

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750160

研究課題名(和文)小胞体ストレスによる細胞アポトーシスを誘導するスマートナノキャリアの構築

研究課題名(英文)Development of cell apoptosis inducing smart nanoparticles by endoplasmic reticulum stress

研究代表者

秋元 淳(AKIMOTO, JUN)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：80649682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は、異常タンパク質が蓄積すると小胞体ストレスと呼ばれる状態になりアポトーシスを誘導する。本研究では、タンパク質のチオール基との反応性を有する分子を細胞内に移行させることにより、細胞内のタンパク質と薬物の反応によりタンパク質を変性させて、小胞体ストレスに基づく細胞死を人為的に誘導する方法を検討した。この結果、数種類のクロロメチルアルカン化合物は単体で投与しても細胞毒性が低いのにに対し、ナノ粒子により化合物を細胞内導入することで高い細胞殺傷性を示すことを明らかとなり、ナノ粒子の細胞内導入の制御により選択的に細胞死を誘導できる新たな細胞殺傷薬として利用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cells become “endoplasmic reticulum (ER) stress” under the accumulation of abnormal proteins inside ER and induce apoptosis under the excess ER stress. In this study, ER stress derived cell apoptosis inducing system was developed by the intracellular delivery of protein reactive molecules using nanoparticles to attack proteins inside cells. To attack intracellular proteins, the study employed chloromethyl compounds because chloromethyl chemicals have high reactivity with thiol groups on proteins. The study revealed that several chloromethyl compounds, in particular chloromethyl alkenes, showed scarce cellular cytotoxicity when they applied to cells alone. In contrast, chloromethyl compounds exhibited high cytotoxicity by intracellular introduction with nanoparticles. From the results, chloromethyl compounds are possibly applied to new cell death inducing agents by using them with nanoparticles that possess selective intracellular uptake property.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

小胞体は、合成されたタンパク質の折りたたみや切断、ジスルフィド結合の付加、コンフォメーションが異常なタンパク質の分解・排除などの機能をもつ細胞内小器官である。この機能が様々な因子により正常に作用しないと、異常なタンパク質が小胞体内に蓄積する“小胞体ストレス”という現象を引き起こす。細胞は恒常性を維持するために、小胞体ストレス応答とよばれる異常なタンパク質の蓄積を回避する機構があり、翻訳抑制やタンパク質分解酵素の発現促進などを行う。その一方、過度の小胞体ストレス条件下では、小胞体ストレス応答のみでは対応できず、細胞をアポトーシスする機構を有する。特に、がん細胞は正常細胞と比較して小胞体ストレスに対する感受性が高く、この機構を利用したプロテアソーム阻害剤が血液がんの治療薬として承認されているが、組織選択性を有さないことから末梢神経障害などの副作用を引き起こすことが知られている。このような薬物にドラッグデリバリーシステム(DDS)技術を適用することは非常に重要な課題である。すなわち、薬物キャリア内に薬物を封入することで、固形がん部位にみられる Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により、薬物の正常組織への移行抑制、ならびにがん細胞への効率的な薬物送達が可能である。その結果、副作用の低減と治療効果の増大が期待できる。しかし、ナノ薬物キャリアを用いた場合、がん組織への蓄積は期待されるものの、そのほとんどがエンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、エンドソームに局在することが知られている。小胞体ストレスに基づく細胞殺傷効果を発現する場合には、小胞体内への効率的な薬物デリバリーがきわめて重要になる。例えば、タンパク質フォールディング阻害剤により小胞体ストレスを誘導する場合、薬物が小胞体外で放出されると、細胞内に存在するタンパク質やグルタチオンと反応して薬物自体が失活してしまう。このため、小胞体ストレスに起因するアポトーシスを効率的に誘導するには、薬物キャリアの高い小胞体移行性が求められるが、小胞体に関する機能・現象をターゲットとした薬物キャリアの研究はほとんど報告されていないのが現状である。研究代表者はこれまでに、温度応答性ミセルキャリアが温度変化により細胞内移行能を変化させることに成功し、さらに細胞内の小胞体に分布することを明らかとしてきた。この特性を利用すれば、投与後に血中を安定に循環し、EPR 効果により腫瘍部位に集積することが可能である。さらに、腫瘍部位を局所加温することで、細胞内移行を促進させ、小胞体内腔へ内包薬物を効率的に送達することが期待できる。小胞体内で放出された薬物は、タンパク質などに作用し、小胞体の機能を阻害することにより、がん細胞を小胞体ストレスによるアポトーシスに誘導

