様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2022～2023
課題番号：２２Ｋ１９５４１

研究課題名（和文）生体内でキメラ抗原受容体制御性T細胞を作り出す自己免疫疾患治療のmRNA療法

研究課題名（英文）mRNA therapy for the treatment of autoimmune diseases that produces chimeric antigen receptor regulatory T cells in vivo

研究代表者
Ｃａｂｒａｌ　Ｈｏｒａｃｉｏ（Cabral, Horacio）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：１０５３３９１１

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）：本研究では、抗CD3 F(ab')2抗体でコーティングした高分子ミセルを用いて、制御性T細胞（Treg）を産生するためのmRNAをT細胞に送達した。mRNAは、Foxp3タンパク質をコードするプラスミドからin vitro転写によって調製した。Foxp3タンパク質はTreg表現型を誘導することができる。抗CD3 F(ab')2を導入したミセルは、in vitroとin vivoの両方でCD3+ T細胞を標的としてmRNAを送達した。ミセルはin vitroとin vivoの両方でTregを産生した。改変されたT細胞は、IL-10、IL-4などのサイトカインを分泌し、抗炎症性プロフィールを示した

研究成果の学術的意義や社会的意義
By using micelles to deliver mRNA encoding Foxp3 protein, we can induce Tregs that mediate immunosuppression, which has potential for treating autoimmune diseases, allergies and inflammatory disorders. The approach could reduce costs and burden of cellular therapies by in situ generation of Tregs.

研究成果の概要（英文）：Herein, we used polymeric micelles installed with anti-CD3 F(ab')2 antibodies to effectively deliver mRNA to T cells, aiming to induce the production of regulatory T cells (Tregs). The mRNA was derived from in vitro transcription of a plasmid encoding Foxp3 protein. Foxp3 can facilitate the generation of Tregs, known for their immune regulatory role. The micelles loaded the mRNA by self-assembly in aqueous conditions. Moreover, the surface of the micelles was modified with anti-CD3 F(ab')2 by click chemistry. The resulting micelles were around 100 nm in diamter. These micelles selectively targeted CD3+ T cells, both in vitro and in vivo, resulting in the production of Tregs. Remarkably, the modified T cells displayed an anti-inflammatory profile, characterized by the secretion of cytokines such as IL-10, IL-4, and Tgf-beta. These findings support the potential of this approach for generating immunomodulating T cells in various disease contexts.

研究分野：Drug and gene delivery

キーワード：mRNA　polymeric micelles　in situ Treg　Immunosuppression

１．研究開始当初の背景

Regulatory T cells (Tregs) can mitigate immune-related disorders, such as autoimmune diseases, allergies, and inflammation. Existing methods for inducing Tregs often lack specificity or entail systemic side effects, necessitating the exploration of innovative approaches. Major efforts have been dedicated to generate Treg cells ex vivo and inject them in animal models. Particularly, T cells can be modifed with pDNA encoding FoxP3 and anti-insulin scFv to target pancreas in diabetic mice [1]. However, such approaches are costly and would need personalized preparation of Tregs for each patient. Nanotechnology offers a promising approach for targeted immune modulation by modifying T cells inside the body directly. This approach has been used for generating chimeric antigen receptor (CAR) T cells *in vivo* by delivering mRNA and pDNA. In this regard, mRNA offer significant advantages compared to pDNA due to its higher safety, low insertional mutagenicity and transient protein expression. However, targeted mRNA to T cells in vivo is challenging and most carrier systems, like virus, lipid nanoparticles and polyplexes show high translation in the tissues of the reticuloendothelial system [2]. Therefore, there is an imperative need for nanocarriers that are able to selectively target CD3+ T cells and deliver mRNA to induce antiinflammatory proteins.

