

タンパク質発現の投与部位／肝臓比の向上を目的とした局所投与用 mRNA-コレステロール低含有脂質ナノ粒子の開発に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

医薬品情報学分野

川口 真帆

2023

# 目次

略語表	4
総論の部	6
総論	6
第1章 肝臓でのタンパク質発現を抑える mRNA-LNP の製剤設計と その物理化学的性質の評価	10
緒言	10
1-1. mRNA-コレステロール低含有 LNP の物理化学的性質	14
1-2. mRNA-コレステロール低含有 LNP 調製後 7 日目までの安定性	18
考察	20

第 2 章 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が mRNA-LNP 局所投与後のタンパク質発現に与える影響	22
緒言	22
2-1. mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロールが <i>in vitro</i> タンパク質発現に与える影響	24
2-2. マウス筋肉内投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が <i>in vivo</i> タンパク質発現に与える影響	26
2-3. マウス皮下投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が <i>in vivo</i> タンパク質発現に与える影響	29
2-4. マウス筋肉内投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量がタンパク質発現の投与部位／肝臓比に与える影響の経時的解析	30
考察	33
結論	39
謝辞	40
実験の部	41
引用文献	47
基礎となった論文	52

## 略語集

ALT	Alanine transaminase
AST	Aspartate transaminase
ApoE	Apolipoprotein E
BCA	Bicinchoninic acid
DDS	Drug Delivery System
DLS	Dynamic Light Scattering
DMD	Duchenne muscular dystrophy
FLuc	Firefly Luciferase
HDL	High density lipoprotein
IDL	Intermediate density lipoprotein
IVIS	In vivo imaging system
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LNP	Lipid Nanoparticle
MC3	DLinMC3 -DMA
mRNA	Messenger RNA
PDI	Poly dispersity index

PEG	Polyethylene glycol
RNA	Ribonucleic Acid
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
VLDL	Very low density lipoprotein

## 総論の部

### 総論

メッセンジャーRNA (mRNA) は、感染症やがん、遺伝性疾患の治療・予防薬として期待されている。mRNA の効果的な送達を実現するために、mRNA 化学修飾に加え、脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticles; LNP)<sup>1</sup>、ナノミセル<sup>2</sup>等の手法が開発されてきた。これらの mRNA の DDS は、種々の標的への応用を目指し、数多くのデザインや投与経路が検討されてきた。特に、LNP を用いた核酸デリバリーは、遺伝性トランスサイレチン型アミロイドーシスに対する siRNA 医薬品パチシランの承認に続き、COVID-19 mRNA ワクチンの承認が急速に進み、世界中で大量使用されていることから注目を浴びている。mRNA 封入脂質ナノ粒子 (mRNA-LNP) は、他の mRNA への応用が容易なため、現在、mRNA 医薬品の開発に向けて複数の臨床試験が進行中である。mRNA-LNP の応用としては、遺伝性疾患の疾患原因因子をコードする mRNA を用いるタンパク質補充療法や抗原タンパク質をコードする mRNA を用いて免疫活性化を誘導するワクチン、また、Cas9 タンパク質をコードする mRNA と sgRNA を用いる CRISPR/Cas9 mRNA ゲノム編集などがある。さらに、LNP と CRISPR/Cas9 シ

システムを組み合わせたトランスサイレチン型アミロイドーシスの治療薬候補である NTLA-2001 の臨床試験<sup>3</sup>がおこなわれている。

ゲノム編集技術は遺伝子配列情報を改変する技術であり、ゲノム上の任意の箇所を切断し、修復する過程でノックアウトあるいはノックインすることができる。なかでも、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムは、細菌や古細菌が持つ外来 DNA を排除する免疫機構を利用した Cas9ヌクレアーゼタンパク質と標的 DNA に相補的な配列を持ち Cas9ヌクレアーゼを誘導する sgRNA を利用して、狙い撃ちした 1カ所を遺伝子改変する。Cas9 と gRNA の送達アプローチは様々な手法があるが、他の手法と比較して、LNP による CRISPR/Cas9 の送達は次のようなアドバンテージがある。①パッケージできるサイズの制限がなく、Cas9 mRNA と sgRNA を同時に封入・送達可能、②Cas9 タンパク質発現が一過性であるため、オフターゲット効果を低減できる可能性<sup>4</sup>、③宿主ゲノムへの組み込みリスクがない<sup>5</sup>、④中和抗体が産生されないため反復投与が可能<sup>6</sup>、⑤大規模製造が可能。LNP を利用した CRISPR/Cas9 in vivo ゲノム編集は疾患治療の強力なプラットフォームとして期待されている。LNP をキャリアとした CRISPR/Cas9 in vivo ゲノム編集の最も有望なアプリケーションは、肝細胞におけるゲノム編集であり、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスや遺伝性血管浮腫の治療の臨床試験が実施されている。また現在、肝臓を標的とした多

くの前臨床試験が実施されているが、様々な臓器や細胞で特異的に高発現できる mRNA デリバリーシステムの開発が進めば、様々な難治性疾患への治療応用が広がると考えられている。

多様な応用を目指して、mRNA-LNP の投与経路は筋肉内投与のほか、静脈内、皮下、皮内、腹腔内、腫瘍内、網膜下、眼窩内、脳室内、経肺、結節内投与など、さまざまな経路が検討されている。<sup>7,8</sup> 筋肉内投与や皮下投与は、手技をあまり必要としない局所投与方法である。mRNA-LNP の筋肉内または皮下投与では、まず投与部位に入った後、リンパ管を通過して血管系に移行すると考えられている。<sup>9</sup> mRNA-LNP の静脈内、筋肉内、皮下投与では、肝臓でタンパク質発現しやすいことが知られている。<sup>7,13</sup> この特性は、mRNA-LNP の粒子径<sup>12</sup> と表面電荷<sup>14</sup>、血液系に入った後のタンパク質の吸着により形成される生体分子コロナ<sup>15</sup>、肝細胞の低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) を介したアポリポタンパク質 E (ApoE) による細胞内取り込み<sup>16</sup> に関連している。しかし、肝臓で多くタンパク質発現した場合、肝臓での細胞傷害性 T 細胞の誘導の可能性があり<sup>17</sup>、現時点では不明だが長期的には肝毒性等の予期せぬ副作用が生じる懸念がある。そのため、mRNA-LNP を肝臓以外の臓器に標的化する際、副作用の軽減と安全性の向上のため、肝臓でのタンパク質発現を抑える必要がある。

そこで、本研究では、mRNA-LNP 局所投与後の肝臓でのタンパク質発現を抑



え、投与部位で選択的にタンパク質発現を実現できる局所投与用 mRNA-LNP の開発を目的とした。

# 第1章 肝臓でのタンパク質発現を抑える mRNA-LNP の製剤設計とその物理化学的性質の評価

## 緒言

総論で触れたように mRNA-LNP は CRISPR/Cas9 システムのキャリアとしてその有用性が期待される一方で、LNP を利用した CRISPR/Cas9 システムの肝臓以外の組織へのアプリケーションには、mRNA-LNP の肝臓指向性は障害となりかねない。そこで、新たに肝臓への移行を抑えた mRNA-LNP の製剤設計を考えた。mRNA-LNP は、主に、イオン化脂質、PEG 脂質、ヘルパー脂質であるリン脂質、コレステロールを構成脂質としている。低 pH mRNA 水系溶液と脂質エタノール溶液の混合により調製されている。イオン化脂質は親水基に第 3 級アミンを有し、調製時の酸性条件下で正に荷電することで、負電荷の mRNA を封入する<sup>18</sup>。さらに、イオン化脂質はこの pH 感受性のために、細胞内エンドソームの低 pH 下で正に荷電し、負に帯電するエンドソーム膜との融合を促進してエンドソーム脱出を促進する可能性がある<sup>19</sup>。PEG 脂質は血中滞留性の改善やサイズ制御、リン脂質は構造安定性や細胞接着の促進、コレステロールは構造安定性に加え、膜の流動性にもはたらいている。これまで、mRNA-

LNP の製剤設計に関して、イオン化脂質や PEG 脂質等の脂質については数多く研究されてきた。LNP は当初 siRNA の送達を目的としておりイオン化脂質 DLinMC3-DMA が開発されたため、COVID-19 の mRNA ワクチンのためにファイザー・ビオンテック社やモデルナ社はより適したイオン化脂質としてそれぞれ独自のイオン化脂質を開発した。また、サイズ制御や血中滞留性に関わる PEG 脂質の量<sup>20</sup>や種類<sup>21</sup>の最適化、ヘルパー脂質の種類と蓄積する臓器の指向性<sup>22</sup>に関して報告がある。

先行して研究されているリポソーム製剤におけるコレステロールの役割に着目した。まず、コレステロールは植物や動物の細胞にも含まれ、リン脂質と水素結合によりインタラクション可能なヒドロキシ基を有し、かさばるステロイド骨格を持つ。膜透過性の向上や膜剛性の調節を担っている。ホスファチジルコリンやコレステロールは構造安定性に寄与することから、ナノ粒子の一つであるリポソームの材料としても汎用されている。コレステロールには、膜透過性の調節、弾力性と剛性、膜強度など、さまざまな重要な役割がある。そして、リポソームにおいて、コレステロールは膜流動性を調整し、リン脂質二重層の安定性を改善することで、リポソームの凝集を防ぎ、リポソーム膜の安定性を改善することができる。<sup>23-26</sup>さらに、薬物封入率の改善<sup>26</sup>や血漿中での構造安定性にも影響<sup>24</sup>することが報告されている。血漿中でのリポソームの構造安定性には、膜安定

