

日本医療研究開発機構 創薬基盤研究推進事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：中枢性希少疾患シアリドーシスに対する mRNA 医薬の開発と脳内動態制御基盤の確立

Development of mRNA medicine for the neurological disease sialidosis and controlling its distribution in the brain.

研究開発実施期間：令和 6 年 4 月 16 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：南川 典昭

Minakawa Noriaki

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 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

本研究の目的は、中枢性の遺伝性希少疾患であるシアリドーシス (SiD) [指定難病 019-17] に対する mRNA 医薬の開発である。

mRNA 医薬は、適切な塩基配列の設計により原理的にいずれのタンパク質 (抗原、酵素など) を産生可能であり、特に感染症に対するワクチン開発において、大きな成果を挙げている。mRNA 医薬は、疾患治療用の創薬モダリティとしても広範な応用の可能性があり、SiD をはじめとする遺伝性希少疾患に対する酵素補充の新たな治療アプローチとして期待できる。

SiD は、ノイラミニダーゼ 1 (NEU1) 遺伝子の遺伝的欠損により末端シアル酸含有糖鎖が蓄積する遺伝性希少疾患である。ミオクロニー発作などの中枢神経症状に加えて心不全などの末梢症状を呈し、重症 SiD 患者は成人前に死に至ることから、早急な治療薬開発が強く望まれている。SiD の治療には、責任酵素 NEU1 の酵素補充が有効であると考えられる。しかし、外来性遺伝子により NEU1 を過剰発現させると、細胞内で NEU1 が結晶化し細胞が損傷を受けることがボトルネックとなり、その治療法開発は全く進んでこなかった。これに対し我々は最近、アミノ酸置換により Asn 結合型糖鎖を増加させることで細胞内結晶を生じない糖鎖改変型 NEU1 (modNEU1) の創出に成功し、このボトルネックを解消した (Tsukimoto *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, 5, 205)。細胞内で modNEU1 を産生する mRNA (modNEU1-mRNA) は、SiD に対する初の治療シーズになり得る。SiD は中枢性の遺伝性希少疾患であることから、modNEU1-mRNA の開発へ向けては、その脳内動態制御が重要となる。mRNA と同じく核酸をモダリティとするアンチセンス医薬あるいは siRNA 医薬においては、配列中への人工核酸分子の導入による物性変化が、脳内動態制御に有効である。例えば Brown らは、siRNA 配列中にたった一残基だけ 2'-位に C16 アルキル鎖を有する人工核酸分子を導入するだけで脳全域への siRNA 送達効率が大幅に向上することを報告した (*Nat. Biotechnol.* **2022**, 40, 1500)。これは、人工核酸分子の導入により siRNA の脂溶性が向上したためであると考えられているが、mRNA 医薬の場合、合成時の転写反応ならびに生体内での翻訳反応 (タンパク質発現) における分子認識機構が複雑であるという 2 つの壁が存在するために、自然界には全く存在しない人工核酸

分子の活用が極めて難しい。

これに対して我々は、フラノースの代わりに 4-チオフラノースを構成糖にもつ人工核酸分子 4'-チオ RNA が mRNA 等価体として機能することを明らかにした (Tarashima *et al.*, *J. Am. Soc. Chem.* **2020**, *142*, 17255)。4'-チオ RNA は、mRNA 医薬への人工核酸技術の活用を妨げる 2 つの壁 (転写と翻訳) を突破する独自の人工核酸技術である。

上記背景を踏まえ、本研究課題は以下の研究開発項目を実施する。

研究開発項目 (1) SiD に対する世界初の治療薬シーズ: modNEU1-mRNA の創出

項目(1)-1: modNEU1-mRNA の創製とキャリア内封

項目(1)-2: modNEU1-mRNA の生物特性評価① (in vitro)

項目(1)-3: modNEU1-mRNA の生物特性評価② (in vivo)