２．研究の目的

The purpose of this research is to explore a novel approach for immune modulation *in vivo* by using polymeric micelles as delivery vehicles for mRNA. The delivered mRNA encodes Foxp3, which is a key regulator of Treg development and function. By specifically targeting CD3+ T cells with anti-CD3 F(ab')2 antibodies-coated micelles, the aim is to induce the production of Tregs both in vitro and in vivo. We also seek to investigate the anti-inflammatory profile of the modified T cells. The ultimate goal is to harness the therapeutic potential of Tregs in mitigating immune-related disorders like diabetes while minimizing off-target effects and systemic side effects associated with conventional therapies.

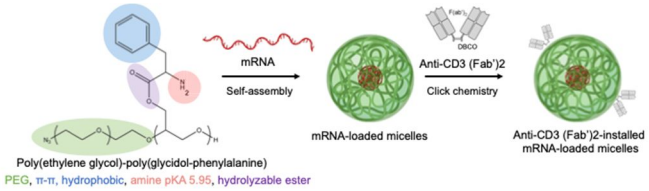

Figure 1. Preparation of anti-CD3 F(ab')2-installed mRNA-loaded micelles for T cell targeting

３．研究の方法

To prepare the micelles, we first synthesized azide-poly(ethylene glycol)-poly(glycidol) block copolymers. These block copolymers were modified with phenylalanine by ester formation between the hydroxyl groups in the poly(glycidol) backbone and the carboxylate in phenylalanine-FMOC. The modified block copolymer was then deprotected by piperidine and purified by dialysis. The polymer was characterized by ^{1}H-NMR and GPC. Next, mRNA encoding Foxp3 protein was prepared through in vitro transcription from a plasmid encoding Foxp3. Moreover, we used mRNA encoding GFP and luciferase (Luc) as reporter agents. The mRNA payload was encapsulated within the micelles just by mixing mRNA and the block copolymers in HEPES buffer at different amine to phosphate (N/P) ratio. The micelle formation and the micelle size were checked by dynamic light scattering (DLS).

The selection of anti-CD3 F(ab')2 antibodies as targeting ligands capitalizes on their specificity for CD3 receptors on T cells, ensuring precise delivery of therapeutic cargo. To introduce anti-CD3 F(ab')2 antibodies, we used click chemistry between the azide group in the polymers and a DBCO moiety that was pre-conjugated to the anti-CD3 F(ab')2 antibodies. The anti-CD3 F(ab')2 antibodies were added at different ratio to the polymers. The conjugation density was checked by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) using Cy5-labeled anti-CD3 F(ab')2 antibodies. The size of the anti-CD3 F(ab')2 antibodies-installed micelles was confirmed by DLS.

To test the micelles in vitro, we cultured CD3+ T cells extracted from mice spleen and exposed them to the micelles carrying the mRNA, followed by assessing the expression of GFP, Luc and Foxp3 protein. The expression of GFP was tested by microscopy and flow cytometry. The expression of Luc was measured by luminescence. And the expression of Foxp3 was assessed by western blotting. Moreover, the secretion of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, IL-4, and Tgf-β, by the modified T cells was evaluated using ELISA.

In vivo, the anti-CD3 F(ab')2 antibodies-installed micelles were administered subcutaneously or intravenously to determine their ability to target T cells. For analyzing the targeting, we used GFP-encoding mRNA as a surrogate and test the GFP-positive fraction of T cells by flow cytometry. To test the micelles delivering Foxp3 mRNA, we stained permeabilized T cells with anti-Foxp3 antibodies and tested by flow cytometry. Moreover, the antii-nflammatory cytokines in blood were tested by ELISA.

4．研究成果

The results obtained from the study highlight several key findings regarding the synthesis and characterization of polymeric micelles, as well as their efficacy in delivering mRNA encoding Foxp3 protein to T cells, both *in vitro* and *in vivo*. Firstly, the synthesis of azide-poly(ethylene glycol)-poly(glycidol) block copolymers modified with phenylalanine, followed by deprotection and purification, yielded polymers with a poly(ethylene glycol) block of 10,000 Da, a poly(glycidol) block of 86 units and 90% of modification with phenylalanine, as confirmed by ^{1}H-NMR and GPC analysis. The polymer allowed the successful preparation of mRNA encoding Foxp3, GFP, and Luc, and their encapsulation within the micelles at different N/P ratios. Particularly, at N/P = 6 we confirmed the formation of uniform micelles of around 100 nm. We then used N/P = 6 for our following experiments [3].

