

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550196

研究課題名(和文)腫瘍細胞マーカー構成糖鎖を特異的に認識する人工レクチンの開発と膜融合活性評価

研究課題名(英文) Construction of the tumor marker saccharide targeting artificial receptors and characterization of their membrane fusion activities

研究代表者

柏田 歩 (KASHIWADA, Ayumi)

日本大学・生産工学部・准教授

研究者番号：80350031

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)：腫瘍細胞マーカーとして知られているTF抗原二糖(Gal-beta-1,3-GalNAc)に高い選択性を有することが知られているボロキソール含有ペプチドを基本としたレセプター分子を新規合成した。そして、表層にレセプター分子を提示させた担体リポソームと、標的として種々の糖鎖配列を有する脂質を含むリポソームも調製し、担体リポソームとの融合挙動をFRETに基づきリポソーム間脂質混合実験や動的散乱測定などから評価した。その結果、TF抗原二糖配列を標的に含むリポソームに対し、選択的な膜融合を示す結果を得られたことから、本課題で合成したレセプターが腫瘍細胞への薬物送達などに有望であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized a novel receptor targeted against the Gal-beta-1,3-GalNAc disaccharide incorporated liposomal vesicles. We selected a peptidyl bis(boroxole) derivative as the disaccharide recognition moiety of the designed receptor. We have previously constructed target-selective liposomal membrane fusion systems. To develop the functional liposomes with targeting capabilities against the Gal-beta-1,3-GalNAc disaccharide, we prepared the receptor incorporated liposomes and some types of the glyco- or glycosphingo- lipids possessing target liposomes. The membrane fusion behavior was examined by a probe dilution assay based on the fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the membrane-bound fluorophores NBD-PE and Rh-PE. The fusion kinetics based on the lipid mixing indicates that the designed receptor acts as an effective membrane fusion device toward Gal-beta-1,3-GalNAc disaccharide.

研究分野：生体関連化学

キーワード：腫瘍細胞マーカー TF二糖構造 糖鎖認識 リポソーム 膜融合 薬物送達系

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞に対し、選択的に必要な物質(薬剤や遺伝物質)を供給する系については社会的にも非常に関心が持たれており、このような系の構築はオーダーメイドな未来型医療への発展に大きく寄与できると考えられてきた。そのため、製薬分野のみならず、材料工学的観点からも注目されてきた。腫瘍細胞への物質送達系構築に関して重視される要因として、異常細胞周囲の血管特有の内皮細胞間空隙を通じて薬剤担持微粒子を異常細胞・組織に蓄積させる方法論である EPR 効果が主流となり、抗腫瘍薬物送達における基礎研究から臨床使用に至るまで幅広く利用されてきている。一方、標的細胞に対する直接的認識とエンドサイトーシス経路を経て物質送達を行うことができる系は細胞・組織選択性の向上が大いに期待できるものの、生体環境中で特定分子を高感度に認識できることが要求されるため広く注目されていなかった。当時、われわれはリポソーム-リポソーム間における標的選択的な人工膜融合系構築を実践しており、その中で簡易な系ながらも細胞表面に存在する糖鎖を意識し、ポロン酸誘導体による糖鎖縁体認識を駆動力とした膜融合系の構築に関して報告してきた。

一方、特定な糖鎖認識を目的とした人工レクチン開発として、ポロン酸含有人工レクチン(ポロノレクチン)が開発された。この人工レクチンは 90%以上の腫瘍細胞に見出される糖鎖である Thomsen-Friedenreich (TF)抗原二糖に対し、選択的認識挙動を示すことが報告されているが、水系での分子認識挙動の観測に限定されていた。そこで、本課題ではポロノレクチン構造を導入した担体リポソームを調製し、標的と見立てた TF 抗原二糖配列含有リポソーム(標的リポソーム)に対する膜融合挙動の検討を行い、*in vitro* な系における糖鎖選択的膜融合系の構築を目指し研究を進めた。