研究開発項目 (2) 人工核酸の活用による mRNA 医薬の脳内動態制御基盤の確立

項目(2)-1: 人工核酸分子 4'-チオ RNA (1) を含む mRNA の作製とキャリア内封

項目(2)-2: 人工核酸分子含有 mRNA の脳内動態解析

項目(2)-3: 人工核酸含有 modNEU1 mRNA の創出

以下、各研究項目に対する成果を記載する。

1) modNEU1 mRNA の創出

1. modNEU1 mRNA の創製とキャリア内封

modNEU1 自体の配列は事前検討でコドン最適化済みのため、主に UTR 部分について、最適な modNEU1-mRNA の配列を決定した (図 1)。さらに、キャリア内封についても問題なく成功した。

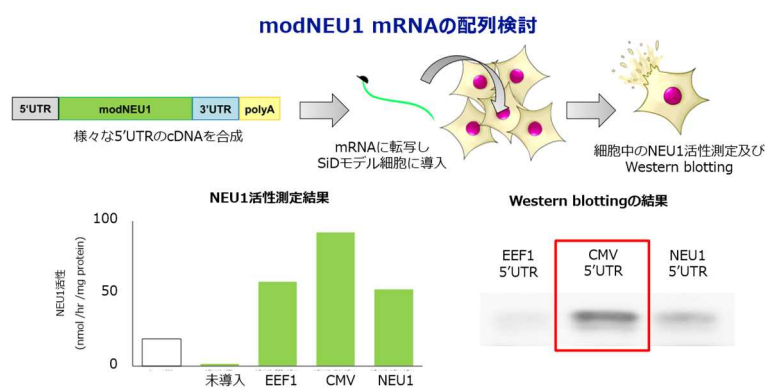


図 1: 最適な mRNA 配列の決定

2. modNEU1-mRNA の生物特性評価① (in vitro)

得られた modNEU1 mRNA を SiD 疾患モデル培養細胞に投与することで、NEU1 酵素活性の回復が見られた (図 2)。さらに、SiD の類似疾患であるガラクトシアリドーシス (GS) モデル細胞においても同様の有効性が認められた (図 3)。さらに、modNEU1 mRNA 単独で投与する場合に比べ、CTSA mRNA を同時に投与する方が高い活性が得られるという結果も得られた。

