

184. 脳機能再生を誘起する mRNA 搭載高分子ミセルの開発

安楽 泰孝

東京大学 大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻

Key words : 薬剤送達システム, 高分子ミセル, mRNA, 脳, 機能再生

緒言

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 [1]。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、①BBB を効率的に通過して、②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。

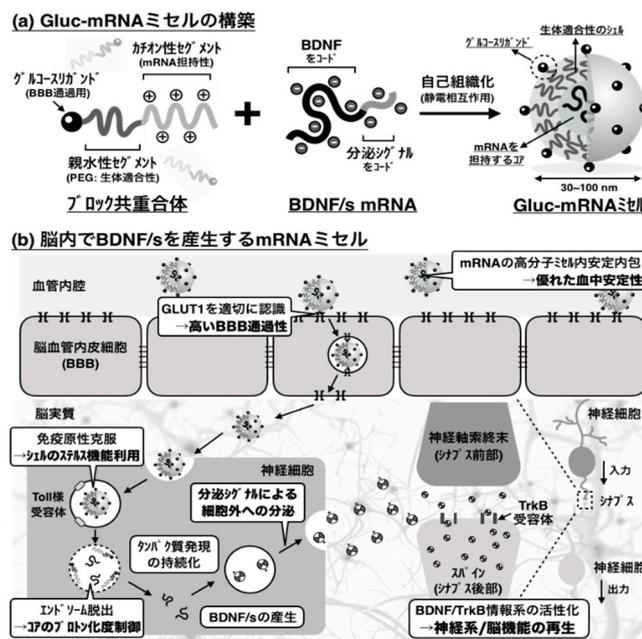


図 1. 本課題の概要

a) mRNAミセルの構築

b) 脳内でタンパク質を産生する mRNA ミセル

そうした中で我々は、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た[2]。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た[3, 4]。また mRNA をポリエチレングリコール(PEG)のシェルで覆われた高分子ミセルに封入することで、mRNAの抱える上記の問題を解決し、生体内でタンパク質を持続的に産生させることに成功している。

そこで本課題では「精密設計したBBB通過型高分子ミセル技術に基づいて、①生体内安定性が低い mRNA を全身投与で脳内に送り届け、②脳内で大量のタンパク質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(図1)」を目的とした。

方法

1. カチオン性ブロック共重合体の合成と評価

アニオン性の mRNA をコアに封入し、BBBを通過するためのリガンド分子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、生体適合性の高いカチオン性ブロック共重合体を合成した(図1a)。ここで、コアを形成するポリカチオン鎖は、既存のアンモニウムカチオンからホスフォニウムカチオンへと構造を変更した。高分子は核磁気共鳴分光法(¹H-NMR)やサイズ排除カラムクロマトグラフィーで評価した。また合成したカチオン性ブロック共重合体が興味深い挙動を示すことが明らかになったため、その挙動を動的光散乱測定(DLS)で評価した。

2. mRNAミセルの構築と機能評価

合成したカチオン性ブロック共重合体とアニオン性の mRNA を任意の割合で混合し、mRNAミセルを形成し、DLS、透過型電子顕微鏡を用いて粒径および形状を同定した。また生理環境における安定性について、蛍光相関分光法(FCS)、定量PCR(RT-qPCR)で評価した。

3. mRNAミセルの全身投与による機能評価

上記の評価で最も安定性が高く、タンパク質発現量の高い mRNA ミセルについて動物実験を実施した。まず、mRNAミセルをマウスに尾静脈投与し、血液を任意の時間に回収し、intactな mRNA を RT-qPCR で定量した。また担がんマウス(大腸がん細胞 C-26 を皮下移植)にも同様に投与し、腫瘍内でのタンパク質発現量を定量した。

4. mRNAミセルの表面修飾と脳内タンパク質発現量評価

生体内での安定性が担保された mRNA ミセルに対して、BBB通過を指向した抗体リガンドを搭載した。ミセルは DLS や FCS を用いてその詳細な物性評価を行った後に、マウスに尾静脈投与し、各臓器におけるタンパク質発現量を定量した。

