

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282132

研究課題名(和文) ナノミクスが拓く次世代のメタボリックシンドローム治療

研究課題名(英文) Nanomix for a future treatment approach of metabolic syndrome

研究代表者

梶本 和昭 (Kajimoto, Kazuaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：10416216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが開発した脂肪組織の血管に対する選択的なナノ送達システム(ナノDDS)を発展させ、独自の脂肪血管標的化リガンドと新たな機能性医薬分子の開発を目指して研究を行った。独自のリガンドについてはin vivoで脂肪血管に対する移行能を有するDNAアプタマーを同定し、これを搭載したナノDDSを構築して肥満モデルマウスに対する有意な肥満治療効果を実証した。新たな機能性医薬分子については天然化合物であるcurcuminに着目し、これを高効率・高濃度でナノDDSに搭載する技術を確立し、in vitroでの機能評価を完了した。今後、両者を組み合わせたシステムによる治療応用へと展開する。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are to develop an original targeting ligand to adipose vasculature and a new functional medicine for obesity treatment. Regarding the original ligand development, we succeeded to identify a novel single-strand DNA aptamer which has in vivo targeting ability to the adipose vasculature in vivo. In addition, we also proved that the DNA aptamer-modified nano DDS (drug delivery system) has significant anti-obesity effects in the mouse model of diet-induced obesity. Next, we focused curcumin as a new functional medicine and succeeded to establish an efficient methodology for preparation of curcumin-loaded nano DDS. We also proved that the curcumin-loaded nano DDS has pro-apoptotic ability in vitro. In the near future, we proceed to in vivo functional assessments of a novel system composed of the original ligands and curcumin for treatment of obesity.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム リボソーム 肥満 脂肪組織 血管

1. 研究開始当初の背景

地球規模で増え続ける肥満に対して治療法の選択肢は限られており、大きなアンメットメディカルニーズが存在する。研究代表者は、脂肪組織の肥大化に血管が必須であることに着目し、脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管の機能を制御できれば効果的な肥満治療が可能になると考えた。このような作業仮説のもと、研究代表者は脂肪組織の血管に対する高親和性ペプチドを標的化リガンドとして利用し、能動的ターゲティングによる脂肪血管選択的ナノリポソーム型ナノ送達システム (ナノ DDS) の開発に世界で初めて成功した。さらに、「肥満の脂肪組織では、腫瘍と同様の Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によってナノ DDS が受動的に集積する」ことを発見し、能動的ターゲティングと受動的ターゲティングの相乗効果による効果的な肥満治療法として「脂肪組織の血管を標的とするナノ医療戦略」を世界に先駆けて提唱し、その有用性を実証した。

申請者らは、脂肪組織における EPR 効果が肥満に特有の現象であることを見出しており、肥満に伴って脂肪組織の血管に機能的・構造的な異常が生じることが強く示唆された。このことから申請者は『脂肪血管の異常こそが肥満に付随する病態の本質であり、異常を来した脂肪血管を正常化することで肥満から始まるメタボリックシンドロームの病態を根治できる』という新たな仮説をもつに至った。そこで、申請者らは脂肪血管の初代培養系を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、肥満の脂肪血管で有意に発現が亢進する因子として CYP1B1 を新たに同定し、さらに CYP1B1 の knockdown によって血管内皮機能が著しく活性化することを見出した。これらの知見から、肥満の脂肪血管で高発現している CYP1B1 を特異的に阻害する医薬分子をナノ DDS に搭載して脂肪血管へ選択的に送達することで、「薬物による選択性」と「DDS による選択性」を兼ね備えた極めて選択性の高い安全かつ効果的な治療法が実現できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、以下の項目について検討を行い、脂肪組織の血管を正常化してメタボリックシンドロームを根治する次世代のナノ医療システムを創製することを目的とする。

(1) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規の DNA アプタマーリガンドを開発してリポソーム型ナノ DDS に搭載し、*in vivo* で脂肪血管へのターゲティング能が最大となるようにシステムを最適化する。

(2) CYP1B1 が脂肪血管の機能低下を引き起こすメカニズムを明らかにし、CYP1B1 の機能を選択的に阻害する化合物を同定する。さらに、その化合物をベースとして、高効

率にナノ粒子化するための構造修飾を施した多機能性医薬分子を開発する。

(3) 脂肪血管標的化ナノ DDS に機能性医薬分子を搭載して疾患モデルマウスに投与し、*in vivo* におけるメタボリックシンドローム治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドの開発

