



Article Open access Published: 14 January 2025

Nanocarrier imaging at single-cell resolution across entire mouse bodies with deep learning

ディープラーニングを用いた単一細胞分解能でのマウス全身の ナノキャリアイメージング

Jie Luo, Muge Molbay, Ying Chen, Izabela Horvath, Karoline Kadletz, Benjamin Kick, Shan Zhao, Rami Al-Maskari, Inderjeet Singh, Mayar Ali, Harsharan Singh Bhatia, David-Paul Minde, Moritz Negwer, Luciano Hoehner, Gian Marco Calandra, Bernhard Groschup, Jinpeng Su, Ceren Kimna, Zhouyi Rong, Nikolas Galensowske, Mihail Ivilinov Todorov, Denise Jeridi, Tzu-Lun Ohn, Stefan Roth, Alba Simats, Vikramjeet Singh, Igor Khalin, Chenchen Pan, Bernardo A. Arús, Oliver T. Bruns, Reinhard Zeidler, Arthur Liesz, Ulrike Protzer, Nikolaus Plesnila, Siegfried Ussar, Farida Hellal, Johannes Paetzold, Markus Elsner, Hendrik Dietz & Ali Erturk

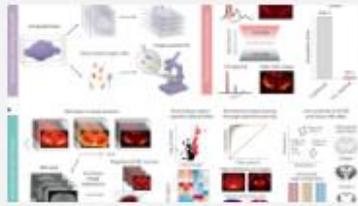
<https://doi.org/10.1038/s41587-024-02528-1>

1

抄録

標的薬物送達のための効率的で正確なナノキャリアの開発は、全生物にわたる細胞レベルの生体内分布を解析する方法がないために妨げられている。ここでは、Single Cell Precision Nanocarrier Identification (SCP-Nano) を提示する。これは、単一細胞の分解能でマウス全身のナノキャリアの標的化を包括的に定量化するための、実験と深層学習の統合されたパイプラインである。SCP-Nano は、従来の全身撮像法の検出限界をはるかに下回る 0.0005 mgkg^{-1} という低用量で様々な注射経路で投与したときの脂質ナノ粒子 (LNP) の組織分布パターンを明らかにする。我々は、SARS-CoV-2 のスパイク mRNA を保有する LNP を筋肉内注射すると、心臓組織に到達してプロテオームが変化することを実証した。このことから、免疫活性化と血管損傷が示唆される。SCP-Nano は、リポソーム、ポリプレックス、DNA 折り紙、アデノ関連ウイルス (HAV) などの様々な種類のナノキャリアに一般化され、AAV2 変異体が脂肪細胞を全身に導入することが明らかにされた。SCP-Nano は、マウスの全身におけるナノキャリアの分布を高感度で包括的に 3 次元マッピングすることを可能にし、正確で安全なナノキャリアを用いた治療法の開発を加速させるはずである。

Similar content being viewed by others



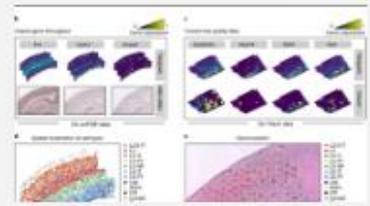
**Multiscale
biochemical mapping
of the brain through
deep-learning-...**

Article | Open access
16 February 2024



**Deep 3D histology
powered by tissue
clearing, omics and AI**

Article | 12 July 2024



**Deep learning and
alignment of spatially
resolved single-cell
transcriptomes wit...**

Article | Open access
28 October 2021

本文

現代の生物医学では、ヒトの体内で疾患の原因となる変化を回復させる可能性のある巨大分子薬(様々な RNA 種、ゲノム編集ツール、タンパク質薬など)が数多く提供されています^{1,2}。しかし、これらの薬物を臨床に応用する上での大きな障害は、これらの大きな荷電分子を標的細胞集団に特異的に送達しながら、オフターゲット効果を最小限に抑えることにある。

ナノキャリア(lipid nanoparticle[LNP]³, liposome⁴, apolyplexes⁵ など)およびウイルスベクター(adeno-associated virus[AAVs]⁶ など)は、最も有望な送達法の1つである。薬物分子を保護し、生物学的障壁の克服を助け、臓器および細胞タイプの標的化を媒介することができる。30 を超える米国食品医薬品局(Food&Drug Administration:FDA)/欧州医薬品庁(European Medicines Agency:EMA)の承認製品があり、多数の臨床試験が進行中であるこれらのナノキャリアは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)ワクチンの成功に例示されるように、大きな治療効果をもたらす可能性を秘めている。DNA 折り紙のような新たな方法では、作製、修飾、特にプログラムの作成が容易である^{7,8,9,10,11,12}。安定性および標的化を増強するために、ナノキャリアはしばしばポリエチレングリコール(PEG)などのポリマーでコーティングされ、抗体などの標的化部分で機能化される。しかし、in vivo 環境に曝されると、ナノキャリアは必然的にタンパク質コロナを獲得することになり、これがナノキャリアの生体内分布や細胞間相互作用に影響を及ぼす可能性があり¹³、ナノキャリアの設計や標的組織の予測が複雑になる。

全てのナノキャリア戦略に共通する重要な課題は、標的組織および細胞に対する特異性および効率を最大化しつつ、有害作用およびオフターゲット作用を最小限に抑えることである。ポジトロン放射断層撮影(PET)、コンピュータ断層撮影(CT)、磁気共鳴画像法(MRI)または in vivo 光学イメージングなど、マウスの全身におけるナノキャリアの生体内分布を解析する既存の方法は、ナノキャリアが標的とする何百万もの個々の細胞を 3 次元

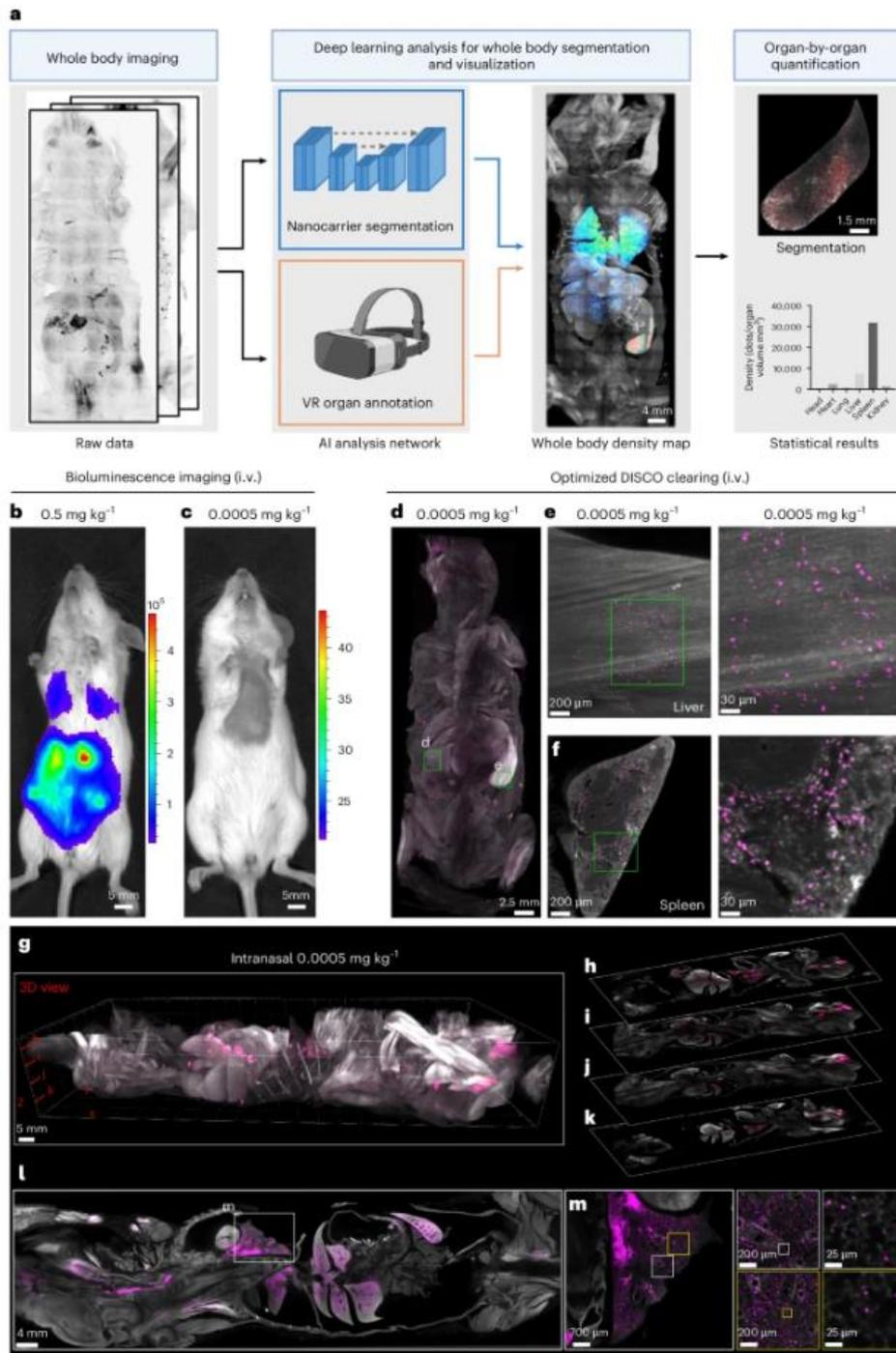
*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等
は行っていません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めて
いただきますようお願いいたします。

(3D)で同定する分解能に欠けており、また予防および治療ワクチンなどの用途で用いられる低用量での作業に対する感度にも欠けることが多い。同様に、低強度のオフターゲット部位を検出および分析する能力にも限界がある^{14,15,16}。逆に、従来の組織学的アプローチでは、細胞内分解能と高い感度が得られるが、事前を選択された薄い二次元(2D)組織切片に依存するため、丸ごとの動物の分析には適さない^{17,18}。

これらの限界に対処するため、我々は Single Cell Precision Nanocarrier Identification(SCP-Nano)を開発した。これは、蛍光標識されたナノキャリアの生体内分布をマウスの全身にわたって単一細胞レベルの分解能と高感度でマッピングして定量化するためのパイプラインである(図 1a)。SCP-Nano は、先進的なディープラーニングパイプラインを用いて、ナノキャリアイメージング用に最適化された DISCO 社の組織透明化法とライトシート顕微鏡法によって得られた大規模な画像データを解析する。このアプローチにより、マウスの全身にわたって臓器、組織、および単一細胞レベルでナノメディシンの送達を正確に定量化することが可能になる。我々は、LNP ベースの mRNA 送達の研究における SCP-Nano の有用性を実証し、 0.0005 mgkg^{-1} という低用量(ワクチンで一般的に使用される用量であり、ナノ粒子に対する従来の画像検査で一般的に使用される用量の 100~1000 分の 1 に当たる)での生体内分布を定量化し、適用経路に依存する組織指向性を明らかにする。注目すべきことに、SARS-CoV-2 スパイク mRNA の送達後に心臓組織に低強度のオフターゲット LNP の蓄積が検出され、その後のプロテオミクス解析で免疫タンパク質および血管タンパク質の発現の変化が明らかになった。これにより、報告された臨床所見の一部を説明できる可能性がある^{19,20,21,22}。

最後に、SCP-Nano をリポソーム、ポリプレックス、DNA 折り紙および 2 つのアデノ随伴ウイルス(AAV)変異体に適用することによって SCP-Nano の一般化可能性を実証し、AAV2 変異体 Retro-AAV の主要標的として脂肪組織を同定した。我々の人工知能(AI)ベースの定量化パイプラインは、数百万の標的事象に対する精度とスケーラビリティの点で、以前に公表されたアプローチを大幅に上回っており、我々の統合された空間プロテオミクス解析は、組織標的化の分子基盤と効果に関する洞察を提供する。SCP-Nano は、正確で安全なナノキャリアを用いた治療法の開発を加速させるはずである。

図 1:低線量でナノキャリアをイメージングするために最適化された DISCO クリアリング



a, Scheme of SCP-Nano pipeline: 蛍光標識されたナノキャリアの生体内分布をマウスの全身にわたってマッピングおよび定量化するためのパイプラインであり、単一細胞レベルの分解能と高感度を備えている。b, c, 0.5 mg kg⁻¹ (b) および 0.0005 mg kg⁻¹ (c) のルシフェラーゼ mRNA 搭載 LNP を静脈内投与して 6 時間後の生物発光イメージング(腹側)。d-f, 0.0005 mg kg⁻¹ の Alexa Fluor 647 標識 EGFP mRNA 搭載 LNP を静脈内投与し、洗練された DISCO クリアリング法でクリアしたマウスの全身ライトシートイメージング。このアプローチにより、肝臓(e)および脾臓(f)を含むマウスの全身への mRNA 送達を細胞レベルの分解能で視覚化できる。g-m, 0.0005 mg kg⁻¹ の鼻腔内投与後のマウスの全身 LNP の視覚化: 最大強度投影(g)および単一光学スライス像(h-l); 肺の代表的な個々の光学スライス(m)。例えば mRNA ワクチンに一般的に用いられる低用量(0.0005 mg kg⁻¹)では、シグナルコントラストは劇的に低下する(図 1c および補足図 1)。

結果

高分解能全身生体分布イメージング

一般的な全身イメージング技術である従来の生物発光イメージングでは、高用量(0.5 mg/kg)を臓器レベルで高コントラストで LNP に基づいて mRNA を送達した後のルシフェラーゼ発現を同定した(図 1b)。しかし、例えば mRNA ワクチンに一般的に用いられる低用量(0.0005 mg/kg⁻¹)では、シグナルコントラストは劇的に低下する(図 1c および補足図 1)。

LNP の分布をより高い感度と分解能で可視化するために、Alexa 蛍光色素(Alexa 647 または Alexa 750)で標識された EGFP mRNA を運び、臨床的に承認された MC 3-イオン化脂質²³に基づいて LNP を作製した。

まず、単一細胞レベルでの臨床 LNP 用量の高感度 3 次元画像化を可能にするために、DISCO の全マウス透明化法を最適化した。われわれは、尿素とアジ化ナトリウムを除去し、ジクロロメタン(DCM)のインキュベーション時間を短縮することが、マウスの全身で Alexa Fluor タグ付き mRNA の蛍光シグナルを維持するために極めて重要であることを発見した^{24,25,26,27}(補足図 2 および方法)。この洗練された DISCO 法を用いて、約 1-2 μm(側面)および約 6 μm(軸方向)の解像度でマウスの画像を撮影した。これにより、0.0005 mg/kg⁻¹という低用量であっても、特に肝臓および脾臓において LNP が広範に細胞標的化されていることが明らかになり(図 1d-f および補足図 3)、全身で単一細胞の解像度が達成された(補足図 4a-d)。2 つの異なる蛍光タグを結合させた LNP は同じ領域を等しく標的とし(補足図 4e)、Alexa Fluor 647 で脂質成分を標識しても同様の結果が得られた(補足図 4f)ことから、mRNA への色素の結合は LNP の生体内分布に影響を及ぼさなかった。

次に、鼻腔内または筋肉内に投与した LNP の体内分布を多数の臨床試験で検討されている経路と比較し²⁸、ここでも全身、特に肺、肝臓および脾臓に広範に細胞が標的化されていることが明らかになった(図 1d-m、補足図 3 および補足ビデオ 1)。詳細な検査により、これらの臓器全体で数千の標的細胞が強調された(図 1m および補足図 3b,c)。

