

令和 3 年 2 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20094

研究課題名(和文) 生体内で高効率に酵素カスケード反応を誘起する革新的ナノリアクタの開発

研究課題名(英文) Development of innovative nanoreactor that induces enzyme cascade reaction in vivo

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵素補充療法(ERT)は、体内に足りない酵素を補充することで症状の改善を計る治療法で、疾患部位まで酵素を送り届け代謝を促すシステムを組み込んだ薬剤送達システム(DDS)は、とりわけ副作用の低い革新的治療法として期待されている。本課題では、これまでに確立した酵素の反応場として最適な構造を有するナノリアクタを基盤技術として、疾患の原因物質の酵素分解に加えて、酵素反応によって生じた重篤な副作用につながる有害物質をも別の酵素によって浄化可能な反応場を構築した。その結果、腫瘍を標的とし副作用の極めて低い酵素補充療法用ナノリアクタを開発することを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で得られた成果は、これまで報告された自己組織化集合体の中でもトップクラスの高い血中循環性能を有しており、「複数の酵素からなるカスケード反応を生体内で誘起する仕組み」は薬剤投与による副作用を著しく低下させる革新的な技術である。これらの技術は、患者のQOLを考えた上でも非常に意義深く、既存の薬剤の薬効を超えるドラッグデリバリーツールに発展することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Enzyme replacement therapy (ERT) is a treatment that improves symptoms by supplementing the enzymes that are lacking in the body. Among them, a drug delivery system (DDS) that incorporates a system that delivers an enzyme to a disease site and promotes metabolism is expected as an innovative therapeutic method with particularly low side effects. In this study, the basic technology is a nanoreactor that has an optimal structure as a reaction field for enzymes established so far. In addition to the enzymatic decomposition of the causative substance of the disease, we constructed a reaction field that can purify harmful substances caused by the enzymatic reaction that lead to serious side effects by another enzyme. As a result, we have succeeded in developing a nanoreactor for enzyme replacement therapy that targets tumors and has extremely low side effects.

研究分野：薬剤送達システム

キーワード：薬剤送達システム 酵素補充療法 ナノリアクタ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素補充療法 (Enzyme Replacement Therapy: ERT)は、体内に足りない酵素を補充することで症状の改善を計る治療法で、疾患部位まで酵素を送り届け代謝を促すシステムを組み込んだドラッグデリバリーシステム (DDS)は、とりわけ副作用の低い革新的治療法として期待されている。ERT を効果的に達成する為に DDS キャリアには、① 酵素を失活することなく封入でき、② 疾患部位に的確に運搬し、③ 標的物質がキャリアを透過し酵素と反応する『反応場』といった一連の機能が必要不可欠である。我々が開発した生体適合性に優れたポリエチレングリコールとポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなる荷電性高分子の静電相互作用による自己組織化 [ポリイオンコンプレックス (PIC)形成]を利用した一枚膜構造の PIC 型ベシクル(図 1)は、酵素を失活することなく封入でき、PIC 膜に特徴的な物質の膜透過性を示す。さらに PIC 型ベシクルを構成する PIC 膜を架橋することで、透過する物質の分子量を制御可能であるのみでなく、マウス体内において高い血中循環性(半減期 30 時間)を示す。一連の体内動態は物質を内水相に封入しても不変であることから、材料科学的視点から考えても PIC 型ベシクルの特徴は、生体内において『酵素の反応場』として最適であることは想像に難くない。実際に単一の酵素を封入した PIC 型ベシクルが、固形がんにおいてナノリアクタとして機能し「くすり」を作り、特定の低分子を「分解する」ことに成功している。しかしながら酵素反応による生成物の一部が生体内において有害であり、重篤な副作用を引き起こすことは珍しくない。例えば白血病の治療薬として広く使用される L-アスパラギナーゼ (L-ASNase)は、白血病細胞の栄養源である L-アスパラギン (L-Asn)を分解することで異常増幅した白血病細胞を栄養欠乏状態にすることで抗腫瘍効果を発揮するが、生成物の一つであるアンモニア分子が高アンモニア血症など多くの副作用を引き起こす。このような副作用が生じた場合、同様の酵素製剤による治療は不可能となるために、臨床において扱いづらい酵素製剤の 1 つである。