性によってクリアランスに影響すること、リポソームと血漿タンパク質との結合を介したクリアランスが要因となっていることが知られている。リポソームの脂質成分中のコレステロールは、循環血からのクリアランスに影響を及ぼすことが報告されている。<sup>27,28</sup> コレステロール含有量の多いリポソームは循環血液に入った後の血漿タンパク質結合量が少ないため、循環血液からのクリアランスが遅れ、肝臓の非実質細胞よりも肝細胞による取り込みが多くなった。<sup>28</sup> 逆に、コレステロール含有量の少ないリポソームは、血漿タンパク質結合量が多く、肝臓や脾臓の細網内皮系に取り込まれ、循環血液からのクリアランスが速かった。

以上のような、リポソームにおいてその膜安定性に与えるコレステロールの役割は、mRNA-LNP においても同様な機能を果たすことが推察される。コレステロールの含有量の違いが mRNA-LNP にどのように影響を与えるのかについては、まだ情報がない。一般的に、mRNA-LNP は粒子の膜安定性の観点から 30~50 mol%のコレステロールを含む組成が多く<sup>29</sup>、mRNA-LNP におけるコレステロール含有量のタンパク質発現に与える影響については、まだ情報がない。著者は、mRNA-LNP の構成脂質中のコレステロール量を減少させることで、筋肉内または皮下投与後の肝臓での発現を調節できると考えた。そこで、本研究では、mRNA-LNP の脂質組成中のコレステロール含有量を 40 mol%を対照として、30mol%未満の 10 および 20 mol%に減少させた製剤を調製し、マウスの投与部

位および肝臓における発現を比較して、投与部位／肝臓での比が増大されるかどうかを検証することを目的とした。これまで、mRNA-LNP でコレステロール含有量を 30mol%未満に低減させた LNP を作製し、その物理化学的性質について、一般的な組成と比較した研究はない。そこで、まずは mRNA-LNP の脂質組成中のコレステロール含有量を 10 および 20 mol%に減少させた製剤の物理化学的性質から評価を行った。

## 1-1. mRNA-コレステロール低含有 LNP の物理化学的性質

mRNA-LNP 製剤を構成する脂質に対するコレステロール含量の影響を調べるために、表 1 に示す組成の LNP を用いた。mRNA-LNP によるトランスフェクションにおいては、イオン化脂質の影響が大きいことが知られており、mRNA-LNP に関する多くの研究が新規イオン化脂質の開発にフォーカスしていることから、本研究においては、「mRNA-LNP において、コレステロール含有量を 30 mol%未満となる 10mol%や 20mol%に減少させることで、筋肉内投与・皮下投与後の肝臓への移行を調整できるのではないか」という本仮説が、イオン化脂質の種類によらず成立するのか検証したいことから、2 種のイオン化脂質を用い、評価した。イオン化脂質として、まずは、siRNA 医薬品パチシランにも使用されており、研究開始時点で市販されていた DLinMC3-DMA を選択した。他方、MC3 に比べて、エンドソームエスケープ能に優れタンパク質発現効率が低いこと、LNP 調製時に用いられるリン脂質の種類が異なることから、SS-OP を選択しました。一般的な LNP では、コレステロールは 30~50mol%を含むことから、従来組成としてコレステロール 40mol%の群を設け、コレステロール含有量の 20mol%、10mol%と減少させた mRNA-LNP をそれぞれ 3 種類、計 6 種類作製した。全ての脂質を表 1 に示す脂質組成でエタノール中に調製し、続

いて1:3でmRNA溶液とマイクロ流体混合した。物理化学的性質の評価項目は、一般的に mRNA-LNP の物理化学的性質の評価に用いられる、粒子径・PDI、ゼータ電位、mRNA 封入率とした。動的光散乱法により、mRNA-LNP の粒子径・粒子のばらつきを表す多分散指数 (PDI)、ゼータ電位を測定した。

リボグリーンアッセイによる RNA 定量によって、mRNA-LNP の mRNA 封入率を算出した。リボグリーンアッセイによる mRNA 封入率の算出では、全ての mRNA-LNP が mRNA の 80%以上を封入していた(図 1)。動的光散乱(DLS)法を用いて mRNA-LNP の粒子径とゼータ電位を測定し、異なる脂質組成で調製されたすべての LNP は、75.5~140 nm の粒子径をもつ狭い分布 (PDI < 0.25) を示し、中性に帯電した(表 2)。

Table 1 Lipid components of LNPs. We prepared three SS-OP LNPs and three MC3 LNPs, containing 10 mol%, 20 mol% and 40 mol% of cholesterol, respectively. Here we showed the lipid components of each LNP and their mRNA encapsulation efficacy (%). Data are represented as mean  $\pm$  SD (n = 3).

SS-OP LNP#	Molar percentage (mol%)				Encapsulation efficacy (%)
	Cholesterol	DOPC	DMG-PEG2000	SS-OP	
1	10	37.5	1.5	52.5	80.1 $\pm$ 2.12
2	20	27.5	1.5	52.5	87.9 $\pm$ 7.49
3	40	7.5	1.5	52.5	92.6 $\pm$ 9.05
MC3 LNP#	Molar percentage (mol%)				Encapsulation efficacy (%)
	Cholesterol	DSPC	DMG-PEG2000	MC3	
4	10	38.5	1.5	50	88.6 $\pm$ 5.98
5	20	28.5	1.5	50	89.0 $\pm$ 8.76
6	40	8.5	1.5	50	97.1 $\pm$ 0.93



Table 2 The zeta potential of mRNA-LNPs. We prepared three SS-OP LNPs and three MC3 LNPs, containing 10 mol%, 20 mol%, and 40 mol% of cholesterol, respectively. Here we showed the zeta potential of mRNA-LNPs (mV). Data are represented as mean  $\pm$  SD (n = 3)

SS-OP LNPs	
10 mol% Chol	-1.62 $\pm$ 1.35 mV
20 mol% Chol	-2.31 $\pm$ 1.48 mV
40 mol% Chol	-3.25 $\pm$ 1.76 mV
MC3 LNPs	
10 mol% Chol	-3.68 $\pm$ 0.89 mV
20 mol% Chol	-4.03 $\pm$ 0.99 mV
40 mol% Chol	-3.85 $\pm$ 1.59 mV

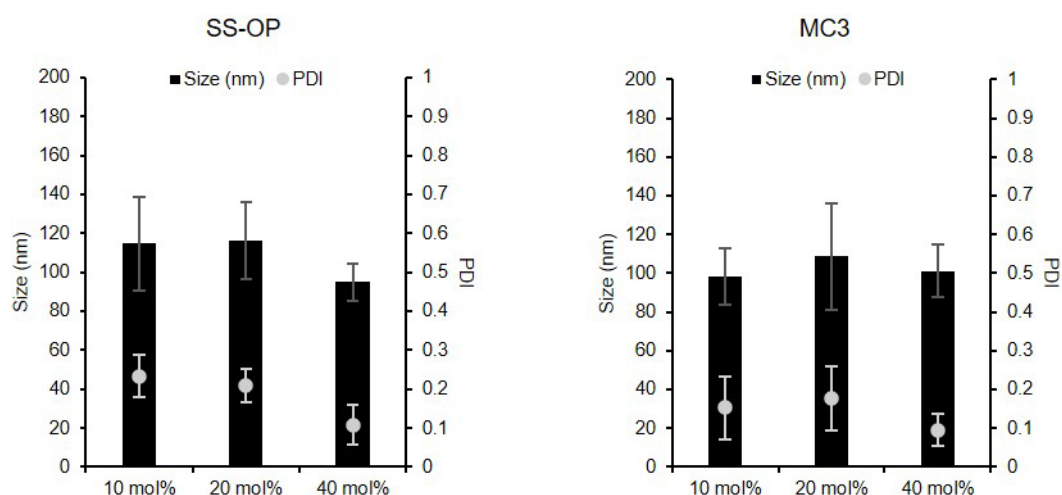


Fig. 1 Physicochemical property of mRNA-LNPs. The particle size and polydispersity index (PDI) of SS-OP LNPs containing 10 mol%, 20 mol%, and 40 mol% of cholesterol. These closed bars mean the size of mRNA-LNPs. These dots mean the PDI of mRNA-LNPs (Left). The particle size and PDI of MC3 LNPs containing 10 mol%, 20 mol%, and 40 mol% of cholesterol. These closed bars mean the size of mRNA-LNPs. These dots mean the PDI of mRNA-LNPs (Right). Data are represented as mean  $\pm$  SD (n = 3–4).

