

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05052

研究課題名(和文) In vivoゲノム編集による肝疾患治療の実現を目指した脂質ナノ粒子の創生

研究課題名(英文) Development of lipid nanoparticles for treatment of hepatic diseases by in vivo genome editing

研究代表者

佐藤 悠介 (Sato, Yusuke)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10735624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集は任意の遺伝子の破壊、修復および挿入等を可能とする技術であり、多様な遺伝性疾患に対する根本的な治療法になりうる。医療応用にはゲノム編集因子の効率的な送達技術の開発が重要である。本研究では、CRISPR-Casタンパク質-gRNA複合体を効率的に送達可能な脂質ナノ粒子を開発した。実用化の観点から、シームレスな製造スケールアップが可能なマイクロ流体デバイスによる連続製造法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ流体デバイスによるゲノム編集因子搭載脂質ナノ粒子の連続製造法を世界に先駆けて見出すことに成功した。マイクロ流体デバイスはシームレスな製造スケールアップが可能であることから、核酸ナノ医薬品開発に広く応用されているが、核酸分子と比較して物理化学的に不安定なタンパク質のナノ製剤化へ応用できることを示したことは今後の高分子搭載ナノ粒子製剤開発における意義は大きい。また、製剤最適化により競合技術よりも圧倒的に高い効率で遺伝子ノックアウトを誘導可能な脂質ナノ粒子製剤の同定に成功した。最適化の過程で得られた重要因子に関する情報は今後の製剤開発における指針となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome editing is a biotechnology that can disrupt, repair and insert genes of interest and can be applied for fundamental treatment of various hereditary diseases. Development of nanotechnology capable of efficient delivery of genome editing factors is important for medical application. In this study, lipid nanoparticles that deliver CRISPR-Cas protein-gRNA complexes efficiently were developed. From a viewpoint of practical application, microfluidic device-based synthesizing methodology that enables seamless manufacturing scale-up was developed.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ゲノム編集 脂質ナノ粒子 マイクロ流体デバイス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集はゲノム DNA の塩基配列の部分的な変異導入や修復を行う技術であり、治療困難な遺伝性疾患の根本治療や、ウイルス感染に対する強力な治療戦略として期待される。特に CRISPR/Cas9 システムはデザインの簡便さやゲノム編集効率の良さから、医療への応用が非常に期待されている。現在、細胞系においてはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の根絶、マウス成体では遺伝性疾患の高チロシン血症 I 型の治療が報告されており、本技術の疾患治療への応用に向けた試みが進み始めていた。これらの報告例では全てウイルスベクターが用いられている。一方で、ゲノム DNA 切断の活性本体である Cas9 タンパク質-RNA 複合体 (RNP) の導入が、発現ベクターによる導入よりもゲノム編集効率および標的特異性の両面から優れることが明らかにされた。ゲノム編集の医療応用においては標的特異性が極めて重要視されるため、この点に優れる RNP の導入による *in vivo* ゲノム編集を実現可能な人工キャリアの開発が重要である。RNP 導入によるゲノム編集医薬は極めて魅力的であるが、その実現には RNP 送達技術の開発が最大の障壁である。一方で、本研究開始当初において、RNP 送達技術の開発に関する報告例は *in vitro* 及び *in vivo* 共に皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では、肝疾患のゲノム編集治療を可能とする脂質ナノ粒子製剤を世界に先駆けて創生することを最終目標とする。マイクロ流体デバイスを用いた連続的な RNP 搭載脂質ナノ粒子 (LNP) 製造法を確立する。また、pH 感受性カチオン性脂質を含む脂質成分の組成など、製剤処方最適化を通し、世界最高の遺伝子ノックアウト誘導活性と安全性を兼ね揃えた LNP 製剤を構築する。さらに、鋳型 DNA の同時送達による相同組換え修復機構を介した遺伝子ノックインが可能な製剤を開発する。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスを用いた RNP 搭載 LNP 製造条件の最適化

