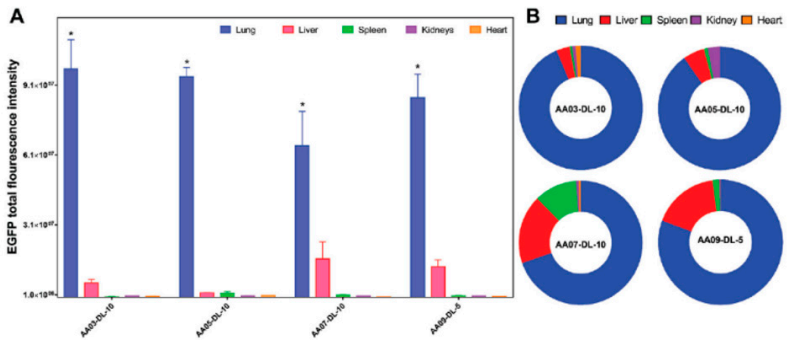
89　内因性リガンドに基づく能動的組織送達法の創製	原島　秀吉

【目的】本研究では、内因性リガンドを用いた組織選択的薬物送達システムという、新しい戦略に基づいて、従来の選択性・機能性を遥かに凌駕する薬物送達システムを創製することを最終目的としている。ウイルスは自然界で最適化された天然型遺伝子送達システムであり、進化の過程を経て超高機能を獲得し、種々の組織移行性と細胞内動態制御能を獲得した。我々は、生体内交通を支配している未知の内因性リガンドを、ナノ構造体の網羅的解析により探索し、従来の人工的な標的化リガンドから天然型のリガンドへと進化させる。そのためには、膨大な数の表面特性・内部構造を有する脂質ナノ粒子（LNP）の生成が必要となる。我々はすでに、工学研究院の佐藤教授等と連携して、種々の物理化学的多様性を有するポリエステルポリマーを作製し、LNP の表面特性を網羅的に解析することが可能となっている。本研究では、ポリエステルポリマーライブラリーを構築し、種々の表面特性を有する LNP 群の中から肺選択性の高い LNP を、マウス個体を用いて網羅的に探索した。

【方法】1. ポリエステルポリマーライブラリーの生成：N 基を含むアルコール性開始剤（AA01～AA11）と e-caprolactone あるいは e-decalactone を開環重合反応によってポリエステルポリマーライブラリーを合成した。2. LNP の構築：各ポリエステルポリマーと DMG-PEG を用いて、mRNA 搭載 LNP を調製した。3. mRNA 発現による *in vivo* スクリーニング：EGFP の mRNA を LNP に搭載し、肺、肝臓、心臓、腎臓、脾臓の遺伝子発現活性を測定した。

【結果】1. ポリエステルポリマーの合成：有機触媒開環重合反応により、アミノアルコールが AA01～AA11 の 11 個、ポリエステルポリマーの重合度が 3、5、10 kDa の 3 種類、合計 33 個（AA01-DL-3/5/10、AA02-DL-3/5/10、AA03-DL-3/5/10、AA04-DL-3/5/10、AA05-DL-3/5/10、AA06-DL-3/5/10、AA07-DL-3/5/10、AA08-DL-3/5/10、AA09-DL-3/5/10、AA10-DL-3/5/10、AA11-DL-3/5/10）のポリエステルポリマーライブラリーを合成した。2. ポリエステルポリマーライブラリーによる脂質ナノ粒子の調製：ポリエステルポリマーと DMG-PEG および mRNA を用いて LNP を調製した。ポリエステルポリマーと DMG-PEG の比率はモル比で 9：1 を用いた。LNP の平均粒子径、PDI（多分散度指数）、ゼータ電位を測定したところ、平均粒子径は 200～300 nm、PDI は 0.19～0.35、ゼータ電位は −29.0～−10.5 mV であった。3. ポリエステルポリマーライブラリーに基づく LNP 群の遺伝子発現解析：*in vivo* のスクリーニングは、mRNA のマウスへの投与量を 0.25 mg/kg とし、LNP 溶液を尾静脈より静脈内投与し、8 時間後の EGFP の蛍光共同を測定した。ε-DL を用いた LNP の中でも、AA03-DL-10、AA05-DL-10、AA07-DL10 そして AA09-DL5 の LNP は、その遺伝子発現活性において極めて高い肺特異性を示した（図 A、B）。これらの高い肺特異性は、内因性因子が介在している可能性を強く示唆した。そこで、肺における遺伝子発現活性とリポポリマーの構造との関係をさらに詳細に解析するために、第二世代のライブラリー構築を行い、解析を進め肺選択性の高いポリマー群を見出すことに成功した。

