

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882011

研究課題名(和文) mRNA内包ナノミセルを用いた抗アポトーシス因子導入システムの開発とその治療応用

研究課題名(英文) mRNA-based introduction of anti-apoptotic factors using nanomicelle for therapeutic application

研究代表者

内田 智士(Uchida, Satoshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20710726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：劇症肝炎、脳梗塞、心筋梗塞など様々な難治性疾患に過剰な細胞死が深く関わっている。遺伝子治療を用いることで、細胞死を抑制する因子を生体へ持続的に供給することが可能である。従来、遺伝子治療ではDNAの導入が行われてきたが、本研究ではより安全性の高い方法であるメッセンジャーRNA(mRNA)導入を用いて、細胞死を抑制する治療を行った。劇症肝炎モデルマウスを用いた実験で、mRNA導入がDNA導入と比べて高い治療効果を示したことから、本治療戦略の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Excessive cell death is associated with various intractable diseases such as fulminant hepatitis, stroke, and myocardial infarction. Gene therapy is a promising approach to these diseases, because it can sustainably provide factors that prevent the cell death, in the body. Although DNA delivery is widely used in a field of gene therapy, we performed messenger RNA (mRNA) delivery to prevent cell death in a disease, in this study, because mRNA delivery can avoid some safety concerns that are associated with DNA delivery. In the treatment of mouse model of fulminant hepatitis, mRNA delivery showed enhanced effect compared to DNA delivery. This result demonstrated the feasibility of the mRNA-based strategy for preventing cell death in diseases.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：mRNA導入 高分子ナノミセル 遺伝子治療 抗アポトーシス因子 劇症肝炎 ハイドロダイナミクス法

## 1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎、脳梗塞、心筋梗塞、神経変性疾患などアポトーシスの亢進が病態に深く関わる疾患は多数存在するが、その多くで有効な治療法が確立されていない。これらの疾患に対して、抗アポトーシス因子の導入は優れた治療となりうる。さらに、これらの因子を遺伝子の形で導入することで、持続的な効果が期待される。

このような遺伝子治療では、従来、DNAの導入が広く行われてきた。しかし、DNAは宿主細胞のゲノムに偶発的に挿入される危険性がある。このようなゲノム挿入は、インテグラーゼ機能を持つウイルス性ベクターを用いた場合だけではなく、ウイルスを用いないDNA導入を行った場合でも、一定の確率で観られる(*Gene Ther* 2004, 11, 711)。ゲノム挿入は、挿入された遺伝子の制御不能な発現上昇を引き起こす危険性がある。この危険性は通常の遺伝子治療では問題にならないが、抗アポトーシス因子を導入する場合、その過剰発現は宿主細胞の癌化の原因となりうる。

そこで、ゲノム挿入の危険性の無いメッセンジャーRNA (mRNA)の導入に着目した。mRNA導入は安全性が高いだけでなく、タンパク質発現に細胞核への移行が不要であり非分裂細胞にも効率的に導入できるという利点を持ち、近年注目を集めている(*Nat Rev Drug Discov* 2014, 13, 759)。一方で、mRNAには、生体内で速やかに酵素分解を受ける、免疫原性が強いといった問題点があり、生体への *in vivo* mRNA 導入に関する報告はほとんどなかった。これに対して、研究代表者らは以前、生体適合性ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)に覆われた高分子ナノミセルに mRNA を内包させることで、これらの問題を回避し(図 1)、マウス・ラットの中枢神経系に対して、投与に伴う炎症を抑えたまま、効率的かつ持続的にタンパク質発現を得ることに成功した(*PLoS One* 2013, 8, e56220)。

## 2. 研究の目的

以上のような背景に基づいて、本研究ではナノミセルを用いた *in vivo* mRNA 導入により、アポトーシス関連疾患を治療することを目的とした。ここでは、劇症肝炎を標的とした。本疾患は、主に肝炎ウイルス、薬剤、自己免疫が原因で肝細胞機能が著しく低下し、黄疸、出血傾向、精神症状といった肝不全症状をきたす。成因に対する治療、及び肝庇護療法が行われるが、致死率が高い。その病態には、広範にわたる肝細胞のアポトーシスが深く関わっており、アポトーシスの抑制は優れた治療となりうる。

本研究では、まずナノミセルを用いて mRNA をマウス肝臓へ導入し、mRNA からのタンパク質発現効率や発現の分布に関して詳細な解析を行った。ここでは、従来広く研究が行われてきた DNA 導入との比較も詳細

