

氏名（本籍）	<sup>ささき</sup> 佐々木 <sup>えり</sup> 愛理（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 329 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 根岸 洋一 教授 井上 勝央 教授 高木 教夫

## 論文内容の要旨

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<sup>®</sup>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、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。

最近実用化され、核酸・遺伝子キャリアとして注目されている脂質ナノ粒子 (LNP) を応用し、DMD 疾患に特化した全身投与が可能な筋ターゲティング型 DDS として新規開発することができれば、有望な治療法開発、さらには今後の核酸・遺伝子医薬品開発においても非常に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、DMD 疾患に有用な筋ターゲティング型 DDS 構築に向け、筋細胞に発現する  $\alpha$  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  $\alpha$  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 (Fig. 1)。

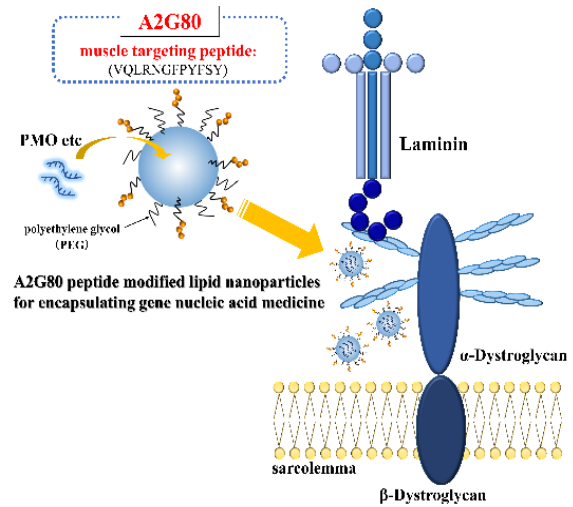


Fig.1. Scheme of muscle-targeting lipid nanoparticles using A2G80.

## 【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

本章では、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 (A2G80-LP-Lip、A2G80-LSP-Lip) を作製した。作製したリポソームの物性、標的指向性、全身投与における筋組織への集積性および他臓器への体内分布について比較検討した。

マイクロ流体技術を用いて作製、さらにポストインサクション法によりペプチド修飾した各リポソームは、いずれも粒子径が約 80 nm と比較的小さな粒子であることが明らかとなった。

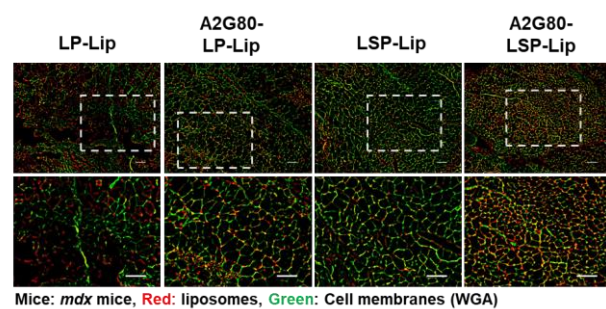


Fig. 2. *In vivo* targeting ability of A2G80-modified liposomes to muscle tissue of mdx mice after intravenous administration.

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り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、蛍光標識 A2G80-LP-Lip および A2G80-LSP-Lip は、筋組織切片への相互作用を認めた。一方で、ペプチド未修飾リポソーム (LP-Lip および LSP-Lip)、および A2G80 のスクランブル配列ペプチド修飾リポソーム (Scr-LP-Lip, Scr-LSP-Lip) 添加群では、顕著な相互作用を認めなかった。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 (ジストロフィン遺伝子にストップコドンが存在することで本タンパク質が欠損している DMD 病態モデルマウス: *mdx*) 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 (Fig. 2)。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 (Fig. 3)。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は、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が影響していると考えられる。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。また、本 A2G80-LSP-Lip は、一般的なり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、組織構築が破綻している部位へ到達しやすく、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。

