

研究終了報告書

「人工エクソソームによる長鎖 DNA の細胞導入法の開発」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：真栄城 正寿

1. 研究のねらい

マイクロ流体デバイスを用いて人工エクソソーム作製法を開発し、長鎖 DNA のトランスフェクション技術の確立に取り組んだ。siRNA や mRNA などの短鎖の核酸送達技術は、創薬・医薬分野にパラダイムシフトを起こしつつある。これらの核酸は脂質ナノ粒子に搭載されており、高い細胞導入効率を示している。一方で、短鎖の核酸と比較して長鎖の核酸は多くの遺伝情報をコードすることができるが、10 kbp 以上の長鎖核酸を細胞に効率良く導入することは未だに困難である。そこで本研究では、人工エクソソームおよび脂質ナノ粒子を用いて、10 kbp 以上の長鎖核酸を細胞に高効率に導入、機能発現させるための重要因子の解明に取り組んだ。これまでに開発したマイクロ流体デバイスを基に、人工エクソソーム作製法を確立し、トランスフェクション性能の解明に取り組んだ。また、長鎖 DNA の細胞導入効率および遺伝子発現効率を向上させるために、粒子の高機能化に取り組み、市販のトランスフェクション試薬であるリポフェクタミン 3000 を凌駕するトランスフェクション効率を達成した。

2. 研究成果

(1) 概要

長鎖 DNA を効率良くトランスフェクションすることができるナノ粒子の開発に成功した。pDNA を搭載した脂質ナノ粒子を作製し、ナノ粒子や pDNA のサイズが、細胞への取り込みや遺伝子導入効率に与える影響を評価した。マイクロ流体デバイスを用いて、15 kbp の GFP を発現する pDNA を人工エクソソームや mRNA ワクチンで利用されている脂質ナノ粒子に搭載した。しかし、人工エクソソームや脂質ナノ粒子のトランスフェクション効率は数%程度であり、効率的な長鎖 pDNA のトランスフェクションのためには、粒子の高機能化が求められた。そこで、カチオン性のアミノ酸やポリマーなど、数種類のポリカチオンを用いて、pDNA との複合体化し、複合体のナノ粒子への搭載を試みた。pDNA には、3、6、10、13、15 kbp の GFP あるいはルシフェラーゼ (Luc) を発現する pDNA を用いた。ポリカチオンとして、膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8)、アルギニンが豊富なポリペプチドである硫酸プロタミン (前述) およびポリエチレンイミン (PEI: 直鎖および分岐タイプ) を用いたが、PEI のみ良好なトランスフェクション活性を示すことを見出した。そこで、pDNA と PEI の混合比を検討した。pDNA と PEI を 1:0、1:0.1、1:1、1:5 の 4 種類の比率で混合・複合体を調製し、ナノ粒子を作製した。ナノ粒子の粒径は、pDNA:PEI = 1:0 および 1:0.1 の場合が、約 75 nm、pDNA:PEI = 1:1 および 1:5 の場合が、約 35 nm であった。それぞれの粒径のナノ粒子の粒子内部構造を小角 X 線散乱および TEM で測定した結果、35 nm の粒子はリポソーム様の中空構造であったが、75 nm の粒子は脂質多重膜構造を形成していることが分か

った。ナノ粒子を HeLa 細胞にトランスフェクションした結果、pDNA:PEI の比率が 1:1 の粒子が最も GFP の発現効率が高くなることが分かった(約 40%)。一方で、市販のトランスフェクション試薬として最も広く使用されている Lipofectamine 3000 (Lf3k) の場合は、GFP の発現効率は 10% 程度であった。また、pDNA と PEI の複合体(混合比率 1:1)では、GFP の発現はほぼ確認されなかった。これらの結果から、長鎖 pDNA のトランスフェクションにおいては、pDNA をポリカチオンと複合体化するだけでは不十分であり、複合体をナノ粒子に搭載することで、トランスフェクション効率が劇的に改善することが明らかになった。