できると考えられる。本研究では、この小胞体デリバリーによる小胞体ストレス誘導法を確立することで、新規ながん細胞治療法の実現が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、温度応答性ミセル型キャリアの開発で得られた知見をもとに、小胞体ストレス誘導型ターゲティングシステムの基礎検討を行った。まず、タンパク質含有のジスルフィド結合と反応することでフォールディングを阻害し、変性タンパク質の蓄積による小胞体ストレスを効率的に誘導する薬物の探索を行った。この化合物を温度応答性ミセルに内包し、温度付加によって小胞体選択的に薬物を誘導することにより小胞体ストレス応答性の変化を解析し、小胞体をターゲットとした DDS 製剤の開発について追究した(図1)。

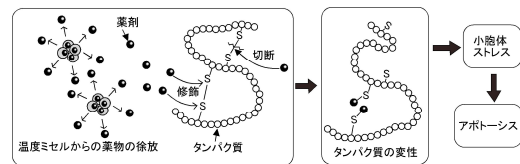


図 温度応答性ミセルから徐放されたタンパク質フォールディング阻害剤によるタンパク質変性法と小胞体ストレスに基づくアポトーシス誘導機構

3. 研究の方法

(1) タンパク質反応性物質内包温度応答性ナノ粒子を用いた温度変化による細胞毒性評価

可逆型付加開裂型連鎖移動ラジカル重合(RAFT 重合)の連鎖移動剤である 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanol のヒドロキシル基を開始点として D,L-ラクチドを開環重合してポリ(D,L-ラクチド)(PLA)を連結した RAFT 連鎖移動剤を合成した。このマクロ RAFT 連鎖移動剤を利用して N-イソプロピルアクリルアミド(IPAAm)と N,N-ジメチルアクリルアミド(DMAAm)を共重合し、温度応答性高分子(P(IPAAm-co-DMAAm))と PLA を連結したブロックコポリマーを合成した。作製したポリマーをジメチルホルムアミドに溶解後、水に対して透析しナノ粒子を形成させた。このナノ粒子溶液に Cell Tracker Red (CTR)を添加後、水に対して透析操作をおこない未内包 CTR を除去した。この CTR を内包したナノ粒子溶液を添加した培養液を用いて、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞を 37 または 42 で培養した。培養後、細胞活性を Cell counting Kit で測定し、内包化合物の細胞に対する影響を評価した。

(2) 温度応答性高分子と非温度応答性高分子からなる外殻をもつ高分子ミセルの設計
PLA をもつ RAFT 連鎖移動剤を利用して、3-

メトキシプロピルアクリルアミド(MPAAm)とIPAAmを重合し、MPAAmからなる非温度応答性鎖またはMPAAmとIPAAmの共重合体からなる温度応答性鎖を有するブロックコポリマーをそれぞれ合成した。鎖長の異なる非温度応答性高分子と温度応答性高分子を任意の割合で混合して、外殻が温度応答性高分子と非温度応答性高分子鎖からなる高分子ミセルを作製した。これらの高分子ミセルの温度変化に対する粒子径の変化を測定し、相転移による温度応答性高分子の凝集後も水中で分散可能な高分子ミセルの作製条件について検討した。

続いて、この非温度応答性高分子を混合した温度応答性高分子ミセルを利用して、マウス線維芽細胞に対する細胞死誘導能を(1)と同様の方法で検討した。さらに小胞体ストレスを効率的に誘導する薬物の探索をおこなった。(1)では、細胞内のチオール基とアミノ基に反応性を有するCTRを利用して細胞に対する影響を検討したが、ここでは、種々のクロロメチル化合物を利用した。これらの化合物単体の細胞毒性を評価後、ミセルに内包することにより、内包化合物の細胞毒性の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) タンパク質反応性物質内包温度応答性ナノ粒子を用いた温度変化による細胞毒性評価

