

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34306
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H03540
研究課題名(和文) 新規ステルス機能素子によるナノ粒子表面改質と癌微小環境制圧核酸キャリアーの開発

研究課題名(英文) Improvement of the surface properties of nanoparticles by using a novel stealth device and their application to nucleic acid carrier controlling tumor microenvironment.

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規血中滞留性素子TGLを修飾した腫瘍環境応答性リポソーム型キャリアーを開発した。腫瘍微弱低pH応答性ペプチドSAPSP修飾リポソームにTGLを修飾した場合、SAPSPのpH応答性を維持しつつ表面水和性が向上した。さらにプラスミドDNA封入することで低pHに応答した遺伝子発現を示した。腫瘍内透過型SAPSP(SAPSP-iRGD)修飾リポソームではTGL修飾によって非修飾体に比べて高い腫瘍内透過性を示すだけでなく、内封したAkt阻害剤は低pHにおいて細胞死を誘導した。これらのことから、TGLは腫瘍環境応答性キャリアーの機能を阻害せずにナノ粒子表面の改質可能な血中滞留性素子として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の癌治療ドラッグデリバリーシステムの開発において、癌への受動的送達のために血中滞留性素子のポリエチレングリコール(PEG)をナノ粒子型キャリアーの表面に修飾する必要がある。しかし、PEG修飾はナノ粒子の細胞内取り込みを阻害することが課題である。本研究で開発した新規血中滞留性素子TGLは、ナノ粒子の細胞内取り込みを阻害しないだけでなく、各種機能性ナノ粒子の機能を維持することが可能である。そのため、TGLはPEGに取って代わる新規血中滞留性素子として、広く医薬品開発へ応用されることが期待される。

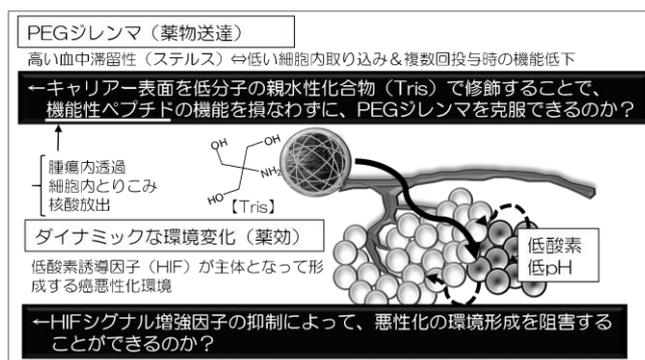
研究成果の概要(英文)：Liposomal nucleic acid carrier in response to tumor microenvironment has been developed by the surface modification of a novel blood circulating device TGL. Slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP)-modified liposomes showed pH-sensitivity even when the surface hydrophilicity was increased by modifying TGL on their surface. When plasmid DNA was encapsulated into TGL-modified SAPSP-lipo, the expression of exogenous gene in cancer cells was enhanced in response to slightly acidic pH. In tumor penetration type SAPSP (SAPSP-iRGD)-modified liposomes, the tumor penetration of SAPSP-iRGD-lipo was enhanced by their surface modification of TGL. Furthermore, Akt inhibitor encapsulated into TGL-SAPSP-iRGD-lipo induced cell death at slightly acidic pH. Therefore, TGL is a novel blood circulating device capable of improving the surface properties of nanoparticles without inhibiting the function of tumor microenvironment-responsive drug carrier.

