

## 生体に融和して抑制性免疫を制御する人工膜ミミック型 RNA 創剤

研究代表者：秋田 英万 東北大学大学院薬学研究科 教授

共同研究者：田中 浩揮 東北大学大学院薬学研究科 准教授



### 1. 研究の背景と達成目標

RNA ワクチンが承認されたことから、今後益々、RNA 創薬が大きく加速すると考えられる。本研究では、脂質が有する免疫の活性化を極限まで抑えながら、生体炎症を制御する RNA 創剤技術を創出する。免役の活性化を主目的とするワクチン用途と異なり、負の免疫反応を制御する RNA 創薬を実現する上では、ナノ粒子製剤あるいはそれを形成する材料が生体と融和し、免役を刺激しないことが重要である。我々はこれまで、mRNA を導入するための独自技術として、エンドソーム内の酸性 pH や細胞質の還元環境に応答して生体膜を突破し、自己崩壊することで『細胞質内へ核酸を送達』できる脂質様材料として、SS-Cleavable and pH-activated lipid-like material (ssPalm) を開発した (Tanaka et al. Adv. Funct Mater 2020)。本研究では、生体膜を模倣した粒子を創製すると共に、免役制御の場であるリンパシステムへ mRNA を送達することにより、生体炎症を制御する RNA 創薬技術を創出する。

本研究では、具体的な自己免疫疾患の治療効果を検証する目的として、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE) モデルを選定し、自己抗原をコードする mRNA を投与することで、病態スコアが改善することを目標として設定した。また、その他、リンパ組織あるいはそれを形成する細胞への核酸導入技術について開発した。

### 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

#### ① 人工膜ミミック型脂質ナノ粒子 (LNP) の開発と EAE モデルの治療効果検証

我々が独自に開発した免役低刺激性かつ細胞内超分解性を示す ssPalm 粒子を基盤技術とし、本粒子に対して天然の細胞外微粒子に多く含まれるフォスファチジルセリン (PS) を搭載した生体融和型 RNA 製剤を開発した。本脂質の融合は、以下の 3 つの観点から極めて高い合目性がある。

- マクロファージ等に対する抗炎症性を介した積極的な免役寛容の誘導
- 粒子への負電荷の付与によるリンパ節への移行性の向上 (皮下投与)
- 粒子への負電荷の付与による脾臓蓄積性の向上 (血中投与)

本粒子を静脈内投与した際には脾臓に mRNA を導入できることを見い出した。また、自己抗原 (ミエリノオリゴデンドロサイト糖タンパク質; MOG) をコードする mRNA を導入することで、EAE モデルの治療効果が認められた。先行技術として、mRNA ワクチン開発をすすめている BioNTech 社から同モデルの治療効果が示されているが、本先行技術における mRNA の投与量は 20  $\mu$ g mRNA/マウスであった。本実験においては、1  $\mu$ g mRNA/マウスであることからも、進歩性が認められる。

#### ② 脾臓への抗炎症薬デリバリーによる新規癌治療戦略の構築

生体内の免疫環境を総合的にエンジニアリングするために、低分子薬物を脾臓へ送達することで腫瘍の免疫環境が改善するという仮説を『Reprogramming of Immuno-reaction in Spleen and Extra-parenchyma in Tumor (RISET)』と名付け、そのコンセプトの証明を試みた。抗炎症薬であるデキサメタゾンのコレステロール誘導体を搭載したナノ粒子を調製し、本粒子表面への水溶性ポリマーの修飾量を変えながら動態を制御するとともに、抗腫瘍効果を検証した。その結果、抗炎症薬を脾臓に届けることにより。抗癌剤を使わなくても癌の退縮効果が認められた。これまで、ナノ粒子を用いた癌治療においては、抗癌剤を腫瘍

組織に直接届けるというコンセプトに基づき開発がすすめられてきた。今回の研究は、また、LNP が脾臓に集まりやすいという特長を生かし、免疫制御により癌治療をおこなうものであり、これまでの戦略とは一線を画する。

### ③ リンパ管を形成する内皮細胞を標的とした新規核酸導入システムの開発

リンパ管内皮細胞は、管を形成するだけでなく、それ自体が免疫を制御する機構を有することが報告されている。本研究では、本細胞に対して核酸を導入するための LNP を開発した。これまで、細胞への標的化においては、抗体などのリガンドを修飾する方法をもちいてきたが、今回我々は、これまでの LNP に対する水溶性ポリマーの密度を変えるだけで、生体内の機構を利用してリンパ内皮細胞へと核酸を送達できることを見いだした。シンプルな製剤で、特定の遺伝子をノックダウンできることから、リンパ管内皮細胞の新たな機能の解明に繋がると共に、新たな原理の創薬へと繋がるのではないかと期待している。

