

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) DMD に対するナノ DDS を用いたゲノム編集治療法の開発  
(英語) Development of Genome Editing Therapy utilizing Nano-DDS for DMD

研究開発実施期間: 令和元年8月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 堀田秋津  
(英語) Akitsu Hotta

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 京都大学・iPS細胞研究所・准教授  
(英語) Kyoto University, Center for iPS Research and Application, Associate Professor

## II 研究開発の概要

### ・本課題の背景

指定難病の1つであるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対して、ゲノム編集技術を利用したエクソンスキッピング誘導による新規治療法を開発するためには、一過性かつ高効率にゲノム編集酵素を筋組織へ送達可能な新規送達技術が必要とされている。本研究提案では、生体内の筋組織でゲノム編集によるエクソンスキッピングを実現するために、カチオン化脂質を用いた新規脂質ナノ粒子(LNP)による効率的なナノ薬剤送達技術開発を行った。

### ・脂質ナノ粒子(LNP)を用いた骨格筋組織へのRNA送達技術

武田薬品工業の全面的な協力の下、骨格筋組織への送達効率が高いカチオン化脂質 TCL053 を見出して、これをベースにCRISPR Cas9 と gRNA の内封入条件を最適化した。また、LNP 製造法確立に向けて、原材料および調剤方法の条件検討を行った他、RNase に対する耐久性試験を実施した所、LNP 内封により高い RNA 保護効果があることが確認できた。こうして調整した LNP-CRISPR をマウスモデルで評価するために、エクソンスキッピングが誘導されるとルシフェラーゼが発光するレポーターマウスと、マウスのジストロフィン遺伝子の一部をヒトのものと置き換えたヒト化モデルマウスを作出し、投与方法の最適化および有効性検証を行った。

#### ・ LNP-CRISPR による長期薬効持続

エクソンススキッピングによるジストロフィンタンパク質回復技術としては、アンチセンス核酸がいくつかすでに承認されているが、血中半減期が3時間余りと短く、DMD患者は一生涯に渡って頻回(毎週)投与が必要となる。この点、LNP-CRISPRであればゲノムレベルでのエクソンススキッピングを誘導できるため、ジストロフィンタンパク質の回復効果は、標的細胞が生存する限りは持続すると考えた。実際、モデルマウスを用いた検討で、LNP-CRISPRを一回投与するだけで、ジストロフィンタンパク質の回復が少なくとも1年は持続していることを確認した。この長い薬効は、DMD患者のQoL向上に貢献できると期待される。

#### ・ 複数回投与が可能な LNP-CRISPR

また、CRISPRを生体内筋組織へと送達する技術として、AAVベクターを用いた送達手法が開発されており、多数の前臨床研究成果が論文報告されている。しかしながらAAVベクターはタンパク質の殻で覆われており抗原性が高く、一回投与すると中和抗体が惹起されてしまうため、二回目以降の投与が阻害されてしまう。我々のマウスを用いた検討において、AAV-CRISPRは二回目投与時にはゲノム編集活性を確認することが出来なかったが、LNP-CRISPRにおいては、二回目投与でも一回目と同等のゲノム編集活性を確認することができた。これにより、投与回数を重ねることで加療範囲を拡大できるほか、治療効果が落ちてきたタイミングでの再投与も可能になると期待される。

#### ・ CRISPR のオフターゲット評価と LNP-CRISPR をマウス投与後の安全性評価

ヒトジストロフィン遺伝子を標的とするCRISPR-gRNAの配列認識特異性を解析するために、CIRCLE-seq解析を行い、試験管内で切断する可能性のある箇所の抽出を行った。さらに、ヒト細胞内で長期に渡りCRISPRを作用させ、見出した切断候補サイトにおける変異導入リスクを解析したが、ゲノムDNAにおける変異導入は検出できなかった。さらに、LNP-CRISPR投与後の血中サイトカインや投与筋組織の解析を行い、一時的な炎症系サイトカインの上昇が見られたが、いずれも一週間程度で投与前と同程度のレベルに回復していることを確認した。さらに、使用したCRISPR gRNAのオフターゲットDNA切断リスクの検証を行うなど、ゲノム編集ナノDDS製剤に適した安全性評価方法の検証を行った。また、これらの成果は、Nature Communications誌に論文報告を行った([doi: 10.1038/s41467-021-26714-w](https://doi.org/10.1038/s41467-021-26714-w))。

