

## 論文の内容の要旨

論文題目 筋組織への遺伝子導入による末梢神経損傷の治療と評価

氏名 長田 和也

### 要旨

### 背景

下肢筋は坐骨神経、大腿神経、閉鎖神経に支配されており、坐骨神経およびその分枝が、ハムストリングスおよび下腿以遠の筋を支配している。そのために、末梢神経である坐骨神経は再生能を有するが、坐骨神経麻痺の間に歩行が著しく障害され、坐骨神経以外が支配する筋群にも廃用を生じる。この結果として、完全な回復が得られないことがある。

末梢神経損傷後に完全な機能回復を得るためには、1)長期に亘る治療期間に生じうる筋萎縮を防ぐこと、2)軸索伸長を促進し治療期間を短縮すること、の両者を満たすことが重要である。これらの要件を満たす1つの手段として、筋肥大効果が知られているタンパク質であるIGF-1を投与することが挙げられる(G. R. Adams *et al. J. Appl. Physiol.* **84**, 1716–1722, 1998)。IGF-1は神経再生の促進作用をも持つことが知られており(E. D. Rabinovsky *FASEB J.* **17**, 53–55, 2002)、治療中に生じうる廃用を防ぐとともに治療期間の短縮に寄与すると考えられるため、末梢神経損傷の治療に用いるタンパクとして適している。

しかしながら、半減期が30分程度であるIGF-1をタンパクのまま投与する場合は複数回の投与が必要となり(H.P. Guler *et al. Eur. J. Endocrinol.* **121**, 753–758, 1989)、患者負担と医療コストの増大を招く。これに対して、遺伝子治療は一度の投与で長期の発現を可能とするため、この問題を解決する可能性がある。pDNAやmRNAなどの核酸を直接体内に導入すると、核酸が速やかに分解されてしまうため、核酸の投与にはキャリアが必要となる。現在開発が進められているキャリアはウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別されるが、ウイルスベクターには安全性に大きな課題がある(S. Haccin-Bey-Abina *et al. N. Engl. J. Med.* **363**, 355–364, 2010)。また、非ウイルスベクターとしてはカチオン性の脂質やポリマーが多く用いられているが、これらを用いて遺伝子を導入した際には、カチオンの持つ細胞毒性のために *in vivo* 環境下において十分な発現が得られない。この問題に対して、本研究では、当研究室で開発された、PEG-PAsp(DET)を核酸キャリアとして用いた。PAsp(DET)と核酸はそれぞれ正電荷、負電荷を帯びているため、両者を混合することで静電相互作用を生じ、凝縮体を形成する。その凝縮体はPEGによって覆われたミセル型の構造となる。このミセル型構造により、遺伝子を分解から保護するとともに、細胞毒性を軽減することができる。本研究ではこのミセルを用いることに加えて、過剰なポリマーによる正電荷をコ

ンドロイチン硫酸により除去するとともに、さらに遺伝子を効率よく導入することが可能となるハイドロダイナミクス法により IGF-1 を発現する核酸を投与した(S. Uchida *et al.* *J. Control. Release* **155**, 296–302, 2011)。

### IGF-1 発現 pDNA の導入による末梢神経損傷の治療

末梢神経損傷モデルマウスに対して IGF-1 を発現する pDNA を筋肉に導入すると、IGF-1 や、その下流で発現する myogenin および myoD の発現が上昇し、末梢神経損傷後に生じる筋萎縮を軽減することができた。さらに、末梢神経損傷後の運動機能および知覚の回復を可能とすることが示された。ミセル化した pDNA を筋肉注射により投与した場合と比較しても、ハイドロダイナミクス法による投与では有意に早期な機能回復が得られた。このことにより、生体適合性キャリアである PEG-PAsp(DET)を用いて IGF-1 発現 pDNA をミセル化し、ハイドロダイナミクス法により下肢筋に投与する手法が、末梢神経損傷の治療法として有用であることが示唆された。

### IGF-1 発現 mRNA の導入による末梢神経損傷の治療

導入核酸として pDNA を用いた遺伝子治療は、ホストゲノムへのランダムな挿入による白血病の発症例や死亡例などが報告されており、このような重篤な副作用を生じうる治療法が非致死の疾患を対象とする再生医療で実現することは難しい。さらに、IGF-1 はがんを惹起する可能性が示唆されており(R. Baserga *et al.* *Int. J. Cancer* **107**, 873–877, 2003)、治療後も高い発現が持続することは望ましくない。一方で、導入核酸として mRNA を用いた場合にはホストゲノムへの挿入が生じない。このことから、導入後一定期間が経過した後には分解されることが期待される。さらに、細胞質で翻訳される mRNA を導入した場合には、核への移行を必要とする pDNA を導入する場合よりも速く翻訳され、早期からの薬効が期待される。これまで遺伝子治療に mRNA が用いられなかった背景には、mRNA そのものの不安定性や、mRNA の持つ免疫原性などの問題があった(G. Tavernier *et al.* *J. Control. Release* **150**, 238–247, 2011)。当研究室で開発されたミセルは mRNA を保護し、安定に投与することができるとともに、免疫原性の問題を克服できることが、鼻粘膜や脳脊髄への投与の事例により示されている(M. Baba *et al.* *J. Control. Release* **201**, 41–48, 2015, S. Uchida *et al.* *PLoS One* **8**, e56220, 2013)。しかしながら、これらの事例で得られたタンパク質の発現は最長でも 5 日間であり、これは mRNA 単独で投与した場合に比較すると長期ではあるが、末梢神経損傷の治療には不十分であった。本研究では、これまで mRNA の投与においては用いられてこなかった、生体適合性キャリアである PEG-PAsp(DET)と mRNA からなるミセル型キャリアにコンドロイチン硫酸を加える手法を用いることで過剰なポリマーによる正電荷を除去してから投与を行うことで、mRNA の遺伝子発現を長期化させることが可能であることを示した。

ハイドロダイナミクス法により下肢筋に Luc 発現 mRNA を投与すると、ミセルによって

保護された mRNA が長期に発現し、市販の遺伝子導入薬を用いた場合には最長で投与 1 日後の発現が確認されるのみであったものが、投与 3 週間後まで発現が確認された。また、投与 5 週間後には発現が確認されず、一定の期間ののちに分解されることが確認された。さらに、mRNA を naked のまま投与した場合には投与 3 日後でも筋に炎症が生じていたのに対して、ミセルで投与した場合には炎症は確認されなかった。末梢神経損傷モデルマウスに対して IGF-1 発現 mRNA を投与すると、IGF-1 や myogenin および myoD などの筋肥大に関するタンパク質の発現が上昇するとともに、筋肉の再生において発現が上昇する myomaker の発現も上昇した。IGF-1 発現 mRNA を末梢神経損傷モデルマウスに導入すると、IGF-1 発現 pDNA を導入したマウスよりも有意に筋萎縮が軽減されるとともに、機能回復も早まることが示された。

## 結語

本研究は生体適合性キャリアを用いて IGF-1 を発現する pDNA や mRNA を導入することにより、末梢神経損傷の治療が可能であることを示した。特に、不安定とされる mRNA を筋肉に対して安定に導入し、3 週間に亘る発現を得ることができた。投与後 3 週間に亘って *in vivo* 環境で導入 mRNA の発現を得た例は他にない。効率よくタンパク質を発現する筋肉をターゲットとする mRNA による遺伝子治療の可能性を示唆したことは、末梢神経損傷の治療にとどまらず他の疾患への応用の可能性を含めているという点で重要であり、今後の遺伝子治療の発展に寄与するものと考えられる。