結果および考察

1. ブロック共重合体の構造最適化検討

まず mRNA ミセルの安定化に向けて、ミセルを構成するブロック共重合体のカチオン性セグメントの構造最

適化を行った。PEG-poly (L-lysine) (PEG-PLys) 側鎖のアミノ基へ 4- (Carboxybutyl) triphenylphosphonium (TPP-COOH) をアミド縮合させることで TPP 基の導入を行った。透析により未反応物を除去し凍結乾燥することで、側鎖に TPP が導入されたブロック共重合体 (PEG-PLys (TPP)) を得た。1H-NMR 測定により側鎖への TPP 導入率を算出したところ、TPP-COOH の添加量に応じて TPP 導入率の異なる 4 種類のブロック共重合体 (PEG-PLys (X% TPP)、X=26、45、75、97) を得たことを確認した。ここで PEG-PLys 側鎖の 97% を疎水的な TPP に置換しても、水溶液中で可溶であり集合体形成が確認されなかった。TPP はカチオン性も有していることから、ブロック共重合体同士の静電反発が疎水性相互作用を上回り、水溶液中での分散が維持されていると推察される。疎水的である TPP の導入率を高めてもブロック共重合体のみで自己集合しないことは、mRNA をミセルコアに封入する上で必要な特性である。一方で、水溶液中の NaCl 濃度を高めていくと TPP 導入率の高いブロック共重合体から順に散乱光強度が増加し、集合体が形成されることを DLS 測定により確認した。形成された集合体はいずれも 50 nm 程度の均一な粒子径であった。Cl⁻イオンが TPP の正電荷を遮蔽することでブロック共重合体同士の静電反発が抑制され、TPP のフェニル基に由来する疎水性相互作用を駆動力としてミセル形成したと推察される。この NaCl 濃度に応じたブロック共重合体の自己集合挙動は、「①TPP 導入率に応じてブロック共重合体の疎水性が高まること」、「②アニオンの存在下でブロック共重合体の疎水性相互作用が促進されること」を示唆している。特に②に関しては、mRNA もアニオン性分子であることから、mRNA ミセルを形成する際に mRNA がブロック共重合体同士の相互作用を促進する接着剤として機能し、ミセル構造安定化に寄与することが期待される。

2. mRNA ミセルの調製及び物性・機能評価

ブロック共重合体と Fluc mRNA を水溶液 (NaCl を含まない 10 mM HEPES) 中で混合し mRNA ミセルを調製した。この際、ブロック共重合体のカチオンと mRNA のアニオンとの電荷比が 3 : 1 となるように攪拌下で混合した。DLS 測定により、各 mRNA ミセルの粒径と多分散指数 (PDI) を評価した。mRNA との混合で 50~60 nm 程度の単分散なミセルが形成された。また粒径に関して TPP 導入に応じて僅かな減少傾向が見られた。そこで、Cy3/Cy5 を両方標識した mRNA をミセル化し、Cy3/Cy5 ペアの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率を指標にしてミセルコアにおける mRNA の凝集度を評価した。PEG-PLys (TPP) は PEG-PLys よりも有意に高い FRET 効率を示すことから、TPP 導入によって mRNA をよりコンパクトに封入でき、ミセルのサイズ減少につながることを示唆された。mRNA のコンパクトな封入には、ブロック共重合体と mRNA、あるいはブロック共重合体同士の相互作用力強化が寄与していると考えられる。

