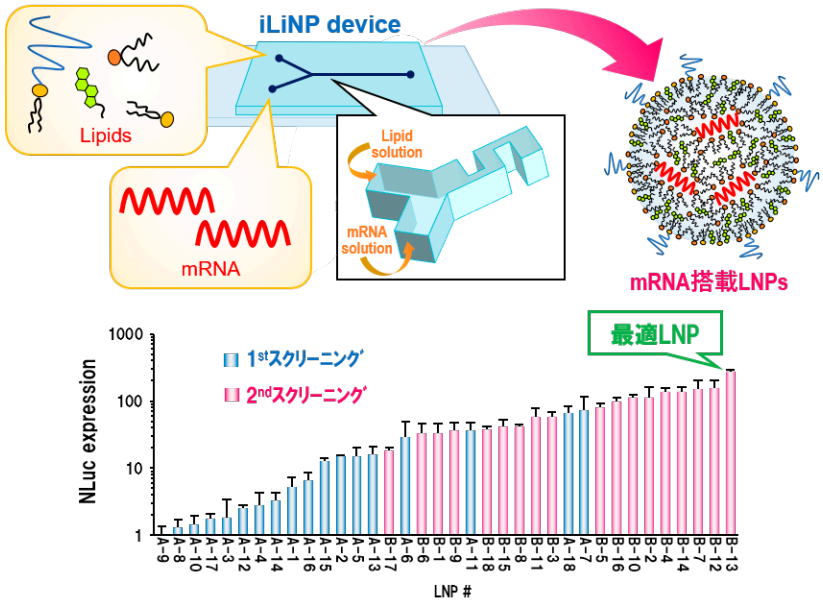
196　*in vivo*ゲノム編集を実現する脂質ナノ粒子	佐藤　悠介

【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



196. *in vivo* ゲノム編集を実現する脂質ナノ粒子

佐藤　悠介

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学分野 薬剤分子設計学研究室

Key words：脂質ナノ粒子，実験計画法，mRNA 送達，ゲノム編集

緒　言

ゲノム編集は目的のゲノム領域の塩基配列を任意に改変可能なバイオテクノロジーである。特に、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ることから、様々な難治性疾患に対する根本治療法として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）との複合体（ribonucleoprotein：RNP）として機能する。本システムの医薬への応用には、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重要である。非ウイルスベクターのよる送達様式としては、主にプラスミド DNA あるいは RNA として送達する手法があるが、前者はプラスミド DNA のゲノム DNA への挿入リスクおよびエンドヌクレアーゼである Cas タンパク質は比較的長期に亘って発現することによる非特異的 DNA 切断リスクが想定されることに加え、プラスミド DNA を核まで送達する技術的なハードルも存在することから、後者の手法が高効率かつ安全なゲノム編集治療の実現に有望であると考えられる。脂質ナノ粒子（LNP）は RNA 送達システムとして最も開発が進んでおり、特に RNA 干渉による遺伝子抑制を誘導する短鎖二本鎖 RNA でる short interfering RNA（siRNA）送達が先行している。LNP の mRNA 送達への応用も試みられてきているものの、多くが siRNA 送達用に最適化された脂質組成に変更を加えずに用いられており、長鎖一本鎖 RNA である mRNA に適した製剤処方が十分把握されているとは言い難いのが現状である［1〜3］。そこで、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最終目標とし、実験計画法を活用した mRNA 搭載 LNP の製剤設計の最適化と処方パラメーターの理解を試みた。

