

博士学位論文 要約

DMD 疾患治療に向けた筋ターゲティング型ナノキャリアの開発と 核酸・遺伝子デリバリーへの応用

研究分野	薬 剤 学
指導教授	根 岸 洋一
学位申請者	佐々木 愛理

難治性の遺伝性疾患の1つであるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、出生男児の 3500~5000 人に 1 人の割合で発症する X 染色体連鎖性の遺伝性筋疾患である。DMD の発症は、筋細胞膜直下に存在し、機械的安定性に寄与するジストロフィンタンパクをコードする遺伝子に変異が起こることに起因する。そのため機能的なジストロフィンタンパクが産生されず、筋細胞膜が破壊、変性や壊死が起こることが DMD の主要因だと考えられている。以上の発症機序より、DMD の治療には遺伝子治療法の開発が急務とされてきた。現在最も有力な治療法として、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一種で、高い生体内ヌクレアーゼ耐性を示す核酸誘導体：モルフォリノ核酸 (PMO) を用いたエキソンスキッピング療法 (スプライシング時にエクソン上のナンセンス変異を切り取り、機能するジストロフィンタンパクを合成する方法)が開発され、2016 年に世界初の DMD 治療薬 (Eteplirsen[®]製剤) として FDA に承認された。しかし、PMO は全身投与後に 99%が腎排泄を受けること、さらに細胞内移行性も極めて乏しいため、治療効率の改善が求められている。このような背景を基に、DMD に対する核酸・遺伝子医薬の送達効率を改善することで治療効率を格段に向上させる全身投与が可能な Drug Delivery System (DDS)技術の開発に期待が寄せられている。しかし、実用的な筋ターゲティング型 DDS 開発は、現状ほとんどなされていない。

そこで近年、核酸・遺伝子医薬の送達キャリアとして実用化されている脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticles: LNP) を応用し、DMD 疾患に特化した筋ターゲティング型 DDS の構築を目的として、研究を行った。目的部位への標的指向化を行った DDS キャリアの開発は、効率かつ効果改善のために重要な戦略となる。本研究により、より有望な治療法の開発、さらには今後の核酸・医薬品開発においても有用な情報提供となるものと期待し、本研究に着手した。

本研究では、筋組織へのターゲティングリガンドとして、筋細胞に発現する α ジストログリカンに対して親和性を有する A2G80 ペプチド (共同研究者の本学野水らによって報告されたラミニン α 2 鎖由来断片ペプチド) に着目し、本ペプチドを LNP に表面修飾させた A2G80 ペプチド修飾 LNP の開発、および核酸・遺伝子デリバリーへの応用を目指した。

【第1章】全身投与が可能な A2G80 ペプチド修飾リポソームの開発

第1章では、中性脂質を主な構成脂質とするリポソーム型キャリアとして、A2G80 ペプチド修飾リポソームを作製した。さらに全身投与時におけるリポソームの血中滞留性向上を目的に、リポソーム表面に修飾する polyethylene glycol (PEG) 脂質の分子量（鎖長）に着目し、2種類の異なる組成のリポソームを作製した。これらの物性評価・標的指向性、全身投与後の組織への分布について評価した。

リポソームはマイクロ流体技術とポストインサクション法を用いて、同一 PEG 鎖長のみで構成したリポソーム (A2G80-modified long-chain PEG-coated liposome: A2G80-LP-Lip) および異なる鎖長の PEG を使用したリポソーム (A2G80-modified long- and short-chain PEG-coated liposome: A2G80-LSP-Lip) を作製した。これらは粒子径が約 80 nm と比較的小さな粒子であることが明らかとなった。

A2G80 リポソームと筋組織の相互作用性について、筋組織切片に対し DiI で蛍光標識を施したリポソームを添加する *ex vivo* によるスクリーニング実験により評価した。その結果、正常マウスおよび DMD 疾患モデルマウス (*mdx*) の筋切片に対し、相互作用性を有することが認められた。一方で未修飾 (LP-Lip および LSP-Lip) および A2G80 ペプチドの配列を入れ替えたスクランブル配列ペプチドを修飾したリポソーム (Scr-LP-Lip, Scr-LSP-Lip) 添加群は、顕著な相互作用性は認められなかった。また、筋組織以外への臓器切片へ A2G80 リポソームを添加した際には相互作用性は認められず、未修飾やスクランブル修飾群と差異が認められなかった。以上の結果より、A2G80-LP-Lip および A2G80-LSP-Lip は A2G80 ペプチド配列によって筋組織選択的に相互作用を示すことが明らかとなった。