透明化中の潜在的なシグナル喪失を評価するために、我々はさらに組織学を用いて我々の方法を検証した。マウス全体の灌流および固定の後、リンパ節および肝臓の組織学的スライスを作製し、LNP 発現 EGFP タンパク質の分布を画像化した。その後、最適化された DISCO プロトコルを用いて同じスライス除去し、再度画像を撮影した。信号コントラストと EGFP 蛋白陽性構造の数の両方が、透明化の前後でよく保存されていた(補足図 5a)。さらに、組織の透明化と全身の画像化を行った後に共焦点顕微鏡を用いて観察したように(補足図 5b)、我々の透明化技術は細胞の内部と外部の両方でナノ粒子を保存する。

我々の方法の一般化可能性を示すために、我々はまた、COOH 修飾 Atto 647 または一本鎖 DNA(ssDNA)-Alexa Fluor 647 をそれぞれ送達するリポソーム(臨床的に承認された Doxil 製剤に基づく)およびポリプレックス(分岐ポリエチレンイミン(PEI)に基づく)の細胞レベルの分布を評価した(補足図 6)。

LNP の標的化に関する AI ベースの細胞レベルの定量化

最適化された組織の透明化により、LNP 標的細胞の可視化が可能になるが、様々な条件下で全身の生体内分布を比較するためには、偏りのない信頼できる定量化が必要である²⁹。その結果、フィルターベースの Immaris ソフトウェアや深層学習ソリューションの DeepMACT³⁰などの既存の方法では、最適な結果が得られないことが判明した(F1 スコア 0.50 未満)。そこで我々は、マウス全体の様々な組織において数千万の標的細胞を確実に検出して定量化するための強固な深層学習パイプラインを開発した。

我々のアプローチでは、利用可能な計算資源によって課される典型的なメモリ制約の範囲内で、全身の画像データを個別のユニットに分割して深層学習解析を行う(図 2a および補足図 7)。我々は、以前にスライスベースのアプローチよりも優れていることが証明されたバーチャルリアリティ(VR)ベースの注釈法を用いて訓練データセットを作成した³¹。このデータセットには、LNP を筋肉内および静脈内注射した後に様々な組織(頭部、心臓、肺、腎臓、肝臓、リンパ節および脾臓)からランダムに選択された 31 個の 3 次元パッチ(200×200×200 ~ 300×300×300 ボクセル)が含まれていた。データを訓練/検証セットとテストセットに手動で分割して、関連する器官全体にわたるセグメンテーションモデルのパフォーマンスを追跡する。パフォーマンスはインスタンス F1 スコア(または Dice 係数)³⁰を用いて評価された。

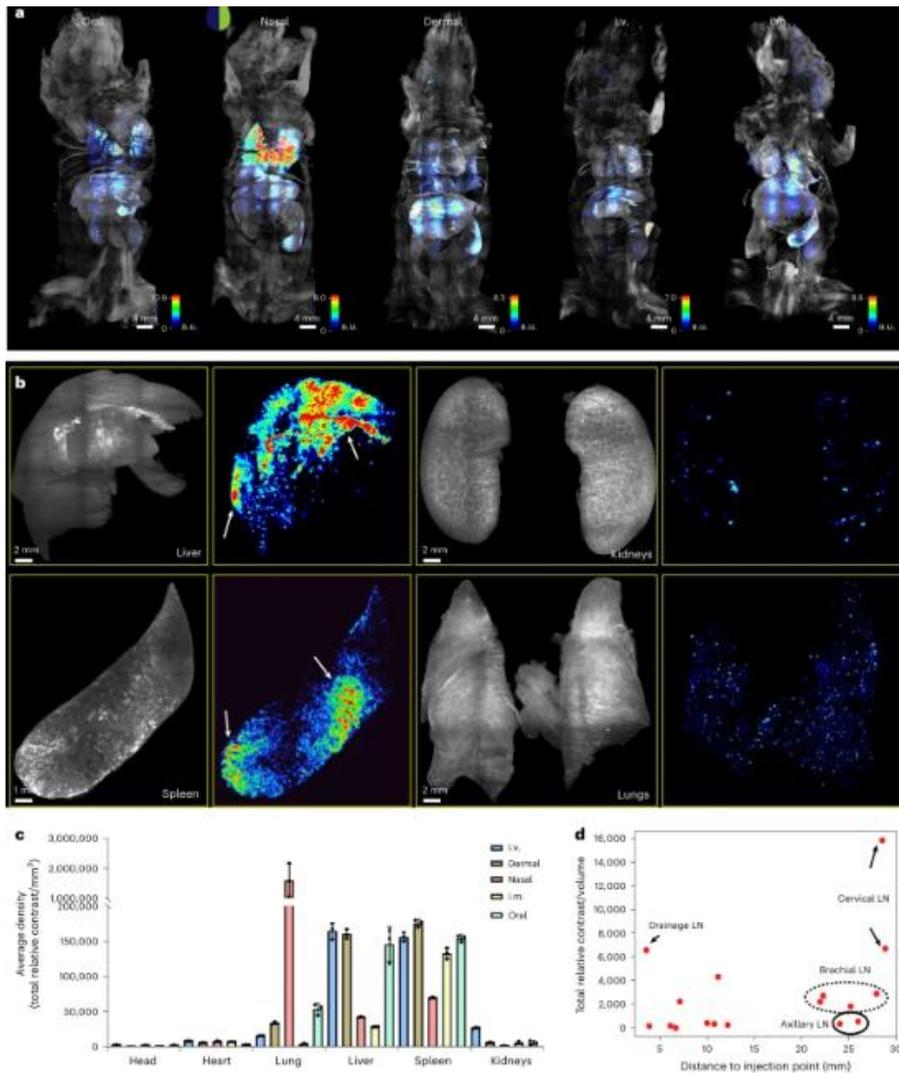
我々は、確立されたパラメータ選択、訓練プロトコルおよび 5 倍の相互検証を用いて、いくつかの深層学習モデル(VNet³²、U-Net++³³、Attention U-Net³⁴、UNETR³⁵、SwinUNETR³⁶、nnFormer³⁶ および 3D U-Net³⁷)を訓練した。筆者らが考案した最高性能のモデルは、6 つの符号化層と 5 つの復号化層からなる 3 次元 U-Net アーキテクチャを採用し、Leaky Rectified Linear Unit(ReLU)活性化関数を備えていた(図 2b)。SCP-Nano は独立した検査データセットで平均 0.7329 のインスタンス F1 スコアを達成し、臓器特異的スコアは 0.6857~0.7967 の範囲であった(図 2c,d)。セグメンテーション性能は注射経路の影響を受けなかった(補足図 8 および 9)。

本発明者らは、cc3d ライブラリー³⁶を用いて、各セグメント化された標的細胞/クラスターインスタンスを同定し、そのサイズおよびバックグラウンドに対する強度コントラストを計算した。これにより、臓器レベルの統計を計算したり、関心のある臓器や容積内のナノキャリア密度を視覚化したりすることが可能になった。このディープラーニングモデルは、洗練された DISCO イメージングとともに、マウス全身の臓器における LNP の標的化と生体内分布を臓器ごとに細胞レベルで定量化するための SCP-Nano パイプラインを構築した(図 2e, f および 補足図 10)。注目すべきことに、SCP-Nano はシグナル密度の高い領域においても個々の細胞を容易に同定することができた。このアルゴリズムは単一値の閾値処理に依存するのではなく、粒子の形状や周辺領域に対する輝度値などの因子に基づいて予測を行い、異なる強度のシグナルを正確に同定するからである(補足図 10)。

SCP-Nano により様々な経路を介した LNP の指向性が明らかになる

次に、SCP-Nano を用いて、異なる投与経路が LNP の生体内分布にどのように影響するかを検討した。蛍光標識された EGFP mRNA を有する LNP を 0.0005 mg/kg の用量で筋肉内、皮内、経口、静脈内および鼻腔内に送達し、注射 6 時間後に分析を行った(各群 n=3 匹)。質的な比較を容易にするために、我々はマウスの全身の投与密度マップを作成し、個々の臓器間および臓器内で投与効率にかなりの不均一性があることを観察した(図 3a)。注目すべきことに、SCP-Nano の解析により、肝臓や脾臓などの臓器内に従来の方法では識別が困難であったホットスポット(図 3b の白矢印)が局所的に明らかになった。

図 3:SCP-Nano により,投与経路の違いによる LNP の生体内分布の違いを明らかにする。



a:様々な投与経路(0.0005 mg kg⁻¹各1回)で投与したLNP運搬mRNAの分布を示した濃度ヒートマップ。b:生の投影画像(左)と選択した臓器の濃度ヒートマップ。矢印は臓器内運搬ホットスポットを示す。c:SCP-Nano 深層学習アルゴリズムを用いた、様々な投与経路における主要臓器への mRNA 運搬イベントの器官レベルでの定量(各群 n=3、平均±標準偏差)。d:筋肉内投与したマウスのリンパ節への mRNA 運搬イベントの定量。i.m.:筋肉内、i.v.:静脈内、LN:リンパ節。

SCP-Nano は、投与経路に基づいた臓器内の明確な分布パターンに関する定量的データをもたらした(図 3c)。鼻腔内投与では、主に肺内で最も多くの mRNA が滞留した。対照的に、予想されたように、他のほとんどの投与経路は主に肝臓と脾臓を標的とした(図 3a-c)。

投与経路の違いにより、投与目的が異なることが推察される。経鼻投与は主に呼吸器組織、特に肺を標的とする。静脈内投与と経皮投与は主に肝臓と脾臓を標的とするが、筋肉内投与では肝臓への標的化が相対的に減少し、脾臓への標的化が増加することが明らかになった。このことから、免疫器官を標的とする場合に肝臓を避けるためには、この経路が有益である可能性が示唆される(図 3a,c)。

mRNA ワクチンの送達に LNP が広く使用されていることを考慮して、われわれは LNP が筋肉内(後肢)注射後に mRNA を様々なリンパ節に輸送する作用を検討した(図 3d、補足図 11 および補足表 1)。LNP により送達された mRNA は分析した全てのリンパ節で検出され、注射部位からの距離と mRNA レベルとの間に明確な相関は認められなかった。注目すべきことに、直接流入領域のリンパ節と、さらに重要なことに、頸部近くの頸部リンパ節は、他のリンパ節よりも著しく高用量の mRNA を受け入れていた。この観察結果から、LNP がリンパ節での免疫応答を促進し、それによってワクチンの有効性を高める可能性が強調される。

LNP データに基づいて訓練された深層学習モデルでは、再訓練を行わずにリポソームとポリプレックスの分布をセグメント化および定量化することもできた(補足図 12a、b)。

全体として、これらの知見は、臓器間および臓器内におけるナノキャリアの生物分布の複雑さを強調するものであり、分布パターンを完全に理解するためには細胞レベルの解析が必要であることを強調している。

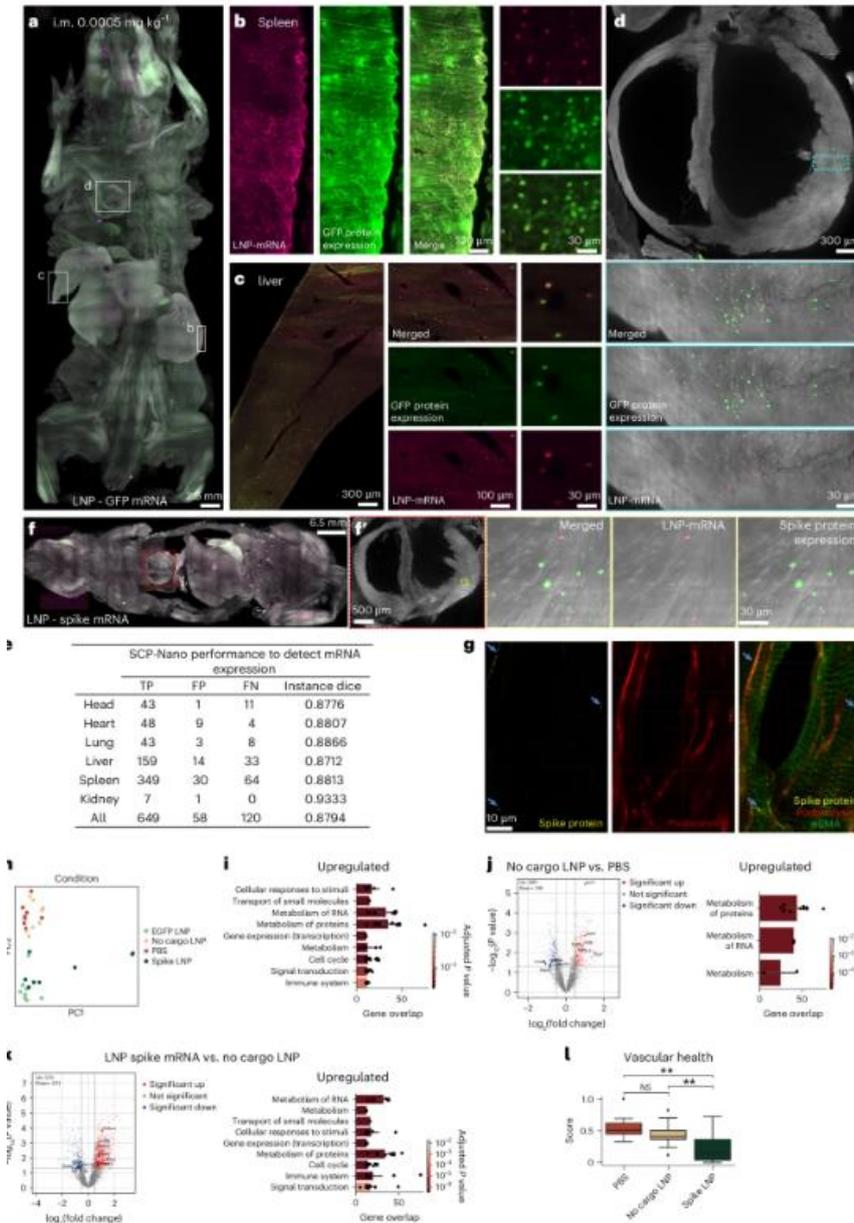
SCP-Nano がオフターゲット効果の可能性を明らかにする

LNP が標的とする細胞を可視化した後、LNP が送達する mRNA を活発に発現する細胞を同定することを目的とした。以前の研究では、全ての LNP 標的細胞が自身の RNA カージを翻訳するわけではないことが示されていた³⁸。LNP を標的とする細胞と封入された mRNA を発現する細胞の両方を同時に同定できるようにするために、最適化された DISCO クリアリングプロトコルにおいて、Alexa で標識した EGFP mRNA(LNP 標的化の画像化のため)と EGFP タンパク質に対するナノボディ(mRNA 翻訳の可視化のため)を使用した。

10

低用量(0.0005 mg/kg;図 4a-d)と高用量(0.5 mg/kg;補足図 12c-f)の両方を用いて、EGFP mRNA を含む LNP を筋肉内注射してから 72 時間後に、SCP-Nano を用いてマウス全身の EGFP 発現細胞を可視化した。EGFP 発現は両方の用量で検出可能であったが、Alexa-mRNA シグナルの大部分は 72 時間後に RNA 分解のために失われた。我々は、EGFP 発現を定量化するために注射付き EGFP データセット(方法)を用いて訓練することによって SCP-Nano アルゴリズムを改良し、全臓器で平均 0.81 の F1 スコアを達成した(図 4e)。

