

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659021

研究課題名(和文) ナノDDS製剤/タンパク質製剤の動態を制御し開発を支援する画期的新技術の構築

研究課題名(英文) Innovation of a novel technology for supporting the development of DDS drugs and protein medicines by controlling their pharmacokinetics.

研究代表者

奥 直人 (OKU, NAOTO)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： ナノ粒子を用いて薬を患部に運ぶ製剤等の開発では、血中から速やかに消失することがしばしば問題となる。本研究では、長期間血中を流れる性質を持つ低分子ペプチドを探し出すことにした。まず、いろいろな種類の5つのアミノ酸からなるペプチドを表面に発現したファージ(ウイルスのようなもの)をマウスに投与した。血液中を長く流れるファージには、この性質をもったペプチドがファージ表面に結合している。こうして、血液中を長く流れる性質をファージに与えるペプチドが得られた。これらのペプチドを表面につけることにより、ナノ粒子を長く血液中に留めることには成功しなかったが、これができれば、薬を患部だけに届けられる。

研究成果の概要(英文)： In the development of drug nanocarriers in drug delivery systems or recombinant protein medicines, rapid blood clearance of these is frequently problematic. To overcome this rapid clearance, we attempted to obtain peptides having long circulating characteristic by use of phage-displayed peptide library that presenting 5 mer random peptides. After intravenous injection of the library, we selected long circulating phages and identified long circulating peptides. Unfortunately, the circulating characteristics of drug nanocarriers was not improved by modifying the surface of them with the peptides. However, since cloned phages presenting these peptides showed quite long circulation in the bloodstream of mice, we believe that these peptides are useful for the development of DDS drugs or protein drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：薬学 長期血中滞留性 薬物送達システム リポソーム ファージディスプレイペプチドライブラリー バイオパニング ドラッグデリバリー DDS

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ粒子を用いた DDS 製剤や組換えタンパク質などの高分子医薬品の開発研究が盛んに行われている。一方、ナノ DDS 製剤/タンパク質製剤の開発において、体内動態の制御が高いハードルとなっている。これらの製剤の血中滞留性を、簡便にそして飛躍的に向上させることができれば、創薬における多大な発展/展開が期待できる。この目的のために、現状ではナノ製剤やタンパク質製剤等のポリエチレングリコール (PEG) 化が主流であり、多くの PEG 化製剤が開発されてきた。医薬品の血中滞留性の向上が、低分子プロブの修飾で可能となれば創薬の歴史を変える大発明となる。申請者らは以前にファージディスプレイペプチドライブラリー (Ph. D. library) を用いて腫瘍新生血管を標的とするペプチドを単離することに成功したが、このペプチドで修飾したリポソームは、細網内皮系 (reticuloendothelial system: RES) による捕獲を回避することが明らかとなった。すなわち、Ph. D. library の血液中への投与により、免疫系や RES に捕獲されるファージは循環中に除かれるため、得られるファージは RES を回避する活性を伴うことになる。本研究ではこの成果を基に、Ph. D. library を血液中に投与し、長期間、血液中を循環するファージを濃縮/単離することにより、細網内皮系を回避できるペプチドを単離することを目的とし、タンパク質創薬、ナノ DDS 創薬等へ応用できる画期的な方法論を構築する。

2. 研究の目的

ナノ DDS 製剤/組換えタンパク質製剤等の開発において、血中からの速いクリアランスが問題となるが、現状ではポリエチレングリコール (PEG) 修飾に代わる良い手法がない。PEG 化は標的細胞との相互作用も抑えるために、薬効の低下が懸念される。本研究は、長期血中滞留性をファージに付与できる低分子ペプチドをファージディスプレイペプチドライブラリーから選別し、これら高分子製剤の長期血中滞留性を簡便に付与する方法論を確立するという挑戦的研究である。具体的には細網内皮系による捕獲を回避できるペプチドを探索し、目的のペプチドで修飾したナノ DDS 製剤/組換えタンパク質製剤の体内動態の検討から、本戦略の Proof of Concept を提出し、高分子医薬品の新たな創薬基盤を確立する。

