

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03531

研究課題名(和文) 逆行性輸送経路を介した小胞体への多元的薬物デリバリー

研究課題名(英文) Muti-step targeted drug delivery to endoplasmic reticulum via retrograde transport systems

研究代表者

山下 富義 (Yamashita, Fumiyoshi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30243041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：中分子・高分子薬物は、治療標的に対する高活性と高選択性が期待されるが、細胞膜透過性は著しく制限されることが問題となる。本研究では、細胞内小胞が示す選別輸送を利用して、細胞外から標的となる細胞内小器官への輸送を可能とする薬物送達システムを開発した。脂質あるいはブロック共重合体で構成されるナノ粒子や低分子抗体を含むタンパク質を、シアリルLewis Xなどの糖鎖リガンドで修飾することにより、小胞体や細胞質への輸送が促進され、生理活性物質による治療効果を高めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表面の形質膜で認識されて内在化された高分子や粒子はリソソーム分解経路に移行するが、本研究で開発した糖鎖リガンド修飾薬物デリバリーシステムは抗体医薬品等を安定に細胞内小器官に輸送する。抗体医薬品は細胞外あるいは細胞表面を標的とするものしか開発できなかった。一方、細胞内情報伝達の多くはタンパク質間相互作用により起こるが、これは低分子薬物では制御できないという問題もある。本システムにより低分子抗体等高分子物質を必要な部位に送達できれば様々な適用が可能となり、新しい医薬品の創製に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Med-size or macromolecular drugs are expected to have high potency and high selectivity for therapeutic targets, but their cell membrane permeability is severely limited. In this study, we developed drug delivery systems that utilizes selective transport mechanisms of intracellular vesicles to transport drugs from outside the cell to targeted intracellular organelles. By modifying nanoparticles composed of lipids or block co-polymers and proteins containing low molecular weight antibodies with carbohydrate ligands such as sialyl Lewis X and hyaluronic acid, the transport to the endoplasmic reticulum and cytoplasm was promoted, thereby enhancing the therapeutic effect of bioactive substances. Because these systems can deliver macromolecules such as low-molecular-weight antibodies effectively, they would be able to expand the range of therapeutic targets and contribute to the development of new drugs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 細胞内標的指向化 糖鎖 小胞体

1. 研究開始当初の背景

中分子・高分子性薬物は、低分子に比べて選択性が高く、細胞内タンパク質 - タンパク質相互作用のように多点結合であっても活性調節が可能である。しかしながら、高分子量のため、これら薬物の細胞膜透過は著しく制限され、結果的には治療的アベイラビリティが極めて低い。この問題を解決し、さらには標的となる細胞内小器官に効率よく到達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術開発が不可欠となる。DDS 開発分野では古くから、細胞膜で起こるエンドサイトーシスに着目し、タンパク質や核酸など高分子医薬品を膜輸送により内在化させる方法が検討されてきた。その際の大きな障壁はリソソームによる分解であり、技術課題の中心は、如何にしてエンドソーム内から細胞質へ送達する点にあった。これまでに、膜透過ペプチドによる膜融合能の付与やプロトンスポンジ効果によるエンドソームの破壊などの技術が開発されてきた。しかしながら、こうした膜透過促進という物理的なアプローチは細胞本来の機能に損傷を与える点で適切とは言いがたく、むしろ自然なロジスティクス (物流) に則って細胞内ドラッグデリバリーの方法論を考えることが重要である。

一方、細胞内での小胞輸送に関する分子細胞生物学的研究が飛躍的に進展してきた。小胞輸送では、膜脂質の収支を高度に保ちながら小胞がダイナミックに循環し、積荷となるタンパク質や脂質が分子認識を介して適切に配送される。最近解析の進んでいる逆行性輸送はそのダイナミズムの一側面である。細胞内ドラッグデリバリーの命題に対し、この逆行性輸送機構は魅力的な配送ルールであり、キャリアあるいは薬物自体へのタグ付けは小器官への標的化ソリューションを提供する。コレラ毒素やシガ毒素は、逆行性輸送によりゴルジ体および小胞体を介して細胞質に侵入する。しかし、オブジェクト分解プロセスを部品化することにより、将来の多様な細胞内 DDS の目的に応用する道を拓くことも可能と考えられる。

申請者は、糖鎖修飾リポソームを中心に、細胞膜上に発現するレクチン様受容体を介して物質を内在化させる標的指向化ナノの開発に長年取り組んできた。ガラクトース修飾により肝実質細胞に、マンノース修飾によりマクロファージなど抗原提示細胞へのターゲティングに成功してきた。さらに、申請者は、複合糖鎖のシアリルルイス X (sLeX) が炎症血管に特異的に発現する E-セレクトリンによって認識されることに着目し、腫瘍血管など炎症血管を標的とする薬物デリバリーの方法として sLeX の構造単純化体 (sLeX mimic) 修飾リポソームを開発した。蛍光標識 sLeX mimic 修飾リポソームの細胞取り込みを評価したところ、これまでの糖修飾リポソームと異なって細胞内に大きな輝点が観察され、ゴルジ体への移行の可能性が示唆されていた (1)。

