

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 高分子ナノテクノロジーを基盤とするバイオ医薬品送達システムの開発
(英語) Development of polymer nanotechnology-based delivery systems
of biopharmaceuticals

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西山 伸宏
(英語) Nobuhiro Nishiyama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
(英語) Professor, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology

II 研究開発の概要

本課題では、核酸医薬、生理活性ペプチド・タンパク質、抗体などのバイオ医薬品の課題を解決し、実用化を加速する先端的 DDS 技術として、以下の項目(1)～(3)の課題を推進した。

項目(1)「中分子医薬の細胞内デリバリーのための pH 応答性ベタイン構造を有するスマートシェル、スマート脂質含有脂質ナノ粒子(LNP)の開発」においては、研究代表者らが見出した血中 pH では電荷的中性を示す一方で、腫瘍内および細胞内の酸性環境(pH<7.0)でカチオン性に変化する pH 応答型ベタインポリマー(スマートシェル)を開発し、脂質ナノ粒子(LNP)に応用することで、PEG ジレンマの課題を解決し、全身投与による中分子医薬のデリバリーを実現することを目指して研究開発を行った。pH 応答性ベタインポリマー被覆 LNP を従来型の PEG 被覆 LNP と比較した結果、①pH 変化(pH7.4→pH6.5 以下)に伴う LNP 表面電荷の中性からカチオン性への変化、②酸性環境(pH6.5)におけるがん細胞による取り込み増大と細胞内移行、それに伴うエンドソーム脱出、③PEG 被覆 LNP より優れた siRNA 発現活性を示すことが確認された。ここで pH 応答型ベタインポリマーの重合度の効果について検討した結果、ポリマー重合度の増加に伴う pH7.4→pH6.5 に対応したカチオン性電荷の増大、細胞取り込み量の増大が確認されたが、siRNA の導入活性、LNP の膜融合活性はポリマー重合度の増加に伴い減少することが確認され、高分子量の pH 応答性ベタインポリマーは細胞との相互作用を向上させるが LNP と細胞膜の脂質同士の相互作用(膜融合)を阻害しうることが示唆された。これらの結果より、PGlu(DET-Car)被覆 LNP のポリマー重合度としては 20-30 が最適値であることが明らかとなった。次に、in vivo 評価においては、pH 応答性ベタインポリマー被覆 LNP は PEG 被覆 LNP よりも高い血中滞

留性およびがん集積性を示した。そこで、siPLK1 を搭載した LNP によるヒト卵巣がん細胞の皮下移植モデルの治療実験を実施したところ、pH 応答性ベタインポリマー被覆 LNP は PEG 被覆 LNP よりも優れた腫瘍増殖抑制効果を示すことが確認された。この結果に基づき、日油(株)と連携して pH 応答性ベタインポリマー脂質複合体の大量製造プロセスを確立した。pH 応答性ベタインポリマーの化学構造を最適化した結果、siPLK-1 のデリバリーにおいて、pH 応答性ベタインポリマー被覆 LNP は PEG 被覆 LNP の 3 倍の 2.5%投与量/g 腫瘍のがん集積性と PEG 被覆 LNP よりも優れた抗腫瘍効果を確認することができた。さらに、pH 応答性ベタインポリマーをシェルとする遺伝子搭載高分子ミセルの開発についても検討を行い、PEG ミセルの 3 倍のがん集積量を実現、可溶型 VEGF 受容体(sFlt-1)の遺伝子デリバリーにより神経腫瘍に対する顕著な抗腫瘍効果も達成することができた。加えて、これらの LNP および高分子ミセルの mRNA デリバリーにおける有用性も確認することができた。

