

核酸搭載脂質ナノ粒子の大量生産用マイクロ流体デバイスの開発

～mRNA ワクチンの製造や個別化ナノ医療の実現に期待～

ポイント

- ・手のひらサイズのマイクロ流体デバイスを用いた、核酸搭載脂質ナノ粒子の大量製造方法を開発。
- ・開発したマイクロ流体デバイスが、mRNA ワクチンと同様の脂質ナノ粒子を製造できることを実証。
- ・mRNA ワクチン製造への応用や遺伝子治療及び個別化医療への応用に期待。

概要

北海道大学大学院工学研究院の真栄城正寿准教授、渡慶次学教授、同大学院総合化学院修士課程（当時）の岡田悠斗氏、信越化学工業株式会社の安藤雅郎氏、山崎裕之氏、竹内正樹氏らの研究グループは、手のひらサイズのマイクロ流体デバイス^{*1}を用いて、mRNA ワクチンに用いられている脂質ナノ粒子（LNP）^{*2}を大量に製造する方法を開発しました。

核酸を搭載した LNP は、COVID-19 に対する mRNA ワクチンにも利用されており、今後は様々な感染症やがんワクチンなどに応用が広がると期待されています。一方で LNP の粒径は、体内動態や薬効などに影響します。そのため、LNP の粒径を精密に制御する技術が求められていました。

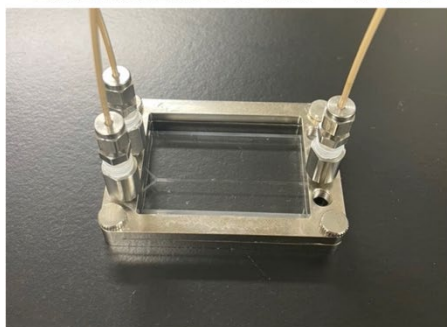
近年、マイクロ流体デバイスを用いた LNP 作製法が世界的に注目されています。LNP は、脂質原料溶液と核酸原料溶液を迅速に混合することで作製されます。マイクロ流体デバイスは、従来の作製法と比較して LNP の粒径を精密に制御することが可能です。しかし、マイクロ流体デバイスを用いた LNP 作製法は、一度に調製できる粒子量が少なく、LNP の生産量に課題がありました。

研究グループは、北大独自のマイクロ流体デバイスである「iLiNP^{*3}」を基に、マイクロ流路を積層化したガラス製マイクロ流体デバイスを開発しました。さらに積層化したマイクロ流体デバイスを並列化することで、従来の iLiNP デバイスの約 50 倍の LNP 生産量を達成しました。また、開発したマイクロ流体デバイスが、COVID-19 用の mRNA ワクチン Comirnaty[®]及び Spikevax[®]製造に応用できることを実証しました。

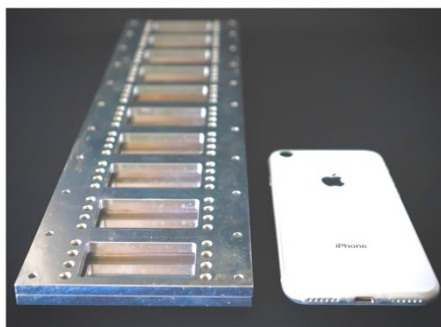
今後、感染症用ワクチンだけでなく、個別化医療^{*4}の実現に向けたナノ医薬品開発への応用が期待されます。

なお、本研究成果は、2023 年 2 月 16 日（木）、Applied Materials Today 誌にオンライン掲載されました。

5流路積層ガラス製デバイス



40流路並列化システム



脂質ナノ粒子大量生産用の石英ガラス製マイクロ流体デバイス

【背景】

核酸医薬は、抗体医薬に次ぐ新たなモダリティとして実用化が進んでいます。2018年には、siRNAをLNPに搭載した Onpattro®（致死性の希少疾患に対する医薬品）が承認されました。また、新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチンとして、Pfizer/Biontech 社の Comirnaty®及び Moderna 社の Spikevax®が実用化され、優れた重症化抑制効果を示しています。

今後、がん治療や遺伝子治療など、様々な疾患への応用が期待されます。しかしながら、mRNAをはじめとした核酸は、生体内では酵素によって分解されやすく、さらに負電荷を帯びているため細胞膜を透過しにくい課題があります。そのため、Comirnaty®などでは、mRNAをLNPの内部に搭載することで、不安定な核酸を保護し、目的の細胞に送達しています。

