



Title	脾臓辺縁帯B細胞を標的とする脂質ナノ粒子を用いた安全で効果的なmRNAワクチン製剤の開発
Author(s)	鈴木, 裕一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第16798号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16798
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99643
Type	doctoral thesis
File Information	Yuichi_Suzuki.pdf, 全文



博士学位論文

脾臓辺縁帯 B 細胞を標的とする脂質ナノ粒子を用いた安全で効果的な mRNA ワクチン製剤の開発

鈴木裕一

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

薬剤分子設計学研究室

令和 8 年 3 月

目次

略語表	3
序論	4
本論	14
第1章 脾臓 B 細胞を標的とする LNP の設計と生体分子コロナに着目した標的 メカニズムの検証	
1-1 緒言	14
1-2 結果	15
1-2-1 iTOT のライブラリ構築と特性評価	15
1-2-2 iTOT を含む LNP 脂質組成の事前検討	17
1-2-3 iTOT を含む LNP の物理化学的な特徴評価	23
1-2-4 iTOT を含む LNP の生体内分布	28
1-2-5 生体分子コロナ調製サンプルの確立と解析	33
1-2-6 脾臓 B 細胞標的 LNP の取り込みメカニズム検証	38
1-3 考察	41
1-4 小括	45
第2章 肝臓への mRNA 送達を回避し MZB 細胞を標的とする LNP の mRNA ワクチン 製剤としての有効性と安全性の検証	
2-1 緒言	46
2-2 結果	47
2-2-1 15%DSPC による MZB 細胞への標的	47
2-2-2 15%DSPC による MZB 細胞を介した免疫反応の誘導	50
2-2-3 15%DSPC による治療的な腫瘍抑制効果の検証	54
2-2-4 がんワクチン製剤としての 15%DSPC の安全性評価	56
2-2-5 筋肉内投与型ワクチン製剤としての 15%DSPC の応用	59

2-3 考察.....	65
2-4 小括.....	68
第3章 ヘルパー脂質に着目した細胞質への mRNA 送達効率を促進する LNP 製剤 の開発	
3-1 緒言.....	69
3-2 結果.....	71
3-2-1 zTOT のライブラリ構築と特性評価.....	71
3-2-2 zTOT を含む LNP による mRNA 発現活性向上の検証.....	72
3-2-3 zTOT を含む LNP のゲノム編集製剤としての応用.....	76
3-2-4 zTOT による mRNA 発現活性向上のメカニズムの検証.....	78
3-2-5 エンドソーム脱出効率の推定.....	81
3-3 考察.....	85
3-4 小括.....	88
結論.....	89
実験方法.....	90
謝辞.....	138
参考文献.....	139

略語表

ApoE	apolipoprotein E
APC	antigen presenting cell
CL	cationic lipid
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CLSM	confocal laser scanning microscopy
COVID-19	corona virus disease-19
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DC	dendritic cell
DCVJ	9-(2-carboxy-2-cyanovinyl)julolidine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
ED ₅₀	effective dose 50%
FCM	flow cytometry
GP	generalized polarization
iLiNP device	invasive lipid nanoparticle production device
iTOT	ionizable tri-oleoyl-tris
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
IVT	<i>in vitro</i> transcribed
Laurdan	6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene
LDL	low-density lipoprotein
LNP	lipid nanoparticle
mRNA	messenger RNA
MZB	marginal zone B
PdI	polydispersity index
PEG	polyethylene glycol
PL	phospholipid
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
R	fluorescence-absorption ratio
SORT	selective organ targeting
TLC	thin-layer chromatography
TNS	6-(<i>p</i> -toluidino)-2-naphtalenesulfonic acid
TTR	transthyretin
zTOT	zwitterionic tri-oleoyl-tris

序論

DNAやRNAの配列情報を利用して特定のタンパク質の発現を制御する核酸医薬は、1980年代にアンチセンス核酸が登場して以来、過去40年間で臨床試験の申請件数が大幅に増加し、医療への応用が探索されてきた[1]。局所投与型の製剤として、1998年にサイトメガロウイルス網膜炎に対してアンチセンス核酸である FOMIVIRSEN®が世界初の核酸医薬品として承認され、全身投与型の製剤についても、2016年にデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対してアンチセンス核酸の ETEPLIRSEN®が FDA により承認された。本邦でも、2019年にトランスサイレチン型家族性アミロイドーシスに対して siRNA 製剤である ONPATRO®が PMDA により承認されている。これらの核酸医薬は機能異常を示すタンパク質の過剰な産生を抑える遺伝子サイレンシング機構に基づいたアンチセンス核酸や siRNA に限られる[2]。この一方で、mRNA は生体内の翻訳システムを利用してあらゆるタンパク質を迅速かつ一過性に発現するため、機能的なタンパク質の産生という新たなアプローチによる核酸医薬として mRNA の医療応用が進められている[3]。実際、mRNA ベースのワクチン製剤は感染症の蔓延を防ぐ上で顕著な効果を示しているだけでなく、がんのような非感染症に対しても有望な治療法の 1 つとなっている[4]。mRNA ワクチンが開発される前のワクチン製剤は、弱体化または不活化された病原体を使用しており、製造プロセスの複雑さや安全性に関して懸念があり、疾患の予防や治療への応用が制限されてきた[5]。加えて、従来のワクチン製剤ではがんなどの非感染性疾患には適用できない。そのため、より簡便で汎用性の高いワクチンの開発が必要とされてきた。その点で、mRNA ワクチンは簡単な *in vitro* 転写反応で合成でき、塩基配列の変更により任意のタンパク質を翻訳できるため[6]、設計の容易さ、迅速さおよび用途の多様性などの観点で、従来のワクチン製剤と比べ多くの利点をもつ。しかしながら、mRNA は生体内で RNA 分解酵素により分解されやすく、親水性で負電荷を帯びた高分子であるため、細胞膜を通過することは困難である。したがって、mRNA 単独では医薬品としての開発に制限があり、その医療応用には送達技術の活用が不可欠であると認識されている。

核酸を標的細胞内に送達させる drug delivery system: (DDS) として報告された送達技術のうち[5, 7]、脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle: LNP) は最も汎用される mRNA の送達手段として研究されてきた (Fig. 1)。標準的な LNP はメインに含まれるイオン化脂質、ヘルパー脂質、コレステロール、polyethylene glycol (PEG) 脂質から構成されるナノサイズの構造体である[8, 9]。この LNP を製剤技術に用いた新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する mRNA ワクチンとして Pfizer/BioNTech 社の COMIRNATY®、Moderna 社の SPIKEVAX®が、ウイルスゲノム解読から 1 年以内に迅速に承認され、ウイルス感染の優れた予防効果と重症化の抑制効果を通じて世界の公衆衛生に大きく貢献した[10-12]。これらの mRNA ベースのワクチン製剤の有効性は着実に実証され、医療応用が進められてい

るが、潜在的な課題を抱えている。それは、LNP の肝臓外臓器への細胞レベルでの標的化と細胞内 mRNA 送達効率の向上である。

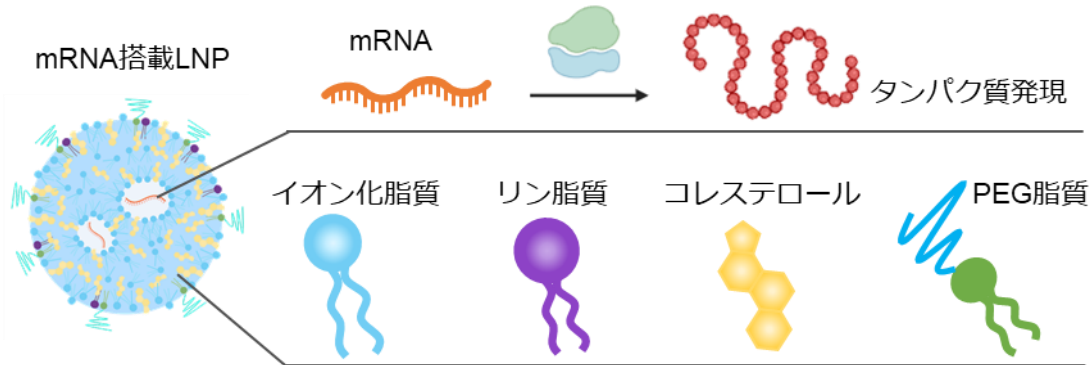


Fig. 1 mRNA を搭載した LNP の模式図。mRNA の送達技術として LNP は研究され、LNP と mRNA を組み合わせることにより、機能的なタンパク質の産生という新たなアプローチを利用した mRNA の医療応用が期待されている。

ワクチン製剤として mRNA-LNP の医療応用を考えた場合、獲得免疫の応答を最大化するために、抗原をコードした mRNA を抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) に送達する必要があるが、標的とすべき APC について理解が進んでいない。これまでのところ、APC のうち樹状細胞 (dendritic cell: DC) は抗原提示に由来した免疫反応を誘導することが示され[13]、がんワクチンとして mRNA-LNP の医療応用を検証した研究の中で[14-17]、最も標準的な標的細胞として認識されている。その一例として、BioNTech 社の開発した mRNA を搭載する Lipoplex (LPX) 製剤である RNA-LPX は、脾臓を含めた二次リンパ組織中の DC を標的とし、がん抗原特異的な T 細胞応答を強力に誘導することで、治療あるいは予防的な腫瘍体積の抑制効果を示している[18]。現在、RNA-LPX によるトリプルネガティブ乳がんや悪性黒色腫、その他のがん治療に対する臨床試験が行われている (NCT02316457、NCT02410733)。DC とは別に、B 細胞の一部も APC として機能し、がんワクチン製剤の標的として注目されている[19-21]。特に、脾臓の辺縁帯に位置する辺縁帯 B (marginal zone B : MZB) 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) クラス II タンパク質と共刺激分子を恒久的に発現するだけでなく[22]、低用量の抗原刺激下では MHC クラス I タンパク質が発現誘導されることも知られている。そのため、MZB 細胞は獲得免疫の誘導に関与する APC として機能すると認識されている[23]。実際に、抗原ペプチドが直接送達された MZB 細胞では、細胞障害性 T 細胞の応答を誘導することが実証されている[20]。さらに、MZB 細胞は抗原とナノ粒子を捕捉し、多数の免疫細胞が集積する濾胞へと輸送することが知られている。これらの抗原は濾胞内の T 細胞領域において提示されるが、この作用は、抗原を濾胞内へと輸送しない DC とは異なる[24]。したがって、がん抗原をコードする mRNA が MZB 細胞に送達されると、抗原提示が迅速にかつ持続的に進行し、効率的な免疫応答が誘導されると期待される。このように、

MZB 細胞はがんワクチンの標的細胞として有望であるにもかかわらず、mRNA を MZB 細胞に送達する効率的な方法が未だ開発されておらず、がんワクチンとしてのポテンシャルを十分に検証できていない。

また、mRNA あるいはその合成過程で副産物として生成する二本鎖 RNA (double strand RNA: dsRNA) や 5'末端ヌクレオチドの三リン酸が露出した RNA は、それぞれ Toll 様受容体 (toll like receptor: TLR) 7/8 経路や retinoic acid-inducible gene I: (RIG- I) および melanoma differentiation-associated protein 5: (MDA-5) といったパターン受容体に認識され、インターフェロンの産生が誘導され意図せず免疫反応を活性化させる [25]。さらに、LNP を構成する脂質のうちイオン化脂質は TLR4 を活性化させ myeloid differentiation primary response 88: (MYD88) を介した炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性遺伝子の発現を誘発する [26, 27]。また、イオン化脂質の生分解性の低さは細胞蓄積に起因する毒性を引き起こす他、LNP によるエンドソーム膜の損傷がガレクチンの集積とその後のインフラマソームの活性化を引き起こすことも知られている [28]。そのため、非免疫細胞への mRNA-LNP の送達は潜在的な毒性につながる事が懸念される。特に、従来の LNP 製剤は筋肉内投与後、その一部が肝臓に移行し投与部位のみならず肝臓においても遺伝子発現し [29, 30]、肝臓で抗原を発現すると細胞傷害性 T 細胞等による攻撃を受ける可能性がある。このような免疫反応に由来する臓器障害のリスクがあるにもかかわらず、mRNA ワクチンは反復投与の必要があり、毒性に関して懸念が強まる。このように、非標的部位である肝臓への mRNA ワクチンの送達は毒性リスクにつながる可能性があると認識されているものの、ワクチン製剤で使用される LNP は依然として肝指向性を有し、肝臓への mRNA 送達を回避する意義がこれまで議論されておらず、mRNA-LNP の生体内分布の制御が臓器障害の低減に寄与するか実際に検証されたことはなかった。

LNP は肝臓への標的化に関しては研究が先行している [31]ものの、肝臓外臓器への移行を果たすキャリアの報告は少なく、その標的化は未だ確立されていないと言える。LNP を全身投与すると、その粒子表面には血液中の多様な生体分子が吸着し生体分子コロナと呼ばれる層を形成し [32-34]、特定のタンパク質との結合は内因性リガンドとして機能して、生体内での LNP の挙動を決定づけることが知られている (Fig. 2)。



Fig. 2 生体内で形成する生体分子コロナと内因性リガンドによる標的化。ナノ粒子を全身投与すると血中のタンパク質が吸着する。特定のタンパク質の吸着が内因性リガンドとして機能し、受容体を介した標的細胞への取り込みメカニズムの解明が注目されている。

この生体分子コロナに着目して、近年では LNP の標的を制御する試みが行われている (Table 1)。例えば、ONPATRO®に代表される肝臓指向性のあるナノ粒子製剤の表面には apolipoprotein E: (ApoE) やアルブミンといったタンパク質が吸着するが、ApoE は低密度リポ蛋白質 (low-density lipoprotein: LDL) 受容体を介し[35]、アルブミンはスカベンジャー受容体により認識されることで肝臓へと効率的に取り込まれることが実証されている[36]。また、肝臓外臓器への移行を示す selective organ targeting (SORT) と呼ばれる LNP では基本的な 4 つの脂質組成に荷電した脂質を 1 成分追加することによって、その LNP 表面の荷電状態を制御するが、アニオン性の脂質を追加し酸乖離定数 (pKa) が 6 以下となる LNP では脾臓選択的な、カチオン性の脂質を追加し pKa が 9 以上となる LNP では肺選択的な mRNA 送達を示されている[37]。これらの LNP に形成される生体分子コロナを解析した結果、肺を標的とする SORT-LNP には凝固に関連するタンパク質であるビトロネクチンが、脾臓を標的とする SORT-LNP には β -2 glycoprotein 1 がそれぞれ濃縮され、LNP の肝臓外への送達を促進する内因性リガンドの候補として同定されている[38]。また、LNP を構成するイオン化脂質の構造の違いにより、生体分子コロナのタンパク質組成に違いが生じることも知られている。肝臓指向性を示すエステル結合をリンカーとするイオン化脂質を含有する LNP では ApoE を含むアポリポタンパク質が吸着した一方で、肺指向性を示すアミド結合をリンカーとするイオン化脂質を含む LNP では、フィブリノーゲンやビトロネクチンの吸着割合が増加している[39]。これまでのところ、肺指向性を持つナノ粒子には、凝固に関わるタンパク質として知られるビトロネクチンやフィブリノーゲンが豊富に吸着しており、これらのタンパク質表面への Arg-Gly-Asp 配列の露出により、血管内皮細胞等に高発現するインテグリンを介した肺への取り込みが示唆されている[38-40]。さらに、ナノ粒子への補体タンパク質や免疫グロブリンの吸着は粒子をオプソニン化することで、食細胞による認識・貪食を受けて迅速なクリアランスが促進される[41, 42]。また、特定の補体タンパク質の吸着は免疫細胞への標的に関与する。例えば、B 細胞指向性のあるナノ粒子には C3 あるいはその分解産物が[43, 44]、好中球指向性のあるリボソーム製剤では iC3b の吸着が認められ[45]、それぞれの免疫細胞に特異的に発現する補体受容体を介して細胞内に取り込まれる。このように生体分子コロナを構成するタンパク質の組成、さらには内因性リガンドとの吸着を制御できれば、肝外臓器において細胞レベルの標的化が可能になると期待される。

Table 1 生体分子コロナに着目したナノ粒子の標的メカニズムの解明。

標的	キャリア	内因性リガンド候補	受容体	ref
肝臓	既承認LNP	ApoE	LDL-R	[31]
肝臓	エステルリンカー型 イオン化脂質含有-LNP	ApoE	LDL-R	[35]
肝臓	cKK-E12 Syn-3 LNP	Albumin	Scavenger receptors gp30, gp18	[32]
肺	正電荷脂質追加 SORT-LNP	Vitronectin	Integrin ($\alpha\beta3$)	[34]
肺	アミドリリンカー型 イオン化脂質含有-LNP	Fibronectin Vitronectin	Integrin	[35]
脾臓	正電荷脂質追加 SORT-LNP	β -2 glycoprotein 1	—	[34]
好中球	DOCP含有 -liposome	iC3b	CD11b	[41]
B細胞	酸化鉄ナノ粒子	C3b/d	CD21/35	[39]

これまでに肝臓、肺、脾臓および免疫細胞を標的とするナノ粒子における生体分子コロナの解析が行われており、内因性リガンドの候補が見つかった。また、特定の受容体を介した標的制御の解明が試みられている。

SORT-LNP を含めた多くの報告で、生体分子コロナを構成するタンパク質の組成は LNP の表面電荷に大きく依存すると認識されてきた。しかしながら、表面電荷に由来した静電的相互作用は血中でのタンパク質とナノ粒子との強力な結合様式の一つではあるものの、両者は極性あるいは疎水性といった多様な相互作用を介して結合すると考えられる。即ち、表面電荷のみに制限されたこれまでの物性理解では、タンパク質との結合に必要な LNP の物理化学的な性質を詳しく把握できず、組織または細胞特異的な mRNA-LNP の合理的な設計を困難にしていると言える。

mRNA-LNP の医療応用は CRISPR/Cas9 システムといった遺伝子編集ツールとしての治療応用に対しても期待されているが[46, 47]、細胞内への効率的な mRNA 送達ゲノム編集因子の医療応用の現実に対してボトルネックとなっている。

ナノ粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、初期エンドソームへと輸送され、その大部分がリサイクリングエンドソームを経由して細胞外へと排出される。あるいは後期エンドソームへと成熟し最終的にリソソームに至る。リソソームに到達した粒子は酸性環境で加水分解酵素により迅速な分解を受ける。一方で、細胞内に取り込まれた粒子のごく少数がエンドソーム膜と融合し、エンドソーム膜から細胞質へと搭載分子を放出する。この過程はエンドソーム脱出と呼ばれ、非常に稀なイベントであると知られている[48-50]。細胞質への効率的な mRNA 等の核酸送達を達成するには、より早期のエンドソーム画分でエンドソーム膜と融合し脱出することが望ましく、エンドソーム脱出が遅延する場合、核酸分解に伴う翻訳効率の著しい低下を招く。その中で、エンドソーム膜との融合を促進し、細胞質への核酸送達を向上させるために、イオン化脂質が開発された[51]。イオン

化脂質を含む LNP では、エンドソーム成熟に伴う pH 低下によってその表面には正荷電を帯びたイオン化脂質が移動する[52]。LNP 表面の荷電が引き金となって、負に帯電したエンドソームが近接し互いの脂質が移動する。このうち、正電荷でコーン型のイオン化脂質はエンドソームを構成する負電荷の脂質と静電的相互作用を介し脂質頭部でイオン対を形成し、脂質足場が立体的に広がる複合体を形成する。この過程で、安定な脂質二重構造であるラメラ相を維持するエンドソーム膜が不安定な逆ヘキサゴナル相へと相転移し、膜同士が融合する[53]。エンドソーム膜の不安定化により LNP 内部の核酸が細胞質へと放出される (Fig. 3)。これまでのイオン化脂質の開発の歴史を辿ると、LNP による核酸送達が飛躍的に向上してきたことが分かる。2000 年代初頭、世界初の siRNA 製剤として霊長類に対して全身投与された LNP 製剤には DLin-DMA という脂質頭部に第 3 級アミン構造をもつ脂質がメインの脂質として使用され、遺伝子抑制効果を実証した[54]。その後、この製剤は医薬品として承認には至らなかったものの、pH に応答して脂質頭部が荷電する特徴に着想を得て、イオン化脂質の構造探索が行われた。マウスの肝臓を標的とした血液凝固第 7 因子 (F VII) に対する遺伝子サイレンシング効果として、50%有効量 (ED_{50}) で比べると DLin-DMA を含む LNP では 1.0 mg/kg のところ[55]、2010 年に報告された DLin-KC2-DMA では 0.01 mg/kg[56]、2012 年に報告された DLin-MC3-DMA: (MC3) では 0.005 mg/kg を達成している[57]。加えて、MC3 を含む LNP は霊長類への投与によって ED_{50} が 0.03 mg/kg 以下という非常に強い遺伝子抑制効果を示し、世界初の siRNA 医薬品である ONPATRRO® の LNP 製剤として承認されている[58]。

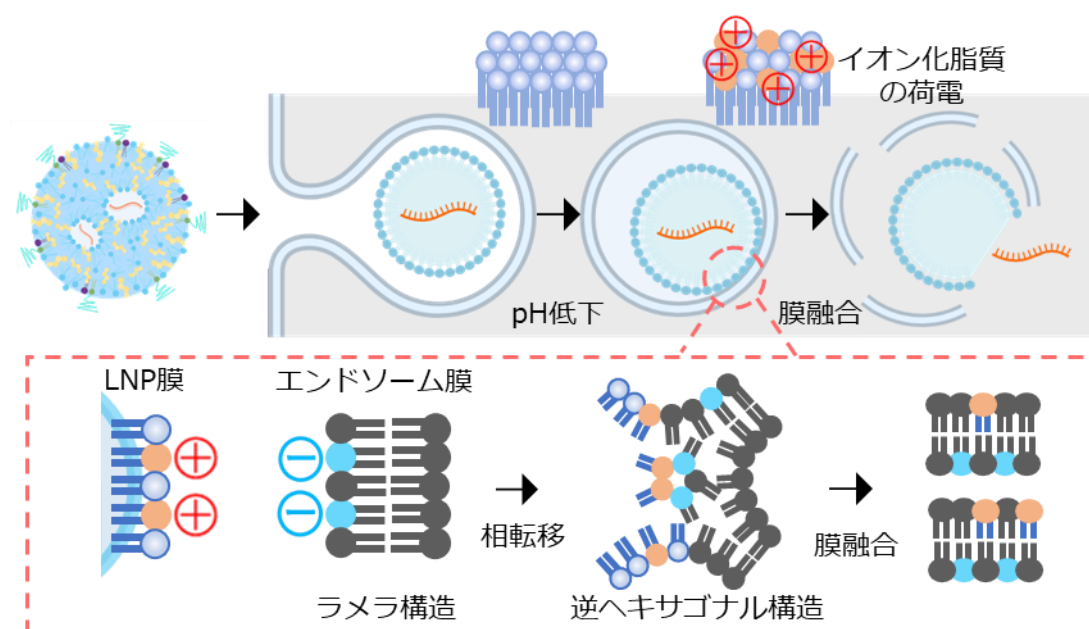


Fig. 3 イオン化脂質により引き起こされる LNP とエンドソーム膜との融合。LNP は細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内の pH に伴ってイオン化脂質が荷電し、エンドソーム膜と相互作用する。安定なラメラ相から逆ヘキサゴナル相に相転移することで膜融合し、細胞質へと mRNA を送達する。

このように、イオン化脂質は LNP 膜とエンドソーム膜の融合に直接関与し、核酸送達の効率を向上させると認識されているものの、イオン化脂質に依存したエンドソーム脱出には以下に示す制限があり、原理的にエンドソーム脱出効率の最大値を発揮できない可能性がある。第一に、LNP が十分に荷電する pH 環境をエンドソーム内で維持できないことが考えられる。通常、初期エンドソームはプロトンポンプによりその内腔の pH が 6.2 から 6.5 ほどに維持されている。そのため、多くの LNP ではエンドソーム内の酸性環境下でプロトンを取り込み荷電するように設計されている。しかしながら、大量の LNP が単一のエンドソームに集積するとイオン化脂質によるプロトン消費がエンドソーム内の酸性化を圧倒し、LNP 表面の荷電が抑えられる。このエンドソームの酸性化の不全によって、LNP とエンドソームとの融合が遅延し、LNP はより成熟したエンドソーム画分に蓄積される[59]。第二に、LNP と相互作用するために可能なエンドソームを構成する負帯電脂質が不足することが考えられる。LNP がエンドソーム内に取り込まれた後、エンドソーム膜の phosphatidylserine: (PS) や phosphatidylinositol: (PI) あるいは bis monoacylglycerol phosphate: (BMP) といった負電荷の脂質をめぐり競合することになる。エンドソーム膜を構成するこれらの負電荷脂質の総量は限定的であり、正電荷のイオン化脂質によってアニオン性脂質が急速に消費され結合が飽和すると、膜融合のプロセスが制限される。そして第三に、エンドソーム膜を形成するリン脂質の中でも phosphatidylcholine: (PC) が、膜構造を安定化し、膜融合を物理的に阻害することが挙げられる。ホスホコリン基を有するリン脂質は親水性頭部が大きくシリンダー型の立体構造をとる。このリン脂質を含む生体膜等の膜構造は曲率が 0 に近く、安定した脂質二重平面を形成する[60]。そのため、LNP とエンドソーム膜との融合において、エンドソーム膜のラメラ相が維持され膜が安定化されぎゃくへキサゴナル相への相転移が阻害される[61, 62]。加えて、従来の LNP 製剤は 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: (DSPC) を構成脂質として採用している。DSPC は LNP の膜構造を安定化させると同時にエンドソーム膜との融合を阻害すると考えられる。さらに、エンドソーム脱出は LNP がエンドサイトーシスされた後、約 10 分間持続する非常に限られたイベントであることが知られている[49]。イオン化脂質のみに依存したエンドソーム脱出は遅延しやすく、エンドソーム成熟に伴う mRNA の分解および細胞質への核酸放出の低下につながる[63]。実際に、ONPATRO®として臨床応用されている MC3 を含む LNP 製剤であっても、そのエンドソーム脱出効率は 2%未満に留まることが示され[64]、標的細胞に到達した LNP のうちごくわずかな割合しか細胞質に核酸を放出しない。また、この LNP 製剤は細胞内へ取り込まれた後、その大部分が後期エンドソームへ蓄積され、mRNA の著しい分解が示唆されている[63]。したがって、標的細胞への効率的な核酸送達は LNP による標的化が先行して研究されている肝臓であっても、依然として課題であると言える。そのため、イオン化脂質によるエンドソーム膜の負電荷脂質との静電的相互作用に

加えて、できるだけ早期にエンドソーム膜と相互作用できる新たなメカニズムの導入が必要とされる。

エンドソーム膜とナノ粒子との融合を向上させるため、イオン化脂質ではなく、ヘルパー脂質に着目した報告がある。1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine: (DOPE) は他のリン脂質と比べて小さな親水性頭部をもち、疎水性足場にシス二重結合を有するため足場構造が広がり、コーン型に近い立体構造をとる。そのため、DOPE を含有するナノ粒子は優れた膜融合作用を示すことが知られているものの、生体膜に含まれる PC 系リン脂質の存在によって相転移が依然として阻害される [65]。また、ヘルパー脂質に ionizable Phospholipid: (iPhos) と呼ばれる人工的に設計された脂質を使用した LNP 製剤も開発されている [66]。iPhos 脂質の構造探索の結果、最適化された 9A1P9 はその脂質頭部に第 3 級アミンとリン酸基を持ち、疎水性足場に 3 本の炭化水素鎖を含む。エンドソーム内の pH 低下に伴って第三級アミンがプロトン化されると、リン酸基との間で脂質頭部に正負の電荷が形成されるため、エンドソーム膜の PC 系リン脂質の脂質頭部に対してイオン対をなし、足場が立体的に広がる複合体を形成することで、生体膜の不安定化を誘導すると想定している。実際に、9A1P9 を含有した LNP 製剤は、従来のヘルパー脂質である DSPC または DOPE を組み合わせた LNP と比べて mRNA 発現の著しい向上が認められている。このように、細胞内への mRNA 送達を向上させるためには、生体内の PC 系リン脂質により安定化される膜構造と積極的に相互作用し、エンドソーム膜との融合を促進するヘルパー脂質の開発が必要であると考えられる。

肝外臓器の細胞レベルの標的化を生体分子コロナに着目して制御する観点では、特定のタンパク質と相互作用する LNP 表面の物理化学的な特徴を、構成脂質の構造から理解する必要がある。LNP を構成する個々の脂質の化学構造は LNP 全体の物理化学的な特徴を決定することから、構成脂質の化学構造を最適化することで表面物性を制御する試みが行われてきた。実際に、LNP 表面の荷電状態はイオン化脂質の頭部構造によって制御され、粒子全体の 50%が荷電する pH の値である LNP の見かけの pKa は、使用するイオン化脂質頭部のオクタノール-水分配係数 (clogP 値) と相関関係にあると知られている [67]。したがって、LNP を構成するイオン化脂質の頭部構造を自由に設計し、LNP 表面の荷電状態を最適化できれば、LNP の生体内での移行を制御できると考えられる。加えて、LNP 製剤として臨床応用されている ONPATRO[®]、COMIRNATY[®]、SPIKEVAX[®]にはイオン化脂質として MC3、ALC-0315: (ALC)、SM-102 (SM) がそれぞれ採用され、LNP 研究においてベンチマークとして頻繁に使用されている (Fig. 4)。しかしながら、これらの承認イオン化脂質はその合成方法の複雑さや収率の低さといった課題に加え、化学構造の自由度が低いいため、脂質構造と見かけの pKa といった LNP の物性検討ができない。また、細胞内への mRNA 送達効率の向上という課題に対しては、LNP のエンドソーム膜との融合を促進するために、生体膜を構成する PC 系リン脂質との相互作用を誘発する LNP 構成脂質のさらなる探索が不可欠である。具体的には、PC 系リン脂質の脂質頭部とイオン対を形成する新規ヘルパー

脂質の開発が求められるが、ヘルパー脂質の頭部構造を系統的に探索することで、特定の脂質構造がエンドソーム脱出効率といった LNP の機能にどのように影響するかを解明できれば、細胞への mRNA 送達効率の向上のための LNP 設計の指針となり得ると考えられる。このような、系統的な脂質構造の探索を行うためには、化学構造の自由度が高く、網羅的な構造展開が可能な脂質骨格を考える必要がある。

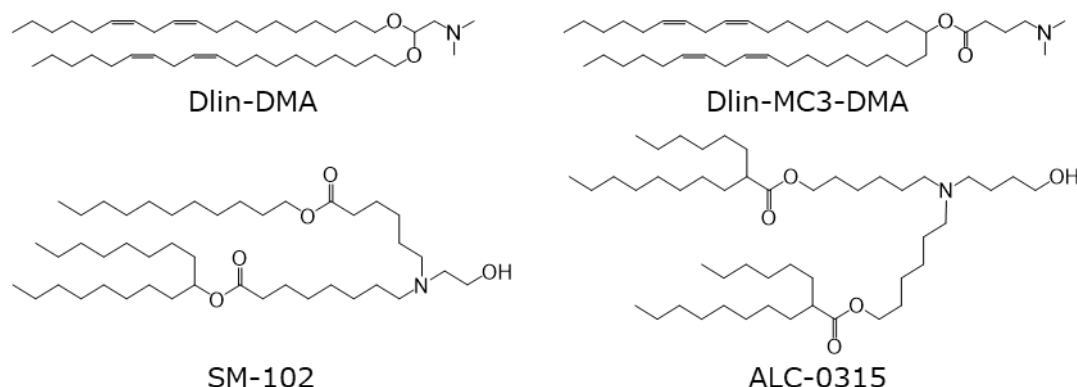


Fig. 4 これまでに開発されたイオン化脂質の構造。pH に応答して荷電するイオン化脂質として初めて報告された Dlin-DMA、siRNA 医薬品の LNP 製剤に採用された Dlin-MC3-DMA、mRNA ワクチンの LNP 製剤として採用された ALC-0315、SM-102。

そこで、本研究では、独自に合成した Tri-Oleoyl-Tris (TOT) 骨格を持つ LNP 構成脂質の開発を行った (Fig. 5)。TOT 骨格はトリス構造をリンカーとして、疎水性足場に 3 本のオレオイル基が導入されている。リンカーのトリスは pH 緩衝液として用いられるほど安価で容易に入手可能な原料であり、金属原子を使用することなく合成可能である。これらの合成反応に関わるメリットに加えて、機能的な親水性頭部を導入する TOT 脂質は、しばしばカルボン酸を使用し、多様な構造を用意できるため、脂質頭部は自由度の高い構造をとる。さらに、TOT は脂質頭部と足場が独立しており、設計の変更が容易に行えるモジュラー型の合成ルートを取り、構造活性相関を迅速に探索できる。ただし、本研究では脂質足場をオレオイル骨格に固定し、脂質頭部の構造探索を進めた。

本研究では、TOT 骨格を共通とし親水性頭部の構造が異なる 2 種類の LNP 構成脂質を開発し、これを含有する LNP の *in vivo* での機能を検証した。1 章では、脂質頭部に第 3 級アミン構造を有する ionizable TOT (iTOT) をイオン化脂質として設計し、肝外臓器への細胞レベルの標的を示す LNP 組成を探索した。また、生体分子コロナに着目した移行メカニズムの解明を目指すとともに、LNP へのタンパク質吸着を LNP 表面の物理化学的な特徴から考察した。肝臓への mRNA 送達を避け、脾臓の抗原提示細胞へ効率的に mRNA を送達する LNP 製剤を使用して、2 章では有効性と安全性を両立する mRNA ワクチンとしての応用を検証した。さらに、3 章では、TOT 脂質の頭部構造に 1 組の正負の電荷をもち全体として中性となる zwitterionic TOT (zTOT) を設計し、これをヘルパー脂質として含

む LNP が PC 系リン脂質と相互作用しエンドソーム脱出を促進し、細胞内への mRNA 送達を向上することを報告する。

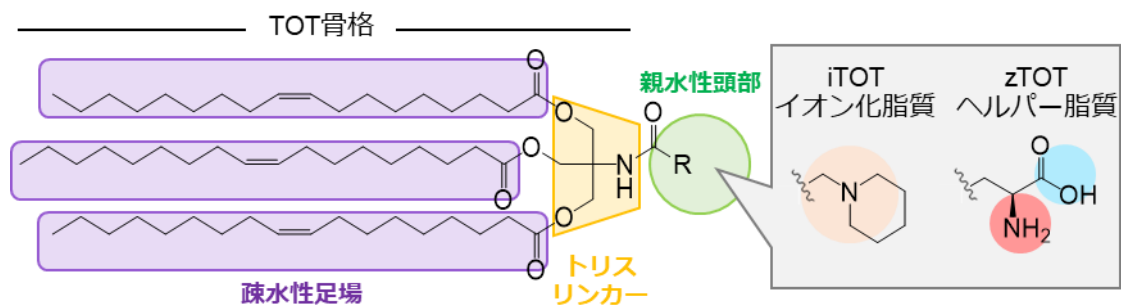


Fig. 5 TOT 骨格を持つ 2 種類の LNP 構成脂質。トリスリンカーにオレオイル基を導入した TOT 骨格をベースとした独自脂質ライブラリを構築した。脂質頭部に第三級アミン構造をもつ iTOT をイオン化脂質として、1 組の正負の電荷をもち全体として中性となる zTOT をヘルパー脂質として含む LNP を開発した。

第1章 脾臓B細胞を標的とする LNP の設計と生体分子 コロナに着目した標的メカニズムの検証

1-1 緒言

序論でも述べた通り、これまでのところ、LNP 表面の荷電状態は生体内の LNP の挙動に大きく関与する物性であると認識されている。また、表面電荷の指標である見かけの pKa は LNP を構成する脂質のうちイオン化脂質の化学構造に着目することで制御できることが知られている。そのため、LNP の荷電状態を最適化するようにイオン化脂質の頭部構造を設計することで、LNP の生体内での挙動を制御できると考えられる。しかしながら、承認されたイオン化脂質は化学構造の自由度が低く、見かけの pKa といった LNP の表面物性に着目した LNP 組成の検討ができないでいた。そこで、本研究では ionizable Tri-Oleoyl-Tris (iTOT) をイオン化脂質として含有する LNP の開発を試みた。親水性頭部に多様な構造を用意できる iTOT 脂質を構成脂質の一つとした LNP の脂質組成検討は、LNP の物性に関する理解を深めると期待される。

また、SORT-LNP を含めた多くの報告で、生体分子コロナを構成するタンパク質の組成は LNP の表面電荷に大きく依存すると認識されてきた。しかしながら、表面電荷に由来した静電的相互作用は血中でのタンパク質とナノ粒子との強力な結合様式の一つではあるものの、両者は極性あるいは疎水性といった多様な相互作用を介して結合すると考えられる。即ち、表面電荷のみに制限されたこれまでの物性理解では、タンパク質との結合に必要な LNP の物理化学的な性質を詳しく把握できず、組織または細胞特異的な mRNA-LNP の合理的な設計を困難にしていると言える。近年の LNP の構造解析によって、大きな親水性頭部をもつリン脂質は LNP の表層に局在することが示されており、リン脂質の種類やその割合は LNP 表面の物理化学的な特徴に最も影響を与える因子であると考えられる。そこで、本章では iTOT-LNP についてリン脂質の種類と割合に着目した脂質組成の検討を行い、肝臓外臓器を標的とする LNP 製剤の処方確立するとともに、その標的メカニズムを生体分子コロナの観点から解明し、LNP とタンパク質の相互作用に関して LNP 表面の物理化学的な特徴から考察を加えることを目的とする。

1-2 結果

1-2-1 iTOT のライブラリ構築と特性評価

本研究では、原料の入手性、拡張性、合成ステップ数および収率を考慮した新たなイオン化脂質 iTOT ライブラリを構築した。iTOT は pH 緩衝剤であるトリスをリンカーとし、その水酸基側に 3 本のオレイン酸が疎水性足場として結合し、アミノ基側に第三級アミノ基を含む親水性頭部構造を有する。親水性頭部構造が異なる 10 種の iTOT を合成した (Fig. 6-a)。

トリスのアミド基と第三級アミノ基との間が炭素数 2 である鎖状スペーサーの脂質 (TOT-1, -4, -5, -16, -17) については、TOT-5 を例にとると、求核剤であるピペリジンがトリスアクリルアミド誘導体の二重結合に対して求核付加し、第三級アミノ基を導入した後、縮合剤である EDCI によりオレイン酸のアシル化中間体を誘導し、トリスの水酸基との間で脱水縮合してエステル形成することで得られる。スペーサーの炭素数がそれよりも多い、あるいはピペリジン以外の環状構造の脂質 (TOT-2, -3, -18, -19, -20) については、TOT-19 を例にとると、トリスを原料としてアミノ酸とクロロギ酸エチルの混合によって得られる酸無水物とトリスのアミノ基選択的な縮合により第三級アミン構造を導入する。その後、オレイン酸を縮合することで得られる (Fig. 6-b)。いずれの合成経路でも 2 工程で iTOT が得られ、TOT-5 の収率は 62% であった。COVID-19 に対する mRNA ワクチンとして承認された LNP 製剤のうち、COMIRNATY® (Pfizer/BioNTech 社) に用いられるイオン化脂質 ALC は 4 段階の合成ステップを踏み、その収率は 20.2% より低く (WO/2016/176330A1)、SPIKEVAX® (Moderna 社) に用いられる SM は 3 段階の合成で収率が 4.5% である [68]。また、遺伝性トランスサイレチン媒介アミロイドーシスに対する siRNA 医薬品として承認された LNP 製剤である ONPATRO® に用いられる MC3 は 4 段階で 55% より低い収率となる [57]。iTOT はいずれの承認イオン化脂質と比較しても少ない工程数と高い収率を示したが、このことはワクチン等としての大スケール製造において大きな意義がある。ただし、親水性頭部のスクリーニング段階では iTOT の共通構造である trioleoyltris に最終工程でアミノ酸を縮合させることで iTOT を得た。

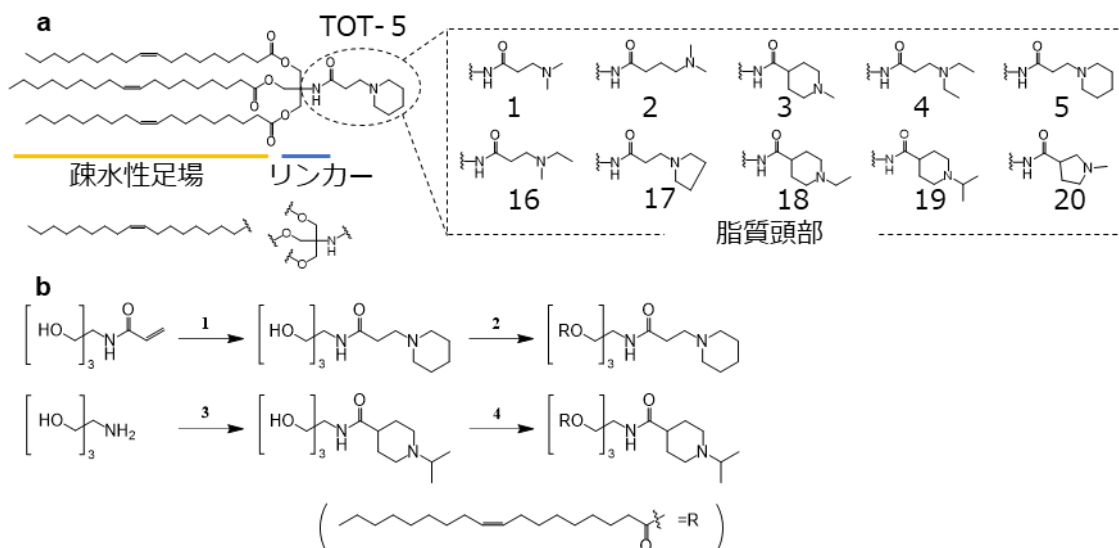


Fig. 6 iTOT の合成。(a) 異なる脂質頭部構造を持つ 10 種類の iTOT 脂質ライブラリ。iTOT は疎水性足場にオレイン酸、リンカーにトリス骨格を持ち、脂質頭部に第三級アミン構造を持つ。(b) iTOT 合成の代表的な経路と反応条件。上段：TOT-5 の合成経路。1) トリスアクリルアミド誘導体にピペリジン、メタノールを加え 40℃、一晩 (O/N) 撹拌した。2) オレイン酸、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI-HCl)、4-dimethylaminopyridine (DMAP)、ジクロロメタン(DCM)を加え、40℃、O/N で撹拌した。下段：TOT-19 の合成経路。3) トリスに 1-(prophen-2-yl)piperidine-4-carboxylic acid, ethyl chloroformate, triethylamine, tetrahydrofuran, N,N-dimethylformamide を加え、0℃ (30 分)~60℃、O/N で撹拌した。4) オレイン酸、EDCI-HCl、DMAP、DCM を加え、40℃、O/N で撹拌した。

iTOT を含有する LNP の見かけの pKa は 6.2~8.0 の範囲で変化した (Fig. 7-a) が、スペーサーの長さや第三級アミン周辺の疎水性基の大きさによって、pKa の値を制御できるという以前の報告と一致していた[67]。また、iTOT は 3つのオレイン酸足場に由来する比較的高いオクタノール-水分配係数を示す特徴を持つ。興味深いことに、iTOT は承認脂質を含む他のイオン化脂質と比較し、順相の薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography: TLC) において明確に高い移動率 (Rf 値) を示した (Fig. 7-b)。イオン化脂質の第三級アミノ基は高極性のシラノール基と水素結合および静電的相互作用により親和性を示すため、Rf 値はイオン化脂質の pKa に依存する。したがって、iTOT の比較的高い Rf 値は、その高い疎水性あるいは嵩高い疎水性足場による親水性頭部と TLC 極性界面との相互作用の阻害によって説明できるだろう。

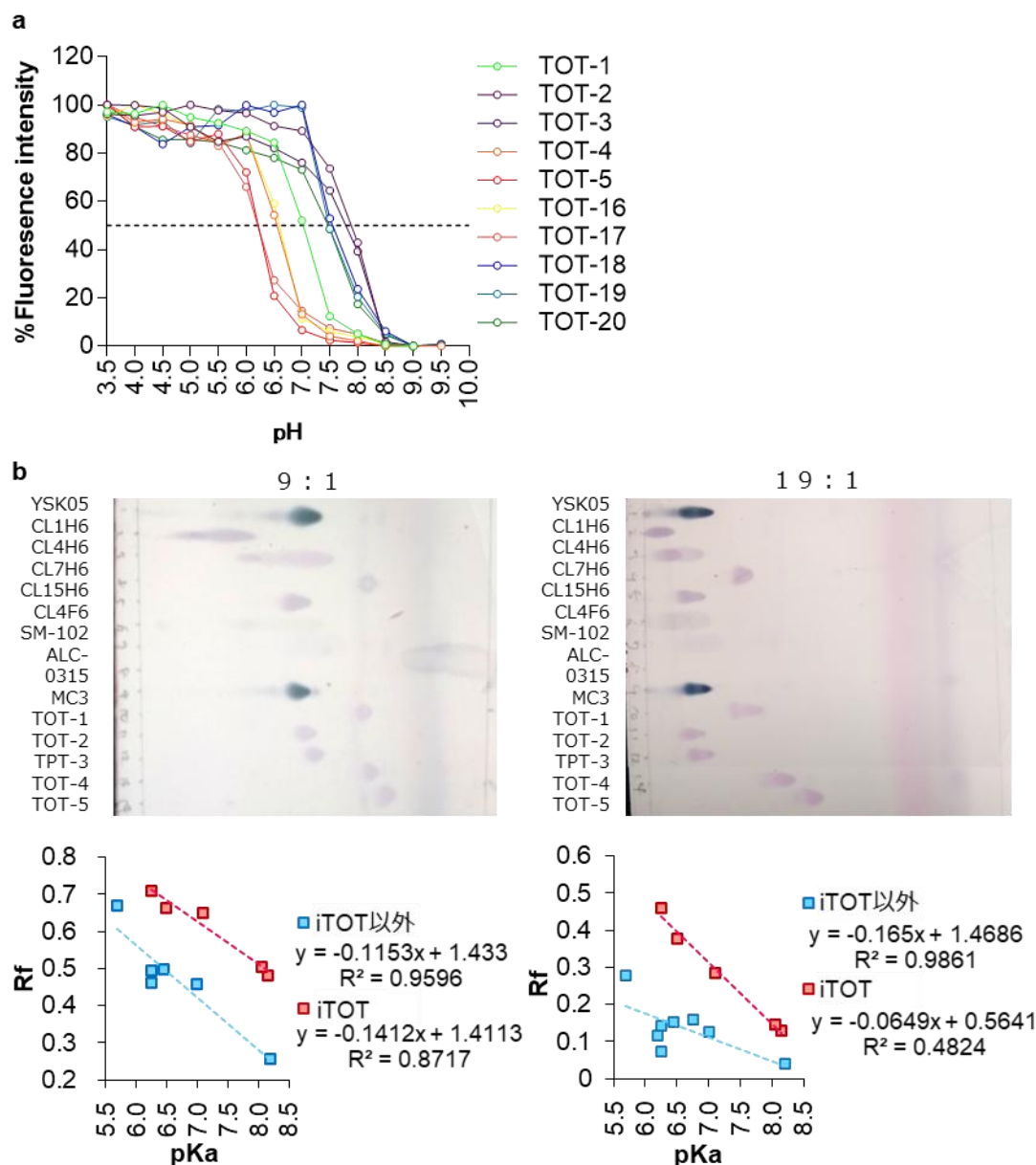


Fig. 7 iTOT の物理化学的な特徴。(a) iTOT-LNP の各 pH における蛍光強度を 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid: TNS アッセイにより測定した。見かけの pKa は、蛍光強度が最大値の 50% となる pH とした。脂質組成：iTOT/DSPC/コレステロール/DMG-*m*PEG_{2k} = 65:15:20:1.5 mol%。破線は蛍光強度の最大値の 50% を表す。(b) TOT-5 およびその他のイオン化脂質について、順相 TLC を用いて Rf 値を測定した。上段：各イオン化脂質はメタノールに溶解し、プレート上にスポットした後、DCM：メタノール=9:1 または 19:1 の有機溶媒中で展開した後、*p*-アニスアルデヒドで染色した。下段：Rf 値に対する見かけの pKa 値の関係をプロットした。

1-2-2 iTOT を含む LNP 脂質組成の事前検討

続いて iTOT を含有する LNP に mRNA を搭載し、*in vivo* における mRNA 発現効率を指標に脂質組成を検討した。通常 LNP の脂質組成はイオン化脂質、リン脂質、コレステロール、PEG 脂質から構成されるが、ここでは、イオン化脂質として iTOT ライブラリのう

ち pKa が最も低く血液循環内で LNP 表面が荷電しないと想定される TOT-5 を使用した。リン脂質として LNP に汎用される DSPC または DOPE を用いた。また、PEG 脂質として m PEG_{2k}-DMG (PEG-DMG) を使用した。核酸は Firefly Luciferase (Fluc) をコードした mRNA (mFluc、5moU 修飾、1929 ヌクレオチド、Trilink 社製) を使用した。また、LNP の調製方法としては北海道大学大学院工学研究院マイクロシステム化学研究室、渡慶次学教授・真栄城正寿准教授よりご供与頂いたマイクロ流体デバイスである invasive lipid nanoparticle production (iLiNP) device を使用し、脂質のエタノール溶液と mRNA の酢酸緩衝液を急速に攪拌混合することで製剤化した。得られた LNP は透析膜に入れ、D-PBS で 4℃、2 時間以上透析し精製した。LNP の物理化学的な特徴として粒子径、 ζ 電位、多分散度指数 (Pdl)、mRNA 封入率を評価した。In vivo での機能的 mRNA の発現として mFluc を搭載した LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与し 6 時間後に肝臓と脾臓を回収し、その発光強度をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

まず、DOPE をリン脂質として含有する LNP の検討を行った。脂質組成 TOT-5:DOPE: コレステロール:PEG-DMG = $X_1:Y_1:100-(X_1+Y_1):1.5$ (mol%) のうち TOT-5 含量 (X_1) を 50~65 mol%、DOPE 含量 (Y_1) を 5~40 mol% までの範囲で、合計 15 種類の LNP を評価した。LNP の物性値として個数平均粒子径は 73~117 nm、粒子径の分散性を表す Pdl は 0.08~0.21、mRNA 封入率は 15.5~90.8% の間にあった (Table 2)。

Table 2 DOPE を含有する TOT-5-LNP の物性 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率) および肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現量の値。

No.	%TOT-5 (X)	%DOPE (Y)	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA Encapsulation	Liver (RLU/mg protein)	Spleen (RLU/mg protein)
1	50	10	139	86	0.16	+3.3	84.7	1790334	169692
2	55	10	142	91	0.15	+3.5	71.5	5285127	318162
3	55	15	143	91	0.13	+3.0	57.0	13151375	619284
4	55	20	164	104	0.14	+3.4	45.8	3625574	622323
5	60	5	148	117	0.07	+3.7	73.4	1774508	303566
6	60	10	146	114	0.12	+2.6	45.7	6777171	505504
7	60	15	115	83	0.10	+2.9	80.0	6471842	501902
8	60	20	125	78	0.12	+3.2	70.1	9685911	824560
9	60	25	131	76	0.21	+4.4	84.5	1224494	402006
10	60	30	141	106	0.08	+3.9	51.5	277570	234362
11	60	35	132	103	0.07	+3.7	67.4	43075	172497
12	60	40	120	81	0.16	+3.9	90.9	2285	134288
13	65	10	158	116	0.11	+2.9	37.0	7368183	1388778
14	65	15	131	73	0.21	+3.1	76.2	5306849	295598
15	65	20	157	115	0.11	+3.1	15.5	4372189	364730

Average, n = 2。

さらに TOT-5 含量、DOPE 含量、粒子径を説明因子とし、肝臓における発現活性、脾臓における発現活性および肝臓に対する脾臓の発現活性の比である脾臓選択性を目的変数とした多変量解析を行った。多変量解析において説明因子に共線性が認められる場合、標準誤差が大きくみなされ有意な関係が得られなくなる。そのため、説明因子は多重共線性を持たないという前提で多変量解析が実行される。また、2 変数間の関係しかみない相関係数では多重共線性を評価することは不十分であり、分散拡大係数 (VIF) が多重共線性を評価する

最も一般的な指標として用いられる。VIF は 1 以上の値で、その値が大きいほど多重共線性の程度が強いことを示すが、実際に 3 つの説明因子の VIF を算出したところ 1.02~1.19 となり、多重共線性の懸念が低いことが示された。多変量解析では各目的変数に対して 3 つの説明因子の 1 次および 2 次の項について AIC 基準を用いた変数増減法を実施し変数を絞り込んだ。このとき、目的変数の値が数桁のオーダーで変動したため、直線性を確保するためにそれらに対数を置き換えて解析を行った。また、絞り込まれた説明因子については多重回帰分析によりモデル化した。その結果、DOPE の含量が 30 mol% までは脾臓よりも肝臓で遺伝子発現が高く、DOPE の含量が 15~20 mol% の範囲では肝臓における mRNA 発現活性が最大となり、それ以上では肝臓における遺伝子発現が著しく低下する傾向がみられた (Fig. 8a-c)。

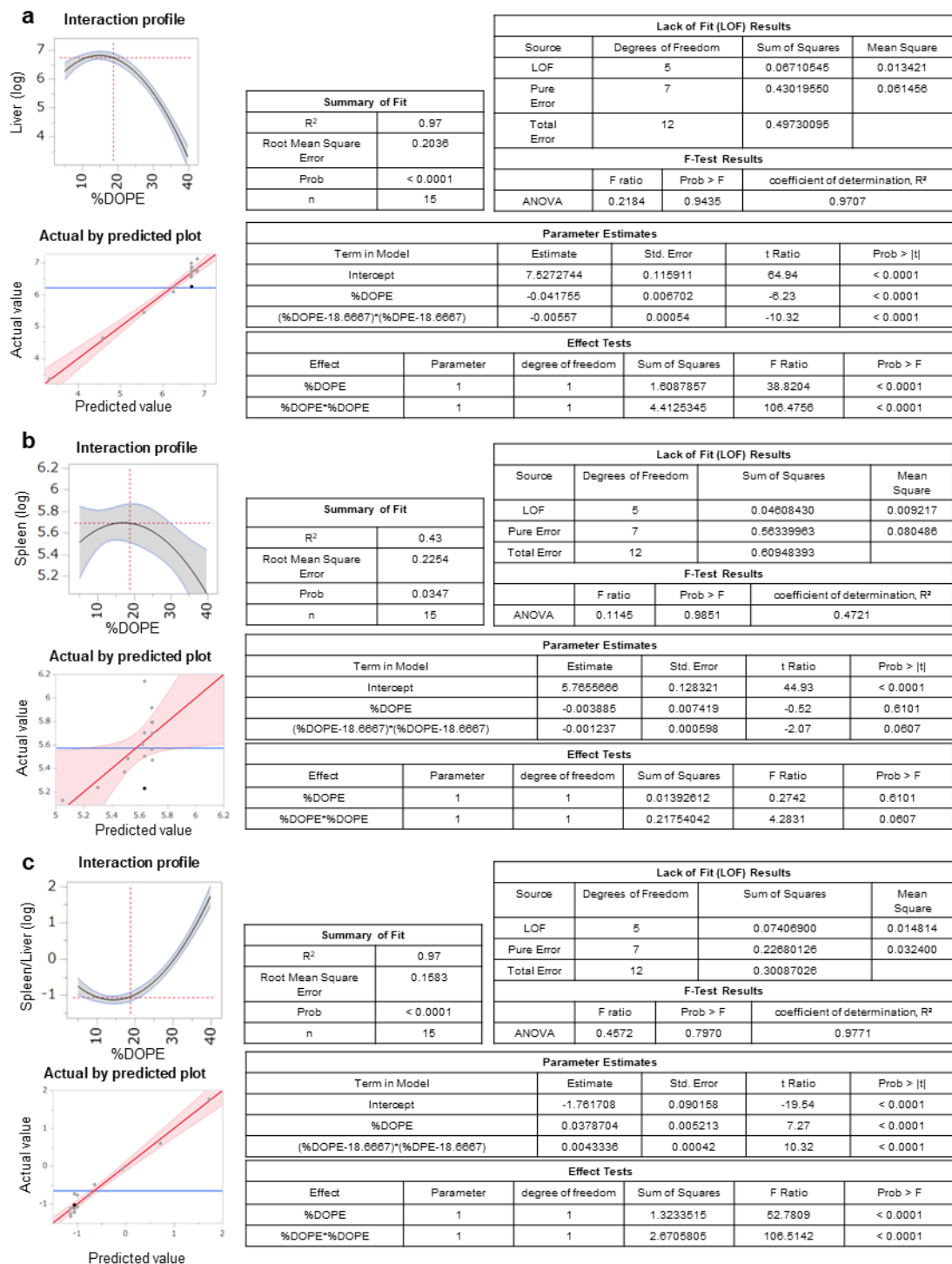


Fig. 8 DOPE を含有する TOT-5-LNP における各臓器の遺伝子発現を予測する多変量解析。(a) 肝臓、(b) 脾臓における遺伝子発現活性、および(c) 脾臓特異性を目的因子、TOT-5 の含量、DOPE の含量、個数平均粒子径を説明因子とした。Average、n = 2。

続いて、DSPC をリン脂質として含有する LNP の検討を行った。脂質組成 TOT-5: DSPC: コレステロール: PEG-DMG = $X_2: Y_2: 100 - (X_2 + Y_2): 1.5$ (mol%) のうち TOT-5 含量 (X_2) を

55～70 mol%、DSPC 含量 (Y₂) を 5～30 mol%までの範囲で、合計 15 種類の LNP を評価した。LNP の物性値として個数平均粒子径は 51～136 nm、PDI は 0.04～0.34、mRNA 封入率は 60.3～92.3%の間にあった (Table 3)。

Table 3 DSPC を含有する TOT-5-LNP の物性 (粒子径、 ζ 電位、PDI、mRNA 封入率) および肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現量の値。

No.	%TOT-5%DSPC		ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	PDI	ζ -Potential (mV)	%RNA Encapsulation	Liver (RLU/mg protein)	Spleen (RLU/mg protein)
1	55	15	106	47	0.34	+3.5	91.7	304086	562324
2	60	5	154	119	0.07	+3.3	67.5	7963602	1550149
3	60	10	149	111	0.15	+2.8	74.1	1057042	3507427
4	60	15	123	89	0.12	+3.2	86.4	78346	2974277
5	60	17.5	142	96	0.14	+3.6	82.6	172389	1853599
6	60	20	144	87	0.14	+3.5	83.4	58649	1135026
7	60	22.5	159	92	0.15	+3.5	75.4	38157	1236216
8	60	25	112	61	0.15	+3.9	90.0	12832	404740
9	60	30	90	51	0.22	+2.6	92.3	1876	148410
10	65	5	148	114	0.08	+3.5	60.3	8433067	3291173
11	65	10	104	79	0.10	+3.6	86.3	2457863	2005399
12	65	15	162	123	0.07	+3.0	73.6	194759	5904138
13	70	5	158	136	0.04	+3.7	68.0	5664806	1237124
14	70	10	165	111	0.12	+3.0	71.0	758183	3921351
15	70	15	165	103	0.15	+3.8	75.7	169212	2753683

Average, n = 2

さらに VIF が 1.38～1.58 となり多重共線性の懸念が低い TOT-5 含量、DSPC 含量、粒子径を説明因子、肝臓、脾臓における発現活性および脾臓選択性を目的変数にした多変量解析を行ったところ (Fig. 9a-c)、肝臓における遺伝子発現活性は DSPC 含量の増加に伴い顕著に低下した一方で、脾臓においては DSPC 含量が約 15 mol%で最大を示すことが明らかになった。また、脾臓選択性は DSPC 含量に依存して上昇した (Fig. 9a-c)。

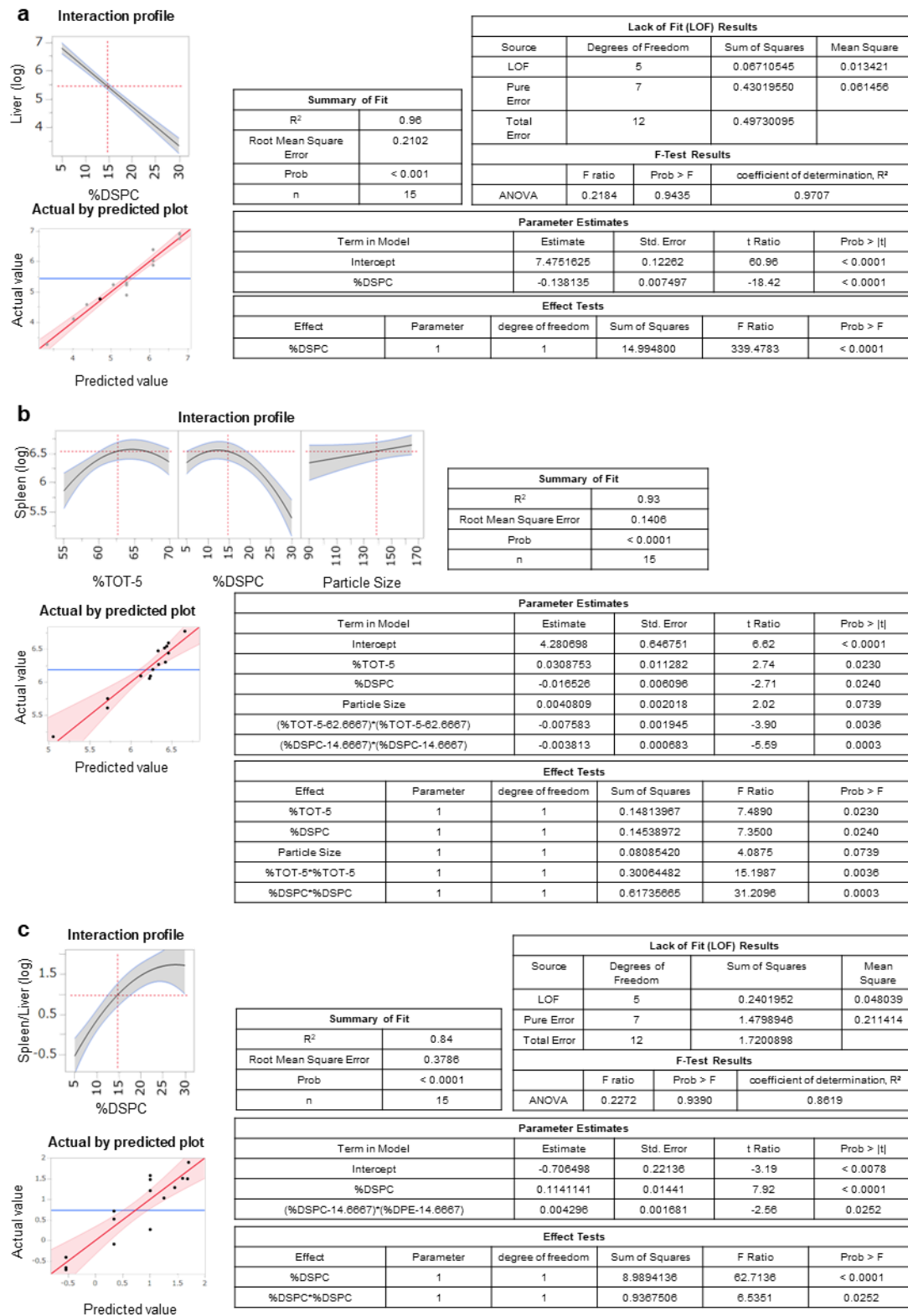


Fig. 9 DSPC を含有する TOT-5-LNP における各臓器の遺伝子発現を予測する多変量解析。(a) 肝臓、(b) 脾臓における遺伝子発現活性、および(c) 脾臓特異性を目的因子、TOT-5 の含量、DSPC の含量、個数平均粒子径を説明因子とした。Average、n = 2

実際に、DSPC 含量 3~20 mol% の 5 種の TOT-5-LNP は DSPC 含量依存的に遺伝子発現が肝臓から脾臓へ劇的にシフトした (Table 4、Fig. 10)。まとめると、TOT-5-LNP において、リン脂質の種類および含量が臓器選択的な mRNA 送達に影響を与える主要な因子であった。また、TOT-5-LNP でみられた 2 種のリン脂質間の標的となる臓器の違いは、リン脂質として DOPE を使用した LNP では肝臓へ mRNA を送達する一方で、DSPC を使用した LNP では脾臓特異的な mRNA 送達を示した以前の報告と一致していた [69]。

Table 4 DSPC 含量が異なる TOT-5-LNP の物性値 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率)。

