

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名： 筋組織への核酸医薬デリバリーに向けたポリマー型リガンドの開発  
Development of polymeric ligands for muscle-targeted nucleic acid delivery

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：宮田 完二郎  
Kanjiro Miyata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
国立大学法人東京大学・大学院工学系研究科マテリアル工学専攻・教授  
The University of Tokyo, Graduate School of Engineering, Professor

## II 研究開発の概要

本研究では、筋ジストロフィーに代表される筋疾患の分子標的治療を目指し、核酸医薬などを筋組織に効率良く送達するための新規デリバリーシステムを開発した。この目標を達成するために、以下の3つの取り組みを中心に研究開発を推進した。(1)筋組織の毛細血管内皮の透過に適したサイズ、および筋細胞への選択的な吸着/細胞内移行能を有する『ポリマー型リガンド(ポリリガンド)』の合成と評価、(2)細胞内で核酸医薬を放出することができる『核酸医薬-ポリマーコンジュゲートあるいはポリイオンコンプレックス』の創製と評価、および(3)筋疾患モデルマウスやレポーターマウスを用いた核酸医薬デリバリーシステムの機能評価である。このうち、ポリリガンドの筋細胞への吸着/細胞内移行に関しては、グルコーストランスポーター(GLUT)や糖鎖などの細胞表面マーカーに着目した。例えば、筋細胞ではGLUT4が過剰発現していることが知られている。従って、筋細胞表面へのGLUT4を認識するポリリガンドを設計すれば、筋細胞特異的な吸着と内在化が実現可能と考えられた。一方で、GLUTは筋細胞以外の細胞でも一定の発現が認められることから、単一のリガンドでは十分な筋細胞選択性が得られない可能性も考えられた。このような場合に備えて、筋細胞指向性を有する2ndリガンドを付加し、筋細胞選択性の改善を図ることとした。

(1)に関して、最初にポリリガンドサイズの最適化を検討した。すなわち、サイズの異なる一連のポリリガンドプラットフォーム(リガンド未導入)を合成し、マウス尾静脈投与後の筋組織への集積性を比較評価した。また、健常なマウス(C57BL/6)と筋ジストロフィーモデルマウス(*mdx*マウス:C57BL/10-*mdx*)との間での比較も実施した。結果として、流体力学直径が8 nm以下の場合、筋組織への集積性は非常に低いことが確認された。これは、全身の組織に分布した後に腎臓から速やかに排泄されたためと説明される。一方、腎排泄の閾値を超える11 nm以上のサイズにすることで、ポリリガンドプラットフォームの筋組織集積性は劇的に

上昇することが確認された。また、11 nm 以上のサイズでは、大きな差ではないが 11-15 nm 前後が筋組織集積に適している傾向が認められた。興味深いことに、健常なマウスに比べ、*mdx* マウスではポリリガンドプラットフォームの集積性が大きく上昇することを見出した。このメカニズムを解明するために筋組織切片観察を行ったところ、筋線維が崩壊している炎症部位(あるいは再生中の筋線維)において、ポリリガンドプラットフォームの高い集積挙動が認められた。これらの結果より、15 nm 前後にサイズが調整されたポリリガンドは、筋組織、特に炎症性部位に高い集積性を有することが明らかになった。

次いで、糖修飾ポリリガンドを合成した。この際、サイズと糖修飾率が異なる計 8 種類のポリリガンドを合成した。健常なマウスの尾静脈投与後の骨格筋への集積性を評価したところ、13 nm のポリリガンドにおいて糖修飾に伴う骨格筋集積量の増加が認められた。さらなる集積量の増加を目指し、2nd リガンドとして糖鎖を認識するヘテロ環状分子を修飾した。この際、サイズに関しては約 11 nm に固定し、修飾率に関しては 0 と 100%となる計 2 種類を合成した。2nd ポリリガンドの健常マウス筋組織集積性を評価したところ、2 倍程度増加することが確認された。一方で、心臓への集積量が 6 倍近く増加するという大変興味深い結果が得られた。そこで、さらに心臓の組織切片を作成し、組織内分布を観察したところ、心臓組織全体に分布している様子が観察された。以上より、糖修飾ポリリガンドおよび 2nd ポリリガンドを用いることで、骨格筋組織への集積量を 2 倍、心臓に対する集積量を 6 倍増加させることに成功した。