LNPは、核酸だけではなく、疎水性や親水性の薬剤を内部に搭載することが可能です。そのため、薬物送達システム(DDS)^{*5}として、世界中で研究が進められてきました。LNPの大きさ(粒径)は、生体内動態に影響することが報告されています。また、Moderna社の研究グループは、マウスにおいてはmRNAワクチンの粒径によって、誘導される抗体価が異なることを報告しています。そのため、LNPの粒径を精密に制御する技術の開発が求められていました。

この課題を解決する技術として、マイクロ流体デバイスを用いたLNP作製法が世界的に注目されています。LNPは複数種類の脂質をエタノールに溶解させた脂質溶液と核酸を溶解させた緩衝液(水溶液)を混合することで作製されています。脂質は水に溶解できないため、緩衝液によってエタノールが希釈されることで、脂質分子が自己会合して核酸を内部に搭載したLNPが形成します。

これまでに研究グループは、脂質溶液中のエタノールを迅速に希釈することが、LNPの粒径を精密に制御するために重要であることを見出してきました。また、この知見をもとに、LNPの粒径を10nm単位で制御可能なiLiNPデバイスという独自のマイクロ流体デバイスを開発し、北海道大学発のベンチャー企業であるライラックファーマ株式会社から販売し、社会実装を実現しました。

しかしながら、一般的にマイクロ流体デバイスは流路幅が数百マイクロメートルと微小であるため、一度に大量の原料をデバイスに導入できません。また、一度に大量の原料を導入すると、流路に高圧力がかかるため、流路構造の変形やデバイスが破損する可能性があるなど、LNPの大量生産性能に課題がありました。

そこで研究グループは、耐圧・耐薬品性に優れた合成石英ガラスを基板として、ガラス製のiLiNPデバイスを開発し、LNPの大量生産及びmRNAワクチン製造への応用に取り組みました。

【研究手法】

本研究では、研究グループがこれまでに開発したiLiNPデバイスを基盤として、合成石英ガラスを用いてマイクロ流体デバイス(ガラス製iLiNPデバイス)を作製しました(図1)。

また、マイクロ流路を加工したガラス基板を5枚積層化したマイクロ流体デバイスユニットを作製し、8個のデバイスユニットを並列化することで、LNPの大量生産システムを構築しました。開発したガラス製iLiNPデバイス及びデバイスユニットのmRNAワクチン作製への応用可能性を検証するために、Comirnaty®及びSpikevax®と同じ脂質組成で内部にmRNAを搭載したLNPの作製に取り組みました。

【研究成果】

研究グループは、モデル脂質としてPOPCを用いて、作製したガラス製iLiNPデバイスのLNP作製性能の評価を行いました。その結果、ガラス製iLiNPデバイスは、LNPの粒径を20~120nmまで

の範囲で、原料溶液の流量依存的に制御できることを確認しました。この流量依存的な LNP の粒径制御は、iLiNP デバイスの特徴の一つであり、基板をガラスにした場合でも従来の iLiNP デバイスの性能が保たれていること明らかにしました。これによって、高い剛性及び耐薬品性を有するガラス製 iLiNP デバイスを達成しました。

次に、マイクロ流路を加工した 5 枚のガラス基板を積層化した iLiNP デバイスユニットの開発に取り組み、さらに、積層化したデバイスユニットを 8 個並列化することで (合計 40 流路)、LNP 大量生産システムを構築しました。構築した LNP 大量生産システムの性能評価として、POPC を用いて LNP を作製し、生成する LNP の粒径及び各デバイスユニットから回収される LNP の粒径分布 (粒径のばらつき) を調べました (図 2)。

デバイスを積層化・並列化することによって、これまでに研究グループが開発したシリコーンゴム製 iLiNP デバイスと比較して、約 50 倍の LNP 生産量を達成しました (26 トン/年)。また、並列化した 8 デバイスユニットから回収された LNP の粒径分布は、ほぼ完全に一致することを確認しました。これは、並列化したデバイスユニットに均一に原料溶液が導入されており、生成した LNP が均一であることを意味しています。LNP を大量生産するためには、マイクロ流体デバイスに高流量で原料溶液を送液する必要があります。シリコーンゴムのような剛性が低いデバイス部材の場合は、高流量の送液によって流路構造が変形して、粒径制御性能が低下する懸念がありました。

