

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20195

研究課題名（和文）ナノ粒子界面上クリック反応によるリガンド修飾法の確立と体系的最適化手法の構築

研究課題名（英文）Development of ligand modification onto the nanoparticle via click reaction and systematic evaluation

研究代表者

櫻井 遊（Sakurai, Yu）

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：00707234

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：核酸搭載脂質ナノ粒子は熱力学的に不安定であることから、特定の細胞を標的とするためのリガンド分子の修飾は困難であった。本研究では、この問題を解決するためにナノ粒子表面でクリック反応を利用して、迅速かつ高効率に抗体を修飾させる技術を開発した。また、実験計画法を用いた体系的な最適化手法を開発したことにより、標的細胞へと核酸を送達するために最適な脂質組成や抗体修飾条件を速やかに見出すことを可能とする手法を考案した。これらの基盤技術により作成した抗体修飾LNPにより、皮下のリンパ管内皮細胞へsiRNAを送達し任意の遺伝子の発現を制御できる技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質ナノ粒子（LNP）型核酸医薬は、近年のCOVID-19ワクチンで示されたように非常に強力な治療モダリティである。しかしながら、現在開発が進行中のLNP製剤はほとんどが肝細胞を標的としたものが局所投与によるものが殆どであり、対象となる疾患は限定的である。本研究により開発した抗体修飾技術により、肝細胞以外の細胞へとLNP型核酸医薬の対象を拡充することが可能となり、核酸医薬のさらなる発展に貢献しうる。

研究成果の概要（英文）：The thermodynamic instability of nucleic acid-loaded lipid nanoparticles has made it difficult to modify LNPs with ligand molecules to target specific cells. In this study, to solve this problem, I developed a technique for rapid and highly efficient modification methodology for antibodies conjugation using click reactions on the nanoparticle surface. In addition, by developing a systematic optimization, I developed a method that allows to rapidly find the optimal lipid composition and conditions for antibody modification to deliver nucleic acids to target cells. Using these fundamental technologies, I have developed a technology to deliver siRNA to subcutaneous lymphatic endothelial cells and control gene expression using antibody-modified LNPs.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：siRNA 脂質ナノ粒子 核酸 リガンド修飾 抗体 リンパ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

siRNA や mRNA などの核酸は遺伝子の補充や抑制可能であり、新規の医薬品分子として期待されている。核酸はそのままの形で投与しても細胞内に取り込まれないため、送達効率を上げるためのキャリアの開発が進められている。最も一般的なキャリアとして脂質ナノ粒子 (LNP) が汎用されており、siRNA を搭載した LNP が難治性の家族性アミロイドーシスの治療薬として 2018 年に承認された。しかしながら、LNP は大部分が肝臓に取り込まれるために、肝臓以外を標的とするためには特定の細胞を認識するためのリガンドの搭載が必要となる。従来のリガンドの搭載には加熱、アルコールの使用、長時間の反応が必要であり、これらに耐性の無い抗体などのリガンドは修飾することが困難であった。このことから、LNP にリガンドを修飾するための新たな方法論が必要である。

2. 研究の目的

本研究ではナノ粒子界面上におけるクリック反応を利用することで、リガンドを粒子へ迅速・高自由度に修飾する方法として CLIP (Click reaction on Interface of the nano-Particle) 法を確立することを目的とした。また、CLIP 法による標的化 LNP の最適化を行い、内封した核酸の機能を評価するための皮下リンパ管内皮細胞 (LEC: Lymphatic endothelial cell) を用いた評価系を作成し、CLIP 法による細胞標的化の有効性について検証した。

