

環境応答性脂質様材料を基盤とした mRNA デリバリー技術

田中 浩揮*, 秋田 英万*

messenger RNA Delivery System Using Ionizable Lipids

Hiroki TANAKA * and Hidetaka AKITA *

1. はじめに

インビトロ転写反応により合成される *in vitro* transcribed messenger RNA (IVT-mRNA) は、生体内へ導入されると細胞質でタンパク質へと翻訳される。IVT-mRNA はその塩基配列を設計することにより、天然・非天然を問わず、多様なタンパク質を生体へと導入できることから、次世代の遺伝子治療を担う核酸として期待されている。特に、IVT-mRNA に病原体のタンパク質をコードしたうえで生体内に投与する RNA ワクチンの技術は、2019 年に発生した新型コロナウイルスによるパンデミックに対する決定的な対抗策となった。本 RNA ワクチンが、ウイルスのゲノム配列の同定からわずか 1 年以内に実用化されたことは、遺伝情報を基盤とする迅速な創薬が可能な mRNA 医薬品の有用性を端的に示すものといえよう。

RNA 分子を用いた遺伝子導入は 1980 年代から試みられてきたが、当時の技術で作成された RNA は、場合によって細胞死を引き起こすほどの強い免疫応答を引き起こしたため、医療応用を考える際の障壁になると認識されていた。しかし、このような激しい応答の引き金となる免疫活性化のメカニズム

が明らかになるにつれ、IVT-mRNA の免疫刺激性が Cap1 構造の付加、RNA 分子の精製、化学修飾塩基の導入などといった RNA 分子のクオリティの向上により、回避できることが明らかとなってきた。

一方、IVT-mRNA は酵素分解に脆弱な分子であり、生体へそのままの形で導入されると容易に破壊されて、機能を失う。また、負電荷かつ水溶性のポリマーであるため、細胞膜を超えて作用部位である細胞質へ自発的にたどり着くことは困難である。このことから、IVT-mRNA を生体内で機能させるためには、本分子の安定性を高めつつ細胞質へと送り届けるための Drug Delivery System (DDS) が必要となる。

本稿では、RNA ワクチンの実用化を導いた脂質ナノ粒子 (LNP) 技術において、その機能で重要な役割を果たす環境応答性の脂質材料について概説する。

2. pH 感受性脂質による細胞内動態の制御

任意の遺伝情報をコードさせた核酸分子を細胞内へ導入し、細胞自身にタンパク質を発現させるとい

* 東北大学薬学部・大学院薬学研究科 薬物送達学分野 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3 (〒980-8578)

Laboratory of DDS Design and Drug Disposition, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

う試みは、長年の間、プラスミド DNA 分子を用いて行われてきた。DNA もまた負電荷かつ水溶性のポリマーであり、細胞質へ自発的に到達することは困難である。DNA を細胞へ導入するため、正電荷を有するカチオン性ポリマーやカチオン性脂質が開発されてきた。これらの材料は、静電的相互作用により核酸をナノサイズの粒子へと凝縮化できる。更に、形成したナノ粒子表面の正電荷が細胞表面の負電荷成分と相互作用するため、細胞内へ核酸を効率的に送達することができる。

一方でカチオン性材料は、核酸の過剰な凝縮化や生体分子との非特異的な相互作用を介して毒性を誘起するなどの問題を抱えていた。これらのカチオン性材料の問題点は、分子内に含まれる第四級アンモニウム塩構造が、周囲の環境を問わず常に正電荷を帯びており、非特異的な静電的相互作用を引き起こすことに由来する。このため、必要な時・場所においてのみ正電荷を獲得する材料として、pH 感受性脂質が開発された (Fig. 1)。pH 感受性脂質は、酸性環境下においてのみプロトン化を受ける第三級アミン構造を有するため、酸性緩衝液を用いた製剤化の過程と、細胞内で酸性エンドソーム中から脱出する過程においてのみ、静電的相互作用を発揮することができる。

