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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　橋　場　一　毅

審査担当者	主査	教　授　原　島　秀　吉
	副査	教　授　小　川　美　香　子
	副査	准教授　山　田　勇　磨
	副査	講　師　高　倉　栄　男
	副査	助　教　佐　藤　悠　介

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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、薬理活性を誘導できる。実際、mRNA ワクチンはCOVID-19 のパンデミックに対応して正式に承認され、感染率や死亡率の大幅な減少に貢献した。しかし、mRNA は生体内で分解されやすく、細胞膜を透過しにくいため、mRNA 単独での細胞質への導入は困難である。

mRNA を生体内へ送達する手法として、脂質ナノ粒子（LNP）は最も進んでいる技術のうちの 1 つである。LNP を構成する脂質のうち、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LNP の電荷制御を担う。具体的には、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とで LNP の体内動態とエンドソーム脱出効率を改善する。また、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、疎水性足場に分岐構造を有するイオン性脂質が mRNA 送達に有効であると報告されている。しかし、脂質の分岐構造がLNP の機能に与える影響についての体系的な知見は得られておらず、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、分岐構造を有する系統的なイオン性脂質ライブラリを設計し、分岐構造に関する体系的な知見を得ることを試みた。著者は、α 分岐構造に着目したことで、市販で入手可能な化合物を原料として、系統的かつ連続的なライブラリの設計が可能となった。加えて、α 分岐構造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記述できるため、構造活性相関の理解にとって理想的であった。合成されたイオン性脂質は 32 種類であり、脂質頭部は過去に当研究室で開発された CL4 構造に固定され、脂質足場は α 分岐構造の対称性と総炭素数が連続的に異なるものである。

著者は、得られた α 分岐脂質ライブラリを用いて、脂質足場の分岐構造が LNP の物理化学的性質に与える影響を検証している。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、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。そのメカニズムとして、「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、その検証のために分子ローターで LNP 内部の粘性を測定している。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。加えて、粘性が高い LNP の物性は 40℃の加速条件下において少なくとも 1 か月維持されることも見出され、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。

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。著者は、イオン性脂質の分岐構造がエンドソーム脱出過程に与える影響を検証した。酸性環境でLNP がどの程度正に帯電できるか（イオン化能）について評価した結果、対称性が高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。そのメカニズムとして、直鎖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て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、各 LNPの膜破壊活性を評価したところ、LNPのイオン化能と膜破壊能に強い正の相関関係が認められた。更に、32 種類のイオン性脂質をそれぞれ含む LNP の *in vivo* mRNA 送達効率を評価したところ、対称性の高い分岐脂質は高効率での mRNA 送達を実現することが見出された。したがって、イオン性脂質の分岐足場は脂質間のパッキングを乱し、LNP のイオン化能、膜破壊能および *in vivo* mRNA 送達効率を高める可能性が示された。

これを要するに、著者は、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用いて系統的な評価を行い、分岐構造が LNP の安定性と *in vivo* mRNA 送達効率に与える影響とそのメカニズムに関する新知見を得たものであり、イオン性脂質を合理的に設計するための指針として貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。