

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20719

研究課題名（和文）構造柔軟性を持つ高機能型の中空アルブミンナノ粒子を用いた腫瘍DDSの開発

研究課題名（英文）Cancer targeting DDS using hollow albumin nanoparticles with structural flexibility

研究代表者

池田 真由美（Ikeda, Mayumi）

和歌山県立医科大学・薬学部・助教

研究者番号：90965708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：カルシウムナノ粒子を中核としてlayer-by-layer法によりアルブミンとカチオンポリマーからなるアルブミンナノ粒子を合成し、これをキレートと反応させることにより中空構造を有するアルブミンナノ粒子を作製することに成功した。細胞内取り込み効率を評価したところ、中空アルブミンナノ粒子は中空でないアルブミンナノ粒子やアルブミンモノマーと比較してがん細胞により効率よく取り込まれた。担がんモデルマウスにおける体内分布を評価したところ、中空アルブミンナノ粒子はアルブミンモノマーよりも腫瘍組織への移行性が高く、一方で肝臓への移行が抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルブミンナノ粒子は生体適合性に優れており、かつ腫瘍に積極的に取り込まれることからがんDDSとして注目されている。本研究により合成した中空型のアルブミンナノ粒子は、構造柔軟性を獲得したことにより従来のアルブミンナノ粒子よりも腫瘍との親和性が向上し、かつ肝臓による捕捉を抑制できた。したがって、従来型よりも優れたがんへの薬物送達キャリアとなり、抗がん剤の有効性の向上や副作用の軽減が期待される。

研究成果の概要（英文）：Albumin nanoparticles consisting of albumin and cationic polymers were synthesized by a layer-by-layer method with calcium nanoparticles as the core. The albumin nanoparticles with a hollow structure were successfully prepared by reacting the albumin nanoparticles with a chelate. The cellular uptake efficiency of the hollow albumin nanoparticles was higher than the non-hollow albumin nanoparticles and albumin monomers. The biodistribution study in a mouse model of carcinoma showed that the hollow albumin nanoparticles migrated into tumor tissue more readily than the albumin monomers, while their migration into the liver was suppressed.

研究分野：薬物送達学

キーワード：DDS albumin nanoparticle cancer targeting

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の2人に1人が悪性腫瘍に罹患する中、副作用の少なく、かつ有効な抗がん剤の開発は喫緊の課題である。これを解決すべく、ヒト血清アルブミン (HSA) が抗がん剤のキャリアとして注目されている。HSA は内皮細胞の間隙を通過する経路と別に、HSA 受容体を介した経内皮細胞や経間質、がん細胞によるエンドサイトーシスによって積極的にがん細胞へ取り込まれる。この現象は Endogenous Albumin Transport (EAT) system と呼ばれ、HSA のがん治療への応用の有用性が表されている。しかし、内因的な HSA に競合して抗がん活性を有する HSA を腫瘍組織へ送り込むことが課題である。腫瘍組織は、粗悪な血管新生により血管壁に間隙があり、数十～数百 nm のナノサイズ粒子が集積し易い性質を有している。そこで、HSA をナノ粒子化して腫瘍選択性を向上させることが有力視されている。しかし現状では HSA をナノ粒子化することで飛躍的に腫瘍移行性が向上したとは言い難い。その原因として、①調製過程で変性を伴うことにより HSA 受容体との親和性が低下したこと、および②構造が堅固であり、異物として貪食細胞に排除されたことが考えられる。実際に変性剤の使用やナノ粒子の硬さがマクロファージや白血球による貪食能に影響を与えることが指摘されている。

