

博士論文(要約)

細胞死抑制因子 mRNA の *in vivo*/*ex vivo* 導入による遺伝子治療

松井 秋倫

細胞死は様々な疾患に関与しており、炎症や虚血だけでなく、活性酸素による酸化ストレスなど多岐に渡る要因によって誘発される。そのため、細胞死が亢進する疾患に対して、細胞死抑制因子を持続的に供給する遺伝子治療は有効であると考えた。しかしながら、遺伝子治療として、主として利用される DNA 導入では、ホストゲノム挿入変異により発現の制御が困難となるため、とりわけ細胞死抑制因子の導入は癌化の危険性が懸念され、臨床応用が不可能と考えられた。そこで、ホストゲノム挿入変異の危険性のない、細胞死抑制因子 mRNA 導入による、mRNA 独自の治療法の確立を目指した。このシステムを展開するにあたって、①直接生体内へ導入する手法(in vivo 導入) や②細胞に対して ex vivo で導入し、その後、細胞移植する手法(ex vivo 導入)の 2 種類が挙げられる。本論文では、この 2 種類の手法について検討した。

mRNA は、生体内で酵素分解を受けやすい、免疫原性があるといった問題があることから、キャリアが必要とされた。そこで、当研究室で開発された高分子ナノミセルに mRNA を内包させることで、その問題の解決を試みた。本手法のナノミセルが in vivo mRNA 導入に有効であるか評価するために、肝臓に効率的に核酸を導入可能なハイドロダイナミクス法を採用した。ルシフェラーゼ発現 mRNA を投与した場合、何もキャリアを用いない Naked mRNA と比較して、ナノミセル投与群で 100 倍以上高い発現が 4 日間持続した。ハイドロダイナミクス投与後の mRNA の安定性について定量 PCR 法にて評価したところ、ナノミセルに内包させることで 30 倍以上有意に安定性を向上させることに成功した。続いて、投与に伴う毒性について、炎症分子の産生を指標として評価したところ、Naked mRNA では炎症が生じるのに対して、ナノミセルを用いることで、その炎症を有意に抑制させ、未投与コントロールと同程度まで抑えることができた。

肝臓への in vivo mRNA 導入について、より詳細に検証するために、従来法であるプラスミド DNA(pDNA)と比較した際の、発現について GFP をレポーターとして、評価した。その結果、pDNA を用いた場合では Naked pDNA、ナノミセル pDNA とともに肝臓組織の少数の細胞で強い発現が得られたが、大半の細胞では発現が得られなかった。一方で、ナノミセルを用いて mRNA を導入した場合、肝臓組織のほぼ全ての細胞で均一な発現が得られた。これは、pDNA はその発現過程が複雑であり、核移行が障害となっていることと考えられた。実際に、肝臓で投与核酸の分布を共焦点顕微鏡にて検証したところ、投与核酸は細胞質には到達したものの、核内移行率が低いことが明らかとなった。

mRNA では、標的細胞のほぼすべての細胞に発現が得られるといった、pDNA にはない新しい特長を持つことが明らかとなった。治療応用にあたって、従来法の pDNA では、少数の細胞でしか発現が得られないことから、分泌型の治療因子への適用が中心となるのに対して、mRNA を用いる場合には、分泌型の因子だけでなく、細胞内因子への適用が可能になることが示唆された。また、mRNA にはホストゲノム挿入変異の危険性がない特長がある。そこで、急性の致

死性疾患に対して、細胞死抑制因子の導入による治療を試みた。本研究では、劇症肝炎モデルマウスを作製し、細胞死抑制因子として代表的である Bcl-2 を用いることで、本戦略の検証を試みた。Bcl-2 を、ナノミセルを用いて mRNA の形で導入した場合は、pDNA を用いた場合と比較して、有意にアポトーシスを抑制できることが明らかとなった。

以上より、本システムは、mRNA を安全かつ効率的に肝臓へと送達することに成功した。mRNA には従来法の DNA 導入にはないほぼ全ての標的細胞に導入可能という特長をもつことから、細胞死抑制因子を mRNA の形で導入することで急性致死疾患の mRNA 独自の治療応用に有望である。

細胞死抑制因子 Bcl-2 mRNA 導入で劇症肝炎モデルマウスの肝組織でのアポトーシスを抑制できたことから、移植時での移植細胞の細胞死により治療効率が低いことが問題となっている、細胞移植治療に応用できると考えた。肝細胞移植は、先天性代謝疾患や肝炎などによる肝不全に対して根治療法に繋がるのが期待され、ex vivo にて細胞死抑制因子 mRNA を導入することで生着率が向上するか検討を行った。

細胞移植による治療において、疾患領域は炎症や虚血といった微小環境の劇的な変化が生じていることが想定されるため、Bcl-2 といった因子だけでなく、他の細胞死抑制因子の細胞死抑制効果を検証した。細胞死が誘発される条件によって、誘導される経路が異なることから、本研究では、NOL、Survivin、Akt、Hsp27 を比較した。まず、初めに、初代培養肝細胞への mRNA 導入法の選定を行った。市販の導入試薬 Trans-IT、エレクトロポレーション法を比較したところ、Trans-IT で最も高い発現が得られたことから、本研究では、Trans-IT を用いた。細胞死誘発条件培養後の、細胞死抑制効果をアポトーシス、ネクローシスを検出することで評価したところ、細胞死抑制因子を用いた場合は、アポトーシス、ネクローシスを抑制することができ、その効果は Bcl-2 が最も高い傾向が観察された。そのため、本研究では Bcl-2 mRNA 導入肝細胞移植の効果を検証した。