高い肺移行性を示した LNP の遺伝子発現



89. 内因性リガンドに基づく能動的組織送達法の創製

原島　秀吉

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学部門 薬剤分子設計学研究室

Key words：ナノ医療，内因性リガンド，能動的送達法，核酸医薬，肺標的化

緒　言

2018 年の ONPATTRO™ の承認は、世界初の siRNA 医薬品となり、核酸医薬の時代が始まった［1, 2］。siRNA を標的組織である肝臓へ高効率で送達したのは、MC3 という pH-応答性のカチオニック脂質であり、これが break-through 技術として大きく貢献したことは良く知られている。MC3 で構築した脂質ナノ粒子（LNP）は血液中に投与されると ApoE という血清蛋白質がナノ粒子表面に結合して肝実質細胞の表面にある LDL-受容体と結合して効率的に肝臓に取り込まれる。従って、この LNP にはもともと標的リガンドは結合されていなかったのであるが、血液循環に入ってから ApoE という内因性のリガンドが結合し、レセプター依存的にエンドサイトーシスにより標的細胞に取り込まれることが知られている［3］。しかしながら、このようなケースは肝臓に限られており、肝臓以外の組織への選択的な送達方法は未だ確立されていない。本研究では、内因性リガンドを用いた組織選択的薬物送達システムという、新しい戦略に基づいて、従来の選択性・機能性を遥かに凌駕する薬物送達システムを創製することを最終目的としている。ウイルスは自然界で最適化された天然型遺伝子送達システムであり、進化の過程を経て超高機能を獲得し、種々の組織移行性と細胞内動態制御能を獲得した。我々は、生体内交通を支配している未知の内因性リガンドを、ナノ構造体の網羅的解析により探索し、従来の人工的な標的化リガンドから天然型のリガンドへと進化させる新たな戦略に着手した。そのためには、膨大な数の表面特性・内部構造を有する LNP の生成が必要となり、我々はすでに、工学研究院の佐藤教授等と連携して、種々の物理化学的多様性を有する脂質誘導体を作製し、膨大な数の表面特性を有する LNP ライブラリーを構築することが可能となってきた。内因性リガンドと LNP との相互作用のメカニズムの詳細は、ONPATTRO™ の場合においても詳細は未解明である。本研究では、膨大な数の表面特性を有する LNP のライブラリーを構築し、その肺組織移行性についてマウス個体を用いて網羅的な探索を行った。

本研究は、内因性リガンドに基づく新たな組織選択的送達システムの創製を目指すと同時に、生体内交通の新しい機構の発見にも繋がることが期待できる。

方　法

1.　ポリエステルポリマーライブラリーの生成

LNP と内因性リガンドとの親和性が如何にして決まるかは未解明であり、主要組織へ誘導する内因性リガンドが明らかとなることにより初めてそのメカニズムが解明される。従って、ライブラリーの多様性と LNP としての機能は結果に大きな影響を及ぼす。本研究におけるポリエステルポリマーライブラリーの合成戦略は、図 1 に示すように、N 基を含むアルコール性開始剤（AA01～AA11）と ε-caprolactone あるいは ε-decalactone ポリマーを開環重合反応によってポリエステルポリマーを合成した（図 1）。