Ionizable lipid	%DSPC	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA Encapsulation
TOT-5	0	136	91	0.15	-0.76	63.2
TOT-5	3	128 $\pm$ 20	93 $\pm$ 23	0.10 $\pm$ 0.05	+2.6 $\pm$ 1.4	85.3 $\pm$ 6.3
TOT-5	5	118 $\pm$ 2.3	92 $\pm$ 10	0.08 $\pm$ 0.06	+1.8 $\pm$ 1.0	89.1 $\pm$ 6.5
TOT-5	10	113 $\pm$ 15	83 $\pm$ 13	0.09 $\pm$ 0.06	+3.4 $\pm$ 0.4	91.4 $\pm$ 4.6
TOT-5	15	109 $\pm$ 8	80 $\pm$ 12	0.11 $\pm$ 0.08	+1.8 $\pm$ 1.5	90.3 $\pm$ 7.0
TOT-5	20	111 $\pm$ 16	84 $\pm$ 12	0.07 $\pm$ 0.06	+2.1 $\pm$ 1.2	91.5 $\pm$ 5.0

脂質組成：TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% (x = 3~15 mol%) Average $\pm$ SD、n = 1-13。

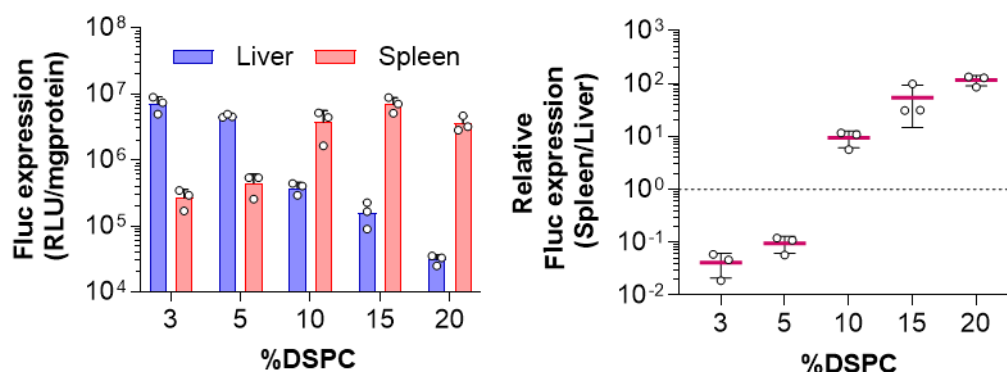


Fig. 10 DSPC 含量に依存した遺伝子発現シフト。左: mFluc を搭載した TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% (x = 3~15 mol%) で構成される LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに静脈内投与し、6 時間後の肝臓および脾臓におけるルシフェラーゼ発現量をルシフェラーゼアッセイにて測定した。右: 肝臓に対する脾臓のルシフェラーゼ発現量の比を算出し脾臓特異性とした。Average $\pm$ SD、n = 3。Relative Light Units: RLU は相対光単位。

1-2-3 iTOT を含む LNP の物理化学的な特徴評価

TOT-5 を含有した LNP で DSPC を 3 mol% 含有し肝臓指向性をもつ LNP および 15 mol% 含有し脾臓指向性を持つ LNP をそれぞれ 3%DSPC、15%DSPC と定義した。両製剤の臓器指向性の違いを考察するために、LNP 表面の物理化学的な特徴を評価した。リン脂質としてシリンダー型の立体構造をとる DSPC やスフィンゴミエリンを多く含有する LNP 表面には明確なラメラ構造あるいは曲率の異なる構成脂質の相分離に由来するブレブ構造が

しばしば観察される[70, 71]。そこで、3%DSPC と 15%DSPC との形態的な違いをクライオ電子顕微鏡により観察したところ、両製剤でブレブ構造は観察されず、顕著な違いは認められなかった (Fig. 11a)。組織指向性が顕著に違うにもかかわらず、界面構造の形態に違いが観察されなかったことは、異なるアプローチによるメカニズム解析の重要性を示している。そこで、LNP 表面の荷電性に着目し、異なる iTOT をイオン化脂質として含有する LNP の DSPC 依存的な組織指向性変化を評価した。3%DSPC と 15%DSPC の 2 つの脂質組成に対して iTOT のうち TOT-1~5 および TOT-16 を組み合わせた LNP に mFluc を搭載し 0.01 mg/kg で静脈内投与した後、肝臓および脾臓のルシフェラーゼ発現を測定し、肝臓に対する脾臓の発光強度の差を比較した。その結果、pKa が 6.2~8.0 までの範囲の中で pKa が 7.1 以下の LNP においては、3%DSPC 組成では脾臓よりも肝臓の遺伝子発現が高くなり、15%DSPC 組成では脾臓特異的な遺伝子発現を示した。一方で pKa が 7.8 以上の LNP においては 3%DSPC 組成の肝臓指向性が消失した。また、各 iTOT-LNP における 3%DSPC 組成と 15%DSPC 組成の肝臓に対する脾臓の発光強度の比の変化量を解析したところ、iTOT-LNP の pKa が高くなるにつれて DSPC 依存的な組織指向性変化が消失した (Table 5、Fig. 11b)。即ち、最も低い pKa を示す TOT-5 を含有した LNP が DSPC 含量に応じた組織選択性を最も顕著に変化させた。TOT-5 を含有する LNP の pKa は 6.2 であり、血液循環においてほぼ荷電していないと考えられ、電氣的に中性である性質が LNP の脾臓指向性に重要であると示唆された。

Table 5 3%DSPC および 15%DSPC における iTOT-LNP の物性値 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率、見かけの pKa)。

%DSPC (X)	iTOT	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA encapsulation	pKa
3	TOT-1	107	55	0.33	+1.9	91.3	7.1
3	TOT-2	154	50	0.45	+4.4	96.6	7.9
3	TOT-3	103	46	0.33	+1.9	95.3	7.8
3	TOT-4	144	88	0.20	+3.2	85.5	6.5
3	TOT-5	106	64	0.13	+1.0	81.1	6.2
3	TOT-16	134	66	0.26	+2.6	91.2	6.5
15	TOT-1	157	84	0.16	+4.8	91.8	6.9
15	TOT-2	113	31	0.34	+1.2	94.9	8.0
15	TOT-3	143	26	0.44	+2.0	91.3	7.9
15	TOT-4	139	48	0.19	+5.4	78.2	6.5
15	TOT-5	114	72	0.22	+2.5	87.5	6.2
15	TOT-16	157	87	0.20	+4.0	58.3	6.5

脂質組成: TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% (x = 3 または 15 mol%) Average、n = 3~6。

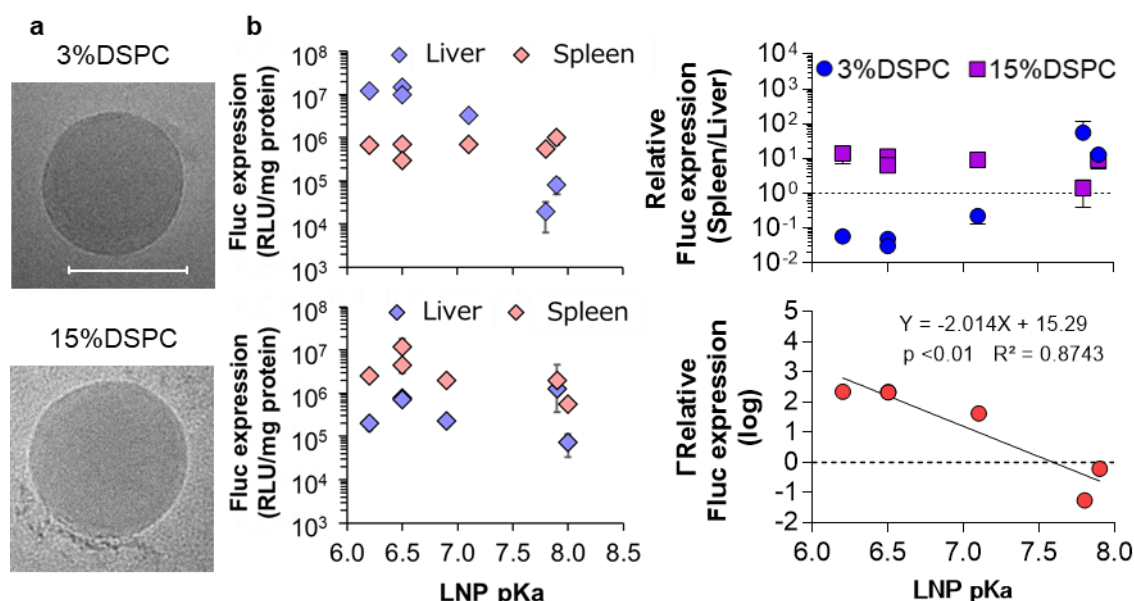


Fig. 11 3%DSPC および 15%DSPC の形態的特徴と表面電荷と DSPC 依存的な臓器指向性の関係。(a) 上段：3 %DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65 : 3:32:1.5 mol%、下段：15%DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%から構成される LNP の代表的なクライオ TEM 画像。スケールバーは 100 nm。(b) iTOT/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% (x=3 または 15 mol%) から構成される iTOT-LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、左上：肝臓および、左下：脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。右上：肝臓に対する脾臓のルシフェラーゼ発現量の比を算出し脾臓特異性とした。右下：3%DSPC に対する 15%DSPC の脾臓特異性の比 (Γ) を算出した。Average $\pm$ SD、n = 3。

また、足場構造の異なるホスホコリン基をもつリン脂質 (PC) を 15mol%含有する LNP についても組織指向性を比較した。足場構造が飽和脂肪酸のみからなる PC である 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) を含有した LNP は DSPC と同様に脾臓指向性を示した一方で、不飽和脂肪酸を含む 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) や 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を含有した LNP では脾臓指向性が消失した (Table 6, Fig. 12a)。脂質の流動性が低いゲル相から流動性の高い液晶相への相転移温度は飽和 PC である DPPC で 41°C、DSPC で 55°Cと体内温度よりも高い値を示す一方で、不飽和 PC である POPC で -2°C、DOPC で -20°Cと低い値を示す。また、不飽和 PC と比べて足場構造にシス二重結合を含まない飽和 PC では、脂質膜が密にパッキングされ、脂質膜と周囲の水分子との相互作用が減少し、水和度が低下することが知られている [72]。したがって、飽和 PC を豊富に含む LNP 膜は脂質の流動性が低く疎水的であり、この性質が脾臓指向性に関与すると示唆された (Fig. 12b)。

Table 6 リン脂質の足場構造が異なる LNP の物性値 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率)。

PC	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA encapsulation
DPPC	101 $\pm$ 10	84 $\pm$ 8	0.03 $\pm$ 0.02	+2.6 $\pm$ 1.4	89.0 $\pm$ 1.2
POPC	86 $\pm$ 9.4	56 $\pm$ 7	0.16 $\pm$ 0.02	+1.6 $\pm$ 1.4	72.2 $\pm$ 8.1
DOPC	101 $\pm$ 6.9	71 $\pm$ 5	0.10 $\pm$ 0.01	+2.7 $\pm$ 0.4	83.9 $\pm$ 4.2

脂質組成: TOT-5/PC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol% (PC = DSPC、DPPC、POPC、DOPC)。Average $\pm$ SD、n = 3。

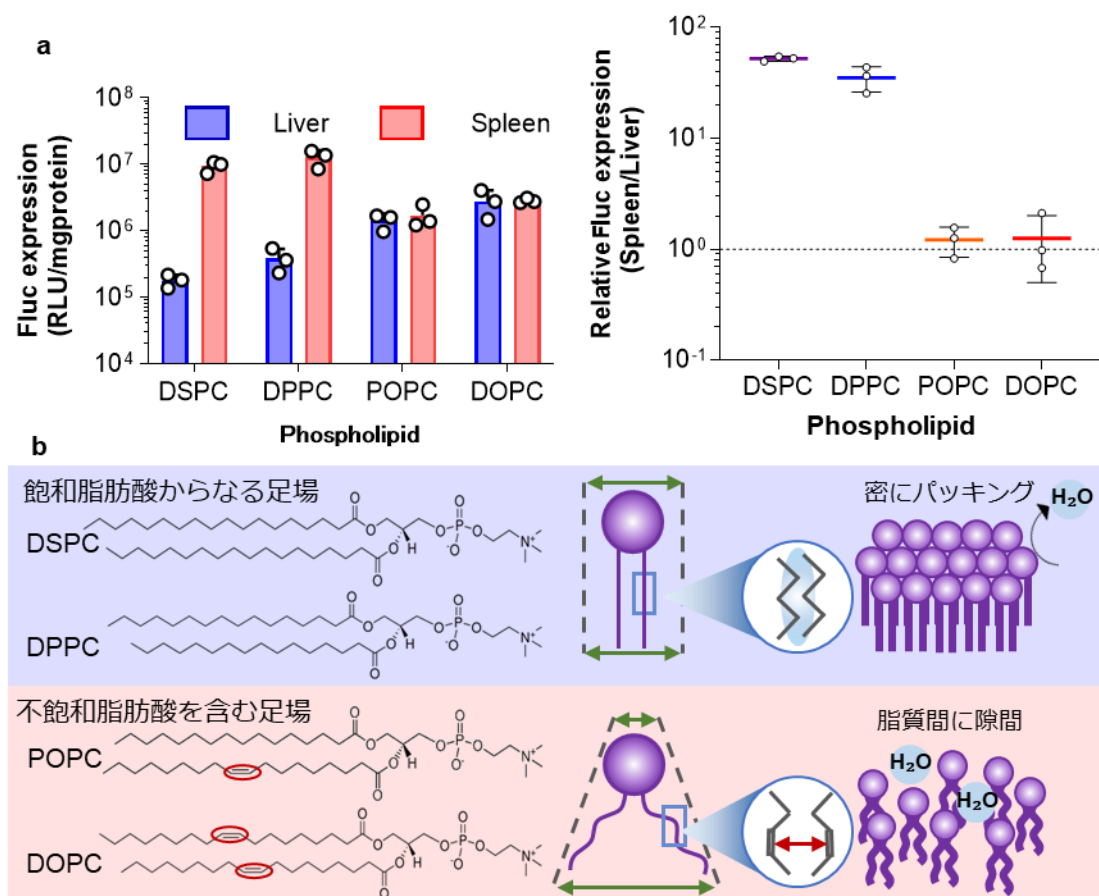


Fig. 12 リン脂質の足場構造がLNPの脾臓指向性に与える影響。(a) 左: 脂質組成: TOT-5/PC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol% (PC = DSPC、DPPC、POPC、DOPC) から構成される LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、肝臓および脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。Average $\pm$ SD、n = 3。右: 肝臓に対する脾臓のルシフェラーゼ発現量の比を算出し脾臓特異性とした。Average $\pm$ SD、n = 3。(b) 飽和 PC と不飽和 PC の脂質構造および形状と脂質膜の特性。

LNP 界面の微細な構造変化や LNP が曝される溶媒との相互作用を評価するため、蛍光プローブを用いた分光法が利用されている。このうち、6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene: (Laurdan) は励起状態において双極子モーメントの増大がみられるが、周囲の極性環境により双極子モーメントが変化する。パッキングが密で脂質の流動性が低い脂質膜では極性溶媒である水分子との接触が抑制されるため、双極子の再配向が遅延する。その結果、蛍光スペクトルのピークは高エネルギー側にシフトする。対してパ

ッキングが疎で脂質の流動性が高い脂質膜では水分子と容易に接触し蛍光スペクトルが低エネルギー側にシフトする。親水基および炭化水素鎖を持つ Laurdan は両親媒性であり、脂質膜と水分子の境界に配置されるため、脂質界面の水分子との相互作用を反映する[73]。Laurdan の蛍光スペクトルのパターン変化から算出される generalized polarization: (GP) は脂質膜の水和度を評価する指標となることが知られており、値が高くなるほど水和度の低下を示す[74]。一方で、9-(2-carboxy-2-cyanovinyl)julolidine: (DCVJ) は励起状態において分子内のシグマ結合が回転するが、周囲の粘性が低く自由に分子内回転する場合、励起エネルギーが失われ蛍光を発さなくなる。周囲の微小環境の粘性が高くなり回転運動が抑制されると蛍光を放つ。DCVJ は疎水性の官能基に富み、脂質膜の炭化水素鎖に挿入される[75]。DCVJ の蛍光強度の消失から算出される fluorescence-absorption ratio: (R) 値は粘度の指標になることが知られており[76]、値が高くなるほど膜粘度の増加を示す(Fig. 13a~c)。

TOT-5 を含有する LNP について DSPC 含量の増加に伴い、膜水和度の指標である GP 値が上昇し、15%DSPC で最大値を示した。また、PC 含量が同じ場合、DSPC や DPPC といった飽和 PC を含有する LNP よりも POPC や DOPC といった不飽和 PC を含有する LNP で GP 値が高くなった。GP 値の増加は膜水和度の低下を示すため、TOT-5-LNP は DSPC 含量の増加によってあるいは不飽和 PC よりも飽和 PC を使用したとき、LNP は疎水的な界面をとることが示唆された。一方で、DCVJ を用いた膜粘度測定では、TOT-5-LNP は DSPC 含量の増加によって膜粘度の指標である R 値が上昇し、不飽和 PC よりも飽和 PC を使用した場合、R 値は高くなった(Fig. 13b)。このことから、DSPC 含量の増加によってあるいは不飽和 PC よりも飽和 PC を使用したとき、LNP は剛直な界面をとることが示唆された。

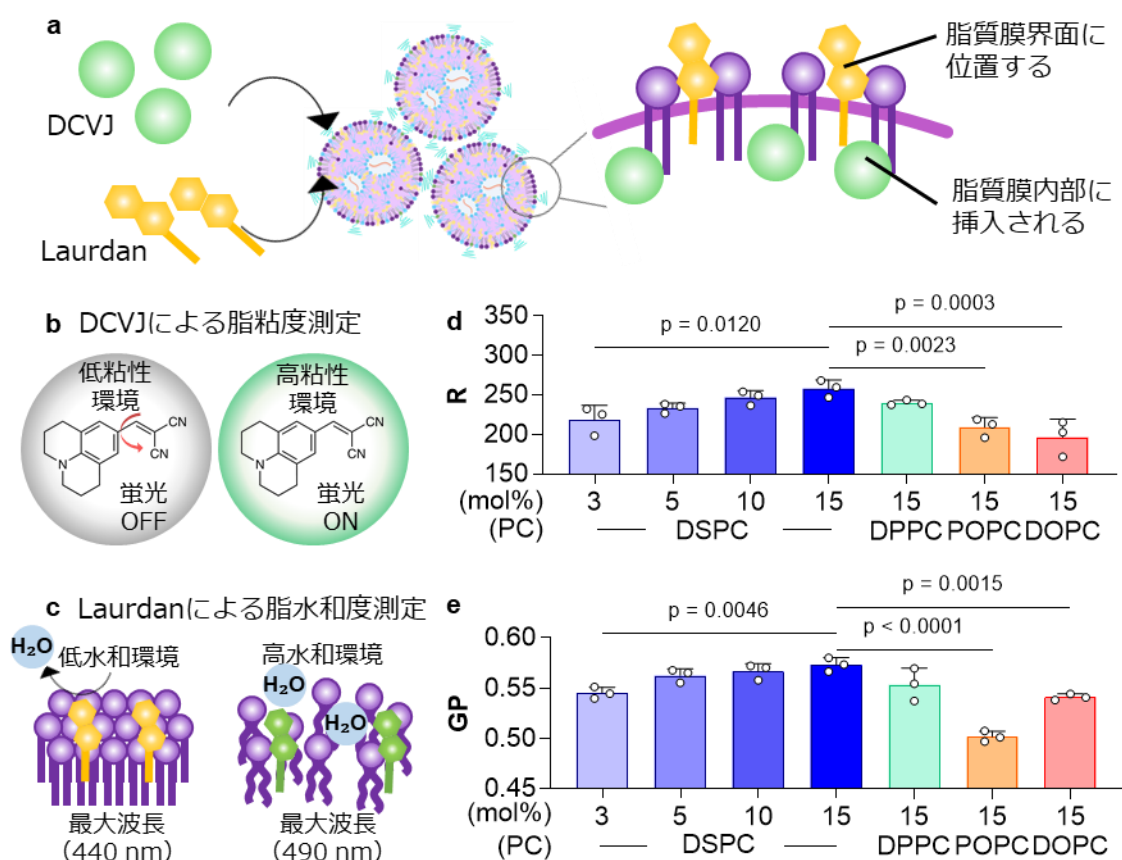


Fig. 13 蛍光プローブを用いたLNP膜の粘度、水和度の評価。(a) DCVJおよびLaurdanの脂質膜での位置関係。(b) DCVJは微小環境における粘性に従って蛍光のON、OFFを切り替える。蛍光強度の消失から算出されるR値は膜粘度の指標となる。(c) Laurdanは脂質界面の極性環境を検出し、水和環境によって蛍光波長の最大値が異なる。蛍光スペクトルのパターン変化から算出されるGP値は膜水和度の指標となる。TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% (x = 3~15 mol%) および TOT-5/PC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol% (PC = DPPC、POPC、またはDOPC) で構成されるLNPを(d) Laurdan標識した後、37°CにおけるGP値を測定した。Average +SD, one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs 15%DSPC), n = 3。(e) DCVJ標識した後、37°CにおけるR値を測定した。Average +SD, one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs 15%DSPC), n = 3。

1-2-4 iTOTを含むLNPの生体内分布

3%DSPCと比べて15%DSPCは肝臓における遺伝子発現が顕著に低下したが、これは、3%DSPCと比べ15%DSPCは肝臓への集積が抑えられるあるいは、肝臓において取り込まれる細胞の種類がLNP間で異なるためであると考えられた。両製剤の肝臓内分布を調査するため、DiD蛍光標識したLNPを静脈内投与し、1時間後の肝臓へのDiD集積を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy : CLSM) にて観察した。その結果、3%DSPCは血管に囲われた肝実質細胞とみられる領域に集積した一方で、15%DSPCは肝実質細胞とみられる領域への集積が認められず、血管やマクロファージに該当する領域でのみ集積が観察された (Fig. 14a)。肝臓を標的とする従来のLNP製剤は血液循環中にApoEと結合し、その受容体であるLDL-Rを高発現する肝実質細胞に移行することが知ら

れている[35, 38, 39]。そのため、3%DSPC と 15%DSPC で肝臓移行に対する ApoE の関与が異なることが示唆された。そこで、両製剤の臓器送達における ApoE 依存性を調べた。mFluc を搭載した LNP を野生型または ApoE 欠損マウスに静脈内投与した後、肝臓および脾臓のルシフェラーゼ発現を測定した結果、3%DSPC では野生型と比較して ApoE 欠損マウスで肝臓における遺伝子発現が著しく低下した一方で、15%DSPC ではマウス間で肝臓または脾臓における遺伝子発現に差はなかった (Fig. 14b)。即ち、3%DSPC の肝臓移行性は ApoE に大きく依存した一方で、15%DSPC は両臓器において ApoE の関与は認められなかった。また、3%DSPC の脾臓における遺伝子発現は ApoE 欠損により増強されず、15%DSPC に及ばなかった。即ち、15%DSPC は ApoE 結合の減少による肝クリアランスの低下によって受動的に脾臓へ移行したわけではなく、脾臓への積極的な移行メカニズムの存在が示唆された。

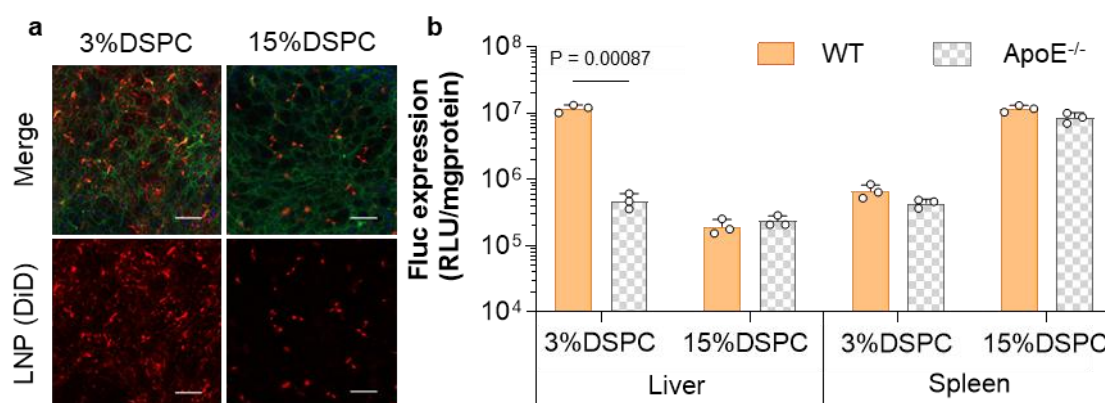


Fig. 14 肝臓への TOT-5-LNP の動態評価。(a) LNP の肝臓内分布観察。DiD 標識 3%DSPC または 15% DSPC をマウスに投与し、1 時間後に、Nikon A1 CLSM を用いて LNP の肝臓内分布を観察した。DiD (LNP) : 赤、FITC (血管) : 緑、Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 100 μ m。 (b) mFluc 搭載 3%DSPC および 15%DSPC を 0.01 mg/kg の用量で野生型 (WT) および ApoE 欠損 BALB/c マウス (ApoE^{-/-}) に投与し肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。Average+SD、multiple student's t-test、n = 3。

次に、TOT-5-LNP が DSPC 含量に従って脾臓のうちの免疫細胞に取り込まれるのか調査した。DiD 蛍光標識した LNP を静脈内投与し、1 時間後に脾臓由来の B 細胞 (CD19⁺)、T 細胞 (CD3⁺)、NK 細胞 (CD49b⁺)、好中球 (Ly6G⁺CD11b⁺) および樹状細胞 (I-A/I-E⁺CD11c⁺) への DiD 取り込みをフローサイトメトリー (flow cytometry: FCM) を用いて測定した (Fig. 15)。

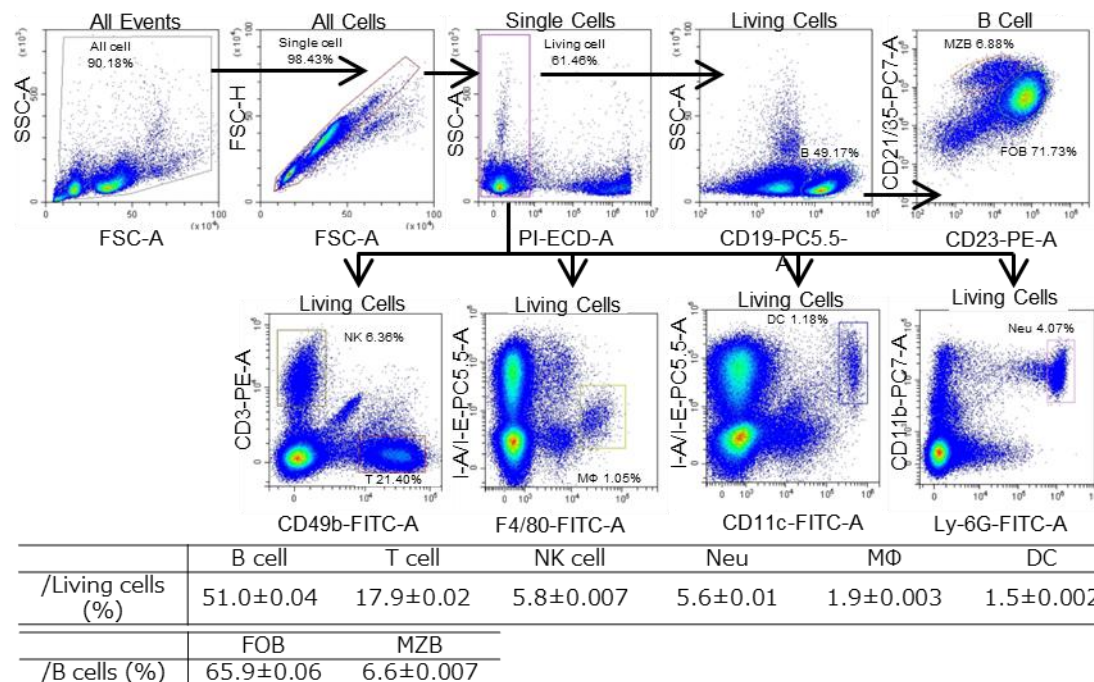


Fig. 15 脾臓免疫細胞における各細胞の定義とその構成割合。Neu は好中球、MΦはマクロファージ、DC は樹状細胞、FOB は濾胞樹状細胞、MZB は辺縁帯 B 細胞をそれぞれ表す。Average±SD, n = 8~12。

脾臓免疫細胞への LNP 取り込みの全体像を把握するために、脾細胞に対する各免疫細胞の存在割合を算出し、1 細胞あたりの DiD 蛍光強度の平均値を乗じることで、各免疫細胞における LNP 取り込みを評価した。その結果、T 細胞や NK 細胞、好中球への取り込みは最小限であり、マクロファージ (MΦ) や樹状細胞 (DC) では DSPC 含量非依存的な細胞取り込みを示した。一方で、B 細胞は DSPC 含量の増加に伴って細胞取り込みが顕著に増加し、15% DSPC において B 細胞への取り込みが最大となった (Fig. 16a)。また、脾臓 B 細胞への機能的 mRNA 発現を測定するために、mFluc を搭載した LNP を 0.1 mg/kg で投与し、6 時間後に脾臓を回収し、磁気細胞分取 (magnetic cell sorting: MACS) を用いて B 細胞を 1×10^7 cells 分取し、ルシフェラーゼ発現を測定した。その結果、DSPC 含量の増加に伴って B 細胞における遺伝子発現が増加し 15mol% で最大に達しており、脾臓 B 細胞への取り込み量の増加は同細胞における遺伝子発現量を反映した (Fig. 16b)。15% DSPC において、B 細胞 1×10^7 cells あたりの発光量は、脾臓全体の発光量の 4 割に該当した。B 細胞は脾臓免疫細胞 ($\sim 10^8$ cells) の約半数であることを考えると、脾臓全体の遺伝子発現に対する B 細胞の寄与率は大きいことが分かった。

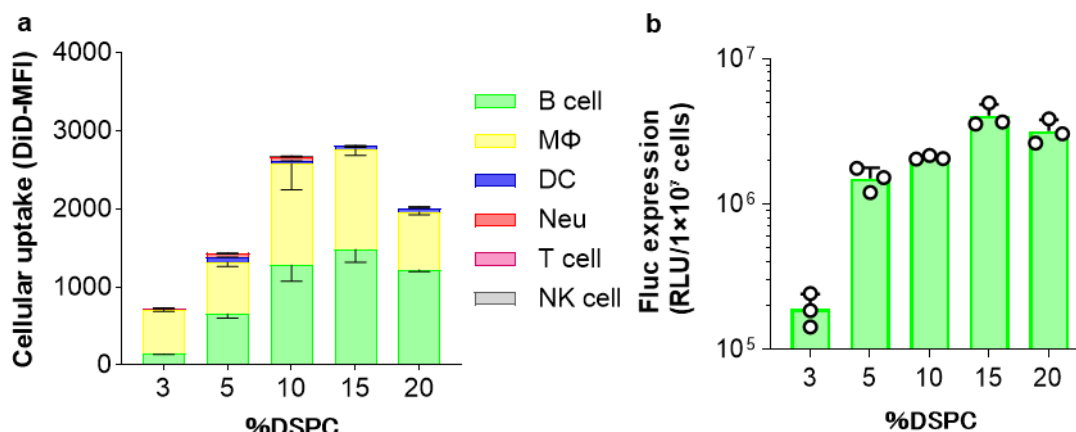


Fig. 16 脾臓免疫細胞への TOT-5-LNP の取り込みおよび B 細胞における遺伝子発現の寄与。(a) TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% ($x = 3 \sim 15$ mol%) から構成される DiD 標識した LNP をマウスに投与し、1 時間後に脾臓免疫細胞への取り込みを FCM により測定した。各細胞種における DiD 平均蛍光強度 (MFI) を免疫細胞の構成割合で乗じた。Neu は好中球、MΦ はマクロファージ、DC は樹状細胞をそれぞれ表す。Average-SD, $n = 3$ 。(b) mFluc を搭載した TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:x:35-x:1.5 mol% ($x = 3 \sim 15$ mol%) から構成される LNP をマウスに投与し、6 時間後に脾臓 B 細胞を MACS により単離し、ルシフェラーゼ発現量を測定した。B 細胞 1×10^7 cells あたりの RLU で表した。Average+SD, $n = 3$ 。

これまでに、B 細胞を標的としたナノ粒子が報告されており、その移行メカニズムとして補体-補体受容体を介することが知られている[43, 44]。15%DSPC の B 細胞移行にも補体の関与が予想された。そこで、補体を不活化した血清下における B 細胞への LNP 取り込み阻害を検証した。DiD 蛍光標識した 3%DSPC または 15%DSPC とマウス由来の血清を混合し、37°C、1 時間静置した後、マウスの脾細胞から MACS を使用して分取された B 細胞を加え、37°C、30 分間静置し、B 細胞への LNP 取り込みを FCM により測定した。なお、補体を不活化した血清として、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加し補体分解のカスケードを阻害した血清、または 56°C で 30 分間加熱し、補体機能を失活させた血清を用意した。その結果、新鮮なマウス血清下において、3%DSPC と比べて 15%DSPC は多く取り込まれた。一方で、その取り込みは EDTA を添加した血清および非働化した血清下において著しく低下した。3%DSPC は使用した血清間で取り込み量に有意な差はなかった(Fig. 17)。以上より、15%DSPC の B 細胞への取り込みには補体が関与すると示唆された。

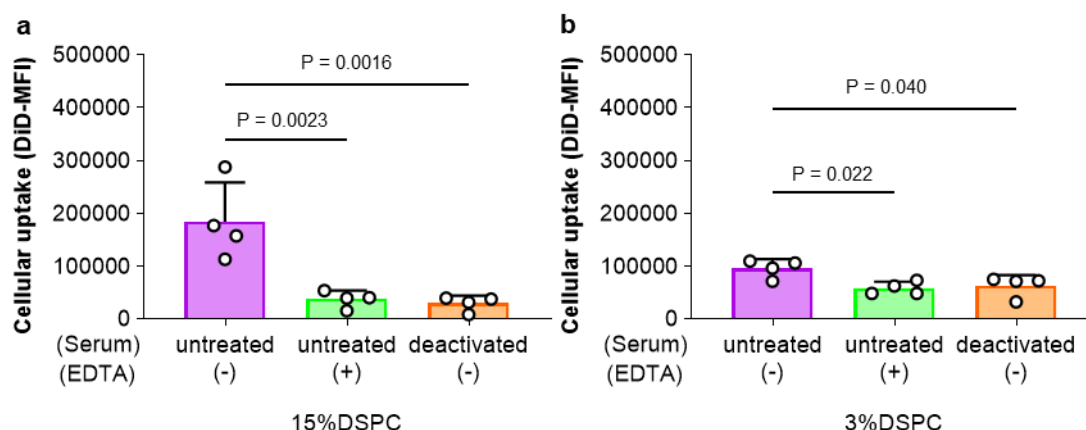


Fig. 17 補体による脾臓 B 細胞への LNP 取り込みへの関与。新鮮なマウス由来の血清、EDTA を添加した血清および非働化した血清下における、(a) 15%DSPC および (b) 3%DSPC の脾臓 B 細胞への取り込みを FCM により測定した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs. EDTA 非添加で加熱未処理の新鮮な血清条件)、n = 4。

加えて、DSPC 含量依存的な臓器選択性の変化が一般的な現象であることを検証した。mFluc を搭載した 3 種類の承認イオン化脂質、即ち、MC3、ALC および SM を含有する LNP を投与し、肝臓および脾臓の遺伝子発現を測定したところ、いずれのイオン化脂質も TOT-5 と同様に DSPC 含量依存的に機能的 mRNA 導入が肝臓から脾臓へシフトした (Table 7, Fig. 18a~c) 一方で、脾臓特異性はイオン化脂質の種類にある程度依存することを示した (Fig. 18d)。

Table 7 承認イオン化脂質を用いた DSPC 含量が異なる LNP の物性値 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率)。

Ionizable lipid	%DSPC	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA Encapsulation
MC3	5	133	72	0.17	+2.2	98.0
MC3	10	148	82	0.20	+1.5	95.8
MC3	15	90	51	0.18	+3.8	96.6
MC3	20	148	114	0.21	+2.2	93.8
SM	5	144	38	0.15	+1.3	96.5
SM	10	131	83	0.17	+2.0	96.8
SM	15	129	75	0.15	+1.2	95.8
SM	20	108	52	0.24	+2.0	96.5
ALC	5	150	119	0.093	+1.3	82.5
ALC	10	117	52	0.26	+2.1	95.0
ALC	15	95	51	0.20	+1.3	97.6
ALC	20	90	45	0.23	+2.2	93.2

脂質組成：イオン化脂質/PC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol% (イオン化脂質 = DLin-MC3-DMA (MC3)、SM-102 (SM)、ALC-0315 (ALC)) Average、n = 3。

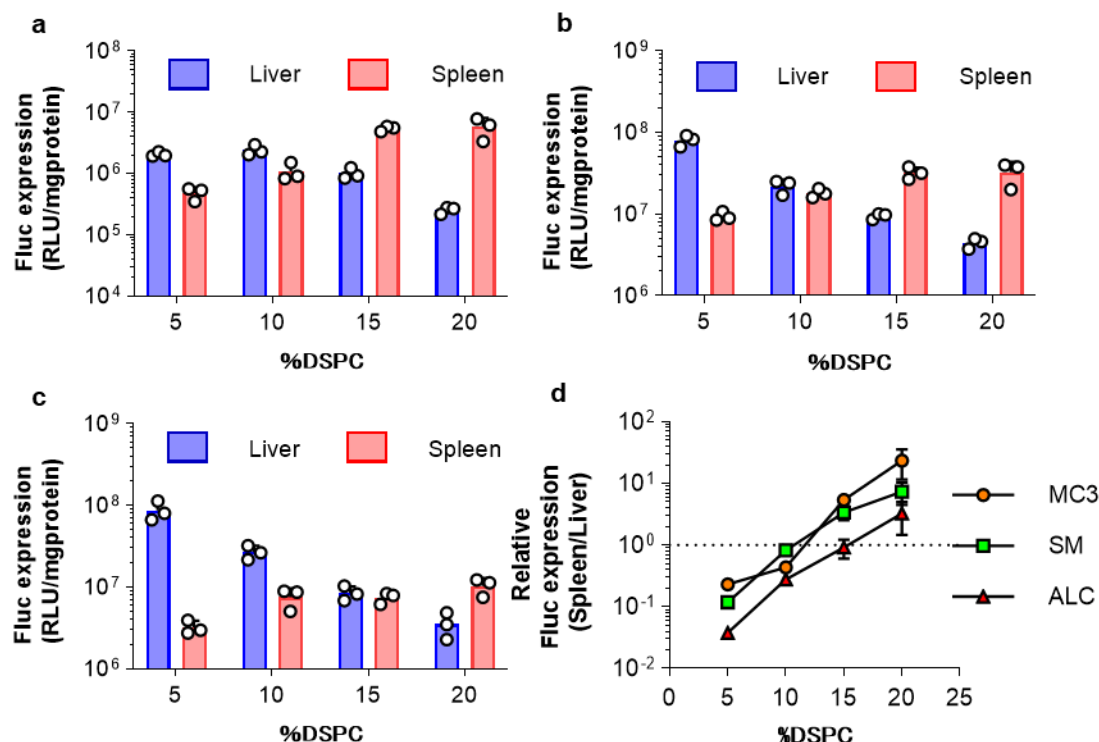


Fig. 18 DSPC 含量依存的な臓器指向性の一般性の検証。承認イオン化脂質として (a) MC3、(b) SM、(c) ALC を含有するイオン化性脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:x:50-x:1.5 mol% (x = 5~20 mol%) で構成される LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。Average±SD, n = 3。 (b) 各 LNP 製剤において、肝臓に対する脾臓のルシフェラーゼ発現量の比を算出し脾臓特異性とした。Average±SD, n = 3。

1-2-5 生体分子コロナ調製サンプルの確立と解析

続いて、全身投与された LNP が血液中のタンパク質と相互作用し形成する生体分子コロナを解析するためにマウス血液由来のタンパク質源と LNP を混合し、形成されるタンパク質-LNP 複合体の回収および精製方法の確立を行った。ナノ粒子に形成する生体分子コロナを解析したこれまでの報告では、タンパク質源として血清を使用した報告が最も多く、血漿の使用がそれに次いでいる [77-79]。血清か血漿、あるいは血漿であっても使用する血液凝固の阻害剤の違いにより生体分子コロナの組成が大きく変化することが知られている [80, 81]。また、血清は血液凝固の後の溶液画分であり、血漿と比べてフィブリンノーゲンが除去されている。したがって、血漿は血清よりもマウス体内における血液組成を再現していると考えられる。一方で、二価の陽イオンをキレートする EDTA を使用し血液凝固反応を停止させて得られた EDTA 血漿は血液凝固のみならず補体の分解カスケードも停止するため、*in vivo* での補体に関連した反応を必ずしも反映しないと考えられる。そこで、本研究ではタンパク質源として血漿および血清を相互補完的に用いて生体分子コロナを形成し、その組成をプロテオーム解析した。

また、タンパク質源とナノ粒子の混合後、サンプル中には LNP に吸着していない遊離タ

ンパク質や生体由来のリポタンパク質が含まれているため、正確なプロテオーム解析のためにサンプルを精製し生体分子コロナに由来するタンパク質のみを得る必要がある。生体分子コロナを解析したこれまでの報告では、超遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) あるいは磁性カラムを使用した精製が主に行われているが[79, 82]、磁性素子を含まない LNP 製剤において、いずれか 1 つの精製法のみだと生体分子コロナに由来しないタンパク質が夾雑し、ノイズにまみれた解析結果となる可能性が考えられた。そこで、本研究の精製方法としては、エクソソーム分離用の SEC によって LNP に吸着していない遊離タンパク質と分離させた後、スクロース溶液を用いて LNP よりも比重が大きなエクソソームが沈降する密度にして超遠心分離することで、上清に浮上した LNP 複合体を回収した (Fig. 19)。エクソソームの比重は 1.10~1.18 g/mL の範囲であり、スクロース密度が約 25% w/w までの範囲で遠心操作によりエクソソームが沈殿すると知られている[83-85]。そこで、スクロース溶液の最終的な濃度は 20% w/w となるように希釈された。また、解析サンプルに用いた LNP は DiR 蛍光標識しており、DiR の蛍光強度を測定することにより各精製操作の LNP 回収率を求めた。その結果、SEC 操作における LNP 回収率は約 7 割、超遠心分離の LNP 回収率は約 7 割ほどであり、精製過程全体でみると LNP 回収率は 5 割ほどであった。この精製過程で得られた生体分子コロナは脂質除去を行った後、タンパク質定量しているが、3%DSPC と 15%DSPC で得られたタンパク質の量は有意な差はなく脂質 1 g あたり 0.01 g ほどのタンパク質が吸着していることが分かった。さらに、LNP を PBS と置換しタンパク質源と混合した後、全く同じ操作で精製されたコントロールサンプルでは、脂質除去操作後のタンパク質定量においてほぼ検出されず、生体分子コロナに由来したタンパク質は 99%以上の純度で得られることが明らかとなった (Fig. 19)。したがって、SEC と超遠心分離を組み合わせた精製法により、LNP に吸着しない遊離タンパク質やリポタンパク質構造が除かれ、生体分子コロナに由来するタンパク質のみが濃縮されることが示唆された。

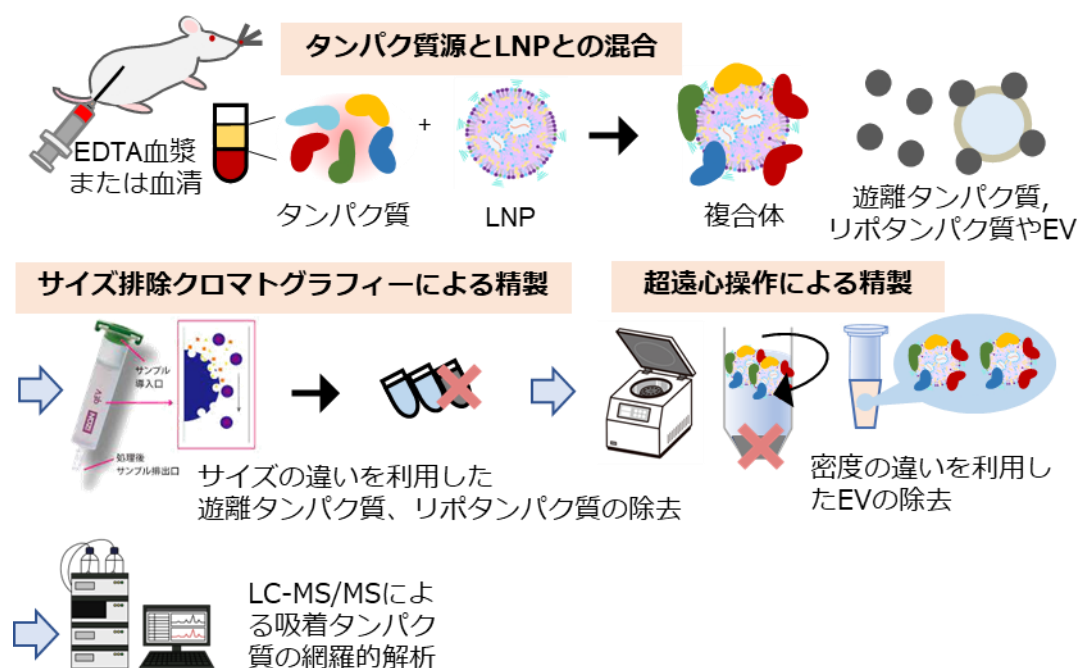


Fig. 19 生体分子コロナ解析サンプルの調製方法。EDTA 血漿と血清を混合し、生体分子コロナ複合体を形成した後、サイズ排除クロマトグラフィーと超遠心分離による夾雑タンパク質を除き、網羅的なプロテオーム解析を行った。

全身投与により肝臓を標的とする 3%DSPC、脾臓の B 細胞を標的とする 15%DSPC および脾臓への選択的な送達が消滅する 15%DOPC の 3 製剤に着目し、上記の調製方法に従って、EDTA 血漿および血清と LNP の混合により形成する生体分子コロナを解析した。得られたタンパク質は、ペプチド断片化され単一の分析で全てのペプチドが LC-MS/MS により測定される data-independent acquisition: DIA 法に従ってプロテオーム解析された。検出されたイオン強度に依存しサンプリングを行う従来の方法と比べて、DIA 法は特定の m/z 範囲内の全てのイオンが分析されるため、複雑な混合物中のイオンに対して偏りなく網羅的にペプチド断片を解析でき、単一の分析でデータが取得できるため再現性および定量性に優れる。また、プロテオーム解析の定量アプローチとしては、タンパク質に特異的な配列であるユニークペプチドの中で最もイオン化効率が高く、精度よく検出されるものを比較する One-Top 法を適用した。他の定量アプローチとしてユニークペプチドの総和を比較する Sum 法があるが、こちらは個々のユニークペプチドの測定値を合計して評価するため検出感度が高くなる一方で、イオン化効率が極めて高いペプチドが存在する場合、測定値の合計に大きく影響を与える可能性があり、支配的なペプチドの測定によってノイズが生じる懸念がある。One-Top 法を適用した解析では、単一のイオン化効率の高いペプチドを測定しており、サンプル間の相対的なタンパク質量の変化を再現性良く評価することに重点を置いている。即ち、LNP 製剤間のタンパク質の相対的な総量を比較できると考えられる。

少なくとも 1 回の実験で、各 LNP サンプルの内で構成割合が 1%以上を占めるタンパク

質を抽出し (Table 8)、機能カテゴリに分類した (Fig. 20a, b)。その結果、タンパク質源として血漿を用いた 3%DSPC の生体分子コロナではアポリポタンパク質がその大半を占めた一方で、血漿中 15%DSPC ではアポリポタンパク質の割合が減少し、凝固に関わるタンパク質であるフィブリノーゲンや補体に関連したタンパク質でレクチン経路を活性化する mannan binding lectin: MBL が顕著に増加した。血漿と異なり血清を用いた 15%DSPC では、補体タンパク質である C3 の吸着割合が大幅に増加した。上述のように、EDTA は補体カスケードを阻害するため、古典経路およびレクチン経路による C3 分解産物の生成とそれに続く LNP への吸着を阻害したと考えられる。なお、血漿あるいは血清を用いた 15%DSPC では血漿中 3%DSPC と比べて補体古典経路の活性化にかかわる IgM の吸着が増加した。また、血漿中 15%DOPC におけるアポリポタンパク質の吸着割合は血漿中 3%DSPC よりも低く、血漿中 15%DSPC よりも高かった。一方で、フィブリノーゲンの割合は血漿中 3%DSPC よりも高く、血漿中 15%DSPC よりも低かった。以上の結果は次のような細胞移行メカニズムを支持する。即ち、まず、3%DSPC は ApoE が吸着することで、肝実質細胞に移行する。コレステロールは ApoE とナノ粒子との吸着を促進することが知られているが [86]、コレステロール含量の多い 3%DSPC は ApoE との吸着が促進されたと考えられる。また、DSPC は ApoE の LNP に対する親和性を低下させることが知られている [69]。実際に、3%DSPC よりも 15%DSPC では ApoE の吸着割合が低下した

一方で、15%DSPC は 3%DSPC や 15%DOPC よりも多くのフィブリノーゲンが吸着した。飽和 PC である DPPC リポソームはフィブリノーゲンを顕著に吸着し、不飽和 PC により阻害される [87]。また、フィブリノーゲン両末端の D ドメインは疎水性界面と吸着しやすく、飽和 PC は疎水性が高いことと整合性がある [88]。また、Mbl は細菌細胞膜に吸着したフィブリノーゲンと相互作用することで、レクチン経路の活性化と細菌表面への C3 分解産物の沈着を促進する [89, 90]。血漿内 15%DSPC で検出された Mbl は LNP の疎水性界面に吸着したフィブリノーゲンに結合していると考えられる。LNP 上の Mbl はレクチン経路を活性化し、LNP 界面への C3 分解産物の吸着を促進したと考えられる。また、15%DSPC は 3%DSPC よりも IgM の吸着割合が高かった。C1q は IgM に結合して古典経路を活性化 [91]。15%DSPC のコロナタンパク質には 1%未満であるものの C1q が検出されており、レクチン経路に加えて古典経路を介した LNP への C3 分解産物の吸着が促進した可能性がある。

Table 8 LNP として 15%DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%、15%DOPC : TOT-5/DOPC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%、3%DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:3:32:1.5 mol%とタンパク質源として血清または EDTA 血漿と混合したサンプルのプロテオーム解析結果。

protein	Abbreviation	category	Plasma- 15%DSPC	Serum- 15%DSPC	Plasma- 15%DOPC	Plasma- 3%DSPC
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	apolipoprotein	33.7	29.6	42.6	48.0
Apolipoprotein E	ApoE	apolipoprotein	7.6	15.8	6.8	22.5
Albumin	Alb	other	6.4	17.5	1.7	1.7
Apolipoprotein C-IV	Apoc4	apolipoprotein	5.4	1.4	1.3	3.3
Fibrinogen alpha chain	Fga	coagulation	5.1	0.0	2.6	0.5
Fibrinogen gamma chain	Fgg	coagulation	4.9	0.0	1.6	0.4
Fibrinogen beta chain	Fgb	coagulation	4.0	0.0	1.7	0.4
Vitronectin	Vtn	coagulation	3.1	0.4	1.0	0.2
Apolipoprotein B-100	ApoB	tissue leakage	3.0	13.5	2.2	4.4
Apolipoprotein C-I	Apoc1	apolipoprotein	2.9	0.0	0.3	7.4
Hemoglobin subunit alpha	Hba	tissue leakage	2.4	0.3	0.2	1.4
Immunoglobulin heavy constant mu	Ighm	immunoglobulin	2.2	6.0	1.9	0.9
Apolipoprotein A-I	ApoA1	apolipoprotein	1.4	1.0	28.3	1.9
Hemoglobin subunit beta-2	Hbb-b2	tissue leakage	1.4	0.1	0.1	0.7
Clusterin	Clu	apolipoprotein	1.0	0.1	0.3	0.3
Mannose-binding protein C	Mbl2	complement	1.0	0.1	0.0	0.1
Serum paraoxonase/arylesterase 1	Pon1	other	1.0	0.0	0.9	0.2
Complement C3	C3	complement	0.1	4.3	0.1	0.0
Apolipoprotein D	ApoD	apolipoprotein	0.2	0.0	0.1	1.9
H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	H2-Q10	other	0.1	0.0	1.6	0.2

各タンパク質の名称と略語、機能カテゴリーの分類およびタンパク質の存在割合を算出した。Average、n = 1, 2。

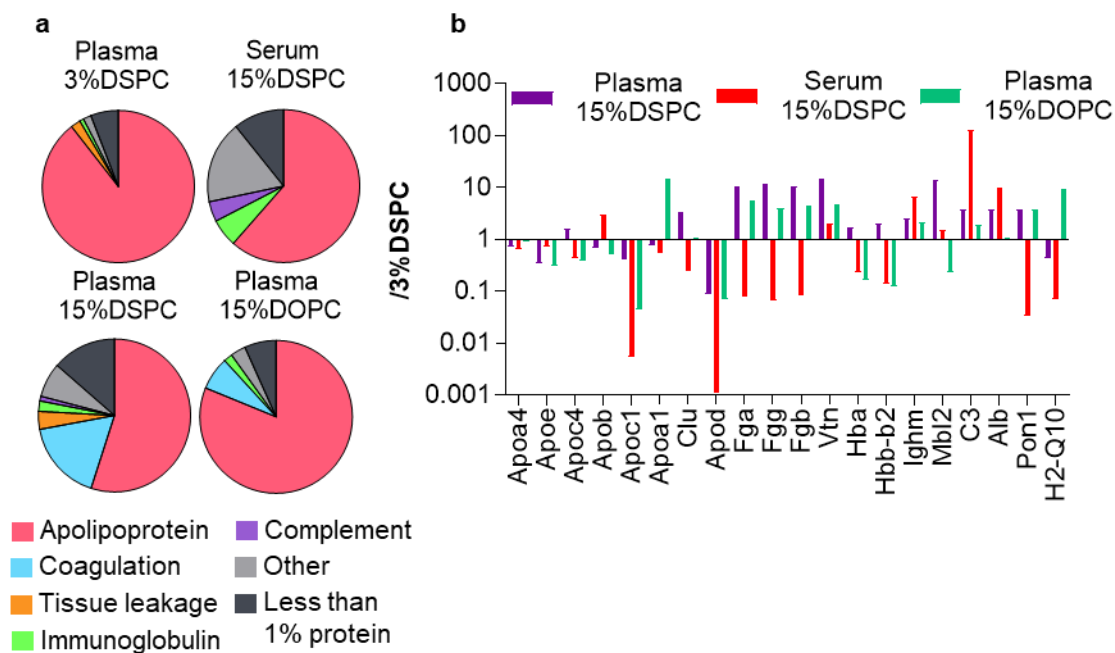


Fig. 20 LNP に吸着するタンパク質のプロテオーム解析。15%DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%、15%DOPC : TOT-5/DOPC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%、3%DSPC : TOT-5/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 65:3:32:1.5 mol%と血清および EDTA 血漿との混合

によって吸着したタンパク質を機能カテゴリごとに分類し、その割合を表示した。(b) EDTA 血漿-3%DSPC に吸着したタンパク質の割合で除した値を比較した。Average、n = 1, 2。

1-2-6 脾臓 B 細胞標的 LNP の取り込みメカニズム検証

補体タンパク質はその分解カスケードに応じて認識される補体受容体が異なり、免疫細胞に特異的に発現する。このうち、マウスの B 細胞は C3b/C3d を認識する補体受容体である CD21/35 を高発現する。また、CD21/35 を介した B 細胞へのナノ粒子の取り込みが提唱されている[43]。本研究においてもマウス血清と 15%DSPC の混合により、LNP への C3 吸着が認められたことから、脾臓 B 細胞への 15%DSPC の取り込みに CD21/35 が関与すると想定された。そこで、抗 CD21/35 抗体による 15%DSPC の取り込みへの影響を調べた。B 細胞の一部は脾臓の辺縁帯と呼ばれる領域に集積しているが、抗原等の刺激により濾胞内へ移動する[92]。そのため、抗 CD21/35 抗体処理による B 細胞の脾臓内分布を CLSM にて観察した。結果として、抗 CD21/35 抗体を投与してから 1 時間後には脾臓 B 細胞は辺縁帯から濾胞内へ侵入した (Fig. 21a)。LNP を含めた高分子量の異物は辺縁帯の物理的障壁により濾胞内へ直接移行ができないため、濾胞内に移行した B 細胞には到達できないと考えられる。抗体刺激による細胞移動による誤った判断を回避するため、抗 CD21/35 抗体を事前に投与したマウスに DiD 蛍光標識した 15%DSPC を投与し、B 細胞が濾胞に移動する前の時点である抗体投与から 30 分後の免疫細胞への LNP 取り込みを FCM にて測定した (Fig. 21b)。結果として、脾臓 B 細胞への 15%DSPC の取り込みは抗 CD21/35 抗体処理により著しく低下した。樹状細胞と好中球においても LNP 取り込みは有意に減少した。脾臓の免疫細胞中の CD21/35 発現量は B 細胞において最も高く、樹状細胞および好中球においてわずかに検出され、阻害の程度と整合性があった (Fig. 21c)。

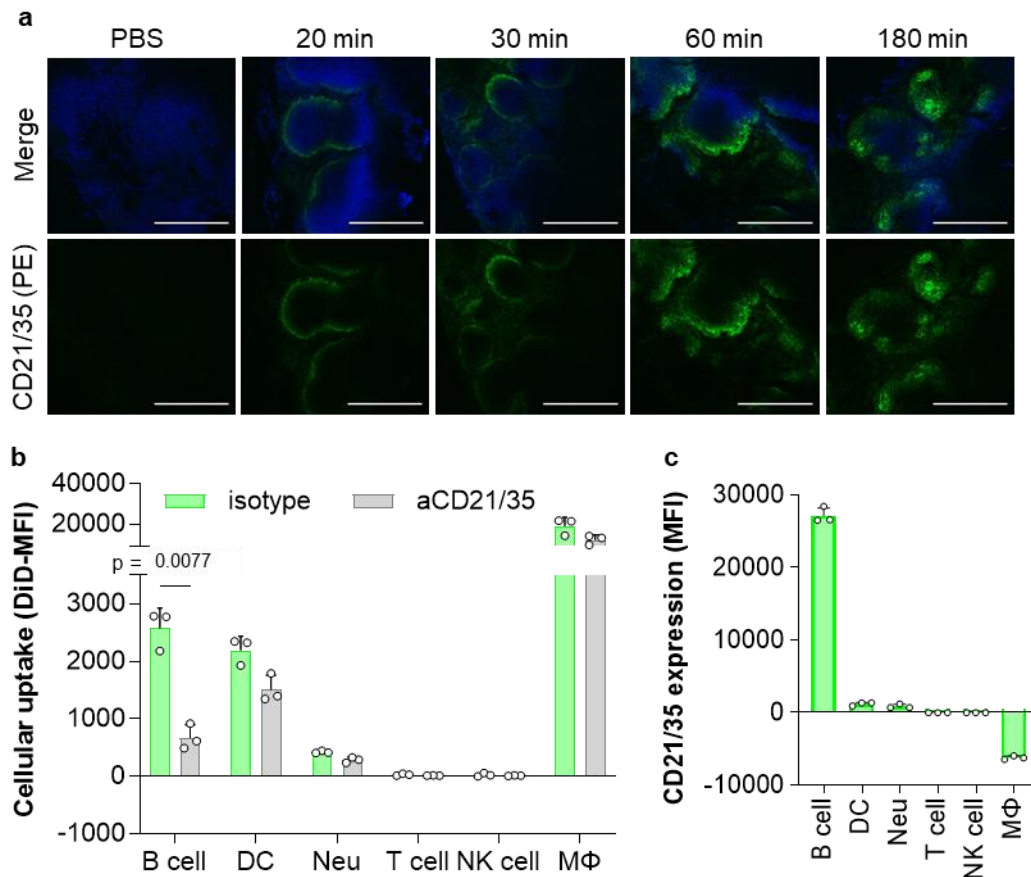


Fig. 21 15%DSPC による脾臓 B 細胞取り込み経路の検証。(a) 抗 CD21/35 抗体処理による B 細胞の脾臓内分布への影響。PE 標識抗マウス CD21/35 抗体をマウスに投与し、20、30、60、または 180 分後に脾臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて脾臓切片を観察した。CD21/35 (PE 標識) : 緑。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μ m。(b) 抗 CD21/35 抗体または isotype コントロールで処理したマウスに DiD 標識した 15%DSPC を投与し、30 分後に脾臓免疫細胞への取り込みを FCM により測定した。各免疫細胞種における DiD 平均蛍光強度 (MFI) の値を isotype 処理と抗 CD21/35 抗体で比較した。Neu は好中球、MΦ はマクロファージ、DC は樹状細胞をそれぞれ表す。Average+SD、multiple student's t-test、n = 3。(c) 脾臓免疫細胞における CD21/35 の発現量を FCM により測定した。Average+SD、n = 3。

脾臓 B 細胞は辺縁帯に存在する辺縁帯 B (marginal zone B: MZB) 細胞と濾胞に存在する濾胞 B (follicle B: FOB) 細胞に分類される[93]。また、MZB 細胞は FOB 細胞よりも CD21/35 を高発現することが知られている[23, 94]。DiD 標識した 15%DSPC を投与後、LNP の脾臓内分布を CLSM により観察したところ、LNP 投与から 1 時間後には辺縁帯に選択的に観察され、主に MZB 細胞に集積することが示唆された (Fig. 22a)。また、DiD 標識した LNP を投与し、1 時間後に脾臓由来の MZB 細胞 (CD19⁺CD21/35^{hi}CD23^{mid})、FOB 細胞 (CD19⁺CD21/35^{mid}CD23^{hi}) への DiD 取り込みを FCM で測定した結果、MZB 細胞で高い取り込みが認められた (Fig. 15, 22b)。

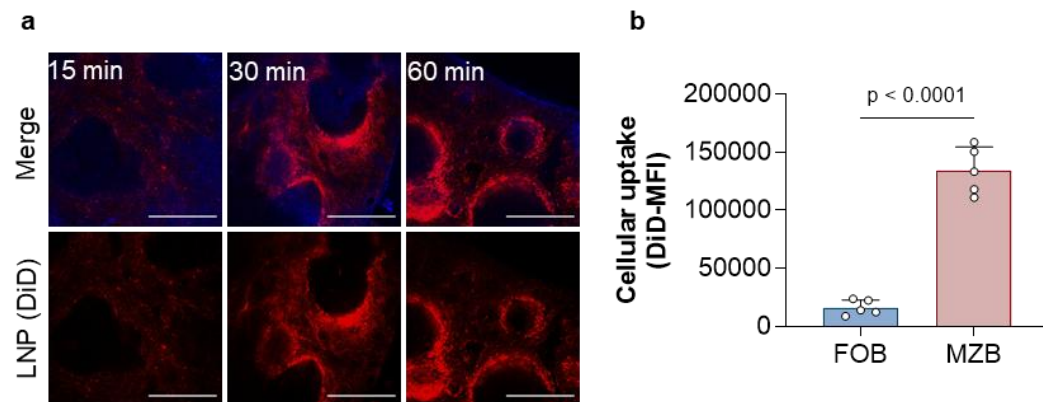


Fig. 22 B 細胞サブタイプへの 15%DSPC の取り込み。(a) 15%DSPC の脾臓内分布。DiD 標識 15%DSPC をマウスに投与し、15、30、60 分後に脾臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて脾臓切片を観察した。DiD (LNP) : 赤。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μm。(b) DiD 標識した 15%DSPC を投与し、60 分後に濾胞 B 細胞 (FOB) および辺縁帯 B 細胞 (MZB) への LNP 取り込みを FCM により測定した。FOB は濾胞樹状細胞、MZB は辺縁帯 B 細胞をそれぞれ表す。Average+SD、student's t-test、n = 5。

1-3 考察

iTOT はトリスリンカーの sp^3 炭素から伸びる最短のスペーサー (C1) を介して 3 本のオレオイル骨格を有する疎水性足場を等価に結合している。そのため、それぞれの足場骨格が立体的に反発し広がり、骨格間の角度が大きくなり、脂質足場が頭部構造を取り囲むような配向をとることが予想される。この iTOT の構造的な特徴は、従来の承認イオン化脂質と大きく異なる。実際に、順相 TLC 上での iTOT の Rf 値は他の承認イオン化脂質と比べて高く、iTOT が親水性界面と積極的に相互作用しないことが示された。これは、全ての iTOT が第三級アミン構造を有しているにも関わらず、承認イオン化脂質と比較して親水性のシラノール界面との相互作用が弱いことを示している。このことから、iTOT は不飽和の足場骨格が立体的な制約から折れ曲がることで、親水性頭部の第三級アミン構造を部分的に覆う配置をとると予想され、iTOT を含有する LNP の界面は他のイオン化脂質をベースとする LNP と比べ、疎水的であることが示唆される。

