HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肺標的脂質ナノ粒子「GALA-LNP」の新規核酸分子への応用展開［全文の要約］
Author(s)	萩野, 裕太
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15318号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89758
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Hagino_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏 名　萩 野 裕 太

学 位 論 文 題 名

肺標的脂質ナノ粒子「GALA-LNP」の新規核酸分子への応用展開

2018年以降、世界初のsiRNA封入脂質ナノ粒子（LNP）製剤「オンパットロ」を始めとし、従来の低分子や抗体に代わって「核酸」を用いた画期的な治療薬が相次いで上市されている。近年ではSARS-CoV-2に対するワクチンとしてmRNAをLNPに封入したmRNAワクチンが世界で初めて承認されたことは記憶に新しい。このように急速に実用化が進んでいる核酸医薬であるが、核酸には血中で容易に分解され、細胞膜を透過しないという課題がある。そのため、核酸を分解から守り、体内の特定の臓器、細胞に選択的に届けるDrug Delivery System(DDS)の開発は核酸医薬に必要不可欠である。

肺には年間200万人以上が亡くなる肺がんを始め、特発性肺線維症やCOPDなど多くのアンメットメディカルニーズが存在する。そして、これらの難治性肺疾患の進行には炎症や血栓症、血管新生、腫瘍免疫を介して肺の血管内皮細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。そのため、肺の血管内皮細胞に核酸を送達することで、これらの疾患に対して有効な治療法の開発が期待できる。

当研究室では、肺血管内皮と親和性が高い新規機能性素子としてGALAペプチドを見出し、これを脂質ナノ粒子（LNP）に修飾することで肺に集積するGALA-LNPを作製した。そして、核酸の一種であるsmall interfering RNA（siRNA）の送達に関して、高効率な肺送達システムの構築に成功している。

そこで本研究ではGALA-LNPをsiRNA以外の核酸分子であるプラスミドDNA（pDNA）、そしてメッセンジャーRNA（mRNA）に応用することを試みた。これらの核酸分子は、siRNAとは異なり発現系でゲノム編集技術への応用も可能である。pDNAは大腸菌を用いて安価に大量生産でき、保存安定性が高いという利点がある。一方でmRNAは、pDNAより安定性が低いものの少量で高い遺伝子発現が期待でき、pDNAで懸念されるゲノム配列への挿入が発生しないため安全性が高いとされ、現在ではmRNAワクチンを始めとして最も実用化が進んでいる核酸分子といっても過言ではない。一方で、siRNA、pDNA、mRNAはそれぞれ分子量、電荷、細胞内動態が大きく異なるので、それぞれの核酸分子に対して最適なパフォーマンスを示すようGALA-LNPの最適化を行うことが必要であった。

第一章では、新規pDNA封入GALA-LNPとしてDODAP-GALA-LNPの作製を行った。DODAPを含む脂質溶液とpDNA溶液をマイクロ流体デバイスで混合してDODAP-LNPを調製した後、DODAP-LNPにGALAペプチド後修飾することでDODAP-GALA-LNPを作製した。しかし、GALAペプチドの修飾時にGALAの高い疎水性により粒子が凝集してpDNAが漏出したため、調製したDODAP-GALA-LNPはpDNA封入率が53%と低くなってしまった。そこで、当研究室の水村らの先行研究を応用し、GALA修飾時にPEG monooleyl etherを加えることで粒子の凝集を防止し、pDNA封入率が改善できないかを検討した。その結果、pDNAの封入率を89%まで改善することに成功した。

次に、調製したDODAP-GALA-LNPの生体内分布と各臓器における遺伝子発現を検討した。その結果、DODAP-GALA-LNPは肝臓や脾臓と比較して肺に高い集積を示し、LNP投与後6時間後において肺で有意に高い遺伝子発現活性を示した。しかしながら、LNP投与後24時間後においてはDODAP-GALA-LNP投与マウスに死亡例が見られ、DODAP-GALA-LNPにおいて粒子に由来すると考えられる

毒性が認められた。

第二章では、DODAP-GALA-LNP を mRNA 送達に応用することを試みた。mRNA は pDNA よりも少ない投与量で高い遺伝子発現が可能であるので投与量を毒性が出ない範囲に抑えることができる。また、mRNA ワクチンを始めとしてヒトへの投与実績が豊富であり実用化の面からも有利である。

最初に、pDNA 封入 DODAP-GALA-LNP と同様の脂質組成で mRNA 封入 DODAP-GALA-LNP の作製を行った。その結果、pDNA の場合と同様に遺伝子発現は肺において有意に高く、また、pDNA と比較して 10 分の 1 以下の核酸投与量で pDNA 封入 LNP と同程度の遺伝子発現を示した。この時、LNP 投与後にマウスが死ぬ等顕著な毒性は認められなかった。

続いて、mRNA 封入 DODAP-GALA-LNP は pDNA 封入 LNP と比較して肺における遺伝子発現について脾臓に対する肺選択性の低下がみられたため、mRNA 封入 DODAP-GALA-LNP の脂質組成最適化を行った。実験計画法を用いて脂質組成の最適化を行った結果、脾臓に対する肺選択性を最適化前の 4 倍から 45 倍へと 10 倍以上向上させることに成功した。

さらに、DODAP-GALA-LNP の活性や肺選択性を既存の肺選択的 mRNA 送達キャリアである肺標的 SORT-LNP と比較した。その結果、肝臓に対する肺選択性が SORT-LNP が約 20 倍である一方 DODAP-GALA-LNP は約 200 倍、脾臓に対する肺選択性は SORT-LNP が約 5 倍である一方 DODAP-GALA-LNP は約 20 倍と DODAP-GALA-LNP は肺標的 SORT-LNP と比較して顕著に高い肺選択性を有していた。

第三章では、最適化した mRNA 封入 DODAP-GALA-LNP を用いた肺がん治療の検討を行った。肺がん治療に対しては近年、抗 PD-1 抗体を始めとしたがん免疫療法が注目されているが、腫瘍内に細胞傷害性 T 細胞 （CTLs） が存在しない「Cold Tumor」の存在が原因で奏効率は患者全体の 20～30%に留まることが問題視されている。そこで本研究では、mRNA が発現系であることを活かし、リンパ組織から腫瘍内に CTLs を誘導する作用を持つケモカイン （CXCL10） を肺組織中に発現させて肺がん部に存在する CTLs の数を増加させる戦略を考えた。CXCL10 をコードした mRNA（mCXCL10） を作製し、これを DODAP-GALA-LNP に封入して肺転移モデルマウスに投与して抗腫瘍効果を検討した。その結果、mCXCL10 封入 DODAP-GALA-LNP 投与群において、Free mCXCL10 投与群や mCXCL10 封入 DODAP-LNP 投与群と比較して有意な抗腫瘍効果が認められた。