一方で、研究グループが開発したガラス製マイクロ流体デバイスの場合は、原料溶液が大量にデバイスに導入されても流路が破損及び変形することなく、均一な LNP を製造できることを確認しました。本研究のマイクロ流体デバイスの基板である石英ガラスは、高い薬品耐性を示すため、従来の樹脂製のデバイスでは使用できない様々な種類の有機溶媒を使用することができます。また、石英ガラスは極めて高純度なので、不純物の溶出の心配がありません。このような石英ガラスの特徴は、医薬品製造装置の開発において重要な要素です。

さらに研究グループは、開発したガラス製 iLiNP デバイス及び製造システムの mRNA ワクチン (mRNA 搭載 LNP) 作製への応用可能性を検証しました。mRNA 搭載 LNP の作製には、COVID-19 に対する mRNA ワクチンである Comirnaty®⁶ 及び Spikevax® のそれぞれと同じ脂質を用いました。また、LNP の内部には、ルシフェラーゼ⁶ というタンパク質を発現する mRNA を搭載しました。

デバイスユニットから回収された mRNA 搭載 LNP の粒径は、Comirnaty® LNP 及び Spikevax® LNP とともに、80~90 nm であり、粒径の分布が狭く、極めて均一な粒径の LNP の製造に成功しました。また、製造したそれぞれの mRNA 搭載 LNP をマウスに静脈投与及び筋肉注射を行い、ルシフェラーゼの発現量によって LNP の薬効を比較しました。

その結果、静脈投与では、Comirnaty® LNP 及び Spikevax® LNP とともに肝臓でルシフェラーゼの発現が確認され、薬効はほぼ同程度でした。一方で、筋肉注射の場合では、Comirnaty® LNP よりも Spikevax® LNP の方が、ルシフェラーゼの発現量が有意に高くなることを確認しました (図 3)。

これらの結果から、ガラス製 iLiNP デバイスの開発及び iLiNP デバイスを積層化・並列化した LNP 大量生産システムを構築し、構築したシステムが mRNA ワクチンなどの核酸搭載 LNP の大量生産にも応用できることを実証しました。

【今後への期待】

研究グループでは、ガラス製マイクロ流体デバイスのさらなる LNP 生産量の向上に取り組んでいます。最新型のマイクロ流体デバイスでは、1 流路あたり 200 mL/分以上の LNP 生産が可能となっており、本研究で確立した積層化・並列化技術と組み合わせることで、数十 L/分の LNP 生産性能が

期待されます。また、研究グループでは、本マイクロ流路技術をもとに、医薬品製造に必要な GMP 基準^{*7}に準拠した LNP 製造装置の開発を進めており、2023 年内に試作機が完成予定です。

本マイクロ流体デバイスを用いた LNP 製造装置の大きな利点として、LNP の生産量を 1 台の装置で需要に応じて容易に切り替えられる点があげられます。感染症用のワクチンのような大量生産から、個別化医療のための少量多品種のナノ医薬品まで、1 台の装置でわずか 1m² のスペースで LNP を製造することが可能となります。そのため将来的には、平時には企業ニーズに応じたナノ医薬品を製造し、パンデミック時には感染症用のワクチン製造に切り替えることが可能な基盤設備になることが期待されます。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業個人型研究 (さきがけ) (JPMJPR19K8)、同戦略的創造研究推進事業 (JPMJCR17H1)、同社会還元加速プログラム (JPMJST2077)、北海道大学機能強化促進経費 (血管を標的とするナノ医療の実装)、北海道大学創成特定研究事業 (パンデミック制御に資する先制医療基盤の開発)、日本医療研究開発機構 (AMED) (22zf0127004h0002、JP21ak0101172)、文部科学省・日本学術振興会科学研究費助成事業 国際共同研究強化 (B) (JP19KK0140)、池谷科学技術振興財団、信越化学工業株式会社の助成を受けて実施されました。

論文情報

論文名 Mass production system for RNA-loaded lipid nanoparticles using piling up microfluidic devices (積層型マイクロ流体デバイスを用いた RNA 搭載脂質ナノ粒子大量生産システム)
著者名 真栄城正寿¹⁻³、岡田悠斗⁴、宇野秀哉⁴、杉浦魁星⁴、鈴木裕一⁵、奥田健斗⁵、佐藤悠介⁶、安藤雅郎⁷、山崎裕之⁷、竹内正樹⁷、石田晃彦¹、谷 博文¹、原島秀吉⁶、渡慶次学¹ (1北海道大学大学院工学研究院、2JST さきがけ、3高エネルギー加速器研究機構、4北海道大学大学院総合化学院、5北海道大学大学院生命科学院、6北海道大学大学院薬学研究院、7信越化学工業株式会社)
雑誌名 *Applied Materials Today* (材料化学の専門誌)
DOI 10.1016/j.apmt.2023.101754
公表日 2023年2月16日(木)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院工学研究院 准教授 真栄城正寿 (まえきまさとし)

