

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2024年03月

研究代表者: 秋田 英万
(東北大学 大学院薬学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究は、『1. ナノ粒子のリンパ内動態制御』、『2. リンパ内皮/微粒子コミュニケーションの解明と制御』、『3. 免疫担当細胞における細胞内動態とシグナル応答制御』の3つの研究を柱とし、微粒子のリンパシステム内動態やコミュニケーションを解明/制御することを目指している。

『1. ナノ粒子のリンパ内動態制御』について、リンパ流改変モデルマウスを開発し、物理化学的物性を系統的に変化させたリポソームの中から、1 次リンパ節(所属リンパ節)に集まりやすい粒子を同定した。また、本リポソームをセンチネルリンパ節のイメージング剤として応用できる可能性を示した。リンパ節内のナノ粒子を岡田グループと連携し、リアルタイムに可視化することにより、マクロファージによる捕捉が本リンパ節内への集積の駆動力となることが明らかとした。また、この知見から、マクロファージが持つアポトーシス細胞の細胞膜に露出したフォスファチジルセリン(PS)を認識するタンパク質である Tim-4 を標的とする戦略を立案した。PS をナノ粒子に組み込むことでマクロファージをより積極的に標的化することでリンパ節への集積性を高めることができると考え、実験計画法を用いて PS を含むナノ粒子の脂質組成を最適化した。その結果、これまでのアニオン性リポソームと比較して、1.5 倍以上リンパ節への集積性が向上した。また、リンパ節への滞留性を利用した核酸導入システムへと発展させるべく、脂質ナノ粒子の構成成分について開発した。

『2. リンパ内皮/微粒子コミュニケーションの解明と制御』に関しては、リンパ節への転移性の高いメラノーマ細胞を樹立し、本細胞から産生される細胞外微粒子がリンパ内皮細胞(LEC: Lymphatic endothelial cells)に与える機能的な影響を解析したが、有意な変化は認められなかった。しかし、LEC を標的化するため、大槻グループによって本細胞膜上に発現する蛋白質群を解析した結果、エクソソームマーカーの一つである CD9 が極めて高く発現していることが示唆された。本結果をうけて、今後は LEC から産生されるエクソソームの機能を解析することにした。一方、LEC は生体から多くの細胞数を取得することが困難であり、エクソソームを単離することが困難であった。そこで、十分量のエクソソームを単離するため、LEC の不死化細胞を樹立した。樹立した不死化 LEC により大量の細胞培養の必要があるエクソソームの抽出が可能となった。これらエクソソームの機能の解析をすすめた。また、本不死化細胞を用いながら、LEC を標的化するための素子の探索(大槻グループ)。また、生来膜を突破し、自己崩壊することで細胞質まで効率的に核酸を届けるための新規脂質(ssPalmO-Phe:ssOP)の開発にも成功した(Adv Funct Mater. 2020)。本粒子の表面に対してリガンドを修飾するための技術の確立もすすんでいる。これまでに、ssPalmP-Phe を含むナノ粒子界面で特殊な条件下でのみ進行する歪みエネルギー誘発型付加環化反応により抗体を迅速にナノ粒子表面に修飾する技術を開発した。本技術を用いて、LEC マーカーであるポドプラニン抗体で修飾したナノ粒子は、皮下投与後に LEC に集積し、内封した RNA を送達した。また、一方で、LNP の有する性質を利用した新規のリンパ内皮細胞標的化戦略を確立した。

『3. 免疫担当細胞における細胞内動態とシグナル応答制御』に関しては、ビタミンEを足場とする ssPalmE のDNA/RNA ワクチンとしての有用性を実証すると共に、岡田グループと連携し、各種遺伝子改変マウスを用いながら、本免疫活性化機構を解明した。また、各種アジュバントの開発について、市川グループと連携してすすめている。上記 1.~3. の研究を進める上では、渡慶次グループで開発されたマイクロ流体デバイスを基盤としたナノ粒子の調製技術を確立しており、随時利用している。龍崎グループでは、独自の1粒子解析技術を用いて、渡慶次グループが作製した脂質ナノ粒子の均一性や分子組成を1粒子ごとに評価することができるナノ粒子評価技術を確立した。これに平行して、本製造技術自身の改良やベンチトップ型装置の開発も進んでいる。一方、田中グループでは、本研究で開発したLNP型ナノ粒子を基盤とするRNA創薬を加速するため、誰でも、簡単にmRNA-LNPを作成できる製剤としてReady-to-Use型製剤を開発した。凍結乾燥技術を基盤とする本製剤は任意のmRNAに適用可能であり、RNA創薬の分野への参入障壁を低減できると期待される。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要：ビタミンE足場型 ssPalm を利用した RNA ワクチンの開発と免疫活性化機構の解明

ビタミン E 足場型の ssPalm が、皮下及び筋肉内投与時に免疫賦活化能を有することを明らかにした。本技術を用いた RNA ワクチンはモデルナ社のシステムと同程度のワクチン機能を示した。本ワクチンはがんや感染症など、細胞性免疫が重要な疾患へ応用できると期待され、実際にトキソプラズマ原虫に対する予防効果が見られた。ビタミン E ユニットが免疫賦活化能を有する事や、本ワクチンの免疫活性化機構を解析した。

2.