The conjugation of anti-CD3 F(ab')2 antibodies to the micelles using click chemistry was assessed by FCS verified the conjugation density, which reached a plateau at 10% modification of the polymers. This modification degree corresponds to 2-3 anti-CD3 F(ab')2 antibodies on the surface of each micelle. Moreover, DLS confirmed that the size of the anti-CD3 F(ab')2 antibodies-installed micelles was increased to around 120 nm, which corresponds with the expected size.

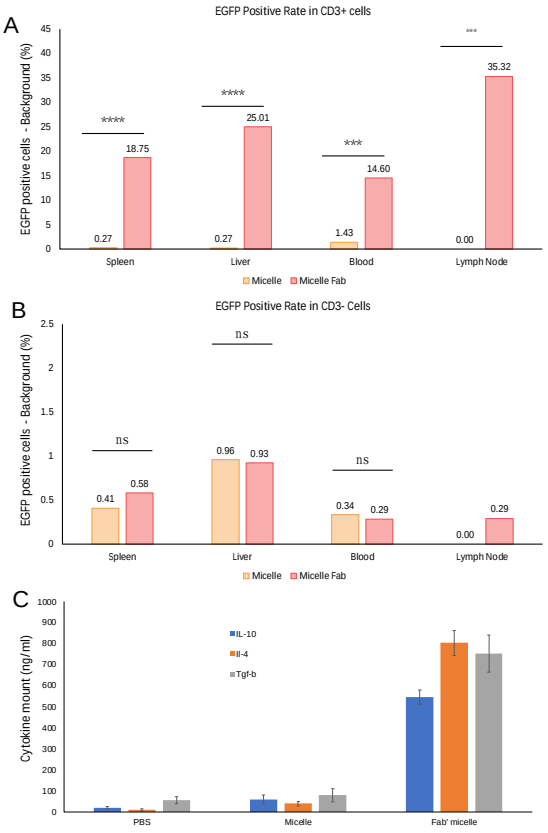

Figure 2. A. GFP expression in CD3+ T cells after intravenous injection of the micelles. B. GFP expression in CD3- T cells after intravenous injection of the micelles. C. Cytokine levels in blood 48 h after injection

In the *in vitro* experiments, the CD3+ T cells exposed to the micelles carrying mRNA encoding Foxp3, GFP, and Luc demonstrated successful transfection and expression of the respective proteins. Particularly, the Foxp3 was detected in the CD3+ cells for more than 24 h. Additionally, the modified T cells with FoxP3 mRNA exhibited secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-4, and Tgf-β), indicating an anti-inflammatory phenotype. Moreover, the selectivity was confirmed by exposing whole splenocytes to the anti-CD3 F(ab')2-installed micelles loading GFP mRNA. The CD3+ T cells showed more that 10-fold higher levels fluorescent levels than the of CD3- cells.

In vivo experiments showed the ability of the anti-CD3 F(ab')2 antibodies-installed micelles to target T cells when administered subcutaneously or intravenously. Flow cytometry analysis confirmed the presence of GFP-positive T cells. Particularly, around 20% and more than 30% of the T cells in the spleen and lymph node of mice, respectively, were modified after systemic injection of the anti-CD3 F(ab')2 antibodies-installed micelles, as determined by flow cytometry (**Figure 2**). On the other hand, non-targeted micelles showed minimal mRNA delivery and negligible protein expression. The Foxp3 expression in T cells was also confirmed by flow cytometry. ELISA assays further confirmed the presence of anti-inflammatory cytokines in the bloodstream (IL-10, IL-4, and Tgf-β) indicating the systemic impact of the modified T cells.

