

令和元年6月16日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12916

研究課題名(和文)超音波応答性ナノバブルによる抗体デリバリーシステムの開発と乳がん治療戦略

研究課題名(英文) Development of antibody delivery system by ultrasound responsive nano bubble and breast cancer treatment strategy

研究代表者

根岸 洋一 (Negishi, Yoichi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50286978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究遂行により、新規Fc領域結合ポリペプチドを利用した抗体修飾バブルリポソーム(BLs)の開発に成功し、がん組織の効率的な超音波診断造影が可能となることを明らかとした。さらに治療用超音波の併用で乳がん細胞への抗体デリバリーが可能となることを示した。またFc領域結合ポリペプチドを用いることで、様々な抗体をBLsに簡便に修飾できることも明らかとした。本成果は、乳がんのみならず他の難治性がんへの応用や非侵襲性の高い診断・治療(セラノスティクス)システムの構築に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fc領域結合ペプチドを用いた新規抗体修飾バブルリポソームの開発に成功し、がん組織の効率的超音波診断造影、治療用超音波併用による乳がん細胞への抗体デリバリーの可能性を明らかとした。本成果は、診断と治療の融合を可能とする多機能型の新規抗体デリバリーツールの開発に繋がることから学術的に意義深い。本基盤技術は、がん治療分野のみならず、他疾患への抗体療法にも応用可能であり、抗体医薬品の低投与化に伴う医療費削減に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the antibody-modified Bubble liposomes (BLs) using Fc-region-binding polypeptide. The ultrasound (US) contrast imaging of the antibody-modified BLs was shown to be prolonged, compared to non-modified BLs. In addition, the antibody was delivered in breast cancer cells by the combination of antibody-modified BLs and therapeutic US. The antibody modification method for BLs could be also applied to various antibodies via an Fc region. Thus, the combination therapy of antibody-modified BLs using Fc-region-binding polypeptide and US may be applied to refractory cancer other than breast cancer and be expected to construct noninvasive diagnostic and therapeutic (Theranostics) systems in cancer disease.

研究分野：超音波DDS

キーワード：ターゲティング 乳がん 抗体デリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性に高頻度に発症するがんであり、十数名に一人の割合で罹患することから、有益な治療法の開発は急務とされている。現在、乳がん細胞に HER2 受容体が高発現している患者に対し、本受容体特異的な抗体医薬 (ハーセプチン) による治療が施行されているが、抗体医薬は他の医薬と比べ非常に高価であることから、患者の治療費軽減には、抗体医薬の低投与量化を可能とする抗体デリバリーシステムの開発は必要不可欠である。これまでに申請者らは導入遺伝子の封入や標的指向性を付与することが可能なリポソームに診断用超音波造影ガスを封入した微小気泡 (ナノバブル) であるバブルリポソームを開発し、新規の遺伝子導入ツールとなること、また超音波造影が可能であることを示してきた。近年、申請者らは高分子量の蛍光修飾核酸オリゴやプラスミドをマウスへと経静脈的投与を行ない、経皮的に超音波照射するとバブルの崩壊に伴う血管透過性や血液閥門透過性が高まり、照射部位選択的に血管外組織 (筋肉や脳内等) へと劇的に送達導入できることを見出している。この方法により分子量約 2000 kDa までの高分子も送達可能となることも明らかとしている。よって抗体のような約 70 kDa 前後の分子の標的組織への送達が十分可能となると考えられる。以上の背景を踏まえ、申請者らはバブルリポソームと治療用超音波の併用が、乳がん組織への抗体送達法の課題を克服する有力な手段となると期待した。即ち、乳がん治療に特化した抗体搭載バブルリポソームをがん組織へと集積させ超音波照射することで、がん組織内の透過性が亢進し、標的細胞への選択的作用も可能となることから、乳がん治療のための効率的な抗体デリバリーシステムが構築できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、乳がんの標的化治療に資するヒト型抗体医薬を搭載した新規バブルリポソームを開発し、超音波照射併用による安全かつ効率的な抗体デリバリーシステムの構築を目指す。乳がん組織内への抗体医薬の導入に最適化した新規バブルリポソームの調製を行ない、担がんモデル動物を用い新規抗体修飾バブルリポソームと超音波照射併用による抗体デリバリー効率と治療の可能性を検証し、新たな抗体デリバリーシステムによる乳がん治療戦略の具体的な方策を考える。本システムは、抗体搭載バブルリポソームを担がんモデル動物への静脈内投与後、乳がん組織に集積させた後にピンポイントの超音波照射を行うことを目指している。本システムが実行可能となれば、非侵襲的かつ効率的な抗体医薬デリバリーが実現できる。本研究成果は、高価な抗体医薬の低投与量化と医療費削減に繋がり、がん治療分野への貢献が大いに期待される。

