

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) 新規ゲノム編集技術とナノ DDS 探索によるダウン症候群の知的発達障害に対する
遺伝子治療法の開発
(英語) Development of gene therapy for intellectual disabilities in Down syndrome
using new genome editing technologies and nano DDS

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

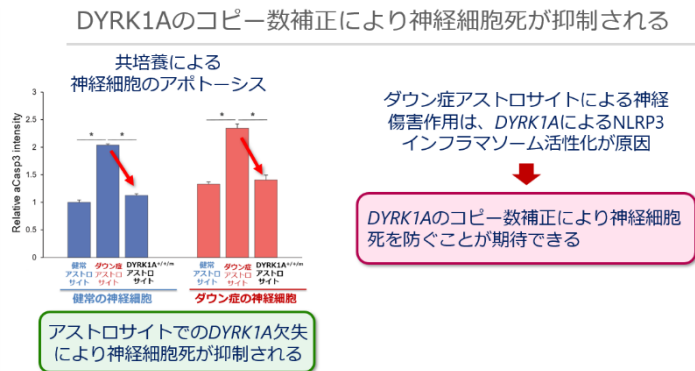
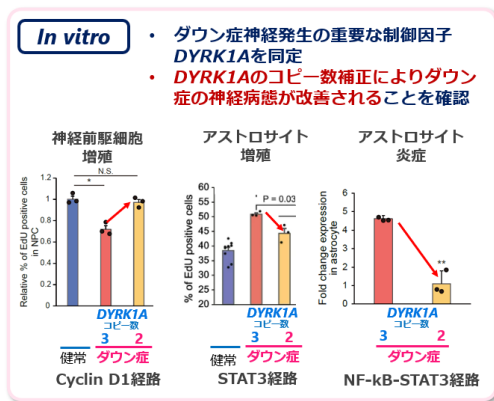
研究開発代表者 氏名: (日本語) 北畠 康司
(英語) Yasuji Kitabatake

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 教授
(英語) The University of Osaka Graduate School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

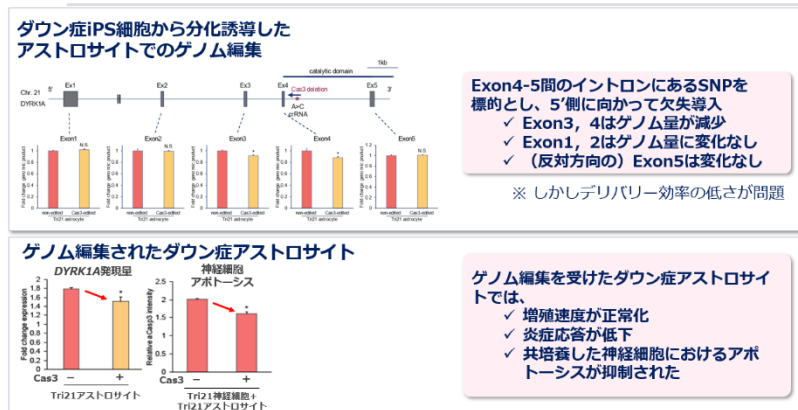
ダウン症候群では知的障害が必発だが治療法は皆無である。これまでの研究により、ダウン症候群では神経幹細胞の増殖阻害とアストロサイトの異常増加、神経炎症の活性化が起こること、21番染色体上に存在する *DYRK1A* がその原因遺伝子であり、この *DYRK1A* が治療標的となりえることが明らかとなってきた。一方で過度の発現低下は小頭症や重篤な発達障害をもたらすことも報告されており、発現抑制には正確なコピー数補正を可能とする技術の開発が必要と考えられた。そこで本研究課題では、ダウン症候群における中枢神経発達の重要な制御因子である *DYRK1A* に注目し、新規ゲノム編集技術である CRISPR-Cas3 とアレル特異的 SNP を組み合わせることで正確なコピー数補正法を確立するとともに、脂質ナノ粒子を用いたドラッグデリバリー技術の探索を通じて、ダウン症候群の知的障害に対する初めての遺伝子治療法の開発を目指した。

In vitro においては、ダウン症 iPS 細胞パネルから分化誘導した神経前駆細胞・ニューロン・アストロサイトをもちいた病態解明、およびニューロン・アストロサイト共培養系をもちいた解析を行うことで、*DYRK1A* のたった 1 コピーの増加が「神経前駆細胞の増殖抑制」「アストロサイトの増殖亢進」「アストロサイトの炎症応答亢進」を引き起こすことを明らかにすることができた。



次にダウン症 iPS 細胞およびそこから分化誘導した神経細胞とアストロサイトに CRISPR-Cas3 を作用させ、*DYRK1A* のコピー数が期待通り補正されて神経発生のレスキューにつながることを示すことを明らかにした。

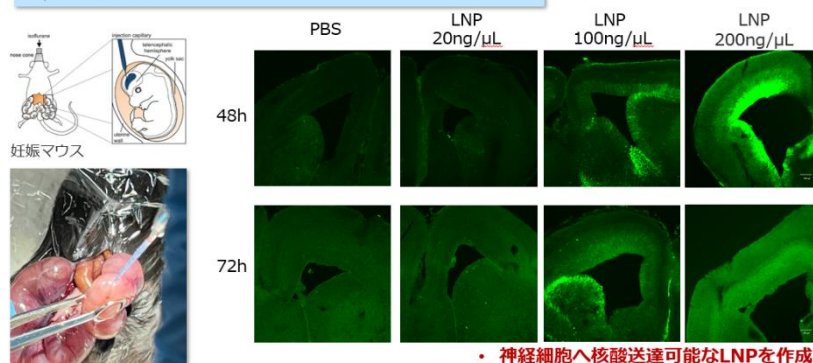
アレル特異的 SNP + CRISPR-Cas3 (in vitro での確認)



