

機能性脂質ナノ粒子の開発と 標準粒子および長鎖遺伝子導入への応用

北海道大学 大学院工学研究院
応用化学部門 分子機能化学分野
准教授 真栄城 正寿

2025年10月16日

標準粒子：従来技術とその問題点

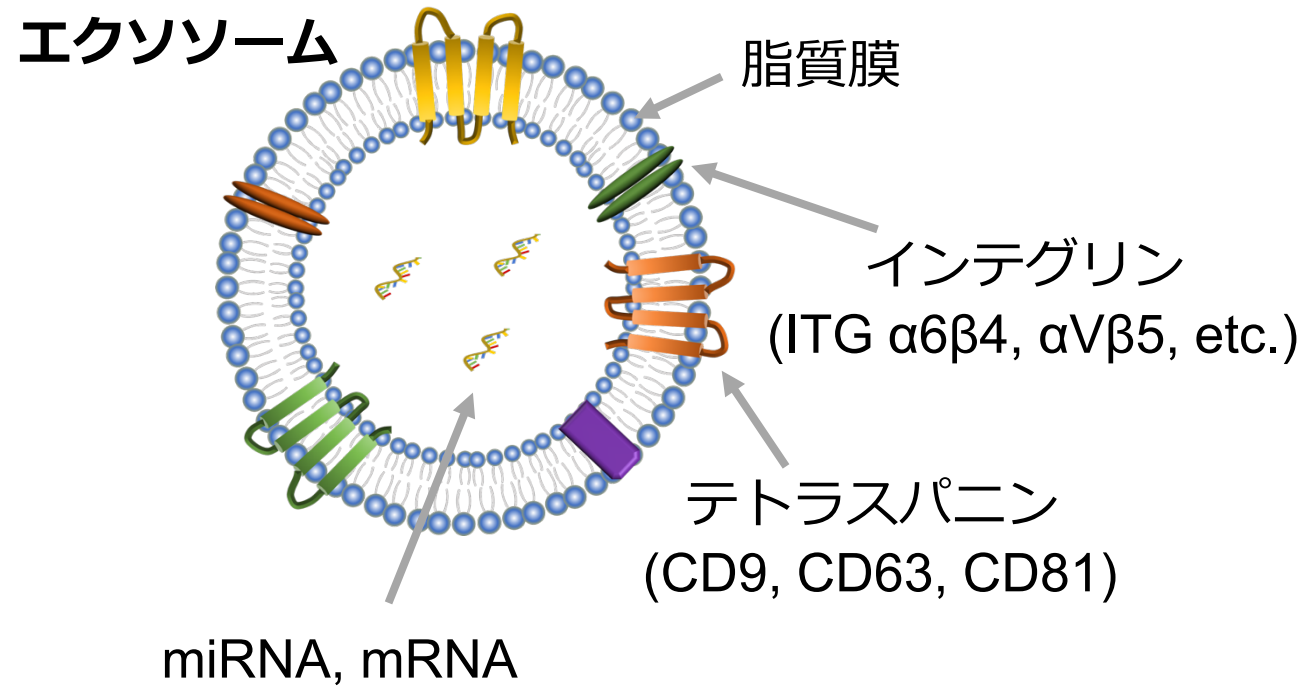
細胞外小胞の1つであるエクソソームは、細胞間の情報伝達を担っており、バイオマーカーや医薬品への応用が期待されている。

一方で、細胞上清から回収されるエクソソームは、多様性に富んでおり、（粒径・脂質組成・表面のタンパク質など）この不均一性の高さが実用化への課題になっている。

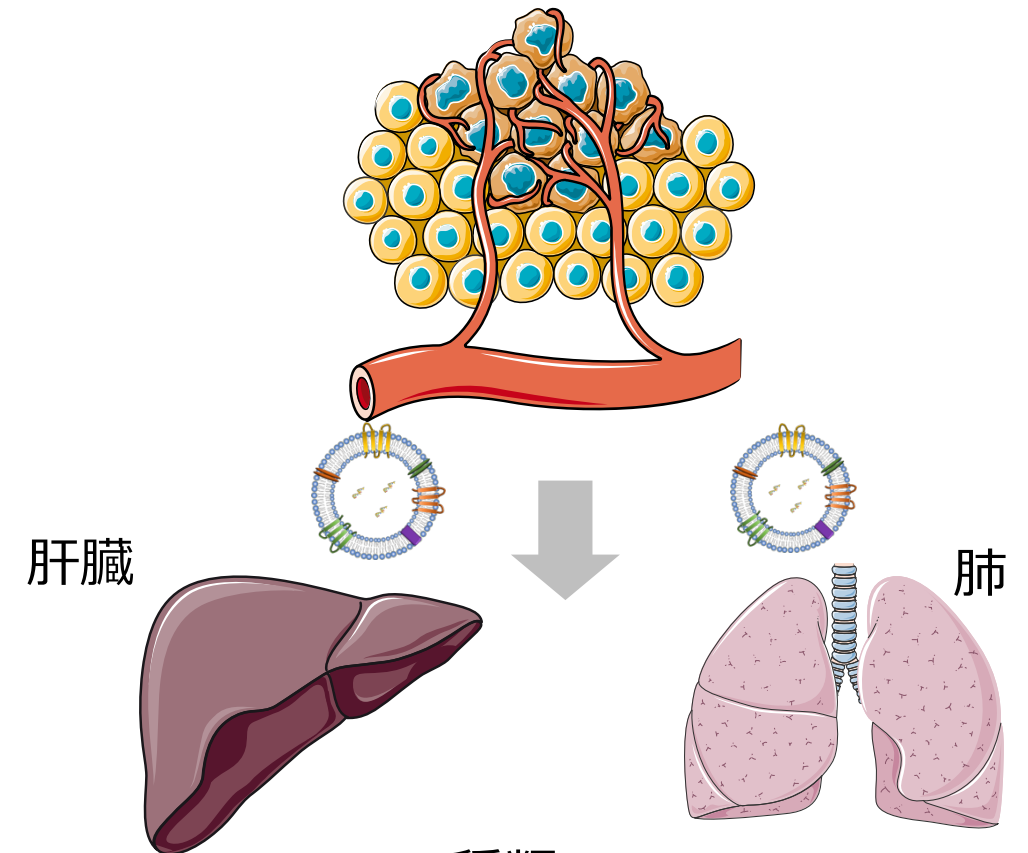
新技術の特徴・従来技術との比較

- 細胞を用いずに, エクソソームを模倣した脂質ナノ粒子の作製に成功した。
- 細胞由来のエクソソームの表面に提示されているCD9, CD63, CD81やインテグリンの提示に成功した。
- 従来技術の問題点であった, エクソソームの不均一性・多様性を解決した。
- 本技術によって, 任意の種類のタンパク質を任意の量, 脂質ナノ粒子の表面に提示できるため, ウイルス様粒子など, 様々な機能性粒子の作製や標準粒子への応用が期待される。

開発の背景と課題



- 粒径が30~150 nmの細胞外小胞の1種
- テトラスパニンやインテグリンが表面に提示
- 細胞由来のmiRNAs, mRNAs, タンパク質を含有
- 細胞間の情報伝達を担っている
- がんの転移や悪性化に関与