(2) 詳細

テーマ A 「長鎖 DNA 搭載エクソソーム様ナノ粒子の作製と性能評価」

長鎖 DNA を搭載したエクソソーム様ナノ粒子を作製するための基盤技術の確立に取り組んだ。まず、モデル系を構築するために、これまでに独自に開発したマイクロ流体デバイス (iLiNP) を用いて、アニオン性粒子:DSPC(中性)/DOPS(アニオン性)/コレステロール(モル比:45/10/45) および中性粒子:DSPC/コレステロール(モル比:50/50) への siRNA の搭載と粒径制御を試みた。その結果、iLiNP を用いることで、粒径の精密制御と核酸の効率的な搭載が可能であることを確認した。そこで、細胞由来のエクソソームの脂質組成をもとにして、エクソソームの人工的な再構成を試み、さらにエクソソーム特異的な膜タンパク質の粒子表面への搭載に取り組んだ。エクソソームを構成する特徴的な脂質の 1 つとして、アニオン性脂質のホスファチジルセリン(PS)がある。そこで、人工エクソソームを、①PS を含有したナノ粒子で、②内部に核酸を搭載し、③粒子表面にはエクソソームに存在する膜タンパク質を提示したナノ粒子と定義して、エクソソームの再構成技術の開発に取り組んだ。その結果、流量条件および粒子作製条件を最適化することで、粒径が制御された siRNA 搭載 PS 含有ナノ粒子の作製に成功した。

次に、人工エクソソームのトランスフェクション性能を評価するために、HeLa-dLuc 細胞を用いて、エクソソーム様ナノ粒子の細胞毒性および Luc ノックダウン活性を評価した。エクソソーム様ナノ粒子は、高濃度の粒子を添加した条件でも細胞毒性を示さなかった(図 1)。一方で、20 nM siRNA を添加した条件では、Luc の発現を約 50% と抑制できることがわかった(図 2)。これらの結果から、作製した人工エクソソームによって、動物細胞への核酸導入が可能であることを確認した。また、siRNA の系と同様の手法で 3~15 kbp の pDNA を人工

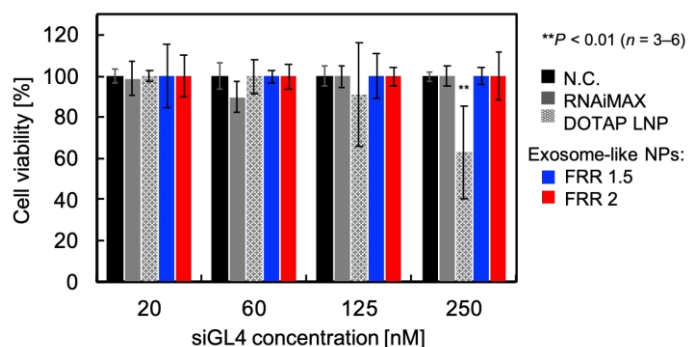


図 1 人工エクソソームの細胞毒性

た(図 2)。これらの結果から、作製した人工エクソソームによって、動物細胞への核酸導入が可能であることを確認した。また、siRNA の系と同様の手法で 3~15 kbp の pDNA を人工

エクソソームに搭載することができた。pDNA を搭載した人工エクソソームの粒径は、約 150 nm 程度であり、pDNA の搭載率は 3kb p が約 40% であった。一方で、15kbp の pDNA においては、搭載率が 10%程度であり、トランスフェクション効率は数%程度であった。そこで、テーマ B においては、長鎖 DNA を搭載した人工エクソソームおよび

脂質ナノ粒子の導入過程を解明し、粒子の高機能化に取り組んだ。

また、これまでに開発した iLiNP デバイスの発展型デバイス(脂質組成スクリーニングデバイス)の開発にも取り組んだ。人工エクソソームや脂質ナノ粒子を構成する脂質成分の組成は、粒径などの物理的特性だけではなく、トランスフェクション効率にも影響を与える。そこで、脂質ナノ粒子の組成を迅速にスクリーニング可能なマイクロ流体デバイスを開発した(ACS Appl. Mater. Eng., 2023)。開発したデバイスは、原料溶液の流量を制御するだけで脂質組成を任意に変更可能であり、従来のバッチ法よりも迅速な脂質組成スクリーニングが可能となった。開発したデバイスは、テーマ B において粒子作製に利用した。