研究分野：薬物送達学

キーワード：DDS 腫瘍微小環境 血中滞留性

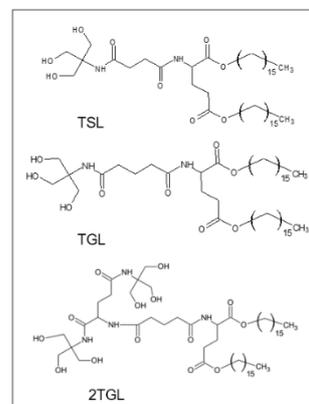
1. 研究開始当初の背景

転移・浸潤性などの悪性度の高い癌に対する核酸治療法を開発するためには、体内動態・腫瘍内動態・細胞内動態を制御し、悪性化の親玉の微小環境下(低酸素・低pH)の癌細胞へ確実に核酸を送達する技術の開発(送達の課題)と微小環境を支配する低酸素誘導因子(HIF)シグナル抑制(薬効の課題)が必要である[右図]。核酸送達法として、目的の細胞内まで確実に送達し、核酸が放出されるように、様々な機能性素子とポリエチレングリコール(PEG)を修飾したリポソーム型キャリアーが開発されている。特に、PEG修飾キャリアーは、高いステルス機能(表面への抗体やタンパク質結合を抑制し、細胞内皮系による補足を回避)のため、高い血中滞留性を示し、Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果によって、腫瘍へ受動的に送達可能なため、PEG修飾は、薬物キャリアー開発に欠かすことができない。しかし、PEG修飾はリポソーム表面に厚い水和層を形成するため、細胞への取り込みを阻害するだけでなく、複数回投与時に、PEGに対する抗体がその表面に結合するため、血中滞留性が低下(ABC現象)するなどの課題、すなわちPEGジレンマが存在する。そのため、PEGにとって替わる新たな血中滞留性素子の開発と腫瘍内・細胞内動態制御可能な機能性素子の修飾が必要である。高い血中滞留性のためには、粒子表面を負電荷かつ高親水性にすることが求められる。PEG修飾の課題はPEGが高分子のポリマーであることに起因するため、低分子の親水性化合物を表面修飾し、さらに粒子の表面電荷を負から正へ反転させ、血中滞留型から細胞内促進型へ転換するような機能性ペプチドを修飾することで、PEGジレンマを解決可能と考えられる。また、高い薬効を期待する上で、ダイナミックに変化する癌悪性化環境の主役であるHIF活性化を抑制可能な核酸をキャリアーに搭載することが重要である。



2. 研究の目的

PEGジレンマの克服が可能であると考えられる低分子の親水性化合物 Tris [2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol]を修飾した脂質 TSL、TGL、2TGL(新規滞留性素子:右図)、腫瘍環境応答性素子 SAPSP-iRGD あるいは SAPSP から構成される核酸キャリアーを開発することを目的とした。また、癌微小環境下で発現増大する Lipocalin2 (Lcn2) の HIF 活性化機構を明らかにすることで、微小環境制御核酸の選定を行うことを目的とした。



3. 研究の方法

核酸キャリアーの基盤となるリポソームは単純水和法によって調製した。SAPSP-iRGD あるいは SAPS を修飾する場合は正電荷リポソーム[Egg phosphatidylcholine (EPC) :1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP)=7.6:1)、オクタアルギニン (R8) を修飾する場合は負電荷リポソーム[EPC: Dicapoyl phosphate =9:1]を用いた。リポソームの粒子径および表面電荷は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によって測定した。さらに、塩添加時の表面電荷を指標として表面水和度 (FALT) を計算した。細胞内取り込みおよび細胞内動態は蛍光標識リポソームを用いてフローサイトメトリーおよび共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により評価した。また、Nano Culture Plate MH pattern, Low-binding, 24 well (ORGANOGENIX) に、細胞と細胞外マトリックスを混合して播種することでスフェロイドを作製し、蛍光標識リポソームのスフェロイド透過性を CLSM 観察によって評価した。プラスミド DNA 封入キャリアーによる遺伝子発現および Akt 阻害剤封入リポソームの細胞死誘導は各々ルシフェラーゼアッセイおよび Propidium Iodide (PI) 染色によって評価した。Lcn2 安定発現細胞における HIF の安定化は免疫染色により、鉄輸送関連タンパク質発現はリアルタイム PCR によって評価した。

4. 研究成果

(1) TSL 修飾リポソーム (TSL-lipo) と TGL 修飾リポソーム (TGL-lipo) の物性評価およ

び細胞内取り込み

正電荷リポソームに TSL あるいは TGL を 10、30、50 mol% 修飾し、粒子径を測定した結果、修飾率の増大に伴い、粒子径の増大が認められたことから、これらの血中滞留性素子がリポソームに修飾されていることが示唆された(右表)。また、PEG を修飾した場合の表面電荷は中性付近まで減少したが、TSL および TGL を修飾した場合は正電荷を保持していた(右表)。TSL-lipo および TGL-lipo の細胞内取り込みを評価した結果、TSL および TGL を 10% 修飾した場合は正電荷リポソームと同程度の細胞内取り込みを示したが、修飾率の増大に伴い、細胞内取り込みは抑制されたことから(上図)、TSL および TGL 修飾によってリポソーム表面の水和性は増大したことが示唆された。また、TSL および TGL を 50 mol% 修飾した場合であっても、PEG 修飾リポソームに比べて著しく高い細胞内取り込みを示したことから(上図)、TSL および TGL は正電荷リポソームの細胞内取り込みを顕著に阻害することなく、リポソーム表面の水和状態を改善可能であることが示唆された。

