

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：異常タンパク質の脳内伝播を標的とする中枢神経変性疾患の非侵襲的な核酸ナノ医薬品の開発
Development of non-invasive nucleic acid nanomedicine targeting pathogenic protein propagation within brain for neurodegenerative diseases

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名：金沢 貴憲
Takanori Kanazawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人徳島大学 大学院医歯薬学研究部 教授
Tokushima University, Graduate School of Biomedical Sciences, Professor

II 研究開発の概要

本研究では、Nose-to-Brain ミセル技術と神経細胞指向性リガンド修飾ヘテロ核酸（HDO）技術を用いて、パーキンソン病の発症・進行機構の1つと考えられている α -シヌクレインの脳内伝播の起点部位である嗅球・脳幹部特異的な脳内伝播関連遺伝子の発現制御を経鼻投与により可能とする核酸医薬品（経鼻投与型核酸ナノ医薬）を開発することを目的として、以下の検討を行った。

（1）リガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの最適化とマウス・サルにおける検証

東京科学大学が保有する様々な神経細胞指向性リガンドを修飾したヘテロ核酸の設計および調製を進め、有望なリガンドを見出し、培養神経細胞を用いて標的遺伝子ノックダウン効果を示すことを確認した。また、*in vivo* で高いノックダウン（KD）効果を示している Nose-to-Brain ミセルの粒子物性を指標に、高い効果が期待できる組成を選定し、マウスへの経鼻投与による嗅球と脳幹部を含む脳内各領域における標的遺伝子 KD 効果を解析した結果、嗅球と脳幹部をはじめ脳内全域で高い KD 効果を示すミセル物性を同定した。さらに、種差について検討するため、同定した物性を示す Nose-to-Brain ミセルによるカンクイザルへの経鼻投与における核酸の脳内分布と標的遺伝子ノックダウン効果を検証した結果、カンクイザルにおいても、嗅球および脳幹部（延髄・橋・線条体）に核酸が分布し、脳内各領域において高い標的遺伝子ノックダウン効果を実証した。

次に、最適化した Nose-to-Brain ミセルにリガンド修飾 HDO を搭載し、物性および神経細胞における標的ノックダウン効果を確認した。その結果、リガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルは、30–40 nm の平均粒子径かつ、分散均一性の指標である多分散指数は 0.1 程度の目的とする良好な物性と、標的遺伝子ノックダウン効果

を發揮した。そこで、 α -シヌクレイン (SNCA) 異常病理が伝播するモデルマウスを用いて、リガンド修飾 SNCA 標的 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセル経鼻投与後の SNCA 遺伝子のノックダウン効果を検証した。結果より、嗅球、脳幹部付近の線条体、および大脳皮質を含む前頭部において SNCA 遺伝子の発現低下が見られ、大脳皮質を含む前頭部では有意な SNCA 遺伝子のノックダウン効果を示したことから、本研究で開発したリガンド修飾 SNCA 標的 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセル (経鼻投与型 HDO 核酸ナノ医薬) は有望なシーズであることが示された。

(2) DDS 評価研究課題との連携

1. イオン液体技術による経鼻投与型核酸ナノ医薬品の送達検討

本研究では、HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの鼻粘膜透過性および脳内移行性の向上を目的とし、経皮・経粘膜吸収を促進するイオン液体ライブラリーを有する石田竜弘博士 (徳島大学) と連携して研究を行った。はじめに、ヒト鼻粘膜モデルを用いた鼻粘膜透過性評価の結果、HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの鼻粘膜透過性を向上させるイオン液体を同定した。また、イオン液体中におけるミセルの安定性を確認した結果、イオン液体濃度が 20%程度までであれば、ミセル物性への影響が少ないことを確認した。さらにマウスにおける検証より、このイオン液体は、鼻粘膜における HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの透過性と滞留性を大きく向上させることで、速やかに脳内に分布させるとともに、その分布を脳内に持続させることを明らかにした。よって、本連携研究により、HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの課題であった鼻粘膜透過性と滞留性を高めて Nose-to-Brain ミセルによる脳内への HDO 送達性を向上させるイオン液体を見出すことに成功した。