まず、皮下移植を行った際の、生着率について定量 PCR 法にて評価したところ、移植後 24 時間で Bcl-2 mRNA 導入細胞移植群は、コントロール mRNA 導入細胞移植群や mRNA 未導入細胞移植群と比較して、有意に高い生着率を示した。しかし、その生着率は移植から 48 時間移行で低下し、移植後 1 週間では殆ど生着した細胞は検出できなかった。このことから、肝細胞にとって、皮下は生着しづらい環境であることが想定されたため、脾臓内移植を行うことで同所移植を試みた。脾臓内移植は、脾静脈、門脈を介した肝臓の肝細胞移植であり、この手法は肝細胞移植の動物実験において汎用される手法である。すると、移植後 1 日目で、ex vivo で Bcl-2 を導入した群は、何も導入していない群やコントロール mRNA 導入群と比較して、約 2-4 倍以上、有意に生着率が上昇した。さらに、経時的に評価したところ、ex vivo で Bcl-2 を導入した群では 1 ヶ月に渡る長期間に渡って効率的な生着が観察された。とりわけ、移植後 2 日目以降

では、移植細胞での細胞死は殆ど観察されず、肝臓へ移植することで長期生存を得ることに成功した。

肝細胞移植の有望な応用として、急性肝炎における肝細胞機能の保護が挙げられるが、このような炎症環境下では肝細胞の細胞死が誘発されている。そこで、このような環境下でも Bcl-2 導入肝細胞が生着するかに関して調べた。ここではコンカナバリン A を投与することで肝炎を作製したが、AST、ALT といったマーカーが上昇していることから、肝炎が作製できていることが確認できた。このような環境に対して、肝細胞移植を行ったところ、Bcl-2 を *ex vivo* 導入した群で、その他の群と比べ、生着率が約 5 倍以上向上した。

Bcl-2 の発現持続期間を ELISA 法にて評価したところ、3 日間程度であったのに対して、肝臓で長期的に生着した。これは、移植後 2 日目以降は外来の Bcl-2 の発現が無いにも関わらず移植細胞が肝臓内で生存していたことが示唆された。そのメカニズムを検証するために、GFP 恒常発現マウスから得た初代培養肝細胞を用いて、同所移植後の移植細胞の分布を観察した。その結果、移植後 6 時間では、移植細胞は門脈やその周辺のシヌソイドに存在していることが観察された。一方で、移植後 48 時間では、血管内に存在する移植肝細胞は殆ど観察されなくなり、大多数が肝臓の実質領域に移行していた。以降の移植から 1 週間後で、肝実質領域に存在する移植肝細胞が多数観察された。ここで、同所移植の生着率の結果では、多くの移植肝細胞が肝実質へ移行したと想定される移植 48 時間以降、ほとんど移植肝細胞の細胞死は観られなかった。以上の結果から、移植肝細胞は、移植 48 時間以降は外来 Bcl-2 の発現が無い状態でも、肝細胞の生存に適した微小環境である肝実質内で長期生存できたことが示唆された。続いて、移植後 48 時間以内の細胞死抑制効果について検証した。以前に Kupffer 細胞による除去機構が重要であることが報告されていたことから、クロドロン酸リポソームによってマクロファージを除去し、Kupffer 細胞による除去機構を阻害した後に、移植を行い 24 時間後の生着率を定量 PCR 法で評価した。すると、Bcl-2 の *ex vivo* 導入の有無によらず高い生着率が確認された。以上の結果から、移植後、マクロファージによる除去機構を、外来 Bcl-2 導入により回避できたことが強く示唆された。

最後に、本戦略の疾患治療への有効性を検証するために、慢性的な炎症により肝機能が低下したモデルマウスに肝細胞移植を行い、その肝機能を補充できるか評価した。四塩化炭素を週 2 回 4 週間投与することで、アルブミン産生量の低下が観察され、肝機能の低下が確認された。これに対して、Bcl-2 を導入した肝細胞を移植した群では、移植後 1 日目で、血漿中のアルブミン濃度は正常マウスと同程度まで回復した。一方で、何も導入していない肝細胞を移植した群やコントロール mRNA を導入した肝細胞を移植した場合でも肝機能は回復したが、その程度は Bcl-2 mRNA を導入した移植群と比較して低かった。また移植後 30 日目において、Bcl-2 mRNA を導入した移植群は、他群と比較して有意な肝機能の回復が観察され、長期的な効果が得られ

た。肝機能不全に対する肝細胞移植は、主として肝移植を待つ間の繋ぎ療法としても期待されていることを踏まえると、治療応用可能に十分な効果が得られたと考えられる。以上のように、本戦略で移植した肝細胞は移植後の肝組織において機能を維持し、治療効果を得られることが明らかとなった。

本論文では、細胞死抑制因子の *in vivo*/*ex vivo* mRNA 導入の確立と、その治療応用について検証した。細胞死抑制因子は、癌遺伝子であるため、これまで主流であった DNA を用いた場合では、ホストゲノムへのランダムな挿入変異の可能性から、特に癌化の危険性が懸念され、臨床応用は不可能とされた。一方で、mRNA の発現持続は数日程度であることから、安全に細胞死抑制因子といった遺伝子を導入する治療法が可能であることが示唆された。このように本研究で構築した細胞死抑制因子 mRNA 導入は、臨床応用可能な手法として、様々な疾患に対して、従来にはない医療の可能性を切り開くものである。今後、今回構築したシステムを他の疾患モデルに対して応用することで、システムの最適化や、さらなる機能評価を行って、将来的に幅広く汎用可能な手法として臨床応用を目指していく。