予備検討で得られていた脂肪血管内皮細胞を特異的に認識する新規 DNA アプタマー候補配列 (76mer) および PCR 増幅のためのプライマー相当配列を除去した配列 (40mer) の 5' 末端を蛍光標識した 1 本鎖 DNA を用い、脂肪血管内皮細胞の初代培養細胞に対して様々な濃度で処理を行い、洗浄後、脂肪血管内皮細胞に結合した DNA アプタマー量を蛍光強度から測定した。

(2) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドを搭載したナノ DDS の構築

5' 末端にアミノリンカーを付加した 40mer の 1 本鎖 DNA を合成し、NHS 化 PEG₅₀₀₀-DSPE と反応させることにより、DNA アプタマー修飾 PEG 脂質を合成した。

また、ローダミンを内包した EPC/Chol/PEG₅₀₀₀-DSPE (67:33:5) の脂質組成からなるリポソームを逆相蒸発法にて調製し、未封入のローダミンを限外濾過にて除去した。得られたローダミン内包 PEG 化リポソームに DNA アプタマー修飾 PEG 脂質を総脂質量の 0.625 モル%量添加してインキュベーションし、アプタマー修飾リポソームを調製した。

得られたアプタマー修飾リポソームをマウスに尾静脈より投与し、17 時間後に脂肪組織を摘出して共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

(3) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドを搭載したナノ DDS の薬効評価

ドキシソルビシンを内包した PEG 化リポソーム (脂質組成は上述の通り) を pH 勾配法にて調製した後、総脂質量の 0.625 モル%量の DNA アプタマー修飾 PEG 脂質を添加して post-insertion 法にてアプタマー修飾リポソームを調製した。

得られたドキシソルビシン内包アプタマー修飾リポソームをマウスに尾静脈より投与し、24 時間後に FITC 標識イソレクチンを尾静脈投与して血管を可視化した後、脂肪組織を摘出して共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。得られた画像データを解析し、脂肪組織の血管密度を算出した。

また、野生型マウスに高脂肪食を与えて肥満を誘導する際、同リポソームを 3 日に一回の頻度で尾静脈より投与し、21 日間の

体重変化を追跡した。リポソームの投与開始から 21 日後にマウスを解剖し、脂肪組織を摘出して重量を測定した。その後、組織を細切して BODIPY493/503 にて脂肪滴を蛍光染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。得られた画像データを解析し、平均の脂肪細胞径を算出した。

(4) Curcumin 内包ナノ DDS の構築と in vitro 機能評価

脂肪組織の血管正常化を促進する医薬分子としてウコン (ターメリック) などに含まれる天然のポリフェノール化合物 curcumin に着目した。Curcumin を内包したナノエマルジョン型 DDS および niosome 型 DDS を構築した。

得られた curcumin 内包ナノ DDS の薬理効果を簡便に評価するため、Hela 細胞に対して種々の濃度で作用させ、細胞生存率を WST アッセイにより測定した。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドの開発

2 種類の DNA アプタマー配列についてプライマー相当配列を含む全長 (Seq1-full、seq2-full) およびプライマー相当配列を除去した配列 (Seq1-40、Seq2-40) を種々の濃度で脂肪血管内皮細胞に作用させ、警句強度の測定を行った。その結果、Seq1 および Seq2 のいずれの場合においても、プライマー相当配列を除去することによって最大結合量が増加し、かつ結合親和性が增大することが明らかとなった (図 1)。

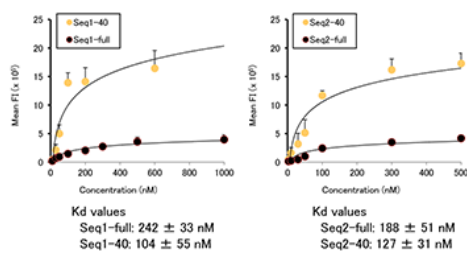


図 1. 新規 DNA アプタマー配列の脂肪血管内皮細胞に対する結合性評価

(2) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドを搭載したナノ DDS の構築

新規 DNA アプタマーを修飾したローダミン

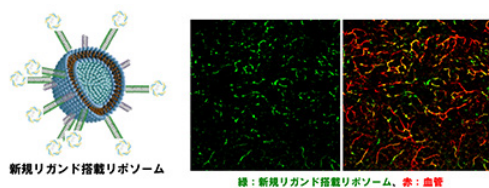


図 2. DNA アプタマー搭載リポソームの in vivo 脂肪血管標的化能の評価

ン内包リポソームを post-insertion 法にて調製し、野生型マウスに尾静脈より投与して 17 時間後に脂肪血管への集積性を共焦点顕微鏡を用いて評価した。その結果、Seq1-40 を修飾したリポソームが脂肪血管に高度に集積している様子が観察された (図 2)。

