

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科
千葉大学大学院薬学研究院

**任意の mRNA を簡便に搭載可能な
凍結乾燥脂質ナノ粒子製剤の開発**
誰でも簡単に使用できる製剤により mRNA の医療応用の加速に期待

【発表のポイント】

- ・ 任意のメッセンジャーRNA(mRNA)の水溶液を凍結乾燥体に加えることで、脂質ナノ粒子製剤の調製が可能な技術を開発した。
- ・ 様々な機器やノウハウを必要とする従来法に比べ、温度制御機器があれば使用可能であるため、誰でも簡単に mRNA の治療コンセプトを検証できる。
- ・ 様々なタンパク質をコードした mRNA だけでなく比較的低分子量の核酸も搭載でき、両者を同時に導入する必要がある遺伝子編集にも応用できる。

【概要】

近年、新型コロナウイルスワクチンの開発に見るように、体外で人工的に作成したタンパク質の設計図である *In vitro* transcribed-mRNA (IVT-mRNA^{注1}) を生体へと導入することで、治療用タンパク質を体に導入する技術が注目を集めています。

IVT-mRNA は体内での分解性が極めて高く、そのままの投与でタンパク質を効率的に産生させることは困難です。そこで、IVT-mRNA を細胞の内部まで送り届けるため、脂質から構成されたナノカプセル Lipid Nanoparticle (LNP^{注2}) が開発されました。IVT-mRNA を内部に封入した LNP (mRNA-LNP) は、細胞外で IVT-mRNA を保護し IVT-mRNA を細胞内へ送り届ける役割を持ちます。しかしその製造には高価な機器やそれらを使用するための経験が必要でした。

東北大学大学院薬学研究科の秋田英万教授、千葉大学大学院薬学研究院の田中浩揮助教を中心とする研究グループは、LNP を凍結乾燥させた固形製剤に任意の IVT-mRNA を加えて短時間加熱するだけで mRNA-LNP が調製できる技術を開発しました。中空の LNP と IVT-mRNA を混合した状態で熱のエネルギーを加えると、カプセルの構造が変化して IVT-mRNA が自発的に内封されます。この方法で作成された mRNA-LNP は従来の技術で作成された mRNA-LNP と同等の構造を有し、血液中に投与した場合においても同等の活性を発揮します。

本製剤を利用すれば、誰でも簡単に mRNA-LNP を調製できることから、mRNA 創薬を劇的に加速できると期待されます。

本成果は 2023 年 1 月 31 日(現地時間)に ACS Nano 誌電子版に掲載されました。

【詳細な説明】

研究背景

近年、体外で合成された IVT-mRNA を生体へ導入し、任意のタンパク質を発現させて治療を行う mRNA 医薬品が注目を集めています。メッセンジャーRNA (messenger RNA; mRNA) は、遺伝情報である DNA から転写^{注3}されてできる核酸分子であり、細胞内で翻訳^{注4}によりタンパク質を合成する際の設計図の役割を担います。IVT-mRNA は効率的にタンパク質を導入できるだけでなく、遺伝子の発現が一過的かつ細胞が持つ DNA に悪影響を持たないため、安全な遺伝子治療^{注5}を実現できるとして期待されています。特に、外来の病原微生物が持つタンパク質を IVT-mRNA の形で生体へ導入して感染防御を行う RNA ワクチン^{注6}の技術は、SARS-CoV-2 のパンデミックへの対応策として既に医療応用がなされています。IVT-mRNA は、アミノ酸の配列が既知のタンパク質であれば、原理上はどのようなタンパク質に対しても適応可能であると考えられるため、RNA ワクチンだけではなく様々な医療応用が期待されています。

RNA 分子は生体内では容易に分解されてしまいます。そこで、細胞外では IVT-mRNA を保護し、細胞内へと送り届けるための技術として LNP が実用化されています。LNP は pH 感受性脂質^{注7}を主成分とし、細胞内外の環境を感受して性質を変化させることで、細胞内へ効率的に IVT-mRNA を導入することができます。しかし、mRNA を内部に封入した mRNA-LNP は、水に溶けやすい IVT-mRNA とアルコールや油に溶けやすい脂質の複合体であるため、その作成には水とアルコールを制御しながら混合するためのマイクロ流体デバイス^{注8}などが必要とされてきました。また、調製直後の mRNA-LNP にはアルコール等が含まれており、そのままでは生体へ投与できないため、ろ過を行って不要な成分を取り除く必要がありました。これらのプロセスは高額な機器とノウハウを必要とするため mRNA-LNP の調製は非常に難しく、多くの研究者が本技術を容易に利用できる状況ではありませんでした。

