

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19895

研究課題名（和文）mRNAのPhotochemical Internalization

研究課題名（英文）Photochemical internalization of mRNAs

研究代表者

大槻 高史（Ohtsuki, Takashi）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授

研究者番号：80321735

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）：標的特異的医薬デリバリー戦略の1つに光でターゲティングする方法が挙げられ、その原理としては、薬剤キャリアと光増感剤を用いたPCIの原理が有望だと考えられる。PCIは、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれてエンドソーム内蓄積する物質を、光と光増感剤の作用により、光依存的にエンドソームから脱出させ、細胞質内に導入する方法である。本研究では、光増感剤搭載型キャリアや「光増感剤+核酸キャリアの組合せ」による光依存的mRNAデリバリー法を確立し、光依存的なゲノム編集や、マウスを用いた光照射領域特異的なmRNAデリバリーにより、本技術の疾患治療への応用可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、光で標的細胞特異的に発現させるmRNAデリバリー法を確立し、mRNA医薬の送達法としての応用可能性を示すものである。mRNAは、遺伝子治療と違ってゲノムへの挿入変異リスクもなく、原理的にどのようなタンパク質でも産生可能であるため、疾患治療用に広範な応用の可能性がある。しかしながら、mRNAは生体内で極めて不安定な物質であり、血中投与や経口投与などで、長い行程を経て標的的特異的に集積させ作用させることは困難である。そのため、本研究のような、mRNAを生分解から守り、高効率な細胞質内デリバリーができて、標的的特異性も兼ね備えるデリバリー技術の開発が必要とされている。

研究成果の概要（英文）：Photochemical internalization (PCI) using drug carriers and photosensitizers is a promising method for photo-mediated target-specific drug delivery. PCI is a method of introducing drugs, which are taken up into cells by endocytosis and accumulate in endosomes, into the cytoplasm by photo-dependent endosomal escape through a reaction in which singlet oxygen is generated by light in the presence of the photosensitizer. In this study, we established a photo-dependent mRNA delivery method using a photosensitizer-loaded carrier or “combination of a photosensitizer and nucleic acid carrier,” and demonstrated the potential of this technology for medical application by the experiments of photo-dependent genome editing and photo-directed mRNA delivery using mice.

研究分野：生体分子工学

キーワード：mRNA PCI 光化学的内在化 光増感剤 光制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

mRNA 医薬に関して近年世界的に研究開発が活発化しており、新型コロナウイルスの感染が拡大した時期に mRNA ワクチンが実用化され、注目を浴びている。mRNA は、遺伝子治療と違ってゲノムへの挿入変異リスクもなく、原理的にどのようなタンパク質でも産生可能であるため、疾患治療用に広範な応用の可能性がある。しかしながら、mRNA は生体内で極めて不安定な物質であり、血中投与や経口投与などで、長い行程を経て標的的特異的に集積させ作用させることは困難である。そこで、mRNA を生分解から守り、高効率な細胞質内デリバリーができて、標的的特異性も兼ね備えるデリバリー技術を開発することが必要とされている。

標的的特異的医薬デリバリー戦略の1つに光でターゲティングする方法が挙げられる。これは、体の表面に加え、内視鏡の届く場所でも使用可能であり、さらには患部を切り開いて光照射する方法もありうる。光でターゲティングする原理としては、薬剤キャリアと光増感剤を用いた photochemical internalization (PCI) が最有力だと考えられる。これは、エンドサイトーシス経路で細胞内に入りエンドソーム内に閉じ込められた薬剤・キャリア複合体を光により（光と光増感剤により生じる ROS の力で）脱出させ細胞質内に導入する方法である。PCI は様々な医薬のデリバリーへの適用に向けて研究されてきた。ところが、mRNA への PCI の適用の報告はごく僅かであり、様々な光増感剤や様々なキャリアを用いた系統的な研究例はなかった。