3. 研究の方法

(1) Fc 領域結合ポリペプチドの精製

Protein A または Protein G 由来の Fc 領域結合ポリペプチド (Fc-A59 polypeptide, Fc-G67 polypeptide) を大腸菌株 BL21 を用いて発現させた。Fc 領域結合ポリペプチドの遺伝子配列を組み込んだ BL21 を MagicMedia™ E. coli Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて培養した。培養終了後、培地を遠心分離し得られたペレットに PBS を加えて懸濁させた。懸濁液をプローブ型超音波照射装置でソニケーションを行ない、不溶性分画を除去後、グルタチオン Sepharose カラム (GE Healthcare Bio-Sciences) にて精製した。得られたポリペプチドは SDS-PAGE にて確認した。ポリペプチドの IgG Fc 領域に対する結合性は、ELISA 法を用いて確認した。

(2) Fc 領域結合ペプチドを利用した抗体修飾リポソーム・バブルリポソームの調製

基本脂質として 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、distearoylphosphatidylethanolamine-PEG₂₀₀₀-OMe (DSPE-PEG₂₀₀₀-OMe) を用い脂質組成が DSPC: DSPE-PEG₂₀₀₀ = 94: 4 (molar ratio) となるように REV 法にてリポソームを作製した。次いでマレイル化 PEG 脂質に Fc 領域結合ポリペプチドを結合させた脂質を用い、最終的な脂質組成として PEG 含有率が総脂質に対し 6 mol%、ポリペプチドが 0.5 mol% となるようポストインサーション法を用いてペプチド修飾を行った。Fc 領域結合ポリペプチド修飾リポソームに抗体を添加し、室温で 15 分インキュベートすることで、抗体修飾リポソームとした。使用した抗体として、血管内皮細胞に発現する CD146 に対する抗体 (マウス CD146 ポリクローナル抗体: m146-pAb)、また乳がん及び卵巣がんを高発現する HER2 に対する抗体 (抗 HER2scFv-Fc: 4D5-Fc) を用いた。

抗体修飾リポソームをガラスバイアルに注入した後に、超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガス (C₃F₈) を充填した。これをバス型ソニケーターを用いて超音波処理することで抗体修飾バブルリポソームを作製した。細胞との相互作用性の評価において、脂溶性カルボシアニン色素である 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI) を脂質量に対し 0.1 mol% となるように加え調製した。リポソーム・バブルリポソームの粒子径は NICOMP 380 ZLS (Particle Sizing Systems, Inc.) を用いて測定した。

(3) *In vitro* における抗体修飾リポソーム・バブルリポソームの細胞相互作用性の評価

CD146 を発現する細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及び HER2 を発現する細胞

であるヒト卵巣がん細胞 (SKOV3)を用いた。96 well プレートに細胞を播種し (3×10^4 cells/well)、24 時間後に 1%BSA-PBS にてブロッキング処理を行ない、リポソームまたはバブルリポソームを添加した。リポソームにおける細胞との相互作用性の検討では、DiI 標識したリポソーム (lipid: 100 $\mu\text{g}/\text{well}$)を添加し 5% CO_2 、37°C条件下で相互作用させた後、1%BSA-PBS で洗浄、4% Paraformaldehyde で細胞を固定後 DAPI にて細胞核を染色し、オールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE, BZ-X700)によりリポソームの蛍光を観察した。バブルリポソームにおける細胞との相互作用性の検討では、細胞播種後バブルリポソームと培地の混合液 (lipid: 60 $\mu\text{g}/420 \mu\text{l}$)を添加し、シーリングフィルムを用いてプレートシール後プレートを反転させ 5% CO_2 、37°C条件下で相互作用させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