(3) 脂肪組織の血管を特異的に認識する新規 DNA アプタマーリガンドを搭載したナノ DDS の薬効評価

ドキシソルビシン内包 DNA アプタマー修飾リポソームを野生型マウスに投与し、24 時間後に脂肪組織を摘出して共焦点顕微鏡にて観察した。得られた画像データから血管密度を算出した結果、リポソーム非投与および、PEG 化リポソーム投与群と比較して DNA アプタマー修飾リポソームを投与したマウスの脂肪組織では、血管密度が有意に低下することが判明した (図 3)。

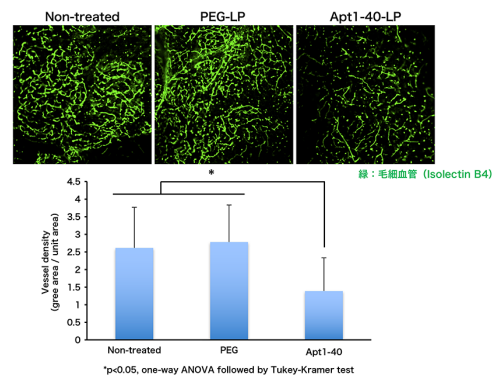


図 3. Dox 内包アプタマー修飾リポソームの in vivo 薬効評価

また、野生型マウスに高脂肪食を与えながら 3 日に 1 回の頻度でドキシソルビシン内包 DNA アプタマー修飾リポソームを尾静脈より投与した結果、投与開始から 21 日後において、リポソーム非投与のコントロールマウスと比較して体重変化率および脂肪組織重量が有意に低下することが明らかとなった (図 4)。

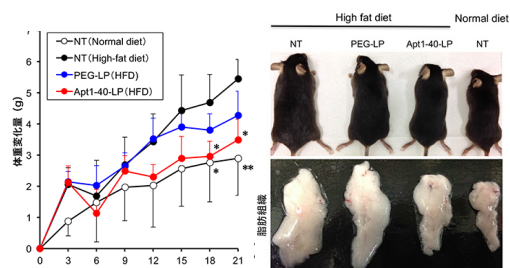


図 4. Dox 内包アプタマー修飾リポソームの in vivo 肥満抑制評価

さらに、リポソームの投与開始から 21 日後の脂肪組織を共焦点顕微鏡にて観察したところ、ドキシソルビシン内包 DNA アプタマ

一修飾リポソームを投与したマウスでは、平均脂肪細胞径もコントロールと比較して有意に小さいことが明らかとなった(図5)。

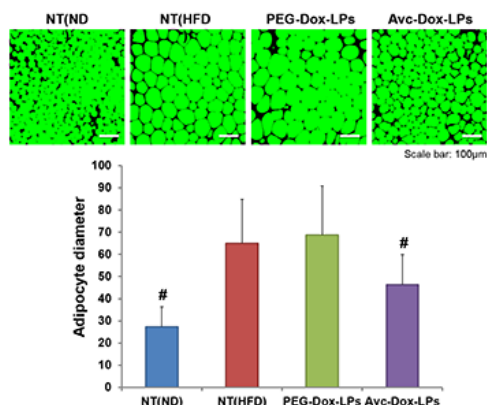


図5. Dox内包アプタマー修飾リポソーム投与による脂肪細胞の縮小

(4) Curcumin内包ナノDDSの構築とin vitro機能評価

Curcuminは、強力な抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用など様々な生理活性を有し、肥満の脂肪血管に高発現するCYP1B1に対する阻害作用を有することも明らかとなっている。しかし、curcuminは水溶性が極めて低く、小腸や肝臓における代謝によって速やかに失活するため、経口投与ではほとんど効果がないという問題がある。そこで、curcuminをナノDDSに搭載し、脂肪血管へ選択的に送達することで上記の問題を克服できると考えた。

Curcuminを効率良くナノDDSに搭載するためには、高濃度のcurcumin溶液を調製する必要がある。一般に、curcuminは脂溶性とされているが、検討の結果、様々な油脂に対してcurcuminは1%も溶解しないことが判明した。そこで、curcuminを高濃度に溶解できる溶媒やナノDDSの調製方法などについて検討を行い、水にほとんど溶解しないcurcuminを数日以上にわたって安定に水中に分散させることが可能なナノDDS

