

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18378

研究課題名(和文) Fine-tuning of polymer amphiphile for high performance of messenger RNA delivery

研究課題名(英文) Fine-tuning of polymer amphiphile for high performance of messenger RNA delivery

研究代表者

Kim HyunJin (Kim, HyunJin)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教

研究者番号：10755002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：幅広いmRNA治療への適用のために、この提案は両親媒性カチオンポリマーを新たに開発した。このポリマーは、エンドソーム回避可能部分と疎水性部分で構成されている。疎水性部分は、細胞外環境でのmRNAがロードされたナノ粒子の安定性と細胞質でmRNAの迅速な放出との間のバランスを提供する。最高のポリマーは、培養細胞条件で他のコントロールポリマーや市販のリポフェクタミンよりモルシフェラーゼとCas9 mRNAの高い翻訳効果を示した。このポリマーはまた、脳室内投与によって注射されると、マウスの脳に高いルシフェラーゼmRNA翻訳を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

科学的な観点から、この研究はまず、logPに基づく疎水性最適化がポリマーの性能を大幅に向上させることを示唆している。一方、これらのポリマーは、その高い性能により、現在、日本および国際特許に出願されている。これらのポリマーは、日本と米国の2つのベンチャー企業からもライセンス供与された。この研究がCRISPR-Cas9テクノロジーを使用して一部の遺伝子疾患治療に引き続き適用される場合、この提案は特定の患者に多大な利益をもたらすでしょう。

研究成果の概要(英文)：For broad application of mRNA therapeutics, this proposal newly developed cationic amphiphilic polymers. The polymers consist of endosome escapable moiety and hydrophobic moiety. The hydrophobic moiety provides the balance between mRNA-loaded nanoparticle stability in the extracellular environment and rapid release of mRNA in the cytoplasm. The best polymers showed better luciferase and Cas9 mRNA translation efficacy than other control polymers and commercially-available lipofectamine in cultured cell condition. The polymers also induced high firefly mRNA translation in the mouse brain when intracerebroventricularly injected.

研究分野：生体材料

キーワード：カチオン性ポリマー mRNA 配送 CRISPR-Casテクノロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質を一時的に発現する mRNA デリバリーはゲノム工学とタンパク質補充療法における新たなアプローチになる。現在の mRNA の非ウイルス送達技術は、mRNA を脂質ベースおよびポリマーベースの材料に内包され、ナノサイズの粒子を形成する。カチオン性ポリマーは、負電荷の核酸と静電的に結合し、ポリプレックスの形成を可能にする。このポリプレックスシステムは、ヌクレアーゼ消化から mRNA を保護し、細胞への取り込みを高める。(2) mRNA の自然な一時的な発現を補償するには高いトランスフェクション活性が必要である。新しい高性能のポリマーを開発すれば、mRNA ベースの治療法を幅広く適用し臨床試験で使用可能になる。

2. 研究の目的

この提案は、カチオン性ポリマーの疎水性の正確な制御に基づいて、より高性能の新しい両親媒性ポリマーを開発することである。ポリマーの疎水性を操作する小さなライブラリーを作成するために、カチオン性ポリマーにさまざまな疎水性化学部分がインストールされる。単一の mRNA 分子 (通常 800~2,000 ヌクレオチド) は、数十から数百のカチオン性ポリマーと相互作用する。これは、静電力や疎水性力の正確な制御がポリプレックス形成プロセスに劇的に影響することを示唆している。この提案は 2 つの要素を明らかにする。(i) 疎水性部分の化学構造は、ポリマーと mRNA のポリプレックス複合体形成と細胞における mRNA の発現レベルに大きく影響する。(ii) 疎水化ポリマーのオクタノール-水分配係数 ($\log P$) は、これらの指標の 1 つである。そのために、様々なアルキル鎖の鎖長と芳香族化合物の構造が、diethylenetriamine (DET) を持っているカチオン性ポリマーに導入される [図 1]。これらのポリマーは *in vitro* での mRNA の発現レベルを大きく増加させるものである。

