

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：54601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25889065

研究課題名(和文) Membranome創薬 ～膜の認識・融合・制御を達成するDDSの創成～

研究課題名(英文) Membranome Drug Discovery -Control of recognition, fusion and regulation of drug carrier-

研究代表者

林 啓太 (Hayashi, Keita)

奈良工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：10710783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、ドラッグ・デリバリー・システムにおけるアクティブターゲティング、特にがん治療においては、抗体やレクチンといった様々な分子が、がん細胞を標的する物質として用いられてきた。がん細胞標的物質をベシクル表面に修飾することで、がん細胞に特異的な送達を達成してきた。これら、がん細胞標的物質を主体とした研究は多く行われているが、ベシクルに着目した研究はほとんど行われていない。本研究では、がん細胞標的物質だけではなく、ベシクルの特性が薬物送達効率に大きく影響することを明らかにした。この結果をもとにベシクルをデザインすることで、より高効率に薬物をがん細胞に送達することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：It has been investigated to active targeting for cancer cells by using biomolecules, such as anti-body and lectin. Drug encapsulating vesicles, such as liposomes and niosomes, were immobilized by these biomolecules in order to deliver efficiently and specifically drug for cancer cells. In recent years, Development of cancer cell targeting biomolecules has been investigated frequently. On the other hand, it has been hardly investigated about an optimal vesicle in spite of development of various kinds of vesicles. In this study, not only cancer cell targeting biomolecules, but also an optimal vesicle has been investigated. This result supported to improve drug delivery efficiency.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：Drug Delivery System Self-assembly Vesicle

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療における化学療法では、抗がん剤の正常な組織への蓄積による重度な副作用が問題となっている。この副作用を軽減するため、抗がん剤をがん細胞のみに送達する方法が検討されてきた。ドラッグ・デリバリー・システムにおけるアクティブターゲティングがその1つである。がん細胞は正常細胞とは異なる膜タンパク質が存在しており、この違いを認識する抗体やレクチンの検討が数多く行われてきた。この異なる膜タンパク質の認識が可能な抗体やレクチンを薬剤キャリアであるベシクルの表面に修飾することで、薬剤をがん細胞のみに効率的に送達することが可能となった。結果として、がん細胞へより多くの抗がん剤が送達され、正常細胞への抗がん剤の蓄積が抑制されることで、抗がん剤を単体で投与する場合と比較し、抗腫瘍効果の向上と副作用の軽減が達成された。

### 2. 研究の目的

上記の様に、がん細胞を特異的に標的する分子に関しては、数多くの検討が行われてきた。しかし、ベシクルに関する検討は行われていない。ベシクルに関して、リン脂質より成るリポソームを用いる場合が多いが、そのリン脂質の種類によりリポソームの物理化学的な特性は大きく変化をする。また、コレステロールやスフィンゴ脂質を含む場合もリポソームの特性を変化させることが知られている。さらに近年では、リン脂質から成るリポソームだけではなく、非イオン界面活性剤から成るニオソームについても、その有用性が検討されている(K. Hayashi, *et al.*, *J. Drug Deliv.*, 2012, **2012**, 842785)。これらベシクルと同様に抗体やレクチンといったがん標的物質を修飾した場合、全てのベシクルが同程度の標的性を示すとは限らない。そこで本研究では、がん細胞への標的性が報告されているレクチンの一種 Concanavalin A を非イオン界面活性剤 Span 80 から成るニオソーム Span 80 ベシクル、およびリン脂質 1,2-dipalmitoyl-*sn*-gl-yccero-3-phosphocholine (DPPC)を Span 80 ベシクルに混合することによりベシクル膜の特性を変化させることで、Concanavalin A (Con A)のがん細胞への標的性がどのように変化するかを検討する。

### 3. 研究の方法

Span 80 ベシクル、および DPPC-Span 80 ベシクルは二段階乳化法により調製した(K. Hayashi, *et al.*, *Colloids Surf. B*, 2011, **87**(1), 28-35) DPPC 添加量の割合は Table 1 に示す。Con A は DPPC-N-Hydroxysuccinimide (DPPC-NHS)と反応させ、二段階乳化時に混合することで、ベシクル膜への修飾を行った。

調製したベシクルはエクストルーダー法により粒径を 100 nm に調整した。このベシクルを用いて、下記の方法にて検討を行った。

**Table 1** 各 DPPC-Span 80 ベシクルの調製時における脂質の割合。

Span80 [mg]	DPPC [mg]	DPPE-NHS [mg]
300	—	5
285	15	5
270	30	5
240	60	5
210	90	5
180	120	5

#### (1) DPPC-Span 80 ベシクル内に含まれる DPPC 濃度の測定

これまでの研究において、Span 80 ベシクルにコレステロールを添加した場合、ベシクル膜内に含有可能なコレステロール量が制限されることを報告している(K. Hayashi, *et al.*, *Colloids Surf. B*, 2011, **87**(1), 28-35)。そこで本研究では、Span 80 ベシクル内に含まれる DPPC 濃度を定量的に評価した。各濃度における DPPC を Span 80 に混合し、ベシクルを調製した後、全体の質量を乾燥質量より、DPPC 濃度をリン脂質テストワコー C キット (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) により定量することで、ベシクルに含まれる DPPC の割合を測定した。