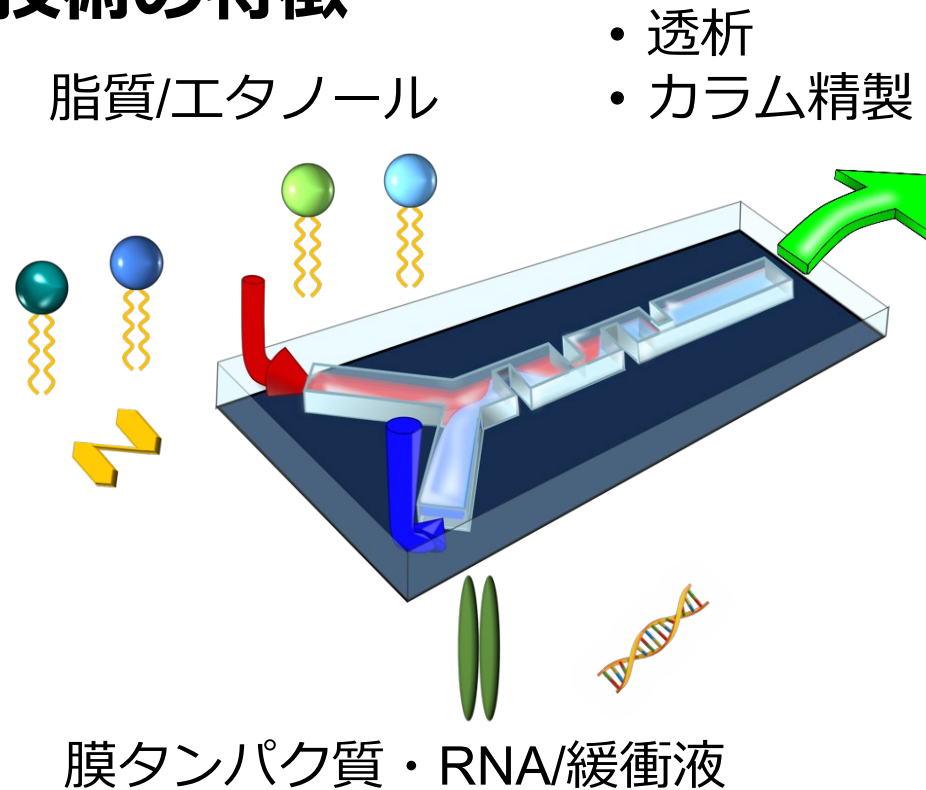


新技術の特徴・従来技術との比較

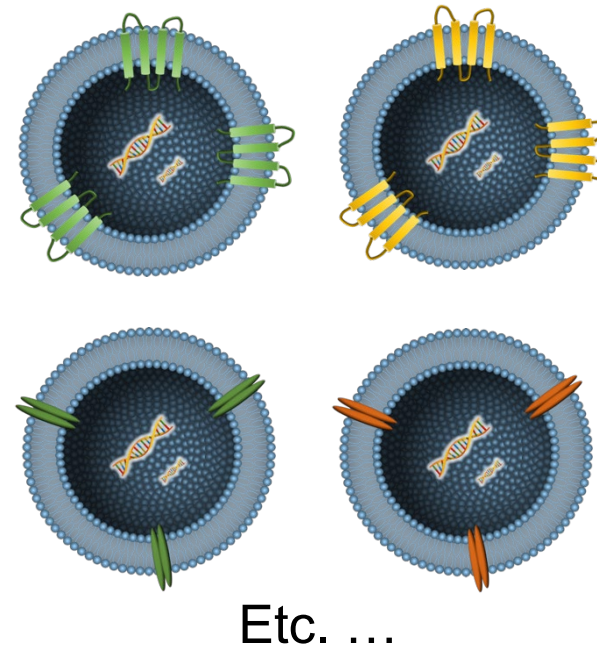
課題

- ・エクソソームの表面タンパク質の機能や役割？
- ・エクソソームの多様性・不均一性が研究の課題

新技術の特徴



エクソソーム様粒子ライブラリー



・テトラスパニンタンパク質

CD9, CD63, CD81

・インテグリン (ITG)

ITG $\alpha V \beta 5$ (肝臓)

ITG $\alpha 6 \beta 4$ (肺)

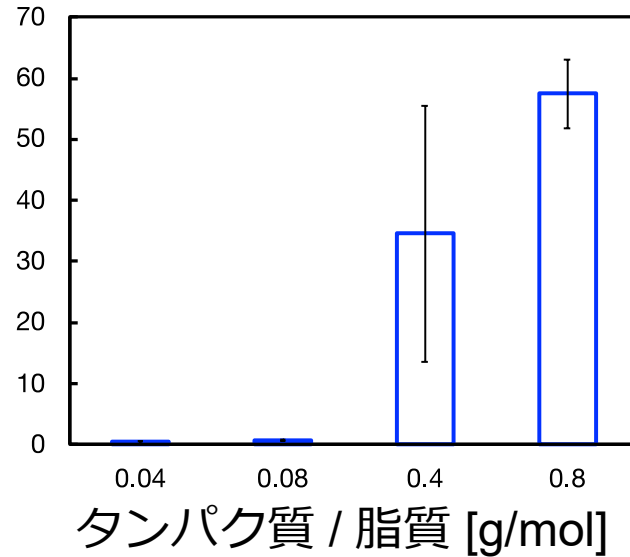
Etc. ...

➡ 標準粒子としての利用やLNPおよびVLPの高機能化

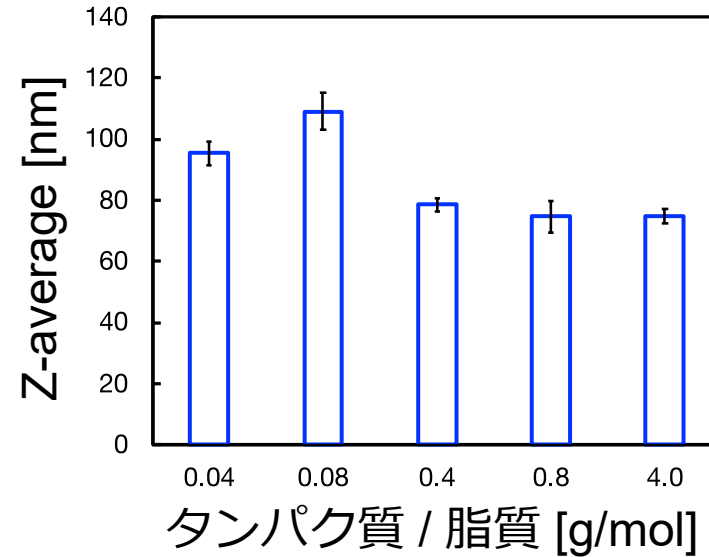
CD63提示エクソソーム様粒子の作製

タンパク質提示量 [ng/mL]

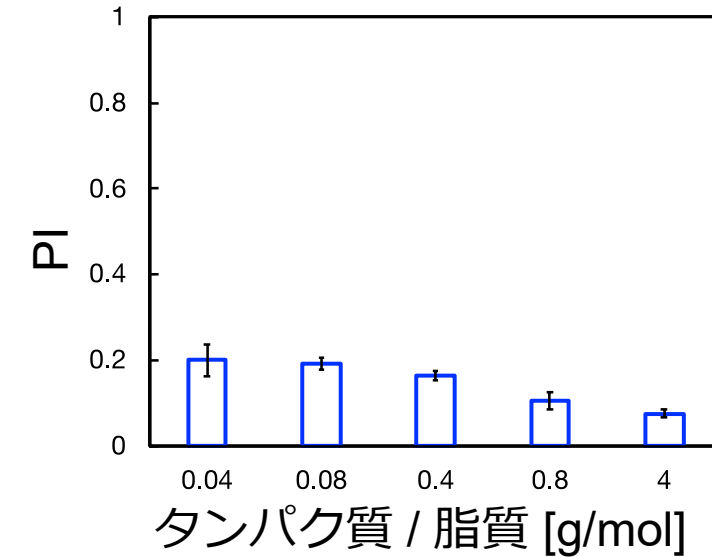
ELISA



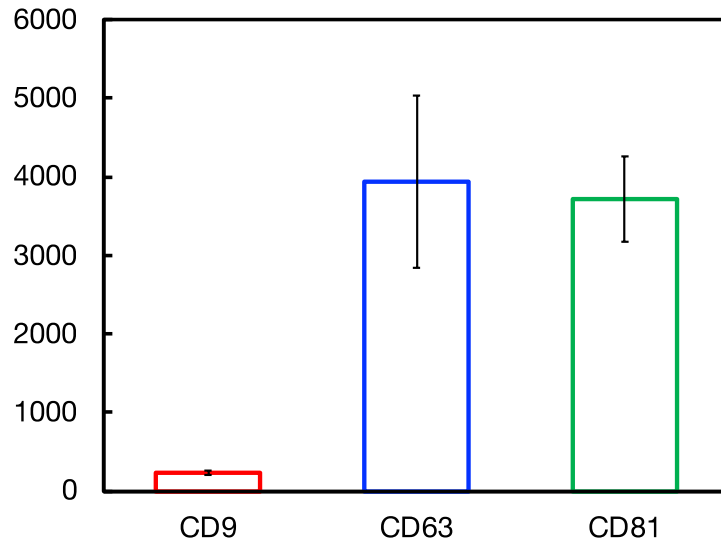
粒径 (DLS)



