

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390014

研究課題名(和文)腫瘍組織内奥へ積極侵入可能なワームライクDDSの創製

研究課題名(英文)Development of a novel type worm-like DDS penetrable into tumor tissue

## 研究代表者

小暮 健太郎 (Kogure, Kentaro)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70262540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来のPEG化癌治療用ナノDDSにおける抗原性と低細胞親和性、腫瘍組織内への低い浸透性を解決するワームライクDDSの開発を目的として検討を行った。その結果、微小環境に感応する表面電荷反転型リポソームを構築し、高いエンドソーム脱出能と細胞内侵入能を確認するとともに、PEGリポソームと同程度の腫瘍集積性を示すことを見出した。さらに、狭小空間に侵入可能なワームライクナノ構造体を構築し、芯構造体の物性改善およびヒアルロン酸分解機能性の付与、さらに機能性ペプチドの表面修飾により著しく高いスフェロイド内浸透性を達成した。これら機能性リポソームの統合化を試み、in vivo機能性評価に着手した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel type worm-like DDS for overcoming drawbacks of conventional nanoDDS for anticancer therapy, such as, antigenicity of PEG, low cell affinity and low permeability into tumor tissue. As the results, we successfully developed charge-invertible liposomes, which can response to tumor microenvironment, and the capabilities of endosomal escape and cellular internalization and tumor accumulation comparable to PEG-liposomes were confirmed. Moreover, the worm-like nanostructures, which can penetrate into narrow space, were developed, and significantly high permeability into spheroids was achieved by improvement of physicochemical property of wick structure, modification with hyaluronidase and functional peptides. Then, integration of those functional liposomes, and evaluation of in vivo functionality was started.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ナノDDS 癌細胞間隙 癌微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子による薬物送達システム(ナノDDS)は、現在癌治療を中心に世界各国で臨床治療に用いられている。代表的な Doxil は抗癌剤ドキシソルピシンを封入したポリエチレングリコール(PEG)化リポソームであり、高い血中滞留性を有することでEPR(血管滲出性と組織蓄積性向上)効果により効率よく癌組織に集積し、治療効果を発揮する優れたDDSである。しかしながら、最近の研究によって、PEG自体が抗原性を有しており、投与によってIgM抗体が産生されることが見出された(Ishida & Kiwada, Int J Pharm, 354(2008)56)。このことは、単にPEG化だけでは免疫システムの回避は容易ではないことを意味している(問題点1)。他方、ナノDDSのPEG化は生体成分との親和性低下だけでなく、標的細胞への取り込みをも低下させてしまうジレンマを抱えている(Hatakeyama 他 Adv Biochem Eng Biotechnol.119(2010)197)(問題点2)。このため、EPR効果によって腫瘍組織に集積しても、癌細胞への取り込み効率は高くない。さらに、腫瘍組織において従来の球状ナノDDSの大きさ(50nm~200nm)では、間質や細胞間結合により阻まれて腫瘍組織内奥に入り込めず、組織外縁部でしか癌細胞を死滅させることができない。このため、間質や細胞間結合も癌治療用ナノDDSには障壁である(Eikenes 他 Br J Cancer, 93(2005)81)(問題点3)。このような従来のナノDDSの抱える大きな3つの問題点を解決し得る新しいナノDDSの開発が必要であるが、従来の発想から抜け出た革新的なものは開発されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の癌治療用ナノDDSの問題点、すなわち血中滞留用機能素子PEGの抗原性と低い細胞親和性、腫瘍組織内への低い浸透性を解決する革新的なActive Invasive Worm-like DDS(ワームライクDDS)の開発を目的とする。具体的には、PEG等親水性高分子を用いず表面電荷を負に保つことで血中滞留性を確保し、EPR効果により癌組織に移行した後、癌間質(コラーゲン等)をナノDDS表面に提示した酵素で分解するとともに機能性ペプチドにより細胞間結合を開裂して、柔軟で細長い構造により癌細胞間隙を透過することで内奥へと侵入し、癌微小環境(弱低pH)に感応して表面電荷を正に反転させ、細胞高親和性を獲得して効率よく細胞内に取り込まれ治療用遺伝子等を細胞内に送達可能なワームライクDDSの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