pH 感受性脂質の開発は、Short interfering RNA (siRNA) の医療応用を目的に行われてきた。siRNA

は 20 塩基対程度の短鎖二本鎖 RNA であり、配列特異的に mRNA をロックダウンすることができる。したがって、疾患の原因となるタンパク質の発現を特異的に抑制し、治療ができる。pH 感受性脂質の siRNA 送達効率、粒子形成を担う疎水性足場と pH 感受性を担う第三級アミンの組み合わせによって決定される。足場構造の検討により、かさ高い足場構造がエンドソーム膜との融合や膜破壊に有効であることが示唆され、脂肪酸鎖としては不飽和結合を二つ有するリノール酸が優れている。また、一般に遊離の第三級アミン分子の pKa は 9~12 程度である一方、LNP 表面に濃縮された第三級アミンは 5~8 程度の pKa を示す。LNP 表面の pKa はエンドソーム脱出の効率を左右する極めて重要な性質であり、静脈内投与によってマウス肝臓へ siRNA を送達する場合は、6.2~6.5 の狭い範囲に最適値を有することが明らかとなった。

かさ高い足場構造と最適な pKa を持つ頭部の組み合わせとして見出された化合物が、DLin-MC3-DMA である (Fig. 2)¹⁾。DLin-MC3-DMA に加え、粒子安定化のためのヘルパー脂質としてリン脂質、コレステロール、Polyethylene glycol 結合型脂質 (PEG 脂質) からなる siRNA-LNP は優れた siRNA 送達効率を有し、現在はオンパットロ[®] (トランスサイレチン型アミロイドーシス治療薬) の製剤のなかで、実際に医療へと応用されている。DLin-

