

I 基本情報

研究開発課題名：

(日本語) RNA工学とペプチド工学の融合による生体内ゲノム編集治療のための技術基盤の開発

(英語) Development of platform technology for in vivo genome editing therapeutics using RNA and peptide engineering

研究開発実施期間：2018年10月15日～2021年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 内田 智士

(英語) Satoshi Uchida

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 京都府立医科大学・大学院医学研究科・医系化学・准教授

(英語) Associate Professor, Medical Chemistry, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine

II 研究開発の概要

生体内ゲノム編集が、遺伝子治療の新たな方法論として期待されているが、その実現に向けて臨床応用可能な安全かつ効率的なゲノム編集の方法論が必要である。ここで、ウイルス性ベクターを用いたゲノム編集酵素遺伝子の導入では、高い遺伝子導入効率を得られるものの、ウイルス自体の安全性の懸念があるほか、ゲノム編集酵素が持続的に発現することによる off target ゲノム切断の可能性がある。さらに、中和抗体を有する患者への投与も大きな課題とある。Cas9 タンパク質/ガイド RNA 複合体など酵素自体の送達も検討されているが、*in vivo* 送達が難しく、また臨床応用可能なスケールでの調製や経済的コストが問題となる。そこで、本研究では、mRNA 医薬を用いたゲノム編集酵素の導入に着目した。mRNA は安全性が極めて高いほか、経済的にも比較的安価であり、既に、その *ex vivo* 送達によるゲノム編集の治験が既に行われている。一方で、効率的な *in vivo* mRNA 送達の方法論がなく、mRNA を用いた生体内ゲノム編集は、動物実験レベルを含めても報告が少なかった。

本研究では、mRNA 送達効率の向上に向けて、①mRNA に対して相補鎖 RNA を結合させ、その機能を向上させる RNA ナノアーキテクチャ(R-NA)の技術、②mRNA と結合して酵素分解から保護するとともに、標的細胞への導入を促進するためのペプチドの技術の2つの技術を融合、発展させた。開発した技術はゲノム編集に用いる際、簡便な配列設計が可能な CRISPR/Cas9 のシステムを用い、Cas9 mRNA とガイド RNA の共送達を行った。また、一連の開発を通じて、ゲノム編集分野に留まらない mRNA 医薬全般の応用に資する mRNA 送達技術の構築に取り組んだ。

【mRNA 送達システムの開発】

mRNA 送達について、**R-NA** とペプチドの各々の開発を行い、それらを統合させた。**R-NA** は、mRNA に安定化のための機能性修飾を行った相補的短鎖 RNA をハイブリダイズさせたもの(**R-NA1**)、及び複数の mRNA 鎖を、相補的短鎖 RNA リンカーを用いて束ね集合体を形成させたもの(**R-NA2**)に大別される。**R-NA1** では、これまでコレステロールを mRNA に修飾することで mRNA 輸送担体を安定化させ、経気道肺投与における mRNA 導入活性を向上することに成功していた[*Biomaterials* 197:255-267 (2019)]。本研究で、このシステムとペプチド間化学架橋を併用し、さらに mRNA 導入活性を向上させた[*J. Control. Release* 330:317-328 (2021)]。また、mRNA に翻訳活性を損なうことなくポリエチレングリコール(PEG)を修飾するシステムを開発した[*Molecules* 24:1303 (2019)]。**R-NA2** に関して、これまでに mRNA に集合体を形成させることで、ルシフェラーゼ mRNA の安定性を向上できることが分かっていたが、今回、複数種の mRNA において、その酵素分解耐性を向上できる汎用的なシステムであることを新たに示したほか、複雑な構造を持つ **R-NA2** から、効果的な翻訳が得られるメカニズムを明らかにした[*Angew. Chem. Int. Ed.* 58:11360-63 (2019)]。**R-NA1**、**R-NA2** 共に、2 本鎖 RNA を含む構造を有しており、自然免疫応答を惹起する可能性が懸念されたが、*in vitro* や *in vivo* の様々な検討で、免疫原性が mRNA 単体と同程度であった。