多分散度 (DLS)

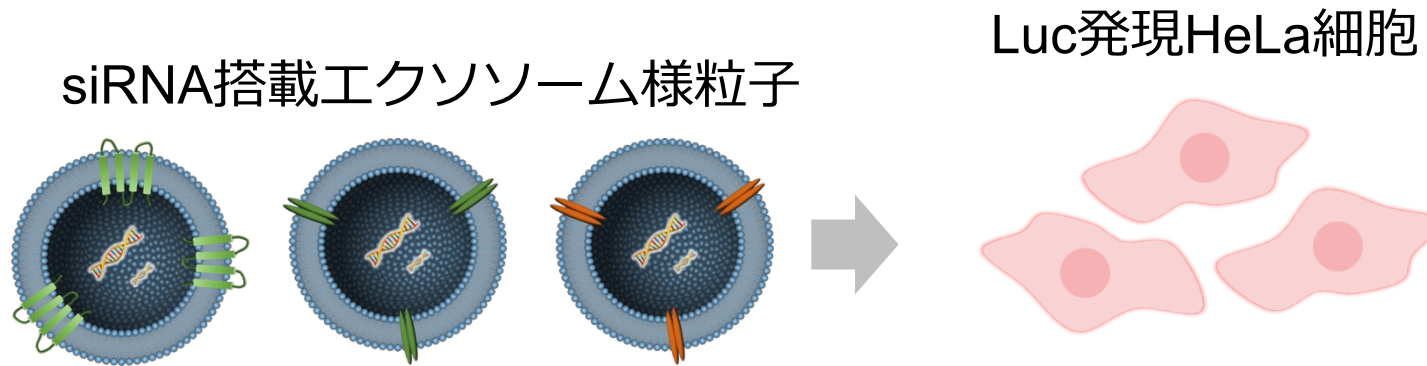


タンパク質提示量 [ng/mL]

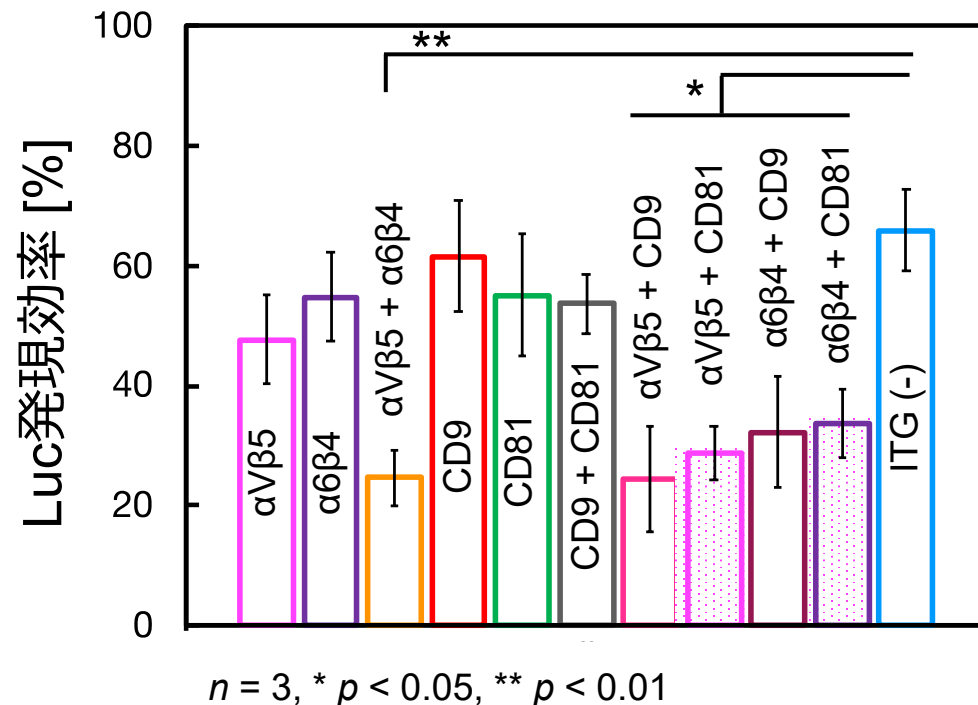


- 粒径の均一性が高く, タンパク質の仕込み量によって, 表面のタンパク質量を制御可能。
- 任意の脂質組成で作製可能。
- CD63だけではなく, CD9やCD81の提示も可能。

エクソソームの表面タンパク質がsiRNA送達に与える影響



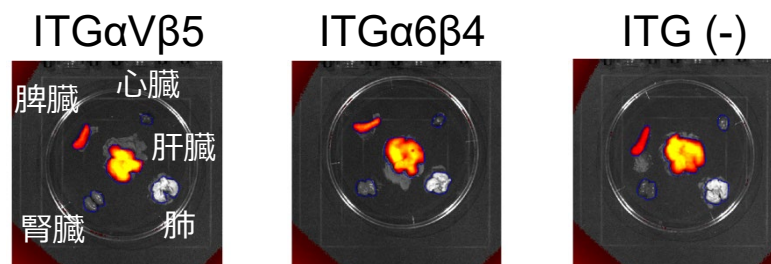
- エクソソームタンパク質が、siRNA送達に与える影響を評価
- siRNA送達効率 **大** : Luc発現 **低**