modNEU1 mRNA導入によるNEU1活性の回復

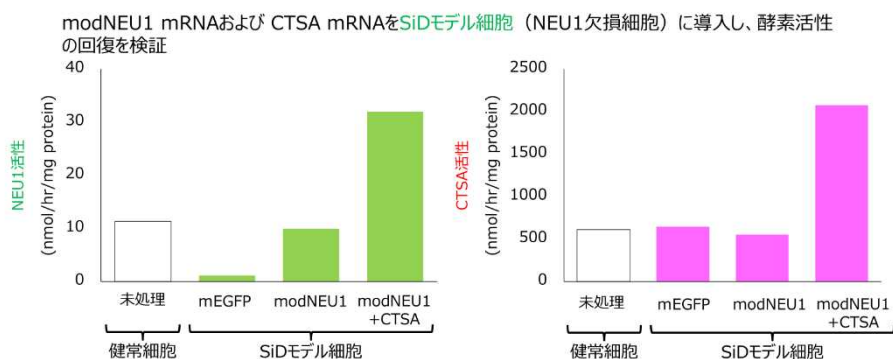


図 2: SiD モデル細胞における modNEU1 あるいは CTSA mRNA 投与後の NEU1、CTSA 酵素活性

modNEU1 mRNA導入によるNEU1活性の回復

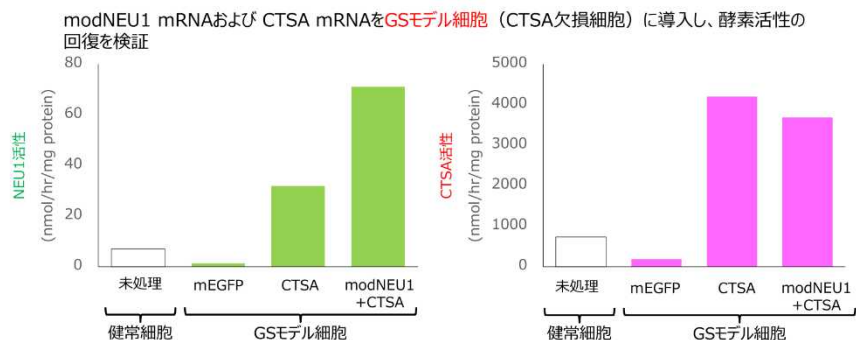


図 3 : GS モデル細胞における modNEU1 あるいは CTSA mRNA 投与後の NEU1、CTSA 酵素活性

薬物動態解析班の川井グループに依頼し、MSスペクトルによる培養細胞中における蓄積糖鎖解析を行った。培養細胞には、神経細胞モデルとして汎用されるSH-SY5YのNEU1遺伝子をゲノム編集により破壊した細胞株 (SH-SY5Y NEU1 KO)を使用した。結果として、通常のSH-SY5Y細胞に比べてSH-SY5Y NEU1 KO細胞ではシアル酸含有糖鎖の蓄積が顕著にみられ、さらにmodNEU1 mRNA導入細胞では蓄積シアル酸の減少が見られた (図 4)。このことから、神経細胞モデルにおいてmodNEU1 mRNAの有効性が確認できた。

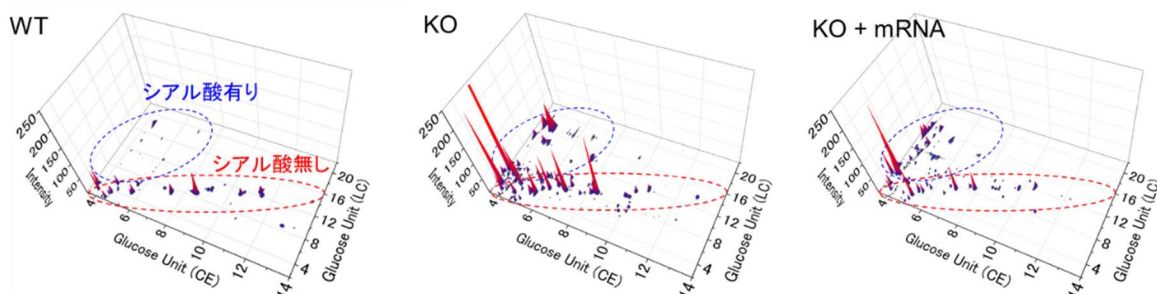


図 4 : SH-SY5Y NEU1 KO 細胞における蓄積シアル酸のMS解析

3. ModNEU1 mRNA の生物特性評価② (in vivo)

ModNEU1 mRNA の LNP への封入を薬物送達技術班の中村グループに依頼し、SiD モデルマウスに投与したが、投与直後に全てのマウスが死亡する結果となった。これは LNP 製剤の高い浸透圧が原因ではないかと予想された。そこで、種々検討し、低張液である 20mM HEPES-NaOH バッファーに LNP を懸濁した場合に毒性が抑えられることが判明した。ModNEU1 mRNA 封入 LNP を当該バッファーに懸濁して SiD マウスに脳室内投与し、48 時間後にマウス脳のノイラミニダーゼ活性を測定したが、LNP 未投与の SiD マウスと比較して酵素活性の上昇は確認できなかった (図 5)。そこで、培養細胞の系と同様に CTSA mRNA との同時投与を検討した。