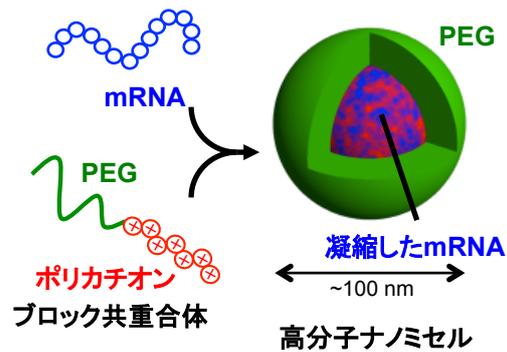


図 1 高分子ナノミセル

に行った。次に、劇症肝炎モデルマウスに対して、抗アポトーシス因子 Bcl-2 発現 mRNA を導入し、その治療効果を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) mRNA の作製

mRNA は、DNA の鋳型から MEGAscript translation kit (Invitrogen)を用いて *in vitro* 転写により作製した。

### (2) 高分子ナノミセルの作製

PEG とポリカチオンのブロック共重合体と mRNA を混合することで、表面に PEG、中心部分に凝縮した mRNA を持つナノミセルを作製した(図 1)。ブロック共重合体のポリカチオン部分には、生分解作用のため毒性が低い PAsp(DET) ポリマーを用いた(*Biomaterials* 2010, 31, 3707)。

### (3) 肝臓へのナノミセルの投与

ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓へナノミセルを導入した。この方法は、多量の核酸溶液を尾静脈より急速に投与することで、静水圧の上昇を利用して肝臓に対して効率的な核酸導入を行うものである(*Gene Ther* 1999, 6, 1258)。ここでは、マウス体重の約 8%にあたる 1.8 ml のナノミセル溶液を 5 秒間で注射した。なお、この手法は現在臨床応用に向けた検討がなされており、大動物への導入、及び臨床試験の報告もある(*Cancer Gene Ther* 2008, 15, 225)。

### (4) 劇症肝炎モデルの作製

Fas リガンドである Jo2 を腹腔内投与することで肝細胞にアポトーシスを惹起した。これは、劇症肝炎モデルとして広く用いられている方法である。非致死モデルでは 5 µg、致死モデルでは 10 µg の Jo2 を投与した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝臓への GFP 発現 mRNA の導入

mRNA の導入はハイドロダイナミクス法により行ったが、この方法では静水圧の上昇を利用して肝臓へ効率的に核酸を取り込ませることが出来る。この方法は従来プラスミド DNA (pDNA)の肝臓への導入に汎用されていたが、その際、pDNA 単体(naked pDNA)の

投与でも非常に効率的なタンパク質発現が得られている。そこで、mRNA 導入の場合もナノミセルを用いた導入の他、mRNA 単体(naked mRNA)の導入も試みた。

まず、レポーター遺伝子として GFP を選択し、肝臓における mRNA からのタンパク質発現の解析を行った。GFP 発現 mRNA をナノミセルに内包して投与したところ、共焦点顕微鏡を用いた観察で肝組織中のほぼすべての細胞に均一な GFP 発現が観られた(図 2)。次に、GFP 発現 pDNA を naked 及びナノミセルの形で投与した。すると、一部の細胞に強い発現を示したものの、他の多くの細胞では全く発現が観られなかった。また、GFP 発現 naked mRNA を投与した際は、ほとんど発現が検出されなかったが、この点については次章 4. (2)で詳しく述べる。

続いて、肝組織中の GFP タンパク質の総量を ELISA 法にて定量したところ、mRNA と pDNA はほぼ同程度の発現量を示した(図 3)。すなわち、mRNA 導入と pDNA 導入ではタンパク質発現の総量は同程度であるものの、その発現の分布において大きく異なることが明らかとなった。

### (2) mRNA 導入におけるナノミセルの機能

pDNA 導入の場合は、naked pDNA と pDNA 内包ナノミセルは、ほぼ同程度の GFP 発現量を示した一方で、mRNA 導入の場合は naked の形ではほとんど GFP 発現は得られなかった(図 2, 3)。

この原因について検証するため、肝臓へ到達した mRNA の量を定量 PCR 法にて評価した。この方法では、両プライマー間の配列が分解を受けていない mRNA しか検出されないため、生体内での mRNA の酵素分解を評価できる。すると、ナノミセルを投与した群で、naked mRNA を投与した群と比べ、100 倍以上の mRNA 量が検出された(図 4)。一方、pDNA を用いて同様の実験を行ったところ、naked pDNA でも pDNA 内包ナノミセルと同程度の値を示した。pDNA と比較して酵素分解を受けやすい mRNA の導入には、ナノミセルなどの適切なキャリアが必要であることが強く示唆された。