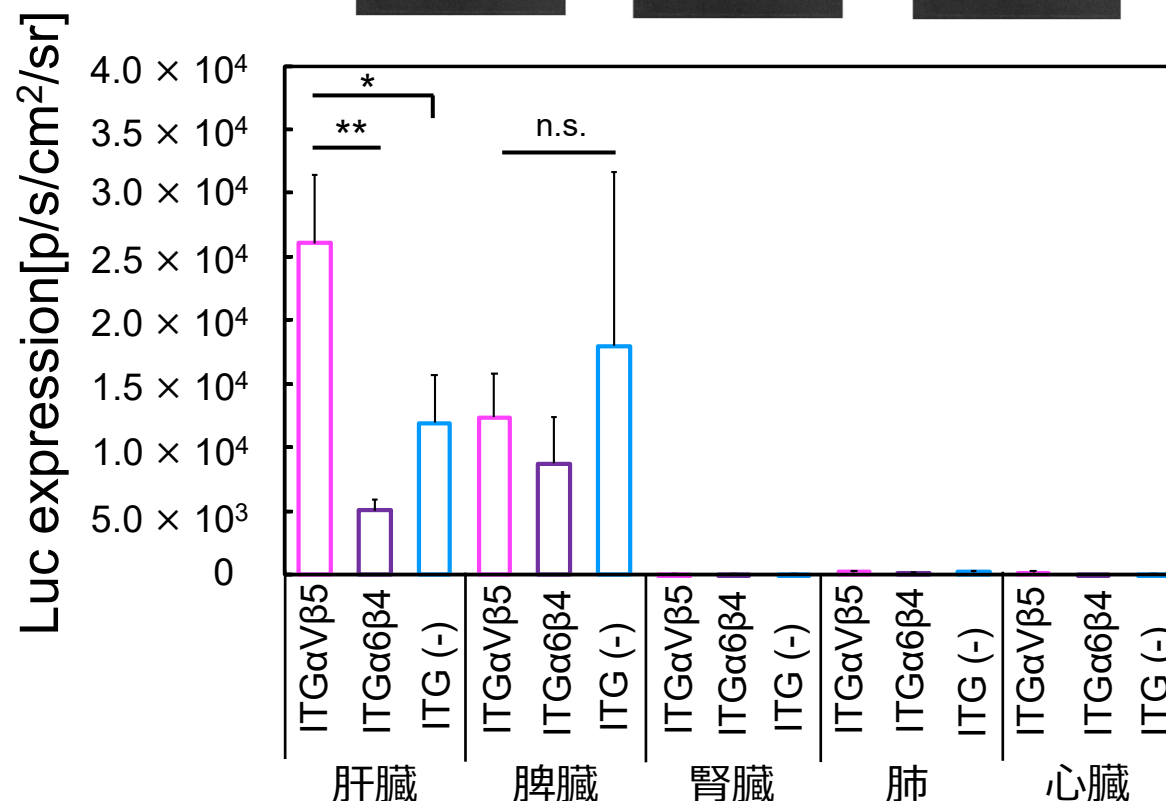
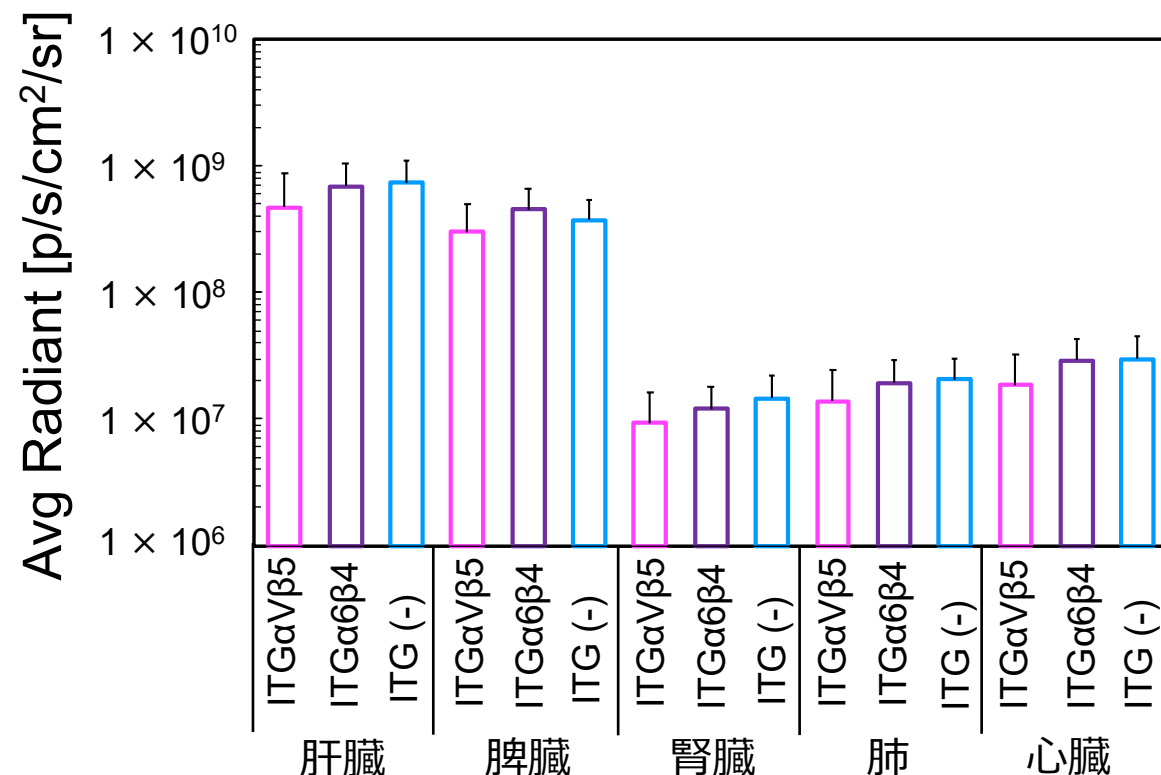
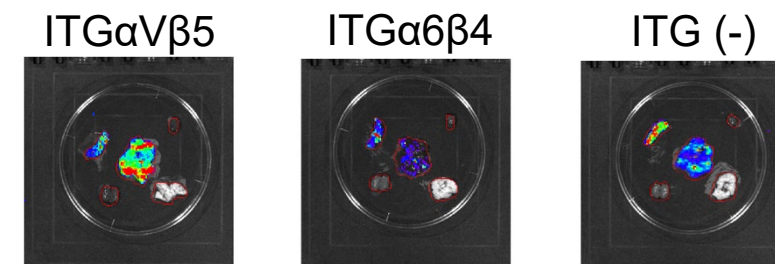
- タンパク質を提示したエクソソーム様粒子は、LNPよりもsiRNA送達効率が高い
- インテグリン (ITG) の方が、CD9などのテトラスパニンよりも核酸送達には重要な可能性
- 2種類のインテグリンあるいは、インテグリン + CD9 or CD81を提示した粒子は70~80%の遺伝子ノックダウン

エクソソームの表面タンパク質がmRNA送達に与える影響

体内動態



Luc発現



- ITG αVβ5は、肝臓への核酸送達を向上させた

長鎖遺伝子導入：従来技術とその問題点

長鎖の核酸は、短鎖の核酸と比較して多くの遺伝情報をコードすることができるが、10 kbp以上の長鎖核酸を細胞に効率良く導入することは困難である。

従来技術として、エレクトロポレーションや脂質ナノ粒子（LNP）が広く利用されているが、核酸の鎖長が長くなるほど、遺伝子導入効率の低下および細胞毒性の増加が課題になっている。

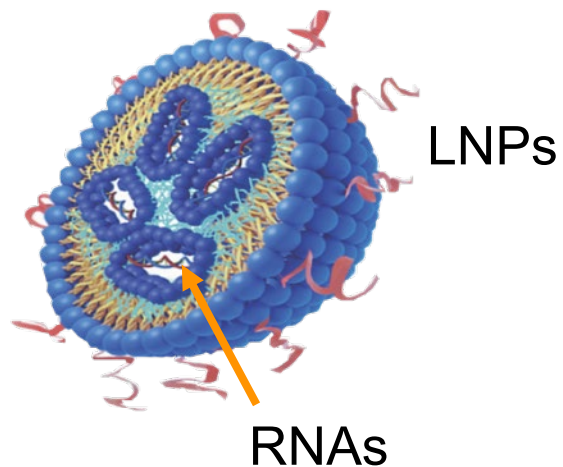
新技術の特徴・従来技術との比較

- 長鎖核酸（長鎖プラスミドDNA：長鎖pDNA）を細胞に効率良く導入可能なLNP・ポリマーハイブリッド粒子の開発に成功した。
- 開発したハイブリッドナノ粒子は, 15 kbpのpDNAを市販のLNPの8倍以上のトランスフェクション効率で細胞に導入可能であった。