最近の LNP の構造解析によって、イオン化脂質は主に RNA とコアを形成している一方で、リン脂質は水と界面を形成する LNP 外層のシェルに主に存在することが明らかとなっており [95, 96]、これは、LNP の界面特性がリン脂質の構造および含量に影響を受ける可能性があることを示唆している。ホスホコリン基を有するリン脂質のうち不飽和型の足場構造をもつ PC はコーン型に近い立体構造をとる一方で、飽和 PC はシリンダー型の立体構造をとるため脂質膜を形成するとその膜構造の曲率は低くなり、剛直性が高くなる。脂質足場どうしの立体障害に由来する分子間力の低下がみられる不飽和 PC と比べて、飽和 PC では脂質膜上で互いに相互作用して密にパッキングされるため、運動性が低下し膜粘度が高くなることが知られている [97]。また、不飽和 PC からなる脂質膜は飽和 PC と比べてフーリエ変換赤外分光法により測定されるリン酸基に由来する吸収バンドが低波長側にシフトしており、このことから不飽和 PC は飽和 PC よりも水分子と相互作用しやすいことが示唆されている [72]。本研究においても、DCVJ を用いた LNP 膜の粘度測定の結果から、不飽和 PC よりも飽和 PC を使用した LNP において膜粘度が増加することが示された (Fig. 13d)。また、Laurdan を用いた LNP 膜の運動性測定の結果から、不飽和 PC よりも飽和 PC を含有した LNP において膜の水和度が減少し、疎水性が高くなることが示唆された (Fig. 13e)。さらに、飽和 PC である DSPC の含量の増加に伴い、LNP の膜粘度および水和度は低下した。飽和 PC に特異的な含量増加に従った LNP 膜の運動性の低下は、イオン化脂質として TOT-5 を用いた LNP に限ったことなのか、一般性のある事象なのかまだ分かっていないが、いずれにしても、DSPC を 15mol% 含有する TOT-5-LNP では、LNP の膜界面は剛直で疎水的であると考えられる。また、この表面特性こそ 15% DSPC が肝臓への mRNA 送達を回避し、脾臓 B 細胞へと効率的に mRNA を送達することに寄与すると示唆される。

ApoE はカルボキシ末端に脂質結合ドメインを有し、4 つの α ヘリックス束が密集した構造モチーフを形成する。この束は脂質と結合すると構造変化し、約 3000 Å² の広範な疎水性界面を露出させる。これにより LNP 表面の疎水性領域に大きな充填欠損が生じる [98]。し

たがって、脂質膜が密にパッキングされ剛直となる飽和 PC が豊富に含まれる LNP では、ApoE 吸着に伴う脂質の充填欠損に由来したエネルギー損失が大きくなるため、ApoE との親和性が低くなると考えられる。実際に、DSPC 密度が高い LNP 表面に対する ApoE の低親和性は、水晶振動子マイクロバランス (Quartz crystal microbalance: QCM) 分析によって観察されており[99]、本研究のプロテオーム解析で示された DSPC を豊富に含有する 15%DSPC への ApoE 吸着は 3%DSPC と比べて低下したという結果とも一致している。また、ApoE をはじめとしたアポリポタンパク質の吸着割合が高い 3%DSPC では肝臓への効率的な mRNA 送達を示された一方で、ApoE の吸着が低減される 15%DSPC では生体内で肝臓におけるクリアランスを回避した (Fig. 14b)。ApoE は肝実質細胞に高発現する LDL 受容体のリガンドとして機能し、LNP への ApoE 吸着により LDL 受容体を介したエンドサイトーシスが引き起こされる。肝臓を標的とする LNP の多くは、この ApoE-LDL 受容体を介した取り込み経路によって搭載分子を効率的に肝実質細胞へと送達する。したがって、DSPC の割合が低い 3%DSPC では ApoE との親和性が高く、LDL 受容体を介して肝実質細胞へと取り込まれる一方で、15%DSPC への ApoE 吸着の阻害は積極的な肝臓への集積を避け、ApoE が関与しない他の経路で肝臓外臓器へと送達されることが考えられる。

これまでに脾臓 B 細胞を標的としたキャリアはいくつか報告されており、その移行メカニズムとしてナノ粒子への補体タンパク質 C3 の吸着とその補体受容体 CD21/35 を介した経路により B 細胞へ取り込まれることが示唆されている。しかしながら、ナノ粒子への補体タンパク質の吸着過程はこれまで実証されておらず不明であった。本研究では、補体経路の活性化以前に、フィブリノーゲンまたは IgM が 15%DSPC に吸着し、その結果として C3 およびその分解産物が LNP 膜へ沈着することが示唆されている。IgM 等の免疫グロブリンの Fc 領域は疎水性アミノ酸に富んでおり[100, 101]、フィブリノーゲンにも疎水性アミノ酸からなる D ドメインと呼ばれる構造があり、2 つの D ドメイン構造により疎水性界面が形成される[25]。このことから、疎水的な界面を持つ 15%DSPC には疎水性相互作用を介してこれらのタンパク質が吸着すると予想される。また、ナノ粒子へのタンパク質の吸着に寄与する相互作用をシミュレーションした報告では、血液中に豊富に存在するアルブミンと比較してフィブリノーゲンとナノ粒子の吸着は、静電的相互作用よりもファンデルワールス力が支配的であることが示唆されている[102]。これらの事実から、血液循環中では 15%DSPC は荷電しておらずその表面電荷はほぼ中性であるため、静電的相互作用を介したタンパク質の吸着が抑えられる一方で、疎水性相互作用を介してフィブリノーゲンや IgM と吸着することが考えられる。この考え方は、iTOT ライブラリのうち pKa 値の低い LNP において DSPC 含量に依存した脾臓への選択的な送達が顕著になり、TOT-5 を含有する LNP のうち DSPC を多く含み疎水性の界面を持つと考えられる 15%DSPC において B 細胞への効率的な mRNA 送達が見られたという事実と一致している。

注目すべき点は、本研究では、LNP の脂質組成に従来使用されている DSPC の含量を調整することで肝外臓器として脾臓 B 細胞という単一細胞への標的化が達成されていること

である。キャリアの移行制御の戦略として、これまでリガンド修飾によるアクティブターゲットや SORT のような荷電脂質の追加による電荷制御が行われてきたが、本研究で示された脂質組成の変更は現状最も単純な方法であり、これまでに開発されてきた LNP 製剤に幅広く適用できると考えられる。

現在のところ生体分子コロナの解析にはいくつかの課題がある。第一に、試験管での調製方法が、生体内の LNP と血液循環中のタンパク質との相互作用を反映しているかという点である。本研究では、LNP と混合するタンパク質源として EDTA 血漿および血清を使用した。タンパク質源として血漿を使用する場合、血液凝固による LNP 回収率の低下を避けるために EDTA による抗凝血処理を考えたが、EDTA は凝固経路のみならず補体カスケードも強力に阻害する[103]。そのため、プロテオーム解析の結果、LNP 表面への C3 およびその分解産物の沈着はほぼ認められなかった。一方で補体経路の活性化を維持する血清をタンパク質源として使用する場合、C3 およびその分解産物の沈着が検出されたが、EDTA 血漿と比較してフィブリノーゲンやそこに結合するビトロネクチンの LNP への吸着は著しく減少した。したがって、EDTA 血漿と血清は補完的な役割を果たすと考えられるものの、生体分子コロナの組成は使用するタンパク質源やその中に含まれるプロテアーゼの活性に大きく依存する[80, 81, 104]。また、生体内に投与されたナノ粒子は血液循環中で遊離しているタンパク質のみならず、血管内皮細胞や血小板、赤血球とも相互作用し、それらに由来したタンパク質や脂質がナノ粒子へと受け渡されることが知られている[105, 106]。このことから、血球および血管構造が除かれた血漿、血清をタンパク質源とした生体分子コロナは必ずしも生体内の反応を反映しないことが考えられる。実際に、タンパク質源として EDTA やクエン酸、ヘパリン処理された血漿および血清と比べて血球成分を含む血液を用いて形成されたサンプルの解析は生体内に投与されたナノ粒子が形成する生体分子コロナのタンパク質組成を最もよく再現している[105, 107]。さらに、マイクロ流体デバイスを用いてナノ粒子とタンパク質を攪拌しながら混合した動的条件の下で形成したサンプルは、静的条件下と比べて細胞漏出時に検出されるタンパク質の吸着割合が低くなり、タンパク質組成に違いがある[108]。生体内での生体分子コロナ形成を厳密に評価するためには、血流や血液の再現もまた必要であると考えられる。

第二の課題は、生体分子コロナに関して定性的な解析が限定されている点である。15%DSPC に吸着したフィブリノーゲンの配向は依然不明であるが、フィブリノーゲンの α C ドメインを介した親水性界面への吸着は、D ドメインと血小板の結合を促進する一方、疎水性界面への D ドメインを介した吸着は、血管内皮細胞と α C ドメインの相互作用を引き起こし、これにより Arg-Gly-Asp 配列が $\alpha_v\beta_5$ インテグリンへの親和性を示す[88, 109]。ナノ粒子に吸着したフィブリノーゲンの配向に関するシミュレーションでは、粒子サイズが小さくなるにつれて粒子に結合するフィブリノーゲンの α C ドメインの露出が予測されている[25]。また、SORT-LNP のうちカチオン性脂質を含有し表面が正に帯電している LNP では、粒子サイズの減少に従って変性フィブリノーゲンの吸着が減少するが、これらのナノ

粒子では血液凝固が低減した[110]。したがって、粒子サイズや LNP 界面の疎水性等の物理化学的な性質は吸着するタンパク質の配向性や変性に大きく影響し、ワクチン製剤の生体内分布と安全性に複雑に関与すると考えられる。LNP とタンパク質をはじめとする生体由来の成分との相互作用に対する深い理解は、その製剤の合理的な設計に不可欠である。ナノ粒子に吸着したタンパク質の配向性を調べるためには、タンパク質の特定のドメイン構造を認識する抗体を用いることが有効な手段となる。具体的には、QCM 等を用いたセンサー表面上に抗体でコーティングされたタンパク質とナノ粒子間の相互作用の測定や、蛍光標識抗体で染色したナノ粒子-タンパク質複合体の単一粒子解析が挙げられるが、将来的には、ナノ粒子へのタンパク質吸着を定量的に分析するだけでなく、これらの相互作用を定性的に分析するバイオインターフェースの研究手法を取り入れることが望まれる。

1-4 小括

本章では、肝外臓器へ mRNA を送達する LNP 脂質組成の探索を行い、生体分子コロナの観点からその標的メカニズムを探った。まず、脂質頭部の化学構造が異なる 10 種類の iTOT を合成し、イオン化脂質のライブラリを構築することで、LNP の見かけの pKa に着目した製剤設計が可能となった。iTOT をイオン化脂質として含有した LNP 製剤に対して、肝外臓器を標的とする LNP 脂質組成をスクリーニングした結果、最も pKa が低い TOT-5 を含有した LNP において、構成脂質の 1 つである DSPC が mRNA 送達における臓器選択性を決定づける主要な因子であり、DSPC 割合の増加に伴い遺伝子発現が肝臓から脾臓へとシフトした。このうち、肝臓を標的とする LNP として 3%DSPC、脾臓を標的とする LNP として 15%DSPC が見出され、15%DSPC は脾臓に存在する免疫細胞の中でも B 細胞へ効率的に取り込まれた。両製剤に形成する生体分子コロナの組成を解析すると、3%DSPC には肝臓の実質細胞への内因性リガンドとして知られる ApoE を含むアポリポタンパク質が主に吸着した一方で、15%DSPC ではフィブリノーゲンや免疫グロブリン、レクチン経路を活性化する MBL、補体 C3 あるいはその分解産物へと置き換わっており、補体受容体 CD21/35 を介して B 細胞に取り込まれることが示された。15%DSPC は生理的な pH で荷電せず、シリンダー型の立体構造をとる DSPC は脂質膜を密にパッキングし、粒子の膜界面での水和度を低下させるため、その LNP 表面は剛直で疎水的な性質を示した。この性質のため、15%DSPC はフィブリノーゲンや免疫グロブリンの疎水性領域と相互作用し、MBL が関わるレクチン経路等により補体 C3 の分解および LNP 表面への補体吸着が促進され、最終的に補体-補体受容体を介し B 細胞へ取り込まれたと考えられる。LNP 構成成分の追加をすることなく DSPC 割合を調整するだけで臓器指向性を制御できる本戦略は、これまでに報告された多くの LNP 製剤に適応可能であり、肝臓外臓器を標的とする LNP の重要な設計指針になることが期待される。また、安全で有効な mRNA ワクチン製剤の開発のために、非標的である肝臓への集積を避け、脾臓の免疫細胞を標的とする 15%DSPC は理想的であると考えられる。

第2章 肝臓への mRNA 送達を回避し MZB 細胞を標的とする LNP の mRNA ワクチン製剤としての有効性と安全性の検証

2-1 緒言

第1章では、iTOT のうち最も pKa が低い TOT-5 を含有した LNP において、DSPC が臓器選択性の主要な要因であることが明らかとなり、DSPC を 15 mol% 含有する LNP 製剤は脾臓 B 細胞のうち、特に MZB 細胞へ効率的に mRNA を送達した。序論でも述べたが、二次リンパ組織である脾臓の辺縁帯に存在する MZB 細胞は MHC クラス分子の恒常的な発現による迅速な免疫反応の誘導、および免疫細胞が集積する濾胞への積極的な抗原輸送という観点から、mRNA ワクチンの有望な標的として期待されている。実際に、抗原ペプチドが直接送達された MZB 細胞では、細胞障害性 T 細胞の応答を誘導することが実証されている。しかしながら、これまで MZB 細胞への効率的な mRNA 送達手法は開発されておらず、mRNA ベースのワクチン製剤の標的としての有用性を十分に検証できていない。そこで、本章では、がん抗原をコードした mRNA を 15% DSPC に搭載し、MZB 細胞へ効率的に mRNA 送達することで、MZB 細胞による獲得免疫誘導の関与を検証し、がんワクチン製剤としての応用を実証することを目的とした。また、COVID-19 に対する mRNA ワクチンは投与部位の炎症や疲労といった全身性の副作用の他、稀ではあるが肝障害マーカーの上昇あるいは急性の肝細胞障害が発生すると知られている。従来の mRNA ワクチン製剤では、筋肉内投与後にその一部が肝臓へ集積し、投与部位だけでなく肝臓でも遺伝子発現することから、懸念となる肝障害は、LNP 投与後の積極的な肝臓への集積に由来すると考えられる。そこで、本章では、肝クリアランスを避け脾臓の免疫細胞を標的とする 15% DSPC の特性を活用し、免疫反応の誘導効果に加え安全性の観点でも優れた筋肉内投与型の mRNA ワクチン製剤としての応用を検証した。

2-2 結果

2-2-1 15%DSPC による MZB 細胞への標的

一部の B 細胞は T 細胞媒介性細胞性免疫を誘導する抗原提示細胞であり[23]、B 細胞を利用したワクチンの開発が試みられている[19-21]。特に MZB 細胞は MHC クラス I/II を恒常的に発現していることや補足した抗原を濾胞内で近傍の T 細胞領域にいる T 細胞へ抗原提示することから、有望な APC として機能することが期待される[20]。しかしながら、MZB 細胞を mRNA ワクチンの標的細胞としてその可能性を検証した報告はない。一方で主要なプロフェッショナル APC である樹状細胞を標的とした mRNA 搭載 LNP によるがんワクチンへの応用は研究が進んでいる。その中でも RNA-Lipoplex: (LPX) は樹状細胞を標的とする mRNA ワクチンとして BioNTech 社により開発されており、これまでにヒトパピローマウイルス陽性頭頸部がんや前立腺がん、非小細胞性肺がんの他、進行性悪性黒色腫を対象とした第 II 相臨床試験が実施されている[111, 112]。

RNA-LPX は主に脾臓免疫細胞の内、マクロファージや樹状細胞に取り込まれ、I 型インターフェロンの分泌に関与し他の免疫細胞を活性化させるプラズマサイトイド樹状細胞での mRNA 発現がみられる[18]。既に臨床研究が進んでいる製剤と比較して、本研究で見出された 15%DSPC は標的とする免疫細胞にどのような違いがあるか評価した。DiD 蛍光標識した 15%DSPC および RNA-LPX をマウスに投与し、APC として知られる MZB 細胞、樹状細胞、マクロファージへの LNP 取り込みを FCM にて測定した。その結果、RNA-LPX はマクロファージを除いて、B 細胞よりも樹状細胞で 1 細胞当たりの LNP 取り込みが有意に高い一方で、15%DSPC は MZB 細胞への取り込みがマクロファージと同程度に高く (Fig. 23a)、TOT-5 を含有する LNP は他の承認イオン化脂質と比べ、APC のうち MZB 細胞選択的な取り込みを示し、1 細胞当たりの取り込みがマクロファージに匹敵していた (Fig. 23b)。このことから、15%DSPC は RNA-LPX と比較して MZB 細胞選択的に mRNA を送達可能な製剤であった。これ以降、15%DSPC は TOT-15 をイオン化脂質として使用した。DiD 標識した 15%DSPC を投与後、LNP の脾臓内分布を CLSM により観察したところ、LNP 投与から 3~24 時間にわたり濾胞内で DiD の局在が観察され、LNP を取り込んだ MZB 細胞が濾胞内に侵入すると示された (Fig. 23c)。マウスへ全身投与された mRNA-LNP が標的臓器に到達し遺伝子発現を始め、その翻訳レベルが最大値に達するまでには通常数時間かかることが知られている[113, 114]。したがって、LNP を取り込んだ MZB 細胞は濾胞に侵入した後、濾胞内で抗原タンパク質を発現することが示唆された。

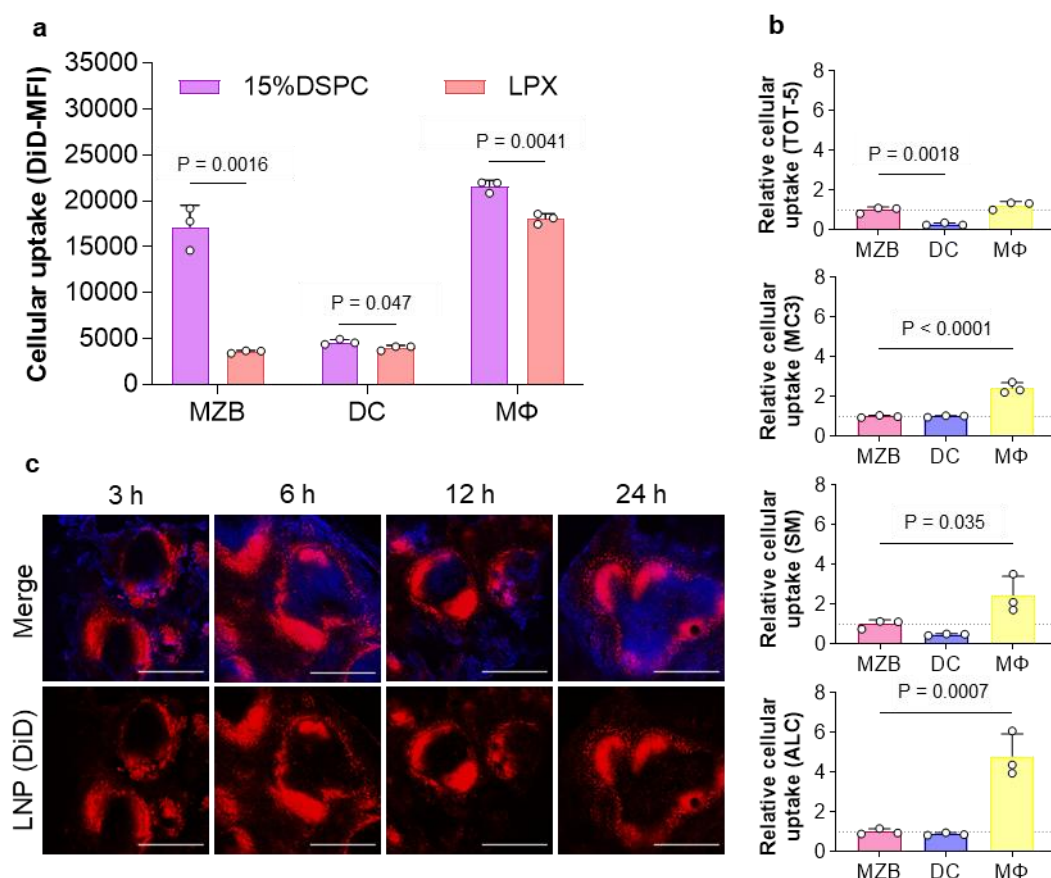


Fig. 23 15%DSPCによるMZB細胞特異的な取り込み。(a) DiD 標識 15%DSPC または RNA-Lipoplex (LPX) をマウスに投与し、1 時間後に脾臓の抗原提示細胞 (MZB 細胞、DC、マクロファージ) への取り込みを FCM により測定した。MZB は辺縁帯 B 細胞、DC は樹状細胞、MΦ はマクロファージをそれぞれ表す。Average±SD, multiple student's t-test, $n = 3$ 。(b) TOT-5 の他、承認イオン化脂質として Dlin-MC3-DMA、SM-102、ALC-0315 を含有するイオン化性脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:15:35:1.5 mol% で構成される DiD 標識した LNP をマウスに投与し、脾臓の抗原提示細胞への取り込みを FCM により測定した。Average±SD, Average +SD, one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs MZB), $n = 3$ 。(c) 15%DSPC の脾臓内分布。DiD 標識 15%DSPC をマウスに投与し、3、6、12、24 時間後に脾臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて脾臓切片を観察した。DiD (LNP) : 赤。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μm 。

MZB 細胞は sphingosine-1-phosphate (S1P) 受容体が高発現し S1P 刺激により辺縁帯に局在するが、S1P 受容体の機能的アンタゴニストである FTY-720 により、S1P シグナルが遮断されると濾胞受容体が放出するケモカインである CXCL10 等により MZB 細胞が辺縁帯から濾胞へ移動する [115]。FTY-720 を投与したマウスでは、脾臓における MZB 細胞の濾胞への移動は少なくとも 24 時間は持続することが報告されており [116, 117]、実際に FTY-720 投与から 3 時間後において脾臓濾胞への B 細胞の移動を確認した (Fig. 24a)。また、DiD 標識した 15%DSPC を投与し、3 時間後の LNP の脾臓内分布を CLSM により観察したところ、FTY-720 事前投与により LNP の集積は著しく低下し、濾胞への LNP の侵入もみられなかった (Fig. 24b)。さらに、FCM による測定の結果、B 細胞、MZB 細胞、FOB 細胞は FTY-720 前投与により取り込みが有意に低下した一方で、樹状細胞においては変化

がなかった (Fig. 24c)。MZB 細胞は辺縁帯で受け取った異物を濾胞に運搬するが[116]、FTY-720 投与により FOB 細胞への取り込みが減少したことから、FOB 細胞は MZB 細胞から LNP を受け取っていることが示唆された。15%DSPC の樹状細胞への取り込みは FTY-720 の事前投与の有無で変化しないことから、B 細胞への取り込みと樹状細胞への取り込みが強い競合関係ではないことが示唆された。

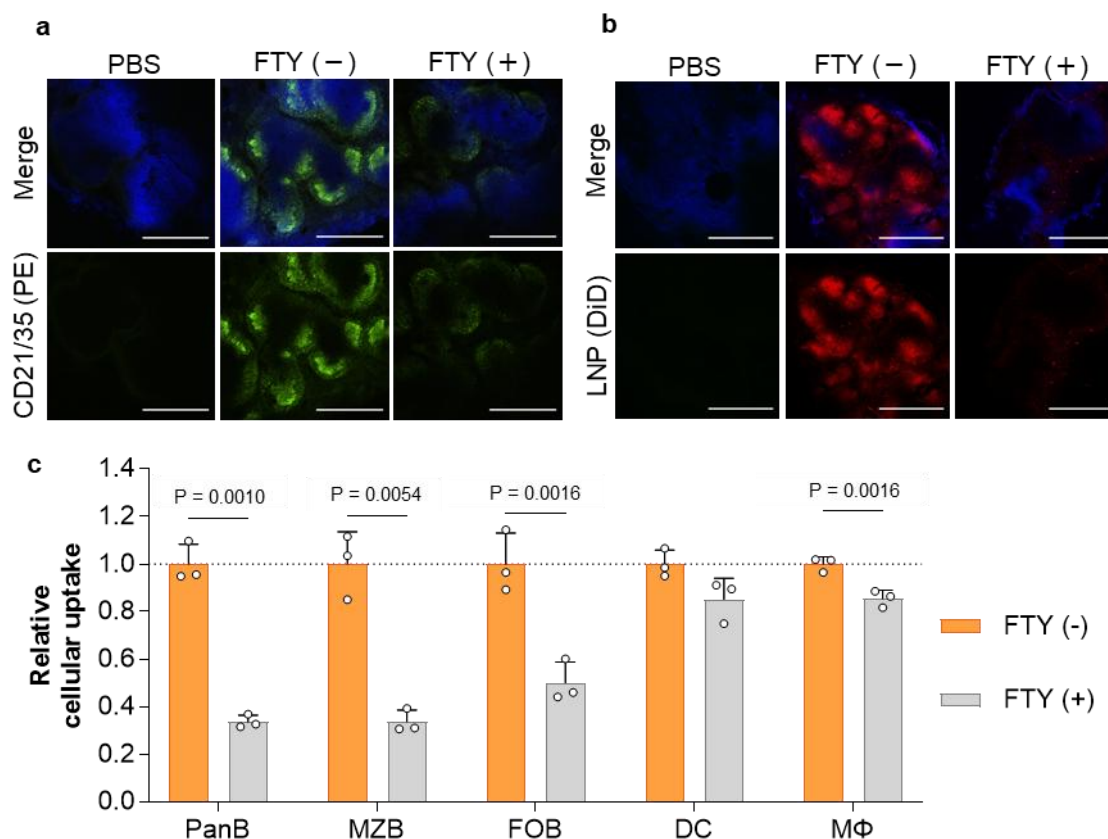


Fig. 24 FTY-720 を用いた MZB 細胞取り込みの検証。(a) FTY-720 処理による B 細胞の脾臓内分布の影響。FTY-720 (FTY (+)) または生理食塩水 (FTY (-)) で処理されたマウスに対して、脾臓サンプル採取の 10 分前に、PE 標識抗 CD21/35 抗体を投与し、FTY-720 投与から 3 時間後に脾臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて脾臓切片を観察した。CD21/35 (PE 標識) : 緑。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μ m。(b) 15%DSPC の脾臓内分布。DiD 標識 15%DSPC を FTY-720 で処理されたマウスに投与し、3 時間後に脾臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて脾臓切片を観察した。DiD (LNP) : 赤。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μ m。(c) DiD 標識 15%DSPC を FTY-720 で処理されたマウスに投与し、脾臓免疫細胞への取り込みを FCM により測定した。各群のデータは生理食塩水処理群 FTY(-)を基準に正規化された。PanB は脾臓 B 細胞、MZB は辺縁帯 B 細胞、FOB は濾胞 B 細胞、DC は樹状細胞、MΦ はマクロファージをそれぞれ表す。Average $\pm$ SD、multiple student's t-test、n = 3。

2-2-2 15%DSPC による MZB 細胞を介した免疫反応の誘導

Ovalbumin (OVA) は T 細胞依存的な免疫反応のモデル抗原として多くの研究で使用され、がんワクチン製剤の免疫反応を評価するために適した抗原である。OVA は CD4 陽性

T細胞の誘導に関わる主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIの抗原提示経路だけでなく、MHCクラスIに強力に結合するエピトープである SIINFEKL を持つため、CD8 陽性 T 細胞を誘導することが知られている[118]。 *In vivo* での免疫誘導を評価するために、OVA をコードする mRNA (mOVA、5moU 修飾、1438 ヌクレオチド、Trilink 社製) とコントロールとして Green Fluorescent Protein (GFP) をコードする mRNA (mGFP、5moU 修飾、997 ヌクレオチド、Trilink 社製) または mFluc を搭載した 15%DSPC を 0.2 mg/kg の用量で 3 日間の間隔をあけて静脈内投与し最終投与の 24 時間後に脾臓を回収し、免疫細胞ごとに MHC クラス I を介した抗原発現量、共刺激分子および活性化マーカーの発現量を FCM により測定した (Table 9)。その結果、MZB 細胞においてコントロールである mGFP を搭載した LNP と比べて、mOVA では MHC クラス I とその抗原エピトープである SIINFEKL の複合体の発現量が有意に高くなり、mFluc を搭載した LNP では抗原発現が検出されなかったことから、抗原特異的な MHC クラス I を介した抗原提示が示唆された (Fig. 25a)。また、MZB 細胞以外の APC として樹状細胞、マクロファージでは mOVA 投与による抗原発現が検出されなかったことから (Fig. 25b)、15%DSPC によって MZB 細胞に抗原コード mRNA を効率的に送達することで、MZB 細胞特異的に MHC クラス I 抗原提示を誘導することが示された。

Table 9 GFP コード mRNA (mGFP) および OVA コード mRNA (mOVA) を搭載した 15%DSPC または RNA-Lipoplex (LPX) の物性値 (粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率)。

mRNA-nanoparticle	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	ζ -Potential (mV)	%RNA Encapsulation
mGFP-LNP	109 $\pm$ 17	73 $\pm$ 10	0.14 $\pm$ 0.08	+2.2 $\pm$ 2.0	90.8 $\pm$ 7.1
mOVA-LNP	107 $\pm$ 16	76 $\pm$ 9	0.10 $\pm$ 0.05	+1.3 $\pm$ 1.8	91.9 $\pm$ 8.5
mOVA-LPX	276 $\pm$ 10	147 $\pm$ 35	0.23 $\pm$ 0.021	-18.0 $\pm$ 2.0	-

15%DSPC : TOT-5/PC/コレステロール/PEG-DMG 65:15:20:1.5 mol%、RNA-LPX : DOTMA/DOPE = 50/50 (mol%)、Average $\pm$ SD、n = 3~8。

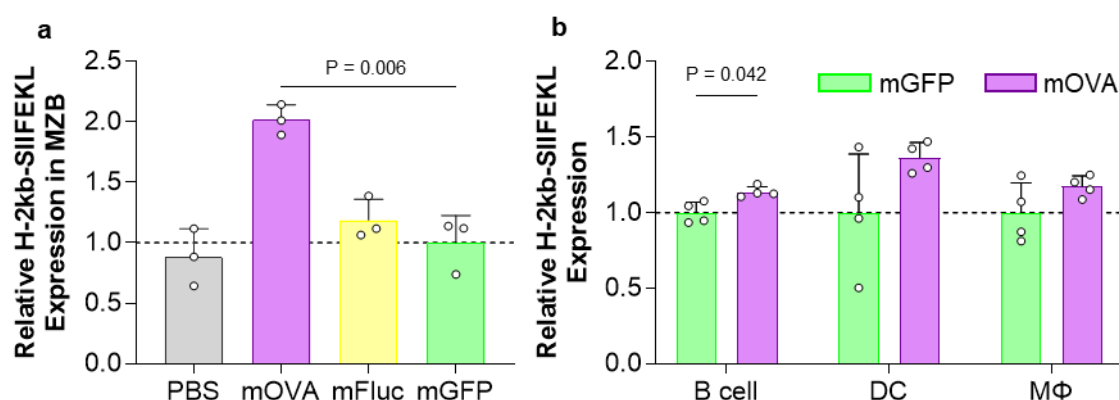


Fig. 25 15%DSPC による MZB 細胞特異的な抗原提示の誘導。(a) EGFP コード mRNA (mGFP)、mFluc、または OVA コード mRNA (mOVA) を搭載した 15%DSPC または PBS を投与し免疫誘導した後、MZB 細胞における MHC クラス I を介した抗原発現を H-2Kb-SIINFEKL の発現量として FCM により測定した。各群のデータは、mGFP 搭載 15%DSPC 投与群で測定された H-2Kb-SIINFEKL 発現量を基準に正規化した。

Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs mGFP)、n = 3。(b) mGFP または mOVA を搭載した 15%DSPC を投与し免疫誘導した後、B 細胞、DC、M Φ （マクロファージ）における H-2Kb-SIINFEKL の発現量を FCM により測定した。各群のデータは、mGFP 搭載 15%DSPC 投与群で測定された H-2Kb-SIINFEKL 発現量を基準に正規化した。Average $\pm$ SD、multiple student's t-test、n = 4。

また、15%DSPC 投与後、MZB 細胞および樹状細胞における共刺激分子 CD40、CD80/86 の発現量は増加しており（Fig. 26a）、NK 細胞および T 細胞における活性化マーカー CD69 の発現量も増加した（Fig. 26b）ことから自然免疫の活性化が支持された。以上より、15%DSPC は MZB 細胞を介して抗原特異的な免疫反応、特に細胞性免疫を誘導する可能性が示唆された。

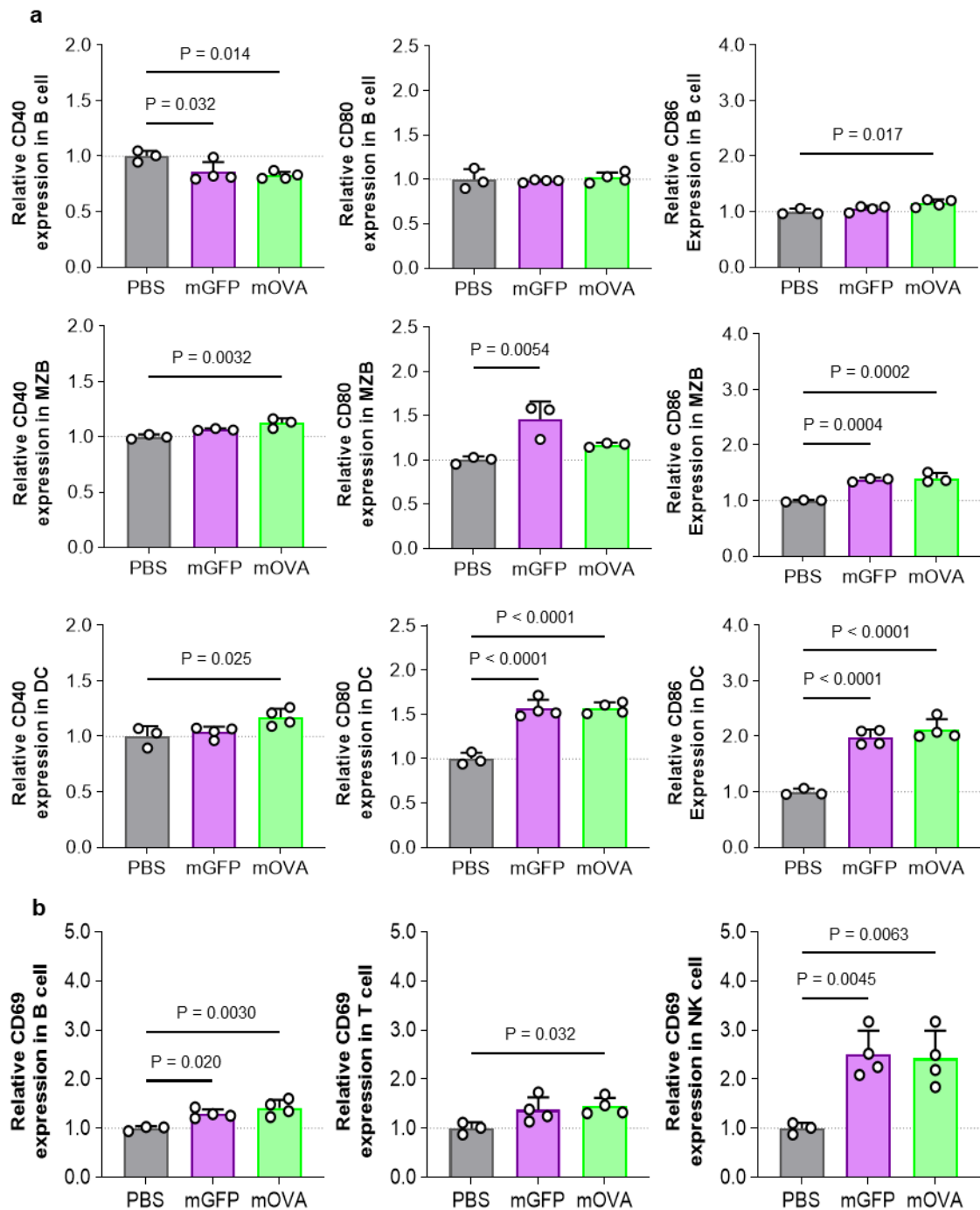


Fig. 26 15%DSPC による共刺激分子、活性化マーカーの活性化。(a) mGFP または mOVA を搭載した 15%DSPC を 0.2 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回投与し免疫誘導した後、最終投与から 24 時間後に、B 細胞、MZB 細胞、DC における CD40、CD80 および CD86 の発現量を FCM により測定した。各群のデータは PBS 投与群を基準に正規化した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs PBS)、n = 3, 4。(b) 同様に B 細胞、T 細胞、NK 細胞における CD69 の発現量を FCM により測定した。各群のデータは PBS 投与群を基準に正規化した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs PBS)、n = 4。

mRNA がんワクチン製剤の治療効果に対する直接的な作用は細胞性免疫の誘導であり、細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の腫瘍内での応答が抗腫瘍効果と強く相関することが知られている [119]。そこで、15%DSPC 投与による細胞性免疫の検証を行った。mOVA を搭載した 15%DSPC を投与し免疫誘導した後、最終投与から 5 日後に OVA ペプチドで処理され CFSE 標識した脾細胞を移植し 20 時間後に脾臓中の CFSE 標識された細胞を FCM により測定することで、*in vivo*での CTL 応答に起因した細胞障害を評価した。まず、単回投与した後の CTL のアッセイでは、コントロールである mGFP を搭載した LNP と比べて mOVA は OVA ペプチド処理された移植細胞が除かれ、抗原特異的な CTL 応答がみられた (Fig. 27a)。また、mOVA を搭載した LNP を 0.01~0.2 mg/kg の用量で静脈内投与したところ、0.1 mg/kg までは投与量依存的な CTL 応答が誘導され、それ以降 100% に近い CTL 活性を示した (Fig. 27b)。また、FTY-720 を事前投与したマウスに対して CTL アッセイを行った結果、未処理群と比べ FTY-720 処理群では CTL 活性が有意に低下したことから (Fig. 27c)、辺縁帯における MZB 細胞による LNP 取り込みが CTL の誘導に重要であることが示唆された。CTL 応答に対する MZB 細胞の関与を直接的に検証するために、mOVA を搭載した 15%DSPC を投与した後、脾臓を回収し脾細胞 (All) を得て、MACS を用いて B 細胞 (PanB) を単離した後、さらに MZB 細胞 (MZB) を単離し、マウス 1 匹分の MZB 細胞数に相当する 5×10^6 cells をナীবマウスに静脈内投与し移植した。免疫誘導したマウスに対し、CTL アッセイを行った結果、PanB や All 移植群と比較して MZB 移植群において有意な CTL 応答の誘導が認められ (Fig. 27d)、MZB 細胞の CTL 誘導への関与が示された。一方で、15%DSPC 投与と比べて MZB 細胞移植による CTL 活性は低くなったが、これは樹状細胞やマクロファージの寄与に加えて脾臓以外の全身のリンパ組織の寄与が排除されているためだと考えられる。それにも関わらず、MZB 細胞移植による有意な CTL 活性の誘導が検出されたことは、脾臓 MZB 細胞の実質的な貢献を強く支持する。

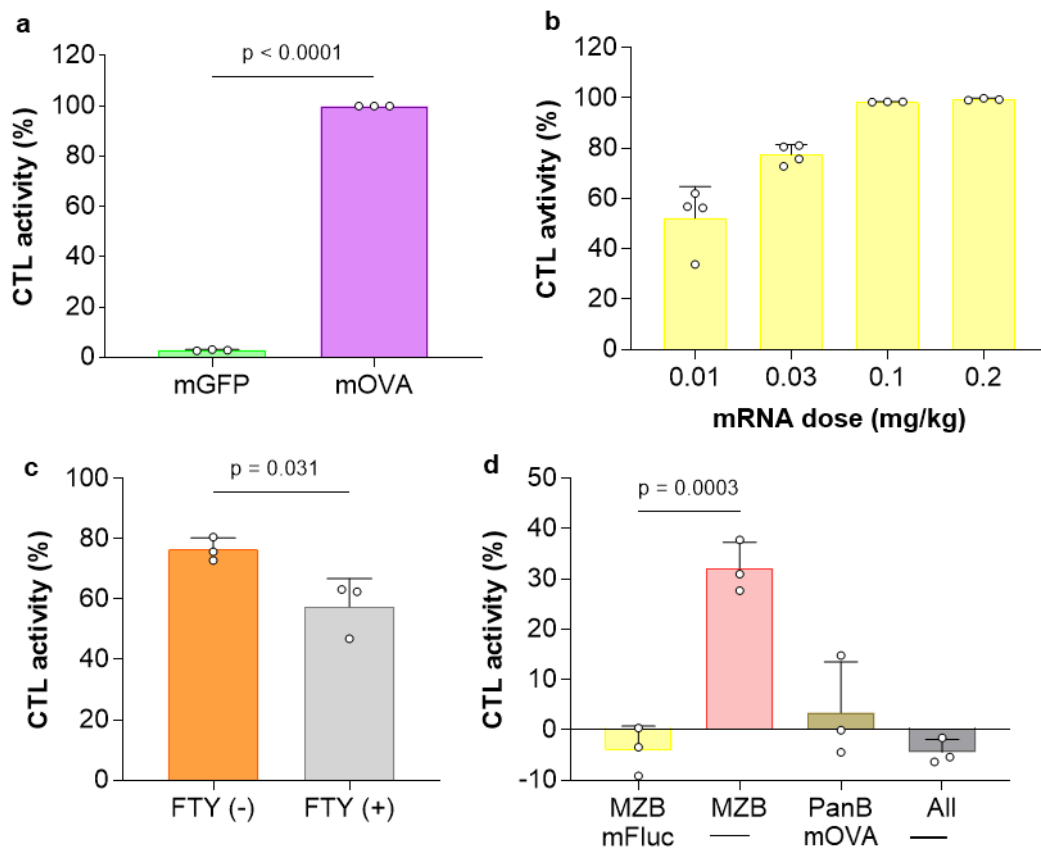


Fig. 27 15%DSPC による CTL 応答への誘導。(a) mGFP または mOVA を搭載した 15%DSPC を 0.1 mg/kg の用量で 3 日間隔で 2 回投与し免疫誘導した後、最終投与から 4 日目に、CTL アッセイにより細胞障害活性を評価した。Average $\pm$ SD、student's t-test、 $n = 3$ 。(b) mOVA 搭載 15%DSPC を 0.01~0.3 mg/kg の用量でマウスに投与し、CTL アッセイを行った。Average $\pm$ SD、 $n = 3, 4$ 。(c) mOVA 搭載 15%DSPC を 0.1 mg/kg の用量で FTY-720 (FTY (+)) または生理食塩水 (FTY (-)) で処理されたマウスに投与し、CTL アッセイを行った。Average $\pm$ SD、student's t-test、 $n = 3$ 。(d) mFluc または mOVA を搭載した 15%DSPC を 0.2 mg/kg の用量でマウスに投与し、1 時間後に脾臓細胞 (All) を回収し、B 細胞 (PanB) および MZB 細胞 (MZB) を単離し、別のナイーブマウスに移植し免疫誘導した後、CTL アッセイを行った。PanB は脾臓 B 細胞、MZB は辺縁帯 B 細胞、All は脾細胞をそれぞれ表す。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs MZB-mFluc)、 $n = 3$ 。

2-2-3 15%DSPC による治療的な腫瘍抑制効果の検証

15%DSPC の MZB 細胞を標的としたがんワクチンとしての有用性が示されたため、治療的抗腫瘍効果を検証した。モデル抗原として OVA を安定発現する E.G7-OVA 細胞を皮下移植した担癌マウスに対し、mOVA またはコントロールとして mGFP を搭載した 15%DSPC あるいは mOVA を搭載した RNA-LPX をそれぞれ 0.2 mg/kg の用量で 3 日間の間隔をあけて合計 2 回静脈内投与し、腫瘍体積の測定を行った。なお、15%DSPC および LPX の物性は Table 9 に示すようになった。その結果、PBS 投与群と比べ mGFP を搭載した LNP 投与群は腫瘍体積に変化はみられなかった一方で、mOVA を搭載した LNP 投与群は腫瘍体積の有意な減少が認められたことから、抗原特異的な抗腫瘍効果が示された。また、

15%DSPC 投与群は RNA-LPX 投与群と同等以上の腫瘍抑制を示した。さらに、腫瘍体積が 4000 mm³ を越えた個体を死亡とみなし、測定期間中の死亡イベントから生存率を求めた。結果として、15%DSPC は抗原特異的に RNA-LPX と同等の延命効果を示した (Fig. 28a, b)。

続いて、15%DSPC のがんワクチン製剤としての性能を評価するためにがん抗原であるメラニン合成酵素チロシナーゼ 2 (Trp2) を発現する B16-F10 細胞を皮下移植した担癌マウスにおける腫瘍体積の抑制効果を検証した。Trp はメラノーマで発現するがん抗原であり、メラノーマに対するがんワクチン製剤の有望な標的として認識されており、これまでに Trp を標的としたがんワクチン製剤の性能の評価が行われてきた [120, 121]。また、メラノーマ患者を対象とした RNA-LPX の臨床試験において、Trp は 4 種類のがん抗原の標的の 1 つに採用され、Trp-mRNA を含むカクテル製剤をメラノーマ患者へ投与することで CD8 陽性 T 細胞の増殖とそれに伴うサイトカイン産生の増強が示され、抗 PD1 抗体との併用または単独投与により一部の患者に対し腫瘍抑制効果を示している [111]。この報告で使用している mRNA はコーディング配列に Trp2 配列の 5'側に分泌シグナルと 3'側に MHC クラス I 認識配列 (MITD) および破傷風毒素のエピトープである P2、P16 を含んでいる。なお、分泌シグナルは発現したエピトープの細胞外分泌に関わり、MITD は MHC クラス I, II によるエピトープ認識の向上に寄与する [122]。破傷風毒素エピトープは発現したエピトープの MHC 受容体への結合を促す抗原となり免疫原性を高めることが知られている [123]。これらの配列を含む mRNA は、鋳型プラスミド DNA を作成し線状化を行った後、*in vitro* 転写 (IVT) 反応による mRNA 合成を行った。N1 メチルシュードウリジン (m¹ΨU) を使用して塩基修飾された mRNA は未修飾 mRNA と比べて発現活性が向上する一方で [124]、サイトカイン産生が低下するといった免疫原性の低下が知られている [125]。がんワクチンにおいて強い自然免疫の活性化は抗腫瘍効果の誘導に重要である [126]。また、未修飾 mRNA および IVT 反応の副産物である dsRNA はそれぞれ TLR7/8 および TLR3、RIG-I/MDA5 等のパターン受容体に認識されることで強力な IFN 応答を誘導する [127]。IFN 応答は抗原発現量を低下させるが [128]、がんワクチンにおいては免疫反応の活性化が抗腫瘍効果の誘導に重要であると知られている [129]。そのため、翻訳効率に優れるという観点では m¹ΨU 修飾した mRNA が適している一方で、免疫応答を活性化するという観点では未修飾の mRNA が適していると考えられ、2 種類の Trp2 をコードした mRNA (mTrp2) およびコントロールとして Fluc をコードした mRNA を IVT 合成した。

B16-F10 細胞を皮下移植した担癌マウスに対し、未修飾および m¹ΨU 修飾された mTrp2 または未修飾の mFluc を搭載した 15%DSPC をそれぞれ 2.0 mg/kg の用量で 3 日間の間隔をあけて合計 2 回静脈内投与し、腫瘍体積の測定を行った結果、PBS 投与群と比べて、mTrp2 搭載 LNP の投与群は抗原特異的で顕著な抗腫瘍効果が示された (Fig. 28c)。また、m¹ΨU 修飾した mTrp2 と比べて未修飾の mTrp2 では腫瘍体積の抑制効果が増強された蛍光を示した。

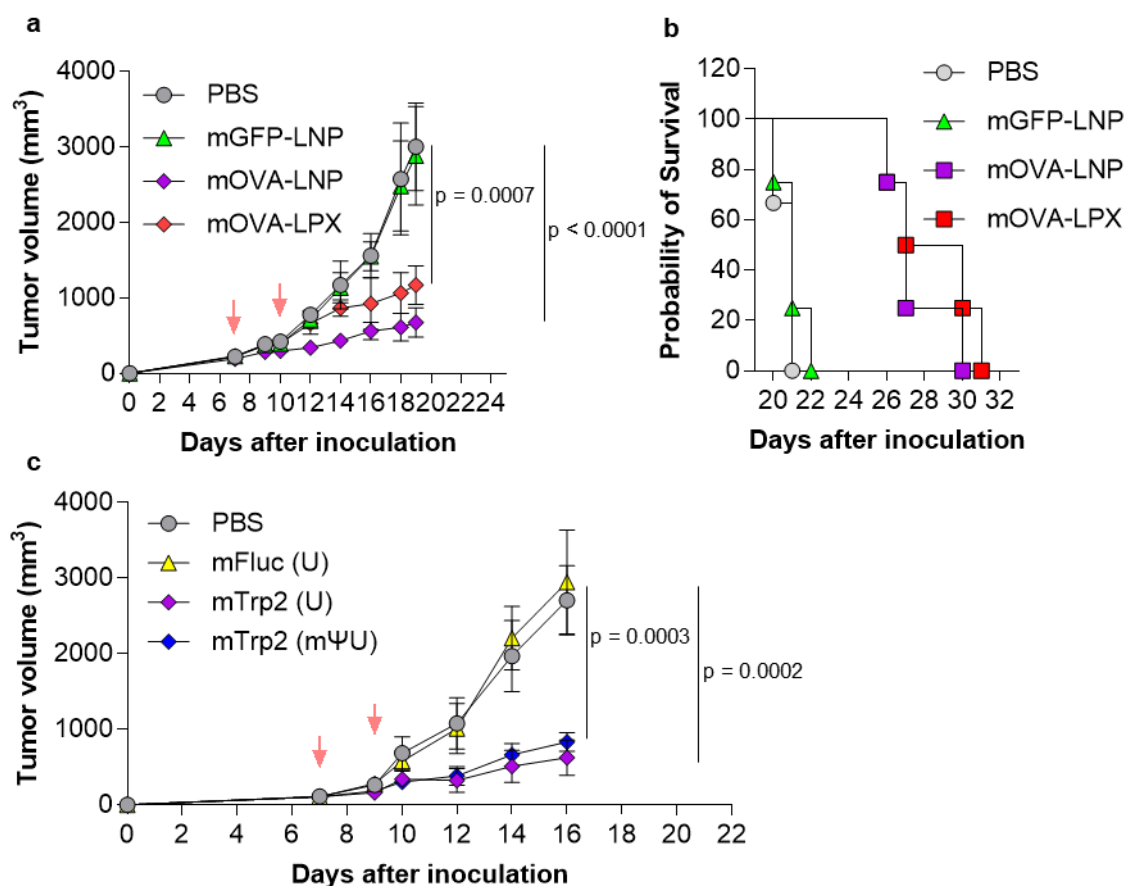


Fig. 28 15%DSPC による治療的な抗腫瘍効果の検証。(a) mGFP または mOVA を搭載した 15%DSPC または mOVA を搭載した RNA-LPX を E.G7-OVA 担癌マウスに 0.2 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回投与し腫瘍体積を測定した。ピンク色の矢印は LNP の投与を表す。Average±SD、one-way ANOVA followed by Tukey's test、n = 4。(b) 腫瘍体積が 4000 mm³ を越えた個体を死亡とみなし、測定期間中の死亡イベントから生存率を求めた。(c) Fluc コード未修飾 mRNA (mFluc (U)) および、Trp2 コード未修飾 mRNA (mTrp2 (U))、mΨU 修飾 mRNA (mTrp2 (mΨU)) を搭載した 15%DSPC を B16-F10 担癌マウスに 2.0 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回投与し腫瘍体積を測定した。ピンク色の矢印は LNP の投与を表す。Average±SD、one-way ANOVA followed by Tukey's test、n = 3, 4。

2-2-4 がんワクチン製剤としての 15%DSPC の安全性評価

がんワクチン製剤としての臨床応用を考えたとき、有効性に加えて安全性も重要な要素である。15%DSPC の全身投与による免疫原性を調べるため、mOVA を搭載した 15%DSPC を 0.2 mg/kg の用量で、コントロールとしてウイルスの RNA を模倣した二本鎖 RNA 類似体である Poly (I:C) を 250 μg/mouse の用量で抗腫瘍効果の検証と同じ投与間隔で静脈内投与し、最終投与から 4 時間後に血清を回収し、炎症性サイトカイン濃度を測定した。Poly (I:C) は免疫原性が高く、炎症性サイトカインの放出を促進することが知られている [130]。Poly (I:C) 投与群では、腫瘍壊死因子 α (TNF-α)、インターロイキン-6 (IL-6)、CXC モチーフケモカインリガンド 1、2、10 (CXCL1, 2, 10)、およびその他の炎症性サイトカイン

の血清レベルが顕著に増加した一方、mOVA を搭載した LNP 投与群ではこれらの炎症性サイトカインの有意な増加は認められなかった (Fig. 29a~f)。さらに、mOVA を搭載した 15%DSPC を 0.2~2.0 mg/kg の用量で同様に静脈内投与し、投与後の体重変化測定、最終投与から 7 日後の血清における生化学検査、肝臓および脾臓の病理組織学的な検査を行い、製剤の安全性を評価した。その結果、PBS 投与群と比較して最大 2 mg/kg で投与された mOVA 搭載 15%DSPC の投与群では体重 (Fig. 29g)、血液学的パラメータ (Table 10)、肝臓における病理学的所見に有意な変化は認められなかった。脾臓の病理学的所見として白髄の腫大が投与量依存的に観察された (Table 11)。白髄は B 細胞や T 細胞等のリンパ球が集まる部位であるため、白髄の腫大はワクチンに対する免疫応答の増強の結果である可能性がある。

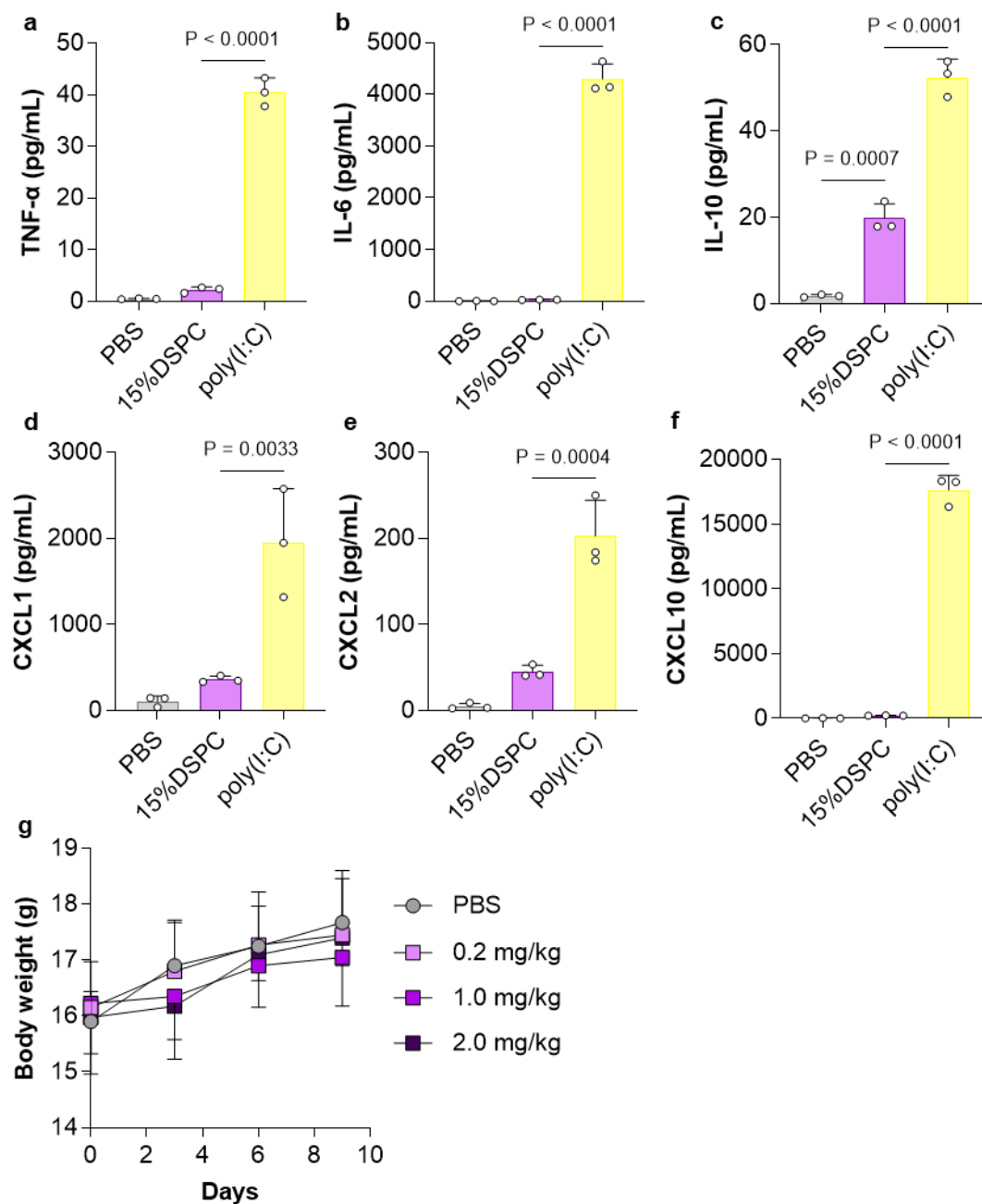


Fig. 29 15%DSPC による全身的な副効果。(a) PBS、mOVA 搭載 15%DSPC または poly (I:C) をマウスに 3 日間隔で 2 回投与し免疫誘導した後、最終投与から 4 時間後に血清を回収し、血清中の炎症性サイトカイン、ケモカイン (a) Tumor necrosis factor-alpha: TNF- α 、(b) Interleukin-6: IL-6、(c) Interleukin-10: IL-10、(d) C-X-C motif chemokine ligand 1: CXCL1、(e) C-X-C motif chemokine ligand 2: CXCL2、(f) C-X-C motif chemokine ligand 10: CXCL10 の濃度を ELISA により測定した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs 15%DSPC)、n = 3。(g) mOVA 搭載 15%DSPC を 0.2~2.0 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回マウスに投与し、体重を測定した。Average $\pm$ SD、n = 3。

Table 10 mOVA 搭載 15%DSPC 製剤の静脈内投与における生化学検査。

	PBS	0.2 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg		PBS	0.2 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg
TP (g/dL)	5.1±0.1	5.2±0.1	5.2±0.1	5.1±0.1*	ALT (IU/L)	18.0±0.7	18.3±1.6	17.0±2.1	18.5±1.1
ALB (g/dL)	3.7±0.04	3.7±0.07	3.6±0.07	3.5±0.07	LDH (IU/L)	228.8±43.0	227.0±30.1	289.5±50.1	304.3±15.8
BUN (mg/dL)	22.2±1.0	21.3±1.0	19.9±1.4	19.7±1.7	AMY (IU/L)	1911.0±77.8	1763.0±19.7	2053.0±65.9	1901.0±115.
CRE (mg/dL)	0.1±0.01	0.±0.01	0.1±0.01	0.1±0.00	γ-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
Na (mEq/L)	150.0±1.0	150.3±0.4	152.5±0.5**	149.5±0.5	T-CHO (mg/dL)	71.5±2.1	67.5±2.1	71.0±2.7	71.5±8.0
K (mEq/L)	7.9±0.6	7.2±0.4	6.1±0.3**	7.0±0.2	TG (mg/dL)	47.5±6.3	42.3±2.5	60.5±18.0	44.8±11.1
Cl (mEq/L)	107.0±0.7	108.3±0.8	109.0±1.6	107.5±0.9	HDL-C (mg/dL)	44.3±1.8	41.5±1.1	44.3±2.2	42.8±5.7
Ca (mg/dL)	11.0±0.1	10.9±0.2	10.7±0.4	10.6±0.2	T-BIL (mg/dL)	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.00	0.1±0.04
IP (mg/dL)	10.8±0.4	10.0±0.1	10.0±0.7	10.0±0.5	GLU (mg/dL)	381.0±24.8	339.3±28.6	364.8±41.2	357.5±46.5
AST (IU/L)	43.0±2.7	45.8±2.2	46.8±2.6	51.3±8.0					

PBS または mOVA 搭載 15%DSPC を 0.2~2.0 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回マウスに投与し、最終投与から 7 日目に血清を回収し、生化学検査を行った。Average±SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (*p < 0.05, **p < 0.01 vs PBS)、n = 4。TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; IP, inorganic phosphates; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; LDH, lactose dehydrogenase; AMY, amylase; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; T-BIL, total bilirubin; GLU, glucose.

