

奨励金No.1502

# 内因性リガンドを介した脳標的ウイルス性遺伝子送達システムの創製

木村 誠悟

名古屋大学 学際統合物質科学研究機構 特任助教

## Developing an endogenous ligand-mediated non-viral gene delivery system targeting the brain

Seigo Kimura,

Integrated Research Consortium on Chemical Sciences, Nagoya University,  
Research Assistant Professor



本研究は、治療用遺伝子を脳内で発現可能なLNPの開発を目的とし、①新規 *in vivo* スクリーニング法の開発と、②遺伝子発現の組織選択性のメカニズム解析を行った。①について、DNAバーコードによってLNPをラベルし、次世代シーケンス（NGS）で測定することで、1匹のマウスで数百種類のLNPの体内動態を同時に測定可能な系を作成した。②について、タンパク質発現量、組織内／核内DNA量・mRNA量の定量解析の結果、翻訳過程に～250倍の差が生じていることが示唆された。

This study aimed to develop LNPs that enable gene expression for therapeutic purposes in the brain. We conducted (1) the development of a novel *in vivo* screening method and (2) the analysis of the mechanism responsible for tissue-selectivity in gene expression. Regarding (1), we created a system that can measure the *in vivo* dynamics of hundreds of types of LNPs simultaneously in a single mouse by labeling the LNPs with DNA barcodes and measuring them with NGS. Regarding (2), the results of quantitative analysis of protein expression levels and tissue/nuclear DNA and mRNA levels suggest that there is a difference of up to 250-fold in the translation process.

### 1. 研究内容

#### 1.1. 背景

核酸医薬・遺伝子治療は、スピララザ®・オンパットロ®・コラテジェン®など、既に国内でも承認され、難治性疾患に対する新たな治療法として期待されている。治療用核酸を、作用部位までいかに送達するかがその薬効を左右するため、核酸医薬・遺伝子治療は最もDDS技術を必要とする分野の一つである。肝臓を標的としたDDS開発が先行しているが、今後は、他の臓器への応用が課題であり、多くの研究グループが研究開発で鎬を削っている。しかし、DDS開発のスクリーニ

ングは、大量の実験動物を必要とし、時間とコストがかかる。さらに、治療用遺伝子を発現させるには、細胞内動態を考慮したキャリア設計が必要となるが、送達遺伝子の発現に違いを生むメカニズムは未解明の部分が多い。本研究では、遺伝子治療用DDS開発における上述した課題（①時間とコストがかかるスクリーニング、②未解明の遺伝子発現機構）を解決するため、オンパットロ®やCOVID-19のmRNAワクチンでも利用されているLNPを対象に研究を行った。また、標的臓器は開発が渴望されているが標的化が困難である脳を選択した。

## 1.2. 新規スクリーニング法によるLNPの*in vivo*機能解析

これまでの研究から、標的化リガンドを用いずとも、LNPの脂質組成を変えることで組織選択性が大きく変化することが分かっている（[Kimura S et al, J Control Release. 2021](#), [Kimura S et al, J control Release. 2023](#), [S.T. LoPresti et al, J Control Release. 2022](#), [Q. Cheng et al, Nat Nanotechnol. 2020](#)）。これは、LNPが生体に投与された際に、LNP表面に吸着する内因性物質による影響だと考えられる。実際、LNP製剤のオンパットロ®はApoEという内因性タンパク質が粒子表面に吸着することで肝実質細胞に効率的に取り込まれる（[Akinc et al, Mol Ther. 2010](#)）。現在、脳移行性の内因性リガンドについてはよく知られていないが、LNP表面の化学構造や物性を変化させることで、表面に結合する内因性リガンドを制御できると考えられる。本研究では、脂質ライブラリーを用いて作成した多様な表面物性を持つLNPの中から、血中で内因性リガンドと吸着し脳内へ移行するLNPの探索を試みた。しかし、1種類のLNPに1

