

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19888

研究課題名(和文)脳内で神経栄養因子の持続的発現を実現するBBB通過型高分子ミセルの創製

研究課題名(英文)Development of BBB-passable polymeric micelles for sustained expression of neurotrophic factors in the brain

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子を用いた脳機能の再生は、難治性の中樞神経系(CNS)疾患の治療において注目されている。一方で十分量のタンパク質を全身投与により脳内に送達するには、血液脳関門(BBB)と呼ばれる脳内への物質輸送を著しく制限する生体内バリアの通過が必要不可欠となり、未だにチャレンジングな課題である。本研究課題では、研究者らが開発した効率的にBBBを通過する機能を有する高分子ミセルを応用し、「生体内安定性の著しく低いmRNAを全身投与で生体内の局所に送り届け、大量のタンパク質を持続的に産生させること」に成功した。本成果は、脳機能の再生に基づくCNS治療法という全く新しい治療法への展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効な治療法が未確立である脳神経系変性疾患に対して、脳内で所望のタンパク質を産生することによる分子治療という抜本的解決策を提供するものであり極めて大きな意義を有している。これらの方法論は、CNS疾患に留まらずアミノ酸代謝異常など広範な疾患治療に大きく貢献することが確信される。また高分子/材料設計の観点からは、生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置する仕掛けを創り込むなど、独創性に秀でた生体材料設計プロセスを当該分野にもたらす意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of brain function using neurotrophic factors derived from the brain has garnered attention as a treatment for refractory central nervous system (CNS) disorders. However, delivering an adequate quantity of proteins to the brain via systemic administration poses a significant challenge due to the presence of the blood-brain barrier (BBB), a biological barrier that severely restricts substance transport into the brain. In this research project, we successfully utilized highly efficient polymeric micelles capable of traversing the BBB to deliver mRNA with remarkably low in vivo stability to the localized region in the body through systemic administration, thereby facilitating sustained production of a substantial amount of proteins. This accomplishment holds promise for the development of a completely novel treatment approach: an innovative CNS therapy based on the regeneration of brain function.

研究分野：薬剤送達システム

キーワード：薬剤送達システム 血液脳関門 mRNA 高分子ミセル 静電相互作用

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)等の中枢神経系(CNS)疾患の治療において、神経細胞の突起進展やシナプス形成を促進する脳由来神経栄養因子(BDNF)を用いた「脳機能の再生」が注目を集めている。例えば AD では BDNF 発現量が著しく低下しているため、脳内に BDNF を「局所投与」することによる認知機能の改善が報告されている。一方、臨床的観点から現実性の高い「全身投与」による BDNF の脳内送達に関しては、血液脳関門(BBB)と呼ばれる血管内腔から脳実質への物質輸送を著しく制限するバリアの存在により報告例は皆無である。ゆえに CNS 疾患に対して脳機能の再生による治療を奏功するには、BBB を効率的に通過して、脳内で BDNF 濃度を高める革新的技術に基づく治療戦略のパラダイムシフトが必要である。

ここでタンパク質の設計図である Messenger RNA (mRNA) は、細胞内で任意のタンパク質を大量にかつ持続的に産生することができる上、ゲノム DNA に変異を与える心配がなく安全性が高い。そのため、mRNA を脳内細胞に送達できれば、BDNF を大量にかつ持続的に産生することが可能になる。しかし、mRNA を薬物として脳内に送達するためには、医薬品全般に共通した「著しく低い BBB 通過性」の問題に加えて、mRNA が抱える複数の問題「速やかに酵素分解される・細胞室内に侵入できない・免疫原性を有する」を全て克服する必要がある。

2. 研究の目的

我々は、ブロック共重合体の精密設計により、生体適合性・標的指向性・環境応答性を具備した薬物送達システム(DDS)を開発し、体内の疾患部位に薬物を選択的かつ効率的に送達することに成功している。中でも近年、グルコース(Gluc)を表層に搭載した高分子ミセルを構築し、血糖値の精密制御によりグルコーストランスポーター1 (GLUT1)のリサイクリング活性化し、臨床薬の約 600 倍効率的に BBB を通過し、脳内の神経細胞へ送達する革新的方法論を見出している。さらに mRNA 同様に生体内で速やかに酵素分解を受ける核酸医薬(siRNA, ASO)の高分子集合体封入安定化に取り組み、上記の方法論を活用し脳内へ送達し、AD 発症に関連すると考えられる遺伝子発現を有意に抑制することに成功している。

そこで本応募課題では「精密設計した BBB 通過型高分子ミセル技術に基づいて、生体内安定性が低い mRNA を全身投与で脳内に送り届け、神経細胞内で大量の BDNF を持続的に産生させることで、脳機能の再生に基づく革新的 AD 治療法を確立すること」を目的とした(図 1)。