そこで、柔軟性に富んだ HSA ナノ粒子の応用に着目した。これまでに、中空 HSA ナノ粒子として人工血小板への応用が報告されている (Anselmo et al. ACS Nano, 2014)。同ナノ粒子は、ポリスチレンナノ粒子 (PS-NP) を正電荷のポリアリルアミン (PAH) と負電荷の HSA で被膜することを繰り返して層を形成し、さらにテトラヒドロフランにて PS-NP を溶解することで合成される。このナノ粒子は、血小板のように柔軟な動的特性を持ち、リポソームなどを基盤とした他の人工血小板と比較して血小板と損傷部位の相互作用や血小板同士の凝集効果が飛躍的に向上している。さらに、静電相互作用と架橋の組み合わせにより表面に HSA を結合させているため、適切な架橋剤を選択できれば、HSA 受容体との親和性を保てる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、構造柔軟性の高い中空 HSA ナノ粒子を最小限の変性で合成し、腫瘍送達キャリアとして応用することを目的とした。剛性の高い従来の HSA ナノ粒子と比較して、本研究の HSA ナノ粒子は中空構造により高い柔軟性を獲得し、これによりエンドサイトーシスを介したがん細胞による取り込みの向上や、貪食細胞による消失の回避が期待できる。現在報告されている中空 HSA ナノ粒子は人工血小板として応用されているもののみであり、がん治療に応用した例はない。HSA ナノ粒子の中空化により体内動態が改善すれば、タンパク質ナノ粒子の革新的な進歩に貢献できると期待できる。

3. 研究の方法

1) HSA ナノ粒子の設計

市販の PS-NPs (100 nm および 200 nm の2種) をコアとし、layer-by-layer 法により HSA および PAH を結合させ、アルブミンをグルタルアルデヒドにて架橋し、テトラヒドロフランにより PS-NPs を溶解することに中空 HSA ナノ粒子の作製を試みた。コアのサイズや架橋剤の濃度、層の数の条件を振って異なるサイズや剛性の粒子を調製した。また、コアの種類についても PS-NPs に加えてシリカナノ粒子やカルシウムナノ粒子でも検討を行なった。作製したナノ粒子の粒子径や多分散指数、電位、安定性を光散乱装置で評価した。

2) 細胞内取り込み活性評価

1) で調製したナノ粒子を蛍光標識し、マクロファージやがん細胞への取り込みを蛍光顕微鏡やプレートリーダーなどで評価した。がん細胞は、マウス大腸がん細胞 C26 やマウス乳がん細胞 4T1 など異なるアルブミン受容体を有するものを使用した。各細胞を 2×10^4 cells/well となるように 96 well plate に播種し、HSA サンプルを添加して2時間インキュベートした後、PBS で2回洗浄し、蛍光を測定および観察した。

3) 生体内分布評価

C26 細胞を皮下移植した担がんマウスに蛍光標識した HSA および各 HSA ナノ粒子を尾静脈内投与した。組織や血液の蛍光を測定することにより、粒子の臓器分布や血中滞留性を評価した。

4. 研究成果

1) HSA ナノ粒子の設計

まず、粒子径 100 nm および 200 nm の PS-NPs を用いて layer-by-layer 法により中空 HSA ナノ粒子の合成を試みた。PS-NPs の周りの HSA およびカチオンポリマーの層はそれぞれ 1-4 ずつになるように調製し、グルタルアルデヒドで架橋後、PS-NPs の溶解を試みた。その結果、2 層以降は全てのサンプルにおいて凝集物が生じ、遠心分離により除去したとしても数 μm の巨大粒子となってしまった (図 1)。また、1 層の場合は数 nm のピークが大きな割合を占めたが、これは HSA monomer であると考えられる。各行程における遠心速度や架橋剤の濃度を振って検討したものの、目的の中空 HSA ナノ粒子を得ることは出来なかった。HSA の負電荷を強めるために HSA のアミノ基を修飾して用いても同様に作製出来なかった。PS-NPs をコアとする本手法による中空 HSA ナノ粒子の合成はすでに他グループによって報告されているものであり、再現性が得られなかった理由は不明である。