2. 研究の目的

PCI に基づく mRNA デリバリー法を、様々なキャリア・光増感剤を用いて系統的に比較し、最善な方法を見出すことを目的とする。その際、(1) 汎用的核酸キャリアと光増感剤を組み合わせた方法を検討するとともに、(2) 独自の光増感剤搭載型キャリアを創り、PCI に基づく mRNA デリバリーを可能にする (図1)。(2)のメリットは、キャリアと光増感剤を別々に用いる一般的な PCI 法と比べて、光増感剤がキャリア・mRNA と必ず同じ場所に存在するため、光増感剤の投与濃度を下げることができて光毒性の低減が期待される点である。さらに、最適な「PCI に基づく mRNA デリバリー法」を、光照射領域特異的なゲノム編集や皮膚疾患治療に応用可能であることを示す。

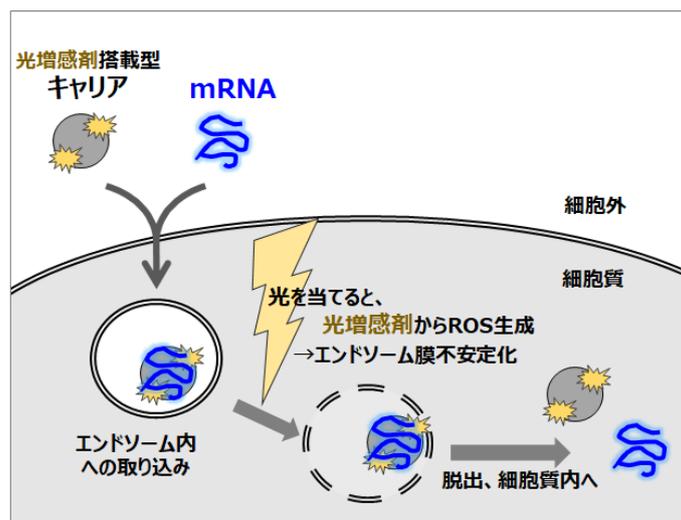


図1. Photochemical internalization (PCI) 法に基づく mRNA の細胞質内デリバリー

3. 研究の方法

(1) キャリア+光増感剤（非一体型）による PCI

カチオン性の脂質、ポリマー、ペプチドなどの代表的核酸キャリアと、光増感剤とを組み合わせ PCI を試し、最良な方法を調べた。光増感剤には、エンドソームに集まりやすく PCI に適していることが知られているものを用いた。ここで求めた最良な方法とは、①タンパク質発現効率が低いこと、②光による発現増強率が高いこと、③細胞のダメージが少ないこと、の3点をバランスよく満たす方法である。HeLa、A431、AsPC1 などのヒト腫瘍由来の培養細胞を用い、これらに対して光増感剤とともにキャリアと緑色蛍光タンパク質 ZsGreen の mRNA を細胞に投与し、16 時間後に光照射し、翌日に ZsGreen の発現を蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにより観察した。導入時に細胞毒性がみられるかどうかは、LDH アッセイ法により調べた。

(2) 光増感剤搭載型キャリア（光増感剤と一体型のキャリア）による PCI

細胞内侵入性をもつペプチドを基材とし、光増感剤とポリエチレングリコール (PEG) を搭載する新規キャリアを作製し、このキャリアと mRNA の複合体を様々な条件により試作・調製した。これらについて、動的分散法 (DLS) により粒径を測定し、電気泳動光散乱よりゼータ電位を測定し、電気泳動により mRNA とキャリアとの結合状態などを調べた。続いて、キャリア・mRNA 複合体を培養細胞に投与し、蛍光タンパク質をコードする mRNA の発現を指標に最適な複合体の型 (ミセル型/静電結合型)、複合体形成条件、投与条件、光増感剤の種類と光照射条件などを

検討を行った。

(3) ゲノム編集

遺伝子治療に CRISPR-Cas9 系ゲノム編集技術を適用する場合、DNA (Cas9 と sgRNA の遺伝子) を用いるとゲノム組み込みのリスクがあるが、RNA (Cas9-mRNA と sgRNA) なら、そのリスクは回避できる。さらに、光で標的的特異的にゲノム編集ができれば治療応用のうえで有望である。そこで、上記キャリアを用いて、培養細胞に対して Cas9-mRNA と sgRNA の同時導入を行い、光照射領域特異的なゲノム編集を試みた。ゲノム編集については、T7E1 法により確認した。

