

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：電荷反転型 LNP 製剤の精密設計と核酸・ペプチド医薬品開発への応用

Design of charge-reversible LNP for delivery of nucleic acids and peptides

研究開発実施期間：令和 3 年 11 月 30 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：浅井知浩

Tomohiro Asai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

静岡県公立大学法人静岡県立大学 薬学部 教授

University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences, Professor

II 研究開発の概要

脂質ナノ粒子 (lipid nanoparticle: LNP) 技術と RNA 技術の進展により、世界初の RNA 干渉薬や coronavirus disease 2019 (COVID-19) に対する mRNA ワクチンが実用化に至った。一般に LNP の構成脂質には、核酸の保持、細胞内移行、エンドソーム脱出に欠かせない pH 応答性の脂質誘導体が含まれる。実用化に至った脂質誘導体の構造の共通点は、その頭部に第 3 級アミンをもつことであり、酸性条件下でのみ頭部がイオン化しカチオン性を示す。そのため、これらの脂質誘導体はイオン化脂質と呼ばれる。一方、研究代表者らは第 3 級アミンをもたない pH 応答性の電荷反転型脂質誘導体および LNP を開発し、small interfering RNA (siRNA) や mRNA の送達に関する基礎研究で成果を挙げてきた。代表者らが保有する LNP 技術の特長のひとつは、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質を使用せずとも分散性の高い LNP を作製可能である点であり、従来のイオン化脂質を用いた LNP とは差別化ができる。イオン化脂質は、中性 pH において頭部がイオン化しておらず分子型のため、ホスファチジルコリンのような両親媒性リン脂質とは異なって頭部の極性が低い。そのため、実用化されたすべての核酸 LNP 製剤には、総脂質に対して数モルパーセントに満たない PEG 脂質が添加されており、この少量の PEG 脂質で膜界面を親水性にすることにより、均一で安定な粒子の形成を可能にしている。mRNA ワクチンの副反応においては、PEG 脂質に対する免疫応答の懸念が報告されている。代表者らが開発した LNP 技術は、粒子形成に PEG 脂質を必要としないため、その解決手段になりうる。

本事業では、代表者らが保有する LNP 技術の高性能化、対応可能なモダリティの追加、投与経路の比較検討を進め、技術の応用範囲の拡大を図った。これまでに代表者らが得た科学的知見を基盤に新規の電荷反転型脂質誘導体を精密設計し、保有する LNP 技術の高度化を図り、実用化された技術を上回る性能をもつ LNP の開発を試みた。モダリティとしては mRNA を中心に、siRNA、microRNA (miRNA)、およびペプチドも開発対象にした。加えて、消化管吸収が専門の分担研究者との連携により、LNP を用いた経口投与による核酸・ペプチドデリバリーに関する研究を行った。さらに、本事業の研究連携体制を活用した産官学連携および異分野連携を行い、他のシーズ開発採択課題の研究推進にも取り組んだ。

1) LNP 技術の高度化

・新規電荷反転型脂質誘導体の開発

以前に代表者らが開発した LNP 技術は、PEG-free で LNP が形成可能であるものの、PEG 脂質を含む LNP と比較して mRNA の導入効率が低いことが課題であった。この課題の解決を目的とし、新たに電荷反転型脂質誘導体 (TMDEDA 脂質) を設計・合成した。TMDEDA 脂質を含有する PEG-free LNP を作成し、LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、モルフォロジー、mRNA 封入率等の製剤に関する検討と、インビボにおける mRNA 導入効率に関する検討を実施した。これらの PEG-free LNP 技術に関する検討で得られた研究成果をもとに、TMDEDA 脂質の特許を令和 5 年度に国内出願した (特願 2023-021016)。国内出願後も検討を継続し、その成果を優先権主張出願に反映させたうえで PCT 出願 (PCT/JP2024/3597) を行った。当該特許は、令和 7 年度に日本、米国、欧州、中国、韓国、豪州への移行手続きを完了した。さらに、また別の pH 応答性脂質である CA 脂質を開発し、令和 7 年度に特許出願 (特願 2025-144198) を行った。CA 脂質を用いた CA-LNP は、*in vitro* でも *in vivo* でも高効率に mRNA を導入可能であり、対照の既存 LNP と比較して高い抗体誘導能を示した。