P(IPAAm-co-DMAAm)-b-PLAを水中で会わせて外殻に温度応答性高分子を有するコアシェル型のナノ粒子を作製した(下限臨界溶液温度(LCST): 約40℃, 粒径: 約30nm(37℃), 約600nm(42℃))。このナノ粒子に細胞内のチオール化合物と反応可能なCTRを内包後、培養液に添加してウシ血管内皮細胞を37℃または42℃で培養した。CTRを内包していないミセルおよびCTRのみを細胞に作用させたものは培養温度の変化によらず細胞は増殖し、形態変化は観察されなかった。これに対し、CTRを内包したミセルは、LCST以下の温度で培養したものは同様に正常に増殖したが、42℃で培養したものでは、細胞が収縮し細胞活性が著しく減少した。次に、CTR濃度変化が細胞増殖に与える影響を測定した。CTR単体およびCTR内包ミセルをLCST以下で培養した条件では15μmol/L以上の濃度で、細胞活性に著しい変化が観察された。一方、CTR内包ミセルを42℃で培養した場合には、CTR濃度の増加にともない細胞活性が低下した(図2)。以上の結果より、通常ほとんど毒性のないCTR(半数阻害濃度: IC₅₀=14.5μmol/L)であるが、ミセルを利用して細胞内送達することにより、CTRの細胞毒性を2万倍以上増加できることがわかった。このミセルを利用したCTRの細胞内送達により細胞活性が著しく低下した原因として、CTRの細胞内分布の違いが考えられる。通常、CTRは細胞膜を透過し細胞内に移行後、

グルタチオンS転移酵素により活性化され、細胞内のタンパク質、グルタチオン等の分子と反応する。CTRをミセルに内包した場合、37℃の培養条件下ではCTRはミセル内に内包されているが、外殻高分子が親水性であるために細胞膜を透過することができない。このため、内包されたCTRは細胞外で徐放されるためにCTR単体を作用させた場合と同様の作用機序を示すことから毒性は低い。一方、42℃においては、ミセルが細胞内に移行し、小胞体に分布する。これにより温度応答性高分子に内包されたCTRが小胞体内で作用することによりタンパク質の製造を阻害し、小胞体内の異常タンパク質が増加したために、小胞体ストレスを惹起し、細胞活性が低下したと考えられる。

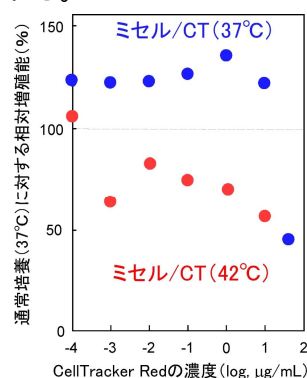


図2. CellTracker Red(CT)内包温度応答性高分子ミセルの温度変化に対する細胞増殖阻害能評価

(2) 温度応答性高分子と非温度応答性高分子からなる外殻をもつ高分子ミセルの設計とクロロメチル化合物導入による細胞活性の評価

(1)では細胞内のチオール基と反応性を有する分子を内包した温度応答性高分子ミセルの細胞内導入によりウシ血管内皮細胞の細胞死誘導に成功した。しかし、温度応答性高分子ミセルは、各種ヒト由来がん細胞に対して温度変化に応答した細胞内移行が観察されなかった。このため、温度応答性ナノ粒子にCTRを内包してもウシ血管内皮細胞以外の細胞に対しては細胞死を誘導することができなかった。この原因として、温度応答性高分子ミセルは相転移によりサブミクロンオーダーの凝集体を形成し、またこの凝集体のサイズコントロールが困難であることが考えられる。そこで、まず温度応答性高分子ミセルのサイズ制御法に関する検討をおこなった。温度応答性高分子ミセルは温度変化にともなう温度応答性高分子鎖の疎水性度の上昇により、ミセル間の疎水性相互作用が強まり粒子が会合し凝集体する。この凝集体の制御を、温度応答性高分子鎖長を変化させて制御することを検討したが、粒子間の相互作用を制御することは非常に困難であった。そこで、温度応答性外殻に親水性高分子を導入し、粒子間の相互作用を制御する方法を検

討した。親水性高分子を温度応答性高分子ミセルに導入したところ、温度付与により形成されるミセル凝集体のサイズは、導入する親水性高分子鎖長および導入量でコントロールできることが明らかとなった(図3)。また、これまで温度応答性高分子ミセルは沈殿形成により薬物放出が抑制される場合があったが、この方法を利用すると、ミセルの分散性が向上することより温度変化に伴う薬物放出の追跡も可能となった。

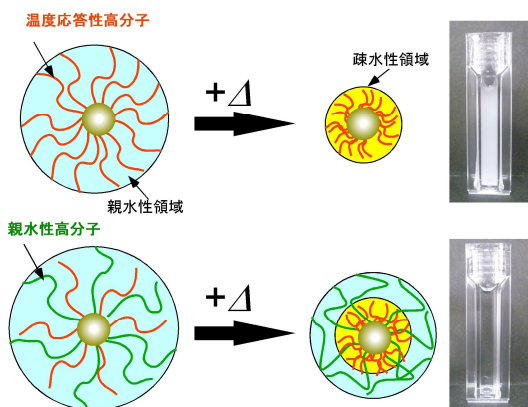


図 3. 温度応答性高分子ミセルと非温度応答性高分子を導入した温度応答性高分子ミセルの温度変化に対する凝集性の変化と LCST 以上の温度におけるミセル溶液の透過度。