Table 11 mOVA 搭載 15%DSPC 製剤の静脈内投与における病理組織学的検査。

Mouse No.	PBS				0.2 mg/kg				1.0 mg/kg				2.0 mg/kg			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enlargement of the white pulp	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	+

PBS または mOVA 搭載 15%DSPC を 0.2~2.0 mg /kg の用量で 3 日間隔で 2 回マウスに投与し、最終投与から 7 日目に肝臓、脾臓を回収し、病理組織学的検査を行った。Average±SD、n = 4。Enlargement of the white pulp は白脾髄の腫大を表す。スコアは、異常所見なし (-)、軽度 (±)、中等度 (+)、中等度 (++)、高度 (+++)

2-2-5 筋肉内投与型ワクチン製剤としての 15%DSPC の応用

COVID-19 に対する mRNA ワクチン製剤は投与部位の強い炎症や疲労、頭痛、筋肉痛といった全身性の副作用のほか、稀ではあるものの肝障害マーカーである AST、ALT 値の上昇や急性の肝細胞障害が発生することが知られている[131, 132]。また、mRNA ワクチン製剤は筋肉内投与後、その一部が肝臓に移行し、投与部位のみならず肝臓においても遺伝子発現する。そのため、従来のワクチン製剤で認められる肝障害は、LNP 投与後の積極的な肝臓への集積に由来すると考えられる。15%DSPC は承認された LNP 製剤と異なり肝クリアランスを避け脾臓の免疫細胞指向性を示した。この特性は筋肉内投与型のワクチン製剤としての効果と安全性の両観点において有利に働くと思定された。そこで、まずは mFluc を搭載した LNP を 5 µg/mouse の用量で筋肉内投与し 6 時間後に投与部位、肝臓および脾臓における発光強度を IVIS で測定し、臓器ごとの mRNA 発現を LNP 製剤間で比較した。本

研究で見出された肝臓標的 LNP の 3%DSPC、脾臓標的 LNP の 15%DSPC を筋肉内投与すると、投与部位だけでなく、肝臓と脾臓で遺伝子発現が認められ、静脈内投与と同様の臓器指向性を示した (Fig. 30a)。また、COVID-19 ワクチンの模倣製剤としてイオン化脂質に SM-102 を含有した LNP 製剤 (SM-10%DSPC) と DSPC を 20mol% 含有する LNP 製剤 (SM-20%DSPC) を筋肉内投与したところ、SM-10%DSPC と比較して SM-20%DSPC は肝臓での遺伝子発現を減少させたが、15%DSPC ほど顕著に肝臓への mRNA 送達を回避しなかった (Fig. 30b)。

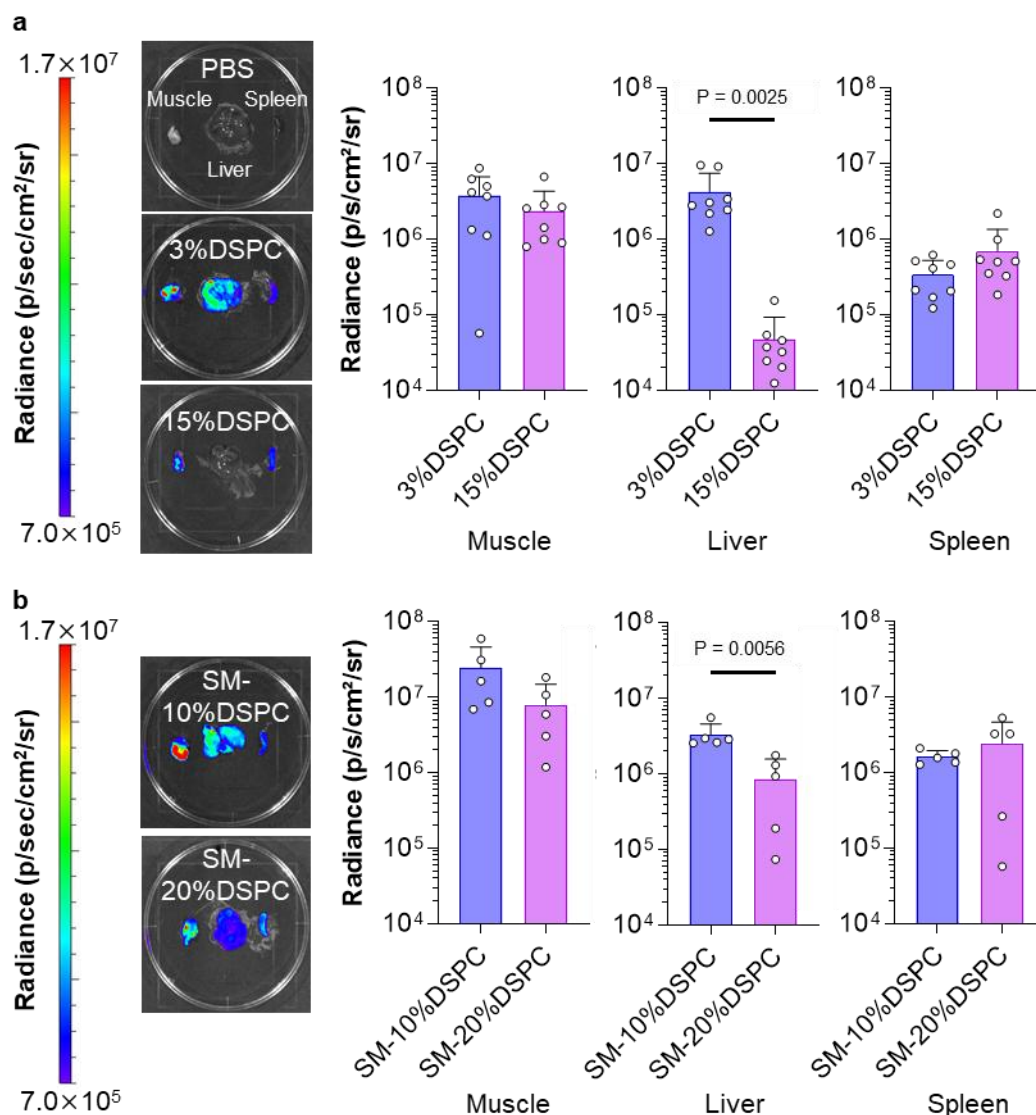


Fig. 30 筋肉内投与によるLNPの臓器指向性。(a) PBSまたはmFlucを添加した3%DSPCおよび15%DSPCを5 μ g/mouseの用量で筋肉内投与した後、投与部位、肝臓、脾臓の発光量をIVISにより測定した。左：代表的な画像。右：ルシフェラーゼ発現の定量を示す。Average $\pm$ SD、student's t-tests、n = 8。(b) mFlucを添加したSM-10%DSPC（脂質組成：SM-102/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:10:40:1.5 mol%）およびSM-20%DSPC（脂質組成：SM-102/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:20:30:1.5 mol%）を筋肉内投与した後、発光量を測定した。左：代表的な画像。右：ルシフェラーゼ発現の定量を示す。Average $\pm$ SD、

student's t-tests, n = 5. Radiance は対象領域内の平均発光量 (photons/s/cm²/sr)。

続いて、mOVA を搭載した 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) の 3 製剤を 10 µg/mouse の用量で 1 週間の間隔をあけて合計 2 回投与し免疫誘導した後、最終投与から 7 日後のワクチン効果の検証を行った。液性免疫の評価として、血清中の OVA 抗原特異的な IgG 産生量を ELISA で測定したところ、3%DSPC および 15%DSPC はワクチン模倣製剤である SM と同程度の抗原特異的な IgG 産生を示した (Fig. 31a)。また、細胞性免疫の評価として、脾臓免疫細胞における OVA テトラマーを使用した抗原特異的な CTL の割合を FCM で測定したところ、15%DSPC は SM-LNP よりも OVA 特異的な CTL の割合が増加した (Fig. 31b)。

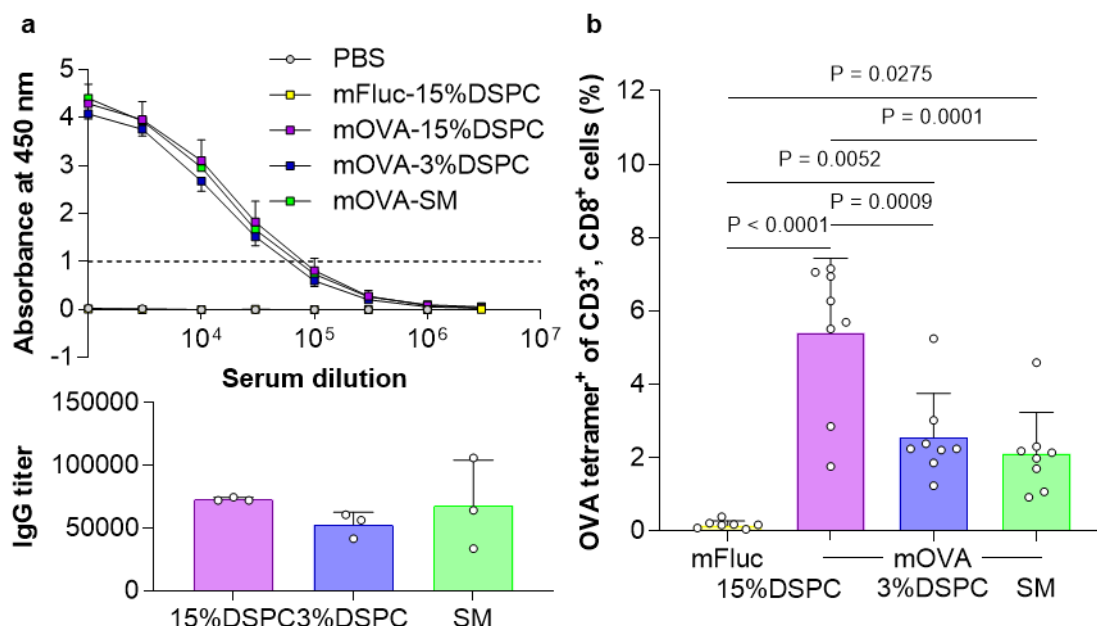


Fig. 31 ワクチン効果の検証。(a) PBS または mFluc 搭載 15%DSPC および mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) (脂質組成: SM-102/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:10:40:1.5 mol%) を 10 µg/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与し免疫誘導した後、最終投与から 5 日後に血清を回収し、血清中の OVA 特異的な IgG 産生を ELISA により測定した。上段: 各血清の希釈倍率に対する吸光強度 (OVA 特異的 IgG レベル) をプロットした。下段: プロットを 4 parameter logistic curve model を使用してフィッティングし、吸光度の値が 1 となる血清の希釈倍率である IgG 力価を比較した。Average±SD、one-way ANOVA followed by a Tukey's test, n = 3。(b) PBS または mFluc 搭載 15%DSPC および mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC および SM を 10 µg/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回投与し、最終投与から 5 日後に回収した脾臓 CD8 陽性 T 細胞のうち OVA テトラマー陽性であった割合を FCM により測定した。各データは PBS 群で得られた値を差し引いて補正した。Average±SD、one-way ANOVA followed by a Tukey's test, n = 8。

加えて、先ほどと同様に mOVA を搭載した LNP 製剤を筋肉内投与し、投与後の体重変化測定、最終投与から 7 日後の血清における生化学検査、肝臓および脾臓の病理組織学的な検査および最終投与から 4 時間後の血清中の炎症性サイトカイン、ケモカインを測定し、

製剤の安全性を評価した。結果として、ワクチン模倣製剤である SM は体重の有意な低下が認められ、3%DSPC も減少傾向であった (Fig. 32a)。また、SM および DSPC を 20 mol% 含有する SM-20%DSPC は肝障害マーカーである ALT や AST の値を有意に上昇させた。3%DSPC も ALT 値を上昇させたが、15%DSPC ではこれらの肝障害マーカーの上昇は認められなかった。また、SM でみられた肝障害マーカーの上昇は抗原性が高い mOVA を搭載した場合に認められ、mFluc を搭載した場合、認められなかったことから抗原特異的であることが示された。SM-LNP でみられた GLU 値の低下は体重減少を考慮すると摂餌量の低下が示唆された (Table 12, Fig. 32b, c)。

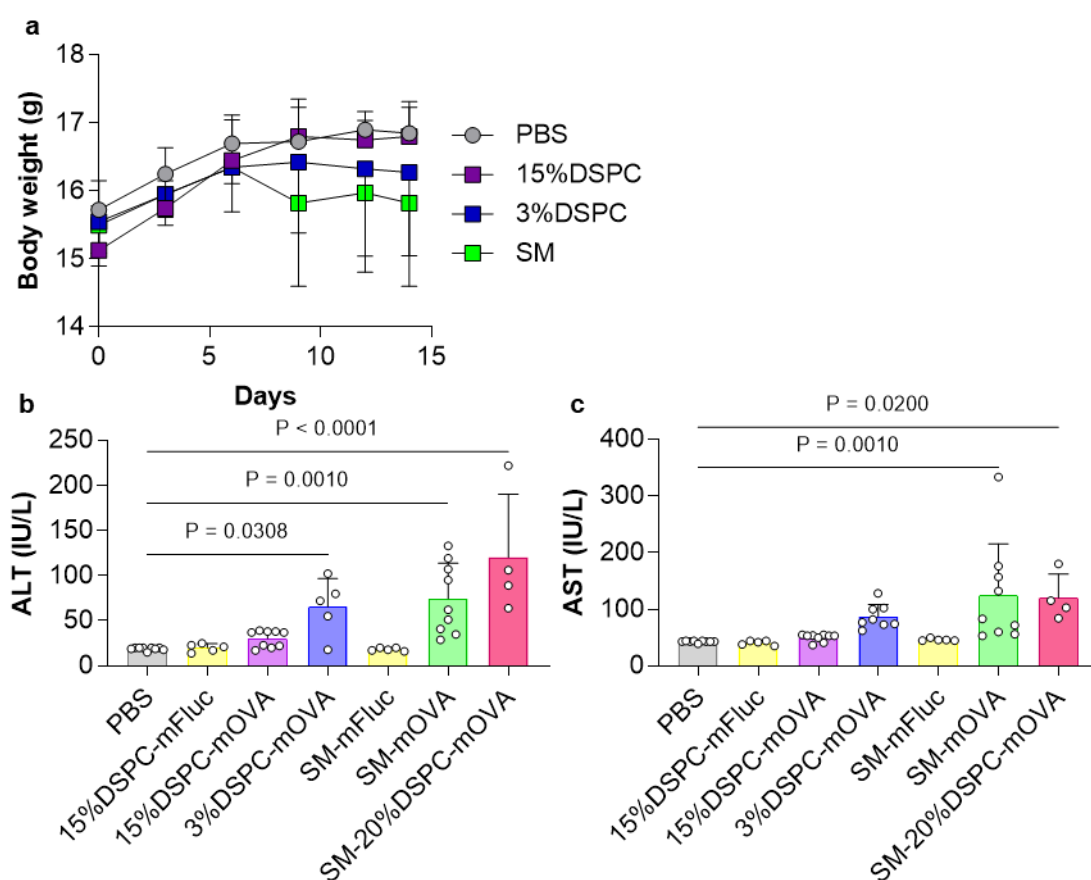


Fig. 32 体重変化と肝毒性の評価。(a) PBS または mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) (脂質組成: SM-102/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:10:40:1.5 mol%) を 10 μ g/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与し、体重を測定した。Average $\pm$ SD, n = 5。(b) PBS または mFluc または mOVA を搭載した 3%DSPC、15%DSPC、SM および SM-20%DSPC (脂質組成: SM-102/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50:20:30:1.5 mol%) を 10 μ g/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回投与し、最終投与から 5 日後に回収した血清中の (b) alanine transaminase: ALT (c) aspartate transaminase: AST の濃度を測定した。Average $\pm$ SD, one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs PBS), n = 8。

Table 12 PBS または mOVA 搭載 LNP 製剤の筋肉内投与における生化学検査。

	PBS	15%DSPC	3%DSPC	SM		PBS	15%DSPC	3%DSPC	SM
TP (g/dL)	5.3±0.2	5.4±0.2	5.3±0.2	5.3±0.3	LDH (IU/L)	347.5±76.9	344.0±225.5	615.0±48.6	362.0±104.8
ALB (g/dL)	3.8±0.1	3.7±0.1	3.6±0.1	3.6±0.2	AMY (IU/L)	1720.0±157.	1802.5±45.1	1829.0±112.	1851.3±120.
BUN (mg/dL)	16.8±0.5	20.8±2.2	19.3±3.0	24.6±3.0	γ-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
CRE (mg/dL)	0.1±0.01	0.2±0.02	0.1±0.01	0.1±0.01	T-CHO (mg/dL)	87.3±3.9	82.8±4.3	77.8±5.9	76.3±11.8
Na (mEq/L)	156.0±1.7	153.8±0.8	152.8±1.5*	155.8±1.1	TG (mg/dL)	52.3±8.8	41.3±9.6	44.8±7.7	33.3±12.9
K (mEq/L)	6.2±0.4	6.7±1.5	6.5±0.2	6.6±0.7	HDL-C (mg/dL)	51.3±1.8	48.3±4.1	45.8±1.5	41.8±8.1
Cl (mEq/L)	109.0±1.4	110.8±1.8	109.3±2.0	112.3±0.8	T-BIL (mg/dL)	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.02*
Ca (mg/dL)	10.7±0.3	10.3±0.2	10.5±0.2	10.6±0.3	GLU (mg/dL)	225.5±30.2	214.5±38.4	224.5±5.4	166.5±17.9*
IP (mg/dL)	12.9±0.6	11.3±3.0	12.7±1.0	12.7±0.6					

PBS または mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) を 10 µg/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与し、最終投与から 7 日目に血清を回収し、生化学検査を行った。Average±SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (*p < 0.05, **p < 0.01 vs PBS)、n = 5。TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; IP, inorganic phosphates; LDH, lactose dehydrogenase; AMY, amylase; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; T-BIL, total bilirubin; GLU, glucose.

また、炎症性サイトカインレベルとしては、SM-LNP の血清中の IFN- γ 、CXCL10 の濃度は、15%DSPC よりも有意に高かった。TNF- α や IL-6 などの他の炎症性サイトカインも増加する傾向があった (Fig. 33a~f)。さらに、SM-LNP や 3%DSPC では肝臓において肝臓血管の壊死や門脈域肝細胞腫大、マクロファージの腫大等の異常所見を認めた。一方で、15%DSPC はそのような所見は全く認められなかった。加えて、全ての LNP 投与群で脾臓における髄外造血が認められた (Table 13)。脾臓での髄外造血は、免疫反応の亢進を示す所見であり [133]、15%DSPC では脾臓で他に毒性の徴候がみられないことから、適切な免疫反応の結果であると示唆された。以上の結果は、15%DSPC が承認 mRNA ワクチン製剤よりも優れたワクチン効果と安全性を両立する製剤であること示す。また、この発見は臓器指向性の制御は有効で安全なワクチン製剤の開発に重要な視点である事実を提供した。

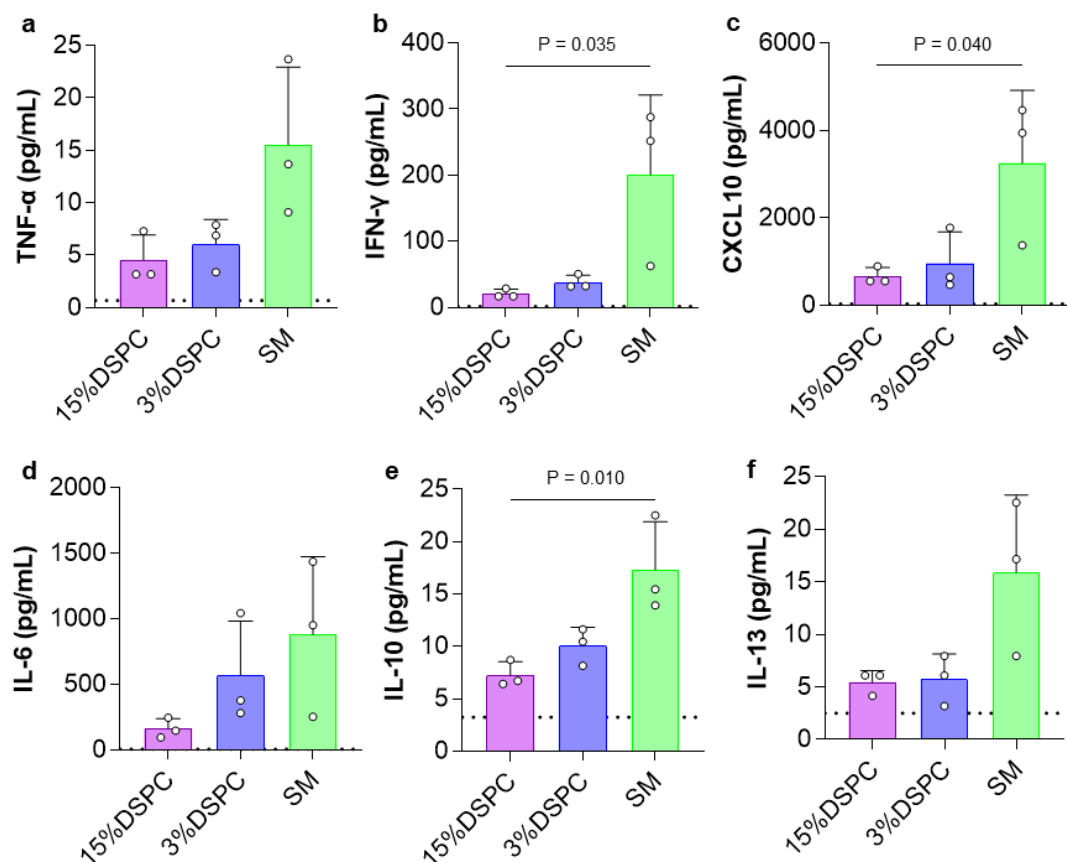


Fig. 33 全身的炎症状態の評価。(a) PBS または mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) を 10 μ g/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与し、最終投与から 7 日目に血清を回収し、血清中の炎症性サイトカイン、ケモカイン (a) Tumor necrosis factor-alpha: TNF- α 、(b) Interferon-gamma: IFN- γ 、(c) C-X-C motif chemokine ligand 10: CXCL10、(d) Interleukin-6: IL-6、(e) Interleukin-10: IL-10、(f) Interleukin-13: IL-13 の濃度を ELISA により測定した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs 15%DSPC)、n = 3。

Table 13 PBS または mOVA 搭載 LNP 製剤の筋肉内投与における病理組織学検査。

Mouse No.	PBS				15%DSPC				3%DSPC				SM			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Liver																
Hepatocellular necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-
Enlargement of the portal region hepatic cell	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	±	±
Enlargement of the Kupffer cell	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	±	±	±
Increased mitotic count	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
Spleen																
Extramedullary hematopoiesis	-	-	-	-	++	±	++	±	+	+	±	-	++	+	++	++
Enlargement of the white pulp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-

PBS または mOVA 搭載 3%DSPC、15%DSPC およびワクチン模倣製剤 (SM) を 10 μ g/mouse の用量でマウスに 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与し、最終投与から 7 日目に肝臓、脾臓を回収し、病理組織学的検査を行った。Average $\pm$ SD、n = 4。Hepatocellular necrosis は肝細胞壊死、Enlargement of the portal region hepatic cell は門脈域肝細胞の腫大、Enlargement of the Kupffer cell はクッパー細胞の腫大、Increased mitotic count は分裂像の増加、Extramedullary hematopoiesis は髄外造血、Enlargement of the white pulp は白脾髄の腫大を表す。スコアは、異常所見なし (-)、軽度 (±)、中等度 (+)、中等度 (++)、高度 (+++)

2-3 考察

15%DSPC は APC として知られる MZB 細胞に効率的に mRNA を送達できるため、MZB 細胞を標的とした mRNA ワクチン製剤としての応用が考えられた。がん抗原をコードする mRNA を搭載した 15%DSPC の全身投与により、APC の中でも MZB 細胞に特異的な MHC クラス I 抗原提示と、それに続く CTL 応答に起因した細胞障害が誘導された。APC への mRNA 送達により細胞質で OVA タンパク質が翻訳された後、内因性のタンパク質として振る舞う。即ち、細胞質で分解を受けて SIINFEKL 等のエピトープが生成した後、小胞内で MHC クラス I 分子に搭載され、その細胞表面に提示される[134, 135]。また、興味深いことに、MZB 細胞を濾胞に固定する FTY-720 の前処理により CTL 活性が抑制され、15%DSPC により免疫誘導したマウスの脾臓から分離した MZB 細胞を移植すると抗原特異的な CTL 活性が認められた。このことから、MZB 細胞が細胞性免疫の誘導に直接的に関与していることが実証された。また、15%DSPC は低用量かつ単回投与であっても強力な CTL 応答の増強が示され、LNP の複数回投与による免疫反応のブースト作用とは対照的に、15%DSPC は比較的早期に細胞性免疫を誘導することが実証された。MZB 細胞が存在する辺縁帯は動脈血がろ過される領域であり、血液を介して全身から運ばれてきた抗原が免疫細胞と最初に接触する構造的な特徴をもち、抗原等の異物に対して迅速で効率的な免疫応答の開始を仲介する役割を担っている。辺縁帯を構成する細胞集団の中でも MZB 細胞は、MHC クラス I/II 分子の発現が亢進し、CD40 や CD80 等の共刺激分子を恒常的に発現することで外来抗原に対する一次免疫応答の迅速な開始を維持することが知られている[22, 23, 136]。したがって、15%DSPC により辺縁帯に存在する MZB 細胞へ効率的に抗原が送達された結果、迅速で強力な免疫応答が誘導されたと言える。さらに、APC の中でも MZB 細胞は遊走性樹状細胞と同程度の二次リンパ組織の濾胞部への浸潤がみられ、濾胞中の T 細胞領域において捕捉された抗原を T 細胞に提示することが可能である[24, 137]。15%DSPC の適用では MZB 細胞特異的な MHC クラス I を介した抗原発現の増加が認められた (Fig. 25a)。このことから、MZB 細胞による抗原提示が強力な免疫応答を誘導することが示唆される。また、mRNA ワクチンの標準的な抗原提示細胞として知られる樹状細胞では抗原発現が認められなかった (Fig. 25b)。この要因として、15%DSPC の樹状細胞への取り込みは MZB 細胞と比べて乏しく (Fig. 23a)、抗原発現が検出されるために十分な量の mRNA を送達できなかったことが考えられる。また、興味深いことに、マクロファージへの取り込みは MZB 細胞に匹敵するにも関わらず、マクロファージでの抗原発現は検出されなかった。一般に、mRNA-LNP の細胞への取り込み量とその細胞におけるタンパク質発現量は必ずしも相関しないことが知られているが[138, 139]、貪食作用をもつマクロファージでは mRNA-LNP を効率的に取り込むものの、内皮細胞や他の免疫細胞よりもタンパク質発現が低くなる[140]。これは、マクロファージに取り込まれた LNP が細胞質へ放出される前に発達したエンドリソソームにより分解を受けることが一因としてされている[141]。マクロファージにおけるタンパク質発現効率の低さが障壁となって、十分な LNP 取り込みがあっ

たにも関わらず、抗原発現の検出には至らなかったと考えられる。

移植された脾臓免疫細胞が CTL 応答を誘導するには、APC が脾臓を含むリンパ組織へ帰還する必要がある。MZB 細胞の移植群と比較して、樹状細胞またはマクロファージを含む脾細胞を同細胞数移植した場合、CTL 応答は有意に増強されなかった (Fig. 27d)。これは、樹状細胞やマクロファージが MZB 細胞に比べて二次リンパ組織への帰還能力が低く、CTL 応答を誘導できなかった可能性が考えられる。MZB 細胞のリンパ組織への帰還効率は本研究で明らかとなっていないが、免疫誘導された MZB 細胞の移植は確かに CTL 応答を誘導したことから、少なくとも一部の MZB 細胞はリンパ組織へ到達しており、その結果、細胞性免疫の誘導に寄与することを示している。E.G7-OVA 担癌マウスモデルにおいて、15%DSPC は樹状細胞を標的とするがんワクチンとして既に臨床試験の段階にある RNA-LPX と同等、あるいはそれ以上の抗腫瘍効果を示した (Fig. 28a)。15%DSPC にがん抗原 Trp2 をコードする mRNA を搭載した場合でも同様に、B16-F10 担癌マウスモデルにおいて腫瘍の成長が有意に抑制された (Fig. 28c)。樹状細胞を標的とする mRNA ベースがんワクチン製剤は広く研究されてきたが、本研究は抗腫瘍免疫誘導における MZB 細胞の重要な役割を初めて示し、MZB 標的 LNP のがんワクチン製剤としての有用性を強調している。

さらに、15%DSPC は肝臓指向性の 3%DSPC あるいは SM-102 を用いたワクチン模倣製剤と同等以上の免疫反応の誘導効果を示したにもかかわらず、肝臓標的 LNP において顕著に発現した肝臓毒性の兆候は見られなかった。mRNA-LNP はそれ自体に潜在的な免疫原性が存在する。例えば、mRNA は IVT 反応により合成される過程で dsRNA や 5'-triphosphate RNA 等の副産物が生じるが[142, 143]、RIG-1/MAD5 や TLR3 等の RNA センサーに認識されることで強力な IFN 応答を誘導することが知られている[144]。また、LNP を構成するイオン化脂質は、強力なアジュバント作用を持つ[145-147]。このため、標的以外の臓器への mRNA-LNP 送達は、安全性に関する懸念事項となる。特に肝臓は、血流量が多く、有窓血管に囲まれているため LNP が集積しやすい臓器であり、非標的として認識されている。従来のワクチン製剤や 3%DSPC では筋肉内投与後、投与部位だけでなく肝臓においても遺伝子発現したが、15%DSPC は静脈内投与と同様に、筋肉内投与でも肝臓への mRNA 送達を最小限に抑えていた (Fig. 30a, b)。15%DSPC と 3%DSPC で構成する脂質の組成比は異なるものの、その脂質の種類は同じであることを考慮すると、従来のワクチン製剤で懸念となる肝臓障害は LNP を構成する脂質によるものではなく、LNP の動態として肝臓への mRNA 送達に由来していると考えられる。

本研究の限界について言及すると、15%DSPC は RNA-LPX よりも効率的に MZB 細胞へ mRNA を送達したが、樹状細胞やマクロファージといった APC にも mRNA を送達していた。この点で、15%DSPC が投与されたマウスに対する顕著な腫瘍抑制効果は、MZB 細胞のみによって誘導されたものではない可能性がある。同様に、RNA-LPX も樹状細胞のみに mRNA を送達することはなく、他の APC も標的とした。将来的には、特定の APC ががん免疫に果たす役割を明確に解明するために、抗原提示細胞に選択的に mRNA を輸送する送

達技術の開発が必要である。さらに、本研究で実施したような、特定の免疫細胞を分離・移植した後、免疫応答を評価する手法を組み合わせることで、抗原提示細胞が直接的な免疫応答に与える貢献度を評価することが求められる。加えて、MZB 細胞を標的とする mRNA-LNP はがんワクチンとしての有用性が示されたものの、MZB 細胞を標的とする利点は完全には実証されていない。MZB 細胞は異物を認識すると、ヘルパーT 細胞に依存せず形質細胞へ分化しながら濾胞内で胚中心形成を誘導することで液性免疫を活性化する作用も知られている[148-150]。したがって、MZB 細胞を標的とするがんワクチン製剤は、細胞性免疫に加えて強力な体液性免疫も誘導できる利点があると考えられる。本研究では 15%DSPC を静脈内投与したマウスにおいては、液性免疫を検証していないが、MZB 細胞を標的とする LNP 製剤は DC を標的とするものよりも強い液性免疫を誘導すると予想される。

2-4 小括

本章では、脾臓 MZB 細胞を標的とする 15%DSPC の mRNA ベースのがんワクチン製剤としての応用を検証し、がんワクチン製剤の標的細胞として MZB 細胞の有用性を実証することを目的とした。二次リンパ組織中の樹状細胞を標的とすることが知られている RNA-LPX と比較して、15%DSPC は脾臓の MZB 細胞選択的な LNP 取り込みを示した。また、モデル抗原をコードした mRNA を内封した 15%DSPC の静脈内投与によって、APC のうち樹状細胞やマクロファージではなく MZB 細胞でのみ MHC クラス I を介した抗原提示が認められ、MZB 細胞による CTL 応答への直接的な関与が示唆された。さらに、15%DSPC は mRNA ベースのがんワクチン製剤として既に臨床応用されている RNA-LPX と同等以上の抗腫瘍効果、延命効果を示した。本研究は、抗腫瘍免疫の誘導における MZB 細胞の重要な役割を初めて実証し、MZB を標的とする LNP のがんワクチン製剤としての有用性を強く示唆している。加えて、非標的である肝臓への mRNA 送達を避ける 15%DSPC の特性を活用し、免疫反応の誘導効果に加え安全性の観点でも優れた筋肉内投与型の mRNA ワクチン製剤としての応用を検証した。筋肉内投与によって、15%DSPC は COVID-19 の mRNA ワクチンを模倣した LNP 製剤と比べ肝臓において著しく低い遺伝子発現を示した。また、抗原をコードした mRNA を内封した LNP 製剤を筋肉内投与したところ、肝臓へ mRNA が集積する 3%DSPC やワクチン模倣製剤では、ALT および AST 値の上昇が抗原特異的に認められ、細胞壊死といった肝臓での異常所見が観察された一方で、肝臓への mRNA 送達著しく回避された 15%DSPC では、そのような肝毒性は認められなかった。加えて、肝臓指向性を示す LNP と比べて 15%DSPC は炎症性サイトカインの増加は認められず、全身性の炎症が抑制されることが示唆された。さらに、15%DSPC はワクチン模倣製剤と同等以上の獲得免疫を誘導した。したがって、15%DSPC は承認 mRNA ワクチン製剤よりも優れたワクチン効果と安全性を両立する製剤であることが実証された。

第3章 ヘルパー脂質に着目した細胞質への mRNA 送達効率を促進する LNP 製剤の開発

3-1 緒言

序論で述べたように、エンドソーム膜を構成する PC 構造を含むリン脂質は脂質膜を安定化し、LNP との融合を阻害するため、イオン化脂質に依存したエンドソーム脱出を制限する要因の一つになっている。エンドソーム膜とナノ粒子との融合を向上させるため、ヘルパー脂質として iPhos と呼ばれる人工的に設計された脂質を使用した LNP 製剤が開発されている。iPhos 脂質はその脂質頭部に第 3 級アミンとリン酸基を持ち、エンドソーム内の pH 低下に伴って脂質頭部に正負の電荷が形成される。そのため、エンドソーム膜の PC 系リン脂質の脂質頭部に対してイオン対をなし、複合体を形成することで、生体膜の不安定化を誘導すると想定している。このように、細胞内への mRNA 送達を向上させるためには、PC 系リン脂質を含む生体膜との相互作用を強化するヘルパー脂質の開発が必要であると指摘されている。そこで、本研究においてもヘルパー脂質に着目した細胞内 mRNA 送達の向上を目指し、zwitterionic Tri-Oleoyl-Tris (zTOT) を含有した LNP 製剤の開発を行った。脂質頭部にリン脂質と対応する組み合わせとなる正負の荷電した構造をもち、トリス骨格のリンカーに 3 本のオレイン酸を導入した zTOT は生体由来の PC 系リン脂質と脂質頭部間でイオン対をなし、PC 系リン脂質を巻き込み逆円錐形の複合体を形成し、安定なラメラ相を形成するエンドソーム膜の相転移を誘導すると想定している (Fig. 34)。

先行研究である iPhos 脂質を含有した LNP 製剤では、2 つのリミテーションが指摘されている。第一に、従来の LNP 製剤で採用されている一般的な脂質組成で mRNA 発現を評価しておらず、その汎用性が十分に検証されていない。そこで、本章では臨床応用されている LNP 製剤が採用している基本的な脂質組成の中で、従来ヘルパー脂質として使用される DSPC を zTOT に置換した LNP 製剤の mRNA 発現を評価するとともに、組み合わせるイオン化脂質の種類や投与方法によらない汎用的な mRNA 発現の向上を検証した。第二に、iPhos 脂質による生体膜の不安定化作用は示されているものの、実際のエンドソーム脱出効率を評価しておらず、細胞質への mRNA 送達量の向上を証明できていない。エンドソーム脱出効率の評価方法として従来、LNP に搭載する核酸を標識する必要があり、本来の LNP 製剤の生体内の挙動を必ずしも反映しない懸念がある。また、培養細胞を使用したエンドソーム脱出の評価は LNP が生体内で曝される環境から逸脱している可能性が考えられる。そこで、本章では、非標識 LNP の *in vivo* エンドソーム脱出効率の評価方法を確立し、zTOT-LNP におけるエンドソーム脱出効率を算出し、既存の LNP 製剤と比較して細胞内への mRNA 送達効率を考察した。

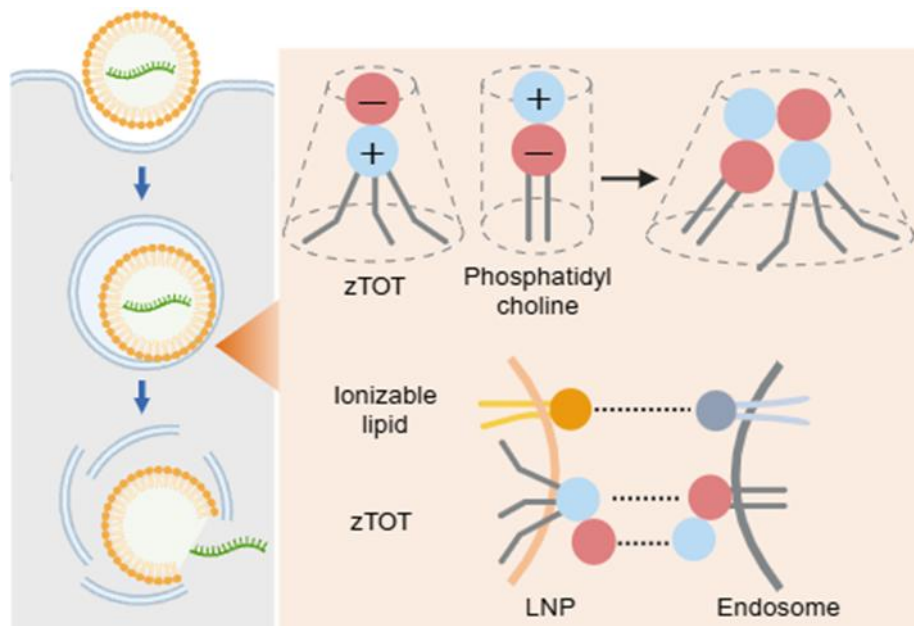


Fig. 34 zTOT によるエンドソーム膜との相互作用の様式と効率的な細胞質への mRNA 送達の予想図。zTOT を含有する LNP は細胞内に取り込まれ、エンドソーム膜と接触すると膜融合の障壁となる PC 系リン脂質と複合体を形成し、イオン化脂質による膜融合をサポートし、細胞質への搭載分子の送達を向上させると考えられる。

3-2 結果

3-2-1 zTOT のライブラリ構築と特性評価

本研究で合成された zTOT は脂質頭部に 1 組の正負の電荷をもち、トリスリンカーに 3 本のオレイン酸足場を結合している。3 本の疎水性足場が広がる zTOT は、生体膜のホスホコリン基をもつシリンダー型のリン脂質を巻き込み、負の曲率をもつ構造へと誘導すると予想される。この結果、zTOT はイオン化脂質による生体膜との融合を助け、相転移を強力に促進することが期待される。これまで、zTOT は頭部グループが異なる 7 種類のライブラリを構築した (Fig. 35a)。トリスのアミド基に対してグルタミン酸の側鎖あるいは主鎖のカルボキシ基を結合した TOT-9, 15 やアスパラギン酸を結合した TOT-13, 14 の他、同一鎖上に正負の電荷が存在するベタイン構造を有する TOT-10, 11、第三級アミン構造を持つ TOT-12 を設計した。このうち、TOT-15 はトリスを原料とし、アミノ酸無水物によるアミノ基選択的に縮合した。その後、オレイン酸を縮合し、保護基を外すことで得られる。わずか 3 工程で合成可能な TOT-15 は収率よく、大スケール製造において意義がある。これらの zTOT の構造が LNP の物理化学的な性質に与える影響を評価するため、トランスサイレチン型家族性アミロイドーシスに対する siRNA 医薬品として承認された ONPATPRO® を模倣した脂質組成において LNP を調製した。即ち、この章で使用した LNP の脂質組成はイオン化脂質:ヘルパー脂質:コレステロール:PEG-DMG = 50:10:40:1.5 (mol%) を基本としたが、これは LNP 研究において最も標準的な脂質組成でありベンチマークとして扱われている。ここでは、イオン化脂質として肝臓への効率的な核酸送達に適した LNP 製剤として開発された CL4F6 を使用した [67, 151]。また、ヘルパー脂質として従来の LNP 製剤に広く採用されてきた DSPC を使用した LNP である DSPC-LNP と、これを zTOT に置換した LNP である TOT-X-LNP を比較した。すべての zTOT-LNP の pKa 値は、DSPC-LNP よりもわずかに (0.1~0.3 単位) 高かった (Table 14, Fig. 35b)。これは、10 mol% 以上の zTOT を含む LNP は pKa 値が高くなることを示唆しており、その生体内分布および搭載分子の細胞内輸送が DSPC-LNP とは大きく異なる懸念が考えられた。その後の検討では、DSPC-LNP との比較対象として 10 mol% の zTOT を含む LNP を採用した。

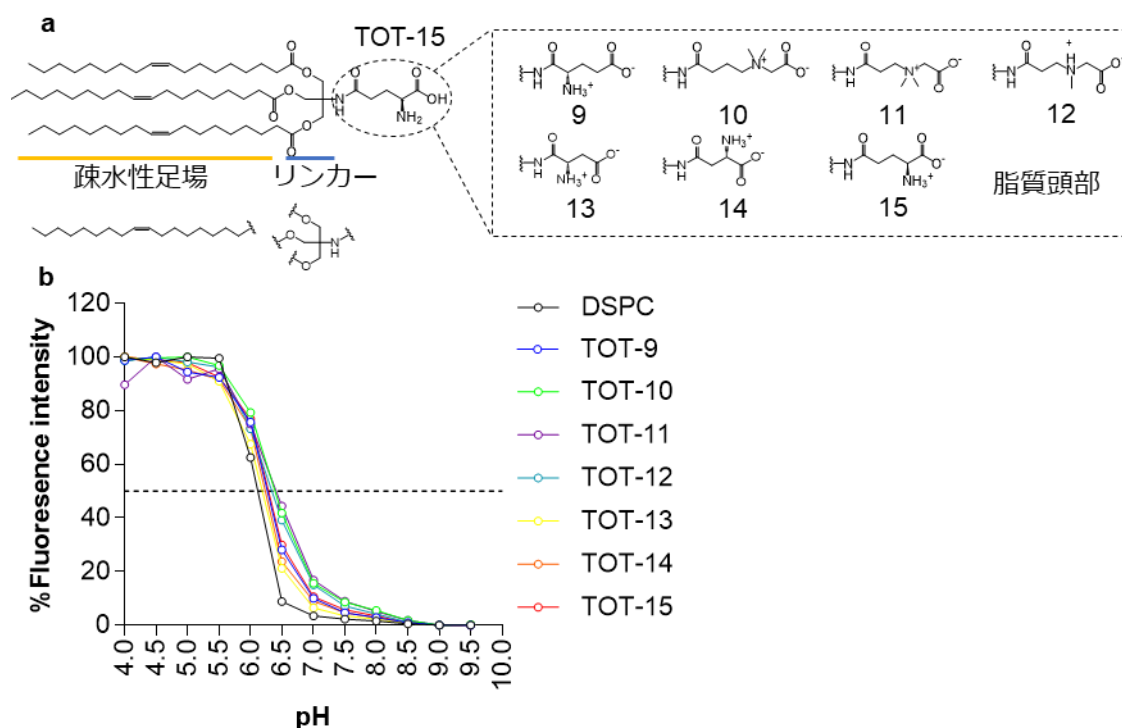


Fig. 35 zTOT の合成。(a) 異なる脂質頭部構造を持つ 7 種類の zTOT 脂質ライブラリ。zTOT は疎水性足場にオレイン酸、リンカーにトリス骨格を持ち、脂質頭部 1 組の正負の電荷をもち全体として中性となる。(b) DSPC-LNP と zTOT-LNP の各 pH における蛍光強度を TNS アッセイにより測定した。見かけの pKa は、蛍光強度が最大値の 50%となる pH とした。脂質組成：CL4F6/DSPC or zTOT/コレステロール/DMG-PEG = 50:10:40:1.5 mol%。破線は蛍光強度の最大値の 50%を表す。

Table 14 DSPC-LNP および zTOT-LNP の物性値（粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA 封入率）。

HL	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	pKa	ζ -Potential (mV)	%RNA encapsulation
TOT-9	154	105	0.14	6.3	2.32	92.3
TOT-10	131	73	0.23	6.4	2.02	93.2
TOT-11	130	81	0.16	6.4	1.05	95.2
TOT-12	143	96	0.16	6.3	0.17	92.0
TOT-13	130	85	0.12	6.2	1.57	91.6
TOT-14	136	77	0.22	6.2	-0.03	87.4
TOT-15	126	77	0.22	6.3	1.22	94.0
DSPC	129	83	0.20	6.1	1.07	89.8

脂質組成：CL4F6/DSPC or zTOT/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% HL はヘルパー脂質を表す。Average、n = 1-14。

3-2-2 zTOT を含む LNP による mRNA 発現活性向上の検証

続いて、zTOT を含有した LNP に mRNA を搭載し、*in vivo* における mRNA の発現効率を評価した。mFluc を搭載した LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与し 6 時間後に肝臓を回収し、その発光強度をルシフェラーゼアッセイにより測定した結果、試験したすべての zTOT-LNP は DSPC-LNP と比較して肝臓での遺伝子発現が高く、その中でも TOT-15 を含有した LNP は DSPC-LNP よりも 5 倍高い遺伝子発現を示した (Fig. 36a)。以下の実験では、zTOT のうち TOT-15 を使用して、従来の DSPC を含有する LNP と比較した。

Fluc 以外のレポータータンパク質の発現活性を評価するために、また、肝臓に送達された mRNA がどの細胞で発現するか調べるために、GFP をコードした mRNA を搭載した LNP を 1.0 mg/kg の用量で静脈内投与し 24 時間後に肝臓を回収し、肝臓内の GFP 蛍光を CLSM により観察した。その結果、DSPC-LNP と比較して TOT-15-LNP では、肝臓の肝実質細胞において高い遺伝子発現が示され (Fig. 36b)、TOT-15 を含有する LNP が肝実質細胞への mRNA 送達を促進することを示唆している。

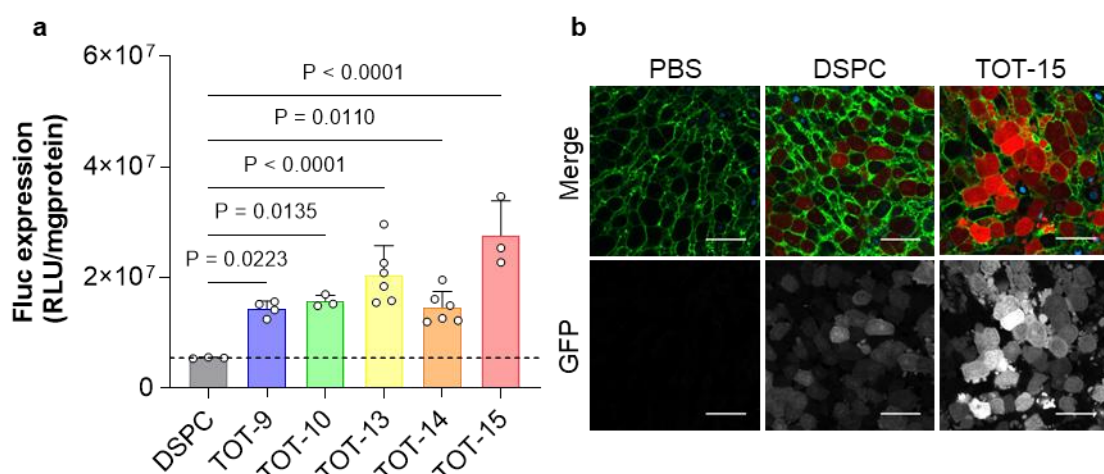


Fig. 36 DSPC-LNP と比較した zTOT-LNP による遺伝子発現活性の向上。(a) mFluc を搭載した脂質組成 : CL4F6/DSPC/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol%) から構成される LNP (DSPC) または脂質組成 : CL4F6/zTOT/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% (zTOT = TOT-9, 10, 13, 14, 15) から構成される LNP (zTOT) をマウスに静脈内投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量をルシフェラーゼアッセイにて測定した。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (vs DSPC)、n = 3。Relative Light Units: RLU は相対光単位。(b) 肝臓における GFP 発現の観察。mGFP を搭載した DSPC-LNP または TOT-15-LNP を 1.0 mg/kg の用量でマウスに投与し、24 時間後に肝臓を採取し、Nikon A1 CLSM を用いて肝臓を観察した。DiD (LNP) : 赤。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 500 μ m。

次に、TOT-15 による遺伝子発現の汎用的な向上効果を検証した。そこでまず、以下に示すイオン化脂質を使用した TOT-15-LNP の調製を行った。CL4H6 および MC3 は肝臓への効率的な mRNA および siRNA 送達を示す LNP 製剤において採用され[151, 152] [1,14]、SM-102 および ALC-0315 は COVID-19 に対する mRNA ワクチンとして筋肉内投与型の LNP 製剤に使用されているイオン化脂質である[10, 11, 68]。mFluc を搭載した LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与し肝臓のルシフェラーゼ発現を測定した結果、CL4F6 だけでなく、市販のイオン化脂質であってもヘルパー脂質として TOT-15 と組み合わせることで遺伝子発現を向上した。その一方でイオン化性脂質として SM-102 を含む LNP は、DSPC と比較して TOT-15 との組み合わせの場合、遺伝子発現をむしろ低下させた (Table15, Fig. 37a)。iPhos 脂質をヘルパー脂質とした LNP は、エンドソーム内の低い pH に応答して PC 系リン脂質と相互作用し、エンドソーム膜を不安定化し細胞質への mRNA 放出を促進する。このうち構造が最適化された 9A1P9 を含む LNP は肝臓における mRNA 発現が最も高く、

イオン化性脂質としてMC3を用いた脂質組成であっても、9A1P9を組み合わせたLNPは、DSPCやDOPEといった従来のリン脂質を用いたLNPと比較して肝臓におけるmRNA発現が増強された[66]。本研究で同定されたTOT-15は構造的特徴がiPhos脂質と類似しているため、その性能を比較した。LNP研究で標準的に用いられる脂質組成において、ヘルパー脂質として9A1P9を含有するLNPはDSPC-LNPよりも遺伝子発現が高く、TOT-15-LNPはさらに高い値を示した (Table 15, Fig. 37b)。加えて、静脈内投与以外の投与経路として筋肉内投与および脳室内投与によっても、TOT-15を含有するLNPが遺伝子発現の向上効果があることを検証した。mRNA-LNPを1 µg/mouse/50 µLの用量で筋肉内投与、あるいは0.1 µg/mouse/5 µLの用量で脳室内投与し、投与部位におけるルシフェラーゼ発現量を測定した結果、DSPC-LNPと比較してTOT-15-LNPでは遺伝子発現が有意に高くなった (Fig. 37c, d)。このことから、TOT-15を含有するLNPの遺伝子発現の向上は投与経路によらず、投与部位での発現活性の向上効果があると示された。

Table 15 異なるイオン化脂質を含有するLNPの物性値（粒子径、 ζ 電位、Pdl、mRNA封入率、見かけのpKa）。

CL	HL	ζ -Average (nm)	Number mean (nm)	Pdl	pKa	%RNA encapsulation
MC3	DSPC	156	49	0.22	6.2	86.5
MC3	TOT-15	126	74	0.17	6.4	94.8
MC3	9A1P9	126	57	0.24	-	96.3
ALC	DSPC	128	65	0.19	6.2	91.1
ALC	TOT-15	133	104	0.06	6.6	89.3
SM	DSPC	101	56	0.20	6.7	95.5
SM	TOT-15	130	76	0.17	6.8	96.4
CL4H6	DSPC	144	87	0.15	-	78.2
CL4H6	TOT-15	131	79	0.17	-	94.1

脂質組成：イオン化脂質/DSPC or TOT-15 or 9A1P9/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% (イオン化脂質=Dlin-MC3-DMA (MC3), ALC-0315 (ALC), SM-102 (SM)) CLはイオン化脂質、HLはヘルパー脂質を表す。Average, n = 2-4。

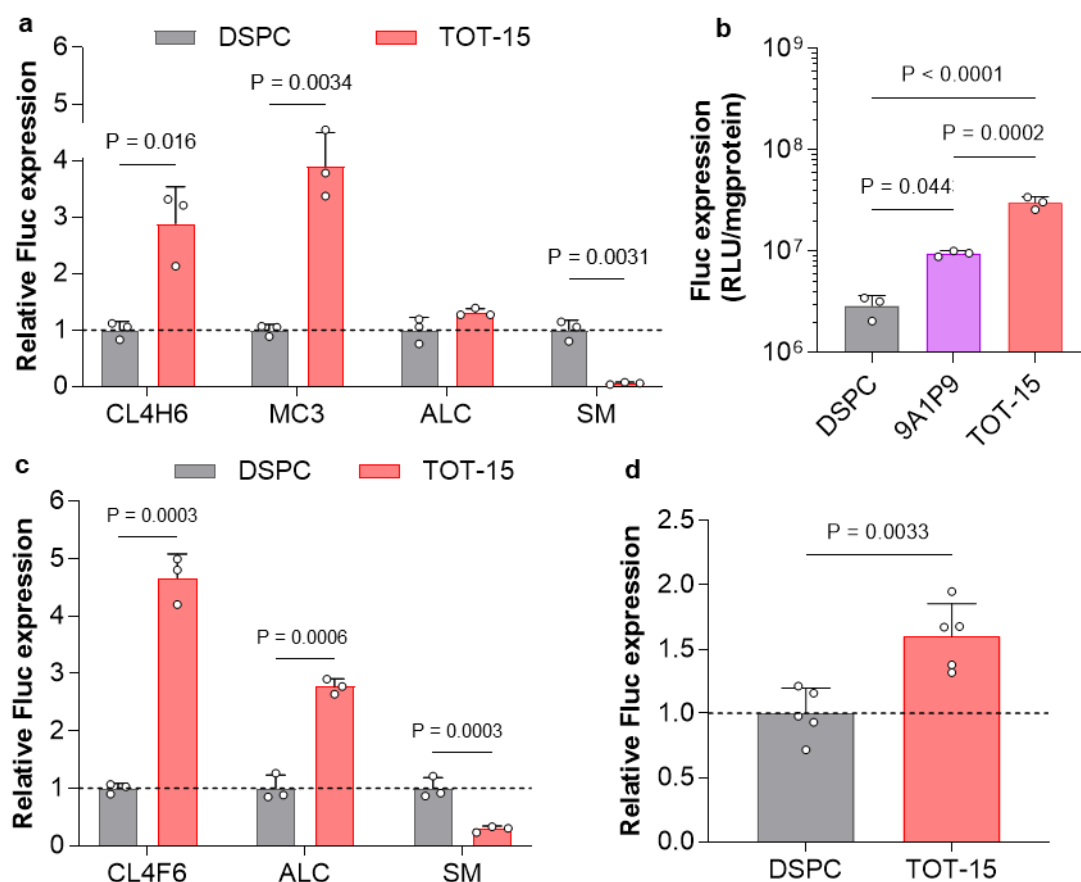


Fig. 37 TOT-15-LNPによる遺伝子発現活性の向上のさらなる検証。(a) 異なるイオン化脂質を使用したLNPにおけるTOT-15の遺伝子発現活性への影響。mFlucを搭載した脂質組成：イオン化脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% から構成されるLNP (DSPC) または脂質組成：CL4F6/TOT-15/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% (イオン化脂質=CL4H6、Dlin-MC3-DMA (MC3)、ALC-0315 (ALC)、SM-102 (SM))から構成されるLNP (zTOT) をマウスに0.01 mg/kgの用量で投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。各群のデータは DSPC を基準に正規化した。Average±SD、multiple student's t-test, n = 3。 (b) iPhos との遺伝子発現の比較。mFluc 搭載 LNP (MC3/ヘルパー脂質/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol% (ヘルパー脂質：DSPC、TOT-15、9A1P9)) を 0.01 mg/kg の用量でマウスに静脈内投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。Average±SD、one-way ANOVA followed by a Tukey's test, n = 3。 (c) 筋肉内投与による遺伝子発現活性の向上。mFluc 搭載 LNP (イオン化脂質/DSPC or TOT-15/コレステロール/DMG-PEG = 50:10:40:1.5 mol% (イオン化脂質=CL4F6、ALC、SM)) を 1 µg/mouse/50 µL の用量で筋肉内投与し、投与部位におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。各群のデータは DSPC を基準に正規化した。Average±SD、multiple student's t-test, n = 3。 (d) 脳室内投与による遺伝子発現活性の向上。mFluc を搭載した LNP (CL4F6/DSPC or TOT-15/コレステロール/PEG-DMG = 50:10:40:1.5 mol%) を 0.1 µg/mouse/5 µL の用量で脳室内投与し、脳におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。各群のデータは DSPC を基準に正規化した。Average±SD、student's t-test, n = 5。

次に TOT-15-LNP の保存安定性を評価した。4℃、遮光下で 1 か月間保存したところ、物性値に有意な変化は認められず、DSPC-LNP よりも高い遺伝子活性を維持していた (Fig. 38a)。また、外相を PBS から 9%スクロースを含む 20 mM トリス緩衝液に懸濁した TOT-15-LNP は、凍結融解サイクル後も物理的特性に有意な変化がなく、遺伝子発現の損失も認

められなかった (Fig. 38b~d)。

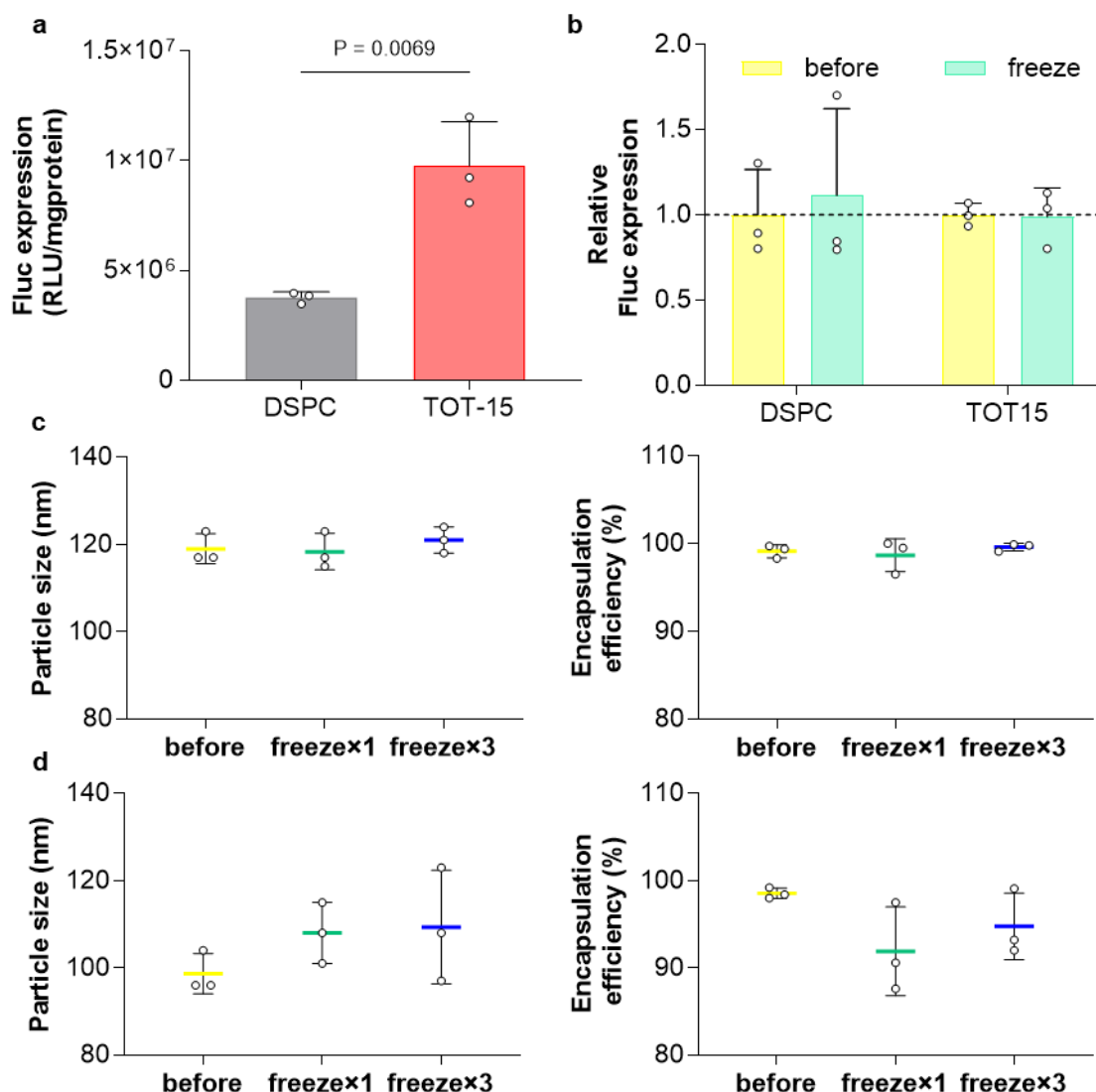


Fig. 38 保存安定性の評価。(a) mFluc 搭載 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を 4°C、遮光下で、1 か月間保存し、0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。Average±SD、student's t-test、n = 3。(b) mFluc 搭載 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を -80°C で 1 回凍結し、0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。肝臓における fluc 発現を測定した。各群のデータは凍結前を基準に正規化した。Average±SD、multiple student's t-test、n = 3。(c) TOT-15-LNP または (d) DSPC-LNP を -80°C で 1 または 3 回凍結し、左：平均粒子径、右：mRNA 封入率を測定した。Average±SD、n = 3。

3-2-3 zTOT を含む LNP のゲノム編集製剤としての応用

CRISPR/Cas9 は標的 DNA の切断を行い、その後の修復経路を経て遺伝子編集に至る最も汎用性の高いゲノム編集ツールである。遺伝子ノックアウトによる異常タンパク質の発現抑制、あるいは遺伝子ノックインによる機能性タンパク質の発現促進は、遺伝性疾患を含

めた様々な疾患に対する根本的な治療戦略となることが期待されている。Cas9 タンパク質をコードする mRNA を搭載した送達技術の開発は広く普及しており[153]、トランスサイレチン (transthyretin: TTR) 遺伝子を標的とした遺伝子ノックアウトの活性は、キャリアの性能を評価する指標として頻繁に使用されている[154]。TTR は主に肝臓の実質細胞で産生され、血中に分泌され循環するタンパク質であり、これまでに、トランスサイレチン型家族性アミロイドーシスの治療において変異型 TTR 遺伝子のサイレンシングを意図した siRNA 医薬品として ONPATRO® が承認されている。また、CRISPR/Cas9 を利用した TTR 遺伝子の永続的なノックアウトというアプローチで NTLA-2001 はトランスサイレチン型アミロイドーシスに対する mRNA-LNP 治療薬として臨床研究が進められている[155]。このように TTR 遺伝子は実用面においても有望な標的となっている。TOT-15-LNP のゲノム編集への応用を実証するため、TTR 遺伝子を標的とする sgRNA と Cas9 をコードした mRNA (mCas9) を重量比で 1:2 となるように搭載した LNP を静脈内投与し、1 週間後に血清を回収し ELISA により TTR 濃度を測定した。LNP 投与前に回収した血清中の TTR 濃度を基準として LNP 投与後に減少した TTR 濃度の割合を TTR ノックアウト効率として評価した (Fig. 39a)。その結果、0.3 mg/kg の投与量に対して、TOT-15-LNP では 95% の TTR ノックアウト効率を示した一方で、DSPC-LNP では 77% の減少にとどまった。1.0 mg/kg の投与量に対して、TOT-15-LNP では血清中の TTR 濃度が 98% 以上減少し、この TTR ノックアウトは少なくとも 1 か月間維持された (Fig. 39b)。

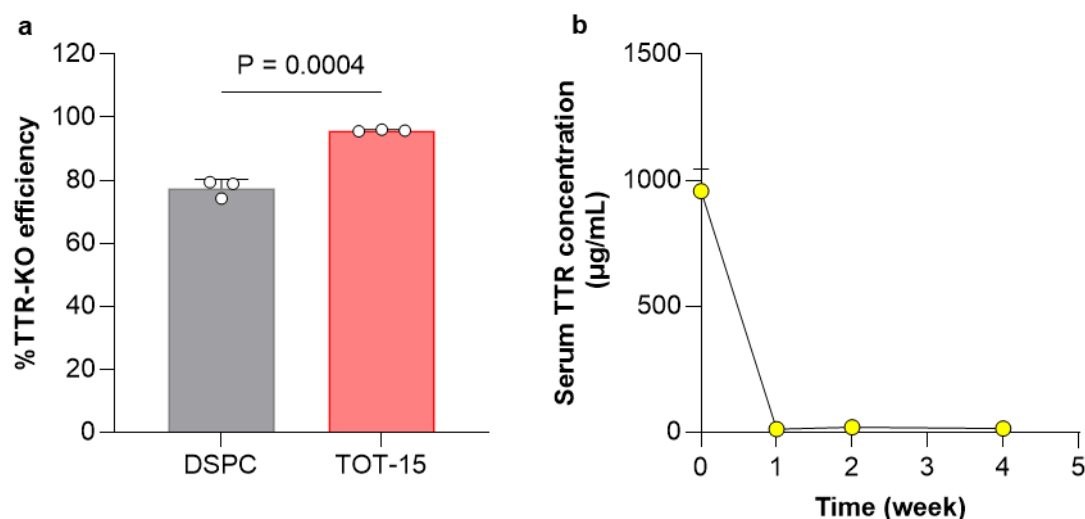


Fig. 39 TOT-15-LNP によるゲノム編集活性向上の検証。(a) Cas9 コード mRNA (mCas9)/transthyretin: TTR 標的 sgRNA を搭載した TOT-15-LNP または DSPC-LNP を 0.3 mg/kg の用量でマウスに投与し、1 週間後に血清を採取し、血清中の TTR タンパク質の濃度を ELISA により測定した。TTR ノックアウト効率は LNP 投与前の血清中 TTR 濃度に対する投与後の TTR 濃度の減少率として算出された。Average±SD, student's t-test, $n = 3$ 。(b) TTR ノックアウトの持続性を測定するため、mCas9/sgTTR を搭載した TOT-15-LNP または DSPC-LNP を 1.0 mg/kg で投与した。LNP 投与前および投与後 1、2、4 ヶ月後に血清中の TTR タンパク質濃度を測定した。Average±SD, $n = 3$ 。

また、TOT-15-LNP の安全性を評価するため、ゲノム編集活性が最大となる用量である 1.0 mg/kg の TOT-15-LNP を投与から 1 週間後に、血液学的パラメータ (Table 16) および肝臓と脾臓の病理組織学的検査を行った (Table 17)。その結果、TOT-15-LNP および DSPC-LNP の投与によって誘発される重大な毒性の兆候は認められなかった。

Table 16 PBS または mFluc 搭載 DSPC-LNP、TOT-15-LNP を 1.0 mg/kg の用量でマウスに投与し、最終投与から 7 日目に血清を回収し、生化学検査を行った。Average $\pm$ SD、one-way ANOVA followed by Dunnett's tests (*p < 0.05, **p < 0.01 vs PBS)、n = 3。TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; IP, inorganic phosphates; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; LDH, lactose dehydrogenase; AMY, amylase; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; T-BIL, total bilirubin; GLU, glucose.