(2) TSL-SAPSP-lipo および TGL-SAPSP-lipo の物性評価

腫瘍微小環境の微弱低 pH に応答して、表面電荷が負から正に反転することで細胞内取り込みが促進する SAPSP-lipo に TSL および TGL を修飾した場合の物性を評価した。各 pH における TSL-SAPSP-lipo および TGL-SAPSP-lipo の粒子径は、一部 pH 6.5 において増大傾向であったが、他の条件では、200 nm 以下であった(右図)。表面電荷に対する pH の影響を検討した結果、SAPSP-lipo と同様に、微弱低 pH において、負から正への電荷反転が認められたことから(右図)、TSL および TGL はリポソーム表面に修飾した腫瘍微小環境応答性素子 SAPSP の機能を阻害しないことが示唆された。一方、表面水和層の厚さの指標である FALT を比較した結果、TGL 修飾した場合において、FALT 値の上昇が認められたが、PEG 修飾に比べて表面水和層の厚さが薄いことが示唆された(上表)。

3) TSL-SAPSP-lipo および TGL-SAPSP-lipo の機能性評価

SAPSP-lipo は微弱低 pH (pH 6.5) において効率的に細胞内に取り込まれ、さらにエンドソームを脱出して細胞質まで送達される¹⁾。そこで、TSL および TGL を修飾した場合の細胞内取り込みの変化を検討した。PEG 修飾した場合は、pH 7.4 および pH 6.5 のいずれの pH においても細胞内取り込みは認められなかったが、TSL および TGL を修飾した場合は、非修飾体と同様に、pH 6.5 において細胞内取り込みの促進が認められた(右図 a)。TSL-SAPSP-lipo において、TSL を 30 mol% 以上修飾した場合は細胞内取り込みが抑制されたことから(上図 a)、TGL の方が SAPSP-lipo の機能を阻害しないことが示唆された。また 30 mol% の TGL を修飾した場合の細胞内動態を評価した結果、非修飾体の SAPSP-lipo と同様に、細胞質まで TSL-SAPSP-lipo が送達

表 TSL-, TGL-lipo の物性評価

	Cationic-lipo		PEG-lipo		TSL (mol%)			TGL (mol%)		
	10	30	10	30	10	30	50	10	30	50
Size(nm)	133.4±26	122.8±34	124.8±24	123.5±13	136.7±18	143.1±14	154.0±39	225.8±24		
Zeta potential (mV)	14.0±3.1	0.6±0.8	10.3±0.8	8.9±1.5	9.9±1.8	9.8±0.7	9.3±0.9	7.5±3.0		

