

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860030

研究課題名(和文) 癌の診断・治療法開発を目指した放出孔サイズ制御型の腫瘍低pH応答性ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of slightly acidic pH-sensitive nanoparticles being capable of size-selective drug release for cancer therapy and diagnosis

研究代表者

濱 進 (Hama, Susumu)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60438041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム型ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いて、効果的な癌治療を達成するためには、リポソームが腫瘍に送達された後に、リポソームから効率的に薬物が放出される必要がある。そこで、本研究では腫瘍低pHに反応して物性が変化するペプチドをリポソームに搭載することで、腫瘍特異的な薬物放出を可能とするDDSを開発した。すなわち、腫瘍内の微弱低pH環境応答性の膜不安定化ペプチドSAMPを設計し、リポソーム膜内にSAMPを組み込んだナノ粒子(SAMP-lipo)を構築した。SAMP-lipoは、腫瘍内の微弱低pH環境に反応して、低分子薬物を選択的に放出可能な薬物運搬ナノ粒子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In anti-cancer therapy mediated by a liposome-based drug delivery system (DDS), overall efficacy depends on the release efficiency of anti-cancer drug from the liposomes after the delivery to tumor tissue. In this study, I developed liposomes incorporating peptide, which can alter the physicochemical property in response to tumoral acidic pH, for tumor-specific drug release. Therefore, I designed a slightly acidic pH-sensitive membrane perturbable peptide (SAMP), and constructed DDS by the incorporation of SAMP into liposomal membrane (SAMP-lipo). In the cells treated with SAMP-lipo co-encapsulating low- and high-molecular drug, SAMP-lipo could release only low-molecular drugs outside of cells and deliver only high-molecular drugs into cancer cells at slightly acidic pH. These results suggest that SAMP-lipo are a novel intelligent nanoparticle being capable of the effective and selective release of low-molecular drugs in response to tumoral acidic pH.

研究分野：薬物送達学

キーワード：腫瘍微小環境 DDS

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、低酸素、低栄養、低 pH などの物理化学的環境変化に対応した癌細胞の特性変化より成長・転移に有利な環境を作り出す。さらに、微小環境下の癌細胞は既存の抗癌剤や放射線に対する耐性を獲得する。すなわち、癌を根治するためには、腫瘍微小環境を考慮し、包括的に腫瘍を攻撃する画期的な癌治療戦略が必要である。さらに、腫瘍微小環境を利用した癌検出法は、悪性度の高い癌を識別可能であり、治療法選択および治癒率の向上に大きく寄与すると考えられる。これらの腫瘍微小環境を利用した診断・治療法を開発する上で、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が大きな鍵を握る。現在の癌 DDS において、Doxil に代表されるように、水溶性高分子のポリエチレングリコール (PEG) を修飾したリポソームが Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により腫瘍へ送達されることから、臨床の場で用いられている。しかし、現在の癌 DDS において以下の問題が挙げられる。血中滞留性素子 PEG は細胞との親和性が低いために、標的特異性が高く長期薬効持続が期待できる高分子薬物などを細胞内へ送達することが不可能である。リポソームからの内封薬物の漏出が制御不能であるために、放出過程が律速となり、十分な薬効を期待できないことから新規の癌治療 DDS の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、これらの問題を解決するために、腫瘍微小環境の微弱低 pH に着目し、微弱低 pH 応答性ペプチド (SAPSP) と PEG コンジュゲート体をリポソーム膜表面に (問題点の解決策) 微弱低 pH 応答性膜不安定化ペプチド (SAMP) をリポソーム膜内に搭載することにより (問題点の解決策) 腫瘍組織内におけるパッシブターゲティングおよびアクティブリリース可能な新規 DDS を開発し、革新的な癌治療・診断システムの開発へ展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微弱低 pH 応答性膜不安定化ペプチド (SAMP) 搭載リポソームの調製。

SAMP (HGHLALLAHALLAHAALAAALA)、ヒスチジンおよび疎水性アミノ酸ブロックを有するペプチド SAMP-HH (HHGGLLLLHHHAAAAALLLAAAA)、親水部と疎水部比を変えた配列 SAMP-H1-L1 (HGHHGGGGGGGAHALLAHAALAH) 4 残基短い配列 SAMP-4AA (HGHLALLAHALLAHAALAAAL) は (株) スクラムに委託し合成した。Egg phosphatidylcholine (EPC) : Dioleoyl glycerophosphoethanolamine (DOTAP)=1:1 (mol 比) のエタノール溶液に上記ペプチドのエタノール溶液を総脂質量の 5 mol% 量を添加し、単純水和法によりペプチド