3. 研究の方法

抗体を LNP に結合させるために、dibenzocyclooctyne (DBCO) とアジド基により 1,2,3-トリアゾール環が形成される、いわゆる歪みエネルギー誘発型付加環化反応 (SPAAC: strain energy-promoted azide alkyne cycloaddition) を LNP への抗体結合方法へと応用した。抗体をリジン残基由来のアミノ基を介してアジド化したものを作成し、これを LNP に修飾した DBCO 結合ポリエチレングリコール脂質 (DBCO-PEG) 脂質と結合させるスキームを考案した (図 1)。初めに LNP 上でのクリック反応の最適条件の探索および、既存の抗体修飾スキーム (抗体のアミノ基と LNP の活性カルボン酸のアミドカップリングによる結合) との反応効率の比較のために、アジド基およびアミノ基を有する蛍光分子を用いたモデル系で精製後の蛍光強度から反応効率を測定した。LNP はあらかじめ別の波長の蛍光分子で修飾することで精製による LNP 回収率の補正を行った。



図 1 クリック反応を用いた抗体結合スキーム

抗体を LNP に結合させる際は、抗体を N-hydroxysuccinimide-PEG4-N3 を炭酸水素ナトリウム緩衝液 (200 mM、pH 8.0) 中で反応させた。得られたアジド化抗体は透析 (MWCO 3,000 Da) により精製し、限外濾過 (MWCO 50 kDa) により濃縮した。収率や濃度測定にはピシンコニン酸法を用いた。本研究に置いて用いたヒトポドラン抗体 (NZ-1.2) およびマウスポドラン抗体 (PMab-1) は AMED の BINDS 事業を通して供与いただいた。

LNP はアルコール希釈法により作成した。核酸を送達するための機能性脂質 (ssPalm) および DBCO-PEG 脂質を含む脂質エタノール溶液に対して、siRNA を含むリンゴ酸緩衝液 (pH 3.0) を混合した溶液を、さらに緩衝液により希釈後、限外濾過によりアルコールおよび未封入の siRNA を除去した。粒子物性については動的散乱法 (ZetaSizer Nano ZS、Malvern Panalytical 製) を用いた。作成した LNP をアジド化抗体と最適条件で混合することにより結合させた。LNP 溶液から抗体を除去する際には超遠心 (100,000g、4℃、60 min) LNP のみを沈殿させたのちに抗体溶液を含む上清を除去した。本操作を 2 度繰り返すことにより、LNP 溶液から未反応抗体を除去した。抗体の検出のために、4-16% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE を 150 V、45 分低電圧で泳動を行い、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー染色によりタンパク質を可視化した。

tLNP および ntLNP の siRNA 送達活性の測定には、ヒト皮膚由来不死化 LEC (HDLEC、LONZA 製) をモデル細胞として使用した。HDLEC は EBM-2 培養キットを用いて培養した。tLNP の取り込み量評価の際には、6-well プレートに HDLEC を播種し、24 時間後に事前に脂溶性蛍光分子 (DiD) により蛍光標識した tLNP および ntLNP を 2 時間暴露し、その後トリプシン処理した細胞を Novocyte (Agilent Technology 製) により細胞内の蛍光強度を測定した。siRNA による遺伝子発現抑制活

性の測定のためには、細胞にコピキタスに発現している polo-like kinase 1 (PLK1) 遺伝子に対する siRNA を用いた。細胞を PLK1 siRNA を搭載した LNP に 24 時間暴露し、その後細胞から total RNA を Maxwell 16 (Promega 社製) を用いて RNA を抽出後に定量的 RT-PCR により PLK1 発現量を定量した。

in vivo での tLNP のターゲティング能の検討のために、皮下組織の LEC を使用した。皮下に tLNP を投与後、尾部皮膚を切除し、皮膚真皮部をコラゲナーゼ溶液とインキュベートすることにより LEC を含む皮下組織の細胞懸濁液を調製した。得られた皮下細胞の懸濁液をポドプラニン、CD31、CD45 に対する蛍光標識抗体で染色後、Novocyte を用いて CD31 陽性ポドプラニン陽性 CD45 陰性細胞を LEC とした。tLNP の非標的細胞として CD31 陽性ポドプラニン陰性 CD45 陰性細胞である血管内皮細胞に含まれる LNP 由来蛍光を定量した。また、遺伝子発現抑制の際には、標的タンパク質に対する抗体も加えて染色し、標的タンパク質の発現量を定量した。