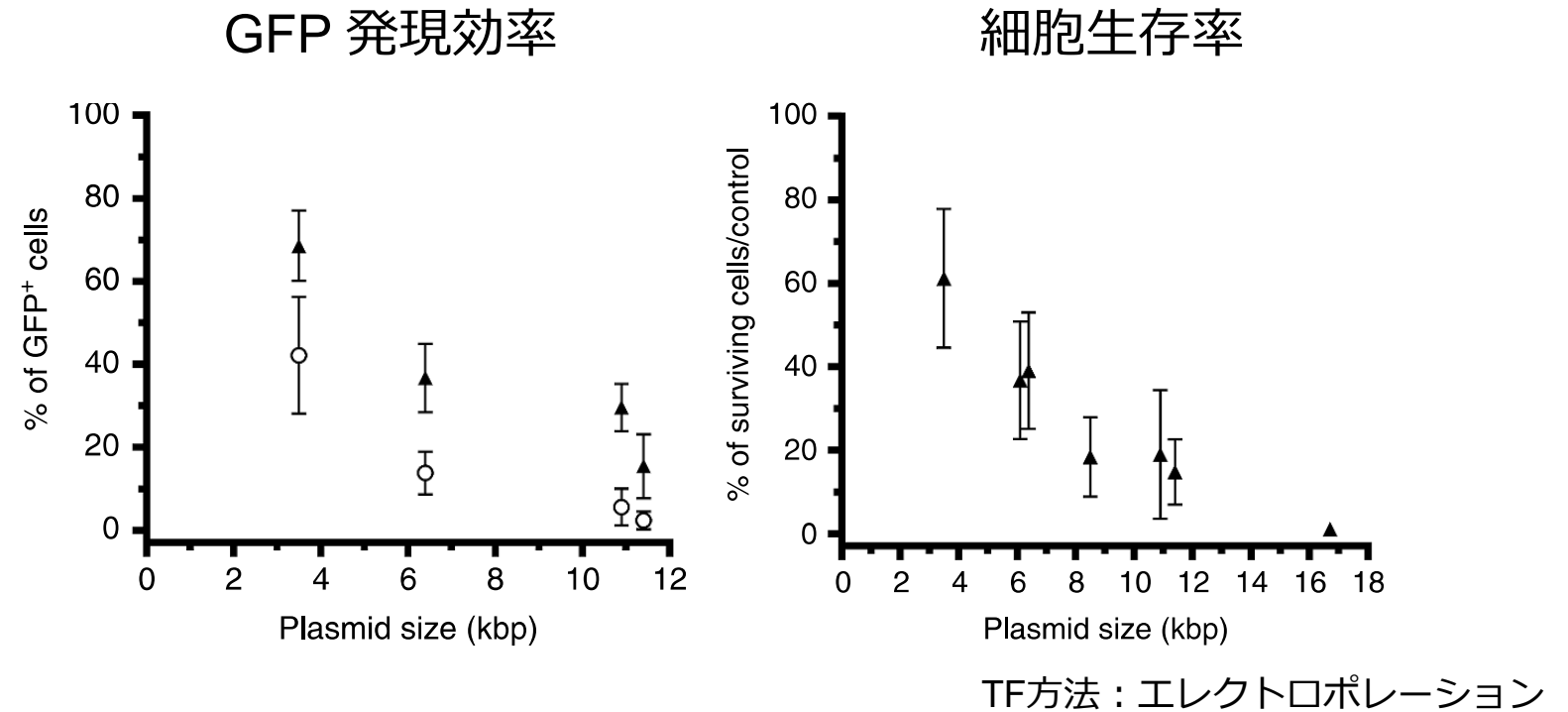
開発の背景と課題

承認されている核酸搭載LNP

- siRNA (21 bp)
 - Onpattro (Patisiran, Alnylam)
- mRNA ワクチン (~ 4300 nt)
 - Comirnaty (Pfizer & BioNTech)
 - SpikeVax (Moderna)



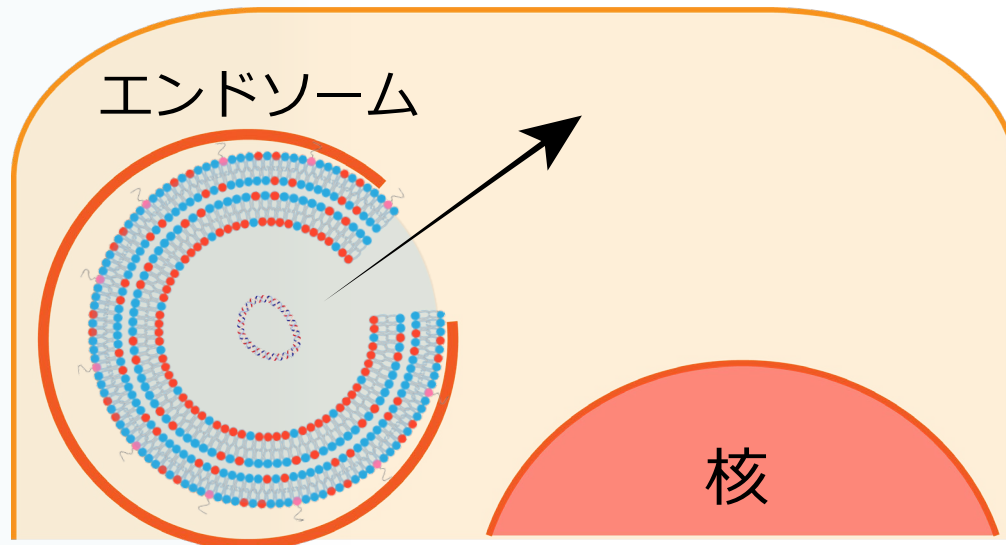
長鎖プラスミドDNA (pDNA) のトランスフェクション



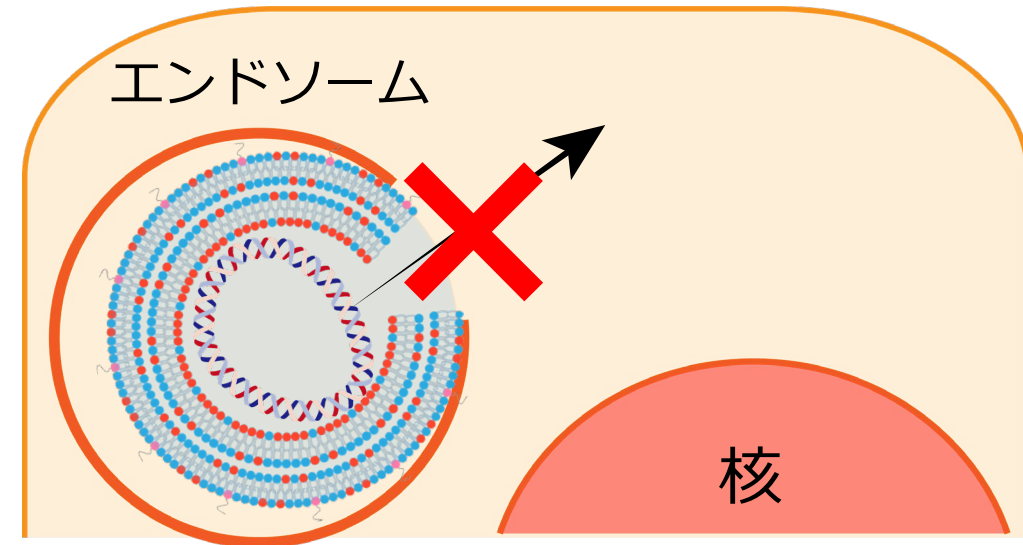
- pDNAの鎖長の増加：**TF効率の低下** および **細胞毒性の向上**