バッフル型ミキサー構造を有するマイクロ流体デバイス (iLNP) を用いたアルコール希釈法を原理とする RNP 搭載 LNP の製造における諸条件の検討を行った。LNP は脂質のアルコール溶液と RNP が溶解した緩衝液をデバイスに通すことで製造する。総流速 (TFR)、流速比 (FRR) および緩衝液 pH をそれぞれ 50~500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、3~9 および 4~6 の範囲で検討した。条件検討は crispr RNA (crRNA) の標的配列を有する 2 本鎖 DNA (dsDNA) 切断活性を指標とした。RNP 溶液とアルコールをデバイスに通し、得られた溶液を PBS(-) に対して透析し、フルオレスカミンによるタンパク質量の後、dsDNA と反応させ、アガロース電気泳動を行った。ゲル染色後に撮影し、ImageJ を用いて dsDNA の切断効率を算出した。

(2) RNP 搭載 LNP の製剤処方最適化

実験計画に基づいた製剤処方の最適化を行った。検討する因子として、pH 感受性カチオン性脂質の種類およびその含量、中性リン脂質の種類およびその含量、PEG 化脂質の含量、および、RNP/lipid モル比とした。pH 感受性カチオン性脂質としては筆者が独自に開発した高膜融合性・生分解性を示す CL4H6 と CL15H6 を用いた。中性リン脂質としては DSPC および DOPE を用いた。PEG 化脂質としては PEG-DMG を用いた。脂質組成は pH 感受性カチオン性脂質、中性リン脂質、コレステロール (chol) および PEG-DMG の 4 種の混合物とした。Cas9 RNP は 1 本鎖 DNA と複合体化させたものを用いた。第 1 スクリーニングとして決定的スクリーニング計画に基づき 14 種の RNP 搭載 LNP (A-1~A-14) を製造した。各 LNP の粒子径および多分散度指数 (PDI) を動的光散乱法により、電位を電気泳動光散乱測定法により測定した。Ribogreen assay により RNP 搭載効率および LNP 溶液中の RNP 濃度を算出した。GFP 安定発現 HeLa (HeLa-GFP) 細胞における GFP ノックアウト効率をフローサイトメーターを用いて解析した。粒子径、RNP 搭載効率および GFP ノックアウト効率を応答として多元分散分析を行った。第 1 スクリーニングの結果を基に、CL4H6 含量、DOPE 含量および PEG-DMG 含量を検討因子として部分実施要因計画 (L-9 タグチ計画) に基づき 9 種の RNP 搭載 LNP (B1-~B-9) を製造した。第 1 スクリーニングと同様の手順で実験および解析を行った。

(3) RNP 送達における 1 本鎖オリゴ核酸 (ssON) の影響と Cpf1 RNP 送達への応用

B-4 および B-9 LNP において Cas9 RNP と複合体化させる ssON の鎖長 (0~132 nt) および種類 (DNA または RNA) について検討した。各 LNP を HeLa-GFP 細胞へ添加し、GFP ノックアウト効率をフローサイトメーターを用いて解析した。続いて、gRNA 鎖長が spCas9 よりも短い Cpf1 RNP において同様の検討を行った。その際、ssRNA 鎖長 (0~120 nt) に加えて文献報告された 5' 末端側に 59 nt 伸長させた gRNA を比較に用いた。各 LNP を HeLa-GFP 細胞へ添加し、GFP ノックアウト効率をフローサイトメーターを用いて解析した。

(4) ダブルニッキング法による遺伝子ノックアウト

spCas9 は低頻度で標的配列に類似した目的外 DNA 配列を認識して切断する off-target 効果が生じる。これまでに、spCas9 の 1 つのエンドヌクレアーゼ活性を失わせた Cas9 nickase (Cas9n) 互いに近傍の DNA 領域を標的とするようデザインすることで目的領域で特異的に DNA 二本鎖切断を誘導するダブルニッキング法が知られている。そこで、Cas9n 搭載 LNP によるダブルニッキング法による遺伝子 KO 活性を評価した。Cas9n 搭載 LNP を HeLa-GFP 細胞へ添加し、GFP ノックアウト効率をフローサイトメーターを用いて解析した。

