

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07907

研究課題名(和文) 腫瘍微小環境応答性ペプチド搭載核酸キャリアーの開発と肝転移がん治療への展開

研究課題名(英文) Development of nucleic acids carriers equipped with tumor microenvironment-sensitive peptides for the therapy of metastatic liver cancer

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境を利用して、肝転移がんに対する新規治療法を開発するために、腫瘍内透過性と微弱低pH応答性を有する新規ペプチドCTR-SAPSPをデザインした。CTR-SAPSPを搭載した核酸キャリアーは、従来型に比べて、高い腫瘍内透過性を有するだけでなく、微弱低pHに反応して細胞質まで送達可能であった。さらに、siRNAをキャリアーに内封する際に、pH応答性ペプチドSAPSPをsiRNAとの凝縮に用いることで、細胞質におけるsiRNAの放出効率が改善され、高い遺伝子発現抑制効果が認められた。これらの腫瘍微小環境応答性ペプチドを搭載した核酸キャリアーは、肝転移がんの新規治療法と期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop novel therapeutic procedure for metastatic liver cancer by using tumor microenvironment, in this study, a novel peptide CTR-SAPSP was designed. CTR-SAPSP has tumor permeability and slightly acidic pH-sensitivity. The tumor permeability of nucleic acids carriers modified with CTR-SAPSP was more potent than that of conventional carriers. Moreover, nucleic acids carriers modified with CTR-SAPSP were delivered into the cytoplasm of cells in response to slightly acidic pH. Besides, carriers encapsulating the core composing of siRNA and pH-sensitive peptide SAPSP showed more potent knockdown effect via the effective cytoplasmic release of siRNA. Collectively, nucleic acids carriers equipped with tumor microenvironment-sensitive peptides are expected as a novel therapeutic procedure for metastatic liver cancer.

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 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

がん種を問わず、がんが転移した場合における死亡率は現在でも著しく高い。この転移がんを克服するためには、組織内に正常細胞と混在しているがん細胞を特異的に死滅させることが可能な治療システムを構築することが重要である。がんの転移機構として、1889年 Paget 博士によって提案された Seed and Soil 説が現在でも支持されており、遠隔部位において予めがん細胞が着生しやすい組織環境を形成されることが転移の原因であるとされている。さらに、着生したがん細胞によって、特殊な環境(腫瘍微小環境)が形成されることも、がん悪性化の原因でもある。このような自身に好都合な環境を形成するがん細胞に対抗するために、微小環境を効果的に抑制可能な siRNA などの核酸を臓器内に点在するがん細胞の細胞質に特異的に送達することが可能なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が求められている。多くのリポソーム型核酸キャリアーは、核酸の保護とリポソーム内への効率的なパッケージングのために、ポチカチオンと核酸との凝集体(核酸コア)を脂質膜で包み、その表面に血中滞留性素子のポリエチレングリコール(PEG)を修飾した構造を有する。現行のキャリアーは表面に修飾した PEG の恩恵を受けることで、enhanced permeability and retention (EPR) 効果により、腫瘍へ送達可能である。しかし、EPR 効果によるキャリアーの腫瘍送達量は投与量の 10%程度であり、さらに腫瘍内に均一に拡散できないことが、最大限の治療効果を発揮できない原因であり、既存のキャリアーの血管・組織透過性を亢進する必要があるだけでなく、血中滞留型キャリアーはがん細胞へ結合しにくいことも課題である。また、キャリアーが一般的なエンドサイトーシス経路で取り込まれた場合、エンドソームから核酸コアが脱出した後、核酸コアが脱凝縮し、free 型核酸とならなければ送達核酸による機能発現は期待できない。