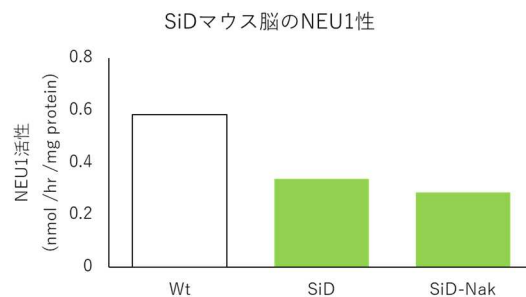


図 5: ModNEU1 mRNA 投与後 SiD マウスの NEU1 活性 (Nak は中村グループ作製 LNP 投与マウス)

ModNEU1 および CTSA mRNA を薬物送達技術班の中村グループおよび浅井グループに提供し LNP 製剤化を依頼した。ModNEU1 mRNA、CTSA mRNA の LNP 製剤をそれぞれ等量混合し、それを SiD モデルマウスに脳室内単回投与した。併せて、modNEU1 mRNA と CTSA mRNA の同時投与は CTSA 欠損症である GS にも有効であると期待されたため、GS マウスにも投与実験を行った。24 時間に 1 回、行動試験としてミオクロニー発作回数を測定した。その結果、GS、SiD マウス共に中村グループ作製の LNP 投与後にミオクロニー発作回数が 30%以下に減少し、48 時間後もミオクロニー発作の再発は見られなかった (図 6)。浅井グループ作製の LNP 投与群でも 24 時間後では 35%以下に減少したが、48 時間後にはミオクロニー発作の再発が見られた。

投与48時間後にマウスの脳を摘出し、その抽出物中におけるNEU1活性を測定した。その結果、中村グループ作製のLNP投与SiDマウス脳において明確なNEU1活性の回復（野生型マウスの約2倍の活性）が見られた（図7）。GSマウスにおいても、中村グループ作製LNP投与マウスにおいて僅かではあるがNEU1活性の回復が見られた。浅井グループLNP投与マウスについては、GSマウスにおいてノイラミニダーゼ活性の回復傾向が見られたもののSiDマウスにおいては回復が見られなかった。

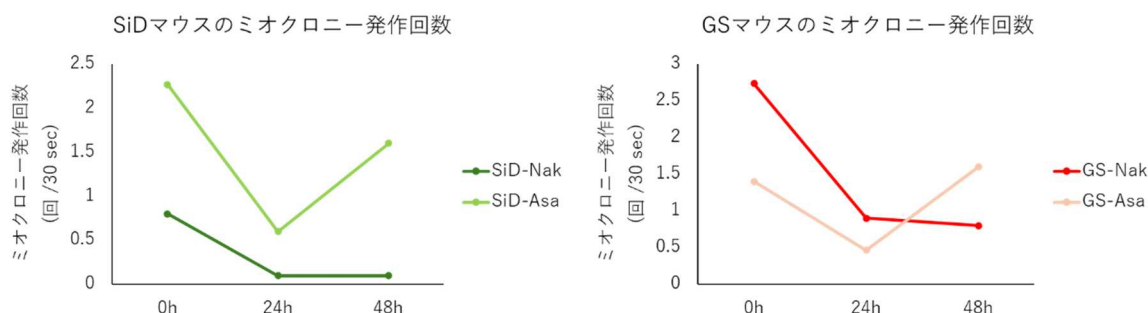


図 6 : modNEU1、CTSA mRNA 投与後モデルマウスでのミオクロニー発作回数 (Nak : 中村グループ作製 LNP 投与マウス、Asa : 浅井グループ作製 LNP 投与マウス)

