

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：サブセットレベルで細胞標的化を可能とする脂質ナノ粒子技術の開発

Development of lipid nanoparticle technology that enables cell targeting at the subset level

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：中村 孝司

Takashi Nakamura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 教授

Faculty of Pharmacy, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University,
Professor

II 研究開発の概要

シングルセルオミクス解析技術の発展により、疾患に関与する細胞の多様性や階層性が明らかになり、細胞サブセットが医薬品の標的になっている。それ故、薬物を細胞サブセットへと選択的に送達可能なドラッグデリバリーシステム（drug delivery system: DDS）は、新しい医薬品開発における重要な製剤技術になる。脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle: LNP）技術は、核酸の送達に有用な DDS であり、世界初の small interfering RNA（siRNA）医薬や新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンの成功に大きく貢献した。一方で、肝臓や脾臓以外の臓器や細胞への送達性に乏しいという課題がある。そこで本研究開発では、細胞サブセットを識別可能な新規標的化技術の開発を目的として研究を進めた。本研究開発課題では、抗体として抗体断片 Fab'（Fab プライム）を用いた。1 種類の Fab' を表面に修飾した LNP は 1 抗体 LNP、標的が異なる 2 種類の Fab' を表面に修飾した LNP は 2 抗体 LNP と記載する。以下に研究開発の成果を記載する。

1) 1 抗体 LNP を用いた標的細胞への親和性評価（in vitro）

細胞サブセットは複数のマーカー分子で規定される細胞集団であることから、複数種類のリガンド分子を LNP 表面に修飾することで、細胞サブセット標的化を実現する戦略を立案した。抗体のような非常に高い親和性を持つリガンドを複数種類修飾する従来の方法の場合、1 種類の標的分子に対しても効率的に結合してしまい、細胞サブセットを識別することができない。そこで我々は、標的親和性が低い Fab' をリガンドとして採用し、独自の戦略に基づいて、LNP 表面に修飾する Fab' 密度を最適化することで、細胞サブセット標的化を実現した。

標的とする細胞サブセットの表面に発現している複数種類の標的分子に対する各 Fab' の LNP への修飾密度を最適化するために、1 種類の Fab' を修飾した LNP を用いて、標的細胞への親和性を調べた。モデル標的細胞サブセットとして、制御性 T 細胞（regulatory T cell: Treg 細胞）を含む CD4 陽性 T 細胞のサブセットである CD4+CD25+細胞を選択し、CD4 に対する Fab'（CD4-Fab'）と CD25 に対する Fab'（CD25-Fab'）を用いた。

マウス CD4 抗体およびマウス CD25 抗体に対し、ペプシン消化と還元処理を行うことで、各 Fab' を得た。核酸を搭載した LNP の表面に各 Fab' を 1 種類ずつ修飾することで、CD4-Fab' 修飾 LNP (CD4-LNP) と CD25-Fab' 修飾 LNP (CD25-LNP) を調製した。CD4-LNP、CD25-LNP は共に 100~140 nm で均一性の高い粒度分布を示した。マウス脾臓から採取した脾臓細胞に対し、Fab' の修飾密度を変化させた CD4-LNP もしくは CD25-LNP を作用させ、フローサイトメトリーにより標的細胞への親和性と選択性を調べた。その結果、CD4-LNP、CD25-LNP とともに、Fab' の修飾密度に応じた標的細胞への結合量の増加が認められた。一方で、CD4 や CD25 を発現しない細胞集団への結合性は、Fab' の修飾密度に関係なく低いものであった。これらの結果から、Fab' を修飾した LNP は、標的分子を発現する細胞への高い親和性と選択性を示すことが明らかとなった。

2) 2 抗体 LNP の構築と標的細胞サブセットへの親和性と選択性の評価 (in vitro)

1 抗体 LNP (CD4-LNP、CD25-LNP) を用いた標的細胞サブセットへの親和性評価の結果に基づき、CD4+CD25+細胞を標的化するための CD4-Fab' と CD25-Fab' の LNP への修飾密度を決定した。決定した CD4-Fab' と CD25-Fab' の修飾密度で LNP へと 2 種類の Fab' を同時修飾し、110 nm 前後の均一性の高いナノ粒子 (CD4/CD25-LNP) を得た。続いて、マウス脾臓から採取した脾臓細胞に対し、CD4/CD25-LNP を作用させ、フローサイトメトリーにより標的細胞サブセットへの親和性と選択性を調べた。その結果、CD4/CD25-LNP は、標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞に対して、同じ修飾密度の CD4-LNP と比較して 20 倍以上の結合量を示し、相乗的な親和性の増強に成功した。また、細胞サブセットごとの結合性を評価した結果、従来技術である 1 種類の抗体のみを修飾した LNP (ここでは CD4-LNP) は、CD4 を発現している標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞と非標的細胞サブセットである CD4+CD25-細胞の両方に高い親和性を示し、細胞サブセットを識別することができなかった。一方で、CD4/CD25-LNP は標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞のみに高い親和性を示し、細胞サブセットを選択的に識別可能であることが明らかになった。