2.　LNP の構築

ライブラリーとして合成したポリエステルポリマーと DMG-PEG を用いて、mRNA 搭載 LNP を調製した。

3.　mRNA 発現による *in vivo* スクリーニング

EGFP の mRNA を LNP に搭載し、肺、肝臓、心臓、腎臓、脾臓の遺伝子発現活性を測定した。

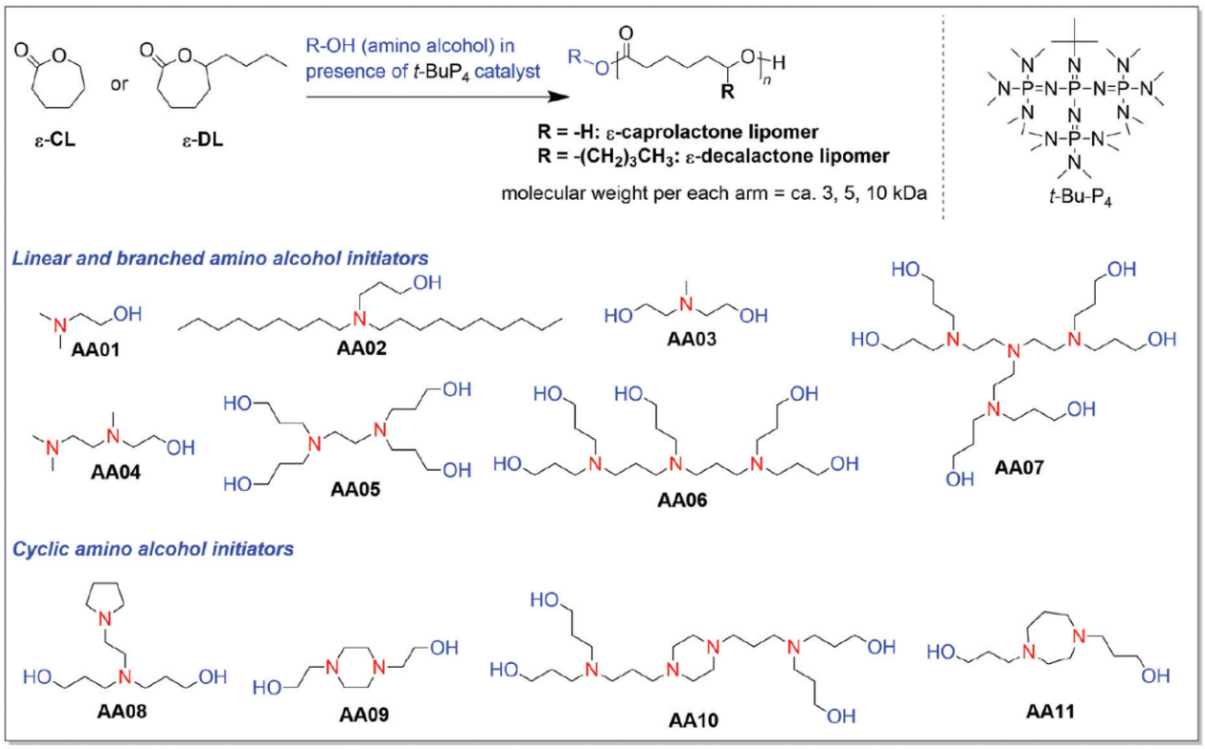


図 1. ポリエステルポリマーライブラリーの合成戦略

モノマーは ε -caprolactone あるいは ε -decalactone を用いた。開始剤のアミノアルコールは AA01 から AA11 までの誘導体を合成した。有機触媒開環重合反応によってポリエステルポリマーを合成した。重合度は、3, 5, 10 kDa。

4. 第二世代のポリエステルポリマーライブラリーの合成

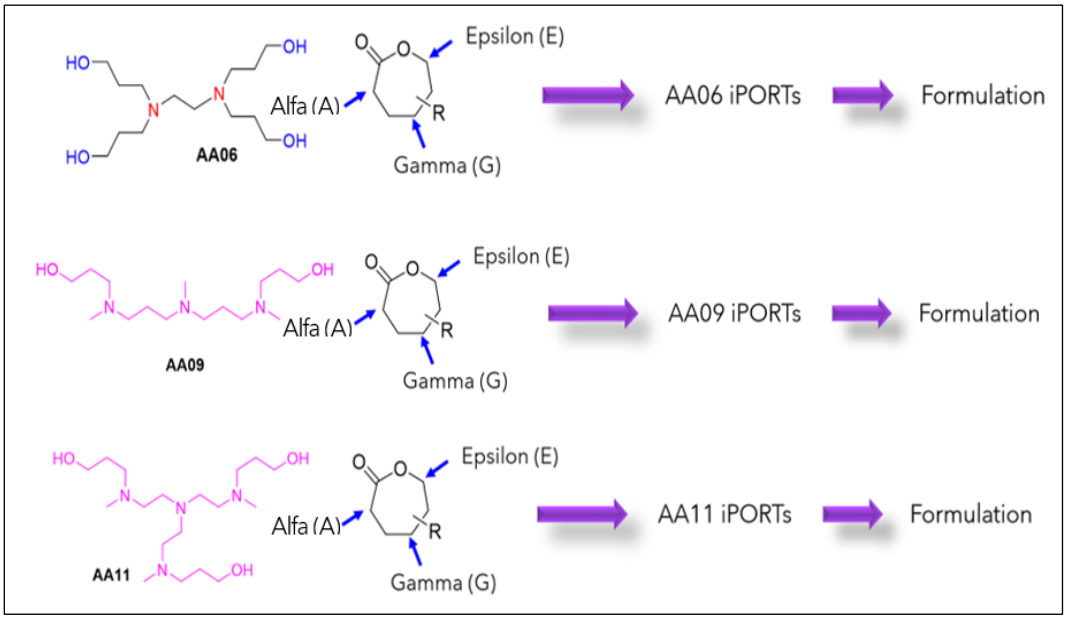


図 2. 第二世代のポリエステルポリマーの合成

モノマーの側鎖の位置をα (A)、γ (G)、ε (E) と変えた誘導体を作製し、開始剤のアミノアルコールは AA02 から AA18 まで合成した。iPORTs は ionizable Polyester RNA-Transporters の略。