(4) *in vivo* 実験による mRNA 医薬としての可能性の実証

マウス皮内の標的細胞への mRNA 導入を試みた。動物皮膚を剃毛し、シリンジ針またはマイクロニードルを用いてキャリア・mRNA 複合体を投与し、光照射を行った。Luciferase をコードした mRNA を用い、光特異的なタンパク質発現を顕微鏡および発光イメージャーにより観察を行った。

4. 研究成果

(1) キャリア+光増感剤 (非一体型) による PCI

高分子、ペプチド、脂質からなるいくつかの核酸キャリアが、HeLa 細胞における mRNA の光依存的細胞質内デリバリーに使用できるかどうかを調べた。光増感剤とともにキャリア、mRNA を細胞に投与し、光照射後、翌日に観察した。特許出願の可能性があるため、現時点ではキャリア名を A~F の記号で記す。キャリア A, B は、カチオン性ポリマーをベースとした核酸キャリアとして伝統的に使用されてきた。しかし、0.26-2.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (N/P 比 1-8) の濃度のキャリア A は、光照射によっても ZsGreen の発現を誘導できなかった (図 2 a)。N/P 比が 16 以上のキャリア A を用いた場合、光照射により ZsGreen の発現がわずかに促進されたが、未照射細胞と比較して有意差は認められなかった。同様の結果は、カチオン性ペプチドであるキャリア E を核酸キャリアとして用いた場合にもみられた。1.06-8.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のキャリア E (N/P=1-8) は、HeLa 細胞に光照射しても ZsGreen の発現を誘導できなかった。キャリア E について、N/P 比 16-64 でも調べたが、光照射の有無にかかわらず ZsGreen の発現は観察されなかった。N/P 比 32-64 では、細胞は明らかに損傷し、細胞数は減少した。カチオン性脂質をベースとする代表的な核酸キャリアの一つであるキャリア C についても調べた。ZsGreen の発現効率は、N/P 比が大きくなるにつれて、特に 4 以上では増加したが、光に依存した増加は観察されなかった (図 2 c)。また、最近の代表的な mRNA トランスフェクション試薬であるキャリア F の使用についても検討した。光照射は細胞損傷を増加させ、ZsGreen 発現を増加させなかった。DOTAP とキャリア F 自体は mRNA の細胞内送達を可能にしたが、PCI を介した増強は促進しなかったことから、これらのキャリアにおいて、キャリア/mRNA 複合体のエンドソーム脱出は細胞質内送達の主要なボトルネックではないことが示唆された。

キャリア B は、キャリア A, C, E, F に比べて、PCI を介した mRNA 発現増強にかなり適していた。非照射条件では、mRNA 発現レベルはキャリア B 濃度 (N/P 比) が増加するにつれて増加したが、HeLa 細胞では N/P 比=8 でも低かった (図 2 b)。一方、光を照射すると、mRNA 発現量はキャリア B 濃度が低い場合 (N/P 比=1 および 2) の方が、キャリア B 濃度が高い場合 (N/P 比=4 および 8) よりも高かった。これは、光がない場合の N/P 比依存性とは異なっており、N/P 比が 2 から 8 に増加するにつれて mRNA 発現量が減少したことは驚くべきことである。これは過剰のキャリア B が mRNA の発現を阻害するか、あるいは PCI を介した mRNA のエンドソーム脱出が減少したためと考えられる。光による増強について、HeLa 細胞では光依存性 mRNA 発現の至適 N/P 比は 2 であった。この光依存性 mRNA 発現現象は、光増感剤の使用に依存していたことから、PCI メカニズムに基づくものと考えられる。さらに、このキャリア B と光増感剤の併用法が他の細胞株にも適用できるかどうかを調べた。その結果、ヒト表皮がん A431 細胞では N/P 比 1-2、ヒト膵がん AsPC-1 細胞では N/P 比 2-4 で mRNA 発現の光増強が観察された。