匹のマウスを使用する従来の試験法では、大量の実験動物、時間・コストがかかる。そこで、DNAバーコードと次世代シーケンス（NGS）を用いて、*in vivo*スクリーニングのハイスループット化を試みた（図1）。DNAバーコードで各LNPを標識し、NGSを用いて体内動態を解析する手法は、1匹の実験動物で同時に300種類以上のLNPを試験できる（[JE Dahlman et al, PNAS. 2017](#)）。本研究では、バーコード配列をRNAとして発現させることで、組織移行性と同時に転写までの遺伝子発現を追うことが可能な、転写型pDNAバーコードを設計した（図2）。脂質組成の異なる30種類のLNPについて、動的光散乱法を用いて（ゼータサイザー）、各LNPの物性（粒子径、多分散指数、ゼータ電位）と、30種類のLNPを混合したLNPプールの粒度分布を測定した（図3）。良好な自己相関曲線と単一ピークの粒度分布が確認され、プールされたLNPは安定であることが示唆された（図3B, C）。また、FRETを用いた検証実験で、LNP同士の融合は生じていないことを確認した（data not shown）。pDNAバーコード法を用いて、

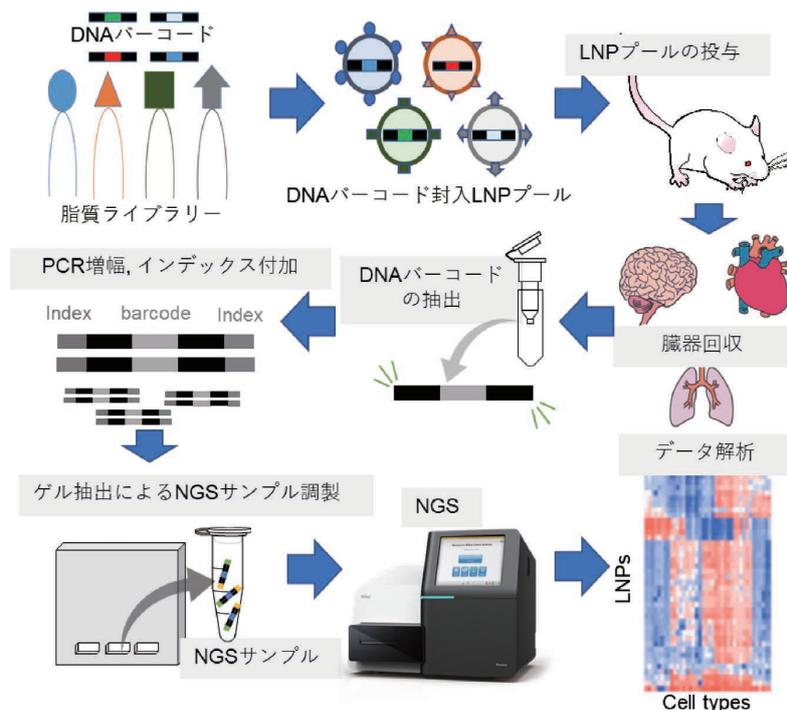


図1. DNAバーコードによるLNPの*in vivo*スクリーニング

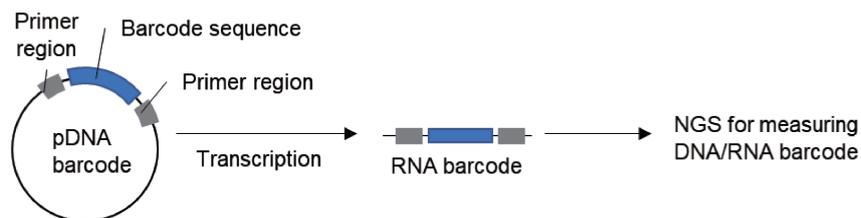


図2. 転写型 pDNA バーコード

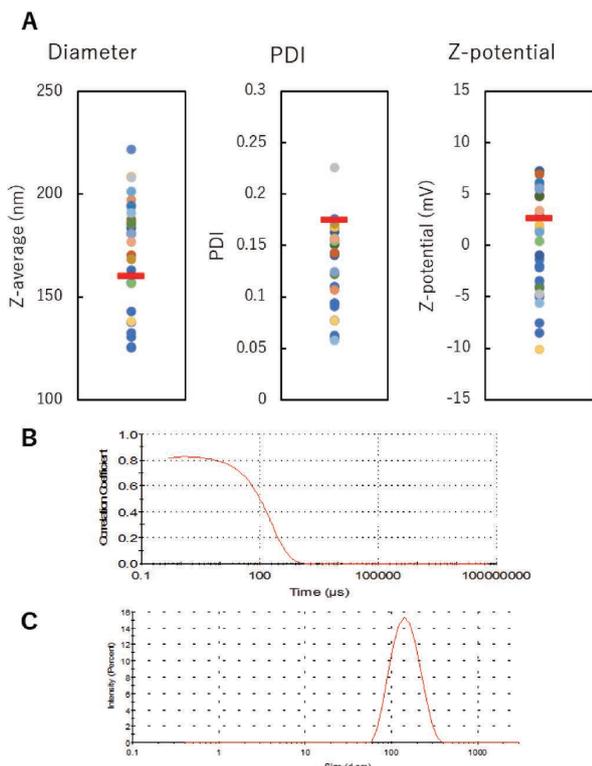


図3. 各LNPの物性（粒子径、PDI、ゼータ電位）(A)とLNPプールの自己相関曲線（B）及び粒度分布（C）、（ゼータサイザーによる測定）