2. 研究の目的

本研究では、マルチブースティング DDS という概念に基づき、細胞内小胞の選別輸送機構を利用した多段階のターゲティング技術を駆使し、標的となる細胞内小器官、特に小胞体に焦点を絞って薬物デリバリーを実現する。

3. 研究の方法

(1) 3'-(1-carboxy)ethyl sialyl LewisX mimic (3'-CE sLeX mimic)修飾リポソーム製剤の作成と細胞内動態および everolimus (EVE) 薬効評価

3'-CE sLeX mimic と DSPE-PEG2000 とを縮合させた 3'-CE sLeX mimic-PEG-DSPE は既報 (1) に従って合成した。3'-CE sLeX mimic-PEG-DSPE、1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)、cholesterol および EVE をエタノールに溶解し、水中に注入することによって、リポソームを作成した。EVE の代わりに Cy5.5 を含有する蛍光標識リポソームも作成し、細胞内動態実験に供した。

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) を TNF- α および IL-1 β で処置して炎症血管のモデルとし、EVE 封入 3'-CE sLeX mimic リポソームの細胞に処置した。その細胞取り込みは LC-MS/MS により分析した。一方、EVE の新生血管形成阻害効果に対するリポソーム封入の影響を評価するために、細胞層に傷をつけて細胞の遊走を見るスクラッチ法、および Matrigel を利用した 3D 培養によるチューブ形成実験を実施した。

(2) 小胞体を標的とするヒアルロン酸修飾ポリマーソーム製剤の作成と動態評価

ポリマーソーム製剤は w/o/w エマルション法により作製した。まず、poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) deblock copolymer (PEG-PCL) を界面活性剤として、超音波処理により薬剤 (bacitracin, Alexa-dextran, KDEL ペプチド) を含有する少量の水溶液を酢酸エチル/ジクロロメタン中に分散させた。得られた w/o エマルションを PEG-PCL を懸濁したリン酸緩

衝液 (PBS) に添加し、超音波を照射して w/o/w エマルションを調製した。これを室温で攪拌して安定させたのち、真空下で有機溶媒を除去して薬剤封入ポリマーソームを創製した。ヒアルロン酸修飾ポリマーソームの作製時には、アミノ基末端の NH₂-PEG-PCL を用いて前述のようにポリマーソームを調製したのち、ヒアルロン酸と縮合剤 DMT-MM を添加して 4 時間反応させた。未封入物を除去するための精製は、透析法と遠心法を組み合わせで行った。

細胞取り込みおよび in vitro 薬理実験はヒアルロン酸受容体である CD44 を発現する HeLa 細胞を用いて行った。細胞取り込みは蛍光測定により、細胞内動態は共焦点レーザー蛍光顕微鏡により、bacitracin 薬理試験は WST-1 アッセイにより評価した。なお、KDEL ペプチドとは、C 末端に KDEL 配列を持ち N 末端を FITC で標識した FITC-(GGGS)₂KDEL であり、ペプチド固相合成法により合成した。

(3) 3'-CE sLeX mimic 修飾低分子抗体の創製と抗 MDM2 による p53 活性化の評価

低分子抗体である単鎖可変領域フラグメント (scFv) の部位特異的 sLeX mimic 修飾を実現するために、scFv 発現ベクターの C 末端側に UAG コドンを導入し、当アンバーコドンを翻訳する tRNA およびその tRNA に azidophenylalanine (AzF) を導入するアミノアシル tRNA 合成酵素を発現するように形質転換した大腸菌 BL21(DE3) で、非天然アミノ酸である AzF を持つ scFv を合成した。一方、3'-CE sLeX mimic は dibenzocyclooctyl (DBCO) と縮合させ、scFv に導入した AzF とクリック反応により環化付加反応できるように設計した。scFv には抗 MDM2 抗体を選び、p53 の転写活性化を評価した。HUVECs への取り込みは scFv の精製のために N 末端側に導入した FLAG タグを利用し、anti-FLAG 抗体による免疫沈降とウエスタンブロッティングにより評価した。

(4) 小胞体移行シグナル導入 3'-CE sLeX mimic 修飾タンパク質の創製と細胞内動態評価

KDEL 配列の付加によりタンパク質の小胞体移行が促進できるかを検討するために、KDEL 配列を C 末端に導入した mKO2-KDEL(AzF) を発現するベクターを構築した。AzF 用の UAG コドンは mKO2 の N 末端側に精製用に導入した His タグ配列と mKO2 の間に挿入した。前項と同じ形質転換した大腸菌 BL21(DE3) から目的タンパク質を合成、精製した。3'-CE sLeX mimic を HUVECs での取り込みおよび細胞内分布は共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて評価した。小胞体の染色には ER Tracker を用いた。