ペプチドについて、核酸のエンドソームから細胞質への脱出を促進する機能性素子を、ポリアスパラギン酸側鎖を導入した PAsp(DET)を、これまで mRNA 送達に用いてきた。一方で、酵素分解を防ぐための輸送担体安定性が重要となるので、本研究では、ポリアスパラギン酸側鎖に、エンドソーム脱出素子に加え、様々な疎水性官能基を修飾した両親媒性ペプチドを合成し、疎水性相互作用による安定化を目指した。スクリーニングを行った結果、側鎖にシクロヘキサノエタン(CHE)を持つペプチドが、培養細胞や、マウス脳に対して優れた mRNA 導入効率を示した[*ACS Cent. Sci.* 5:1866-1875 (2019)]。このシステムを用いることで、脳への *in vivo* ゲノム編集にも成功している(後述)。また、このようなポリアスパラギン酸骨格を持つポリペプチド鎖を、生体内で速やかに分解するように設計したところ、細胞内でペプチドが mRNA から速やかに放出され、優れたタンパク質翻訳活性が得られた[*Sci. Technol. Adv. Mater.* 20:105-115 (2019)]。

R-NA とペプチドの融合に関して、これまでに、**R-NA2** を単体で用いることで生体内 mRNA 送達効率の向上に成功していたが、ペプチドとの併用効果に関しては未知数であった。今回、PEG 化ポリリシンと **R-NA2** を混合したところ、単体の mRNA と混合した場合と比べて、複合体表面の PEG 密度が向上し、さらに内部でより密な mRNA 凝縮が得られた。結果的に優れた脳への mRNA 導入活性が得られた[*Biomaterials* 261 120332 (2020)]。RNA の立体構造が、カチオン性高分子との複合体の安定性に影響することを示した、世界に先駆けた報告である。更に新規に開発したペプチドと **R-NA** との融合にも取り組んだ。ここで、*in vivo* mRNA 送達では、PEG 化が重要であることから、上述のスクリーニングにより得られた PAsp(DET/CHE)を PEG 化し、**R-NA1** 及び **R-NA2** との複合体を調製したところ、優れた mRNA 導入効率を得られた。

本研究における生体内ゲノム編集では局所投与を対象としたが、同時に mRNA 医薬全般に有益な mRNA 全身投与に向けた開発も行った。静脈内からの全身投与では、標的組織に到達するまでの間の血液循環中での mRNA 酵素分解が大きな課題であったが、酵素耐性を大幅に向上させる様々な技術を開発し[*J. Drug Target.* 27:670-680 (2019), *European Polymer Journal* 140:110028 (2020)]、mRNA の血液循環中での安定性を向上させた[*Biomaterials* 261:120332 (2020), *Adv. Healthc. Mater.* 9:e2000538 (2020)]。更に、最近、全身投与のもう一つの課題であるナノ粒子の肝類洞内皮細胞を介したクリアランスを抑制する方法論も開発し[*Science Advances* 6(26) eabb8133 (2020)]、mRNA 全身投与に向けて基盤技術が構築された。

【生体内ゲノム編集】

上述の mRNA 送達システム開発と並行して、生体内ゲノム編集にも取り組んだ。多くの *in vivo* ゲノム編集試験を行う上で、ハイスループットな評価系は重要であった。そこで配列特異的なゲノム切断により、蛍光タンパ

ク質(tdTomato)を発現する遺伝子改変マウスを用いた。実際に、このマウスの肝臓に対して、ゲノム編集酵素を発現するプラスミド DNA を、静水圧を用いて投与したところ、tdTomato の発現が観察され、評価手法として機能することが確認された。なお、この投与法は、動物実験におけるポジティブコントロールとして有効であるが、侵襲性が強いいため、臨床応用は困難である。

次に、培養細胞を用いて、Cas9 mRNA、ガイド RNA 混合比の最適化を行った。ここでは上述の遺伝子改変マウスより得た初代培養肝細胞に対して、PAsp(DET/CHE)を用いた導入を行った。すると、Cas9 mRNA: ガイド RNA が、重量比で 1:1、モル比換算で 1:45 というガイド RNA 過剰条件で優れたゲノム編集活性が得られた。以降の *in vivo* 導入実験では、この構成比を用いた。

生体内ゲノム編集では、まず PAsp(DET/CHE)を用いて、脳を標的とした。ここでは、PAsp(DET/CHE)/Cas9 mRNA 複合体と PAsp(DET/CHE)/ガイド RNA 複合体を混合し、上述の遺伝子改変マウスの脳室へ投与した。脳室の上皮細胞にゲノム編集活性が得られた[*ACS Cent. Sci.* 5(11) 1866-1875 (2019)]。一方で、脳実質に対する浸透作用は観られなかった。

