有馬英俊
2. 発表標題 機械学習を用いたシクロデキストリン複合体形成自由エネルギーの簡易予測
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 有馬英俊
2. 発表標題 創剤と医療におけるAI活用の概要
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村順也、有馬英俊、香月正明、入倉 充
2. 発表標題 機械学習を用いたシクロデキストリン誘導体の複合体形成自由エネルギーの予測
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidetoshi Arima
2. 発表標題 Potential Application of Cyclodextrins as Targeted Drug Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients
3. 学会等名 10th Asian Cyclodextrin Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>第一薬科大学薬学部先端医薬データ研究センター https://www.daiichi-cps.ac.jp/education/lab/454/</p>
--

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
研究分担者	城野 博史 (Jono Hirofumi) (40515483)	熊本大学・病院・准教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	北岸 宏亮 (Hiroaki Kitagishi) (60448090)	同志社大学・理工学部・教授 (34310)	

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