

令和 元 年 6 月 1 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17901

研究課題名(和文)細胞選択的侵入ペプチドを用いた新規がん治療薬の開発研究

研究課題名(英文)Development of a novel light-induced anti-cancer drug using cell-selective penetrating peptides

研究代表者

赤星 彰也(Akahoshi, Akiya)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特定事業研究員

研究者番号：00782773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000 円

研究成果の概要(和文)：今日では光線力学的療法や光免疫療法など光増感剤のような応答性分子を用いた研究が広く行われている。本研究の目的は、光で励起し、活性酸素種を産生する光増感剤を内包させた輸送担体を作製することで、がんなど特定の細胞の内部まで効率良く輸送担体を送達し、効果的に治療可能な手法の開発を行うことである。そのため、種々の光増感剤および細胞膜透過性ペプチドを輸送担体に組み込んだ複合体を作製し評価した。さらに、腫瘍細胞への標的能力の改善を目指した改変型細胞膜透過性ペプチドの設計と付与効果の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が行った本研究により、高分子ミセル型輸送担体内に数種類の光増感剤を簡便に内包できることを明らかにした。これにより、これまで化学反応を経由して搭載していた光増感剤をより簡単に搭載することが可能となり、効果の高い光増感剤を選択することができるなど、輸送担体に利用できる分子候補の幅を広げられることが期待できる。また、腫瘍部位でのみ光傷害性効果を発揮する機構を加えることにも組み組み腫瘍特異性を高めることにも成功した。本研究成果によって開発された輸送担体は、生体に毒性が少なく効果的にがん治療が行える新たなツールになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, research using photo-reaction such as photodynamic therapy and photoimmunotherapy is widely performed and reported. The purpose of this study is to develop a novel light-induced anti-cancer drug using cell-selective penetrating peptides and photosensitizers. We created a new transport carrier complex conjugated with the modified cell penetrating peptides and confirmed tumor cell targeting-ability of the complex.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：細胞膜透過性ペプチド 光増感剤 ドラッグデリバリーシステム

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

1. 研究開始当初の背景

今日では抗がん剤などの薬剤を内包する薬物送達用の製剤の開発が活発に行われ、薬剤に疾患部位指向性を持たせることや可視化させる技術が開発されている。この製剤として、長い間、脂質二重膜からなるリポソームが中心的なモデルとして基礎研究に用いられてきており、臨床の現場で使用されている。研究例が多いことから、リポソームは製剤として改良されてきているが、安定性の低さや細網内皮系への蓄積などの理由から未だ改善のための研究が行われており、研究段階のものも多い。

近年、生分解性・両親媒性ポリマー（親水部；ポリサルコシン、疎水部；ポリ乳酸）により形成される高分子ミセル型輸送担体「ラクトソーム」が開発された（Makino A. et al., *Biomaterials*, 2009）。高分子ミセル型輸送担体は、粒径制御を容易に行うことができ、ペプチドや蛍光色素など様々な機能性分子を担持させることが可能であることから注目を集めており、中でもラクトソームは、腫瘍へ効率良く集積し、網内系への蓄積も低く、さらには生分解性ポリマーを用いているために生体内で安全な分子に分解され毒性も低いという利点がある。その一方で我々のこれまでの研究で、ラクトソームは単体では腫瘍付近までは送達されるが、その後細胞内へ侵入する能力が乏しいことも分かった。我々はこれまでにラクトソームの細胞への取り込み率を増強させる研究に取り組み、細胞膜透過性ペプチド（CPP）を付加することでラクトソーム（輸送担体）が細胞内へと非常に効率よく取り込まれることを発見した（Akahoshi A. et al., *Science and technology of advanced materials*, 2016, 特願 2014-227611 号, 図 1）。また、同時に、がんなどの疾患を治療するための光線力学的療法や、薬剤などを細胞内へと導入する光化学的細胞内導入法に用いられる光増感剤を輸送担体に搭載することで、光照射による細胞傷害の誘導にも成功している。光増感剤は光に反応することで活性酸素種を産生し、この活性酸素種が導入や傷害に大きく寄与することが報告されている分子である。しかしながら、我々がこれまでに用いてきた光増感剤の励起波長は 400 nm 程度のものであり、課題（1）生体内ではこの波長域の光は透過しにくいこと、外部光源を用いる場合においては将来的な生体への応用が難しいことが考えられる。また、CPP を付加したラクトソームは弱い正電荷を帯びているために細胞内へと効率よく侵入していくことが分かっているが、課題（2）生体に投与する際には血中の負電荷を帯びている蛋白質などと複合体を形成してしまい腫瘍以外の組織にも送達されてしまい十分な効果が見込めない可能性も考えられる。そこで、本研究については、これまで研究してきた高分子ミセル型複合体についてこの上記 2 つの課題を解決することを目的とする。

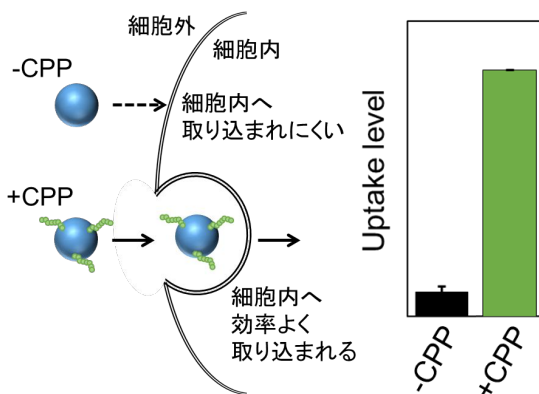


図 1. CPP 付加による細胞内への取り込み

2. 研究の目的

光増感剤を用いた代表的な光応答反応である光線力学的療法は近年、がんの治療方法にも使われはじめている。光線力学的療法は、*in vitro* や *in vivo* において反応を起こす場所や時間、時期を、光によって容易に制御できることから副作用が少ない手法として期待できる。本研究では、光で励起できる光増感剤を内包させた輸送担体を作製し、がんなどの特定の細胞内部まで効率良く送達することで効果的に治療可能な手法の開発を目指す。

3. 研究の方法

（1）近赤外光で励起される光増感剤の検討および輸送担体への組み込み

近赤外光付近（600 nm～）で励起されるクロリン、フタロシアニンなどの光増感剤を用いて、ラクトソームへ組み込めるか確認し、光照射することで活性酸素種を産生するかラジカル検出

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

薬 (Singlet Oxygen Sensor Green や Hydroxyphenyl Fluorescein など) を用いて評価した。また、どの程度搭載可能かについても吸光度測定やゲル濾過により検討した。これらの実験により、使用可能な光増感剤およびその搭載量などを決定した。

(2) 標的性を持たせた改変型 CPP の作製および輸送担体への搭載

我々がこれまで用いてきた細胞膜透過性ペプチド (CPP) は正電荷を帯びているため、血中の負電荷をもつ蛋白質などと会合し目的部位以外にも送達されてしまう。また、送達されると細胞内に非特異的に侵入していくことが懸念事項であった。この問題を改善するために、腫瘍部位のみで本来の CPP の効果を発揮するような改変型 CPP を作製した。実際には、CPP の電荷を打ち消すための負電荷配列のペプチドと腫瘍付近で産生されているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) により切断される配列を付加した改変型 CPP の作製を試みた。この改変型 CPP は、腫瘍付近に存在する MMP の働きによって付加した MMP 配列が切断され、本来の CPP として働くものである。(2) については電気泳動や HPLC、培養細胞での複合体の取り込み率で評価を行った。

4. 研究成果

(1) 近赤外光で励起される光増感剤の検討および輸送担体への組み込み

光照射により励起し活性酸素種を産生することが可能な光増感剤 (テトラフェニルポルフィリンやフタロシアニン、ローズベンガル) を両親媒性ポリマーから構成される高分子ミセル型輸送担体に組み込んだものを準備し、粒子径測定や吸光度測定により内包量や安定性などを評価した。その結果、種々の光増感剤を輸送担体に内包することが可能であることがわかった。本研究で用いた輸送担体はコア部分が疎水性であり、外側に親水性部分があるため作製後は水系の溶液によく溶け、内包された光増感剤は疎水性の分子のほうがより内包率が高かったという結果も得られた。また、初期に用いる光増感剤の量を増加させることで内包される光増感剤量も増加するが、これに比例して粒子径も増加することがわかった。これは疎水性の光増感剤が輸送担体自体がもつ疎水コア部と相互作用するためだと考えられる。