続いて、mRNA ミセルの *in vitro* 安定性を評価した。50% FBS 中でインキュベーション後、残存する intact な mRNA を RT-qPCR により定量した結果、TPP 導入に伴い mRNA ミセル安定性が向上することがわかった (図 2a)。TPP によってミセルコアが安定化されることで、RNase による分解から mRNA を保護できることが示唆された。さらに、培養細胞に mRNA ミセルを添加して 24 時間後、細胞内でのタンパク質発現が増加した (図 2b)。培地中での mRNA ミセルが安定化したことで、細胞内に送達される intact な mRNA が増加し、タンパク質発現向上につながったと考えられる。以上の結果から、TPP 導入により、高い「安定性」と「タンパク質発現効率」を併せ持つ mRNA 送達システムが構築された。

続いて、生体内での mRNA ミセル安定性を評価した。PEG-PLys もしくは PEG-PLys (97% TPP) で形成される mRNA ミセルをマウスに静脈内投与し、経時的に血液を採取後、血液中に残存する intact な mRNA を RT-qPCR で定量した。PEG-PLys の場合、投与後速やかに mRNA が消失したのに対し、PEG-PLys (97% TPP) ではより多くの intact な mRNA が血中に滞留することがわかった (図 3a)。全身投与を介して生体内組織へ mRNA を送達する上で、血中での mRNA 分解抑制が必須である。実際、担癌マウスに mRNA ミセルを静脈内投与したところ、24 時間後の腫瘍組織において PEG-PLys (97% TPP) が PEG-PLys の約 10 倍量のタンパク質発現を達成した (図 3b)。以上の結果から、TPP 導入による安定化効果で、全身投与した mRNA の bioavailability を有意に向上させられることを確認した。

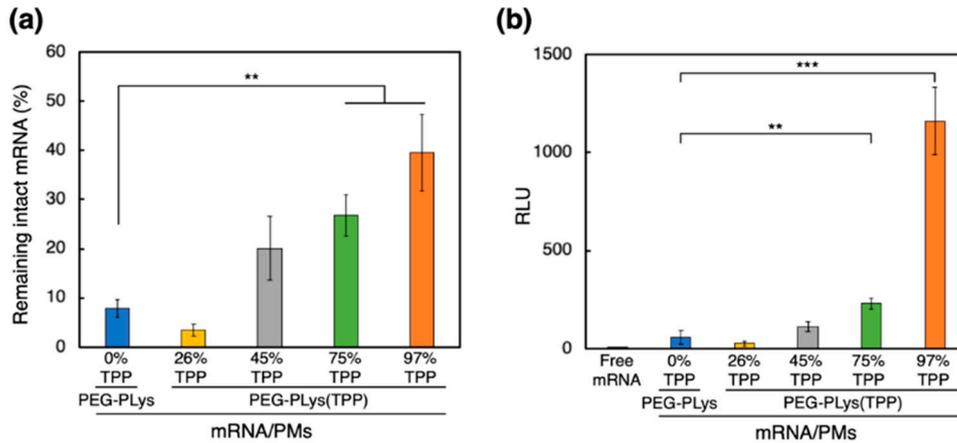


図 2. TPP 導入率の異なる mRNA ミセルの調製及び物性・機能評価

a) mRNA ミセルの 50%FBS 中での安定性評価

b) 細胞内でのタンパク質発現量評価

** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test)

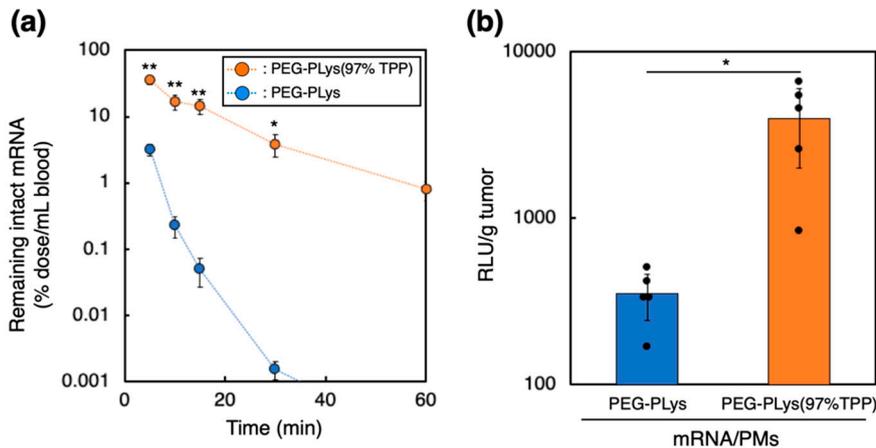


図 3. mRNA ミセルの *in vivo* 試験

a) mRNA ミセルの血中循環性試験

b) mRNA ミセルの腫瘍 (大腸がん) 集積性試験

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (two-tailed Student's t-test)

