

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16082

研究課題名(和文) IL-12p40遺伝子を標的としたナノ核酸医薬に関する基盤研究

研究課題名(英文) Basic research on nucleic acids therapeutics for IL-12p40 gene targeting

研究代表者

宋 復燃 (song, furan)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30846001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、比較して安全性が高いcharge-reversible脂質ナノ粒子(LNP)を用い、マクロファージ様細胞株であるRaw264.7細胞においてLNPの遺伝子発現抑制効果を確認できた。また高いsiRNA保持能を有し、粒子径約100 nmの均一な糖鎖修飾LNP粒子の構築する方法が得た。さらに、糖鎖修飾LNPの修飾法を最適し、標的遺伝子の発現抑制効果をマウス骨髄由来のマクロファージ細胞、樹状細胞において確認できた。標的の免疫細胞に高い移行性を有する脂質ナノ粒子を開発し、免疫細胞において標的する遺伝子の発現低下を誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBDの病因はいまだ不明であるが、マクロファージと樹状細胞からインターロイキンが大量に産生されることがIBD発症の要因と考えられている。実際に、抗ヒトインターロイキン抗体製剤はIBDの維持療法に用いられているが、治療にはくすりの持続投与と医療費負担が問題となっている。IBDを根源的に治療するには、すでに過剰産生されたインターロイキンを抗体で中和するのではなく、その産生自体をRNA干渉薬で抑える治療法の開発が有効であろうとの着想に至った。本研究では、安全性が高く、標的のマクロファージに特異的に取り込まれるCharge-reversible脂質ナノ粒子を開発し、IBD治療に応用することを試みる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we were able to confirm the gene expression suppression effect of LNP in Raw264.7 cells, which are macrophage-like cell lines, using charge-reversible lipid nanoparticles (LNPs), which are relatively safer than traditional nucleic acid carriers. A method for constructing uniform mannoside modified LNP particles having a high siRNA encapsulation ratio and having a particle size of about 100 nm was obtained. Furthermore, the modification method of mannoside modified LNP was optimized, and the effect of suppressing the expression of the target gene was confirmed in macrophage cells and dendritic cells derived from mouse bone marrow. We developed charge-reversible lipid nanoparticles having high migrability to target immune cells and were able to induce a decrease in the expression of the target gene in immune cells.

研究分野：核酸送達

キーワード：炎症性腸疾患 脂質ナノ粒子 siRNA送達 マクロファージターゲット IL-12p40遺伝子



流路を用いて siIL-12p40 を内封する LNP を調製し、粒子の物理化学的性質（粒子径、多分散指数、ゼータ電位）を評価し、クライオ電子顕微鏡法（cryo-TEM）を用いて粒子の形状を観察した。

#### [ナノ粒子の有用性の確認]

マクロファージは炎症性疾患など様々な疾患に関与しているため、マクロファージ中でノックダウンを行うことができれば、LNP によって治療できる疾患が大幅に広がることが期待される。そこで、siIL-12p40 を内封する LNP を RAW264.7 マクロファージ様細胞に添加し、RT-PCR 法にて RAW264.7 細胞中の IL-12p40 遺伝子の発現抑制効果を評価した。

#### [マクロファージ細胞においてナノ粒子の処方最適化]

RNA 干渉療法のインビボ応用を念頭に置き、マクロファージへ siRNA をデリバリーするナノ粒子の処方最適化を評価するため、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 の他にマウスの骨髄から単球細胞を単離し、マクロファージ細胞および樹状細胞に分化させ、複数の異なる免疫細胞を用いたマンノシド修飾 LNP の細胞移行実験とノックダウン実験を行い、データの確実性を高めると同時に各種の免疫細胞への siRNA 送達の LNP の処方最適化をした。