新技術の特徴・従来技術との比較

エンドソーム脱出



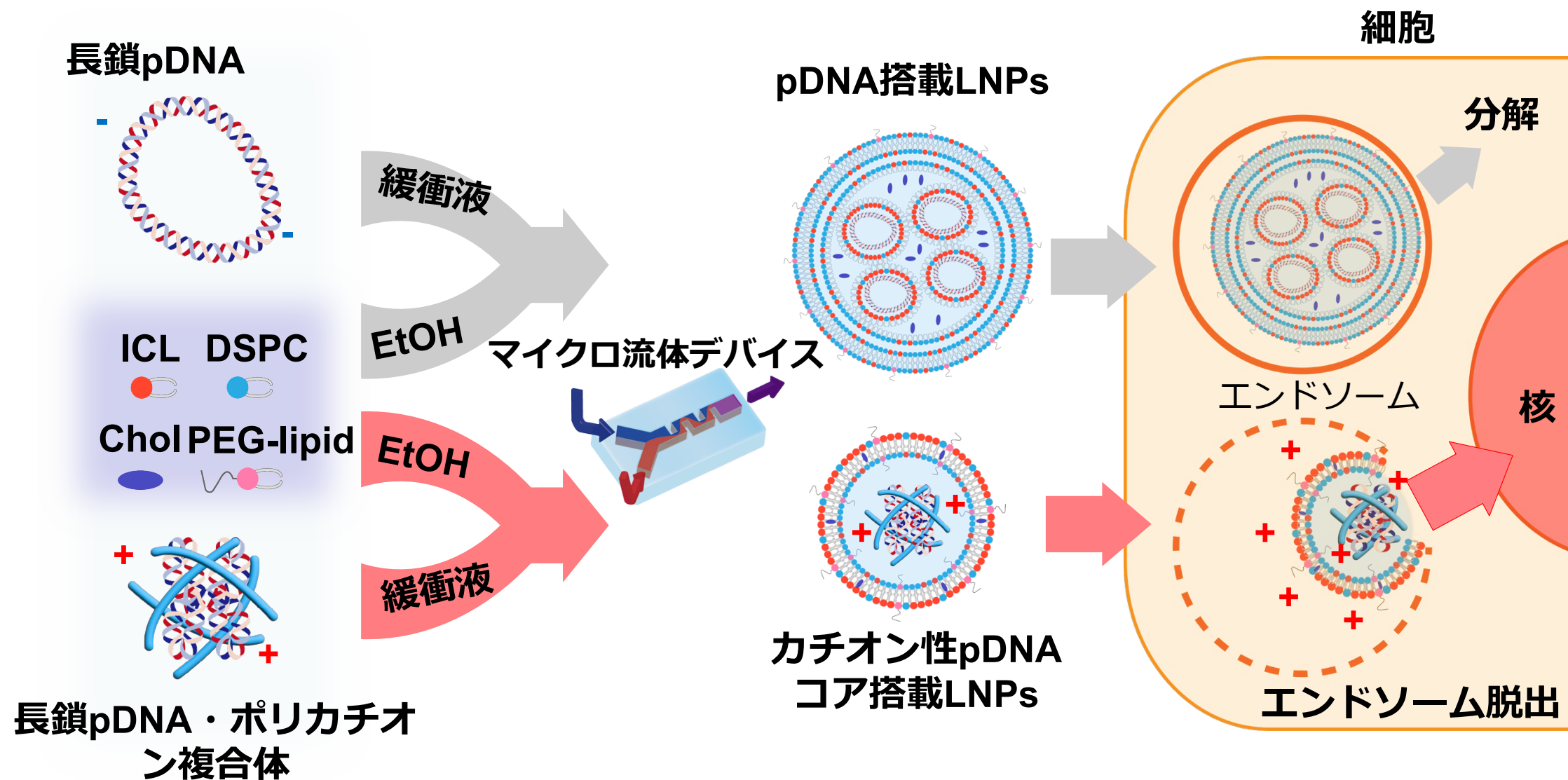
小さなサイズのpDNA



長鎖pDNA

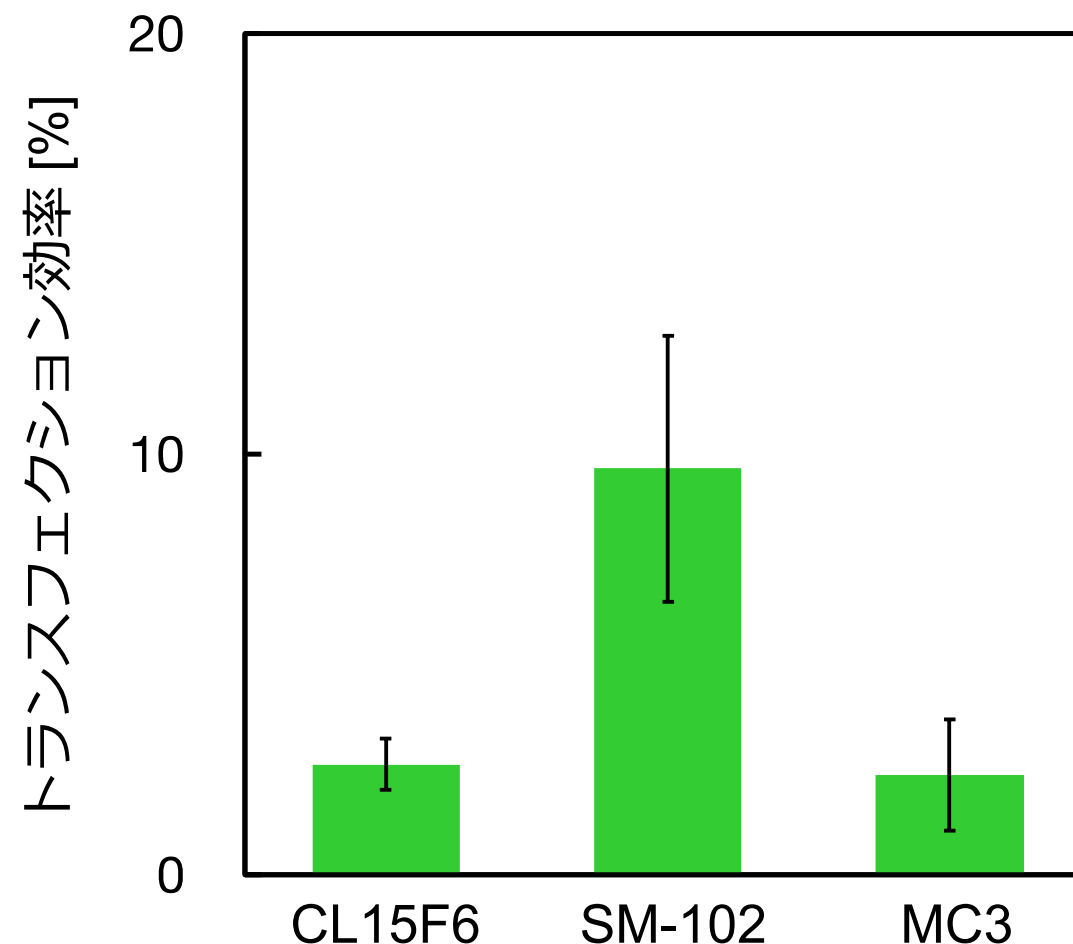
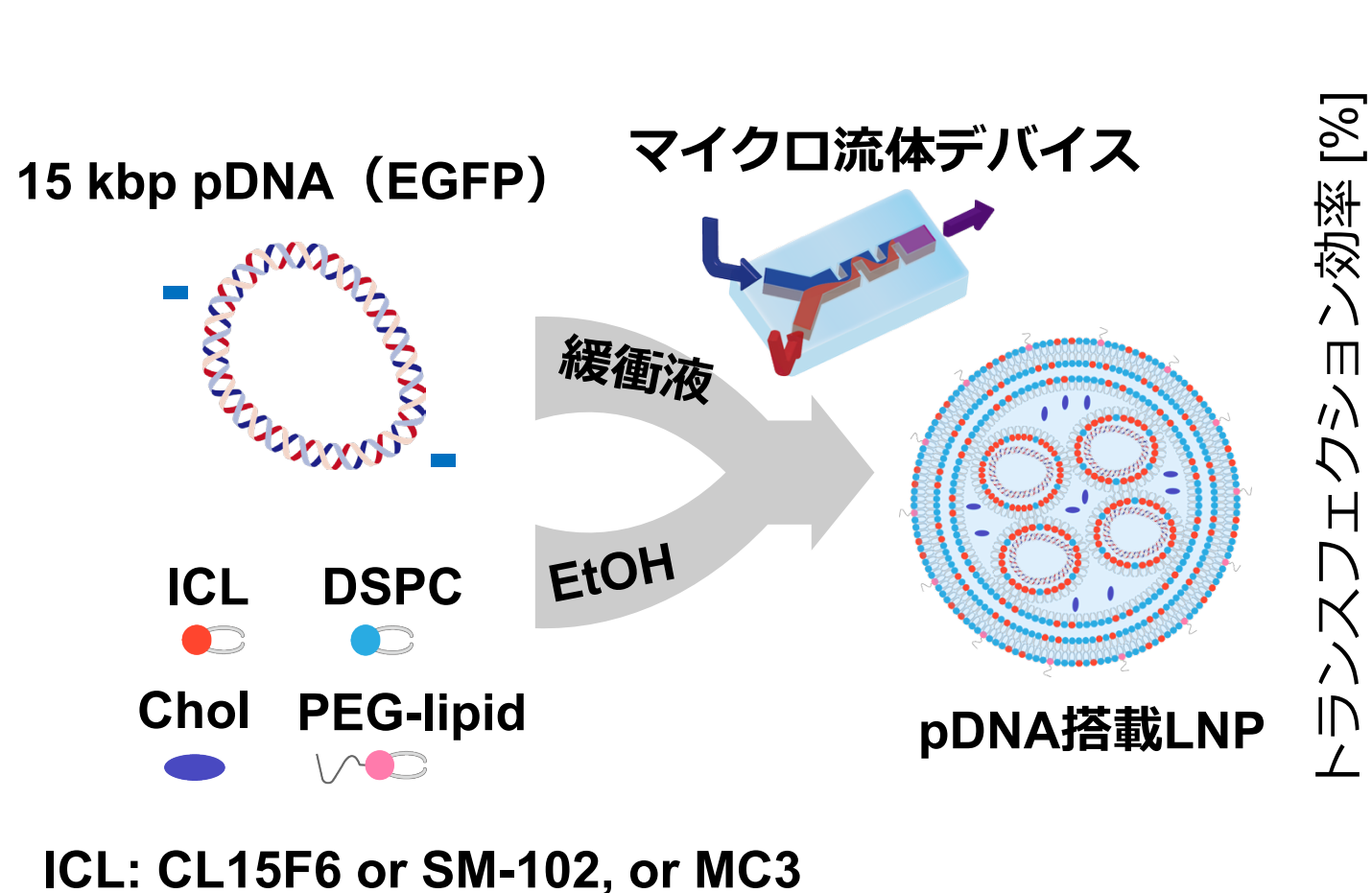
- 長鎖pDNAの場合は, エンドソームとLNPとのダイナミックな融合が必要であると考えられる。