	PBS	DSPC	TOT-15		PBS	DSPC	TOT-15
TP (g/dL)	4.8 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.005	ALT (IU/L)	19.7 $\pm$ 1.9	19.0 $\pm$ 1.4	20.3 $\pm$ 2.5
ALB (g/dL)	3.3 $\pm$ 0.05	3.2 $\pm$ 0.00*	3.3 $\pm$ 0.05	LDH (IU/L)	400.3 $\pm$ 67.1	426.0 $\pm$ 57.7	584.7 $\pm$ 81.7
BUN (mg/dL)	18.1 $\pm$ 0.4	16.2 $\pm$ 1.0	19.8 $\pm$ 1.6	AMY (IU/L)	2270.7.0 $\pm$ 129.9	2096.0 $\pm$ 201.8	2017.7 $\pm$ 165.0
CRE (mg/dL)	0.2 $\pm$ 0.005	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.01	γ -GT (IU/L)	<3	<3	<3
Na (mEq/L)	149.0 $\pm$ 0.8	151.7 $\pm$ 2.1	151.3 $\pm$ 1.7	T-CHO (mg/dL)	86.7 $\pm$ 2.9	84.0 $\pm$ 1.6	97.7 $\pm$ 4.1*
K (mEq/L)	10.2 $\pm$ 1.0	8.3 $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 0.05*	TG (mg/dL)	144.0 $\pm$ 32.4	110.0 $\pm$ 17.0	122.3 $\pm$ 8.5
Cl (mEq/L)	107.7 $\pm$ 0.5	110.0 $\pm$ 0.8*	108.7 $\pm$ 0.5	HDL-C (mg/dL)	50.0 $\pm$ 1.4	51.3 $\pm$ 1.7	59.7 $\pm$ 1.9**
Ca (mg/dL)	10.7 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 0.4	10.3 $\pm$ 0.2**	T-BIL (mg/dL)	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.005
IP (mg/dL)	15.0 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 0.6	GLU (mg/dL)	314.7 $\pm$ 59.0	288.7 $\pm$ 40.3	268.3 $\pm$ 21.0
AST (IU/L)	45.3 $\pm$ 2.1	53.3 $\pm$ 5.4	55.7 $\pm$ 3.8				

Table 17 PBS または mFluc 搭載 DSPC-LNP、TOT-15-LNP を 1.0 mg/kg の用量でマウスに投与し、最終投与から 7 日目に肝臓、脾臓を回収し、病理組織学的検査を行った。Average $\pm$ SD、n = 4。Hepatocellular necrosis は肝細胞壊死、Extramedullary hematopoiesis は髄外造血を表す。スコアは、異常所見なし (-)、軽度 ($\pm$)、中等度 (+)、中等度 (++)、高度 (+++)

	PBS			DSPC			TOT-15		
Mouse No.	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Liver									
Hepatocellular necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen									
Extramedullary hematopoiesis	-	-	-	-	-	-	$\pm$	-	-

3-2-4 zTOT による mRNA 発現活性向上のメカニズムの検証

次に、zTOT を含有した LNP による遺伝子発現の向上メカニズムを検証した。DSPC を TOT-15 に置換した LNP は特に肝臓における遺伝子発現効率を向上させたが、これは、TOT-15 による細胞内への mRNA 送達効率の向上に由来するのではなく、LNP の生体内での挙動に影響を与え肝臓の特定の細胞へ積極的に移行した結果である可能性が考えられ

た。そこでまず、mRNA-LNP の臓器移行性を評価した。DiR 蛍光標識した LNP を静脈内投与し、1 時間後の各臓器への DiR 蛍光を IVIS にて画像化および解析した結果 (Fig. 40a)、DSPC-LNP と TOT-15-LNP のいずれも主に肝臓に移行し、次いで脾臓に移行した。各組織における TOT-15-LNP の移行量は DSPC-LNP と同程度であった。このことから、DSPC を TOT-15 に置換しても LNP の生体内分布に変化は見られず、TOT-15 による遺伝子発現の向上効果は肝臓への積極的な LNP 移行によるものではないことが明らかになった。続いて、LNP の肝臓内分布を特定するため、DiI 蛍光標識した LNP を投与し、1 時間後の LNP の肝臓内分布を CLSM で観察した。DSPC-LNP と TOT-15-LNP のいずれも、肝実質細胞に広く蓄積し、その一部は血管内皮細胞またはクッパー細胞とみられる領域にも分布しており (Fig. 40b)、DSPC-LNP と TOT-15-LNP で肝臓内分布に差は認められなかった。これは、TOT-15-LNP の発現効率の向上が、生体内分布ではなく、細胞内取り込み後の mRNA 送達効率の改善によるものであることを示唆している。

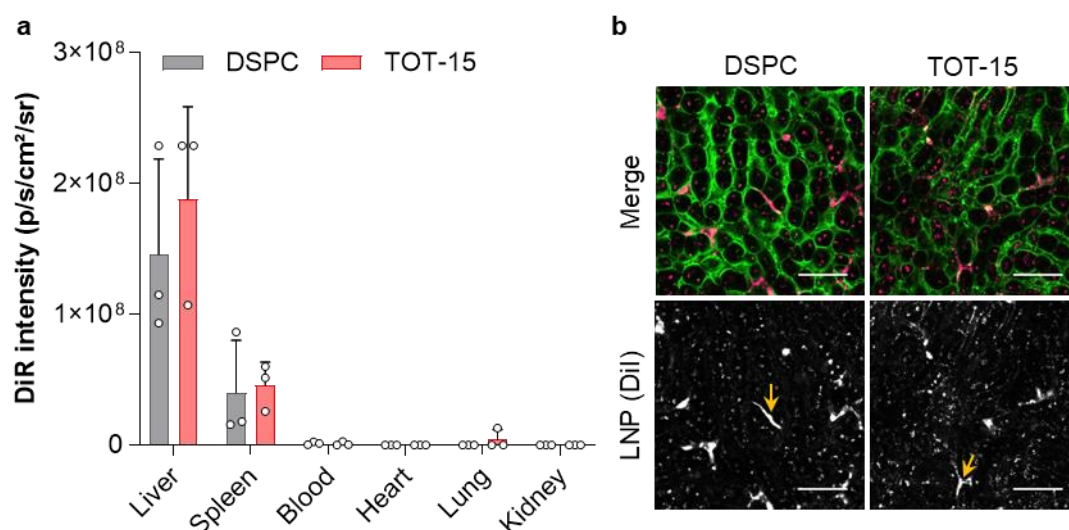


Fig. 40 TOT-15-LNP の体内分布。(a) DiR 標識 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を投与し、1 時間後、各臓器の DiR 蛍光強度を IVIS を用いて測定した。DiR 蛍光強度は Radiant efficiency (p/s/cm²/sr) で表した。Average±SD、multiple student-t test、n = 3。(b) LNP の肝臓内分布の観察。DiI 標識 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を投与し 1 時間後に肝臓を回収し、LNP の肝臓内分布を Nikon A1 CLSM で観察した。DiI (LNP) : 赤。FITC (血管) : 緑。Hoechst33342 (核) : 青。Bars : 100 μm。黄色矢印は肝細胞以外の細胞 (血管内皮細胞またはクッパー細胞) への LNP 取り込みを示す。

次に、生体膜に対する TOT-15 脂質の不安定化作用を評価するため、生体膜の主要な構成脂質として PC 系リン脂質である POPC と TOT-15 を混合し形成した脂質膜の相構造を ³¹P-NMR により測定した。脂質膜に存在するリン脂質は、脂質が二重平面に整列するラメラ相、負の曲率を持つ逆ヘキサゴナル相、立方相/ミセルといった等方性の相をとるとき、それぞれの構造ごとに分子運動が制限を受ける。即ち、ラメラ相では軸対象の回転運動が生

じ、逆ヘキサゴナル相ではそれに加えてシリンダー軸周りの回転運動が加えられる。さらに等方性の相ではリン脂質の運動が完全にランダムになる。化学シフトの異方性により、それぞれの相で固有の NMR スペクトルをとる。具体的にはラメラ相では高磁場側に、等方性の相では 0 ppm 付近に、逆ヘキサゴナル相では低磁場側に偏ったピークが現れる (Fig. 41b)。そのため、POPC と TOT-15 の脂質懸濁液における膜構造を ^{31}P -NMR 測定することで、相転移を評価できると考えた。結果として、POPC と TOT-15 を 1:1 の mol 比で含有する脂質懸濁液の脂質膜では低磁場側へピークがシフトし逆ヘキサゴナル相が観察され、POPC の比率を増やし 3:1 の mol 比とした脂質懸濁液では等方性ピークが観察された。さらに 5:1 の mol 比とした脂質懸濁液では高磁場側のピークが認められ、ラメラ相が観察された (Fig. 41b)。

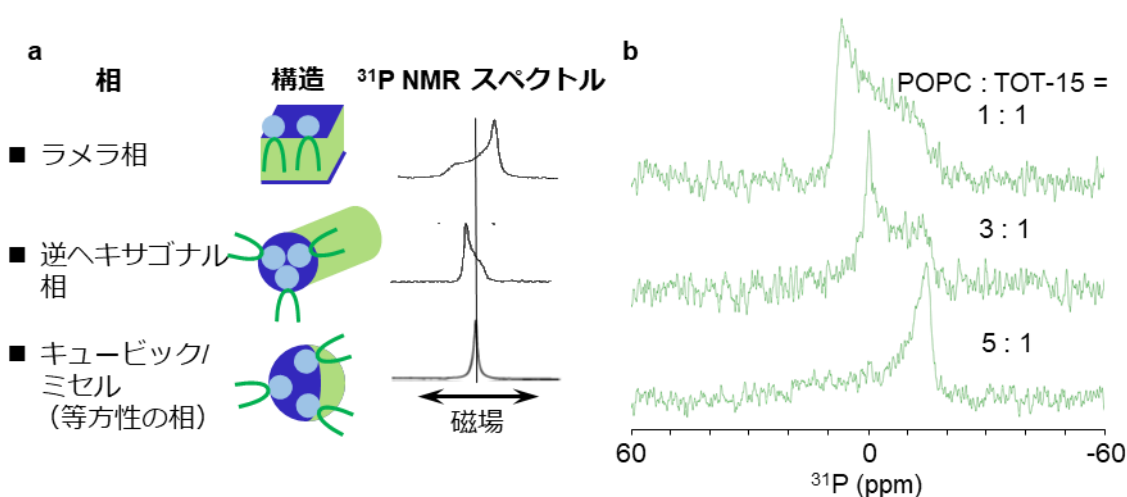


Fig. 41 ^{31}P -NMR による脂構造の評価。(a) 脂質膜の相構造と ^{31}P -NMR スペクトルの関係。ラメラ相、逆ヘキサゴナル相およびキュービック/ミセル等の等方性の相はそれぞれ高磁場（右）、低磁場（左）および 0 ppm に寄った形のピークを示す。(b) POPC:TOT-15 を mol 比で $x:1$ ($x=1, 3, 5$) で混合し脂質フィルムを作り、HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で水和させて形成した脂質懸濁液の 25°C における ^{31}P -NMR スペクトルを測定した。

続いて、zTOT を含有する LNP と生体膜との相互作用をヘモライシスアッセイにより評価した。ヘモライシスアッセイでは赤血球に LNP を混合し、赤血球の膜破壊により生じる溶血を測定するが、本研究では、エンドソーム内の低い pH を模倣した弱酸性緩衝液を使用することで、エンドソーム膜に対する LNP の膜破壊能を疑似的に再現し、生理的 pH の緩衝液を使用することで、全身投与された LNP の血中での生体由来の膜成分との相互作用を再現した (Fig. 42a)。TOT-15-LNP と DSPC-LNP はいずれも pH 5.0 の酸性緩衝液中では赤血球の破壊を示し、pH 6.0 の緩衝液中では、全ての TOT-15-LNP が溶血を示したのに対し、DSPC-LNP は全く示さなかった。一方で、pH 7.4 の緩衝液中では、2 つの LNP で赤血球の破壊は認められなかった。このことから、zTOT を含有する LNP は生体内に投与されると血中の赤血球やリポタンパク質などの生体由来の脂質膜成分とは相互作用しない

一方で、標的細胞に取り込まれ (Fig. 42b)、初期エンドソーム内のような弱酸性の pH 環境に曝露されると容易にエンドソーム膜と相互作用することが示唆される。

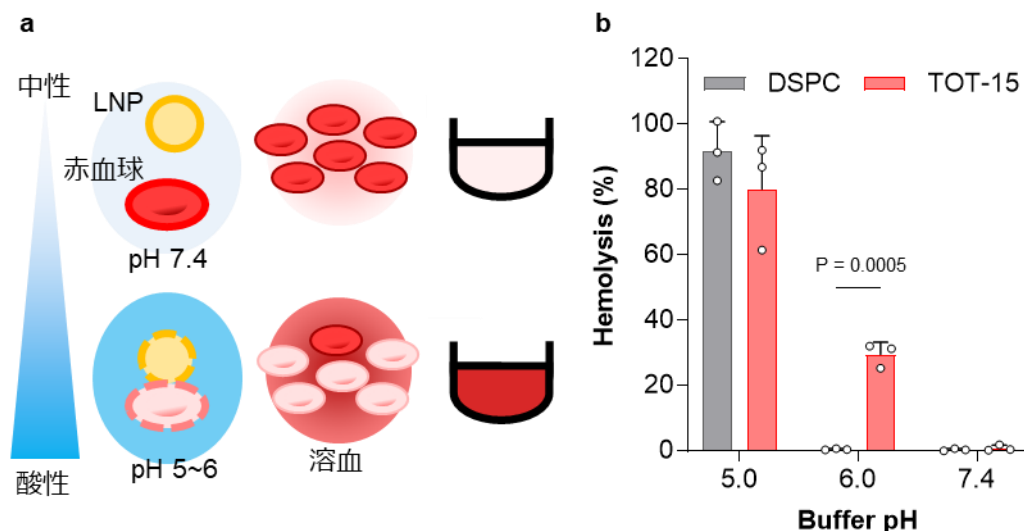


Fig. 42 ヘモライシスアッセイによる膜破壊の評価。(a) 赤血球懸濁液と LNP を混合し、膜破壊により生じた溶血を測定した。pH 7.4 の緩衝液は生体内 pH 環境を再現し、弱酸性の pH を持つ緩衝液はエンドソーム内の pH 低下を再現する。(b) 総脂質が 12.5 nmol となるように TOT-15-LNP または DSPC-LNP を、各 pH (5.0、6.0、7.4) の緩衝液に懸濁した赤血球懸濁液に加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、上清の吸光度を測定した。Hemolysis (%) は、陽性対照として赤血球に 1% Triton X-100 を添加したサンプルの吸光度に対する割合として算出した。Average $\pm$ SD、multiple student's t-test、n = 3。

3-2-5 エンドソーム脱出効率の推定

最後に、非標識の TOT-15-LNP をマウスに投与し、*in vivo* でのエンドソーム脱出効率を算出した。TOT-15-LNP は静脈内投与すると主に肝臓へ到達したが、細胞内に取り込まれた mRNA-LNP はその後、次の二つの経路をたどる (Fig. 43)。LNP がリソソームに到達すると、LNP は崩壊し、mRNA は直ちに分解される一方で、LNP が細胞内に取り込まれた後 5~15 分かけてエンドソーム脱出すると、mRNA は細胞質へと放出されその場で徐々に分解されると予想される。これは、細胞質内に移行した mRNA は、その 5' キャップ構造やポリ A 末端によって RNA 分解経路から保護される可能性があるのに対し、RNase を含む加水分解酵素が豊富なリソソームに移行した mRNA は、細胞質よりはるかに速い速度で分解するためである。[156, 157] さらに、TOT-15-LNP の構成脂質として使用した PEG-DMG は、他の PEG 脂質と比較して足場構造が短く、全身投与の後 LNP から脱離しやすい。PEG-DMG 脂質を含む LNP では投与から数十分以内に迅速にクリアランスされると報告されている [158]。そのため、TOT-15-LNP の肝臓への分布速度は、mRNA の分解速度よりも速いことが予想される。このモデルに従えば、mRNA を搭載した TOT-15-LNP を全身投与した後、肝臓での mRNA 残存量を経時的に測定すると、肝臓へ mRNA が直ちに到達した後、リソソームでの急速な mRNA 分解を反映した α 相と細胞質での漸進的な mRNA 分解

を反映した β 相の二つの相をとると予想できる。また、エンドソーム脱出効率は肝臓への mRNA 到達量に対する β 相の近似直線の切片として表される細胞質に放出された mRNA 送達量の商と定義できる。しかしながら実際には、LNP が投与された後、肝臓への分布には時間差ができる一方で、mRNA は肝臓に到達したそばから分解を受ける。そのため、肝臓に到達した mRNA の正確な総量を決定することは困難である。そこで、本研究では 2 つの仮定を考えた。投与された LNP が全て肝臓に到達すると仮定すると、肝臓への mRNA 到達量は投与量とみなせるが、実際にすべての LNP が肝臓へ移行することはなく肝臓外の臓器にも多少蓄積されるため、エンドソーム脱出効率の算出値は過小評価される可能性がある。一方、肝臓への mRNA 到達量を実測した最大の mRNA 量とみなすと、肝臓内での分解の影響を幾分か含むため、エンドソーム脱出効率の算出値は過大評価される恐れがある。とはいえ、エンドソーム脱出効率の真の値は両者の値の範囲内にある (Fig. 43)。

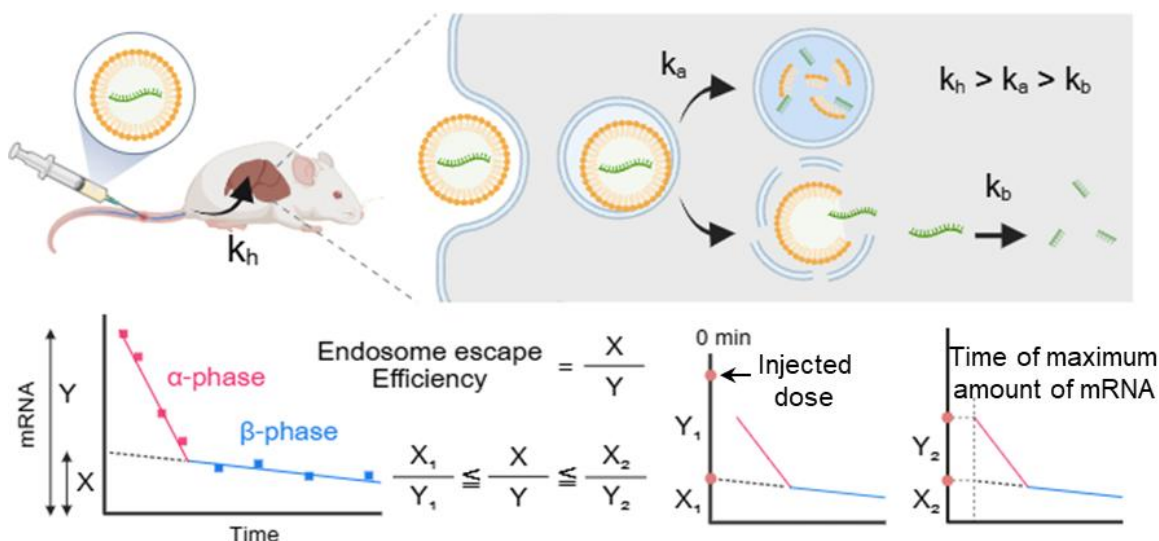


Fig. 43 mRNA-LNP の細胞内動態モデルとエンドソーム脱出効率の計算。mRNA-LNP が肝臓へ移行する速度を k_h 、リソソーム内で mRNA が分解される速度を k_a 、エンドソーム脱出後の細胞質内で mRNA が分解される速度を k_b とおくと、 $k_h > k_a > k_b$ の順で表せる。mRNA-LNP 投与後、肝臓内の mRNA 量は α 相または β 相を経て経時的に減少する。ここで、 X を細胞質への mRNA 送達量、 Y を肝臓への mRNA 到達量とし、 Y_1 は mRNA-LNP の投与量 (肝臓 1 g あたり 200 ng) として表され、 X_1 は β 相の近似直線の y 軸切片、 Y_2 は LNP 投与から 30 分後の実測の mRNA 量、 X_2 は LNP 投与から 30 分後の β 相の近似直線の値を示す。エンドソーム脱出効率は X/Y と表されるが、この値は X_1/Y_1 と X_2/Y_2 の間にある。

mFluc を搭載した TOT-15-LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与し経時的に肝臓を回収し、その mRNA 残存量を RT-qPCR により測定した結果、LNP 投与から 4 時間を境として、肝臓中の mFluc 量は α 相と β 相の 2 つの相を明確に示した (Fig. 44a)。細胞質での分解過程を反映する β 相における mRNA の半減期は約 11 時間であり、リソソームでの分解過程を反映する α 相における mRNA の半減期として算出された約 0.8 時間よりも大幅に長かった。また、TOT-15-LNP のエンドソーム脱出効率は以下のように具体的に算出し

た。肝臓への mRNA 到達量を投与量から肝臓 1 g あたり 200 ng と、細胞質への mRNA 送達量を β 相の近似直線の y 軸切片から肝臓 1 g あたり 14.5 ng とそれぞれ計算し、その商であるエンドソーム脱出効率の下限値を 7.2%と求めた。一方で、肝臓への mRNA 到達量を LNP 投与から 30 分後に実測された最大値から肝臓 1 g あたり 5.26 ng と、細胞質への mRNA 送達量を β 相の近似直線の投与後 30 分の切片から肝臓 1 g あたり 0.70 ng とそれぞれ計算し、その商であるエンドソーム脱出効率の上限値を 13.3%と求めた。即ち、TOT-15-LNP のエンドソーム脱出効率は 7.2~13.3%の範囲と算出された。ここで、肝臓への mRNA 到達量を投与量に係数として LNP の肝臓への移行割合を乗じた値として考えると、エンドソーム脱出効率をより正確に予想できる。上述のように mRNA は肝臓へ蓄積した後、急速な分解を受けて正確な到達量を求めることが困難なため、分解の影響を受けにくい蛍光標識した脂質を含む LNP を用いて、肝臓移行割合を評価した。DiR 蛍光標識した LNP を静脈内投与し、1 時間後の肝臓ホモジェネートの DiR 蛍光を測定した結果、肝臓への LNP の移行割合は 74.4%と算出された (Fig. 44b)。この係数を投与量に乘じることで、肝臓への mRNA 到達量を肝臓 1 g あたり 148 ng と計算した結果、TOT-15-LNP のエンドソーム脱出効率は 9.7%以上と算出された。

さらに、LNP 投与から 4 時間以上経過すると、リソソームによる mRNA 分解に由来した mRNA 残存量の急速な低下が終結している。即ち、この時点の mRNA 量はエンドソームから脱出し細胞質中に存在する mRNA 量を反映する。TOT-15-LNP 投与から 6 時間後の肝臓における mRNA 残存量は、DSPC-LNP と比較して 1.8 倍多くなった (Fig. 44c)。このことから、TOT-15-LNP が mRNA を細胞質に効率的に送達したことを示唆している。

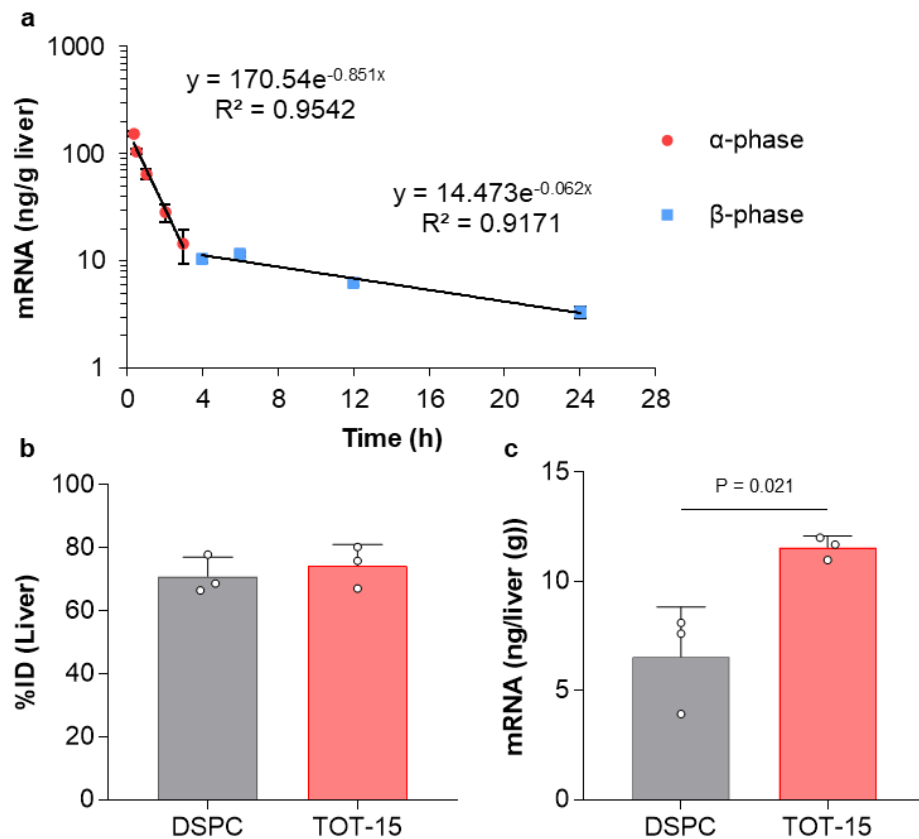


Fig. 44 TOT-15-LNP のエンドソーム脱出効率の算出。(a) mFluc 搭載 TOT-15-LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、投与後 0.5~24 時間にわたり経時的に肝臓を回収し、肝臓 1 g 中に残存する mRNA 量を RT-qPCR により定量した。 α 相は LNP 投与後 4 時間未満、 β 相は投与後 4 時間以上と定義し、それぞれの指数近似曲線を示した。(b) 肝臓へ移行した LNP の割合。DiR 標識 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を 0.01 mg/kg の用量で投与し、1 時間後、回収された肝臓の DiR 蛍光を Varioskan LUX マイクロプレートリーダーを用いて測定した。%ID は mRNA-LNP が全て肝臓へ移行すると仮定した場合 100%ID とし、各サンプルで測定された蛍光強度から算出した比率である。各サンプルの %ID は肝臓重量で補正され、投与された LNP に対する肝臓へ移行した LNP の割合を算出した。Average $\pm$ SD、student's t-test、n = 3。(c) mFluc 搭載 TOT-15-LNP または DSPC-LNP を 0.01 mg/kg の用量でマウスに投与し、6 時間後に回収した肝臓 1 g 中の残存 mRNA 量を測定した。Average $\pm$ SD、student's t-test、n = 3。

3-3 考察

DSPC は LNP で一般的に使用されるヘルパー脂質であり、親水性頭部に大きなホスホコリン基と、2つの飽和炭化水素鎖で構成される。この化学構造により曲率が低く、相転移温度が低いためシリンダー型となり、LNP に含まれると脂質膜を安定化させる。したがって、DSPC を含む LNP ではエンドソーム膜との相互作用を低下させる可能性がある。エンドソーム膜中の PC 系リン脂質も同様にシリンダー型をとり、これによりエンドソーム膜が安定化されると同時に、膜融合を介した LNP のエンドソーム脱出が阻害される。一方、zTOT はこれらの PC 系リン脂質とは異なる荷電官能基の配向を持つ脂質頭部を有し、zTOT と生体膜を構成する PC 系リン脂質の間に強い分子間引力を生じさせる。さらに、足場構造に導入される3つのオレオイル骨格はシス二重結合が含まれ、トリスリンカーの sp^3 炭素から等価に伸がるため、zTOT は円錐型の立体構造をとると考えられる。zTOT のこれらの構造的な特徴は、エンドソーム膜の PC 系リン脂質との結合後に円錐状構造を維持した複合体を形成すると予想される。実際、TOT-15 を生物膜の主成分である POPC の混合物の ^{31}P -NMR スペクトルには、逆ヘキサゴナル相に由来するピークが観察された (Fig. 41b)。このことから、TOT-15 を含む LNP は標的細胞に到達して取り込まれた後、エンドソーム膜の PC 系リン脂質と積極的に相互作用し、エンドソーム膜を不安定な膜構造へと強力に促進することが考えられる。また、TOT-15 と POPC の混合物では等方性ピークも観察されており、TOT-15 が脂質膜を容易に負の曲率を持つキュービック相へと誘導することが示唆される。キュービック構造は膜融合プロセスに必要なエネルギーが低く、膜融合を促進する構造であることが知られている [159]。逆ヘキサゴナル相であれ等方性のキュービック相であれ、TOT-15 は安定なラメラ相をとる生体膜を負の曲率をもつ構造体へ誘導し、生体膜を不安定化させると考えられる。興味深いことに、TOT-15 と POPC の mol 比が等価な状態を下回り TOT-15 に対する POPC の数が多くなっても等方性ピークは観察され続けた。これは TOT-15 が周囲の複数のリン脂質と相互作用することで、負の曲率をもつ膜構造を誘導することを示唆している。

TOT-15 を含む LNP は、pH 6.0 の緩衝液中において赤血球と相互作用し、細胞膜を破壊した。この緩衝液は、初期エンドソーム内の弱酸性環境を模倣している (Fig. 42b)。DSPC-LNP と TOT-15-LNP の pKa 値がそれぞれ 6.1 および 6.3 であり、両製剤のイオン化脂質が同様に荷電することを考慮すると、TOT-15 を含む LNP は初期エンドソームの時点でエンドソーム膜と容易に相互作用し、エンドソーム脱出効率を高めると予想される。実際、TOT-15-LNP 投与後、経時的に肝臓に残存する mRNA 量を qRT-PCR により測定し、エンドソーム脱出効率を算出したところ 9.7%以上であることが示された。エンドソーム脱出効率を推定した過去の報告では、搭載する核酸分子を標識した上で培養細胞を用いて評価していた。具体的には、金標識した siRNA の輸送過程を電子顕微鏡により観察した報告や [64]、蛍光標識した mRNA の細胞内コンパートメントへの集積を単一分子蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察した報告があるが [68]、このような従来のエンドソーム脱

出効率の評価手法と比べて、本研究では、非標識 mRNA-LNP を用いて *in vivo* におけるエンドソーム脱出効率を推定しており、mRNA-LNP 本来の生体内での挙動を反映し、エンドソーム脱出効率を正確に定量できる利点がある。また、エンドソーム脱出効率を推定した報告では、ONPATPRO[®] 製剤である MC3 をイオン化脂質として含む LNP では 1~2% [64]、ポルフィリン脂質を含むナノ粒子では約 2% [160]、PDPAEMA コアを有するナノ粒子では 2% 未満、PDEAEMA-r-PDPAEMA コアをもつナノ粒子では 10~15% とその値が求められており [161]、Moderna 社が開発した mRNA-LNP では 15% と算出された [68]。これらの報告と比較すると、TOT-15-LNP はトップレベルのエンドソーム脱出効率であると考えられる。さらに、LNP 投与から 6 時間後という肝臓での mRNA 発現を評価した時間枠において、TOT-15-LNP の肝臓中の mRNA 残存量は DSPC-LNP よりも 1.8 倍高かった (Fig. 44c)。したがって、TOT-15 を含む LNP はエンドソーム成熟の初期にエンドソーム膜と容易に相互作用することでエンドソーム脱出が促進される。その結果、mRNA の細胞質への送達量が多くなると示唆される。一方で、TOT-15-LNP による肝臓での遺伝子発現は DSPC-LNP の 5 倍高く (Fig. 36a)、mRNA 送達と遺伝子発現との間には乖離が認められた。これは、TOT-15 がエンドソーム脱出効率の改善以外に遺伝子発現を向上する要因を持つためと考えられる。mRNA の翻訳プロセスは遺伝子発現を決定するもう一つの重要なパラメータである。LNP 内の脂質と強く相互作用する mRNA は細胞質内で翻訳が阻害されると想定されるが、DSPC と比較して TOT-15 はエンドソーム脱出時にエンドソーム膜との相互作用のために動員され、その後さらに解離が進むと考えられる。

zTOT を含む LNP は DSPC よりも高い遺伝子発現を示した (Fig. 36-38)。さらに、mCas9 を搭載した LNP においても、TOT-15-LNP は DSPC-LNP と比較して TTR を効率的にノックアウトした (Fig. 39a)。さらに、TOT-15-LNP は、核酸医薬品として臨床応用される ONPATPRO[®] や COVID-19 の mRNA-LNP 製剤に使用される MC3 や ALC-0315 等をイオン化脂質として組み合わせた場合であっても、DSPC-LNP よりも高い遺伝子発現を示した (Fig. 37a)。この結果は、zTOT を含む LNP が従来使用されてきた DSPC の代替として遺伝子発現をさらに向上させる汎用的な戦略となり得ることを示している。

一方で、イオン化性脂質として SM-102 を含む LNP は、TOT-15 を DSPC に置換した場合、むしろ遺伝子発現が低下した。SM-102 含有 LNP と TOT-15 の組み合わせで遺伝子発現が低下する理由は特定されていないが、SM-LNP の pKa 値は 6.8 であり、本研究で評価した LNP の中で最も高かった (Table 14)。したがって、LNP 中のイオン化脂質の一部は血流中で帯電し、TOT-15 がリボタンパク質等の生体内の脂質膜構造と相互作用を誘発することで、肝臓に到達する前に LNP が分解されやすくなる可能性がある。将来的には、LNP 調製における最適条件を見出すため、組み合わせる zTOT の種類と LNP の脂質組成比を検討する必要がある。

さらに、TOT-15 を含有する LNP は pH7.4 における緩衝液中で赤血球を破壊しなかった (Fig. 42b)。イオン化脂質として CL4F6 を含む LNP の pKa 範囲が 6.1~6.3 であり、これ

らは血流中でほぼ電荷を持たないことを考慮すると、TOT-15 単独では生体膜中のリン脂質と相互作用して膜破壊を誘導しないことが示唆される。これは、TOT-15-LNP によるエンドソーム膜の破壊がイオン化脂質の電荷に直接起因し、TOT-15 の生物学的膜に対する不安定化作用がイオン化脂質による膜破壊を促進することを示唆している。つまり、TOT-15-LNP は、イオン化脂質が帯電するエンドソーム中の低い pH 環境では生体膜と相互作用を強く誘導する一方、イオン化脂質が帯電しない血流中では生体膜との積極的な相互作用が抑制されると予想される。一般的に、血流中のナノ粒子と細胞成分との相互作用は毒性を誘発することが知られている。赤血球との相互作用は溶血や赤血球の凝集を誘発する懸念があり[162, 163]、血小板との相互作用は血小板凝集や血栓形成を誘発する懸念がある[164, 165]。さらに、白血球との相互作用は炎症性サイトカインの分泌や免疫反応の活性化を誘発することが知られている[166]。したがって、血液循環中の LNP と生体膜との望ましくない相互作用を回避することは、安全な LNP 製剤の設計に不可欠であると考えられる。実際、TOT-15-LNP は、血液学的パラメータおよび肝臓・脾臓の病理所見に基づく知見から、有意なレベルの毒性を示さなかった (Table 16, 17)。

本研究には限界がある。各 zTOT が遺伝子発現活性の向上に寄与する程度は異なっていたものの、脂質頭部構造が生体膜の不安定化やその後の細胞質への mRNA 送達にどのように影響するかは依然として分かっていない。TOT-10 はベタイン構造を有し、正負の電荷が同一鎖上に固定されている。一方、TOT-9、13、14、15 は Asp や Glu などの酸性アミノ酸構造を持ち、正負の電荷の位置が固定されない。これらの脂質頭部の構造的な違いは、zTOT と生体膜中のリン脂質との相互作用に影響を与える可能性がある。脂質間、あるいは脂質と脂質膜との間の実際の相互作用を測定するには技術的課題が残るものの、分子動力学シミュレーションは脂質相互作用や LNP 内での脂質位置を予測する強力なツールとして知られている。将来的には、シミュレーション等を用いた各 zTOT とリン脂質または生体膜との相互作用の予測が、mRNA 送達を強化する脂質構造の設計につながる可能性がある。

3-4 小括

本章では、細胞内 mRNA 送達の向上を目指し、脂質頭部に 1 組の正負の電荷を持つ zTOT をヘルパー脂質として含有した LNP 製剤の開発を行った。DSPC を zTOT に置換した LNP は静脈内投与により肝臓における遺伝子発現を向上し、特に、TOT-15 を含有する LNP では遺伝子発現が約 5 倍高くなった。また、承認 LNP 製剤で採用されている一般的な脂質組成において、先行研究である iPhos 脂質よりも高い遺伝子発現を示した。加えて、当研究室で開発されたイオン化脂質のみならず、承認イオン化脂質との組み合わせの場合でも、TOT-15 を含有する LNP は遺伝子発現が向上した他、脳室内投与や筋肉内投与といった投与経路においても遺伝子発現の向上が明らかになった。しかしながら、イオン化脂質として SM-102 を使用した場合、遺伝子発現はむしろ低下しており、今後、組み合わせる zTOT の種類や LNP の脂質組成割合を検討する必要がある。また、安定なラメラ構造をとる生体膜を構成する PC 系リン脂質に TOT-15 を混合することで形成した脂質膜は不安定な逆ヘキサゴナル相あるいは、等方性の構造をとり、TOT-15 を含有する LNP は初期エンドソームを再現した pH 6.0 の緩衝液中において赤血球の破壊を示したことから、TOT-15 による生体膜との相互作用が検証された。本研究では、非標識 mRNA-LNP を用いて *in vivo* におけるエンドソーム脱出効率を推定しており、TOT-15 を含有する LNP のエンドソーム脱出効率は 9.7%以上であると算出された。DSPC と比較して TOT-15 を含有する LNP はより多くの mRNA を細胞質へと送達しており、エンドソーム膜との積極的な相互作用を介して効率的な細胞質への mRNA を達成した結果、遺伝子発現活性が向上したと示唆された。ヘルパー脂質として TOT-15 を採用した LNP 製剤は、標的細胞内への効率的な mRNA 送達に寄与し、遺伝子発現を向上させるため、ゲノム編集等への応用が期待される。

結論

mRNA と LNP の組み合わせにより mRNA 医薬品への応用が進められているが、その潜在的な課題として、肝臓外臓器への細胞レベルでの標的化と細胞内への mRNA 送達効率の制約がある。本研究では、TOT 骨格を共通とし、頭部構造が異なる 2 種類の LNP 構成脂質を開発し、これを含有する LNP の *in vivo* における機能を検証した。

1 章では、脂質頭部に第 3 級アミン構造を有する iTOT をイオン化脂質として設計した。肝臓外臓器を標的とする LNP 脂質組成を探索したところ、iTOT のうち最も pKa が低い TOT-5 を含み、DSPC を 15 mol% 含有する製剤が脾臓 B 細胞へ移行した。DSPC を豊富に含む LNP は剛直で疎水的な界面を形成し、フィブリノーゲンとの相互作用を介し、補体の吸着を促し、CD21/35 を介して B 細胞へ取り込まれた。リガンド修飾によるアクティブターゲットや SORT のような表面電荷に従ったナノ粒子の体内動態の制御戦略と比べ、DSPC の含量を調節するシンプルな方法で LNP の臓器指向性を制御できる本報告は、肝外臓器を標的とする LNP 設計指針として、幅広く適用できると考えられる。

2 章では、脾臓 B 細胞の中でも抗原提示細胞として知られる MZB 細胞へ効率的に取り込まれる 15% DSPC の特徴を利用して、mRNA ワクチンとしての応用を検証した。抗原コード mRNA を搭載した 15% DSPC により、MHC クラス I を介した抗原提示および CTL の誘導に対する MZB 細胞の直接的な関与が示された。また、15% DSPC は RNA-LPX と同等以上の優れた抗腫瘍効果を認め、MZB 細胞を標的とするがんワクチン製剤の有用性が示された。さらに、15% DSPC は COVID-19 のワクチン製剤と比べ、肝臓への mRNA を回避し、肝臓標的の LNP で認められた肝毒性を示さなかった。したがって、15% DSPC は優れたワクチン効果と安全性を両立する製剤であることが実証された。

3 章では、TOT 骨格の頭部構造に 1 組の正負の電荷をもち全体として中性となる zTOT を設計し、zTOT をヘルパー脂質として含有する LNP 製剤の開発を行った。従来の LNP 製剤で採用されている一般的な脂質組成において、DSPC を zTOT の一つである TOT-15 に置換した LNP は先行研究である iPhos 脂質よりも遺伝子発現が向上し、組み合わせるイオン化脂質や投与経路によらない汎用的な遺伝子発現の向上に寄与した。TOT-15 を含む LNP は生体膜を不安定しエンドソーム膜を破壊することが示唆され、そのエンドソーム脱出効率は 9.7% 以上であると推定された。

以上より、iTOT をイオン化脂質とした LNP 開発から、脾臓の抗原提示細胞を標的とする製剤が見いだされ、さらにワクチン製剤としての応用が検証された。また、zTOT をヘルパー脂質とした LNP 開発から、細胞質へ効率的に mRNA を送達する製剤が見いだされ、その細胞質送達の増強による mRNA 発現活性の向上も示された。本研究で得られた知見が、LNP 研究の 2 つの課題解決に向けた LNP 設計の指針となり、mRNA 医薬の更なる発展につながることを期待し、本稿を終える。

実験方法

【実験材料】

【試薬】

・ 2-Mercaptoethanol	Gibco (cat#21985-023)
・ 4×Laemmli サンプルバッファー	Bio-Rad (cat#1610747)
・ 5×Passive Lysis Buffer	Promega (cat# E1941)
・ Acetate	Wako (cat#017-00256)
・ ACK lysing buffer	Gibco (cat# 00-4333-57)
・ Albumin bovine serum fraction V, >96% (BSA)	SIGMA (cat# A5611-10G)
・ ALC-0315	Ambeed (#A1375212-100 mg)
・ Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 100K	Merck Millipore (cat# 910096)
・ APC anti-mouse CD3 antibody Clone: 17A2	Biolegend (cat# 100236)
・ APC/Cy7 anti-mouse CD21/35 antibody Clone: 7E9	Biolegend (cat# 123418)
・ Anti-CD8(mouse) mAb-FITC (Clone;KT15)	MBL Life Science(cat# K0227-4)
・ Block Ace Powder	ケー・エー・シー (cat#UKB80)
・ Buffer Solution Standard (pH6.86)	Wako (cat#025-03195)
・ Buffer Solution Standard (pH4.01)	Wako (cat#028-03185)
・ Buffer Solution Standard (pH9.18)	Wako (cat#028-03205)
・ CBQCA Protein Quantitation Kit	Thermo (cat#C6667)
・ CD19 MicroBeads mouse	Miltenyi Biotec (cat#130-121-301)
・ Cell strainer (40 μm)	FALCON(cat# 352340)
・ Cholesterol	Aldrich (cat# C8667)
・ CleanCap EGFP mRNA (5moU)	Tri Link (cat# L-7201-1000)
・ CleanCap Fluc mRNA (5moU)	Tri Link (cat#L-7204-1000)
・ CleanCap M6 Cas9 mRNA (N1MePsU)	Tri Link (cat# L-8106-1000)
・ CleanCap OVA mRNA (5moU)	Tri Link (cat# L-7610-1000)
・ CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	BECKMAN (cat#B53230)
・ DiD	Molecular Probes (cat# D-7757)
・ DiI	Molecular Probes (cat# D-3899)
・ DiR	Molecular Probes (cat# D-1273)
・ DL-Malic Acid	ナカライテスク (#21028-65)
・ D-luciferin K	Biomedical science (#BR-404000)
・ DMG-PEG2000	NOF (cat# GM-020)
・ DMSO	Invitrogen (cat# D12345)
・ DOPE	NOF (cat# ME-8181)

• DOPC	NOF (#MC-8181)
• D-PBS(-)	Wako (cat# 045-29795)
• DSPC	NOF (cat# MC-8080)
• EDTA 2NA	DOJINDO (cat# 345-01865)
• EzGel Ace	ATTO (cat#2332327)
• EzProtein Ladder	ATTO (cat#2332346)
• Ethanol	Wako (cat# 057-00456)
• Fetal bovine serum (FBS)	Wako (cat# 453-04567)
• FITC anti-mouse CD49b antibody Clone: DX5	Biolegend (cat# 108905)
• FITC anti-mouse F4/80 antibody Clone: BM8	Biolegend (cat# 123108)
• FITC anti-mouse Ly-6G antibody Clone: 1A8	Biolegend (cat# 127605)
• FTY-720	Avanti (cat# A85392)
• HBSS(-)	ナカライテスク (cat# 14249-95)
• HEPES	DOJINDO (cat# 342-01375)
• HEPES solution	SIGMA (cat#H0887-100mL)
• HRP Goat anti-mouse IgG	Biolegend (cat# 405306)
• Insulin syringe with a needle 30G × 10 mm 0.5 mL	NIPRO (cat# 08-277)
• Lectin (LEL, TL) Dylight 649	Vector laboratory (cat# DL1178)
• Lectin (LEL, TL) Fluorescein	Vector laboratory (cat# FL1171)
• LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche (cat# 04729692001)
• Luciferase Assay Substrate	Promega (cat# E152A)
• MES	Dojindo (#343-01621)
• Milli-Q	Merck Millipore
• Marginal Zone and Follicular B Cell Isolation Kit	Miltenyi biotec (cat#130-100-366)
• N, N-メチレンビス (アクリルアミド)	Wako (cat#138-06032)
• Nunc イムノプレート	Thermo (cat# 439454)
• OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) peptide	MedChemExpress (cat# HYP1489)
• PBS(-)	TAKARA(cat#T900)
• PE anti-mouse CD11b antibody Clone: M1/70	Biolegend (cat# 101208)
• PE anti-mouse CD11c antibody Clone: N418	Biolegend (cat#117307)
• PE anti-mouse CD21/35 antibody Clone: 7E9	Biolegend (cat# 123409)
• PE anti-mouse CD23 Clone: B3B4	Biolegend (cat# 101607)
• PE anti-mouse CD3 antibody Clone: 17A2	Biolegend (cat#100206)
• PE anti-mouse CD19 antibody Clone: 6D5	Biolegend (cat#115507)
• PE/Cy7 anti-mouse CD19 antibody Clone: 6D5	Biolegend (cat#115520)
• PE/Cy7 anti-mouse CD11b antibody Clone: M1/70	Biolegend (cat#101216)

• Penicillin-streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco (cat# 15140-122)
• PerCP/Cy5.5 anti-mouse I-A/I-E antibody Clone: M5 Biolegend (cat#107626)	
• Pierce™ BCA Protein Assay Regent Kit	Thermo (#23225)
• Purified anti-mouse CD16/32 Antibody	Biolegend (cat# 101302)
• POPC	NOF (#MC-6081)
• propidium iodide solution	Biolegend (cat# 421301)
• ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	TOYOBO (cat# FSQ-301)
• Ribogreen	Thermo (cat# R11490)
• RPMI-1640	SIGMA (cat# R8758)
• SM-102	CaymanChemical (#33474)
• Sodium azide	ナカライテスク (cat# 31233-42)
• Sodium chloride	Wako (cat# 191-01665)
• Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Wako (cat# 191-07145)
• Sodium pyruvate solution	SIGMA (cat#S8636-100ML)
• Sucrose	Wako (cat# 193-00025)
• Sulfuric acid	Wako (cat# 192-04696)
• Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit	Wako (cat# 6141)
• TEMED	Bio-Rad (cat#161-0800)
• TMB キット	ナカライテスク (cat# 05298-80)
• TOT	当研究室内で合成
• T-Select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL-PE	MBL Life Science(cat# TS-5001-1)
• TRIzol reagent	ThermoFisher (cat# 15596026)
• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	ナカライテスク (cat# 35434-21)
• TritonX-100	Aldrich (cat# T8787)
• Tween20	SIGMA-ALDRICH (cat# P9416)
• Ultra-LEAF Purified anti-CD21/35 antibody (clone 7E9)	Biolegend (cat# 123430)
• Ultra-LEAF Purified Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl antibody (clone RTK2758)	Biolegend (cat# 400544)
• Water for Molecular Biology	Millipore (cat#H20MB0106)

【器具・機器類】

• 1 mL シリンジ	HAMILTON (cat# 81320)
• 384-well black plate	Greiner Bio One (cat# 781076)
• 96-well 黒色 plate	Corning (cat#3915)

• Amicon Ultra-4, 3kDa	MerckMillipore (cat#UFC781076)
• Cool Block Bath EC-40R	AS ONE
• CytoFLEX	BECKMAN COULTER
• GLOMAX 20/20 LUMINOMETER	Promega
• in vivo imaging system 200 series	PerkinElmer
• Nikon A1	Nicon
• Thermal Cycle Dice Real Time System III	TaKaRa
• Varioskan Lux	Thermo Fisher
• Vortex mixer	AS ONE
• Zetasizer Nano ZS ZEN3600	Marvern instrument
• ガラス基板バッフルミキサー内蔵マイクロ流路	北大工学研究院よりご供与
• セルストレイナー (メッシュ 40 μ m)	FALCON(cat# 352340)
• シェーキングインキュベーターSI-300	AS ONE
• シリンジポンプ Pump 33 DDS	HARVARD APPARATUS
• テルモ注射針 (27G)	Terumo (cat# NN2725-R)
• ニプロマイシヨット (30G)	ニプロ (cat# 08277)
• バス型ソニケーター	AIWA
• ポータブル pH メーター	LAQUA
• ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash MS-100R	TOMY

【試薬調製】

- 25 mM acetate buffer

酢酸 (Mw 60.05、1.05 mg/mL) 71.5 μ L を DDW 約 40 mL に加えた。その後、1 M NaOH 水溶液を用いて pH4.0 (5.0, 6.0) にし、DDW を加えて 50 mL にメスアップした。この溶液を 0.45 μ m 滅菌フィルターろ過し、4°Cで保存した。

- FACS buffer の調製

PBS 錠 10 個を DDW 1 L に溶かし、オートクレーブを行った。その後、溶液にアルブミン、ウシ血清由来、フラクシオン V, pH7.0 を 5.0 g、アジ化ナトリウムを 1.0 g 加えた。4°Cで保存した。

- 10 mM HEPES Buffer (pH 7.4)

HEPES を DDW 450 mL に溶解し 5 M NaOH で pH を 7.4 に調整した。その後 DDW で 500 mL にメスアップし、0.20 μ m 滅菌フィルターろ過を行い 4°Cで保存した。

- 0.25% TritonX-100 in PBS(-)

10×PBS(-) 5 mL を DDW 45 mL で希釈し、そこへ TritonX-100 125 μ L を加えて攪拌後、4°Cで保存した。

・ 10 mM DL-Malic Acid, 10 mM HEPES, 10 mM MES, 120 mM NaCl buffer (pH5.0, 6.0, 7.4)

HEPES を 119 mg, MES を 107 mg, DL-Malic Acid を 67 mg, NaCl を 351 mg, DDW を加え NaOH 溶液で各 pH に調製し DDW で 50 mL にメスアップし、0.20 μ m 滅菌フィルターろ過を行い 4°Cで保存した。

・ 20 mM クエン酸・130 mM NaCl buffer (pH3.50-5.50 (5 種))

無水クエン酸 190 mg と NaCl 380 mg を DDW に加え、NaOH 溶液で各 pH に調製し 50 mL にメスアップした。0.20 μ m 滅菌フィルターろ過を行い 4°Cで保存した。

・ 20 mM リン酸・130 mM NaCl buffer (pH3.50-5.50 (5 種))

NaH₂PO₄・2H₂O 160 mg と NaCl 380 mg を DDW に加え、NaOH 溶液で各 pH に調製し 50 mL にメスアップした。0.20 μ m 滅菌フィルターろ過を行い 4°Cで保存した。

・ 20 mM Tris-HCl・130 mM NaCl buffer (pH8.50-9.50 (3 種))

Tris 0.12 g と NaCl 0.38g を DDW に加え、NaOH 溶液で各 pH に調製し 50 mL にメスアップした。0.20 μ m 滅菌フィルターろ過を行い 4°Cで保存した。

【細胞培養】

E.G7-OVA 細胞および B16-F10 細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から入手した。E.G7-OVA 細胞については、Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) に 50 μ M 2-メルカプトエタノール、10 % v/v FBS、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシンとなるように加えた培地を用いた。B16-F10 細胞については、RPMI-1640 に 50 μ M 2-メルカプトエタノール、10 % v/v FBS、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウムとなるように加えた培地を用いた。細胞は 37°C、5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、継代を 3~5 回行った。

【動物実験】

実験プロトコルはすべて、実験動物の管理と使用に関する指針に基づき、北海道大学動物実験委員会の審査を受け承認されたものである (承認番号: 20-0176)。マウスは特に言及のない限り Balb/c (4 週齢、雌性) または C57BL6/N (5 週齢、雌性) を日本 SLC (静岡, 日本) より購入した。マウスは北海道大学の特定の施設で 12 時間明期/12 時間暗期の規則的

な周期で維持され、pelleted mouse diet (cat#5053, LabDiet, US) や水が自由に摂取可能な環境で、1 ゲージあたり 5 匹で飼育された。なお、C57BL6/N は実験に使用する前に 1 週間環境に順化させた。

【*In vitro* 転写反応による mRNA の合成】

抗腫瘍効果の検証で使用した mFluc および mTrp2 は *In vitro* 転写で合成した。T7 mRNA 合成用テンプレートベクター (BspQ1) (タカラバイオ, 滋賀, 日本) に Fluc 配列、または Trp2 配列 (シグナルペプチド、破傷風毒素エピトープ P2 および MITD を含む) を組み込んだ鑄型プラスミド DNA に対して制限酵素 BspQ1 (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を使用して線状化した。具体的には、100 µg の鑄型プラスミド DNA に対して 10 U/µL の BspQ1 を 100 µL と 10×BspQ I Buffer を 200 µL 加え、Nuclease-Free Water を加えて全量 2 mL とした反応液を 50°C で 1 時間静置した。反応液に TE 飽和フェノール、クロロホルムをそれぞれ 2 mL 加えて混合し、4°C、15,000 g、10 分間遠心した。上清を回収し、クロロホルムを等量加えて混合し、4°C、15,000 g、5 分で遠心した。上清を回収し、DDW を加えて全量を 2 mL とし、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 200 µL および 4 µL の Dr. GenTLE precipitation carrier を加え混合した後 5 mL のエタノールを加えて混合し、4°C、15,000 g、15 分で遠心した。上清を除去し、70% エタノールを加え軽く転倒混和した後、4°C、15,000 g、2 分で遠心した。上清除去し、風乾後、1 mg/mL となるように線状化プラスミド DNA を Nuclease-Free Water に溶解した。続いて、Takara IVTpro™ mRNA SynthesisKit(low dsRNA) (タカラバイオ, 滋賀, 日本) のプロトコルに従って *in vitro* 転写反応を行った。具体的には、60 µg の線状化した鑄型プラスミド DNA に対して 100 mM の ATP、CTP、GTP およびキット付属 UTP または N1-Methylpseudouridine-5'-Triphosphate (TriLink BioTechnologies, CA, US) をそれぞれ 120 µL ずつ、100 mM の CleanCap Reagent AG (TriLink BioTechnologies, CA, US) を 48 µL、10×Transcription Buffer および 10×Enzyme Mix 2 をそれぞれ 120 µL ずつ加え、Nuclease-Free Water を加えて全量 1200 µL とした反応液を 37°C で 2 時間静置した。反応液に 240 µL の DNase I を加え混合し 37°C で 15 分間静置した後、NucleoSpin RNAClean-up (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて mRNA を精製した。mRNA は 260 nm の吸光度測定により定量した。得られた mRNA はアガロース電気泳動により確認した後、使用時まで -80°C で保存した。用いた鑄型 pDNA の配列を以下に示す。

Template DNA for IVT Trp2 mRNA (BspQI)	ATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAG GATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTT CTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCG GCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCG ACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCG
4879 bp	

転写開始配列	CGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGC
Trp2 コーディ ング配列	TGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGC
BspQ1 切断 サイト	TATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCAC
	CTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATG
	CGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGAC
	CACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATG
	GAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAACA
	TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCGCCAGGCTCAAGG
	CGAGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGC
	GATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAATAATGGCCGCTTT
	TCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCG
	CTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGA
	ACTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACG
	GTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCC
	TTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCC
	TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTAC
	ACCGCATCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
	CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG
	CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCAC
	GTGCTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAG
	ATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG
	TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAA
	GGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
	TTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTG
	CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
	TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAG
	CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
	ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCC
	AGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACG
	ATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGG
	GTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG
	AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGC
	TTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC
	AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG
	AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCT
	CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC

	GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT TCCTGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGGCTCACATGTTCTTGCTGC TTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTAT TGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGT TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT AACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAG AGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCA CTATAAGGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTC AGAGAGAACCCGCCACCATGCTTGTGATGGCCCCAAGGACCG TGCTGCTGCTGCTGCTCAGCCGCCCTGGCCCTTACCGAAACCT GGGCAGGCTCTGGGTCAGGTAGCGGCTCCGGGTCCGGACTC GTCGGATGGGGACTCCTGCTTGGTTGCCTGGGTTGTGGGAT CTTGCTGAGAGCCAGAGCCCAGTTTCCTCGGGTGTGTATGA CACTCGATGGCGTCCTGAACAAGGAGTGTTGCCCTCCACTG GGGCCGGAGGCTACAAACATCTGCGGGTTTCTGGAAGGTAG GGGTCAGTGTGCTGAGGTCCAGACCGATAACCGACCTTGGA GCGGCCCCGTATATTCTGCGAAATCAGGATGACCGTGAGCAG TGGCCAAGGAAGTTCTTCAATCGCACATGCAAATGCACTGGA AACTTTGCCGGATATAATTGTGGTGGGTGTAAATTTGGCTG GACGGGACCAGATTGCAATAGGAAGAAACCAGCCATACTGAG GAGAAACATCCACTCACTGACAGCGCAAGAACGGGAACAGTT CCTGGGAGCACTCGACCTGGCTAAGAAGAGTATCCATCCCGA CTACGTGATTACAACGCAGCATTGGCTGGGACTGCTTGGGC CCAATGGGACTCAACCACAGATTGCCAATTGCTCTGTATATG ACTTCTTTGTCTGGCTCCACTACTACAGCGTCAGAGACACAC
--	---

	TGCTTGGCCCAGGCAGGCCCTATAAGGCCATCGACTTTTCCC ACCAAGGCCCTGCCTTTGTACATGGCACAGGTACCATCTCC TGTGGCTTGAGAGAGAGCTGCAACGCCTGACTGGAAACGAG TCCTTCGCTCTGCCCTACTGGAACCTCGCAACAGGCAAGAAC GAATGTGACGTTTGCACGGACGAATTGCTTGGCGCAGCCAG ACAGGATGACCCCACTCTGATCAGCCGAAACAGCCGCTTCAG TACCTGGGAGATAGTTTGGCGACTCCTTGGACGACTATAACCG GAGGGTAACACTCTGTAATGGCACCTACGAAGGTCTGCTGC GGCGGAATAAGGTTGGTCGTAACAATGAGAACTGCCCACCC TGAAGAATGTGCAGGATTGCCTTTCTCTCCAGAAATTCGATT CTCCACCTTTCTTTCAGAACAGCACGTTTCAGCTTCAGAAATG CGCTCGAAGGGTTCGATAAAGCGGATGGCACTCTGGATAGT CAAGTGATGAACCTTCACAATCTGGCTCACTCTTTCTTGAAT GGGACCAATGCTTTGCCTCATAGCGCAGCAAACGATCCTGTC TTTGTGGTACTCCACTCCTTCACAGACGCCATCTTTGATGAG TGGCTGAAGCGCAACAACCCCTCTACCGACGCTTGGCCTCAG GAGCTCGCACCCATTGGGCATAATCGAATGTACAACATGGTG CCTTTCTTTCCACCCGTGACCAACGAGGAATTGTTCTCTACT GCCGAACAGTTGGGATACAACCTACGCAGTGGATCTGTCAGA GGAGGAGGCTCCTGTTTGGTCTACTACTCTGTCCGTGGTGA TTGGTATCTTGGGAGCGTTTGTCTTTTGCTGGGCTTGCTG GCTTTTCTCCAGTATCGGAGACTCCGCAAAGGATATGCACCG CTGATGGAGACAGGACTGAGCAGCAAGCGGTATACCGAGGA AGCTGGGTCCGGTTCCGGACAGTACATCAAGGCGAACAGCA AGTTCATAGGGATCACTGAACTGTCTGGCGGCGGTGGAAGT GGCGGCGGTGGGTCTGGAGGAGGCGGATCCATTGTGCGCCG GGCTCGCCGTTCTGGCTGTGGTGGTGATTGGCGCTGTTGTA GCAGCTGTGATGTGTGCGCCGTAATCATCAGGCGGCAAAGG CGGCAGTTACAGTCAGGCCGCCTGTTTCAGACAGCGCTCAAG GGAGCGACGTGAGTCTGACCGCATGATGAGCTGGAGCCTCG GTGGCCTAGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTC CTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAG TCTGAGTGGGCGGCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AA AA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAGCTCTCGAGTCGA
--	---

	CCTAGGATCCCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGC GAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGG GAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAG GATCTG
--	---

【mRNA を搭載した LNP の調製】

エタノールにより溶解したイオン化脂質、コレステロール、DSPC、PEG-DMG を例えば、TOT-5:コレステロール:DSPC:PEG-DMG=65:20:15:1.5 (mol 比) となるように総脂質濃度が 8 mM となるように混合して脂質溶液とした。また、25 mM acetate buffer (pH4.0) により mRNA を 55 µg/mL に希釈し mRNA 溶液とした。Pump 33 DDS (Dual Drive System) Syringe Pump (Harvard Apparatus, US) を使用して脂質溶液と mRNA 溶液をそれぞれ 0.5 mL/min、1.5 mL/min で送流し、ガラス基板バッフルミキサー内蔵マイクロ流路 (iLiNP) を使用して混合攪拌し、LNP 溶液を得た。なお、iLiNP は北海道大学大学院工学研究院、マイクロシステム化学研究室、渡慶次学教授・真栄城正寿准教授よりご供与頂いた。LNP 溶液は Spectra/Por 4 dialysis membrane (MWCO 12,000-14,000、Spectrum Laboratories) に移し、外水相を PBS (-) として 4°C で 2 時間以上透析した。

承認されているイオン化脂質 (DLin-MC3-DMA、ALC-0315、または SM-102) を使用した LNP については、イオン化脂質/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50: x :50 - x :1.5 mol% (x = 5~15 mol%) かつ総脂質濃度が 8 mM となるように脂質溶液を調製した。

RNA-LPX は 10 mM DOTMA と 10 mM DOPE を mol 比で 1:1 で含む 400 µL 含むエタノール溶液を蒸発させ脂質フィルムを形成した。800 µL の PBS(-) を脂質フィルムに加え、室温で 7 分間静置し脂質を水和させた。空のリポソームを形成するために、水和した脂質フィルムをバスソニケーター (Aiwa, 東京, 日本) にかけて約 20 秒間超音波処理した。最終脂質濃度 0.845 mM となるように PBS(-) で 5.92 倍希釈した後、リポソーム懸濁液と PBS(-) を加え 0.2 mg/mL とした mRNA 溶液を等量混合し、N/P 比が 1.3:2 となる RNA-LPX を調製した。得られたサンプルは直ちにマウスに投与した。

zTOT-LNP は例えば CL4F6:コレステロール:TOT-15:PEG-DMG=50:40:10:1.5 (mol 比) かつ総脂質濃度が 8 mM となるように脂質溶液を調製した。

【Ribogreen アッセイによる mRNA 封入率の評価】

10 mM HEPES buffer (pH7.4) により mRNA 搭載 LNP を 150 倍希釈した溶液を黒色 96 well プレートに 100 µL 添加し、10 mM HEPES buffer (pH7.4) により TritonX-100、Ribogreen をそれぞれ 2% (wt/vol)、200 倍希釈した溶液 (Triton (+)) および、10 mM HEPES buffer (pH7.4) により Ribogreen を 200 倍希釈した溶液 (Triton (-)) をそれぞれ 100 µL ずつ混合した。シェーキングインキュベーター SI-300 (AS ONE) を使用して 700 rpm、30 秒間攪拌し、Varioskan LUX (Thermo Fisher Science, US) により蛍光測定した。

(Excitation/Emission = 500/525 nm)。mRNA の回収率、内封率を以下のように算出した。

$$\text{mRNA 回収率 (\%)} = \left(\frac{\text{Triton (+) を加えた溶液の RNA 濃度}}{\text{100\%回収した時の理論上の RNA 濃度}} \right) \times 100$$

$$\text{mRNA 封入率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Triton (-) を加えた溶液の RNA 濃度}}{\text{Triton (+) を加えた溶液の RNA 濃度}} \right) \times 100$$

【粒子径、ゼータ電位の測定】

LNP の粒子径は、D-PBS(-)により 50 倍に希釈した LNP 溶液 50 μL を粒子径測定用ディスプレイキュベットに加え Zetasizer Nano ZS ZEN3600 を使用して測定した。また、ゼータ電位は、あらかじめ 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) 500 μL を加えたゼータ電位測定用ディスプレイキュベットに、10 mM HEPES buffer (pH 7.4) により 10 倍希釈した LNP 溶液を 200 μL 加え Zetasizer Nano ZS ZEN3600 を使用して測定した。

【TNS アッセイによる LNP の pKa 測定】

130 mM NaCl, 20 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.50~5.50, 5 種)、130 mM NaCl, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.00~8.00, 5 種)、130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.50~9.50, 3 種) をそれぞれ 930 μL と 10.0 μL の 0.6 mM TNS を混合した溶液を、蛍光測定用 384-well black plate に 3.00 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。LNP 溶液は 0.5 mM lipid となるように生理食塩水により希釈した溶液を 47.0 $\mu\text{L}/\text{well}$ で加えた。Varioskan Lux で蛍光 (Ex : 321 nm , Em : 447 nm) を測定し、各緩衝液の pH における蛍光強度の平均値を算出後、その最小値をブランクとして差し引き、最大値を 100%荷電状態として各 pH における荷電率を求めた。50%荷電時の pH を脂質膜 pKa とした。