項目(2)「ポリフェノール類/ボロン酸含有ポリマーを利用したタンパク質送達システムの開発」においては、生体分子と相互作用を示すタンニン酸(TA)と TA と pH 応答性結合を形成するボロン酸基含有ブロック共重合体から形成される三元系高分子ミセルをタンパク質やアデノ随伴ウイルス(AAV)のデリバリーに応用する研究を行ってきた。本システムによって、 β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)等のさまざまなタンパク質や CRISPR Cas9/sgrRNA 複合体(RNP)を内包した高分子ミセルの形成を確認し、タンパク質分解酵素に対する高い安定性、腫瘍内および細胞内低 pH 環境下でのタンパク質のリリース、高い血中滞留性、7-8 倍の固形がんへの集積性、固形がん選択的な β -Gal の酵素反応に基づく基質分子の活性化(酵素プロドラッグ治療への展開)、Cas9 蛋白質 gRNA 複合体(RNP)のデリバリーによる部位特異的ゲノム編集効果を確認することができた。RNP のデリバリーに関しては、複数のがん遺伝子の in vivo ゲノム編集による抗腫瘍効果を確認することに成功している。また、オボアルブミン(OVA)を三元系高分子ミセルに搭載し、がんワクチンとしての応用についても検討を行った。その結果、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)における Class I 経路による抗原提示、マウスへの皮下投与後の脾細胞での OVA ペプチド刺激特異的な IFN- γ の産生(OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導)が確認されたため、マウスリンパ腫細胞の皮下移植モデルに対する抗腫瘍効果を検討したところ OVA 単独、OVA/TA 複合体よりも有意に高い抗腫瘍効果が OVA 内包ミセル投与群において確認された。このメカニズムに関して蛍光標識 OVA を利用してリンパ節への OVA 集積量を評価した結果、OVA 内包ミセルは最も高い集積を示すことが確認された。これらの結果より、OVA 内包ミセルはリンパ節に効率的に移行し、抗原提示細胞に効率的に取り込まれることで強力ながん細胞に対する細胞性免疫が誘導できたものと考えられる。以上のように、本研究では、三元系高分子ミセルは、任意のタンパク質を搭載でき、標的に対する選択的なデリバリーを実現することで、in vivo ゲノム編集やがんワクチンなどのさまざまな治療へと応用できることを実証することができた。

一方、AAV のデリバリーに関しては、TA、ボロン酸基含有ブロック共重合体の混合比の最適化により 46nm の単一な AAV 内包ミセルを調製することに成功した。AAV 内包ミセルは、AAV 単独および AAV/TA 複合体よりも高い遺伝子導入効率を示し、さらに抗 AAV 抗体(中和抗体)存在下において、AAV 単独および AAV/TA 複合体は顕著な導入効率の低下を示したが、AAV 内包ミセルは抗 AAV 抗体非存在下と同等の遺伝子導入効率を示した。そこで、AAV 内包ミセルにおける in vivo での中和抗体による失活の回避について抗体をマウスの血中に投与する passive immunity model を用いて検討した。その結果、AAV および AAV/TA では遺伝子発現の顕著な減少が認められたが、AAV 内包ミセルはブロック共重合体の組成の最適化によって中和抗体投与後でも 100%の遺伝子発現活性を維持していることが確認された。さらに、AAV および AAV 内包ミセルをマウスに投与し、7、14 日後の血中の抗 AAV 中和抗体量を測定した結果、AAV 投与群では中和抗体濃度の増加が認められたが、AAV 内包ミセル投与群では中和抗体濃度の増加が認められなかった。これらの結果より、AAV 内包ミセルはマウスにおいて中和抗体による失活の回避を実現するだけでなく、AAV の産生自体も抑制できることが示唆された。さらに、AAV 内包ミセルの in vivo 機能として血中滞留性を評価した結果、AAV 内包ミセルは静

脈内投与後に AAV 単独と比較して高い血中滞留性を示すことが確認された。さらに担がんマウス(皮下腫瘍および脳腫瘍同所移植モデル)への全身投与後の遺伝子導入効率を評価したところ、ミセルにより正常組織、特に肝臓、脾臓、肺での遺伝子発現が顕著(10 倍以下)に減少し、固形がんでの遺伝子発現が 2-3 倍に増加することが確認された。さらにミセル表面へのリガンド分子の導入による遺伝子発現の上昇や集束超音波の照射による部位特異的な遺伝子発現にも成功した。以上のように本研究では、三元系ミセルは、AAV の中和抗体による失活を抑制し、正常組織への作用を抑制しつつ、がん選択性を向上できることが明らかになった。本システムは、AAV に対する中和抗体の問題を解決し、繰り返し治療が可能となることから臨床的意義は極めて高いものと考えられる。

項目(3)「抗体への腫瘍環境特異性の賦与による低毒性の免疫チェックポイント阻害剤の開発」においては、環境応答性結合によって抗体に PEG を導入し、腫瘍内環境で PEG が脱離することで抗体の抗原認識能が ON になる抗体-ポリマーコンジュゲート(APC)の開発を行った。抗体医薬としては、免疫チェックポイント阻害剤(ICI)を使用し、in vivo における抗腫瘍効果および安全性を検討した結果、ICI の有効性が乏しい膵がんモデルにおいて、APC は抗 PD-L1 抗体より優れた抗腫瘍効果を示す一方で、毒性を低減させ、さらに肝臓におけるサイトカイン産生を有意に抑制できることが示唆された。ICI においては、免疫関連有害事象(irAEs)が副作用として課題となっているが、APC はがん組織特異的に抗原認識能を発現することで irAEs を回避できる技術として期待される。一方、これらの研究を進める中で、APC が 1 型糖尿病モデル(NOD)マウスの膵ランゲルハンス氏島(膵ラシ島)に選択的な集積を示すことが確認された。そこで自己免疫性疾患の新規治療法の開発を視野に入れて、APC による NOD マウスの治療実験を実施した。その結果、APC は膵ラシ島への選択的な集積を示し、膵ラシ島へのリンパ球の浸潤評価では、未投与群、抗体投与群では顕著なリンパ球の浸潤が認められたが、APC 投与群ではリンパ球の浸潤が顕著に抑制されていることが確認された。そこで、NOD マウスに対する治療効果の検証を行ったところ、体重減少等の毒性を示さず、APC が最も顕著に加齢に伴う血中グルコース濃度の上昇を抑制することが明らかになった。また、血中インスリン濃度に関しても、APC 投与群で最も高い血中インスリン濃度の上昇が確認された。以上のように、本研究では、APC の NOD マウスの糖尿病発症に対する抑制効果を明らかにすることができた。APC はさまざまな自己免疫性疾患の治療に有望であるものと考えられ、今後は、その他の自己免疫疾患に対する有効性を検討する予定である。