2. 研究の目的

薬物送達担体として広く研究が行われているリポソームの中でも腫瘍細胞などの標的細胞に対し、選択的な膜融合活性を有するリポソームは薬剤とみなせる内包物質を直接細胞質内へ送達する系の構築においてきわめて有用である。本課題では腫瘍細胞表面に高確率で発現される TF 抗原特有の二糖を選択的に認識するデバイスの合成とデバイスを担持させたりポソームによる TF 抗原二糖担持標的膜に対する膜融合能評価を行う。さらに、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法を利用してリポソーム界面における分子認識挙動を定量的に評価する。これらの評価を通じて、エンドサイトーシス経路を利用して担体リポソームの細胞内取り込み、そしてリポソーム-エンドソーム膜間での融合を介した直接的な物質送達系の構築に展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 既往の研究として TF 抗原二糖 (Gal-beta-1,3-GalNAc 配列)に対し特異的な認識挙動を示すポロン酸含有人工レクチン(ポロノレクチン)が開発されており、その開発者であり、共同研究者である Prof. Dennis G. Hall との議論のもと、リポソーム界面で TF 抗原二糖との分子認識を引き金に膜融合を促進させることができるデバイスの合成を行った。Prof. Dennis G. Hall による Gal-beta-1,3-GalNAc 配列選択的ポロノレクチンは水溶性であるため、薬物送達担体としてのリポソームへの導入を考慮すると、デバイスには認識部位の他に脂質(膜)結合部位を導入する必要がある。より単純な構造ながらもわれわれは同様の両親媒性分子認識デバイスを合成し、リポソーム界面での分子認識を駆動力とした膜融合系構築に関していくつかの系を報告している(A. Kashiwada et al. Chem. Commun. 2009, 695; A. Kashiwada et al. Soft Matter 2009, 5, 4719; A. Kashiwada et al. Langmuir 2011, 27, 1403; A. Kashiwada et al. Chem. Eur. J. 2011, 17, 6179)ことから、ノウハウを活かし、ポロノレクチンにステアロイル基を導入して両親媒性のポロノレクチン合成を行った。ポロノレクチンは Fmoc ペプチド固相法により合成し、HPLC による高純度精製を行った。

(2) 合成したデバイス分子に関して、TF 抗原二糖に対する結合活性評価を行うために buffer 系における膜融合挙動の検討を行った。膜融合は TF 抗原二糖構造を有する糖脂質あるいは対照となる脂質導入リポソーム (EggPC を主たる脂質とする)に対し、デバイス分子を含む担体リポソーム間によるもので、リポソーム界面での分子認識を駆動力として促進される。膜融合活性測定は担体、標的となるリポソームを混合することによるリポソーム膜のサイズ変化ならびに担体-標的間の脂質混合による融合確認を主として行う。サイズ変化に関しては動的散乱測定により検討を行った。また、膜融合に伴うリポソーム間の構成脂質混合挙動は蛍光ドナー(NBD)およびアクセプター(Rh)で標識した標的リポソーム中での蛍光共鳴エネルギー移動現象(FRET)の効率により評価した。すなわち、膜融合による標的膜への脂質混合による NBD - Rh 間距離の増大を FRET 効率低下によって評価することで、膜融合に伴う脂質の混合度合いを定量的に見積もった。これら動的散乱および脂質混合測定による広範な融合条件検討により、膜融合条件の規格化を行い、設計・合成したデバイス分子の性能を評価した。

さらに、膜融合がリポソーム界面における分子認識を駆動力として起こっているか確認するために標的リポソームを化学吸着させた水晶振動子に担体リポソームを添加した際の振動数変化を測定した。

4. 研究成果

(1) Rink amide 樹脂上で Prof. Dennis G. Hall による Gal-beta-1,3-GalNAc 配列選択的ポロノレクチンをもとにリポソーム導入部位としてステアロイル基を有するデバイス分子の合成を行った(図1)。固相合成後、HPLCによる精製を行い、約 35 mg のデバイス分子を得た。なお、合成の確認は ESI-MS により行った。

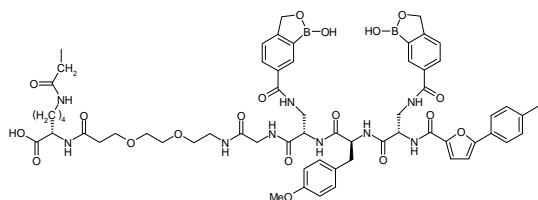


図1 設計したデバイス分子の構造

(2) これまでわれわれは標的選択的リポソーム融合系の構築を行ってきた。本課題では TF 抗原二糖である Gal-beta-1,3-GalNAc 配列に対して選択的な機能性リポソームを作製するために上記のデバイス分子を導入した担体リポソームを調製した。一方、Gal-beta-1,3-GalNAc 配列を有する GM1 および類似の糖鎖配列を有する脂質(図2)を含む標的リポソームを調製した。