2. 研究の目的

本研究では、これらの問題を解決し、組織・腫瘍内透過性の高い核酸キャリアーを開発することを目的とした。開発するキャリアーは、高い血管・組織透過性と腫瘍低 pH に応答した細胞内取り込み促進効果を併せ持つペプチド(CTR-SAPSP)とキャリアーからの核酸医薬の放出を促進可能なペプチド(SAPSP)を搭載したリポソーム型キャリアーであり、腫瘍微小環境を抑制可能な機能性核酸を内封することで、転移がんの細胞内に free 型の核酸を送達可能なだけでなく、高い抗腫瘍効果も期待できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) CTR-SAPSP または SAPSP 修飾リポソームの調製

CTR-SAPSP (stearyl-GGGGGAHEHAGHEHAAGEHH AHEGGGG-CTR) および、SAPSP (stearyl-GGGGGAHEHAGHEHAAGEHHAHE) は、(株)スクラムに委託し、合成した。Egg phosphatidylcholine (EPC) と dioleoyl glycerophosphoethanolamine (DOTAP) のエタノール溶液を EPC : DOTAP = 7.6 : 1 [mol : mol] となるように、それぞれガラス試験管に添加し、vortex 後、窒素ガスで dry up した。クロロホルムで再溶解後、再度窒素ガスで Dry up することにより脂質膜を作製した。次に総脂質濃度が 10 mM になるように PBS (-) を添加し、10 分以上室温でインキュベートすることにより水和させ、バスタイプソニケーターで超音波処理した。その後、総脂質量の 5 mol% となるように SAPSP または CTR-SAPSP を添加し、30 分間室温でインキュベートすることで SAPSP 修飾リポソーム(SAPSP-lipo)、CTR-SAPSP 修飾リポソーム(CTR-SAPSP-lipo) を調製した。これらのリポソームの物性は、粒子径およびゼータ電位測定によって評価した。

(2) CTR-SAPSP-lipo のスフェロイド透過性、腫瘍内透過性の評価

スフェロイドは Nano Culture Plate MH pattern, Low-binding, 24 well (SCIVAX ライフサイエンス) を用いて作製した。すなわち、細胞懸濁液 6×10^4 cells/mL (0.5%マトリゲル含有) を各 well に添加し、37°C、5%CO₂ 条件下で 3 日インキュベートした後、スフェロイドを崩さないように、8 well チャンバースライドに移し、蛍光色素 3,3'-Dioctadecyl-5,5'-Di(4-Sulfophenyl) Oxacarboyanine (sp-DiO) で標識した SAPSP-lipo または CTR-SAPSP-lipo を添加し、一定時間後に、各種リポソームのスフェロイド透過性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

また、腫瘍内透過性を評価するために、担癌マウスの腫瘍内に sp-DiO 標識リポソームを局所注射し、一定時間後に摘出した腫瘍の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、腫瘍内におけるアクチン脱重合は、ローダミン標識ファロイジン染色によって評価した。

(3) CTR-SAPSP-lipo の細胞内取り込みおよび細胞内動態評価

ローダミン標識 CTR-SAPSP-lipo を pH 調整した培地へ添加し、一定時間後にフローサイトメトリーによって細胞内取り込みを評価した。また、リポソーム添加 1 時間に、核を Hoechst33342、エンドソーム・ライソソームを Lyso Tracker GreenTMDND-26 で染め分けた細胞内におけるリポソームの局在を共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価した。

(4) 抗腫瘍核酸封入 CTR-SAPSP-lipo によ

る細胞死誘導の評価
抗腫瘍核酸として、Kinesin family member11 (KIF11) に対する siRNA (anti-KIF11 siRNA) を t-BuOH 法によって CTR-SAPSP-lipo 内に封入し、DAPI 染色によって、アポトーシスを評価した。

(5) 細胞質 pH 応答性核酸コアの作製と試験管レベルにおける siRNA 放出評価

微弱低 pH 応答性ペプチド SAPSP と siRNA を pH 4.0 の緩衝液中で混合することにより、核酸コアを作製した。核酸コアからの siRNA の放出はエチジウムブロマイド排除試験によって評価した。