この CRISPR-Cas3 をもちいた遺伝子治療法を臨床応用につなげるためには、神経系へのデリバリー技術の開発が必須となる。pH 感受性カチオン性脂質ライブラリをもとに、異なる pKa をもつカチオン性脂質とヘルパー性脂質および PEG 化脂質を多様な割合で混合することで、神経細胞への核酸送達を可能とする LNP 候補のスクリーニングを行った。その結果、従来の 50 倍以上の送達効率を可能とする LNP を得ることに成功した。この LNP はすでに市販されている LNP よりも核酸送達効率が 4 倍以上高く、この LNP をもちいて GFP mRNA をマウス胎児の脳室内へ投与することで、脳室周囲のみならず全脳に渡って GFP が導入されたことを確認することができた。

マウス胎児脳室内への LNP 投与

マウス胎児 (E13.5) の脳室内に GFP mRNA-LNP を投与し 48, 72h 後に評価



現在ダウン症候群の治療法は皆無であり、本研究は初めてのダウン症遺伝子治療の創出につながる基盤研究として期待される。国内の年間出生数はこの 10 年間で 3 割も減少したが、一方で妊娠女性の高齢化と不妊治療件数の増加によりダウン症児の発症率は逆に増加していること、平均寿命が 60 歳を越えてきていることから、その治療介入は社会的に求められていると言えよう。またダウン症では病態ごとに異なる責任遺伝子が存在する。このアレル特異的コピー数補正法が確立すれば、遺伝子ごとに同様のアプローチが可能となり、ダウン症の多様な合併症の根本的治療法プラットフォームになると期待される。

一方、mRNA 搭載 LNP はコロナワクチン開発で注目を集めた最新技術であり、肝臓での in vivo ゲノム編集治療にもすでに用いられ、第一相臨床試験の結果も報告されている。AAV、lentivirus ベクターよりサイズの大きな核酸を搭載でき、また中和抗体を生成しないため複数回投与が可能という大きな利点を持つ。しかし神経系へのデリバリーはまだ報告がなく、本研究により神経組織への取り込み効率に優れた LNP を開発できたことは、今後の遺伝子・核酸医療の発達に大きく資するだろう。

(英語)

In Down syndrome, intellectual disability is an invariable feature, yet no effective treatment currently exists. Our previous studies have shown that Down syndrome is associated with impaired proliferation of neural stem cells, abnormal proliferation of astrocytes, and activation of neuroinflammation. *DYRK1A*, located on chromosome 21, has been identified as a causative gene underlying these phenotypes and is emerging as a promising therapeutic target. However, excessive suppression of *DYRK1A* expression has been reported to cause microcephaly and severe developmental disorders, indicating the need for technologies that enable precise correction of gene dosage.

In this research project, we focused on *DYRK1A*, a key regulator of central nervous system development in Down syndrome. We aimed to establish a precise method for dosage correction using a novel genome editing approach—CRISPR-Cas3 combined with allele-specific SNPs. Furthermore, we explored lipid nanoparticle (LNP)-based drug delivery technologies, with the ultimate goal of developing the world's first gene therapy targeting intellectual disability in Down syndrome. As no treatment currently exists for Down syndrome, this project is expected to lay the groundwork for pioneering therapeutic strategies.

In vitro, we used neural progenitor cells, neurons, and astrocytes differentiated from a panel of Down syndrome-derived iPS cells to elucidate disease mechanisms. Through these studies, including co-culture systems of neurons and astrocytes, we revealed that a single additional copy of *DYRK1A* was sufficient to cause impaired proliferation of neural progenitor cells, excessive astrocyte proliferation, and enhanced inflammatory responses in astrocytes.

We then applied CRISPR-Cas3 to Down syndrome iPS cells and their neural derivatives, demonstrating that precise correction of *DYRK1A* copy number led to rescue of neurodevelopmental deficits. To advance this gene therapy approach toward clinical application, development of an effective delivery system to the nervous system was essential.

We constructed a library of pH-sensitive cationic lipids with varying pKa values, and mixed them with helper and PEGylated lipids in different ratios to screen for LNP candidates capable of efficient nucleic acid delivery to neural cells. As a result, we successfully developed an LNP with more than 50-fold higher delivery efficiency than conventional formulations. This LNP also exhibited over 4-fold higher nucleic acid delivery efficiency compared to existing commercial LNPs. Using this optimized LNP to deliver GFP mRNA into the cerebral ventricles of mouse fetuses, we achieved GFP expression not only around the ventricles but throughout the entire brain, confirming its

robust delivery capacity.

While the annual number of births in Japan has declined by 30% over the past decade, the incidence of Down syndrome is increasing due to advanced maternal age and rising use of infertility treatments. Moreover, as the average lifespan of individuals with Down syndrome now exceeds 60 years, there is growing social demand for effective interventions. Since different genes are responsible for different pathological features of Down syndrome, the establishment of allele-specific dosage correction could serve as a versatile platform for treating a wide range of Down syndrome-related complications.

LNP-based delivery of mRNA has gained attention as a cutting-edge technology, especially through the development of COVID-19 vaccines. It has already been applied in liver-targeted in vivo genome editing therapies, and results from Phase I clinical trials have been reported. Compared to AAV or lentiviral vectors, LNPs can deliver larger nucleic acid payloads and can be administered repeatedly without inducing neutralizing antibodies. However, efficient delivery to the nervous system had not yet been demonstrated. Our success in developing LNPs with high delivery efficiency to neural tissue represents a major advancement in gene and nucleic acid therapeutics.