

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870301

研究課題名(和文) pH応答性高分子を利用した高比重リポ蛋白質の細胞内動態制御

研究課題名(英文) Development of endosomal membrane destabilizing high-density lipoprotein nanoparticle using pH-responsive polymer

研究代表者

KIM HYUNGJIN (KIM, HYUNGJIN)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員

研究者番号：80711457

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)：ナノ粒子を用いた細胞内への薬物送達には、細胞内小器官であるエンドソーム内に留まることにより妨げられる。そこで、本研究では薬物の治療効果の向上を目的として、エンドソーム膜を破壊する高分子と天然のナノ粒子である高比重リポタンパク質間の複合体を調製した。薬物を担持した高比重リポタンパク質は、高分子と複合体を形成することによって、効率よくエンドソームから脱出し薬物の治療効率を上げることが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Intracellular drug delivery by nanoparticles is often hampered by their endosomal entrapment followed by their degradation in the lysosomal compartment and/or exocytosis. Here, we show that internalization and endosomal escape of cargoes in a cationized natural nanocarrier, high-density lipoprotein (HDL), can be controlled in a pH-dependent manner through stable complexation with a membranolytic anionic block polymer. A genetically and chemically cationized form of HDL (catHDL) is prepared. Upon addition of polyanion (PA), catHDL yields inhibition of internalization at neutral pH and its subsequent recovery at mildly acidic pH. Significant enhancement of endosomal escape of a catHDL component is observed after a 1h treatment of human cancer cells with catHDL/PA. Anti-cancer drugs, encapsulated into catHDL/PA are also translocated outside of endosomes, compared with that into catHDL, and their cytotoxicities are enhanced inside the cells.

研究分野：drug delivery

キーワード：endosomal escape internalization membranolytic polymer anticancer drug delivery mildly acidic pH

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ドラッグキャリア開発で頻用されてきた生体適合性高分子ポリエチレングリコール (PEG)の免疫原性が報告されて以来 (*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298, 607, 2001)、PEGを用いないドラッグキャリア開発の重要性が高まっている。高比重リポタンパク質 (High-Density Lipoprotein, HDL)は、約 10 nm のディスク状ナノ粒子であり、生体由来の薬物キャリアとして注目されている。

(2) 我々のグループでは薬物の細胞内送達を目指して、遺伝子組み換えにより apoA-I の C 末端に、カチオン性の細胞膜透過ペプチドを融合し、細胞膜透過型 HDL (cpHDL) を得ることに成功している (*Nanomedicine (London)*, 5, 867, 2010)。これは遺伝子組換え HDL を、ドラッグキャリア応用することに成功した初めての例であり、様々な薬物への展開が期待される。例えば、フラレン誘導体 (*J. Am. Chem. Soc.*, 134, 6092, 2012) やナフトロシアン誘導体 (*ACS Nano*, accepted, 2013) のデリバリーにも成功している。

(3) Doxorubicin (DXR) を内包した cpHDL (DXR@cpHDL) は、DXR の薬効を増強したが、取り込まれた多くの薬物はエンドソームに蓄積した。従って、cpHDL によるさらなる薬物増強のためには、エンドソームから積極的に細胞質へと脱出するキャリアの設計が必要である。申請者は、これまでにカルボキシル基を有する両親媒性高分子を用いて、エンドソーム内における膜破壊のメカニズムを明らかにしてきた (*J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 21, 315, 2010)。この経験を生かしエンドソームを効率良く脱出する cpHDL を作製する。

(4) Poly(alkylacrylic acid) (PAA) は中性から弱酸性へと pH が低下すると、そのカルボキシル基がプロトン化され疎水性が増すことにより、その構造がランダムコイル状態からグロビュル状態へと変化する。重要なことに、この構造変化は近傍に存在するリン脂質二重膜を破壊する。エンドソーム内は弱酸性であることから、PAA がエンドソーム内に取り込まれると、エンドソーム膜は破壊される (*Adv. Drug Delivery Rev.*, 56, 999, 2004)。

(5) そこで、申請者はカチオン化した cpHDL は PAA と複合体を形成し、この cpHDL/PAA 複合体はエンドソームから効率良く脱出できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

ドラッグキャリアの細胞取込後のエンドソーム蓄積は、薬効を低下させる主要な要因

である。本研究では、エンドソームの酸性 pH で構造変化しエンドソーム膜を破壊するアニオン性ポリマー (poly(alkylacrylic acid), PAA) と生体由来の薬物キャリア High-density lipoprotein (HDL) の複合体を用いて、エンドソーム蓄積を回避するドラッグキャリアを開発する。カチオン性ペプチド、カチオン性脂質を用いて HDL をカチオン化し、静電相互作用を利用して PAA との安定な複合体を形成させる。この複合体に薬物を内包させ、薬効が増強されることを確認する。