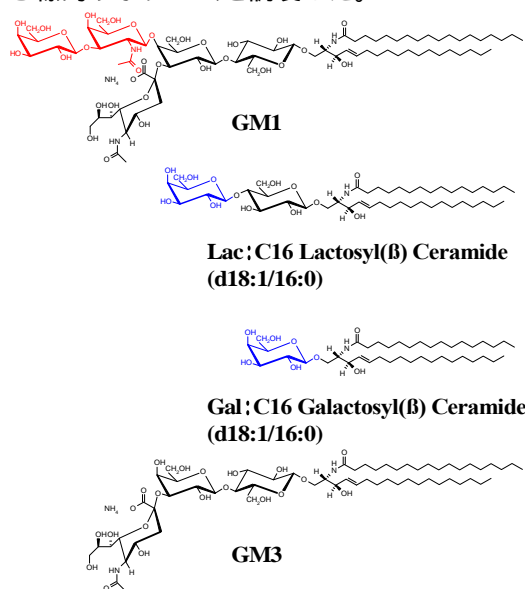


図2 標的として用いた脂質の構造

約 100 nm に調製した担体リポソームと標的リポソームを 1:1 で混合し、標的リポソーム中に導入した NBD と Rh 間の FRET 効率変化により評価した。図3は pH 7.4 における膜融合挙動を示している。その結果、合成したデバイス分子を導入した担体リポソームは TF 二糖構造を有する GM1 を含む標的リポソームに対し、良好な膜融合活性を示すことがわかった。一方、この担体リポソームはガラクトース部位を含む脂質(Gal)や異なる二糖構造を有する脂質(Lac)を含む標的リポソームに対しては明確な認識に伴う膜融合活性が認められなかった。

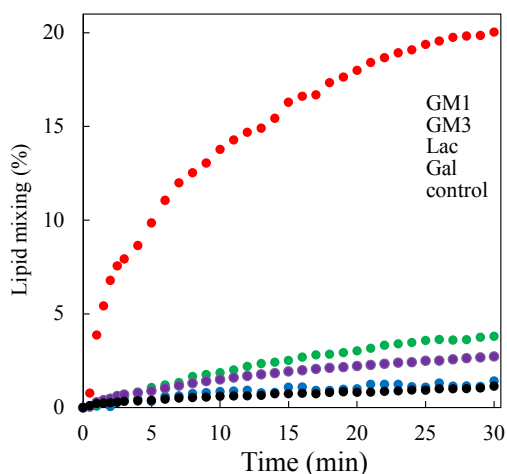


図3 種々の糖脂質を含む標的リポソームに対する担体リポソーム添加による膜融合挙動評価

これらの膜融合挙動はリポソーム界面上における、デバイスの二糖構造に対する選択的な分子認識に起因するものと示唆された。この結果は Prof. Dennis G. Hall による既往の成果と一致しており、腫瘍マーカーに対する有用な認識デバイスを提供できたといえる。

図3に示した結果は担体-標的リポソーム間の構成脂質混合を指標として膜融合を評価しているが本課題中では標的リポソーム内水相に蛍光分子である ANTS を、そして担体リポソームの内水相には ANTS の消光剤である DPX を封入し、膜融合による内水相混合挙動の評価も行った。合成したデバイス分子を導入した担体リポソームと GM1 を含む標的リポソームを混合させた結果、ANTS の消光が確認された。この結果は図3に示した脂質混合による膜融合評価に矛盾しないものであった。

リポソーム間の膜融合はリポソームサイズの増大を伴う。そこで、膜融合に伴うリポソーム粒径の変化を動的分散測定(DLS)測定により追跡した。はじめに担体および標的リポソーム単独で DLS 測定を行った結果、水系においては明確なサイズ変化を示さなかった。約 100 nm に調製した担体リポソームと標的リポソームを 1:1 で混合した際の粒径変化を追跡した結果を図4に示す。GM1を含む標的リポソームに対し、合成したデバイス分子を導入した担体リポソームを添加すると、添加直後にリポソーム界面の乱れに伴う粒径の急激な増大が確認できた。その後、約 30 分に渡って粒径は減少し、最終的に複数のリポソームが融合した結果に矛盾しない粒径が得られた。一方、担体リポソームを他の標的を含むリポソームに対して添加した際には明瞭な粒径変化が認められなかったことから、上述の脂質混合や内水相混合による膜融合挙動によって示された結果と併せて、TF 二糖構造に対して極めて選択的な膜融合系が構築できたことが示された。

