

2017年度採択研究代表者

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つの基本戦略に則って研究を進めた。

① ナノ粒子のリンパシステム内動態制御とリンパ節イメージング

前年度までに種々のサイズ(80、130、300 nm)・電荷(カチオン性・中性・アニオン性)を持つ脂質ナノ粒子を投与した際のリンパシステム内動態の網羅的解析を行い、130 nm のアニオン性ナノ粒子にのみ投与した部位から初めに到達するリンパ節(一次リンパ節)に滞留する性質が見られることを明らかとした。2019年度は一次リンパ節に滞留するメカニズムとこれを応用したセンチネルリンパ節イメージングを行った。蛍光標識した粒子を投与後のリンパ節を切除し、抗体染色によりリンパ節内のT細胞、B細胞、マクロファージに取り込まれた粒子を定量した。その結果、リンパ節内の大多数を占めるT細胞・B細胞への取り込みは著しく低かった。一方で、小集団であるマクロファージの中でも特にCD169陽性のマクロファージにおいてリポソームの取り込みが見られた。さらに、投与部位に最も近接したリンパ節に留まりやすい性質を利用し、がん近傍のセンチネルリンパ節のイメージングへと応用した結果、既存の蛍光造影剤と比較して高い感度でセンチネルリンパ節を検出することに成功した。

リンパ節の滞留性向上を目的として、免疫細胞に認識されるフォスファチジルセリン(PS)をリポソームに組み込んだ粒子の開発にも着手した。PSは一般的にアルコールに不溶性であるため、一般的なアルコール希釈法による脂質ナノ粒子作成において使用が困難であった。そこで、アルコールへの可溶化を目指し、ヘテロな2つの脂肪酸からなる新規PS誘導体を設計した。飽和・不飽和の短鎖脂肪酸を有する6種類のアルコール可溶型PSの合成に成功した。また、負電荷脂質を含む組成でも負電荷の核酸を高効率で封入するために3Dピラーを有する新規マイクロ流

体デバイスを開発した。今後この新規アルコール可溶性 PS を用いた核酸搭載粒子の物性・活性の評価を進めていく。

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

R1 年度では、ビタミン E を足場とする環境応答性脂質様物質 ssPalm (ssPalmE) の核酸ワクチンへの応用を進めた。これまでに我々は、ssPalmE 分子を用いて DNA をナノ粒子化することで、顕著な免疫活性化能を有するナノアジュバントとして利用できることを報告してきた。本年度では、内封される DNA に抗原タンパク質をコードすることにより、免疫活性化能と抗原導入能を両立したナノ DNA ワクチンを開発した。本製剤は抗原非コード DNA を内封したナノアジュバントに比べ、有意に高い抗腫瘍効果や抗原虫効果を示した。本製剤は生体へ投与後リンパ節のマクロファージに集積するが、リンパ節内 CD169 陽性マクロファージの枯渇実験を行ったところ、予想外にも、本細胞群の枯渇によりワクチン機能が向上した。本結果は、マクロファージによるトラップが DNA ワクチンの効果を妨げることを示唆している。次いで我々は、ssPalmE と抗原をコードした mRNA を組み合わせた RNA ワクチンの機能解析を行った。我々は前年度までの研究で、本 RNA ワクチンが従来技術と比較し数百倍優れたワクチン機能を有することを示している。前述した DNA ワクチンの知見より、核酸ワクチンのリンパ節内標的細胞はマクロファージ以外の抗原提示細胞であると推察され、実際に本マクロファージ群の枯渇はワクチン機能に影響を与えなかった。リンパ節内の遺伝子発現を詳しく解析した結果、本 RNA ワクチンは Cd11c 陽性樹状細胞に mRNA を送達している可能性が示唆された。

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

H31/R1 年度ではがん/リンパ管上皮細胞間の微粒子を介したコミュニケーションを評価するために不死化リンパ管上皮細胞 (LEC) の確立を目指した。PromoCell より購入した大人皮膚由来プライマリー LEC に対してレンチウイルスベクターを用いて、ヒト Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) 遺伝子をトランスフェクションした後に、改良型 single cell cloning 法によりクローニングを行った。LEC のマーカータンパク質であるポドプラニンの発現をフローサイトメトリーにより評価したところ、市販のプライマリー細胞と同等の発現が認められた。また、その発現は 50 回以上の継代後も維持されていた。

また、ナノ粒子に標的指向性を付与する手法として、ナノ粒子海面上においてクリック反応を用いてリガンドを修飾する方法の確立を行った。本法は従来使用されていたアミド結合の形成反応と比較して反応速度は 10 倍程度早かった。さらに、LEC を認識するためのペプチドリガンドの探索のためファージディスプレイを行い LEC に強く結合する 3 つの配列を同定した。新たな流路を作成し、負電荷脂質を用いた場合でも高い核酸封入効率を達成した。

【代表的な原著論文】

Naho Tateshita, Naoya Miura, Hiroki Tanaka, Takeshi Masuda, Sumio Ohtsuki, Kota Tange, Yuta Nakai, Hiroki Yoshioka, and Hidetaka Akita, "Development of a lipoplex-type mRNA carrier composed of an ionizable lipid with a vitamin E scaffold and the KALA peptide for use as an ex

vivo dendritic cell-based cancer vaccine”, *Journal of Controlled Release*, vol. 310, pp.36–46, 2019

Mio Maeta, Naoya Miura, Hiroki Tanaka, Takashi Nakamura, Ryo Kawanishi, Yoshifumi Nishikawa, Kenichi Asano, Masato Tanaka, Shinya Tamagawa, Yuta Nakai, Kota Tange, Hiroki Yoshioka, Hideyoshi Harashima, and Hidetaka Akita, “Vitamin E Scaffolds of pH-Responsive Lipid Nanoparticles as DNA Vaccines in Cancer and Protozoan Infection”, *Molecular Pharmaceutics*, vol.17, No.4, pp.1237–1247, 2020

§ 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上皮細胞の表面・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