

2022年11月30日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科

**内在性脂質運搬機構を利用した
皮膚リンパ管での遺伝子発現制御技術の開発
リンパシステムを標的としたRNA創薬基盤として期待**

【発表のポイント】

- 皮下投与された脂質ナノ粒子(LNP)^{注1}がアポリポタンパク質 E^{注2}を吸着し、皮膚のリンパ管内皮細胞^{注3}に選択的に取り込まれることを発見した。
- 脂質ナノ粒子に搭載したRNAによりリンパ内皮の遺伝子発現制御に成功した。
- リンパ管内皮細胞の機能不全に起因するリンパ浮腫等の難治性疾患の治療への応用が期待される。

【概要】

リンパ管は体液の循環や免疫に関わる細胞および外来の微生物等の通り道であり、その管腔を構成するリンパ管内皮細胞(LEC)の機能的な異常がリンパ浮腫などの病態に関わっているとの報告があります。しかしながら、リンパ管内皮細胞で選択的に遺伝子発現を制御する方法は報告されていませんでした。

細胞内の環境に応答して生体膜を突破する脂質ナノ粒子(Lipid NanoParticle; LNP)は、RNAを細胞質に届ける技術であり、世界発の small interference RNA (siRNA^{注4})を用いた核酸医薬や、新型コロナウイルスに対するRNAワクチンにも使われています。東北大学大学院薬学研究科の秋田英万教授、櫻井遊講師および日油株式会社を中心とする共同研究グループは、LNPの表面に修飾する水溶性ポリマーの種類や密度を最適化することで、皮下投与した脂質ナノ粒子をリンパ液中のアポリポタンパク質 E と吸着させ、リンパ管内皮細胞に取り込ませられることを世界で初めて明らかにしました。さらに、脂質ナノ粒子に siRNA を搭載することにより、リンパ内皮細胞内での遺伝子発現を制御することに成功しました。本研究の知見は、リンパ管内皮細胞の機能を制御する新たな戦略を提唱するものであり、新規治療法に繋がるものと期待されます。

本研究成果は、2022年11月23日(現地時間)に「Journal of Controlled Release」誌電子版に掲載されました。

【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

東北大学大学院薬学研究科

講師 櫻井 遊(さくらい ゆう)

電話 022-795-6833

E-mail yu.sakurai.e7@tohoku.ac.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

【詳細な説明】

研究背景

リンパ管は体液の循環や免疫に関わる細胞および外来の微生物等の通り道であり、その管腔はリンパ管内皮細胞 (LEC^{注3}) により構成されます。近年リンパ管内皮細胞の機能解析が詳細に進むにつれ、LEC の機能的な異常が、リンパ管内のリンパ液の貯留によるリンパ浮腫などの病態に関わっていることが報告されています。血管に繋がる臓器や血管を構成する内皮細胞に対する薬剤の開発は進んでいますが、それと比べると LEC の機能やリンパ管を介した薬物の輸送についての研究は遅れており、リンパを対象とした薬剤送達の例は殆ど報告されていませんでした。

研究内容

東北大学大学院薬学研究科の秋田英万教授、櫻井遊講師および日油株式会社を中心とする共同研究グループは、ある特定の脂質組成の脂質ナノ粒子 (LNP^{注1}) が皮下において生体内の脂質運搬機構を介して LEC に取り込まれ、細胞内に RNA を送達し、遺伝子の機能を制御することができることを見出しました (図 1)。

これまでに、RNA による遺伝子発現制御を介した RNA 創薬を目的とし独自の pH 応答性脂質として ssPalm^{注5} を基盤とした LNP を開発し、遺伝子治療や mRNA ワクチン開発などを進めています。血中に投与された LNP は、アポリポタンパク質 E (ApoE)^{注2} と結合し、低密度リポタンパク質受容体を介して肝細胞に非常に素早く取り込まれることが示されてきました。研究グループでは、リンパ液にも ApoE が含まれていること、そして LEC に低密度リポタンパク質受容体の発現が報告されていることから、皮下に投与された LNP も血中と同様に ApoE の結合およびそれに引き続く LEC への内在化が起こるのではないかと予想しました。

研究グループは上記の仮説を実施するために、マウスの皮膚から LEC を単離したのちに不死化遺伝子を導入した細胞を作成しました。この不死化 LEC に対して、ApoE を LNP と事前に混合することで、混合しない場合と比較して有意に LNP の取り込み量が上昇しました。

次に、実験動物で ApoE 依存的な LEC の LNP 取り込みが起こるかを検証しました。ApoE タンパク質の吸着をコントロールするために、LNP 表面に提示する安定化ポリマーポリエチレングリコール (PEG) の量と種類を網羅的に検討しました。その結果、ある特定の比率のポリマーで LNP を覆った場合に特に LEC への取り込みが増大することを見出しました。