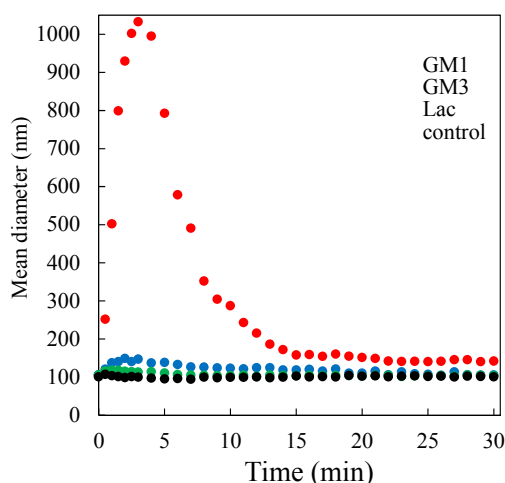


図 4 種々の糖脂質を含む標的リポソームに対する担体リポソーム添加による粒径変化

これまでの結果から本課題において設計・合成したデバイス分子は TF 二糖構造を選択的に認識することがわかった。そこで、脂質膜界面での認識挙動を直接観察するために標的リポソームを化学吸着させた水晶振動子に担体リポソームを添加した際の振動数変化を測定した。GM1 または GM3 を含む標的リポソームを水晶振動子上に化学吸着させた際の振動数変化はいずれも 150 から 160 Hz であった。その後、デバイス分子を含む担体リポソームを添加すると、GM1 を含む標的リポソームが吸着した基板に対してのみ、さらに約 170 Hz の振動数変化が認められた。

表 1 水晶振動子上に標的リポソーム、さらに担体リポソームを添加した際の振動数変化

	target		
	GM1	GM3	control
+ target liposome	-159.3 Hz	-150.2 Hz	-168.1 Hz
+ pilot liposome	-169.8 Hz	-5.2 Hz	-7.0 Hz

以上の結果は TF 二糖構造を含む GM1 に対し、デバイス分子が定量的に分子認識していることが示された。

本課題における成果はモデル系に限定されているが、代表的な薬物送達担体であるリポソームに腫瘍細胞マーカーである TF 抗原二糖指向性を付与することができた。in vitro 系におけるさらなる検討、そして in vivo 系における実践的な検討は必要となるが、これまでの EPR 効果を利用した薬物送達系に対し、新規な系の提供につながり、医用マテリアル創出に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Ayumi Kashiwada, Masaki Mizuno, Iori Yamane, Jun-ichi Hashimoto,
 “pH dependence of disruption of liposomal membranes by artificial lytic peptides”
 27th European Conference of Biomaterials
 2015 年 8 月 30 日 ~ 9 月 3 日
 Cracow, Poland

Ayumi Kashiwada
 “Synthesis and Characterization of novel pH-triggered membrane lytic peptides”
 人工光合成ワークショップ：ペプチドおよびタンパク質科学に基づく光収穫プロセス工学
 2014 年 10 月 6 日
 名古屋工業大学, 名古屋

Ayumi Kashiwada, Jun-ichi Hashimoto, Masaki Mizuno
 “Disruption of liposomes by pH-dependent membrane lytic peptides”
 5th EuCheMS Chemistry Congress
 2014 年 8 月 31 日 ~ 9 月 4 日
 Istanbul, Turkey

鯉沼 聖美・大森 真乗・中島 千織・柏田 歩
 “Thomsen-Friedenreich (TF) 二糖選択的な膜融合系の構築”
 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム
 2013 年 9 月 27 日 ~ 9 月 29 日
 名古屋大学, 名古屋

Ayumi Kashiwada, Mana Tsuboi, Iori Yamane, Kiyomi Matsuda
 “Construction of high-performance artificial membrane fusion system with target-selectivity”
 4th EuCheMS Chemistry Congress
 2012 年 8 月 26 日 ~ 8 月 30 日
 Prague, Czech Republic

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏田 歩 (KASHIWADA, Ayumi)
 日本大学生産工学部・准教授
 研究者番号：80350031