



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称: 博士(臨床薬学) 氏名 鈴木 裕 一

学位論文題名

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

脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle : LNP) は mRNA の送達技術として汎用され、近年では、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する mRNA ワクチン製剤として採用されている。mRNA ベースのワクチン製剤は感染症の蔓延防止だけでなく、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。このように、mRNA-LNP は医療応用が進められているが、有効性および安全性のさらなる向上を実現するためには、非標的組織である肝臓への mRNA 集積を回避し、多様な免疫細胞が存在する脾臓へ細胞レベルで標的化することに加え、標的細胞への mRNA 送達効率を向上することが不可欠である。LNP 標的化の課題に対して、近年では、全身投与により LNP 表面へ吸着する生体分子コロナに着目した移行制御が試みられており、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。しかしながら、承認 LNP に採用されるイオン化脂質の化学構造は自由度が低く、脂質構造と LNP の物性との関連性に着目した LNP 製剤の検討ができていない。一方で、細胞内への mRNA 送達効率の向上に対しては、LNP のエンドソーム膜との融合を促進するために、生体膜の安定化に寄与する phosphatidylcholine (PC) 系リン脂質との相互作用を積極的に誘発する新規ヘルパー脂質の開発が先行している。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、細胞内への mRNA 送達効率の向上のための LNP 設計の指針となり得る。また、系統的な脂質構造の探索を行うために、化学構造の自由度が高く、広範な構造展開が可能な脂質骨格を考える必要がある。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。TOT 骨格はトリスをリンカーとして、疎水性足場に 3 本のオレオイル基が導入される。機能的な親水性頭部を導入する TOT 脂質は、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。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。

まず、脂質頭部に第 3 級アミン構造を有する ionizable TOT (iTOT) を合成し、イオン化脂質として含有する LNP 製剤において、肝外臓器の細胞レベルでの標的を示す脂質組成を探索した。iTOT を含む LNP 製剤に firefly luciferase (Fluc) をコードした mRNA (mFluc) を内封し、マウス投与後の各臓器におけるルシフェラーゼ発現量を測定し、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、iTOT のうち最も 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ることが分かった。また、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。続いて、両製剤に形成する生体分子コロナのタンパク質組成を解析すると、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 apolipoprotein E 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 mannan binding lectin (MBL)、補体 C3 あるいはその分解産物へと置き換わり、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唆された。そこで、CD21/35 を阻害したところ B 細胞での LNP 取り込みが低下し、15%DSPC は補体-補体受容体を介して細胞内に取り込まれると示された。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。

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。最も標準的な標的は樹状細胞であると認識され、樹状細胞を標的とする RNA-Lipoplex (RNA-LPX) 製剤は mRNA ベースのがんワクチン製剤として臨床研究が行われている。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。APC として知られる MZB 細胞は、mRNA ワクチンの有望な標的として期待されている。そこで、モデル抗原 Ovalbumin (OVA) をコードした mRNA (mOVA) を内封した 15%DSPC の MZB 細胞を標的とするがんワクチン製剤としての応用を検証した。mOVA を搭載した 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 を介した抗原発現が認められ、細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte : CTL) の応答に起因する細胞障害が誘導された。また、mOVA を搭載した 15%DSPC を投与し、免疫誘導したマウスから単離された脾細胞、B 細胞、MZB 細胞をナイーブマウスへ移植したところ、MZB 細胞移植群で CTL 応答の抗原特異的な誘導が認められた。このことから、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、担癌モデルマウスに対し、mOVA を搭載した LNP 製剤を投与したところ、15%DSPC は抗原特異的な腫瘍体積の抑制効果を認め、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 標的 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。mFluc を搭載した LNP を筋肉内投与したところ、15%DSPC は COVID-19 の mRNA ワクチンを模倣した LNP 製剤と比べて、肝臓において著しく低い遺伝子発現を示した。続いて、mOVA を内封した LNP 製剤を投与したところ、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 送達が著しく回避された 15%DSPC では、そのような肝毒性は認められなかった。また、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。

続いて、脂質頭部に 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、zTOT を含有した LNP 製剤の細胞内への mRNA 送達の向上を検証した。ヘルパー脂質として従来使用されてきた 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た。特に、TOT-15 を含有する LNP は DSPC よりも遺伝子発現が約 5 倍高くなり、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、先行研究よりも高い遺伝子発現を示した。また、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によっても、TOT-15 を含有する LNP により遺伝子発現が向上した。さらに、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。加えて、TOT-15 による生体膜との相互作用を検証した。安定なラメラ構造をとる生体膜を構成する PC 系リン脂質と 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、等方性の構造をとることが示された。また、LNP による赤血球の破壊に由来した溶血を評価したところ、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生体膜の破壊を示した。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、ヘルパー脂質として TOT-15 を使用することで、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る。