光増感剤を内包させた輸送担体を作製した後に、粒子の安定性の評価を行ったところ、37 の溶液中で最低でも 24 時間までは分解されず、粒子径および多分散度に大きな変化は見られなかったが、48 時間後では粒子径および多分散度が増加することを確認した (図 2)。

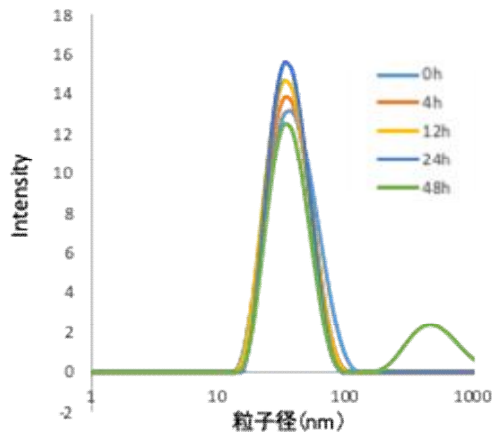


図2. 安定性の評価

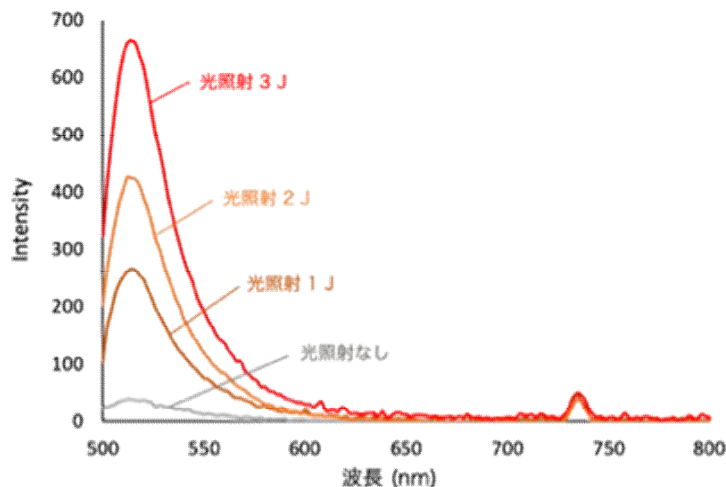


図3. 光増感剤内包輸送担体のラジカル検出の測定結果

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

さらに作製した光増感剤内包輸送担体に光を照射することで活性酸素種を産生することも確認できた(図3)。また、光増感剤内包輸送担体から産生される活性酸素種は光照射量依存的に増加することも確認した。

(2) 標的性を持たせた改変型 CPP の作製および輸送担体への搭載

細胞膜透過性ペプチド(CPP)は正電荷を帯びたペプチドで核酸やタンパク質などを細胞内に運び込むのを容易にすることが知られている。このような CPP のうち代表的な CPP である Tat を題材とし、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)により認識および切断される配列を付加した改変型 Tat の作製を行った。固相合成法により合成した改変型 Tat を(1)で用いた輸送担体にマイケル付加反応により連結させることで複合体を作製した。これを HeLa 細胞を用いて MMP の有無によって複合体が細胞内へ取り込まれる量が変化するか確認した。結果として、MMP 処理なしのものと比較して MMP で処理した改変型 Tat を含む複合体の方が細胞内へ取り込まれる割合が高い結果が得られた。ただし、MMP 処理なしのものでも細胞内に一定量は取り込まれるという結果も得られている。この点については CPP と MMP 認識・切断配列との間にリンカー配列を長めに設計するなど更なる検討により高効率の細胞内侵入能の選択性を得られるようにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9、C K - 1 9 (共通)

職名：

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。