(6) 細胞レベルにおける核酸コアの siRNA 放出評価

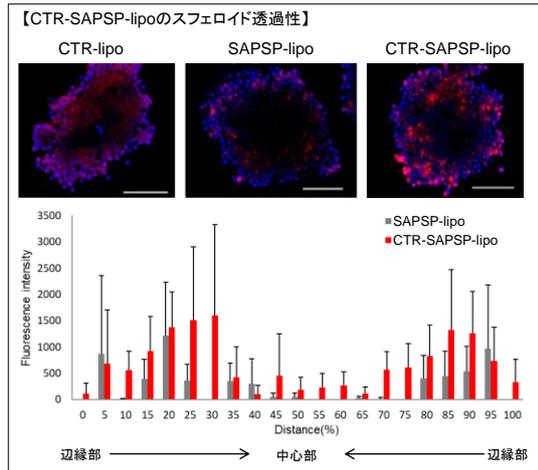
蛍光色素 NBD 標識 SAPSP と蛍光色素 Alexa546 標識 siRNA から構成される核酸コアをリポソーム内に封入し、その表面を細胞透過性ペプチドのオクタアルギニン (R8) で修飾した核酸キャリアを構築した。本キャリアを細胞へ添加後、タイムラプスイメージングにより、細胞質における核酸コアからの siRNA 放出を評価した。また、細胞質における siRNA 放出と遺伝子発現抑制効果との関係の評価するために、抗ルシフェラーゼ siRNA を封入した核酸キャリアをルシフェラーゼ安定発現細胞株へ添加し、一定時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) CTR-SAPSP-lipo の構築およびスフェロイド・腫瘍内透過性

微弱低 pH 応答性ペプチド SAPSP を修飾したリポソームは、PEG 修飾リポソームに比べて血管から離れた領域まで送達される。この送達メカニズムを解析した結果、SAPSP がアクチン脱重合を誘導することにより、細胞と細胞外マトリックスの間隙をリポソームが通過することを明らかにした。そこで、SAPSP-lipo の腫瘍内透過を更に亢進させるために、SAPSP とは異なる経路を介して腫瘍内透過を促進する CTR に着目し、SAPSP に CTR を連結させた新規ペプチド CTR-SAPSP を設計した。単純水和法によって調製した正電荷リポソームに CTR-SAPSP を修飾させた場合、粒子径は約 100 nm であった。また、ゼータ電位は、pH 7.4 で -13.5 mV、pH 6.5 で -5.5 mV であり、微弱低 pH において、負電荷の緩和が認められ、SAPSP に CTR を連結させた場合でも微弱低 pH に応答することが示唆された。構築した CTR-SAPSP-lipo のスフェロイド透過性を共焦点レーザー顕微鏡観察によって評価した結果、オリジナル SAPSP-lipo や CTR-lipo に比べて、スフェロイド深部に CTR-SAPSP-lipo が認められた。スフェロイドの上面から 4 μm の深さの x-y 画像における任意の 4 本の線上の蛍光強度を比較した結果、CTR-SAPSP-lipo は SAPSP-lipo に比べて、

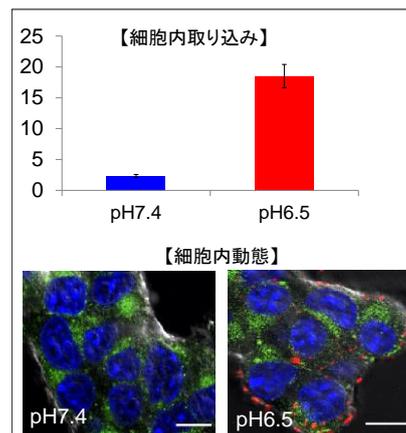
スフェロイド中心部における蛍光強度が高かったことから、CTR-SAPSP-lipo は SAPSP-lipo に比べてスフェロイド透過性に優れていることが示唆された (下図)。