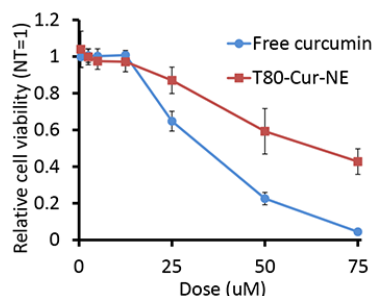


図6. Curcumin内包ナノエマルジョン型DDSによる徐放性薬理効果

の構築に成功した。構築したナノDDS化curcuminの薬理効果をin vitroで簡便に評価するため、がん細胞に対する細胞増殖抑制効果を調べたところ、ナノDDS化curcuminの処理濃度依存的に増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。またDMSOに溶解した遊離のcurcuminを処理した場合と比較して、ナノエマルジョン型DDSの場合の場合はより緩やかな作用を示したことから、ナノエマルジョン型DDSに搭載されたcurcuminは時間経過とともに徐々に培地中に放出されて薬効を発揮する、徐放性を有することが示唆された(図6)。一方、Niosome型DDSの場合、遊離のcurcuminを処理した場合よりも低濃度で強い細胞増殖抑制効果を示したことから、徐放化とは異なる未知の機構を介してcurcuminを細胞に伝達する可能性が示唆された(図7)。現在、これらのナノDDSについてin vivoにおける薬効評価を進めている。

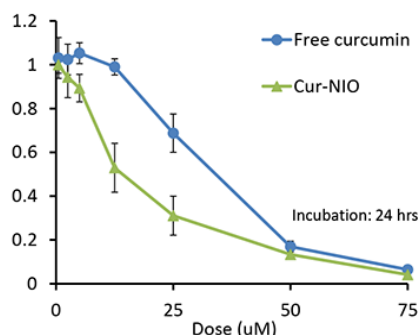


図7. Curcumin内包Niosome型DDSによる薬理効果の増強

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5件)

1. Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. "Innovative Technologies in Nanomedicines: from Passive Targeting to Active Targeting / from Controlled Pharmacokinetics to Controlled Intracellular Pharmacokinetics." *Macromol Biosci.* 2016 in press
2. 櫻井遊, 梶本和昭, 原島秀吉. "血管を標的とする薬物送達システムに基づいた新しい治療法." *Dementia Japan.* (2016) 30(1): 30-40.
3. Sakurai Y, Kajimoto K, Harashima H. "Anti-angiogenic nanotherapy via active

targeting system to tumor and adipose tissue vasculature.” *Biomater Sci.* (2015) 3(9): 1253-1265.

4. Hayashi Y, Hatakeyama H, Kajimoto K, Hyodo M, Akita H, Harashima H. “Multifunctional Envelope-Type Nano Device: Evolution from Nonselective to Active Targeting System.” *Bioconjug Chem.* (2015) 26(7): 1266-1276.
5. Sakurai Y, Kajimoto K, Hatakeyama H, Harashima H. “Advances in an active and passive targeting to tumor and adipose tissues.” *Exp Opin Drug Deliv.* (2015) 12(1): 41-52.

[学会発表] (計 5 件)

1. 梶本和昭. “脂肪血管を標的とした抗肥満 DDS 製剤の開発と新たな研究展開.” *四国オープンイノベーションワークショップ in 松山*, 2016 年 11 月 2 日 (愛媛)
2. Mahara N, Kajimoto K, Harashima H. “Elucidation of endocytosis mechanisms of prohibitin-mediated pathway” *The 18th Hokkaido University – Seoul National University Joint Symposium*, 27th Nov, 2015 (Seoul, Korea).
3. Abbasi S, Kajimoto K, Harashima H. “Nano-Emulsion for the control of 15d-PGJ2 biphasic pharmacodynamics” *The 18th Hokkaido University – Seoul National University Joint Symposium*, 27th Nov, 2015 (Seoul, Korea).
4. 梶本和昭. “脂肪組織の血管を標的とするナノ医療戦略.” *日本油化学会第 53 回年会 オレオナノサイエンス部会ランチョンシンポジウム「新たな医療のディメンジョンを模索するオレオナノサイエンス」*, 2014 年 9 月 10 日 (札幌)
5. 梶本和昭. “脂肪血管を標的とするナノ医療戦略.” *公開シンポジウム「血*

管を標的とするナノ医療の実用化に向けた拠点形成～がんを始めとする国民病を血管から治療する～」, 2014 年 6 月 27 日 (札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO, Kazuaki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号：10416216

(2) 研究分担者

櫻井 遊 (SAKURAI, Yu)
北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号：00707234