## 1-2. mRNA-コレステロール低含有 LNP 調製後 7 日目までの安定性

コレステロール含量の異なる mRNA-LNP の構造安定性の違いをさらに評価するために、4° C での mRNA-LNP 調製後 0、1、3、および 7 日目の物理化学的特性(粒子径、PDI、および mRNA 封入率)を DLS およびリボグリーンアッセイで測定した。RNA 定量アッセイでは、SS-OP LNP の 10 mol%コレステロール群における mRNA 封入率は、1 週間の保存後に 67.0%に減少し、封入率が最大に達した保存後 1 日と比較して有意差があることが示された。また、SS-OP LNPs の 10 mol%コレステロール群の粒子径は、mRNA-LNP を調製した日と比較して、7 日間の保存後に有意に増加した(図 2)。しかし、一般的に言えば、コレステロール含有量を 30 mol%未満に減少させても、依然として高い mRNA 封入率を保っていたと言える。また、粒子径は 200 nm を超えず、投与部位からのリンパへの移行等の動態には影響を与えない程度の変化であった。

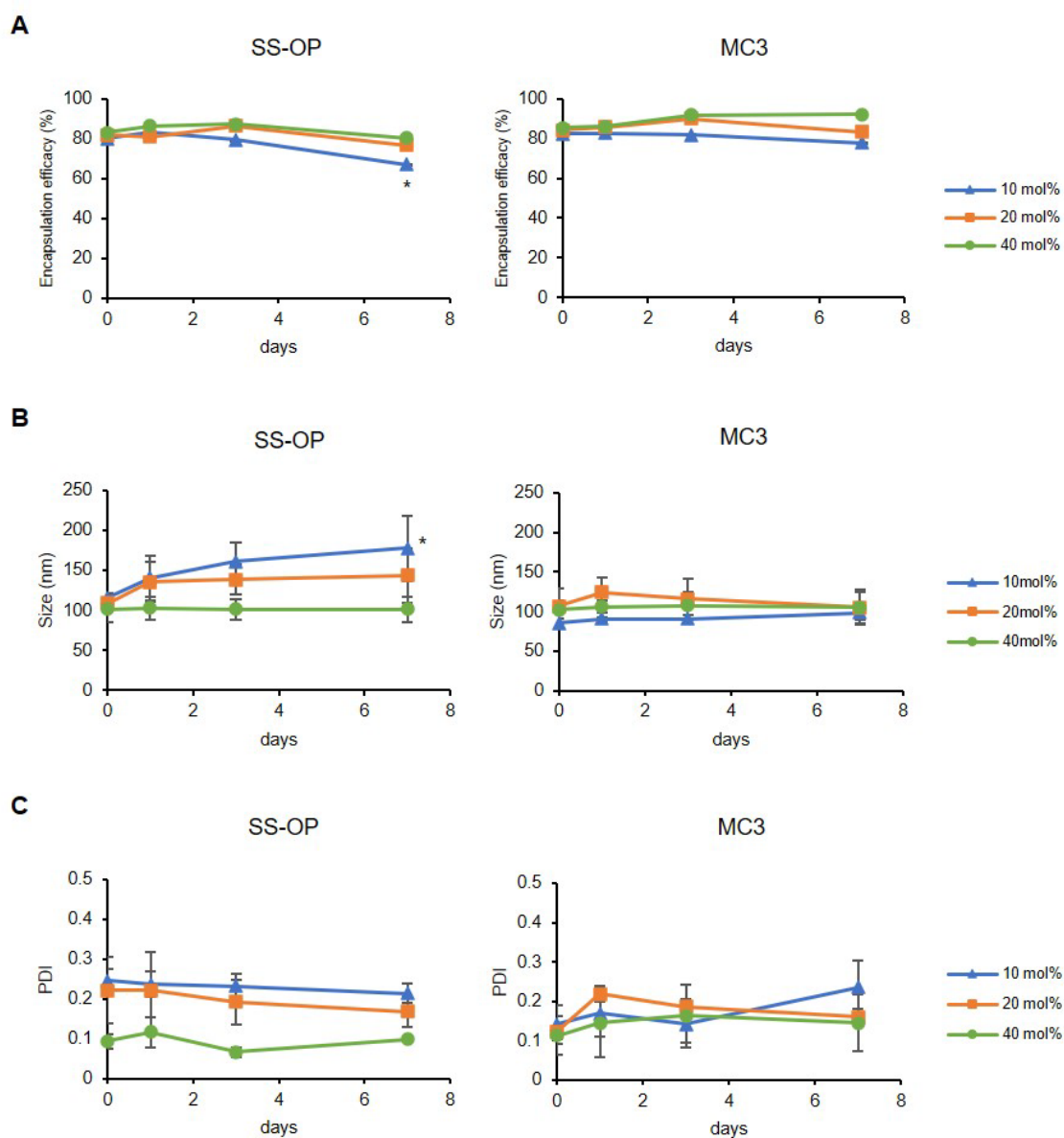


Fig. 2 The one-week stability of mRNA-LNPs. All LNPs were tested at 0, 1, 3, and 7 days after the preparation while they were stored at 4 °C. (A) The mRNA encapsulation efficacy of SS-OP LNPs (Left) and MC3 LNPs (Right). Data are represented as mean  $\pm$  SD for encapsulation efficacy (n = 3–4). (B) The particle size of SS-OP LNPs (Left) and MC3 LNPs (Right). (C) The PDI of SS-OP LNPs (Left) and MC3 LNPs (Right). Data are represented as mean  $\pm$  SD for particle size and PDI (n = 3–4). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test. \*P < 0.05, between Day 0 and Day 7 of SS-OP LNPs containing 10mol% cholesterol groups.

## 考察

本研究では、MC3 はパチシランでも使用されており、研究開始時点で市販され、LNP に用いられるのゴールドスタンダードなイオン化脂質と見なした。他方、MC3 に比べて、S-S 結合の構造を持つことからエンドソーム内の還元下での分子の崩壊による高いエンドソームエスケープ能を持ちタンパク質発現効率が高いこと、LNP 調製時に用いられるリン脂質の種類が異なることから、SS-OP を選択した<sup>30</sup>。各種イオン化脂質(SS-OP または MC3)、リン脂質(DOPC または DSPC)、DMG-PEG 脂質、コレステロールを用いて LNP 製剤を調製した。mRNA-LNP のコレステロールモル比を低減させるのに伴って、リン脂質のモル比を増加させることで LNP を調製し、mRNA-LNP の発現に対するコレステロール含量の影響を評価した。SS-OP LNP のコレステロールモル比は 10 mol% から 20 mol% または 40 mol% とし、イオン化脂質が mRNA-LNP のトランスフェクション効率に関与し、PEG 脂質が製剤の粒子サイズの制限に関連しているため、DOPC のモル比を 27.5 mol% から 17.5 mol%、7.5 mol% に変更した。MC3 LNP のコレステロールモル比は 10 mol% から 20 mol% または 40 mol% とし、DSPC のモル比を 28.5 mol% から 18.5 mol%、8.5 mol% に変更した。すべての mRNA-LNP の粒子径は 75.5~140 nm の範囲であり、mRNA-LNP の PDI は 0.25< だった。コレステロールは構造安定性に寄与

するため、mRNA-LNP の標準的なコレステロール含有量は 30~50 mol%である。<sup>31</sup>一方、コレステロールを含まないリポソームの発現特性はコレステロール含有リポソームとは異なることが知られている。<sup>27,28,32</sup>したがって、mRNA-LNP においてもコレステロール含有量を 30 mol%未満に減少させた粒子を調製することが可能であると仮定した。本章において、異なる脂質組成で調製されたすべての LNP は、100 nm 前後の粒子径をもつ狭い分布 (PDI < 0.25) を示し、中性に帯電し、高い mRNA 封入率を示した。一般的な mRNA-LNP の粒子径が 100nm 程度であり、ファイザー社のコミナティ筋注の PDI が 0.2 と報告されている。本章における結果は、コレステロールモル比が 30 mol%未満である 10 mol%や 20 mol%に低下しても、高品質な mRNA-LNP が調製できたことを示唆する。しかし、コレステロールを含まない mRNA-LNP は粒子を形成することが出来なかった (Data not shown)。リポソームは脂質二重膜構造を形成し、mRNA-LNP は内部に脂質と mRNA の複合体のようなものを内封し、外側に脂質膜を持つ構造を取る。このようなリポソームと mRNA-LNP の構造の違いにより、安定性に差異が生じたのではないかと考察する。これらの知見は、コレステロール含有量の低い mRNA-LNP を使用するにあたって有益な情報となりうると考える。

## 第2章 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が mRNA-LNP 局所投与後のタンパク質発現に与える影響

### 緒言

第1章において、コレステロール含有量を 10 mol% および 20 mol% に減少させても高品質な mRNA-LNP を調製できることが確認された。本章では、コレステロール含有量 40 mol% の mRNA-LNP を対照として、このコレステロール含有量を 10 mol% および 20 mol% に減少させた mRNA-LNP を HepG2 培養肝細胞にトランスフェクションした際のタンパク質発現に与える影響、およびマウス局所投与（筋肉内投与・皮下投与）後のタンパク質発現の投与部位／肝臓比に与える影響を評価した。

Semple SC らの過去のリポソームの報告においては、リポソーム脂質組成中のコレステロールが循環血からのクリアランスに影響を与え、そのメカニズムとして、コレステロール含有量の増加が血中のタンパク質結合量の減少に繋がっていることを提示している。<sup>27</sup> 一般に、細網内皮系によるリポソームの消失はリポソーム研究の初期から知られており、循環血中に入ったリポソームと血漿タンパク質の相互作用がこのクリアランスに関与していることが報告されてい