キャリア D は、多くの一級および二級アミンを含む官能基を持つポリマーで、キャリア B と類似しているが、より生分解性が高く毒性が低い。このキャリアを用いた場合、光依存性 mRNA 発現に最適な N/P 比は 4 であり (図 2 d)、光未照射の場合と比べて光照射時に 6 倍の発現増強が見られた。キャリア D を用いた方法も、HeLa 以外の細胞株 (A431 および AsPC-1 細胞株) にも適用可能であった。A431 および AsPC-1 細胞の両方で、N/P 比 8 で mRNA 発現の明らかな光増強が観察された。

細胞毒性は、キャリア (キャリア B またはキャリア D) と光増感剤で処理した後に光照射を行い、LDH アッセイで評価した。キャリア B を用いた場合、標準照射量 (1 J/cm²) において、N/P 比 0.25~4 で有意な細胞毒性は観察されなかった。また、キャリア D を用いた場合、1J/cm² における N/P 比 1~8 では有意な細胞毒性は観察されなかった。これらの結果は、mRNA 発現の光増強が起こる条件下では細胞毒性がないことを示している。

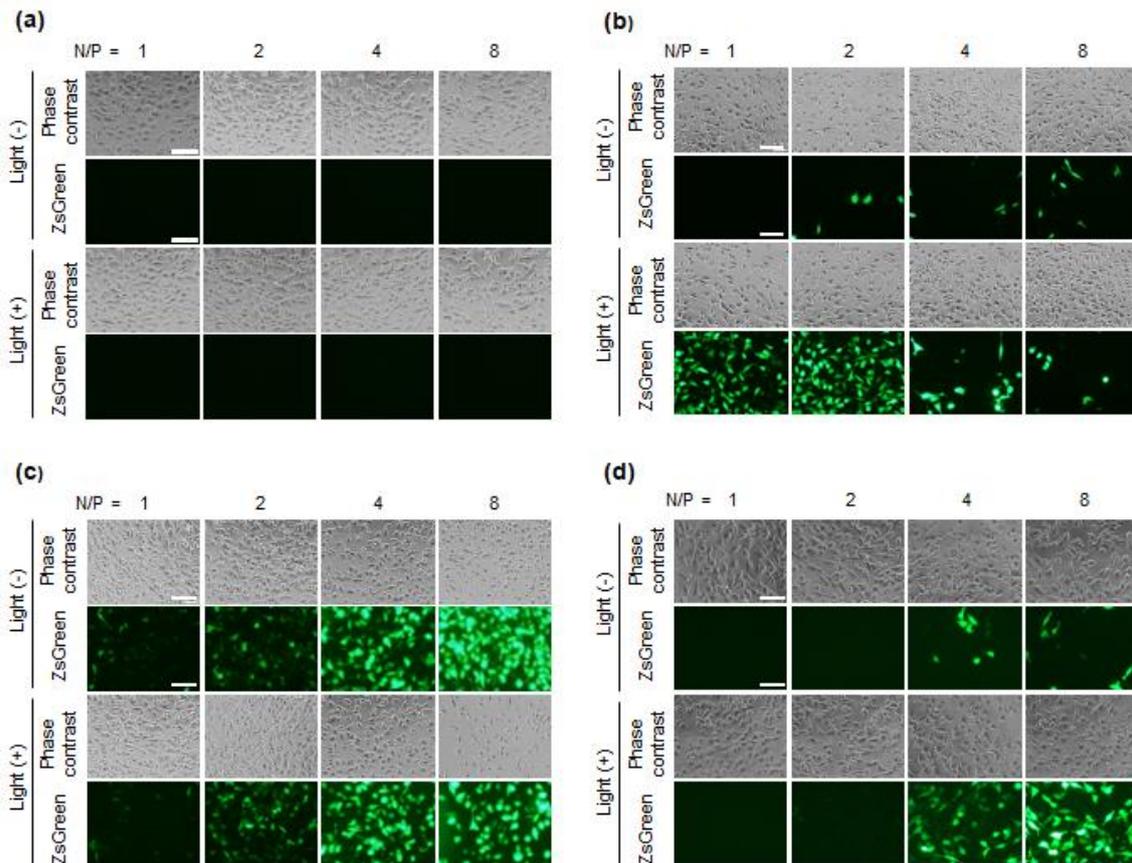


図 2. mRNA 送達の光および N/P 比依存性。HeLa 細胞を ZsGreen mRNA、キャリア分子、光増感剤で処理した後、 1 J/cm^2 の励起光を照射した。(a) キャリア A、(b) キャリア B、(c) キャリア C、(d) キャリア D を用いた。スケールバー、 $100 \mu\text{m}$ 。