## 4. 研究成果

#### [IL-12p40 に対する siRNA (siIL-12p40) を内封するナノ粒子の作成]

マイクロ流路を用いて charge-reversible LNPs を作製することに成功した。調製方法を最適化したため、100 nm 程の粒子径を有していた。機械的に調製条件を固定し、再現性良く LNPs を調製することが可能となったため、LNPs を今後、工業的に使用できることが期待できる。そして、PdI は 0.1 以下であり均一な粒子ができていることが分かった。また、pH の異なる溶媒中で LNPs のゼータ電位が反転したため、charge-reversible な性質を有していることが示された。

cryo-TEM により、LNPs を観察したところ、100 nm 程の均一な粒子が確認された、さらに、一般的な脂質ナノ粒子とは異なり、リポソーム様の脂質二重膜を有していることが分かった。また、多重膜リポソーム様の粒子を形成している粒子も見られた（図 2）。これは、DOP-DEDA がどの pH においてもイオン化しており、他の pH 応答性脂質に比べて親水性が高いため、脂質ナノ粒子に見られる脂質コアを持たず、脂質二重膜や多重膜ミセルを形成したと考えられる。siRNA 内封率を測定したところ、95%以上の高い内封率を示した。LNPs の pKa が 6.1 付近にあることが分かった。エンドソームなどの pH の低い環境下では正電荷を帯びることで siRNA の細胞質送達を効率化できる。エンドソームからの脱出はサイトゾルへの効率的な siRNA 送達に重要であるため、pKa は核酸キャリアにおける重要な性質である。エンドソーム脱出に有利な pKa を示したため、効率的な RNA 干渉誘導が期待できる。

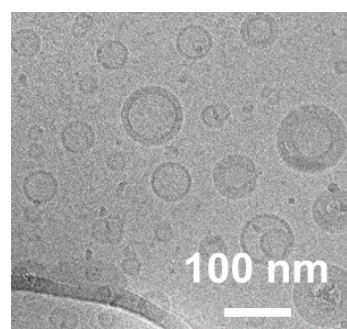


図 2 Charge-reversible LNP のクライオ TEM 画像

#### [Charge-reversible LNP の有用性の確認]

マクロファージ様細胞株である Raw264.7 細胞を用いて IL-12p40 遺伝子の抑制効果を評価した（図 3）。様々な疾患で重要な役割を果たしているマクロファージ中での RNA 干渉誘導効果

を確認することができた。さらに、一般的なトランスフェクション試薬であるリポフェクタミン添加群では、IL12p40 を逆に増加させてしまったことから、サイトカイン応答を引き起こしたことが分かる。一方、LNP添加群においては、40%程減少させたため、LNPを炎症性疾患において、炎症性物質を減らすために用いることができる可能性が示唆された。このことから、LNPをマクロファージが関与するがんや炎症性疾患など、種々の疾患に適応できる可能性があり、また、炎症性物質を抑制することも可能であることが示唆された。

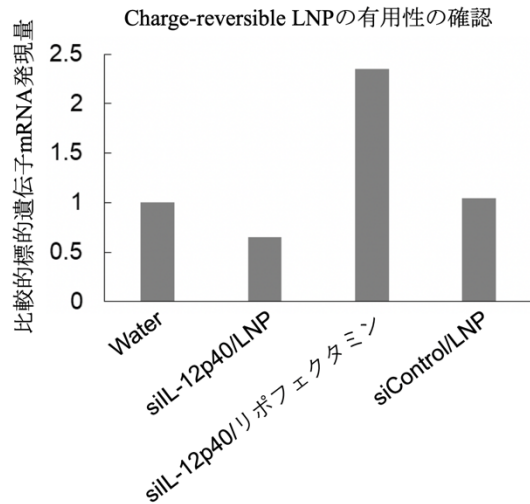


図3 Charge-reversible LNPの有効性の確認

[マクロファージ細胞においてナノ粒子の処方最適化]