低分子ペプチドの修飾によりナノ製剤/高分子医薬品の長期血中滞留性が実現できれば、薬剤の動態制御に PEG 化以外の選択肢を持つことが可能となる。ナノ製剤では PEG 化により標的細胞との相互作用も弱まるいわゆる PEG ディレンマが問題となっており、低分子ペプチドではこのディレンマも解消できる可能性がある。さらに、組換えタンパク質製剤に、遺伝子レベルでこのペプチド配列をコードする DNA 鎖を組み込むことで、簡

便に長期血中滞留性の付与が可能となれば、タンパク質創薬が大きく前進する。本研究の成功により、我が国発の技術が世界の創薬の流れを大きく支援する可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

ファージディスプレイペプチドライブラリーを用いた *in vivo* biopanning により RES 回避能を有する長期血中滞留性ペプチド発現ファージを選別する。クローニングしたファージの動態等の解析に基づき、候補となるペプチドでリポソームを修飾し、その体内動態を評価する。また、組換えタンパク質にペプチドを融合し、タンパク質製剤への応用を試みる。これらの検討から、高分子医薬品が異物認識機構を回避できる新たな方法論を確立し、創薬を支援する画期的な技術を世界に先駆けて提案する。

(1) RES 回避能を有する長期血中滞留性ペプチド発現ファージの探索

RES 回避能を有する長期血中滞留性ペプチドを得ることを目的に、M13 ファージのコートタンパク質の先端に 5 mer のランダムペプチドを発現したファージディスプレイペプチドライブラリーをマウスに尾静脈内投与する。24 時間後に血液中に残存するファージを回収し定量する。(予備検討によりランダムライブラリーの回収率が 24 時間後に約 0.07% となるという結果を得ていることから、この時間帯を設定した。) ペプチド発現ファージを増幅し、*in vivo* biopanning 法を繰り返す。この方法を用いて、マクロファージ様細胞が多く存在する肝臓、脾臓などの細胞内皮系組織による捕獲を回避し、長期に渡り血中を滞留するファージを選別する。

(2) RES 回避能を有する長期血中滞留性ペプチドの単離・同定

上記の検討により、マウスにおける長期血中滞留性を有するファージクローンを用いて、再度、マウスにおける個々のファージクローンの血中滞留性を評価する。これにより得られた候補ファージクローン (30 クローン) のペプチドシーケンスを決定する。

(3) 長期血中滞留性ペプチドの DDS 創薬への応用

上記の検討を基に、長期血中滞留性ファージから得られた候補となるアミノ酸配列のペプチドをナノ粒子 (ここではリポソームを用いる) に修飾し、その体内動態を評価する。まず、候補ペプチドの絞り込みのために、候補となる 5 mer ペプチドに Gly スペースを介してパルミトイル基を導入した脂質誘導体を合成し、リポソームに組込む。ペプチド修飾リポソームを [³H] コレステリルヘキサデシルエーテルで放射標識し血中滞留性と組織分布を評価する。得られた結果を基に、

高い RES 回避能を有する数種のペプチドを絞り込む。次にペプチド修飾リポソームと PEG 修飾リポソームの体内動態と組織分布を比較検討し、長期血中滞留性ペプチド配列を決定する。

ところで長期血中滞留性を有するナノ製剤は、enhanced permeability and retention (EPR) 効果により固形がんが集積することが知られている。そこでペプチド修飾リポソームを用いた腫瘍のイメージングおよび抗がん剤内封ペプチド修飾リポソームによる抗腫瘍効果についても検討し、長期血中滞留性ペプチドの有用性を、創薬への応用の観点からも実証する。また研究が順調に進んだ場合には、組換えタンパク質の末端に長期血中滞留性ペプチドを融合したタンパク質をコードした発現プラスミドを構築し、精製したタンパク質を用いて体内動態を評価することも可能と考えている。