4. 研究成果

(1) 3'-(1-carboxy)ethyl sialyl LewisX mimic (3'-CE sLeX mimic) 修飾リポソーム製剤の作成と細胞内動態および everolimus (EVE) 薬効評価

エタノール注入法により作製したリポソームの大きさは約 80nm であった。EVE 封入リポソームの HUVECs への取り込みを評価したところ、3'-CE sLeX mimic 修飾体のほうが高い取り込みを示したが、過去に行った Fluorescein-PEG-DSPE で標識した時の結果ほど、未修飾体との差が小さく、EVE が取り込み実験中にリポソームから徐々に放出されることが示された。しかし、E-selectin 抗体で処置した時には EVE の細胞内取り込みが有意に減少したことから、EVE が放出されるよりも速く 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソーム製剤が細胞内に取り込まれることが確認された。一方、Cy5.5 含有 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームを用いて細胞内局在を詳細に評価した結果、LysoTracker Green 以外にも Golgi-ID Green との共局在が確認され、一部ゴルジ体への移行も示された。

スクラッチ後の HUVECs の細胞遊走および 3D 培養時の HUVECs のチューブ形成とも、EVE 封入 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソーム処置群のほうが EVE 封入未修飾リポソーム処置群に比べて抑制された。この結果は、EVE の細胞取り込みとよく対応した結果であった。EVE は mTOR 阻害剤であるのでその下流にある pS6 キナーゼのリン酸化で確認したところ、EVE 封入 3'-CE sLeX mimic 修飾リポソームで pS6 キナーゼのリン酸化が顕著に抑制されており、E-selectin を介して取り込まれたリポソームから EVE が放出され、細胞質内で機能していることが確認された。

(2) 小胞体を標的とするヒアルロン酸修飾ポリマーソーム製剤の作成と動態評価

調製されたポリマーソームは約 140nm の粒子径をもち、ヒアルロン酸修飾することにより表面電位が大きく低下した。水溶性の Alexa Fluor 488 修飾 Dextran に対する薬物保持率は 0.60 程度であった。Alexa Fluor 488 (AF488) 修飾 Dextran を内封するポリマーソームの HeLa 細胞への取り込みを評価したところ、ヒアルロン酸とりわけ高分子量ヒアルロン酸で修飾することにより取り込みが顕著に増大した。

小胞体滞留シグナルである KDEL 配列を C 末端に持つ蛍光標識ペプチド (FITC-(GGGS)₂-KDEL) を封入したヒアルロン酸修飾ポリマーソーム製剤の HeLa 細胞による取り込みを共焦点顕微鏡により観察した。KDEL 配列を C 末端に持つペプチドにおいてもヒアルロン酸修飾ポリマーソームによる同等の取り込みが認められたが、KDEL ペプチドの場合には ER-Tracker Red との強い共局在が見られ、より顕著に小胞体に分布する様子が観察された。この結果は、内包物に対して小胞体移行を促進するデリバリー技術を適用することによって多元的な小胞体デリバリーを実現できることを示唆するものであった。

bacitracin はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ阻害剤であり、グラム陽性細菌に対して毒性を示す。真核細胞の小胞体内にも PDI が存在するため(2)、この小胞輸送を促進することでがん細胞に対する障害性が期待される。5 μ M のバシトラシンや未修飾ポリマーソームへの封入体では HeLa 細胞にほとんど毒性を示さないのに対し、ヒアルロン酸修飾ポリマーソームにバシトラシンを封入した場合には顕著な細胞障害性が認められた。毒性発現メカニズムにはさらなる確認が必要であるが、本実験結果より、中分子薬物の細胞内送達に本ポリマーソームが有効なツールとなることが示された。

(3) 3'-CE sLeX mimic 修飾低分子抗体の創製と抗 MDM2 による p53 活性化の評価

scFv(AzF)と 3'-CE sLeX mimic-DBCO との混合比を最適化するにあたり、DBCO-PEG4-5/6-FAM を用いて未反応の AzF を検出することで検討した結果、scFv(AzF) : 3'-CE sLeX mimic-DBCO = 1:3 が適当と判断された。TNF- α および IL-1 β で処置した HUVECs において 3'-CE sLeX mimic-scFv の取り込みを評価したところ、1-10 μ M の濃度範囲で線形に細胞取り込みが上昇し、その取り込みは抗 E-selectin 抗体により完全に阻害された。3'-CE sLeX mimic-mKO2 の結果と合わせて、本手法により低分子抗体を含め広くタンパク質を細胞内に導入できることが確認された。