(2)に関して、まずリガンド導入前のポリリガンドプラットフォームに核酸医薬を共有結合でコンジュゲートした。構造解析の結果、ポリリガンドプラットフォーム当たり約 6 分子の siRNA が導入されたことを確認した。コンジュゲート形成の意義を確認するために、マウス尾静脈投与後の血中動態を評価したところ、コンジュゲートにより血中半減期が大幅に延長されることを確認した。次いで、*mdx* マウスの骨格筋への集積性を評価したところ、コンジュゲートにより約 2 倍の増加が認められた。さらに、骨格筋における標的遺伝子に対するノックダウン効果を評価したところ、コンジュゲートによる集積量の増加に反して、核酸医薬単体のノックダウン効率と同程度という結果となった。これらの結果より、コンジュゲートからの核酸医薬の放出がノックダウン活性に対する律速段階になっているものと考察された。

そこで、より簡便に核酸医薬を放出可能なデリバリーシステムとして、共有結合ではなく静電相互作用を介してポリマーと複合体化する方法、すなわちポリイオンコンプレックス (PIC) を利用する方法論へと展開した。具体的には、2 分岐型 PEG とカチオン性ポリペプチドからなる Y 字型ポリマーと核酸医薬 1 分子の間で形成される最小単位の PIC である「ユニット PIC」を調製した。ユニット PIC のサイズは、PEG の分子量で調節できることから、20 nm 以下となるように設計した。*mdx* マウスへの尾静脈投与後の骨格筋組織への集積性を評価したところ、Y 字型ポリマー/siRNA の混合比の増加に伴い増加し、核酸医薬単体と比して 10 倍以上の増加が認められた。次いで遺伝子ノックダウン効率を評価したところ、核酸医薬の集積量とよく対応し、混合比の増加に伴いノックダウン効率も上昇する傾向が認められ、50%を超える有意なノックダウン効率を得ることに成功した。以上より、核酸医薬の放出を速やかに行うことができる約 15 nm のデリバリーシステムを構築することで、炎症性の骨格筋組織に対する優れた集積性と遺伝子ノックダウンを誘導できることが示された。

(3)に関して、エクソン 23 にスキッピングを誘導することでルシフェラーゼが発現する遺伝子改変レポーターマウス (Luc-Tg マウス) を作出した。作出の成否は、IVIS で検出されるルシフェラーゼ発現効率と対応する遺伝子のスキッピング効率から確認し、実際に期待された Luc-Tg マウスが作出されていることを確認した。次いで、(2)の結果を踏まえ、核酸医薬搭載ユニット PIC のエクソンスキッピング効率を Luc-Tg を用いて評価した。その結果、筋肉内への局所投与において、核酸医薬単体投与に比べ、ユニット PIC は 2 倍近

いエクソンスキッピング効率を示すことが確認された。これより、筋組織に対して高い集積性を有するデリバリーシステムを用いることで、核酸医薬の治療効果を改善できる可能性が示された。

上記検討を通じて、ポリリガンドあるいはデリバリーシステムのサイズ制御により、核酸医薬の筋組織集積性を改善することに成功した。今回の検討においては、(炎症性あるいは再生)筋組織への集積性に対する最も大きなパラメーターはサイズであり、最大で10倍以上の集積量の増加を達成した。一方、GLUTなどを認識するポリリガンドに関しては、2倍ほどの増加に留まっていた。これと並行して、デリバリーシステムの設計に関しては、共有結合を介したコンジュゲート型よりも静電相互作用を介したコンプレックス(PIC)型の方が、高い遺伝子ノックダウン活性につながり易いことが示唆された。こられの知見を踏まえ、簡便に調製可能なユニットPICに着目して活性評価を進めたところ、核酸医薬を効率的に *mdx* マウスの骨格筋へとデリバリーすることができ、核酸医薬単体では有意な遺伝子ノックダウンを誘導できない投与条件であっても、50%を超える遺伝子ノックダウンを誘導することに成功した。さらに、エクソンスキップ核酸をユニットPICに搭載することで、Lug-Tg マウスにおいてエクソンスキッピングを誘導できることも確認された。以上より、サイズが精密調整されたユニットPICは、炎症性の筋組織に対する優れた核酸医薬デリバリーシステムとなり得ることが示された。