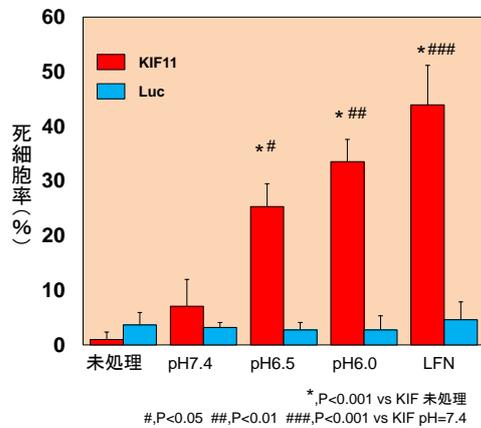
また、担癌マウスの腫瘍内にリポソームを局所注射した場合でも、CTR-SAPSP-lipo は SAPSP-lipo に比べて、腫瘍内に広く分布していたことから、CTR-SAPSP-lipo は腫瘍内透過性が高いことが示唆された。CTR-SAPSP-lipo の透過メカニズムを解析するために、アクチン重合度を評価した結果、CTR-SAPSP-lipo は、SAPSP-lipo と同様に、アクチンの脱重合を誘起することが明らかとなった。一方、CTR による透過を阻害する物質 A を共存した場合、CTR-SAPSP-lipo の透過が阻害されたことから、CTR-SAPSP-lipo は SAPSP と CTR の両方のメカニズムを介して、腫瘍内透過を促進することが示唆された。

(2) CTR-SAPSP-lipo の機能性評価

これまでに、SAPSP-lipo は微弱低 pH に応答して、細胞内取り込みが促進されるだけでなく、細胞質まで送達されることを報告している。そこで、SAPSP に CTR を連結させた場合でも、SAPSP と同様の機能が保持しているのか検討した。フローサイトメトリーによって細胞内取り込みを評価した結果、オリジナル SAPSP と同様に pH 6.5 において細胞内取り込みが促進された (下図)。

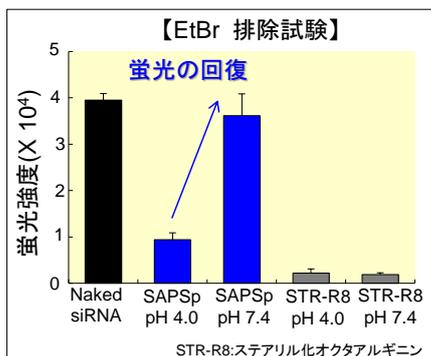


さらに、細胞内動態を評価した結果、細胞内における CTR-SAPSP-lipo はエンドソーム・ライソソームと共局在せず、細胞質に観察されたことから（上図）、CTR-SAPSP-lipo は SAPSP と同様の機能性を有することが示唆された。また、抗腫瘍核酸 anti-KIF11 siRNA を CTR-SAPSP-lipo に封入し、細胞死を評価した結果、pH 6.5 以下において、細胞死が増強された（下図）。これらの結果より、CTR-SAPSP-lipo は内封 siRNA を細胞質まで送達することで RNAi 効果を示すことが示唆された。