3. mRNA ミセルへのリガンド修飾検討

脳への効率的な mRNA 送達に向けて、脳血管内皮細胞に高発現する transferrin receptor 1 (TfR1) に対する抗体を mRNA ミセルに修飾した。全長抗体をリガンドとして用いる場合、抗体の分子量の大きさに起因するミセルのサイズ増大、抗体の Fc 領域に起因する免疫細胞による捕捉等の問題が懸念される。そこで本研究では、マウス TfR1 に対する抗体フラグメント (Fab') をリガンド分子として採用した。またミセル表面へのリガンド修飾には Click chemistry を利用した。まず dibenzocyclooctyne (DBCO) 基が導入された Fab' (Fab'-DBCO) を調製した。マウス TfR1 に対する全長抗体 8D3 をタンパク質分解酵素 pepsin により消化することで Fab'² を得た。続いて還元剤 tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) により Fab' を得た。Fab' のチオール基に

DBCO-PEG4-maleimide を反応させることで Fab'-DBCO を取得した。次に、ミセル表面への Fab'修飾を行った。PEG 末端に azide 基を有するブロック共重合体 (azide-PEG-PLys (TPP)) と Fluc mRNA を 10 mM HEPES 中で混合することで、表面に azide 基を有する mRNA ミセルを調製した。表面の azide 基に対し、0.05、0.1、0.2、0.4 等量の Fab'-DBCO を添加し 4℃下で incubation することで Fab'修飾 mRNA ミセル (Fab'-mRNA ミセル) を得た。DLS 測定により、粒子径分布を測定したところ、Fab'-DBCO 添加量に応じて僅かなサイズ増大が見られたものの、いずれの添加量でも 60 nm 程度の均一な粒子径分布を示した。次に、ミセル表面に結合する Fab'の個数を、蛍光相関分光法 (FCS) を用いて評価した。Cy3 色素で標識した Fab'-DBCO を mRNA ミセルに修飾し、FCS でミセル 1 個あたりの Cy3 蛍光強度 (count per molecule) を測定したところ、Fab'-DBCO 添加量依存的に mRNA ミセルへの Fab'修飾数が増加する傾向を確認した。続いて、TfR1 陽性である B16F10 細胞を用いて Fab'修飾の効果を検証した。Cy5 標識 Fluc mRNA を封入した Fab'修飾ミセルを B16F10 細胞に添加し、3 時間インキュベーション後に共焦点顕微鏡観察したところ、Fab'修飾数依存的な mRNA の取り込み増加が確認された。さらに、細胞内で発現した Fluc タンパク質を定量したところ、0.05、0.1 等量の Fab'修飾で有意なタンパク質発現増加が見られた。一方で、0.2 等量以上の Fab'修飾では発現効率が低下した。50% FBS 中での安定性評価において、0.2 等量以上の Fab'修飾で mRNA の安定性低下傾向が見られたことから、過剰な Fab'修飾により mRNA ミセルの安定性が損なわれ、細胞内に送達される intact な mRNA 量が減少したと考えられる。

4. Fab'-mRNA ミセルの脳集積性試験

上記で Fab'搭載量を最適化した Fab'-mRNA ミセルについて、マウスに尾静脈投与し各臓器におけるタンパク質発現量を検討した (図 4)。ここではコントロールとして、Fab'を搭載していない mRNA ミセルを用いた。その結果、脳以外の臓器では Fab'搭載によるタンパク質発現量は、Fab'未搭載の mRNA と大きく差がなかったのに対し、脳では Fab'を搭載することでタンパク質発現量が 10 倍近く増大した。今後は、脳内のどの細胞でタンパク質が発現しているか検証を行う。