る。<sup>33</sup> 関連するタンパク質として、アルブミンや補体、免疫グロブリン、フィブロネクチン、アポリポタンパク質、C 反応性タンパク質、 $\beta$ 2-糖タンパク質 I などが報告されている。<sup>34</sup> このようなコレステロールのリポソーム動態に与える影響と同様に、mRNA-LNP 中のコレステロール含有量が mRNA-LNP の動態や分布・タンパク質発現に影響を与えることが推定される。しかしながら、mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が、mRNA-LNP 局所投与後のタンパク質発現に与える影響に関して評価したものはない。

## 2-1. mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロールが *in vitro* タンパク質発現に与える影響

まずは、mRNA-LNP の脂質組成のコレステロール含有量が肝臓到達後のタンパク質発現に与える影響を推定するために、HepG2 細胞におけるタンパク質発現効率を評価した。トランスフェクション効率は、コレステロール含有量が異なる mRNA-LNP について評価した。HepG2 細胞に FLuc mRNA を封入する LNP を添加し、トランスフェクションの 24 時間後にアッセイした。従来の組成である 40mol%と比較して、10mol%および 20mol%では有意にタンパク質発現量が低下した(図 3)。



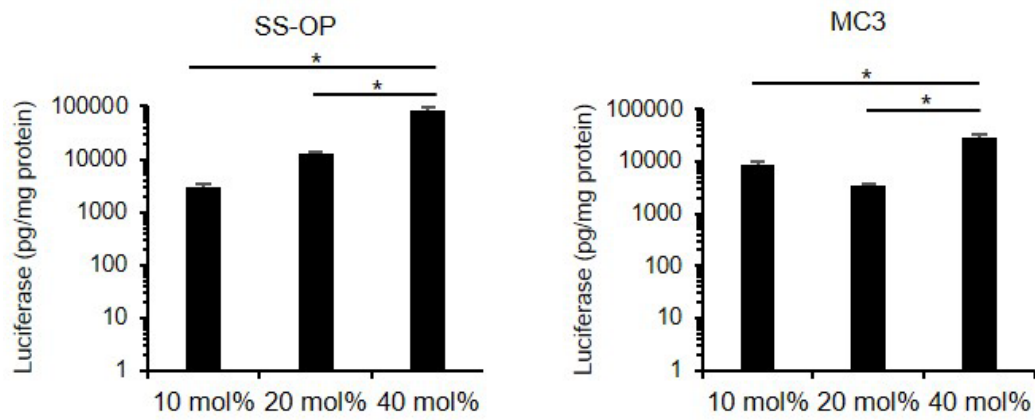


Fig. 3 *In vitro* transfection efficiency of mRNA-LNPs. The luciferase expression levels of HepG2 cells transfected by using SS-OP LNPs containing 10 mol%, 20 mol%, and 40 mol% of cholesterol (Left) and MC3 LNPs containing 10 mol%, 20 mol%, and 40 mol% of cholesterol (Right). Data are represented as mean + SD (n = 3). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (\*P < 0.05).

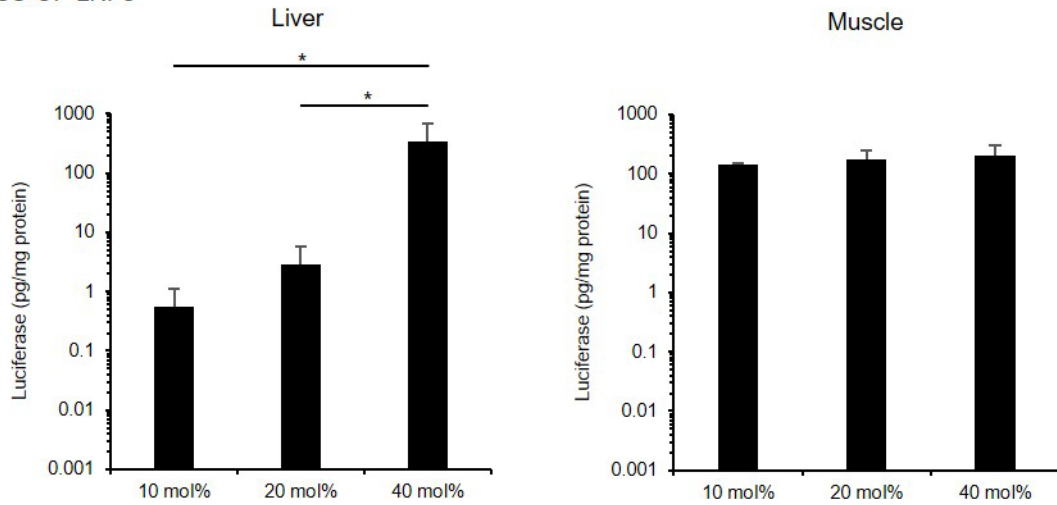
## 2-2. マウス筋肉内投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が *in vivo* タンパク質発現に与える影響

コレステロール含有量を変化させた mRNA-LNP の *in vitro* 発現の結果に基づいて、*in vivo* での mRNA 発現を調べた。2  $\mu$ g の FLuc mRNA を封入した SS-OP LNP および MC3 LNP を 6 週齢雄性 ddY マウスに筋肉内投与し、ルシフェラーゼ発現量およびその発現の臓器特異性を解析した。

ルシフェラーゼ発現レベルは、10、20、40 mol%のコレステロールを含む SS-OP LNP および 10、20、40 mol%のコレステロールを含む MC3 LNP の投与後、4.5 時間で測定した。筋肉内投与後、肝臓におけるルシフェラーゼ発現は、HepG2 細胞株において観察された結果と同じ傾向を示した。SS-OP LNP のルシフェラーゼ発現は、40 mol%コレステロール群で 10 mol% (615 倍) または 20 mol% (118 倍) 群よりも有意に高かった (図 4A)。MC3 LNP の場合、ルシフェラーゼ発現は、40 mol%コレステロール群で 10 mol% (13.1 倍) または 20 mol% (15.3 倍) よりも有意に高かった(図 4B)。対照的に、筋肉内ルシフェラーゼ発現はすべての群で同等であった。しかし、筋肉内ルシフェラーゼ発現は、Naked mRNA 投与群よりも LNP 群で有意に高かった(Data not shown)。SS-OP LNP のルシフェラーゼ発現の筋肉/肝臓値は 10 mol%群で 434, 20 mol%群で 64.7,

40mol%群で 1.22 であり、MC3 LNP の筋肉／肝臓は 10 mol%群で 627, 20 mol%群で 34.3, 40 mol%群で 7.51 であった。

### A SS-OP LNPs



### B MC3 LNPs

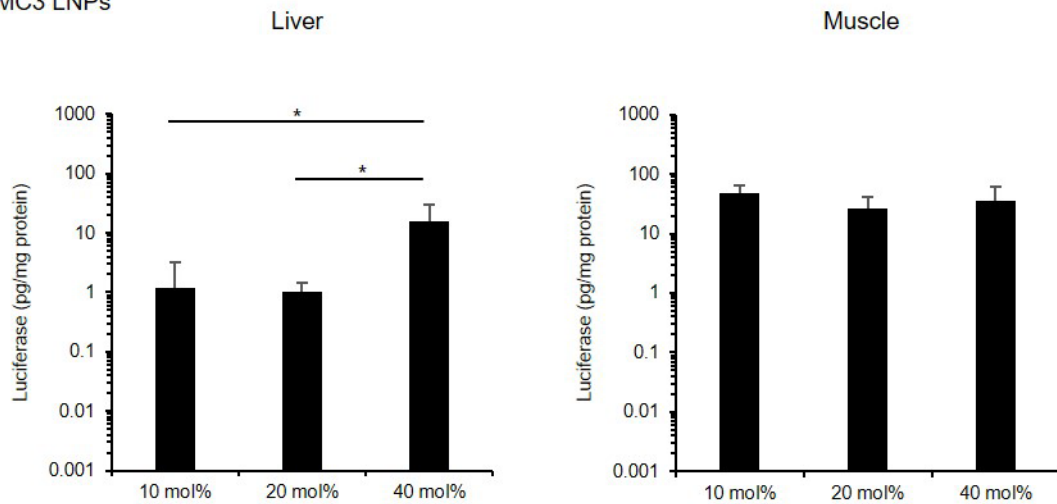


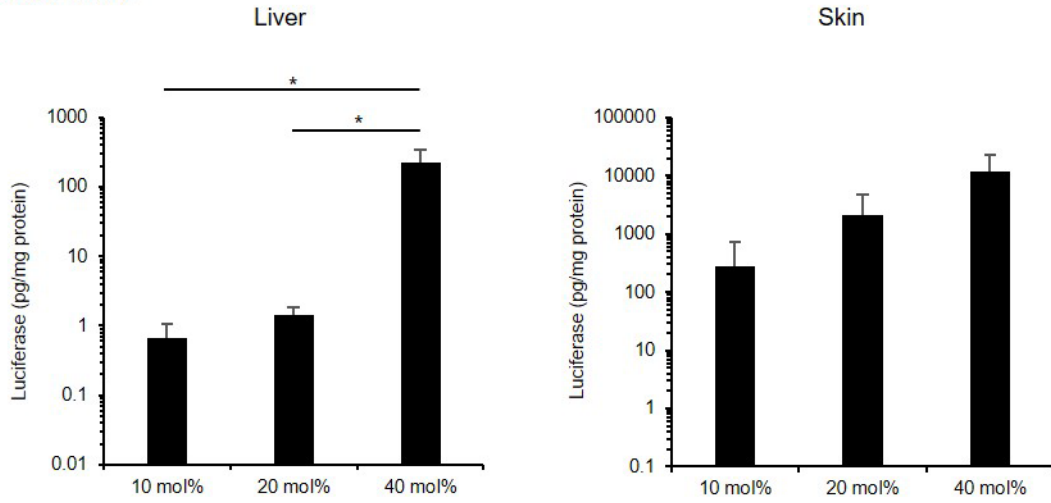
Fig. 4 *In vivo* transfection efficiency of mRNA-LNPs by intramuscular administration. Transfection efficiency of SS-OP LNPs (A) and MC3 LNPs (B) by intramuscular administration. Mice were intramuscularly administrated with luciferase mRNA LNPs, containing 10 mol%, 20 mol%, 40 mol% cholesterol. Four and a half h after administration, luciferase expression levels were analyzed in the muscle and the liver (n=3–4). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (\* $P < 0.05$ ). Data are represented as mean + SD (n=3–4).