TEL 011-706-6773 FAX 011-706-6745 メール m.maeki@eng.hokudai.ac.jp

URL <https://microfluidic.chips.jp/jp/>

信越化学工業株式会社 広報部 小石川哲也 (こいしかわてつや)

TEL 03-6812-2340 FAX 03-6812-2341 メール sec-pr@shinetsu.jp

URL <https://www.shinetsu.co.jp/jp/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 北海道札幌市北区北8条西5丁目)

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

信越化学工業株式会社 (〒100-0005 東京都千代田区丸の内1-4-1 丸の内永楽ビルディング)

TEL 03-6812-2340 FAX 03-6812-2341 メール sec-pr@shinetsu.jp

【参考図】

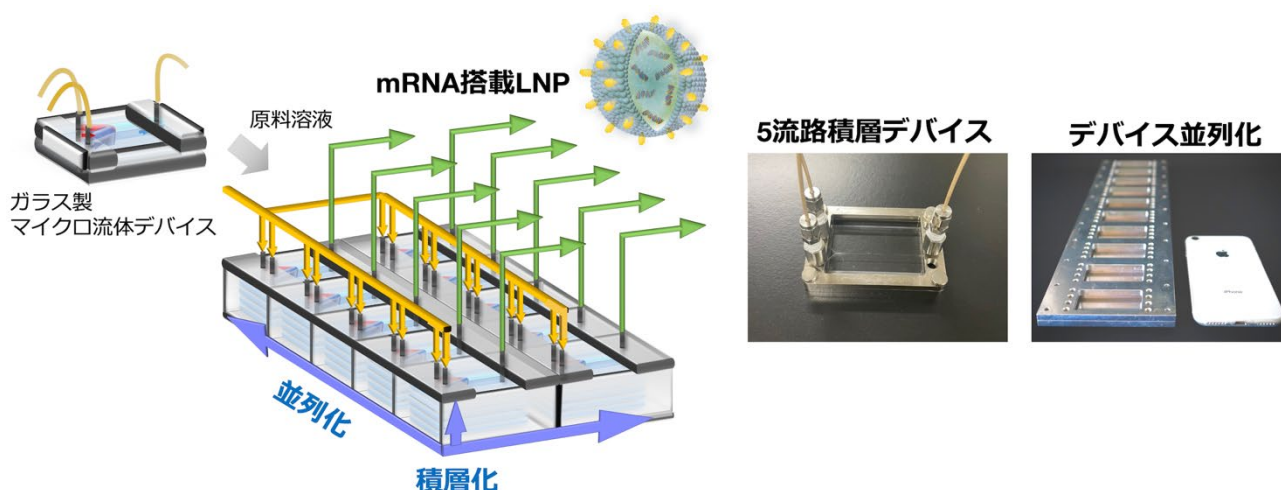


図1. マイクロ流体デバイスを基盤とした核酸搭載脂質ナノ粒子大量生産システム

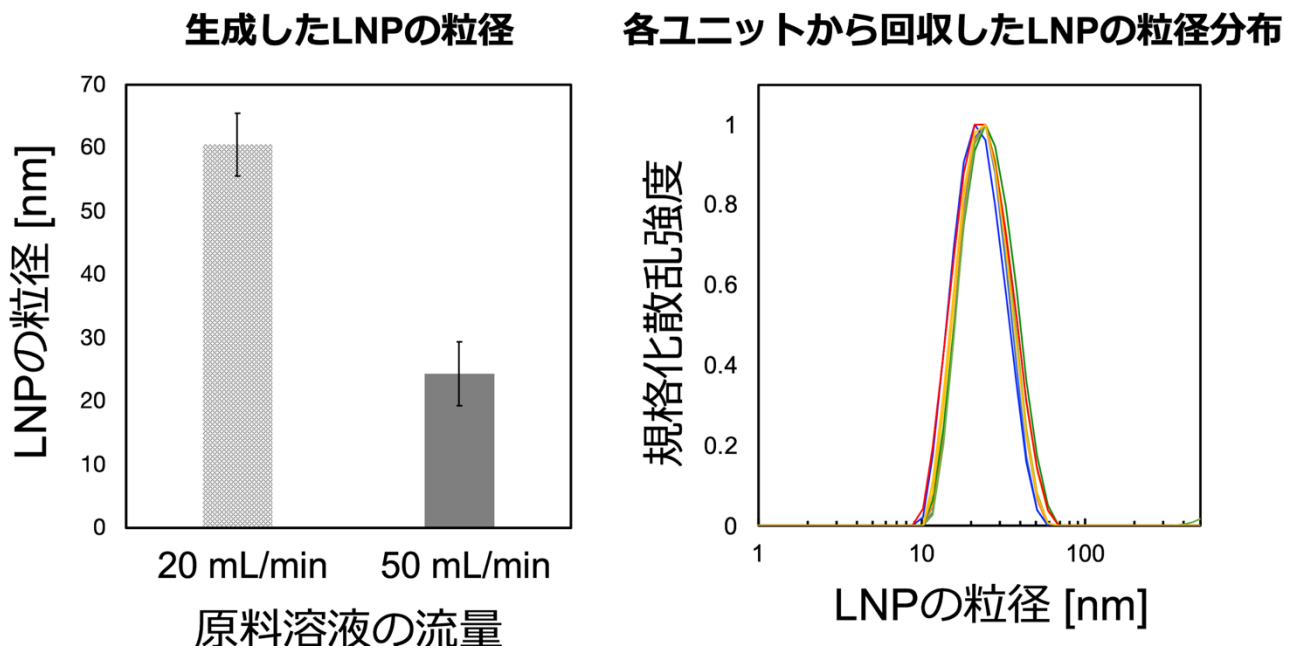


図 2. LNP 大量生産システムで生成した LNP の粒径及び各デバイスユニットから回収した LNP の粒径分布

