

血液由来細胞からmRNA内包リポソームを使用したiPS細胞の樹立

P17-3



梅景 雅史¹, 野崎 絵美², 菅野 美津子², 塚原 正義¹
 1.京都大学iPS細胞研究財団, 2.株式会社東芝研究開発センター

背景・目的

■ 血液由来細胞からmRNAを使用した樹立が有利だが困難

ドナーや患者由来の細胞を取得する際、侵襲性と無菌性の観点から末梢血由来の細胞を使用してiPS細胞を樹立することが望ましいと考えられる。また、mRNAを使用したiPS細胞の樹立は、初期化因子のゲノムへの挿入リスクが回避できること、ターンオーバーの速さから初期化因子が残存しないことなどのメリットがある。しかしながら、mRNAを使用したiPS細胞の樹立は、血液由来の細胞からの樹立については困難とされてきた。

■ リポソームの脂質組成をカスタマイズ設計し作製する技術を開発

株式会社東芝が開発したリポソームは、新規イオン化脂質を含む脂質構成成分比を標的細胞に合わせて設計し、標的細胞への指向的な送達を実現。

■ 目的

mRNAを内包したリポソームを使用して、末梢血単核球由来細胞からiPS細胞を樹立する方法を確立

方法

■ 細胞指向性リポソーム

新規イオン化脂質
 FFT-10, FFT-20 (日米欧中特許登録済み)

リポソーム設計技術
 バイズ最適化や導入予測モデルを活用し、標的細胞に最適なリポソームの構成脂質組成を設計 (J. Nanomedicine(2021)に掲載)

リポソーム製造技術
 マイクロフロー法を応用した製造プロセスの確立 (特許出願済み) 治験薬GMPグレードリポソーム製造環境 (2024年提供開始予定)

■ 標的細胞に対応したリポソーム設計

リポソーム脂質組成最適化プロセス

- Creation of the initial dataset: LNP's were prepared using 70 types of lipid composition (X₁...X₇₀). The luciferase activity (A) and the cell viability (B) of hPBMC transfected with each LNP's were measured. The output value (Y₁, Y₂...) was calculated by multiplying logarithm of A and B.
- Construction of the surrogate model: Based on the data set (X₁...X₇₀, Y₁, Y₂...), considering the lipid composition ratio (X) and the output value (Y), the surrogate model f(X) = f(X₁, X₂, ..., X₇₀) that gives a probability distribution of Y was constructed by Gaussian process regression (Using an experimental kernel).
- Selection of the next lipid composition: The acquisition function (a(x)) was calculated based on the surrogate model constructed in Step 2, and the lipid composition (X_{opt}) that maximized the acquisition function was selected.
- Measurement of the output value: LNP's was prepared using X_{opt}. The luciferase activity (A) and the cell viability (B) of hPBMC transfected with the LNP's were measured. The output value (Y_{opt}) was calculated in the same way as in Step 1. Repeating Step 2 to Step 4 until Y_{opt} is achieved.
- Checking the output value and stopping of the data set: Complete.

Point 1
 ① リポソームの構成脂質成分配合比率の最適化により指向的に送達
 ② バイズ最適化を活用し探索範囲の拡大と探索時間の短縮を実現

実験順序に基づくリポソームの分布
性能値Yの強度に基づくリポソームの分布

■ PBMCへのmRNA導入

Day -5 市販PBMC, StemSpan SFEM II +6 Cytokine, 3 × 10⁶ cells/well (24well plate)

Day 0 リポソーム45種にGFP mRNAを内包した細胞に添加 1.3uL/well (96well plate)
 Lipo551 + mRNA (初期化)
 StemFit + Y-27632
 2.5 × 10⁵ cells/well (24well plate)
 Coating by LN511

Day 1-5 GFPをScan, リポソームを追加添加

Day 14 GFPの発現強度をもとにリポソーム45種からスクリーニングした, コロニー確認

初期化のプロトコール

mRNAを導入する細胞は、6種のCytokineを加えたStemSpan SFEM II 培地でPBMCを5日間培養した浮遊細胞を使用した。StemFit培地にY-27632とLaminin511-E8(LN511)を加えた細胞を播種し、mRNAを内包したリポソームを添加した(Day0)。スクリーニング時には45種類のリポソームそれぞれにmGFPを内包したリポソームを添加後、3日間、蛍光顕微鏡にて全WellをスキャンしGFPの発現強度を解析した。初期化にはOct4, Sox2, Klf4, cMyc, Nanog, Lin28などの各mRNAを内包したリポソームを使用した。(iPS細胞の樹立条件を参照)

■ 細胞指向性リポソームの設計

線維芽細胞, **T細胞**, **CD34陽性細胞**, **乳がん細胞 (MDA-MB-231)**, **肺がん細胞 (A549)**

蛍光標識リポソームの細胞への導入
 レーザー共焦点顕微鏡による観察結果

赤: ローダミン (リポソーム) 青: DAPI (核)