2. 研究の目的

本課題では「病因物質の酵素分解」に加えて、「酵素反応によって生じた生体内で重篤な副作用につながる有害物質をも別の酵素によって浄化」可能な反応場構築、すなわち 2 種類の異なる機能を有する酵素を共封入したデュアル酵素封入 PIC 型ベシクルを構築し (図 1)、内水相でカスケード反応を誘起することで副作用の低い酵素補充療法用 DDS の開発を目的とする。具体的には、PIC 型ベシクルを基盤技術とし『L-ASNase とアンモニアを解毒する作用のあるグルタミン合成酵素(GS)によるカスケード反応を高効率に誘起するような反応場を構築』し、血流中という厳しい環境において、白血病細胞にとっての栄養源を「分解」し、さらに有害物質を「浄化する」といった革新的なナノリアクタを創出し、酵素補充療法用 DDS に新しい方法論を持ち込むことを目的とした。

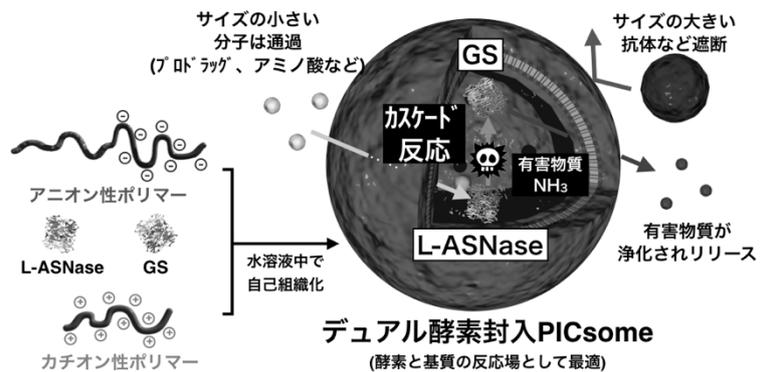


図1. 本課題の概念図

3. 研究の方法

(a) L-ASNase/GS@ PIC 型ベシクルの構築と基礎物性評価

血液中において L-Asn を分解し、異常増幅した白血病細胞を栄養欠乏状態にすることで抗腫瘍効果を発揮する L-ASNase と、その生成物であり副作用の要因になる NH₃ を解毒する GS を封入した L-ASNase/GS@ PIC 型ベシクルを調製した。得られた粒子のサイズは動的光散乱法 (DLS)を用いて評価し、また異なる蛍光色素(D488、Cy5)でラベル化した D488-L-ASNase および Cy5-GS を調製し、粒子 1 個あたりに封入される酵素の数や封入効率、さらに異なる酵素が同一の内水相中に封入されていることを蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いて評価した。

(b) 基質変換効率の最適化

(a)の評価により、L-ASNase および GS が同一 PIC 型ベシクル内に封入されていることが確認された後、低分子の基質である「(i) L-Asn が PIC 膜を透過し内水相に存在する L-ASNase と反応し生成物である L-アスパラギン酸 (L-Asp)と NH₃ を生成」、「(ii) 生成物の NH₃ が GS と反応してグルタミン (Gln)が生成」する過程を高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)を用いて評価した。またそれぞれの酵素が単独で封入された PIC 型ベシクル(L-ASNase @ PIC 型ベシクル、GS@ PIC 型ベシクル)を調製し、PIC 型ベシクルに異なる 2 種類の酵素が封入されたシステムの基質変換効率を比較した。

(c) 体内動態評価

(a)と同様に異なる蛍光色素で標識した D488-L-ASNase/Cy5-GS を封入した PIC 型ベシクルをマウスに尾静脈投与し、in vivo 共焦点顕微鏡を用いて、血中循環性および血流中においてもいづれの酵素も漏れることなく循環していることを、酵素に標識した蛍光の共局在を観察した。