方　法

1.　mRNA 搭載 LNP の製造および物性評価

カチオン性脂質（CL）として筆者が独自に開発した pH 感受性カチオン性脂質 CL4H6 および CL15H6 を用いた［4, 5］。リン脂質（PL）として DSPC（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）、DOPE（1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）および卵黄由来スフィンゴミエリン（ESM）を用いた。また、コレステロール（chol）および PEG 化脂質（PEG）である PEG-DMG（methoxypolyethyleneglycol 2000）を用いた。mRNA については nanoluciferase（Nluc）、mCherry またはヒトエリスロポエチン（hEPO）をコードしたものを用いた。エタノールに溶解した脂質混合液（CL、PL、chol、PEG）と酸性緩衝液に溶解した mRNA を流速比 3、総流速 500 μL/min でミキサー内蔵マイクロ流体デバイス（iLiNP）に送液した。得られた溶液を PBS（−）を外水相として 4℃で透析し、LNP を得た。動的光散乱法により粒子径および多分散度指数（PdI）を測定した。核酸定量試薬 Ribogreen を用いて mRNA 濃度および封入率を求めた。また、対照 LNP として MC3-LNP を既報と同条件で製造した。

2. 動物実験

ICR マウス（雌性、4 週齢）に LNP を静脈内投与した。投与から 24 時間後に肝臓および脾臓を回収し、各組織における Nluc 発光量をルミノメーターにより測定した。測定サンプルのタンパク質濃度を BCA 法により定量した。Nluc 発現量を relative light unit (RLU)／mg protein として算出した。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて肝臓における mCherry 発現を観察した。血管は FITC 標識トマトレクチンにより染色した。また、採血し血清を得、血液学的パラメーターを測定した。さらに、投与から 6 時間後に採血し血漿を得、ELISA 法により hEPO 濃度を定量した。

3. 実験計画法

JMP ソフトウェアを用いて実験計画を作成した。1st スクリーニングとして 4 つの 3 水準連続因子（mRNA／lipid 比、CL 含量、PL 含量、PEG 含量）と 2 つの 2 水準カテゴリカル因子（CL 種類、PL 種類）を含む決定的スクリーニング計画（DSD）を立て、18 種の LNP 製剤処方を決定した（表 1）。2nd スクリーニングとして 3 つの 3 水準連続因子（CL 含量、PL 含量、PEG 含量）と 1 つの 2 水準カテゴリカル因子（PL 種類）を含む一部実施要因計画（FFD）を立て、18 種の LNP 製剤処方を決定した（表 1）。LNP の粒子径、PdI および肝臓・脾臓における Nluc 発現量に対して多元分散分析を行った。DSD においては DSD の効果的モデル選択により、あてはまりが悪い場合は補正赤池情報量基準に基づく変数増加法によりモデルを作製した。FFD においては最小二乗法による線形回帰分析によりモデルを作製した。

表 1. 各スクリーニングにおける因子とその水準

因子	1st スクリーニング	2nd スクリーニング
mRNA/lipid比 (g/mol)	18.3 – 36.7	18.3 (固定)
カチオン性脂質種類 (CL)	CL4H6, CL15H6	CL4H6 (固定)
リン脂質種類 (PL)	DSPC, DOPE	DSPC, ESM
CL (%CL)	40 – 60	50 – 70
PL含量 (%PL)	5 – 25	5 – 15
PEG化脂質含量 (%PEG)	0.5 – 2.5	0.5 – 2.5

結　果

1. mRNA 搭載 LNP の製剤処方の最適化

1st スクリーニングを行った（図 1A）。肝臓における Nluc 発現量と粒子径あるいは PdI とのプロットから、粒子径約 25 から 70 nm、PdI 約 0.08 から 0.44 までの範囲でそれぞれ有意な正および負の相関性が認められた（図 1B、C）。各応答に対するモデルを構築し、有意な影響を及ぼす因子およびその水準を表 2 にまとめた。例として、CL として CL4H6、PL として DSPC を用い、PEG 量を少なくすれば粒子径の大きい LNP が得られた。これらの結果より、2nd スクリーニングでは mRNA／lipid 比および CL を 18.3 および CL4H6 に固定した。また、PL として DOPE を除き、予備検討として比較的大きな粒子径に制御可能な ESM を検討に加えることとした。また、CL 含量を 1st スクリーニングよりも 10%高く設定した。最も肝臓における Nluc 活性が高かった A-7 および A-18 の肝臓選択性（肝臓／脾臓比）を比較すると A-18 が 10 倍以上優れており（図 1A）、2 者の製剤処方を比較すると A-18 の PEG／PL 比が高いことが明らかとなった。PEG／PL 比が肝臓選択性に寄与していると予測し、応答間で適する水準が異なった PEG 含量の水準を据え置き、PL 含量の水準を低くすることとした。