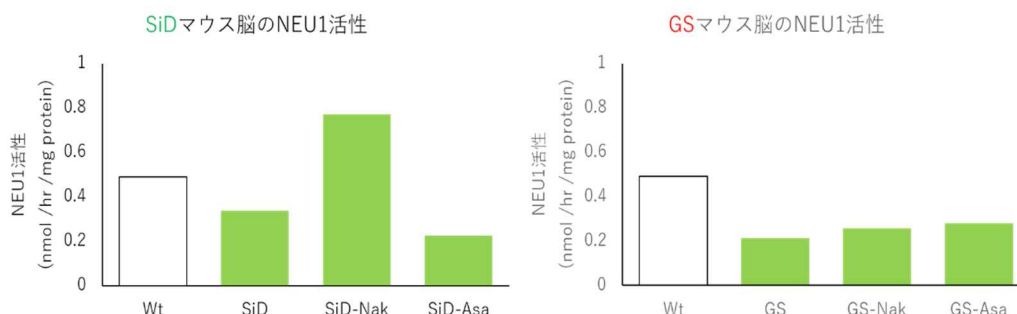


図 7 : ModNEU1、CTSA mRNA 投与後モデルマウス脳での NEU1 活性 (Nak : 中村グループ作製 LNP 投与マウス、Asa : 浅井グループ作製 LNP 投与マウス)

以上から、LNPの組成等によっては脳組織へのmRNA導入効率に大きな差があることが示唆された。本成果はSiDだけでなくGSにも応用可能であることを示すものであり、中枢性疾患治療法として一般性の高いものであると考えている。

また分担者松田グループでは、実際のGS患者のQOLに甚大な影響を及ぼしている視力低下に着目して実験を行った。まずは、SiD、GSマウスにおいて眼病変がフェノタイプとして現れるか検証した。その結果、毛様体上皮細胞および網膜色素上皮層（図8）の腫大が観察された。SiDマウスに、中村グループのLNPに封入したmodNEU1 mRNAを硝子体内投与したところ、NEU1活性が上昇していたため、modNEU1 mRNA導入には成功したと判断できる（図9）。