## 3. 研究成果

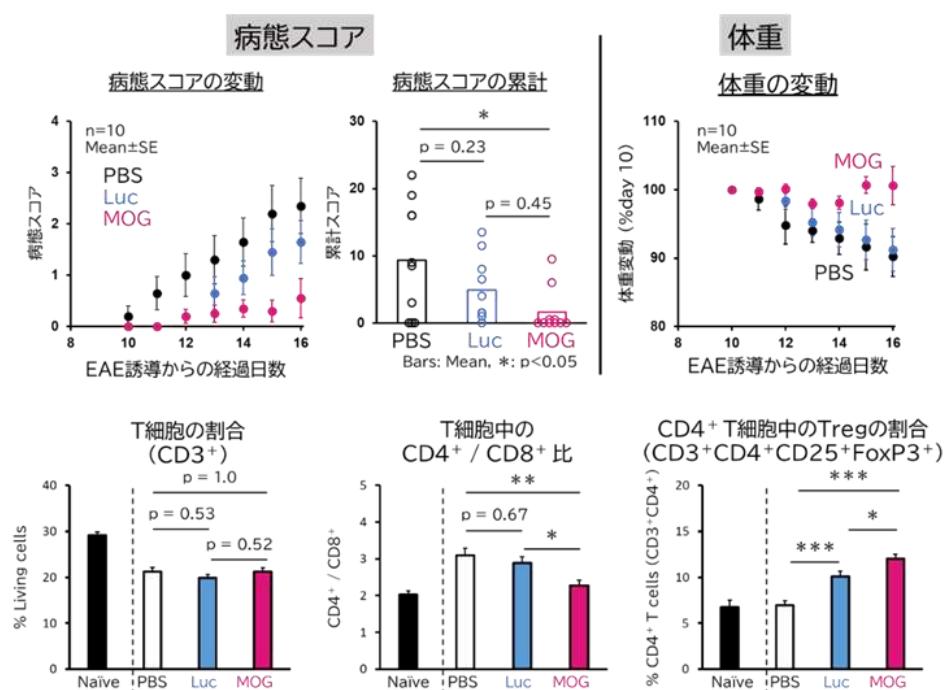
### ① 人工膜ミック型脂質ナノ粒子 (LNP) の開発と EAE モデルの治療効果検証

通常用いられるフォスファチジルセリン (PS) は、アルコールへの溶解性が極めて高く、マイクロ流体デバイスを用いた LNP の製造が困難であった。そこで、アルコール可溶性の高い PS のライブラリのなかから、高いマクロファージ標的化を維持した PS 構造を新規に同定した。さらに、細胞性免疫の活性化能の低いオレイン酸足場型の人工脂質を基盤とし、本アルコール可溶性 PS を搭載した LNP を開発した。本 LNP はアニオン性を示したことから、PS が LNP に安定的に組み込まれたと考えられる。また、Tim-4 を提示したビーズへの LNP の結合が、PS を搭載することで高まるところから、本 PS 搭載粒子のマクロファージへの取り込みにおいては、細胞外微粒子の取り込みに Tim-4 が関与することが明らかとなった。通常、LNP を静脈内投与した際には肝臓で特異的に発現するが、PS を搭載した LNP (PS-LNP) は、脾臓において mRNA が発現することを見いだした<sup>6)</sup>。

自己免疫疾患のモデルとして、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いて、PS-LNP により自己抗原 (MOG) に対しての免疫寛容を誘導可能であるかを評価した<sup>3)</sup>。その結果、MOG 発現 mRNA を搭載した PS-LNP を搭載した場合にのみ、多発性硬化症の治療効果が認められ、また、体重減少が抑制されることが認められた (図：

上段)。

また、これらの PS-LNP を投与マウスにおける T 細胞の応答について評価した (図：下段)。CD3 陽性 T 細胞の数自体に変化は認められなかつたが、CD8 陽性 T 細胞数に対する CD4 陽性 T 細胞の割合が減っていることから、Th1/Th2 バランスが変化し、Th1 優位となっていることが示唆された。また、本自己抗原に対する制御性 T 細胞の割合も増えていくことが示された。



## ② 脾臓への抗炎症薬デリバリーによる新規癌治療戦略の構築<sup>4)</sup>

血中においてナノ粒子に安定的に搭載するため、デキサメタゾンのコレステロール誘導体を合成し、本薬を搭載した LNP を調製した。本粒子をマウス大腸がん細胞 CD26 の皮下移植モデルマウスにパルス投与したところ、顕著な抗腫瘍効果が見られた。