また、ナノミセルにおけるタンパク質発現効率を、市販の遺伝子導入試薬と比較した。ナノミセルでは、カチオン性ポリマー-linear polyethyleneimine (LPEI)やカチオン性脂質 lipofectamine を用いた場合と比べて、マウス肝臓に対して有意に高い mRNA 導入効率を示した。この原因として、ナノミセルは生体適合性が高く投与後の炎症反応が軽減されたこと、更に生体内で凝集せず安定に存在できたことが挙げられる。

### (3) 投与した mRNA 及び pDNA の細胞内分布

図 2 に示すように、mRNA と pDNA では発現の分布が大きく異なる。この原因に関して、mRNA は細胞質内でタンパク質を発現する

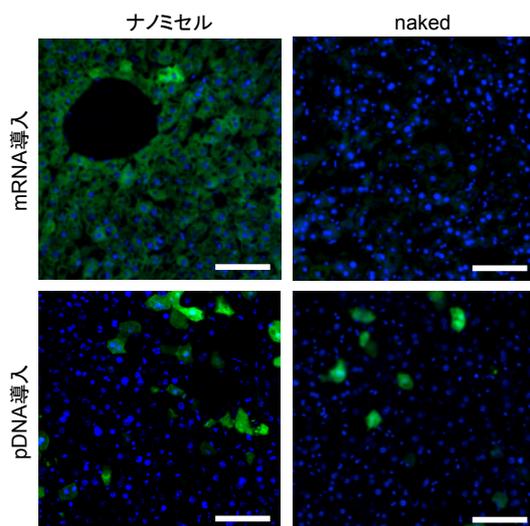


図 2 肝組織中の GFP 発現の分布 投与 24 時間後に共焦点顕微鏡にて観察。緑: GFP、青: 細胞核、スケールバー: 100 μm

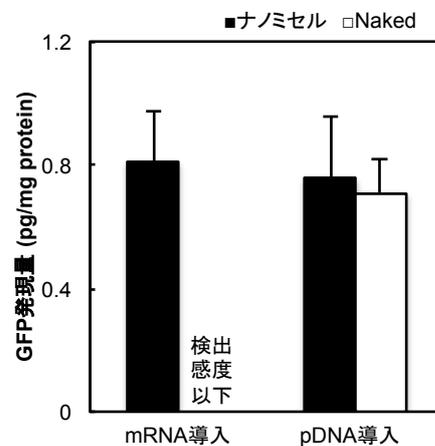


図 3 肝組織中の GFP 発現量 投与 24 時間後に ELISA 法にて定量。N=4.

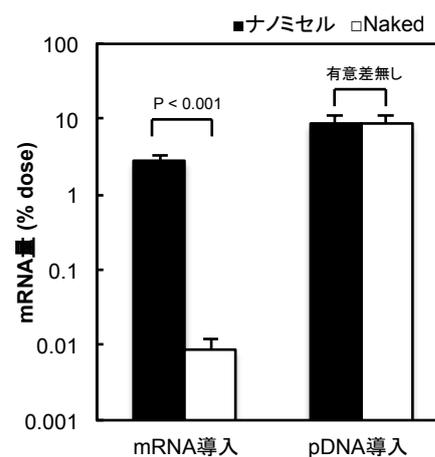


図 4 肝組織中の EGFP 発現 mRNA の量 投与 10 分後に定量 PCR 法で評価。N=5.

のに対して、pDNA ではタンパク質発現に細胞核への移行が必要であるといった違いが想定された。この点を調べるために、Cy5 で蛍光標識した mRNA 及び pDNA を肝臓へ投与した後、肝組織切片を作製し、Cy5 シグナ

ルの細胞内分布を共焦点顕微鏡にて観察した。すると、mRNA、pDNA 共にほぼすべての細胞の細胞質内へ取り込まれていることが観察された(図 5)。一方で、mRNA や pDNA の細胞核への移行は一部の細胞でしか観られなかった。従って、核移行が必要な pDNA 導入では、その過程が障害となり、一部の細胞にしか GFP 発現が得られなかったのに対して、細胞質で発現する mRNA では、すべての細胞に GFP 発現が得られたものと想定された。

図 2 のような GFP の発現分布の違いは、培養細胞へ mRNA 及び pDNA を導入した際にも観られた。このように、mRNA 導入では、標的細胞に均一にタンパク質発現を得られるという、従来の DNA 導入には無い特長を持つことが明らかとなった。