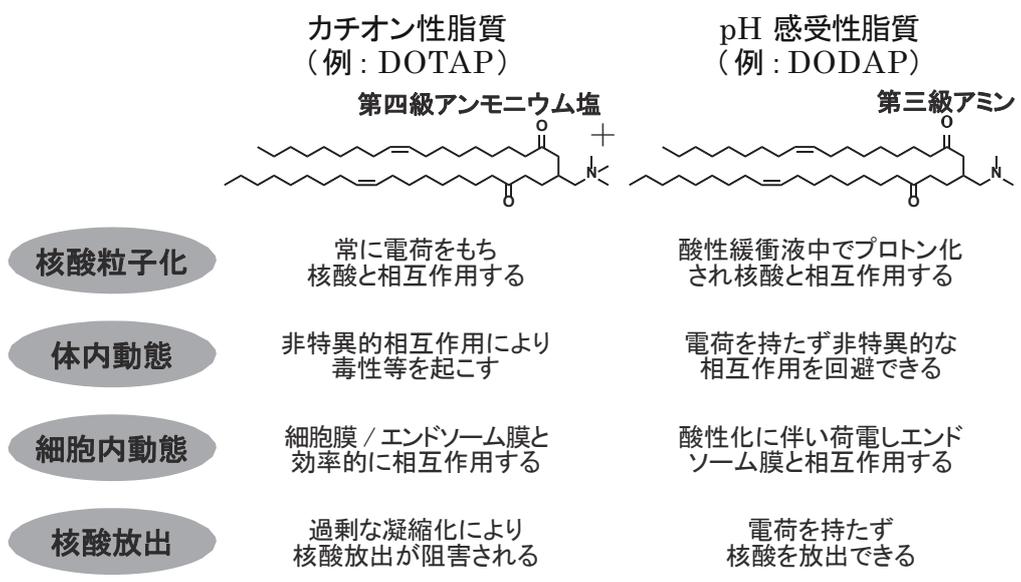


Fig. 1 カチオン性脂質と pH 感受性脂質の比較

MC3-DMA が持つ問題点はその生分解性の低さであり、生体からのクリアランスが非効率的であるため、高投与量時に生体に毒性を示す可能性が示唆されていた。

そこで、安全性の向上を目的に、DLin-MC3-DMA の疎水性足場にエステル結合を導入した pH 感受性脂質が L319 である²⁾。エステル結合の導入位置を検討することで、元となった DLin-MC3-DMA と同等の活性を維持しながらも、投与 24 時間後の肝臓への蓄積性を劇的に低減することに成功した。siRNA-LNP の開発過程において、『かさ高い疎水性足場構造を有すること』、『pKa が 6.2~6.5 程度の値であること』、『分子構造中に生分解性の結合を有すること』の 3 条件を満たす pH 感受性脂質が、RNA 分子の安全かつ効率的な細胞質送達に重要であることが明らかとなった。

3. mRNA-LNP を基盤とする RNA ワクチンの開発

IVT-mRNA は、塩基配列の設計により任意のタンパク質を生体へ導入することができる。これを利用し、病原微生物のタンパク質を IVT-mRNA にコードして生体へ投与する RNA ワクチン技術は、感染症に対する新たな医療のモダリティとして

2010 年代から精力的に開発されてきた。RNA ワクチンの技術が成熟しつつあるなか、SARS-CoV-2 によるパンデミックが発生し、これに対応するために開発された mRNA-LNP 型の RNA ワクチンがスパイクバックス筋注（モデルナ社）及びコミナティ筋注（ファイザー社）である。スパイクバックス筋注に用いられた SM-102 とコミナティ筋注に用いられた ALC-0315 は、どちらもかさ高く、生分解性を有する疎水性足場を有しており、siRNA-LNP の知見が活用されていることがわかる (Fig. 2)。

mRNA-LNP 型の RNA ワクチンは、抗原特異的な濾胞性ヘルパー T 細胞や胚中心 B 細胞の増殖を誘起することができる。このような抗原特異的な獲得免疫の活性化には、抗原タンパク質の導入と同時に自然免疫系の活性化が必須である。RNA ワクチンに含まれる IVT-mRNA には、自然免疫系の刺激を回避するような工夫が施されていることから、LNP 自身が自然免疫系を活性化している可能性が考えられる。実際に、抗原タンパク質と核酸を含まない empty-LNP (eLNP) を混合して投与すると、血中抗体価の上昇がみられ、所属リンパ節における抗原特異的な濾胞性ヘルパー T 細胞の増加や胚中心 B 細胞の成熟といった、mRNA-LNP ワクチンの機能が再現された³⁾。eLNP の免疫刺激性は pH 感受性脂質に依存しており、pH 感受性脂質を含まない粒