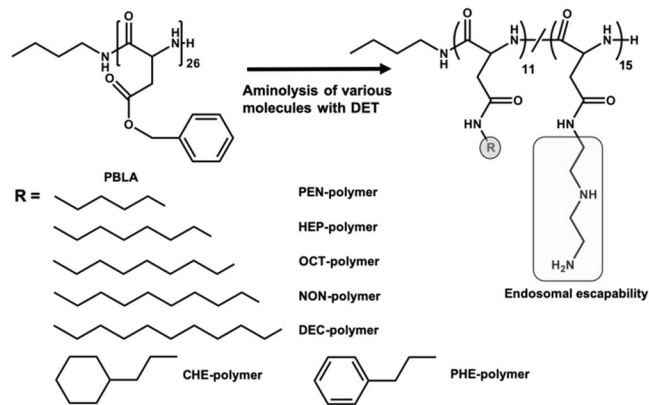


図1. 両親媒性カチオンポリマーの合成スキーム (ACS Cent. Sci. 2019, 5, 1866-1875).

(i) 疎水性部分の化学構造は、ポリマーと mRNA のポリプレックス複合体形成と細胞における mRNA の発現レベルに大きく影響する。(ii) 疎水化ポリマーのオクタノール-水分配係数 ($\log P$) は、これらの指標の 1 つである。そのために、様々なアルキル鎖の鎖長と芳香族化合物の構造が、diethylenetriamine (DET) を持っているカチオン性ポリマーに導入される [図 1]。これらのポリマーは *in vitro* での mRNA の発現レベルを大きく増加させるものである。

3. 研究の方法

この研究は両親媒性カチオンポリマーを得るために DET とアミンを含む疎水性分子 (HM) の co-aminolysis の合成方法を選ぶ [図 1]。DET と HM の導入比率は、DET : HM = 6 : 4 と決定され、最良の mRNA 発現を得られる。両親媒性カチオンポリマーは、様々なアルキル鎖の炭素数、芳香族化合物の構造、および重合度 (DP) を持つように合成される。

(1) 高分子合成: ホモポリマー (poly(-benzyl-L-aspartate)) (PBLA) は、開環重合によって調製される [1]。PBLA は、20~120 の異なる DP で準備される。DET および HM は、アルゴン条件下で PBLA と反応 (co-aminolysis) される。DET と HM の導入比率は、NMR によって確認される。

(2) 細胞のルシフェラーゼアッセイ: 新しく合成されたポリマーは *gaussia luciferase* (GLuc) mRNA とポリプレックスを形成する。次に、このポリプレックスを不死のマウス筋芽細胞 (C2C12) 細胞にトランスフェクションして、ルシフェラーゼ発現レベルを調べる。最高性能のポリマーを選択し、培養細胞における Cas9 mRNA 送達効率を調査する。

(3) オクタノール-水分配係数 ($\log P$) 測定: 両親媒性カチオンポリマーの疎水性は、 $\log P$ を使用して測定する [2]。Alexa647 染料を標識したポリマーを 10 mM HEPES バッファー (pH 7.3) に溶解し、この溶液を、同じ容量の 1-オクタノールと混合される。1-オクタノールおよび HEPES バッファー相における Alexa647 の蛍光強度 (I) を、分光蛍光光度計で測定する。それぞれの I を次式に代入して計算する。 $\log P = \log([1\text{-オクタノールからの } I] / [\text{HEPES バッファーからの } I])$ 。

4. 研究成果

(1) 高分子合成: DP = 26、63、および 121 を持つ 3 つの異なる PBLA を合成した。DP = 26 の PBLA をさらに DET および HM と反応させた。HM は、線状構造で異なる数の炭素原子 (つまり、5、7、8、9、および 10) を持つように選択した。8 炭素原子の場合、シクロヘキシル環 (CHE) とフェニル環 (PHE) も反応した。すべてのポリマーは、側鎖に疎水性アミンの導入率がほぼ同じ (~40%) であることを NMR で確認した。DP = 63 および 121 の PBLA は、約 40% の導入率で DET と CHE 部分を持つように準備された。すべてのポリマーは、NMR および GPC を使用して十分に分析された。一方、各ポリマーの疎水性の $\log P$ 値を測定した。1-オクタノールと HEPES バッファーに分散した Alexa647 の蛍光強度を測定して、 $\log P$ 値を計算した。各ポリマーの $\log P$ 値は -1.9~-2.6 の範囲であった。

(2)ポリプレックスの形成: ポリプレックスサンプルは、両親媒性カチオンポリマーを 10 mM HEPES バッファー (pH 7.3) で GLuc mRNA と混合することにより調製した。ポリプレックスは、約 100 nm の直径と約 0.2 の多分散指数を示した。また、ポリプレックスは約+20 mV の高い表面電位を示した。