30種類のLNPについて、各組織中のpDNA移行量、RNA発現量を測定し、さらに、発光タンパク質であるルシフェラーゼをレポーターとして、タンパク質発現量を測定した。各組織（肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓、脳）におけるpDNA量、RNA量、タンパク質量をそれぞれプロットした結果、タンパク質発現量に10～100倍の差があるにもかかわらず、pDNA量・RNA量に大きな差は見られなかった（図4、表1）。

### 1.3. 組織選択的な遺伝子発現機構の解析

図5のように、全身投与された薬物は、組織移行、細胞内移行、オルガネラ移行の3つの障壁をクリアする必要があり、その各過程で非特異的な分布や分解が起こりえる。さらに、pDNAによる遺伝子導入の場合、核移行後に、転写・翻訳の過程が存在する。1.2.の結果から、送達遺伝子の発現量の差は、組織・細胞内移行後、特に翻訳過程で大きな差が生じていることが示唆された。そこで、より詳細な解析を行うため、発現の組織選択性が異なる2種類のLNP（図6）について、組織内タンパク質発現量、組織内・核内pDNA量・mRNA量を定量することで、細胞内移行から翻訳までの各過程の効率を比較した（図7）。その結果、遺伝子発現における組織間及びLNP間の差は、翻訳過程に～250倍の差が生じていることが示唆された。LNP導入による細胞の状態（エンドサイトーシス機構、代謝等）の変化が翻訳効率、タンパク質発現量に影響しているという仮説の基、発現細胞種についてトランスクリプトーム解析を行った結果、RNAプロセッシングやリボソーム生合成といった転写・翻訳に関わるパスウェイが遺伝子送達効率の高い細胞で有意に変動していた。

### 1.4. まとめと展望

本研究では、LNPを用いた遺伝子送達における新たな*in vivo*スクリーニング系の開発と、遺伝子発現機構の解析を行った。現時点で、脳へ効率的に（投与量の1%以上）送達可能なLNPは見出されていないが、本スクリーニング系を用いた解析から、移行と発現の組織選択性に関して、pDNA