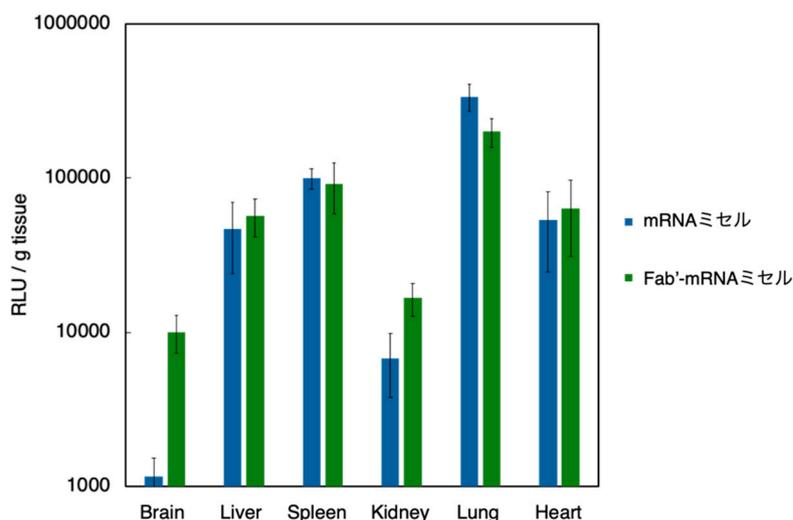


図 4. mRNA ミセルの脳集積性試験

青 : mRNA ミセル

緑 : Fab'-mRNA ミセル

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院工学系研究科の乗松純平氏である。また本研究成果は文献 [5] として公表し、一定の成果を挙げることができた。公益財団法人上原記念生命科学財団の研究助成により滞りなく進行することができたおかげであり、ここに改めて感謝の意を表す。

文 献

- 1) Nagahara, A. H., Merrill, D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M., Wang, L., Blesch, A., Kim, A., Conner, J. M., Rockenstein, E., Chao, M. V., Koo, E. H., Geschwind, D., Masliah, E., Chiba, A. A., Tuszynski, M. H. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 2009, 15, 331–337. PMID: 19198615 DOI: 10.1038/nm.1912
- 2) Anraku, Y., Kuwahara, H., Fukusato, Y., Mizoguchi, A., Ishii, T., Nitta, K., Matsumoto, Y., Toh, K., Miyata, K., Uchida, S., Nishina, K., Osada, K., Itaka, K., Nishiyama, N., Mizusawa, H., Yamasoba, T., Yokota, T., Kataoka, K. Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nature Communications* 2017, 8, 1001. PMID: 29042554 DOI: 10.1038/s41467-017-00952-3
- 3) Min, H. S., Kim, H. J., Naito, M., Ogura, S., Toh, K., Hayashi, K., Kim, B. S., Fukushima, S., Anraku, Y., Miyata, K., Kataoka, K. Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood-Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020, 59, 8173–8180. PMID: 31995252 DOI: 10.1002/anie.201914751
- 4) Zhou, Y., Zhu, F., Liu, Y., Zheng, M., Wang, Y., Zhang, D., Anraku, Y., Zou, Y., Li, J., Wu, H., Pang, X., Tao, W., Shimoni, O., Bush, A. I., Xue, X., Shi B., Blood-brain barrier-penetrating siRNA nanomedicine for Alzheimer's disease therapy. *Sci. Adv.* 2020, 6, eabc7031. PMID: 33036977 DOI: 10.1126/sciadv.abc7031
- 5) 安楽泰孝、乗松純平、水野ローレンス隼斗、特願 2024-004164 (出願日 2024 年 1 月 15 日)