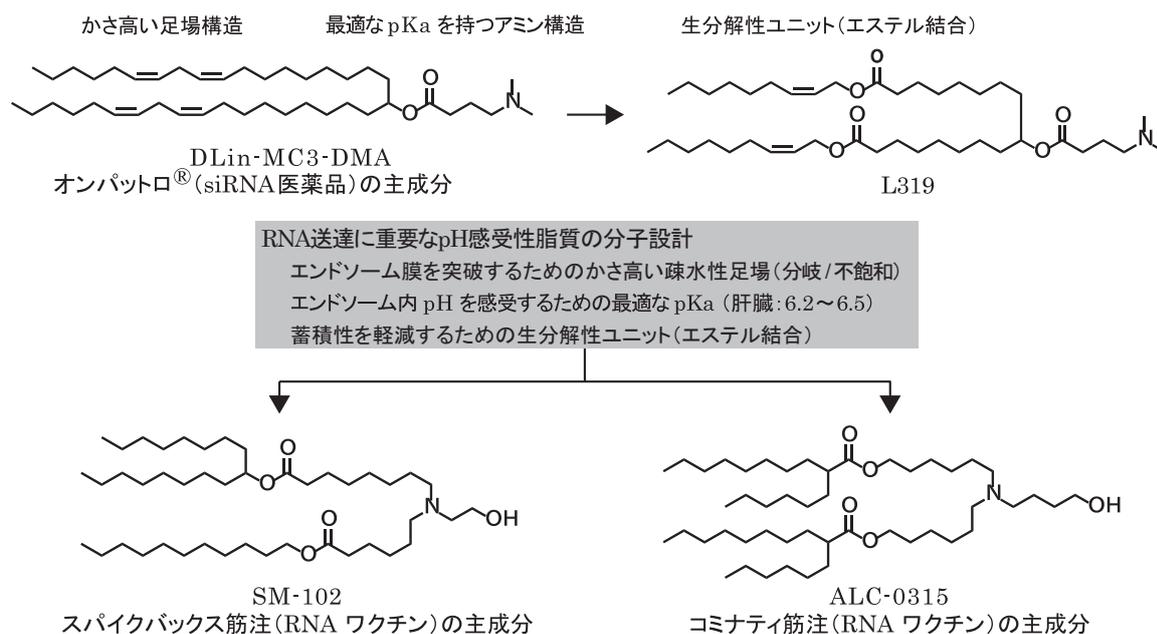


Fig. 2 RNA 医薬品に使用された pH 感受性脂質

子では上記のような抗体の産生が見られない。

LNPの投与から24時間後、投与部位である皮下や筋肉において $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 等の炎症性サイトカインと、 Ccl2 、 Ccl7 等のケモカインの産生が観察され、単球や好中球の浸潤が認められた⁴⁾。eLNPのアジュバント能にはDose依存性があり、脂質量として $125\mu\text{g}$ のLNPを抗原とともに投与した場合には、アラムアジュバントとMPLAの混合物に匹敵する抗体産生を引き起こした。また、LNPと抗原を別の部位に投与した場合や、LNPの投与部位へ投与24時間後に抗原を投与した場合には、抗体産生は認められていない⁵⁾。これらの結果から、LNPによる炎症は、局所的かつ一時的なものであることが示唆されている。このような自然免疫の活性化はRNAワクチンが機能するためには極めて重要であるものの、LNPのどのような因子が免疫活性化を誘導するのか、更に、どのような細胞、更には受容体が生体内でそれを感知するのかについて、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

4. 免疫刺激性の回避

上述の通り、LNPは免疫系を刺激する能力が備わっていたため、RNAワクチンを成立させるための基盤技術となった。しかし、ワクチン以外の遺伝子治療を考えた際には、LNPの免疫刺激性が治療用タンパク質に対する獲得免疫を活性化する懸念がある。このことから、mRNA医薬品の対象疾患を拡大するためには、LNPの免疫刺激性を回避しなければならない。

免疫刺激の回避を目的に現在行われている戦略が、ステロイド系抗炎症薬の併用である。構造安定化を目的に、LNPに含有されているコレステロールの一部をデキサメタゾンに置換することで、血中の $\text{TNF}\alpha$ の上昇を回避することができる⁶⁾。また、ステロイドを長期にわたりナノ粒子に保持させる目的で、薬物の脂質誘導体化についても検討が進められている。mRNA-LNPの自己投与を目指して、ステロイド系抗炎症薬であるロフレポニドとブデゾニドの脂質誘導体化とLNPへの搭載が行われた。

本LNPは投与部位における自然免疫の活性化を防ぐことが可能であり、線維芽細胞成長因子21(FGF21)を搭載した免疫回避型のmRNA-LNP皮下

に繰り返し投与することで、血中のFGF濃度の維持と肥満マウスに対する治療効果が確認されている⁷⁾。

5. 終わりに

LNPを代表とする脂質型のmRNAベクターは優れた遺伝子導入効率を持つ。また、本来備わった免疫刺激性はmRNA-LNPのRNAワクチンへの応用に極めて有用であった。しかしながら、mRNA-LNPの高い遺伝子導入効率を遺伝子治療へと幅広く応用するためには、免疫刺激性の原因を理解し戦略的に回避することが必須であろう。