(3)細胞のルシフェラーゼアッセイ: ポリプレックスの mRNA 配達効率、C2C12 培養細胞でルシフェラーゼアッセイを使用し測定した[図 2A]。ポリプレックスサンプルを細胞に 50 ng mRNA /ウェルでトランスフェクションし、細胞をその後 24 時間インキュベートした。線状アルキル鎖の HEP、OCT、NON、および DEC ポリプレックスは、PEN および DET ポリプレックスよりも大幅に高い発光強度を示した。これは、高い mRNA トランスフェクションには 5 個以上の炭素を持つアルキル鎖が必要であることを示す。特に、8 つの炭素を持つ OCT-ポリプレックスは、線形シリーズで最高のトランスフェクション効率を示した。8 つの炭素を持つ OCT-、CHE-、および PHE-ポリプレックスを比較すると、CHE-ポリプレックスの発光強度が他のポリプレックスよりも高いことを確認した。この結果は、CHE の疎水性が mRNA を搭載したポリプレックスの安定性に最適なバランスを提供できることを示唆している。一方、DP = 63 および 121 の CHE-ポリプレックスを、DP = 26 の CHE-ポリプレックスと比較した。すべての CHE-ポリプレックスは、似たような GLuc 発現を誘導した。したがって、CHE-ポリマーの DP は、DP = 26~121 の範囲では高レベルの mRNA 発現に影響を与えてない。ポリマーの疎水性と mRNA の翻訳効率の相関関係を理解するために、C2C12 細胞での GLuc mRNA 発現効率を logP に対してプロットした[図 2B]。LogP = -2.3 と -2.4 の間に、GLuc mRNA 発現効率の数値が高くなった。この結果は、両親媒性カチオンポリマーの疎水性が mRNA 送達のために最適化されるべきであることを明確に示す。特に、logP = -2.31 の CHE-ポリマーは、培養細胞条件での mRNA デリバリーのための最適な疎水性のバランスを実現したことを示す。

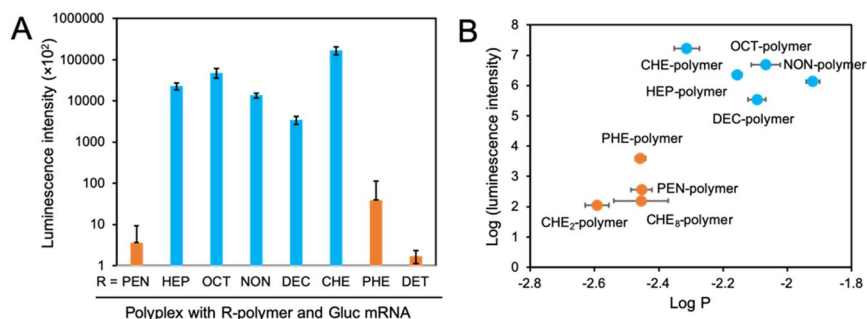


図2. (A) C2C12細胞へのルシフェラーゼアッセイ。(B) logPとGLuc mRNAのルシフェラーゼ発現レベルの関係グラフ。CHE₂およびCHE₆-ポリマーは、CHE部分が10%および30%導入されたCHE-ポリマーを示す。

(4)CHE-ポリプレックスによる in vitro Cas9 mRNA デリバリー: CRISPR/Cas9 テクノロジーは、多種多様な細胞のゲノムをサイト固有に変更することが可能である。Cas9 のヌクレアーゼ活性を、ルシフェラーゼレポータープラスミド DNA 相同性修復 (HDR) アッセイによって調査された[3]。ルシフェラーゼ発光強度の測定により、Cas9 mRNA 活性を推定できる。初めに細胞でレポーター成分 (ガイド RNA、StopFluc レポーター、およびルシフェラーゼドナー) をトランスフェクションした後、24 時間インキュベートした。次に、Cas9 mRNA を含むサンプルを細胞にトランスフェクションし、さらに 24 時間インキュベートした。非処理細胞とレポーター成分だけをトランスフェクションした細胞の発光強度は、それぞれ 190 ± 10 と 390 ± 30 であった。対照的に、CHE-ポリプレックスは、リポフェクタミン (1350 ± 90) および DET-ポリプレックス (420 ± 40) よりも大幅に高い Cas9 ヌクレアーゼ活性 (1800 ± 150) を示し、CHE-ポリプレックスは Cas9 mRNA 配達にも高い効率を示した。陽性対照として Cas9 プラスミド DNA を含むリポフェクタミンでトランスフェクションした細胞は、2380 ± 330 の発光強度を示した。