5. LNP の調製

第二世代のポリエステルポリマーと脂質を PL : CHO : DOPE : DMG-PEG（モル比 50 : 25 : 23.5 : 1.5）の割合で LNP を調製した。10 μg の mRNA（ルシフェラーゼ遺伝子）に対して総脂質量を 500 nmol とした。粒子径は 100～200 nm、多分散度指数は 0.15 以下で均一性は高かった。

6. *In vivo* 遺伝子発現解析

LNP をマウスに投与後、5 時間後に *in vivo* イメージングシステムによりルシフェラーゼ活性を測定した。

結果と考察

1. ポリエステルポリマーの合成

有機触媒開環重合反応により、アミノアルコールが AA01~AA11 の 11 個、ポリマーの重合度が 3、5、10 kDa の 3 種類、合計 33 個（AA01-DL-3/5/10、AA02-DL-3/5/10、AA03-DL-3/5/10、AA04-DL-3/5/10、AA05-DL-3/5/10、AA06-DL-3/5/10、AA07-DL-3/5/10、AA08-DL-3/5/10、AA09-DL-3/5/10、AA10-DL-3/5/10、AA11-DL-3/5/10）のポリエステルポリマーを合成した。

2. ポリエステルポリマーライブラリーによる脂質ナノ粒子の調製

ポリエステルポリマーと DMG-PEG および mRNA を用いて脂質ナノ粒子（LNP）を調製した。ポリエステルポリマーと DMG-PEG の比率はモル比で 9 : 1 を用いた。LNP の平均粒子径、PDI（多分散度指数）、ゼータ電位を測定したところ、平均粒子径は 200～300 nm、PDI は 0.19～0.35、ゼータ電位は−29.0～−10.5 mV であった。なお、ε-caprolactone を用いた LNP は粒子径が大きく（>800 nm）また分散性も悪く（PDI>0.6）、不安定なため、以下の実験では用いなかった。

3. ポリエステルポリマーライブラリーによる LNP の遺伝子発現の組織分布

in vivo のスクリーニングは、mRNA のマウスへの投与量を 0.25 mg/kg とし、LNP 溶液を尾静脈より静脈内投与し、8 時間後の EGFP の蛍光強度を測定した。ε-DL を用いた LNP の中でも、AA03-DL-10、AA05-DL-10、AA07-DL10 そして AA09-DL5 の LNP は、その遺伝子発現活性において極めて高い肺特異性を示した（図 3A、B）。これらの高い肺特異性は、内因性因子が介在している可能性を強く示唆した。そこで、肺における遺伝子発現活性とポリエステルポリマーの構造との関係をさらに詳細に解析するために、第二世代のライブラリー構築を行い、解析を進めた。

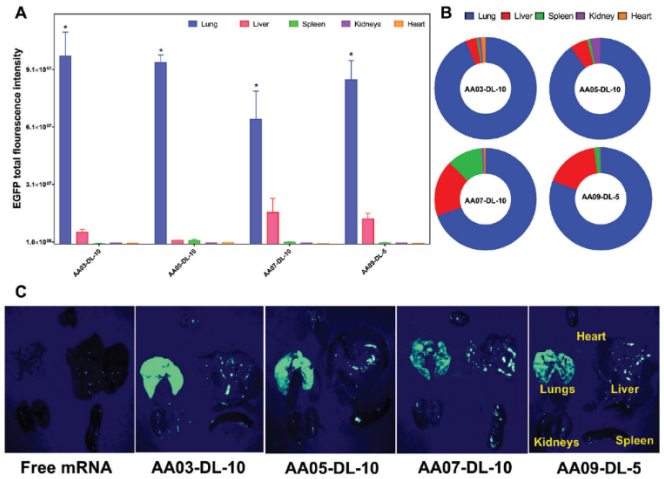


図 3. 高い肺移行性を示した LNP の遺伝子発現

A) 肺での発現が高い上位 4 種の LNP（AA03-DL-10、AA05-DL-10、AA07-DL-10、AA09-DL-5）の各組織における EGFP 発現レベル。