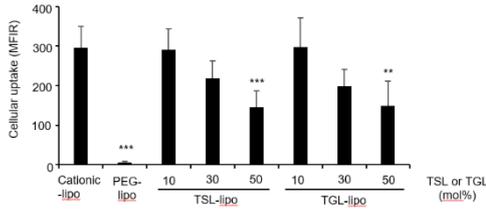


図 TSL-, TGL-lipo の細胞内取り込み

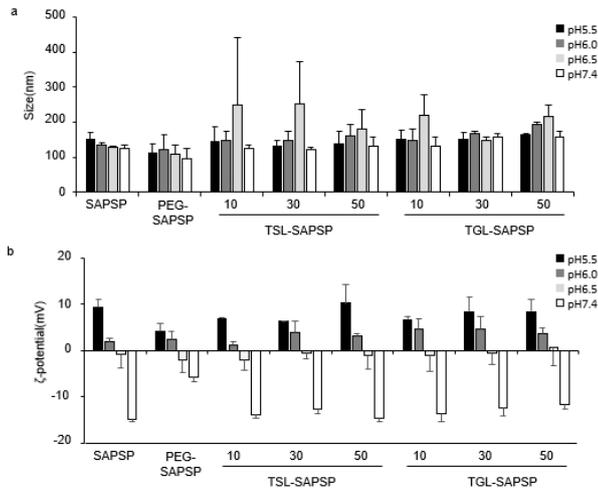


図 TSL-, TGL-SAPSP-lipo の物性評価。(a) 粒子径、(b) 表面電荷

表 各種リポソームのFALT値の比較

	SAPSP	PEG-SAPSP	TGL-SAPSP	TSL-SAPSP
FALT	0.50±0.04	1.70±0.33	0.74±0.29	0.50±0.25

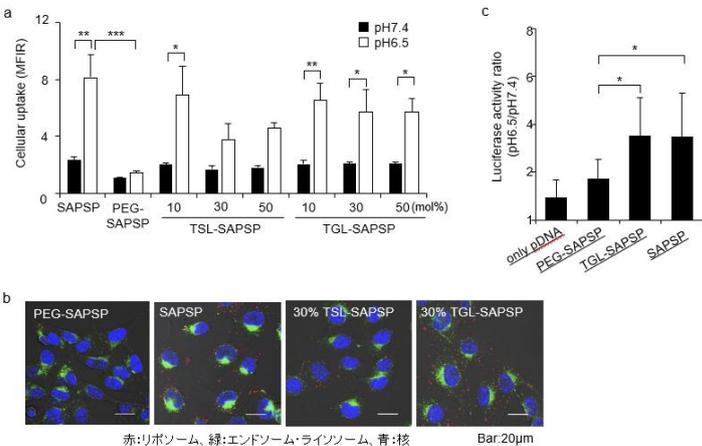


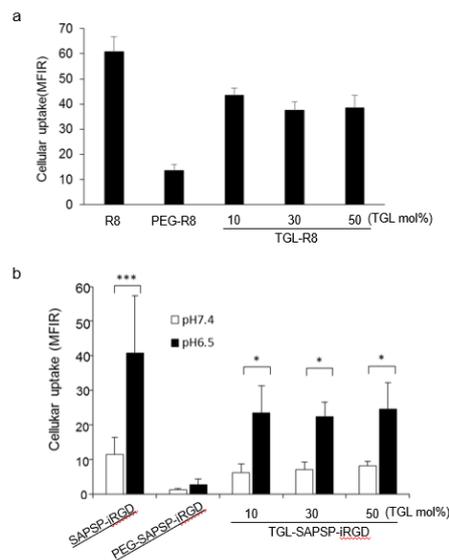
図 TSL-SAPSP-lipo および TGL-SAPSP-lipo の機能性評価。(a) 細胞内取り込み、(b) pH 6.5 における細胞内動態、(c) plasmid DNA 封入 lipol による遺伝子発現。

した結果、非修飾体の SAPSP-lipo と同様に、細胞質まで TSL-SAPSP-lipo が送達

されることが示された (上図 b)。また、1 分子中に 2 個の Tris が脂質に結合されている 2TGL では、15 mol%修飾した場合に SAPSP-lipo の細胞内取り込みが阻害されないことも考慮して、TGL の修飾率は 30 mol%に決定した。TSL-SAPSP-lipo は細胞質まで送達されることから、ルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を TSL-SAPSP-lipo に封入して、その遺伝子発現を評価した結果、pH 6.5 において、SAPSP-lipo と同程度の遺伝子発現を示し、その発現は PEG 修飾体に対して 2 倍以上高かった (上図 c)。これらの結果より TSL-SAPSP-lipo は腫瘍微弱低 pH に応答する遺伝子キャリアーとして期待される。

(4) SAPSP 以外の機能性素子を修飾したリポソームの細胞内取り込みに対する TGL の影響

SAPSP 以外の機能性素子として、細胞透過性ペプチドのオクタアルギニン (R8) あるいは腫瘍微弱低 pH 応答性と腫瘍内透過性を併せ持つ SAPSP-iRGD を修飾したリポソームの細胞内取り込みに対する影響を検討した結果、いずれのリポソームにおいても PEG を修飾した場合は非修飾体に対して、細胞内取り込みが顕著に抑制された (右図 ab)。一方、TGL 修飾においては高い細胞内取り込みが認められた (右図 ab)。特に SAPSP-iRGD-lipo に TGL を修飾した場合では、pH6.5 において細胞内取り込みが著しく促進されるだけでなく、非修飾体に対して、pH7.4 における細胞内取り込みが低下したことから (右図 b)、微弱低 pH に対する特異性が向上した。これらの結果より、TGL は各種機能性素子を修飾したリポソームにおいても、それらの機能を阻害しないことが示唆された。



