

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）KLF1-mRNA 医薬の開発による心筋再生誘導
（英語）Induction of cardiac regeneration via KLF1 mRNA delivery

研究開発実施期間：令和4年7月25日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）菊地 和
（英語）Kazu KIKUCHI

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立循環器病研究センター研究所・心臓再生制御部・部長
（英語）National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute・Department of Cardiac Regeneration Biology・Director

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

研究の目的 本研究開発の目標は、自己の心筋から新たな心筋を直接作り出す新規心筋再生療法の開発である。その実現のため最近 COVID19 のワクチン開発でも脚光を浴びたモダリティである mRNA に着目した。先行研究において、代表者は転写因子 Klf1 がそれ単独の発現により、成熟心筋細胞の増殖を誘導する強力な心筋再生誘導因子であることを見出した。本研究では、この独自の知見に立脚し、心筋再生誘導を可能とする KLF1-mRNA 医薬の開発を目標とした。

研究開発の成果

1) 心筋 mRNA 発現増強技術の開発

本研究項目では、心筋細胞において mRNA の発現効率を高める非翻訳配列の同定を試みた。また、mRNA 導入効率の上昇を目的とした新規核酸キャリア・媒剤の開発、内在性トランスポゾンを利用した SEND 法 (selective endogenous encapsidation for cellular delivery; Segel, et al. Science 373:882, 2021) の検討に取り組み、高効率な心筋 mRNA 導入法の開発を目指した。さらに、タンパクレベルでの発現増強を目的とし、高安定型 Klf1 変異体の作製を実施した。以上の開発に際し、培養細胞、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、ゼブラフィッシュ、マウスなどを適宜使用した。

非翻訳配列の開発 ヒト心筋での遺伝子発現プロファイルをもとに、5' 非翻訳配列 29 種類、3' 非翻訳配列 31 種類を選別し、これらについてヒト培養心筋細胞を用いたルシフェラーゼレポーター解析を実施した。その結果、遺伝子発現を向上させる 1 種類の 5' 非翻訳配列および 3 種類の 3' 非翻訳配列を同定し、これらについてさらにヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた解析を実施したところ、hCDH2 遺伝子由来 5' UTR と hTRDN 遺伝子由来 3' UTR の組合せ、または hCDH2 遺伝子由来 5' UTR と hPDLIM 遺伝子由来 3' UTR の組合せにより、現在 mRNA 治療に用いられている既存の 5' UTR-3' UTR と比較して 5 倍以上の発現増強効果が得られることが明らかとなった。さらに、この組合せにより *in vivo* での心筋発現が同様に増強されるか検討したところ、*in vitro* の結果とは異なり、既存の UTR よりやや低いレベルの発現増強効果に止まる結果が得られた。この結果は、*in vitro* でのスクリーニング結果が必ずしも *in vivo* で成立するものではないことを示しており、今後の実験デザインにおいて重要な示唆が得られた。また、ファージディスプレイ法により心筋結合性ペプチドの探索を行った結果、ヒト培養心筋細胞に結合性を示すペプチド 6 種類およびヒト iPS 心筋細胞に結合性を示すペプチド 2 種類を同定した。なお、下記に記載する送達効果を増強する媒剤が得られたため、ポリマーに結合する予定であったこれらの心筋結合性ペプチドは、*in vivo* での mRNA 送達には使用しなかった。

核酸キャリア・媒剤の開発 ラジカル重合と可逆的付加開裂連鎖移動重合を用いて、異なる構造および重合度を持つ 24 種類のポリマーを合成し、ヒト培養心筋細胞を用いて合成したポリマーの送達能力を解析した。さらに、これらのポリマーの送達能力について *in vivo* における検討を実施したところ、最終的に MPC 中鎖が *in vivo* において最も発現範囲が広く、既存の媒剤と比較して約 2 倍の増強効果を示すことが明らかとなった。また、カネカ株式会社の協力により、さらに多くの媒剤候補を探索した結果、MPC 中鎖よりもさらに送達効果の強い添加材 X の同定に成功した（特許申請準備中）。

心筋指向性 SEND 法の開発 膜融合タンパク質を搭載した SEND 法コンストラクトを 11 種類作製し、ヒト培養心筋細胞株を用いて蛍光レポーター mRNA の送達効果を検討した。その結果、心筋細胞に mRNA 送達効果を有する 4 種類の融合タンパクを同定した。しかし、マウス心臓における送達検証実験の結果、いずれも *in vivo* での mRNA 送達効果を有しないことが明らかとなり、上記のような *in vitro* と *in vivo* における結果の相反が見られ、今後の実験デザインについての重要な示唆が得られた。

高安定型 Klf1 の開発 PEST 配列を欠損させた Klf1 変異体を作製し、野生型 Klf1 と比較して 1.5 倍のタンパク発現増強効果を有する変異体の開発に成功した。現在、hiPS 細胞由来心筋細胞を用いた増殖誘導実験を実施中である。