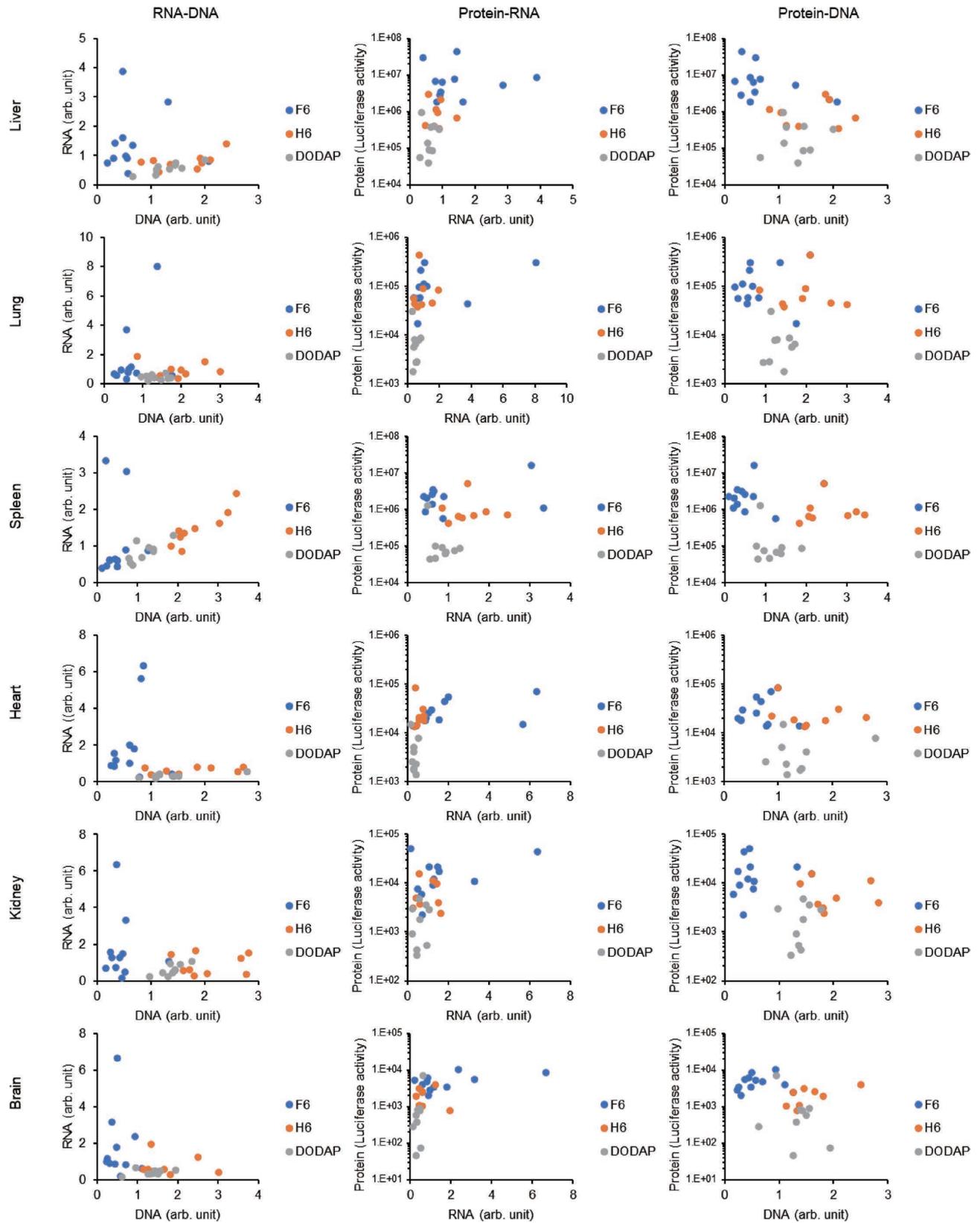


図4. 30種類のLNPデリバリーの各組織(肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓、脳)におけるpDNA移行量、RNA発現量、タンパク質発現量の関係。各プロットはそれぞれのLNPの値(平均値、N=3)を示し、用いたイオン化脂質によって色分けしてある(青:F6、オレンジ:H6、グレー:DODAP)。pDNA量(DNA (arb. unit))、RNA量(RNA (arb. unit))、タンパク質量(Luciferase activity)をそれぞれの組み合わせで2軸プロットした。

表1. 各組織における pDNA 量、RNA 量、タンパク質量の相関性

Tissue	RNA-DNA	Protein-RNA	Protein-DNA
Liver	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0018 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.3119 R <sup>2</sup> DODAP: 0.7737	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.044 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.348 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0203	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0712 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0379 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0002
Lung	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.1536 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0241 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0009	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.238 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0023 R <sup>2</sup> DODAP: 0.2458	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.2382 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0103 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0235
Spleen	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0047 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.8062 R <sup>2</sup> DODAP: 0.5521	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.3055 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.001 R <sup>2</sup> DODAP: 0.4145	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0652 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.00001 R <sup>2</sup> DODAP: 0.096
Heart	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0372 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.1265 R <sup>2</sup> DODAP: 0.5517	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.3419 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0723 R <sup>2</sup> DODAP: 0.3692	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0976 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.1739 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0249
Kidney	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0059 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0052 R <sup>2</sup> DODAP: 0.6157	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.000002 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0046 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0413	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0112 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0445 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0731
Brain	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0043 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.0057 R <sup>2</sup> DODAP: 0.1757	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.2975 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.000006 R <sup>2</sup> DODAP: 0.4626	R <sup>2</sup> CLAF6: 0.0567 R <sup>2</sup> CL4H6: 0.5361 R <sup>2</sup> DODAP: 0.0455

