

# シクロデキストリンを基盤とする超分子ポリマーの動的特性を活用した ゲノム編集分子デリバリープラットフォームの構築

創薬・生命薬科学専攻 ドラッグデリバリーコース (製剤設計学分野) 田原春 徹

近年、創薬モダリティは従来の低分子化合物からタンパク質性薬物、核酸、ゲノム編集などに移行しつつある。特に、CRISPR-Cas9 システムは、遺伝子の標的配列を自在に操るゲノム編集技術の最新ツールであり、開発者の J.A. Doudna 博士らは、2020 年のノーベル化学賞を受賞した。多分野における応用が期待され、特に医薬領域においては、遺伝性疾患の根本治療法としての応用研究が活発に展開されている。CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集には、Cas9 (DNA 切断酵素) とガイド RNA (標的配列認識) を細胞内へ導入する必要があるため、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで、これらを細胞内にて発現させる方法が試みられてきた。一方、ウイルスベクターは安全面に懸念があり、安全な代替手段として知られる非ウイルス性キャリアの開発が望まれている。そこで本研究では CRISPR-Cas9 システムを安全かつ高効率に導入できる非ウイルス性キャリアを構築し、その有用性を評価した。以下に本研究で得られた主な知見を要約する。

- 1) 当研究室ではこれまで、シクロデキストリン (CyD) とポリアミドアミン dendrimer との結合体 (CDE) が遺伝子・核酸導入用キャリアとして有用であることを明らかにしてきた。第 1 章では、肝臓の遺伝性疾患である遺伝性トランスサイレチン (TTR) アミロイドーシスの治療を企図して、肝臓標的型 CDE を合成し、CRISPR-Cas9 発現 plasmid DNA キャリアを構築した。肝臓標的型 CDE/CRISPR-Cas9 発現 plasmid DNA 複合体は、ゲノム編集を介して原因タンパク質 (TTR) の発現を抑制した。また、CDE 自身が TTR アミロイドの形成を抑制し、さらに、既に形成された TTR アミロイドを分解することを明らかにした。これらの結果より、肝臓標的型 CDE/CRISPR-Cas9 発現 plasmid DNA 複合体は、遺伝性 TTR アミロイドーシスに対して、多機序の治療効果を有することが示された。
- 2) Cas9/sgRNA 複合体 (Cas9 ribonucleoprotein: Cas9 RNP) を細胞内へ直接導入する方法は、CRISPR-Cas9 発現 plasmid DNA の遺伝子導入法と比較して、安全かつ高効率な CRISPR-Cas9 システムの導入法として注目されている。第 2 章では、Cas9 RNP キャリアとしての CDE の有用性を評価した。その結果、CDE は、Cas9 RNP と三元複合体を形成し、細胞内へ送達できることが示された。さらに、CDE/Cas9 RNP 三元複合体は、遺伝子導入法によるゲノム編集が困難な神経細胞および脳においてもゲノム編集を誘導できることを明らかにした。
- 3) 第 3 章では、CDE などのカチオン性ポリマーに替わる次世代型 Cas9 RNP キャリアとして、アミノ化ポリロタキサン (amino-PRX) を構築した。Amino-PRX は、PRX 中の CyD の動的特性により、Cas9 RNP の構造や電荷分布を認識して変形することで、従来のカチオン性ポリマーと比較して Cas9 RNP と効率良く複合体を形成した。さらに、アミノ基の最適化や細胞内分解性官能基の導入などにより、Cas9 RNP の細胞内動態を制御する機能を付与した amino-PRX (5<sup>th</sup> generation; 5G) を構築した。Amino-PRX (5G) は、Cas9 RNP の立体構造や電荷分布のみならず、細胞内環境変化も認知して多段階に変形し、Cas9 RNP の細胞内動態を制御する結果、Cas9 RNP を核まで送達することを明らかにした。さらに amino-PRX (5G)/Cas9 RNP は、Cas9 RNP 導入用試薬のグローバルスタンダードである Lipofectamine™ CRISPRMAX™ との複合体と同等以上のゲノム編集効率を示した。
- 4) Amino-PRX (5G) はその動的特性により、Cas9 RNP 以外のバイオ化合物の構造や電荷分布も認識して相互作用し、高効率に細胞内へ導入できると予想される。さらに amino-PRX (5G) のエンドソーム