ド搭載リポソームを調製した。EPC 単独から構成されるリポソーム、または 1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DSPG) リポソームへのペプチド修飾も同様に行った。調製した各種ペプチド搭載リポソームは異なる pH の buffer で希釈懸濁した後、粒子径および表面電荷を測定した。

(2) 異なる pH 条件におけるペプチド含有リポソームからの内封薬物漏出量の測定。

(1) と同様の方法で、ペプチド含有脂質薄膜を調製後、カルセイン (Mw 622.55) 30 mM 溶液を添加し、実施例 1 と同様の方法でリポソームを調製した。未封入のカルセインはゲル濾過 (Sephadex G50) により除去した。内封カルセインのリポソームからの漏出量を測定するために、調製したリポソームを異なる pH の buffer で希釈懸濁した後、37 °C で 10 分間インキュベートし、プレートリーダー (infinite M200, TECAN 社) を用いて漏出されたカルセインの蛍光 (ex: 488 nm, em: 517 nm) を測定した。尚、調製したリポソームに 1% Triton-X100 を混合した場合に漏出されたカルセインの蛍光を完全漏出量とした。漏出率は以下の式により算出した。

$$\text{漏出率 (\%)} = \frac{(F_{\text{sample}} - F_{\text{pH7.4}})}{(F_{\text{triton}} - F_{\text{pH7.4}})} \times 100$$

F_{sample} : 各 pH 下においてリポソームから漏出したカルセインの蛍光

$F_{\text{pH7.4}}$: pH 7.4 におけるリポソームから漏出したカルセインの蛍光

F_{triton} : 当該リポソームに 1% Triton-X100 を混合した場合のカルセインの蛍光

(3) 異なる pH 条件における SAMP 単体および SAMP 搭載リポソームの CD spectrum。

SAMP 単体およびリポソーム (それぞれペプチド濃度にして 20 μM) を異なる pH の PBS (-) に懸濁し、J-720WI を用いて CD (円偏光二色性 circular dichroism) スペクトルを測定した。

(4) 培養細胞における SAMP-lipo からの薬物漏出の顕微鏡観察

ポリエルリジンでコートした 96 well imaging plate に B16-F1 細胞を 5×10^3 で播種し、24 時間インキュベートした。リポソームは事前に pH 7.4, pH 6.5 の DMEM 中で、37 °C、10 分間プレインキュベートした後、細胞へ添加し、1 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて、内封薬物の漏出を観察した。

(5) ドキソルビシン封入 SAMP リポソームの抗腫瘍効果

ドキソルビシン (Dox) は、硫酸アンモニウム法によって SAMP リポソームへ封入した。Dox 封入 SAMP リポソームの抗腫瘍効果を評価するために、B16-F1 細胞を皮下に移植して形成した腫瘍の大きさが 100 mm³ にまで成長した担ガンヘアレスマウスに、Dox 溶液または Dox 封入 SAMP リポソームを 1 回投与あたり Dox 濃度 0.5mg/kg で移植 5、8、12、15 日後に尾静脈内投与した。腫瘍体積は、腫瘍の直

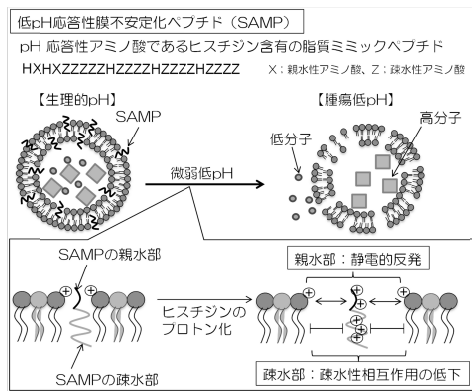
径および短径を測定し、以下の式により算出した。

$$(\text{腫瘍体積}) = 0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$$

4. 研究成果

(1) SAMP-lipo の構築

本研究では、新たに微弱低 pH 応答性の薬物放出システムを構築した。リポソームは安定なラメラ構造を有するために内封薬物を保持することが可能であることから、微弱低 pH 下において、ラメラ構造を乱すことができれば、内封薬物の放出を制御できると考えられる。そこで、ラメラ構造に導入されやすいように、脂質分子を模倣した親水性アミノ酸ブロックと疎水性アミノ酸ブロックからなる両親媒性ペプチドの各ブロックにヒスチジンを組み込んだ新規ペプチド SAMP をカチオン性リポソームに搭載した。本リポソームは、下図に示すように、生理的 pH では安定なラメラ構造を形成するが、微弱低 pH において、ヒスチジンがプロトン化することにより、疎水部において、脂質分子と SAMP の疎水部間の疎水性相互作用の低下および親水部において静電的反発によりリポソーム膜がルーズになることにより低分子薬物のみ短時間で放出されることが期待される。