文献

- 1) Semple, S.C.; Akinc, A.; Chen, J.; Sandhu, A.P.; Mui, B. L.; Cho, C. K.; Sah, D.W.; Stebbing, D.; Crosley, E. J.; Yaworski, E.; Hafez, I. M.; Dorkin, J. R.; Qin, J.; Lam, K.; Rajeev, K. G.; Wong, K. F.; Jeffs, L. B.; Nechev, L.; Eisenhardt, M. L.; Jayaraman, M.; Kazem, M.; Maier, M. A.; Srinivasulu, M.; Weinstein, M. J.; Chen, Q.; Alvarez, R.; Barros, S. A.; De, S.; Klimuk, S. K.; Borland, T.; Kosovrasti, V.; Cantley, W. L.; Tam, Y. K.; Manoharan, M.; Ciufolini, M. A.; Tracy, M. A.; de Fougères, A.; MacLachlan, I.; Cullis, P. R.; Madden, T. D. and Hope, M. J. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* 2010, **28** (2), p.172-176.
- 2) Maier, M. A.; Jayaraman, M.; Matsuda, S.; Liu, J.; Barros, S.; Querbes, W.; Tam, Y. K.; Ansell, S. M.; Kumar, V.; Qin, J.; Zhang, X.; Wang, Q.; Panesar, S.; Hutabarat, R.; Carioto, M.; Hettlinger, J.; Kandasamy, P.; Butler, D.; Rajeev, K. G.; Pang, B.; Charisse, K.; Fitzgerald, K.; Mui, B. L.; Du, X.; Cullis, P.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Manoharan, M. and Akinc, A. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther.* 2013, **21** (8), p.1570-1578.
- 3) Alameh, M. G.; Tombácz, I.; Bettini, E.; Lederer, K.; Sittplangkoon, C.; Wilmore, J. R.; Gaudette, B. T.; Soliman, O. Y.; Pine, M.; Hicks, P.; Manzoni, T. B.; Knox, J. J.; Johnson, J. L.; Laczkó, D.; Muramatsu, H.; Davis, B.; Meng, W.; Rosenfeld, A. M.; Strohmeier, S.; Lin, P. J. C.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Karikó, K.; Jacquet, A.; Krammer, F.; Bates, P.; Cancro, M. P.; Weissman, D.; Prak, E. T. Luning; Allman, D.; Locci, M. and Pardi, N. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T

- follicular helper cell and humoral responses. *Immunity*. 2021, **54** (12), p. 2877-2892. e7.
- 4) Ndeupen, S.; Qin, Z.; Jacobsen, S.; Bouteau, A.; Estantboui, H. and Igyártó, B. Z. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience*. 2021, **24** (12), 103479.
- 5) Thoryk, E. A.; Swaminathan, G.; Meschino, S.; Cox, K. S.; Gindy, M.; Casimiro, D. R. and Bett, A. J. Co-Administration of Lipid Nanoparticles and Sub-Unit Vaccine Antigens Is Required for Increase in Antigen-Specific Immune Responses in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2016, **4** (4), 47.
- 6) Zhang, H.; Han, X.; Alameh, M. G.; Shepherd, S. J.; Padilla, M. S.; Xue, L.; Butowska, K.; Weissman, D. and Mitchell, M. J. Rational design of anti-inflammatory lipid nanoparticles for mRNA delivery. *J Biomed Mater Res A*. 2022, **110** (5), p.1101-1108.
- 7) Bartesaghi, S.; Wallenius, K.; Hovdal, D.; Liljeblad, M.; Wallin, S.; Dekker, N.; Barlund, L.; Davies, N.; Seeliger, F.; Winzell, M. S.; Patel, S.; Theisen, M.; Brito, L.; Bergenhem, N.; Andersson, S. and Peng, X. R. Subcutaneous delivery of FGF21 mRNA therapy reverses obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022, **28**, p.500-513.