

「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明と
その制御に向けた基盤技術の創出」
平成 29 年度採択研究代表者

H29 年度
実績報告書

秋田 英万

千葉大学大学院薬学研究院
教授

リンパシステム内ナノ粒子動態・コミュニケーションの包括的制御と創薬基盤開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 「ナノ粒子開発・機能解析グループ」グループ

① 研究代表者: 秋田 英万 (千葉大学大学院薬学研究院 教授)

② 研究項目

- ・リンパ流改変モデルマウスの開発とリンパシステム内におけるナノ粒子動態解析法の開発
- ・メラノーマからのエクソソーム調製
- ・細胞内環境応答性脂質様材料の改良
- ・DNAワクチン製剤の開発と機能/動態評価
- ・DNA搭載ナノ粒子のアジュバント活性評価

(2) 「コミュニケーション素子開発」グループ

① 主たる共同研究者: 市川 聡 (北海道大学大学院薬学研究院 教授)

② 研究項目

- ・免疫担当細胞の標的化素子の合成・開発
- ・免疫担当細胞の活性化素子の合成・開発

(3) 「ナノ粒子製造技術開発」グループ

① 主たる共同研究者: 渡慶次 学 (北海道大学大学院工学研究院 教授)

② 研究項目

- ・マイクロ流路内ミキサー構造の検討
- ・流体シミュレーションとイメージング実験
- ・作製したデバイスの粒子サイズ制御性能の評価
- ・小角 X 線溶液散乱測定用デバイスの作製

(4)「細胞コミュニケーション解析」グループ

① 主たる共同研究者:大槻 純男 (熊本大学大学院生命科学研究部 教授)

② 研究項目

- ・表面ビオチン化法による表面・内在化タンパク質のプロテオーム解析の最適化
- ・ヒト臍帯静脈由来静脈内皮細胞の表面・内在化タンパク質の同定
- ・リンパ管内皮細胞の培養系の構築
- ・プロテオミクス技術のトランスファー

(5)「生体内イメージング解析」グループ

① 主たる共同研究者:岡田 峰陽 (理化学研究所統合生命医科学研究センター チームリーダー)

② 研究項目

- ・微粒子 DNA ワクチンのリンパ節内動態イメージング解析
- ・微粒子 DNA ワクチンによる抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の分化誘導評価

§ 2. 研究実施の概要

リンパは、免疫担当細胞の貯蔵を司るリンパ節と、これらをつなぐリンパ管から形成され、免疫制御の場として中心的な役割を果たすことや、がんの転移やリンパ浮腫などの難治性疾患に深く関与している。従って、本システム内における薬物の送達技術(Drug Delivery System: DDS)には極めて高いニーズがある。しかし、本システムは無色透明な液体が流れるために、血管と比較して肉眼でも観察が困難であり、その研究は遅れてきた。本研究ではナノ粒子の製造および臓器・細胞標的化技術を活かしながら、リンパシステム・組織・細胞の各階層における動態を包括的に制御する技術を開発することを目的としている。H29年度は、リンパシステム内、特にリンパ節間におけるナノ粒子を評価する上で有用なリンパ流改変モデルマウスを開発すると共に、主に DNA ワクチン製剤を中心としたリンパ節への移行能を評価した。また、本技術を mRNA ワクチンへと応用すべく、ssPalmE 分子に対して mRNA を搭載したナノ粒子の開発を行った。また、ナノ粒子に搭載するアジュバント分子等の合成にも着手した。

通常、足裏(皮下)に投与された分子は、膝窩リンパ節を介して体の深部に流れるリンパ流にのるため、定量的な評価が困難となる。我々は、膝窩リンパ節を除去することにより、鼠径リンパ節から腋窩リンパ節に至る、体表近くのリンパ流を誘導できることを見いだした(図1)。