(5)マウス脳への mRNA 局所送達: さらに、マウス脳における CHE-ポリプレックスの mRNA 送達効果を評価した。Firefly luciferase (FLuc) mRNA を搭載した CHE-ポリプレックスをマウスの脳室内に投与した。脳内の FLuc mRNA のタンパク質発現効率は、投与 4 時間および 24 時間後 IVIS 測定によって定量的に評価された。CHE-ポリプレックスは、リポフェクタミンおよび DET-ポリプレックスと比較して、4 時間でより高い発光強度を示した。CHE-ポリプレックスの発光強度は 24 時間後には FLuc の半減期が短いため、急速に減少した。全体として、本提案は、ポリマーの疎水性と mRNA の翻訳効率の関係を明確に示し、ポリマーの疎水性の最適化に役立つ指標 (logP) を提供する。さらに、最良のポリマーは、局所投与による mRNA ベースの治療法にアプリケーション可能性が高いことを明らかにした。

<引用文献>

1. Miyata, K., Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16287-16294.

2. Rothwell, J. A., Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4355-4360.
3. Nihongaki, Y., Photo-activatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 755-760.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Hyun Jin, Ogura Satomi, Otabe Takahiro, Kamegawa Rimpei, Sato Moritoshi, Kataoka Kazunori, Miyata Kanjiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Fine-Tuning of Hydrophobicity in Amphiphilic Polyaspartamide Derivatives for Rapid and Transient Expression of Messenger RNA Directed Toward Genome Engineering in Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1866 ~ 1875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00843	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 Yi Yu, Kim Hyun Jin, Zheng Meng, Mi Peng, Naito Mitsuru, Kim Beob Soo, Min Hyun Su, Hayashi Kotaro, Perche Federico, Toh Kazuko, Liu Xueying, Mochida Yuki, Kinoh Hiroaki, Cabral Horacio, Miyata Kanjiro, Kataoka Kazunori	4. 巻 295
2. 論文標題 Glucose-linked sub-50-nm unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles for targeted siRNA delivery to glucose transporter 1-overexpressing breast cancer stem-like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 268 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2019.01.006	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Cationic Polymer Synthesis Based on Optimization of Hydrophobicity for mRNA
3. 学会等名 68th SPSJ Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Disease Responsive Nanomedicine-Polymeric Assembly for Oligonucleotide Delivery
3. 学会等名 Korean Chemical Society 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Satomi Ogura, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Cationic Amphiphilic Polymer Development for Cas9 mRNA and its Application
3. 学会等名 Nano Korea 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Development of amphiphilic polymers for CRISPR-Cas9 mRNA delivery
3. 学会等名 5th COINS Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Hyun Su Min, Keisaku Katsushima, Yutaka Kondo, Kanjiro Miyata, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Development of Thiol-Crosslinked Micelle for Systemic Delivery of Antisense Oligonucleotide to Treat Brain Disease
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Tuning of Hydrophobicity in Amphiphilic Polymers for mRNA Delivery and Their Application for CRISPR-Cas9 Technology
3. 学会等名 12th Annual Symposium on Nanobiotechnology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hyun Jin Kim, Moritoshi Sato, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata
2. 発表標題 Adjustment of Hydrophobicity in Amphiphilic Polymers For Highly Efficient Messenger RNA Delivery
3. 学会等名 6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 AMPHIPHILIC POLY(AMINO ACID), BLOCK COPOLYMER USING THE AMPHIPHILIC POLY(AMINO ACID), AND COMPLEX INCLUDING THE AMPHIPHILIC POLY(AMINO ACID) OR THE BLOCK COPOLYMER AND NUCLEIC ACID	発明者 H.J. Kim, K. Miyata, K. Kataoka	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/037555	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 両親媒性ポリアミノ酸、該両親媒性ポリアミノ酸を用いたブロックコポリマー、および該両親媒性ポリアミノ酸または該ブロックコポリマーと核酸とを含む複合体	発明者 キムヒョンジン, 宮田 完二郎, 片岡一則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-178320	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----