膜破壊能、薬物放出能、細胞内分解能などは、バイオ医薬品を高活性で細胞内へ導入するためにも重要な機能である。したがって、amino-PRX (5G) は多種多様なバイオ化合物に対するユニバーサルキャリアとしての可能性を有する。第 4 章では、amino-PRX (5G) の適用拡大を企図して、核酸医薬 (small interfering RNA: siRNA および antisense oligonucleotide: ASO)、mRNA、アニオン性タンパク質 ( $\beta$ -Galactosidase) および Cas9 RNP とは別種のゲノム編集分子 (Cas12a (Cpf1) RNP) など、様々な創薬モダリティの細胞内導入用キャリアとしての amino-PRX (5G) の有用性を評価した。その結果、amino-PRX (5G) は、検討した全ての分子に対して、市販の導入用試薬よりも安全かつ高効率な導入効率を示したことから、多様な創薬モダリティに適用できる、汎用性の高いデリバリープラットフォームとして有用であることが明らかとなった。

- 5) より高効率な Cas9 RNP 導入能を付与するため、Amino-PRX (5G) のアミノ基置換度、軸分子量、貫通率などを微調整した。その結果、1) 軸分子 (polyethylene glycol: PEG) の分子量が 35 kDa、2) PRX の CyD 貫通率が約 25%、3) CyD 1 分子に対する修飾アミノ基数が低置換度で、ジエチレントリアミン/シスタミンのモル比が 1:1 の amino-PRX (5G): 35k LDS は、最も高効率な Cas9 RNP 導入能を示した。35k LDS は、アミノ基の低置換度化により Cas9 RNP のリリースを、軸分子の高分子量化によりエンドソーム脱出を高効率にする結果、Cas9 RNP によるゲノム編集を増強した。加えて、35kLDS の末端のアダマンタンに、ホスト-ゲスト相互作用を介してリガンド修飾 CyD を修飾すると、標的細胞に対する細胞内取り込みを促進することでゲノム編集効果を向上させることができた。特筆すべきことに、35kLDS およびリガンド修飾 CyD/35kLDS は、Lipofectamine™ CRISPRMAX™ よりも顕著に高い Cas9 RNP 導入効率を示した。
- 6) PRX 中の CyD の動的特性は、薬物との複合体形成だけでなく、標的細胞表面に存在する受容体の認識のためにも活用できると推察される。つまり、PRX にリガンド修飾を施すと、標的細胞表面の受容体の分布を認知して相互作用する可能性がある。そこで、肝実質細胞のリガンドとして知られる *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を修飾した PRX (GalNAc-PRX) を新規に調製し、肝実質細胞内取り込みおよび細胞膜上の標的受容体 (ASGPR, 三量体) との相互作用について検討した。その結果、PRX 中に修飾された GalNAc は、ASGPR の三量体構造や空間配置を認識しながら変形し、ASGPR と効率良く多価相互作用できることが示された。さらに、がん細胞リガンドである葉酸 (FA) を修飾した FA-PRX も、がん細胞膜上の標的受容体 (葉酸受容体  $\alpha$ , 単量体) と動的に多価相互作用することで、がん細胞内へ高効率に取り込まれた。このことから、PRX を介した動的な標的指向戦略は、オリゴマー型受容体および単価型受容体のいずれに対しても有用であることが示された。全身投与後、Cas9 RNP を標的組織に送達できるキャリアの構築を目指して、amino-PRX (5G) の末端にリガンド PRX を付与した。本キャリアと Cas9 RNP との複合体は、表面のリガンド PRX が amino-PRX (5G)/Cas9 RNP コアのカチオンを立体的に遮蔽するために、血清に対する安定性を向上させるとともに、カチオン介在性の細胞内取り込みを減少させることで Cas9 RNP を標的細胞へ選択的に取り込ませた。その結果、肝臓標的複合体 (GalNAc system/Cas9 RNP) およびがん標的複合体 (FA system/Cas9 RNP) は、マウス尾静脈内に単回投与後、肝臓において約 20%、がん組織にて約 60% のゲノム編集を誘導した。

以上、本研究では CyD の超分子特性を活用して、CRISPR-Cas9 導入用の非ウイルス性キャリアを構築した。特に、PRX の動的特性を活用することで、ゲノム編集分子との複合体形成能、細胞内動態制御能、標的指向能を付与できるデリバリーシステムを構築することに成功した。本システムはユーザビリティに優れ、かつゲノム編集分子以外の核酸医薬、mRNA、タンパク質などにも応用できるため、様々な創薬モダリティに対するデリバリープラットフォームとして期待される。加えて、本研究において得られた知見は、薬物の標的指向化や細胞内導入用キャリアを開発する上で有用な基礎資料になるものと考えられる。