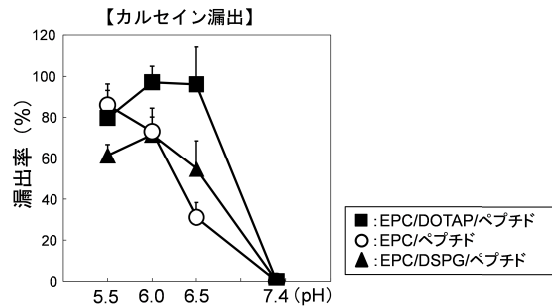


実際に、EPC と DOTAP から構成されるカチオン性リポソームに SAMP を 5 mol% 搭載し、粒子径および表面電荷を測定した結果、pH 7.4 における粒子径は約 100 nm であり、pH 6.5 以下では粒子径は増大し、pH 7.4 に比べて約 2 倍であった。また、表面電位は、pH 7.4 では -2.0 mV であったが、pH 6.5 において +9.8 mV へと変化した。これらの結果は、微小な pH 変化によりペプチドに含まれるヒスチジンがプロトン化されることにより、粒子径および表面電位が変化することが示唆された。pH 7.4 から 6.5 へ低下した際の粒子径の増大は、ヒスチジンがプロトン化されることにより、疎水部における疎水的相互作用の低下と親水部における静電的反発のため、リポソーム構造がルーズになったためであると考えられる。

(2) 異なる pH 条件における SAMP-lipo からの薬物放出評価

下図に示すように、正電荷リポソームにペ

プチドを搭載した場合 (EPC/DOTAP/ペプチド)、pH 6.5 における漏出率が約 100% であったが、中性リポソーム (EPC/ペプチド) では約 30%、負電荷リポソーム (EPC/DSPG/ペプチド) では約 50% と著しく低下した。さらに負電荷リポソームでは pH を変化させても最大で約 70% しか漏出されなかった。また、中性リポソームの場合、pH の低下に伴い漏出率が増大したが、正電荷リポソームの漏出パターンと大きく異なっていた。すなわち、SAMP による微弱低 pH 性薬物放出を期待するためには、正電荷リポソームに SAMP を搭載するのが最適であり、このことは恐らくペプチドと脂質の親水部における静電的反発が pH 応答性および内封薬物の漏出に寄与していることを示唆するものである。

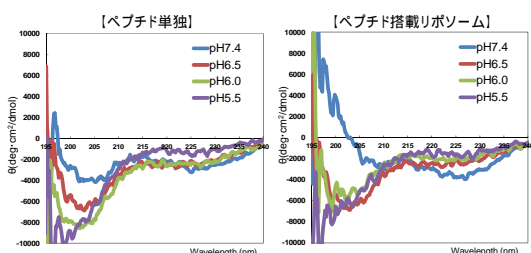


また、ペプチドの構造活性相関を検討するために、各種ペプチドを搭載したリポソームからのカルセイン漏出を比較した。ヒスチジンおよび疎水性アミノ酸ブロックを有するスクランブルペプチド SAMP-HH 搭載リポソームでは、漏出率は pH 6.5 において約 30% であり、最大でも約 60% であったことから、構成アミノ酸が同じであっても、ペプチドの親水部および疎水部におけるヒスチジンのブロックを有する配列は pH 応答性の内封薬物の漏出を著しく低下させることが示唆された。親水部と疎水部比を変えた配列 SAMP-H1-L1 搭載リポソームでは、漏出率は pH 6.5 において約 30% であり、最大でも約 50% であったことから、構成アミノ酸が同じであっても、ペプチドの親水部および疎水部の比を変更することにより、pH 応答性の内封薬物の漏出を著しく低下させることが示唆された。4 残基減の配列 SAMP-4AA のペプチドでは、リポソームが不安定であり、カルセインを封入することができなかった。これらの結果より、SAMP が微弱低 pH (6.5) に応答して、十分な薬物放出を達成するためには、ペプチドの親水部と疎水部の比率が 1 : 5 であり、ペプチド長が 24 残基、ヒスチジンおよび疎水性アミノ酸ブロックを有する必要があることが示唆された。

(3) 異なる pH 条件における SAMP 単体および SAMP-lipo の CD スペクトル解析

SAMP-lipo の pH に応答した薬物放出のメカニズムを明らかにするために、ペプチドの二次構造の変化に着目した。下図に示すように、SAMP 単独の場合、pH 7.4 では -helix (196 nm 付近に正、207 と 222 nm 付近に負のピー