(5) 相同組換修復による塩基置換

RNP による DNA 二本鎖切断の際にドナーDNA を導入するとそれを鋳型にした相同組換修復機構が働き、ドナーDNA に挿入配列あるいはミスマッチ配列を導入することでゲノム DNA を目的の配列へと変換可能である。crRNA の標的配列を GFP 発色団のごく近傍に設計し、Cas9 RNP と複合体化させる ssDNA に GFP 発色団 (TYG) が BFP 発色団 (SHG) へ変化するような数塩基の変異を導入した。B-4 および B-9 LNP を GFP 安定発現 HEK (HEK-GFP) 細胞へ添加し、GFP ノックアウト効率および BFP ノックイン効率をフローサイトメーターを用いて解析した。

(6) 細胞毒性評価

B-4 および B-9 LNP を HeLa-GFP および HEK-GFP 細胞へ添加し、24 時間後の細胞生存率を WST-8 アッセイにより測定した。

(7) Cas9 搭載 RNP の保存安定性評価

B-9 LNP を製造してから冷蔵保存後の粒子径、PdI および HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト効率を測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイスを用いた RNP 搭載 LNP 製造条件の最適化

まず TFR を検討したところ、今回行った範囲において RNP が不活化される条件は見出されなかった(図 1A)。マイクロメートルサイズの流路内に溶液を高速に送液するに伴うシェアストレスに対しては比較的安定であることが示唆された。続いて、FRR を検討したところ、FRR が 7 以上で活性が保持された一方で、5 以下ではその低下に伴って活性の著しい現象が認められた(図 1B)。FRR の低下に伴って EtOH 含有率が上昇するため、EtOH による変性が生じたものと推察された。続いて、緩衝液 pH を検討したところ、pH の低下に伴った活性の顕著な現象が認められた(図 1C)。pH 低下により Cas9 タンパク質が変性したものと推察された。EtOH 非存在条件下では pH5 付近で処理しても活性の低下は認められなかったことから、低 pH と EtOH の存在が複合的に作用して活性が低下したことが示唆されている。これらの検討から見出された最適条件下でマイクロ流体デバイス処理した RNP の活性を検討したところ、未処理と比較して有意な活性低下は認められなかった(図 1D)。以上より、RNP の活性を保持可能な RNP 搭載 LNP 製造条件を見出すことに成功した。

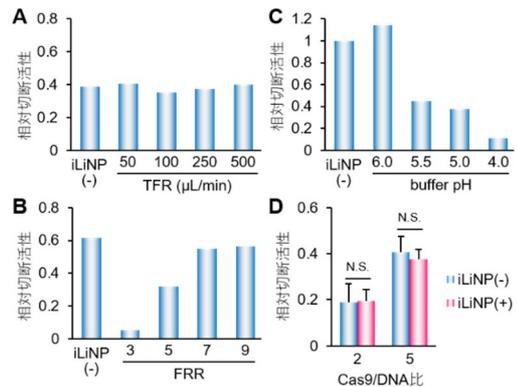


図 1 RNP 搭載 LNP 製造条件の検討 (A-C) Cas9 RNP の DNA 二本鎖切断活性に与える TFR (A)、FRR (B) および緩衝液 pH の影響。 (D) 最適条件下における RNP の DNA 二本鎖切断活性。