【クライオ顕微鏡観察による LNP の構造解析】

3%DSPC および 15%DSPC に対してクライオ電子顕微鏡により観察した。LNP 懸濁液を Quantifoil Cu1.2/1.3 グリッド (EMJapan, 東京, 日本) に添加し、FEI Vitrobot Mark IV システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて液体エタン中で凍結した。グリッドは液体窒素中で保存した後、DE-20 カメラ (Direct Electron, 米国カリフォルニア州サンディエゴ) を装備した JEM-2200FS 電界放出電子顕微鏡 (JEOL, 日本) を用いて、200 kV で 30,000 倍の倍率で観察した。試料調製および観察は Terabase 株式会社 (愛知県) に依頼した。

【DCVJ による粘性の測定】

脂質濃度 1 mM の LNP を 5 mM DCVJ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と激しく攪拌し

ながら混合し、DMSO に溶解して脂質に対する DCVJ の mol 比を 400 とした。DCVJ 標識 LNP を 37°C に設定した Varioskan LUX を用いて 440 nm で励起し、460~650 nm の範囲の蛍光スペクトルを測定した。DCVJ の分子数を補正するために、1% w/v となるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えて 60°C、700 rpm で 10 分間攪拌した後、Varioskan LUX を用いて 350~550 nm の範囲の吸光度を測定した。粘性の指標として、R (fluorescence-absorption ratio) を算出した。具体的には、460~660 nm の範囲の蛍光スペクトルの積分値を、390~510 nm の範囲の吸光スペクトルの積分値で除した。R 値は LNP 膜の粘度を評価する指標となり、値が大きくなるほど膜粘度が高いことを示す。

【Laurdan による水和度の測定】

脂質濃度 0.1 mM の LNP 溶液 500 μ L に対して、DMSO に溶解した 0.2 mM の Laurdan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 0.5 μ L を加え、総脂質に対して Laurdan を 0.2 mol% とし、激しく攪拌しながら混合した後、37°C、700 rpm で 3 時間攪拌した。Laurdan 標識 LNP を 37°C に設定した Varioskan LUX を用いて 340 nm で励起し、440 nm の蛍光強度 (I440) および 490 nm の蛍光強度 (I490) を測定した。ゲル相に由来する蛍光スペクトルの極大値 (I490) および流動相に由来する蛍光スペクトル (I440) を用いて $(I440 + I490) / (I440 + I490)$ として Generalized Polarization (GP) を定義した。GP は LNP 膜の水和度を評価する指標となり、値が大きくなるほど膜水和度が低いことを示す。

【*In vivo* ルシフェラーゼアッセイによるルシフェラーゼ発現量の測定】

BALB/c マウスに対して CleanCap Fluc mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, CA, US) を搭載した LNP を 0.01 mgRNA/kg で静脈内投与した。LNP 投与から 6 時間後に肝臓および脾臓をジルコニアビーズ (直径 1.4 mm) を加えたサンプルチューブに約 50 mg 回収し、使用時まで -80°C で保存した。1×Passive Lysis Buffer を 500 μ L/tube で加え、Micro Smash MS-100R にて、肝臓を 4000 rpm, 20 秒で 2 回、脾臓を 5000 rpm, 20 秒で 2 回、細胞破碎し、4°C, 13000 rpm, 10 分で遠心した。上清を 1×Passive Lysis Buffer にて 100 倍希釈しサンプルとした。50 μ L の Luciferase Assay Buffer を添加した試験管に 50 μ L のサンプルをピペッティングにより混合し、3 分間静置した後、GLOMAX20/20 LUMINOMETER により発光量を測定した。各サンプルは Bicinchoninic acid: (BCA) アッセイによりタンパク量を測定し、タンパク質 1 mg あたりのルシフェラーゼ発光量 (RLU/mg protein) として算出した。

【BCA アッセイによるタンパク質定量】

In vivo luciferase assay にて得られたサンプルを DDW で 150 倍に希釈した。また、BSA protein を DDW で希釈して 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/mL の検量線サンプルを得た。検量線サンプルと測定サンプル 20 μ L を 96-well plate に添加した。Pierce BCA protein

assay reagent を Reagent A : Reagent B = 50 : 1 で混合した溶液 160 μ L と混合して 37°C, 30 min インキュベートし VARIOSKAN LUX にて 562 nm の吸光度を測定した。

【IVIS によるルシフェラーゼ発現量の測定】

C57BL6/N マウスに対して CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 10 μ gRNA/50 μ L/mouse または PBS を 50 μ L となるように筋肉内投与した。PBS (-)により希釈した D-ルシフェリン (Bio Medical Science, Japan) を測定 10 分間に 150 mg/kg で腹腔内投与し、LNP 投与から 6 時間後に大腿二頭筋、肝臓および脾臓を回収し、*in vivo* imaging system 200 series (Perkin Elmer, US) により発光量を測定した。各組織の発光量 (photons/s/cm²/sr) は Living Image software (Perkin Elmer, US) により定量した。

【FCM による LNP 細胞取り込みの測定】

特に言及のない限り、Balb/c マウスに対して蛍光色素 DiD を脂質終濃度 0.5 mol%で標識した LNP を 0.1 mgRNA/kg で静脈内投与した。LNP 投与から 1 時間後にマウスを安楽死し、脾臓を回収した。脾臓は細断した後、滅菌シャーレに HBSS (-) を加え脾臓をほぐして 40 μ m セルストレイナーに通し、4°C、400 g、5 分で遠心した。上清を除去した後、1 mL の RBC lysis buffer を加え赤血球を除去した。9 mL の HBSS (-) で懸濁し 4°C、400 g、5 分で遠心した。上清を除去した後、5 mL の HBSS (-) で再懸濁後、 3×10^6 cells/tube となるようにとり、4°C、400 g、5 分で遠心した。上清を除去して 1×10^6 cells あたり 100 μ L となるように purified anti-mouse CD16/32 antibody (10 μ g/mL in FACS buffer) を加え、10 分間氷上で静置した。B 細胞、T 細胞、NK 細胞については、得られた細胞を FITC 標識抗 CD49b 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体、PE/ Cyanine7 標識抗 CD19 抗体を加え 30 分間氷上で静置し染色した。樹状細胞および好中球は、PE 標識抗 CD11c 抗体、PerCP/ Cyanine5.5 標識抗 IA/IE 抗体、FITC 標識抗 Ly-6G 抗体、PE/ Cyanine7 標識抗 CD11b 抗体を加え染色した。MZB 細胞、FOB 細胞は、PE/ Cyanine7 標識抗 CD19 抗体、PE 標識抗 CD23 抗体、APC/ Cyanine7 標識抗 CD21/35 抗体を加え染色した。染色後、FACS buffer により 1 mL/tube とし、4°C、400 g、5 分間遠心し、続けて 2 回 FACS buffer 1 mL で洗浄してサンプルとした。versa comp antibody capture bead kit のプロトコルに従い、CytoFLEX の蛍光漏れ込み補正用ビーズを調製した。サンプルに propidium iodide solution を 6 μ L 添加し、各細胞群を抽出後、DiD 蛍光強度を測定した。各細胞群の DiD 蛍光強度は、細胞の自家蛍光を減じ算出した。なお、B 細胞を CD19⁺, CD3⁻、T 細胞を CD19⁻, CD3⁺、NK 細胞を CD3⁻, CD49b⁺、樹状細胞を CD11c⁺, I-A/I-E⁺、好中球を Ly6G⁺, CD11b⁺、MZB 細胞を CD19⁺, CD21/35^{hi}, CD23^{mid}、FOB 細胞を CD19^{hi}, CD21/35^{mid}, CD23⁺と定義した。

抗 CD21/35 抗体による LNP の取り込み阻害を測定するため、BALB/c マウスに Ultra-LEAF 精製抗 CD21/35 抗体 (クローン 7E9) またはラット IgG2a κ アイソタイプコントロール抗体 (クローン RTK2758) を 100 μ g/mouse で静脈内投与し、投与から 5 分後に、

0.5%DiD 標識 LNP を 0.2 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。抗体投与から 30 分後に脾臓を採取し、脾臓免疫細胞における DiD の平均蛍光強度 (MFI) を CytoFLEX で測定した。

LNP の *in vitro* 細胞内取り込みを測定するため、未処理 BALB/c マウスを安楽死させ、血清を採取した。未処理血清、1 μ mol EDTA ニナトリウムを含む未処理血清、または加熱不活化血清を、8 ngRNA/mL の 0.5%DiD 標識 LNP と、血清対 LNP が容量比 2 となるように混合し、37°C で 1 時間静置した。脾臓 B 細胞は、マウス CD19 MicroBeads (130-121-301; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて分離し、50 μ M 2-メルカプトエタノール、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および 100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地に懸濁した。2 $\times$ 10⁵ cells の脾臓 B 細胞を血清処理した LNP 懸濁液と混合した。最終濃度を 10% v/v 血清、10 mM EDTA、10% v/v 未満の PBS(-)とした。37°C、5% CO₂ で 30 分間静置した後、脾臓 B 細胞を回収し、DiD 蛍光強度を CytoFLEX で測定した。

FTY-720 投与による LNP 取り込み阻害の測定のため、FTY-720 1 mg/kg をマウスに腹腔内投与後 3 時間で 0.5%DiD 標識 LNP を投与した。DiD-LNP 投与後 1 時間で脾臓を採取し、脾臓免疫細胞における DiD の MFI を CytoFLEX で測定した。

15% DSPC と mRNA-LPX の免疫細胞への取り込みを比較するために、0.1 mol% DiD で標識したナノ粒子をマウスに静脈内注射し、脾臓免疫細胞における DiD の MFI を CytoFLEX で測定した。

【プロテオーム解析】

Balb/c (7~9 週齢, 雌性) から採取した 1 mL の血液に対して直ちに 1.0 mg の EDTA・2Na で処理し、血液を得た。血漿については、血液を 4°C、800 g、5 分で遠心した後、上清を回収し、再び 4°C、10,000 g、10 分で遠心し、上清を回収して得た。血清については、BALB/c マウスからの新鮮な血液を室温で 30 分間静置した後、室温、800 g、5 分で遠心した後、上清を回収し、再び 4°C、10,000 g、10 分で遠心し、上清を回収して得た。また、0.1 mol% の DiR で標識した LNP を脂質濃度 20 mM となるように D-PBS (-) で希釈した。マウス血清または血漿を各 LNP 溶液と体積比 1:1 で混合し、37°C で 1 時間静置した。反応液は、qEVoriginal Gen 2 カラム (Izon Science 社、ニュージーランド・クライストチャーチ) を用いて精製した。回収した画分は等量の 40 w/w スクロース溶液と超遠心チューブ (Beckman Coulter 社, CA, USA) 内で混合し、Optima XPN-90 超遠心機 (Beckman Coulter 社, CA, USA) を用いて 4°C、200,000 g で 2 時間遠心分離し、さらに精製した。脂質を除去するため、精製された反応液を ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) のプロトコルに従って抽出した。精製タンパク質の濃度は CBQCA Protein Quantitation Kit (C-6667; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) のプロトコルに従って測定した。各サンプルのタンパク質解析および相対定量 (データ非依存型プロテオミクス) はカズサ・ゲノム・テクノロジーズ株式会社 (千葉県) に委託した。試料の解析手順

は以下の通りである。サンプルに 100 mM Tris pH 8.0、4% SDS、20mM NaCl 60 μ L を加え、密閉式超音波破での碎機によってタンパク質を溶解した。タンパク質の S-S 結合を切断するために、タンパク質溶解液に終濃度 20 mM になるように TCEP を添加し、80°Cで 10 分間静置した。システイン残基をアルキル化処理するために、終濃度 30 mM になるようにヨードアセトアミド (IAA)を添加して遮光下、室温で 30 分間静置した。Cytiva 社の Sera-Mag SpeedBead Carboxylate-Modified Magnetic Particles (Hydrophylic)と Sera-Mag Carboxylate-Modified Magnetic Particles (Hydrophobic)を 1:1(v/v) で混合し、蒸留水で 3 回洗浄し、蒸留水で 8 μ g solids/ μ L になるように調製した。アルキル化したサンプルに SP3 ビーズ 20 μ L を入れて、さらにサンプル液量の 3 倍量のエタノールを加えた後、20 分間室温で混合した。ビーズを 80%エタノールで 2 回洗浄し、50mM Tris-HCl pH8.0 を 100 μ L 添加して混合した。タンパク質をペプチド断片化するために Trypsin/Lys-C Mix (プロメガ) 500 ng を添加して、37°Cで一晩静置した。5% TFA を 20 μ L 加え、サンプル密閉式超音波破碎機で処理した。逆相スピンカラム(GL-Tip SDB, GL サイエンス社)を用いて脱塩後、遠心エバポレーターで乾固した。2% ACN-0.1% TFA を加え、サンプル密閉式超音波破碎機ペプチドを溶解した。BCA アッセイによりペプチド濃度を測定し、ペプチド濃度 200 ng/ μ L になるように 2% ACN-0.1% TFA で調整した。続いて、LC-MS 分析を行った。

【CLSM による組織中の LNP 分布の観察】

脾臓内の LNP 分布を観察のために、BALB/c マウスに DiD を脂質終濃度 0.5 mol%で標識した LNP を 0.2 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。投与後に脾臓を回収し質量比で 10 倍以上のマイルドホルムに浸し 4°Cで一晩静置した後、PBS(-)で 2 回洗浄した。組織スライサー (Natsume Seisakusho Co. Ltd., 東京, 日本) を用いて 0.2 mm 厚の切片を作製し、10 μ g/mL Hoechst 33342 を含む PBS(-)中に浸し 4°C、30 分間静置した後、PBS(-)で 2 回洗浄した。脾臓切片は Nikon A1 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Nikon Co. Ltd., 東京, 日本) により観察し画像化した。使用した対物レンズは Plan Apo VC 20 $\times$ DIC N2 (Magnification: 20, Numerical aperture: 0.75)、レーザーおよびフィルターは Ch1 (450BP50) Hoechst33342 (Ex/Em = 405/450 nm), Ch2 (700BP75) DiD (Ex/Em = 638/700 nm)。

FTY-720 処理後の B 細胞分布を観察するため、BALB/c マウスに生理食塩水または 1 mg/kg の FTY-720 を腹腔内投与した。脾臓回収の 10 分前に、PE 標識抗 CD21/35 抗体を 1 μ g/mouse で静脈内投与した。脾臓を採取・切片化し、Hoechst33342 で染色後、Nikon A1 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Nikon Co. Ltd., 東京, 日本) により観察し画像化した。使用した対物レンズは Plan Apo VC 20 $\times$ DIC N2 (Magnification: 20, Numerical aperture: 0.75)、レーザーおよびフィルターは Ch1 (450BP50) Hoechst33342 (Ex/Em = 405/450 nm), Ch2 (595BP50) PE (Ex/Em = 488/595 nm)。

肝臓内の LNP 分布観察のために、BALB/c マウスに、DiD を脂質終濃度 0.5 mol% で標識した LNP を 0.2 mg mRNA/kg の用量で静脈内投与した。臓器回収の 10 分前に、FITC 標識トマトレクチン (Vector Laboratories, Inc., Newark, CA, USA) を 40 µg/mouse で静脈内投与し、肝臓の血管内皮を染色した。LNP 投与から 1 時間後に肝臓を回収し、5 µg/mL Hoechst 33342 を含む PBS(-) 中に浸し氷冷下で 30 分間静置した後、PBS(-) で 2 回洗浄した。肝臓は Nikon A1 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Nikon Co. Ltd., 東京, 日本) により観察し画像化した。使用した対物レンズは Plan Apo 60×Oil DIC H (Magnification: 60, Numerical aperture: 1.40)、レーザーおよびフィルターは Ch1 (450BP50) Hoechst33342 (Ex/Em = 405/450 nm), Ch2 (525BP50) FITC (Ex/Em = 488/525 nm), Ch3 (700BP75) DiD (Ex/Em = 638/700 nm)。

【CLSM による肝臓での GFP 発現の観察】

BALB/c マウスに CleanCap GFP mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, CA, US) を搭載した LNP を 1.0 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。臓器回収の 10 分前に、Lycopersicon Esculentum (トマト) レクチン (LEL, TL)、DyLight®649 (DL-1178; Vector Laboratories) を 40 µg/mouse で静脈内投与し、肝臓の血管内皮を染色した。LNP 投与から 1 時間後に肝臓を回収し、5 µg/mL Hoechst 33342 を含む PBS(-) 中に浸し氷冷下で 30 分間静置した後、PBS(-) で 2 回洗浄した。肝臓は Nikon A1 共焦点レーザー走査顕微鏡 (Nikon Co. Ltd., 東京, 日本) により観察し画像化した。使用した対物レンズは Plan Apo 60×Oil DIC H (Magnification: 60, Numerical aperture: 1.40)、レーザーおよびフィルターは Ch1 (450BP50) Hoechst33342 (Ex/Em = 405/450 nm), Ch2 (525BP50) FITC (Ex/Em = 488/525 nm), Ch3 (700BP75) DyLight649-labeled Tomato lectin (Ex/Em = 638/700 nm)。

【MHC クラス I 抗原提示の検出】

C57BL/6 N マウスに、CleanCap OVA mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, CA, US)、CleanCap GFP mRNA (5 moU) または CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した 15%DSPC を 0.2 mgRNA/kg または PBS (-) を 200 µL の用量で、3 日間隔となるように 2 回静脈内投与した。最終投与から 24 時間後にマウスを安楽死させ脾臓を回収し、RBC Lysis Buffer (420301; BioLegend) で処理して脾細胞を得た。MZB 細胞は、PE/Cyanine7 標識抗 CD19 抗体、PE 標識抗 CD23 抗体、APC/ Cyanine7 標識抗 CD21/35 抗体および APC 標識抗 H-2K^b-SIINFEKL 抗体で染色し、樹状細胞およびマクロファージは、PE 標識抗 CD11c 抗体、PerCP/ Cyanine5.5 標識抗 I-A/I-E 抗体、FITC 標識抗 F4/80 抗体および APC 標識抗 H-2K^b-SIINFEKL 抗体で染色した。H-2K^b-SIINFEKL の発現は、CytoFLEX フローサイトメーター (Beckman Coulter 社, CA, USA) を用いて測定した。各 mRNA 搭載 LNP 群における H-2K^b-SIINFEKL の発現レベルは、mGFP 搭載 LNP 処理後の発現レベルを基準として標準化した。

【CD69 活性化マーカーおよび共刺激分子の検出】

C57BL/6 N マウスに、CleanCap OVA mRNA (5 moU)、CleanCap GFP mRNA (5 moU) を搭載した 15%DSPC を 0.2 mgRNA/kg または PBS (-) を 200 μ L の用量で、3 日間隔となるように 2 回静脈内投与した。最終投与から 24 時間後にマウスを安楽死させ脾臓を回収し、RBC Lysis Buffer (420301; BioLegend) で処理して脾細胞を得た。CD69 の測定については、得られた細胞を FITC 標識抗 CD49b 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体、PE/ Cyanine7 標識抗 CD19 抗体、および APC 標識抗マウス CD69 抗体で染色した。T 細胞、B 細胞、NK 細胞における CD69 の発現は、CytoFLEX フローサイトメーターを用いて測定した。共刺激分子の測定については、得られた細胞を PerCP/Cyanine5.5 標識抗 I-A/I-E 抗体、PE 標識抗 CD11c 抗体、PE/Cyanine7 標識抗 CD19 抗体、PE 標識抗 CD23 抗体、APC/ Cyanine7 標識抗 CD21/35 抗体、APC 標識抗 CD40 抗体、FITC 標識抗 CD80 抗体、および Pacific Blue 標識抗 CD86 抗体で染色した。B 細胞、MZB 細胞、および樹状細胞における CD40、CD80、CD86 の発現は CytoFLEX フローサイトメーターを用いて測定した CD69 および共刺激分子の相対発現量は PBS 処理群と比較した。

【*In vivo* CTL アッセイ】

特に言及のない限り、C57BL/6 N マウスに対し、PBS (-)、CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap GFP mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 0.01~0.2 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。投与から 5 日後、未処置の C57BL/6 N マウスから採取した脾細胞を移植した。CleanCap GFP mRNA (5 moU)脾細胞の半数は OVA と等量の DMSO を加え攪拌した。2 つの細胞群を 37°C で 1 時間処理した後、carboxyfluorescein succinimidyl ester: CFSE を使用して OVA 257-264 処理細胞および未処理細胞に対してそれぞれ 5 μ M または 0.5 μ M の濃度で PBS (-) 中で 37°C, 10 分間染色した。培地による洗浄を行い未結合の CFSE を除去した後、PBS (-) で置換して等数の OVA 257-264 処理 CFSE high 細胞と未処理 CFSE low 細胞を得た。2 つの脾細胞を混合し 1 $\times$ 10⁷ cells/200 μ L/mouse の用量で免疫誘導したマウスに静脈内投与した。脾細胞の移植から 20 時間後、免疫誘導したマウスから脾細胞を採取し、CytoFLEX フローサイトメーターを用いて細胞懸濁液中の CFSE high 細胞と CFSE low 細胞の数を測定した。移植した細胞の生存率は CFSE high 細胞のカウント数を CFSE low 細胞のカウント数で除した。また、CTL 活性を (1 - 各 mRNA-LNP 投与による生存率/ PBS (-) 投与による生存率) $\times$ 100 の式で算出し、各 mRNA-LNP 投与による抗原特異的な細胞障害の値を求めた。

FTY-720 処理が CTL 応答に及ぼす影響を検証するため、C57BL/6 N マウスに、生理食塩水または FTY-720 を 1 mg/kg の用量で腹腔内投与し、投与から 3 時間後に mOVA を搭載した LNP を 0.03 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。LNP 投与から 5 日後に未処置の C57BL/6 N マウスから採取した脾細胞を CFSE 染色した後、上記の通りに移植した。移植

から 20 時間後に抗原特異的な細胞障害を評価した。

MZB 細胞による CTL 応答の誘導を検証するため、C57BL/6 N マウスに、CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap GFP mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 0.2 mg RNA/kg の用量で静脈内投与した。LNP 投与から 1 時間後に脾細胞を採取し、Marginal Zone and Follicular B Cell Isolation Kit (130-100-366、Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) のプロトコルに従って B 細胞および MZB 細胞を単離した。未処置の C57BL/6 N マウスに、脾細胞、B 細胞または MZB 細胞を 5×10^6 cells/mouse で静脈内投与し免疫誘導した。免疫誘導から 5 日後に未処置の C57BL/6 N マウスから採取した脾細胞を CFSE 染色した後、上記の通り移植した。移植から 20 時間後に抗原特異的な細胞障害を評価した。

【MACS による MZB 細胞の単離】

C57BL/6 N マウスを安楽死させ、脾臓を回収した。脾臓は細断した後、滅菌シャーレに HBSS (-) を加え脾臓をほぐして 40 μ m セルストレイナーに通し、4°C、400 g、5 分で遠心した。上清を除去した後、1 mL の RBC lysis buffer を加え赤血球を除去した。9 mL の HBSS (-) で懸濁し 4°C、400 g、5 分間遠心した。上清を除去した後、MACS buffer で懸濁し、 1×10^8 cells/tube とし、4°C、300 g、10 分間遠心し上清を除去した。400 μ L の MACS buffer で懸濁し、100 μ L の MZ & FO B cell Biotin-Antibody カクテルを加え全量 500 μ L とし氷冷下で 5 分間静置した。その後、300 μ L の MACS buffer と 200 μ L の Anti Biotin MicroBeads を加え氷冷下で 5 分間静置し、4°C、300 g、10 分間遠心し、上清を除去し 500 μ L の MACS buffer で再懸濁し、LS カラムに細胞懸濁液を加え流出液を回収した。500 μ L の MACS buffer で 3 回洗浄しそれぞれの流出液を回収して、B 細胞を得た。さらに、B 細胞懸濁液を 4°C、300 g、10 分間遠心し、上清を除去した後 450 μ L の MACS buffer で懸濁し、50 μ L の CD23 Micro Beads を加え全量 500 μ L とし氷冷下で 10 分間静置した。4°C、300 g、10 分間遠心し、上清を除去し 500 μ L の MACS buffer で再懸濁し、LS カラムに細胞懸濁液を加え流出液を回収した。500 μ L の MACS buffer で 3 回洗浄しそれぞれの流出液を回収して、MZB 細胞を得た。

【mRNA-LNP の治療的抗腫瘍効果】

C57BL6/N マウスにイソフルラン麻酔下で E.G7-OVA 細胞を 5×10^6 cells/40 μ L/mouse となるように右脇腹に皮下投与した。担癌マウスに対し PBS (-)、CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap GFP mRNA (5 moU) を搭載した 15%DSPC および CleanCap OVA mRNA (5 moU) を搭載した RNA-LPX を、腫瘍移植後 7 日目と 10 日目に 0.2 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。腫瘍はデジタルノギス(ミットヨ, 日本)を用いて腫瘍移植後 4~31 日目まで測定した。腫瘍体積は、長径×短径×短径×0.52 の式を用いて算出した。腫瘍体積が 4000 mm³を人道的エンドポイントとしマウスを安楽死させた。B16-F10 細胞の場合、 5×10^6 cells/40 μ L/mouse となるように右脇腹に皮下投与した担癌マウス

に対し PBS (-)、In vitro 転写反応で合成された未修飾の mFluc または未修飾、mΨU 修飾された mTrp2 を搭載した 15%DSPC を、腫瘍移植後 7 日目と 10 日目に 2.0 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。腫瘍体積の測定は腫瘍移植後 4~16 日目まで測定した。

【抗原特異的な IgG 産生誘導の評価】

C57BL6/N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 10 µgRNA/50 µL/mouse または PBS (-) を 50 µL となるように 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与した。最終投与から 7 日後に採血し、室温、1 時間静置した後、室温、3,000 g、10 分間遠心した。上清を回収し血清を得た。Nunc イムノプレートに 100 mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) により 100 µg/mL に溶解した OVA (Aldrich, cat# A2512) 溶液を 100 µL/well で添加し、4°Cで一晩静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、10 g/L ブロックエース水溶液を 200 µL/well で加え、4°Cで一晩静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、4 g/L ブロックエースにより血清を希釈した溶液を 50 µL/well で添加し、室温、90 分間静置した。PBS-T で 3 回洗浄し、4 g/L ブロックエースで 5000 倍に希釈した HRP Goat anti-mouse IgG を 100 µL/well で添加し、室温、60 分間した。PBS-T で 3 回洗浄し、TMB solution を 100 µL/well で添加し、室温、30 分間静置した。1 M 硫酸を 100 µL/well で添加して発色反応を停止させ、450 nm における吸光度を Varioskan LUX により測定した。測定結果は、4-parameter logistic curve fit analysis を使用し、横軸が血清希釈倍率、縦軸が吸光度となるシグモイド曲線を描いた。また、吸光度が 1 となる希釈倍率の値を算出し、IgG 力価とした。

【抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞誘導の評価】

C57BL6/N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 10 µgRNA/50 µL/mouse または PBS (-) を 50 µL となるように 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与した。最終投与から 7 日後に脾臓を回収し、HBSS(-) を加え細胞を剥がした後、RBC lysis buffer により赤血球を除去して脾臓細胞を得た。脾臓細胞 1×10⁶ cells あたり FACS buffer により希釈した purified anti-mouse CD16/32 antibody を 1 µg/100 µL/tube で添加し、氷上で 10 分間ブロッキングした。その後、PE 標識 Tetramer-SIINFEKL-H2kb を加え氷上で 10 分間染色した後、FITC 標識抗 CD8a 抗体、PE 標識抗 CD3 抗体を加え氷上で 30 分間染色した。抗体染色後、FACS buffer で 3 回洗浄し CytoFLEX により蛍光測定した。なお、各サンプルは propidium iodide solution を加えた後に測定し、陰性細胞のみ解析した。CD8 陽性 T 細胞を CD3⁺, CD8⁺細胞群、SIINFEKL エピトープ特異的な CD8 陽性 T 細胞を Tetramer-SIINFEKL-H2kb⁺, CD3⁺, CD8⁺細胞群として、CD8 陽性 T 細胞に対する OVA 発現 CD8 陽性 T 細胞の割合を算出した。各 LNP 投与群の算出値から PBS 投与群の算出値を差し引いた。

【生化学検査および病理組織学的検査】

静脈内投与型がんワクチン製剤の安全性評価のために、C57BL/6 N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) を搭載した 15%DSPC を 0.2 mgRNA/kg となるように 3 日間間隔で 2 回静脈内投与した。コントロールとして Poly (I:C) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を 250 µg/mouse の用量で静脈内投与した。最終投与から 7 日後に血液を採取し、室温で 1 時間静置した後、室温, 3000 g, 10 分で遠心した。上清を回収し血清を得て、オリエンタル酵母工業株式会社に依頼して生化学検査を行った。また、最終投与から 7 日後に脾臓および肝臓を回収し、質量比で 10 倍以上のマイルドホルムに浸し、株式会社札幌総合病理研究所に依頼して病理組織学検査を行った。

筋肉投与型ワクチン製剤の安全性評価のために、C57BL6/N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) または CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 10 µgRNA/50 µL/mouse または PBS を 50 µL となるように 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与した。最終投与から 7 日後に血液を採取し血清を得て生化学検査を行った。また、最終投与から 7 日後に脾臓および肝臓を回収し病理組織学検査を行った。

TOT-15-LNP の安全性評価のために、Balb/c マウスに対して CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 1.0 mgRNA/kg の用量で静脈内投与した。投与から 7 日後に血液を採取し血清を得て生化学検査を行った。また、投与から 7 日後に脾臓および肝臓を回収し病理組織学検査を行った。

【炎症性サイトカインの測定】

静脈内投与型がんワクチン製剤の安全性評価のために、C57BL/6 N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) を搭載した 15%DSPC を 0.2 mgRNA/kg となるように 3 日間間隔で 2 回静脈内投与した。コントロールとして Poly (I:C) を 250 µg/mouse の用量で静脈内投与した。最終投与から 4 時間後に麻酔下で下大静脈から採血し、室温で 30 分間静置した後、25°C、3000 g、10 分間遠心し上清を回収して血清を得た。

筋肉投与型ワクチン製剤の安全性評価のために、C57BL/6 N マウスに対して CleanCap OVA mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 10 µgRNA/50 µL/mouse または PBS (-) を 50 µL となるように 1 週間間隔で 2 回筋肉内投与した。最終投与から 4 時間後に麻酔下で下大静脈から採血し、血清を得て血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定した。

【血清 TTR タンパク質濃度の測定】

Balb/c マウスへの LNP 投与 1 日前、尾静脈から採血し、25°C、1,000g、15 分間遠心し、血清を回収した。マウスに CleanCap M6 Cas9 mRNA (N1MePsU) (TriLink BioTechnologies, CA, US)/TTR を標的とするに対する single guide RNA (sgTTR) (IDT, IA, USA) = 1/2(w/w) となるように搭載した LNP を 0.3 mg/kg の用量で静脈内投与した。投与から 1 週間後にマウスを安楽死させ、採血し血清を回収した。血清中 TTR タンパク質

は、Prealbumin ELISA Kit (マウス用) (Aviva Systems Biology, CA, USA) のプロトコルに従い測定した。血清中 TTR 濃度は four parameter logistic curve model を使用して算出した。TTR ノックアウト効率は、LNP 投与前の血清中 TTR タンパク質濃度に対する LNP 投与後の血清中 TTR タンパク質濃度の減少率として算出した。TTR ノックアウトの持続性を確認するため、マウスに mCas9/sgTTR = 1/2 (w/w) となるように搭載した LNP を 1.0 mg/kg の用量で静脈内投与した。LNP 投与の 1、2 または 4 ヶ月前に尾静脈から採血し血清を回収し、血清中の TTR タンパク質濃度を測定した。sgTTR の配列は以下の通りである。m: 2'-o-methylation, *: phosphorothioate bonds である。

5'- mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA
AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*
mU*mU*U - 3'

【IVIS による LNP の生体内分布の観察】

Balb/c マウスに対して DiR 標識した LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与した。投与から 1 時間後に肝臓、脾臓、肺、腎臓および血液を回収し、*in vivo* imaging system 200 series (Perkin Elmer, US) により蛍光を測定した。各組織の蛍光量 ($[p/s/cm^2/sr]/[\mu W/cm^2]$) は Living Image software (Perkin Elmer, US) により定量した。

【LNP の肝臓集積量の定量】

Balb/c マウスに対して DiR 標識した LNP を 0.01 mg/kg の用量で静脈内投与した。投与から 1 時間後に肝臓を回収し、ジルコニアビーズ (直径 1.4 mm) を加えたサンプルチューブに約 50 mg 回収し、使用時まで $-80^{\circ}C$ で保存した。1% SDS 溶液を 500 μL /tube で加え、Micro Smash MS-100R にて、肝臓を 4000 rpm, 20 秒で 2 回細胞破碎し、 $4^{\circ}C$, 13000 rpm, 10 分で遠心した。上清を Varioskan Lux で蛍光 (Ex: 748 nm, Em: 780 nm) 測定した。%ID は、各サンプルで測定された蛍光強度を、mRNA-LNP を 200 ng/肝臓 (g) 添加したサンプルを 100%ID として算出した比率で計算した。各サンプルの %ID は肝臓重量で補正し、投与された LNP に対する肝臓へ移行した LNP の割合を算出した。

【凍結融解サイクルに対する LNP の安定性】

mRNA-LNP を、9%w/v スクロースを含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で $4^{\circ}C$ 、少なくとも 2 時間透析した。LNP を $-80^{\circ}C$ で少なくとも 2 時間凍結した後、室温で融解した。凍結融解を最大 3 回繰り返した。

【 ^{31}P -NMR による脂質多型解析】

POPC:TOT-15 (mol 比 x:1 (x = 1, 3, 5)) かつ POPC が 8 μmol となるようにガラス試験管内で混合し、回転式エバポレーターで溶媒除去した後、脂質混合物を 400 μL のクロロ

ホルムに溶解し、溶媒除去した後、少なくとも 15 分間乾燥して脂質薄膜を形成した。この薄膜を 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 500 μ L で 60°C、3 分間水和し、超音波処理により溶液を激しく攪拌して白色の脂質分散液を得た。脂質分散液の ^{31}P -NMR スペクトルは ECZ500R 分光計で測定した。取得パラメータを 60°、スペクトル幅を 280kHz、32,768 データポイント、パルス間遅延時間を 1 秒とした。温度は 25°C に制御した。フーリエ変換前に、自由誘導減衰信号に対して 50Hz の線幅拡大に相当する指数乗算を適用した。化学シフトは外部標準として 85%リン酸(H_3PO_4)を用いた。

【Hemolysis アッセイによる膜破壊能の測定】

BALB/c マウスを安楽死させ、血液を採取した。生理食塩水による希釈と 4°C、400g、5 分間遠心し上清除去を 5 回繰り返しタンパク質除去し、新鮮な赤血球を得た。後述の手法で TritonX-100 により赤血球懸濁液を破壊した際に吸光度が 1.0 となるように、得られた赤血球を 10 mM DL-マレイン酸、10 mM HEPES、10 mM MES 緩衝液 (pH 5.0、6.0 または 7.4; 120 mM NaCl) に懸濁した。総脂質として 0.781~12.5 nmol となるように生理食塩水で段階希釈した LNP 溶液を赤血球懸濁液と混合し、37°C で 900 rpm、30 分間攪拌しながらインキュベートした。4°C、400 g、5 分間遠心し非溶血赤血球を除去した後、上清を回収し 545 nm における吸光度を測定した。陽性対照として 0.5 w/v-1% Triton X-100 を添加した赤血球懸濁液を、陰性対照として LNP を添加しない赤血球懸濁液をインキュベートした。溶血率 (%Hemolysis) は陽性対照の吸光度に対する割合として算出した。

【TRIzol を用いた組織からの total RNA 抽出】

Balb/c (メス 4 週齢) に対して CleanCap Fluc mRNA (5 moU) を搭載した LNP を 0.01 mg/kg で静脈内投与した。LNP 投与から 6 時間後に肝臓をジルコニアビーズ (直径 1.4 mm) を入れたサンプルチューブに約 50 mg 回収し、使用時まで -80°C で保存した。各サンプルに速やかに 1 mL の TRIzol を加え、Micro Smash MS-100R により 5500 rpm、20 秒で 2 回、組織を破碎した。室温で 2 分間静置した後、200 μ L のクロロホルムを加え、激しく攪拌した。さらに室温で 2 分間静置し、4°C、15000 rpm、5 分で遠心した後、水相を 300 μ L 回収し、EZ 1&2TM RNA Tissue Mini Kit を用いて RNA 抽出を行い、RNA 溶液を得た。

【RNA の cDNA への逆転写】

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover のプロトコルに従って逆転写を行った。具体的には、0.5 μ g/6 μ L の RNA 溶液を 65°C、5 分間熱変性し、2 μ L の 4×DN Master Mix を加え、37°C、5 分間で加熱し、2 μ L の 5×RT Master Mix II solution を加え、37°C で 15 分、50°C で 5 分、98°C で 5 分間加熱し逆転写反応を行った。得られた cDNA 溶液は、-20°C で保管した。

【定量的 PCR】

検量線サンプルは、cDNA 原液と DDW を用いて 4, 20, 80, 320 倍希釈し DDW のみのサンプルを含め 5 点用意した。また、各サンプルの cDNA を DDW を用いて 8 倍希釈した。PCR 反応液を 2×PrimeTime™ Gene Expression 5 µL、10×PrimeTime qPCR Assay 1 µL の割合で混合し調製した。PCR 溶液を 96 well PCR Plate に 6 µL/well で添加し、各 well に検量線 サンプル及び希釈した cDNA サンプルを 4 µL/well で添加した。Thermal Cycle Dice Real Time System III を用いて以下の条件で RT-PCR を行った。

95°C, 3 min→ (95°C, 5 sec→60°C, 30 sec) ×45 cycles

すべての測定値は、ハウスキーピング遺伝子である β -グルクロニダーゼ (Gusb) に対して $\Delta\Delta C_t$ 法により正規化された。mFluc および Gusb のプライマー/プローブセット (IDT, IA, USA) は以下の通りである。

Fluc プライマー forward 5'-GCA GGA CTA CAA GAT CCA GAG-3'; reverse 5'-GGT TGC TCA GGT CGT ACT T-3' プローブ 5'-/6-FAM/ ACC CTG TTC /ZEN/ AGC TTC TTC GCC AA /IBFQ/-3'; Gusb プライマー forward 5'-ACC ACA CCC AGC CAA TAA AG-3'; reverse 5'-AGC AAT GGT ACC GGC AG-3'; プローブ 5'-/6-FAM/ ACA TCA CCC /ZEN/ AAG AAG CAG CCC T /IBFQ/-3'.

【データ解析】

特に言及のない限り、結果は独立した実験の平均値±標準偏差で示した。データの統計解析および作図は Graphpad Prism Software version 10.1.2 を使用した。2 群間の比較には unpaired student's t-test あるいは multiple t-test を、2 群以上の比較には one-way analysis of variance followed by Dunnett's あるいは Tukey's post hoc tests を使用し、統計的な有意性は $p < 0.05$ (multiple t-test では調整 $p < 0.05$) と定めた。

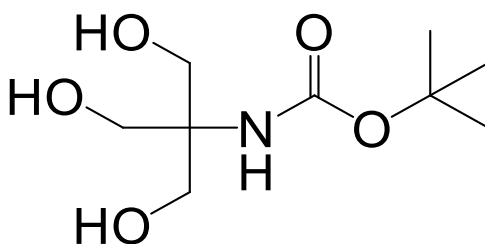
【脂質合成一般】

^1H および ^{13}C NMR スペクトルは、ECX400P、ECZ400、または ECZ500R 分光計を用いて、テトラメチルシランを内部標準 (0 ppm) として取得した。多重度を表すために以下の略語を使用した：s = シングレット；d = ダブルレット；t = トリプレット；m = マルチプレット。 ^1H NMR ピークの化学シフトは、テトラメチルシランからダウンフィールド方向に ppm で示した。合成反応は、プレコート TLC プレート (Millipore 社製) を用いた TLC によりモニタリングし、リン酸モリブデン酸、p-アニソールアルデヒド、ヨウ素、ニンヒドリン、またはドラゲンドルフ試薬を染色剤として用いて、UV 光 (254 nm) 下で可視化した。生成物は、蒸発光散乱検出器 (Biotage Japan Ltd., 東京、日本) を備えた Biotage Selekt システムを用いて精製した。各画分および最終生成物は、Plate Express 自動 TLC プレートリーダー (Advion Interchim Scientific) を備えたコンパクト質量分析計 (Expression CMS; Advion Interchim Scientific Inc., NY, 米国) を用いて分析した。全ての試薬は市販品を購

入し、精製せずに使用した。

【TOT-0 の合成】

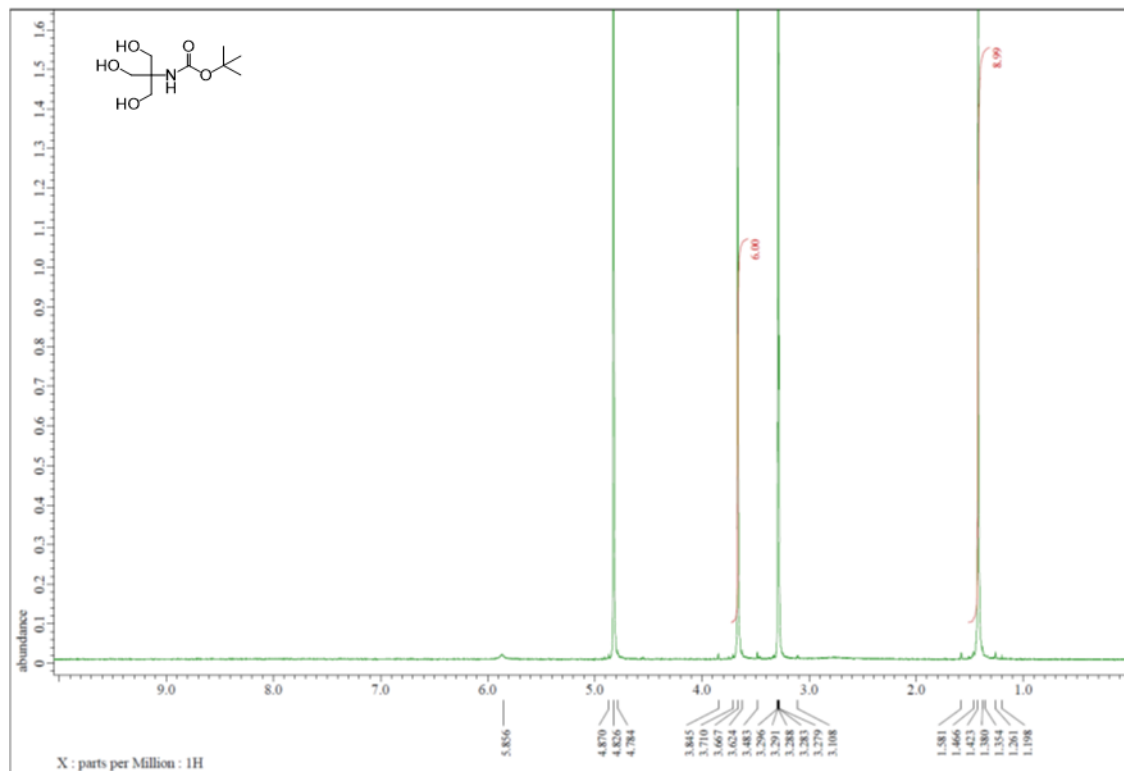
TOT-0 は Di-*tert*-butyl dicarbonate (23.5 g, 107.7 mmol) を *tert*-BuOH (75 mL) に溶解し、tris(hydroxymethyl)aminomethane (10.0 g, 82.6 mmol) に滴下した。これをメタノール (75 mL) と *tert*-BuOH (75 mL) の混合溶媒中に分散させた。反応液を室温で一晩攪拌した後、溶媒除去し、残渣を冷エタノールで沈殿して精製した。真空濾過により、16.7 g (91%) の *tert*-butyl (1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)carbamate を白色粉末として得た。



tert-butyl (1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)carbamate

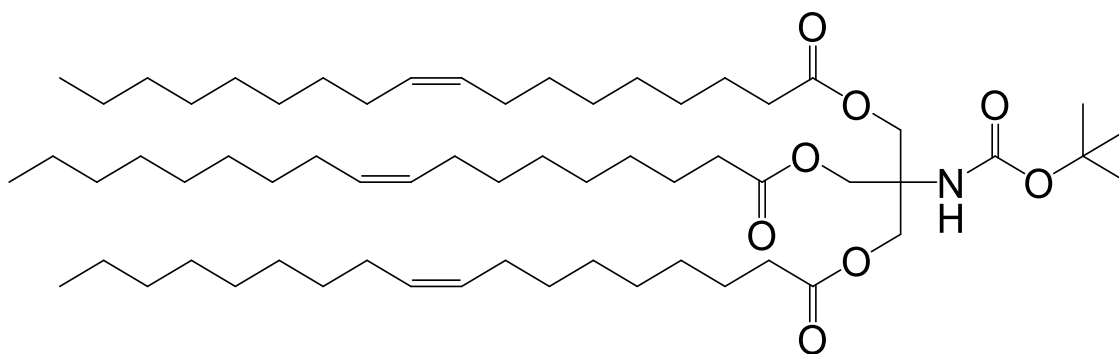
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 1.42 (s, 9H), 3.29 (s, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NNaO}_5$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 244.12; found, 243.9.



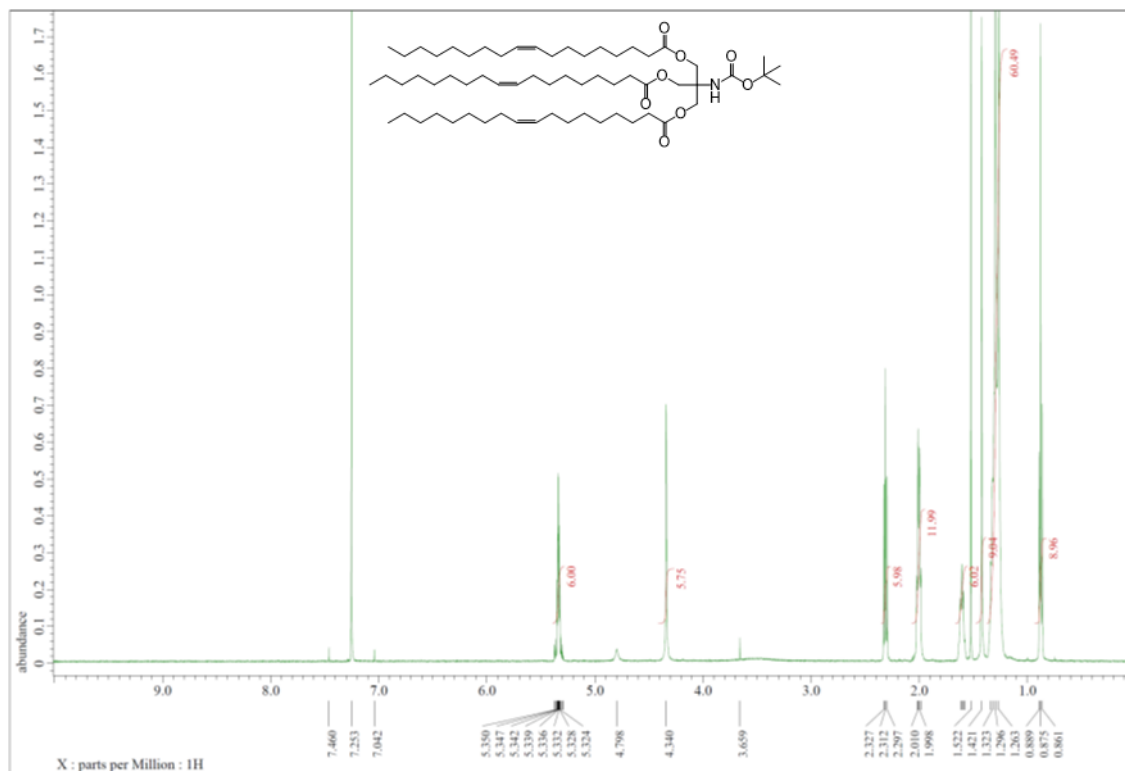
tert-Butyl (1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)carbamate (2.21 g, 10.0 mmol)

を無水 DCM (50 mL) に溶解した。オレイン酸 (9.32 g, 33.0 mmol)、DMAP (122 mg, 1.0 mmol)、EDCI-HCl (7.67 g, 40.0 mmol) の順に加え、反応液を室温で一晩攪拌した。溶媒除去し、残渣を EtOAc に懸濁し、水で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を濾過し、濾液を除去し、残渣を順相カラム (Sfär Silica HCD、Biotage) に充填し、ヘキサンと EtOAc からなる移動相を用いたグラジエント移動相を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製し 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate が 8.50 g (84%)、無色油状で得られた。



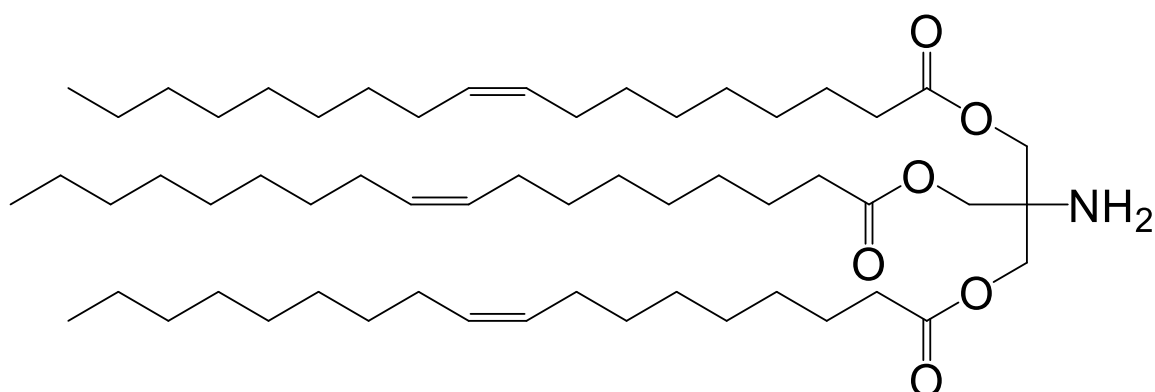
2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm) δ: 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.60 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.32 (s, 6H), 4.33 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).



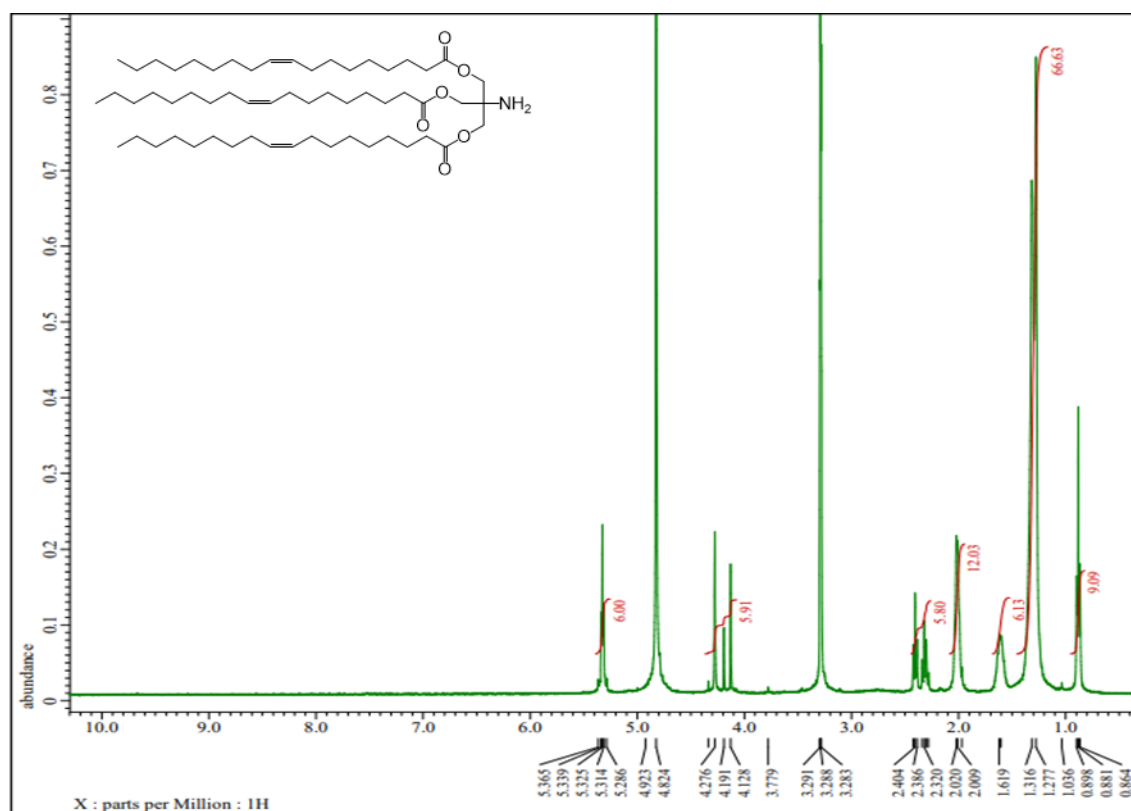
2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (8.50 g,

8.38 mmol) を無水 DCM (44 mL) に溶解した。次に、トリフルオロ酢酸 (TFA) (5 mL) およびトリイソプロピルシラン (TIPS) (1 mL) を添加し、反応液を室温で 3 時間攪拌した。その後、混合物を EtOAc で希釈し、有機相を 1 N NaOH(aq)、水、および食塩水で順次洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を濾過し、濾液を除去し、残渣を順相カラム (Sfär Silica HCD, Biotage) に充填し、ヘキサンと EtOAc からなる移動相を用いたグラジエント移動相を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製した。これにより、無色の油状物として TOT-0 を 5.00 g (65%) 得た。



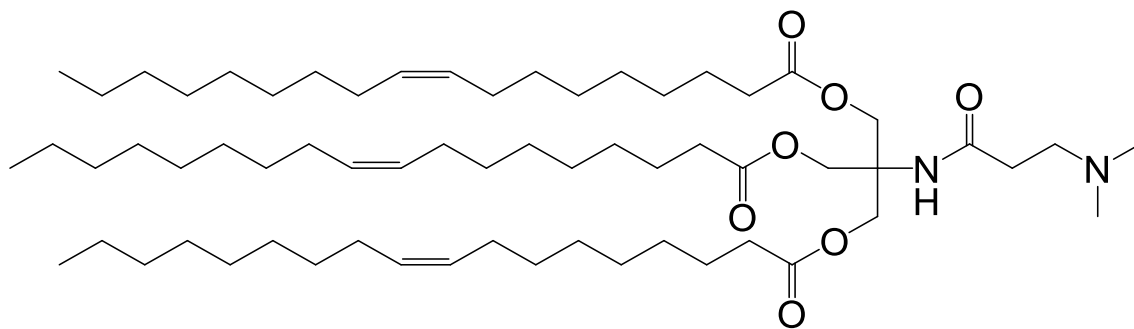
22-amino-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-0)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.60 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.32–2.40 (m, 6H), 4.13–4.32 (m, 6H), 5.32 (m, 6H).



【iTOT の一般的な合成】

22-amino-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-0; 366 mg, 0.40 mmol) を無水ジクロロメタン (DCM; 2 mL) およびジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し、アミノ酸 (0.50 mmol)、4-dimethylaminopyridine (DMAP; 4.9 mg, 0.04 mmol)、トリエチルアミン (TEA; 83.6 μ L, 0.60 mmol)、および EDCI-HCl; 115 mg, 0.60 mmol を混合物に加え、35°Cで一晩攪拌した。その後、溶媒を除去し、残渣を EtOAc (4 mL) に懸濁し、0.5 N NaOH(aq) (5 mL) で洗浄し、無水 Na₂SO₄で乾燥した。溶液を濾過し、濾液から溶媒を除去し、残渣を順相カラム (Sfär Silica HCD, Biotage) に充填し、ヘキサンと EtOAc からなる移動相を用いたグラジエント移動相を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製した。これにより、無色または淡黄色の油状物として iTOT が得られた。

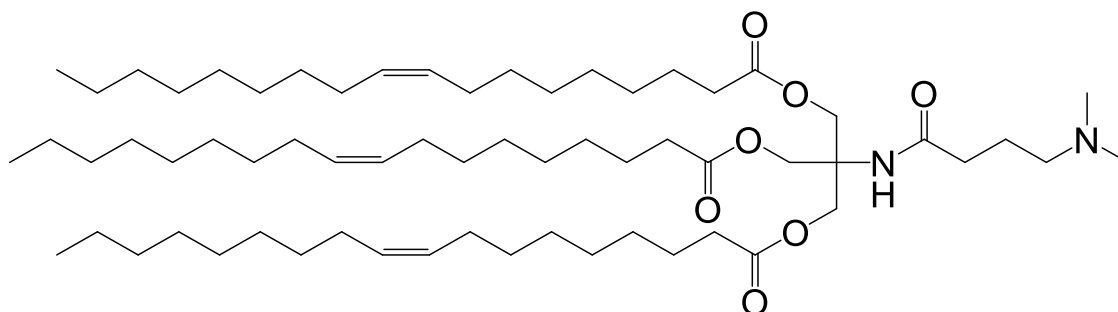
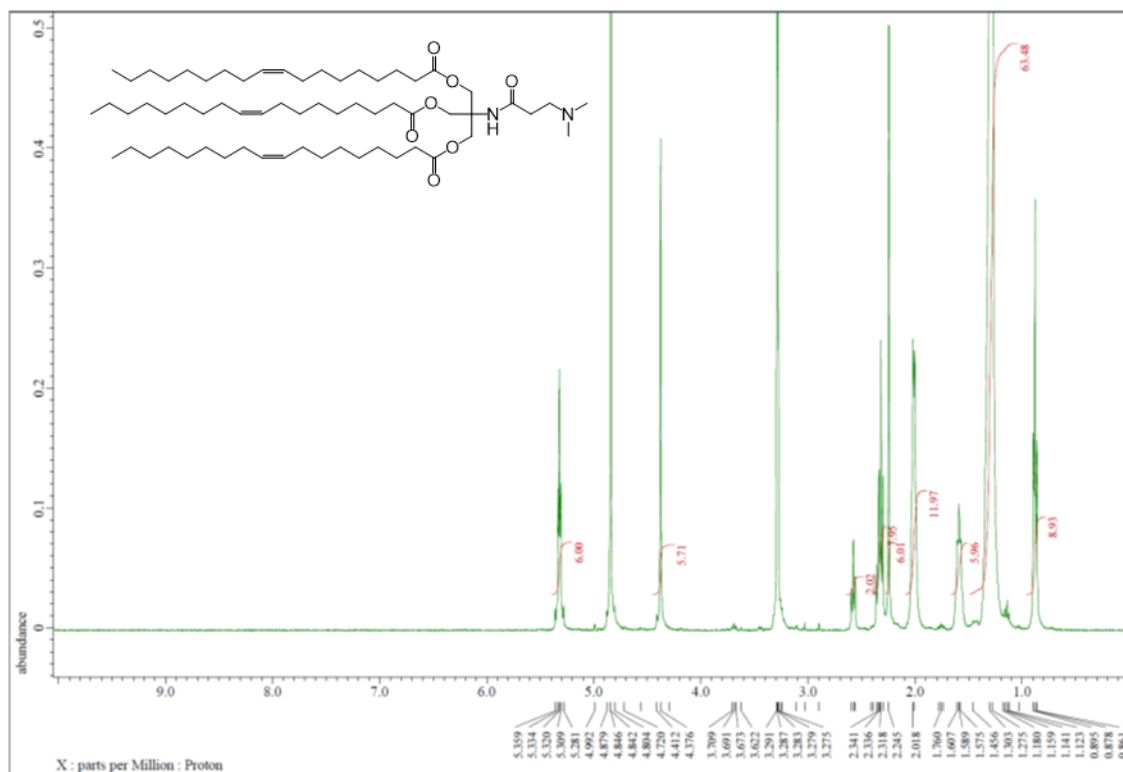


2-(3-(dimethylamino)propanamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-1)

245 mg (60%) as a colorless oil

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.60 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.25 (s, 6H), 2.34 (m, 8H), 2.58 (t, 2H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for C₆₃H₁₁₇N₂O₇ (M+H)⁺, 1013.89; found, 1013.4 and for C₆₃H₁₁₆N₂NaO₇ (M+Na)⁺, 1035.87; found, 1035.3.

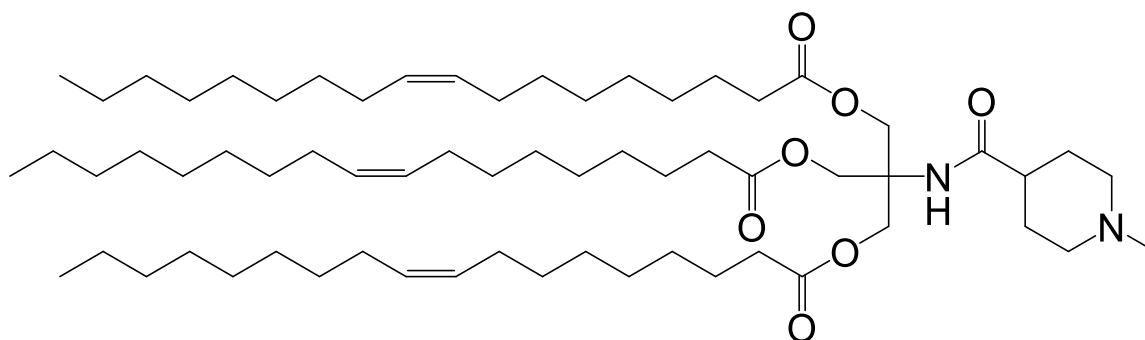


2-(4-(dimethylamino)butanamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-2)

341 mg (83%) as a colorless oil

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 1.74 (tt, 2H), 2.00 (m, 12H), 2.19 (t, 2H), 2.26 (s, 6H), 2.34 (m, 8H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{119}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1026.89; found, 1027.4 and for $\text{C}_{64}\text{H}_{118}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1049.88; found, 1049.4.

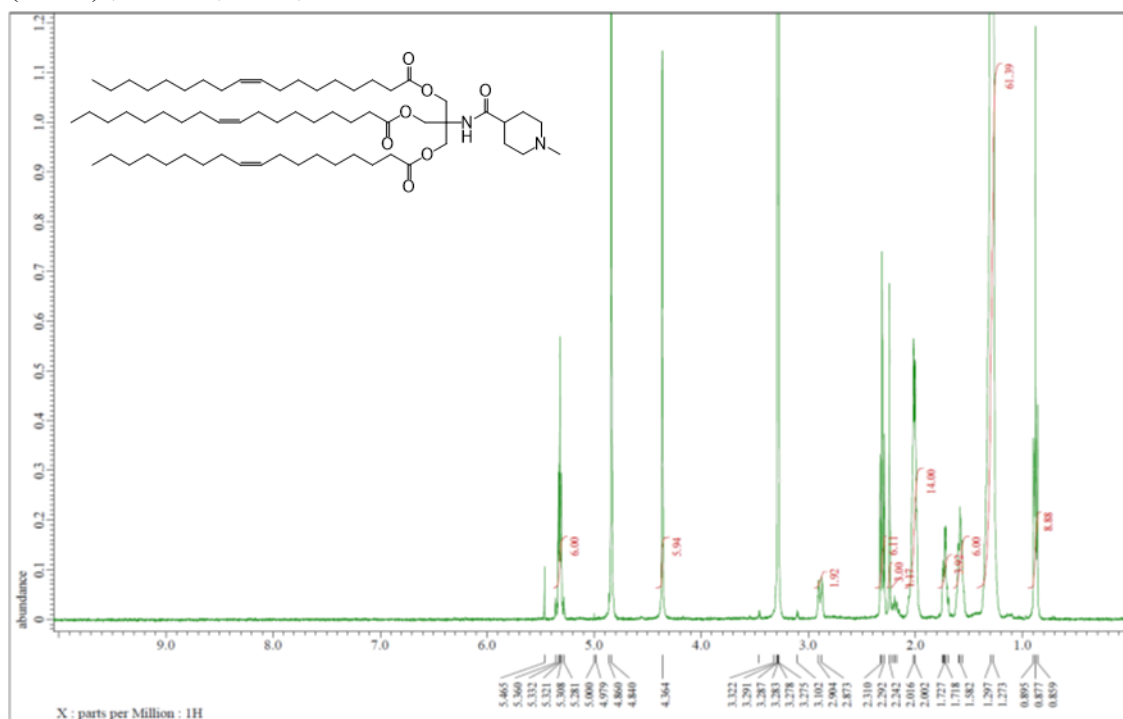


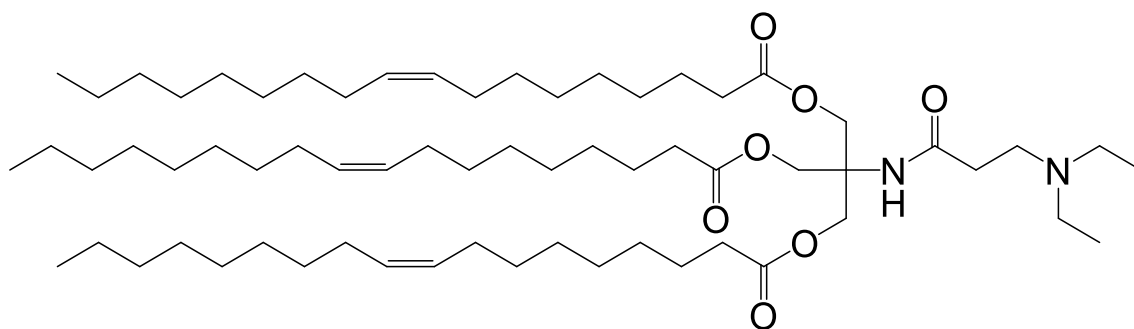
2-(1-methylpiperidine-4-carboxamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-3)

345 mg (83%) as a white wax.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.58 (m, 6H), 1.73 (m, 4H), 2.00 (m, 14H), 2.19 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.31 (m, 6H), 2.87 (tt, 2H), 4.36 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{119}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1039.90; found, 1039.4 and for $\text{C}_{65}\text{H}_{118}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1061.88; found, 1062.4.