図 4:SCP-Nano により,LNP が送達した mRNA からのタンパク質発現と LNP のオフターゲット化が明らかになる。



a.0.0005 mg kg⁻¹ EGFP mRNA-LNP を筋肉内投与した 72 時間後の mRNA 及び EGFP タンパク質発現の全身投影図 b-d:脾臓(b)、肝臓(c)及び心臓(d)の詳細図 e:タンパク質発現を検出するための SCP-Nano segmentation model(EGFP データを微調整)の定量的評価(FN:偽陰性、FP:偽陽性、TP:真陽性、手動注釈との比較)f.投与 72 時間後に筋肉内投与した LNP 送達 mRNA 由来の SARS-CoV-2 スパイク S1 タンパク質の全身分布(f)。スパイクタンパク質は心臓で検出された(f')。g:ボドカリキシン抗体を用いて毛細血管内皮細胞を染色した心臓組織切片の共焦点画像(赤)、α SMA 抗体を用いて動脈を染色した共焦点画像(緑)、スパイクナノボディを用いてスパイク S1 タンパク質を染色した共焦点画像(黄)。h:スパイク LNP、EGFP LNP、無カーゴ LNP 及び PBS の異なるグループの質量分析に基づくプロテオミクスデータの PCA。i:無カーゴ LNP/PBS と無カーゴ LNP 及び EGFP LNP の複合グループとの間で差別的に発現した Reactome データベースのトップレベル経路(n=9、平均±s.d.;一元配置分散分析)。j,k:無カーゴ LNP で PBS(j)と比較して、またスパイク mRNA で無カーゴ LNP(k)と比較してアップレギュレートされたタンパク質について同様の解析(n=9、平均±s.d.;一元配置分散分析)。l:3 つの異なるグループの典型的なタンパク質マーカーを用いた血管健康状態の解析(補足表 3)。NS P>0.05,**P<0.01(n=9;一元配置分散分析)。i.m.:筋肉内、PC:主成分、NS:有意ではない。

我々のパイプラインの感度により、標的から外れた可能性のある組織における低強度のシグナルを検出することができる。ここでは、例えば、マウスの心臓において、まばらではあるが異なる LNP の標的化と EGFP mRNA の発現を観察した(図 4d および補足動画 2)。MC 3 ベースの LNP がマウス、非ヒト霊長類およびヒトにおける RNA 療法および薬剤開発に使用されていること^{23,38,39,40,41},ならびに別の LNP 製剤を用いたワクチン接種後に心合併症が発生したとの報告があること^{42,43,44,45,46}を考慮して、心臓における LNP 誘導性の mRNA 発現の潜在的影響をさらに検討した。

この目的のために、SARS-CoV-2 スパイク mRNA を含む MC 3 ベースの LNP をマウスに筋肉内注射し(2.4 μ g、約 0.1 mg kg⁻¹)、72 時間後に灌流し、DISCO で除去してスパイクタンパク質⁴⁷に対してナノボディで染色した。この高用量は、0.0005 mg/kg と比較して、ヒトからマウスへの用量変換のための体表面積標準化法(アロメトリスケール)⁵⁰に基づき、マウスを用いた信頼性の高いワクチンの免疫原性及び有効性試験で推奨される用量の範囲内であることから選択された^(48,49)。SCP-Nano 解析では、筋肉内注射後に LNP が mRNA を心臓に輸送する際のオフターゲット(off-targeting)が確認され、スパイクタンパク質シグナルの主要な発生源として注射部位から心臓へのスパイクタンパク質の輸送が除外された(図 4f および補足動画 3)。免疫細胞マーカーである CD45 と LNP を導入した mRNA から発現する SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を染色することにより、LNP が標的とする細胞型を全身レベルで解析した。LNP-mRNA 由来のスパイクタンパク質は、全身の免疫細胞と非免疫細胞の両方で認められた(補足図 13)。

心臓組織においてスパイク mRNA-LNP の標的となる特定の細胞を同定するために、これらの領域について免疫組織学を実施した(SCP-Nano で同定された領域は、さらなる分子探索のためにマウスの全身から分離された;詳細については「方法」の項を参照)。われわれは、スパイクタンパク質が心臓の心筋細胞(トロポニン T; 補足図 14a)、免疫細胞(CD45;補足図 14a)または動脈(α 平滑筋アクチン[α SMA];図 4g および補足図 14b)と共局在しないことを発見した。その代わりに、スパイクタンパク質が主に心臓毛細血管の内皮細胞内に存在することを発見した(ポドカリキシン;図 4g 及び補足図 14b)。

オフターゲット組織における mRNA 発現によって誘導される可能性のある分子変化を検討するために、SCP-Nano で同定された心臓領域 51 に対して質量分析法に基づくプロテオミクスを実施した。各群 3 匹のマウスの右、中央、左心領域から検体を採取し、PBS(対照)、無カーゴ LNP,EGFP mRNA を含む LNP,スパイク mRNA を注射した LNP からそれぞれ 8 個以上の検体を採取した。我々は 4,161 のタンパク質を同定し、そのうち 2,828 のタンパク質を下流の解析(方法)に用いた。主成分分析(PCA)により、mRNA 発現のある群とない群の間に明確な分離が示された(no-cargo LNP/PBS 対 spike LNP/EGFP LNP)(図 4h)。Reactome のデータベース(Methods)を用いた経路解析により、特に mRNA 発現群では(積み荷なしの LNP+PBS 併用群と比較して)細胞代謝、シグナル伝達および免疫系に関連する変化が明らかになった(図 4i、補足図 14c および補足データ 1)。

次に、LNP 単独で誘導されたプロテオーム変化を検討した(無カーゴ LNP vs PBS)。われわれは、375 の差次的発現タンパク質(DEP)を同定した(PBS と比較してノーカーゴ LNP では 240 がアップレギュレートされ、135 がダウンレギュレートされた)(図 4j および補足データ 2)。これらの変化はリボソーム活性、翻訳、RNA 代

謝などの代謝過程と関連しており(Reactome database analysis;Methods),Rpl11,Rpl15,Eif4b,Rps6,Rps2,Eif2b3 などのマーカーが異なった調節を受けていた。

次に、スパイク mRNA の発現によって特異的に引き起こされるプロテオームの変化を解析したところ、カーゴを含まない LNP サンプルと比較して、LNP スパイク mRNA では 578 のタンパク質がアップレギュレートされ、201 のタンパク質がダウンレギュレートされていることが判明した(図 4k および補足データ 3)。その結果、非カーゴ LNP サンプル(図 4k)でみられた変化に加えて、代謝に関連するタンパク質の発現と RNA およびタンパク質の発現に顕著な変化が認められた。また、個々の DEP レベルでの免疫反応シグナルの増加も観察された(図 4k)。注目すべきことに、血管の形成と維持に関連するタンパク質に変化が認められた(個別に発現するマーカー: Cd34 とコラーゲンファミリーのいくつかのメンバー; 図 4l と補足表 2 の血管機能スコア)。EGFP mRNA の発現はまた、非カーゴ LNP と比較して、心臓において顕著なプロテオーム変化(581 のアップレギュレートされたタンパク質と 424 のダウンレギュレートされたタンパク質)を引き起こし、主に代謝応答と細胞応答に関連していた(補足図 14d および補足データ 4)。このことから、LNP を介した分子標的薬の送達については、スパイク mRNA だけでなく、あらゆる mRNA の送達および発現も慎重に評価すべきであることが示唆される。心臓へのオフターゲットとそれに伴うプロテオーム変化が MC 3 ベースの LNP に特異的なものであるのか、それとも現代の LNP のより一般的な現象であるのかを評価するために、イオン性脂質 SM-102(Moderna 社の SARS-CoV-2 ワクチンで使用されている)と Lung SORT LNP^{38,52,53} を用いて LNP の体内分布も評価した。MC 3-LNP と同様に、心臓にも少数ではあるが明確な数の両方の LNP が認められた(補足図 15a)。LNP(無カーゴ LNP, EGFP mRNA および SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 mRNA を含む LNP)と PBS 対照のそれぞれについて 8 つ以上の試料を再度分離し、質量分析法を用いてプロテオームを解析した(補足図 15b-d)。PCA プロットでは、LNP 試料は再び PBS 対照から分離され、空の LNP は対照に最も近かった(補足図 15b)。MC 3 ベースの LNP を用いた我々の観察と同様に、血管構造に関連するタンパク質は最も調節不全の遺伝子の 1 つであり、その中には血管構造の維持に参与するいくつかのタンパク質も含まれていたが、それらは強くダウンレギュレートされていた(個々のタンパク質を補足図 15d に示す)。

心臓組織で観察された LNP の蓄積とプロテオームの変化は、LNP ベースの mRNA ワクチンが報告された心合併症^{42,43,44,45,46}に寄与する可能性のある機序を示唆している。しかし、ここで使用されている厳密な LNP 製剤および潜在的にスパイク mRNA は、承認された mRNA ワクチンのものとは異なる可能性があるため、さらなる研究が必要である。したがって、我々が特定した潜在的な原因となる機序については、今後の研究でさらに検討する必要がある。

異なる製剤間で心臓を標的とする共通の機序を調べるために、次に各 LNP タイプ(MC3, Lung SORT, SM-102 および ALC-0315)の蛋白コロナを調べた。LNP 表面に結合するタンパク質が特定の細胞型を標的とする上で重要であることが、LNP 製剤の SORT シリーズ^{54,55,56,57,58}で示された。質量分析プロテオミクスを用いて、われわれはビトロネクチンなどのタンパク質の存在を観察した。このタンパク質は内皮細胞に付着することができ、それによって心臓細胞への LNP の標的化を促進する(補足図 15e)^{59,60}。(1)全ての LNP コロナに強

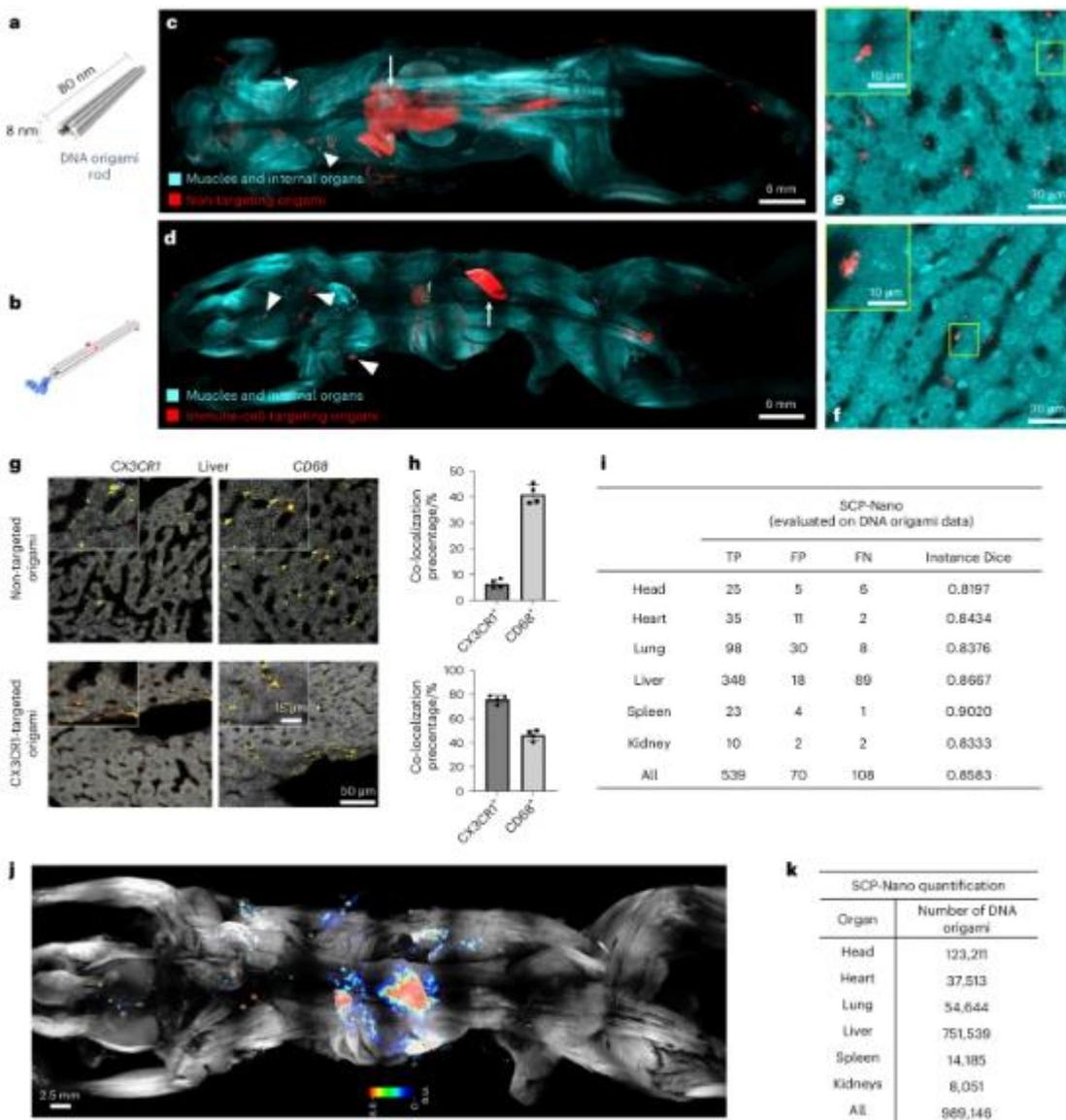
く濃縮されたタンパク質;(2)LNP 上のレベルが心臓の LNP+細胞の数と統計的に有意な正の相関を示したタンパク質($R>0.5$);(3)心臓に発現する既知の結合パートナーを有していたタンパク質(UniProt 社の StringDB またはマニュアルキュレーション)をフィルタリングしたところ、心臓⁶²に強く発現するエラスチン⁶¹の既知の結合因子であるフィコリン 1(Fcn1)が、心臓における LNP 蓄積のさらなる潜在的メディエーターとして同定された(補足図 15e)。

異なる種類の細胞を標的とする DNA 折り紙の可視化

SCP-Nano の広範な適用性を実証するために、次に DNA 折り紙ナノ粒子について検討した。この方法は、将来の臨床応用のために現在開発中である。DNA 折り紙^{2,4,12,13}のプログラム可能な自己組織化により、多様な用途のためのナノ粒子の設計が可能になる^{3,13,14,15}。DNA 折り紙は、生体適合性、形状およびサイズの正確な制御、環境からの手がかりに対する応答性、ならびに所定の位置^{63,64,65}で構造を機能化する能力を提供する。この多様性により、ワクチン¹⁶、抗ウイルス薬^{17,18}、刺激応答性治療薬^{19,20}について革新的な概念が生まれている。

基本構造として長さ 80 nm、直径 8 nm の DNA ナノロッドを作製した(図 5a および補足図 16)。この非結合 DNA 折り紙は最小限の免疫応答を誘導し(補足図 17)、標的化送達に適した循環時間を示した(補足図 17g)。動的光散乱(DLS)と蛍光相関分光法(FCS)による解析から、折り紙を血清中でインキュベートすると、タンパク質のコロナに覆われた安定な単分散ナノ粒子が形成されることが示された(補足図 18)。このナノロッドを標的免疫細胞に対する CX3CR1 抗体と結合させ(図 5b)、これらの構造体を 50.725 mg/kg の用量で静脈内投与した。折り紙構造の血中半減期は一般的に数分であることから、注射の 20 分後にマウスを安楽死させて異物を除去し、画像検査を行った¹⁷。LNP と同様に、SCP-Nano によってマウス全身の様々な DNA 折り紙構成体の単一細胞解像度の画像化が可能になった(図 5c-f および補足動画 4)。

図 5:SCP-Nano による DNA 折り紙の標的デリバリー



a-f: Cell-level resolution biodistribution of non-targeted and CX3CR1 antibody immune-cell targeted origami (左図) マウス全身 (c, d) および肝臓の詳細図 (e, f; single-cell resolution の例) に 50.725 mg/kg を静脈内投与して 20 分後の DNA origami 1 本。g: 免疫細胞と非標的細胞の origami の組織内分布 (赤) および標的細胞マーカー CX3CR1 (左, 黄) と一般免疫細胞マーカー CD68 (右, 黄) との各肝スライスの共焦点像における共染色。h: 非標的細胞と CX3CR1 標的細胞の origami と CX3CR1+ および CD68+ 細胞の共局在の定量化 (n=3, 平均±s.d.)。i: SCP-Nano アルゴリズムによる DNA origami 検出の予測精度。j: 免疫細胞を標的とした origami のマウス全身分布の密度マップ。k: SCP-Nano-based quantification of CX3CR1 immune-cell targeted origami in different organ.