本申請研究は、癌微小環境に感応する表面電荷転換型ナノDDSの構築、癌間質分解能および細胞間結合開裂能を有するナノDDSの

構築、狭小空間に侵入可能なワームライクナノ構造体の構築、およびそれらを統合した革新的なワームライクDDSの創製とin vivo癌治療効果の検討からなる。平成23年度は基盤ユニット構造の確立を目指し、各機能性リポソームの構築を達成する。平成24年度以降は、各機能性リポソームにsiRNA等の評価用薬剤を封入した機能性ナノDDSについて、in vitroおよびin vivoにおける機能評価を行う。得られた知見を機能性リポソーム構築にフィードバックし、機能性ナノDDSを完成させる。さらに、それぞれの機能性ナノDDSを統合し、ワームライクDDSを構築する。In vivoにおける抗癌効果および動態追跡を行うことで機能性を評価する。

### 4. 研究成果

初年度、ナノDDSの基礎構造であるリポソームを基本とし、これらの機能性を搭載した各機能性リポソームの構築を目指した。微小環境に感応する表面電荷反転型リポソームの構築:pH6.5程度でプロトン化されるように塩基性アミノ酸のpKaが上昇するようなアミノ酸配列を設計し、高感度pH感応性ペプチドを構築した(配列は特許の関係で割愛)。設計・委託合成したペプチドを表面に修飾したリポソームは、pH7.4では負電荷を示すが、pH6.5にすることで電荷が正に反転することを確認した。さらに、細胞への取り込みをFACS解析および共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価したところ、pH7.4ではほとんど細胞に取り込まれなかったが、pH6.5以下の条件において顕著に取り込まれることが明らかになった。癌間質分解能を有するリポソームの構築:ヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)をナノ粒子表面に化学修飾し、癌間質分解能を有するナノ粒子の構築を目指した。ヒアルロニダーゼをPEG脂質先端に化学修飾した脂質を合成し、ナノ粒子脂質膜に挿入することで表面をヒアルロニダーゼ修飾した。得られたナノ粒子を癌細胞スフェロイドに添加したところ、スフェロイド内部まで広く分布することが確認され、ナノ粒子表面のヒアルロニダーゼによって間質を分解して細胞塊内部まで侵入可能であることを確認した。狭小空間に侵入可能なワームライクナノ構造体の構築:研究代表者が見出した、柔軟で細い構造を有する合成高分子カチオン(ポリリジン)とsiRNAの複合体調製し「芯」として脂質膜コーティングすることにより、柔軟性のあるナノ構造体を構築した。癌細胞スフェロイドへの侵入能について、得られたナノ構造体は既存のトランスフェクション試薬複合体と比較したところ、ナノ構造体はより多くスフェロイド内部に存在することが確認された。

2年度目は、初年度の成果に基づき、各機能性リポソームにsiRNA等の評価用薬剤を封入した機能性ナノDDSについて、in vitroおよびin vivoにおける機能評価を行った。 虫

光標識した表面電荷反転型リポソームを用い、異なる pH における細胞内動態を評価することで、癌微小環境に感応する表面電荷反転型リポソームの機能性を評価した。その結果、当該リポソームは効率よくエンドソームを脱出可能であり、興味深いことに細胞表面から膜融合によっても細胞内に侵入可能であることが示唆された。さらに、トレーサー DNA を封入した機能性リポソームを担癌マウスに尾静脈投与したところ、コントロールである従来の PEG リポソームと同程度の腫瘍集積性を示すことが明らかとなった。さらに、腫瘍組織内分布を検討したところ、従来の PEG リポソームは血管周辺に局在しているのに対して、機能性リポソームは血管から離れた低 pH 領域に局在していることが明らかとなった。ワームライクナノ構造体の機能評価を進めたところ、最初の siRNA 芯構造の構築段階で、弱い凝集が起こっており、そのために柔軟な構造を有する物ができにくくなっている可能性が示唆されたため、芯構造の構築方法の改良を行った。これまでの分子量の大きいポリリジンではなく、分子量の小さいポリリジンをポリカチオンとして選択し、siRNA と混合することで、新しい芯構造の構築を試みたところ、低い N/P 比において、ポリアクリルアミドゲル中を泳動可能な芯構造体の構築に成功した。これも用いて、脂質膜コートを行い、それまでのワームライクナノ構造体と、スフェロイドへの浸透能について比較したところ、従来のワームライクナノ構造体よりも、高いスフェロイド浸透活性を示した。このことから、芯構造の物性が構造体全体の柔軟性に重要であることが示唆された。

最終年度は、2 年度目の成果に基づき、各機能性リポソームの *in vitro* および *in vivo* における機能評価を行うとともに、統合化を目指し検討を行った。ワームライクナノ構造体をメラノーマ担癌マウスに局所投与し、*in vivo* における腫瘍内動態を評価したところ、*in vitro* での検討から予想されたほどの腫瘍内浸透性を示さなかったため、再度 *in vitro* スフェロイド系を用いて、組織浸透性のさらなる向上を検討した。細胞間相互作用を減弱させるため、当初提案していた細胞間隙開裂活性を有する AT1002 ペプチドをワームライクナノ構造体表面に修飾し、浸透性を評価した。AT1002 ペプチド修飾により若干細胞間隙への浸透性が改善されたようにも思われたが、ワームライクナノ構造体同士の凝集が起こってしまうことで浸透が阻害されていることが推察された。そこで、ポリエチレングリコール (PEG) を同時に表面修飾することで、ナノ構造体同士の相互作用を軽減する工夫をした。その結果、AT1002/PEG 両修飾ワームライクナノ構造体は、ペプチド未修飾ナノ構造体や AT1002 単独修飾ナノ構造体、PEG 単独修飾ナノ構造体に比べて、著しく高いスフェロイド内浸透性を示した。他方、2 年度目

の成果において、癌微小環境に感応する表面電荷反転型リポソームの腫瘍内動態観察の結果、血管から離れた腫瘍内奥に浸透することが明らかとなっていたが、スフェロイドを用いた詳細な解析により、表面電荷反転型リポソームが細胞と相互作用することで、細胞内骨格が変化し、細胞間隙が開いている可能性が見出された。このことは、表面電荷反転能を付与するためにリポソーム表面に修飾した機能素子が AT1002 と同様の機能性を有することを示唆するものである。これらの機能性リポソームの統合化を試み、*in vivo* における機能性評価の検討に着手した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Mitsuueda A, Shimatani Y, Ito M, Ohgita T, Yamada A, Hama S, Gräslund A, Lindberg S, Langel U, Harashima H, Nakase I, Futaki S, Kogure K. Development of a novel nanoparticle by dual modification with the pluripotential cell-penetrating peptide PepFect6 for cellular uptake, endosomal escape, and decondensation of an siRNA core complex. *Biopolymers*. Vol 100, 2013, 698-704. DOI: 10.1002/bip.22310.

Hama S, Takahashi K, Inai Y, Shiota K, Sakamoto R, Yamada A, Tsuchiya H, Kanamura K, Yamashita E, Kogure K. Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J Pharm Sci*. Vol 101, 2012, 2909-2916. DOI: 10.1002/jps.23216.

Hama S, Utsumi S, Fukuda Y, Nakayama K, Okamura Y, Tsuchiya H, Fukuzawa K, Harashima H, Kogure K. Development of a novel drug delivery system consisting of an antitumor agent tocopheryl succinate. *J Control Release*. Vol 161, 2012, 843-851. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.031.

Kigasawa K, Miyashita M, Kajimoto K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Efficient intradermal delivery of superoxide dismutase using a combination of liposomes and iontophoresis for protection against UV-induced skin damage. *Biol. Pharm. Bull.* Vol 35, 2012, 781-785.

Kitazoe K, Wang J, Kaji N, Okamoto Y, Tokeshi M, Kogure K, Harashima H, Baba Y. A touch-and-go lipid wrapping technique in microfluidic channels for rapid fabrication of multifunctional envelope-type gene delivery

nanodevices. Lab. Chip Vol 11, 2011, 3256-3262  
DOI: 10.1039/C1LC20392D  
Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. invasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. Int. J. Pharm. Vol 403, 2011, 57-65  
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.021

〔学会発表〕(計 16 件)

小暮健太郎、鄭賢卿、宇野晃平、島谷悠里、濱進 柔軟な構造を有する組織浸透性 siRNA キャリアーの開発. 第 23 回アンチセンスシンポジウム(徳島) 2013.11.