#### (2) DPPC-Span 80 ベシクルの膜特性解析

ベシクルの物理化学的な特性、特に膜特性に関して、薬剤キャリアの機能として非常に関連性があることを報告している(K. Hayashi, *et al.*, *Int. J. Biol. Sci.*, 2013, **9**(2), 142-148)。そこで本研究では、蛍光プローブを用いた複数の方法(Laurdan, Pyrene, TEMPO 消光法)を組み合わせることで膜特性を評価した。

Laurdan は環境応答性蛍光プローブであり、ヘッドグループ/アシル鎖境界面付近に配向することが報告されている(L. A. Bagatolli, *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**(4), 557-564)。Laurdan は疎水性環境に存在する場合は 440 nm に、親水性環境に存在する場合は 490 nm に最大蛍光波長を示すことが知られており、これはベシクル膜の相状態と相関性を示す。

Pyrene を 336 nm で励起した場合、蛍光波長にはいくつかのピークが確認される。Pyrene はモノマーからの蛍光は 375 nm 付近に発光極大波長があるのに対して、エキシマー蛍光における極大波長は 470 nm へと長波長シフトする。エキシマーの蛍光強度と 375 nm 付近のモノマーの蛍光強度の比はベシク

ルが相分離しているのか、また 375 nm 付近の蛍光強度( $I_I$ )と 393 nm 付近に現れるモノマーの蛍光強度( $I_{II}$ )の比は Pyrene の周囲が親水性・疎水性環境であるかの指標となる(L. Le Guyader, *et al.*, *Biophys J.*, 2007, **93**(12), 4462-4473)。

蛍光プローブ DPH は膜のゲル相に配向されやすく、消光剤 TEMPO は膜の液晶相に配向しやすいという特性を持つ。この特性を利用し、秩序相に配向された蛍光プローブ DPH の蛍光残存率より秩序相ドメインのサイズを測定した(TEMPO-消光法)(K. Suga, *et al.*, *Langmuir*, 2013, **29**(15), 4830-4838)。

### (3) DPPC-Span 80 ベシクルとがん細胞の相互作用評価

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (18:1 NBD-PE)を蛍光プローブとして用い、Con A 修飾 Span 80 ベシクル、および Con A 修飾 DPPC-Span 80 ベシクルをマウス骨肉腫細胞(LM8 細胞)に添加し、15 min インキュベートした後、細胞をトリプシン処理により回収し、PBS により 2 回洗浄した後、フローサイトメーター Attune™ (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, U.S.A)により細胞への取り込みを評価した。

## 4. 研究成果

### (1) DPPC-Span 80 ベシクルの調製、および組成の評価。

Figure 1 にベシクル調製時における DPPC 添加量とベシクル形成時における DPPC 組成の割合を示す。DPPC 添加量の増加に伴い、ベシクル形成時に含まれる DPPC 量も増加することが明らかとなった。このことから、添加量 約 40%において、DPPC は任意に Span 80 ベシクル膜内に存在することが明らかとなった。

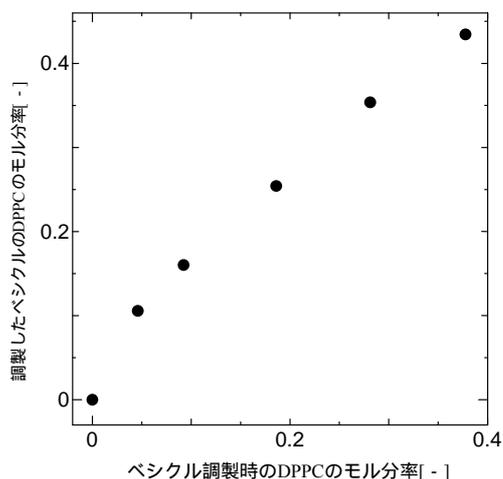


Fig. 1 ベシクル調製時における DPPC 添加量とベシクル形成時における DPPC 組成の割合。

### (2) DPPC 添加量に伴う、DPPC-Span 80 ベシクルの膜特性変化。

Table 1 に示す通り、Span 80 に DPPC を混合し、ベシクルを調製した後、DPPC 含有量に対する膜特性変化について Laurdan, Pyrene, および TEMPO 消光法により評価した。Laurdan による結果を Figure 2 に示す。Span 80 ベシクルでは、490 nm において最大蛍光波長を示したが、DPPC を混合することにより、440 nm においてもピークが観察されたことから、相分離の可能性が示唆された。また、DPPC を混合することにより、より疎水性な環境へと変化することが明らかとなった。