われわれは、マウス全体の画像化後に組織学的手法を用いて、抗体を結合させた DNA 折り紙の特異的標的化を検証した。肝組織を CD68 (リソソーム/後期エンドソームマーカー標識クッパー細胞) または CX3CR1 (単核食細胞マーカー) 抗体で共染色した (図 5g, h)。非抱合型 DNA 折り紙は主に CD68 と共同在し、肝臓の受動的クリアランスを示唆したが、抗 CX3CR1 DNA 折り紙は CX3CR1+ 免疫細胞を標的にすることに成功した (図 5g, h)。

次に、DNA 折り紙データセットを用いて、SCP-Nano ディープラーニングパイプラインのパフォーマンスを評価した。13 個の 3 次元パッチ(頭部、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)のテストデータセットに手動で注釈を付け、LNP が訓練したアルゴリズムの評価に使用した。SCP-Nano は平均 F1 スコア 0.8583 を達成し(図 5i)、大規模な再訓練を行うことなく他のナノキャリアを検出し定量化できることを実証した。我々は、背景上の各分節インスタンスの強度コントラストを合計することによって、折り紙の生体内分布を定量化した。この解析により、肝臓が非抱合型 DNA 折り紙の主要な標的器官であることが確認された(図 5j,k)。

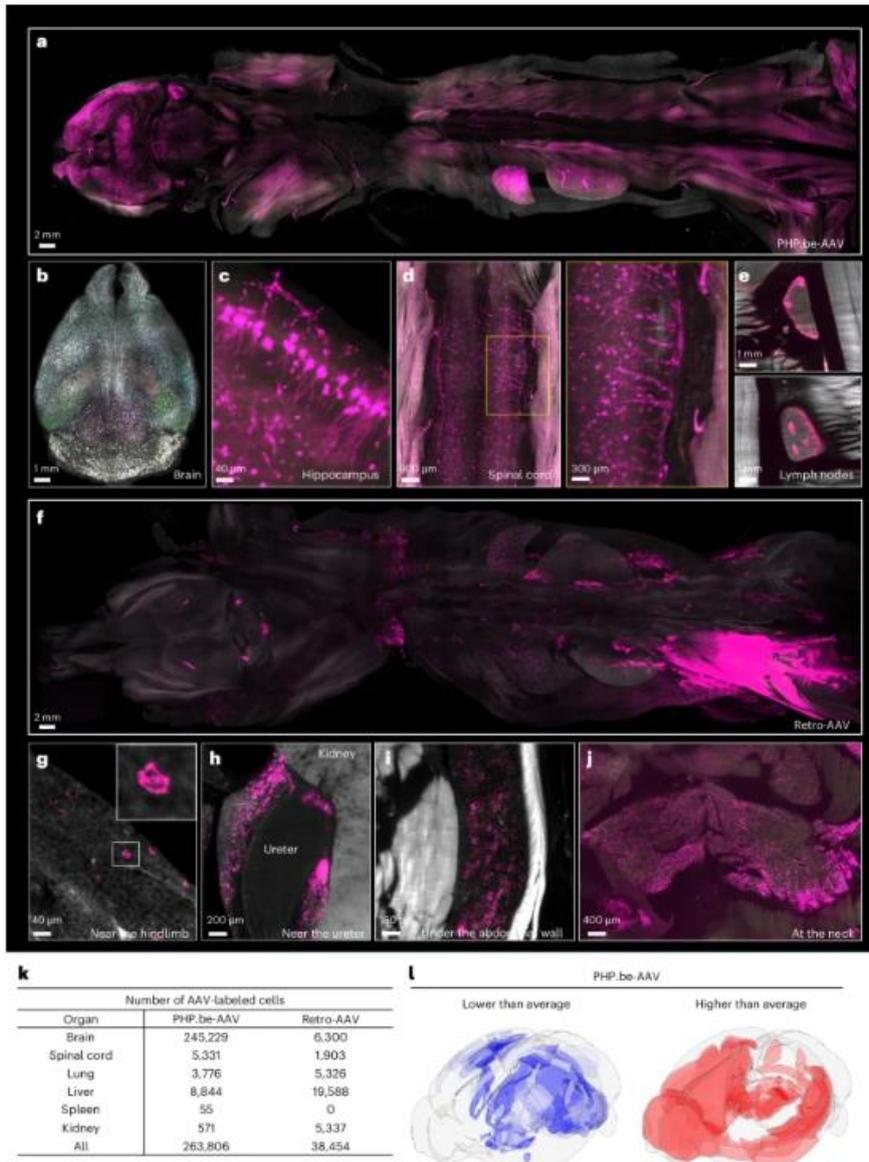
抗体を結合させた DNA 折り紙による細胞特異的な標的化の可視化と確認が成功したことは、精密ナノ医療における SCP-Nano の価値を強調するものである。この能力は、DNA 折り紙を用いた将来の治療法の有効性と安全性を最適化する上で極めて重要である。

AAV 分布の可視化と定量化

AAA は遺伝子治療用ナノキャリアとして期待されている⁶⁶。しかし、その有効性と安全性を最適化するには、その標的化について細胞レベルでの正確な理解が必要である。われわれは SCP-Nano を用いて、2 つの AAV 変異体の標的プロファイルを調べた:(1)ニューロン⁶⁷で逆行輸送するように設計された Retro-AAV(AAV2 変異体)と、(2)中枢神経系伝達のために血液脳関門を通過するように設計された PHP.eB-AAV(AAV9 変異体)である^{68,69}。EGFP をコードする AAA を^{69,70,71,72}年に注射し(Retro-AAV:筋肉内;PHP.eB-AAV:静脈内)、2 週間後にマウスを灌流して SCP-Nano による全身分析を行った。

以前の報告⁶⁹と一致して、PHP.eB-AAV-EGFP は主に脳と脊髄を標的とし(図 6a-d,補足図 19 および補足ビデオ 5)、標的細胞の大きさが多様であることから明らかなように(図 6c)、様々なニューロン集団に遺伝子導入を行った。特に、鼠径リンパ節と腰部リンパ節にも強いシグナルが認められたが、この所見は以前には報告されていなかった(図 6e)。

図 6:SCP-Nano は 2 種類の AAV の標的特異性を定量化する。



a-e, PHP-be-AAV による遺伝子導入後に発現した EGFP の注射 2 週間後の全身分布。全身像(a)と小領域。脳(b, PHP-be-AAV で標識した PHP-be 体の濃度マップ)、海馬(c)、脊髄(d)、鼠径リンパ節(e)などの様々な領域における EGFP の分布。f-j, Retro-AAVs による遺伝子導入後の EGFP の注射 2 週間後の全身分布: 全身像(f)と小領域。後肢付近の脂肪(g)、尿管に近い脂肪(h)、腹壁下(i)、頸部(j)などの小領域。k, SCP-PHP-be-AAV と Retro-AAV 由来の EGFP で標識した細胞数を高精度でナノ定量。l, PHP-be-AAV ベースの遺伝子導入における脳内差。青は平均より低い EFP+細胞密度を示し、赤は平均より高い EFP+細胞密度を示す。カラースケールは全脳平均に対する log₂ 変換した細胞密度を表し、Allen Brain Atlas の参考文献である Atlas with BrainRender を用いて DELiVR31 を用いてプロットしたものである。カラーコーディングは Allen Brain Atlas の CCF3 領域に従っている。

Retro-AAV は、予想されたように、様々な組織における軸索様伸長の標識を伴うニューロン標的化(補足図 20)を示した^{67,73}。しかし、我々は全身の脂肪組織を標的とする顕著な Retro-AAV-EGFP も同定した(図 6f-j および補足動画 6)。

Retro-AAV が脂肪組織を標的とする機序についてさらなる洞察を得るため、まずウイルスの標的細胞型を同定した。Retro-AAV を注射したマウスの褐色脂肪の組織スライスを標準的な脂肪滴マーカであるペリリピン-1 で染色したところ、Retro-AAV のシグナルのほとんどが脂肪細胞内に含まれていることが示された(補足図 21a)。さらに、マウス脂肪細胞の *in vitro* 培養において、脂肪細胞を標的とする Retro-AAV の能力を確認した(補足図 21b,c)。

脂肪細胞における細胞受容体を同定するために、著者らは、AAVR,膜関連ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG), $\alpha V\beta 5$ インテグリンおよび線維芽細胞増殖因子受容体 1(FGFR1)^{74,75,76,77,78} を含む Retro-AAV の親 AAV サブタイプである AAV2 の既報の受容体および共受容体を、*in vitro* で分化させた脂肪細胞をポリクローナル抗体とプレインキュベーションすることにより阻害した(補足図 21d)。AAVR を阻害すると、*in vitro* でウイルス感染が 85.7%減少したことから、AAVR は脂肪細胞における Retro-AAV の一次細胞侵入受容体の候補となりうる。その他のタンパク質を阻害した場合には、ウイルス取り込み率の低下は大幅に低下したが、依然として顕著であり、以前に示唆されたように^{73,79}、これらのタンパク質も感染過程で役割を果たしていることが示唆された。

定量的な分析を容易にするために、我々は小規模なデータセット(16 パッチ)に注釈を付け、パイプラインを再トレーニングし、平均インスタンス F1 スコア 0.8019 を達成した(補足表 3)。SCP-Nano 解析により、PHP.eB-AAV による脳細胞への標的化は Retro-AAV の約 40 倍であることが明らかにされた(図 6k)。我々はさらに、PHP.eB-AAV による様々な脳領域 31 への標的化に著しい不均一性があることを発見した(図 6l)。

これらの結果は、SCP-Nano がマウスの全身にわたって AAVs の細胞標的を明らかにする能力があることを強調している。このアプローチは、AAV のデザインを最適化し、オフターゲット効果を最小限に抑えながら目的細胞への送達を最大化する上で極めて重要である。

討論

SCP-Nano は、先進的なディープラーニングパイプラインを用いて、マウス全身の画像データにおける単一細胞レベルでのナノキャリアの標的化を定量化する。数千万の標的細胞を検出するには、たとえ人口が密集した地域であっても、形状、大きさ、明るさなどの複数のパラメータに基づいて細胞を分割する高度なアルゴリズムが必要である。これらのアルゴリズムを質の高い 3 次元データに基づいて訓練することで、非常に正確な細胞同定を達成することができ、これは ground truth の比較から得られた F1 スコアによって検証されている。これにより SCP-Nano は極めて低い線量範囲(約 0.0005 mg/kg)で生体内分布解析を行うことができ、約 1-2 μm の横分解能と 6 μm の軸方向分解能を備えた全身画像において低強度のオフターゲット部位を確実に検出することができる。

代替の高分解能生体内分布評価は、臓器/組織の解剖とそれに続く選択された切片の顕微鏡検査に依存しており^{15,17,18}、サンプリングバイアスと薬物標的化の完全な全身空間情報の欠如をもたらす。SCP-Nano の全身分析は、これらの限界を克服し、臓器内投与異型遺伝子性や細胞種指向性などの情報を含む、ナノキャリア

分布の包括的で偏りのない全体像を提供する(図 3 および補足図 14)。ここでは、SCP-Nano が質量分析法を用いたプロテオミクスや免疫蛍光法などの分子生物学的手法と組み合わせることができることを示すとともに、空間トランスクリプトミクスやプロテオミクスイメージングなどの他の手法とも互換性があることを期待する。

筆者らは、SCP-Nano を臨床的に意義のある新たな薬物送達方法、特に LNP、リポソーム、ポリプレックス、AV および DNA 折り紙などの広範な方法に適用することに成功し、筆者らの AI ベースの定量化パイプラインが、以前に発表された方法やモデル構造よりも大幅に優れていることを実証した(図 2c)。新たなナノキャリアの深層学習定量化モデルを再訓練するために必要とされたのは、わずかな新しいデータのアノテーションだけであった。広範な導入を促進するために、すべてのアルゴリズムと再訓練プロトコルを公開している。

SCP-Nano がわずかなオフターゲットであっても明らかにし、イメージングと空間プロテオミクス解析を組み合わせることで分子レベルでの影響を評価できることは、臨床への応用に直接的な意味をもつ。LNP スパイク mRNA の送達後に心臓組織における免疫タンパク質および血管タンパク質の発現に変化がみられたという我々の知見は、mRNA ワクチンを接種された患者の一部で心筋炎および心膜炎が発生したという報告と一致している^{21,44,45,46,80,81}。しかし、同様の作用がヒトでもみられるかどうかを明らかにし、マウスで観察されたこれらの分子変化が報告されている臨床症状と因果関係があるかどうかを明らかにするには、さらなる研究が必要である。我々はまた、承認された Good Manufacturing Practice(GMP)施設で製造された LNP-mRNA ワクチンとは異なる、研究所で製造された LNP および mRNA スパイク製剤を使用した(補足図 22 ならびに補足データ 3 および 5)。それにもかかわらず、これらの結果は、動物の体全体にわたって細胞レベルの感受性を有する LNP ベースの治療薬の体内分布およびオフターゲット効果を調査する必要性を強調している。このアプローチは、標的化の精度を高め、オフターゲット活性とその影響を明らかにすることによって毒性リスクアセスメントを支援する。注目すべきことに、SCP-Nano は最低用量であってもオフターゲットを同定し(図 4d)、リスクの層別化に役立ち、必要に応じて代替のワクチン製剤や治療法の選択に情報を提供した。

SCP-Nano は、AAV の標的細胞を可視化する際に極めて高い感度を示したが、これは AAV ベースの治療法、特に遺伝子治療を最適化する上で極めて重要な要素である。注目すべきことに、我々は筋肉内注射後に脂肪組織を標的とする全身の Retro-AAV を同定した。この研究により、脂肪組織が Retro-AAV を介した遺伝子導入の重要な標的であることが明らかになり、肥満に関連する健康上の合併症を治療するための選択肢が提供される。

SCP-Nano にはかなりの利点があるが、さらなる限界を認識することが不可欠である。クリアリング、イメージング、ディープラーニングの分析は複雑になる可能性があります。詳細なチュートリアルを提供し、コードとプロトコルをオープンソースにすることで(手法と「コードの可用性」)、この問題を軽減している。さらに、SCP-Nano では、PET や生物発光イメージングなどの生きた動物を用いた方法で得られる動的かつ長期的な情報を得ることができない。このように、SCP-Nano は固定した動物を用いたエンドポイント解析であるため、典型的な薬理学的パラメータを直接測定することは困難であろう。しかし、生きた動物の画像化法を SCP-Nano と組み合わせることで、前臨床モデルにおけるナノキャリアの最も包括的な特徴づけのための補完的な情報が得