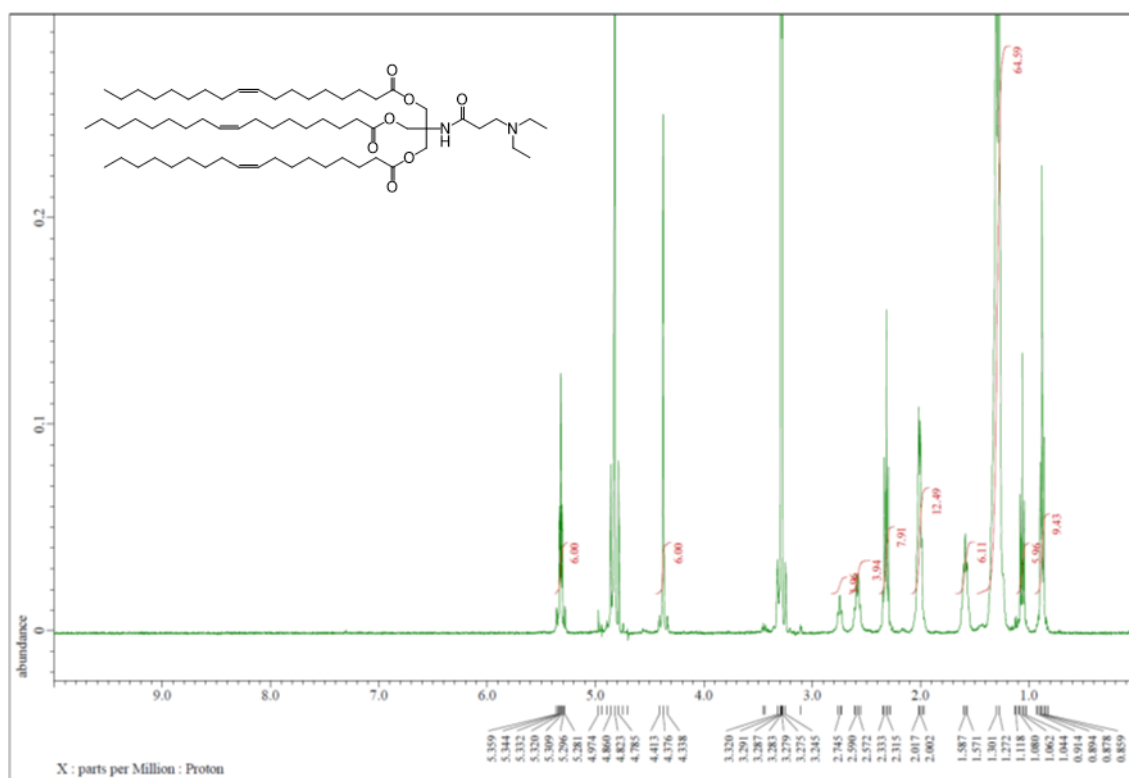


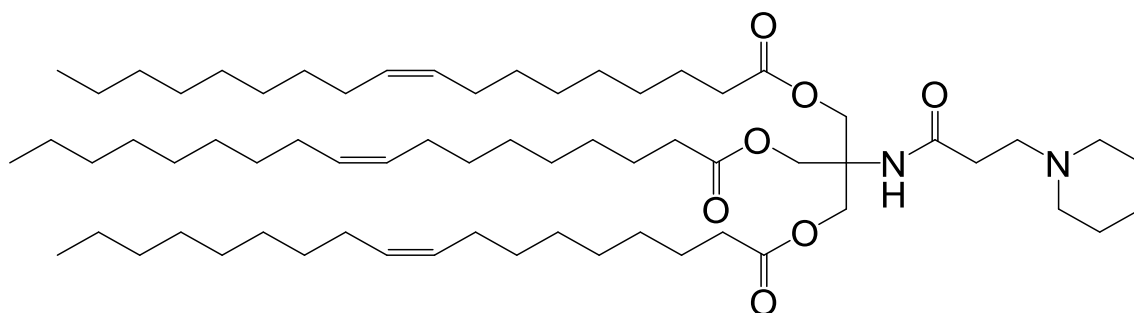
2-(3-(diethylamino)propanamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-4)

67.6 mg (16%) as a colorless oil.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.06 (t, 6H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.32 (m, 8H), 2.58 (m, 4H), 2.75 (t, 2H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{121}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1041.92; found, 1041.4 and for $\text{C}_{65}\text{H}_{120}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1063.90; found, 1063.4.





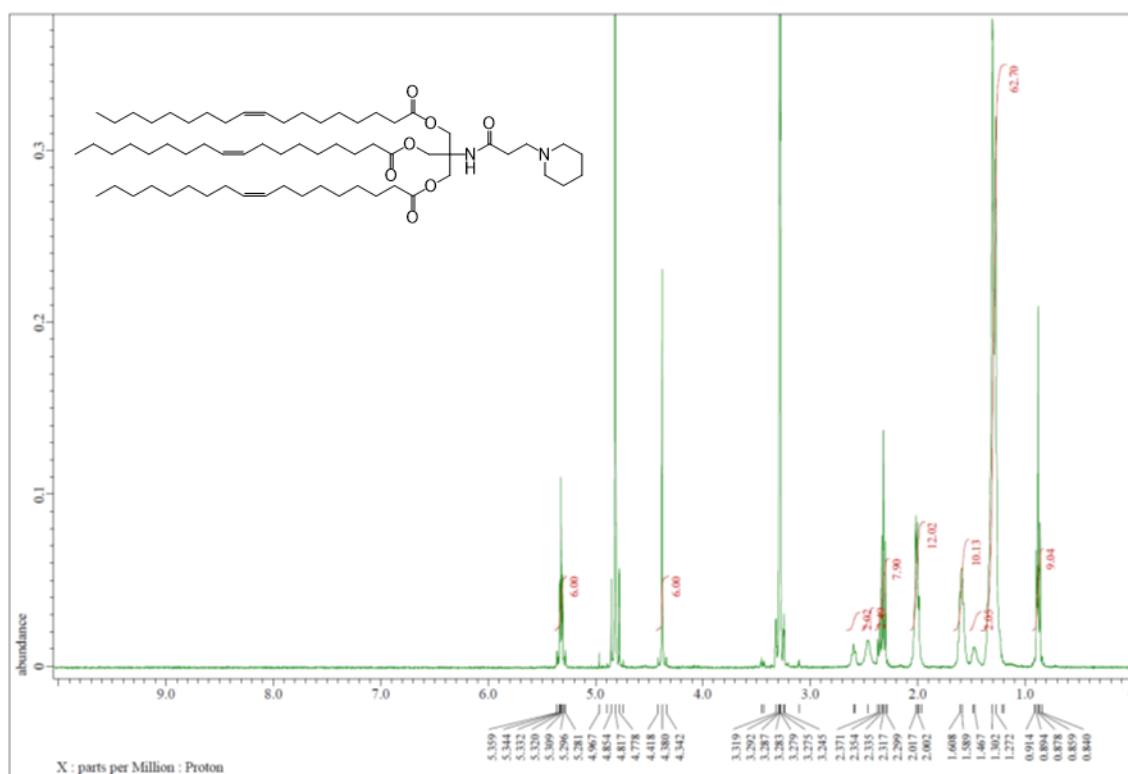
2-((oleoyloxy)methyl)-2-(3-(piperidin-1-yl)propanamido)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-5)

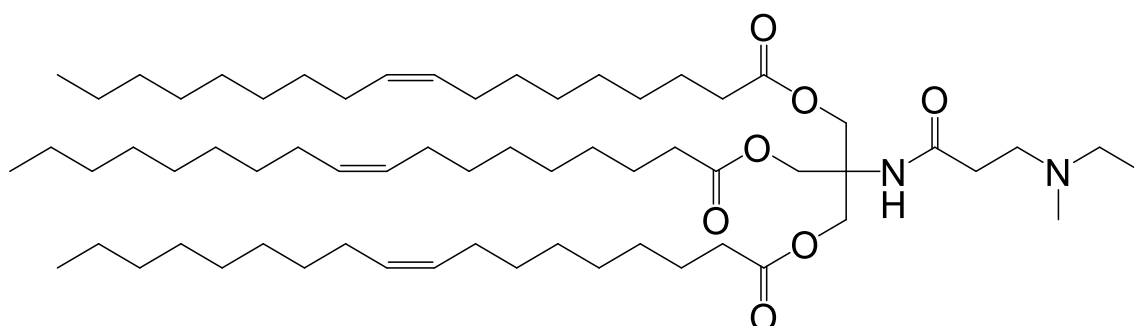
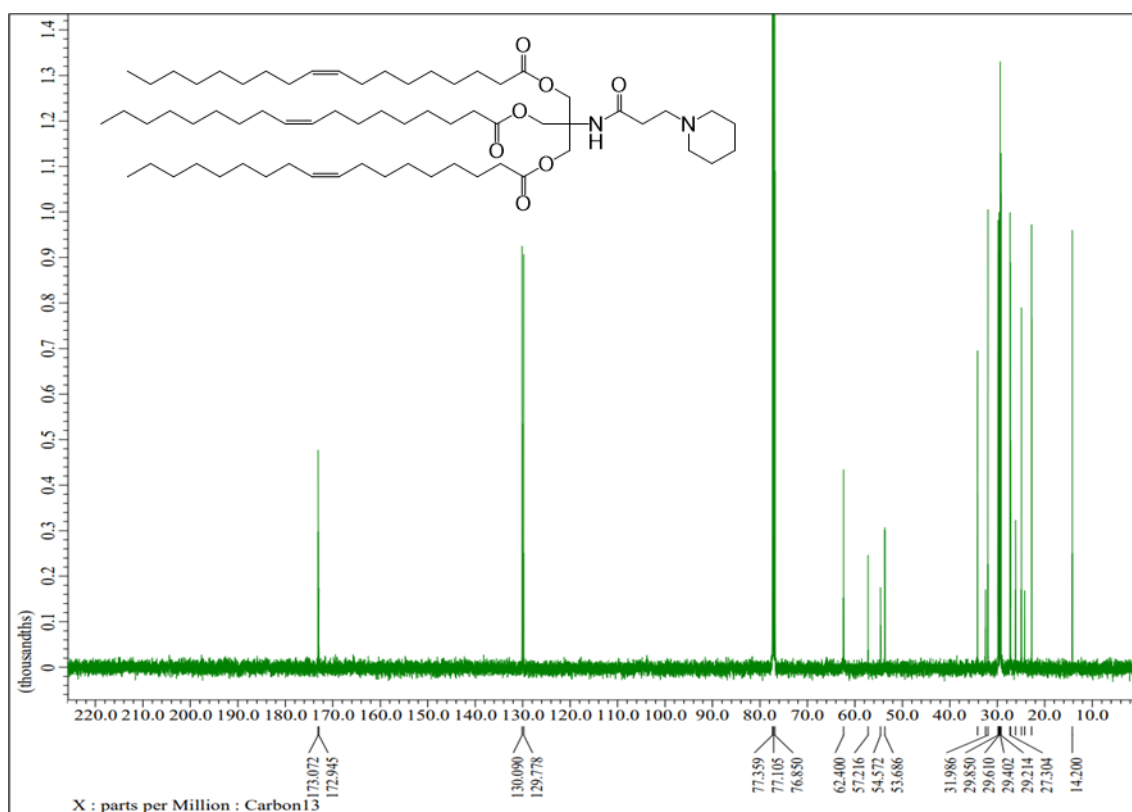
799 mg (76%) as a colorless oil.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.47 (br, 2H), 1.59 (m, 10H), 2.00 (m, 12H), 2.32 (m, 8H), 2.46 (br, 2H), 2.60 (m, 2H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 14.20, 22.76, 24.24, 24.94, 26.15, 27.26, 27.30, 29.21, 29.29, 29.40, 29.61, 29.80, 29.85, 31.99, 32.49, 34.17, 53.69, 54.57, 57.22, 62.40, 129.78, 130.09, 172.95, 173.07.

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{121}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1053.92; found, 1053.4 and for $\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1075.9; found, 1075.4.



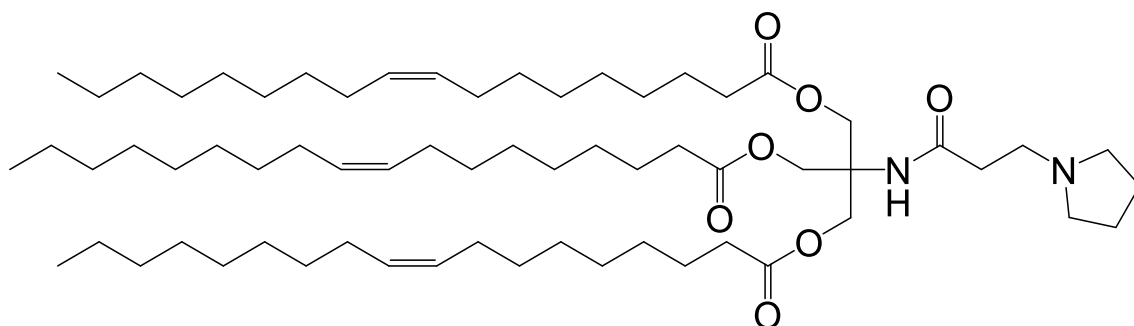
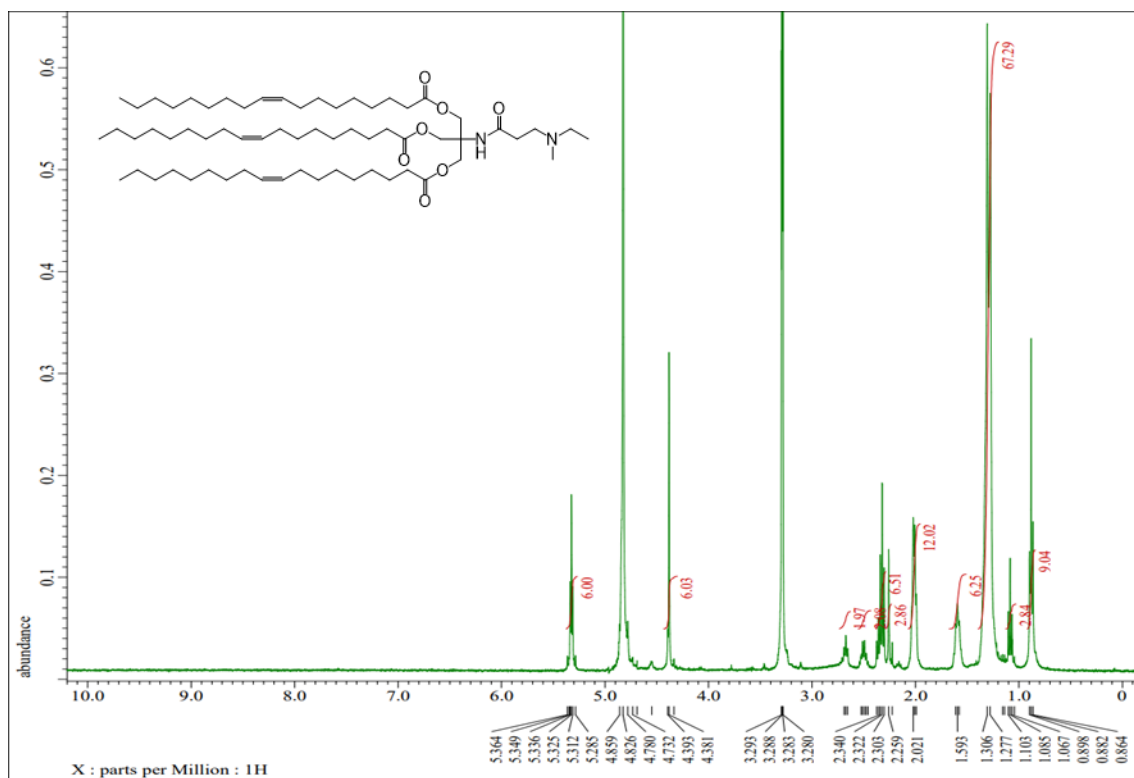


2-(3-(ethyl(methyl)amino)propanamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-16)

27.1 mg (6.6%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.10 (t, 3H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.28 (s, 3H), 2.32 (m, 6H), 2.51 (m, 2H), 2.68 (m, 2H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

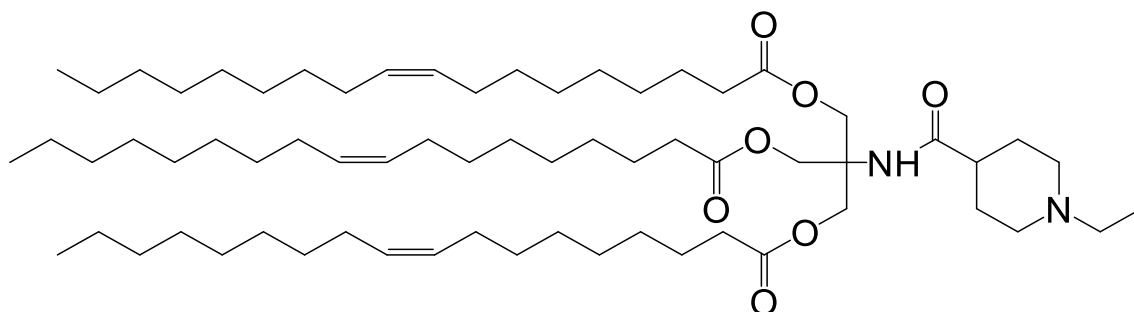
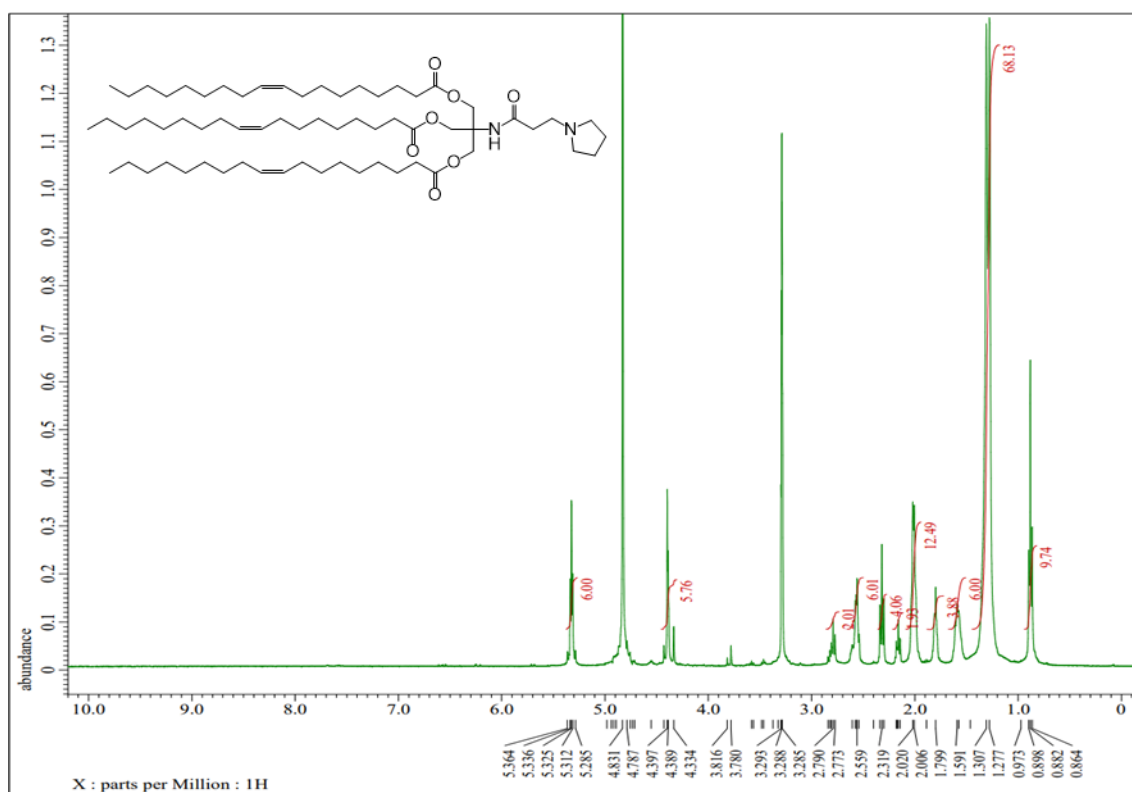
TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{119}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1027.90; found, 1027.4 and for $\text{C}_{64}\text{H}_{118}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1049.88; found, 1049.6.



2-((oleoyloxy)methyl)-2-(3-(pyrrolidin-1-yl)propanamido)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-17)

36.3 mg (8.7%) as a colorless oil.

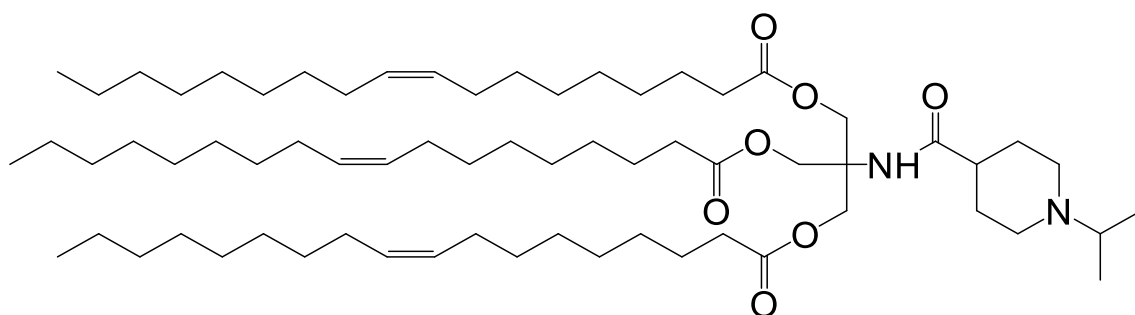
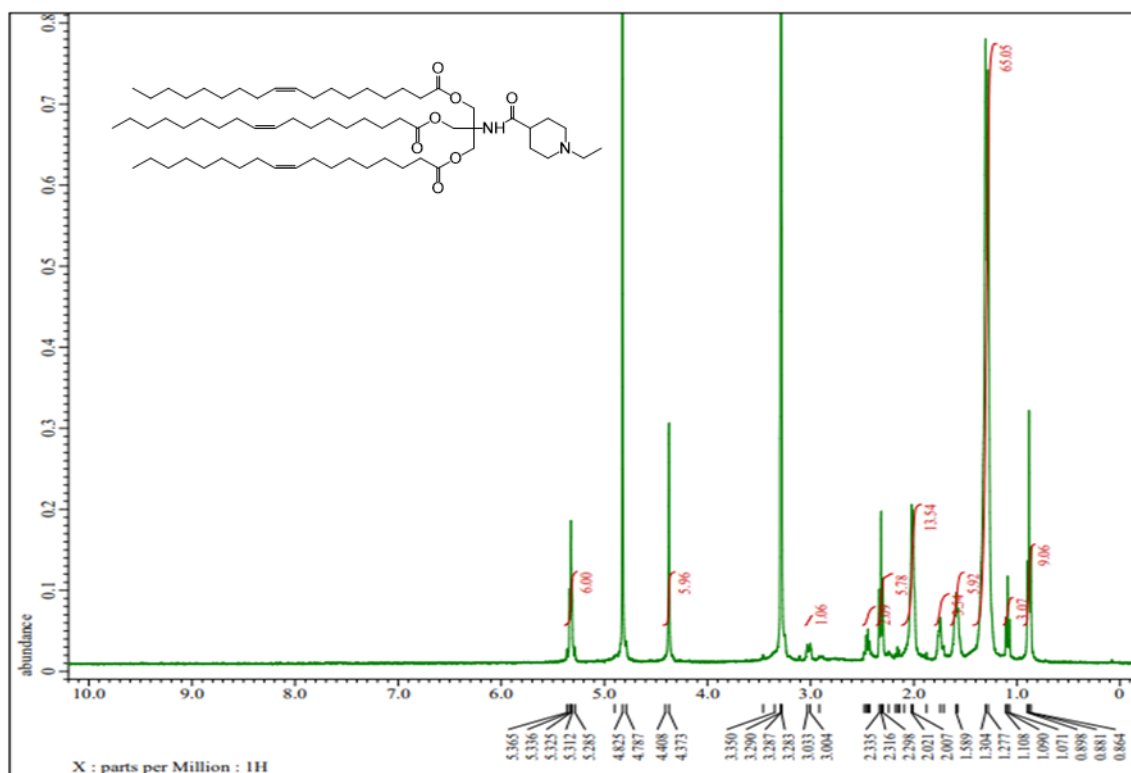
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm) δ: 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.18 (m, 2H), 2.32 (m, 4H), 2.60 (m, 6H), 2.80 (m, 2H) 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).



2-(1-ethylpiperidine-4-carboxamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-18)

37.4 mg (8.9%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.09 (t, 3H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 1.74 (m, 4H), 2.00 (m, 12H), 2.32 (m, 6H), 2.42 (m, 2H), 3.01 (m, 1H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

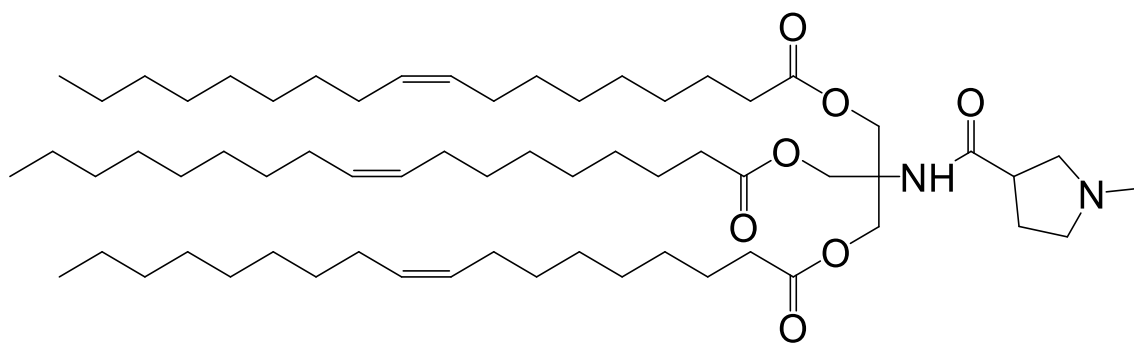
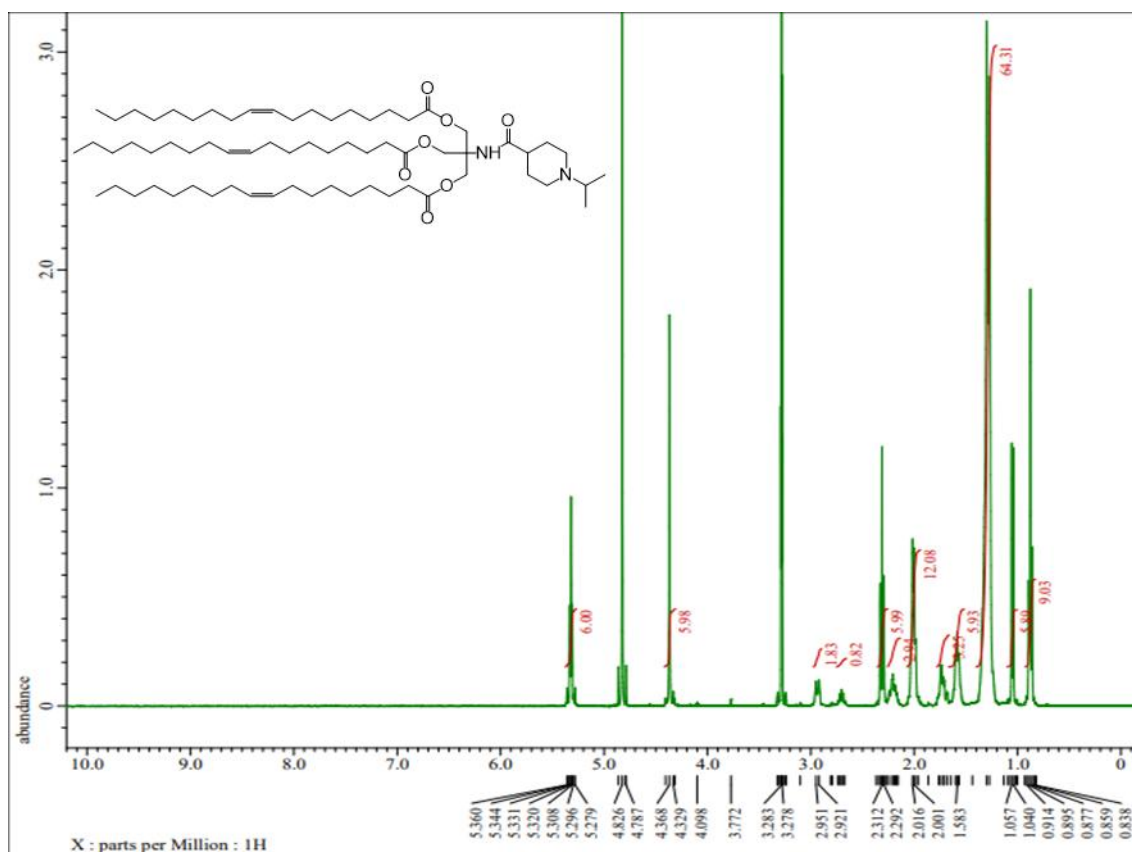


2-(1-isopropylpiperidine-4-carboxamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-19)

108.4 mg (25.4%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.07 (d, 6H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (br, 6H), 1.74 (m, 4H), 2.00 (m, 12H), 2.22 (m, 4H), 2.32 (m, 6H), 2.71 (m, 1H), 2.95 (m, 2H), 4.38 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{67}\text{H}_{123}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1068.73; found, 1067.4 and for $\text{C}_{67}\text{H}_{122}\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1089.91; found, 1089.4.

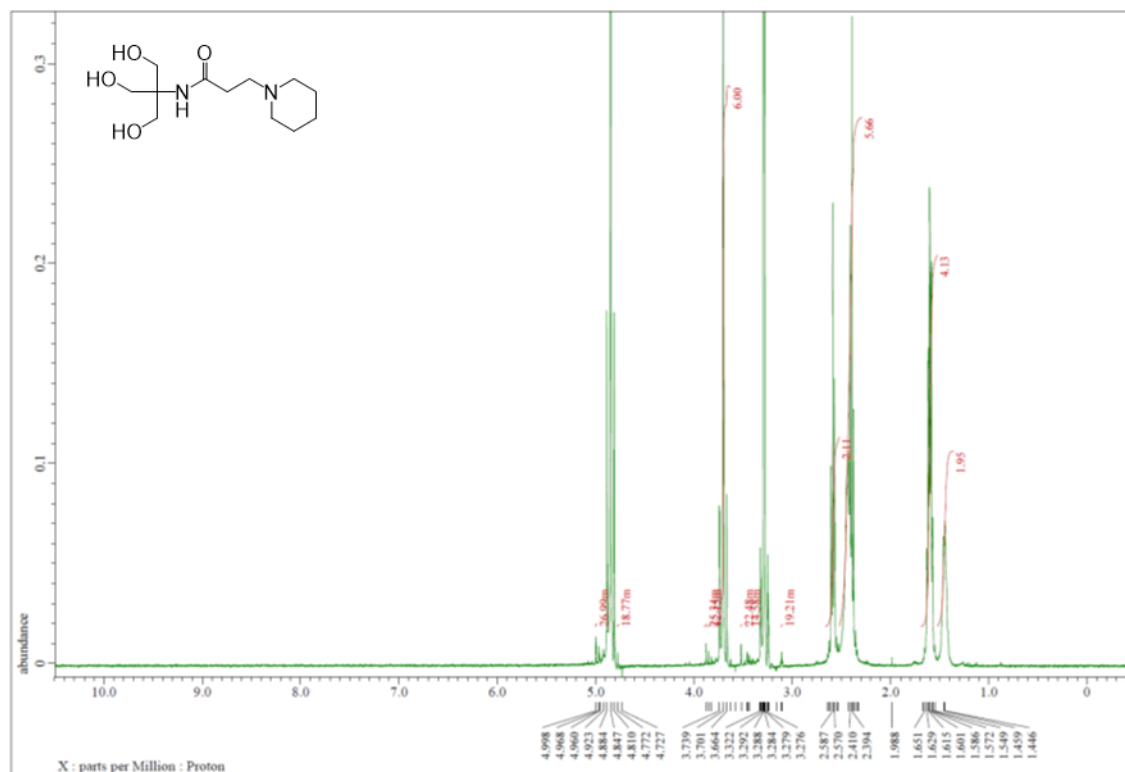


2-(1-methylpyrrolidine-3-carboxamido)-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-20)

116.6 mg (28.4%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.39 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 2.00 (m, 14H), 2.32 (t, 6H), 2.40 (s, 3H), 2.61 (m, 2H), 2.78 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.97 (m, 1H), 4.37 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{117}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 1025.89; found, 1025.4 and for $\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{N}_2\text{NaO}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1047.87; found, 1047.4.



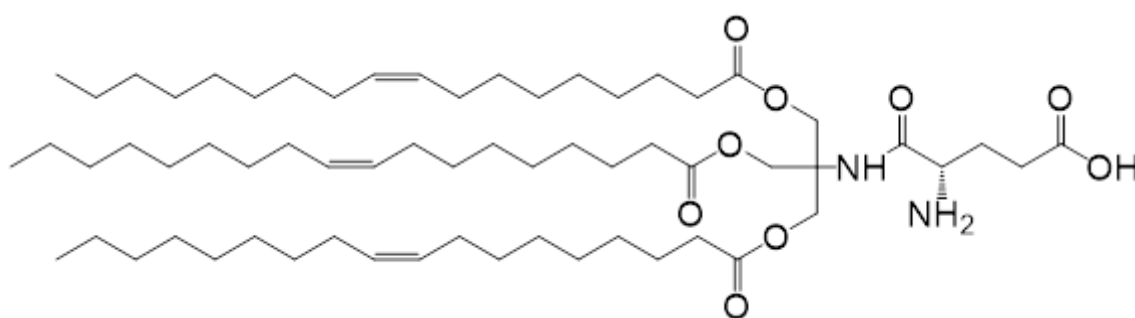
次に、TxT-5 head (260 mg, 1.0 mmol) を無水 DCM (10 mL) に溶解し、オレイン酸 (890 mg, 3.15 mmol) を加え、DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol) および EDCI-HCl (633 mg, 3.3 mmol) を混合物に添加し、40℃で一晩攪拌した。その後、溶媒除去し、残渣を EtOAc に懸濁し、シリカゲルを通した。濾液を 0.1 N NaOH(aq) および食塩水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。残渣を順相カラム (Sfär Silica HCD, Biotage) に充填し、ヘキサンと 0.5% v/v TEA を含む EtOAc からなる移動相を用いたグラジエント移動相を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製した。これにより、無色の油状物として TOT-5 を 799 mg (76%) 得た。

【zTOT の一般的な合成】

脂質頭部にアミノ酸の構造を含む zTOT では、22-amino-2-((oleoyloxy)methyl)propane-1,3-diyl dioleate (TOT-0 ; 366 mg, 0.40 mmol) およびアミノ酸 (0.44 mmol) をエタノール (4 mL) に溶解し、4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chlorid (DMT-MM ; 122 mg, 0.44 mmol) を加え、反応液を室温で一晩攪拌した。その後、溶媒を除去し、残渣を EtOAc (4 mL) に懸濁し、水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を濾過し、濾液から溶媒を除去し、残渣を DCM (2.8 mL) に懸濁し、TFA (0.8 mL) および Triisopropylsilyl chloride (TIPS) (0.4 mL) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去し、順相カラム (Sfär Silica HCD, Biotage) に充填し、DCM とメタノールから

なる移動相を用いたグラジエント溶出によるフラッシュクロマトグラフィーで精製した。これにより、無色の油状物として TOT-9, 13, 14, 15 が得られた。

脂質頭部にベタイン構造を含む zTOT では、TOT-1 または TOT-2 (0.40 mmol) を無水 DCM (5 mL) に溶解した。bromoacetic acid または 3-(dimethylamino)propionic acid hydrochloride (0.44 mmol) とトリエチルアミン (167.5 μ L, 1.20 mmol) を混合物に加え、40°Cで一晩攪拌した。溶媒を除去し、順相カラム (Sfär Silica HCD, Biotage) に充填し、DCM と MeOH からなる移動相を用いたグラジエント溶出によるフラッシュクロマトグラフィーで精製し、Sfär Silica HCD (Biotage) の順相カラムに充填した。これにより、無色の油状物として TOT-10, 11, 12 が得られた。

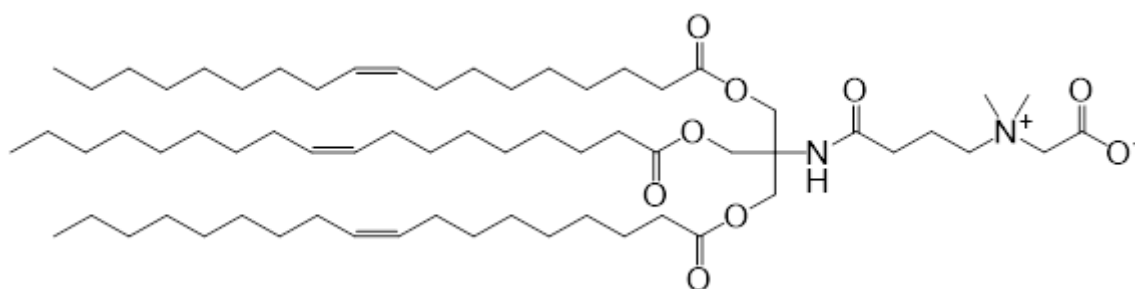
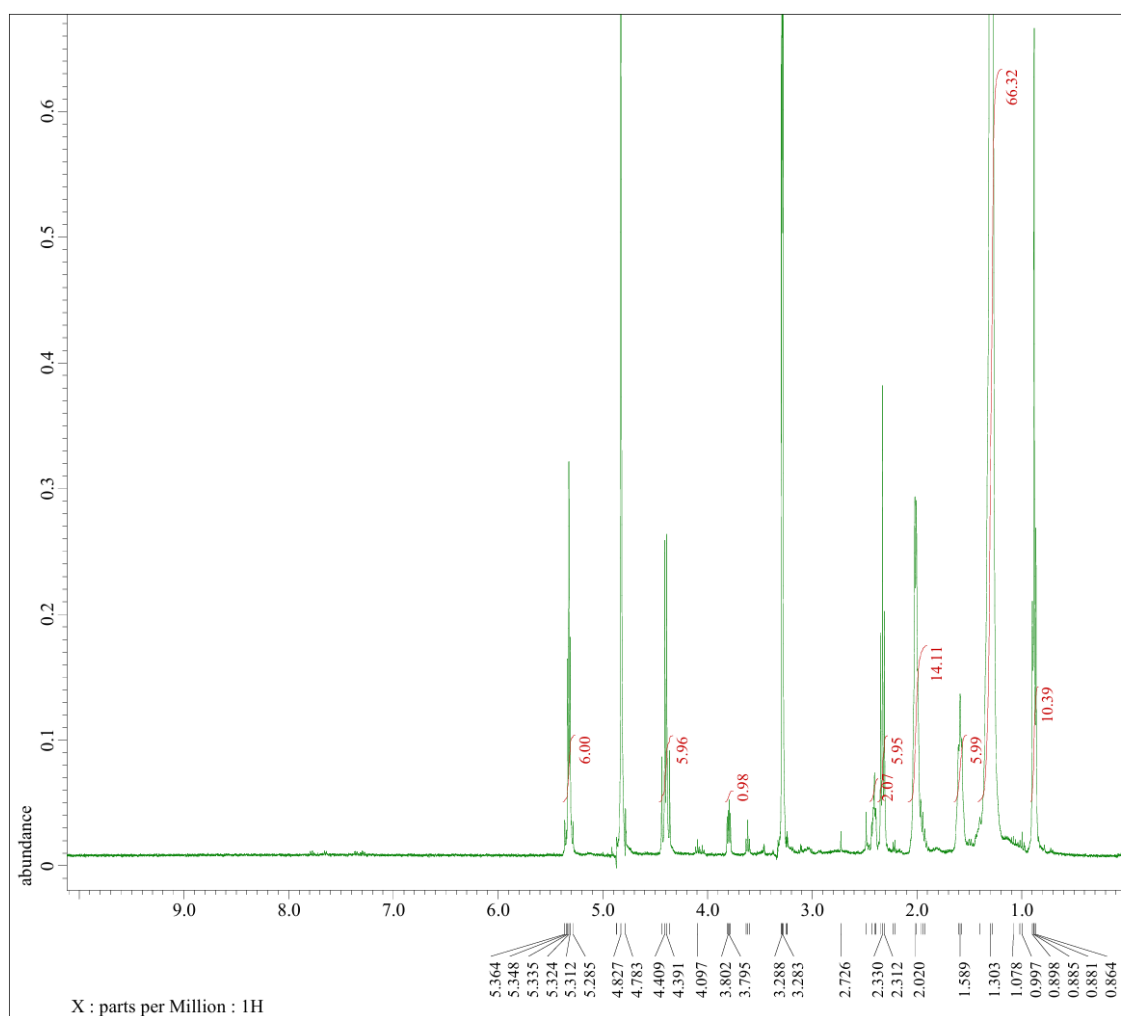


(S)-4-amino-5-((1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)amino)-5-oxopentanoic acid (TOT-9)

92 mg (22%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.41 (m, 60H), 1.57 (m, 6H), 1.98 (m, 14H), 2.31 (s, 6H), 2.40 (m, 2H), 3.79 (t, 1H), 4.40 (m, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_2\text{O}_9$ (M-H) $^-$, 1041.84; found, 1041.6.

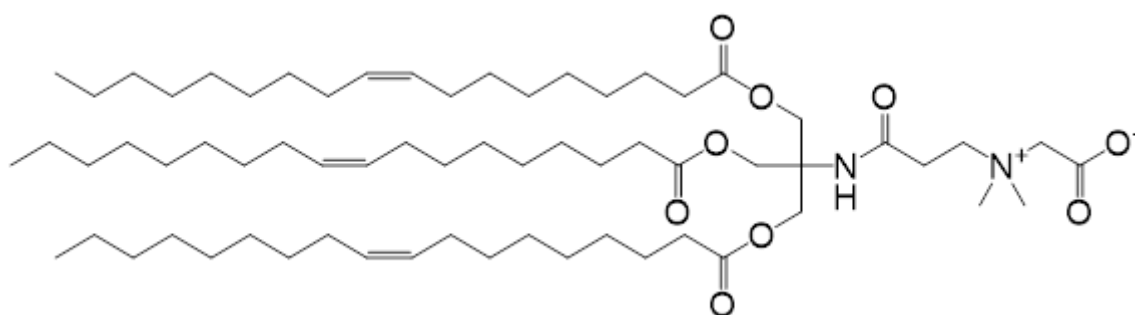
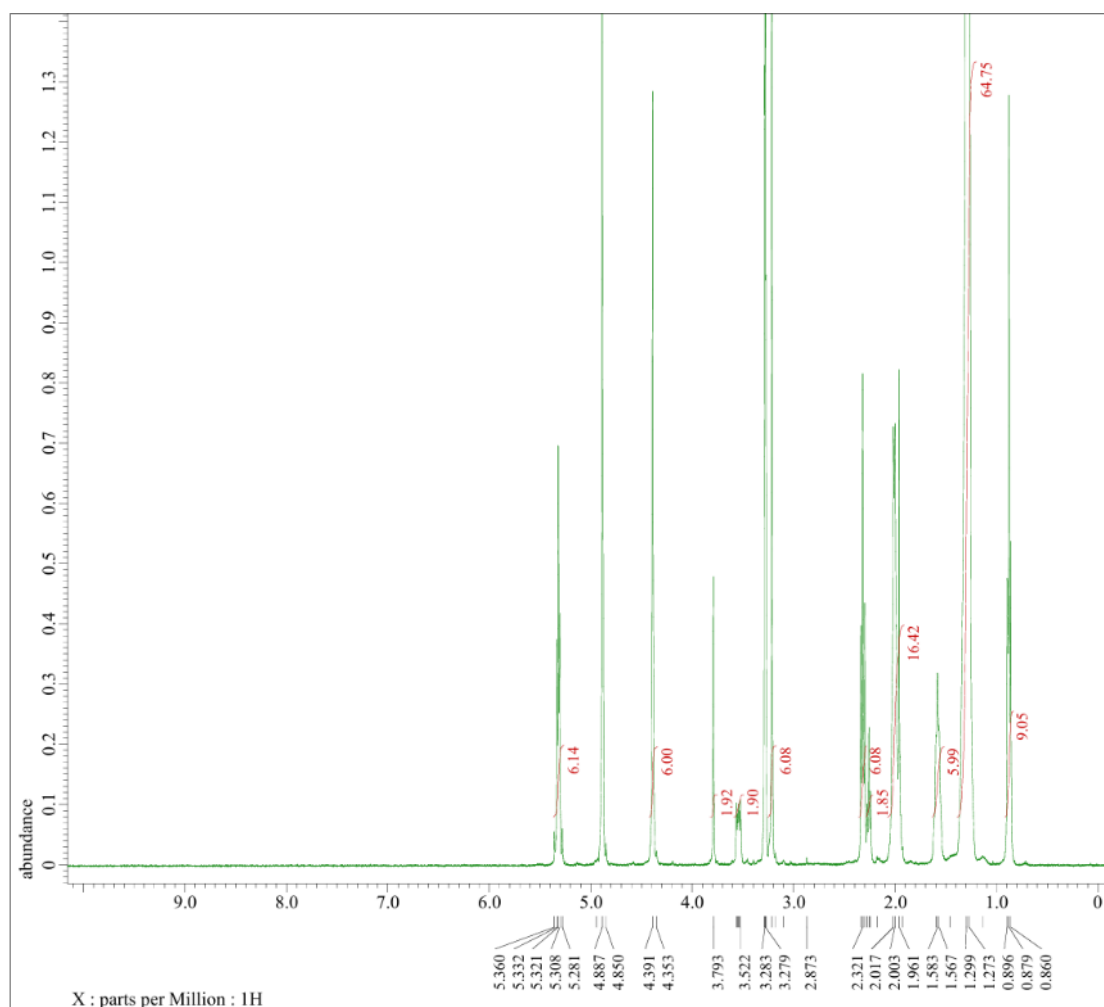


2-((4-((1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)amino)-4-oxobutyl)dimethylammonio)acetate (TOT-10)

0.99 g (91%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.41 (m, 60H), 1.57 (m, 6H), 1.91–2.08 (m, 14H), 2.25 (m, 2H), 2.32 (m, 6H), 3.21 (s, 1H), 3.25 (m, 2H), 3.80 (s, 2H), 4.40 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{119}\text{N}_2\text{O}_9$ ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 1083.89; found, 1083.6 and for $\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{N}_2\text{NaO}_9$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1107.89; found, 1107.5.

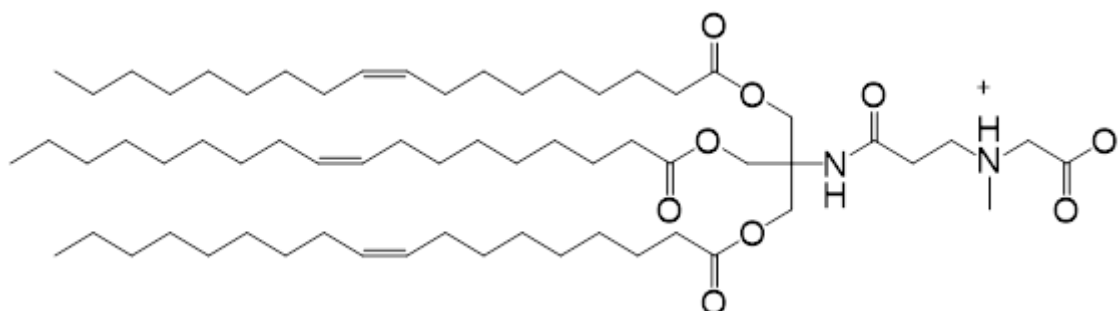
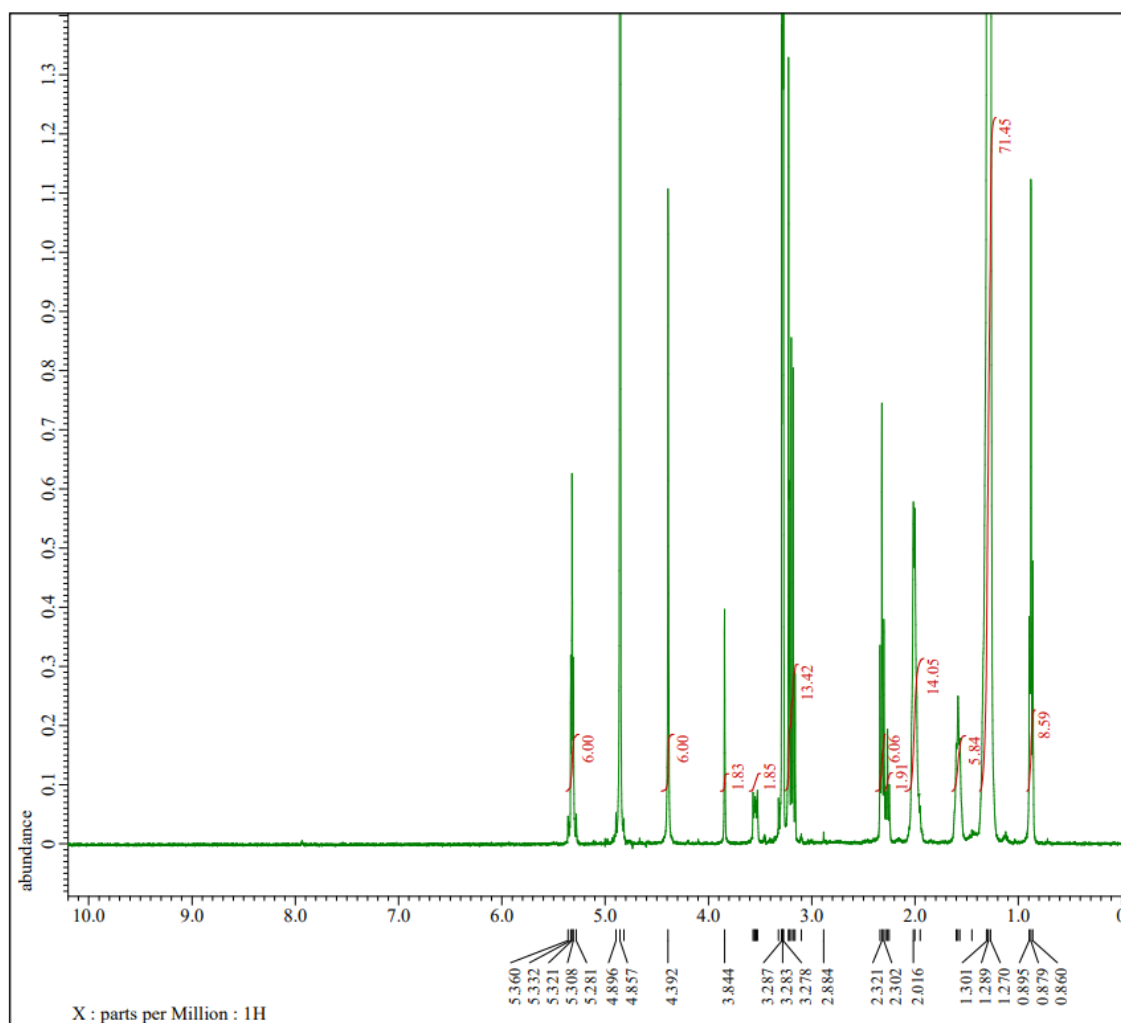


2-((3-((1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)amino)-3-oxopropyl)dimethylammonio)acetate (TOT-11)

85.8 mg (53%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.41 (m, 60H), 1.57 (m, 6H), 2.00 (m, 14H), 2.26 (m, 2H), 2.30 (m, 6H), 3.18 (m, 14H), 3.53 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 4.39 (s, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{117}\text{N}_2\text{O}_9$ (M-H) $^-$, 1069.88; found, 1068.4 and for $\text{C}_{65}\text{H}_{118}\text{N}_2\text{NaO}_9$ (M+Na) $^+$, 1093.87; found, 1093.6

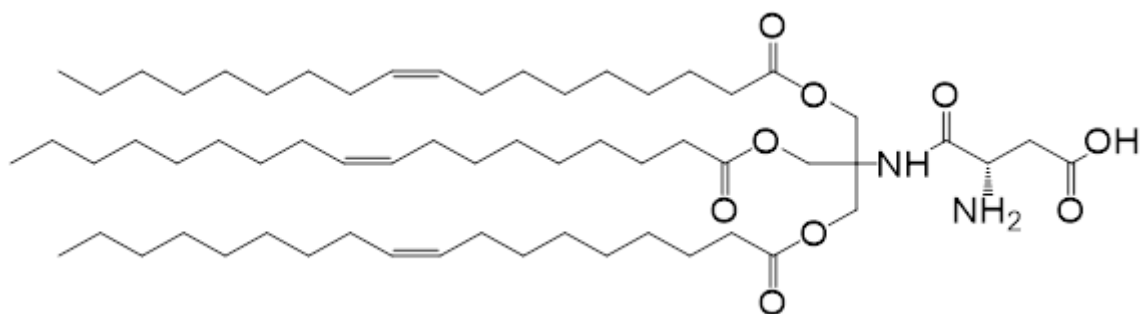


2-((3-((1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)amino)-3-oxopropyl)(methyl)ammonio)acetate (TOT-12)

88 mg (39%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.20–1.40 (m, 60H), 1.59 (m, 6H), 2.01 (m, 12H), 2.32 (t, 6H), 2.39 (m, 5H), 2.79 (t, 2H), 4.39 (s, 6H), 5.33 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{115}\text{N}_2\text{O}_9$ ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 1055.86; found, 1055.6 and for $\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{N}_2\text{NaO}_9$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 1079.86; found, 1078.5

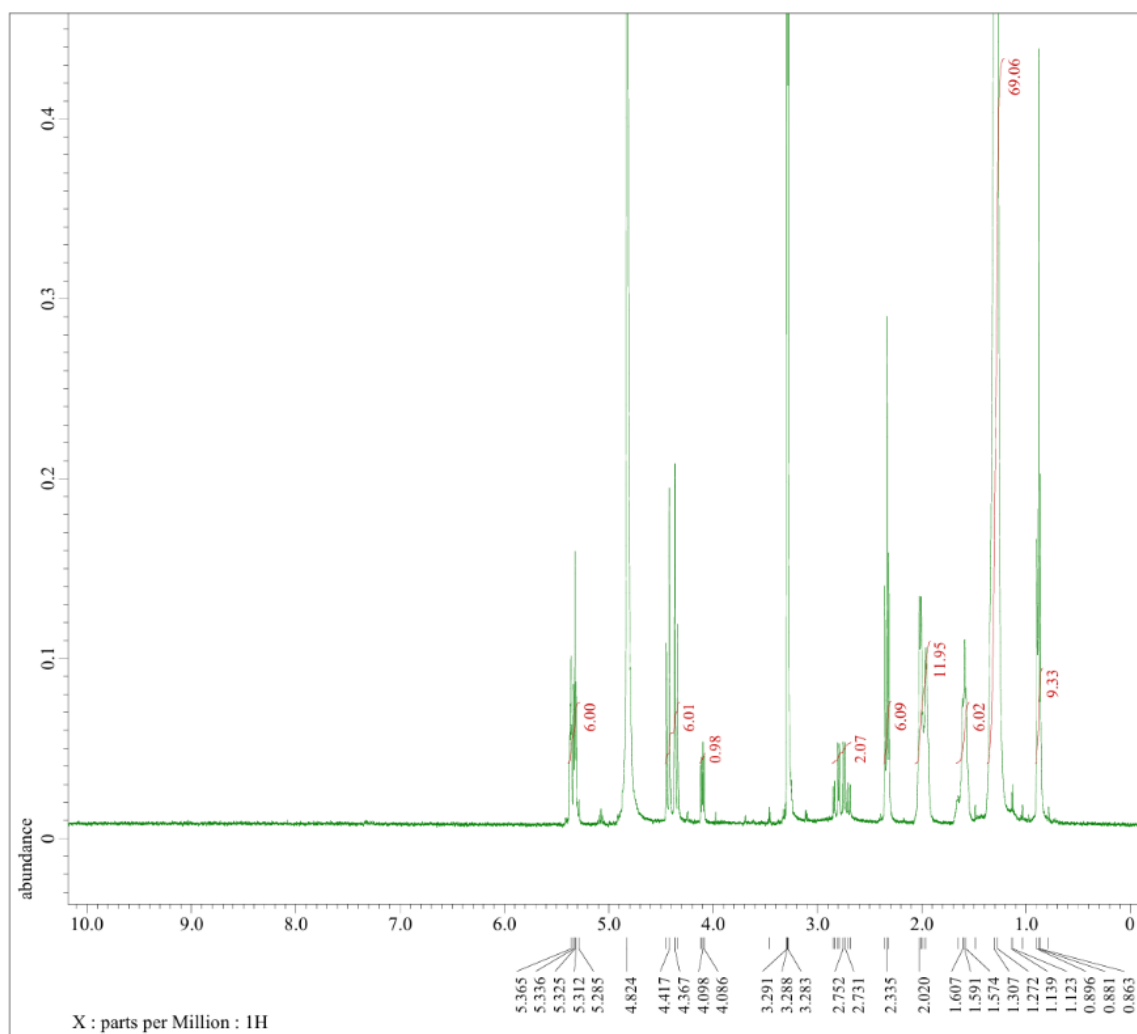


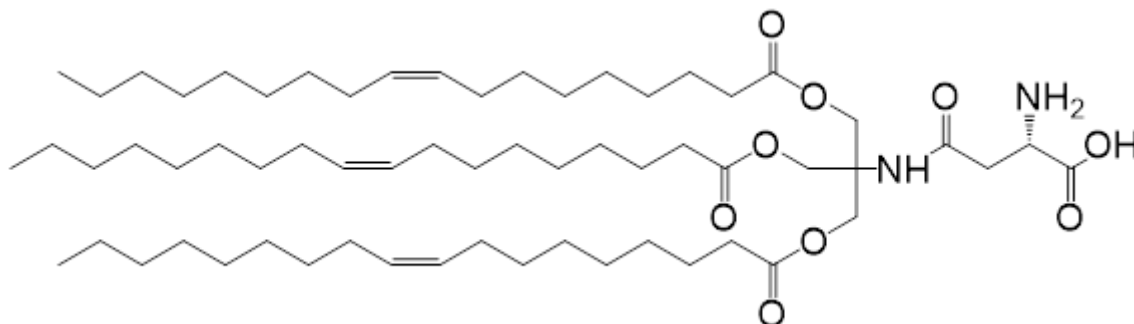
(S)-3-amino-4-((1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)amino)-4-oxobutanoic acid (TOT-13)

180 mg (44%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.20–1.40 (m, 60H), 1.58 (m, 6H), 1.97 (m, 12H), 2.33 (t, 6H), 3.75 (m, 2H), 4.08 (m, 2H), 4.40 (m, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_2\text{O}_9$ ($\text{M}-\text{H}$) $^-$, 1027.83; found, 1027.7.



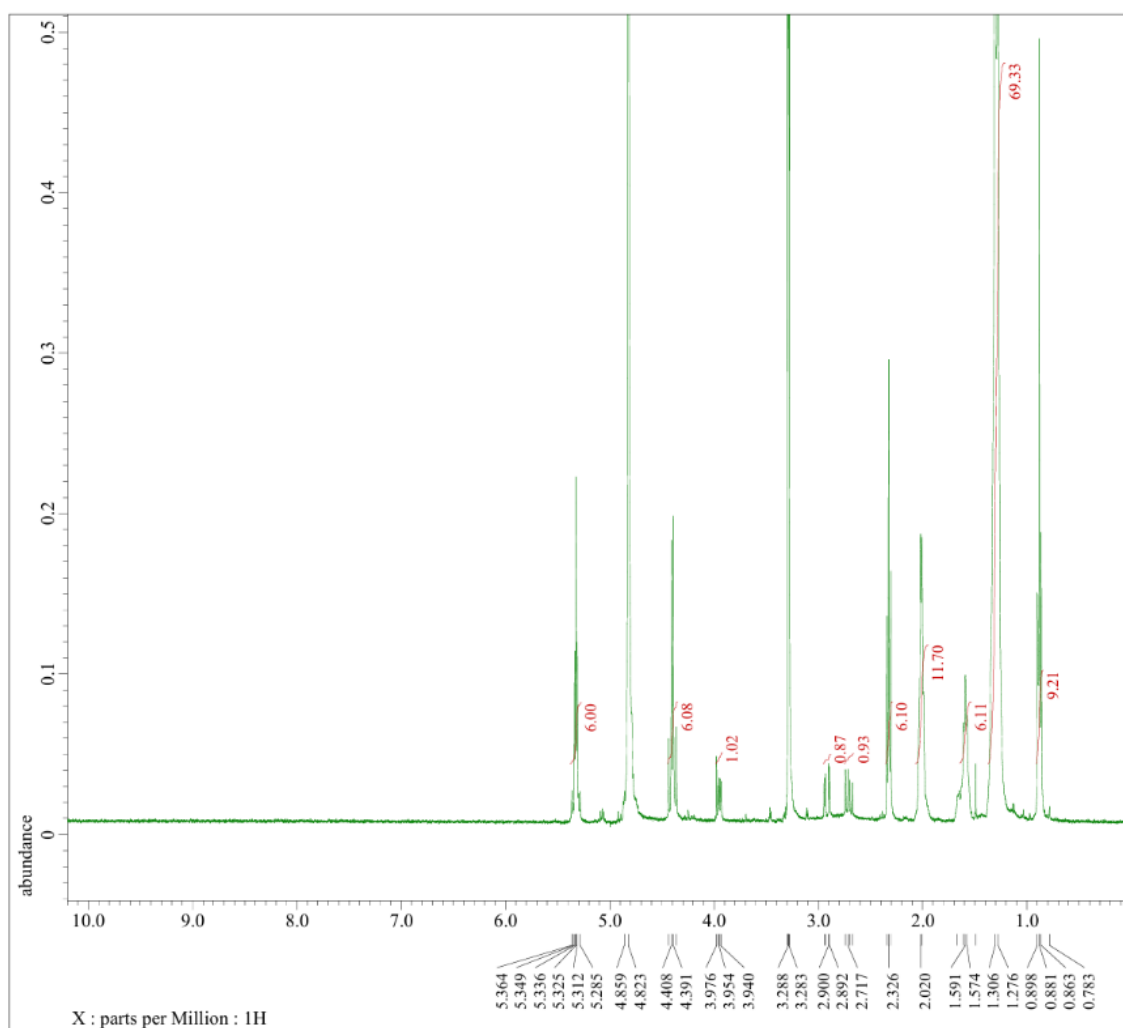


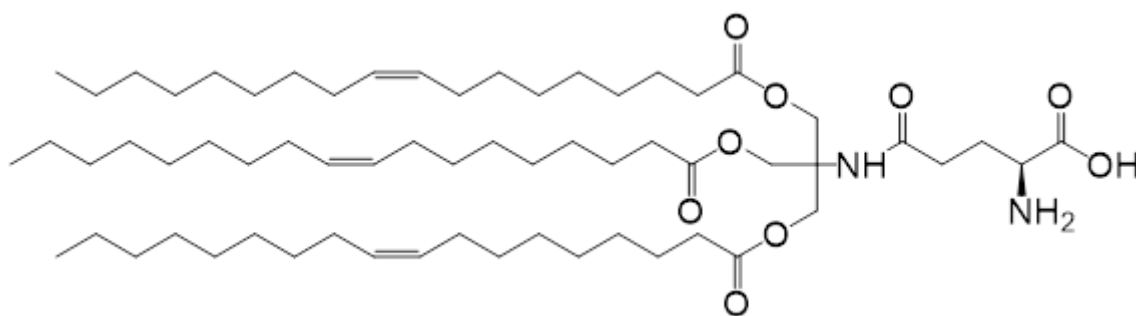
N4-(1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)-L-asparagine (TOT-14)

199 mg (47%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.41 (m, 60H), 1.58 (m, 6H), 2.00 (m, 12H), 2.32 (t, 6H), 2.71 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.40 (m, 6H), 5.32 (m, 6H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_2\text{O}_9$ (M-H) $^-$, 1027.83; found, 1027.6.