(4) *In vivo* における抗体修飾バブルリポソームのがん組織超音波イメージング

SKOV3 (5×10^6 cells/mouse)を KSN ノードマウスの皮下移植した担がんモデルマウス (腫瘍径: 約 100 mm^3)に抗 CD146 抗体修飾バブルリポソーム (脂質量として 200 $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$)を尾静脈投与し超音波診断装置 (Aplio80, 東芝)を用いてがん組織の超音波造影を行なった。

なお今回は、ヒト乳がん細胞 (SKBR3)を用いて担がんモデルマウスを作製したが、移植細胞塊の成長が不良であったため、その代替えとして HER2 発現細胞株として SKBR3 を利用した。

(5) 超音波照射と抗体修飾バブルリポソームを併用した細胞への抗体デリバリー

96 well プレートにヒト乳がん細胞 (SKBR3)を播種し (3×10^4 cells/well)、24 時間後に 1%BSA-PBS にてブロッキング処理を行なった。その後、蛍光ラベル化した抗体を修飾したバブルリポソームと培地の混合液 (lipid: 60 $\mu\text{g}/420 \mu\text{l}$)に超音波照射 (frequency, 1 MHz; duty, 50%; intensity, 2.0 W/cm^2)を行なったものを添加し、蛍光顕微鏡にてバブルリポソームと抗体の細胞内分布を観察した。

4. 研究成果

(1) Fc 領域結合ポリペプチドの精製とペプチドの機能評価

抗体医薬の導入に最適化した新規バブルリポソームの調製を行なうため、Protein A または Protein G に由来する Fc 領域結合リンカーポリペプチド (Fc-A59 polypeptide, Fc-G67 polypeptide) の作製を試みた。これらポリペプチドは大腸菌内から発現させ、GST 融合ペプチドとしてアフィニティー精製した。精製したポリペプチドの SDS-PAGE の結果から、高純度のポリペプチドが得られることを確認できた。更にこれらポリペプチドのヒト IgG Fc に対する結合性を検討したところ、精製したポリペプチドは IgG Fc 領域に強い親和性を有することが明らかとなった。このことから Fc 領域結合リンカーポリペプチドは、リポソームに抗体への修飾能を付与するリンカーペプチドとして有用であることが示唆された。

(2) Fc 領域結合ペプチドによる抗体修飾リポソーム・バブルリポソームの調製と物性評価

精製したポリペプチドを修飾したマレイル化 PEG 脂質をポストインサージョン法を用いてリポソームに修飾しその後抗体を添加したものを抗体修飾リポソームとした。抗 CD146 抗体を修飾したリポソーム (m146-Lips)、抗 HER2 抗体を修飾したリポソーム (4D5-Lips)のいずれもおよそ 170 nm の粒子径を示し、粒子径分布も正規分布であることを示した。

抗体修飾リポソームを超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンガスをを用いてバブル化し、抗体修飾バブルリポソームを調製した (m146-BLs, 4D5-BLs)。抗体未修飾のバブルリポソーム (PEG-BLs)、並びに抗 CD146 抗体修飾バブルリポソーム (m146-BLs)、抗 HER2 抗体修飾バブルリポソーム (4D5-BLs)のいずれも、およそ 600 nm の粒子径となり、抗体修飾の有無に関わらず、均一な粒子であることが認められた。

(3) *In vitro* における抗体修飾リポソーム・バブルリポソームの細胞との相互作用性

調製した抗体修飾リポソーム・バブルリポソームの標的指向性を評価するため、蛍光顕微鏡を用いて細胞との相互作用を検討した。まず Fc 領域結合ポリペプチドを用いた抗体修飾が可能かどうか検証するため、抗体修飾リポソームと細胞との相互作用を確認した。CD146 を発現している HUVEC において、抗 CD146 抗体を修飾している m146-Lips 添加群のみ細胞内取り込みが観察されたものの、抗体未修飾リポソーム (PEG-Lips)及び抗 HER2 抗体を修飾した 4D5-Lips 添加群での取り込みは観察されなかった。一方で HER2 を発現している SKOV3 においては、4D5-Lips 添加群においてのみ細胞内取り込みが観察され、その他の群においてリポソームの細胞内取り込みは観察されなかった。このことから、Fc 領域結合ポリペプチドは抗体をリポソームに修飾するためのリンカーとして機能することが明らかとなった。