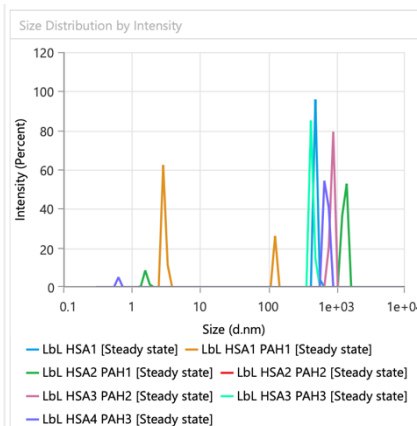


図 1 PS-NPs をコアとし LbL 法にて調製した粒子の粒子径

そこで次に、PS-NPs ではなくシリカナノ粒子を用いて同様に layer-by-layer 法で中空ナノ粒子の合成を試みた。シリカナノ粒子の場合は、コアを溶解するのに有機溶媒であるテトラヒドロフランではなく、フッ化水素酸溶液を用いた。シリカナノ粒子の粒子径は 200 nm のものを用いた。PS-NPs 同様にカチオンポリマーと HSA を LbL 法でそれぞれシリカナノ粒子の周囲に結合させ、グルタルアルデヒドを反応させたのちにフッ化水素酸溶液を反応させることでシリカナノ粒子を溶解した。その結果、フッ化水素酸溶液を入れることにより濁度が減少したことから、コアの溶解には成功した。しかし、粒子径を測定すると 1 μm よりも大きなピークとなり、生体に投与するには大きなサイズとなってしまった。さらに、粒子数も少なく、タンパク質定量では検出限界以下となり、HSA の残存率が低いことが示された。これは、シリカナノ粒子に結合したカチオンポリマーが少ない可能性を示唆している。

次に、炭酸カルシウム (CaCO_3) ナノ粒子に着目した。過去の知見により、 CaCO_3 ナノ粒子をコアとしたカチオンポリマーとアニオンポリマーを用いた LbL 法 (Li J., et al., Polymers, 10(3), 335) において、キレート剤を反応させることでコアの溶解が可能であることが明らかになっている。まず CaCO_3 ナノ粒子を調製すべく、 CaCl_2 溶液と Na_2CO_3 溶液を 700 rpm で回転させながら反応させた。水で洗浄後に粒子径を測定したところ、どの濃度で反応させた場合にも 500 nm を超えてしまい、静脈内投与するには大きすぎる粒子径となってしまった。そこで、市販の CaCO_3 ナノ粒子に着目した。用いた CaCO_3 ナノ粒子は粒子径が 15-40 nm として販売されているが、水に懸濁させた状態では粒子径が数 μm となる。そこで、既報に従いドデシル硫酸ナトリウム水溶液中で懸濁させたところ、濃度によって多少異なるものの約 300 nm の粒子として調製することができた。そこで本溶液を用いて CaCO_3 ナノ粒子をコアとし、LbL 法により HSA およびカチオンポリマーを結合させた。架橋剤としてグルタルアルデヒドを用いた場合にはキレート剤による CaCO_3 コアの溶解効率が悪く、数マイクロサイズの粒子となったが、カルボジイミド類の架橋剤を用いたところ、ナノサイズの粒子が得られた。そこで、HSA およびカチオンポリマーの層の数による違いを評価したところ、1 層と 2 層では粒子径はほとんど変化しなかったものの、3 層重ねた場合においてピークが 2 つに分かれ、大きなピークは 499 nm となった (図 2)。したがって、以降の検討では 2 層重ねて作製したものを実験に供することとした。

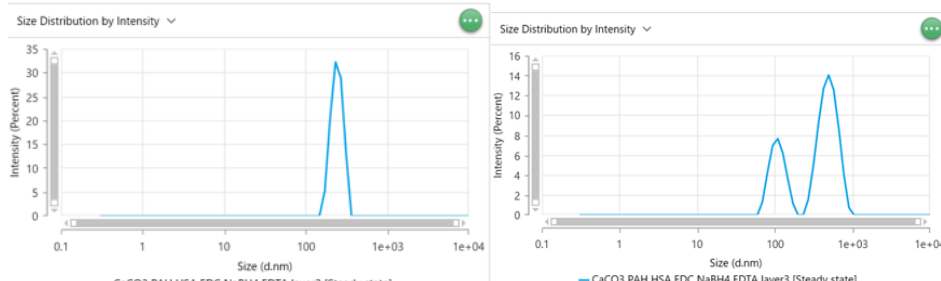


図 2 CaCO_3 ナノ粒子をコアとして作製した中空 HSA ナノ粒子の粒子径

(左) 2 層の HSA およびカチオンポリマーで調製した場合の粒子径 (intensity)