2nd スクリーニングを行った（図 2A）。1st スクリーニングと比較した結果、粒子径、PdI および肝臓における Nluc 発現がそれぞれ優位に上昇、低下および上昇し、適切な実験スペースのデザインに成功したことが確認された（図 2B～D）。検討した 18 製剤（B-1 から B-18）を肝臓選択性の観点で分類（<1、1～3、>3）し解析した結果、高い肝臓選択性を示す条件として約 60 nm 程度の比較的小さな粒子径、高い PEG／PL 比が見出された（図 2E～G）。以上の解析結果から、B-13（CL4H6／ESM／chol／PEG=60／5／35／1.5 mol%）が肝臓における遺伝子発現活性および肝臓選択性の観点で最も基準に適合すると考えられ、本製剤を最適製剤として決定した。

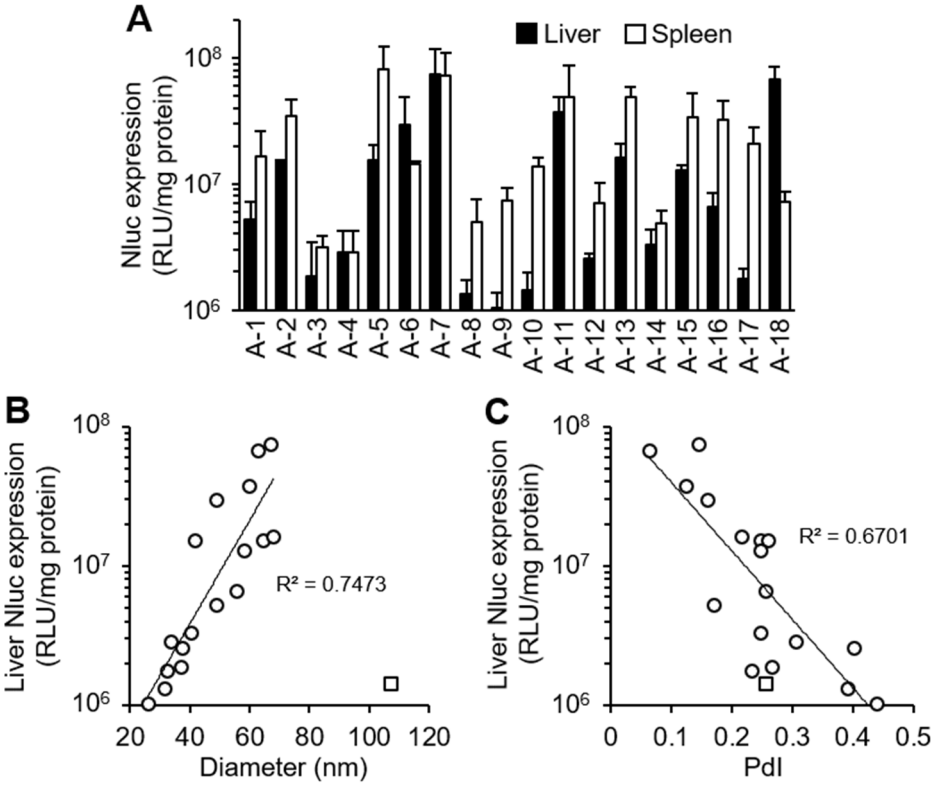


図 1. 1st スクリーニングの結果

A） 各 LNP（A-1～A-18）投与後の肝臓および脾臓における Nluc 発現。

B） 肝臓における Nluc 発現量と粒子径との相関。

C） 肝臓における Nluc 発現と PdI との相関。

表 2. 多元分散分析（1st スクリーニング）結果

因子＼応答	粒子径（上昇）	PdI（減少）	肝臓Nluc活性（上昇）	脾臓 Nluc活性（上昇）
mRNA/lipid比	–	–	–	–
CL	CL4H6	CL4H6	CL4H6	CL4H6
PL	DSPC	DSPC	DSPC	–
%CL	–	–	高	高
%PL	–	–	–	–
%PEG	低	高	–	低