(2) RNP 搭載 LNP の製剤処方最適化

RNP 搭載 LNP の製剤処方の最適化を実験計画法を活用して行った。特に重要な因子を同定するため、第 1 スクリーニングとして決定的スクリーニング計画により 14 製剤 (A-1 ~ A-14) を製造し、各物性を測定後、HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を評価した。その結果、検討した濃度域でほぼ活性を示さない製剤から 50% 阻害濃度 (IC₅₀) として 0.1 nM を下回る高活性な製剤まで多様であった(図 2A)。続いて多元分散分析による各物性及びノックアウト活性に対する統計学的有意な因子の同定を行った。その際、ノックアウト活性の線形性を確保するため、特定の濃度における活性に対する解析ではなく、検討した 3 点の濃度における活性の平均値をノックアウト活性指数 (KO activity index) として解析した。

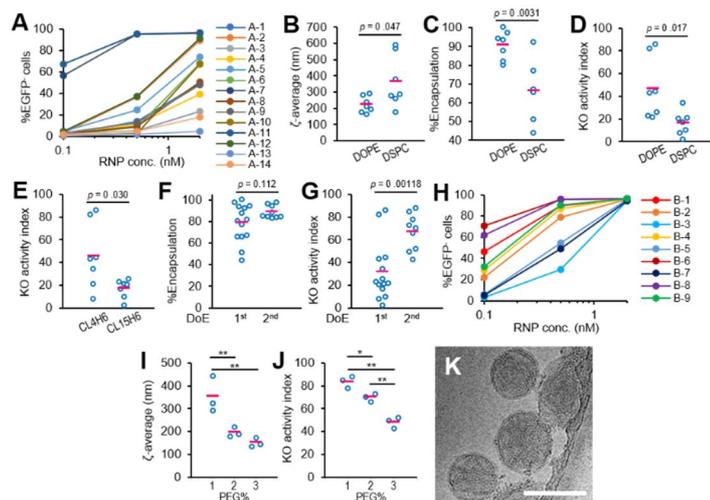


図 2 実験計画法による RNP 搭載 LNP の製剤処方の最適化 (A-E) 第 1 スクリーニングの主な結果。 (A) 14 製剤の GFP ノックアウト活性。 (B) 粒子径に対する中性リン脂質の影響。 (C) RNP 搭載効率に対する中性リン脂質の影響。 (D) ノックアウト活性指数に対する中性リン脂質の影響。 (E) ノックアウト活性指数に対する pH 感受性カチオン性脂質の影響。 (F, G) 第 1 および第 2 スクリーニング間の RNP 搭載効率 (F) および ノックアウト活性指数 (G) の比較。 (H-J) 第 2 スクリーニングの主な結果。 (H) 9 製剤の GFP ノックアウト活性。 (I) 粒子径に対する PEG-DMG 含量の影響。 (J) ノックアウト活性指数に対する PEG-DMG 含量の影響。 (K) B-9 LNP のクライオ電子顕微鏡像 (スケールバー: 100 nm)。

特に影響度の大きい因子と以下に述べる。中性リン脂質として DOPE を用いることで粒子径を小さく制御可能であり(図 2B)、高い RNP 搭載効率を達成可能であり(図 2C)、かつ高いノックアウト活性を示すことが明らかとなった(図 2D)。また、pH 感受性カチオン性脂質として CL4H6 を用いることでもノックアウト活性が有意に上昇した。これらの解析結果を基に実験スペースを縮小し、第 2 スクリーニングによる最適製剤処方の同定を試みた。一部実施要因計画により 9 製