られる。最後に、蛍光色素では容易に標識できないナノキャリアや治療薬には、別の標識アプローチが必要となる場合がある。

結論として、SCP-Nano によって、マウスの全身にわたる細胞レベルでのナノメディシンの分布と効果を定量的、包括的、かつ偏りなく評価することが可能になる。他のモデル生物やヒト試料への応用が期待されており、安全で正確なナノキャリアを用いた治療薬の開発を加速する道を開いている。

方法

材料

DLin-MC3-DMA(555308)は MedKoo バイオサイエンス社から購入した。DSPC(850365P)、コレステロール(C8667)および DMG-PEG-2000(880151P)は Sigma-Aldrich から入手した。Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits(PURD35030,WMCO,3.5 kDa)を Sigma-Aldrich から購入した。In vitro translation(IVT)法により作製された EGFP mRNA、スパイクタンパク質 mRNA、Alexa Fluor 647 標識及び Alexa Fluor 750 標識 EGFP mRNA、並びに FLuc mRNA を RiboPro 薬品工業株式会社から購入した。Alexa Fluor 568 結合抗 GFP シグナル増強ナノボディ(gb2AF568-50)および Alexa Fluor 647 結合抗 GFP シグナル増強ナノボディ(gb2AF647)を ChromoTek 社から購入した。ヨウ化プロピジウムは Sigma-Aldrich(P4864)から入手した。VivoGlo ルシフェリンは Promega から入手した。我々は以下の AAV 構成体を用いた:Retro-AAV:(retro AAV-CAG-GFP,Addgene,37825-AAVrg;力価 $\geq 7 \times 10^{12}$ vg/ml;1×PBS で 1:10 希釈)および PHP.eB-AAV:(PHP.eB-CAG-GFP,Addgene,37825-PHPeB;力価 $\geq 7 \times 10^{13}$ vg/ml;1×PBS で 1:10 希釈)。

20

動物

混合性別 C57BL/6 マウスは Charles River Laboratories から入手した。動物は 12 時間の明/暗サイクルで飼育され、餌と水は任意に与えられた。温度は 18-23°C に、湿度は 40-60% に維持された。動物実験はミュンヘン大学(Klinikum der Universität München/Ludwig Maximilian University of Munich)の施設ガイドラインに従って、Government of Upper Bavaria(Regierung von Oberbayern,Munich,Germany)の倫理審査委員会(Ethical Review Board of the Government of Upper Bavaria)の承認を得た上で、動物研究に関する欧州指令 2010/63/EU に基づいて実施された。全ての実験は 3 回実施した。

LNP 製剤

MC 3 ベースの LNP はエタノール希釈法を用いて調製された。特定のモル比(Dlin-MC 3-DMA/DSPC/コレステロール/PEG-DMG のモル比を 50:10:38.5:1.5 とする)を有する全ての脂質を無水エタノール(99.8%未満)に溶解し、mRNA を 10 mM クエン酸緩衝液(pH 4.0)に溶解した。これら 2 つの溶液を水対エタノールの容積比 3:1 で混合し、最終的な重量比(mRNA/総脂質)を 1:10 とした後、室温で 10 分間インキュベートした。最終的な LNP 製剤を PBS に対して 2 時間透析し(Pur-A-Lyzer Midi Dialysis Kits,分子量カットオフ(MWCO)3.5 kDa),エタノールを除去して pH を中和した。Alexa Fluor 647 で標識された EGFP mRNA LNP については、20%の非標識 UTP を Alexa Fluor 647 で標識された UTP82,83 に

置き換えた。LNP の水力学的直径およびゼータ電位を、Malvern Zetasizer 内の使い捨てキュベットを用いて DLS により測定した。封入効果は Quanti-iT RiboGreen RNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Q33140)84 を用いて検討された。

その他の LNP 製剤について:

- 肺 SORT(モル比): コレステロール(19.3), DSPC(5), PEG-DMG(0.8), MC3(25), DOTAP(50) (総脂質/mRNA=40/1, wt/wt)
- SM-102 LNP 製剤(モル比): コレステロール(38.5), DSPC(10), PEG-DMG(1.5), SM-102(50) (総脂質/mRNA=10/1, wt/wt)
- ALC-0315 LNP 製剤(モル比): コレステロール(38.5), DSPC(10), PEG-DMG(1.5), ALC-0315(50) (総脂質/mRNA=10/1, wt/wt)

DNA 折り紙の作製

バイオテクノロジーにより作製されたナノロッドは、前述の方法に従って調製された 85。簡単に言うと、ナノオブジェクトのためのステーブルストランドは、自己切除 DNAzyme カセットによってインターリーブされた偽遺伝子として配置される。偽遺伝子は、ナノオブジェクトの足場となる鎖であるファージミドのバックボーンにクローニングされる。完全にクローン化されたファージミドを形質転換により大腸菌 JM109 細胞に導入した。ヘルパーファージレスキューを用いて、ファージミド一本鎖 DNA を含むファージ粒子を撹はん槽型バイオリアクターで産生させ、続いてファージおよび DNA を精製して純粋な環状 ssDNA を得る。In vivo 実験の前提条件として、ssDNA は Hahn ら⁸⁶が Triton X-114 を用いて記載した方法に従ってエンドトキシン精製されたものである。亜鉛陽イオンを加えることによって、自己切除する DNAzyme が活性化され、ナノロッドのための足場とステーブル鎖を生じる。エタノールでさらに DNA を精製した後、5 mM Tris, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ を含む緩衝液中で、DNA 濃度 50 nM でナノロッドを組み立てた(65°Cで 15 分間、その後 1°Cにつき 1 時間で 60-45°C)。最適化された DISCO クリアリングプロトコルのために蛍光標識された DNA ナノオブジェクトを構築するために、Integrated DNA Technologies 社または Biomers 社から Atto 550 または Atto 647N 修飾の化学合成された一本鎖のステーブルストランドを購入した。折りたたみ反応は 100 μL または 2 mL の反応液に UV 架橋剤を添加して 5 分間行う⁸⁷。

IgG ssDNA コンジュゲートの調製

3'チオール修飾されたオリゴヌクレオチドは、Biomers 社から購入した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製・乾燥したものである。このオリゴを 5 mM TCEP とともに PBS(pH 7.2)に溶解し、室温で 1 時間インキュベートした。3 回のフィルター精製(10k Amicon Ultra 0-5 ml 遠心フィルター)の後、10 nmol の還元されたチオールオリゴを 10 当量の Sulfo-SMCC(スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキササン 1-カルボキシラート)と混合した。Thermo Fisher Scientific, ddH₂O に溶解し、15 分間。PBS(pH 8)への緩衝液交換を含むフィルター精製(10k Amicon Ultra 0-5 ml 遠心フィルター)を 3 回行った後、PBS(pH 8)中の 100 μg の抗体を加えた。反応液を少なくとも 4°Cで 4 時間インキュベートした。その後、PBS(pH 7.2)中で 150-1,000 mM の NaCl 勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー(Dynamic

Biosensors, proFIRE)により結合体を精製した。オリゴ抗体結合体の純度を SDS-PAGE およびアガロースゲルによって分析した。

抗体で機能化された DNA ナノロッドの構築

Stahl ら 88 が報告したように、構築されたナノロッドは過剰なステープルストランドを除去するために 2 回の PEG 沈殿で精製され、PEG 8000(8.25%wt/vol)と NaCl(275 mM)の濃度はわずかに高かった。ナノロッドには、最大 4 本の ssDNA ハンドル鎖(上記で組み立てた元の構造の一部)が付属しており、ssDNA の IgG 結合体と相補的な配列を有していた。5 mM Tris, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA および 10 mM MgCl₂ を含む緩衝液中で、pH 8, 30°C で一晩、IgG ssDNA のナノロッドへのハイブリダイゼーションを行った(補足図 16b)。完全に機能化したナノロッドを濃縮するために、もう一度 PEG 精製を行い、続いてナノロッドを Tris 緩衝液(5 mM Tris, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA および 5 mM MgCl₂)に 4 μM の高濃度で溶解した。PEG-ポリリジン(メトキシ-ポリ(エチレングリコール)-ブロック-ポリ(L-リジン塩酸塩、10 リジン繰り返し単位、5 kDa 分子量(MW)PEG, Alamanda ポリマー))を窒素:リン酸(N:P)比 1:1 で添加し、in vivo での低塩条件およびヌクレアーゼ活性に対してナノロッドを安定化させた。In vivo 試験では、滅菌 PBS を用いてナノロッドを 0.5 μM または 2 μM に希釈し、マグネシウム濃度を 2 mM 以下に減少させた。最後に、Endosafe nexgen-PTS(Charles River Laboratories)を用いて、100 μL の静脈内注射で 1 日 36 EU ml⁻¹ 未満という FDA の要件を満たすように、完全装備のナノロッドのエンドトキシン濃度を測定した。

マウスに投与された様々なナノキャリアと用量計算

LNP は、鼻腔内、筋肉内、静脈内、経口、および皮内など様々な経路で投与された。鼻腔内への投与は、軽度麻酔したマウスに対して、ピペットを用いて 1 滴ずつ試料を受動的にマウスに投与し、正常な呼吸下で各滴が鼻に入るまで待つことにより行われた。筋肉内への投与は後肢の筋肉に行われた。尾静脈から静脈内注射が行われた。覚醒マウスに動物用注射針を用いて強制経口投与が行われた。麻酔したマウスの背部の剃毛した小領域に皮内注射した。注射には全て 30 G の針を使用した。

注射量は前述のように 0.0005 mg/kg から 0.5 mg/kg の間で変化させた。ヒトのワクチン用量を動物モデルに変換する際には、体重だけでなく体表面積の差も考慮に入れることが極めて重要である(アロメトリックスケーリング)。ガイドラインによれば、マウスの等価用量を推定するには、ヒトの用量を 12.3 で除すべきである。例えば、ヒトでの用量が 30 μg(ヒト mRNA ワクチンに用いられるおおよその用量)である場合、マウスでの用量は約 2.4 μg(30 μg を 12.3 で除した値)となる⁵⁰。この変換により、その投与量がマウスにおいて同様の薬学的反応を確実に誘発することになる^{48,49}。

投与 6 時間後(生体内分布)および 72 時間後(発現)に動物を安楽死させた。FDA 承認薬である Doxil をベースとするリポソームは、Atto 647 色素を送達する。リポソーム製剤は、水素添加大豆ホスファチジルコリン、コレステロール及び PEG 修飾ホスファチジエタノールアミンから構成され、モル比は 55:40:5 であり、カーゴとして Atto 647(AD 647, ATTO-TEC)が含まれる。これらのリポソームは、薄膜水和法に続いて均一性⁸⁹を達成するために 200 μm フィルターを用いたサイズ押し出し法を用いて製造された。作製後、Amicon 30 kDa フィルターを用いてリポソームを濃縮した。分岐 PEI は、一本鎖 Alexa Fluor 647 標識

*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等はありません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めていただきますようお願いいたします。

DNA(Alexa 647-AGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCCCTCCAG ATCGGAAGAGCGTCGTGTG)を送達する。N:P 比 15 で 647 色素で標識された ssDNA と結合した分子量 25 kDa の分岐 PEI を用いて粒子を調製した。これらの粒子は、参考文献に記載されているように、自己組織化プロセスによって生成された。90%未満リポソームとポリプレックスを 0.1 mg/kg の濃度で筋肉内注射した。異なる DNA 折り紙(非標的折り紙および Cx3cr1 抗体標的折り紙)を 50.725 mgkg⁻¹ の用量で、20 分から 20 時間までの様々な注入時点で静脈内投与した。Retro-AAV および PHP.eB-AAV をそれぞれ筋肉内および静脈内に注射した(25 μ l 中に 1013 GC/ml)^{67,68,69}。2 週間後、マウスを灌流して固定した。

タンパク質コロナ製剤

野生型 Balb/c マウスから血液を後眼窩的に採取し、血漿(EDTA を被覆したマイクロ遠心チューブに採取し、氷上で採取した後、2,000 rpm、4°C で 15 分間遠心して血漿(上清)を回収)または血清(被覆していないマイクロ遠心チューブに採取し、室温で 30 分間放置して凝固させた後、2,000 rpm、4°C で 15 分間遠心して血清(上清)を回収)を得た。LNP(上記の最終製剤をそれぞれ 50 μ L、1 製剤当たり 1 μ g の非標識 mRNA を封入)をマウス血漿または血清とともに 37°C、容量比 31:1 で 15 分間インキュベートした。0.7 M ショ糖溶液は、固体ショ糖をミリ Q 水に溶解することによって調製された。LNP/血漿混合物を、15,300g、4°C で 1 時間遠心分離した 300 μ L のショ糖クッションに添加した。上清を除去し、ペレットを 1×PBS で洗浄した。次に、ペレットを 15,300g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。洗浄はさらに 2 回行われた。質量分析では、タンパク質で覆われた LNP を -20°C で乾燥させた状態で分析した。

23

灌流および組織標本作製

ケタミンとキシラジンの組み合わせ(濃度 2 mL/1 kg 筋注)を用いてマウスを深く麻酔した。その後、マウスの胸腔を開き、ヘパリン化 PBS(0.01 M PBS に溶解した 10-25 U/ml-1 ヘパリン)を 100-125 mmHg の圧で 5-10 分間、血液が洗い流されるまで室温で心腔内灌流を行った。(肝臓の色が赤色から淡黄色に変化する)。次に、4%パラホルムアルデヒド(PFA)でマウスを灌流し、全身を 5 分間固定した。最後に、皮膚を注意深く除去し、虫体を 4%PFA 溶液に 4°C で一晩固定した後、後で免疫染色を行うために PBS に移すか、後述のように直接透明化の処理を行った。

色素標識 LNP-mRNA を可視化するために最適化された DISCO 法

筆者らは、Alexa Fluor 647 で標識した mRNA を LNP とともにマウスに注射する際に、蛍光シグナルをマウスの体内に保持しながらマウスを透明にする改変 DISCO 法を開発した。蠕動ポンプ(ISMATEC, REGLO デジタル MS-4/8 ISM 834, 基準配管, SC0266)を用いて、単純化された心臓内循環系を確立した。1 本の参照用チューブを 2 本のコネクター(Omnilab, 5434482)で端から端まで接続し、別の PVC チューブ(Omnilab, 5437920)で延長した。1 mL 注射器(Braun, 9166017 V)の頭部を切断し、灌流針(Leica, 39471024)のコネクターとして流出 PVC チューブに挿入した。次に、PBS で灌流し、PFA で固定したマウスの体を 250 mL のガラスチャンバーに入れた(Omnilab, 5163279)。経心臓循環システムの流入管は、粘着テープを用いてガラスチャンバー内の PBS の表面下に固定され、循環管から気泡は完全に除去された。固定後、脱色液(25 wt%N,N,N,N'-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン(Sigma-

*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等
は行っていません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めて
いただきますようお願いいたします。

Aldrich 社製)および 15 wt% Triton X-100 から成る CUBIC 試薬の 1:4 希釈液)を 12 時間心臓内に灌流した。その後、マウスの体を PBS で 12 時間洗浄し、3 回繰り返した後、脱灰液(10 wt/vol% EDTA, pH 8.00, Carl Roth 社製)で 2 日間灌流した。それぞれ 12 時間継続して PBS 洗浄液をさらに 3 回経心臓的に投与した後、マウスをフード下の受動的清浄(経心臓ポンピングなし)に移した。70 vol% THF、80 vol% THF および 2×100 vol% THF 中でマウスをインキュベートした。続いて DCM で 20 分間処理した後、組織が完全に透明になるまで BABB で処理した。