#### ・ 本研究成果の意義

本研究で開発されたLNP-CRISPR技術は、従来のウイルスベクターを用いた遺伝子治療やアンチセンス核酸を用いた核酸医薬とは異なり、複数回投与可能で、かつ一回の投与で年オーダーの薬効持続期間が期待できるなどの優れた特性を備えており、今後、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する革新的な治療法に繋げて行きたいと考えている。さらには、デュシェンヌ型筋ジストロフィー以外にも、遺伝子変異が原因で引き起こされる難病は多数あり、ゲノム編集による遺伝子修復や遺伝子改変を主体とした新しいゲノム編集治療法としての応用も期待される。

To develop a novel therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD) by inducing exon skipping using genome editing technology, a novel delivery technology that can transiently and efficiently deliver genome editing enzymes to muscle tissue is required. In this study, we propose a novel delivery technology that can deliver genome-edited enzymes to muscle tissue in vivo. In this research proposal, we developed an efficient nano-drug delivery technology using novel lipid nanoparticles (LNPs) with cationizable lipids to realize exon skipping by genome editing in muscle tissue in vivo. With the full cooperation of Takeda Pharmaceutical Company, we found a cationic lipid TCL053 with high delivery

efficiency to skeletal muscle tissue and optimized the conditions for internal inclusion of CRISPR Cas9 and gRNA based on it. In addition, we investigated the conditions of raw materials and preparation methods to establish an LNP production method, conducted a durability test against RNase, and confirmed that the LNP encapsulation has a high RNA protection effect. To evaluate the LNP-CRISPR in a mouse model, we created a reporter mouse that emits luciferase when exon skipping is induced and a humanized mouse model in which a part of the dystrophin gene of the mouse was replaced with a human one. We optimized the administration method and validated the efficacy of the method.

Several antisense nucleic acids have already been approved for dystrophin protein recovery by exon skipping, but they have a short half-life in blood of just over 3 hours, and DMD patients require frequent (weekly) administration over their lifetime. In this regard, since LNP-CRISPR can induce exon skipping at the genome level, we hypothesized that the restorative effect of dystrophin protein would last as long as the target cells survive. In fact, in a study using model mice, we confirmed that dystrophin protein recovery was sustained for at least one year after a single administration of LNP-CRISPR. This long drug effect is expected to contribute to the improvement of QoL in DMD patients.

As a tool for delivering CRISPR to muscle tissue in vivo, a delivery method using AAV vectors has been developed, and many preclinical research results have been reported in papers. However, AAV vectors are highly antigenic due to their protein shell, and once administered, neutralizing antibodies are elicited, preventing a second or subsequent administration. In our mouse study, AAV-CRISPR failed to show genome-editing activity after the second administration, but LNP-CRISPR showed the same genome-editing activity after the second administration as after the first. This is expected to make it possible to expand the range of treatment by administering LNP-CRISPR more frequently and also to readminister LNP-CRISPR when the therapeutic effect has declined.

Furthermore, analysis of blood cytokines and muscle tissue after LNP-CRISPR administration showed a temporary increase in inflammatory cytokines, but both recovered to the same level as before administration in about one week. In addition, we verified safety evaluation methods suitable for genome-edited nano-DDS formulations, including verification of the off-target DNA cleavage risk of the CRISPR gRNA used.

The LNP-CRISPR technology developed in this study is expected to lead to innovative treatment for Duchenne muscular dystrophy because of its superior characteristics, which are different from those of conventional gene therapy using viral vectors and nucleic acid medicine using antisense nucleic acids.

### III 事後評価総合所見

本課題は、LNP を用いたゲノム編集によるエクソスキッピング誘導 DMD 治療法の開発であるが、有効性については、DMD モデルマウスを用いた筋注試験で筋線維でのジストロフィン陽性、効果の持続性が確認され、安全性については、オフターゲット解析も含めて、重篤な毒性は認められていない。また、製剤開発については、LNP を用いたゲノム編集製剤の GLP/GMP レベルでの製造法を構築し、CMO への対応も目処がついており、当初の目標は一部を除いて概ね達成された。

一方、gRNA 探索において、3 種類のみを比較しているが、gRNA 配列の設計の全体像の説明が不十分である。また、LNP 製剤については、Cas9 mRNA と gRNA の混合比率の最適化、LNP 製剤内の 2 種の RNA の存在状態、LNA

の粒子物性、などの CMC 関連のデータが示されていない。さらに、LNP の GLP 製造が予算の関係で実施できていないことは、当初目標の未達成事項であり、今後、GLP 等非臨床試験の実施を進めて欲しい。そして、実用化に向けては、競合品である ASO との差別化として、今回示された効果の持続時間のデータ以外に、筋組織の回復性、ジストロフィン発現度合い、筋機能などの比較データは必要である。