\* 図4の各グラフから R 二乗値 (R<sup>2</sup>) を計算した。

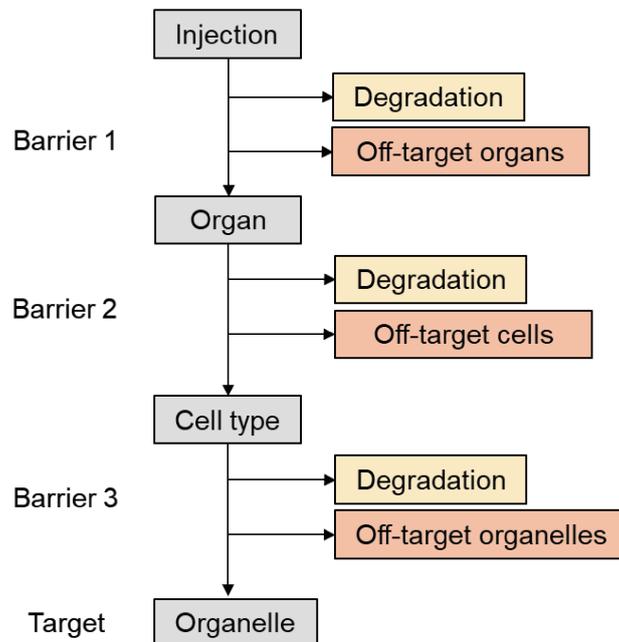


図5. 薬物送達プロセスのフレームワーク（模式図）

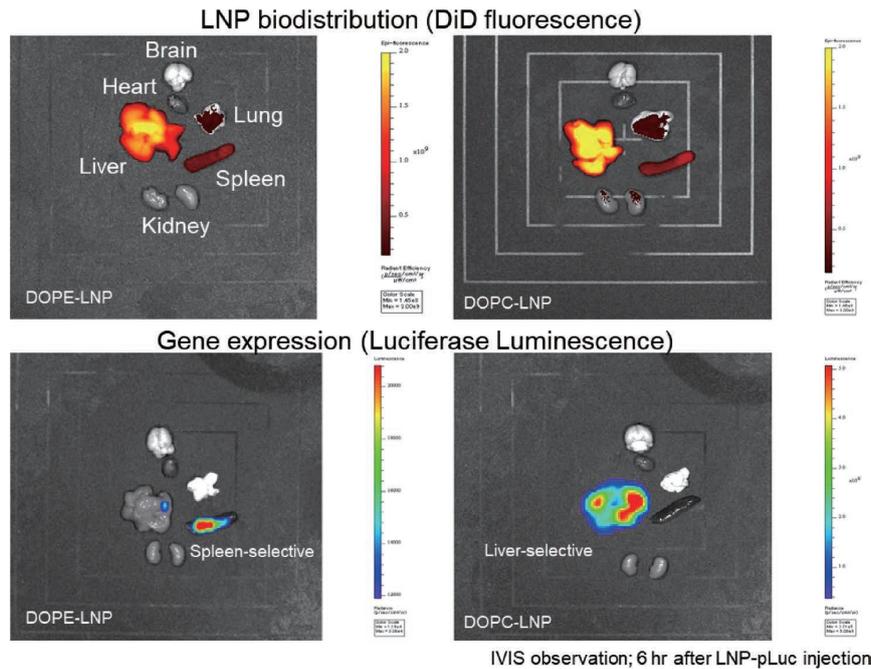


図6. ルシフェラーゼをコードしたpDNA封入LNP(DOPE-LNP、DOPC-LNP)の体内分布(蛍光)とレポーター活性(ルシフェラーゼ発光)の*Ex vivo*イメージング。LNPをマウスに尾静脈内投与し、6時間後に各臓器を摘出後、IVISで観察。