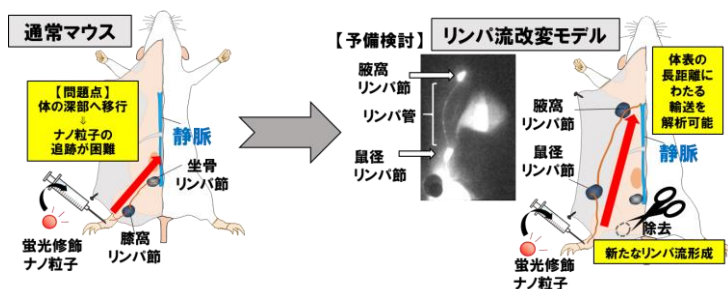


図1 リンパ流改変モデルマウスの確立
今後、本モデルを用いる事により、今後様々な物性を有するナノ粒子のリンパシステム内動態を解析したいと考えている。

また、我々はこれまで、抗原をコードする DNA をビタミンE 足場型材料(ssPalmE)に搭載した粒子が抗原特異的な免疫活性化を示すことや、抗腫瘍効果を発揮する結果を得ていた。本年度は、免疫活性化機構について、ナノ粒子のリンパシステム内動態も含めた解析をおこなった。その結果、本ナノ粒子は、マクロファージの活性化能を有していることが明らかとなった。また、リンパ節内において、ナノ粒子が特定のマクロファージに効率的に取り込まれることを明らかとした。DNA ワクチンで培った技術を RNA ワクチンへと応用すべく、mRNA を ssPalmE 粒子に搭載する技術を確立した。また、本粒子の *in vitro* 培養細胞に対する遺伝子導入効率を検証し、従来技術に対する優位性を確認した。

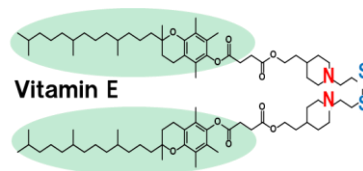


図2 ビタミン E 足場型

脂質化アジュバント開発のために、細菌のペプチドグリカン生合成の前駆体であるリポド II に着目した。リポド II は糖ペプチド部と脂溶性側鎖がジリン酸結合を介して結合した構造を有しており、免疫活性化能には糖ペプチド部が重要である。我々はリポド II の脂溶性側鎖をナノ粒子導への足場として使用することを計画し、リポド II の誘導體合成を行った。構造最適化のための誘導體展開が容易となる、固相合成法を用い、リポド II の脂溶性側鎖を 10 炭素数のネリル基に置き換えたネリルリポド II の合成を達成した(図 3)。また、本合成法を利用して、ネリルリポド II の N-アセチルグ

ルコサミン欠損体にあたるネリルリピド I の合成も達成した。

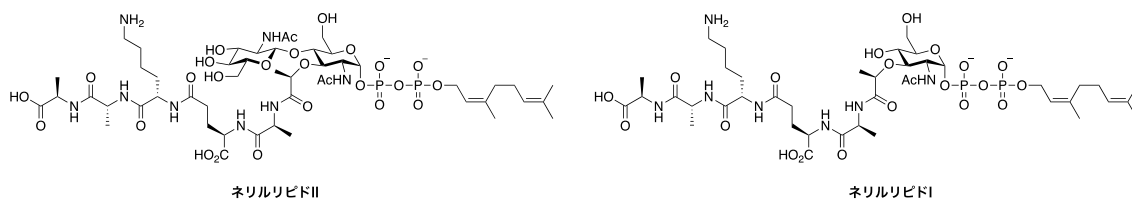


図3 ネリルリピド I, II の構造

Yoshihisa Yamaji, Shinsuke Akita, Hidetaka Akita, Naoya Miura, Masaki Gomi, Ichiro Manabe, Yoshitaka Kubota, Nobuyuki Mitsukawa. Development of a mouse model for the visual and quantitative assessment of lymphatic trafficking and function by in vivo imaging. *Sci Report*, 8(1) 5921

Hiroki Tanaka, Taichi Nakatani, Tomomi Furihata, Kota Tange, Yuta Nakai, Hiroki Yoshioka, Hideyoshi Harashima, and Hidetaka Akita In Vivo Introduction of mRNA Encapsulated in Lipid Nanoparticles to Brain Neuronal Cells and Astrocytes via Intracerebroventricular Administration. *Mol. Pharmaceutics in press doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01084*.

Akira Katsuyama, Kousuke Sato, Fumika Yakushiji, Takanori Matsumaru and Satoshi Ichikawa, "Solid-phase Modular Synthesis of Park Nucleotide and Lipid I and Lipid II Analogues", *Chem. Pharm. Bull.* 2018, 66, 84-95.