概要：リンパ節移行性ナノ粒子の網羅的探索

様々な物性を持つ粒子のリンパシステム内動態に関する包括的な評価を行うために、膝窩リンパ節の外科的切除により体表を流れるリンパ流を誘導するリンパ流改変モデルを作成した。本マウスを用いて、異なる表面物性・サイズを持つ 9 種類の脂質ナノ粒子を作成し、リンパシステム内動態を網羅的に解析した結果、表面電位をアニオン性とし、サイズを 130 nm 程度にコントロールした粒子は、マクロファージからの強い認識により最初に到達したリンパ節に留まる性質を有することを明らかにした(Mol Ther, 2021)。さらにマクロファージからの認識を高めるために、マクロファージが認識するアニオン性脂質 PS で作成した粒子はより高いリンパ節滞留性を示すことを明らかにした(Pharmaceutics, 2021)。

3.

概要：

これまでに樹立した市販のヒト皮膚由来 LEC の不死化株をがん細胞と共移植すると、がんの成長を助長されることなどを明らかにしてきた。しかしながら、ヒト由来細胞では免疫不全マウスを用いる必要があり、LEC と免疫系の関連を明らかにすることは困難である。そこで、マウス皮膚よりセルソーターを用いてリンパ内細胞を単離および不死化を試みた。培養条件を最適化し、不死化遺伝子を導入することで LEC マーカー (LYVE1、PDPN、CD31) 陽性の細胞を樹立した。本細胞を用いて、リンパ管内皮細胞に標的化能を有する LNP の開発に成功した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要：細胞内環境で分解性を示す脂質様材料の mRNA/核酸導入技術としての機能評価

mRNA を用いた遺伝子導入技術は、あらゆる蛋白質の導入を可能とすることから、様々な応用が考えられる。核酸は膜透過性を持たず分解性が高いため、生体への導入に際しては細胞質へ送達するための mRNA キャリアが必須となる。我々は mRNA キャリアの材料として自己分解性脂質 (ssPalmO-Phe: ssOP) を開発した(Adv Funct Mater. 2020)。本材料は細胞内で積極的に分解するため、優れた核酸導入効率と安全性を兼ね備えている。本材料は現在、日油株式会社から全世界の企業、大学へ供給されている。また、RNA 創薬を加速するため、溶かすだけで使用可能できる RtoU 凍結乾燥製剤を開発し、共同研究での評価等を開始した。

2.

概要：LNP の大量調製技術の開発

流量依存的に脂質ナノ粒子の粒径を精密に制御することができるマイクロ流体デバイス (iLiNP デバイス) を開発した (北大発ベンチャー企業から販売中)。また、iLiNP デバイスの実用化のために、耐薬品性・耐圧性に優れるガラス製 iLiNP デバイスの開発に取り組み、脂質ナノ粒子の大量生産システムを構築した。開発した iLiNP デバイスによるナノ粒子形成制御技術は、脂質ナノ粒子だけではなく、ポリマーミセルや量子ドットなどへの応用も期待できる。そこで、企業と共同で iLiNP デバイスを用いたベンチトップ型のナノ粒子作製装置を開発し、北大発ベ

ンチャー企業から販売を開始した。また、サイズ制御型脂質ナノ粒子の大量生産に向けて、iLiNP を基盤とした GMP 基準の粒子製造システムの開発に取り組んでいる。

< 代表的な論文 >

1. Tanaka H *et al.*, Self-Degradable Lipid-Like Materials Based on “Hydrolysis accelerated by the intra-Particle Enrichment of Reactant (HyPER)” for Messenger RNA Delivery. *Adv Funct. Mater.*, 30(4) 1910575

概要: mRNA 医療はワクチンや遺伝子編集、再生医療等、様々な疾患への応用が期待されている。mRNA は酵素分解に脆弱であるため、細胞外ではナノ粒子等に封入し保護する必要がある。一方、mRNA の過剰なコンパクションは核酸の機能を阻害し、遺伝子の発現を妨げることが知られている。このことから、mRNA キャリアは細胞外における安定性と細胞内における柔軟性の双方を兼ね備えなくてはならない。近年我々は、ジスルフィド脂質を構成成分として含むナノ粒子を還元環境に曝露すると、粒子内部で特異的に加水分解が起きることを見出した。そこで本研究では本分解反応を mRNA キャリアに応用し、細胞内で自発的に自己分解する新規脂質として ssPalmO-Phe (ssOP)を開発した。ssPalmO-Phe は還元剤存在下において、予想された化合物へ自己分解した。また、本材料の遺伝子導入効率は非分解型の材料や siRNA 医薬品の主成分である DLin-MC3-DMA と比較して有意に高かった。さらに、ラットにおける単回投与毒性は低いことが明らかとなった。これらの結果から、ssPalmO-Phe は mRNA を基盤とする遺伝子治療に有用な素材であることが示された。