(d) 白血病治療への展開

血液疾患の一つである白血病の化学治療へと展開した。一般的に白血病では、血中の白血球数が通常より著しく増加し、赤血球数が減少することが知られている。そこで本課題では、L-ASNase/GS@PIC 型ベシクルを急性白血病モデルマウス(免疫不全移植モデル)に投与し、経時的に採血を行い、血液に含まれる血球数を多項目自動血球計数装置で確認した。コントロール実験として臨床でも使用されている酵素製剤(L-ASNase, PEG-L-ASNase)に加えて PIC 型ベシクルに封入せずにカクテル投与した L-ASNase/GS と比較した。併せて LC/MS を用いて標的とするアミノ酸 (L-Asn, L-Asp, Gln)の定量と、アンモニアの定量については生化学自動分析装置を用いて評価した。

4. 研究成果

(a) L-ASNase/GS@PIC 型ベシクルの構築と基礎物性評価

L-ASNase/GS@PIC 型ベシクルの構築方法については、特許出願準備中のため公開不可。

調製した集合体は、DLS より直径 120 nm で単分散性(PDI=0.056)の高分子集合体を形成していることを確認した。また酢酸ウランルで染色し、透過型電子顕微鏡観察を行ったところベシクル構造に特徴的なナノ粒子を観察したことから、本高分子集合体が PIC 型ベシクルを形成していることを確認した。

また異なる蛍光色素で修飾した L-ASNase と GS を調製し、上記と同様の方法で PIC 型ベシクルを調製し、FCCS 及び FCS 測定を行った。FCCS 測定より、異なる蛍光色素を修飾した L-ASNase と GS の運動に相互相関が得られた。これはすなわち、同一の PIC 型ベシクルの内水相に目的どおり異なる 2 種類の酵素を封入できていることを強く支持する結果である。続いて調製条件(特許出願準備中のため公開不可)を詳細に検討したところ、FCS 測定より PIC 型ベシクル 1 粒子あたりに封入可能な酵素数は L-ASNase と GS でそれぞれ 0~3 個であることが明らかになった。

(b) 基質変換効率の最適化

上記で調製したそれぞれ封入個数の異なる「(I) L-ASNase/GS@PIC 型ベシクル」と、それぞれの酵素が単独で封入された PIC 型ベシクルを任意の割合で混合した「(II) L-ASNase@PIC 型ベシクル+GS@PIC 型ベシクル」、さらに PIC 型ベシクルに封入されておらず任意の割合で混合した「(III) L-ASNase と GS」に低分子の基質である L-アスパラギン(L-Asn)を添加し、生成物の NH3 が GS と反応してグルタミン (Gln)が生成する過程の経時変化(@3, 5, 15, 30, 60 分)を LC/MS を用いて評価した。その結果、最も基質変換効率が高いのは「(III) L-ASNase と GS」で 5 分後には約 97%の L-Asn が分解され、そのうち約 90%が Gln に変換されることが明らかとなった。一方、(I) と(II)に関して優位差はなく、15 分後で約 94%の L-Asn が分解され、そのうち約 92%が Gln に変換されることが明らかとなった。(III)が(I)、(II)と比べて基質変換効率が高い理由として、(I)と(II)は、それぞれの基質が PIC 膜を通過する必要があるためだと考えられる。

(c) 体内動態評価

(b)の結果を踏まえ、(a)と同様に異なる蛍光色素で標識した「(I) L-ASNase/GS@PIC 型ベシクル」、「(II) L-ASNase@PIC 型ベシクル+GS@PIC 型ベシクル」、「(III) L-ASNase と GS」をそれぞれマウスに尾静脈投与し、投与 1 時間後に採血し血中循環性を評価した(図 2)。その結果、(I)と(II)については L-ASNase と GS 共に高い血中循環性(60 分後でおおよそ 90%が血中に残存)を示したのに対し、(III)は酵素単体を投与していることもあり、いずれも血中残存量は著しく低かった。また「(I) L-ASNase/GS@PIC 型ベシクル」、「(II) L-ASNase@PIC 型ベシクル+GS@PIC 型ベシクル」について、血流中においてもいずれの酵素も漏れることなく循環していることを、酵素に標識した蛍光の局在を IVRTCLSM 観察で評価した。まず(II)については、異なる PIC 型ベシクルにそれぞれ異なる酵素を封入しているために、蛍光の共局在は確認されなかったが、蛍光強度の消失などは確認されなかったことから、血流中での放出は著しく低いと考えられる。また(I)については、同一の PIC 型ベシクル中に異なる酵素が封入されていることから血流中で蛍光の共局在が確認され、さらに共局在の減衰などは確認されなかったことから、こちらも血流中での放出は著しく低いと考えられる。