新技術の特徴・コンセント



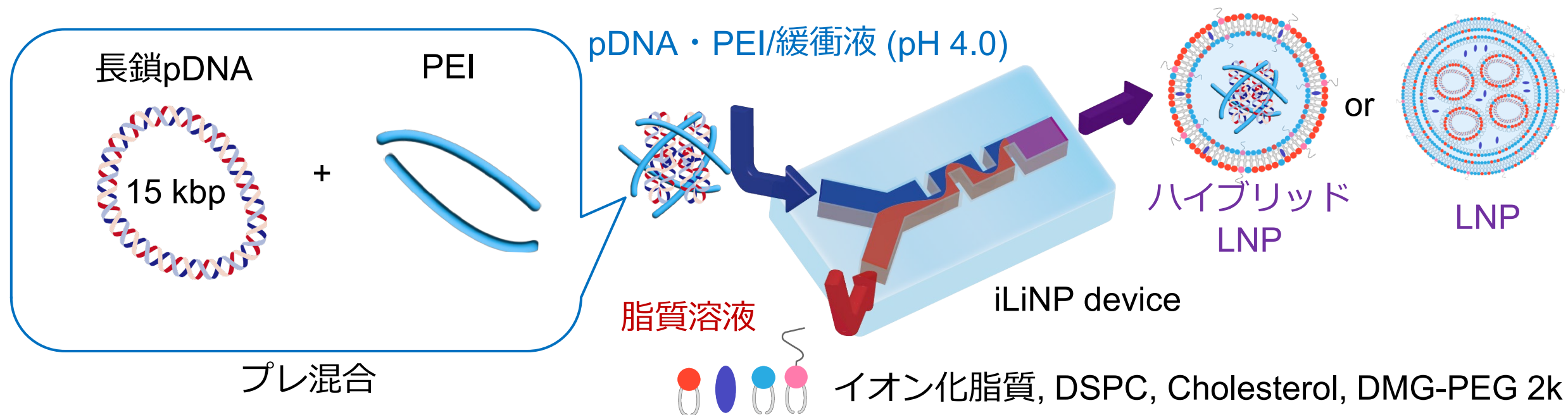
*ICL：イオン化脂質

15 kbp pDNA搭載LNPのTF効率



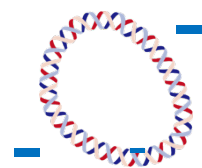
- 一般的なLNPでは, 15 kbp pDNA搭載LNPのTF効率は最大で10%程度

LNP・ポリマーハイブリッドナノ粒子の作製

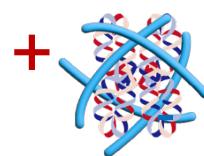


pDNA : PEI
(重量比)

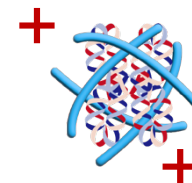
A15 1 : 0



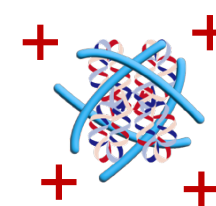
B15 1 : 0.1



C15 1 : 1



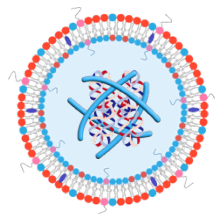
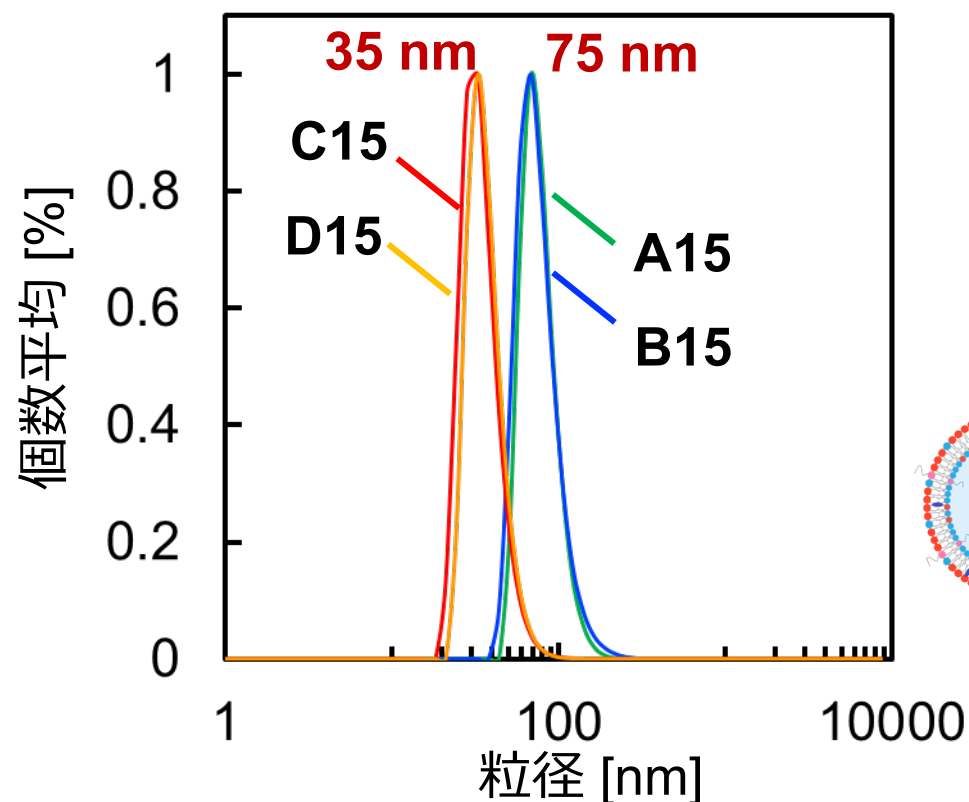
D15 1 : 5



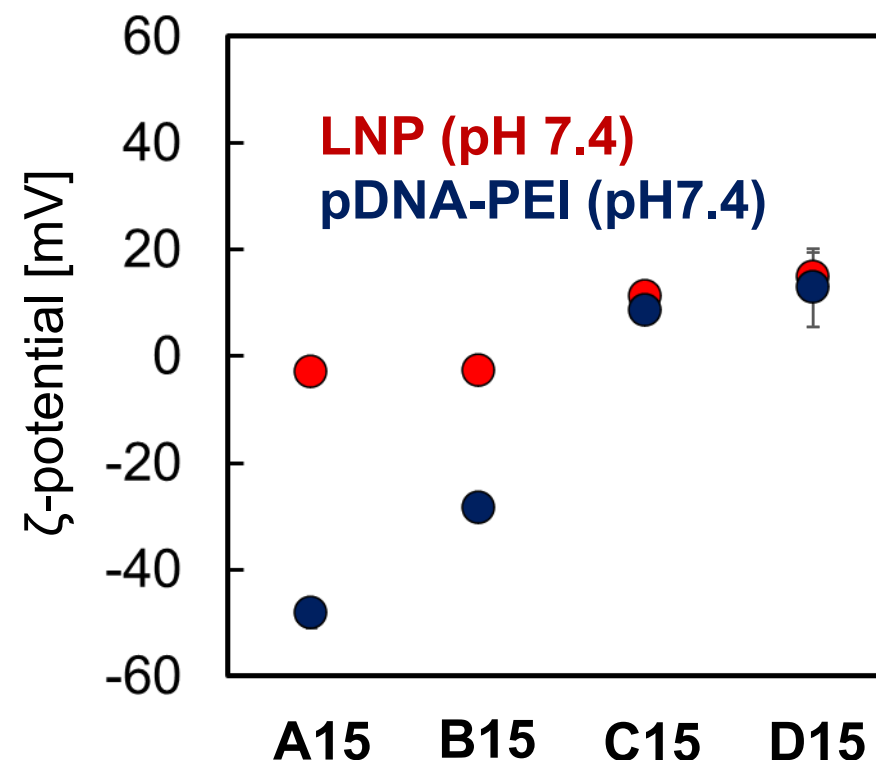
PEI: Polyethyleneimine, branched, Mw.10 k