2) Klf1-mRNA 医薬の治療効果の検討

まず、障害モデルを確立するため、冠動脈結紮部位など、様々な観点からマウス心筋梗塞モデル、ラット虚血再灌流モデルについて検討し、再現性が高く、治療効果判定の信頼性が高いラット虚血再灌流モデルの実施要領を確立した。さらに、投与量、投与部位、投与方法などを検討し、Klf1-mRNA の至適投与条件を求めたのち、上記媒剤 X を用いて虚血再灌流 7 日後に Klf1-mRNA を梗塞辺縁部位に注入した。mRNA 投与および解析は完全にブラインド（二重盲験）で実施した。その結果、Klf1-mRNA の心筋内投与後 2 週目から心機能改善を示し、一ヶ月後には対照群と比較して有意に心機能が改善することが明らかとなり、Klf1-mRNA がラットにおいて治療効果を有することが明らかとなった。現在、回復心臓を用いた組織学的解析を実施中である。

3) ヒト心臓における KLF1 の再生機能の検討

まず、ヒト心臓組織において KLF1 のタンパク発現を解析するため、ヒト KLF1 特異的抗体を作製した。解析の結果、現在市場にある抗 KLF1 抗体は、いずれもファミリー分子である KLF2 などを認識する非特異的抗体であることが分かった。これに反し、本研究で作製した抗 KLF1 抗体は、ウェスタンブロット解析、組織学的解析のどちらにおいても特異的に KLF1 を標識することが明らかとなった。次に、ヒト心臓における Klf1 の再生機能を検証するため、ヒト左室補助人工心臓（LVAD）の装着による自己回復例に着目し、虚血性心筋症

および心筋炎を伴った LVAD 検体のうち、自己回復例と移植適応例(自己回復なし)の 4 例を用いて上記 KLF1 特異的抗体を用いた組織学的解析を行った。その結果、自己回復例の心筋において KLF1 の発現を認め、心筋の自己回復過程における KLF1 の関与が示唆された。さらに、自己回復過程に寄与する遺伝子を網羅的に同定するため、空間トランスクリプトーム解析を行なった。現在、データの解析を実施中である。

研究開発の意義

KLF1-mRNA 医薬の開発により、自分の心筋から直接心筋を再生する、全く新しい心筋再生療法の実現化に貢献できる。mRNA 医薬はカテーテルによる投与が可能であるため、KLF1-mRNA 医薬の開発が嚆矢となり、開胸手術を必要としない低負担の心筋再生医療が発展する可能性がある。このような心カテーテル再生療法は心臓再生医療の日常化を促進し、今後社会高齢化にともない急増する心不全の重症化予防に大きく貢献すると期待される。

(英語)

The goal of this research is to establish a novel cardiac regeneration therapy that directly generates new cardiomyocytes from existing heart muscle. To achieve this, we focused on mRNA, a modality that has recently gained prominence through the development of COVID-19 vaccines. In prior studies, the principal investigator discovered that the transcription factor Klf1 acts as a potent cardiac regeneration factor capable of inducing proliferation in mature cardiomyocytes through its expression. Building on this unique insight, the present study aimed to develop a KLF1-mRNA therapeutic capable of inducing myocardial regeneration. Specifically, we first developed techniques to enhance the expression of exogenously introduced mRNA in the heart. Using this technology, we then induced Klf1-mRNA expression in the hearts of mammalian model animals following myocardial infarction. Cardiac function and regeneration were subsequently evaluated over time using echocardiography and histological analysis to assess the therapeutic efficacy of the developed Klf1-mRNA drug.

We examined carriers, non-translated sequences, KLF1 mutants, and the SEND method, and found that mRNA was most effectively transduced to the myocardium in mouse hearts using a novel additive X, which was developed in collaboration with Kaneka Corporation. Using the additive X, we administered Klf1-mRNA in the peri-infarct myocardium in a rat ischemia-reperfusion model one week after the injury. A gradual improvement was observed in cardiac function two weeks after the administration, and cardiac function was significantly improved by 30 days after the injury, demonstrating the therapeutic effect of Klf1-mRNA in infarcted rat hearts.

To gain insight into the role of KLF1 in the functional recovery of human hearts, we analyzed KLF1 expression in heart tissues derived from patients with ischemic cardiomyopathy or myocarditis—two patients who experienced spontaneous recovery following the implementation of the left ventricular assist device (LVAD). Samples that did not show spontaneous recovery in each disease were used as controls. Using the anti-hKLF1 antibody developed in this study, we observed KLF1 expression in the myocardial tissue of the spontaneously recovered cases, suggesting a potential role for KLF1 in the functional recovery associated with LVAD implementation. We also conducted spatial transcriptomics analysis using the recovered samples, and expression profiling is currently underway and scheduled for completion soon.