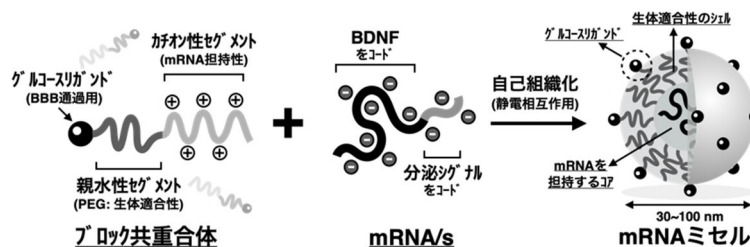


図1. 本課題で構築したmRNAミセルの概念図

3. 研究の方法

以下に記す 4 項目を段階的に進めていき、最終的には全身投与系での適用を目指した。まず細胞外分泌を誘導する分泌シグナルを結合した BDNF(BDNF/s)をコードした mRNA を準備し、Lipofectamine を用いて細胞に導入し、BDNF/s の発現・細胞外分泌量、BDNF 受容体(TrkB)に対する結合をウェスタンブロット法、表面プラズモン共鳴(SPR)法等で評価し機能の確証を得た。続いてアニオン性の mRNA をコアに封入し、BBB を通過するためのリガンドを表層に有する高分子ミセル(mRNA ミセル)を調製するために、PEG の末端にリガンド分子を担持したカチオン性ブロック共重合体を合成した。コアを形成するポリカチオン鎖(エンドソーム膜傷害性を具備)は、カチオン構造の変更などの分子構造の最適化を行い、生体内での安定性や mRNA の翻訳効率を最適化した。続いて調製した Gluc-mRNA ミセルは、基礎物性評価(動的光散乱測定、透過型電子顕微鏡)に加え、ウェスタンブロット法などで in vitro における mRNA の機能評価を行う。次に、マウスに対して Gluc-mRNA ミセルを尾静脈(iv)投与し機能を評価した。送達された mRNA 濃度をリアルタイム定量 PCR 法で定量し、産生されたタンパク質量を上記と同様の方法で定量した。

4. 研究成果

mRNA の調製と機能評価

本研究で提案したシステムを実現するためには、細胞内で標的のタンパク質を発現後に、細胞外へ分泌する必要がある。そこで mRNA のシークエンスに細胞外分泌を誘導する分泌シグナル(Interleukin2 (IL2) 由来ペプチド)を結合した mRNA(mRNA/s)を委託合成した。得られた mRNA/s を lipofectamine を用いて細胞内に導入したところ、十分量の標的タンパク質の生成が確認された。また IL2 受容体を SPR 基板表面に固定し、生成されたタンパク質の認識能を評価したところ

る、IL2 ペプチドをコードしていない mRNA より発現したタンパク質と比べ、mRNA/s を用いて発現したタンパク質は優位に SPR 基板への結合が認められた。これらの結果は、mRNA に IL2 ペプチドをコードすることの有用性を支持する結果である。

Gluc-mRNA ミセルの構築と機能評価

アニオン性の mRNA をコアに封入し、BBB を通過するための Gluc を表層に有する高分子ミセル(Gluc-mRNA ミセル)を調製するために、生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)の末端に Gluc を担持した新規カチオン性ブロック共重合体を合成した。具体的には、既存のカチオン性ブロック共重合体 PEG-ポリリシン(PEG-PLL(NH₃⁺))のアンモニウムカチオン種(NH₃⁺)に対して、PLL 側鎖に N 原子より電子親和力の高い P 原子を中心に配置したホスホニウムカチオン (PR₃⁺, R はベンジル基、メチル基、メトキシ基、フルオロ基)を担持したポリカチオン(PEG-PLL(PR₃⁺))を合成した。合成した高分子構造は、核磁気共鳴法、液体クロマトグラフィーを用いて評価・同定し、単分散性が高く、PLL の重合度が 60 で、添加する PR₃⁺量を変えることで PR₃⁺の導入率を 26、45、75、97%と制御可能であることを確認した。

ここで興味深い点として、PEG-PLL(NH₃⁺)単体は水溶液中で塩(NaCl)濃度に依存して集合体形成しないのに対し、PEG-PLL(PR₃⁺)は塩濃度に応答して単分散な集合体形成が確認された。これは、PR₃⁺の R が疎水性が高い官能基であるために、塩濃度が高くなるにつれてカウンターイオン(Cl⁻)が相互作用し、電氣的にニュートラルになることで静電反発力が減少し、PEG-PLL(PR₃⁺)が自己組織化し集合体を形成することが示唆される。すなわち、イオン強度に応答したカチオン性ブロック共重合体を合成することに成功した。これは、本研究で用いる mRNA がポリアニオンであることから、mRNA と相互作用する際に静電相互作用に加えて、さらに疎水相互作用による高分子ミセルの安定化が期待できる。