次に、静脈内投与における本リポソームの筋組織への集積性を検討した。DMD モデルマウスの尾静脈よりリポソームを投与し、24 時間後の集積を観察した。その結果、LP-Lip および LSP-Lip と比較して A2G80-LP-Lip、A2G80-LSP-Lip 投与群では筋組織への高い集積性を認めた。筋切片の単位面積当たりのリポソームの集積量を定量的に解析した結果、A2G80-LSP-Lip 投与群の集積量が有意に高いことが明らかとなった。これは、PEG 脂質の鎖長の影響による血中滞留性の向上が関与した可能性が考えられた。一方で、同様の群を正常マウスに投与しても、いずれの群において筋組織への集積はほとんど認められなかった。

以上の結果が得られた理由について DMD モデルマウスと正常マウスにおける筋組織の形態学的な違いの影響を推察する。DMD モデルマウスは、ジストロフィンタンパク質が欠損していることで筋組織構築の破綻、壊死により炎症が常時誘発され、血管透過性の亢進ならびに筋組織の脆弱性が高まっている状態にあると考えられる。そのため、筋組織深部までの集積が容易となり、さらに A2G80 の標的部位であるジストログリカンが露出するなどのターゲティングしやすい環境が整ったために、DMD モデルマウスでは A2G80-LSP-Lip の集積が認められたが、正常マウスでは認められなかったものと考えられる。更に、我々が開発した A2G80-LSP-Lip の粒子径は一般的なリポソームの粒子サイズ (100 nm) よりも比較的

小さな粒子径（約 80 nm）を有する。そのため脆弱で血管透過性が亢進し、組織構築が破綻している筋組織へより到達しやすく、ペプチドによるターゲティングの増強効果が得られたため、最も顕著な筋組織への集積性を示したと考える。

以上本章の結果から、A2G80-LSP-Lip は、DMD 筋組織に選択的に集積する全身投与型の筋ターゲティングナノキャリアとなり得る事を明らかとした。

【第 2 章】 mRNA を封入した A2G80 ペプチド修飾 LNP の開発と全身投与に伴う遺伝子発現活性の評価

第 2 章では、第 1 章で明らかとした基盤技術を基に、核酸・遺伝子送達により最適な脂質組成へ改良し、全身投与が可能な筋ターゲティング型核酸・遺伝子封入 LNP の開発を試みた。機能性評価のため、レポーター遺伝子として、ホタルルシフェラーゼをコードした mRNA を利用し、A2G80 ペプチド修飾 mRNA 封入 LNP と未修飾 LNP の筋組織における遺伝子発現活性の評価を行った。

前章と同様にマイクロ流体技術とポストインサクション法を用いて作製した A2G80 ペプチド修飾 mRNA 封入 LNP は粒子径が約 100 nm であり、mRNA の LNP 中への封入化効率は約 90%、mRNA の回収率は約 70%を示した。また、LNP の脂質組成については、全身投与に最適な組成とするため、DMD モデルマウスへの静脈内投与を実施し、肝臓など他の臓器への集積が最も抑えられた脂質組成に決定した。

上記評価で決定した LNP 組成を受け、A2G80 を修飾した A2G80-LNP を作製し、DMD モデルマウスおよび正常マウスへ全身投与を行った。その結果、A2G80 ペプチド未修飾の PEG-LNP 投与群と比較して A2G80-LNP 投与群では、DMD モデルマウス骨格筋組織において有意に高いルシフェラーゼ活性を認めた。一方で、正常マウスではいずれの LNP 投与群もルシフェラーゼ活性は低値を示した。これは前章で立てた仮説と同様に、DMD の病態に起因するものと考えられる。以上の結果から、mRNA を封入した LNP においても、DMD 筋組織に選択的なターゲティングが可能であり、DMD 遺伝子治療のための有用なキャリアとなることが明らかとなった。

【総括】

本研究より、A2G80 ペプチドを用いた筋ターゲティングナノキャリアは、DMD 筋組織に対して選択的に集積し、十分に遺伝子デリバリーキャリアとしても機能することを明らかとした。今回開発に成功した筋ターゲティング型キャリアは、肝臓への移行性を抑えることに成功するため、既存のキャリアで懸念される筋組織以外での非特異的遺伝子発現を抑えつつ、筋組織選択的な高い遺伝子導入が獲得できる。DMD 治療の更なる発展に向け、種々の遺伝子・核酸を送達するための筋ターゲティング型キャリアの開発は必要不可欠である。以上の研究成果は、DMD 治療法開発において本筋ターゲティング型 DDS の重要性を示す有益

な情報提供となるのみならず、社会的波及効果の高い研究へと発展することを期待したい。