2. PET イメージングによる経鼻投与型核酸ナノ医薬品の動態評価

本研究では、HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの経鼻投与後の脳内分布特性を明らかにすることを目的とし、核酸やナノ粒子製剤の生体 PET イメージング技術を有する向井英史博士 (長崎大学) と連携して研究を行った。はじめに、5'末端をアジド修飾したアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) に、クリック化学を利用して標識安定性の高い二官能性キレーター-BCN-CB-TE1A1P を結合した。キレーターを介して ASO に ^{64}Cu を標識した後、リガンド修飾 cRNA とアニーリングし相補鎖形成させることで ^{64}Cu 標識 HDO を調製した。これに Nose-to-Brain ミセルを混合し、 ^{64}Cu 標識 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルを作製した。そこで、 ^{64}Cu 標識 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルおよびミセル化していない ^{64}Cu 標識 HDO をマウスに経鼻投与し、PET 試験を実施し、全身 PET 画像から脳部位のみを抽出し MRI 標準画像 (T2 強調画像) と融合させたサジタルスライス画像を観察することで詳細な脳内分布の解析を試みた。併せてオートラジオグラフィーを実施した。結果より、PET 画像とオートラジオグラフィーの結果は高い一致を示しており、Nose-to-Brain ミセルに搭載していない HDO の方が嗅球および嗅神経が位置する領域への移行量が高かったのに対し、Nose-to-Brain ミセルに搭載することで、HDO は嗅球領域だけでなく、脳幹部への集積と一部脳実質への分布が観察された。この違いは、鼻粘膜から脳幹部に直接つながる三叉神経経路からの移行やその後の脳脊髄液を介した脳内拡散などによると考えられる。本連携研究によって、HDO と HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルは、経鼻投与による HDO の脳内における局所的な分布領域が異なり、ミセル搭載によって脳幹部や一部脳実質まで脳内の広い範囲に分布する可能性があることが明らかとなった。一方で、脳内移行量はミセル化していない HDO の方が高かったが、これは HDO に比べサイズが大きくなる HDO 搭載ミセルの鼻粘膜透過性が低いことが影響しているものと考えられた。本結果から、HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの鼻粘膜透過性を向上させるための DDS 技術が必要であることが明らかとなり、先に述べたイオン液体技術は強力なツールになることが期待される。

3. 超高感度 CE-MS 技術およびイメージング質量分析による経鼻投与型核酸ナノ医薬品の動態評価

本研究では、リガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの経鼻投与後の脳内における分布領域を明らかにすることを目的とし、超高感度 CE-MS 技術を有する川井隆之博士（九州大学）およびイメージング質量分析技術を有する瀬藤光利博士（浜松医科大学）と連携し、各技術による計測・解析条件の確立を進めた。川井博士との連携では、HDO を構成する 2 種類の人工核酸およびリガンド結合核酸の CE-MS 分析条件の最適化を進め、正電圧での電気泳動分離と positive モードでのイオン化により、各成分を分離して検出することに成功した。また electrokinetic supercharging による濃縮および μL レベルの生体試料に対応可能なマイクロ固相抽出カラムを用いた精製条件を見出し、微量のリガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルを EKS-CE-MS で計測する条件を確立した。瀬藤博士との連携では、イメージング質量分析によるリガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセル中の HDO およびミセルに含まれる塩基性材料の計測条件の最適化を行い、脳組織切片上にスポットしたりガンド HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルから HDO を構成するアンチセンス核酸、リガンド修飾核酸ならびに Nose-to-Brain ミセルを安定的に計測することに成功した。本連携研究では、事業期間中での HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセル経鼻投与マウスの脳組織切片の検出には至らなかったが、今回確立した脳組織切片中の微量なりガンド修飾 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセルの解析条件は今後のシーズ開発において重要な評価技術となるものと確信している。

以上、本研究開発課題によって、パーキンソン病の病態進行に関わる α -シヌクレイン脳内伝播の起点部位である嗅球・脳幹部特異的な脳内伝播関連遺伝子の発現制御を経鼻投与により可能とする核酸医薬シーズ（リガンド修飾 SNCA 標的 HDO 搭載 Nose-to-Brain ミセル）を確立した。本成果は、脳神経疾患に対する核酸医薬開発において、経鼻投与という新たな投与剤形・創薬技術の開拓に大きく貢献するもので、未だ有効な治療薬・治療法が十分に確立されていないあらゆる脳神経疾患に対する医薬品開発を加速する高い波及効果が期待される。また、本研究開発課題では、DDS・動態評価技術を有する研究者との連携により、シーズの課題である鼻粘膜透過性の向上および経鼻投与後の全身・脳内分布動態データを世界に先駆けて取得することができた。これらの成果は、脳神経疾患を標的とする医薬品開発を加速するだけでなく、科学的観点からも画期的な技術・知見であると考えている。加えて今回の連携研究による最大の成果は、様々な DDS・動態研究者とのシームレスな研究基盤ネットワークを構築し、今後の開発研究を持続的に発展させる環境を整えたことである。本研究課題終了後も、引き続き連携体制をとることで、未だ情報の少ないげっ歯類やサル（霊長類）での経鼻投与による脳内・生体内動態データを集積し、新たな医薬品創出に繋げていくことができると考える。