各応答に対して有意な影響を及ぼす因子を表している。例として、CLとしてCL4H6、PLとしてDSPCを用い、%PEGを低くすることで粒子径が上昇することを意味する。

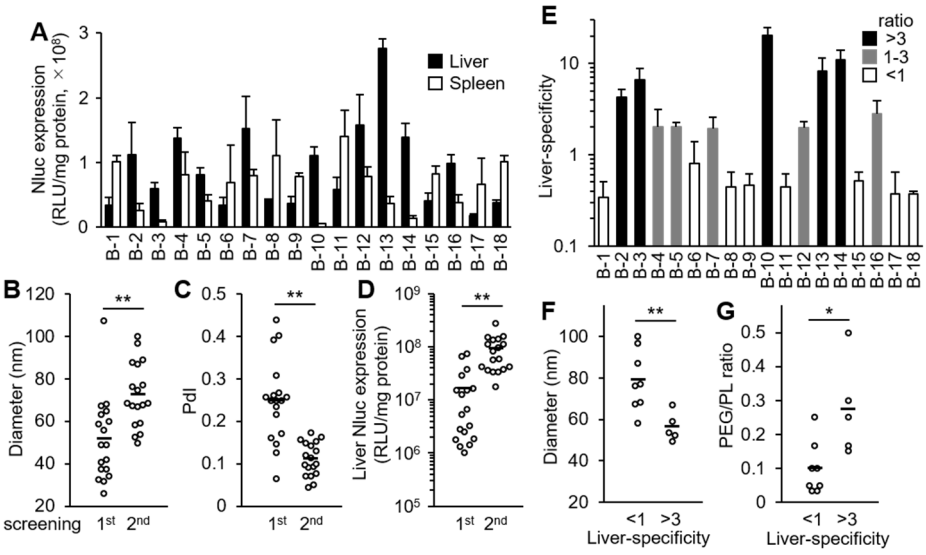


図 2. 2nd スクリーニングの結果

A) 各 LNP（B-1～B-18）投与後の肝臓および脾臓における Nluc 発現。

B) 粒子径のスクリーニング間比較（t 検定、**p＜0.01）。

C) PdI のスクリーニング間比較（t 検定、**p＜0.01）。

D) 肝臓における Nluc 発現のスクリーニング間比較（t 検定、**p＜0.01）。

E) 各 LNP（B-1～B-18）投与後の脾臓に対する肝臓中 Nluc 発現比（肝臓選択性）。

F) 肝臓選択性と粒子径との関係（t 検定、**p＜0.01）。

G) 肝臓選択性と PEG/PL 比との関係（t 検定、**p＜0.05）。

2. 最適化 LNP の遺伝子発現活性の検証

3 製剤（B-13、B-16、B-17）による hEPO 発現活性を検討した結果、B-13 が最も高い hEPO 濃度（8,756 ng/mL）を示したことから、異なる mRNA 長（Nluc：～2,000 nt、hEPO：858 nt）においても最適な製剤処方範囲は大きく変化しないことが示唆された（図 3A）。トランスサイレチン型アミロイドーシスに対する LNP 型 siRNA 治療薬 Onpattro の主要脂質成分 MC3 を含有する LNP と B-13 との遺伝子発現活性を比較した結果、B-13 は MC3 よりも 2.5 倍高い Nluc 発現を示した（図 3B）。また、B-13 は MC3 よりも強い mCherry 由来蛍光が観察され、主に肝実質細胞で発現が認められた（図 3C）。

