

56	新規機能性分子修飾核酸封入脂質ナノ粒子の開発と応用	川上 茂
----	---------------------------	------

【目的】 mRNA 封入脂質ナノ粒子 (LNP) は mRNA ワクチンとして実用化されたが、*in vitro* 発現能を生かしたデザイナー細胞創出、様々な細胞を標的とした治療薬としても期待されている。本研究では、配向性を制御した標的指向型 mRNA/LNP 製剤ならびにその大量調製法の開発を目的として、(i) 細胞膜への結合を高める新規 (EK)₄-KK-HFQ (High Functionality and Quality : 高機能・高品質) 脂質の開発、(ii) (EK)₄-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の迅速後修飾・マイクロ流体法による調製法の開発、(iii) 配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP 開発に向けた Fc 領域 (FcR) 結合性ペプチドおよびクリック反応結合が可能な Alkyne 基-HFQ 脂質の開発、(iv) ゲノム編集ツールを搭載した mRNA/LNP 製剤の開発を行った。

【方法】 mRNA/LNP はマイクロ流体デバイスを用いて調製した。発現を評価するためにホタルルシフェラーゼをコードした mRNA を用いた。各 HFQ 脂質は固相合成法により合成し、HPLC で精製を行った。評価方法としては、各 HFQ 脂質修飾が及ぼす物理化学的性質および品質への影響を明らかにした。また、細胞結合に影響を与える機能性分子修飾の効果については、細胞結合や細胞内化機構の解析を行った。mRNA/LNP の発現への影響については、ルシフェラーゼ活性の評価を行った。マイクロ流体・後修飾法については、マイクロ流路の2つの流路のうち、PEG 化リポソーム、mRNA/LNP、小型細胞外小胞 (sEVs) を片方の流路に HFQ 脂質をもう片側の流路にセットし、迅速混合を利用した新たなフロー調製を行い、物理化学的性質、品質、細胞結合性に与える影響を解析した。

【結果】 (i) 細胞膜への結合を高める新規 (EK)₄-KK-HFQ 脂質の開発に関しては、様々な誘導体を合成して、ペプチド配列が細胞結合性に与える影響を明らかにした。また、(EK)₄-KK-HFQ 脂質は PEG 化リポソームや mRNA/LNP の物理化学的性質や品質に大きく影響を与えることなく (EK)₄-KK 修飾を施すことが可能であり、それぞれの細胞結合性を有意にあげることができた。(EK)₄-KK-HFQ 脂質で修飾した mRNA/LNP は、電荷的に安全とされるほぼ中性の電荷を保ちながらも、A549 細胞、DC2.4 細胞、C2C12 細胞において 85~300 倍という発現を大幅に上げることができると、今後のデザイナー細胞樹立において有益なツールとなり得ることが示された。(ii) (EK)₄-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の迅速後修飾・マイクロ流体法による調製法の開発に関しては、本法を用いて PEG 化リポソーム、mRNA、sEVs の (EK)₄-KK-HFQ 脂質による機能化ができることを証明した。(iii) 配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP 開発に向けた Fc 領域 (FcR) 結合性ペプチドおよびクリック反応結合が可能な Alkyne 基-HFQ 脂質の開発については、各々の HFQ 脂質を用いて、新たな配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP の開発を行うことに成功した。(iv) ゲノム編集ツールを搭載した mRNA/LNP 製剤の開発については、Cas9 mRNA およびがん抑制遺伝子 PTEN を認識する sgRNA の設計・合成に成功した。今後は、各 HFQ 脂質修飾 LNP に内封してゲノム編集薬としての研究を行う。

PEG 化リポソーム、mRNA/LNP、sEVs のマイクロ流体・迅速後修飾法

