

110. 神経細胞標的 mRNA デリバリーによる脳虚血性疾患治療

内田 智士

*東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門

Key words : 一過性全脳虚血, 脳神経栄養因子, ナノミセル, mRNA 導入

緒言

中枢神経系難病に対して、持続的に治療用タンパク質を患部に供給することができる遺伝子治療は有力な方法論である。従来の多くの研究ではウイルスベクターが用いられてきたが、安全面での懸念があるほか、搭載できる遺伝子の大きさに制限があるといった問題がある。これに対して、ウイルスを用いずにプラスミド DNA やメッセンジャー RNA (mRNA) を導入する手法が注目されている。なかでも mRNA は、脳内の大部分を占める非分裂細胞にも効率的に導入可能であり、また宿主細胞ゲノムへ挿入され変異を誘発する危険性がないといった特長を持つ¹⁾。実際に、我々はマウス初代培養神経細胞に対して、mRNA が pDNA と比べて高い導入効率を示すことを報告している²⁾。

一方で、mRNA は、生体内で速やかに酵素分解を受けることや、強い免疫原性を有することが問題となり、これまで生体への導入はあまり検討されてこなかった。これに対して、我々は表面がポリエチレングリコール (PEG) で覆われた高分子ナノミセルに mRNA を搭載することでこれらの問題の克服を目指してきた³⁾。実際に、ナノミセルを齧歯類の脳脊髄液 (CSF) へ導入したところ、脳脊髄組織において、炎症反応を惹起することなく 1 週間近くにわたる mRNA からのタンパク質発現が得られた⁴⁾。一方で、このシステムを疾患治療に応用する際、患部に効率的にナノミセルが送達されること、さらには用いる治療因子に応じて適切な細胞種においてタンパク質発現が得られることが必要となる。

そこで、本研究ではナノミセルを CSF に投与した際のナノミセルの分布を詳細に観察することで、ナノミセルの投与方法に関して検討した。さらに、心肺停止後蘇生後脳症を対象として、本システムの疾患治療への有用性を検証した。この病態では、一過性全脳虚血後に海馬 CA1 領域の神経細胞が選択的に細胞死を起こすことで、記憶力障害といった症状をきたす。臨床でもしばしば観られる病態であるが、現段階で有効な治療法はなく、新たな治療法の開発が求められている。

方法

BDNF mRNA の合成、ナノミセルの調製は、過去の報告に従った^{4,5)}。具体的には、mRNA を鋳型 DNA から *in vitro* 転写によって合成し、それを PEG-PAsp (DET) ブロック共重合体と混合することでナノミセルを調製した (図 1)。マウス cisterna magna への投与は過去の報告に従い、第三脳室に関しては、ブレグマの尾側 0.5 mm、深さ 3 mm の部位へ投与した。いずれも 2 μ g の mRNA を含む 10 μ l の溶液を投与した。組織学的な評価は、14 μ m 厚で作製した凍結切片を用いて行った。