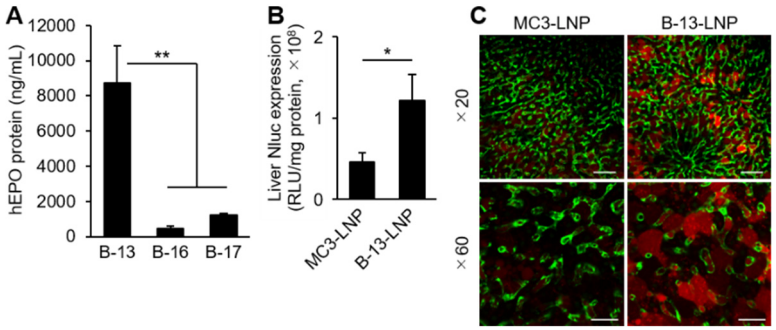


図 3. B-13 LNP の遺伝子発現活性

A) hEPO mRNA 搭載 LNP 投与から 6 時間後の血清中 hEPO 濃度（SNK 検定、**p＜0.01）。

B) Nluc mRNA 搭載 LNP 投与から 24 時間後の肝臓中 Nluc 発現量（t 検定、**p＜0.05）。

C) mCherry mRNA 搭載 LNP 投与から 24 時間後における肝臓の蛍光顕微鏡観察像
（スケールバー：100 μm（上）、20 μm（下））。

3. 最適化 LNP の安全性評価

B-13 をマウスに 0.5 mg mRNA/kg で静脈内投与し、24 時間後における血液学的パラメーター（アラニンアミノ基転移酵素：ALT、アスパラギン酸アミノ基転移酵素：AST、乳酸脱水素酵素：LDH、血清尿素窒素：BUN、クレアチニン：CRE）を測定した。その結果、いずれのパラメーターも B-13 投与による有意な変動は認められなかった（図 4）。

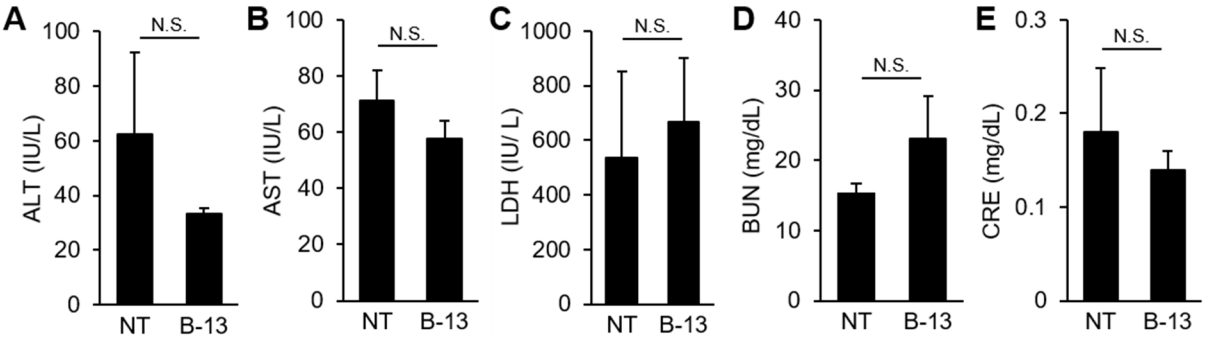


図 4. B-13 LNP の安全性評価

B-13 LNP 投与から 24 時間後の血清中 ALT（A）、AST（B）、LDH（C）、BUN（D）、および CRE（E）（N.S. : not significant.）。

考　察

本研究では実験計画法を活用して mRNA 搭載 LNP の製剤処方の最適化を行った。通常の実験計画法では 1 つの従属因子に対する複数の独立因子の影響を解析する［6, 7］。独立因子には実験的に制御できない因子、あるいは他の独立因子に影響を受ける因子はおけない制約があるため、粒子径、PdI および脾臓（オフターゲット臓器）における遺伝子発現を肝臓における遺伝子発現に加えて従属因子として並行して解析を行い、各従属因子間の相関等の詳細な解析を行った。その結果、従来の解析では検出できない遺伝子発現の肝臓選択性に与える製剤の要件（粒子径および PEG／PL 比）を見出すことに成功した。特に、粒子径は LNP の薬物送達効率に大きな影響を与えることが明らかになっているため、そのような交絡因子に着目して計画を立案し、解析することは真の最適製剤処方を見出すうえで重要であると考えられる。