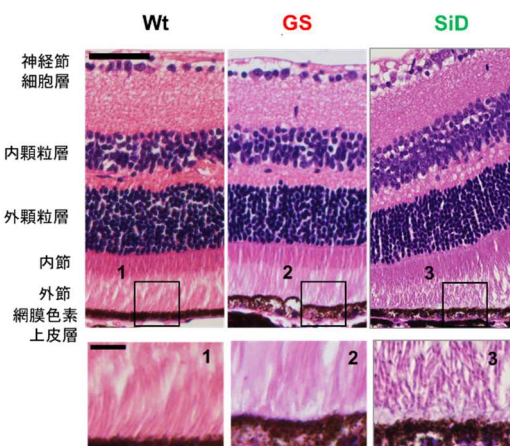


図 8 : GS、SiD マウスの網膜 HE 染色

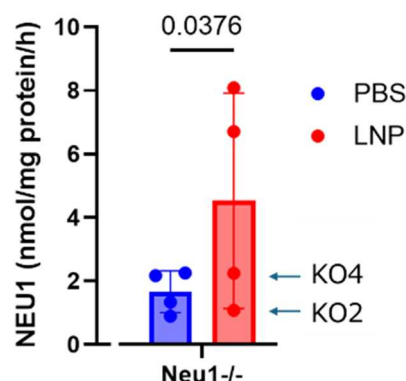


図 9 : SiD マウスの眼の NEU1 活性

2) 人工核酸の活用によるmRNA医薬の脳内動態制御基盤の確立

1.人工核酸分子4'-チオRNAを含むmRNAの作製とキャリア内封

4'-チオRNAを含むmRNAの酵素合成の原料となる4'-チオヌクレオチド三リン酸体 (4'S-NTPs) を合成した。得られた4'S-NTPsおよび複数のRNAポリメラーゼを用いて、100塩基程度の長さの4'-チオRNAの合成を試みた。まずは一般的に汎用されるT7RNAポリメラーゼを用いてRNA合成を試みたが、CTPを4'-SCTPに置換した場合でのみ反応が進行し、それ以外の4'-チオヌクレオチド三リン酸体 (4'-SUTP、4'-SGTP、4'-SATP) に置換した場合にはほとんどRNAが得られなかった。そこで、用いるRNAポリメラーゼを検討したところ、SP6 RNAポリメラーゼを用いた場合に、4'-SCTP、4'-SUTP、4'-SGTP存在下でもRNAを作製可能であることが示された (図10)。また、更に高機能型の化学修飾RNAの調製についても検討した。すなわち、免疫原性の低減能が知られている5-メチルシトシン (5-mC)、細胞内でのタンパク質翻訳能に優れることが一般に知られているシュードウリジン (Ψ)、あるいはN1-メチルシュードウリジン (N1m Ψ) の4'チオ型RNAを調製するために4'S-5mCTP、4'S- Ψ TP、4'S-N1m Ψ TPを合成しRNAポリメラーゼによるRNA調製を検討した。その結果、目的とするRNAの合成に成功した。特に4'S-N1m Ψ TPに置換した場合に最も高効率で化学修飾RNAを合成することができた。

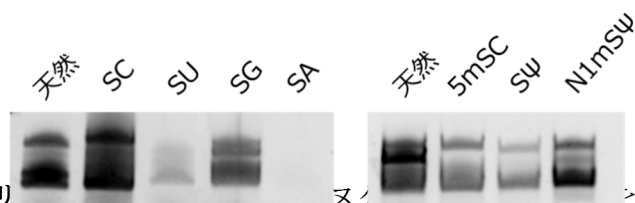


図 102 : SP6RNA ポリメラーゼを用いた RNA 合成
(SC : 4'-SCTP、SG : 4'-SGTP、SU : 4'-SUTP、SA : 4'-SATP、
5mSC : 4'S-5mCTP、S Ψ : 4'S- Ψ TP、N1mS Ψ : 4'S-N1m Ψ TP)

以上の結果からこれら検討した4'S-NTPsでは4'-SCTPが最も効率よくRNAを与えることが明らかとなった。そこで4'-チオシチジンを含む4'-チオmRNA(GFPをコード) を合成し、哺乳類細胞に導入した。しかし、GFPの蛍光は見られず、すなわち細胞内でのタンパク質への翻訳が進行しないことが判明した。そこで、mRNAの5'-cap構造に着目し、cap部分に4'-チオヌクレオシドを組み込む実験を行った。その結果、タンパク質への翻訳は進行したものものの天然型Cap構造をもつmRNAを上回る効果は得られなかった。

2.人工核酸分子含有mRNAの脳内動態解析

薬物動態解析班の向井グループとの協議の結果、mRNAでの脳内動態解析の実施は困難と予想されたため、人工核酸含有siRNAを作製し、提供した。4'-チオアデノシン、4'-チオグアノシン、4'-チオシチジン、4'-チオウリジンのホスホロアミダイト体をそれぞれ合成し、ホスホロアミダイト法によって4'-チオヌクレオシドを分子内に含む4'-チオ二本鎖RNAを合成した。また、二本鎖RNAのうち、片側の鎖の3'末端にアジド基が付加するように合成した。得られたsiRNAに放射性の銅イオンをキレートさせ、マウスに脳室内投与後PETを用いてその分布を検証した。その結果、4'-チオRNAは天然型RNAよりも広範囲に分布することが判明し、体内からの消失もより緩やかであった (図11)。このことから、4'-チオRNAは生体内でより長時間、広範囲に有効性を示すことが期待される。



図 113 : 4'-チオ RNA の PET による分布解析。
左 : 4'-チオ RNA 投与、右 : 天然型 RNA 投与。
赤色が RNA 分布領域を示す。

3.人工核酸分子含有modNEU1-mRNAの創出

「1. 人工核酸分子4'-チオRNAを含むmRNAの作製とキャリア内封」において良好な結果が得られた条件において化学修飾核酸分子含有modNEU1-mRNAの合成を試みた。しかし、modNEU1のような数千塩基長のmRNAの場合は収率が低く、動物時投与する程の量を用意するにはさらなる検討を要する事が判明し、最適な修飾様式の決定には至らなかった。