＜引用文献＞

1. M. Tenspolde, et al. *Journal of Autoimmunity,* 103 (2019) 102289
2. W. Yang, et al. *Advanced Healthcare Materials,* 12 (2023) 2202688
3. L. Mixich, et al. *Biomacromolecules* 25 (2024) 1058–1067

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計15件（うち査読付論文　15件／うち国際共著　15件／うちオープンアクセス　11件）

１．著者名 Liu Jing、Cabral Horacio、Mi Peng	４．巻 207
２．論文標題 Nanocarriers address intracellular barriers for efficient drug delivery, overcoming drug resistance, subcellular targeting and controlled release	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	６．最初と最後の頁 115239～115239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.addr.2024.115239	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 Li Shang-Wei、Hsieh Ming-Feng、Hong Taehun、Chen Pengwen、Osada Kensuke、Liu Xueying、Aoki Ichio、Yu Jiashing、Wu Kevin C.-W.、Cabral Horacio	４．巻 4
２．論文標題 Block Copolymer–Stabilized Metal?Organic Framework Hybrids Loading Pd Nanoparticles Enable Tumor Remission Through Near–Infrared Photothermal Therapy	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Advanced NanoBiomed Research	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anbr.202300107	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 該当する

１．著者名 Chen Pengwen、Li Shangwei、Xu Zhining、Cabral Horacio	４．巻 9
２．論文標題 Nanoassemblies of heptamethine cyanine dye-initiated poly(amino acid) enhance ROS generation for effective antitumour phototherapy	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Nanoscale Horizons	６．最初と最後の頁 731～741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3NH00584D	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 該当する

１．著者名 Cabral Horacio、Li Junjie、Miyata Kanjiro、Kataoka Kazunori	４．巻 2
２．論文標題 Controlling the biodistribution and clearance of nanomedicines	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Nature Reviews Bioengineering	６．最初と最後の頁 214～232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s44222-023-00138-1	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 Chen Pengwen、Yang Wenqian、Mochida Yuki、Li Shangwei、Hong Taehun、Kinoh Hiroaki、Kataoka Kazunori、Cabral Horacio	４．巻 63
２．論文標題 Selective Intracellular Delivery of Antibodies in Cancer Cells with Nanocarriers Sensing Endo/Lysosomal Enzymatic Activity	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202317817	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 該当する

１．著者名 Mixich Lucas、Boonstra Eger、Masuda Keita、Li Shang-Wei、Nakashima Yuki、Meng Fanlu、Sakata Momoko、Goda Tatsuro、Uchida Satoshi、Cabral Horacio	４．巻 25
２．論文標題 Ionizable Polymeric Micelles with Phenylalanine Moieties Enhance Intracellular Delivery of Self-Replicating RNA for Long-Lasting Protein Expression In Vivo	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Biomacromolecules	６．最初と最後の頁 1058～1067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.3c01102	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 Yang Wenqian、Miyazaki Takuya、Nakagawa Yasuhiro、Boonstra Eger、Masuda Keita、Nakashima Yuki、Chen Pengwen、Mixich Lucas、Barthelmes Kevin、Matsumoto Akira、Mi Peng、Uchida Satoshi、Cabral Horacio	４．巻 24
２．論文標題 Block catiomers with flanking hydrolyzable tyrosinate groups enhance in vivo mRNA delivery via π?π stacking-assisted micellar assembly	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2023.2170164	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 該当する

１．著者名 Watanabe Takayoshi、Mizuno Hayato Laurence、Norimatsu Jumpei、Obara Takumi、Cabral Horacio、Tsumoto Kouhei、Nakakido Makoto、Kawauchi Daisuke、Anraku Yasutaka	４．巻 15
２．論文標題 Ligand Installation to Polymeric Micelles for Pediatric Brain Tumor Targeting	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Polymers	６．最初と最後の頁 1808～1808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym15071808	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 該当する

1．著者名 Chen Pengwen、Yang Wenqian、Nagaoka Koji、Huang George Lo、Miyazaki Takuya、Hong Taehun、Li Shangwei、Igarashi Kazunori、Takeda Kazuyoshi、Kakimi Kazuhiro、Kataoka Kazunori、Cabral Horacio	4．巻 10
2．論文標題 An IL‐12‐Based Nanocytokine Safely Potentiates Anticancer Immunity through Spatiotemporal Control of Inflammation to Eradicate Advanced Cold Tumors	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Advanced Science	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/advs.202205139	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 該当する

