



Tokyo Tech



東京大学大学院
工学系研究科
SCHOOL OF ENGINEERING
THE UNIVERSITY OF TOKYO



Press Release

2024年7月24日

東京工業大学
東京大学大学院工学系研究科
ナノ医療イノベーションセンター

トリフェニルホスホニウムを用いた高分子ミセルによる mRNA の効率的な生体内送達

ー アミンベースの送達キャリアに代わる新たな mRNA 送達戦略ー

【要点】

- トリフェニルホスホニウム（TPP）をベースとした新規カチオン性材料を用いて、mRNA を送達する高分子ミセルを創製
- 実験的評価と計算科学を組み合わせた多面的解析で、TPP 導入による mRNA 安定化のメカニズムを解明
- 従来のアミンから TPP への変換で mRNA 送達キャリアの多様化と機能向上に期待

【概要】

東京工業大学 物質理工学院 材料系の安楽泰孝准教授（ナノ医療イノベーションセンター（以下、iCONM） 副主幹研究員）、東京大学 大学院工学系研究科のカブラルオラシオ准教授（iCONM 客員研究員）、乗松純平大学院生、国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センターの黒田大祐主任研究官らの研究チームは、**メッセンジャーRNA（mRNA）**（用語 1）の効率的な生体内送達に向けて、TPP をベースとした新規カチオン性材料を用いた mRNA 内包**高分子ミセル**（用語 2）を創製した。

これまでの研究で、mRNA を効率的に送達する多様な脂質キャリアや高分子キャリアが開発されているが、いずれのキャリアも、mRNA と静電相互作用を介して複合体形成するために、アミンをベースとした材料が汎用されてきた。本研究では従来の設計で見落とされてきた、アミン以外のカチオン性官能基による mRNA 複合体安定化に着目した。

本研究で用いた TPP ベースの新規カチオン性材料は、アミンをベースとする従来のカチオン性材料と比較して、生体内における mRNA の安定性を大幅に向上させ、全身投与を介した mRNA の効率的な生体内送達を実現した。本研究ではさらに、この mRNA 安定化のメカニズムを物理化学、生物学、計算科学など多面的な解析から解明し、mRNA 送達キャリア設計におけるアミンから TPP への変換の妥当性と有用性を実証した。

アミンから TPP への変換というこの戦略は、現在 mRNA 送達に使用されているさまざまなカチオン性材料に適用可能と考えられ、今後、mRNA 送達キャリアの多様化・高機能化に寄与することが期待される。

本研究成果は、東京工業大学 物質理工学院 材料系の安楽泰孝准教授 (iCONM 副主幹研究員)、水野ローレンス隼斗助教、東京大学 大学院工学系研究科のカブラルオラシオ准教授 (iCONM 客員研究員)、津本浩平教授、中木戸誠講師、乗松純平大学院生、国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センターの黒田大祐主任研究官らによって行われ、7月10日付の英国王立化学会が発行する科学誌「*Materials Horizons*」に掲載された。

●背景

タンパク質の設計図である mRNA は、さまざまな疾患へ適用可能な新規治療薬として近年注目を集めている。しかし、mRNA には生体内不安定性や細胞膜非透過性などの問題があるため、mRNA 創薬においては、mRNA を標的部位へ効率的に送達可能なキャリア設計が極めて重要となる。これまでに、脂質や高分子から構成される多様なキャリア設計が報告され、mRNA の安定化や生体内送達が試行されてきた。しかし従来のほとんどの設計が、mRNA との複合体形成をアミンとの静電相互作用に依存しており、アミン以外のカチオン性官能基による mRNA 複合体化は未開拓であった。

本研究では、アミンの代替としてトリフェニルホスホニウム (TPP) に着目し、その有用性を検証した。TPP は3つのフェニル基を持ち、従来のアミンとは異なり、中心のカチオン原子が窒素原子ではなくリン原子であることから、従来のアミンとは mRNA との相互作用が異なると予想される。本研究では、従来核酸の送達に用いられる高分子ミセルをモデルキャリアとして使用することで、TPP を用いた mRNA との複合体形成のメカニズムと、その生体内送達の効果を検証した (図1)。