全身免疫染色用に最適化された DISCO 法

LNP-mRNA をマウスの全身に注射すると、カーゴ mRNA にコードされたタンパク質が発現した。シグナル増強ナノボディを用いて発現タンパク質を染色し、mRNA の機能的完全性を確認した。脱色および脱灰は上記と同様に行った。次に、0.5% Triton X-100, 1.5% ヤギ血清(Gibco, 16210072), 0.5 mM メチル-β-シクロデキストリン(Sigma-Aldrich, 332615), および 0.2% トランス-1-アセチル-4-ヒドロキシ-L-プロリン(Sigma-Aldrich)を含む透過化溶液にナノボディを溶解し、この溶液を 6 日間にわたり心臓経由で能動的にポンプ輸送した。免疫染色工程の後、マウスの体は、室温で、70 vol% THF、80 vol% THF、100 vol% THF、および再度 100 vol% THF 中でそれぞれ 12 時間のインキュベーションにより、ドラフト内で穏やかに振り動かして受動的にきれいになった。その後、マウスの体を DCM で 20 分間処理し、組織が完全に透明になるまで BABB に浸した。

マウスの体の免疫染色に使用された抗体、ナノボディおよび色素は、ラット抗 CD 45(BD Biosciences, 14-0451-82)、SARS-CoV-2 スパイク抗体(GeneTex, GTX135356)、Alexa Fluor 568 結合抗 GFP シグナル増強ナノボディ(ChromoTek, gb2AF568-50)、Alexa Fluor 647 結合抗 GFP シグナル増強ナノボディ(ChromoTek, gb2AF647)およびヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich, P4864)であった。

前脂肪細胞の分化と受容体遮断

褐色の前脂肪細胞への分化

野生型 C57Bl/6 マウス⁹¹由来の不死化褐色前脂肪細胞を計数し、チャンバースライド(Nunc Lab-Tek II チャンバーカバーガラス, Z734853)上に播種した。DMEM 10% FBS 中に IBMX(0.5 mM), インスリン(100 nM), インドメタシン(5 μM), デキサメタゾン(5 μM) 及びロシグリタゾン(1 μM)を含む誘導培地カクテルを用いて 2 日間完全に融合した前脂肪細胞を誘導し、その後、培地を 2 日毎に 100 nM インスリン、T3 及びロシグリタゾンを含む分化培地(DMEM, 10% FBS)に交換した。

受容体遮断および免疫染色

分化 7 日目に、細胞を PBS で処理するか(対照), AAV に感染させた。ブロッキング実験では、細胞をヘパリン(500 μg/mL; Merck, H4784-250MG), 抗 FGFR 1(20 μg/mL; Invitrogen, PA5-86349), 抗インテグリン αVβ5(20 μg/mL; Bioss, BS-1356R)または抗 AAVR(20 μg/mL; Proteintech, 21016-1-AP)抗体で 1 時間前に前処理した後、Retro-AAV を適用した(Addgene, 37825-AAVrg)。9 日目に、細胞を PBS で洗浄し、4% PFA(pH 7.4)中で室温で 10 分間固定し、3% BSA および 0.3% Tween 20 を用いてブロックおよび透過処理を行った。次に細胞を抗ペリリピン-1 抗体(1:500; Cell Signaling

*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等
は行っていません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めて
いただきますようお願いいたします。

Technology,3470)とともに 4°Cで一晩インキュベートした後、PBS で 3 回洗浄し、GFP-Booster Alexa Fluor 568(1:1000;Thermo Fisher Scientific,17363333)及びヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor 647(1:500;Thermo Fisher Scientific,A-21244)。3 回洗浄した後、Dako antifade 封入剤を用いてスライドを封入し、Leica TCS SP8 顕微鏡で画像を撮影した。

水分補給および除去された組織の免疫染色

LNP がマウス心臓の特定の細胞に侵入したことを確認するために、我々はラット抗 CD 45(BD Biosciences,14-0451-82;希釈 1:500)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗ラット IgG(H+L)抗体(ThermoFisher Scientific,A-11077;希釈 1:500)、マウス抗トロポニン T(Abcam,ab8295;希釈 1:500)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体(ThermoFisher Scientific,A-11004;希釈 1:500)、マウス抗ポドカリキシン(R&D Systems,MAB1556;希釈 1:500)、ウサギ抗 α SMA(Abcam,ab5694;希釈 1:500)および Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(ThermoFisher Scientific,A-11036;希釈 1:500)を用いた。清浄にしたマウス心臓を、100%THF、90%THF、70%THF、50%THF および 0.01 M PBS を用いて室温で穏やかに振り混ぜながら再水和させた。その後、心臓組織を切開し、10 μ m の切片に切断し、0.2%ゼラチン、0.5%トリトン X-100 および 5%ヤギ血清を含む 0.01 M PBS 中で 37°Cで 1 日間インキュベートした。次いで、これらの切片を同じ溶液で希釈した一次抗体とともに一晩インキュベートし、PBS で 2 回洗浄し、二次抗体とともに 4 時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。

共焦点画像

40 倍油浸レンズ(Zeiss,EC Plan-Neofluar \times 40/1.30 oil DIC M27)及び 25 倍水浸長作動距離(WD)対物レンズ(Leica,開口数(NA)0.95,WD=2.5 mm)を装備し、z-step サイズ 0.3 μ m を採用した反転レーザー走査共焦点顕微鏡システムを用いて、細胞の種類を識別するために染色した心臓スライスを撮像した。

ライトシート法

Miltenyi Biotec 社の UltraMicroscope Blaze ライトシート画像システムを使用した。マウスの全身観察には \times 1.1 および \times 4 の拡大対物レンズを用いた(LaVision BioTec MI PLAN \times 1.1/0.1 NA,Wd=17 mm および Olympus XLFLUOR \times 4 corrected/0.28 NA,Wd=10 mm).25%のオーバーラップを用いて高倍率のタイルスキャンを行い、視野内で最大の照明が得られるようにライトシートの幅を縮小した。z-ステップサイズは 6 μ m であり、曝露時間は 100 ms であった。データの収集には ImSpector(Miltenyi Biotec,version 7.3.2)を用いた。

生体内画像検査

血液中の非標的 DNA 折り紙の半減期を測定するための多光子イメージングでは、Ti:Sa レーザー(Coherent,Chameleon Vision II)と赤色および緑色蛍光用の 2 つの外部光電子倍增管検出器を装備した直立型 Zeiss LSM710 共焦点顕微鏡を使用した。Charles River Laboratories から入手した 8 週齢の C56BL/6N マウスに、メドトミジン(0.5 mg/kg),フェンタニル(0.05 mg/kg)およびミダゾラム(5

mg/kg)の組合せ(MMF)で腹腔内麻酔を行った。体温は、フィードバック制御式の温熱パッドに接続した直腸プローブを用いて、実験中モニタリングし、維持した。蛍光色素またはナノ粒子を投与するためにカテーテルを大腿動脈に留置した。92に記載したように、生理食塩水で継続的に冷却しながら、右側前頭頭頂皮質上に4×4 mmの長方形の頭蓋窓を開けた。脳血管を同定しベースライン画像を得るために、マウスにFITC-デキストランを3 μ l/gで注射した。その後、小動物の生体内イメージングに適した多光子顕微鏡に動物を乗せた。Atto 550を結合させた非標的DNA折り紙を1 μ Mの濃度で120 μ lの容量で注入した。走査は、800 nmで10%レーザー出力、LP<570 nmフィルターを備えたGAASP検出器、およびFITCチャンネルに対して600のマスターゲインを用いて、80 μ mの深さで時系列で行われた。ナノ粒子チャンネルには、マスターゲインが600のLP>570 nmフィルターを使用した。全体として、撮像時間は70分を超えなかった。蛍光分析はFIJIソフトウェアを用いて実施した。

生物発光イメージング

異なる用量のLNP FLuc mRNA(0.5,0.05,0.005 および 0.0005 mg/kg-1;脂質対 mRNA 比, 5:1)をマウスに静注した。LNP-Luc mRNAの注入から6時間後にL-ルシフェリンの水溶液(250 μ l,1.6 mg;BD Biosciences)を腹腔内投与し、注入から10分後に生物発光シグナルを測定し、Living Image Software version 4.2(Caliper Life Sciences)を用いて定量した。

DNA折り紙のタンパク質コロナ測定

DNA折り紙をHEPES緩衝液または血清含有培地に段階的濃度(70%,90%,99%)で溶解した。試料を入れた折りたたまれた毛細管セルを25°Cで3回測定し(各6回)、蛍光相関分光法により測定した。

ウイルス注入法

AAVの注射にはCharles River Laboratories社のC57BL/6Jマウス(全て雄、6-8週齢)を用いた。このウイルスは、31ゲージのインスリン注射器(BD Biosciences,328438)を用いて、尾静脈から静脈内に、大腿二頭筋内に筋肉内投与された。静脈内注射にはAAV-PHP.eB-CAG-GFP(Addgene,37825-PHPeB;力価 $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/ml;1 \times PBSで1:10に希釈)を用い、筋肉内注射にはAAV-retro-CAG-GFP(Addgene,37825-AAVrg;力価 $\geq 7 \times 10^{12}$ vg/ml;1 \times PBSで1:10に希釈)を用いた。静脈内および筋肉内注射はいずれも30 μ Lの容量で行われた。

いずれの注射の前にも、マウスをイソフルラン(0.5 L min⁻¹の酸素下で、誘発には5%,維持には1%)で麻酔し、37°Cの体温を維持するために温熱パッドの上に置いた。注射後、マウスに7.5 mg/kgのカルプロフェンを皮下投与した。

LNP ナノキャリア検出のためのディープラーニング

データの注釈

アノテーションはSyGlassアノテーションソフトウェア(バージョン1.7.2)を用いてバーチャルリアリティで実施された。全身の関心のある臓器(すなわち、頭部、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)から採取した合計31個のパッチ(大きさは様々)に対して、ナノ粒子を標的とする細胞を手作業で標識した。最適なアーキテクチャとハイパーパラメータを決定するために、VR注釈付きデータを2つのサブセット(訓練/検証サブセットとテストセット)に分

割する。トレーニングおよびバリデーションサブセットは、13,927 個のアノテーション付きナノ粒子インスタンスを含む 21 個のパッチで構成される。検査サブセットには、10 個のパッチ(対象臓器毎に少なくとも 1 個)と 6,424 個の注釈付き粒子が含まれる。この分割は、注釈が付けられたすべての臓器タイプを代表する検査セットで訓練された方法を評価できるように、手動で選択された。

トレーニング前の前処理として、各パッチの最小値と最大値を用いて各パッチを 0-1 の範囲に正規化した。

セグメンテーションモデルの開発

ナノキャリアに対して最高のセグメンテーションパフォーマンスを達成するために、我々はアノテーション付きデータセットを用いて、VNet32、U-Net++33、Attention U-Net34、UNETR35、SwinUNETR36、nnFormer36、3D U-Net37 など、いくつかの最先端のセグメンテーションネットワークをテストした。最も優れたモデルは、6 つの符号化層、5 つの復号化層、leaky ReLU 活性化関数を備えた 3 次元 U-Net であり、Isensee ら(93)が記述したパラメータと訓練プロトコルに従って訓練された。最も性能の高いモデルを SCP-Nano と命名した。このモデルは、トレーニング期間中に元のパッチからサブサンプルされた $128 \times 128 \times 128$ ボクセルのパッチサイズを用いて、5 倍のクロスバリデーション方式に従ってトレーニングされた。訓練中のパッチサイズは 2 であった。適用された損失関数は、Dice とクロスエントロピー損失の平均的な組み合わせであった。学習率 0.0001 での訓練には、確率的勾配降下法(SGD)オプティマイザが用いられた。このモデルは 1,000 エポックにわたって訓練され、検証サブセットで最も低い損失値を示すチェックポイントが、すべての折り畳みに対して最良のモデルとして維持された。5 段階の交差検定方式で訓練された最良のモデルはすべて、下流の評価と推論のために集められた。我々は VR を用いて手動で臓器の注釈を行った。

推論と分析

1 回の全身マウス LNP スキャンは最大 $30,000 \times 10,500 \times 2,000$ ボクセルまで可能である。スキャン全体が専用サーバーの一般的な RAM や VRAM には大きすぎるため、全身の画像を最大 $500 \times 500 \times 500$ ボクセルのパッチに分割する。これらのパッチを訓練されたセグメンテーションモデルに導入することで、対応するナノ粒子のセグメンテーションが得られた。全身スキャンのナノ粒子セグメンテーションマップは、パッチセグメンテーションをつなぎ合わせることによって得られた。

定量的な分析のために、私たちは VR を使用して、全身スキャンごとに脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を含む 6 つの標的臓器に注釈を付けている。各臓器について関心のある体積を定義することにより、この情報を以前に得られたナノ粒子のセグメント化と重ね合わせて、臓器特異的な定量的データを得ることができる。このために、我々は cc3d ライブラリー(<https://github.com/seung-lab/connected-components-3d>)からの連続成分分析法を採用し、各臓器における全てのセグメント化されたナノ粒子ドットを標識して測定した。LNP 定量分析では、局所的な明るさのレベルを考慮に入れたが、これは細胞に取り込まれた LNP の量に関する情報が得られるためである。具体的には、背景強度と比較した各セグメント化 LNP ドットの相対強度コントラストを算出した。背景強度は、分割された点に属するボクセルを除外し、臓器内のボクセルの平均強度から臓器ごとに推定した。次に、セグメント化された各 LNP ドットについて、内部の全ボクセルの相対強度コントラスト値を合計した。最後に、特定の領域または臓器における LNP の量を反映させるために、全ての分節化した点の相対的なコントラスト値を合計した。

*本翻訳は MediTRANS®(<http://www.mcl-corp.jp/meditrans/>)という機械(AI)翻訳エンジンによるものであり、人による翻訳内容の検証等
は行っておりません。従いまして本翻訳の利用に際しては、原著論文が正であることをご理解の上、あくまでも個人の理解のための参考に留めて
いただきますようお願いいたします。

次に、様々な臓器におけるナノ粒子の分布を視覚化するために、ナノ粒子の分節化に基づいた細胞密度マップを作成した。スライディングウィンドウ法を用いて、セグメント化されたナノ粒子の局所的な相対強度コントラスト値を算出した。我々の実験では、 $16 \times 16 \times 4$ ボクセルのウィンドウサイズを採用した。次に、この立方体の各ボクセルに相対的なコントラスト値の合計を割り当てた。最後に、3次元ガウスフィルタを用いて、滑らかで完全な解像度の密度マップを得た。

SCP-Nano パイプラインコードは <https://github.com/erturklab/SCP-Nano> で公開されている。

質量分析用試料の調製

我々は研究をスパイク LNP, EGFP LNP, ノーカーゴ LNP および PBS の 4 群に分けた。心臓の LNP 分布を観察したところ、左室と右室の間の中壁にかなりの LNP 分布が認められたが、他の領域では LNP の存在は少なかった。そこで我々は、20 ゲージ針を用いて各心臓(左、右、中央部)から 3 つの組織検体(合計 45 検体)を手作業で採取した。