(3) 細胞質 pH 応答性核酸コアからの siRNA 放出

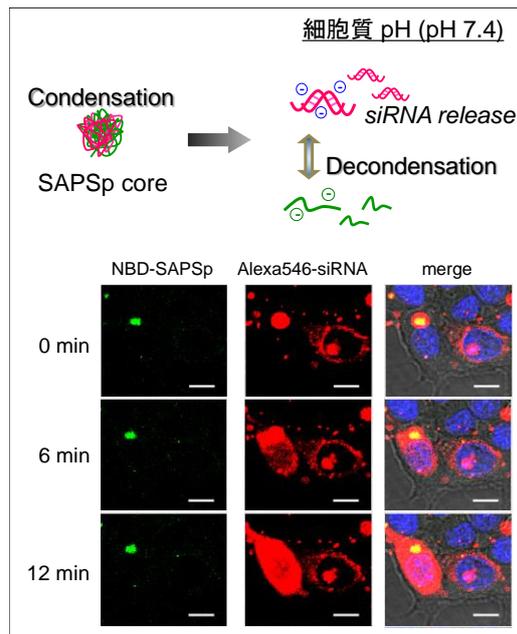
リポソーム型核酸キャリアーの調製において、核酸とポリカチオンのコアを形成後、脂質膜で覆う方法が用いられている。その場合、核酸コアは静電的相互作用によって強固にポリカチオンと核酸が結合しているため、細胞質における核酸コアからの核酸の放出効率が低いことが課題である。そこで、SAPSP が低 pH に応答して可逆的に電荷が反転する性質に着目し、酸性条件下で正電荷を有する SAPSP と siRNA で核酸コアを形成させた。エチジウムブロマイド (EtBr) 排除試験によって、核酸コアの凝縮度を評価した結果、pH4.0 において、naked siRNA に比べて、蛍光強度の低下が認められたことから、低 pH において SAPSP は静電的相互作用によって、siRNA と核酸コアを形成可能であることが示唆された。一方、細胞質 pH (7.4) では、naked siRNA と同程度の蛍光強度を示したことから、SAPSP コアは、細胞質 pH において、SAPSP の



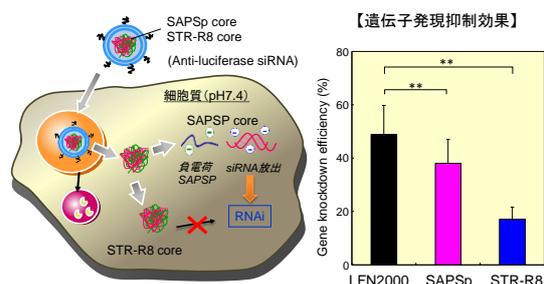
電荷が負に反転することで、静電的反発によって、効率的に siRNA を放出可能であることが示唆された（上図）。また、pH 非応答性の正電荷ペプチドであるステアリルオクタアルギニン (STR-R8) では、pH に応答した siRNA 放出は認められなかった（上図）。

(4) 細胞質における核酸コアからの siRNA の放出

蛍光色素 NBD 標識 SAPSP と蛍光色素 Alexa546 標識 siRNA から構成される核酸コアをリポソーム内に封入し、その表面を細胞透過性ペプチドのオクタアルギニン (R8) で修飾した核酸キャリアーを構築し、タイプラミス顕微鏡観察によって、細胞質における siRNA の放出を評価した。



核酸キャリアーを細胞へ添加し 6 分後から、siRNA の赤色蛍光の拡散が認められた（上図）。さらに、内封 siRNA による遺伝子発現抑制効果を検討した結果、pH 非応答性 STR-R8 の核酸コアに比べて、約 2 倍高い抑制効果を示した（下図）。これらの結果より、核酸コア形成のための凝縮剤として、SAPSP を用いることで、細胞質における naked siRNA の放出促進が可能であり、送達 siRNA による効果的な遺伝子発現抑制効果が期待できると考えられる。



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 4 件)

- (1) Suzuki S, Itakura S, Matsui R, Nakayama K, Nishi T, Nishimoto A, Hama S, Kogure K, Tumor Microenvironment-Sensitive Liposomes Penetrate Tumor Tissue via Attenuated Interaction of the Extracellular Matrix and Tumor Cells and Accompanying Actin Depolymerization, Biomacromolecules, 査読有, Vol. 18, No. 2, 2017, pp. 535-543 DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01688.
- (2) Itakura S, Hama S, Matsui R, Kogure K, Effective cytoplasmic release of siRNA from liposomal carriers by controlling the electrostatic interaction of siRNA with a charge-invertible peptide, in response to cytoplasmic pH, Nanoscale, 査読有, Vol. 8, No. 20, 2016, 10649-10658 DOI: 10.1039/c5nr08365f