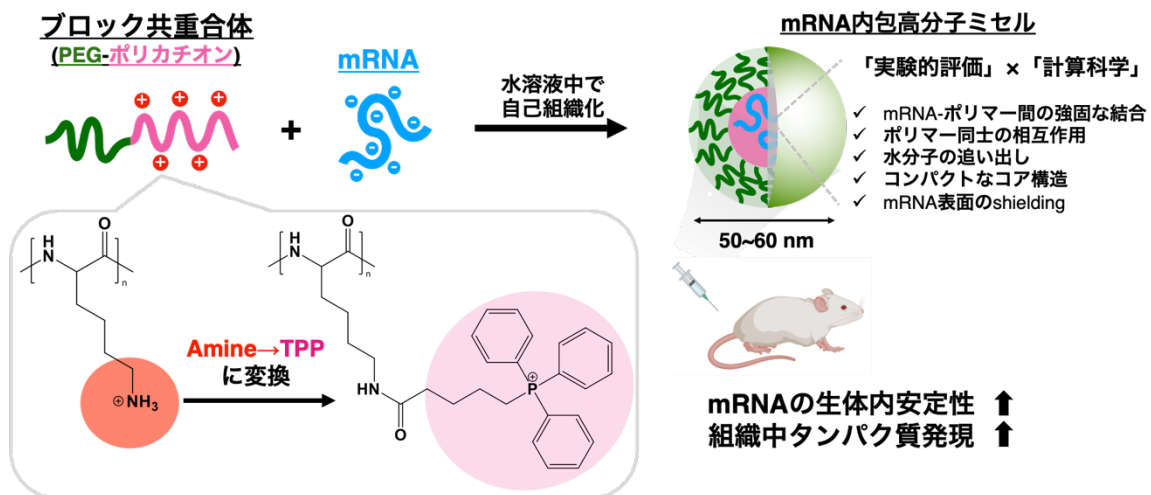


図1. 本研究の概要

●研究成果

(1) TPP と mRNA との複合体形成のメカニズム

本研究ではまず、高分子ミセルを構成するカチオン性材料として**ブロック共重合体** (用語3) PEG-poly (L-lysine) (PEG-PLys)を使用し、側鎖のアミノ基にアミド結合を介して TPP を導入した。PEG-PLys 側鎖への TPP 導入率は精密に制御可能であり、導入率の異

なる5種類のブロック共重合体（ポリマー）を合成した。いずれのポリマーも側鎖の正電荷に起因して水溶液中で優れた溶解性と分散性を示す一方で、TPPを導入したポリマー（PEG-PLys(TPP)）は、溶液中のNaCl濃度に応答して自己集合挙動を示した。この挙動は、塩化物イオンがポリマー間の静電反発を遮蔽することで、TPPの疎水性に起因するポリマー間の疎水性相互作用が促進されたことを意味しており、TPPの併せ持つカチオン性と疎水性が、アニオンに応答したポリマーの自己集合能を誘導することが示されたことになる。この性質は、PEG-PLys(TPP)がアニオン性分子を効率的に内包できる可能性を示唆している。

次に、mRNAとPEG-PLys(TPP)ポリマーを水溶液中で混和して、mRNAとの複合体を形成させることで、mRNAを内包した高分子ミセルを調製した。粒子径が100nm以下の高分子ミセルに、さまざまな長さのmRNAを効率的かつコンパクトに封入可能であることを確認した。この複合体形成時に生じる、ポリマーとmRNA間の相互作用を熱力学的観点で解析したところ、PEG-PLysポリマーはエンタルピー（用語4）駆動型の発熱反応を示すのに対し、PEG-PLys(TPP)ポリマーはエントロピー（用語5）駆動型の吸熱反応を示した。この結果は、TPP導入に伴い、mRNAとの相互作用が静電相互作用支配的な結合から水分子の排除を伴う疎水性相互作用支配的な結合に変化することを示唆している。

さらに、分子動力学シミュレーション（用語6）を用いて、ポリマーとmRNA間の相互作用を原子レベルで解析した。アミンとTPPの構造上の違い、すなわち「側鎖長」「フェニル基の有無」「中心原子の違い（N原子 vs P原子）」が、それぞれ「mRNA分子に対する親和性向上」「mRNA周辺からの水分子の排除およびmRNA表面の被覆」「ポリマー同士の親和性向上」に寄与することが示唆され、アミンからTPPへ構造を変換する戦略の妥当性を支持する知見を得た。

(2)新規高分子ミセルによる生体内送達の効果

従来の高分子を用いたmRNAの生体内送達では、生体内のアニオン性高分子によるキャリア構造の崩壊やRNA分解酵素によるmRNA分解が大きな障壁となる。今回の研究では、こうした生体内成分に対するmRNA安定性を、TPPの導入によって顕著に向上させられることを確認した。TPPを導入した高分子ミセルによる細胞内へのmRNA送達能を、培養細胞を用いて評価したところ、さまざまな細胞種においてTPP導入率が高いほど細胞内へのmRNA送達とタンパク質発現が促進されることが分かった。

最後にマウス体内でのmRNA安定性および送達能を評価した（図2）。アミンまたはTPPをベースとした高分子ミセルをマウス静脈内にそれぞれ投与し、血中に残存するmRNAを定量RT-PCR（用語7）で評価した。アミンベースの高分子ミセルの場合、投与後速やかに血中からmRNAが消失したのに対し、TPPベースの高分子ミセルでは血中を循環するmRNA量が大幅に増加した（図2左）。さらにTPPベースの高分子ミセルでは、全身投与後に生体内の各組織へのmRNAの送達も促進され、担癌マウスの腫瘍組織におけるタンパク質発現量がアミンベースの高分子ミセルの約10倍に達した（図2右）。以上の結果から、mRNA送達キャリアにおけるカチオン性材料をアミンからTPPへ変換