そこで、以下 3 つの戦略を検討した。(i)ペプチド/RNA 複合体を PEG 化し、浸透性の向上を目指した。(ii)ゲノム編集の効果の持続性を踏まえると、脳実質内投与も許容されると考え、脳実質内投与を行った。(iii)上述のようにペプチド/Cas9 mRNA 複合体とペプチド/sgRNA 複合体を別に調製し混ぜて投与する場合[NP(Cas9)+NP(ガイド RNA)]; NP は nanoparticle の略)と、ペプチド/Cas9 mRNA/sgRNA の 3 つの要素を含む複合体を調製して投与する場合[NP(Cas9/ガイド RNA)]の比較も行った。ここで、詳細な物性解析より PEG 化ペプチドと、Cas9 mRNA、sgRNA の混合物を混ぜることで、PEG 化ペプチド/Cas9 mRNA/ガイド RNA の全てを含む三元複合体が形成されることを確認した。続いて大脳皮質への投与を行ったところ、NP(Cas9/ガイド RNA)で NP(Cas9)+NP(ガイド RNA) と比べ、高いゲノム編集効率が得られた[*J. Control. Release* 332:260-268 (2021)]。メカニズム解析から、sgRNA はペプチドとの会合力が弱く、生体内での安定性が低いが、Cas9 mRNA と同時にペプチドと複合体を形成させることで、その会合力が向上し、安定性が高まったことが示唆された。また、PEG 化により輸送担体の組織浸透性が向上し、ゲノム編集効率が向上することも明らかとなった。ここで、PEG 化した NP(Cas9/ガイド RNA)では、投与部位の大半の細胞にゲノム編集が観られたが、PEG 化していない設計や NP(Cas9)+NP(sgRNA)では、局所投与した部位であっても、十分なゲノム編集活性が得られておらず、mRNA 送達システムの精密設計が、効果的な生体内ゲノム編集において重要であることが明らかとなった。また、PEG 化した NP(Cas9/sgRNA)では、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアの全ての細胞種に対してゲノム編集活性を認めた。さらに、このシステムを **R-NA2** と融合することで有望な結果を得ている。また、投与後に血液検査により投与システムの安全性を評価したが、肝障害(AST,ALT)、腎障害(BUN,Cre)、全般的な組織障害(LDH)のマーカーに異常はなく、また血液中の電解質にも異常は見られなかった。

【実用化に向けた取り組み】

医薬品としての実用化に向け、汎用性が高く、かつ大量調製可能な合成スキームの確立を行った。既に試薬メーカーから販売されている poly(β -benzyl-L-aspartate) (PBLA)を起点とするアミノリシス反応を介して種々のポリペプチド PAsp(DET/R)の合成を行った。NMP 溶媒、5°C、24 h という反応条件により、一連のポリペプチドが問題なく合成できることを ¹H NMR で確認した。また、同様の反応条件は導出先企業でも追従することができ、リードポリペプチドである PAsp(DET/CHE)を問題なく合成できることが確認された。以上より、医薬品としての大量調製に向けた合成スキームが確立された。

以上のように、本研究では、様々な mRNA 送達システムの開発に成功し、そのうちいくつかで、効率的な生体内ゲノム編集活性が得られたほか、安全性も確認されている。ゲノム編集は、一度の治療で長期にわたる効果が得られる優れた方法論であるが、これまで、安全かつ効率的に、生体内ゲノム編集を実現するための技術がなか

った。今回、ウイルスを用いず、mRNA 医薬を基盤として、生体内でゲノム編集を行う技術を確立した。この成果は、臨床応用可能なゲノム編集の実現に資するものである。また、mRNA 医薬は、タンパク質補充治療、がん免疫治療の分野で期待されているが、本研究で開発した mRNA 送達技術は、これらの分野へも展開できる。

また、**R-NA** の技術はワクチンへも展開できる。この技術を応用し、RNA の構造を制御すると、mRNA のタンパク質翻訳活性を維持したまま、mRNA に 2 本鎖 RNA 構造由来の免疫賦活化作用を付与することができる [*Biomaterials* 150:162-170 (2018)]。すなわち、調製した mRNA は抗原タンパク質を発現するとともに、合わせて免疫賦活化アジュバントとしても機能する。mRNA ワクチンに対するアジュバント開発の研究があまりないなか、安全性が高くシンプルな設計の画期的な技術である。現在、この技術を基盤として新型コロナウイルスワクチンの開発を行っている。