次に、この凝集体サイズの制御が可能な温度応答性高分子ミセルを利用して、マウス線維芽細胞の細胞活性を検討した。マウス線維芽細胞を培養後、非温度応答性ブロックコポリマーと温度応答性ブロックコポリマーの比率を変化させた高分子ミセルを細胞に添加した。非温度応答性高分子ミセルに CTR を添加したものでは細胞活性に変化は観察されなかった。また温度応答性高分子のみからなるミセルは、温度付加により凝集体を形成し沈殿したことにより細胞毒性は観察されなかった。これに対し、非温度応答性ブロックコポリマーと温度応答性ブロックコポリマーを 1:1 で混合したものではマウス線維芽細胞の活性が著しく低下した。このブロックコポリマーの比率を変化させたところ、両者の割合は 1:1 程度が細胞内移行に適していることがわかった。温度応答性鎖が過剰の場合、凝集体のサイズが制御できるが数百ナノメートルと細胞内移行しにくいサイズであることから導入効率が低下したものと考えられる。一方、非温度応答性高分子が過剰である場合には凝集後もナノ粒子表面の親水性が非常に高く細胞との相互作用が抑制され細胞内移行効率が低下したものと考えられる。

続いて、細胞内のタンパク質を変性させる化合物として、これまで CTR を利用していたが、他のチオール基反応性化合物の細胞活性抑制能を検討した。CTR は細胞内のチオール基とクロロメチル基を介して反応すること

から種々のクロロメチル化合物を利用して検討した。まず、クロロメチル化合物単体で細胞に作用させ、単体での細胞毒性が低い化合物を探索した。この結果、クロロメチル化合物はクロロメチル基の数が多ほど細胞毒性が高く、芳香環に結合したクロロメチル基は高い毒性を示すのに対しアルキル基に結合したクロロメチル化合物は非常に低い細胞毒性を示すことがわかった(例 2,2-Dimethyl-1,3-dichloropropane : $IC_{50} > 709 \mu\text{mol/L}$)。このクロロメチルアルカン化合物をミセルに内包して細胞に作用させると細胞毒性が 100 倍以上上昇することがわかった(図4)。続いてこの細胞毒性が小胞体ストレスに関連する細胞死に由来するかを検討するため、カスパーゼ由来のアポトーシスの影響を検討した。しかし、小胞体ストレスに關与するカスパーゼの発現は顕著に観察されなかった。この結果は小胞体ストレスの関与を否定するものではないが、クロロメチル化合物による細胞死には小胞体ストレスに限らない細胞死の機構が関与していると考えられる。本研究期間では、細胞死誘導メカニズムは解明されなかったが、クロロメチル化合物は細胞内に直接導入することにより高い細胞殺傷性を示すことがわかり、ナノ粒子の細胞内導入の制御により選択的に細胞死を誘導できる新たな細胞殺傷薬として利用できる可能性が示された。

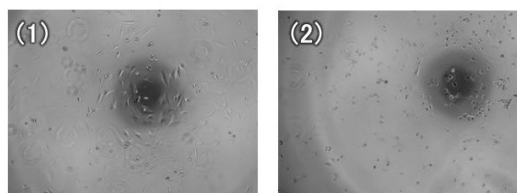


図 4. (1) 2,2-Dimethyl-1,3-dichloropropane (DD) ($709 \mu\text{mol/L}$) および (2) DD ($7.09 \mu\text{mol/L}$) 内包高分子ミセル細胞毒性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 秋元淳, 中山正道, 岡野光夫, 伊藤嘉浩, チオール基反応性化合物内包ナノ粒子の細胞内導入による細胞死誘導システムの構築、つくば医工連携フォーラム 2017, 2018 年 1 月 20 日、国立研究開発法人物質・材料研究機構・千現地区(つくば、茨城)

2. J. Akimoto, M. Nakayama, and T. Okano, Controlled phase transition behaviors of thermoresponsive polymeric micelles by introducing hydrophilic chain in their corona, The 2nd Int'l Conference on Polymer Materials Science, 2016 年 1 月 14-16 日、Bangkok (Thailand)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋元 淳 (AKIMOTO Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医

工学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号:80649682

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし