

令和元年6月18日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18952

研究課題名(和文) 光刺激応答性リポソームを用いたがんのセラノスティクスに関する基礎研究

研究課題名(英文) Cancer theranostics by using light-sensitive liposomes

研究代表者

田上 辰秋 (Tagami, Tatsuaki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：10609887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光を用いたドラッグデリバリー・イメージング融合技術(セラノスティクス)に関する基礎研究を行った。安全で生体透過性が高い近赤外線レーザーと、脂質ナノカプセルであるリポソームを組み合わせ、がん組織にレーザーを照射することで、がん組織に到達したリポソームが光に反応して内部薬物(抗がん剤・光増感剤)を放出できるような光刺激応答性リポソーム、さらにリポソームおよび放出される薬物をモニターできるような蛍光イメージング用の極小ナノキャリア(金ナノクラスター)の作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの構造は不均一であり、がん組織に到達する薬物量は、患者によって大きく異なるため、がんに対する治療効果は個人差が大きい。このため、「ドラッグデリバリーによる治療」と同時に、がん組織中に必要量の治療薬物が到達したどうか、モニターできる「イメージングによる診断」を行うことが重要であり、治療(Therapy)と診断(Diagnostic)を融合させた治療様式である、セラノスティクス(Theranostics)が注目されている。本研究はセラノスティクスに関する基礎研究として、有用な情報を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on the fused technology of drug delivery and imaging by using light, which is called "Theranostics". Near-infrared laser which is safe and has high permeability was used for the experiment with liposome which is lipid nanocapsule. We estimated that light-sensitive liposome is accumulated into the cancer tissue and the irradiation of near-infrared laser make the liposomes broken in the site, resulting in the drug release in cancer tissue. We assumed the liposome which contains fluorescence gold nanocluster is also useful for the monitoring of liposome in vitro and in vivo.

研究分野：薬剤学

キーワード：リポソーム ドラッグデリバリーシステム(DDS) 光刺激応答性リポソーム セラノスティクス がんDD

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

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、筆者は、がん治療に向けた革新的なドラッグデリバリー技術として、超高感度の温熱感受性リポソームの開発を行ってきた<sup>1, 2)</sup>。これは、熱を加えることで(40-42℃)リポソームに含有されているPEG系界面活性剤がリポソーム表面上でナノサイズの穴を形成するため、リポソーム内部の薬物を短時間の間に大量に放出することができるというものである。がん組織を加熱しておくことで、がん組織内に高濃度の抗がん剤が暴露されるため、顕著な治療効果が期待できる。

しかしながら、がんの構造は不均一であり、がん組織に到達する薬物量は、患者によって大きく異なるため、がんに対する治療効果は個人差が大きい。このため、「ドラッグデリバリーによる治療」と同時に、がん組織中に必要量の治療薬物が到達したどうか、モニターできる「イメージングによる診断」を行うことが重要であり、治療(Therapy)と診断(Diagnostic)を融合させた治療様式である、セラノスティクス(Theranostics)に関する研究の重要性を認識するに至った。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究は、光を用いたドラッグデリバリー・イメージング融合技術(セラノスティクス)に関する基礎研究を行った。安全で生体透過性が高い近赤外線レーザーと、脂質ナノカプセルであるリポソームを組み合わせ、がん組織にレーザーを照射することで、がん組織に到達したリポソームが光に反応して内部薬物(抗がん剤・光増感剤)を放出できるような光刺激応答性リポソーム、さらにリポソームおよび放出される薬物をモニターできるような蛍光イメージング用の極小ナノキャリア(金ナノクラスター)の作成を行った。

### 3. 研究の方法

リポソームの調製と評価：光増感剤と抗がん剤を共封入したリポソームを逆相蒸発法により調製した。マイクロチューブに入れたリポソーム溶液に近赤外線レーザーを照射した。薬物放出量の測定は、蛍光物質のクエンチングを利用した測定法および、高速液体クロマトグラフィーを用いた薬物定量法を用いた。