#### (4) 劇症肝炎モデルマウスへの Bcl-2 発現 mRNA の導入

劇症肝炎モデルマウスに対して、抗アポトーシス因子 Bcl-2 発現 mRNA を用いた治療を行った。まず、非致死モデルを用い、肝組織中のアポトーシス細胞の観察を行った。非致死量の Jo2 の腹腔内投与により肝細胞にアポトーシスを惹起し、15 分後にナノミセルを用いて、Bcl-2 発現 mRNA を投与した。その 4 時間後に肝組織切片を作製し、TUNEL 法によりアポトーシス細胞を染色した。すると、mRNA を投与することで、生理食塩水を投与したコントロールと比べて、肝臓におけるアポトーシスが有意に軽減されていることが分かった(図 6)。一方で、naked pDNA を用いて同様の治療を行ったところ、有意なアポトーシスの抑制効果は観られなかった。

最後に、致死性モデルを用いて、生存率の評価を行った。致死量の Jo2 を腹腔内投与した 15 分後に、ナノミセルを用いて Bcl-2 発現 mRNA を投与し、その後マウスの生存期間を評価した。すると、生理食塩水を投与した群と比べて、生存期間が向上する傾向が観られた(図 7)。以上のように、ナノミセルを用いた Bcl-2 発現 mRNA の導入により、劇症肝炎モデルマウスに対して治療効果を示すことが出来た。

#### (6) 遺伝子治療における mRNA 導入の DNA 導入に対する利点

図 3 に示すように、mRNA 導入と DNA 導入でタンパク質発現効率がほぼ同程度であるのにも関わらず、図 6 に示すように、劇症肝炎治療において mRNA 導入により pDNA 導入と比べて高い抗アポトーシス効果が得られた。この原因として、図 2 に示すような mRNA 導入と pDNA 導入の発現分布の違いが想定される(図 2)。すなわち、mRNA ではほぼすべての細胞に Bcl-2 が発現し、抗アポトーシス効果が得られたのに対して、pDNA では多くの細胞に Bcl-2 発現が得られなかったため、治療効果が得られなかったことが強く

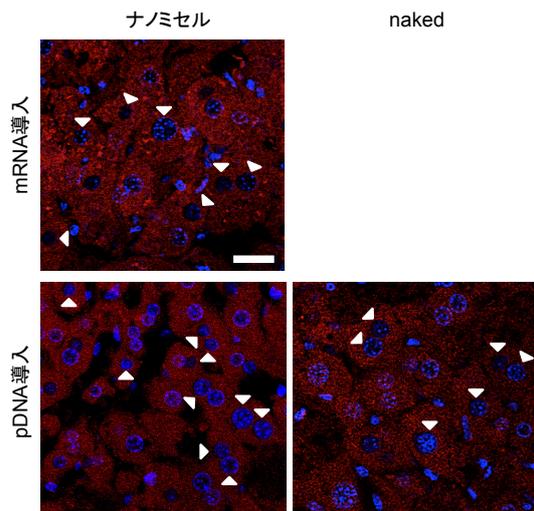


図 5 肝組織中の Cy5 標識 mRNA、pDNA の分布 投与 30 分後に共焦点顕微鏡にて観察。赤: Cy5 標識 mRNA、pDNA、青: 細胞核、スケールバー: 20  $\mu$ m 矢頭は mRNA、pDNA の取り込みがほとんど観られない細胞核。

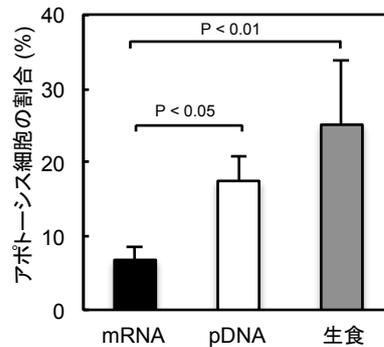


図 6 肝組織中の全細胞に対するアポトーシス細胞の割合 N=6.

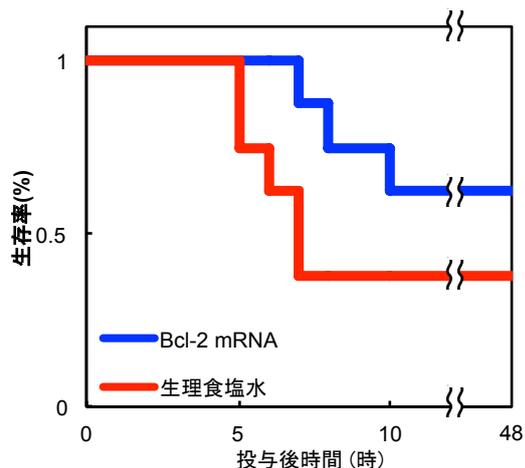


図 7 劇症肝炎モデルマウスの生存率 N=8.