ク)であったが、pH の低下に依存して、順次ランダムコイル型 (196 nm 付近に負のピーク)へ変換された。一方、SAMP-lipo の場合、pH 7.4 では同様に α -helix であったが、pH 6.5 において、ほぼ完全にランダムコイル型へ変換された。このように SAMP 単独および SAMP-lipo では pH 変化に伴う構造変換が異なっていた。すなわち、微弱低 pH 下で、SAMP がランダムコイル構造へシフトすることが、リポソーム膜構造の乱れに關与することが推察された。さらに、SAMP の pH 応答性には膜構造基盤が不可欠であることが示唆された。



(4) SAMP-lipo からの低分子選択的な薬物放出

SAMP-lipo の低分子化合物選択的な漏出について検討するために、カルセイン (Mw 622.55) と Texas Red 標識デキストラン (Mw 3,000) を共封入し、各 pH buffer 下における各モデル薬物の漏出を評価した。その結果、カルセインは pH 6.5 において約 60%、それ以下では約 80% 漏出された。一方、デキストランは全ての pH において漏出は認められなかったことから、SAMP-lipo は微弱 pH 変化により、低分子化合物を選択的に漏出させることが確認された。さらに、共封入 SAMP-lipo からの薬物放出パターンを共焦点レーザー顕微鏡によって観察した結果、微弱低 pH においては、分子量が大きい Texas Red 標識デキストランのみが、細胞内に取り込まれていた。これらの結果より、SAMP-lipo に低分子の抗癌剤と高分子の抗腫瘍核酸などを共封入することで、SAMP-lipo が腫瘍へ送達された後に、細胞外低 pH に応答して、低分子薬物が放出されるだけでなく、抗腫瘍核酸は作用部位の細胞内まで送達可能であるため、両薬物による効果的な癌治療が期待できると考えられる。

(5) ドキソルピシン封入 SAMP リポソームの抗腫瘍効果

低用量 Dox 投与において、SAMP-リポソームは Dox 溶液に比べて、高い腫瘍成長抑制効果を示した。

SAMP-lipo は低 pH 応答性を有する両親媒性ペプチドであり、脂質膜に組み込むことで、腫瘍の微弱低 pH に応答して、選択的に低分子薬物を放出可能な新規薬物キャリアーである。今後、SAMP-lipo 表面に SAPSP 修飾した新規キャリアーを構築し、その内部に治療薬を搭載することで、画期的な癌治療法の開

発へ繋がるとともに、診断薬を内封することで、腫瘍微小環境下の癌細胞を検出することも可能であることから悪性度の高い癌を識別可能な新規の診断法開発の基盤技術として期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Hama S, Itakura S, Nakai M, Nakayama K, Morimoto S, Suzuki S, Kogure K. Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry. *J Control Release*. 査読有, 206, 2015, 67-74. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.011.

[学会発表](計 4 件)

濱 進、板倉祥子、鈴木智子、中山佳代子、森本智士、小暮健太郎
腫瘍内動態制御可能な低 pH 応答性ペプチド修飾薬物キャリアーの開発
第 33 回分子病理研究会
2014 年 07 月 25 日 ~ 2014 年 07 月 26 日
宮城

濱 進、小暮健太郎
腫瘍微小環境にตอบสนองする新規ペプチドを修飾したナノ粒子はポリエチレングリコールのジレンマを克服する
第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 09 月 25 日 ~ 2014 年 09 月 27 日
横浜

濱 進、大石利一、板倉祥子、小暮健太郎
腫瘍内低 pH 応答性ペプチドを利用した薬物放出キャリアーの開発
第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
2014 年 11 月 20 日 ~ 2014 年 11 月 21 日
徳島

鈴木智子、濱 進、板倉祥子、中井麻由美、中山佳代子、森本智士、小暮健太郎
微弱低 pH 応答性ペプチド SAPSP 修飾ナノ粒子の腫瘍内透過メカニズムの解析
第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
2014 年 11 月 20 日 ~ 2014 年 11 月 21 日
徳島

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 弱酸性 pH 応答性ペプチド及び該ペプ

チドを含むリポソーム
発明者：小暮健太郎，濱 進
権利者：小暮健太郎，濱 進
種類： 特許
番号： PCT/JP2013/078497
出願年月日：2013 年 10 月 22 日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
京都薬科大学薬品物理化学分野
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bukka/>

6．研究組織

(1)研究代表者

濱 進 (HAMA Susumu)
京都薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：60438041