研究内容

東北大学大学院薬学研究科の秋田英万教授、千葉大学大学院薬学研究院の田中浩揮助教、日油株式会社を中心とする研究グループでは、簡単に mRNA-LNP を調製する技術が開発できれば、mRNA 医薬品の開発が加速できると考えました。特に、事前に作成された中身の入っていない中空の LNP を任意の IVT-mRNA 水溶液と混合するだけで mRNA-LNP が作成できれば、使用者の負担が大きく軽減できると考え、Ready-to-Use 型、つまり必要に応じてすぐに使用可能な LNP (LNP(RtoU)) 製剤の開発をすすめました。研究グループは凍結乾燥の技術に着目し、IVT-mRNA の水溶液で溶かすことで使える乾燥体制剤の開発を試みました(図1)。

実験計画法^{注9}を用いた検討と検証実験の結果、LNP(RtoU)を用いて mRNA-LNPs を作成するために重要な条件は、LNP(RtoU)と IVT-mRNA の混合時における条件や、加熱温度であることが明らかとなりました。最適な条件で緑色蛍光タンパク質の mRNA を内封した mRNA-LNP は、細胞に対して均一かつ効率的に遺伝子を導入できることがわかりました(図2)。加温の影響に着目し解析を進めたところ、IVT-

mRNA と LNP(RtoU)を混合した状態ではお互いに付着している状態となるものの、加温の過程で吸熱を伴う構造変化が起き、IVT-mRNA が LNP(RtoU)の内側に取り込まれることがわかりました。また、凍結乾燥の過程で LNP(RtoU)の構成成分であるコレステロールが結晶化するものの、加温によりこの結晶が溶け、最終的には従来技術で作成した mRNA-LNP と同様の構造体が形成することを明らかとしました(図3)。

最後に研究グループは LNP(RtoU)を CRISPR/Cas9 をベースとする遺伝子編集^{注10}へと応用しました。本方法では、Cas9 のタンパク質をコードする IVT-mRNA と、ゲノム上の遺伝子編集の場所(今回はトランスサイレチンの遺伝子)を指定するための small guide RNA (sgRNA)を混合溶液とし、LNP(RtoU)の内部へと封入しました。本粒子をマウスへ2回投与すると、マウスの肝臓におけるトランスサイレチンの遺伝子が破壊され、血液中のトランスサイレチンの濃度が低下することが明らかとなりました(図4)。

研究の意義

IVT-mRNA の導入は原理上あらゆるタンパク質に応用可能であることから、ワクチンだけではなく様々な治療に応用できると期待されており、実際にワクチン応用以外の臨床試験も盛んになってきています。中でも mRNA-LNP は、既に RNA ワクチンで使用された実績もあることから利用が広がっています。一方で mRNA-LNP は作成方法が複雑なことが原因となって、誰でも使える技術ではありませんでした。本研究で開発した LNP(RtoU) は、より多くの生命科学研究者に対して、IVT-mRNA を用いた治療戦略の検討の機会を提供し、RNA 医薬品開発を加速できるものとして期待されます。

【謝辞】

本研究は、(国立研究開発法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業科学研究費助成事業 JPMJCR17H1)、日本学術振興会科学研究費助成事業(JP18K18377、JP21K18035、JP19K22948、JP20H00657、JP21K18320)等の研究費支援を受けて実施されました。

説明図

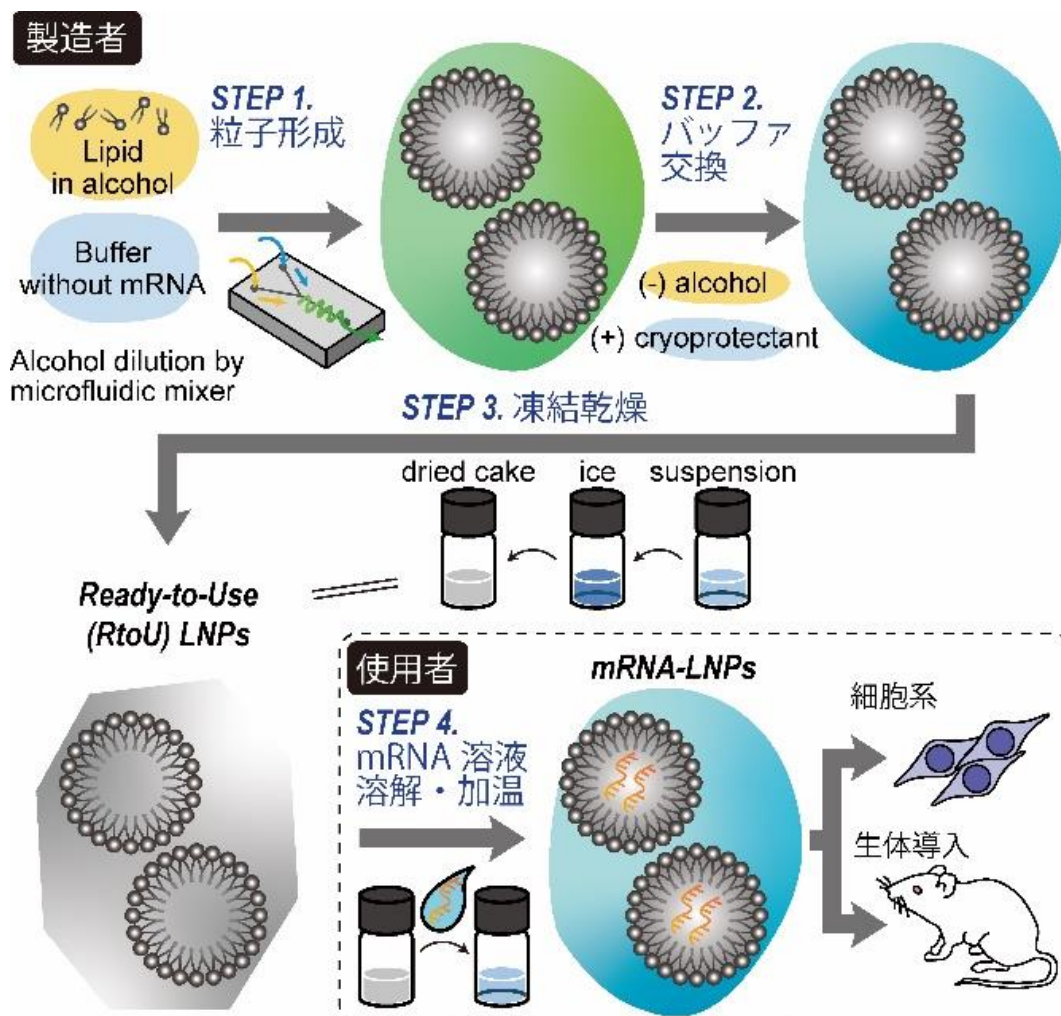


図 1 Ready-to-Use 型 LNP (LNP(RtoU)) の概略図

mEGFP(m1Ψ): 緑色蛍光タンパク質をコードする mRNA

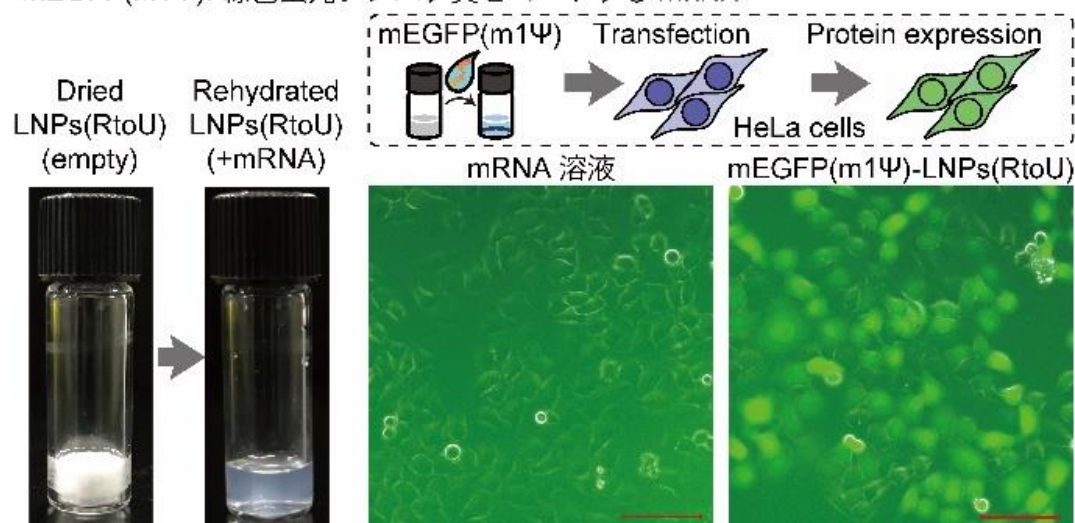


図 2 細胞系における緑色蛍光タンパク質の導入

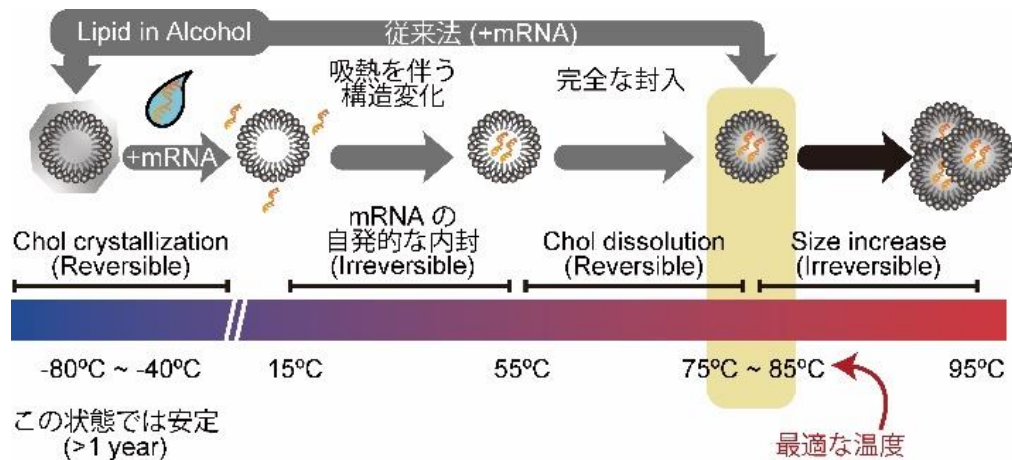