・PEG-free LNP 導入効率・安全性等の評価

mRNA を封入した PEG-free LNP の有効性、安全性、安定性等を評価した。TMDEDA 脂質を含有する PEG-free LNP をマウスに筋肉内投与したところ、PEG 脂質を用いた場合と同等以上の mRNA 導入効率を示し、加えて炎症性が低く安全性が高い結果を得た (J Pharm Sci. 2026)。また既存 LNP と比較して安全性および安定性において優位性があることが明らかになった。さらに脂質を適切に組み合わせることで PEG-free LNP を作製することにより、PEG 脂質を用いずとも PEG を含有する既存 LNP と同程度の抗体誘導が可能になった (特願 2026-012878)。なお、PEG 脂質有り同士で各 LNP を比較した場合は、本事業で開発した LNP は、既存 LNP よりも優れた抗体誘導および薬理効果を示した。

2) LNP の製剤化

・mRNA 製剤の凍結製剤化

mRNA を封入した LNP 製剤に凍結保護剤のスクロースを添加した後、LNP を -80°C で凍結した。凍結融解の前後で LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、mRNA 封入率が変化しないことを確認した。また凍結 mRNA/LNP 製剤を融解後にマウスに投与し、mRNA の活性 (ルシフェラーゼ mRNA の導入効率) に変化がないことを明らかにした。

・siRNA・mRNA 製剤の凍結乾燥製剤化

siRNA あるいは mRNA を封入した LNP の凍結乾燥製剤を開発するため、凍結保護剤、その他添加剤、凍結条件、乾燥条件等について検討した。凍結乾燥 mRNA/LNP 製剤を復水した後、LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、mRNA 封入率、および mRNA の活性 (ルシフェラーゼ mRNA の導入効率) を測定した。データを凍結乾燥の前後で比較して mRNA の凍結乾燥製剤を評価し、動物試験において凍結乾燥の前後で mRNA の活性がほとんど変化しない製剤を開発した。LNP の凍結乾燥製剤は、調製から半年間以上経過しても粒子物性に变化がなく、十分なルシフェラーゼ発現活性を示した。

3) LNP 技術の汎用化

・ペプチドの LNP 内への内封

電荷反転型脂質誘導体とヘルパー脂質を組み合わせ、非共有結合性の弱い相互作用の協同性作用をドライビングフォースにしてペプチドを LNP 内に封入することを試みた。ペプチドとしてはヒトインスリンを選択し、インスリン封入 LNP の調製を試みた。インスリンを溶解させる緩衝液濃度や pH、インスリン濃度等を様々に変えた条件で LNP の粒子径、分散性、インスリン封入率、薬理活性を評価し、インスリン封入 LNP を開発した。

糖尿病モデルマウスにインスリン封入 LNP を経口あるいは皮下投与したところ、いずれも持続的な血糖値の低下が観察された (Biochem Biophys Res Commun. 2025)。インスリンの経口製剤は待望されており、その実現に向けて成果が得られた。

- ・ LNP (mRNA) 投与経路の検討

電荷反転型脂質誘導体を用いた LNP 技術の汎用化を目的とし、LNP の投与経路に関する検討を実施した。投与経路 (筋肉内投与、静脈内投与、経口投与) で種々の各 mRNA/LNP をマウスに投与し、mRNA の発現効率や LNP の体内分布を評価した。本事業で開発した LNP は、筋肉内投与においても静脈内投与においても、PEG 脂質の有無にかかわらず肝臓への集積性が低かった。既存 LNP は高い肝集積性を示したが、本事業で開発した LNP は脾臓に高い集積性を示した。そこで、フローサイトメトリーを用いて細胞レベルで解析したところ、脾臓の樹状細胞に高い集積性を示した (特願 2025-144198)。各投与経路 (筋肉内投与、静脈内投与、経口投与) において、本事業で開発した LNP は、既存 LNP とは明らかに異なる体内動態およびタンパク質発現を示した。

- ・ mRNA がんワクチンの開発

本事業で開発した LNP にモデル抗原オボアルブミン (OVA) をコードする mRNA を封入し、マウスに筋肉内投与したところ、抗原特異的な液性免疫と細胞性免疫が顕著に誘導された (PCT/JP2022/17539、特願 2025-144198)。一方で、炎症性サイトカインの産生量は、既存 LNP よりも顕著に低く、高い安全性が示唆された。同様に溶血性試験においても高い安全性を示した。そこで、OVA 発現 EG7 腫瘍モデルにおいてワクチン効果を評価したところ、既存 LNP よりも高い抗腫瘍効果を示し、既存技術に対する優位性が明らかになった。よって本事業で開発した LNP は、mRNA がんワクチンの開発に有用であることが示唆された。