次に抗体修飾リポソームを超音波処理し超音波造影ガスを内封後も抗体修飾が保持されているのかを検証するため、抗体修飾バブルリポソームでも同様の検討を試みた。リポソームを用いた場合と同様、m146-BLs は HUVEC に対してのみ顕著な細胞相互作用性を示し、4D5-BLs の場合においては SKOV3 にのみ細胞相互作用性を示した。結果から、超音波処理を行なっても、依然として抗体がリポソーム表面に提示されていることが示された。以上より、Fc 領域結合ポリペプチドを用いることで Fc 領域を有する抗体は、容易にリポソーム・

バブルリポソーム表面に搭載することが可能であり、また、バブル化の際に行う超音波処理後でも結合は保持されていることから、Fc 領域結合ポリペプチドを用いた抗体修飾法は、抗体搭載バブルリポソームの調製に適用可能であることが示唆された。

(4) *In vitro* における抗体修飾バブルリポソームのがん組織超音波イメージング

In vitro において Fc 領域結合ポリペプチドを利用した抗体修飾バブルリポソームの標的指向性が示されたので、次に担がんモデルマウスを用いてがん組織への超音波造影能を指標に抗体修飾バブルリポソームの *in vivo* での有用性を評価した。m146-BLs 及び抗体未修飾 BLs (PEG-BLs) を尾静脈注射により全身投与し、がん組織に対する超音波造影画像を観察したところ、PEG-BLs 投与群では 5 分程度の超音波造影能であるのに対し、m146-BLs 投与群では 20 分程度までがん組織を描出することが可能となった (Fig. 5)。近年 CD146 は、VEGFR2 の共受容体であり、血管内皮細胞に対する標的分子として有用であるとの報告がある (Jiang T et al., *Blood*, 2012, 120, 2330-2339)。したがって m146-BLs が、がん組織内の血管を標的とした結果、長時間の超音波造影を可能となったことが示唆される。またこの結果より、ポリペプチドにより修飾された抗体は、血流中のタンパク成分や IgG などと置き換わることなく、バブルリポソームに保持されたままであることが示唆された。以上、今回調製したポリペプチドを利用した抗体修飾バブルリポソームは *in vivo* においても抗体を保持し、がん組織に集積する抗体デリバリーキャリアとして有用であることが示唆された。

(5) 超音波照射と抗体修飾バブルリポソームを併用した細胞への抗体デリバリー

次に抗体修飾バブルリポソームと治療用超音波を併用することで、バブルリポソームに修飾した抗体を細胞内へとデリバリーすることが可能かを検証した。FITC を用いて蛍光ラベル化した抗 HER2 抗体 (4D5-Fc) 及び IgG 抗体を修飾した DiI 標識バブルリポソームに治療用超音波を照射した混合物を SKBR3 に添加し細胞との相互作用を観察した。IgG 抗体修飾バブルリポソームと超音波照射併用群では抗体の蛍光はほとんど観察されなかった一方、4D5-BLs と超音波照射群では広範囲に抗 HER2 抗体が細胞に行き渡っているのが観察された。また観察された蛍光は抗体由来の FITC のみで、バブルリポソームに由来する DiI の蛍光はほとんど観察されなかったことから、抗体のみが効率的に送達されていることが示唆された。今後 Fc 領域結合ポリペプチドを用いて臨床で用いられているハーセプチンをバブルリポソームに搭載することで、抗体搭載バブルリポソームと治療用超音波の併用はがん治療を視野に入れた効率的な抗体デリバリー法として有用な手段となることが期待できる。