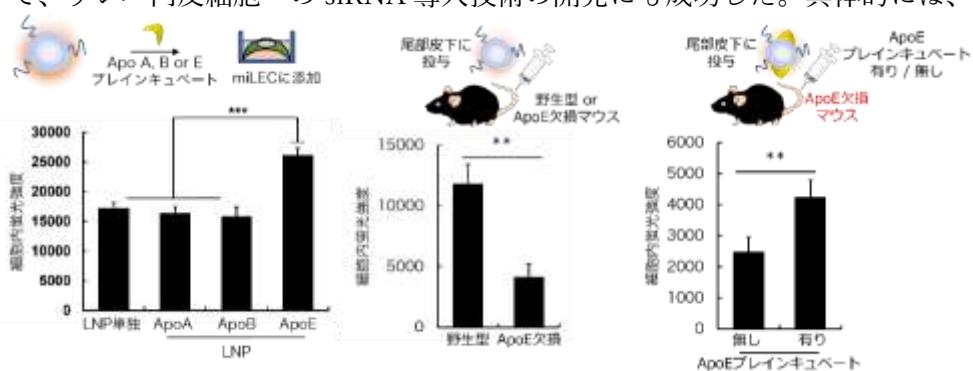
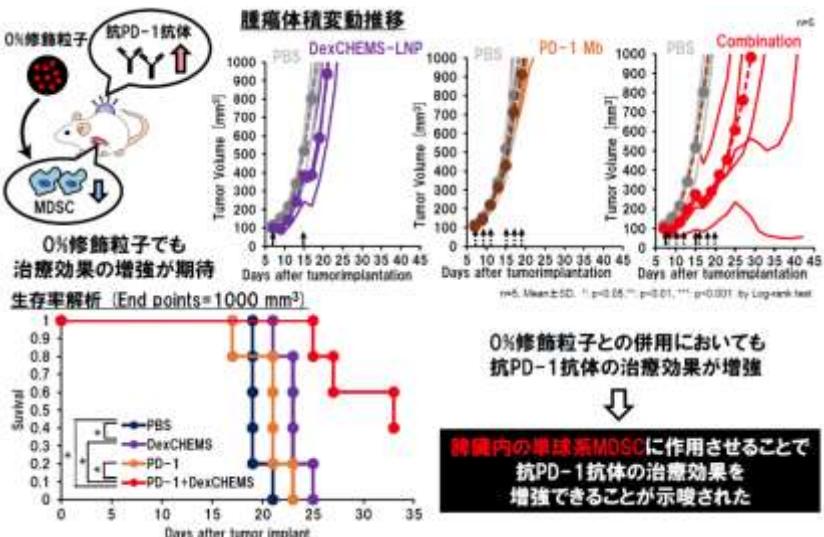
抗腫瘍効果が得られるメカニズムについて、DexCHEMS 搭載ナノ粒子を投与した後の細胞のポピュレーションを解析したところ、未成熟な免疫抑制性細胞群である Myeloid derived suppressor cells (MDSC) の減少が確認された。このことから、RISET 療法により脾臓において MDSC の誘導が妨げられることによってがん免疫の抑制が解除され、抗腫瘍効果が得られたものと推察される。さらに、MDSC は免疫チェックポイント阻害剤とは異なるメカニズムでがん免疫を活性化することが示唆されている。実際に両者を併用することにより、相乗的な抗腫瘍効果が得られた。

## ③ リンパ管を形成する内皮細胞を標的とした新規核酸導入システムの開発

脂質で構成されるナノ粒子は、血中投与されたのちにアポタンパク質 E (ApoE) が結合し、その後 ApoE とナノ粒子の複合体が肝細胞の低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) に結合し、肝細胞に非常に速やかに取り込まれることが報告されている。一方、リンパ系においてリンパ液中には ApoE タンパク質が 18.7 mg/L (血液の 38.4% の濃度) 程度含まれることに加え、LEC が LDLR を発現していることも報告されている。これらのことから、血中で起こる ApoE – LDLR を介した取り込み機構はリンパ系においてリンパ液の中でも起こり得るのではないかと仮説を立てた。種々の量の PEG 脂質を修飾した粒子を皮下投与し、LEC および陰性対照として血管内皮細胞に対する取り込みを評価した。その結果、脂肪酸の炭素数が 14 の PEG 脂質で修飾した粒子では、修飾量依存的な LEC での取り込みの増大が認められた。PEG 脂質修飾量は脂質全量に対して 6% 修飾した際が最適であり、それ以上の添加では取り込み量は増大しなかった。本最適化された LNP を用いて、リンパ内皮細胞への siRNA 導入技術の開発にも成功した。具体的には、LEC マーカーである VEGFR3 に対する siRNA を 0.1  $\mu$ g/mouse で投与すると、有意に VEGFR3 発現が抑制された<sup>5)</sup>。