4) 創薬シーズ保有研究者との連携

- ・ シーズ対応 1

B 型肝炎ウイルス (HBV) の抗原タンパク質をコードする mRNA を封入した凍結 LNP 製剤について評価したところ、抗体産生や HBV の感染抑制効果が認められた。HBV の mRNA/LNP ワクチンは、既存のワクチン不応者に対してのニーズがあり、また治療ワクチンとして応用可能になれば、かなりのニーズがあると考えられる。

- ・ シーズ対応 2

強力な抗腫瘍効果をもつ核酸 A を封入した LNP 製剤を開発することを目的とし、核酸 A の LNP への封入方法や LNP の処方について検討を実施した。LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、miRNA 封入率を評価し、物性に関して良好な結果を得た。ヒト頭頸部がんを移植したマウスに核酸 A/LNP を静脈内投与したところ顕著な抗腫瘍効果が得られた。

- ・ シーズ対応 3

TP53 スプライシング異常をターゲットにした核酸 B をがん細胞に導入するための LNP の研究開発を実施した。電荷を持たない核酸 B は、従来の静電的相互作用を利用したナノ粒子化は困難であった。そこで本事業では核酸 B を LNP に封入する手法について検討した。その結果、核酸 B を 80% 以上の内封率で PEG-free LNP に封入する手法を見出し、LNP 化が可能なモダリティが新たに追加された。

- ・ シーズ対応 4

高純度 mRNA を封入した LNP 製剤の開発を行った。電荷反転型脂質誘導体を用いて高純度 mRNA を含有する PEG-free LNP を調製し、その性能を動物試験で評価した。ルシフェラーゼ mRNA を封入した PEG-free LNP をマウス後肢の筋肉内に投与後したところ、対照 mRNA と比較して高純度 mRNA は高いルシフェラーゼ活性を示した。さらに OVA をコードする mRNA を封入した PEG-free LNP を同様に投与したところ、対照 mRNA と比較して高純度 mRNA は高い抗体誘導能を示した。PEG-free LNP 技術と高純度 mRNA 技術の融合により、優れた mRNA ワクチンを開発できる可能性が示唆された。

- ・ シーズ対応 5

核酸Cを電荷反転型 LNP に封入する方法について検討した。核酸Cを封入した LNP 製剤の試作を行い、LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、核酸封入率を評価し、物性に関して良好な結果を得た。ヒト膵がん細胞株を用いた抗腫瘍効果の実験において、核酸Cは有効性を示した。カニクイザルに投与する核酸Cを調製するため、脂質と LNP のスケールアップ製造に関する検討を行い、従来よりも 100 倍程度のスケールで LNP が調製可能になった。カニクイザルの反復静脈内投与毒性試験においては LNP の高い安全性が明らかになった。従来のキャリアと異なり、自発運動や摂餌状態の低下が観察されず、血液生化学的検査の結果では炎症および肝機能へのダメージが軽減された。病理学的検査においても異常は認められなかった。

- ・ シーズ対応 6

TP53 スプライシング異常をターゲットにした核酸Dを LNP 化し、CDX モデルにおいて核酸D/LNP 製剤の有効性評価を行った。核酸D/LNP 製剤とシスプラチンとの併用で評価したところ、CDX モデルにおいて核酸D/LNP 製剤の有効性が明らかになった。

- ・ シーズ対応 7

中枢性遺伝性希少疾患シアリドーシスに対する創薬シーズ（酵素Xをコードする mRNA）を封入した LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、核酸封入率を評価し、物性に関して良好な結果が得た。mRNA/LNP をマウスの脳室内に投与したところ、酵素Xのタンパク質発現と活性の上昇が観察された。一方で、LNP 溶液に含まれる凍結保護剤スクロースの浸透圧が脳組織に影響を及ぼす可能性が考えられたため、スクロースを含有しない冷蔵製剤を開発した。冷蔵 mRNA/LNP 製剤の粒子物性や安定性について評価した後、mRNA/LNP をシアリドーシスモデルマウスおよびガラクトシアリドーシスモデルマウスに脳室内投与したところ、両モデルにおいてミオクローニー発作回数が減少した。