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 板垣 渚、松井 諒、板倉祥子、斎藤博幸、濱 進、腫瘍深部の微弱低 pH 下のがん細胞へ薬物送達可能な腫瘍透過性リポソームの開発、日本薬学会第 138 年会、2018 年
- (2) 板垣 渚、松井 諒、斎藤博幸、小暮健太朗、濱 進、微弱低 pH 応答性薬物キャリアーの腫瘍内透過促進、第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年
- (3) 松井 諒、鈴木智子、小暮健太朗、斎藤博幸、濱 進、腫瘍深部への薬物送達可能な微小環境応答性リポソームの開発、2016 年
- (4) Hama S, Itakura S, Matsui R, Kogure K, Development of liposomal siRNA carriers using slightly acid pH-sensitive peptide SAPSP for cancer therapy, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo, 2016 年
- (5) 松井 諒、鈴木智子、板倉祥子、小暮健太朗、斎藤博幸、濱 進、微小環境応答性ドラッグデリバリーシステムの腫瘍内透過性の改善、第 14 回がんとハイポキシア研究会、2016 年
- (6) Hama S, Itakura S, Kogure K, Slightly Acidic pH Sensitive Peptide-Modified Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery to Cancer Cells, BIT' s 6th Annual World Congress of Nano Science & Technology-2016, 2016 年
- (7) 濱 進、板倉祥子、電荷反転型ペプチドによる癌治療 DDS からの siRNA の効率的な細胞質放出、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年

(8) 松井 諒、濱 進、鈴木智子、板倉祥子、小暮健太朗、斎藤博幸、腫瘍内透過性と微弱低 pH 応答性を併せ持つ薬物キャリアーの開発、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016 年

(9) 濱 進、板倉祥子、小暮健太朗、がん微小環境応答性素子を組み込んだリポソーム型 DDS の構築、第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2015 年

(10) Hama S, Nakamura I, Nishimoto A, Nishi T, Itakura I, Kogure K, Lipocalin2 stabilizes hypoxia inducible factor-in through the iron delivery into normoxic cancer cells, AACR-NCI-EORTC INTERNATIONAL CONFERENCE MOLECULAR TARGETS AND CANCER THERAPEUTICS, 2015 年

(11) 濱 進、板倉祥子、松井 諒、小暮健太朗、pH 応答性ペプチド SAPSp から構成される核酸凝集体をコアとする核酸キャリアーからの siRNA 放出促進、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年

(12) 鈴木智子、濱 進、板倉祥子、中山佳代子、小暮健太朗、腫瘍低 pH 応答性ペプチド SAPSp 修飾リポソームのアクチン脱重合を介した腫瘍内透過、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年

(13) 松井 諒、板倉祥子、濱 進、小暮健太朗、細胞質環境に応答して電荷が反転するペプチドを用いた核酸放出システムの開発、遺伝子・デリバリー研究会第 15 回シンポジウム、2015 年

(14) 鈴木智子、濱 進、板倉祥子、中山佳代子、小暮健太朗、腫瘍低 pH 応答性ペプチド SAPSp 修飾リポソームの腫瘍内透過機構の解析、遺伝子・デリバリー研究会第 15 回シンポジウム、2015 年

[図書] (計 1 件)

(1) 濱 進、板倉祥子、小暮健太朗、技術情報協会、DDS 先端技術の製剤への応用開発、2017 年、283-291

[その他]

京都薬科大学薬品物理化学分野ホームページ
<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

(2) 連携研究者

小暮 健太朗 (KOGURE, Kentaro)
徳島大学・薬学部・教授
研究者番号：70262540

(3) 研究協力者

ハサン マハディ (HASAN, Mahadi)
桐村 直子 (KIRIMURA, Naoko)
鈴木 智子 (SUZUKI, Satoko)
西 貴之 (NISHI, Takayuki)
松井 諒 (MATSUI, Ryo)