B) 五つの組織における EGFP の発現レベルを円グラフで現したもの。

C) *in vivo* イメージングの結果。

肺での活性は、AA06/AA09/AA11 で顕著であり、AA06＜AA09＜AA11 の順に肺選択性は高くなる傾向が見られ、アミノ基の数が遺伝子発現活性に影響している可能性が示唆された。モノマーの側鎖も肺での活性に大きな影響を及ぼすことがわかり、A＞E＞G の順に肺での活性が高かった。一方で、AA02 では脾臓の活性が高く、肺では活性は見られなかった。

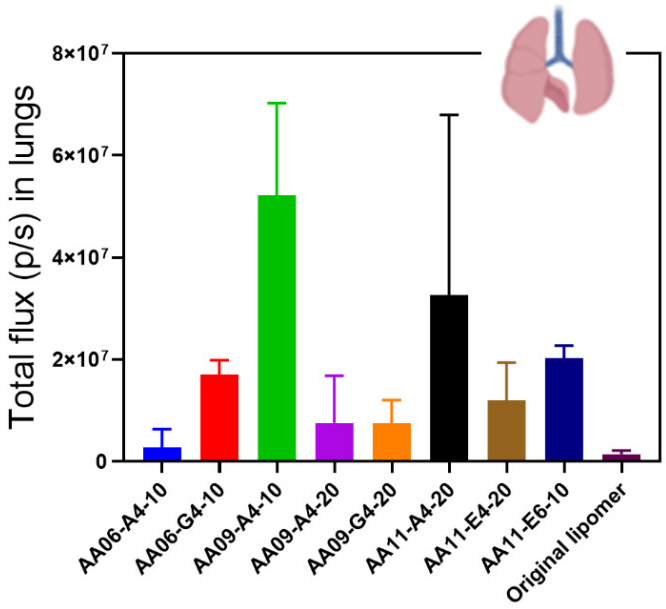


図 4. 第二世代のポリエステルポリマーの肺における遺伝子発現活性
肺での遺伝子発現活性は、AA09-A4-10、AA11-A4-20、AA11-E6-10 がトップ 3 で、開始剤の効果とともに、モノマーの側鎖もα位（A）またはε位（E）がγ位（G）よりも有効であった。

今回の検討で、ポリエステルポリマーライブラリーは mRNA の組織選択的な遺伝子発現において、戦略上の優位性を示すと同時に、優れた DDS を生み出すことを実証することができた。本研究の前半部分は、北海道大学より特許出願を行い［4］、2021 年の Materials Horizons に掲載された［5］。現在、欧米の企業と共同研究が始まっている。

共同研究者・謝辞

本研究は、北海道大学大学院工学研究院の佐藤敏文教授、磯野拓也准教授と大学院薬学研究院の佐藤悠介助教、Mahmoud Mansour Abd Elwakil 博士との共同研究として行った研究成果であり、ここに心より感謝申し上げます。また、本共同研究をご支援いただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に心より深謝申し上げます。

文献と特許

1） A. Akinc, M.A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M.J. Hope, T.D. Madden, B.L. Mui, S.C. Semple, Y.K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J.A. Kulkarni, R. van der Meel, P.R. Cullis, The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs, Nat Nanotechnol 14:1084-1087 (2019). doi: 10.1038/s41565-019-0591-y.PMID: 31802031

2） Younis MA, Tawfeek HM, Abdellatif AAH, Abdel-Aleem JA, Harashima H. Clinical translation of nanomedicines: Challenges, opportunities, and keys. Adv Drug Deliv Rev. 181:114083 (2021). doi: 10.1016/j.addr.2021.114083. PMID: 34929251

3) A. Akinc, W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, K.G. Rajeev, W.L. Cantley, J.R. Dorkin, J.S. Butler, L. Qin, T. Racie, A. Sprague, E. Fava, A. Zeigerer, M.J. Hope, M. Zerial, D.W. Sah, K. Fitzgerald, M.A. Tracy, M. Manoharan, V. Koteliansky, A. Fougerolles, M.A. Maier, Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms, Mol Ther 18: 1357-1364 (2010). doi: 10.1038/mt.2010.85. PMID: 20461061

4) 特許出願：名称：アミノポリエステル及び脂質ナノ粒子　出願番号：特願 2021-007461　発明者：佐藤敏文、原島秀吉、磯野拓也、佐藤悠介、マハモド　マンソル　アブドワキル、コウ　テンラク　出願日：2021 年 1 月 20 日　出願人：北海道大学

5) Elwakil MM A, Gao T, Isono T, Sato Y, Elewa Y, Satoh T and Harashima H. Engineered ε-decalactone lipomers by-pass the liver to selectively in vivo deliver mRNA to the lungs without targeting ligands Materials Horizons 8(8):2251-2259 (2021). doi: 10.1039/d1mh00185j. PMID: 34846429