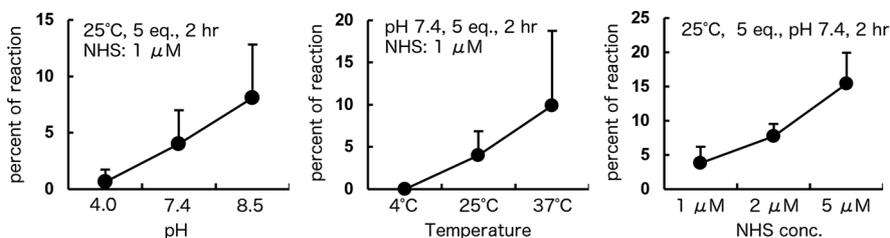
4. 研究成果

古典的には抗体に修飾したチオール基と LNP に修飾したマレイミド基の間の 1,4-付加反応を利用する方法があるが、予備的検討の結果からマレイミド基と ssPalm に含まれるジスルフィド基が反応する可能性が示された(図 2)。そこで、同様に古くから抗体結合法として用いられている、抗体のアミノ基と LNP の活性カルボン酸を持つ PEG 脂質によるアミドカップリングをコントロールの反応とした。これらの反応による LNP 表面上での分子の反応率の測定のために、LNP に NHS 基を含む脂質および DBCO を含む脂質を混合し、このようにして作成した LNP とアミノ基もしくはアジド基を有する蛍光分子を反応させるモデル系により反応温度、反応当量、pH について検討した。その結果、既存のアミドカップリングを利用した方法では、反応温度、反応当量依存的に結合量が増大した(図 3)。また、pH については塩基性が適していることが明らかとなった。これは、アミドカップリングにおいてアミノ基は脱プロトン化する必要があり中性～塩基性条件が好まれるという過去の報告と一致した。また、アミドカップリング反応は S_N1 反応であることから、反応温度・濃度に依存して反応速度が高くなるという過去の知見とも一致した。一方で、CLIP 法では、温度依存性、反応当量依存性は認められず、比較的温和な条件かつ過剰量の基質を必要としないことが明らかとなった。また、特徴的な条件とし酸性条件においてのみ結合反応が進行した。これは、SPAAC が一般的に pH 非依存的であるという報告と矛盾する。そのため、酸性においてのみ LNP への蛍光分子結合が見られた結果は、反応そのものが進行しない条件で合ったというよりはむしろ LNP 上の DBCO を含む PEG 脂質の配向性や表面への提示の程度が変化していることが原因である可能性が考えられる。反応率を比較すると、CLIP 法では最大 30%の蛍光分子が結合していることから、CLIP 法が従来法と比較して迅速に反応を進行させることが明らかとなった。これらの系高分子を用いた検討から、CLIP 法による最適反応条件を、pH 4.0、室温、1 時間とした。