レポーターアッセイ系を用いて p53 転写活性に対する 3'-CE sLeX mimic-scFv の効果を評価した。炎症性サイトカインで処置していない HUVECs や抗 E-selectin 抗体を併用した場合には p53 転写活性がほとんど認められず、3'-CE sLeX mimic-scFv が MDM2 の p53 阻害を効果が確認された。さらにスクラッチ法やチューブ形成法でも 3'-CE sLeX mimic-scFv による血管新生抑制効果も示された。

(4) 小胞体移行シグナル導入 3'-CE sLeX mimic 修飾タンパク質の創製と細胞内動態評価

mKO2-KDEL(AzF)およびそのコントロールとなる mKO2 (AzF)の発現ベクターで形質転換した大腸菌の破碎後、溶性画分から Ni レジンで目的タンパク質を精製した。SDS-PAGE の後 CBB 染色および FAM-DBCO による蛍光染色した結果、目的とする位置にタンパク質が検出されアジド活性を有していることが確認された。3'-CE sLeX mimic-DBCO と各 mKO2 の混合比を 1:3 として反応させた後、得られた修飾体の HUVECs への取り込みを評価した。その結果、3'-CE sLeX mimic 修飾による取り込みの上昇はいずれの mKO2 でも観察されたが、KDEL 配列の付加による影響は認められなかった。小胞体マーカーによる染色後、より高解像度での細胞内分布を観察した結果、mKO2 と小胞体マーカーの蛍光シグナル分布が一致し、KDEL 修飾の有無にかかわらず、sLeX mimic 修飾 mKO2 が小胞体に移行する可能性が示唆された。E-selectin の取り込みについては、内在化後にリソソームに移行するという報告(3)やゴルジ体・小胞体に移行するという報告(4)もあり、十分な結論が得られておらず、今後より詳細な検討が必要と考えられる。

<引用文献>

- (1) Chantarasrivong C, et al, Synthesis and functional characterization of novel sialyl LewisX mimic-decorated liposomes for E-selectin-mediated targeting to inflamed endothelial cells. *Mol Pharm* 14(5):1528-1537 (2017).
- (2) Wilkinson B & Gilbert HF, Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699:35-44 (2004).
- (3) Subramaniam M et al, Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 4(8):791-801 (1993).
- (4) Alekseeva A et al, Interactions of antitumour Sialyl Lewis X liposomes with vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1848 (5):1099-1110 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chantarasrivong Chanikarn, Higuchi Yuriko, Tsuda Masahiro, Yamane Yuuki, Hashida Mitsuru, Konishi Miku, Komura Naoko, Ando Hiromune, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Sialyl LewisX mimic-decorated liposomes for anti-angiogenic everolimus delivery to E-selectin expressing endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 20518 ~ 20527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9RA01943J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Babazada Hasan, Yanamoto Shinya, Hashida Mitsuru, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 552
2. 論文標題 Binding and structure-kinetic relationship analysis of selective TLR4-targeted immunosuppressive self-assembling heparin nanoparticles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2018.09.054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 内田結、森川知彦、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 糖鎖リガンドsLeX mimicと小胞体局在シグナルペプチドKDELを利用した 小胞体へのタンパク質デリバリー
3. 学会等名 第30回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Targeted delivery of proteins and nucleic acids via carbohydrate binding receptors
3. 学会等名 Joint Symposium on Frontiers of Pharmaceutical Science and International Pharmaceutical Education（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川知彦、采女紗也、河村奈緒子、安藤弘宗、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 sLeX mimic修飾抗 MDM2 scFvによるHUVECの血管新生阻害
3. 学会等名 日本薬剤学会 第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Targeted delivery of drugs, genes, and cells by using specialized ligand-receptor recognition systems
3. 学会等名 International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Sciences and Technology 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Data mining technologies in accelerating ADME screening
3. 学会等名 The 5th Asian Symposium on Pharmaceutical Science and Technology & the 5th Enlarged Editorial Board Conference of the Asian Journal of Pharmaceutical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下富義
2. 発表標題 薬学系からみた最近のDDSのトピックと将来展望
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuuki Yamane, Chanikarn Chantarasrivong, Ryosaku Ohta, Yuriko Higuchi, Mitsuru Hashida, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Bio-distribution characteristics of liposomes bearing structurally simplified sialyl Lewis X
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会/MDO国際合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山根悠暉、Chantarasrivong Chanikarn、太田亮作、樋口ゆり子、橋田 充、山下富義
2. 発表標題 構造単純化シアリルルイス X 修飾リポソームの創製と物性・体内動態評価
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Application of machine learning techniques to pharmacokinetic analysis
3. 学会等名 13th France-Japan DDS Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	樋口 ゆり子 (Higuchi Yuriko) (40402797)	京都大学・薬学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宗 可奈子 (So Kanako) (50816684)	京都大学・薬学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Pennsylvania		