剤 (B-1~B-9) を製造し、物性を測定後、HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を評価した。第 1 と第 2 スクリーニング間の RNP 搭載効率及びノックアウト活性指数を比較したところ、いずれも第 2 スクリーニング用製剤において有意に高い値を示したことから (図 2F,G)、第 1 スクリーニングにおける解析とそれに基づく第 2 スクリーニングの実験デザインの妥当性が示唆された。各製剤の KO 活性を見ると、濃度依存的に活性が向上し、2 nM において全て 90%以上のノックアウト効率を示した (図 2H)。多元分散分析の結果、特に顕著であった因子として PEG-DMG 含量が見いだされ、含量を上げることで粒子径は小さく制御可能であるがノックアウト活性は減少することが明らかとなった (図 2I,J)。粒子径制御性とノックアウト活性のバランスを考慮して PEG-DMG 含量は 2% が最適であると判断した。pH 感受性カチオン性脂質と中性リン脂質の含量は RNP 搭載効率にやや影響を与えるものの、その他の物性やノックアウト活性への影響は有意ではなかった。以上より、最適製剤として pH 感受性カチオン性脂質と中性リン脂質の含量がそれぞれ大きく異なる 2 製剤 (B-4 と B-9) を最適製剤処方として以降の検討に使用することとした。B-9 LNP のクライオ電子顕微鏡撮影を行ったところ、動的光散乱法により求められた直径と同等の 100 nm 程度の球状粒子であり、外膜が脂質二重膜構造を有し、内部に複雑な二重膜構造が認められた (図 2K)。

(3) RNP 送達における 1 本鎖オリゴ核酸 (ssON) の影響と Cpf1 RNP 送達への応用

RNP と複合体化させる ssON の鎖長およびその種類 (DNA または RNA) について HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を指標に検討した。物性は ssON の種類やその有無によらず同等であった (データ未掲載)。検討の結果、ssON を用いない場合でも活性は認められた一方で、ssDNA 鎖長依存的に活性の上昇が認められた (図 3A,B)。また、ssRNA を用いた際に最も高い活性を示す傾向が認められた。20 nt の ssDNA を用いた場合はノックアウト活性が完全に消失したことから、ssON は潜在的に RNP の標的 DNA 認識あるいは切断活性を阻害する可能性が示唆された。試験管内における DNA 切断アッセイにおいては 132 nt の ssDNA 存在下で DNA 切断が顕著に阻害された結果も得られており、上記の可能性が支持される。比較的長い ssON で活性が阻害されないのは細胞内において ssON が RNP から乖離することや分解を受けることが原因と考えられる。spCas9 RNP において ssON による活性向上が認められたことから、本戦略をより gRNA 鎖長の短い Cpf1 RNP 送達への応用を試みた。ssRNA 鎖長の検討に加え、Park らによって報告された、Cpf1 RNP 送達効率が向上する 5' 末端側に 59 nt 伸長した gRNA (gGFP+59) を比較として検討した。本検討には B-9 LNP を用いた。ssRNA を用いない場合、LNP は凝集傾向にあったが、RNA 鎖長依存的に 100 nm 程度の均一性の高い製剤が得られた (データ未掲載)。HeKa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を評価した結果、ssRNA 鎖長依存的に活性の顕著な上昇が認められた (図 3C)。また、既報通り gGFP+59 を用いた場合も活性の向上が認められた。また、120 nt の ssRNA と gGFP+59 を組み合わせることで最大のノックアウト活性を示した。ssRNA と gRNA の合計鎖長とノックアウト活性指数との関係をプロットしたところ、非常に高い相関性を示した (図 3D)。これは RNP の負電荷密度を向上させることが RNP の効率的な送達に重要であることを示している。

(4) ダブルニッキング法による遺伝子ノックアウト

標的特異性を大幅に向上可能なダブルニッキング法によるノックアウトへの応用性を検討した。gRNA は GFP コード領域で互いに反対の DNA 鎖を認識し、オフセットが +9 nt となる位置に設計した (図 4A)。Cas9n として CuvC エンドヌクレアーゼドメインに点変異の入った Cas9n D10A を用いた。B-9 LNP を用いて HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を評価した結果、コントロールとして用いた Cas9 RNP と比較して Cas9n RNP はやや劣るものの、濃度依存的に最大 95% のノックアウト効率を示した (図 4B)。以上より、本製剤はダブルニッキング法に十分適用可能であることが示された。