図 3 粒子の加温に対する応答の概念図

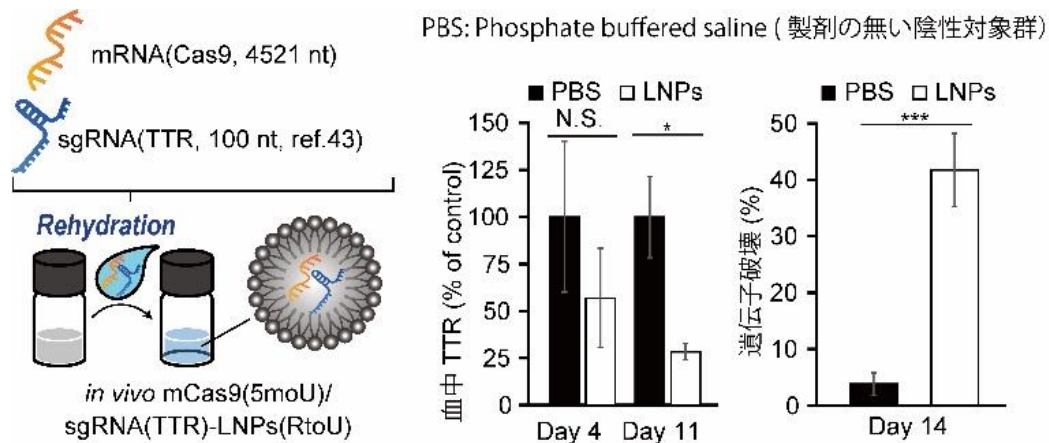


図 4 遺伝子編集への応用

【用語説明】

注1) *In vitro* transcribed-mRNA; IVT-mRNA

生体では核の中で行われる転写を、酵素を混ぜ合わせて試験管内で行う過程がインビトロ転写 (*In vitro* transcription) である。これにより作成された mRNA を IVT-mRNA という。