## 3. 研究の方法

本研究では、エンドソームから脱出するドラッグキャリア設計を目指して、カチオン化 cpHDL と pH 応答性のアニオン性ポリマー PAA との複合体を作製することを目指す。具体的には以下の項目について研究を行う。

### (1) カチオン性脂質導入によるカチオン化 cpHDL の調製

申請者は、まず、90 % の中性リン脂質と 10 % のカチオン性脂質 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP) からなるカチオン化 cpHDL を作製した。DOTAP の導入により、サイズは 15 nm から 60 nm まで増加し、表面電位 (zeta potential) は -11 から +18.6 mV へと変化した。また、カチオン化 cpHDL (10% DOTAP) と PAA との複合体をアガロースゲル電気泳動による移動度から確認した。その結果、10% DOTAP の導入により cpHDL の移動度が増加し、cpHDL はより多くの PAA と結合することを確認した。カチオン性脂質は HDL の構造を不安定化すると報告 (*Soft Matter.*, 9, 2329, 2013) を考慮しながら、DOTAP 混合比の最適化や膜安定化のためのコレステロール導入など、さらなる条件検討を行う。

### (2) PAA の合成及びカチオン化 cpHDL/PAA 複合体形成の条件検討

PAA の合成は、海外共同研究者である ETH の J. Leroux 教授のラボと共同で行う。エンドソーム内の pH 環境に応答して膜を破壊する PAA とカチオン化 cpHDL の複合体形成の最適化は、申請者の過去の実績を元にして (*Macromol. Biosci.*, 9, 825, 2009)、混合時のイオン強度、PAA の分子量・濃度・疎水性グループなどを変化させることにより行う。複合体形成において、カチオン化 cpHDL と PAA 間での静電相互作用のみならず、cpHDL 脂質内部の疎水性空間と PAA 由来の疎水性グループ (アルキル鎖) 間の疎水性相互作用も重要なファクターである。従って、アルキル鎖の長さを変化させ、複合体の形成を検討する。

### (3) 光学・電子顕微鏡によるエンドソーム

## 脱出及び薬効増強の確認

### (3-1) 共焦点顕微鏡観察及び電子顕微鏡観察

共焦点顕微鏡による蛍光観察により癌細胞内のエンドソームからの脱出を確認する。生細胞のエンドソーム・リソソームを緑色蛍光色素でラベルし、カチオン化 cpHDL は赤色蛍光色素でラベルし、共局在性を調べる。また、カチオン化 cpHDL に内包させた DXR の赤色蛍光を利用して、エンドソームから脱出した DXR の動態を確認する。cpHDL は細胞成分にはないディスク状の独特な構造をしており、apoA-I の存在により化学固定も可能なため、電子顕微鏡観察に適している。これらの特徴を活かし、細胞内のエンドソームから脱出するカチオン化 cpHDL の様子を直接可視化する。申請者の知る限り脂質・ポリマー系ドラッグキャリアの細胞内動態を電子顕微鏡で直接可視化した例はない。申請者と同じ研究所に所属する Heuser 教授との共同研究により、細胞膜表面の cpHDL が可視化できることは既に報告済みである (*J. Am. Chem. Soc.*, 134, 6092, 2012)。本申請課題においても、共同研究を予定している。

### (3-2) モデル薬物による薬効評価及び核酸医薬への応用

DXR をモデル薬物として使用し、PAA との複合体形成により薬効が向上することを細胞増殖阻害アッセイにより確認する。更には、抗癌剤のみならず、合成 siRNA にもその用途を拡張する。siRNA を脂質修飾すると、HDL への内包が可能である (*Nat. Biotechnol.*, 25, 1149, 2007)。従って、カチオン化 cpHDL と PAA との複合体を形成させ、エンドソーム脱出により siRNA の効果を高めることができる。

## 4. 研究成果

(1) pH 応答性高分子 (polyanion, PA) は中性条件下アニオン性であり、酸性のエンドソーム内でプロトン化して電氣的に中性化、すなわち疎水化することによりエンドソーム膜を破壊する。2015 年度には、この PA を高比重リポタンパク質 (HDL) と静電相互作用により複合体を形成させることを目指した。HDL の構成タンパク質 apoA-I の C 末端にカチオン性の TAT ペプチド融合し、更にカチオン性脂質である DOTAP