続いて、PEG-PLL(PR₃⁺)と mRNA を混合して、集合体化して動的な光散乱測定を行った。その結果、PR₃⁺の導入率が上がるにつれて粒径が小さくなる傾向が確認されたが、おおよそ直径が 40 nm 程度で単分散性の高い高分子ミセルを形成することが明らかになった。ここで分子内で FRET が起きるように異なる蛍光色素を修飾した mRNA を調製し、上記と同様に高分子ミセルを調製したところ、mRNA 単体や PEG-PLL(NH₃⁺)を用いて調製した高分子ミセルと比べて、PR₃⁺を導入することで FRET 効率が向上する、すなわち mRNA が PEG-PLL(PR₃⁺)を用いることでコンパクトに高分子ミセルコアに封入されていることが明らかとなった。

続いて、PR₃⁺の導入率の異なる PEG-PLL(PR₃⁺)を用いて調製した mRNA を封入した高分子ミセルの安定性試験を検討した(図 2)。まずそれぞれの高分子ミセルを 50% ウシ胎児血清(FBS)中で静置し、24 時間後に残存するインタクトな mRNA 量をリアルタイム定量 PCR 法で定量した。その結果、PR₃⁺の導入率増加に伴って、インタクトな mRNA 量が増加することが明らかとなった(図 2(A))。また細胞内でのタンパク質発現量を評価したところ、同様に PR₃⁺の導入率増加に伴って、タンパク質

の発現量が増加することが明らかとなった(図 2(B))。これらの結果を踏まえて、高い安定性とタンパク質発現能を具備した、PR₃⁺の導入率の PEG-PLL(PR₃⁺)を用いて調製した mRNA 封入高分子ミセルを用いて以後の動物実験を実施した。

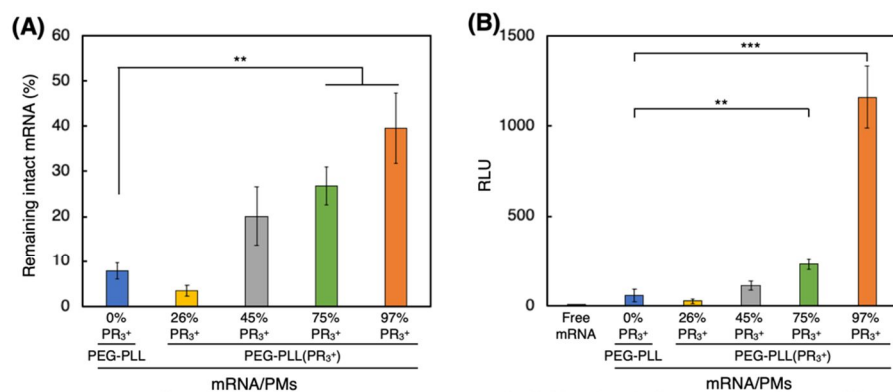


図2. PR₃⁺の導入率の異なる mRNA ミセルの安定性・細胞内タンパク質発現性試験。(A) FBS 中で 24 時間インキュベート後に残存するインタクト mRNA 量の定量。(B) 細胞内タンパク質発現量の定量試験。**p < 0.01 and ***p < 0.001

mRNA ミセルの全身投与による機能評価

上記で構築した mRNA ミセルをマウスに尾静脈(iv)投与し機能評価を行った。本研究では、脳内でのタンパク質産生を目的としているが、まず大腸がんを異所移植した担がんマウスを用いた機能評価を行った。まず血中循環性をリアルタイム定量 PCR 法で評価した。その結果、PEG-PLL(NH₃⁺)を用いて調製した mRNA 高分子ミセルと比べて、PEG-PLL(PR₃⁺)を用いて調製した高分子ミセルは投与 30 分後で約 500 倍以上のインタクトな mRNA が残存することが明らかになった。また腫瘍中におけるタンパク質発現量も PEG-PLL(PR₃⁺)を用いることで 100 倍以上向上することが明らかとなった。

今後は本研究で構築したプラットフォーム技術を基に、脳内でのタンパク質発現について評価を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 高分子集合体を用いた脳神経系疾患の革新的治療技術の開発
3. 学会等名 キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 ナノマシンが拓く革新的な脳神経系疾患治療法の開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳内に薬剤を効率的に送達するBBB通過型ナノマシンの基礎と応用
3. 学会等名 第117回日本精神神経学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳神経系疾患の革新的治療技術開発
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 第4回情報交換会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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