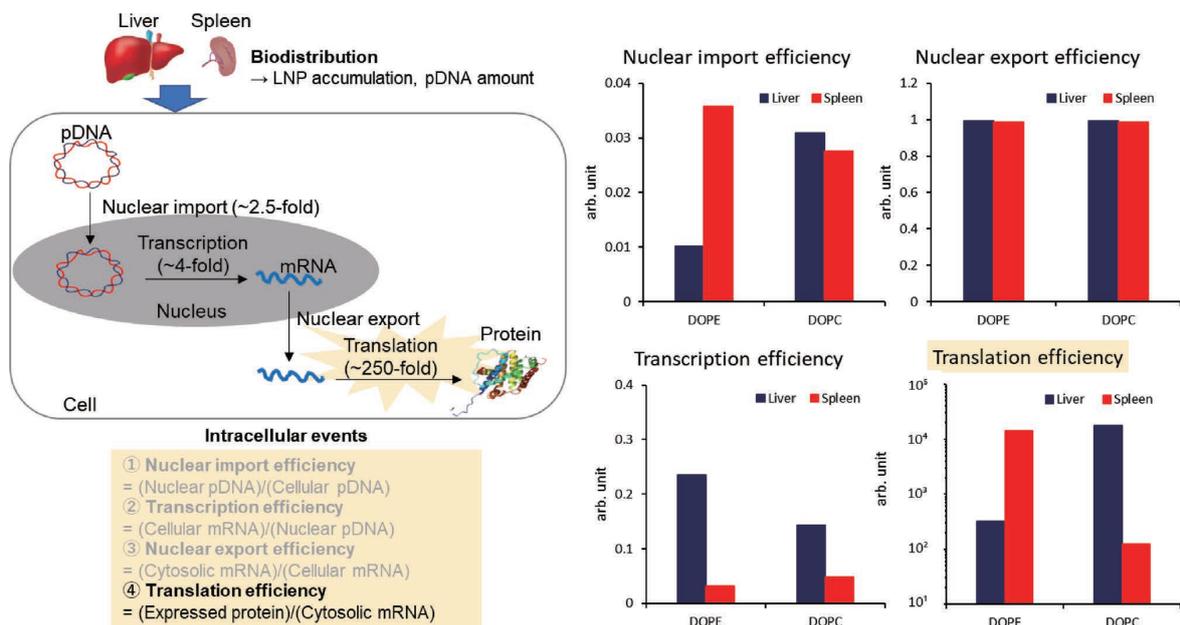


図7. 2種類のLNP-pDNA送達における、各細胞内過程(核移行、転写、核外輸送、翻訳)効率の比較

移行量、mRNA発現量、タンパク質発現量の相関が低く、特に翻訳過程に大きな差が生じている可能性が示唆された。*in vivo* 遺伝子送達における組織選択性の違いに、翻訳過程が大きく関わってい

るという知見は、これまでの核移行前の過程(エンドソーム脱出や核移行)に着目したDDS設計に一石を投じるものである。今後は、動態解析だけでなく、キャリアが細胞にどう認識され、それ

が遺伝子発現に関与するどのような生物学的プロセスに影響しているのかを検証していく必要がある。

## 2. 発表（研究成果の発表）

1. Kimura S, Khalil IA, Elewa YHA, Harashima H. “Novel lipid combination for delivery of plasmid DNA to immune cells in the spleen”, J Control Release, 330: 753-764, 2021
2. Shimosakai R, Khalil IA, Kimura S, Harashima H. “mRNA-Loaded Lipid Nanoparticles Targeting Immune Cells in the Spleen for Use as Cancer Vaccines”, Pharmaceuticals, 15: 1017, 2022
3. Kimura S, Harashima H. “On the mechanism of tissue-selective gene delivery by lipid nanoparticles”, J Control Release, 2023 in press
4. The 7th Annual Meeting of the Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan, Tokyo, Japan, “Different cellular responses to lipid-based carriers affect tissue/cell-selective gene delivery”, Seigo Kimura, Hideyoshi Harashima, August 2022 \*川原賞受賞
5. Liposome Research Days 2022, Vancouver, Canada, “On the mechanism of tissue-selective gene transfection by lipid-based carriers”, Seigo Kimura, Hideyoshi Harashima, June 2022