以上本研究より、Fc 領域結合ポリペプチドを用いた新規抗体修飾バブルリポソームの開発に成功した。Fc 領域結合ポリペプチドを用いることで、様々な抗体が簡単に修飾可能となり、結果がん組織に対する長時間の超音波造影を可能にするなど、*in vivo* においても有用であることを明らかとした。加えて治療用超音波と本抗体修飾バブルリポソームを併用することで乳がん細胞へ抗体デリバリーが可能となり得ることを示した。このことから乳がんに対する非侵襲性の高い診断・治療 (セラノスティクス) システムの構築に繋がることが期待される。本研究で得られた知見並びに基盤技術は、乳がんのみならず他の難治性がんへの応用や抗体医薬品の低投与化とそれに伴う医療費削減に繋がり、がん治療分野全体への貢献が大いに期待できるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Nobuhito Hamano, Sho Kamoshida, Yamato Kikkawa, Yusuke Yano, Tomomi Kobayashi, Yoko Endo-Takahashi, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yuji Ito, Motoyoshi Nomizu, Yoichi Negishi. Development of antibody-modified nanobubbles using Fc-region-binding polypeptide for ultrasound imaging, *Pharmaceutics*, 査読有, doi: 10.3390/pharmaceutics11060283.

[学会発表](計 5 件)

鴨志田翔、矢野結友、吉川大和、田中悠介、高橋葉子、野水基義、鈴木亮、丸山一雄、根岸洋一、Fc 結合ドメインペプチドを利用したがん細胞標的化抗体修飾ナノ粒子の調製法の検討、日本薬剤学会第 33 年会、2018 年 5 月、静岡

小林知美、濱野展人、鴨志田翔、矢野結友、吉川大和、田中悠介、高橋葉子、野水基義、鈴木亮、丸山一雄、根岸洋一、Fc 領域結合ペプチドを利用したがん標的抗体修飾リポソームの調整とその有用性の評価、第 62 回日本薬学会関東支部大会、2018 年 9 月、東京

矢野結友、鴨志田翔、小林知美、濱野展人、吉川大和、田中悠介、高橋葉子、野水基義、鈴木亮、丸山一雄、根岸洋一、がん組織の超音波造影を可能とする Fc 領域結合ペプチドを利用したがん標的抗体修飾バブルリポソームの開発、第 17 回日本超音波治療研究会、2018 年 11 月、東京

矢野結友、鴨志田翔、小林知美、濱野展人、吉川大和、高橋葉子、野水基義、鈴木亮、丸山一雄、根岸洋一、Fc領域結合ペプチドを利用したがん標的化抗体修飾ナノ粒子の開発、日本薬学会第139年会、2019年3月、千葉

矢野結友、濱野展人、小林知美、吉川大和、高橋葉子、野水基義、鈴木亮、丸山一雄、根岸洋一、Fc領域結合ペプチドを利用した抗体修飾ナノバブルの調製法の確立、日本薬剤学会第34年会2019年5月、富山

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名： 根岸 洋一

ローマ字氏名： (Yoichi NEGISHI)

所属研究機関名： 東京薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 50286978

(2) 研究分担者

研究分担者氏名： 吉川 大和

ローマ字氏名： (Yamato KIKKAWA)

所属研究機関名： 東京薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 准教授

研究者番号(8桁)： 20274227

(3) 連携研究者

連携研究者氏名：高橋(遠藤) 葉子

ローマ字氏名：(Yoko ENDO-TAKAHASHI)

所属研究機関名： 東京薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 助教

研究者番号(8桁)： 30453806

連携研究者氏名：丸山 一雄

ローマ字氏名：(Kazuo MARUYAMA)

所属研究機関名： 帝京大学

部局名： 薬学部

職名： 特任教授

研究者番号(8桁)： 30130040

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：濱野 展人

ローマ字氏名：(Nobuhito HAMANO)

所属研究機関名：東京薬科大学

部局名： 薬学部

職名： 嘱託研究員

研究者番号(8桁)： 80708397

研究協力者氏名：伊東 祐二
ローマ字氏名：(Yuji ITO)
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：理工学研究域理学系
職名：教授
研究者番号(8桁)：25460151

研究協力者氏名：鈴木 亮
ローマ字氏名：(Ryo SUZUKI)
所属研究機関名：帝京大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：90384784

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。