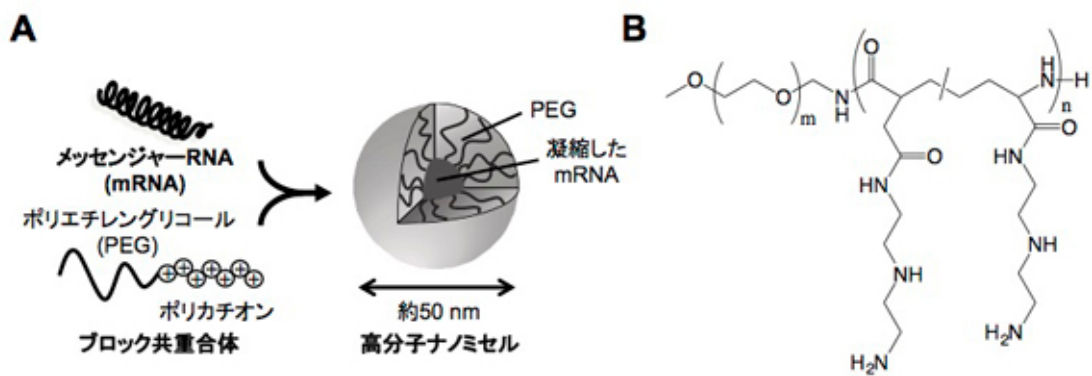


図1. 高分子ナノミセルの調製
 A) ナノミセルの調製法、B) PEG-PAsp (DET)。

結果

蛍光色素で標識した mRNA を搭載したナノミセルをマウス CSF へ投与し、その組織分布を評価した。まず、第三脳室への投与を行い、その 24 時間後に投与部位近傍における mRNA の分布を評価した。すると、投与部位近傍では、非常に強いシグナルが観察され、多くのナノミセルが分布していることが明らかとなった (図 2)。一方で、本システムの幅広い応用を考えた際、投与部位から離れた部位への分布も重要である。そこで、cisterna magna に導入し、そこから 3 mm 頭側の脳を含むスライスで分布を観察した。すると、CSF に接している脳組織の表面を中心に広い範囲で分布が観られ、CSF を介して離れた部位へもナノミセルが送達されたことが示唆された (図 3)。興味深いことに、脳表面より 1 mm 近くにわたり浸透していることも明らかとなった。表面が PEG に覆われたナノミセルは、他の分子の吸着を抑制され、結果的に非常に高い組織浸透性が得られたものと想定された。これは、以前報告とも一致しており [6](#))、CSF を介した mRNA 導入において、ナノミセルが優れた特性を有することを示している。

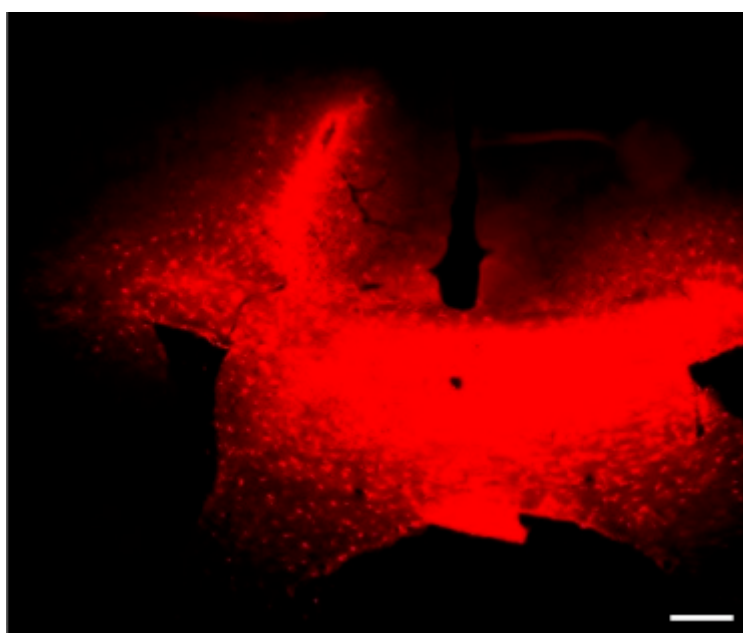


図2. 蛍光標識 mRNA 搭載ナノミセルの投与部位近傍における組織分布
 Cy5 標識した mRNA (赤) をマウス第三脳室へ投与し、24 時間後に投与部位近傍における組織分布を評価した。スケールバー：200 μ m。