1．著者名 Yang Wenqian、Mixich Lucas、Boonstra Eger、Cabral Horacio	4．巻 -
2．論文標題 Polymer‐Based mRNA Delivery Strategies for Advanced Therapies	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6．最初と最後の頁 2202688～2202688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adhm.202202688	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 該当する

1．著者名 Panagi Myrofora、Mpekris Fotios、Chen Pengwen、、Michael Christina、Fukushima Shigeto、Georgiou Paraskevi、Papageorgis Panagiotis、Papaphilippou Petri Ch.、Koumas Laura、Costeas Paul、Ishii Genichiro、Kojima Motohiro、Kataoka Kazunori、Cabral Horacio、Stylianopoulos Triantafyllos	4．巻 13
2．論文標題 Polymeric micelles effectively reprogram the tumor microenvironment to potentiate nano-immunotherapy in mouse breast cancer models	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Nature Communications	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34744-1	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 該当する

1．著者名 Chen Pengwen、Yang Wenqian、Hong Taehun、Miyazaki Takuya、Dirisala Anjaneyulu、Kataoka Kazunori、Cabral Horacio	4．巻 288
2．論文標題 Nanocarriers escaping from hyperacidified endo/lysosomes in cancer cells allow tumor-targeted intracellular delivery of antibodies to therapeutically inhibit c-MYC	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Biomaterials	6．最初と最後の頁 121748～121748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2022.121748	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 該当する

1．著者名 Miyazaki Takuya、Chen Shaoyi、Florinas Stelios、Igarashi Kazunori、Matsumoto Yu、Yamasoba Tatsuya、Xu Ze-Qi、Wu Herren、Gao Changshou、Kataoka Kazunori、Christie R. James、Cabral Horacio	4．巻 16
2．論文標題 A Hoechst Reporter Enables Visualization of Drug Engagement In Vitro and In Vivo: Toward Safe and Effective Nanodrug Delivery	5．発行年 2022年
3．雑誌名 ACS Nano	6．最初と最後の頁 12290～12304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnano.2c03170	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 Panagi Myrofora、Mpekris Fotios、Chen Pengwen、Voutouri Chrysovalantis、Nakagawa Yasuhiro、Martin John D.、Hiroi Tetsuro、Hashimoto Hiroko、Ishii Genichiro、Kojima Motohiro、Kataoka Kazunori、Cabral Horacio、Stylianopoulos Triantafyllos	4．巻 82
2．論文標題 Abstract 6381: Superior effects of polymeric micelles in reprogramming tumor microenvironment and enhancing nano-immunotherapy	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Cancer Research	6．最初と最後の頁 6381～6381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1538-7445.AM2022-6381	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 該当する

1．著者名 Cabral Horacio、Chen Pengwen、Kakimi Kazuhiko、Kataoka Kazunori、Miyazaki Takuya、Nagaoka Koji	4．巻 82
2．論文標題 Abstract 2072: pH-activatable IL-12-loaded polymeric micelles safely enhance antitumor efficacy as monotherapy and in combination with immune checkpoint inhibitors	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Cancer Research	6．最初と最後の頁 2072～2072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1538-7445.AM2022-2072	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 該当する

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計1件

1．著者名 Boonstra, E., Uchida, S., Cabral, H.	4．発行年 2022年
2．出版社 Springer	5．総ページ数 18
3．書名 Messenger RNA Therapeutics. RNA Technologies	

〔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
研究分担者	持田　祐希 (Mochida Yuki) (60739134)	公益財団法人川崎市産業振興財団（ナノ医療イノベーションセンター）・ナノ医療イノベーションセンター・副主幹研究員 (82731)	
研究分担者	松元　亮 (Matsumoto Akira) (70436541)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授 (12602)	
研究分担者	宮崎　拓也 (Miyazaki Tatsuya) (80844779)	地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト・研究員(任期有) (82718)	

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