図 2 ssPalm とマレイミド含有脂質の反応

アミドカップリング



CLIP法

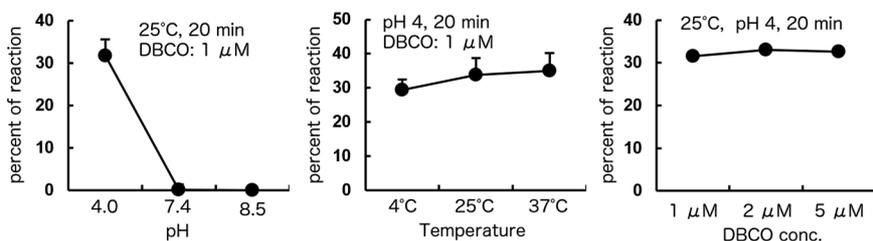


図 3 種々の反応条件における LNP 表面における反応効率

次に、抗体の結合について検討を行った。従来法および CLIP 法によりアジド化抗体もしくは DBCO を修飾した LNP と反応させ、SDS-PAGE により観察した。その結果、CLIP 法において LNP 由来の脂質との結合により分子量が増大したと考えられるバンドが観察された(図 4 左)。一方で、従来法ではその分子量が増大したバンドは薄く、反応効率が良くないことが示唆された。次に、分子量が増大したバンドが確かに LNP と相互作用している抗体であることを検証するために、超遠心により LNP と未結合の抗体を分離し、その後 SDS-PAGE により分析した(図 4 右)。なお、超遠心操作により LNP および抗体が希釈され検出限界以下になったことから、凍結乾燥により溶媒を除去して濃縮した後に泳動操作を行った。その結果、超遠心により分子量が増大したバンドのみが LNP 画分から検出されたことから、移動度が低下したバンドは確かに LNP と結合した抗体であることが示唆された。また、これらの結果から CLIP 法は従来法と比較して迅速かつ高効率に抗体を LNP に結合させられることが明らかとなった。

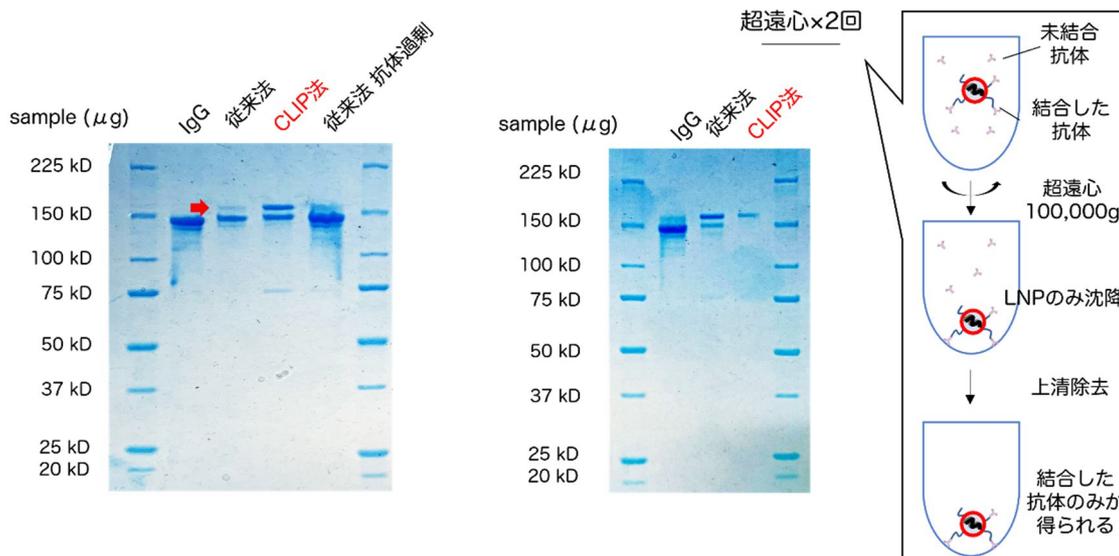


図 4 SDS-PAGE による LNP への抗体結合評価と超遠心による未結合抗体の分離

このようにして作成した、抗体修飾 LEC 標的 LNP (tLNP) と抗体を修飾していない LNP (ntLNP) の siRNA 送達量について検討を行った。培養細胞における取り込み量は、tLNP が ntLNP と比較して有意に高かった(図 5 左)。また、siRNA によるノックダウン効果を観察したところ、tLNP は ntLNP の約 3 分の 1 の濃度で遺伝子サイレンシングを誘導できることが明らかとなった(図 5 右)。