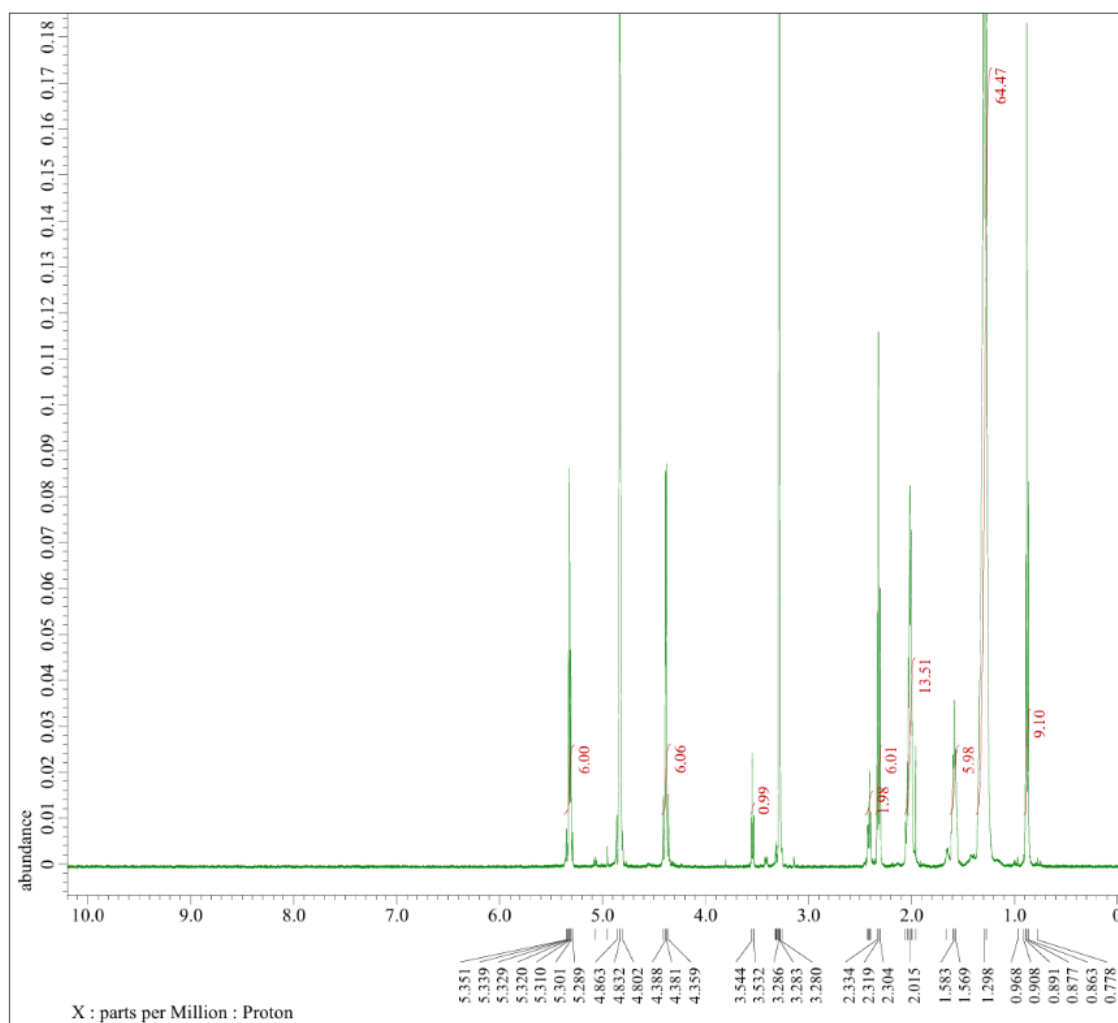
N5-(1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)-L-glutamine (TOT-15)

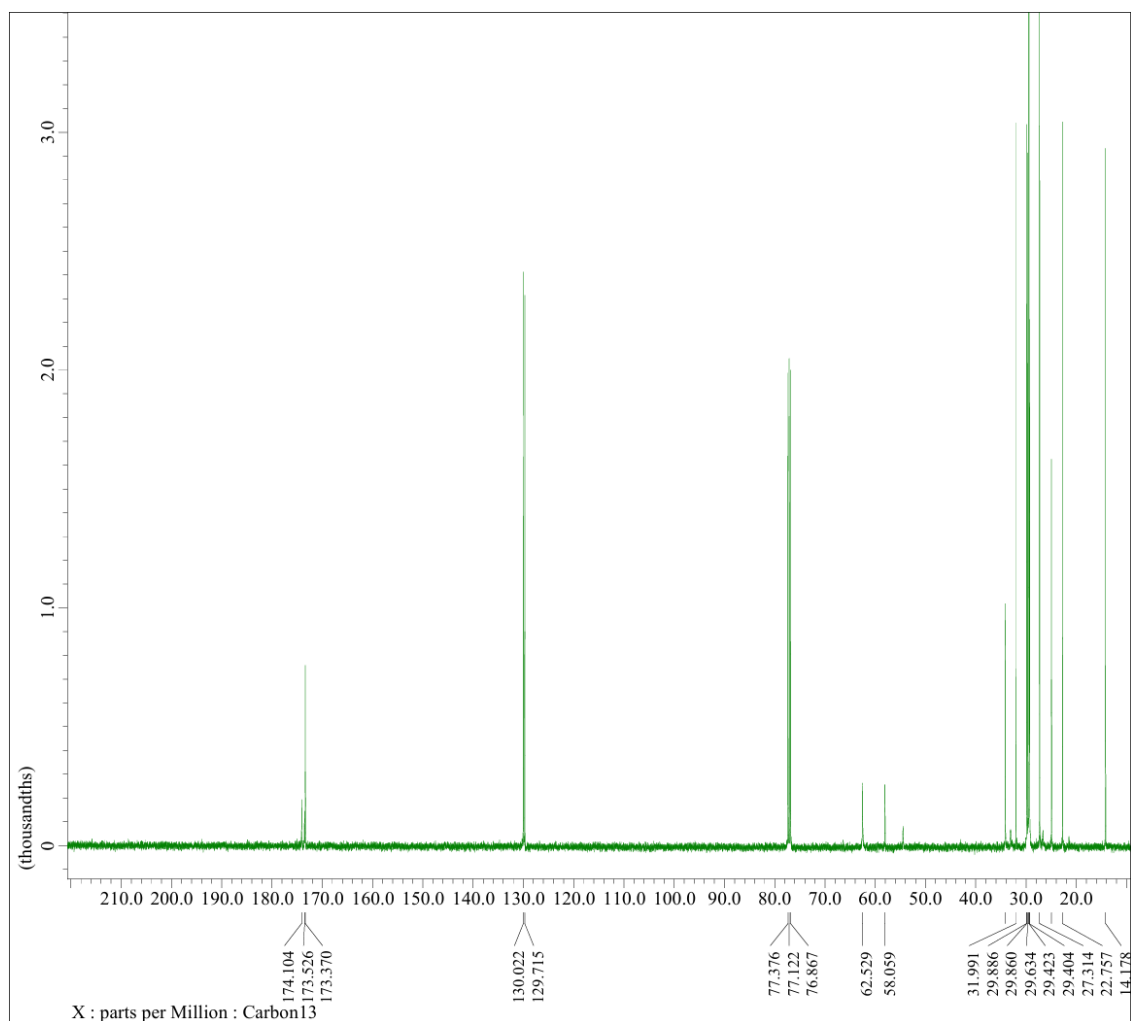
141 mg (34%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 0.88 (t, 9H), 1.21–1.41 (m, 60H), 1.58 (m, 6H), 2.00 (m, 14H), 2.32 (t, 6H), 2.41 (m, 2H), 2.53 (t, 1H), 4.40 (m, 6H), 5.32 (m, 6H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 14.18, 22.76, 24.95, 27.31, 29.28, 29.34, 29.40, 29.42, 29.63, 29.86, 29.89, 32.00, 34.12, 54.48, 58.06, 62.53, 76.87, 77.38, 129.72, 130.02, 173.37, 173.53, 174.10.

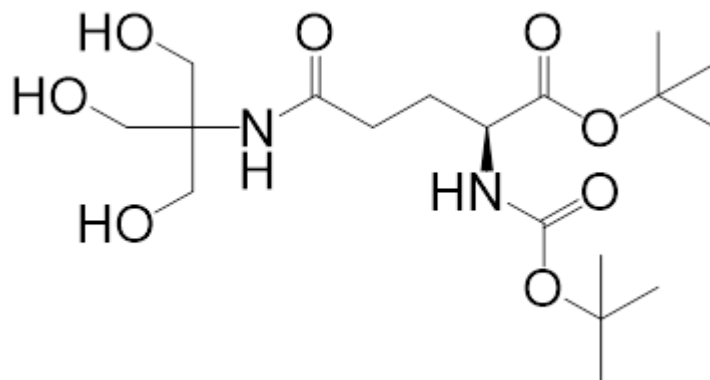
TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_2\text{O}_9$ (M-H) $^-$, 1041.84; found, 1040.4.





【TOT-15 のラージスケール合成】

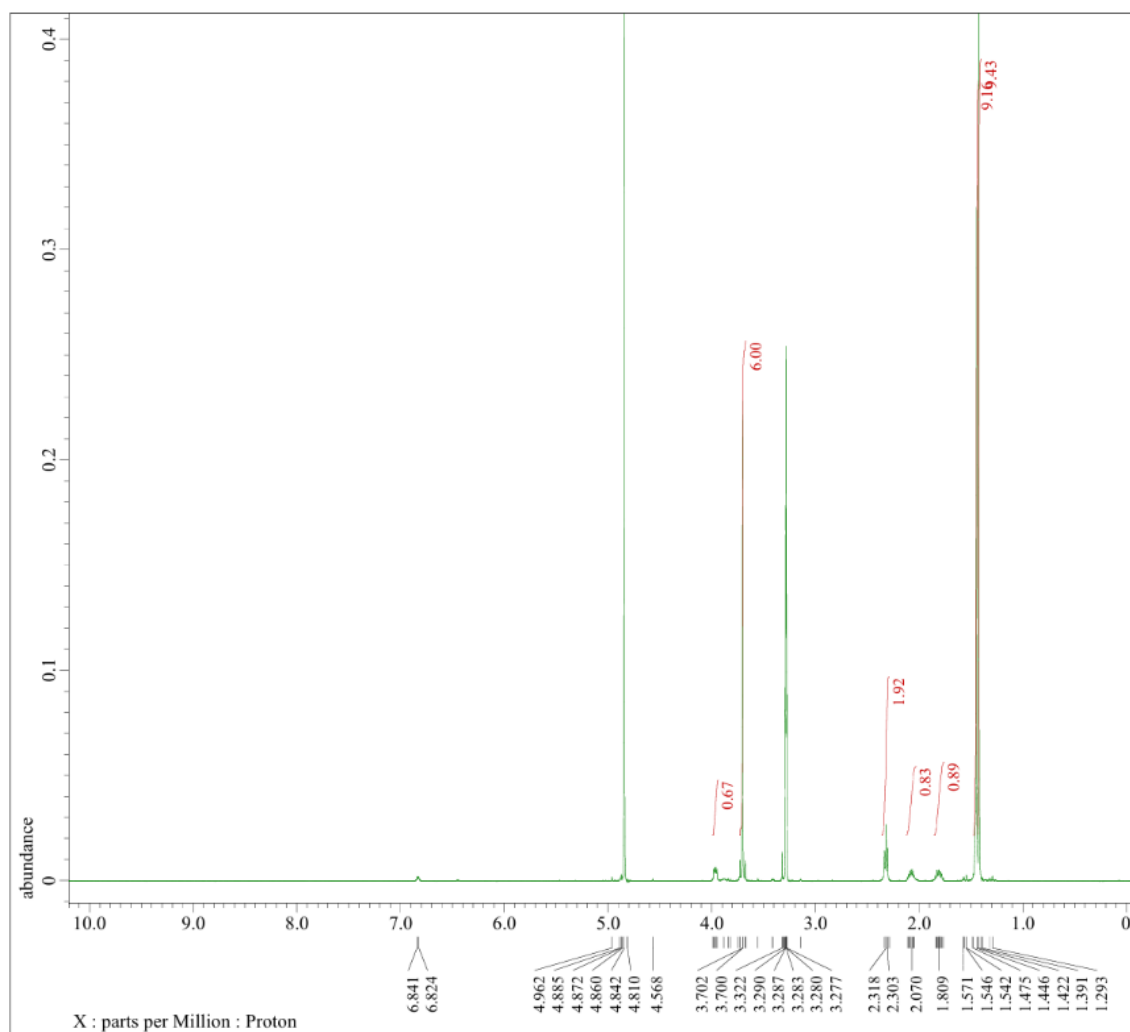
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (399 mg, 3.3 mmol) と 1-tert-Butoxy-carbonyl)-L-glutamate (910 mg, 3.0 mmol) をメタノール (10 mL) に溶解した。次に、4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (913 mg, 3.3 mmol) を添加し、反応液を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣を DCM に懸濁し、水で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を濾過し、濾液を除去した。残渣を順送カラム (Sfär Silica HCD、Biotage) に充填し、DCM と MeOH からなる移動相を用いたグラジエント溶出によるフラッシュクロマトグラフィーで精製した。これにより、無色の油状物質として 236 mg (23%) の *tert*-butyl *N*2-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*5-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)-L-glutamate が得られた。



***tert*-butyl *N*2-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*5-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)-*L*-glutamate**

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , ppm) δ : 1.41 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.81 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 2.30 (t, 2H), 2.70 (s, 6H), 3.95 (m, 1H).

TLC-MS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_6$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 273.11; found, 273.4.



tert-butyl N2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N5-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)-L-glutamate (3.50 g, 9.14 mmol) をオレイン酸 (8.52 g, 30.16 mmol)、DMAP (0.11 g, 0.91 mmol) 及び EDCI-HCl (6.31 g, 32.90 mmol) を DCM (88 mL) に溶解し、反応液を 40°C で一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣をヘキサン/酢酸エチル (3:1, 50 mL) に懸濁し、シリカゲルに通した。濾液を蒸発させ、順相カラム (Sfär Amino, Biotage) に充填し、ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒を用いたグラジエント溶出によるフラッシュクロマトグラフィーで精製した。次に、精製された生成物 (3.20 g, 2.67 mmol) を DCM (17.5 mL) に懸濁させ、TFA (5.0 mL) と TIPS (2.5 mL) を添加した。反応液を室温で一晩攪拌した。溶媒を蒸発させ、逆相カラム (Sfär Silica C18D, Biotage) に充填し、水とアセトニトリル/イソプロパノール (1:4) に 0.1% v/v の酢酸を含む移動相を用いたフラッシュクロマトグラフィーによるグラジエント溶出で精製した。これにより、無色の油状物質として N5-(1,3-bis(oleoyloxy)-2-((oleoyloxy)methyl)propan-2-yl)-L-glutamine が 1.98 g (52%) 得られた。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費、北海道大学 DX 博士人材フェローシップ奨学金の助成を受けたものである。

本研究を遂行するにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、また適切な御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室教授・山田勇磨先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、また適切な御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤研究室卓越教授・原島秀吉先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日頃から活発な議論をして頂くと共に、的確かつ有益なるご助言を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授・佐藤悠介先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言と深い理解を頂きました、金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 薬物動態学研究室教授・中村孝司先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、マイクロ流路をご提供して頂くと共に、的確かつ有益な御助言を頂きました、北海道大学大学院工学研究院 マイクロシステム化学研究室教授・渡慶次学先生、および准教授・真栄城正寿先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、IVIS imaging system をご提供して頂くと共に、的確かつ有益な御助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室教授・小川美香子先生に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、的確かつ貴重な御助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室准教授・米田宏先生に深く感謝致します。

日頃から活発な議論をして頂くと共に、快適な研究環境の場を提供して頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室 清水りな学士、花沢瞬学士、八鍬まい学士、神鳥真帆さん、西田健悟さん、二瓶祐一郎さん、鈴木柊哉さん、高屋大智さんならびに有益な御助言を頂きました薬剤分子設計学研究室の諸先輩、同輩、後輩の皆様に感謝致します。

2026 年 3 月 鈴木 裕一

参考文献

- [1] L. Lapteva, T. Purohit-Sheth, M. Serabian, R.K. Puri, Clinical Development of Gene Therapies: The First Three Decades and Counting, *Mol Ther Methods Clin Dev* 19 (2020) 387-397.
- [2] A. Holm, S.N. Hansen, H. Klitgaard, S. Kauppinen, Clinical advances of RNA therapeutics for treatment of neurological and neuromuscular diseases, *RNA Biol* 19(1) (2022) 594-608.
- [3] S. Qin, X. Tang, Y. Chen, K. Chen, N. Fan, W. Xiao, Q. Zheng, G. Li, Y. Teng, M. Wu, X. Song, mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases, *Signal Transduct Target Ther* 7(1) (2022) 166.
- [4] A. Afzal, M.H. Abbasi, S. Ahmad, N. Sheikh, M.B. Khawar, Current Trends in Messenger RNA Technology for Cancer Therapeutics, *Biomater Res* 29 (2025) 0178.
- [5] M. Ghattas, G. Dwivedi, M. Lavertu, M.G. Alameh, Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities, *Vaccines (Basel)* 9(12) (2021).
- [6] D.D. Kang, H. Li, Y. Dong, Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics, *Adv Drug Deliv Rev* 199 (2023) 114961.
- [7] W. Meng, C. He, Y. Hao, L. Wang, L. Li, G. Zhu, Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source, *Drug Deliv* 27(1) (2020) 585-598.
- [8] Y. Zhang, C. Sun, C. Wang, K.E. Jankovic, Y. Dong, Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery, *Chem Rev* 121(20) (2021) 12181-12277.
- [9] M.J. Carrasco, S. Alishetty, M.G. Alameh, H. Said, L. Wright, M. Paige, O. Soliman, D. Weissman, T.E.t. Cleveland, A. Grishaev, M.D. Buschmann, Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration, *Commun Biol* 4(1) (2021) 956.
- [10] F.P. Polack, S.J. Thomas, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, J.L. Perez, G. Pérez Marc, E.D. Moreira, C. Zerbini, R. Bailey, K.A. Swanson, S. Roychoudhury, K. Koury, P. Li, W.V. Kalina, D. Cooper, R.W. Frenck, Jr., L.L. Hammitt, Ö. Türeci, H. Nell, A. Schaefer, S. Ünal, D.B. Tresnan, S. Mather, P.R. Dormitzer, U. Şahin, K.U. Jansen, W.C. Gruber, Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine, *N Engl J Med* 383(27) (2020) 2603-2615.
- [11] L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, D. Diemert, S.A. Spector, N. Rouphael, C.B. Creech, J. McGettigan, S. Khetan, N. Segall, J. Solis, A. Brosz, C. Fierro, H. Schwartz, K. Neuzil, L. Corey, P. Gilbert, H. Janes, D. Follmann, M. Marovich, J. Mascola, L. Polakowski, J. Ledgerwood, B.S. Graham, H. Bennett, R. Pajon, C. Knightly, B. Leav, W. Deng, H. Zhou, S. Han, M. Ivarsson, J. Miller, T. Zaks, Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine, *N Engl J Med* 384(5) (2021) 403-416.

- [12] G. Zhang, T. Tang, Y. Chen, X. Huang, T. Liang, mRNA vaccines in disease prevention and treatment, *Signal Transduct Target Ther* 8(1) (2023) 365.
- [13] N.A. Nagy, A.M. de Haas, T.B.H. Geijtenbeek, R. van Ree, S.W. Tas, Y. van Kooyk, E.C. de Jong, Therapeutic Liposomal Vaccines for Dendritic Cell Activation or Tolerance, *Front Immunol* 12 (2021) 674048.
- [14] K. Sasaki, Y. Sato, K. Okuda, K. Iwakawa, H. Harashima, mRNA-Loaded Lipid Nanoparticles Targeting Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy, *Pharmaceutics* 14(8) (2022).
- [15] J. Yan, Y. Zhang, S. Du, X. Hou, W. Li, C. Zeng, C. Zhang, J. Cheng, B. Deng, D.W. McComb, W. Zhao, Y. Xue, D.D. Kang, X. Cheng, Y. Dong, Nanomaterials-Mediated Co-Stimulation of Toll-Like Receptors and CD40 for Antitumor Immunity, *Adv Mater* 34(47) (2022) e2207486.
- [16] X. Tang, J. Zhang, D. Sui, Q. Yang, T. Wang, Z. Xu, X. Li, X. Gao, X. Yan, X. Liu, Y. Song, Y. Deng, Simultaneous dendritic cells targeting and effective endosomal escape enhance sialic acid-modified mRNA vaccine efficacy and reduce side effects, *J Control Release* 364 (2023) 529-545.
- [17] G. Mahalingam, H.K. Rachamalla, P. Arjunan, K.V. Karuppusamy, Y. Periyasami, A. Mohan, K. Subramaniam, S. M, V. Rajendran, M. Moorthy, G.M. Varghese, K.M. Mohankumar, S. Thangavel, A. Srivastava, S. Marepally, SMART-lipid nanoparticles enabled mRNA vaccine elicits cross-reactive humoral responses against the omicron sub-variants, *Mol Ther* 32(5) (2024) 1284-1297.
- [18] L.M. Kranz, M. Diken, H. Haas, S. Kreiter, C. Loquai, K.C. Reuter, M. Meng, D. Fritz, F. Vascotto, H. Hefesha, C. Grunwitz, M. Vormehr, Y. Hüseman, A. Selmi, A.N. Kuhn, J. Buck, E. Derhovanessian, R. Rae, S. Attig, J. Diekmann, R.A. Jabulowsky, S. Heesch, J. Hassel, P. Langguth, S. Grabbe, C. Huber, Ö. Türeci, U. Sahin, Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy, *Nature* 534(7607) (2016) 396-401.
- [19] I. Rastogi, D. Jeon, J.E. Moseman, A. Muralidhar, H.K. Potluri, D.G. McNeel, Role of B cells as antigen presenting cells, *Front Immunol* 13 (2022) 954936.
- [20] T. Shimizu, A.S. Abu Lila, Y. Kawaguchi, Y. Shimazaki, Y. Watanabe, Y. Mima, Y. Hashimoto, K. Okuhira, G. Storm, Y. Ishima, T. Ishida, A Novel Platform for Cancer Vaccines: Antigen-Selective Delivery to Splenic Marginal Zone B Cells via Repeated Injections of PEGylated Liposomes, *J Immunol* 201(10) (2018) 2969-2976.
- [21] T. Shimizu, Y. Kawaguchi, H. Ando, Y. Ishima, T. Ishida, Development of an Antigen Delivery System for a B Cell-Targeted Vaccine as an Alternative to Dendritic Cell-Targeted Vaccines, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 70(5) (2022) 341-350.
- [22] M. Mathieu, N. Cotta-Grand, J.F. Daudelin, S. Boulet, R. Lapointe, N. Labrecque, CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8⁺ T cells to generate effector but not memory T cells, *PLoS One* 7(1) (2012) e30139.

- [23] A.M. Oliver, F. Martin, J.F. Kearney, IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells, *J Immunol* 162(12) (1999) 7198-207.
- [24] L. Zhang, B.W. Bridle, L. Chen, J. Pol, D. Spaner, J.E. Boudreau, A. Rosen, J.D. Bassett, B.D. Lichty, J.L. Bramson, Y. Wan, Delivery of viral-vectored vaccines by B cells represents a novel strategy to accelerate CD8(+) T-cell recall responses, *Blood* 121(13) (2013) 2432-9.
- [25] K. Hyltegren, M. Hulander, M. Andersson, M. Skepö, Adsorption of Fibrinogen on Silica Surfaces-The Effect of Attached Nanoparticles, *Biomolecules* 10(3) (2020).
- [26] T. Korzun, A.S. Moses, A. Jozic, V. Grigoriev, S. Newton, J. Kim, P. Diba, A. Sattler, P.R. Levasseur, N. Le, P. Singh, K.S. Sharma, Y.T. Goo, B. Mamnoon, C. Raitmayr, A.P. Mesquita Souza, O.R. Taratula, G. Sahay, O. Taratula, D.L. Marks, Lipid Nanoparticles Elicit Reactogenicity and Sickness Behavior in Mice Via Toll-Like Receptor 4 and Myeloid Differentiation Protein 88 Axis, *ACS Nano* 18(36) (2024) 24842-24859.
- [27] A.E. Zelkoski, Z. Lu, G. Sukumar, C. Dalgard, H. Said, M.G. Alameh, E. Mitre, A.M.W. Malloy, Ionizable lipid nanoparticles of mRNA vaccines elicit NF- κ B and IRF responses through toll-like receptor 4, *NPJ Vaccines* 10(1) (2025) 73.
- [28] S. Omo-Lamai, Y. Wang, M.N. Patel, E.O. Essien, M. Shen, A. Majumdar, C. Espy, J. Wu, B. Channer, M. Tobin, S. Murali, T.E. Papp, R. Maheshwari, L. Wang, L.S. Chase, M.E. Zamora, M.L. Arral, O.A. Marcos-Contreras, J.W. Myerson, C.A. Hunter, A. Tsourkas, V. Muzykantov, I. Brodsky, S. Shin, K.A. Whitehead, P. Gaskill, D. Discher, H. Parhiz, J.S. Brenner, Lipid Nanoparticle-Associated Inflammation is Triggered by Sensing of Endosomal Damage: Engineering Endosomal Escape Without Side Effects, *bioRxiv* (2024).
- [29] K. Lam, A. Leung, A. Martin, M. Wood, P. Schreiner, L. Palmer, O. Daly, W. Zhao, K. McClintock, J. Heyes, Unsaturated, Trialkyl Ionizable Lipids are Versatile Lipid-Nanoparticle Components for Therapeutic and Vaccine Applications, *Adv Mater* 35(15) (2023) e2209624.
- [30] M. Maeki, Y. Okada, S. Uno, K. Sugiura, Y. Suzuki, K. Okuda, Y. Sato, M. Ando, H. Yamazaki, M. Takeuchi, A. Ishida, H. Tani, H. Harashima, M. Tokeshi, Mass production system for RNA-loaded lipid nanoparticles using piling up microfluidic devices, *Applied Materials Today* 31 (2023).
- [31] X. Yan, F. Kuipers, L.M. Havekes, R. Havinga, B. Dontje, K. Poelstra, G.L. Scherphof, J.A. Kamps, The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse, *Biochem Biophys Res Commun* 328(1) (2005) 57-62.
- [32] D. Chen, S. Ganesh, W. Wang, M. Amiji, The role of surface chemistry in serum protein corona-mediated cellular delivery and gene silencing with lipid nanoparticles, *Nanoscale* 11(18) (2019) 8760-8775.
- [33] V. Francia, K. Yang, S. Deville, C. Reker-Smit, I. Nelissen, A. Salvati, Corona Composition Can Affect the Mechanisms Cells Use to Internalize Nanoparticles, *ACS Nano* 13(10) (2019)

11107-11121.

- [34] S.M. Pustulka, K. Ling, S.L. Pish, J.A. Champion, Protein Nanoparticle Charge and Hydrophobicity Govern Protein Corona and Macrophage Uptake, *ACS Appl Mater Interfaces* 12(43) (2020) 48284-48295.
- [35] 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(12) (2019) 1084-1087.
- [36] L. Miao, J. Lin, Y. Huang, L. Li, D. Delcassian, Y. Ge, Y. Shi, D.G. Anderson, Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver, *Nat Commun* 11(1) (2020) 2424.
- [37] Q. Cheng, T. Wei, L. Farbiak, L.T. Johnson, S.A. Dilliard, D.J. Siegwart, Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing, *Nat Nanotechnol* 15(4) (2020) 313-320.
- [38] S.A. Dilliard, Q. Cheng, D.J. Siegwart, On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(52) (2021).
- [39] M. Qiu, Y. Tang, J. Chen, R. Murph, Z. Ye, C. Huang, J. Evans, E.P. Henske, Q. Xu, Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioleiomyomatosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(8) (2022).
- [40] S.A. Dilliard, Y. Sun, M.O. Brown, Y.C. Sung, S. Chatterjee, L. Farbiak, A. Vaidya, X. Lian, X. Wang, A. Lemoff, D.J. Siegwart, The interplay of quaternary ammonium lipid structure and protein corona on lung-specific mRNA delivery by selective organ targeting (SORT) nanoparticles, *J Control Release* 361 (2023) 361-372.
- [41] E. Papini, R. Tavano, F. Mancin, Opsonins and Dysopsonins of Nanoparticles: Facts, Concepts, and Methodological Guidelines, *Front Immunol* 11 (2020) 567365.
- [42] V.P. Vu, G.B. Gifford, F. Chen, H. Benasutti, G. Wang, E.V. Groman, R. Scheinman, L. Saba, S.M. Moghimi, D. Simberg, Immunoglobulin deposition on biomolecule corona determines complement opsonization efficiency of preclinical and clinical nanoparticles, *Nat Nanotechnol* 14(3) (2019) 260-268.
- [43] L. Shen, S. Tenzer, W. Storck, D. Hobernik, V.K. Raker, K. Fischer, S. Decker, A. Dzionek, S. Krauthäuser, M. Diken, A. Nikolaev, J. Maxeiner, P. Schuster, C. Kappel, A. Verschoor, H. Schild, S. Grabbe, M. Bros, Protein corona-mediated targeting of nanocarriers to B cells allows redirection of allergic immune responses, *J Allergy Clin Immunol* 142(5) (2018) 1558-1570.
- [44] S. Kimura, I.A. Khalil, Y.H.A. Elewa, H. Harashima, Novel lipid combination for delivery of plasmid DNA to immune cells in the spleen, *J Control Release* 330 (2021) 753-764.
- [45] S. Li, M. Li, S. Huo, Q. Wang, J. Chen, S. Ding, Z. Zeng, W. Zhou, Y. Wang, J. Wang,

Voluntary-Opsonization-Enabled Precision Nanomedicines for Inflammation Treatment, *Adv Mater* 33(3) (2021) e2006160.

[46] J. Popovitz, R. Sharma, R. Hoshyar, B. Soo Kim, N. Murthy, K. Lee, Gene editing therapeutics based on mRNA delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 200 (2023) 115026.

[47] P.J.L. Schürmann, S.P.E. van Breda Vriesman, J.A. Castro-Alpizar, S.A.A. Kooijmans, E.E.S. Nieuwenhuis, R.M. Schiffelers, S.A. Fuchs, Therapeutic Application of mRNA for Genetic Diseases, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 17(3) (2025) e70019.

[48] M. Schlich, R. Palomba, G. Costabile, S. Mizrahy, M. Pannuzzo, D. Peer, P. Decuzzi, Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles, *Bioeng Transl Med* 6(2) (2021) e10213.

[49] Z. Liu, S. Wang, C. Tapeinos, G. Torrieri, V. Känkänen, N. El-Sayed, A. Python, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Non-viral nanoparticles for RNA interference: Principles of design and practical guidelines, *Adv Drug Deliv Rev* 174 (2021) 576-612.

[50] J. Huotari, A. Helenius, Endosome maturation, *Embo j* 30(17) (2011) 3481-500.

[51] X. Han, H. Zhang, K. Butowska, K.L. Swingle, M.G. Alameh, D. Weissman, M.J. Mitchell, An ionizable lipid toolbox for RNA delivery, *Nat Commun* 12(1) (2021) 7233.

[52] J. Philipp, A. Dabkowska, A. Reiser, K. Frank, R. Krzysztoń, C. Brummer, B. Nickel, C.E. Blanchet, A. Sudarsan, M. Ibrahim, S. Johansson, P. Skantze, U. Skantze, S. Östman, M. Johansson, N. Henderson, K. Elvevold, B. Smedsrød, N. Schwierz, L. Lindfors, J.O. Rädler, pH-dependent structural transitions in cationic ionizable lipid mesophases are critical for lipid nanoparticle function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 120(50) (2023) e2310491120.

[53] S. Chatterjee, E. Kon, P. Sharma, D. Peer, Endosomal escape: A bottleneck for LNP-mediated therapeutics, *Proc Natl Acad Sci U S A* 121(11) (2024) e2307800120.

[54] T.S. Zimmermann, A.C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M.N. Fedoruk, J. Harborth, J.A. Heyes, L.B. Jeffs, M. John, A.D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L.V. Nechev, L.R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A.J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H.P. Vornlocher, I. MacLachlan, RNAi-mediated gene silencing in non-human primates, *Nature* 441(7089) (2006) 111-4.

[55] J. Heyes, L. Palmer, K. Bremner, I. MacLachlan, Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids, *J Control Release* 107(2) (2005) 276-87.

[56] S.C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A.P. Sandhu, B.L. Mui, C.K. Cho, D.W. Sah, D. Stebbing, E.J. Crosley, E. Yaworski, I.M. Hafez, J.R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K.G. Rajeev, K.F. Wong, L.B. Jeffs, L. Nechev, M.L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M.A. Maier, M. Srinivasulu, M.J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S.A. Barros, S. De, S.K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W.L. Cantley, Y.K. Tam, M. Manoharan, M.A. Ciufolini, M.A. Tracy, A. de Fougères, I. MacLachlan, P.R. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, *Nat*

Biotechnol 28(2) (2010) 172-6.

- [57] M. Jayaraman, S.M. Ansell, B.L. Mui, Y.K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J.K. Narayanannair, K.G. Rajeev, I.M. Hafez, A. Akinc, M.A. Maier, M.A. Tracy, P.R. Cullis, T.D. Madden, M. Manoharan, M.J. Hope, Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo, *Angew Chem Int Ed Engl* 51(34) (2012) 8529-33.
- [58] S.M. Hoy, Patisiran: First Global Approval, *Drugs* 78(15) (2018) 1625-1631.
- [59] P. Paramasivam, C. Franke, M. Stöter, A. Höijer, S. Bartesaghi, A. Sabirsh, L. Lindfors, M.Y. Arteta, A. Dahlén, A. Bak, S. Andersson, Y. Kalaidzidis, M. Bickle, M. Zerial, Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale, *J Cell Biol* 221(2) (2022).
- [60] M.F. Brown, Curvature forces in membrane lipid-protein interactions, *Biochemistry* 51(49) (2012) 9782-95.
- [61] M. Klacsová, A. Bóta, P. Balgavý, DOPC-DOPE composition dependent $L\alpha$ -HII thermotropic phase transition: SAXD study, *Chem Phys Lipids* 198 (2016) 46-50.
- [62] J.M. Seddon, R.H. Templer, N.A. Warrender, Z. Huang, G. Cevc, D. Marsh, Phosphatidylcholine-fatty acid membranes: effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal (H(II)) phases, *Biochim Biophys Acta* 1327(1) (1997) 131-47.
- [63] J.M. Johansson, H. Du Rietz, H. Hedlund, H.C. Eriksson, E. Oude Blenke, A. Pote, S. Harun, P. Nordenfelt, L. Lindfors, A. Wittrup, Cellular and biophysical barriers to lipid nanoparticle mediated delivery of RNA to the cytosol, *Nat Commun* 16(1) (2025) 5354.
- [64] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Koteliansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier, M. Zerial, Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape, *Nat Biotechnol* 31(7) (2013) 638-46.
- [65] C.P. Tilcock, P.R. Cullis, The polymorphic phase behaviour of mixed phosphatidylserine-phosphatidylethanolamine model systems as detected by ^{31}P -NMR, *Biochim Biophys Acta* 641(1) (1981) 189-201.
- [66] S. Liu, Q. Cheng, T. Wei, X. Yu, L.T. Johnson, L. Farbiak, D.J. Siegwart, Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing, *Nat Mater* 20(5) (2021) 701-710.
- [67] Y. Sato, K. Hashiba, K. Sasaki, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo, *J Control Release* 295 (2019) 140-152.

- [68] S. Sabnis, E.S. Kumarasinghe, T. Salerno, C. Mihai, T. Ketova, J.J. Senn, A. Lynn, A. Bulychev, I. McFadyen, J. Chan, Ö. Almarsson, M.G. Stanton, K.E. Benenato, A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates, *Mol Ther* 26(6) (2018) 1509-1519.
- [69] R. Zhang, R. El-Mayta, T.J. Murdoch, C.C. Warzecha, M.M. Billingsley, S.J. Shepherd, N. Gong, L. Wang, J.M. Wilson, D. Lee, M.J. Mitchell, Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver, *Biomater Sci* 9(4) (2021) 1449-1463.
- [70] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA, *Nanoscale* 11(45) (2019) 21733-21739.
- [71] N. Chander, G. Basha, M.H. Yan Cheng, D. Witzigmann, P.R. Cullis, Lipid nanoparticle mRNA systems containing high levels of sphingomyelin engender higher protein expression in hepatic and extra-hepatic tissues, *Mol Ther Methods Clin Dev* 30 (2023) 235-245.
- [72] T. Shimanouchi, M. Sasaki, A. Hiroiwa, N. Yoshimoto, K. Miyagawa, H. Umakoshi, R. Kuboi, Relationship between the mobility of phosphocholine headgroups of liposomes and the hydrophobicity at the membrane interface: a characterization with spectrophotometric measurements, *Colloids Surf B Biointerfaces* 88(1) (2011) 221-30.
- [73] G.C.N. Thakur, A. Uday, P. Jurkiewicz, FRET-GP - A Local Measure of the Impact of Transmembrane Peptide on Lipids, *Langmuir* 39(50) (2023) 18390-18402.
- [74] D. Carradori, A.G. Dos Santos, J. Masquelier, A. Paquot, P. Saulnier, J. Eyer, V. Pr  at, G.G. Muccioli, M.P. Mingeot-Leclercq, A. des Rieux, The origin of neural stem cells impacts their interactions with targeted-lipid nanocapsules: Potential role of plasma membrane lipid composition and fluidity, *J Control Release* 292 (2018) 248-255.
- [75] A.P. Demchenko, Y. M  ly, G. Duportail, A.S. Klymchenko, Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes, *Biophys J* 96(9) (2009) 3461-70.
- [76] G. Chwastek, E.P. Petrov, J.P. S  enz, A Method for High-Throughput Measurements of Viscosity in Sub-micrometer-Sized Membrane Systems, *Chembiochem* 21(6) (2020) 836-844.
- [77] S. McColman, R. Li, S. Osman, A. Bishop, K.P. Wilkie, D.T. Cramb, Serum proteins on nanoparticles: early stages of the "protein corona", *Nanoscale* 13(48) (2021) 20550-20563.
- [78] M. Dolci, Y. Wang, S.W. Nooteboom, P.E.D. Soto Rodriguez, S. S  nchez, L. Albertazzi, P. Zijlstra, Real-Time Optical Tracking of Protein Corona Formation on Single Nanoparticles in Serum, *ACS Nano* 17(20) (2023) 20167-20178.
- [79] M.J. Hajipour, R. Safavi-Sohi, S. Sharifi, N. Mahmoud, A.A. Ashkarran, E. Voke, V. Serpooshan, M. Ramezankhani, A.S. Milani, M.P. Landry, M. Mahmoudi, An Overview of Nanoparticle Protein Corona Literature, *Small* 19(36) (2023) e2301838.

- [80] S. Schöttler, K. Klein, K. Landfester, V. Mailänder, Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake, *Nanoscale* 8(10) (2016) 5526-36.
- [81] L.E. González-García, M.N. MacGregor, R.M. Visalakshan, A. Lazarian, A.A. Cavallaro, S. Morsbach, A. Mierczynska-Vasilev, V. Mailänder, K. Landfester, K. Vasilev, Nanoparticles Surface Chemistry Influence on Protein Corona Composition and Inflammatory Responses, *Nanomaterials* (Basel) 12(4) (2022).
- [82] D. Song, Y. Zhao, Z. Wang, Q. Xu, Tuning Lipid Nanoparticles for RNA Delivery to Extrahepatic Organs, *Adv Mater* 36(44) (2024) e2401445.
- [83] J.B. Simonsen, R. Münter, Pay Attention to Biological Nanoparticles when Studying the Protein Corona on Nanomedicines, *Angew Chem Int Ed Engl* 59(31) (2020) 12584-12588.
- [84] E. Voke, M. Arral, H.J. Squire, T.J. Lin, R. Coreas, A. Lui, A.T. Iavarone, R.L. Pinals, K.A. Whitehead, M. Landry, Protein corona formed on lipid nanoparticles compromises delivery efficiency of mRNA cargo, *bioRxiv* (2025).
- [85] R. Wubbolts, R.S. Leckie, P.T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Möbius, J. Hoernschemeyer, J.W. Slot, H.J. Geuze, W. Stoorvogel, Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation, *J Biol Chem* 278(13) (2003) 10963-72.
- [86] H. Tang, Y. Zhang, T. Yang, C. Wang, Y. Zhu, L. Qiu, J. Liu, Y. Song, L. Zhou, J. Zhang, Y.K. Wong, Y. Liu, C. Xu, H. Wang, J. Wang, Cholesterol modulates the physiological response to nanoparticles by changing the composition of protein corona, *Nat Nanotechnol* 18(9) (2023) 1067-1077.
- [87] D. Faizullin, Y. Valiullina, V. Salnikov, Y. Zuev, Direct interaction of fibrinogen with lipid microparticles modulates clotting kinetics and clot structure, *Nanomedicine* 23 (2020) 102098.
- [88] L. Zhang, B. Casey, D.K. Galanakis, C. Marmorat, S. Skoog, K. Vorvolakos, M. Simon, M.H. Rafailovich, The influence of surface chemistry on adsorbed fibrinogen conformation, orientation, fiber formation and platelet adhesion, *Acta Biomater* 54 (2017) 164-174.
- [89] M.W. Turner, The role of mannose-binding lectin in health and disease, *Mol Immunol* 40(7) (2003) 423-9.
- [90] Y. Endo, N. Nakazawa, D. Iwaki, M. Takahashi, M. Matsushita, T. Fujita, Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway, *J Innate Immun* 2(1) (2010) 33-42.
- [91] K.E. Sullivan, The yin and the yang of early classical pathway complement disorders, *Clin Exp Immunol* 209(2) (2022) 151-160.
- [92] J.G. Cyster, B cell follicles and antigen encounters of the third kind, *Nat Immunol* 11(11) (2010) 989-96.

- [93] S. Pillai, A. Cariappa, The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision, *Nat Rev Immunol* 9(11) (2009) 767-77.
- [94] D. Allman, S. Pillai, Peripheral B cell subsets, *Curr Opin Immunol* 20(2) (2008) 149-57.
- [95] M. Yanez Arteta, T. Kjellman, S. Bartesaghi, S. Wallin, X. Wu, A.J. Kvist, A. Dabkowska, N. Székely, A. Radulescu, J. Bergenholtz, L. Lindfors, Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(15) (2018) E3351-e3360.
- [96] F. Sebastiani, M. Yanez Arteta, M. Lerche, L. Porcar, C. Lang, R.A. Bragg, C.S. Elmore, V.R. Krishnamurthy, R.A. Russell, T. Darwish, H. Pichler, S. Waldie, M. Moulin, M. Haertlein, V.T. Forsyth, L. Lindfors, M. Cárdenas, Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles, *ACS Nano* 15(4) (2021) 6709-6722.
- [97] N. Watanabe, K. Suga, J.P. Slotte, T.K.M. Nyholm, H. Umakoshi, Lipid-Surrounding Water Molecules Probed by Time-Resolved Emission Spectra of Laurdan, *Langmuir* 35(20) (2019) 6762-6770.
- [98] H. Saito, T. Minamida, I. Arimoto, T. Handa, K. Miyajima, Physical states of surface and core lipids in lipid emulsions and apolipoprotein binding to the emulsion surface, *J Biol Chem* 271(26) (1996) 15515-20.
- [99] F. Sebastiani, M. Yanez Arteta, L. Lindfors, M. Cárdenas, Screening of the binding affinity of serum proteins to lipid nanoparticles in a cell free environment, *J Colloid Interface Sci* 610 (2022) 766-774.
- [100] M.L. Chiu, D.R. Goulet, A. Teplyakov, G.L. Gilliland, Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics, *Antibodies (Basel)* 8(4) (2019).
- [101] D. Prozeller, C. Rosenauer, S. Morsbach, K. Landfester, Immunoglobulins on the surface of differently charged polymer nanoparticles, *Biointerphases* 15(3) (2020) 031009.
- [102] H. Lopez, V. Lobaskin, Coarse-grained model of adsorption of blood plasma proteins onto nanoparticles, *J Chem Phys* 143(24) (2015) 243138.
- [103] G. Wang, J.I. Griffin, S. Inturi, B. Brenneman, N.K. Banda, V.M. Holers, S.M. Moghimi, D. Simberg, In Vitro and In Vivo Differences in Murine Third Complement Component (C3) Opsonization and Macrophage/Leukocyte Responses to Antibody-Functionalized Iron Oxide Nanoworms, *Front Immunol* 8 (2017) 151.
- [104] C. Rodriguez-Quijada, H. de Puig, M. Sánchez-Purrà, C. Yelleswarapu, J.J. Evans, J.P. Celli, K. Hamad-Schifferli, Protease Degradation of Protein Coronas and Its Impact on Cancer Cells and Drug Payload Release, *ACS Appl Mater Interfaces* 11(16) (2019) 14588-14596.
- [105] A. Yildirim, E. Ozgur, M. Bayindir, Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption, *J Mater Chem B* 1(14) (2013) 1909-1920.

- [106] J. Müller, D. Prozeller, A. Ghazaryan, M. Kokkinopoulou, V. Mailänder, S. Morsbach, K. Landfester, Beyond the protein corona - lipids matter for biological response of nanocarriers, *Acta Biomater* 71 (2018) 420-431.
- [107] J. Simon, G. Kuhn, M. Fichter, S. Gehring, K. Landfester, V. Mailänder, Unraveling the In Vivo Protein Corona, *Cells* 10(1) (2021).
- [108] L. Digiacomio, S. Palchetti, F. Giulimondi, D. Pozzi, R. Zenezini Chiozzi, A.L. Capriotti, A. Laganà, G. Caracciolo, The biomolecular corona of gold nanoparticles in a controlled microfluidic environment, *Lab Chip* 19(15) (2019) 2557-2567.
- [109] A.M. Belkin, G. Tsurupa, E. Zemskov, Y. Veklich, J.W. Weisel, L. Medved, Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling, *Blood* 105(9) (2005) 3561-8.
- [110] S. Omo-Lamai, M.E. Zamora, M.N. Patel, J. Wu, J. Nong, Z. Wang, A. Peshkova, A. Majumder, J.R. Melamed, L.S. Chase, E.O. Essien, D. Weissman, V.R. Muzykantov, O.A. Marcos-Contreras, J.W. Myerson, J.S. Brenner, Physicochemical Targeting of Lipid Nanoparticles to the Lungs Induces Clotting: Mechanisms and Solutions, *Adv Mater* (2024) e2312026.
- [111] U. Sahin, P. Oehm, E. Derhovanessian, R.A. Jabulowsky, M. Vormehr, M. Gold, D. Maurus, D. Schwarck-Kokarakis, A.N. Kuhn, T. Omokoko, L.M. Kranz, M. Diken, S. Kreiter, H. Haas, S. Attig, R. Rae, K. Cuk, A. Kemmer-Brück, A. Breitzkreuz, C. Tolliver, J. Caspar, J. Quinkhardt, L. Hebich, M. Stein, A. Hohberger, I. Vogler, I. Liebig, S. Renken, J. Sikorski, M. Leierer, V. Müller, H. Mitzel-Rink, M. Miederer, C. Huber, S. Grabbe, J. Utikal, A. Pinter, R. Kaufmann, J.C. Hassel, C. Loquai, Ö. Türeci, An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma, *Nature* 585(7823) (2020) 107-112.
- [112] W. Chen, Y. Zhu, J. He, X. Sun, Path towards mRNA delivery for cancer immunotherapy from bench to bedside, *Theranostics* 14(1) (2024) 96-115.
- [113] D.W. Wolfson, N.K. Kim, K.H. Lee, J.P. Beyersdorf, J.J. Langberg, N. Fernandez, D. Choi, N. Zureick, T.Y. Kim, S. Bae, J.M. Gu, J.L. Kirschman, J. Fan, C.Y. Sheng, D. Gottlieb Sen, B. Mettler, J.H. Sung, Y.S. Yoon, S.J. Park, P.J. Santangelo, H.C. Cho, Transient pacing in pigs with complete heart block via myocardial injection of mRNA coding for the T-box transcription factor 18, *Nat Biomed Eng* 8(9) (2024) 1124-1141.
- [114] D.J. Williams, H.L. Puhl, S.R. Ikeda, A Simple, Highly Efficient Method for Heterologous Expression in Mammalian Primary Neurons Using Cationic Lipid-mediated mRNA Transfection, *Front Neurosci* 4 (2010) 181.
- [115] S.N. Patmanathan, L.F. Yap, P.G. Murray, I.C. Paterson, The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod, *J Cell Mol Med* 19(10) (2015) 2329-40.
- [116] G. Cinamon, M.A. Zachariah, O.M. Lam, F.W. Foss, Jr., J.G. Cyster, Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport, *Nat Immunol* 9(1) (2008) 54-62.

- [117] G. Cinamon, M. Matloubian, M.J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R.L. Proia, J.G. Cyster, Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone, *Nat Immunol* 5(7) (2004) 713-20.
- [118] T.I. Näslund, U. Gehrman, K.R. Qazi, M.C. Karlsson, S. Gabrielsson, Dendritic cell-derived exosomes need to activate both T and B cells to induce antitumor immunity, *J Immunol* 190(6) (2013) 2712-9.
- [119] C. Voutouri, L.L. Munn, T. Stylianopoulos, R.K. Jain, Biomarkers of mRNA vaccine efficacy derived from mechanistic modeling of tumor-immune interactions, *PLoS Comput Biol* 21(6) (2025) e1013163.
- [120] C.L. Lorentzen, J.B. Haanen, Ö. Met, I.M. Svane, Clinical advances and ongoing trials on mRNA vaccines for cancer treatment, *Lancet Oncol* 23(10) (2022) e450-e458.
- [121] M.B. Bloom, D. Perry-Lalley, P.F. Robbins, Y. Li, M. el-Gamil, S.A. Rosenberg, J.C. Yang, Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma, *J Exp Med* 185(3) (1997) 453-9.
- [122] S. Kreiter, A. Selmi, M. Diken, M. Sebastian, P. Osterloh, H. Schild, C. Huber, O. Türeci, U. Sahin, Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals, *J Immunol* 180(1) (2008) 309-18.
- [123] X. Wen, K. Wen, D. Cao, G. Li, R.W. Jones, J. Li, S. Szu, Y. Hoshino, L. Yuan, Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4(+) T cell epitope P2 significantly enhanced the immunogenicity of recombinant rotavirus Δ VP8* subunit parenteral vaccines, *Vaccine* 32(35) (2014) 4420-4427.
- [124] D.M. Mauger, B.J. Cabral, V. Presnyak, S.V. Su, D.W. Reid, B. Goodman, K. Link, N. Khatwani, J. Reynders, M.J. Moore, I.J. McFadyen, mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life, *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(48) (2019) 24075-24083.
- [125] H. Moradian, T. Roch, L. Anthofer, A. Lendlein, M. Gossen, Chemical modification of uridine modulates mRNA-mediated proinflammatory and antiviral response in primary human macrophages, *Mol Ther Nucleic Acids* 27 (2022) 854-869.
- [126] N. Pardi, M.J. Hogan, F.W. Porter, D. Weissman, mRNA vaccines - a new era in vaccinology, *Nat Rev Drug Discov* 17(4) (2018) 261-279.
- [127] Y.G. Chen, S. Hur, Cellular origins of dsRNA, their recognition and consequences, *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(4) (2022) 286-301.
- [128] J. Nelson, E.W. Sorensen, S. Mintri, A.E. Rabideau, W. Zheng, G. Besin, N. Khatwani, S.V. Su, E.J. Miracco, W.J. Issa, S. Hoge, M.G. Stanton, J.L. Joyal, Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation, *Sci Adv* 6(26) (2020) eaaz6893.
- [129] C. Sittplangkoon, M.G. Alameh, D. Weissman, P.J.C. Lin, Y.K. Tam, E. Prompetchara, T. Palaga, mRNA vaccine with unmodified uridine induces robust type I interferon-dependent anti-tumor immunity in a melanoma model, *Front Immunol* 13 (2022) 983000.

- [130] C. Murray, W. Griffin É, E. O'Loughlin, A. Lyons, E. Sherwin, S. Ahmed, N.J. Stevenson, A. Harkin, C. Cunningham, Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C, *Brain Behav Immun* 48 (2015) 274-86.
- [131] S. Alhumaid, A. Al Mutair, A.A. Rabaan, A.L. FM, O.P. Choudhary, S.J. Yong, F. Nainu, A. Khan, J. Muhammad, F. Alhelal, M.H. Al Khamees, H.A. Alsouaib, A.S. Al Majhad, H.R. Al-Tarfi, A.L. AH, Y.Y. Alatiyyah, A.A. Alsultan, M.E. Alessa, M.A. Alissa, E.H. Alsayegh, H.N. Alshakhs, H.A. Al Samaeel, R.A. AlShayeb, D.A. Alnami, H.A. Alhassan, A.A. Alabdullah, A.H. Alhmed, F.H. AlDera, K. Hajissa, J.A. Al-Tawfiq, A. Al-Omari, New-onset and relapsed liver diseases following COVID-19 vaccination: a systematic review, *BMC Gastroenterol* 22(1) (2022) 433.
- [132] C. Efe, A.V. Kulkarni, B. Terziroli Beretta-Piccoli, B. Magro, A. Stättermayer, M. Cengiz, D. Clayton-Chubb, C. Lammert, C. Bernsmeier, Ö. Gül, F.H. la Tijera, M. Anders, E. Lytvyak, M. Akın, T. Purnak, R. Liberal, M. Peralta, B. Ebik, S. Duman, N. Demir, Y. Balaban, Á. Urzua, F. Contreras, M.G. Venturelli, Y. Bilgiç, A. Medina, M. Giralá, F. Günşar, M.C. Londoño, T. Androutsakos, A. Kisch, A. Yurci, F. Güzelbulut, Y.F. Çağın, E. Avcı, M. Akyıldız, E.K. Dindar-Demiray, M. Harputluoğlu, R. Kumar, S.K. Satapathy, M. Mendizabal, M. Silva, S. Fagiuoli, S.K. Roberts, N.K. Soylu, R. Idilman, E.M. Yoshida, A.J. Montano-Loza, G.N. Dalekos, E. Ridruejo, T.D. Schiano, S. Wahlin, Liver injury after SARS-CoV-2 vaccination: Features of immune-mediated hepatitis, role of corticosteroid therapy and outcome, *Hepatology* 76(6) (2022) 1576-1586.
- [133] C.H. Kim, Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis, *J Blood Med* 1 (2010) 13-9.
- [134] E. Ylösmäki, C. Malorzo, C. Capasso, O. Honkasalo, M. Fusciello, B. Martins, L. Ylösmäki, A. Louna, S. Feola, H. Paavilainen, K. Peltonen, V. Hukkanen, T. Viitala, V. Cerullo, Personalized Cancer Vaccine Platform for Clinically Relevant Oncolytic Enveloped Viruses, *Mol Ther* 26(9) (2018) 2315-2325.
- [135] H. Shen, A.L. Ackerman, V. Cody, A. Giodini, E.R. Hinson, P. Cresswell, R.L. Edelson, W.M. Saltzman, D.J. Hanlon, Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles, *Immunology* 117(1) (2006) 78-88.
- [136] A. Cerutti, M. Cols, I. Puga, Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes, *Nat Rev Immunol* 13(2) (2013) 118-32.
- [137] O. Garraud, G. Borhis, G. Badr, S. Degrelle, B. Pozzetto, F. Cognasse, Y. Richard, Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond, *BMC Immunol* 13 (2012) 63.
- [138] E.J. Sayers, S.E. Peel, A. Schantz, R.M. England, M. Beano, S.M. Bates, A.S. Desai, S. Puri,

- M.B. Ashford, A.T. Jones, Endocytic Profiling of Cancer Cell Models Reveals Critical Factors Influencing LNP-Mediated mRNA Delivery and Protein Expression, *Mol Ther* 27(11) (2019) 1950-1962.
- [139] C. Lin, A. Kuzmanović, N. Wang, L. Liao, S. Ernst, C. Penners, A. Jans, T. Hammor, P.B. Stach, M. Peltzer, I. Volkert, E. Zechendorf, R. Hassan, M. Myllys, C. Liedtke, A. Herrmann, G. Chakraborty, C. Trautwein, J. Hengstler, G. Müller-Newen, J. Wang, A. Ghallab, M. Bartneck, Exceptional Uptake, Limited Protein Expression: Liver Macrophages Lost in Translation of Synthetic mRNA, *Adv Sci (Weinh)* 12(9) (2025) e2409729.
- [140] C.D. Sago, M.P. Lokugamage, K. Paunovska, D.A. Vanover, C.M. Monaco, N.N. Shah, M. Gamboa Castro, S.E. Anderson, T.G. Rudoltz, G.N. Lando, P. Munnial Tiwari, J.L. Kirschman, N. Willett, Y.C. Jang, P.J. Santangelo, A.V. Bryksin, J.E. Dahlman, High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(42) (2018) E9944-e9952.
- [141] J. Fu, Y. Zhang, Y. Lv, R. Li, H. Gu, J. Yang, A Bioactive Lipid Nanoparticle Integrating Arachidonic Acid Enables High-Efficiency mRNA Delivery and Potent CAR-Macrophage Engineering, *Int J Mol Sci* 26(18) (2025).
- [142] A. Schmidt, T. Schwerd, W. Hamm, J.C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, F.S. Hoffmann, M.C. Michallet, R. Besch, K.P. Hopfner, S. Endres, S. Rothenfusser, 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29) (2009) 12067-72.
- [143] Y. Sari, S. Sousa Rosa, J. Jeffries, M.P.C. Marques, Comprehensive evaluation of T7 promoter for enhanced yield and quality in mRNA production, *Sci Rep* 14(1) (2024) 9655.
- [144] X. Mu, S. Hur, Immunogenicity of In Vitro-Transcribed RNA, *Acc Chem Res* 54(21) (2021) 4012-4023.
- [145] E.A. Thoryk, G. Swaminathan, S. Meschino, K.S. Cox, M. Gindy, D.R. Casimiro, A.J. Bett, Co-Administration of Lipid Nanoparticles and Sub-Unit Vaccine Antigens Is Required for Increase in Antigen-Specific Immune Responses in Mice, *Vaccines (Basel)* 4(4) (2016).
- [146] M.G. Alameh, I. Tombácz, E. Bettini, K. Lederer, C. Sittplangkoon, J.R. Wilmore, B.T. Gaudette, O.Y. Soliman, M. Pine, P. Hicks, T.B. Manzoni, J.J. Knox, J.L. Johnson, D. Laczkó, H. Muramatsu, B. Davis, W. Meng, A.M. Rosenfeld, S. Strohmeier, P.J.C. Lin, B.L. Mui, Y.K. Tam, K. Karikó, A. Jacquet, F. Krammer, P. Bates, M.P. Cancro, D. Weissman, E.T. Luning Prak, D. Allman, M. Locci, N. Pardi, Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses, *Immunity* 54(12) (2021) 2877-2892.e7.
- [147] J. Connors, D. Joyner, N.J. Mege, G.M. Cusimano, M.R. Bell, J. Marcy, B. Taramangalam, K.M. Kim, P.J.C. Lin, Y.K. Tam, D. Weissman, M.A. Kutzler, M.G. Alameh, E.K. Haddad, Lipid

nanoparticles (LNP) induce activation and maturation of antigen presenting cells in young and aged individuals, *Commun Biol* 6(1) (2023) 188.

[148] M. Zouali, Y. Richard, Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity, *Front Immunol* 2 (2011) 63.

[149] D. Marinkovic, T. Marinkovic, Putative role of marginal zone B cells in pathophysiological processes, *Scand J Immunol* 92(3) (2020) e12920.

[150] F. Martin, A.M. Oliver, J.F. Kearney, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens, *Immunity* 14(5) (2001) 617-29.

[151] K. Hashiba, Y. Sato, M. Taguchi, S. Sakamoto, A. Otsu, Y. Maeda, T. Shishido, M. Murakawa, A. Okazaki, H. Harashima, Branching Ionizable Lipids Can Enhance the Stability, Fusogenicity, and Functional Delivery of mRNA, *Small Science* 3(1) (2023).

[152] A. Hashiba, M. Toyooka, Y. Sato, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, The use of design of experiments with multiple responses to determine optimal formulations for in vivo hepatic mRNA delivery, *J Control Release* 327 (2020) 467-476.

[153] A. Vasudevan, A. Jozić, A.G. Curtis, E. Bodi, R.C. Ryals, G. Sahay, Lipid nanoparticle-mediated intracameral mRNA delivery facilitates gene expression and editing in the anterior chamber of the eye, *J Control Release* 379 (2025) 1022-1028.

[154] J.D. Finn, A.R. Smith, M.C. Patel, L. Shaw, M.R. Youniss, J. van Heteren, T. Dirstine, C. Ciullo, R. Lescarbeau, J. Seitzer, R.R. Shah, A. Shah, D. Ling, J. Growe, M. Pink, E. Rohde, K.M. Wood, W.E. Salomon, W.F. Harrington, C. Dombrowski, W.R. Strapps, Y. Chang, D.V. Morrissey, A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing, *Cell Rep* 22(9) (2018) 2227-2235.

[155] J.D. Gillmore, E. Gane, J. Täubel, B. Pilebro, A. Echaniz-Laguna, J. Kao, W. Litchy, S. Shahda, A. Haagenzen, L. Walsh, D. Smith, J. Kachadourian, J.H. Ward, D. Lebowhl, P. Zhu, Y. Xu, A. Leung, A. Sonderfan, D.E. Gutstein, G. Manvelian, D. Adams, Nexiguran Ziclumeran Gene Editing in Hereditary ATTR with Polyneuropathy, *N Engl J Med* 393(14) (2025) 1375-1386.

[156] D.R. Schoenberg, L.E. Maquat, Regulation of cytoplasmic mRNA decay, *Nat Rev Genet* 13(4) (2012) 246-59.

[157] A. Yamashita, T.C. Chang, Y. Yamashita, W. Zhu, Z. Zhong, C.Y. Chen, A.B. Shyu, Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover, *Nat Struct Mol Biol* 12(12) (2005) 1054-63.

[158] B.L. Mui, Y.K. Tam, M. Jayaraman, S.M. Ansell, X. Du, Y.Y. Tam, P.J. Lin, S. Chen, J.K. Narayanannair, K.G. Rajeev, M. Manoharan, A. Akinc, M.A. Maier, P. Cullis, T.D. Madden, M.J. Hope, Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles, *Mol Ther Nucleic Acids* 2(12) (2013) e139.

- [159] L. Zheng, S.R. Bandara, Z. Tan, C. Leal, Lipid nanoparticle topology regulates endosomal escape and delivery of RNA to the cytoplasm, *Proc Natl Acad Sci U S A* 120(27) (2023) e2301067120.
- [160] Y. Mo, M.H.Y. Cheng, A. D'Elia, K. Doran, L. Ding, J. Chen, P.R. Cullis, G. Zheng, Light-Activated siRNA Endosomal Release (LASER) by Porphyrin Lipid Nanoparticles, *ACS Nano* 17(5) (2023) 4688-4703.
- [161] M.A. Beach, S.L.Y. Teo, M.Z. Chen, S.A. Smith, C.W. Pouton, A.P.R. Johnston, G.K. Such, Quantifying the Endosomal Escape of pH-Responsive Nanoparticles Using the Split Luciferase Endosomal Escape Quantification Assay, *ACS Appl Mater Interfaces* 14(3) (2022) 3653-3661.
- [162] T. Avsievich, A. Popov, A. Bykov, I. Meglinski, Mutual interaction of red blood cells influenced by nanoparticles, *Sci Rep* 9(1) (2019) 5147.
- [163] L.Q. Chen, L. Fang, J. Ling, C.Z. Ding, B. Kang, C.Z. Huang, Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity, *Chem Res Toxicol* 28(3) (2015) 501-9.
- [164] J. Simak, S. De Paoli, The effects of nanomaterials on blood coagulation in hemostasis and thrombosis, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 9(5) (2017).
- [165] C.F. Jones, R.A. Campbell, Z. Franks, C.C. Gibson, G. Thiagarajan, A. Vieira-de-Abreu, S. Sukavaneshvar, S.F. Mohammad, D.Y. Li, H. Ghandehari, A.S. Weyrich, B.D. Brooks, D.W. Grainger, Cationic PAMAM dendrimers disrupt key platelet functions, *Mol Pharm* 9(6) (2012) 1599-611.
- [166] V. Rungelrath, S.D. Kobayashi, F.R. DeLeo, Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches, *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 12(1) (2020) e1458.