Itakura S. Hama S. Nakai M. Nakayama K. Morimoto S. Tsuchiya H. Kogure K. Efficient cytoplasmic delivery of siRNA by tumoral pH sensitive nanoparticles via membrane fusion under tumor microenvironment. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Hawaii, U.S.A.) 2013.7.

Kogure K. Shimatani Y. Uno K. Chon H.K. Hama S. A flexible nano carrier for siRNA delivery into tumor. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society(Hawaii, U.S.A.) 2013.7.

濱進、板倉祥子、中井麻友美、中山佳代子、森本智士、小暮健太郎 腫瘍低 pH 応答性ナノ粒子の効率的な細胞質送達メカニズムの解析. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会(京都) 2013.7.

森本智士、濱進、板倉祥子、中井麻友美、中山佳代子、土谷博之、小暮健太郎 腫瘍集積性向上のための腫瘍微弱低 pH 応答性リポソームの改良と機能性評価. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会(京都) 2013.7.

中山佳代子、濱進、板倉祥子、中井麻友美、森本智士、大石利一、土谷博之、小暮健太郎 腫瘍の微弱低 pH に応答して細胞内取り込みが促進される SAPS ペプチド修飾ナノ粒子の機能性評価. 日本薬剤学会第 28 年会(名古屋) 2013.5.

宇野晃平、鄭賢卿、濱進、小暮健太郎 腫瘍内部への浸透を目指した新規 siRNA キャリアーの開発. 日本薬剤学会第 28 年会(名古屋) 2013.5.

Hama S. Utsumi S. Nakayama K. Okamura Y. Tsuchiya H. Fukuzawa K. Harashima H. Kogure K. Development of a novel drug delivery system for combination therapy in cancer. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(京都)

2012.11.

板倉祥子、濱進、中井麻友美、中山佳代子、森本智士、大石利一、土谷博之、小暮健太郎 腫瘍環境の微弱な pH に応答するペプチドを用いた薬物キャリアーの開発. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会(兵庫) 2012.10.

濱進、土谷博之、小暮健太郎 抗癌剤トコフェロールコハク酸を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発. 第 71 回日本癌学会学術総会(札幌) 2012.9.

Hama S. Itakura S. Nakai M. Nakayama K. Morimoto S. Tsuchiya H. Kogure K. Development of nobel tumoral pH responsive nanoparticles for cancer therapy. the 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Quebec city, Canada) 2012.7.

小暮健太郎、島谷悠里、宇野晃平、土谷博之、濱進 組織狭小空間への送達を目指した siRNA キャリアーの開発. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会(札幌) 2012.7.

森本智士、濱進、板倉祥子、中井麻友美、中山佳代子、土谷博之、小暮健太郎 癌治療のための微弱 pH 変化応答性薬物キャリアーの開発. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会(札幌) 2012.7.

濱進 ナノ粒子の膜物性制御による腫瘍低 pH 下の癌細胞への効率的な薬物送達. 第 9 回がんハイポキシア研究会(東京) 2011. 11.

小暮健太郎、板倉祥子、中井麻由美、中山佳代子、森本智士、濱進 腫瘍環境応答性ナノキャリアーの開発. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(岡山) 2011. 11.

Kogure K. Shimatani Y. Uno K. Hama S. (招待講演) Development of a flexible siRNA carrier penetrable into tumor. the IUMRS-ICA 2011, 12th International Conference in Asia(台湾) 2011.9.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: pH 応答性ペプチドを含むナノ粒子  
発明者: 小暮健太郎、濱進  
権利者: 大鵬薬品工業株式会社  
種類: 特許  
番号: W02012/147714A1  
出願年月日: 平成 24 年 11 月 1 日  
国内外の別: 国外

名称: pH 応答性ペプチドを含むナノ粒子  
発明者: 小暮健太郎、濱進  
権利者: 大鵬薬品工業株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-097694

出願年月日：平成 23 年 4 月 25 日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bukka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小暮健太郎 (KOGURE Kentaro)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70262540

### (2) 研究分担者

土谷博之 (TSUCHIYA Hiroyuki)

前京都薬科大学・薬学部・講師

(平成 24 年まで)

研究者番号：00403402

### (3) 研究分担者

濱 進 (HAMA Susumu)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60438041