4. 研究成果

(1) 長期血中滞留性ペプチド発現ファージの探索

まず予備検討として、長期血中滞留性ペプチドの探索に適切なファージディスプレイランダムペプチドライブラリーの回収時間を検討した。

BALB/c マウスに、5 mer ペプチドを発現するファージライブラリーを 2.0×10^{11} cfu 尾静内脈に投与した。1, 3, 24, および 48 時間後に血清サンプルを採取し、対数増殖期にある大腸菌に加え、寒天培地プレート上でのコロニー形成能から、ファージの回収率を評価した。それぞれの回収率は 34.4, 18.4, 0.068, 0% であった。そこで、回収時間を 24 時間とした。

バイオパニングを 5 回行ったところ、回収率は 15.8% となり、ランダムファージに比べて長期血中滞留性ファージが 232 倍に濃縮された。

(2) 長期血中滞留性ペプチドの単離・同定

上記の得られたファージをクローン化した。30 クローンのシングルコロニーについて QLAprep spin M13 キットを用いてファージ ssDNA の抽出を行った。これらの DNA 配列を決定し（決定できたのは 29 クローン）、アミノ酸配列を決定した。決定された配列を表 1 に示した。29 個中 10 個のファージは LTNKF のペプチドを発現していた。また、AHTAK, YHNTF, TSGYA, AFNAA, EYKHT の配列は、複数のファージから得られた。これら 6 種のアミノ酸配列発現ファージクローンを増殖させ、マウス投与 24 時間後の回収率を調べた。結果は表 2 に示した。

AHTAK 発現ファージを用い、マウスにおける臓器分布を検討した。ファージ投与 3 時間後には、血中から 54.7% のファージが回収された。臓器分布ではいずれの臓器でも 0.1% injected dose/100 mg tissue 以下であった。

No.	Sequence	No.	Sequence
1	SSHST	16	YHNTF
2	EYKHT	17	VSAPK
3	LTNKF	18	TSGYA
4	LTNKF	19	LTNKF
5	TPQKH	20	LARTH
6	NGLVT	21	YHNTF
7	TSGYA	22	TAASS
8	AHTAK	23	AHTAK
9	HHHKN	24	EYKHT
10	LTNKF	25	LTNKF
11	TLNTP	26	AFNAA
12	AFNAA	27	LTNKF
13	LTNKF	28	LTNKF
14	LTNKF	29	TMSNT
15	LTNKF		

表 1 Amino acid sequences obtained from long circulating phage clones.

Amino acid sequence	Yield ^a	Ratio ^b
YHNTF	21.6	216
LTNKF	20.1	201
AHTAK	17.6	176
EYKHT	9.1	91
AFNAA	8.2	82
TSGYA	0.58	5.8
Random	0.1	1.0

表 2 Yield of selected phage clones. Phages carrying the peptide (2×10^{11} cfu) were injected into the tail vein of mice. The amount of phage recovered blood in terms of cfu. ^aThe yield is defined as the ratio of the phages circulated in blood to the injected phages in terms of cfu. ^bThe ratio was expressed as magnification against control value obtained with random peptide expressing-phage.

(3) 長期血中滞留性ペプチドの DDS 創薬への応用

上記検討で、回収率の高かった 3 種のペプチドを選択し、Palmitoyl-GAHTAK、Palmitoyl-GLTNKF、Palmitoyl-GYHNTF を合成した。Dipalmitoylphosphatidylcholine / Cholesterol / palmitoyl-peptide = 10 / 5 / 1 (モル比) でリポソームを調製した。リポソームは extrusion 法により 100 nm にサイジングした。得られたリポソームの性状を表 3 に示す。

Formulations	Particle size (nm)	Pdl	zeta-potential [mV]
Control liposome	121	0.082	-5.5
AHTAK-liposome	83.8	0.276	41.1
LTNKF-liposome	106	0.136	13.6
YHNTF-liposome	92.8	0.101	4.59

表 3 Characteristics of peptide-modified liposomes

次に安定性を検討したところ、YHNTF-liposome においては、時間経過とともに凝集性が観察されたため、検討から外すこととした。他の2種のリポソームについて放射標識リポソームを用いて体内動態を測定したところ、AHTA-liposome で脾臓への集積低下と、血中滞留性向上が見られたが、肝臓への集積が高く、さらなる工夫が必要と考えられた(図1)