(5) TGL-SAPSP-iRGD-lipo の腫瘍内透過性評価

SAPSP-iRGD-lipo は、SAPSP の腫瘍内透過性²を向上させたペプチドであるため、右図 a に示すように、スフェロイド (細胞塊) 透過性が高い。しかし、PEG を修飾した場合においては、スフェロイド内に赤色で示すリポソームが観察されなかった (右図 a)。このことは、スフェロイド内の癌細胞と相互作用できない PEG-SAPSP-iRGD-lipo が CLSM 観察前の洗浄により流失したためであると考えられる。一方、TGL を修飾した場合は、非修飾体と同様に、スフェロイド深部にリポソームが観察された (右図 a)。CLSM 画像を基にスフェロイド内のリポソームの分布を解析した結果、スフェロイド中心部 (Distance:10-90%) において、TGL 修飾体の方が非修飾体に対して多くのリポソームが分布していた (右図 b)。これら結果より、TGL 修飾は SAPSP-iRGD のスフェロイド透過性 (腫瘍内透過性) を阻害しないことが示唆された。さらに、TGL 修飾によって表面水和性が向上することで、スフェロイド透過が促進され、深部の微弱低 pH 下の癌細胞と相互作用することで、深部にリポソームが存在することが推察された。

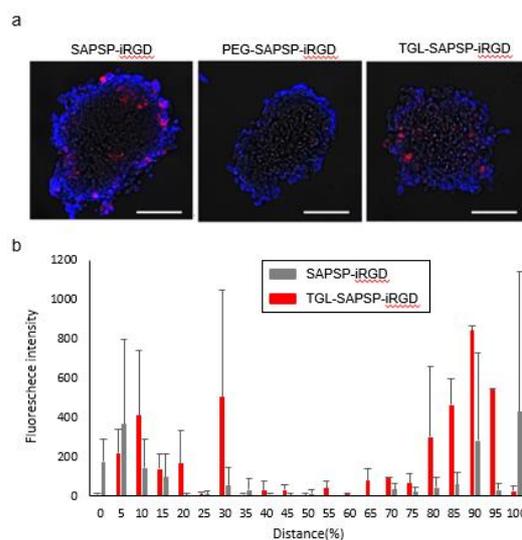


図 5 SAPSP-iRGD-lipo のスフェロイド透過性に対する TGL 修飾の影響。(a) スフェロイド透過性の CLSM 画像。(b) 画像を用いた定量的評価。

(6) TGL-SAPSP-iRGD-lipo の細胞質送達

TGL-SAPSP-iRGD-lipo の細胞内動態を評価した結果、非修飾体と同様に、TGL-SAPSP-iRGD-lipo は細胞質まで送達されることが示された (右図 a)。そこで、細胞質の標的タンパク質 Akt に対する阻害剤 PHT427 を封入した TGL-SAPSP-iRGD-lipo の細胞死誘導効果を評価した。PHT427 単独処理では、pH に依存しない

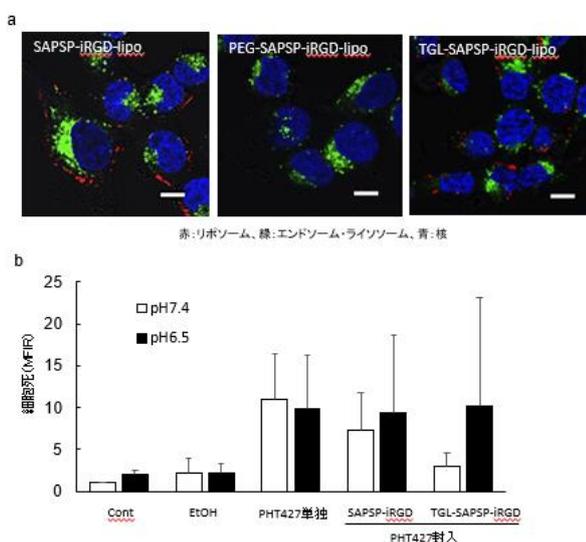


図 6 TGL-SAPSP-iRGD-lipo の細胞質送達。(a) pH 6.5 における細胞内分布の CLSM 画像。(b) Akt 阻害剤 PHT427 封入 TGL-SAPSP-iRGD-lipo の細胞死誘導効果。

細胞死誘導が認められた (上図 b)。一方、TGL-SAPSP-iRGD-lipo に封入した場合は、pH6.5 において、細胞死が増強された (上図 b)。これらの結果より、TGL-SAPSP-iRGD-lipo は微弱低 pH に応答して細胞内に取り込まれた後、細胞質へ送達され、内封 PHT-427 が Akt に作用することで細胞死が誘導されたことが示唆された。