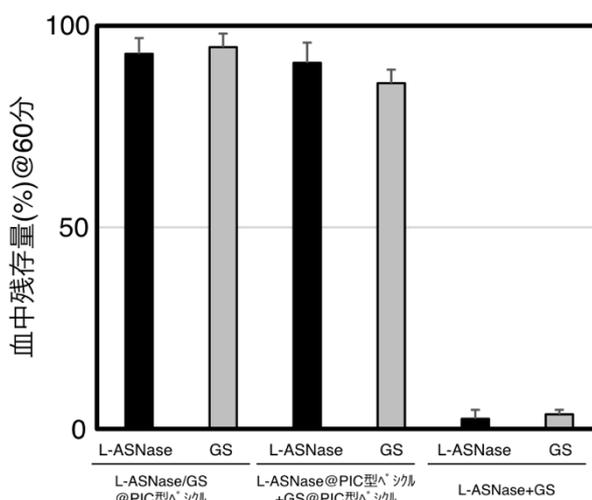


図2. L-ASNase/GS@PIC型ベシクル, L-ASNase@PIC型ベシクル +GS@PIC型ベシクル, L-ASNase+GSの血中安定性評価

(d) 白血病治療への展開

「(I) L-ASNase/GS@PIC 型ベシクル」、「(II) L-ASNase@PIC 型ベシクル+GS@PIC 型ベシクル」、

「(III)L-ASNase と GS」を急性白血病モデルマウス(免疫不全移植モデル)に投与し、投与 1 日後に採血を行い、血液に含まれる標的とするアミノ酸 (L-Asn, L-Asp, Gln)の定量と、アンモニアの定量を評価した。その結果、本課題で標的とする有害物質であるアンモニアの生成量は、未投与群と比較して、(I) 52%、(II) 82%、(III) 123%であった。まず(III)に関しては、(c)で確認したように GS の血中循環性が低いためにアンモニアの浄化が機能しなかったために、生成量が増加したと考えられる。また(I)と(II)では優位な差が確認されたが、この結果は申請者の提案通り、「同一粒子内に異なる酵素を封入しているシステムの方が血流中で高い酵素カスケード反応を惹起する」ことを支持する結果と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Suzuki, Y. Miura, Y. Mochida, T. Miyazaki, K. Toh, Y. Anraku, V. Melo, X. Liu, T. Ishii, O. Nagano, H. Saka, H. Cabral, K. Kataoka	4. 巻 301
2. 論文標題 Glucose transporter 1-mediated vascular translocation of nanomedicines enhances accumulation and efficacy in solid tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 28-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2019.02.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 B. -S. Kim, S. Chuanoi, T. Suma, Y. Anraku, K. Hayashi, M. Naito, H. -J. Kim, I. C. Kwon, K. Miyata, A. Kishimura, K. Kataoka	4. 巻 141
2. 論文標題 Self-assembly of siRNA/PEG-b-cationer at integer molar ratio into 100 nm-sized vesicular polyion complexes (siRNAsomes) for RNAi and codelivery of cargo macromolecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 3699-3709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b13641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 W. Ke, J. Li, F. Mohammed, Y. Wang, K. Tou, X. Liu, P. Wen, H. Kinoh, Y. Anraku, H. Chen, K. Kataoka, Z. Ge	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic polymersome nanoreactors with tumor-specific activable cascade reactions for cooperative cancer therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 2357-2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.8b09082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安楽泰孝	
2. 発表標題 ほったらかしで健康になる? -体内ナノマシンによる医療革命-	
3. 学会等名 科学未来館 トークセッション(招待講演) (招待講演)	
4. 発表年 2018年	

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院バイオエンジニアリング専攻 カブラル研
<http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp>
東京大学大学院工学系研究科 カブラル研究室

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----