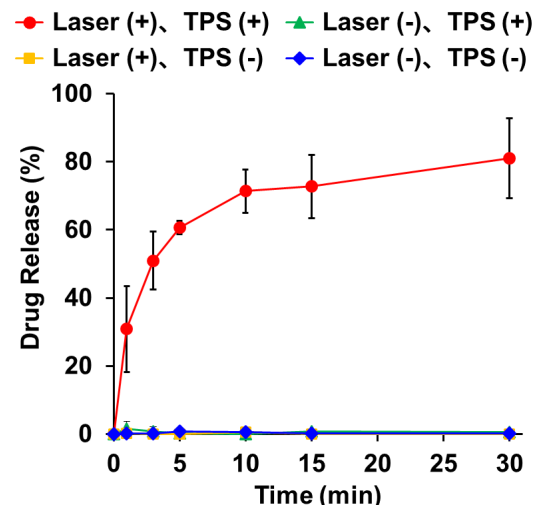
金ナノクラスターの調製：塩化金酸溶液に保護基(タンパク等)を加え、還元条件下で攪拌することで行った。金ナノクラスターの粒子径は、電子顕微鏡(TEM)および動的光散乱法により評価した。

### 4. 研究成果

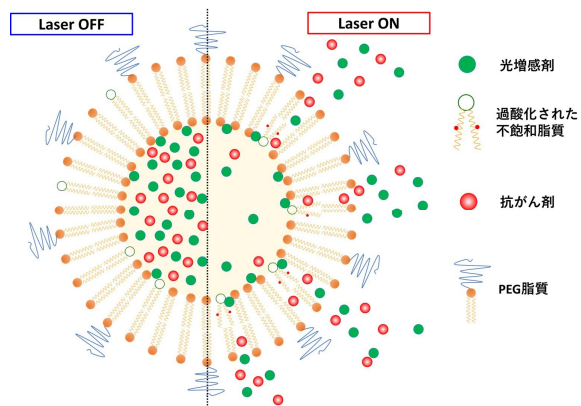
#### 光刺激応答性リポソームの調製と評価：

本研究計画では、近赤外線レーザーに反応して薬物放出する光刺激応答性リポソームの作製を試みた。脂質ナノカプセルであるリポソームの構成成分として、基本的なリン脂質であるDSPCとコレステロール、血液中での滞留を長くするためのものとして、PEG脂質であるPEG-DSPE、そして、不飽和脂肪酸を含む脂質であるDOPEの合計4種類の組成から構成されているリポソームを調製した。リポソームの中には水溶性の光増感剤としてタラポルフィンナトリウム(TPS)と水溶性抗がん剤であるゲムシタピンが共封入されている。

調製したリポソームに近赤外線レーザーを照射して薬物放出挙動を確認したところ、短時間で大部分の薬物を放出することを発見した(右図。Fuse et al., IJP. 2018)。比較対照として、TPSを含有していないリポソームにレーザーを照射したが薬物はほとんど放出されなかった。また、ヘルパー脂質として、DOPEを含有させた場合、少量のDOPEを含有させることでレーザー刺激に反応して顕著に薬物が放出された。また、放出メカニズムについては不明な部分があるが、筆者は、近赤外線レーザーを照射した場合、活性化した光増感剤がDOPEの不飽和脂質の化学構造の2重結合を過酸化し、その過酸化脂質がリポソームを不安定化することで薬物が漏出されているのではないかと考察している(次頁に放出メカニズムの考察図。田上. DDS.2018)。



がん細胞株(EMT6)を用いて、光刺激応答性リポソームが殺細胞効果にどのような影響を与えるか検討を行った。その結果、レーザー照射することにより、レーザーを照射しないグループよりと比較して顕著な殺細胞効果を得ることができた。また、抗がん剤であるゲムシタピンを共封入することにより、TPS 単独のものと比較して殺細胞効果を得ることができた。光増感剤を用いた光線力学療法と、抗がん剤を用いた化学療法との組み合わせは、新しいがん治療アプローチとして有用なもの1つになるとと思われる。



また、従来の光刺激応答性リポソームやナノキャリアは、光（近赤外）を吸収することで熱を持ち、温熱感受性リポソームのように働くものが多く研究されてきた。本研究は、それとは放出メカニズムが異なるため（レーザーを当てても温度は大きく上昇しない）ユニークな光刺激応答性リポソームであると考えている。

さらにこれまでに脂溶性光増感剤をリポソームに含有させた研究が行われてきたが、それらは脂溶性であるため体内に残存しやすく、副作用（光過敏症）が懸念されてきた。これに対してTPSは水溶性光増感剤であり、肺がんや脳腫瘍に対する光線力学療法として臨床で使用されている。化合物が実用化されているだけでなく、臨床使用されている照射強度の近赤外線レーザーを使用しているため、安全面においても比較的優れているのではないかとと思われる。

#### 金ナノクラスターの調製と評価：

ナノキャリアであるリポソームの中に封入したり、リポソーム表面に修飾したりできるようなイメージング用のナノ素材として、金ナノクラスターに着目した。これまでに筆者のグループは、金ナノ粒子をドラッグキャリアとしたドラッグデリバリーシステムの基礎研究を行ってきた<sup>3, 4)</sup>。金ナノ粒子は、大きさや形状を変えることにより、吸収される光の波長の異なることが知られている。さらに粒子径を小さくしてナノクラスターのサイズに調整することにより、金原子に近い性質を示すことが知られており、感光性を示すことが知られている。しかしながら、ドラッグデリバリーシステム分野において、金属ナノクラスターに関する研究はほとんどなく、本検討では、金ナノクラスターを調製した後、物性評価を行った。

まず、金ナノクラスターを調製する際にクラスター形成を保護するための保護基として、血液中に最も多く存在するタンパクであるアルブミンを用いて金ナノクラスターを調製した。その結果、紫外線を照射することにより、強い蛍光を発することを確認した。蛍光強度は、使用するタンパクと金溶液の混合比率によって異なることから、調製方法によって形成される金ナノクラスターが異なることにより、光学的性質も異なることが明らかとなった。また、使用するタンパクによっても蛍光性が異なることが分かった。

また、2 次的な研究成果としてラクトフェリンを保護基として金ナノクラスターを調製した場合、がん細胞への取り込み量が大きく向上したことを発見した。金ナノクラスターに抗がん剤を含有させることも可能であるため、金ナノクラスターをドラッグナノキャリアとして使用することが今後の展開として期待できる。

#### <引用文献>

- 1) Tagami T, Kubota M, Ozeki T. Effective Remote Loading of Doxorubicin into DPPC/Poloxamer 188 Hybrid Liposome to Retain Thermosensitive Property and the Assessment of Carrier-Based Acute Cytotoxicity for Pulmonary Administration. *J Pharm Sci.* (2015) 104(11):3824-32.
- 2) Tagami T, Ernsting MJ, Li SD. Optimization of a novel and improved thermosensitive liposome formulated with DPPC and a Brij surfactant using a robust in vitro system. *J Control Release.* (2011) 154(3):290-7.
- 3) Hoshikawa A, Tagami T, Morimura C, Fukushige K, Ozeki T. Ranibizumab biosimilar/polyethyleneglycol-conjugated gold nanoparticles as a novel drug delivery platform for age-related macular degeneration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* (2017)

38:45-50.

4) Hoshikawa A, Nagira M, Tane M, Fukushige K, Tagami T, Ozeki T. Preparation of curcumin-containing  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cyclodextrin/ polyethylene glycol- conjugated gold multifunctional nanoparticles and their in vitro cytotoxic effects on A549 cells. Biol Pharm Bull. (2018) 41:908-914.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fuse T, Tagami T, Tane M, Ozeki T. Effective light-triggered contents release from helper lipid-incorporated liposomes co-encapsulating gemcitabine and a water-soluble photosensitizer. Int J Pharm. (2018) 540(1-2): 50-56.

### 〔学会発表〕(計 5 件)

Tatsuaki Tagami. Liposomal drug delivery system and light-triggered drug release from functional liposome for the treatment with cancer. NCU-HU International Exchange Symposium, Nagoya, Japan, Nov. 29, 2018

田上辰秋. がん治療に有用な刺激応答性ナノメディシンの開発, 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部 合同学術大会 2018, 静岡県静岡市, 2018 年 11 月 4 日

田上辰秋, 竹内堂朗, 尾関哲也: 蛍光金ナノクラスターを含有した機能性リポソームの調製, 第 27 回静岡 DDS カンファランス, 静岡県静岡市, 2018 年 9 月 7 日

林原純季, 竹内堂朗, 田上辰秋, 尾関哲也: セラノスティクスに向けた金ナノクラスタータンパクナノ粒子の調製, 平成 29 年度界面特性を利用した粒子設計とプロセス開発に関するワークショップ, 岐阜県土岐市, 2017 年 8 月 29 日

太根将史, 布施俊樹, 田上辰秋, 尾関哲也: 光増感剤を利用した光刺激応答性リポソームの開発, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 京都府京都市, 2017 年 7 月 6~7 日

### 〔図書〕(計 1 件)

田上辰秋. がんおよび疾患部位におけるトリガーリリースに効果的な高感度の刺激応答性リポソームの開発. Drug Delivery System. (2018) 33(3):156-157

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

### 〔その他〕

ホームページ

URL: <http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/dds/>

## 6 . 研究組織

## 研究代表者のみ

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。