前述の方法に従って質量分析用の試料を調製した 5l。簡単に述べると、組織を PBS で洗浄し、SDS 溶解緩衝液(6%ドデシル硫酸ナトリウム、500 mM Tris-HCl, pH 8.5)に再懸濁した。続いて、サーモミキサー中で 95°C で 45 分間、1000 rpm で加熱した。次いで、高周波で 30 秒間オンおよび 30 秒間オフに操作した Bioruptor Pico 超音波処理装置を用いて、試料を 30 サイクル超音波処理に供した。超音波処理後、試料を再びサーモミキサー中で 95°C で 45 分間、1000 rpm で加熱した。その後、氷冷したアセトン(80%vol/vol)中で -80°C で一晩タンパク質を沈殿させ、4°C で 15 分間遠心分離した。還元とアルキル化のために、タンパク質を SDC 緩衝液に再懸濁し、95°C で 10 分間 1,000 rpm で加熱した。トリプシンと LysC による消化は酵素/基質比 1:50 で行い、試料はサーモミキサー中で 37°C で 1,000 rpm で一晩インキュベートした。次に、99%イソプロパノールに溶解した 1%トリフルオロ酢酸(TFA)を用いて 1:1 の容量/容量比でペプチドを酸性化した。これらのペプチドを、スチレン-ジビニルベンゼン逆相スルホン酸(SDB-RPS; 3M Empore)膜の 2 層からなる自家製 StageTips に入れた。活性化した(それぞれ 100%アセトニトリル(ACN)、30%メタノールに溶解した 1%TFA、0.2%TFA)StageTips、SDB-RPS 膜に通し、1%TFA を含む EtOAc、1%TFA を含むイソプロピルアルコール及び 0.2%TFA でそれぞれ洗浄する。ペプチド溶出は 60 μ l の 1.25%アンモニアと 80%ACN(アセトニトリル)中で行い、SpeedVac(Eppendorf, Concentrator plus)中で 45°C で 45 分間乾燥させた。乾燥したペプチドを 8 μ l の 2%ACN/0.1%TFA に溶解し、Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay を用いてペプチド濃度を測定した。

LNP コロナ検体の調製

ナノ粒子試料は、PCR ストリップ中の 25 μ l の 4%SDS-Tris-HCl 緩衝液(4%SDS と 10 mM TCEP から成る、pH 8.5)に再懸濁された。LNP 試料を 95°C で 5 分間加熱した後、4°C で 15 分間超音波処理した。続いて、25 μ l の 2%SDC 緩衝液(10 mM TCEP および 40 mM CAA も含有)を加え、混合物を再び 95°C で 10 分間加熱した。SpeedBeads の 1:1 混合物 3 μ l を導入し、5 分間攪拌しながらエタノールを用いてタンパク質を最終濃度 75%になるまで沈殿させた。ビーズを磁気 96 ウェルラックに捕捉し、80%エタノ

ール 100 μ L で 2 回洗浄した。残留エタノールは SpeedVac で蒸発させた。次に試料を 0.02% LMNG の 50 mM TEAB 50 μ L に溶解した 0.4 μ g のトリプシン-LysC で 37°C で一晩消化した。

Evotip PURE による LNP コロナ検体のクリーンアップ

Evotip の PURE プロトコルは、96 ウェルフォーマットでのオフライン C18 クリーンアップの再現性と標準化を確実にするために修正された。最初に、Evotip PURE チップを 20 μ L の緩衝液 B (80% ACN, 水および 0.1% ギ酸から成る) でリンスし、800g で 60 秒間スピンドウンした。Evotips を 10 μ L のイソプロピルアルコールで調整した後、100g でパルス回転し、1 分間保温し、さらに 100g で 4 分間保温して Evotips を空にした。PURE Evotips は 20 μ L の緩衝液 A (0.1% ギ酸) 中で平衡化され、酸性化された試料を添加する準備ができるまで保存のために 800g でパルス遠心された。試料を 0.4% TFA 中で酸性化し、800g で 1 分間遠心分離することによって Evotip PURE を空にした。酸性化した試料を PURE Evotips に添加し、800g で 1 分間遠心分離した。試料を 20 μ L の緩衝液 A で 2 回洗浄し、800g で 1 分間遠心分離した。450g の 45% 緩衝液 B (45% ACN, 水および 0.1% TFA を含む) 20 μ L で溶出することにより、溶出液を PCR ストリップに回収した。ペプチドを SpeedVac 中で乾燥し、質量分析分析のために 0.015% DDM を添加した 0.1% TFA 中に再懸濁した。

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法

質量分析データは DIA (data-independent acquisition) モードで得られた。LC-MS/MS 分析は、EASY nanoLC 1200 (ThermoFisher Scientific 社製) と CaptiveSpray ナノエレクトロスプレイイオン源を介した四重極飛行時間型単細胞プロテオミクス質量分析装置 (Bruker Daltonik 社製 timsTOF SCP) を組み合わせて実施された。ペプチド (100 ng) を CaptiveSpray インサート付き 15 cm Aurora Elite UHPLC カラム (75 μ m ID, 1.7 μ m C18) に 60°C で負荷し、60 分間のグラジエント (30 分間に 5-20% Buffer B, 9 分間に 20-29% Buffer B, 6 分間に 29-45%, 5 分間に 45-95%, 5 分間に 95% Buffer B, 5 分間に 95-5% Buffer B で洗浄) を用いて流速 300 nl min⁻¹ で分離した。緩衝液 A および B は、それぞれ 0.1 vol% ギ酸を含む水および 80:20:0.1 vol% ACN:水:ギ酸であった。質量分析データはシングルショットライブラリーフリー DIA モードで収集し、timsTOF SCP は高感度検出-低試料量モードを用いて DIA/並行蓄積逐次分割 (PASEF) で操作した。ほぼ 100% の負荷サイクルを達成するために、イオン蓄積時間とランプ時間をそれぞれ 100 ms に設定した。衝突エネルギーは移動度の関数として、 $1/K0=1.6$ Vs cm⁻² での 59 eV から、 $1/K0=0.6$ Vs cm⁻² での 20 eV まで直線的に増加した。分離窓は 24 \times 25 Th, m/z 400~1000 と定義された。

LNP コロナ試料は改良クロマトグラフィーを用いて分析した。簡潔に述べると、1 回の注入につき 50 ng のペプチドを 5.5 cm High Throughput μ PAC Neo HPLC Column (ThermoFisher Scientific) に負荷し、80 分間のアクティブグラジエント法を用いて流速 250 nl min⁻¹ で分析した。

プロテオミクスのデータ処理

DIA-NN94 を用いて、diaPASEF の生データをマウス UniProt データベースで検索した。N 末端アセチル化を含む 7 種のアミノ酸からなるペプチド長の範囲を検討した。メチオニン酸化は可変修飾、システインカルバ

ミドメチル化は固定修飾とされた。酵素特異性は Trypsin/P with two missed cleavage に設定した。ライブラリーフリー探索のための FASTA ダイジェストは、ライブラリーの生成を予測することを可能にした。前駆体および全体のタンパク質レベルでの偽検出率は 1% に設定された。Match-between-run (MBR) 機能を有効にし、定量モードを「Robust LC (high precision)」に設定した。DIA-NN's report の Protein Group カラムを用いてタンパク群を同定し、PG.MaxLFQ を用いて発現差を算出した。

プロテオミクスの下流データ解析

心臓組織における MC3 のプロテオミクス解析

1. プロテオミクスのデータ解析

Python 3.10 の Scanpy (バージョン 1.10.2) と anndata (バージョン 0.10.8) のパッケージを用いて、LC-MS 試料を分析するための下流の分析パイプラインを実装した。各群 3 匹の動物から 9 つの独立した検体を採取して分析したが、PBS については 8 つの独立した検体を採取した。

2. 品質管理

各群の半数未満の検体で発現した全てのタンパク質をフィルターで除去した。

3. データ処理

データは対数変換され、検体毎に正規化された。欠測値は sklearn パッケージ (version 1.5.1) の KNNImputer ($n_neighbors=5$) を用いて入力された。異なる試験間でのバッチ効果を補正するために、データはさらに、scib ツール (<https://github.com/theislab/scib>) (バージョン 1.1.3) からの ComBat を用いてバッチ補正された。

4. 樹状図

Scanpy の樹状図関数を用いて、平均した 50 個の主成分について、Pearson の相関行列に基づいて階層的連鎖クラスタリングを計算した。

5. 差次的発現検査

2 つのグループ間で異なる調節を受けるタンパク質を同定するために (例えばスパイク LNP vs ノーカーゴ LNP), t 検定を用いて遺伝子グループをランク付けする Scanpy の方法が用いられた。最大 P 値および最小 log fold change を用いて DEP を同定した。閾値は $P < 0.05$, $\log \text{fold change} > 0.5$ である。これらの DEP は火山のプロットにも利用された。Reactome のデータベースと GProfiler を用いて、DEP 保有遺伝子の濃縮解析を行った。視覚化では、生物学的経路の最も広いカテゴリーに焦点が置かれた。

血管関連遺伝子は、公的に利用可能なデータベース (Reactome) から関連する経路を用いて手作業で収集された。血管関連遺伝子セットは、各群の標準化平均発現スコアを用いて個別に検討された。

心臓組織における SM-102 および Lung SORT 製剤のプロテオミクス解析

1. プロテオミクスのデータ解析

Python 3.10 で Scanpy(version 1.10.2)および anndata(version 0.10.8)を用いてマウス検体を分析した。この研究では、SM-102 と Lung SORT という 2 つの異なる剤形が用いられた。検体は無カーゴ LNP、EGFP およびスパイクタンパク質の 3 群に分類された。各群は 3 匹の動物から採取した検体で構成され、各群の各製剤の検体数は 9 となった。さらに、PBS からなる 9 つの対照試料を 3 匹の動物から採取して分析した。

2. 品質管理

各群の半数未満の検体で発現していたタンパク質をすべて除外した結果、2,191 種類のタンパク質が下流工程の分析に使用された。

3. データ処理

データは対数変換され、検体毎に正規化された。欠測値は sklearn パッケージ(version 1.5.1)の KNNImputer(n_neighbors=5)を用いて入力された。

4. 差次的発現検査

2 つのグループ間で異なる調節を受けるタンパク質を同定するために(例えば、SM-102 スパイク対 PBS)、t 検定を用いて遺伝子グループをランク付けする Scanpy の方法が用いられた。最大 P 値および最小 log fold change を用いて DEP を同定した。閾値は $P < 0.05$, $\log \text{fold change} > 0.5$ である。これらの DEP は火山のプロットにも利用された。

選択した DEP の規格化強度を各製剤および群についてプロットした。さらに、対照群(PBS)と比較した差の統計的有意性を評価するために、スチューデントの t 検定を実施した。

LNP 製剤のタンパク質コロナ

1. プロテオミクスのデータ解析

Python 3.10 で Scanpy(version 1.10.2)および anndata(version 0.10.8)を用いてマウス検体を分析した。この研究では、4 つの異なる LNP 製剤(MC3, SM-102, BioNTech および Lung SORT)の血漿が対象とされた。各群は 3 匹の動物から採取した検体で構成された。さらに、PBS からなる対照試料を 3 匹の動物から採取して分析した。

2. 品質管理

各群の半数未満の検体で発現した全てのタンパク質をフィルターで除去した。

3. データ処理

データは対数変換され、検体毎に正規化された。欠測値は sklearn パッケージ (version 1.5.1) の KNNImputer (n_neighbors=5) を用いて入力された。

4. 差次的発現検査

2つのグループ間で異なる調節を受けるタンパク質を同定するために (例えば、MC3 vs PBS)、t 検定を用いて遺伝子グループをランク付けする Scanpy の方法が用いられた。最大 P 値および最小 log fold change を用いて DEP を同定した。閾値は $P < 0.05$, $\log \text{fold change} > 0.5$ である。これらの DEP は火山のプロットにも利用された。対照 PBS と比較した各製剤の DEP を測定した。潜在的なタンパク質コロナを調べるために、各製剤と PBS 対照とのペアワイズ比較により、共通の特異的結合タンパク質を同定した。その後、一般的な差次的結合タンパク質の正規化強度をプロットし、スチューデントの t 検定を実施して、対照群 (PBS) と比較した差の統計的有意性を判定した。UniProt 社の StringDB・パイソン・パッケージとマニュアル・キュレーションを用いて、これらのタンパク質の潜在的な結合因子が決定された。

Statistics and reproducibility

All experiments were independently repeated at least three times with similar results. Relevant statistical tests are described in the figure legends or in the relevant sections above. Representative data, including micrographs, are presented where applicable.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. The proteomics data were uploaded to the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD056871 (ref. 95), accessible at <http://proteomecentral.proteomexchange.org>. Whole body imaging data are available upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Code availability

The SCP-Nano pipeline code is available on GitHub at <https://github.com/erturklab/SCP-Nano> (ref. 96).

References

1. Yin, H. et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat. Biotechnol.* **34**, 328–333 (2016).
2. Paunovska, K., Loughrey, D. & Dahlman, J. E. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **23**, 265–280 (2022).
3. Mulligan, M. J. et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* **586**, 589–593 (2020).
4. Wang, C. et al. Ultrasound-responsive low-dose doxorubicin liposomes trigger mitochondrial DNA release and activate cGAS-STING-mediated antitumour immunity. *Nat. Commun.* **14**, 3877 (2023).
5. Casper, J. et al. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: current status and clinical applications. *J. Control. Release* **362**, 667–691 (2023).
6. Zhao, Z., Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* **7**, e10258 (2022).
7. Zeng, Y. C. et al. Fine tuning of CpG spatial distribution with DNA origami for improved cancer vaccination. *Nat. Nanotechnol.* **19**, 1055–1065 (2024).
8. Wagenbauer, K. F. et al. Programmable multispecific DNA-origami-based T-cell engagers. *Nat. Nanotechnol.* **18**, 1319–1326 (2023).
9. Wamhoff, E.-C. et al. Enhancing antibody responses by multivalent antigen display on thymus-independent DNA origami scaffolds. *Nat. Commun.* **15**, 795 (2024).
10. Wang, Y. et al. A DNA robotic switch with regulated autonomous display of cytotoxic ligand nanopatterns. *Nat. Nanotechnol.* **19**, 1366–1374 (2024).
11. Sigl, C. et al. Programmable icosahedral shell system for virus trapping. *Nat. Mater.* **20**, 1281–1289 (2021).
12. Dey, S. et al. DNA origami. *Nat. Rev. Methods Primers* **1**, 13 (2021).
13. Hadjidemetriou, M. & Kostarelos, K. Evolution of the nanoparticle corona. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 288–290 (2017).
14. Schwenck, J. et al. Advances in PET imaging of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **23**, 474–490 (2023).
15. Zhang, Q. et al. DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS Nano* **8**, 6633–6643 (2014).