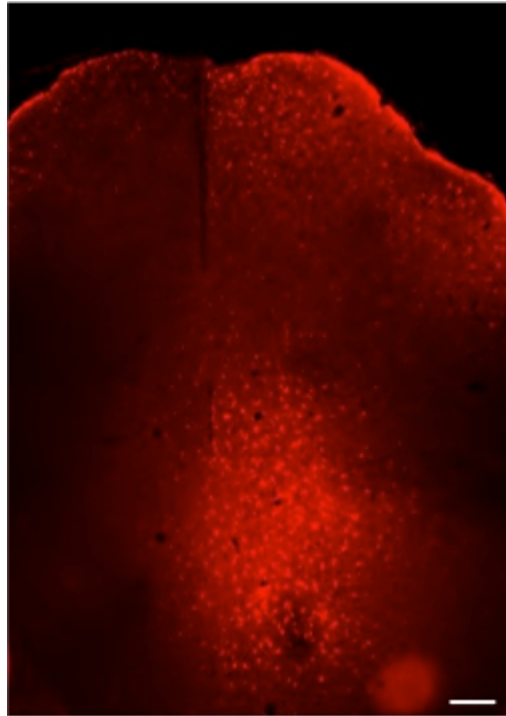


図 3. 蛍光標識 mRNA 搭載ナノミセルの投与部位から離れた場所における組織分布
Cy5 標識した mRNA (赤) をマウス cisterna magna へ投与し、24 時間後に投与部位より
3 mm 頭側の横断面における組織分布を評価した。スケールバー：200 μ m。

続いて、ナノミセルが分布する細胞種に関して、とりわけ疾患治療に重要と考えられる神経細胞への分布を評価した。ここでは、神経細胞の細胞核を NeuN によって免疫染色したところ、それと接する部分に mRNA 由来の蛍光を認めたことから、mRNA は神経細胞へも取り込まれることが明らかとなった (図 4)。一方で、神経細胞がない部位へも分布しており、取り込みに関する細胞種選択性は観られなかった。脳組織には神経細胞以外にもグリア細胞が存在し、これらの細胞にも取り込まれていることが想定される。したがって、治療応用においては、グリア細胞に導入されても効果を示すような因子を用いることで、より優れた効果が得られることが期待される。例えば、神経栄養因子のような分泌型の治療因子であれば、グリアに導入されても、神経細胞にも作用させることができる。

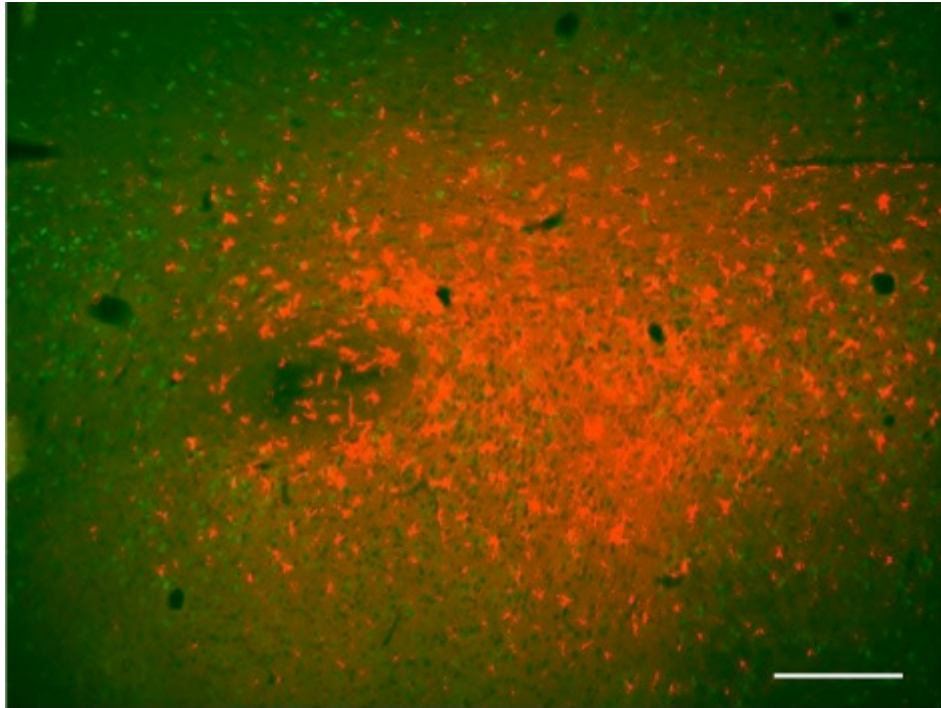


図 4. 蛍光標識 mRNA 搭載ナノミセルの神経細胞への取り込み

Cy5 標識した mRNA (赤) をマウス cisterna magna へ投与し、24 時間後に凍結切片を作製した。神経細胞の核を NeuN で免疫染色した (緑)。スケールバー：200 μ m。