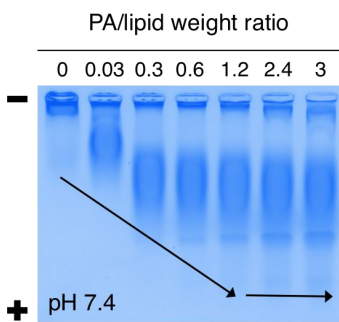


図1. catHDL/PA複合体形成の確認

(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) を導入することでカチオン化

HDL (catHDL) を調製することに成功した。catHDL と PA との複合体の形成は、未変性アガロースゲル電気泳動における catHDL の移動度の変化により確認できた (図 1)。catHDL に存在する脂質重量に対して 1.4 倍重量の PA を添加した際に、PA 結合は飽和に達することが分かった。

(2) 赤色蛍光ラベル catHDL/PA 複合体を細胞に作用させ、その後その細胞のエンドソームを緑色蛍光色素でラベルした。catHDL のみの処理では赤色蛍光がエンドソームに局在していることに対して、catHDL/PA 複合体の処理では細胞質全体へと広がっていた (図 2)。エンドソーム脱出効率をこれらの蛍光色素の共局在率 (%) で評価したところ、catHDL のみの処理では、1 時間処理で約 55% であり、3-5 時間ではやや低下し 40% の共局在率を示した。一方、PA/catHDL 複合体では、1 時間の培養で既に約 20% と低い共局在率を示した。これにより、catHDL は PA との複合体形成によって、エンドソーム脱出能力を獲得したことが確認された。

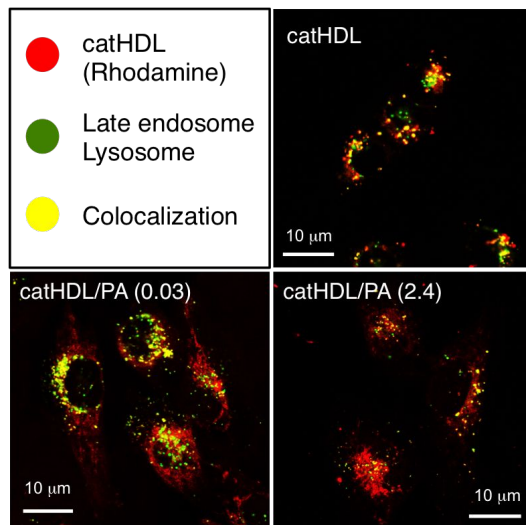


図2. catHDL/PA複合体のエンドソーム脱出

(3) 2016 年度には、蛍光性の抗がん剤であるドキシソルピシンを内包した catHDL (DXR@catHDL) を調製し、PA との複合体

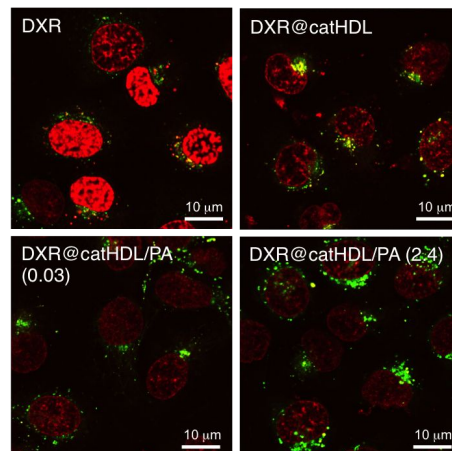


図3. DXR@catHDL/PA複合体のエンドソーム脱出

を形成させた後、薬物の細胞内動態の観察を行った。その結果、DXR@catHDL に比べて、DXR@catHDL/PA において DXR のエンドソーム内への局在が減少しており、エンドソームからの脱出を促進していることが明らかとなった(図 3)。一方、細胞内取り込み量においては、DXR@catHDL/PA が DXR@catHDL に比べて減少しているにもかかわらず、同等の薬効を示していた。これは DXR のエンドソーム脱出により低い取り込み量による薬効の低下を補ったからであると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Polymer-Coated pH-Responsive High-Density Lipoproteins, Hyungjin Kim, Haruki Okamoto, Arnaud E Felber, Anna Polomska, Nobuhiro Morone, John E Heuser, Jean-Christophe Leroux, Tatsuya Murakami, J. Control. Release 228, 132-140 (2016)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Development of pH-dependent endosomolytic high-density lipoprotein nanoparticles, Hyungjin Kim, 第 30 回日本 DDS 学会, 2014 年 7 月 30 日-2014 年 7 月 31 日

2. Development of polyanion-coated high-density lipoprotein nanoparticles, Hyungjin Kim, 第 64 回高分子学会年次大会, 2015 年 5 月 27 日-2015 年 5 月 29 日

3. Development of pH-dependent endosome-destabilizing high-density lipoprotein nanoparticles, Hyungjin Kim, 2015 Controlled Release Society Annual Meeting, 2015 年 7 月 26 日-2015 年 7 月 29 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

キム ヒョンジン ( KIM Hyungjin )  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
特定研究員  
研究者番号：80711457

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：