本研究で確立したナノ粒子による長鎖 DNA のトランスフェクションにおいて、将来的にナノ粒子の大量生産が必要となる。そこで、ナノ粒子の大量生産のために、耐圧性が高いガラス製デバイスを開発し、これまでの生産量(0.5 mL/min)の(50 mL/min)の 100 倍の粒子生産を達成した(Appl. Mater. Today, 2023)。

テーマ B 「エクソソーム・脂質ナノ粒子による細胞への長鎖 DNA 導入過程の解明」

カチオン性のアミノ酸やポリマーなど、数種類のポリカチオンを用いて、pDNA との複合体化およびナノ粒子を調製した。また、pDNA のサイズがトランスフェクションに与える影響を明らかにするために、3、6、10、13、15 kbp の GFP あるいはルシフェラーゼ(Luc)を発現する pDNA を用いた。pDNA とポリカチオンの複合体の調製は、マイクロチューブ内で行い、作製した複合体と脂質/エタノール溶液をマイクロ流体デバイスに導入することで、ナノ粒子を調製した。作製したナノ粒子の粒径を動的光散乱法で測定した結果は、粒径は約 30~80 nm であった。様々なポリカチオンを評価した結果、長鎖 pDNA(15 kbp)においては、PEI を複合材料に用いた場合のみ、トランスフェクション効率が向上することが分かった。そこで、pDNA と PEI の混合比を検討した(図 3)。pDNA と PEI を 1:0、1:0.1、1:1、1:5 の 4 種類の比率で混合・複合体を調製し、ナノ粒子を作製した。ナノ粒子の粒径は、pDNA:PEI = 1:0 および 1:0.1 の場合が、約 75 nm、pDNA:PEI = 1:1 および 1:5 の場合が、約 35 nm であった。また、それぞれのナノ粒子の表面電位は、pDNA:PEI = 1:0 および 1:0.1 の場合