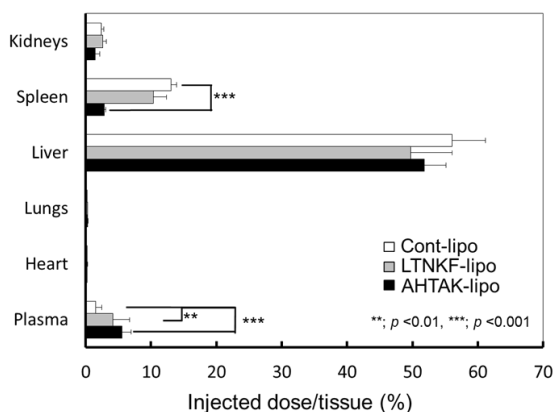


図 1. Biodistribution of ³H-labeled Peptide-modified liposomes in mice. Balb/c mice were i.v. injected with control liposome, AHTAK-liposome, or LTNKF-liposome. Twenty-four hours after injection, the mice were sacrificed and the radioactivity in each organ was determined (n=6). Data in the graph are represented as percentage of the injected dose per tissue and S.D. Significant difference: (vs. non-modify; **, p<0.01 and ***, p<0.001).

最後に長期血中滞留性が知られる PEG 修飾リポソームにおいても肝臓への集積が見られることについて、Kupffer 細胞の関与を明らかとする検討を加えた。

以上、ファージクローンレベルでは長期血中滞留性に関与すると考えられるペプチドの同定に成功した。しかしながら、このペプチドで修飾したリポソームでは、長期血中滞留性の低下が見られた。今後は、さらなる検討により、キャリア修飾によっても本性質の低下の見られないペプチドを探索し、本研究目的を達成したいと考えている。

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2件)

Koide H, Asai T, Kato H, Ando H, Shiraishi K, Yokoyama M, Oku N. Size-dependent induction of accelerated blood clearance phenomenon by repeated injections of

polymeric micelles. *Int J Pharm.* 432, 75-79, 2012.

Sugiyama T, Asai T, Nedachi YM, Katanasaka Y, Shimizu K, Maeda N, Oku N. Enhanced active targeting via cooperative binding of ligands on liposomes to target receptors. *PLoS One* 8 (2013) e67550.

〔学会発表〕(計4件)

Takashi Nakada, Koji Hirashima, Yuri Kiyokawa, Kentaro Hatanaka, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Nanoto Oku Identification of a novel peptide targeting to human tumor vasculature for drug delivery Liposome Research Days (Hangzhou, China) Oct. 9, 2012

清河友理、中田貴志、古屋恵一、清水広介、浅井知浩、奥直人：ファージライブラリーを用いた長期血中滞留性ペプチドの探索 .日本薬学会第133年会(横浜)2013年3月28日

Jantana Yahuafai, Yuri Kiyokawa, Yoshito Takeuchi, Daiki Saito, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Pongpun Siripong, Kenji Hyodo, Hiroshi Ishihara, Hiroshi Kikuchi, Naoto Oku: Enhanced circulation of secondly injected PEGylated liposomes after injection of doxorubicin-encapsulated PEGylated liposomes. The 5th Asian Arden Conference. (名古屋) 2013年8月5日
Jantana Yahuafai, Tomohiro Asai, Genki Nakamura, Yuri Kiyokawa, Yoshihito Takeuchi, Kosuke Shimizu, Pongpun Siripong, Kenji Hyodo, Hiroshi Ishihara, Hiroshi Kikuchi, Naoto Oku: Increased Half-life of secondly injected PEGylated liposomes in mice pretreated with doxorubicin-encapsulated PEGylated liposome. International Liposome Society 2013 Meeting Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery. (London, UK) Dec. 14, 2013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/mbc/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 直人 (OKU NAOTO)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：10167322

(2) 研究分担者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：00381731

(3) 清水 広介 (SHIMIZU KOSUKE)

静岡県立大学・薬学部・助教
研究者番号：30423841