The purpose of this research is to develop mRNA replacement therapy for the cure of sialidosis (SiD), which is genetic neuraminidase 1 (NEU1) deficiency with central nervous system failure. For the treatment of SiD, injection of mRNA encoding NEU1 seems effective, but it is harmful because overexpression of normal NEU1 causes intracellular crystallization of NEU1 protein and the crystals harm the cells. To resolve this problem, we have developed modified NEU1 (modNEU1) which does not crystalize in cells by amino acid replacement. With this background, we have set the next development items.

1. Synthesis of modNEU1-mRNA and encapsulation in drug delivery system (DDS) carrier
2. Evaluation of the effect of modNEU1-mRNA administration in vitro.
3. Evaluation of the effect of modNEU1-mRNA administration in vivo.
4. Synthesis of artificial mRNA and its pharmacokinetics

1. Synthesis of modNEU1-mRNA and encapsulation in drug delivery system (DDS) carrier.

We had already optimized the codon usage, therefore, we tried to find the proper UTR sequence. We found that CMV 5'-UTR makes the most efficient expression of NEU1. We also succeeded in the encapsulation of modNEU1-mRNA in DDS carrier.

2. Evaluation of the effect of modNEU1-mRNA administration in vitro.

ModNEU1-mRNA with DDS carrier was transfected to the SiD model cultured cells. The NEU1 activity was restored by modNEU1-mRNA administration. Simultaneous administration of mRNA encoding cathepsin A (CTSA), which is the activator protein, was more effective.

3. Evaluation of the effect of modNEU1-mRNA administration in vivo.

ModNEU1-mRNA and CTSA-mRNA with DDS carriers were intracerebroventricularly injected into the SiD model mice. SiD model mice exhibit some phenotypes including myoclonus seizures caused by central nervous system failure. 24 to 48 hours after mRNA injection, the myoclonus seizures decreased less than 30% compared with the before administration (Figure 1). The NEU1 activity was also restored after mRNA administration (Figure 2).

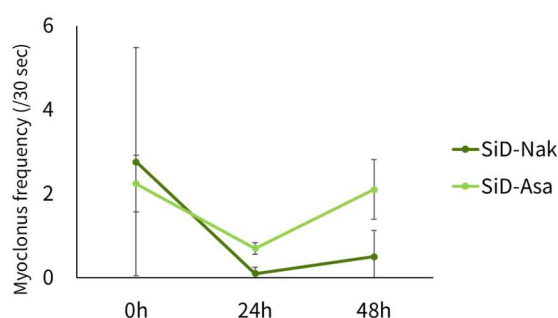


Figure 1: Frequency of myoclonus seizure of SiD mice after mRNA injection

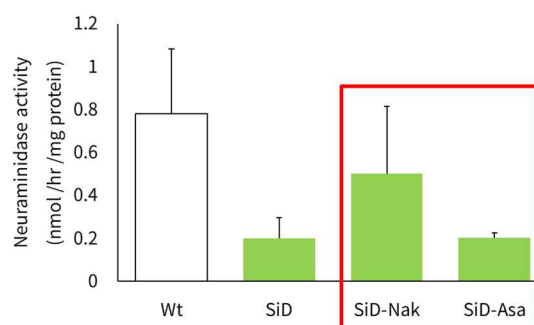


Figure 2: Neuraminidase activity of SiD mice brains 48 hour after mRNA injection.

4. Synthesis of artificial mRNA and its pharmacokinetics

We tried to synthesize 4'-thio modified mRNA to extend the half life of mRNA by RNase resistant. We succeeded in synthesizing 4'-thio modified mRNA with RNA polymerase, but unfortunately, it was not translated to protein in mammalian cells. We are under investigating 4'-thio modification in untranslated region, poly A, or 5'-cap structure in the mRNA.