

【目的】 ゲノム編集技術は目的のゲノム領域の塩基配列を任意に改変可能な手法である。第 3 世代のゲノム編集技術である CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) -Cas (CRISPR-associated) システムは高効率なゲノム編集を誘導しかつ簡便なデザインが可能であり、医療への応用が非常に期待されている。CRISPR-Cas システムは Cas タンパク質と guide RNA (gRNA) から成り、これらの因子を効率的に標的細胞へ送達可能な技術の開発が医療応用において重要である。これらの因子を RNA として送達する手法は DNA と比較してゲノムへの挿入リスクおよび off-target 効果の低減が期待される。本研究では脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticles : LNP) による肝臓への mRNA 送達によるゲノム編集を目指し、製剤設計の最適化を目的とした。

【方法】 LNP の構成因子として独自の pH 感受性カチオン性脂質 (CL)、中性リン脂質 (PL)、コレステロール (chol)、PEG 化脂質 (PEG) および nanoluciferase (Nluc) をコードした mRNA を用い、脂質の種類・含量および mRNA/lipid 比に関して実験計画法を 2 段階行うことで最適化を試みた。LNP は 2 液の急速混合を実現するマイクロ流体デバイス (iLiNP) を用いて合成し、LNP の粒子径、多分散度指数 (PdI)、マウスに静脈内投与してから 24 時間後の肝臓および脾臓における遺伝子発現量 (Nluc 発光量) を測定し、各測定結果を多元分散分析により解析した。得られた最適 LNP と実用化製剤 (MC3-LNP) との遺伝子発現活性を Nluc 発現定量および CLSM により比較した。また、ヒトエリスロポエチン (hEPO) をコードした mRNA を搭載した最適 LNP をマウスに静脈内投与した際の hEPO 発現を ELISA 法により定量した。また、毒性の指標として血液学的パラメーター (ALT、AST、LDH、BUN、CRE) の測定を行った。

【結果】 多元分散分析により、肝臓における遺伝子発現効率に重要な脂質の種類およびそれらの組成比率の最適値を同定した。また、肝臓における遺伝子発現効率および遺伝子発現の肝臓選択性に重要な因子として粒子径、PdI および PL/PEG 比を新たに同定した。これらの解析結果から最適 LNP を同定した。最適 LNP は主に肝実質細胞における遺伝子発現を誘導し、その発現量は MC3-LNP よりも約 2.5 倍高かった。最適 LNP は factor IX (FIX) 補充による血友病治療効果を示した競合技術よりも高い hEPO 発現量を誘導した。また、いずれの血液学的パラメーターの変動も認めず、最適 LNP の安全性が示された。

mRNA 搭載 LNP の製造と実験計画法による製剤最適化

