



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イオン性脂質の分岐足場は脂質ナノ粒子の安定性とin vivo mRNA送達効率を高める [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	橋場, 一毅
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第7177号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89907
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Hashiba_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 橋場 一 毅

学位論文題名

イオン性脂質の分岐足場は脂質ナノ粒子の安定性と *in vivo* mRNA 送達効率を高める

人工的に合成された mRNA を薬として導入することで、細胞質で目的のタンパク質が産生され、疾患の治療や予防に貢献できる。また、mRNA は低分子化合物や抗体で狙うのが難しい分子を創薬標的とすることが可能である。しかし、mRNA はサイズが大きく、陰イオン性であるため、細胞膜を透過しにくい。その上、血液中や組織に存在する RNase による分解を受けやすいため、mRNA 単独で効率的に細胞に導入されて機能することは困難である。

外因性の RNA を生体内で効果的に機能させる手法として、脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticles: LNPs) は最も進んでいる技術のうちの 1 つであり、COVID-19 のパンデミックに対応して承認された mRNA ワクチンも LNP 製剤である。典型的な LNP は、イオン性脂質、コレステロール、リン脂質およびポリエチレングリコール脂質から構成され、mRNA を内包することで分解から保護し、細胞質への mRNA 送達を実現する。

イオン性脂質は正に帯電可能な頭部と疎水性の足場から成る。頭部は第 3 級アミンであることが多く、生理的 pH では電荷を帯びず、酸性環境でカチオン性となる。この電荷制御により、LNP の体内動態とエンドソーム脱出効率の改善が期待されるため、イオン性脂質は RNA のバイオアベイラビリティ向上を担う重要なマテリアルである。

イオン性脂質の疎水性足場は自己集合による粒子形成やエンドソーム脱出時の膜融合に寄与する。近年、分岐脂肪酸を足場構造とするイオン性脂質が mRNA 送達に有効であると報告されており、上述した mRNA/LNP ワクチンにも分岐足場を有するイオン性脂質が採用されている。しかし、市販で入手可能な分岐化合物は限られており、正確な比較を意図した系統的な脂質ライブラリ設計が容易ではないため、分岐構造が LNP の機能に与える影響に関する体系的な知見は得られていない。この体系的な知見を得ることを本研究の目的とした。

第 1 章では、分岐構造と LNP の機能の関係性理解のための系統的な脂質ライブラリ設計を試みた。本研究では、足場構造として α 分岐脂肪酸に着目した。 α 分岐脂肪酸は主鎖と α 位の分岐鎖からなり、市販で入手可能な化合物を原料として各鎖の長さを独立して制御しながら合成可能である。加えて、 α 分岐脂肪酸は主鎖と分岐鎖の対称性と総炭素数という 2 つの独立因子のみで構造を記述できる。 α 分岐のこれらの特徴は、系統的な脂質ライブラリ設計や構造活性相関の理解にとって理想的であると考えた。頭部を当研究室で開発済みの CL4 構造に固定し、対称性と総炭素数が連続的に異なる α 分岐足場を有するイオン性脂質を新たに 32 種類合成した。

第 2 章では、イオン性脂質の分岐構造が LNP の物理化学的性質に与える影響を検証した。32 種類のイオン性脂質をそれぞれ含む mRNA/LNP を作製したところ、イオン性脂質の分岐構造に依存して LNP の物性が変化することが見出された。具体的には、対称性が高く、総炭素数が多いイオン性脂質からは mRNA 封入率が高く、均一で小さい粒子が形成された。そこで、脂質の分岐構造が LNP の物性に寄与するメカニズムの検証を試みた。分岐足場を有するリン脂質はその分岐鎖のために脂質膜中での分子運動が制限されるという知見に基づき、「イオン性脂質の分岐足場が脂質の分子運動を制限し、LNP 内部の粘性が増加し、封入率が高く、均一で小さい粒子が形成した」と仮説を立てた。仮説検証のため、粘性に応じて蛍光強度が変化する分子ローターを利用し、LNP 内部の粘性を測定した。その結果、分岐足場の対称性が高く、総炭素数が多いほど、LNP の粘性が増加することが見出された。また、粘性の高い LNP は mRNA 封入率が高く、均一で小さい粒子であるという関係性も認められ、上記仮説を支持する結果が得られた。また、実用化を目指す上では、LNP の経時的な物理的劣化を抑制することも重要だが、それを類推する指標は明ら