In vivo genome editing is an excellent tool in gene therapy. For its wide-spread clinical application, safe and efficient methods are needed to introduce genome editing enzymes *in vivo*. Although viral vector-based approaches induce efficient genome editing, prolonged expression of genome editing enzymes would cause off-target cleavage of the genome. Moreover, the function of viral vectors is diminished by neutralizing antibodies to the viruses. Protein-based approaches, including the delivery of *Cas9* mRNA/single guide RNA (sgRNA) complexes, are extremely challenging *in vivo*, and have issues in a large-scale production and economic costs. Thus, we focus on an RNA-based approach, especially co-delivery of *Cas9* mRNA and sgRNA, which is a safer and more economical option. Meanwhile, reports of *in vivo* genome editing using RNA-based approaches are still limited largely due to the issue in delivery. Herein, we developed safe and efficient mRNA delivery system for *in vivo* genome editing by combining two technologies: (i) RNA Nano-Architecture (**R-NA**), which improves mRNA functionalities by hybridizing complementary RNA to mRNA, (ii) peptide engineering, which protects mRNA from degradation and facilitates intracellular delivery processes of mRNA.

Regarding **R-NA**, we previously reported hybridization of cholesterol-introduced RNA oligonucleotides (OligoRNAs) stabilizing poly(ethylene glycol) (PEG)-peptides-based mRNA carriers and improving *in vivo* mRNA delivery efficiency in the lung [*Biomaterials* 197:255-267 (2019)]. In this study, we further improve mRNA delivery efficiency by crosslinking between peptides [*J. Control. Release* 330:317-328 (2021)]. We also succeeded in introducing PEG to mRNA with preserved mRNA translational activities [*Molecules* 24:1303 (2019)]. Furthermore, we successfully improved mRNA nuclease stability by bundling mRNA strands using OligoRNA linkers, with preserved translational activity [*Angew. Chem. Int. Ed.* 58:11360-63 (2019)]. Although these **R-NA** systems have a potential concern of immunogenicity caused by double stranded RNA structures, we successfully avoid this concern by controlling hybridization lengths.

Regarding peptides, we previously developed functional peptides facilitating endosomal escape of mRNA to the cytosol after cellular uptake. In this study, we installed hydrophobic moieties to the peptides to stabilize mRNA/peptide complexes and avoid mRNA enzymatic degradation. This system induced genome editing in the brain [*ACS Cent. Sci.* 5:1866-1875 (2019)]. We also improve mRNA translational activity by facilitating the degradation of peptides inside cells, which enhanced the release of mRNA from peptide inside cytosol [*Sci. Technol. Adv. Mater.* 20:105-115 (2019)].

Then, we combined these two technologies, **R-NA** and advanced peptides. For example, we improved *in vivo* mRNA introduction efficiency to the brain by complexing bundled mRNA, one form of **R-NA** mentioned above, and PEG-polypeptides [*Biomaterials* 261 120332 (2020)]. To the best of our knowledge, this is the first study to improve mRNA polyplex stability by modulating mRNA steric structure. In addition, we succeeded in improving the functionalities of **R-NA**, using newly developed peptides introduced with hydrophobic moieties mentioned above. Collectively, we developed various formulations of **R-NA**/peptide complexes for improving *in vivo* mRNA delivery efficiency.

Lastly, we provided design concept of mRNA/peptide nanoparticles (NPs) to deliver *Cas9* mRNA and sgRNA efficiently *in vivo* after intraparenchymal delivery to mouse brain [**J. Control. Release** 332:260-268 (2021)]. We prepared NPs in two methods; separate formulation of peptide/*Cas9* mRNA and peptide/sgRNA complexes, followed by their mixing (NP_{cas9} + NP_{sgRNA}) and formulation of peptide/*Cas9* mRNA/sgRNA ternary complexes (NP_{Cas9/sgRNA}). Interestingly, NP_{sgRNA} was highly unstable, while sgRNA was stably encapsulated in NP_{Cas9/sgRNA}. As a result, NP_{Cas9/sgRNA} induced more efficient genome editing in mouse brain compared to NP_{sgRNA}. Notably, PEGylated NP_{Cas9/sgRNA} showed enhanced efficiency in genome editing compared to non-PEGylated NP_{Cas9/sgRNA}. Mechanistic analyses showed wider distribution of NPs in the brain after NP PEGylation. Ultimately, PEGylated NP_{Cas9/sgRNA} induced successful genome editing in neurons, astrocytes, and microglia. Safety analyses revealed no detectable toxicity after the genome editing.

In conclusion, we succeeded in efficient genome editing *in vivo* using RNA-based approaches after developing efficient mRNA delivery systems. This achievement provides an excellent tool to genome editing-based gene therapy with safety sufficient for clinical applications. Furthermore, the basic technologies of mRNA delivery developed in this study will contribute to other application fields of mRNA therapeutics, including mRNA vaccines, protein replacement therapies, and cancer immunotherapy.