また、この LNP の取り込みは、ApoE を遺伝的に欠損させたマウスでは見られなかったこと、およびこの欠損マウスに対して ApoE を事前にインキュベートした LNP では再び取り込みが観察されるようになったことから、LNP が ApoE 依存的に LEC に取り込まれることを実証しました。さらに LNP の中に LEC が発現している vascular endothelial cell growth factor receptor 3 (VEGFR3)^{注6} に対する小分子干渉 RNA (siRNA)^{注4} 内封し、この LNP を皮下投与すると VEGFR3 遺伝子の発現が著しく抑

制されることを明らかにしました(図 2)。

研究の意義

リンパ管内皮細胞の先天的な遺伝子の異常により引き起こされる疾患として、Milroy 病や Hennekam 症候群などが知られています。これらの疾患は現在根治療法が存在せず、対症的な療法が使用されています。本研究の応用により、RNA をリンパ管内皮細胞に送達することで、疾患の原因遺伝子の発現を制御することで新たな治療法の開発へと繋がるのが期待されます。

【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 (JPMJCR17H1)、日本学術振興会 科学研究費助成事業 (20H00657、21K18320、20K20195)、キャノン財団を始め多数の研究費支援を受けて実施されました。

本研究は【問い合わせ先】に記載の秋田英万ならびに櫻井遊が前職・千葉大学大学院薬学研究院に在籍時から継続してすすめてきた研究成果です。

説明図

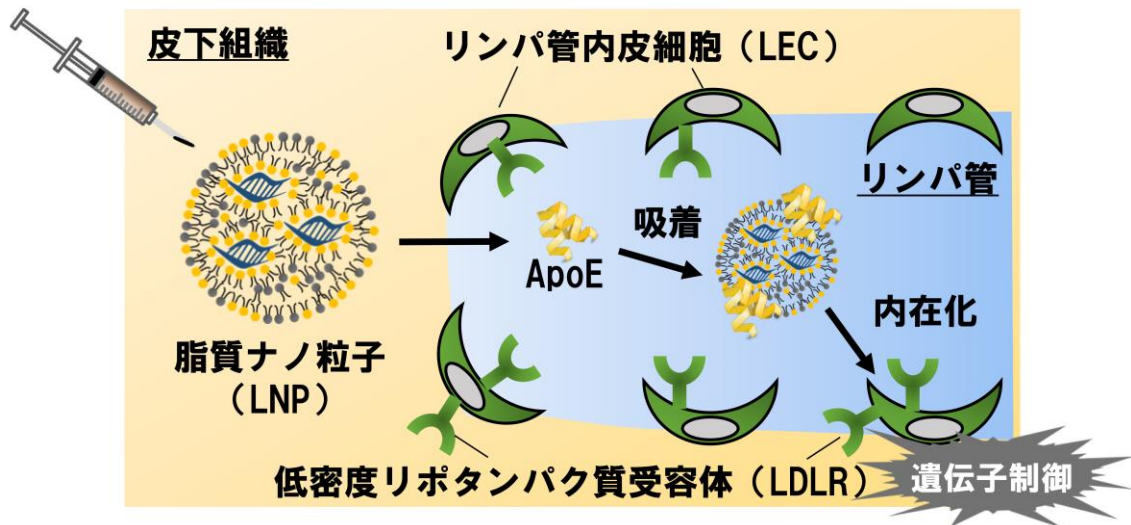


図 1 アポタンパク質 E の吸着とそれに引き続いて起こる脂質ナノ粒子の取り込みの模式図

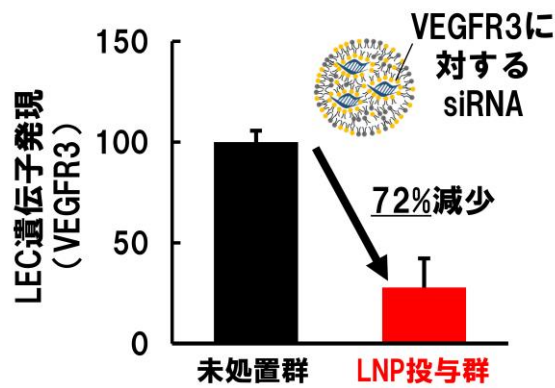


図 2 LNP 表面への分子提示された PEG 脂質

【用語説明】

注1) LNP

脂質分子とその内封物 (RNA、DNA など) から構成される直径およそ 100 nm 程度の極小サイズの粒子のことを指します (図 3)。近年では COVID-19 に対するワクチンとして、ウイルスのスパイクタンパク質の遺伝情報を持つメッセンジャーRNA を内封した

LNP が話題となりました。

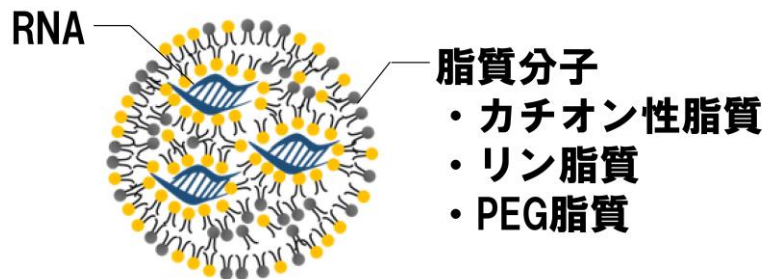


図3 RNA 内封 LNP の構造と模式図

注2) ApoE

生体内に存在する脂質の運搬体に結合するアポリポタンパク質ファミリーの一種です。アポリポタンパク質 E は、肝細胞などが発現している低密度リポタンパク質(いわゆる悪玉コレステロール)の受容体に認識されるための目印として働いています。