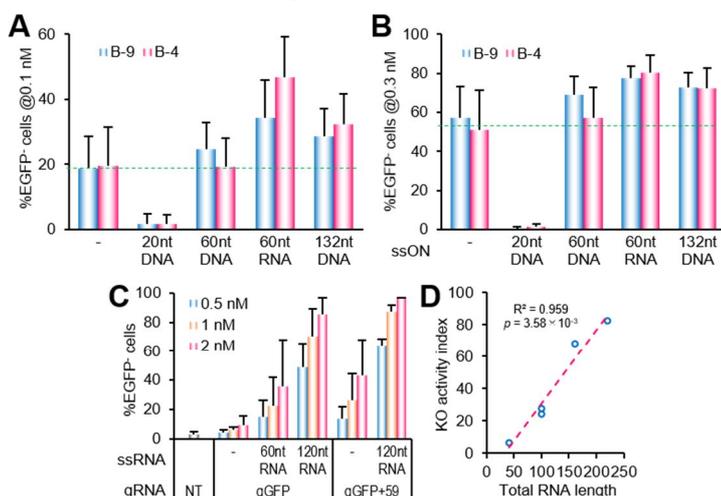


図 3 ssON の RNP 送達に与える影響

(A,B) spCas9 RNP 送達における ssON の影響。RNP 添加濃度 0.1 nM (A) および 0.3 nM (B) における HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト効率。(C,D) Cpf1 RNP 送達における ssRNA および伸長 gRNA (gGFP+59) の影響。(C) 各 ssRNA および伸長 gRNA を用いて製造した B-9 LNP の HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性。(D) ssRNA および gRNA の合計 RNA 鎖長とノックアウト活性指数との相関。

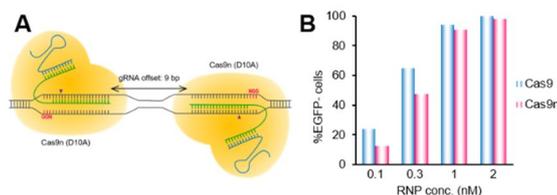


図 4 ダブルニッキング法による遺伝子ノックアウト

(A) 2 種の gRNA 標的デザインの模式図。(B) Cas9n 搭載 B-9 LNP の HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性。

以上より、本製剤はダブルニッキング法に十分適用可能であることが示された。

(5) 相同組換修復による塩基置換

ssDNA をゲノム編集酵素と共導入することで相同組換修復機構により、ssDNA がテンプレートとして働いて 2 本鎖切断されたゲノム DNA が修復される。挿入配列あるいは変異配列を導入した ssDNA を用いることでゲノム DNA 配列を任意に変更す

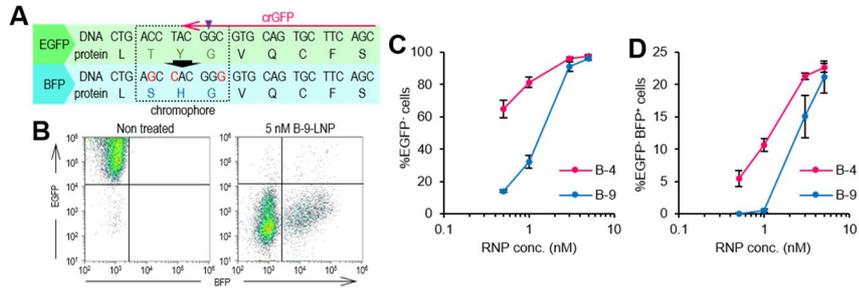


図5 変異ssDNA共導入による相同組換修復機構を介した塩基置換 (A) gRNA標的配列およびssDNAの変異配列. (B) GFPからBFPへの変換時のドットプロット例. (C) HEK-GFP細胞におけるGFPノックアウト活性. (D) HEK-GFP細胞におけるBFPノックイン活性.