また、CD4/CD25-LNP が標的細胞サブセットへの高い親和性と選択性を生み出す要因を数学的に明らかにするため、最小現象学的モデルを用いた定量解析を実施した。CD4-LNP、CD25-LNP、CD4/CD25-LNP の Fab' 修飾密度を変化させたときの細胞サブセットへの結合量のデータを用いて、フィッティングを行い、細胞取り込み速度を規定するモデル式の係数および反応次数を決定した。決定した細胞取り込み速度式に基づいたシミュレーション解析の結果、LNP 上に修飾されている CD4-Fab' と CD25-Fab' が協調的に作用し、標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞への高い親和性と選択性を発揮していることが明らかになった。一方で、非標的細胞サブセットでは、CD4-Fab' と CD25-Fab' の協調作用は認められず、どちらか一方の Fab' の効果に依存していた。

以上のことから、実験データおよびシミュレーションの両方の観点から、我々が提唱した細胞サブセット標的化戦略の有用性が実証された。

3) 2 抗体 LNP の標的細胞サブセットへの親和性と選択性の評価 (in vivo)

続いて、in vivo においても CD4/CD25-LNP が機能するかを評価した。マウスの尾静脈から CD4/CD25-LNP を投与し、血液および脾臓を採取した。血液中および脾臓細胞中の CD4+CD25+細胞への親和性と選択性を、フローサイトメトリーを用いて解析した。解析対象は、CD4-CD25-細胞、CD4+CD25-細胞、CD4-CD25+細胞、CD4+CD25+細胞 (標的細胞サブセット) とした。その結果、CD4/CD25-LNP は、非標的細胞サブセットである CD4-CD25-細胞、CD4+CD25-細胞、CD4-CD25+細胞に比べ、標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞に有意に高い親和性を示したことから、in vivo においても細胞サブセットを識別可能であることが明らかになった。

上述した in vitro、in vivo の結果より、我々は独自の設計戦略により、細胞をサブセットレベルで識別可能な新規の標的化技術を開発することに成功した。本技術は世界初のものであり、CD4+CD25+細胞以外の標的細胞サブセットの実施例を追加し、特許出願を行った (特願 2023-175890、PCT/JP2024/036074)。また、本成果は英語論文としてまとめ、現在投稿中である。

4) 2 抗体 LNP の大量製造方法の確立

本研究課題で開発した 2 抗体 LNP の実用化を目指すための基礎検討の 1 つとして、マイクロ流路デバイスを用いた大量製造方法の確立を進めた。マイクロ流路デバイスは、別々の流路から脂質を溶解したアルコール溶液と核酸を溶解させた酸性緩衝液を流し、合流後に高速混合のための構造を有する流路内を進むことで LNP 形成を行い、大量に製造するための装置である。研究開発分担者である真栄城（北海道大学大学院工学研究院）は、LNP 形成後に Fab' を修飾するために、Fab' 溶液を流すための流路を途中で合流させたマイクロ流路デバイス（3 又流路デバイス）を作製した。種々の条件検討を行うことで、バッチ法と同等の物性を有する CD4/CD25-LNP を調製することに成功した。また、標的細胞サブセットである CD4+CD25+細胞への選択性を、マウス脾臓細胞を用いたフローサイトメトリー解析により比較した。その結果、バッチ法と同様にマイクロ流路デバイスで調製した CD4/CD25-LNP は、標的である CD4+CD25+細胞に高い選択性を示した。また、真栄城は耐圧性能が高く、より高速に混合可能がガラスベースのマイクロ流路デバイスを開発にも成功した（Matsuura-Sawada Y, et al., *ACS Appl Eng Mater* 1: 278-286, 2022; Maeki M, et al., *Appl Mater Today* 31: 101754, 2023）。以上のことから、2 抗体 LNP の大量製造方法の基礎を確立することに成功し、LNP にリガンドを修飾する際の大量製造方法に関する重要な知見を得ることができ、LNP 開発への貢献に繋がった。