カチオン性pDNAコア搭載LNPの作製

粒径分布

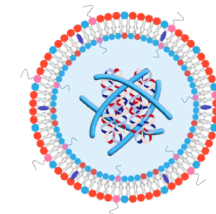


ζ-電位 (pH 7.4)



pDNA : PEI

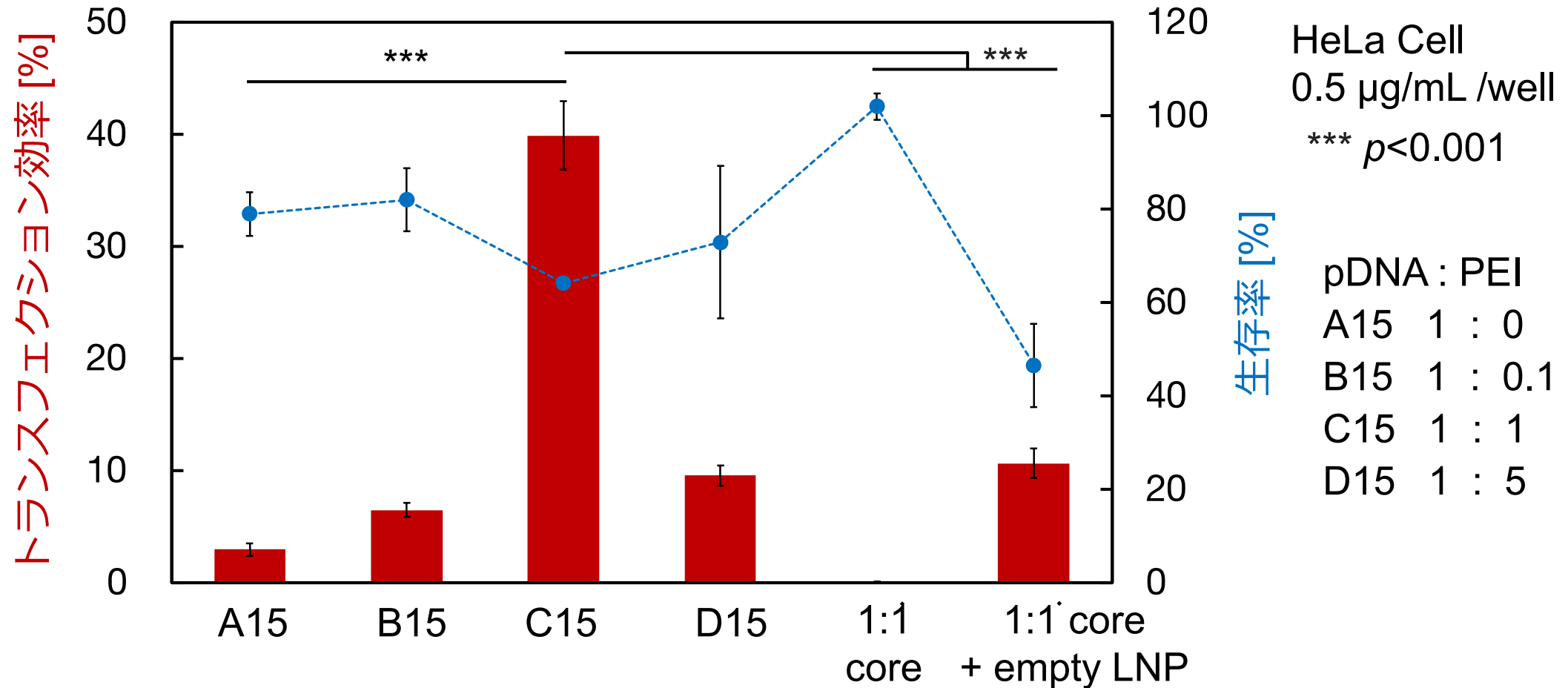
A15	1 : 0
B15	1 : 0.1
C15	1 : 1
D15	1 : 5



A15-LNP and B15-LNP → 75 nm, 負電荷のpDNAを搭載したLNP, 0 mV

C15-LNP and D15-LNP → 35 nm, カチオン性pDNAコアを搭載したLNP, 10 mV

長鎖pDNAのトランスフェクション効率の比較



- カチオン性pDNAコアを搭載したC15 LNPは, 40%のトランスフェクション効率を達成した。
- 一方で, 一般的なLNP組成のA15 LNPやPEIのみのトランスフェクション効率は, 5%以下であった

長鎖pDNAのトランスフェクションメカニズム

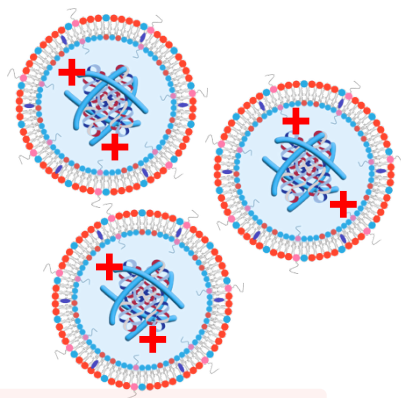
細胞

細胞質

エンドソーム

核

ハイブリッド粒子



小さな粒径:
高い取り込み効率

単相あるいは少数の脂質二重膜とpDNAのコンパクション

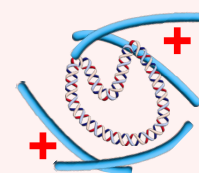
エンドソーム脱出の促進

トランスフェクション効率

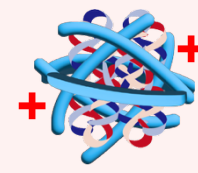
1:1 (w/w) > 1:5 (w/w)

最適なPEI

過剰のPEI



C15



D15

PCT/JP2023/035730

ACS Appl. Mater. Interfaces, **16**, 2110, 2023.

想定される用途

- 本技術によって作製した粒子は, 不均一性が高いエクソソームの標準粒子として利用することができ, リキッドバイオプシーや試薬（検出）キットへの応用が期待できる。
- また, ウイルス様粒子への応用にも成功しており, 試薬（検出）キットや核酸送達材料への展開も可能である。
- 本技術によって作製した粒子は, 鎖長が長い核酸の細胞への効率的な導入が期待でき, トランスフェクション試薬キットへの展開も可能である。

実用化に向けた課題

- 現在, ワクチンへの応用に取り組んでおり, *in vivo*での実験データの取得や汎用性の実証を進める必要がある。
- 実用化に向けて, タンパク質の入手元の確保が必要である。
- 長鎖遺伝子導入技術については, *in vivo*での有効性の評価が必要である。

企業への期待

- 様々なタンパク質発現系を有する企業との連携・共同研究を希望。
- エクソソーム関連研究や試薬（検出）キットの開発への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。
- 長鎖遺伝子導入技術については、トランスフェクション試薬キットとしての展開が期待できる。

企業への貢献、PRポイント

- 標準粒子作製技術は、製造量も任意に調製でき、マイクロ流体デバイスを用いて連続生産が可能であるため、細胞系よりも生産性やコストパフォーマンスの点で企業に貢献できると考えている。
- 本技術の導入にあたり、評価用のサンプル提供が可能。
- 本格導入にあたっての技術指導等

本技術に関する知的財産権（１）

- 発明の名称：脂質粒子含有液、その製造方法及びキット
- 出願番号：特願2024-503121
- 出願人：国立大学法人北海道大学
- 発明者：真栄城 正寿、渡慶次 学、丹羽 彩由花、
米田 明弘、岡田 悠斗、村野 健作、杉浦 魁星

本技術に関する知的財産権（2）

- 発明の名称：核酸複合体組成物、遺伝子導入用脂質粒子及びそれを用いた遺伝子導入方法
- 出願番号：特願2024-550517
- 出願人：国立大学法人北海道大学、国立大学法人鳥取大学
- 発明者：真栄城 正寿、渡慶次 学、宇野 秀哉、原島 秀吉、佐藤 悠介、香月 康宏、山崎 匡太郎

産学連携の経歴

- 2019年～2023年 JSTさきがけ事業に採択
- 2020年～ 信越化学工業株式会社と共同研究実施
- 2024年～ AMED ワクチン・新規モダリティ
研究開発事業
- 2025年～ AMED創薬基盤研究推進事業

お問い合わせ先

北海道大学 産学・地域協働推進機構
産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口

<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>