ることが可能である。本実験では EGFP の発色団 (TYG) をコードする DNA 領域のごく近傍に crRNA を設計し、発色団のコードするアミノ酸を青色蛍光タンパク質の発色団 (SHG) へ書き換えるような変異配列を有する ssDNA を設計した (図 5A)。即ち、ssDNA がテンプレートとして作用し相同組換修復がなされれば EGFP⁺BFP⁺細胞が得られる (図 5B、右側ドットプロットの右下の領域)。HeLa 細胞などのがん細胞は相同組換修復活性が低下し、ssDNA による塩基置換が生じにくいことが知られているため、本検討においては HEK-GFP 細胞を用いた。検討の結果、濃度依存的に GFP-細胞が認められ、最大 95% となったことから、HeLa-GFP 細胞において最適化した製剤が他の細胞種においてもワークすることが示された (図 5C)。一方で、2 製剤間で活性が異なったことから、細胞種によって効率的な遺伝子ノックアウトを誘導する上で製剤に求められる特性がやや異なることが示唆された。EGFP⁺BFP⁺細胞に着目したところ、濃度依存的な割合の上昇が認められ、最大 23% に達した。この値はエレクトロポレーションによる導入例と同等であった。また、相同組換修復機構が非相同末端結合機構による修復と競合的に作用し、一般的に哺乳類細胞では前者の活性が後者に比べて低いこと、また、前者は S 期および G2 期のみで働くことを考慮すると十分に高い値であると考えられる。

(6) 細胞毒性評価

HeLa-GFP 細胞および HEK-GFP 細胞における Cas9 RNP 搭載 LNP の安全性を評価した。各製剤を細胞に添加してから 24 時間後における細胞生存率を WST-8 アッセイにより測定したところ、いずれの条件においても 80% 以上を示した (図 5)。以上より、製剤の高い安全性が示された。

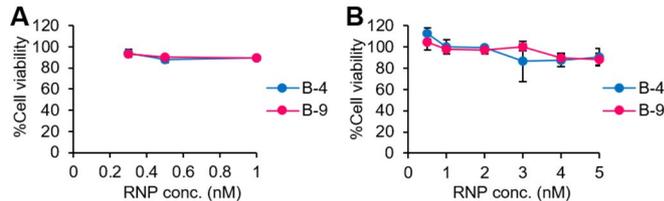


図6 細胞毒性評価 B-4およびB-9 LNP添加後のHeLa-GFP細胞 (A) およびHEK-GFP細胞 (B) の生存率.

(7) Cas9 搭載 RNP の保存安定性評価

Cas9 RNP 搭載 B-9 LNP の保存安定性を評価した。製剤を製造後、PBS(-)中、4 条件下で各期間保存し、物性 (粒子径および Pdl) を測定し、また、2 週間後における HeLa-GFP 細胞における GFP ノックアウト活性を測定した。その結果、保存期間における凝集等は認められず、物性は 5 週間まで維持された (図 7A)。また、ノックアウト活性は 2 週間維持された (図 7B)。

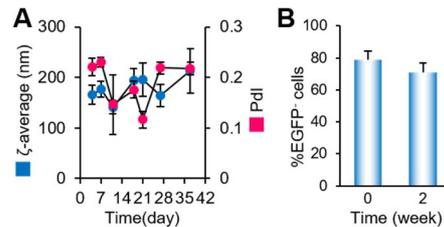


図7 B-9 LNPの保存安定性評価 (A) 粒子径およびPdl. (B) HeLa-GFP細胞におけるGFPノックアウト活性.