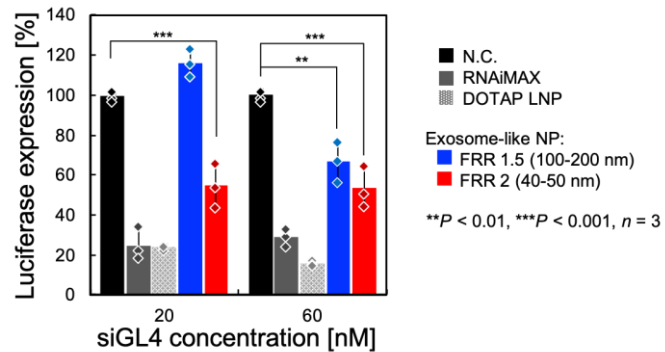


図 2 人工エクソソームによるルシフェラーゼのノックダウン活性

は、ほぼ 0 mV であり、pDNA:PEI = 1:1 および 1:5 の場合は、約 10 mV であった。それぞれの粒径のナノ粒子の粒子内部構造を小角 X 線散乱および TEM で測定した結果、35 nm の粒子はリポソーム様の中空構造であったが、75 nm の粒子は脂質多重膜構造を形成していることが分かった。ナノ粒子を HeLa 細胞にトランスフェクションした結果、pDNA:PEI の比率が 1:1 の粒子が最も GFP の発現効率が高く、約 40% のトランスフェクション効率を達成した。一方で、市販のトランスフェクション試薬として最も広く使用されている Lipofectamine 3000 (Lf3k) の場合は、GFP の発現効率は 10% 程度であった。また、pDNA と PEI の複合体(混合比率 1:1)では、GFP の発現はほぼ確認されなかった。これらの結果から、長鎖 pDNA のトランスフェクションにおいては、pDNA をポリカチオンと複合体化するだけでは不十分であり、複合体をナノ粒子に搭載することで、トランスフェクション効率が劇的に改善することが明らかになった(特願 2022-158025)。ナノ粒子の細胞毒性は、Lf3k と同程度であり、高いトランスフェクション効率と低細胞毒性の両立を達成した。PEI:pDNA の比率が 1:1 の条件で調製した複合体を用いて作製したナノ粒子は、粒径が約 35 nm と小さく、また表面電荷が正電荷のため、他の粒子と比較して細胞に取り込まれやすいと考えられる。また、PEI の比率が高すぎる場合は、エンドソーム脱出後の細胞質あるいは核内で、pDNA との複合体構造が解消されていない可能性が考えられる。さらに、搭載する pDNA のサイズと作製したナノ粒子のトランスフェクション性能の関係の解明に取り組んだ。その結果、サイズが小さな pDNA の場合は、Lf3k など pDNA とナノ粒子を複合体化するだけで、一定のトランスフェクション効率を達成できるが、サイズの大きな pDNA の場合は、本研究で見出した PEI との複合体後にナノ粒子に搭載することがトランスフェクション効率の向上において重要であることが分かった。

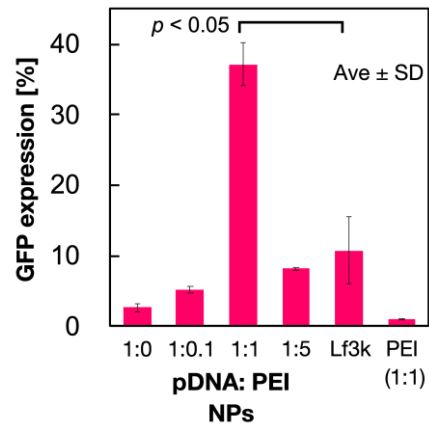


図3 (上) 15 kbp の pDNA (GFP 発現) 搭載ナノ粒子のトランスフェクション性能評価

3. 今後の展開

本研究では、人工エクソソーム作製技術を確立し、ナノ粒子によって市販試薬の約 4 倍の動物細胞への長鎖 DNA のトランスフェクションを達成した。今後の展開としては、人工エクソソームの創薬への応用、植物細胞への長鎖核酸導入への応用、細胞への染色体導入への応用を考えている。例えば、ヒトのミトコンドリアゲノムは、約 17 kbp であり、本研究で使用していた長鎖 DNA のほぼ同程度のサイズである。そのため、本研究で見出した長鎖 DNA の送達に適した粒子物性および内部構造の粒子を用いることで、ミトコンドリアを対象とした治療が期待される。また、本研究の基盤技術である「マイクロ流体デバイスを用いた脂質ナノ粒子製造技術」については、すでに社会実装を実現した(北大発ベンチャーから販売)。現在、信越化学工業株式会社と GMP 機開発を進めており、製薬企業を中心に連携を進めている。

4. 自己評価

本領域で定義されている「10 kbp 以上の長鎖 DNA」をナノ粒子によって、市販のトランスフェクション試薬よりも、約 4 倍の効率でトランスフェクションすることに成功した。そのため、研究目標は達成できたと考えられる。また、社会実装に不可欠な特許についても、2022 年 9 月に出願しており、学術面だけではなく、産業面においても目標を達成できたと考えられる。今後、本領域で研究が進んでいる長鎖 DNA の合成技術が発展すれば、将来的にはゲノムスケールの DNA を細胞に導入できる技術として展開することが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:6件

1. Yuka Matsuura-Sawada, Shuya Uno, Masatoshi Maeki*, Koichi Wada, and Manabu Tokeshi*, Microfluidic Platform Enabling Efficient On-Device Preparation of Lipid Nanoparticles for Formulation Screening, ACS Appl. Eng. Mater., accepted. (責任著者)