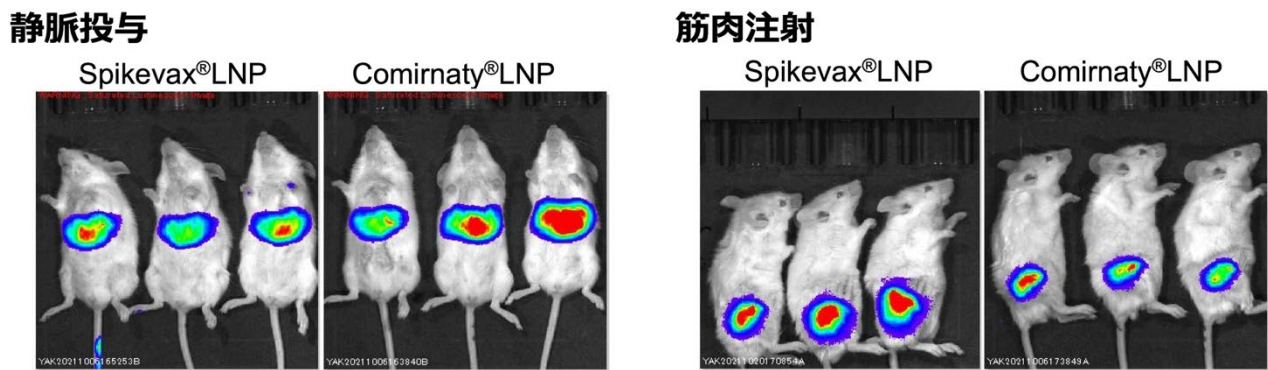


図 3. Spikevax®LNP 及び Comirnaty®LNP のルシフェラーゼ発現活性

【用語解説】

- *1 マイクロ流体デバイス … 流路幅が数 μm ～数百 μm の微小な流路をもつデバイス。
- *2 脂質ナノ粒子 (LNP) … Lipid Nanoparticle の略語。脂質及び核酸で形成されたナノ粒子のこと。COVID-19 の mRNA ワクチンにも使用されている。
- *3 iLiNP® … これまでに研究グループが独自に開発した LNP 作製用のマイクロ流体デバイスのこと。
- *4 個別化医療 … 患者の遺伝情報などを調べて、患者一人ひとりにあった治療法や治療薬を選択する医療のこと。

*5 薬物送達システム（DDS） … Drug Delivery System の略語。薬物を標的の細胞や臓器に、必要な時に必要な量を送達する技術のこと。

*6 ルシフェラーゼ … ホタルなどの生物発光において、発光反応を触媒するタンパク質（酵素）のこと。mRNA 搭載 LNP の薬効評価にも利用されている。

*7 GMP … Good Manufacturing Practice の略語（日本語では、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準）。