以上のように、本研究では、高分子ナノテクノロジーを基盤として、スマート機能を付与した脂質ナノ粒子や高分子ミセル等のナノ DDS の開発に取り組み、核酸医薬、タンパク質、ウイルスベクター、抗体医薬などのバイオ医薬品の課題を解決することで、それらの実用化を加速する革新的技術を創出することができた。これらの技術の一部は、化学メーカー・製薬企業との共同研究へと進んでおり、社会実装へと繋げていきたいと考えている。

In this project, we developed innovative drug delivery systems (DDSs) to solve the problems of biopharmaceuticals such as nucleic acid medicines, bioactive peptides/proteins, and antibodies towards their practical application.

In project (1) "Development of pH-responsive polybetaine-coated lipid nanoparticles (LNPs) for intracellular delivery of nucleic acids", we developed a pH-responsive polybetaines (smart shell) that exhibit neutral charge during blood circulation but change to cationic property in acidic tumor microenvironments (pH<7.0) or inside the targeted cells. The pH-responsive polybetaines were applied to lipid nanoparticles (LNPs). As a result of comparing pH-responsive polybetaine-coated LNPs with conventional PEG-coated LNPs, we found that (i) the LNP surface charge changed from neutral to cationic due to pH change (pH 7.4 → pH 6.5), and (ii) the LNPs exhibited increased uptake and internalization by cancer cells at pH 6.5, followed by the endosomal escape, and (iii) the LNP

revealed superior siRNA activity. In in vivo study, pH-responsive polybetaine-coated LNPs showed higher blood retention and cancer accumulation than PEG-coated LNPs. Hence, pH-responsive polybetaine-coated LNPs loaded with siPLK1 showed superior tumor growth inhibitory effect than PEG-coated LNPs in a subcutaneous model of human ovarian cancer cells. Based on these results, we established a mass production process of pH-responsive polybetaine-lipid conjugates and confirmed in vitro and vivo functionalities towards non-clinical study in the future.

In project (2) "Development of protein delivery system using tannic acid (TA)/polymers containing boronic acid", we established ternary polymeric micelles loading proteins and adeno-associated virus (AAV), where boronic acid moiety in the polymer forms pH-responsive bonds with TA that interacts with biomolecules. Polymeric micelles containing various proteins such as β -galactosidase (β -Gal) and CRISPR Cas9/sgRNA complexes (RNP) revealed high stability against proteolytic enzymes, protein release under acidic pH environment, prolonged blood circulation, and enhanced tumor accumulation. We have confirmed the antitumor effects by in vivo genome editing of multiple cancer genes. On the other hand, the AAV-loaded micelles showed higher gene transfer efficiency than AAV alone and AAV/TA complex even in the presence of anti-AAV antibody (neutralizing antibody). In in vivo study, the AAV-loaded micelles could not only avoid inactivation by neutralizing antibodies but also suppress the production of neutralizing antibodies after AAV administration. Furthermore, the AAV-loaded micelles showed significantly increased gene expression in target tissue (tumor, brain etc.) while remarkably suppressing the gene expression in normal organs such as liver, spleen, and kidneys. This system is considered to have extremely high clinical significance as it solves the problem of neutralizing antibodies and thereby enables the repeated treatments.

In project (3) "Development of low toxic immune checkpoint inhibitors (ICIs) by polymer nanotechnology", we developed a polymer-conjugated anti-PD-L1 antibody, so-called antibody-polymer conjugate (APC), that can activate its antigen recognition ability selectively at the tumor site. In in vivo study, APC could reduce the toxicity of ICI by significantly suppressing immune-related adverse events (irAEs) in the liver, while showing superior antitumor effects.

As described above, in this project, we succeeded in the development of nano-DDSs for the delivery of biopharmaceuticals and demonstrated their efficacies and safety in diseased mice models. These nano-DDS are expected to bring innovation to cutting-edge medical care in the future.