注2) Lipid Nanoparticle; LNP

水に溶けやすい IVT-mRNA を保護するために開発された、脂質からなるナノカプセルである。両者を複合体化するためには、IVT-mRNA の水溶液と脂質

のエタノール溶液を混合し相互作用させる必要があると考えられてきた。

注3) 転写

遺伝情報は細胞の核に格納された DNA にコードされている。実際にタンパク質を合成する際には、DNA 中の必要な部分をつなぎ合わせた mRNA が必要である。DNA から mRNA を合成する過程が転写である。

注4) 翻訳

mRNA を構成している塩基の配列をタンパク質のアミノ酸の配列に変換する過程が翻訳である。本過程は細胞内に存在するリボソームというタンパク質によって行われる。

注5) 遺伝子治療

DNA や RNA などの核酸を生体へ導入し、生体自らに治療用のタンパク質を発現させて疾患治療を行う治療戦略の総称である。

注6) RNA ワクチン

病原体に由来するタンパク質の情報を IVT-mRNA にコードさせ生体に導入すると、当該のタンパク質を持った微生物に対する獲得免疫を活性化出来る。これを利用したワクチンが RNA ワクチンであり、既に SARS-CoV-2 に対する医薬品が承認されている。

注7) pH 感受性脂質

LNP は細胞へ取り込まれた後、そのままでは分解され活性を失う。これを回避するため、粒子を取り込んだエンドソームの小胞が成熟により酸性化することを利用し、低 pH で膜を破壊する能力を付与された脂溶性分子の総称である。

注8) マイクロ流体デバイス

均一な LNP を調製するためには核酸水溶液と脂質エタノール溶液の混合過程を制御する必要がある。本デバイスは二つの溶液を連続的に混合することが可能な流路型のデバイスであり、現在の mRNA-LNP の調製において主流となっている。

注9) 実験計画法

統計解析を利用し、網羅的な解析を行うことなく複数のパラメータを効率的に評価するための方法論である。本研究では直交表を用いた実験計画法を利用した。

注10) 遺伝子編集

DNA を切断することができるヌクレアーゼ等を利用し、細胞の遺伝情報を書き換える方法である。本研究では、微生物を由来とし特定の遺伝子配列を標的として切断(破壊)することができる CRISPR/Cas9 システムを利用した。

【発表論文】

雑誌名:ACS Nano

論文タイトル:Ready-to-Use-type lyophilized lipid nanoparticle formulation for the post-encapsulation of messenger RNA

(日本語訳:メッセンジャーRNA の後封入のための Ready-to-Use 型 LNP 凍結乾燥製剤)

著者:Hiroki Tanaka, Shinya Hagiwara, Daiki Shirane, Takuma Yamakawa, Yuka Sato, Chika Matsumoto, Kota Ishizaki, Miho Hishinuma, Katsuyuki Chida, Kasumi Sasaki, Etsuo Yonemochi, Keisuke Ueda, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Takashi Tadokoro, Katsumi Maenaka, Sakura Taneichi, Yuta Nakai, Kota Tange, Yu Sakurai, Hidetaka Akita

DOI: [10.1021/acsnano.2c10501](https://doi.org/10.1021/acsnano.2c10501)

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 秋田 英万 (あきた ひでたか)

電話 022-795-6831

E-mail hidetaka.akita.a4@tohoku.ac.jp

千葉大学大学院薬学研究院

助教 田中 浩揮 (たなか ひろき)

電話 043-226-2894

E-mail hiroki_tanaka8922@chiba-u.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

電話 022-795-6801

E-mail ph-som@grp.tohoku.ac.jp

千葉大学広報室

電話 043-290-2018

E-mail koho-press@chiba-u.jp