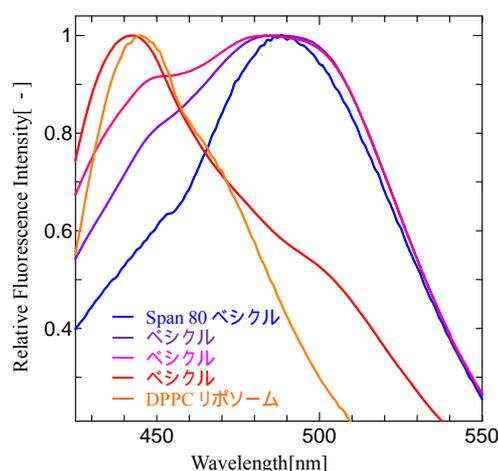
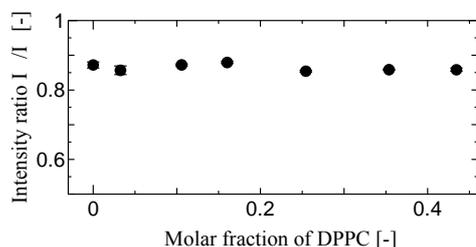


Fig. 2 Laurdan によるベシクル膜の親水・疎水性評価。

より詳細に膜特性を議論するため、Pyrene, 及び TEMPO 消光法を用いて検討を行った。これらの結果からも、一定以上の DPPC を混合することで、DPPC-Span 80 ベシクルは膜上で相分離を誘導していることが明らかとなった。しかし、Laurdan を用いた検討において、DPPC を混合することにより、より親水的な環境を示したのに対し、Pyrene を用いた検討においては、DPPC を添加した場合でもあまり変化が観察されなかった(Fig. 3)。これは、Laurdan がヘッドグループ/アシル鎖界面付近に配向するのにに対し、Pyrene はよりアシル鎖部位に近い領域に分離することが報告されている(B. Hoff, *et al.*, *Biophys J.*, **88**(3), 1818-1827)。従って、アシル鎖部位における親水・疎水性に関しては DPPC 添加した場合でも、あまり変化しないことが明らかとなった。

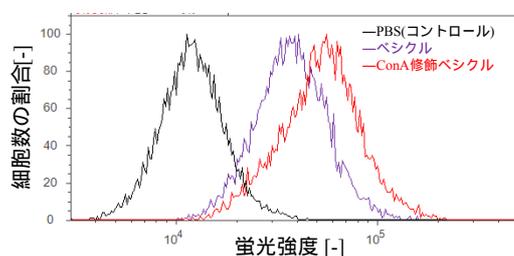
### (3) LM8 細胞による DPPC-Span 80 ベシクルの取り込みの評価。

上記の検討をもとに、フローサイトメーターにより LM8 細胞による Con A 修飾 DPPC-Span 80 ベシクルの取り込みを評価した。Con A 修飾 DPPC-Span 80 ベシクルの LM8 細胞による取り込みを評価するために、まず



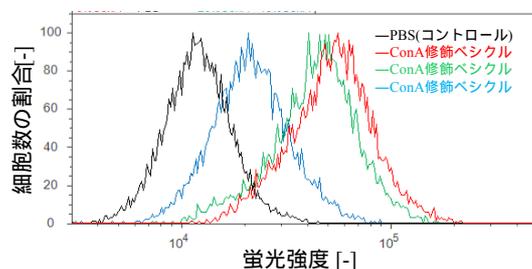
**Fig. 3** Pyrene による親水・疎水性評価．DPPC を添加した場合でも大きな変化は観察されなかった．

Con A の LM8 細胞によるベシクル取り込みに対する影響を評価した(Fig. 4)．その結果，Con A を修飾することで，ベシクルの取り込みが増加することが明らかとなった．



**Fig. 4** Span 80 ベシクル, および Con A 修飾 Span 80 ベシクルの LM8 細胞による取り込み．

上記の結果を踏まえ，各 DPPC-Span 80 ベシクルの LM8 細胞による取り込みを評価した(Fig. 5)．その結果，DPPC 含有量が増加するに伴い，LM8 細胞による取り込みが低下することが明らかとなった．



**Fig. 5** Span 80 ベシクル, および Con A 修飾 Span 80 ベシクルの LM8 細胞による取り込み．

これまでの検討により，Span 80 ベシクルの方がリポソームと比較し，より送達効率が低いことを報告している(K. Hayashi, *et al.*, *Int.*

*J. Biol. Sci.*, 2013, **9(2)**, 142-148) 本研究によりがん細胞標的物質を修飾した場合でも，Span 80 ベシクルのような運動性の高いベシクルの方が(K. Hayashi, *et al.*, *Colloids Surf. B*, 2011, **87(1)**, 28-35) より効率的に送達可能であることが明らかとなった．

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 〔その他〕

ホームページ等  
奈良工業高等専門学校物質化学工学科ホームページ  
<http://chemhp.chem.nara-k.ac.jp/staff/kagakukougaku/hayashi.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 啓太 (HAYASHI KEITA)  
奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・助教

研究者番号：10710783