(7) lipocalin2 (Lcn2) による微小環境形成機構の解析

Lcn2 は低酸素下の癌細胞において発現増大する分泌タンパク質である³⁾。右図 a に示すように、癌細胞 B16-F1 を LCN2 タンパク質で処理することで、正常酸素下であっても低酸素誘導因子 HIF が安定化される。この HIF 安定化機構を解析するために、Lcn2 の過剰発現細胞を作製した。右図 a に示すように、Lcn2 過剰発現細胞では、Lcn2 タンパク質処理と同様に HIF の安定化が認められた。HIF の安定化には細胞内鉄量が関与することから、鉄輸送タンパク質の Divalent Metal (Ion) Transporter 1 (DMT1) とフェロポーチン (FPN) の mRNA 発現を評価した。その結果、Lcn2 過剰発現細胞では、親細胞に比べて DMT1 および FPN 発現が増大した。これらの結果より、Lcn2 は細胞内の鉄輸送を亢進させることで HIF を安定化することが推察された。

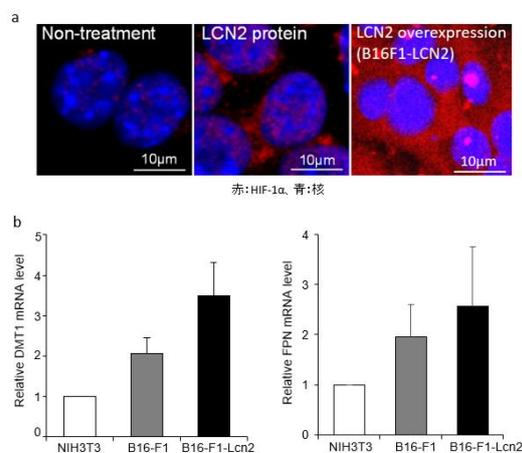


図 正常酸素下におけるHIFの活性化。(a) HIFの免疫染色画像、(b) 鉄輸送タンパク質DMT1およびFPN mRNA発現。

本研究において、新規血中滞留性素子 TGL はリポソーム表面に修飾した機能性素子の機能を阻害することなく、表面改質が可能であることを示した。腫瘍微小環境応答性と腫瘍内透過性を併せ持つ SAPSP-iRGD-lipo に TGL を修飾したキャリアー内に、微小環境形成を阻害可能な anti-Lcn2 siRNA を封入することで、効果的な癌治療システムになり得ると考えられる。

〈引用文献〉

1. Hama S, Itakura S, Nakai M, Nakayama K, Morimoto S, Suzuki S, Kogure K. Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry. *J Control Release* (2015) 206, 67-74.
2. 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* (2017) 18, 535-543.
3. Lipocalin2 as a plasma marker for tumors with hypoxic regions. Nakamura I, Hama S, Itakura S, Takasaki I, Nishi T, Tabuchi Y, Kogure K. *Sci Rep* (2014) 4, 7235.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱 進、丸川裕己、板倉祥子、宗 慶太郎
2. 発表標題 血中滞留性と腫瘍低pH応答性を併せ持つDDSの開発
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱 進、板倉祥子、宗 慶太郎
2. 発表標題 新規血中滞留性素子を修飾した腫瘍微小環境応答性リポソームの開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 優哉, 中山 佳代子, 中井 麻友美, 丸川 裕己, 小暮 健太郎, 濱 進
2. 発表標題 ポリエチレングリコール修飾リポソームと微弱低pH応答性ペプチド修飾リポソームの血中滞留性の比較
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hama S, Itakura S, Kogure K
2. 発表標題 Development of a siRNA Carrier Penetrable into the Deep Region of Tumor
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱 進、板倉祥子、前田静香、丸川裕己、宗 慶太郎
2. 発表標題 腫瘍低pH応答性リポソームの表面改質による血中滞留性の向上
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	宗 慶太郎 (Sou Keitaro)		
研究協力者	板倉 祥子 (Itakura Shoko)		
研究協力者	丸川 裕己 (Marukawa Hiroki)		
研究協力者	伊丹 里花 (Itami Rika)		
研究協力者	渡辺 優哉 (Watanabe Yuya)		

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
研究協力者	亀井 一帆 (Kamei Kazumo)		
研究協力者	前田 静香 (Maeda Shizuka)		

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