脂質ナノ粒子を構成する脂質組成を迅速にスクリーニングするためのマイクロ流体デバイスを開発した。開発したマイクロ流体デバイスでは、原料溶液の流量によって、オンラインで脂質組成を制御することが可能であった。

2. N. Kimura, M. Maeki* (equal contribution to the 1st author), A. Ishida, H. Tani, M. Tokeshi*, One-Step Production Using a Microfluidic Device of Highly Biocompatible Size-Controlled Noncationic Exosome-like Nanoparticles for RNA Delivery, ACS Appl. Bio Mater., 2021, 4, 1783-1793. (筆頭著者、責任著者)

マイクロ流体デバイスを用いたエクソソーム様ナノ粒子の作製法について報告した。作製したエクソソーム様ナノ粒子は、細胞毒性が低く、細胞へのトランスフェクションが可能であった。また、トランスフェクション性能は、市販のトランスフェクション試薬とほぼ同程度であることが分かった。

3. N. Kimura, M. Maeki* (equal contribution to the 1st author), K. Sasaki, Y. Sato, A. Ishida, H. Tani, H. Harashima, M. Tokeshi*, Three-dimensional, symmetrically assembled microfluidic device for lipid nanoparticle production, RSC Adv, 2021, 11, 2021, 1430-1439. (筆頭著者、責任著者)

これまでに開発したマイクロ流体デバイスよりも、高い粒径制御性能を示すことができる流路構造を開発した。開発した新型デバイスは、粒径 20~100 nm の範囲で脂質ナノ粒子の粒径のばらつきを小さくすることができた。さらに、開発したデバイスは、核酸搭載脂質ナノ粒子の作製にも応用できることを確認した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:4件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	真栄城正寿、渡慶次学、宇野秀哉、原島秀吉、佐藤悠介
	発 明 の 名 称	核酸複合体組成物、遺伝子導入用脂質粒子及びそれを用いた遺伝子導入方法

	出願人	北海道大学
	出願日	2022/9/30
	出願番号	特願 2022-158025
	概要	長鎖 DNA を細胞に効率良く導入することが可能なナノ粒子に関する出願。
2	発明者	真栄城正寿, 渡慶次学, 丹羽彩由花, 米田明弘
	発明の名称	脂質粒子含有液及びその製造方法
	出願人	北海道大学
	出願日	2022/2/22
	出願番号	特願 2022-025530
	概要	マイクロ流体デバイスを用いた人工エクソソーム作製に関する出願。
3	発明者	真栄城正寿, 渡慶次学, 岡田悠斗, 村野健作
	発明の名称	脂質粒子含有液及びその製造方法
	出願人	北海道大学
	出願日	2022/2/22
	出願番号	特願 2022-025776
	概要	マイクロ流体デバイスを用いたウイルス様ナノ粒子に関する出願。
4	発明者	真栄城正寿, 渡慶次学
	発明の名称	流路構造体およびこれを用いた脂質粒子ないしミセル形成方法
	出願人	北海道大学
	出願日	2022/2/8
	出願番号	特願 2022-017619
	概要	粒径 100~200 nm の脂質ナノ粒子を効率良く作製可能なマイクロ流体デバイスに関する出願。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 日本化学会北海道支部奨励賞、2020年
2. 令和4年度 北海道科学技術奨励賞
3. マイクロ流体デバイスを用いた脂質ナノ粒子の連続製造技術の開発と GMP 機開発への取り組み、真栄城正寿、第 27 回創剤フォーラム若手研究会、2022 年 9 月 15 日(招待講演)
4. マイクロ流体デバイスを用いた人工エクソソームの開発と診断・創薬への応用、真栄城正寿、SAIRAS DAYS、2022 年 9 月 14 日(依頼講演)
5. 核酸搭載脂質ナノ粒子の大量生産用マイクロ流体デバイスの開発～mRNA ワクチンの製造や個別化ナノ医療の実現に期待～(北海道大学・信越化学工業株式会社 共同プレスリリース)