かになっていない。LNP 内部の粘性がその指標になるのではないかと考え、粘性から保存安定性を予測できるか検証した。その結果、粘性が 150 mPas を超える LNP の物性は 40°C の加速条件下において少なくとも 1 か月維持された。よって、LNP 内部の粘性から LNP の保存安定性を類推できる可能性が示された。

第 3 章では、イオン性脂質の分岐構造が LNP の膜破壊活性や mRNA 送達に与える影響を検証した。LNP は細胞に取り込まれた後、イオン性脂質がエンドソーム酸性化に伴い正に帯電することで、エンドソーム膜の破壊やそれに伴う mRNA の細胞質への送達が促進される。エンドソーム脱出過程は mRNA 送達の律速段階であることが知られているため、分岐構造が LNP の膜破壊能に与える影響を理解することは重要である。初めに、イオン性脂質の分岐構造がイオン化能（酸性環境で LNP がどの程度正に帯電できるか）に与える影響を評価した。その結果、対称性が高く、かつ総炭素数の少ない分岐脂質から構成される LNP は高いイオン化能を示した。そのメカニズム解明のため、分岐鎖を有するリン脂質は脂質膜のパッキングを乱すという知見に着目した。直鎖のイオン性脂質は密なパッキングを形成するため脂質同士の距離が近く、電荷反発によってプロトン化しない方向に平衡が移動する一方で、分岐のイオン性脂質はパッキングを乱すため、電荷反発が緩和されてプロトン化しやすくなると仮説を立てた。検証のため、イオン化能の低い LNP を界面活性剤で可溶化し、パッキングを乱したところ、可溶化前と比較してイオン化能が有意に向上し、仮説を支持する結果が得られた。続いて、酸性環境下で赤血球と LNP を混合し、漏出したヘモグロビン由来の吸光度を測定することで、各 LNP のエンドソーム膜に対する膜破壊活性を疑似的に評価した。その結果、LNP のイオン化能と膜破壊能に強い相関関係が認められた。したがって、脂質足場の分岐鎖は脂質間のパッキングを乱し、LNP のイオン化能や膜破壊能の向上に寄与する可能性が示された。続いて、32 種類のイオン性脂質から Fluc mRNA 封入 LNP を作製し、*in vivo* mRNA 送達効率を評価した。その結果、対称性の高い分岐脂質は高効率での mRNA 送達を実現し、イオン化能や膜破壊能評価と一貫した結果が得られた。最後に、本研究で合成したイオン性脂質のうち、高い保存安定性と肝臓への効率的な mRNA 送達を両立する分岐脂質 CL4F 8-6 が *in vivo* ゲノム編集へ応用可能か評価した。その結果、Cas9 mRNA と sgRNA を封入した CL4F 8-6 LNP は単回投与で、肝臓において 54% のゲノム編集と 77% のタンパク質低減を誘導した。

本研究では、足場の分岐構造が連続的に異なるイオン性脂質ライブラリを設計した。各脂質の構造は 2 種類の独立因子で記述できるため、構造活性相関の理解を容易にした。本脂質ライブラリを利用して系統的な評価を行い、脂質足場の分岐鎖は粒子の安定性、膜破壊活性および *in vivo* mRNA 送達効率を高めることが明らかになった。本研究で得られた知見は、今後のイオン性脂質設計の指針となり、mRNA 医薬の更なる発展に繋がることが期待される。