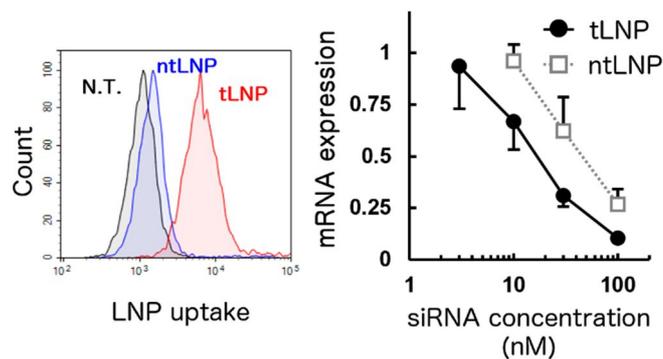


図 5 tLNP による in vitro 培養細胞での取り込みおよび siRNA 送達能の評価

最後に in vivo における tLNP による核酸送達能を評価した。マウス尾部皮下の細胞懸濁液と蛍光標識した tLNP および ntLNP をインキュベートし、フローサイトメトリーにより LEC における LNP 取り込みを定量した(図 6 左)。その結果、tLNP において ntLNP よりも高い取り込み量が認められた。一方で、コントロール細胞である血管内皮細胞ではそのような増大は認められなかった。また、ネガティブコントロールとしてヒトポドプラニンに対する抗体を結合させた場合と比較して、マウス抗体を結合させた場合に有意な取り込み増大が見られたことから、確かに抗体がマウスポドプラニンを認識することにより LNP の取り込みが増大していることが示された(図 6 右)。以上の結果は、LNP に簡便かつ迅速な抗体結合法として CLIP 法が有用であることを示唆