(8) まとめ

近年、核酸ナノ医薬品開発に利用されているマイクロ流体デバイスを用いた連続的製造法で RNP 搭載 LNP を製造することに世界に先駆けて成功した。本製造法は原理的にシームレスなスケールアップ製造が可能であるため、技術の実用化の観点から極めて重要である。また、製剤処方の最適化により得られた最適製剤は IC₅₀ で 0.1 nM RNP 程度であり、競合する人工 RNP 搭載ナノ粒子製剤と比較して数 10 倍高い活性達成した。また、90% 以上の遺伝子ノックアウトを示す濃度においても細胞毒性を示さなかった。以上より、本製剤化技術は競合技術と比較して大きなアドバンテージを有していると考えられる。現在、本技術をベースとした *in vivo* への応用に向けた検討および更なる改良、さらには遺伝子ノックインを実現する製剤の開発に着手しており、肝疾患をはじめとしたさまざまな遺伝性疾患に対する根本治療の実現を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niko Kimura, Masatoshi Maeki, Yusuke Sato, Yusuke Note, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Hideyoshi Harashima, Manabu Tokeshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5044-5041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b00341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Sato, Kazuki Hashiba, Kosuke Sasaki, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Hideyoshi Harashima	4. 巻 295
2. 論文標題 Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 140-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2019.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeki M, Fujishima Y, Sato Y, Yasui T, Kaji N, Ishida A, Tani H, Baba Y, Harashima H, Tokeshi M	4. 巻 12
2. 論文標題 Understanding the formation mechanism of lipid nanoparticles in microfluidic devices with chaotic micromixers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0187962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187962.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yusuke, Okabe Nana, Note Yusuke, Hashiba Kazuki, Maeki Masatoshi, Tokeshi Manabu, Harashima Hideyoshi	4. 巻 102
2. 論文標題 Hydrophobic scaffolds of pH-sensitive cationic lipids contribute to miscibility with phospholipids and improve the efficiency of delivering short interfering RNA by small-sized lipid nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 341 ~ 350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2019.11.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Khalil Ikramy A., Sato Yusuke, Harashima Hideyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Recent advances in the targeting of systemically administered non-viral gene delivery systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17425247.2019.1656196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Takashi, Yamada Yuma, Sato Yusuke, Khalil Ikramy A., Harashima Hideyoshi	4. 巻 218
2. 論文標題 Innovative nanotechnologies for enhancing nucleic acids/gene therapy: Controlling intracellular trafficking to targeted biodistribution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119329 ~ 119329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2019.119329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤悠介, 橋場一毅, 原島秀吉.
2. 発表標題 効率的な in vivo 核酸送達を実現する高機能脂質ナノ粒子
3. 学会等名 第27回インテリジェント材料・システムシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤悠介.
2. 発表標題 機能性脂質を基盤とした in vivo 核酸送達システムの開発
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部主催 第1回若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 シヨバキ ヌレ, 佐藤悠介, 原島秀吉.
2. 発表標題 脂質ナノ粒子の膜乖離定数の操作による細胞選択的なsiRNA送達
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato Y, Hashiba K, Hashiba A, Okabe N, Harashima H
2. 発表標題 Efficient delivery of macromolecules by molecular design of cationic lipids
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki Y, Sato Y, Sato R, Maeki M, Tokeshi M, Harashima H
2. 発表標題 Development of Ribonucleoprotein-loaded lipid nanoparticles for genome editing
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤悠介, 鈴木裕一, 佐藤里咲, 真栄城正寿, 渡慶次学, 原島秀吉
2. 発表標題 ゲノム編集タンパク質搭載脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤悠介, 鈴木裕一, 佐藤里咲, 真栄城正寿, 渡慶次学, 原島秀吉
2. 発表標題 Cas9-gRNA RNP搭載脂質ナノ粒子による高効率ゲノム編集
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 siRNA細胞内送達のための脂質膜構造体	発明者 原島秀吉, 佐藤悠介	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/022940	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 siRNA細胞内送達のための脂質膜構造体	発明者 原島秀吉, 佐藤悠介	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-117708	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脂質ナノ粒子	発明者 佐藤悠介, 原島秀吉, 渡慶次学, 真栄城正寿	権利者 国立大学法人北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-101203	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考