(右) 3 層の HSA およびカチオンポリマーで調製した場合の粒子径 (intensity)

2) 細胞内取り込み活性評価

C26 細胞および 4T1 細胞を用いて中空 HSA ナノ粒子、中空でない HSA ナノ粒子、および HSA モノマーの取り込み活性を評価した。その結果、全ての濃度において中空 HSA ナノ粒子が最も高い取り込み活性を示した (図 3)。さらに、中空 HSA ナノ粒子は中空でない HSA ナノ粒子よりも

取り込み効率が高い傾向が得られた。

本結果より、HSA はナノ粒子にすることによりがん細胞に取り込まれやすくなることが示された。さらに、中空構造にすることにより取り込み効率が上昇する可能性が示唆された。

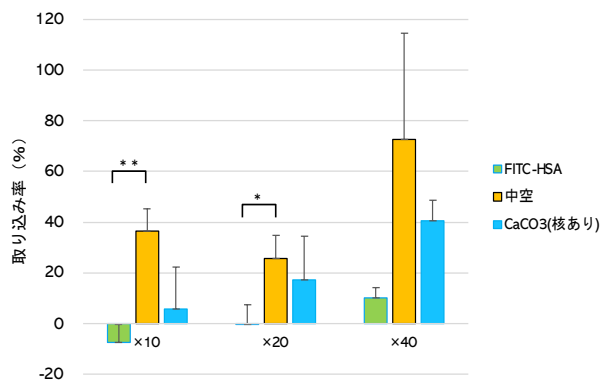


図3 マウス乳がん細胞 4T1 細胞における取り込み活性評価

FITC で標識した HSA 92.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の蛍光強度と同等になるように濃度調整した中空 HSA ナノ粒子および非中空 HSA ナノ粒子を 10, 20, 40 倍に希釈し添加した。N=4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs FITC-HSA

3) 生体内分布評価

次に、作製した中空 HSA ナノ粒子の担がんモデルマウスにおける生体内分布試験を行なった。C26 細胞を皮下に移植し、2 週間後に Alexa Fluor 647 で蛍光標識した中空 HSA ナノ粒子、コアを破壊していない非中空の HSA ナノ粒子、および HSA モノマーを尾静脈内投与し、蛍光を測定することで体内分布を評価した。その結果、投与から 24 時間後において、中空アルブミンナノ粒子を投与した群では腫瘍、肝臓、腎臓、肺、脾臓、心臓、脳の順に %ID が大きい結果となった。一方で HSA モノマーを投与した群においては腫瘍よりも肝臓へより多く蓄積しており、腫瘍における %ID は中空 HSA ナノ粒子の方が HSA モノマーよりも有意に大きかった。また、肝臓における %ID は中空 HSA よりも HSA モノマーの方が有意に大きかった。%ID の腫瘍/肝臓比は HSA モノマー投与群よりも中空 HSA 投与群で 6.23 倍高かった。血中濃度は HSA モノマーよりも中空 HSA ナノ粒子の方が 1.37 倍高かった。中空でない HSA ナノ粒子群については CaCO_3 の体積分、投与できる蛍光標識 HSA の量が限られており、今回の測定系では全ての臓器および血液において蛍光を観察することはできなかった。

また、中空 HSA ナノ粒子について、尾静脈内投与後 6 時間と 24 時間後の臓器蓄積量を比較したところ、肝臓における %ID は 0.60 倍に減少したのに対し、腫瘍における %ID は 24 時間後で 2.91 倍に増加していた。血中濃度は 6 時間後の方が 24 時間後よりも 3.33 倍高かった。

以上の結果により、中空型の HSA ナノ粒子を合成することに成功した。中空 HSA ナノ粒子は HSA よりもがん細胞に取り込まれやすく、腫瘍移行性が高いことから、抗がん剤の新しいキャリアとしての応用が期待できる。

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〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------