The aim of this study was to develop nucleic acid medicine that can be administered intranasally to regulate the expression of genes related to pathogenic propagation in the olfactory bulb and brainstem, which are the initial regions of pathogenic protein propagation, using nose-to-brain micelle technology and neuron-targeting ligand-modified HDO technology.

1. Optimization of ligand-modified HDO-loaded nose-to-brain micelles and their validation in mice and primates.

In this study, promising ligands were identified from HDO libraries modified with various neuron-targeting ligands by investigation using cultured neuron cells. In addition, the particle properties of the nose-to-brain micelle with a high suppression of target gene expression in the brain, especially in the olfactory bulb and brainstem, by intranasal administration were determined. Next, in order to examine species differences, the distribution of nucleic acids and the inhibitory effect on target gene expression in macaque monkeys were validated by intranasal administration of nose-to-brain micelles with optimum particle properties. As a result, distribution of nucleic acids and suppression of target gene expression in olfactory bulb and brainstem including the medulla oblongata, pons and striatum were demonstrated in macaque monkeys as well as in mice by intranasal administration of nose-to-brain micelles. Therefore, ligand-modified HDOs were loaded into optimized nose-to-brain micelles. The ligand-modified HDO-loaded nose-to-brain micelles demonstrated the desired good physical properties, with an average particle size of 30-40 nm and a polydispersity index of around 0.1, as well as suppression of target gene expression. Finally, α -synuclein (SNCA) gene expression suppression was investigated by intranasal administration of ligand-modified SNCA-targeted HDO-loaded nose-to-brain micelles in a mouse model of SNCA propagating pathology. As a result, SNCA gene expression was suppressed in the olfactory bulb, striatum near the brainstem and frontal region including the cerebral cortex, indicating that the ligand-modified SNCA-targeted HDO-loaded nose-to-brain micelles developed in this study could be a promising therapeutic seed for the treatment of neurodegenerative disorders.

2. Collaboration with DDS and PK research projects

First, the combination of ionic liquid technology as a mucosal absorption enhancer was investigated to improve the permeability of HDO-loaded nose-to-brain micelles in the nasal mucosa and distribution in the brain. As a result, the permeability and retention of HDO-loaded nose-to-brain micelles in the nasal mucosa were greatly improved by the combined use of ionic liquids, leading to their rapid and sustained distribution in the brain. Next, in collaboration with the PET imaging technology using ^{64}Cu -labelled HDO, the distribution of HDO in the brain after intranasal administration of HDO-loaded nose-to-brain micelles and HDO alone in mice was investigated. As a result, HDO alone showed higher distribution to the olfactory bulb and olfactory nerve. In contrast, HDO loaded to nose-to-brain micelles was distributed not only to the olfactory bulb region, but also to the brainstem and cerebral parenchyma. These differences could be relevant to transfer through the trigeminal nerve pathway, which leads directly from the nasal mucosa to the brainstem region, and subsequent diffusion into the brain via cerebrospinal fluid. This collaboration revealed that HDO and HDO-loaded nose-to-brain micelles differ in the regional distribution of HDO in the brain after intranasal administration, and that HDO may be widely delivered in the brain to the brainstem and cerebral parenchyma by nose-to-brain micelles. In collaboration with the ultra-sensitive CE-MS and imaging mass spectrometry technologies, the detection of brain tissue sections from mice intranasally administered with HDO-loaded nose-to-brain micelles was not achieved, but the conditions for analyzing trace amounts of ligand-modified HDO-loaded nose-to-brain micelles in brain tissue sections were successfully identified. These analyses can be expected as important techniques in the drug development process.

This project has laid the foundation for intranasal nucleic acid medicine to regulate the expression of genes involved in pathogenic protein propagation in key regions such as olfactory bulb and brainstem. This achievement will contribute to the development of nucleic acid medicines for neurodegenerative disorders as a novel approach of drug discovery.