16. Biancacci, I. et al. Optical imaging of the whole-body to cellular biodistribution of clinical-stage PEG-b-PHPMA-based core-crosslinked polymeric micelles. *J. Control. Release* **328**, 805–816 (2020).
17. Ponnuswamy, N. et al. Oligolysine-based coating protects DNA nanostructures from low-salt denaturation and nuclease degradation. *Nat. Commun.* **8**, 15654 (2017).
18. Perrault, S. D. & Shih, W. M. Virus-inspired membrane encapsulation of DNA nanostructures to achieve in vivo stability. *ACS Nano* **8**, 5132–5140 (2014).
19. Patone, M. et al. Risks of myocarditis, pericarditis, and cardiac arrhythmias associated with COVID-19 vaccination or SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **28**, 410–422 (2022).
20. Rosenblum, H. G. et al. Safety of mRNA vaccines administered during the initial 6 months of the US COVID-19 vaccination programme: an observational study of reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System and v-safe. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 802–812 (2022).
21. Bozkurt, B., Kamat, I. & Hotez, P. J. Myocarditis with COVID-19 mRNA vaccines. *Circulation* **144**, 471–484 (2021).
22. Montgomery, J. et al. Myocarditis following immunization with mRNA COVID-19 vaccines in members of the US military. *JAMA Cardiol.* **6**, 1202–1206 (2021).
23. Akinc, A. et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 1084–1087 (2019).
24. Ertürk, A. et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* **7**, 1983–1995 (2012).
25. Cai, R. et al. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nat. Neurosci.* **22**, 317–327 (2019).
26. Retelletti Brogi, S., Derrien, M. & Hur, J. In-depth assessment of the effect of sodium azide on the optical properties of dissolved organic matter. *J. Fluoresc.* **29**, 877–885 (2019).
27. Susaki, E. A. et al. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat. Commun.* **11**, 1982 (2020).
28. Mitchell, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 101–124 (2021).
29. Al-Maskari, R., Paetzold, J. C., Horvath, I. & Erturk, A. On the pitfalls of deep image segmentation for lightsheet microscopy. In *Medical Imaging with Deep Learning. MIDL 2022 Short Papers* <https://openreview.net/pdf?id=3Krfu84W-Wx> (2022).
30. Pan, C. et al. Deep learning reveals cancer metastasis and therapeutic antibody targeting in the entire body. *Cell* **179**, 1661–1676 (2019).
31. Kaltenecker, D. et al. Virtual reality empowered deep learning analysis of brain activity. *Nat. Methods* **21**, 1306–1315 (2024).
32. Milletari, F., Navab, N. & Ahmadi, S.-A. V-Net: fully convolutional neural networks for volumetric medical image segmentation. In *Proc. of the 2016 Fourth International Conference on 3D Vision (3DV)* <https://doi.org/10.1109/3DV.2016.79> (IEEE, 2016).
33. Zhou, Z., Rahman Siddiquee, M. M., Tajbakhsh, N. & Liang, J. UNet++: a nested U-Net architecture for medical image segmentation. In *Deep Learning in Medical Image Analysis and Multimodal Learning for Clinical Decision Support* (eds Stoyanov, D. et al.) https://doi.org/10.1007/978-3-030-00889-5_1 (Springer, 2018).
34. Oktay, O. et al. Attention U-Net: learning where to look for the pancreas. Preprint at <https://arxiv.org/abs/1804.03999> (2018).
35. Hatamizadeh, A. et al. UNETR: transformers for 3D medical image segmentation In *Proc. of the IEEE/CVF Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV)* <https://doi.org/10.1109/WACV51458.2022.00181> (IEEE, 2022).

36. Hatamizadeh, A. et al. Swin UNETR: Swin transformers for semantic segmentation of brain tumors in MRI images. In *Brainlesion: Glioma, Multiple Sclerosis, Stroke and Traumatic Brain Injuries* (eds Crimi, A. & Bakas, S.) https://doi.org/10.1007/978-3-031-08999-2_22 (Springer, 2022).
37. Çiçek, Ö., Abdulkadir, A., Lienkamp, S. S., Brox, T. & Ronneberger, O. 3D U-Net: learning dense volumetric segmentation from sparse annotation. In *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2016* (eds Ourselin, S., Joskowicz, L., Sabuncu, M., Unal, G. & Wells, W.) https://doi.org/10.1007/978-3-319-46723-8_49 (Springer, 2016).
38. Hou, X., Zaks, T., Langer, R. & Dong, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* **6**, 1078–1094 (2021).
39. Bernard, M.-C. et al. The impact of nucleoside base modification in mRNA vaccine is influenced by the chemistry of its lipid nanoparticle delivery system. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **32**, 794–806 (2023).
40. Suzuki, Y. et al. Design and lyophilization of lipid nanoparticles for mRNA vaccine and its robust immune response in mice and nonhuman primates. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **30**, 226–240 (2022).
41. Shepherd, S. J. et al. Throughput-scalable manufacturing of SARS-CoV-2 mRNA lipid nanoparticle vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **120**, e2303567120 (2023).
42. Tsilingiris, D., Vallianou, N. G., Karampela, I., Liu, J. & Dalamaga, M. Potential implications of lipid nanoparticles in the pathogenesis of myocarditis associated with the use of mRNA vaccines against SARS-CoV-2. *Metab. Open* **13**, 100159 (2022).
43. Stowe, J., Miller, E., Andrews, N. & Whitaker, H. J. Risk of myocarditis and pericarditis after a COVID-19 mRNA vaccine booster and after COVID-19 in those with and without prior SARS-CoV-2 infection: a self-controlled case series analysis in England. *PLoS Med.* **20**, e1004245 (2023).
44. Das, B. B., Moskowitz, W. B., Taylor, M. B. & Palmer, A. Myocarditis and pericarditis following mRNA COVID-19 vaccination: what do we know so far? *Children (Basel)* **8**, 607 (2021).
45. Barda, N. et al. Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine in a nationwide setting. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1078–1090 (2021).
46. Alami, A. et al. Risk of myocarditis and pericarditis in mRNA COVID-19-vaccinated and unvaccinated populations: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **13**, e065687 (2023).
47. Kong, J. et al. Pulmonary fat embolism: a potentially new fatal complication of SARS-CoV-2 infection. A case report. *BMC Infect. Dis.* **23**, 576 (2023).
48. Ji, R.-R. et al. BNT162b2 vaccine encoding the SARS-CoV-2 P2 S protects transgenic hACE2 mice against COVID-19. *Vaccines (Basel)* **9**, 324 (2021).
49. Vogel, A. B. et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature* **592**, 283–289 (2021).
50. Nair, A. B. & Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* **7**, 27–31 (2016).
51. Bhatia, H. S. et al. Spatial proteomics in three-dimensional intact specimens. *Cell* **185**, 5040–5058 (2022).
52. Hassett, K. J. et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **15**, 1–11 (2019).
53. Cheng, Q. et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat. Nanotechnol.* **15**, 313–320 (2020).
54. Walkey, C. D. et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* **8**, 2439–2455 (2014).
55. Zhang, Y., Wu, J. L. Y., Lazarovits, J. & Chan, W. C. W. An analysis of the binding function and structural organization of the protein corona. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 8827–8836 (2020).

56. Dilliard, S. A., Cheng, Q. & Siegwart, D. J. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118**, e2109256118 (2021).
57. Ngo, W. et al. Identifying cell receptors for the nanoparticle protein corona using genome screens. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 1023–1031 (2022).
58. Dilliard, S. A. et al. The interplay of quaternary ammonium lipid structure and protein corona on lung-specific mRNA delivery by selective organ targeting (SORT) nanoparticles. *J. Control. Release* **361**, 361–372 (2023).
59. Li, R. et al. Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS ONE* **7**, e37195 (2012).
60. Ayloo, S. et al. Pericyte-to-endothelial cell signaling via vitronectin-integrin regulates blood–CNS barrier. *Neuron* **110**, 1641–1655 (2022).
61. Harumiya, S. et al. Characterization of ficolins as novel elastin-binding proteins and molecular cloning of human ficolin-1. *J. Biochem.* **120**, 745–751 (1996).
62. Mo, X. G. et al. NCF2, MYO1F, S1PR4, and FCN1 as potential noninvasive diagnostic biomarkers in patients with obstructive coronary artery: a weighted gene co-expression network analysis. *J. Cell. Biochem.* **120**, 18219–18235 (2019).
63. Wiraja, C. et al. Framework nucleic acids as programmable carrier for transdermal drug delivery. *Nat. Commun.* **10**, 1147 (2019).
64. Wang, P. et al. Visualization of the cellular uptake and trafficking of DNA origami nanostructures in cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 2478–2484 (2018).
65. Bastings, M. M. C. et al. Modulation of the cellular uptake of DNA origami through control over mass and shape. *Nano Lett.* **18**, 3557–3564 (2018).
66. Kulkarni, J. A. et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 630–643 (2021).
67. Tervo, D. G. R. et al. A designer AAV variant permits efficient retrograde access to projection neurons. *Neuron* **92**, 372–382 (2016).
68. Deverman, B. E. et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* **34**, 204–209 (2016).
69. Chan, K. Y. et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* **20**, 1172–1179 (2017).
70. Chen, Z., Fan, G., Li, A., Yuan, J. & Xu, T. rAAV2-retro enables extensive and high-efficient transduction of lower motor neurons following intramuscular injection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **17**, 21–33 (2020).
71. Tosolini, A. P. & Sleight, J. N. Intramuscular delivery of gene therapy for targeting the nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 129 (2020).
72. Mathiesen, S. N., Lock, J. L., Schoderboeck, L., Abraham, W. C. & Hughes, S. M. CNS transduction benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 are dependent on administration route and mouse strain. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **19**, 447–458 (2020).
73. Bates, R., Huang, W. & Cao, L. Adipose tissue: an emerging target for Adeno-associated viral vectors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **19**, 236–249 (2020).
74. Pillay, S. et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* **530**, 108–112 (2016).
75. Zhang, R. et al. Divergent engagements between adeno-associated viruses with their cellular receptor AAVR. *Nat. Commun.* **10**, 3760 (2019).
76. Summerford, C. & Samulski, R. J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* **72**, 1438–1445 (1998).

77. Summerford, C., Bartlett, J. S. & Samulski, R. J. $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat. Med.* **5**, 78–82 (1999).
78. Qing, K. et al. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat. Med.* **5**, 71–77 (1999).
79. Meyer, N. L. & Chapman, M. S. Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights. *Trends Microbiol.* **30**, 432–451 (2022).
80. Heidecker, B. et al. Myocarditis following COVID-19 vaccine: incidence, presentation, diagnosis, pathophysiology, therapy, and outcomes put into perspective. A clinical consensus document supported by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart Fail.* **24**, 2000–2018 (2022).
81. Qaisar, I. & Sunmboye, K. A case of severe ANCA associated vasculitis after COVID-19 vaccination. *Ann. Rheum. Dis.* <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.2748> (2022).
82. Kranz, L. M. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **534**, 396–401 (2016).
83. Kreiter, S. et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **520**, 692–696 (2015).
84. Schober, G. B., Story, S. & Arya, D. P. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient. *Sci. Rep.* **14**, 2403 (2024).
85. Praetorius, F. et al. Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature* **552**, 84–87 (2017).
86. Hahn, J., Wickham, S. F. J., Shih, W. M. & Perrault, S. D. Addressing the instability of DNA nanostructures in tissue culture. *ACS Nano* **8**, 8765–8775 (2014).
87. Gerling, T., Kube, M., Kick, B. & Dietz, H. Sequence-programmable covalent bonding of designed DNA assemblies. *Sci. Adv.* **4**, eaau1157 (2018).
88. Stahl, E., Martin, T. G., Praetorius, F. & Dietz, H. Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 12735–12740 (2014).
89. Syed, A. M. et al. Liposome imaging in optically cleared tissues. *Nano Lett.* **20**, 1362–1369 (2020).
90. Dai, Z., Gjetting, T., Matthebjerg, M. A., Wu, C. & Andresen, T. L. Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials* **32**, 8626–8634 (2011).
91. Pramme-Steinwachs, I., Jastroch, M. & Ussar, S. Extracellular calcium modulates brown adipocyte differentiation and identity. *Sci. Rep.* **7**, 8888 (2017).
92. Khalin, I. et al. Ultrabright fluorescent polymeric nanoparticles with a stealth pluronic shell for live tracking in the mouse brain. *ACS Nano* **14**, 9755–9770 (2020).
93. Isensee, F. et al. nnU-Net: self-adapting framework for U-Net-based medical image segmentation. Preprint at <https://arxiv.org/abs/1809.10486> (2018).
94. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S. & Ralser, M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat. Methods* **17**, 41–44 (2020).

95. Luo, J. et al. Nanocarrier imaging at single-cell resolution across entire mouse bodies with deep learning. *PRIDE* <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD056871> (2024).
96. Luo, J. et al. Nanocarrier imaging at single-cell resolution across entire mouse bodies with deep learning. *GitHub* <https://github.com/erturklab/SCP-Nano> (2024).

Acknowledgements

This work was supported by the Vascular Dementia Research Foundation; the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy within the framework of the Munich Cluster for Systems Neurology (EXC 2145 SyNergy, grant no. ID 390857198); and DFG grants SFB 1052, project A9, and TR 296, project O3. Additional support came from the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)) within the NATON collaboration (grant no. 01KX2121); a European Research Council Consolidator grant (no. GA 865323, A.E.); and a Nomis Heart Atlas project grant (Nomis Foundation). BMBF (HIVacToGC) and Helmholtz AI (ZT-I-PF-5-094) also provided funding. M.M. was supported by the Turkish Ministry of Education for her PhD studies. I.K. was supported by DFG grant 457586042. A.L. was supported by the Vascular Dementia Research Foundation, the European Research Council (ERC-StGs 802305) and the DFG under Germany's Excellence Strategy (EXC 2145 SyNergy – ID 390857198) and through FOR 2879 (LI-2534/5-1). Both Z.R. and Y.C. were supported by the China Scholarship Council for their PhD studies. We thank J. Cui for the dynamic light scattering measurements.

Author contributions

A.E. conceived and led the whole project, including the entire sections on the AI development, LNPs and AAVs. A.E. and H.D. led the research around DNA origami design and imaging. J.L. performed most of the experiments on lipid nanoparticles and AAVs. M.M. performed most of the experiments on DNA origami nanoparticles and proteomics sample preparation. Y.C., I.H., R.A.-M. and J.P. developed the SCP-Nano analysis algorithm and analyzed data for lipid nanoparticles, origamis and AAVs. K.K. co-conducted most of the experiments on lipid nanoparticle sections. K.K. and C.K. conducted experiments on liposomes and polyplexes as well as the protein corona experiments. B.K. designed and produced all the DNA origami particles. S.Z. and V.S. carried out sample collection and experiments during the project's initial phase. S.Z. also performed immunohistochemistry of liver samples. I.S., J.L. and S.U. designed and conducted adipose tissue and adipocyte cell culture experiments. M.A. conducted the proteomics analysis. H.S.B. and D.-P.M. were responsible for proteomics sample preparation and mass spectrometry. M.N. analyzed the PHP.eB-AAV distribution in cell bodies across different brain regions. L.H. created virtual reality (VR) videos. G.M.C., B.G. and N.P. designed and executed two types of AAV injections. J.S. and U.P. designed and conducted vaccine/lipid nanoparticle injections. Z.R. carried out the confocal imaging. N.G. was responsible for organ annotation using VR. T.-L.O. acquired whole body images of non-targeted DNA origami and collaborated with M.I.T. for reconstruction. S.R., A.S. and V.S. undertook flow cytometry for immunogenicity assessments. D.J. managed the injection experiments and vDISCO clearing. I.K. performed two-photon intravital imaging of DNA origami in pial vessels. C.P., S.Z. and M.M. executed the transcatheter injection of MDA-MB-231 cells. A.L. oversaw parts of the experiments (flow cytometry and FACS) and contributed to manuscript editing. A.E., M.E. and F.H. provided overall supervision for the project. J.L. wrote the initial draft of the manuscript; M.E. revised the manuscript; and

A.E. wrote the final version. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding

Open access funding provided by Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH).

Competing interests

A.E., J.L., K.K., I.H. and R.A.-M. have filed for intellectual property on AI-based technologies described herein. A.E. is a co-founder of Deep Piction. The other authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02528-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Hendrik Dietz or Ali Erturk.

Peer review information *Nature Biotechnology* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.