シーズ対応 8

核酸Eを LNP に封入する方法について検討した。核酸Eを封入した LNP 製剤を調製し、核酸E/LNP の粒子径、ゼータ電位、多分散指数、核酸E封入率を評価し、物性に関して良好な結果を得た。ヒト乳がん細胞を移植したマウスに核酸E/LNP を投与し、その抗腫瘍効果を検討したところ、腫瘍増殖の顕著な抑制は認められなかった。

This project aimed to expand the application range of our lipid nanoparticle (LNP) technology by improving its performance, adding compatible modalities, and comparing administration routes. One of the features of our LNP technology is that it is possible to produce highly dispersible LNPs without using polyethylene glycol (PEG) lipids, which differentiates it from conventional LNPs. Although omitted in this report, research collaborations were also conducted to promote research in other seed development projects.

Development of novel charge-reversible lipid derivatives

A new charge-reversible lipid derivative (TMDEDA lipid) was designed and synthesized. The usefulness of PEG-free LNP containing TMDEDA lipid was clarified and a patent application was filed (PCT/JP2024/3597). In addition, another pH-responsive lipid, CA lipid, was developed and a patent application was filed (JP2025-144198). CA-LNPs using CA lipids enabled highly efficient mRNA transfection both *in vitro* and *in vivo*, and showed higher antibody induction compared to existing control LNPs.

Evaluation of effectiveness and safety of mRNA/PEG-free LNPs

When PEG-free LNPs containing TMDEDA lipids were administered intramuscularly to mice, they showed mRNA transfection efficiency equivalent to or better than that using PEG lipids, and in addition, they exhibited lower inflammation and higher safety (J Pharm Sci. 2026). Furthermore, superiority in safety and stability compared to existing LNPs was revealed. Moreover, by appropriately combining lipids to produce PEG-free LNPs, antibody induction comparable to that of existing PEG-containing LNPs became possible without using PEG lipids (JP2026-012878).

Freezing formulation of mRNA/LNPs

Sucrose, a cryoprotective agent, was added to LNP preparations containing mRNA, and the LNPs were frozen at -80°C. We demonstrated that there was no change in particle properties or mRNA activity (luciferase mRNA transfection efficiency) before and after a freeze-thaw cycle.

Freeze-dried formulation of siRNA or mRNA/LNPs

To develop lyophilized preparations of LNPs encapsulating siRNA or mRNA, we investigated cryoprotective agents, other additives, freezing conditions, drying conditions, etc. In animal studies, we developed a preparation in which mRNA activity remained almost unchanged before and after lyophilization. The lyophilized mRNA/LNP preparation showed no change in particle properties even after more than six months from preparation, and exhibited sufficient luciferase activity.

Encapsulation of peptides into LNPs

We developed insulin-encapsulated LNPs and administered them orally or subcutaneously to diabetic model mice, resulting in a sustained decrease in blood glucose levels (Biochem Biophys Res Commun. 2025).

Investigation of Administration Routes of mRNA/LNPs

Various mRNA/LNPs were administered to mice via each administration route (intramuscular, intravenous, and oral), and the mRNA expression efficiency and LNP distribution in the body were evaluated. Our LNPs showed low accumulation in the liver, regardless of the presence or absence of PEG lipids, after both intramuscular and intravenous administration. While existing LNPs showed high accumulation in the liver, our LNPs showed high accumulation in the spleen, particularly in splenic dendritic cells (JP2025-144198). In all administration routes, our LNPs exhibited clearly different characteristics in pharmacokinetics and protein expression compared to existing LNPs.

Development of mRNA Cancer Vaccines

When mRNA encoding the model antigen ovalbumin (OVA) was encapsulated in our LNPs and administered intramuscularly to mice, antigen-specific humoral and cellular immunity was significantly induced (PCT/JP2022/17539, JP2025-144198). On the other hand, the production of inflammatory cytokines was significantly lower with our LNPs than with existing LNPs, suggesting high safety. When the cancer vaccine effects were evaluated in an OVA-expressing EG7 tumor model, our LNPs showed higher antitumor effects than existing LNPs, demonstrating superiority over existing technologies. Therefore, it is suggested that our LNPs are useful for the development of mRNA cancer vaccines.