注3) LEC

血管と並ぶ脈管系であるリンパ管を形作るリンパ管内皮細胞のことを指します。リンパ管は、血管とは異なり無色透明であることから、リンパ系やそれを構成する細胞の解析は進んでいませんでした。2000年代に LEC を識別するための遺伝子が報告されてから、近年急速に解析が進んでいます。リンパ浮腫などの体液循環に関わる機能の他、免疫細胞に対しても活性化を抑制するような機能があることが明らかになっています。

注4) siRNA または小分子干渉 RNA

短い二本鎖で構成される RNA のことを指し、細胞内で RNA 干渉により対象の遺伝子のメッセンジャーRNA を分解することができる。その遺伝子は、メッセンジャーRNA が無くなるために、タンパク質へと翻訳されなくなり機能を発揮できなくなります。

RNA 干渉は、2006年にノーベル生理学・医学賞の受賞対象となった現象です。外来から導入した RNA の配列依存的にメッセンジャーRNA を分解する機構のことを言います。対象の遺伝子の働きを効率的に抑制できることから、医薬品としての研究が盛んに行われています。

注5) ssPalm (COATSOME® SS-OP)

SS-cleavable pH-activated lipid-like material の略称です。生体内の目的の細胞内に治療用の RNA を送達するための分子として、東北大学大学院薬学研究科の秋田教授らのグループと日油株式会社が共同で開発を進めています。生体内の酵素や環境により自発的に分解・崩壊を起こすユニットから構成される構造的特徴を持ち、メッセンジャーRNA ワクチンに使用されている脂質に匹敵する活性を有しています。また、分解性が高いことから、生体に対する安全性が高いという特徴を持ちます。

参考 URL: <https://www.yuka-sangyo.co.jp/dds/liposomal.html>

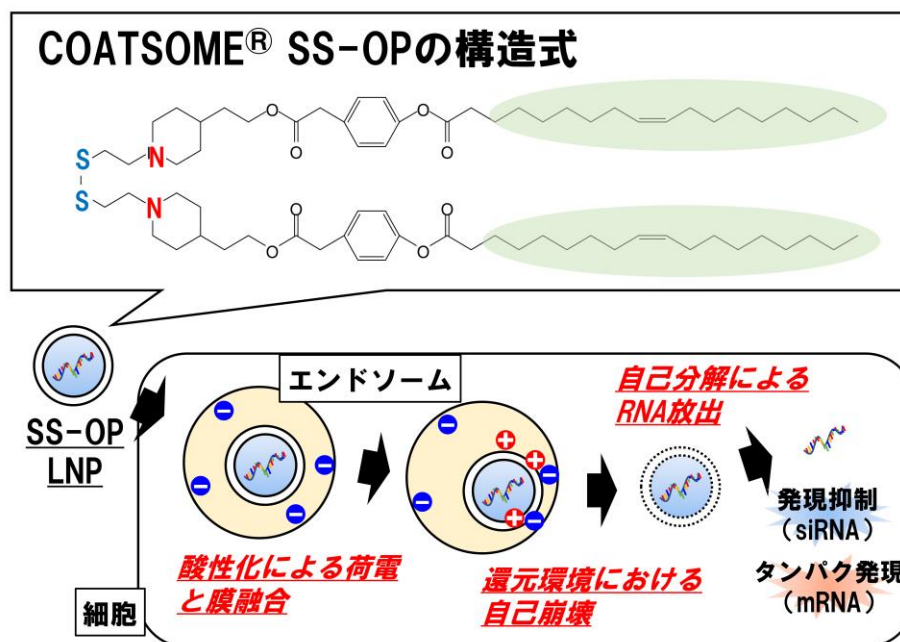


図 4 ssPalm の構造と作用機序の模式図

注6) VEGFR3

血管内皮細胞増殖因子受容体 3 の略称です。生体を構成する細胞は、様々な増殖を促進する因子により細胞分裂が誘導されます。VEGFR3 はリンパ管を構成する LEC に特に多く見られる受容体で、LEC の増殖を制御する役割があります。また、LEC とその他の細胞を識別するためのマーカータンパク質としても用いられています。

【発表論文】

雑誌名: Journal of Controlled Release

論文タイトル: siRNA delivery to lymphatic endothelial cells via ApoE-mediated uptake by lipid nanoparticles

(日本語訳: アポタンパク質 E 介在性取り込みを利用したリンパ管内皮細胞への siRNA 送達)

著者: Yu Sakurai, Keito Yoshikawa, Kenta Arai, Akira Kazaoka, Shigeki Aoki, Kousei Ito, Yuta Nakai, Kota Tange, Tomomi Furihata, Hiroki Tanaka, Hidetaka Akita

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.036>