5) LNP 技術の高度化と課題間連携の推進

研究開発代表者の中村（金沢大学医薬保健研究域薬学系）と研究開発分担者の佐藤（北海道大学大学院薬学研究院）を中心に、リガンド修飾 LNP や LNP の主成分であるイオン化脂質の高度化、AMED 内での課題間連携研究に取り組んだ。本研究課題で確立した LNP 上の Fab' の修飾密度制御技術を応用し、腫瘍血管へと選択的に送達可能なリガンド修飾 LNP を開発し、腫瘍血管を特異的に破壊する新しいがん治療法を発見した（Endo R, et al., *Biomaterials* 321: 123297, 2025）。また、イオン化脂質の高度化として、免疫細胞への mRNA 送達を促進するイオン化脂質の開発に成功した（Nakamura T, et al., *Int J Pharm* 636: 122810, 2023; Suzuki Y, et al., *J Control Release* 382: 113687, 2025; Suzuki Y, et al., *Next Nanotechnol* 8: 100154, 2025）。本研究開発課題実施中に、AMED 内の 6 課題との連携研究を実施した。核酸をベースとした創薬シーズを保有する研究者との連携が中心であり、創薬シーズを標的臓器や細胞へと送達するための LNP もしくは抗体 LNP の開発を行い、送達性および薬効の評価を実施した。概ね、掲げていた目標を達成することに成功し、連携研究の継続や新しい共同研究へと繋がっている。

以上のように、本研究課題では、細胞をサブセットレベルで識別可能な世界初の DDS 技術を開発することに成功し、LNP の課題であった肝臓や脾臓以外の標的へ送達する技術の発展に貢献することができた。また、今後、医薬品の標的としてニーズが高まる細胞サブセットへと薬物を送達する際にも製剤技術として重要な貢献をすることができる技術である。本研究課題の成果は、10 報の国際誌、51 件の学会発表として発信した。

The advancement of single-cell omics analysis technologies has revealed the heterogeneity and hierarchy of cells involved in diseases, leading to the identification of specific cellular subsets as therapeutic targets. Therefore, drug delivery systems (DDSs) capable of selectively delivering therapeutics to cellular subsets are becoming important formulation technologies for next-generation drug development. Lipid nanoparticles (LNPs) are highly useful DDSs for nucleic acid delivery. However, LNPs still face limitations in delivery efficiency to organs and cells other than the liver and spleen. Accordingly, this research project aimed to develop a novel targeting technology capable of discriminating cellular subsets. The research outcomes are summarized below.

1) Evaluation of the affinity of single-Fab'LNPs for target cells (in vitro)

Because cellular subsets are defined by the expression of multiple marker molecules, we proposed a strategy to achieve cellular subset targeting by modifying the LNP surface with multiple ligand molecules. We employed Fab' fragments as ligands and optimized the surface density of Fab' molecules on LNPs based on our original strategy, thereby enabling cellular subset targeting. To optimize the modification density of each Fab' against multiple target molecules expressed on the target cellular subset, we first evaluated the affinity of single-antibody LNPs toward target cells. As a model cellular subset, CD4+CD25+ cells, a subset of CD4-positive T cells including regulatory T cells (Tregs), were selected. Fab' fragments against CD4 (CD4-Fab') and CD25 (CD25-Fab') were used. LNPs encapsulating nucleic acids were modified with either CD4-Fab' or CD25-Fab', yielding CD4-Fab'-modified LNPs (CD4-LNPs) and CD25-Fab'-modified LNPs (CD25-LNPs), respectively. Mouse splenocytes were treated with CD4-LNPs or CD25-LNPs possessing varying Fab' modification densities, and their affinity and selectivity toward target cells were analyzed by flow cytometry. As a result, both CD4-LNPs and CD25-LNPs showed increased binding to target cells in a Fab'-density-dependent manner.

2) Construction of dual-Fab' LNPs and evaluation of their affinity and selectivity toward target cellular subsets

Based on the results obtained from the affinity evaluation of single-antibody LNPs, the optimal modification densities of CD4-Fab' and CD25-Fab' for targeting CD4+CD25+ cells were determined. LNPs simultaneously modified with both Fab' molecules at the optimized densities were prepared, yielding highly uniform nanoparticles approximately 110 nm in diameter (CD4/CD25-LNPs). The CD4/CD25-LNPs exhibited more than 20-fold higher binding to the target CD4+CD25+ cellular subset and high target selectivity. Furthermore, even in vivo, the LNPs exhibited high affinity and selectivity toward Treg cells in both the blood and spleen.

Collectively, we successfully developed a novel targeting technology capable of discriminating cells at the subset level through our original design strategy. Additional examples targeting cellular subsets other than CD4+CD25+ cells were included in patent applications (Japanese Patent Application No. 2023-175890; PCT/JP2024/036074). The findings have also been compiled into a manuscript currently under submission.

In conclusion, this project successfully developed the world's first DDS technology capable of discriminating cellular subsets at the subset level, thereby contributing to overcoming a major limitation of LNPs—the inability to efficiently target organs and cells beyond the liver and spleen. Furthermore, this technology is expected to play an important role as a formulation platform for delivering therapeutics to cellular subsets that will increasingly emerge as important drug targets in the future. The outcomes of this project were disseminated through 10 international journal publications and 51 conference presentations.