最適化製剤（B-13）は 2018 年に上市された LNP 型 siRNA 製剤の主要脂質成分 MC3 を含有する LNP よりも 2.5 倍程度高い遺伝子発現効率を示した。また、B-13 は血友病 B モデルマウスにおける治療効果を示した競合製剤よりも投与量当たりの hEPO 発現で 1.5 倍程度高かったことから［8］、B-13 は疾患治療が可能なレベルの活性を有する製剤であることが示唆された。今後は B-13 を基盤とした *in vivo* ゲノム編集の実証を進めたい。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、マイクロ流体デバイスをご供与いただいた北海道大学大学院工学研究院生物計測化学研究室の渡慶次学教授および同研究室の真栄城正寿助教に謝意を表する。

文　献

1） Andreas Thess, Stefanie Grund, Barbara L Mui, Michael J Hope, Patrick Baumhof, Mariola Fotin-Mleczek, Thomas Schlake. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. Mol Ther. 2015 Sep;23(9):1456-64. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26050989 DOI: 10.1038/mt.2015.103

2) Suvasini Ramaswamy, Nina Tonnu, Kiyoshi Tachikawa, Pattraranee Limphong, Jerel B. Vega, Priya P. Karmali, Pad Chivukula, and Inder M. Verma. Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Mar 7;114(10):E1941-50. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28202722 DOI: 10.1073/pnas.1619653114

3) Maja Sedic, Joseph J Senn, Andy Lynn, Michael Laska, Mike Smith, Stefan J Platz, Joseph Bolen, Stephen Hoge, Alex Bulychev, Eric Jacquinet, Victoria Bartlett, Peter F Smith. Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. Vet Pathol. 2018 Mar 1;55(2):341-54. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29191134 DOI: 10.1177/0300985817738095

4) Yusuke Sato, Kazuki Hashiba, Kosuke Sasaki, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Hideyoshi Harashima. Understanding Structure-Activity Relationships of pH-sensitive Cationic Lipids Facilitates the Rational Identification of Promising Lipid Nanoparticles for Delivering siRNAs in Vivo. J Control Release. 2019 Feb 10;295:140-52. Epub 2019 Jun 2. PMID: 30610950 DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.01.001

5) Yusuke Sato, Nana Okabe, Yusuke Note, Kazuki Hashiba, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Hideyoshi Harashima. Hydrophobic Scaffolds of pH-sensitive Cationic Lipids Contribute to Miscibility With Phospholipids and Improve the Efficiency of Delivering Short Interfering RNA by Small-Sized Lipid Nanoparticles. Acta Biomater. 2020 Jan 15;102:341-50. Epub 2019 Nov 13. PMID: 31733331 DOI: 10.1016/j.actbio.2019.11.022

6) Kevin J Kauffman, J Robert Dorkin, Jung H Yang, Michael W Heartlein, Frank DeRosa, Faryal F Mir, Owen S Fenton, Daniel G Anderson. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. Nano Lett. 2015 Nov 11;15(11):7300-6. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26469188 DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b02497

7) Matthias A. Oberli, Andreas M. Reichmuth, J. Robert Dorkin, Michael J. Mitchell, Owen S. Fenton, Ana Jaklenec, Daniel G. Anderson, Robert Langer, and Daniel Blankschtein. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. Nano Lett. 2017 Mar 8;17(3):1326-35. Epub 2016 Dec 5. PMID: 28273716 DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b03329

8) F DeRosa, B Guild, S Karve, L Smith, K Love, J R Dorkin, K J Kauffman, J Zhang, B Yahalom, D G Anderson, M W Heartlein. Therapeutic Efficacy in a Hemophilia B Model Using a Biosynthetic mRNA Liver Depot System. Gene Ther. 2016 Oct;23(10):699-707. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27356951 DOI: 10.1038/gt.2016.46