## 4. 今後の展開

今回の研究では主に、LNP の脂質組成の改良による臓器・細胞標的化技術を磨いてきた。一方、より広範な疾患へ用途を広げるためには、より厳密な細胞標的化技術が必要であろう。in vivo で T 細胞を標的化する等のリガンド修飾 LNP の開発は世界的に大きな競争となっている。これらの技術を磨く供に、そのような煩雑な製剤を製造するための技術開発が必要となると考え、我々も研究を進めている。



## 5. 発表実績

### 【論文】

1. Tanaka H, Sato Y, Nakabayashi T, Tanaka A, Nishio K, Matsumoto C, Matsumaru A, Yamakawa T, Ishizaki K, Ueda K, Higashi K, Moribe K, Nakai Y, Tange K, Akita H\*. A post-encapsulation method for the preparation of mRNA-LNPs via the nucleic acid-bridged fusion of mRNA-free LNPs. *Nano Lett.* *in press* (2025)
2. Anindita J, Tanaka H, Yamakawa T, Sato Y, Matsumoto C, Ishizaki K, Oyama T, Suzuki S, Ueda K, Higashi K, Moribe K, Sasaki K, Ogura Y, Yonemochi E, Sakurai Y, Hatakeyama H and Akita H\*. The Effect of Cholesterol Content on the Adjuvant Activity of Nucleic-Acid-Free Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* 16(2): 181 (2024)
3. Anindita J, Tanaka H, Ohyama R, Hagiwara S, Shirane D, Taneichi S, Oyama T, Suzuki S, Ueda K, Higashi K, Moribe K, Sasaki K, Ogura Y, Yonemochi E, Nakai Y, Tange K, Sakurai Y and Akita H. Development of a Ready-to-Use-Type RNA Vaccine Carrier Based on an Intracellular Environment-Responsive Lipid-like Material with Immune-Activating Vitamin E Scaffolds. *Pharmaceutics* 15(2): 2702 (2023)
4. Oyama R, Ishigame H, Tanaka H, Tateshita N, Itazawa M, Imai R, Nishiumi N, Kishikawa JI, Kato T, Anindita J, Nishikawa Y, Maeki M, Tokeshi M, Tange K, Nakai Y, Sakurai Y, Okada T, Akita H\*. An Ionizable Lipid Material with a Vitamin E Scaffold as an mRNA Vaccine Platform for Efficient Cytotoxic T Cell Responses. *ACS Nano*. 17(19):18758-18774 (2023)
5. Gomi M, Nakayama Y, Sakurai Y, Oyama R, Iwasaki K, Doi M, Liu Y, Hori M, Watanabe H, Hashimoto K, Tanaka H, Tange K, Nakai Y, Akita H\*. Tolerogenic Lipid Nanoparticles for Delivering Self-Antigen mRNA for the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Pharmaceuticals*. 16(9):1270 (2023)
6. Doi M, Tanaka H, Ohoto T, Miura N, Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H\*. Reactivation of Anticancer Immunity by Resetting Interorgan Crosstalk in Immune-Suppressive Cells with a Nanoparticulated Anti-Inflammatory Drug. *Small*. 19: e2205131 (2023)
7. Sakurai Y, Yoshikawa K, Arai K, Kazaoka A, Aoki S, Ito K, Nakai Y, Tange K, Furihata T, Tanaka H, Akita H. siRNA delivery to lymphatic endothelial cells via ApoE-mediated uptake by lipid nanoparticles. *J Control Release* 353:125-133 (2023) 【Cover Art に選出】
8. Gomi M, Sakurai Y, Sato M, Tanaka H, Miyatake Y, Fujiwara K, Watanabe M, Shuto S, Nakai Y, Tange K, Hatakeyama H, Akita H\*. Delivering mRNA to Secondary Lymphoid Tissues by Phosphatidylserine-Loaded Lipid Nanoparticles. *Adv Healthc Mater.* 12(9): e2202528 (2022)

### 【学会発表】

1. 秋田 英万 核酸・mRNA 医薬品の DDS 技術としての LNP ～基礎から最近の動向まで～ サイエンス&テクノロジー株式会社 Zoom 配信セミナー 2024年12月19日 オンライン
2. 秋田 英万 核酸・RNA 創剤技術としての LNP の応用と将来展望 JBA 創薬モダリティ基盤研究会 2024年11月18日 オンライン
3. Hidetaka Akita. Development of intracellular environment-responsive lipid like material (ssPalm) for the in vivo immune regulation towards RNA-based therapeutics. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity. 9月15日 京都
4. 秋田 英万 L N P の分子デザインと次世代送達技術としての応用展開 第11回次世代モダリティセミナー ～新規 DDS としての LNP～ 2024年8月30日 オンライン など