In this study, we aimed to develop polymeric nanomedicines for the muscle-targeted oligonucleotide delivery directed toward the molecular therapy of muscle diseases, including Duchenne muscular dystrophy. Herein, we highlighted two types of delivery vehicles, i.e., oligonucleotide-polymeric ligand conjugates (polyligands) and oligonucleotide-loaded polyion complex (PIC).

At first, the size of nanomedicines (or polyligands) was optimized for the muscle accumulation via systemic route. To this end, a series of polyligands with varying sizes were synthesized to covalently introduce the varying numbers of poly(ethylene glycol) (PEG) into the backbone polymer. After systemic administration, a smaller sample (< 8 nm in hydrodynamic diameter) was rapidly eliminated from the bloodstream through the kidney filtration. In contrast, the polyligands with a size of > 11 nm showed much longer blood retention profiles, resulting in more efficient accumulation in the muscle tissue compared with the smaller control. As a result, 11–15 nm-sized polyligands achieved the most efficient accumulation in the muscle tissue after intravenous injection into mice. Interestingly, the muscle accumulation of the polyligands was significantly enhanced in a murine model of muscular dystrophy (*mdx* mouse). The polyligands were apparently accumulated in the inflammatory (or regenerative) muscle tissues in the tissue section images.

Next, polyligands were chemically modified with targeting molecules that can recognize glucose transporters (GLUT) for enhanced muscle accumulation. The sugar-installed polyligands showed ~2 times higher muscle accumulation after intravenous administration. An additional targeting molecule (2<sup>nd</sup> ligand) was further installed to polyligands. The obtained 2<sup>nd</sup> polyligands also showed twice more efficient muscle tissue accumulation. Interestingly, the 2<sup>nd</sup> polyligands dramatically enhanced the heart accumulation compared with non-modified polyligands. The heart targeting might be explained by the recognition of 2<sup>nd</sup> polyligands to cell surface polysaccharides, but the detailed mechanism should be clarified by additional studies. Overall, polyligands demonstrated their targetability to the muscle and heart tissues via systemic route.

Based on the above results, we first delivered oligonucleotides after their covalent conjugation with polygands. The obtained oligonucleotide-polyligand conjugates were analyzed to have ~6 oligonucleotides per conjugate. In in vivo experiments, the conjugates showed the longer blood retention and higher muscle tissue accumulation. However, the gene knockdown efficiency of the conjugates was comparable to that of naked oligonucleotide. This suggests that the release of oligonucleotides from conjugates should be a rate-limiting step. Thus, we altered oligonucleotide-loading from covalent conjugation to electrostatic interaction. Indeed, we prepared PICs by simply mixing Y-shaped cationic polymers and oligonucleotides in aqueous media. The prepared PICs, termed unit PICs, were composed of 1–2 Y-shaped polymers and 1 oligonucleotide, thereby showing a relatively small size of ~15 nm in hydrodynamic diameter. The unit PICs achieved much more efficient accumulation in the muscle tissue of *mdx* mice, accompanied by the enhanced gene knockdown in the muscle tissue, compared to naked oligonucleotides.

Ultimately, we verified the therapeutic potential of uPICs for exon skipping therapeutics. Indeed, the exon-skipping oligonucleotide-loaded uPICs were applied to a transgenic mouse that can express luciferase gene with exon-skipping (thereby allowing us to determine the exon-skipping efficiency via luminescence intensity). As a result, the unit PICs induced ~2 time more efficient exon skipping effect in the muscle tissue after intramuscular administration, in comparison with a naked oligonucleotide control. These results demonstrate that unit PICs are a promising oligonucleotide nanomedicine that can target the (inflammatory) muscle tissues.