(2) 光増感剤搭載型キャリア（光増感剤と一体型のキャリア）による PCI

ペプチド基材を用いた光増感剤搭載型の独自キャリアについて試作検討を行った。RNA との結合を担うカチオン性アミノ酸、細胞外でジスルフィド結合を形成（細胞内で結合が解消）するためのシステイン、などに着目した設計、および、ミセルを形成する両親媒性ペプチドの設計などを行った。これらのペプチドに生体内安定性を付与するポリエチレングリコール（PEG）を付加する設計および作製も行った。これらのペプチドの一部に光増感剤を化学的に結合させ、HPLC で精製を行った。光増感剤を付加したキャリアペプチドと付加していないキャリアペプチドを様々な混合比で mRNA と混合した結果、設計したうち多くのペプチドにおいて mRNA と結合が PAGE 分析により確認された。また、DLS による粒径測定の結果、N/P 比 4~8 くらいにおいて $100\text{-}200 \text{ nm}$ のサイズになるものが多かった。細胞への投与の結果、光依存的に mRNA を運べるキャリアも見つかっている。公表前なので、まだ詳細をここに述べることは避けるが、今後、高効率な光依存的 mRNA 送達に向けてキャリア構造を最適化したうえで特許出願および論文発表を行う予定である。

(3) ゲノム編集

GFP 遺伝子を標的とする sgRNA および、Cas9 をコードする mRNA を転写合成により作製した。この sgRNA および mRNA を光増感剤とともに GFP 安定発現細胞に投与し、光照射を行った。蛍光標識した sgRNA および mRNA を用いた場合、この方法により細胞内へのこれらの RNA の導入が確認された。T7E1 法により解析した結果、低効率ではあるが光依存的にゲノム編集が起こっている傾向がみられた。今後、本技術については用いるキャリアや sgRNA/mRNA と投与濃度など条件検討による改善が必要であるが、ゲノム編集への応用の可能性を示すことはできた。

(4) in vivo 実験による mRNA 医薬としての可能性の実証

ルシフェラーゼをコードする mRNA をキャリア D 誘導体および光増感剤とともにマウスの皮内に投与し、その 3 時間後に 670 nm の赤色光により照射を行った。その結果、光照射部位では未照射部位と比べて 4 倍量のルシフェラーゼの発現が見られた。このことにより、in vivo において（少なくとも皮膚での投与において）PCI に基づく mRNA の投与法の有用性を示すことができた。

以上の研究結果により、photochemical internalization 原理にもとづく光依存的な mRNA デリバリー法を確立し、光依存的なゲノム編集および in vivo での光依存的 mRNA 発現の実験により、本技術の mRNA 医薬送達法としての応用可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Ikawa, Y., Wakai, T., Funahashi, H., Soe, T. H., Watanabe, K., Ohtsuki, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Photo-dependent cytosolic delivery of shRNA into a single blastomere in a mouse embryo.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-40361-9	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 Bando Akinari, Watanabe Kazunori, Ohtsuki Takashi	4. 巻 44
2. 論文標題 Photochemical internalizationに基づく光依存的細胞質内RNA導入法の副作用低減	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine	6. 最初と最後の頁 62～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2530/jslsm.jslsm-44_0004	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 渡邊 和則、大槻 高史	4. 巻 37
2. 論文標題 光応答的なRNA デリバリー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 229-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dd.37.229	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前本隼玖、渡邊和則、大槻高史
2. 発表標題 光増感剤と核酸キャリアの併用による光依存的mRNAデリバリー法
3. 学会等名 第45回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	位高 啓史 (Itaka Keiji) (60292926)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	

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