Liposome: ローダミン標識脂質を使用したリポソーム
 添加量: 2 μL / 2 × 10⁵ cells/well
 観察条件: 24時間後にFACS、蛍光顕微鏡でGFP発現を測定

① 細胞ごとに異なるリポソームを用いることで多様な細胞への導入が可能
 ② リポソームは細胞内で核周辺に送達されている

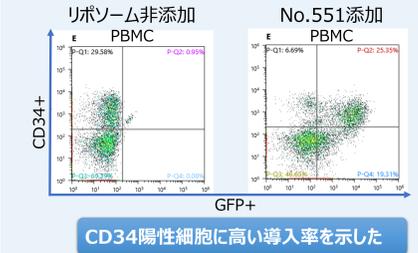
結果

■ GFP導入によるスクリーニング

No.551が安定して導入効率が高く、高発現であった

7ドナーのPBMCをStemSpan SFEM II +6 Cytokineで5日間培養した細胞に、mGFPを内包した45種類のリポソームを添加した。写真は添加後、1日目の蛍光写真。細胞へ導入されたmGFPが発現していることが確認できた。ドナーにより導入効率に差があったが、リポソームNo.551が比較的安定して導入できた。

■ 組成No.551リポソームの特性



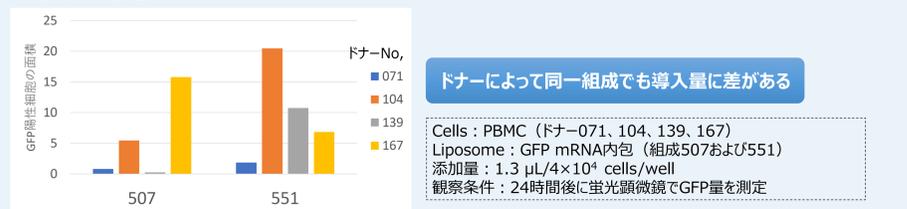
■ iPS細胞の樹立条件

条件	Day0	1	2	3	4	5	iPSC	iPS細胞 (Day13)
1	8uL	-	-	-	-	-	-	-
2	4uL	-	4uL	-	2uL	-	+	+
3	4uL	-	2uL	-	2uL	-	-	-
4	4uL	-	-	-	-	-	+	-
5	2uL	2uL	2uL	2uL	2uL	2uL	+	+
6	2uL	2uL	2uL	2uL	2uL	2uL	-	-
7	1uL	1uL	1uL	1uL	1uL	1uL	-	-

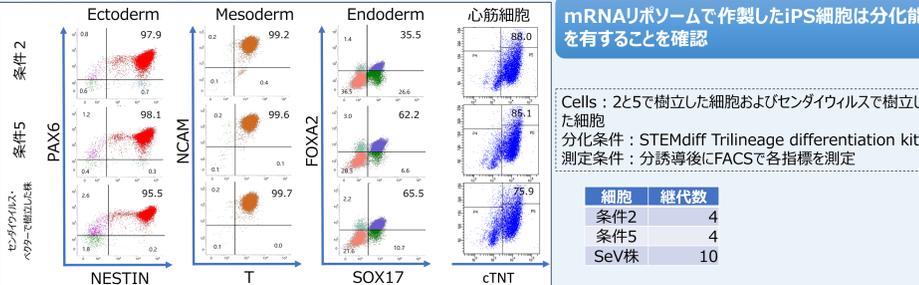
条件2で樹立した iPS細胞 (Day13)

① 複数の投与条件でiPS細胞を樹立することができた。
 ② 条件2および5では、比較的安定にiPS細胞を樹立することができた

■ ドナー間差



■ 分化能の確認



考察と課題

- 脂質組成No.551のリポソームはPBMCに含まれるCD34+細胞へのmRNA送達性能が高かったためiPS細胞を樹立できたと考えられる。
- リポソーム4 μLをDay0のみ添加する条件でiPS細胞を樹立できたことから、同リポソームによって持続的に初期化因子を送達できる可能性がある。
- 初期化因子をmRNAで導入するiPS細胞樹立方法は、理論上は初期化因子が細胞内に残存しないため、安全性や品質管理試験を省略することができ、従来より早く分化誘導へ移行することが期待できる。
- mRNAを内包して細胞へ送達するリポソームは、一般的なリポソームと比べてmRNAが分解されにくく、GMPグレードでの提供が可能。
- 異なるドナーのPBMCによってリポソームのmRNA送達性にばらつきがあるため、ドナー間でiPS細胞樹立効率が変化する可能性がある。
 ➔ 脂質組成の異なる複数のリポソームを組み合わせることで樹立効率の向上を目指す。

まとめ

- 導入効率の高いリポソームを見出すことによって、血液由来の細胞からmRNAを使用してiPS細胞を樹立することができた。
- リポソーム使用量、細胞への添加タイミング、添加期間などを調整することにより、iPS細胞の複数の樹立条件を確立できた。