初代培養マクロファージ細胞および樹状細胞を用いて検討するため、マウス骨髄から採取した細胞を用い、細胞の分化誘導を行った。各細胞への siRNA 送達効率を向上するために、LNPの表面をマンノシドで修飾した。蛍光標識 siRNA を封入したマンノシド修飾 LNP を初代培養マクロファージ細胞および樹状細胞に添加し、siRNA の取り込み効率を評価した。その結果、マンノシド修飾 LNP は、未修飾 LNP やフリーの siRNA と比べ、有意に初代培養マクロファージ細胞および樹状細胞の siRNA の取り込みが増加することが明らかになった(図4)。蛍光標識 siRNA を封入したマンノシド修飾 LNP の各細胞への取り込み効率を評価することで、最適な LNP のマンノシド修飾率および修飾方法が明らかになった。

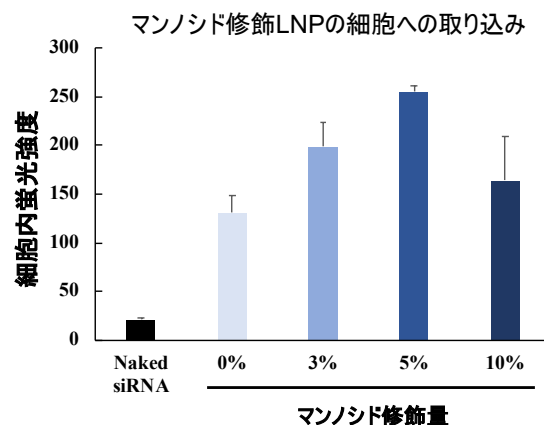


図4 マンノシド修飾 LNP の細胞へ移行性の評価

最後に初代培養マクロファージ及び樹状細胞への遺伝子ノックダウン効果を RT-PCR 法で評価した(図5)。その結果、siRNA 封入したマンノシド修飾 LNP を各細胞に添加し

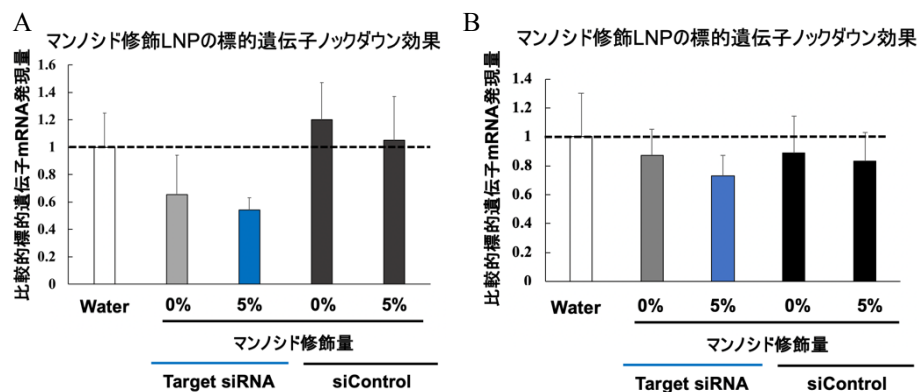


図5 初代培養マクロファージ(A)及び樹状細胞(B)においてマンノシド修飾 LNP の遺伝子ノックダウン効果

たところ、標的する遺伝子の mRNA の量が低下することが確認でき、Charge-reversible LNP を用いて IL-12p40 に対する siRNA をマクロファージ細胞および樹状細胞にデリバリーする可能性を証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirai Yusuke, Saeki Ryoko, Song Furan, Koide Hiroyuki, Fukata Naofumi, Tomita Koji, Maeda Noriyuki, Oku Naoto, Asai Tomohiro	4. 巻 585
2. 論文標題 Charge-reversible lipid derivative: A novel type of pH-responsive lipid for nanoparticle-mediated siRNA delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 119479 ~ 119479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2020.119479	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Furan Song
2. 発表標題 Development of charge-reversible lipid nanoparticles for nucleic acid delivery
3. 学会等名 2nd Taiwan International Liposome Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本昌、藤堂浩明、岡本浩一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 401
3. 書名 医薬品におけるDDS技術開発と製剤への応用	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------