している。今後は LEC 以外の標的化 LNP の作成へと展開し、様々な疾患へと応用していきたい。

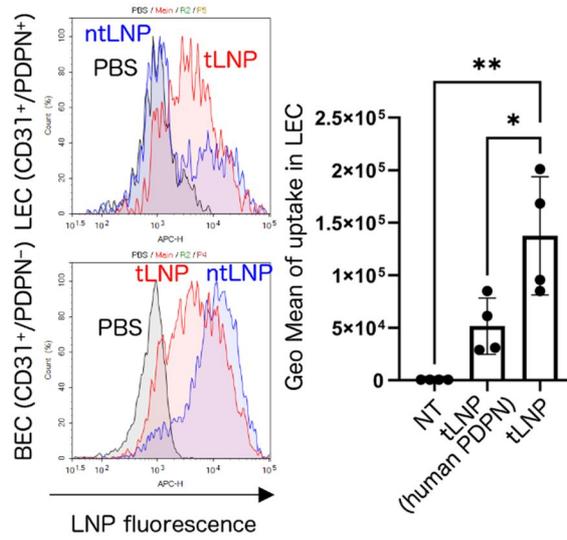


図 6 tLNP による in vivo の siRNA 送達評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Cho Riki, Sakurai Yu, Jones Haleigh Sakura, Akita Hidetaka, Hisaka Akihiro, Hatakeyama Hiroto	4. 巻 12
2. 論文標題 Silencing of VEGFR2 by RGD-Modified Lipid Nanoparticles Enhanced the Efficacy of Anti-PD-1 Antibody by Accelerating Vascular Normalization and Infiltration of T Cells in Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3630～3630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12123630	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 Gomi Masaki, Sakurai Yu, Okada Takaharu, Miura Naoya, Tanaka Hiroki, Akita Hidetaka	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of Sentinel LN Imaging with a Combination of HAase Based on a Comprehensive Analysis of the Intra-lymphatic Kinetics of LPs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 225～235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2020.09.014	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 Yamada Yuma, Munechika Reina, Satrialdi, Kubota Fumika, Sato Yusuke, Sakurai Yu, Harashima Hideyoshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Mitochondrial Delivery of an Anticancer Drug Via Systemic Administration Using a Mitochondrial Delivery System That Inhibits the Growth of Drug-Resistant Cancer Engrafted on Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2493～2500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.04.020	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 Sakurai Yu, Mizumura Wataru, Ito Kenichiro, Iwasaki Kazuhiro, Katoh Takayuki, Goto Yuki, Suga Hiroaki, Harashima Hideyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Improved Stability of siRNA-Loaded Lipid Nanoparticles Prepared with a PEG-Monoacyl Fatty Acid Facilitates Ligand-Mediated siRNA Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1397～1404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00087	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 Sakurai Yu, Kato Akari, Harashima Hideyoshi	4. 巻 525
2. 論文標題 Involvement of Caveolin-1-mediated transcytosis in the intratumoral accumulation of liposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 313 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.086	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 Tanaka Hiroki, ...Sakurai Yu, Ueda Keisuke, Higashi Kenjiro, Moribe Kunikazu, Shinsho Eiji, Nishida Ruka, Fukuzawa Kaori, Yonemochi Etsuo, Okuwaki Koji, Mochizuki Yuji, Nakai Yuta, Tange Kota, Yoshioka Hiroki, Tamagawa Shinya, Akita Hidetaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Self Degradable Lipid Like Materials Based on "Hydrolysis accelerated by the intra Particle Enrichment of Reactant (HyPER)" for Messenger RNA Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 1910575 ~ 1910575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.201910575	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 櫻井遊、阿部のどか、小笠原諭、加藤幸成、村田武士、丹下耕太、中井悠太、吉岡宏樹、玉川晋也、田中浩揮、秋田英万
2. 発表標題 リンパ管内皮細胞を標的とする核酸搭載脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五味昌樹、櫻井遊、田中浩揮、秋田英万
2. 発表標題 リポソームの物性制御によるリンパ節標的技術の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井健太、櫻井遊、千田克幸、梅原健太、降幡知巳、秋田英万
2. 発表標題 リンパ管内皮細胞の共移植がメラノーマの腫瘍微小環境に与える影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井瑞貴、大東昂良、田中浩揮、三浦尚也、櫻井遊、秋田英万
2. 発表標題 脾臓に対する抗炎症薬送達(RISET療法)の動態およびメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井瑞貴、大東昂良、田中浩揮、三浦尚也、櫻井遊、秋田英万
2. 発表標題 抗炎症薬搭載ナノ粒子による脾臓を標的とした新規がん治療戦略の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三山亮、田中浩揮、中井悠太、櫻井遊、玉川晋也、丹下耕太、秋田英万
2. 発表標題 人工mRNAベクターを基盤とするT細胞エンジニアリング技術の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大山遼太郎、館下菜穂、Jessica Anindita、田中浩揮、三浦尚也、櫻井遊、石亀晴道、岡田峰陽、秋田英万
2. 発表標題 mRNAとビタミンE足場型の新規pH応答性材料を基盤とするがんワクチン技術の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井瑞貴、田中浩揮、櫻井遊、秋田英万
2. 発表標題 エマルション型ナノ粒子製剤における薬物の疎水性が血中動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井遊、五味昌樹、三浦尚也、田中浩揮、秋田英万
2. 発表標題 リポソームのリンパシステム内動態の網羅的解析とセンチネルリンパ節イメージングへの応用
3. 学会等名 第44回リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井健太、櫻井遊、千田克幸、梅原健太、降幡知己、秋田英万
2. 発表標題 原発巣リンパ管内皮細胞がメラノーマのリンパ節転移に与える影響の解析
3. 学会等名 第44回リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千田克幸、櫻井遊、新井健太、梅原健太、増田豪、大槻純男、降幡知巳、田中浩輝、秋田英万
2. 発表標題 リンパ節高転移性メラノーマ細胞株の樹立とタンパク質発現の解析
3. 学会等名 第44回リンパ学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大山遼太郎、館下菜穂、Jessica Anindita、田中浩揮、三浦尚也、櫻井遊、石亀晴道、岡田峰陽、丹下耕太、中井裕太、吉岡宏樹、秋田英万
2. 発表標題 ビタミンE足場型pH応答性新規材料を基盤とするmRNAがんワクチンの開発
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井瑞貴、大東昂良、田中浩揮、三浦尚也、櫻井遊、秋田英万
2. 発表標題 抗腫瘍免疫の正常化を目的とした脾臓の炎症環境の改善：RISSET療法の提唱
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三山亮、田中浩揮、中井悠太、櫻井遊、玉川晋也、丹下耕太、秋田英万
2. 発表標題 人工mRNAベクターを基盤とするT細胞エンジニアリング技術の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 センチネルリンパ節イメージング剤	発明者 秋田英万、櫻井遊、 五味昌樹、田中浩揮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-044942	出願年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------