2. Gomi M *et al.*, Development of Sentinel LN Imaging with a Combination of HAase Based on a Comprehensive Analysis of the Intra-lymphatic Kinetics of LPs. *Mol Ther*, 2021

概要: アニオン性の 130 nm の粒子がリンパ節に留まりやすい性質を利用し、腫瘍から初めて到達するリンパ節であるセンチネルリンパ節のイメージングへと応用を試みた。その結果、中性リポソームと比較して、より高感度にセンチネルリンパ節を検出可能であった。また、リンパシステムへの流入量を増大させるために、細胞外基質であるヒアルロン酸を分解する酵素と組み合わせることでさらに検出感度が向上することを見出した。

3. Kimura N *et al.*, Development of a Microfluidic-Based Post-Treatment Process for Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to siRNA Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12 (30), 34011-34020.

概要: マイクロ流体デバイス (iLiNP デバイス) に脂質ナノ粒子の作製および後処理機能の集積化を試みた。その結果、後処理機能を集積化したマイクロ流体デバイスでは、よりサイズ均一性が高い脂質ナノ粒子が作製可能であった。また、脂質組成によって、後処理方法が脂質ナノ粒子の粒径に与える影響が異なることを明らかにした。さらに、機能集積化 iLiNP デバイスを用いて siRNA 搭載脂質ナノ粒子を作製し、開発したデバイスが核酸医薬に応用可能であることを示した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「ナノ粒子開発・機能解析」グループ

研究代表者: 秋田 英万 (千葉大学大学院薬学研究院 教授)

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/エクソソーム動態の解析
- ・不死化リンパ内細胞を用いた微粒子・細胞作用の解明
- ・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

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)

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

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)

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

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)

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・内在化蛋白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蛋白質の発現変動解析

⑤ 「生体内イメージング解析」グループ

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)

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

⑥ 「1 粒子計測・解析グループ」グループ

主たる共同研究者: 龍崎 奏 (海道大学・大学院理学研究院・准教授)

研究項目

- ・脂質ナノ粒子における分子組成と粒子活性の相関性に関する研究

⑦ 「脂質ナノ粒子製剤処方開発」グループ

主たる共同研究者: 田中浩揮 (千葉大学・大学院薬学研究院・助教)

研究項目

- ・汎用性の高いナノ粒子製剤技術の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

【リンパ管内皮細胞】 環境由来微粒子は、呼吸器の細胞、リンパ管を介してリンパ組織へと集積する。リンパ組織を構成する細胞の内、環境由来微粒子と免疫細胞の相互作用については報告されているが、LEC との相互作用については報告されていない。これまでに、ディーゼルエンジン微粒子 (DEP) を京都大学の高野先生のグループから供与頂き、DEP を作成した不死化 LEC に暴露した際の応答について評価を行っている。

【核酸・RNA 送達用脂質材料】 脂質材料 ssPalm を用いた核酸送達に関して、アカデミアとの共同研究を進めている。RNA 創薬への参入障壁を改善する目的で開発した Ready-to-Use 製剤についても、大学間の共同研究に応用している。CREST 研究内においても、山下グループと連携し、

心筋由来細胞に対する miRNA の導入技術として利用していただいている(Sci Rep. 12(1):14902 (2022))。また、国産の RNA ワクチンの開発を目指し、感染症に対する抗体産生能の評価もすすめている。

【ナノ粒子製造装置】 **【ナノ粒子製造装置】** iLiNP デバイスを用いた脂質ナノ粒子作製について、研究チーム外において北大・薬学研究院と連携して研究を進めている。また、北大外への iLiNP デバイスの技術提供・連携として、国内の研究機関などと研究を進めている。産業界の連携としては、北大発ベンチャー企業であるライラックファーマ(株)から iLiNP デバイスを販売しており、製薬企業や大学の研究機関への販売実績がある。また、iLiNP デバイスの装置化は、住友理工(株)およびライラックファーマ(株)と共同で取り組んでいる。GMP 基準のナノ粒子大量生産システムについては、信越化学工業株式会社と共同研究を進めており、来年度にプロトタイプ機が完成予定である。さらに、海外の研究機関と連携して iLiNP デバイスを用いた脂質ナノ粒子作製と応用に関する研究を展開しており、海外とのネットワークも構築されている。このように、国内外の大学等の研究機関だけではなく、産業界とも幅広くネットワークを形成し、連携を着実に進めている。

【質量分析技術】 膜タンパク質を効率よく可溶化しトリプシン消化を行う独自の前処理法応用し、と国内企業と連携して単離したエクソソームのプロテオームを効率よく消化し、高深度プロテオーム解析を行う技術を構築した。現在、連携企業のエクソソーム単離キットのプロトコルへの採用の検討を進めている。