

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. 研究成果の概要

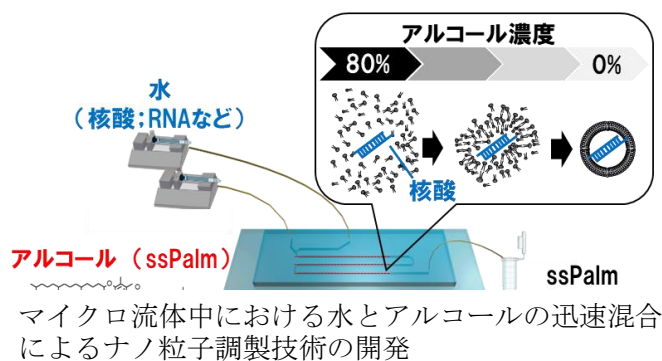
リンパシステム内ナノ粒子動態・コミュニケーションの包括的制御と創薬基盤の開発を行うにあたり、下記の①～③の 3 つの戦略に沿って研究を進めた。

#### ① ナノ粒子のリンパシステム内動態評価

これまでに膝窩リンパ節の除去により作成したリンパ留改変モデルマウスを用いることで、リポソームのリンパシステム内動態を定量可能であること明らかにしており、今年度は種々の表面物性を有するナノ粒子のリンパシステム内動態の系統的評価を行った。その結果、表面電荷を負に調節し、サイズを 50 nm 程度に制御した際に投与部位から遠位のリンパ節まで移行可能であることが明らかとなった。また、投与部位からリンパシステム内へ到達するナノ粒子を増大させる戦略を実現すべく、新規水溶性ポリマー脂質誘導体の合成法の検討を行い、モデル分子を用いた合成手法の確立に成功した。

#### ② 免疫担当細胞における細胞内動態とシグナル応答制御

ビタミン E を足場に有する脂質様物質 ssPalmE に対して DNA を搭載したナノ粒子が免疫賦活化作用を持つことを明らかとし、本材料をナノアジュバントとして応用した。本ナノアジュバントはタンパク質ワクチンの活性を顕著に向上させた。マクロファージ由来細胞をもちいてメカニズムを解析した結果、ssPalmE は DNA を細胞質に送達



し、かつ、その免疫賦活化作用を増強する可能性が示唆された。

また、本材料を mRNA およびペプチドリガンドと組み合わせ、*ex vivo* 樹状細胞ワクチンのための mRNA ベクターを開発した (ssPalme-KALA)。本ベクターを曝露した樹状細胞は、脂肪鎖を有する ssPalm (ミリスチン酸足場型 ssPalm: ssPalmM) と比較して優れた mRNA からの蛋白質発現と、免疫活性化効果を示した。メカニズムの解明を目的としプロテオミクス解析を行ったところ、ssPalme-KALA 特異的にリン酸化状態が変動することが見出された。また、本知見を基に、皮下に直接投与可能な ssPalme 製剤の開発をすすめている。均一な mRNA 搭載ナノ粒子の調製を可能とするマイクロ流体デバイスを開発することに成功している。

### ③ リンパ内皮における微粒子コミュニケーションの解明と制御

リンパ内皮における微粒子のコミュニケーションを解明するためのツールとして、原発巣からリンパ節に高い転移性を示す細胞株の作成を試みた。原発巣からリンパ節へと転移したがん細胞を *in vivo* で継代を繰り返すことにより、高頻度でリンパ節転移を起こすがん細胞の樹立に成功した。リンパ管内皮細胞の機能制御を目的とし、核酸をリンパ管内皮細胞の細胞質へ送達するための新規脂質様物質を開発した。本脂質様物質はナノ粒子内の特殊な環境においてのみ自発的に分解する特性を有し、既承認核酸医薬品と比較しても効率的な核酸送達能を示した。この新規脂質ナノ粒子に修飾するリガンドとして、リンパ節内の細胞を認識する抗体を修飾したナノ粒子の作成条件を検討した。本抗体修飾により、標的細胞への取り込みを促進させることに成功した。

#### 【代表的な原著論文】

1. Yoshihisa Yamaji, Shinsuke Akita, Hidetaka Akita, Naoya Miura, Masaki Gomi, Ichiro Manabe, Yoshitaka Kubota, and Nobuyuki Mitsukawa, "Development of a mouse model for the visual and quantitative assessment of lymphatic trafficking and function by *in vivo* imaging", *Sci. Rep.*, 8, 5921, 2018
2. Minori Kawai, Takashi Nakamura, Naoya Miura, Hiroki Tanaka, Keisuke Ueda, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Kota Tange, Yuta Nakai, Hiroki Yoshioka, Hideyoshi Harashima and Hidetaka Akita, "DNA-loaded nano-adjuvant formed with a vitamin E-scaffold intracellular environmentally-responsive lipid-like material for cancer immunotherapy." *Nanomedicine*, 14(8), pp2587-, 2018
3. Niko Kimura, Masatoshi Maeki, Yusuke Sato, Yusuke Note, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Hideyoshi Harashima, and Manabu Tokeshi, "Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery", *ACS Omega*, 3(5), pp5044-, 2018

## § 2. 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を用いたリンパシステム内におけるナノ粒子動態の解析
- ・リンパ節高転移性メラノーマの確立
- ・細胞内環境応答性脂質様材料を用いたナノ粒子の細胞内動態解析
- ・RNA ワクチン製剤の開発と機能/動態評価
- ・核酸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改良による溶解性の改善
- ・免疫担当細胞の活性化素子の合成の検討

### (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

- ・新規マイクロ流路内ミキサー構造の開発（ピラー型）
- ・ガラス製マイクロデバイスの試作
- ・小角 X 線溶液散乱測定用デバイスの作製、および、ナノ粒子の構造変化の実時間測定

### (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リンパ管内皮細胞の表面・内在化タンパク質のプロテオーム解析
- ・RNA ワクチン製剤投与時における樹状細胞内リン酸化タンパク質の発現変動解析

### (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 RNA 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
- ・微粒子 RNA ワクチンのリンパ節内動態イメージング解析