そこで、今回、脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) を用いて、一過性全脳虚血後の海馬 CA1 領域における神経細胞の細胞死抑制を目指した。標的組織の近傍に投与した方が、高濃度のナノミセルの分布が得られることから、海馬の近傍である側脳室への投与を行った。正常ラット側脳室へ BDNF mRNA を投与し、海馬における BDNF 発現量を ELISA にて評価したところ、3 - 4 日程度の持続発現が観察された。続いて、一過性全脳虚血モデルラットの作製を行った。脳を栄養する血管である総頸動脈と椎骨動脈を 6 分間遮断し、その 6 日後に海馬の組織切片において NeuN を免疫染色したところ、CA1 領域で NeuN 陽性細胞が完全に消失しており、正確なモデル作製が確認された (図 5)。治療実験では、BDNF mRNA をモデル作製の 2、5 日後に投与し BDNF タンパク質を約 1 週間にわたり発現させた。すると、治療群では投与 3 週間後においても CA1 領域の神経細胞の約 60% の生存が確認された一方で、未治療群では細胞の生存はほとんど観察されなかった。このように治療効果が確認されたが、今後、例数 (N) を増やし、統計的な解析を行う予定である。

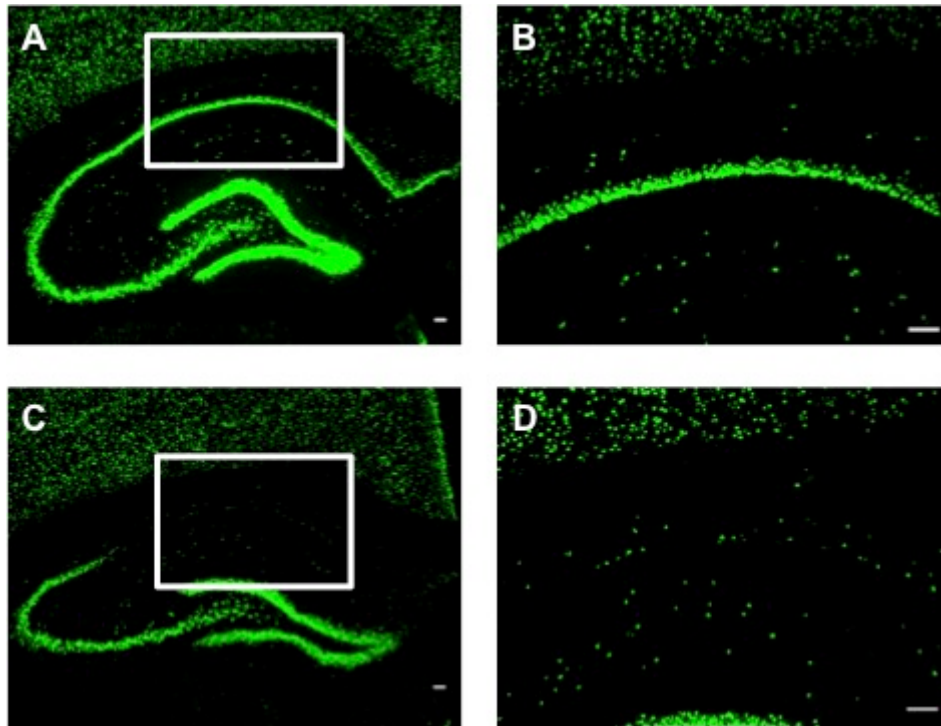


図5. ラット一過性全脳虚血に伴う神経細胞死
モデル作製の6日後に海馬領域の組織切片を作製し、神経細胞核を NeuN を用いて免疫組織染色した。A、Bは正常ラット、C、Dはモデルラットを示す。A、Cの拡大像をそれぞれB、Dに示す。スケールバー：A、Cは200 μ m、B、Dは100 μ m。