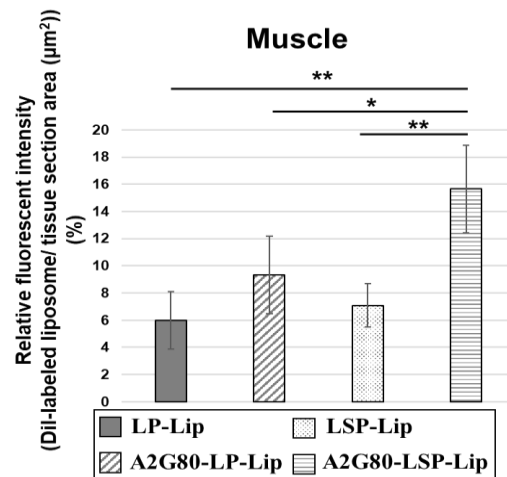


Fig. 3. The biodistribution profile of liposomes 24 h after intravenous injection. Quantification of DiI fluorescence in each tissue. \*\* $p < 0.01$  \* $p < 0.05$  (one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer HSD test).

## 【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

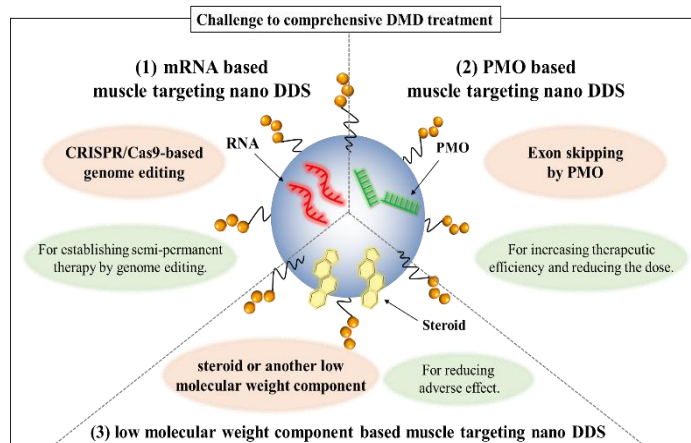
本章では第一章で明らかとした基盤技術を基に、核酸・遺伝子送達により最適な脂質組成へ改良し、全身投与が可能な筋ターゲティング型核酸・遺伝子封入 LNP の開発を試みた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードした mRNA を封入し、DMD モデルマウスを用いて、全身投与に最適な LNP 組成の決定を行い、A2G80 ペプチド修飾 mRNA 封入 LNP と未修飾 LNP の筋組織における遺伝子発現活性の評価を行った。前章と同様にマイクロ流体技術とポストインサクション法を用いて作製した A2G80 ペプチド修飾 mRNA 封入 LNP は粒子径が約 100 nm であり、mRNA の LNP 中への封入化効率は約 90%、mRNA の回収率は約 70%を示した。

全身投与に最適な LNP 組成とするため、PEG 脂質の炭素鎖部分が C14 と C18 の異なる 2 種類の分子（PEG-DMG; 1-(Monomethoxy polyethyleneglycol 2000)2,3-dimyristoylglycerol、および PEG-DSG; 1-(Monomethoxy polyethyleneglycol 2000)-2,3-distearoylglycerol）を利用して作製した LNP（炭素鎖 C14; PEG-DMG-LNP、および炭素鎖 C18; PEG-DSG-LNP）を DMD モデルマウスへ投与し、各臓器における遺伝子活性を検討した。その結果、PEG 脂質の炭素鎖が長い PEG-DSG を用いて作製した PEG-DSG-LNP 投与群において、静脈内投与後の筋組織で 3~6 倍程度高い活性を認めた。さらに肝臓での発現は PEG-DMG-LNP と比較し、100 倍ほど低下することから、PEG-DSG を用いた LNP が筋組織を標的とした全身投与において最適な脂質組成であることが明らかとなった。本結果を受け、DSG-LNP に A2G80 ペプチドを修飾した A2G80-DSG-LNP を新たに作製し、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-DSG-LNP 投与群と比較して A2G80-DSG-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】

本研究から、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。

今回の報告では実際に DMD の遺伝子治療効果の検証までは至らなかったが、レポーター遺伝子として mRNA を採用しているため、RNA ベースの治療として、ゲノム編集による治療への応用が期待できる。さらに封入する薬剤を変え、PMO を封入した筋ターゲティング LNP による効率的な治療を実現することが出来れば、異なるモダリティによる治療戦略を直接的に比較することが可能になる。一方、第 1 章で開発した A2G80-LSP-Lip は、コレステロール骨格を含有するため、DMD 治療の第一選択であるステロイド製剤の封入も容易となる。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したため、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、筋組織選択な高い遺伝子導入が獲得できる。



副作用を軽減する観点からも臨床応用に繋がっていくものと期待される。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。

### 【研究結果の掲載誌】

(1) E. Sasaki et al. 他 16 名, *J. Control. Release*, **329**, 1037-1045 (2021).

## 【 審 査 要 旨 】

デュシャンヌ型筋ジストロフィー（DMD）治療において、2016年より核酸医薬の臨床応用が開始している。しかしながら、筋細胞内移行性が極めて乏しく、治療効率改善のためのドラッグデリバリーシステム(DDS)技術の開発が喫緊の課題とされている。佐々木愛理氏の学位申請論文は、筋ターゲティング型ナノキャリア開発を目的として、筋組織に豊富に存在する alpha-Dystroglycan に高親和性を有する A2G80 ペプチドに着目し、DMD モデル動物において、筋ターゲティング能を発揮する A2G80 ペプチド修飾ナノ粒子の DDS 研究開発について述べたものである。研究成果として、A2G80 ペプチド修飾ナノ粒子（リポソームおよび脂質ナノ粒子（LNP））は、DMD モデルマウスにおける全身循環を介した筋組織集積能と核酸・遺伝子送達能を有することを明らかにし、筋ターゲティング型ナノキャリアとしての有用性を実証している。本学位申請論文は、それらをまとめたものであり、2章からなる。

第1章では、全身循環を介して筋組織移行性を示す A2G80 ペプチド修飾リポソームの開発に取り組んだ。静脈内投与後のリポソームの血中滞留性向上を目的に、リポソーム表面を修飾する polyethylene glycol (PEG)脂質の分子量（鎖長）に着目し、鎖長の異なる PEG 脂質を組み合わせた A2G80 ペプチド修飾リポソーム（A2G80-LSP-Liposome）をマイクロ流体技術により作製した。これらを DMD モデルマウスへ静脈内投与し、本リポソームの筋組織への集積性を検討した。結果として、A2G80-LSP-Liposome は、高い筋組織移行性を有することを示した。一方で正常マウス筋組織では集積性を示さなかったことから、A2G80-LSP-Liposome は、DMD 病態依存的な筋ターゲット能を有することを明らかとした。

第2章では、第1章で明らかとした基盤技術をもとに、核酸・遺伝子送達に最適な脂質組成へと改良し、筋ターゲティング型核酸・遺伝子封入 LNP の開発を試みた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ mRNA を封入した A2G80 ペプチド修飾 LNP を作製し、DMD モデルマウスへ静脈内投与し、各臓器における遺伝子発現活性を評価した。その結果、PEG-DSG と A2G80 ペプチドを用いた A2G80-DSG-LNP は、筋組織において高い遺伝子発現を示した。一方で A2G80-DSG-LNP を正常マウスに投与した場合の筋組織では、極めて低い遺伝子発現を示したことから、A2G80-DSG-LNP は DMD 筋組織選択的な遺伝子送達ナノキャリアとなりうることも明らかとした。今回開発に成功した筋ターゲティング型キャリアは、肝臓への移行量が低いため、既存のナノ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、筋組織選択的な遺伝子送達が可能となる。副作用を軽減する観点からも将来的に臨床応用に繋がる基盤技術として期待される。

以上、佐々木氏の本学位申請論文では、A2G80 ペプチド修飾リポソーム・LNP は、DMD 筋組織に対して指向性を有し、核酸・遺伝子医薬のための筋ターゲティング型ナノキャリアとなり得ることを明らかとした。DMD 治療法開発において本 DDS ナノキャリアの重要性を示す有益な情報提供となるのみならず、様々な筋疾患に対する

DDS キャリア創製の発展に大きく貢献できる成果と言える。したがって、本論文は博士（薬学）学位申請論文として相応しい内容を有すると判断する。