### 2-3. マウス皮下投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロール含有量が *in vivo* タンパク質発現に与える影響

投与経路のうち、皮下投与も 1) 手技をあまり必要としない容易さ、2) 局所投与後に投与部位からリンパ系を介して全身循環に移行する、という筋肉内投与との類似点に着目し、mRNA-LNP 中のコレステロールが *in vivo* 発現に及ぼす影響に同様の傾向がみられるのではないかと考えた。コレステロール含有量を変化させた mRNA-LNP のマウス筋肉内投与後の発現の結果に基づいて、マウス皮下投与後の mRNA 発現を調べた。2 µg の FLuc mRNA を封入した SS-OP LNP および MC3 LNP を 6 週齢雄性 ddY マウスに皮下投与し、ルシフェラーゼ発現量およびその発現の臓器特異性を解析した。

皮下投与後の肝臓におけるルシフェラーゼ発現に関しては、SS-OP LNP のルシフェラーゼ発現は、40 mol%コレステロール群で 10 mol% (333 倍) または 20 mol% (157 倍) よりも有意に高かった(図 5A)。MC3 LNP の場合、ルシフェラーゼ発現は、40 mol%コレステロール群で 10 mol% (107 倍) または 20 mol% (67.9 倍) よりも高かった(図 5B)。投与部位近くの皮膚におけるルシフェラーゼ発現に有意差はなかった。しかし、mRNA-LNP トランスフェクションの傾向は 40mol% > 20 mol% > 10 mol%であった。

### A SS-OP LNPs



### B MC3 LNPs

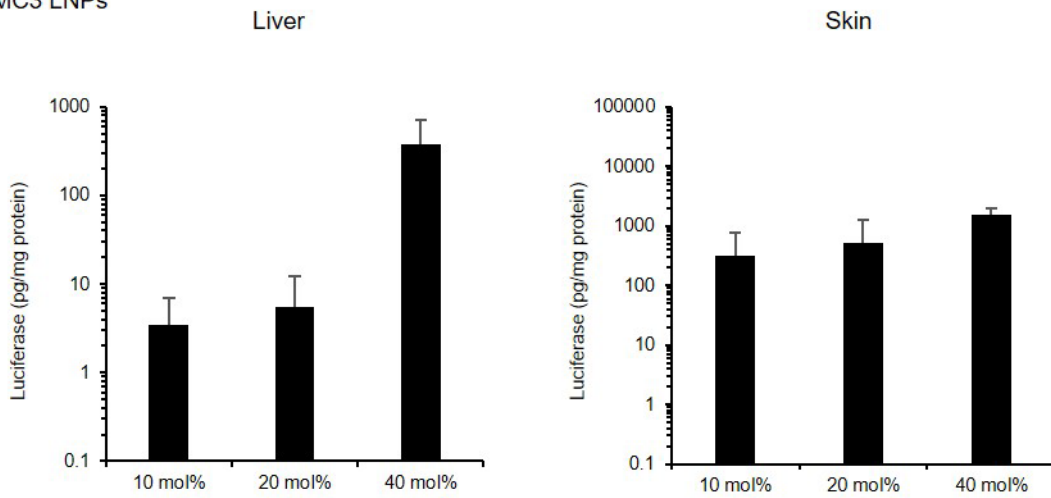


Fig. 5 *In vivo* transfection efficiency of mRNA-LNPs by subcutaneous administration. Transfection efficiency of SS-OP LNPs (A) and MC3 LNPs (B) by subcutaneous administration. Mice were subcutaneously administrated with luciferase mRNA-LNPs, containing 10 mol%, 20 mol%, 40 mol% cholesterol. Four and a half h after administration, luciferase expression levels were analyzed in the muscle and the liver (n=3–4). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (\*P < 0.05). Data are represented as mean + SD (n=3–4).

## 2-4. マウス筋肉内投与後 mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロールがタンパク質発現の投与部位／肝臓比に与える影響の経時的解析

2-2 および 2-3 で明らかとなった *in vivo* 発現の結果から、ルシフェラーゼ mRNA の発現効率が高い SS-OP LNP の筋肉内投与について経時的解析を行った。ddY 雄性マウスを用い、mRNA-LNP の mRNA 翻訳速度に与える mRNA-LNP 構成脂質中のコレステロールの影響を評価した。マウスに Naked FLuc mRNA または 10, 20, 40 mol% のコレステロールを含む SS-OP LNP を筋肉内投与した。投与後 0、4.5、9、24、48、72 時間に D-ルシフェリン 3 mg をマウスに腹腔内投与し、各時点で IVIS を用いて発光イメージングを行った (図 6A, 6B)。そして、これらの画像から筋肉と肝臓の発光レベルを解析した。肝臓の発現レベルに対する筋肉の発現レベルを数値として図 6B のグラフに示し、同条件で筋肉内投与した場合の mRNA-LNP の肝臓への移行を数値化した。

コレステロール含有量 40 mol% の mRNA-LNP では、既報と同様に肝臓における高い発現が確認された。一方で、10 mol% や 20 mol% の群では肝臓における発光レベルは小さかった。また、筋肉／肝臓比は顕著に 10 mol% > 20 mol% > 40 mol% となった (図 6B)。

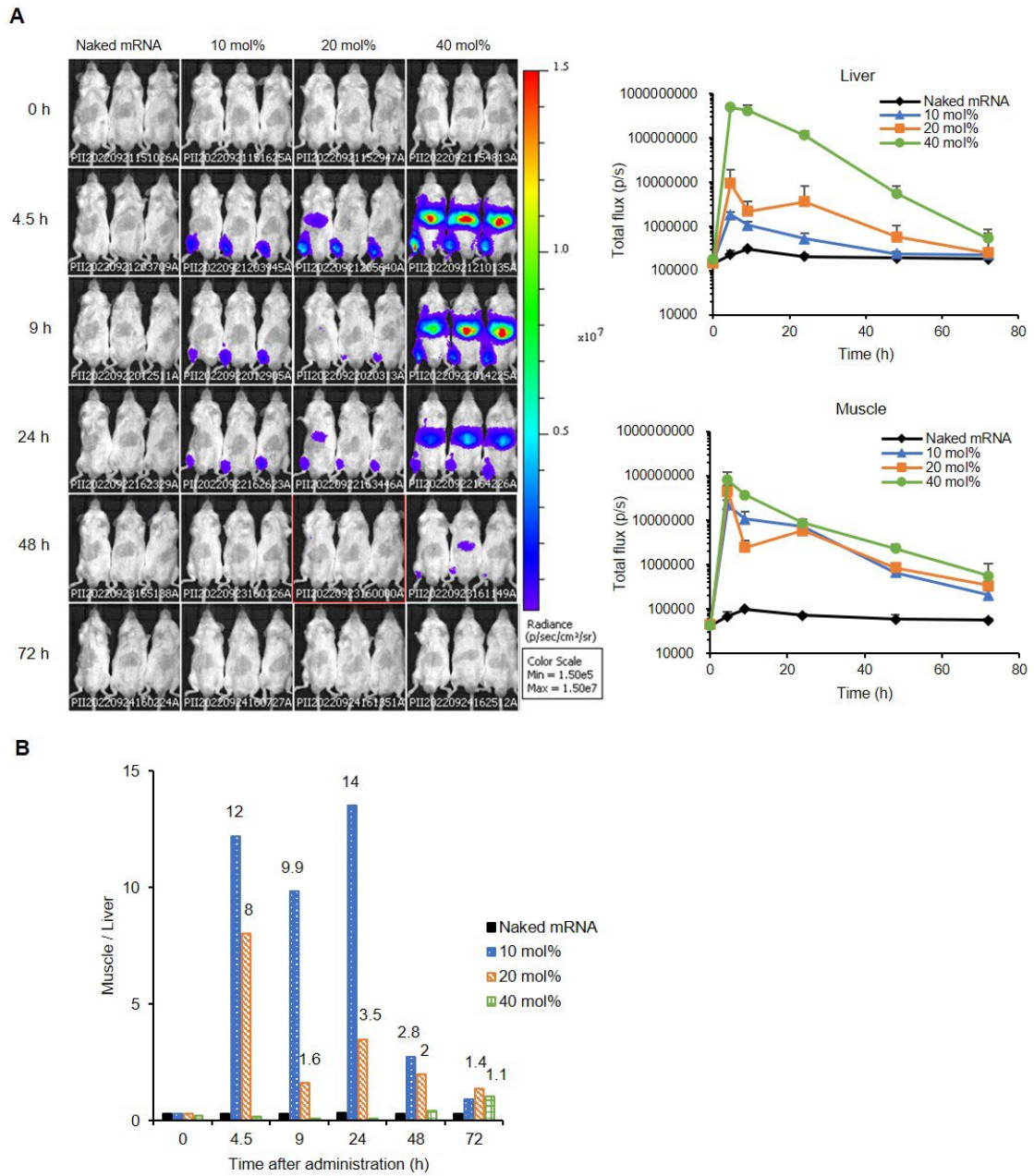


Fig. 6 Luciferase expression kinetics of SS-OP LNPs by intramuscular administration. Naked FLuc mRNA, SS-OP LNPs containing 10 mol%, 20 mol%, or 40 mol% cholesterol were administered intramuscularly to ddY male mice as a dose of 2  $\mu$ g of FLuc mRNA. Then, 0, 4.5, 9, 24, 48, and 72 h after the administration, 3 mg of D-luciferin was intraperitoneally injected, and IVIS imaging was performed at each time point (A). The value of the total flux of muscle to the liver was calculated (B). More than 1 is shown in the graph as numbers.



## 考察

第 1 章にて、コレステロールモル比が 10 または 20 mol% に減少した場合でも、高品質な mRNA-LNP が調製できることを示した。HepG2 細胞および筋肉内投与後のマウスの肝臓における mRNA-LNP トランスフェクション後のタンパク質発現量は、コレステロールモル比が 40 mol% > 20 mol% > 10 mol% であった(図 3、4)。これらの結果が皮下投与時に同様の傾向を示すかどうかを評価するために、筋肉内投与と同様に局所投与により各種ワクチンを投与するために使用される皮下投与で実験を行った。皮下投与における注射部位から肝臓への発現の値は、筋肉内投与で観察されたものと同様に、mRNA-LNP のコレステロール含有量が低いほど、高かった(図 5)。これらの結果は、mRNA-LNP のコレステロールモル比を低下させると、mRNA-LNP の筋肉内または皮下投与後の肝臓でのタンパク質発現が低下するという仮説を支持している。

mRNA-LNP のマウス筋肉内投与では、mRNA-LNP 中のコレステロールのモル比が 40 mol% から 20 mol% および 10 mol% に減少させることで、肝臓でのタンパク質発現量は低下した(図 4、6)。これらの結果は、マウスの静脈内投与において、コレステロール含有量が少ない／含有しないリポソームと比較して、コレステロール含有量が多いリポソームが肝細胞に分布していることを示した以前の研究と一致している。<sup>28</sup> また、リポソーム中のコレステロールの割合が増加

するにつれて、血中タンパク質結合が減少し、血漿クリアランスが遅れた。<sup>13,24</sup> 筋肉内投与された mRNA-LNP は、中性電荷および約 100nm の平均粒径を有するリポソームのように最終的に体循環に入ることを考慮すると<sup>10</sup>、mRNA-LNP のコレステロールモル比が低い mRNA-LNP の筋肉内投与は、体循環で分解され、肝臓でのタンパク質発現を低下させる可能性がある。

筋肉におけるタンパク質発現は、肝臓におけるタンパク質発現よりも持続的であった。図 6A では、筋肉および肝臓におけるルシフェラーゼ活性の消失を評価した。Naked mRNA を筋肉内投与した後もタンパク質が発現することを Wolff J A らが報告したように、mRNA-LNP としての細胞内取り込みだけでなく、不安定な mRNA-LNP から漏出する mRNA も筋肉内投与後の投与部位でのタンパク質発現に寄与する可能性がある。<sup>35</sup> 肝臓でのタンパク質発現については、肝細胞における LDLR を介した mRNA-LNP の取り込みが報告されており、LNP 粒子安定性の寄与は比較的大きいと考えられています。また、組織内での mRNA の放出効率が異なる可能性があるため、タンパク質の発現効率は組織ごとに異なる可能性があることも報告されている。<sup>10</sup> この傾向は以前の報告と一致しており、組織による発現プロファイルの違いが示唆されている。

これまで、mRNA-LNP のコレステロール含量が培養肝細胞のタンパク質発現に与える影響についての報告はほとんどない。mRNA-LNP の脂質組成のコレス

テロール含量が肝臓到達後のタンパク質発現に与える影響を推定するために、HepG2 細胞におけるタンパク質発現効率を評価した。mRNA-LNP のコレステロールモル比が 40 mol%から 20 mol%および 10 mol%に減少したため、HepG2 細胞でもタンパク質発現が減少した(図 3)。ナノ粒子の膜の曲げ剛性はコレステロール含有量によって変化することが報告されている。<sup>36</sup> リポソームの機械的剛性は、粒子安定性の重要なパラメータである膜の剛性によって定義されることが多い。<sup>37</sup> さらに、リポソーム膜の曲げ剛性は、エンドサイトーシスによる細胞取り込みに重要な役割を果たすことが報告されている。<sup>38</sup> 血液中でのタンパク質結合が関与していなくても、mRNA-LNP の膜安定性は HepG2 細胞のタンパク質発現に関与している可能性がある。肝臓におけるコレステロール含量の低い mRNA-LNP の発現低下は、全身循環血中の mRNA-LNP の分解だけでなく、肝細胞への分布後のタンパク質発現低下も関与している可能性を示した。

著者は、mRNA-LNP 中のコレステロール含量が *in vitro* および *in vivo* でのタンパク質発現に及ぼす影響を評価したが、この研究の限界についてここに記述する。局所投与後の組織におけるタンパク質発現の過程から、LNP の筋肉内または皮下投与後の肝臓におけるタンパク質発現には、血液中への吸着(リンパ経由)、血液循環からのクリアランス、LDLR との相互作用、ApoE と mRNA-LNP の複合体を含む肝細胞への取り込み速度、細胞質への mRNA の放出速度、

肝細胞での mRNA の転写など、様々な因子が関与していると考えられる。まず、mRNA-LNP の粒子径と表面電荷が局所投与後のリンパ系への移行に影響を与えることが報告されている。<sup>39</sup>皮下投与の場合、50nm 以下<sup>40</sup>、負電荷<sup>41</sup>の LNP がリンパ系に移行しやすいと報告されている。この時点で、今回マウスに投与した mRNA-LNP は、その粒子径が約 100nm と中性に帯電しており、その分布特性を残すことが可能であった。したがって、これらの mRNA-LNP の表面電荷は、本研究における動態に影響を与える要因とはならないだろう。第二に、コレステロールのモル比率が高くなると、血中のタンパク質結合が低下することが報告されている<sup>28</sup> が、血中タンパク質である ApoE が肝細胞上の LDLR を介して mRNA-LNP の肝吸収に寄与するとの報告がある。<sup>16,42</sup>ApoE は通常、カイロミクロンレムナント、超低密度リポ蛋白 (VLDL)、中密度リポ蛋白 (IDL)、一部の高密度リポ蛋白 (HDL) の一部として血中を循環し、VLDL 受容体と相互作用してリポ蛋白を異化している。末梢組織では、ApoE はコレステロールの代謝を担っている。この過程にどの因子が最も大きく寄与しているかは不明である。このような複数の因子が mRNA-LNP 中コレステロール量のタンパク質発現への影響に関与していると推測され、最も寄与の大きい因子を特定するための実験デザインは複雑であると思われる。今後、このメカニズムを明らかにするために、より詳細な評価が必要である。なお、AST および ALT 測定により肝毒

性については評価したが、顕著な毒性はみとめられなかった (Data not shown)。

その他の全身毒性について詳細に評価したり、発現プロファイルを観察した以上の長期間での毒性については評価していない。しかし、本研究の目的は、遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにすることであった。mRNA-LNP の研究で一般的に使用されている 2 種類のイオン化可能な脂質を用いた mRNA-LNP を使用した。MC3 を用いた mRNA-LNP の場合、マウスに 0.3 mg mRNA/kg を皮下投与しても肝毒性を示さないことが報告されている。<sup>43</sup> 本研究における *in vivo* 実験では、ルシフェラーゼの発現とマウスでのタンパク質発現に対するコレステロール含量の影響を解析するために 2 µg mRNA/mouse (約 0.08 mg mRNA/kg) で十分だったため、先行報告の約 1/4 と十分低い投与量を選んだ。しかし、治療への応用には、今後、全身毒性について評価する必要がある。

また、今回得られた知見の今後の応用について考察する。mRNA-LNP のコレステロール含量を低下させることにより、肝臓での発現を低下させ、筋肉での局所的な発現が可能であることを見いだした。しかし、筋肉での発現は増加しなかった。筋肉の遺伝性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) では、ゲノム編集を組み合わせることで、トランスフェクション時の発現量が低くてもタンパク質の永久発現を実現することが可能である。また、標的組織外での

発現を永続化させると副作用が避けられないため、ゲノム編集では局所発現を可能にすることが重要である。最近、LNP を利用した Cas9 mRNA と sgRNA の送達による CRISPR/Cas9 システムを利用した DMD のゲノム編集に関する研究が報告されている。<sup>44</sup> これまで、送達システムとしてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを利用した手法が多く研究されていたが、AAV ベクターの長い発現はオフターゲット突然変異のリスクや AAV ベクター反復投与による中和抗体の産生などが課題とされている。<sup>45</sup> 筋肉／肝臓比を増大させたコレステロール低含有 mRNA-LNP を利用することで、オフターゲットのリスクを減らし、局所への送達に応用できることが期待される。

## 結論

本研究では、mRNA-LNP のコレステロール含有量を 10 mol% および 20 mol% に減少させることで、mRNA-LNP の筋肉内投与時に肝臓でのタンパク質発現が抑制されることを検証した。本研究により、LNP 中のコレステロールモル比率を低下させても、粒子径約 100nm、PDI<0.25、mRNA 封入率 80%以上の高品質な mRNA-LNP を調製できることを明らかにした。さらに重要なことは、コレステロールモル比を下げることで、筋肉での発現量を維持したまま肝臓での発現量を低下できる可能性が示されたことである。コレステロール低減 mRNA-LNP で筋肉の発現量が相対的に増加することは、今後、この mRNA-LNP を、恒久的な mRNA 発現による治療を狙う in vivo 局所ゲノム編集による先天性遺伝子変性疾患である筋ジストロフィー等の安全な治療薬の開発に応用できることが期待される。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始ご懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医薬品情報学分野の川上茂教授、向井英史准教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金にご支援いただきまして、深謝いたします。

最後に、種々の貴重なご助言を賜りました、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品情報学研究室の皆様深く感謝いたします。



## 実験の部

### [1] 試薬

DMG-PEG2000(SUNBRIGHT<sup>®</sup> GM-020)、DOPC(COATSOME<sup>®</sup> MC-8181)、および SS-OP(COATSOME<sup>®</sup> SS-OP)は、日油株式会社(東京、日本)から入手しました。コレステロールはナカライテスク社(京都、日本)から購入した。1,2-Distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DSPC) Avanti Polar Lipids 社(Alabaster, AL)から、DLin-MC3-DMA(MC3)は MedChemExpress(Monmouth Junction, NJ)から購入した。DL-リンゴ酸は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪、日本)から購入した。NucleoSpin Plasmid Transfection Grade は MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. (KG, Germany)、SapI 制限酵素および HiScribe T7 High Yield RNA 合成キットは New England BioLabs 社(Beverly, MA, USA)から購入した。DNase TURBO はライフテクノロジー社(Carlsbad, CA)から、CleanCap<sup>®</sup> Reagent AG は TriLink BioTechnologies 社(San Diego, CA)から購入した。2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)は DOJINDO LABORATORIES (熊本、日本)から、Quanti-iT<sup>™</sup> RiboGreen RNA reagent は Molecular Probes 社(Eugene, OR)から購入した。

## [2] インビトロ転写によるメッセンジャーRNA(mRNA)の合成

ホタルルシフェラーゼとそれに続く 120 bp poly(A/T)配列を運ぶプラスミド DNA を、カスタム人工遺伝子合成によって構築しました。<sup>46</sup> プラスミド DNA は、大腸菌 DH5a を用いて増幅し、NucleoSpin Plasmid Transfection Grade を用いて精製しました。線状化 DNA は、Sap I 制限酵素処理によって作製した。 mRNA は、HiScribe T7 High Yield RNA 合成キットおよび CleanCap<sup>®</sup> Reagent AG を用いて合成した。

## [3] 細胞培養

ヒト肝細胞癌由来細胞株である HepG2 は、理化学研究所バイオリソースセンター(茨城県、日本)から入手した。HepG2 細胞は、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液および 10%ウシ胎児血清(FBS)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養した。細胞は CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37° C 中で管理した。 HepG2 細胞は、in vitro 遺伝子および核酸トランスフェクション実験に一般的に使用されるヒト肝細胞癌由来の細胞である。<sup>47</sup> であり、HepG2 細胞において mRNA-LNP によるトランスフェクションが可能であることを確認した。

#### [4]動物

6週齢の雄性 ddY マウスは、日本エスエルシー社(静岡県静岡県)から購入した。すべての動物は餌と水を自由に摂取させた。すべての動物実験は、長崎大学動物実験委員会の規定に従って行った。

#### [5]mRNA 封入脂質ナノ粒子(mRNA-LNP)の調製

脂質((SS-OP/DOPC/コレステロール/DMG-PEG2000)または(MC3/DSPC/コレステロール/DMG-PEG2000))を最終濃度 4.5 mM でエタノールに溶解した。脂質組成を表 1 に示す。mRNA を 20mM リンゴ酸に溶解した。脂質-エタノール溶液と mRNA 溶液(3:1(v/v))を、NanoAssemblr®Benchtop マイクロ流体デバイス(Precision NanoSystems, Inc., South San Francisco, CA, USA)を用いて総流量 4mL/min で混合した。SS-OP LNP 溶液を 20 mM MES 緩衝液(pH 6.5)で透析し、MC3 LNP 溶液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(-)(pH 7.4)中で 4° C で一晩透析した。これらの LNP 溶液を 10 kDa の MWCO Amicon® Ultra15(Merck Millipore 社製)を用いて 4,000 × g で濃縮し、PBS に置換した。

#### [6] mRNA-LNP の物理化学的性質の評価

LNP の粒径(Z 平均)、多分散指数(PDI)、およびゼータ電位は、マルバーンゼータサイザープロ (Malvern Panalytical Ltd., Royston, UK) を用いて測定した。

mRNA 封入率は、Quanti-iT™ RiboGreen RNA reagent を用いたリボグリーンアッセイによって測定した。<sup>46</sup>

#### [7] mRNA-LNP のインビトロトランスフェクション効率測定

トランスフェクション 24 時間前に、HepG2 細胞を  $3.8 \times 10^4$  cells/well で 48 ウェルプレートに播種した。細胞を FLuc mRNA-LNP に 0.1  $\mu$ g mRNA/well で 24 時間インキュベートした。ルシフェラーゼ発現はルシフェラーゼアッセイを用いて分析し、タンパク質量はビシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイを用いて試験した。ルシフェラーゼアッセイでは、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.05% Triton X-100 および 2 mM EDTA を含む 0.1 M Tris-HCl(pH 7.8) からの溶解バッファーで細胞膜を破壊した。溶解バッファーの容量は 150  $\mu$ L/well とした。回収した細胞を 206,000g で 5 分間遠心分離した。次いで、5  $\mu$ L の上清を 50  $\mu$ L のルシフェラーゼアッセイ基質(PicaGene®、東洋インキ製造株式会社、東京、日本)と混合し、ルミネセンスレベルをルミノメーター(AB-2270 Luminescence Octa、ATTO 株式会社、東京、日本)で測定した。同じ上清を

BCA タンパク質アッセイに用いた。BCA タンパク質アッセイは、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用し、ユーザーガイドに記載されているプロトコルに従って実施した。

#### [8] マウスへの mRNA-LNP の投与

2  $\mu\text{g}$  mRNA の用量の mRNA-LNP を 30G 針でマウス (40  $\mu\text{L}$ ) に筋肉内注射した。2  $\mu\text{g}$  の用量の mRNA-LNP を 27G 針でマウス (200  $\mu\text{L}$ ) に皮下注射した。

#### [9] mRNA-LNP のインビボトランスフェクション効率測定

ルシフェラーゼアッセイ評価には、FLuc mRNA-LNP をマウス当たり 2  $\mu\text{g}$  mRNA の用量で筋肉内または皮下に投与した。mRNA-LNP を筋肉内投与し、マウスの筋肉と肝臓が採取した。mRNA-LNP を皮下投与し、皮膚と肝臓を採取した。全ての組織を mRNA-LNP 投与後 4.5 時間で回収し、溶解緩衝液でホモジナイズした。発光レベルは、ホモジナイズした上清サンプルにルシフェラーゼアッセイ基質を加えて、ルミノメーターを用いて測定した。サンプル中のタンパク質の量は、BCA タンパク質アッセイを用いて測定した。

#### [10] *in vivo* イメージングシステム (IVIS) イメージング評価

IVIS のために、10、20、および 40mol% のコレステロールを含むルシフェラーゼ mRNA SS-OP LNP を選択した。Naked FLuc mRNA または FLuc mRNA-LNP を、マウス当たり 2  $\mu$ g の mRNA の用量で筋肉内投与した。mRNA-LNP 投与後 4.5、9、24、48、72 時間に 100 マイクロリットルの 30 mg/mL D-ルシフェリン (Syd Labs, Inc., Natick, MA) 溶液を腹腔内注射し、2% イソフルラン麻酔下で IVIS イメージング (IVIS Lumina II, Caliper Life Sciences, MA) によりルシフェラーゼタンパク質の発現を観察した。筋肉における全流束の値は、肝臓におけるものに対する、画像結果から算出した。筋肉と肝臓の間でのルシフェラーゼ発現を特徴付けるための基準値として示す。

本研究では、4° C で保存した調製から 1 日以内の mRNA-LNP を *in vivo* 実験すべてに用いた。

#### [11] 統計解析

統計分析は、Tukey の多重比較検定による一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて行った。グループ間の有意差は、\* $P < 0.05$  として表した。すべての統計解析は、統計ソフトウェア EZR (埼玉県立自治医科大学埼玉医療センター) で行った。

## 引用文献

1. Mukai H, Ogawa K, Kato N, Kawakami S. Recent advances in lipid nanoparticles for delivery of nucleic acid, mRNA, and gene editing-based therapeutics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2022; **44**: 100450  
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2022.100450>
2. Oyama N, Kawaguchi M, Itaka K, Kawakami S. Efficient Messenger RNA Delivery to the Kidney Using Renal Pelvis Injection in Mice. *Pharmaceutics* 2021, **13**(11), 1810 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111810>
3. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med* 2021; **385**:493-502  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>
4. Liang X, Potter J, Kumar S, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotech* 2015; **208**: 44-53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>
5. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes *Cell* 2017; **168**: 20-36.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044>
6. Kenjo E, Hozumi H, Makita Y, et al. Low immunogenicity of LNP allows repeated administrations of CRISPR-Cas9 mRNA into skeletal muscle in mice. *Nat Commun* 2021;**12**, 7101. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26714-w>
7. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Cont Release* 2015; **217**: 345-351 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
8. Loughrey D, Dahlman JE. Non-liver mRNA Delivery. *Acc Chem Res* 2022; **55**(1): 13–23 <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00601>
9. Chen S, Tam YYC, Lin PJC, Leung AKK, Tam YK, Cullis PR. Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration. *J Cont Release* 2014; **196**(28): 106-112  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.025>
10. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin D, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection.: II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *BBA* 1997; **1328**(2) :261–72  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00122-3)

11. Trevaskis NL, Kaminskis LM, Porter CJH. From sewer to saviour — targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nature Rev Drug Discovery* 2015; **14**: 781-803 <https://doi.org/10.1038/nrd4608>
12. Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribution and Non-linear Gene Expression of mRNA LNPs Affected by Delivery Route and Particle Size. *Pharm Res* 2022; **39**: 105-114 <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>
13. Zhang N, Li X, Deng Y, et al. A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell* 2020; **182**(5): 1271-1283 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.024>
14. Carrasco MJ, Alishetty S, Alameh M, et al. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Nature Comm Biol* 2021; **4**: 956 <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02441-2>
15. Francia V, Schiffelers RM, Cullis PR, Witzigmann D. The Biomolecular Corona of Lipid Nanoparticles for Gene Therapy. *Bioconjugate Chem* 2020; **31**(9): 2046-2059 <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00366>
16. Akinc A, Querbes W, De S, et al. Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Mol Ther* 2010; **18** (7): 1357-1364 <https://doi.org/10.1038/mt.2010.85>
17. Igyarto BZ, Jacobsen S, Ndeupen S. Future considerations for the mRNA-lipid nanoparticle vaccine platform. *Current Opinion in Virology* 2021; **48**:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.008>
18. Leung AKK, Tam YYC, Chen S. Microfluidic Mixing: A General Method for Encapsulating Macromolecules in Lipid Nanoparticle Systems *J Phys Chem B* 2015; **119**(28): 8698–8706 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02891>
19. Wang X-L, Ramusovic S, Nguyen T, Lu Z-R. Novel Polymerizable Surfactants with pH-Sensitive Amphiphilicity and Cell Membrane Disruption for Efficient siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem* 2007; **18**(6): 2169–2177 <https://doi.org/10.1021/bc700285q>
20. Ryals RC, Patel S, Acosta C, et al. The effects of PEGylation on LNP based mRNA delivery to the eye. *PLoS ONE* 2020; **15**(10): e0241006 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241006>
21. Chen S, Tam YYC, Lin PJC, Sung MMH, Tam YK, et al. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *J Cont Release* 2016; **235**: 236-244 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.059>
22. Zhang R, El-Mayta R, Murdoch TJ, Warzecha CC, Billingsley MM, et al. Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen



- and liver. *Biomater Sci* 2021; **9**: 1449-1463 <https://doi.org/10.1039/DOBM01609H>
23. Scheffer L, Solomonov I, Jan Weygand M, et al. Structure of Cholesterol/ceramide Monolayer Mixtures: Implications to the Molecular Organization of Lipid Rafts. *Biophysical J.* 2005; **88** (5), 3381–3391. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.051870>
  24. Sun M, Northup N, Marga F, et al. The Effect of Cellular Cholesterol on Membrane-Cytoskeleton Adhesion. *J. Cel. Sci.* 2007; **120** (13), 2223–2231. <https://doi.org/10.1242/jcs.001370>
  25. Zhao L, Temelli F, Curtis JM, Chen L. Preparation of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide Technology: Effects of Phospholipids and Sterols. *Food Res. Int.* 2015; **77**, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.006>
  26. Trucillo P, Campardelli R, Reverchon E. Supercritical CO<sub>2</sub> Assisted Liposomes Formation: Optimization of the Lipidic Layer for an Efficient Hydrophilic Drug Loading. *J. Co2 utilization* 2017; **18**, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.02.001>
  27. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry* 1996; **35**(8): 2521-2525 <https://doi.org/10.1021/bi950414i>
  28. Murao A, Nishikawa M, Managit C, et al. Targeting Efficiency of Galactosylated Liposomes to Hepatocytes in Vivo: Effect of Lipid Composition. *Pharm Res* 2002; **19**(12): 1808-1814 <https://doi.org/10.1023/A:1021433206081>
  29. Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, et al. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021; **9**: 705886 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>
  30. Tanaka H, Takahashi T, Konishi M, et al. Self-degradable lipid-like materials based on “hydrolysis accelerated by the intra-particle enrichment of reactant (HyPER)” for messenger RNA delivery. *Adv Funct Mater* 2020;1910575. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910575>
  31. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm* 2021; **601**, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
  32. Patel HM, Tužel NS, Ryman BE. Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *BBA* 1983; **761**(2): 142-151. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(83\)90223-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(83)90223-4)
  33. Bonté F, Juliano RL. Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem. Phys. Lipids* 1986; **40**, 359-372. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90079-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90079-4)

34. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **32**, 3-17 [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00128-2)
35. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 1990; **247**(4949): 1465-1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>
36. Takeuchi-Haraya Y, Sakai-Kato K, Abe Y, et al. Observation of liposomes of differing lipid composition in aqueous medium by means of atomic force microscopy. *Microscopy* 2016; **65**(4): 383-389 <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfw011>
37. Liang X, Mao G, Ng KYS. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci* 2004; **278**(1): 53-62 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.042>
38. Zhang S, Gao H, Bao G. Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano* 2015; **9**: 8655-8671. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
39. Nakamura T, Kawai M, Sato Y, et al. The Effect of Size and Charge of Lipid Nanoparticles Prepared by Microfluidic Mixing on Their Lymph Node Transitivity and Distribution. *Mol Pharm* 2020; **17**(3): 944–953. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01182>
40. Reddy ST, Rehor A, Schmoekel HG, Hubbell JA, Swartz MA. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J Controlled Release* 2006; **112**(1): 26-34 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.006>
41. Rao DA, Forrest ML, Alani AWG, Kwon GS, Robinson JR. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. *J Pharm Sci* 2010; **99** (4): 2018-2031 <https://doi.org/10.1002/jps.21970>
42. Sebastiani F, Arteta YM, Lerche M, Porcar L, Lang C, et al. Apolipoprotein E Binding Drives Structural and Compositional Rearrangement of mRNA-Containing Lipid Nanoparticles. *ACS Nano* 2021; **15**(4): 6709-6722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c10064>
43. Davies N, Hovdal D, Edmunds N, et al. Functionalized lipid nanoparticles for subcutaneous administration of mRNA to achieve systemic exposures of a therapeutic protein. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021; **24**, 369-384. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.03.008>
44. Cox D, Platt R, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 2015; **21**, 121–131. <https://doi.org/10.1038/nm.3793>

45. Akcakaya P, Bobbin ML, Guo JA, et al. In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature* 2018; **561**, 416–419.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0500-9>
46. Ogawa K, Kato N, Yoshida M, et al. Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain. *J Cont Release* 2022; **348**: 34-41 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.042>
47. Niemietz C, Nadzemova O, Zibert A, Schmidt H. H.-J. APOE polymorphism in ATTR amyloidosis patients treated with lipid nanoparticle siRNA. *AMYLOID* 2020; **27**(1): 45–51 <https://doi.org/10.1080/13506129.2019.1681392>
48. Kamiya M, Matsumoto M, Yamashita K, et al. Stability Study of mRNA-Lipid Nanoparticles Exposed to Various Conditions Based on the Evaluation between Physicochemical Properties and Their Relation with Protein Expression Ability. *Pharmaceutics* 2022; **14**(11): 2357 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112357>

## 基礎となった論文

Maho Kawaguchi, Marin Noda, Akari Ono, Mariko Kamiya, Makoto Matsumoto, Masako Tsurumaru, Shusaku Mizukami, Hidefumi Mukai, Shigeru Kawakami: Effect of cholesterol content of lipid composition in mRNA-LNPs on the protein expression in the injected site and liver after local administration in mice, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, in press (doi: 10.1016/j.xphs.2022.12.026)