考 察

本研究では、mRNA 搭載ナノミセルの中枢神経系疾患治療への応用にあたって、まず脳室内投与後の組織分布について評価した。すると、投与部位から離れた組織であっても分布を示したほか、脳表面から1 mm 近くにわたって浸透していることが分かり、脳内の幅広い領域の細胞に mRNA を導入できることが明らかとなった。続いて、本システムを一過性全脳虚血モデルラットの治療に用いたところ、海馬領域の神経細胞抑制死を抑制することに成功したことから、治療応用への有用性が実証された。特筆すべきことに BDNF を1週間程度発現させただけで、ほぼ永続的な治療効果を得られることが明らかとなった。BDNF の持続発現は副作用の危険性もあるため、一過性発現が得られる mRNA 導入の特長を活かした応用法であると言える。

また、今回、mRNA が導入される細胞種に関する選択性は得られなかったが、ミセル表面に特定の細胞に結合するリガンドを搭載することで、原理的に選択性を得ることは可能である。実際に本研究でもこの課題に取り組んでいるが、優れた選択性を得るためにはリガンドの最適化だけでなく、非特異的な細胞への吸着を減らすためのナノミセルの安定化も必要であることが明らかとなった。ナノミセルの安定化に関しては以前も報告しているが⁷⁾、現在更なる機能向上に取り組んでいる。本研究に加え、アルツハイマー病を標的とした他の研究からも、ナノミセルの中枢神経系治療への有用性は実証されているが^{2,8)}、それに加えて細胞種選択性を得ることができれば、利用できる治療因子の幅が広がり、画期的な治療戦略を構築できることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門教授の片岡一則、准教授の位高啓史、東京大学医学部脳神経外科大学院生の福島雄大である。最後に、本研究にお支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Sahin U, Kariko K, Tureci O. mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(10):759-80. doi: 10.1038/nrd4278. PubMed PMID: 25233993.
- 2) Lin CY, Perche F, Ikegami M, Uchida S, Kataoka K, Itaka K. Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles. *J Control Release.* 2016;235:268-75. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.001. PubMed PMID: 27282413.
- 3) Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):113-31. doi: S0169409X00001241. PubMed PMID: 11251249.
- 4) Uchida S, Itaka K, Uchida H, Hayakawa K, Ogata T, Ishii T, et al. In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One.* 2013;8(2):e56220. doi: 10.1371/journal.pone.0056220. PubMed PMID: 23418537.
- 5) Baba M, Itaka K, Kondo K, Yamasoba T, Kataoka K. Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles. *J Control Release.* 2015;201:41-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.01.017. PubMed PMID: 25599855.
- 6) Han M, Oba M, Nishiyama N, Kano MR, Kizaka-Kondoh S, Kataoka K. Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol Ther.* 2009;17(8):1404-10. doi: 10.1038/mt.2009.119. PubMed PMID: 19471245.
- 7) Uchida S, Kinoh H, Ishii T, Matsui A, Tockary TA, Takeda KM, et al. Systemic delivery of messenger RNA for the treatment of pancreatic cancer using polyplex nanomicelles with a cholesterol moiety. *Biomaterials.* 2016;82:221-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.031. PubMed PMID: 26763736.
- 8) Perche F, Uchida S, Akiba H, Lin CY, Ikegami M, Dirisala A, et al. Improved Brain Expression of Anti-Amyloid beta scFv by Complexation of mRNA Including a Secretion Sequence with PEG-based Block Cationomer. *Current Alzheimer research.* 2017;14(3):295-302. doi: 10.2174/1567205013666161108110031. PubMed PMID: 27829339.