することで、全身投与した mRNA のバイオアベイラビリティ（用語 8）を向上させ、生体内組織でのタンパク質発現を促進することが示された。

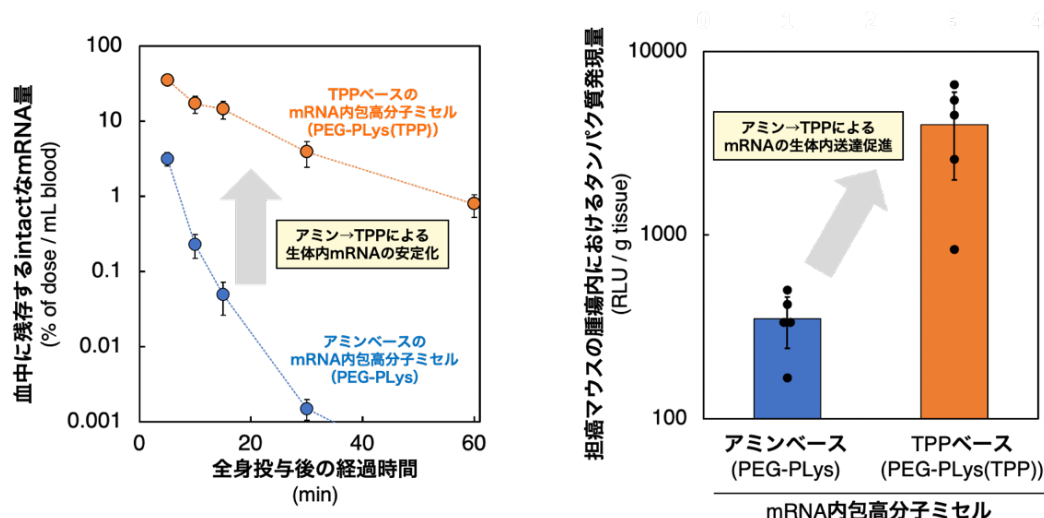


図2. アミンから TPP への変換による全身投与した mRNA の安定化および生体内送達促進

●社会的インパクト

今回の研究では、mRNA 送達キャリアにアミンの代わりに TPP を導入することで、生体内での mRNA 安定性を向上させ、生体内組織への効率的な送達を実現するというアプローチを採用した。この新たな送達戦略は、高分子ミセルだけでなく、脂質や他の高分子ベースなどさまざまな種類の mRNA 送達キャリアにも適用可能であり、今後の mRNA 送達キャリアの多様化と高機能化に貢献すると期待される。そうした mRNA 送達戦略の発展は、mRNA 創薬の前進にもつながると期待される。

●今後の展開

さまざまな薬物送達に使用される高分子ミセルは、組織浸透性や免疫回避能などの特徴に加え、表面にリガンドを修飾することで標的細胞への特異性を付与できるという利点がある。今回構築した TPP ベースの高分子ミセル表面に適切なりガンドを修飾し、対象疾患に合わせた治療用タンパク質をコードする mRNA を搭載することで、全身投与を介したさまざまな疾患治療に応用できると期待される。また、本研究で実施した実験的評価と計算科学を組み合わせた複合的アプローチは、今後さらなる高分子材料設計に有用と考えられる。

●付記

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) の科学研究費助成事業 (JP23H00545, JP21H05090, JP23K18558, JP20H04525, JP21K18310, JP23KJ0601, JP22KJ3168)、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) の JST FOREST Program (JPMJFR2138)、JST-Mirai Program (JPMJMI21G6)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の創薬基盤推進研究事業 (21483716)、第一三共株式会社との共同研究費などの支援を受けて行われた。

【用語説明】

- (1) **メッセンジャーRNA (mRNA)**：遺伝情報を DNA からリボソームに運ぶ分子。細胞内において DNA の遺伝情報が転写されて mRNA が合成され、リボソームで翻訳されることでタンパク質が合成される。
- (2) **高分子ミセル**：ブロック共重合体が水中で自己組織化して形成されるナノサイズの構造体。
- (3) **ブロック共重合体**：異なるポリマーセグメントが連結した高分子。
- (4) **エンタルピー**：システム内の総エネルギーを表す指標。
- (5) **エントロピー**：システム内の乱雑さや無秩序の度合いを表す指標。
- (6) **分子動力学シミュレーション**：原子や分子の運動をシミュレーションする計算手法。
- (7) **定量 RT-PCR**：特定の RNA 量を定量するための分子生物学的手法。
- (8) **バイオアベイラビリティ**：薬物が体内でどの程度効率的に吸収され、利用されるかを示す指標。

【論文情報】

掲載誌：*Materials Horizons*

論文タイトル：Triphenylphosphonium-Modified Cationomers Enhance in vivo mRNA Delivery through Stabilized Polyion Complexation

著者：Jumpei Norimatsu, Hayato L. Mizuno, Takayoshi Watanabe, Takumi Obara, Makoto Nakakido, Kouhei Tsumoto, Horacio Cabral,* Daisuke Kuroda,* Yasutaka Anraku*

DOI: 10.1039/d4mh00325j