示唆される。

この点は、他の遺伝子治療においても重要である。分泌型の治療因子を発現する遺伝子を導入する際は、タンパク質導入が得られる細胞が標的細胞の一部であっても、その細胞

が治療因子を分泌することで、周囲の細胞に治療効果を及ぼすことが出来る。従って、この場合、DNA 導入でも良い効果が得られる。一方で、Bcl-2 の様な細胞内で作用する因子を導入する際は、しばしばすべての細胞への導入が必要となる。このような場合、均一な発現を誘導できる mRNA 導入が必要となる。

以上のように、本研究ではナノミセルを用いた Bcl-2 発現 mRNA の導入により、劇症肝炎モデルマウスに対して治療効果を得ることに成功した。本システムは致死率の高い当疾患に対して画期的な治療となることが期待される。更に、同様の戦略は、他の様々なアポトーシス関連疾患にも応用できる。

以上の内容は、現在国際誌へ投稿中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Q. Chen, S. Uchida (11 人中 4 番目), A tadpole-shaped gene carrier with distinct phase segregation in a ternary polymeric micelle. *Soft Matter* 11 (14) 2718-2722 (2015) (DOI: 10.1039/C4SM02850C) 査読あり
2. K. Hayakawa, S. Uchida (6 人中 2 番目), Intrathecal injection of a therapeutic gene-containing polyplex to treat spinal cord injury. *J. Control. Release* 197 1-9 (2015) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.10.027) 査読あり
3. A. Dirisala, S. Uchida (13 人中 11 番目), Optimized rod length of polyplex micelles for maximizing transfection efficiency and their performance in systemic gene therapy against stroma-rich pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (20) 5359-5368 (2014) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.037) 査読あり
4. K. Nagata, S. Uchida (6 人中 4 番目), Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J. Control. Release* 183 27-34 (2014) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.021) 査読あり
5. Z. Ge, S. Uchida (15 人中 6 番目), Targeted gene delivery by polyplex micelles with crowded PEG palisade and cRGD moiety for systemic treatment of pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (10) 3416-3426 (2014) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.086) 査読あり
6. S. Uchida (7 人中 1 番目), An injectable spheroid system with genetic modification for cell transplantation therapy. *Biomaterials* 35 (8) 2499-2506 (2014)

(DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.012) 査読あり

7. T. A. Tockary, S. Uchida (13 人中 6 番目), Tethered PEG crowdedness determining shape and blood circulation profile of polyplex micelle gene carriers. *Macromolecules* 46 (16) 6585-6592 (2013) (DOI: 10.1021/ma401093z) 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. S. Uchida, A. Matsui, K. Itaka, K. Kataoka, Messenger RNA (mRNA)-based gene therapy for introduction of an anti-apoptotic factor. ASGCT 18th annual meeting. 平成 27 年 5 月 15 日 New Orleans, LA, USA
2. 内田智士、位高啓史、松井秋倫、早川謙太郎、緒方徹、片岡一則、生体適合性ナノミセルを用いた mRNA デリバリーシステムの開発とその治療応用、遺伝子デリバリー研究会第 14 回夏期セミナー、平成 26 年 8 月 21 日、阿蘇いこいの村、熊本県阿蘇市
3. 内田智士、松井秋倫、石井武彦、位高啓史、片岡一則 mRNA 投与による生体内での細胞アポトーシスシグナル制御第 30 回日本 DDS 学会学術集会、平成 26 年 7 月 30 日、慶應義塾大学、東京都港区
4. S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, Hydrodynamic delivery of mRNA to mouse liver using polyplex nanomicelle. FIRST 合同国際シンポジウム、平成 26 年 2 月 21 日、東京大学、東京都文京区

[図書] (計 1 件)

1. S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, CRC press, Taylor & Francis Group, Drug and gene delivery in the lungs, in Nanoparticles in the lung: environmental exposure and drug delivery, 2015, 225-238 (DOI: 10.1201/b17943)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: タンパク質発現を向上させる方法およびタンパク質発現用組成物

発明者: 位高啓史、片岡一則、池上賢、内田智士、内田寛邦、長田和也

権利者: 一般社団法人医療産業イノベーション機構

種類: 特許、特願

番号: 2014-90634

出願年月日: 平成 26 年 4 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: mRNA 送達用組成物

発明者: 片岡一則、位高啓史、石井武彦、内田寛邦、内田智士、馬場美雪

権利者：一般社団法人医療産業イノベーション機構  
種類：PCT/JP  
番号：2014/53190  
出願年月日：平成 26 年 2 月 12 日  
国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/member/suchida.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

内田 智士 (UCHIDA, Satoshi)  
東京大学大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：20710726

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし