

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14945

研究課題名(和文)腫瘍組織への自走侵入可能なpH感应性べん毛駆動型リポソームの創成

研究課題名(英文)Development of pH-sensitive flagellar driven type-liposomes penetrable into tumor tissue

研究代表者

小暮 健太郎(KOGURE, Kentaro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：70262540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍内pH変化を感知し自走するDDSキャリアー開発を目指した。初年度は、バクテリアゴースト調製に試薬濃度等の詳細な検討が必要なこと、また大腸菌からのべん毛単離に成功した。2年度目は、バクテリアゴーストの調製に成功した。また、ゴースト画分にべん毛フィラメント構成タンパク質FliCが存在することを確認した。これらから、初年度に困難であったバクテリアゴースト調製法を確立できた。また、腫瘍組織浸透機能性素子AT1002とポリエチレングリコールを表面修飾したナノ粒子を構築し、がん細胞スフェロイド内へのナノ粒子の浸透に成功した。当初計画を完遂できなかったが、その足掛かりとなる材料が揃った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop DDS carriers, which can sense pH change and move autonomously in tumor environment. In the first year, we found that detailed consideration of conditions was required for preparation of bacterial ghost, and succeeded in isolation of flagellar. In the second year, we succeeded in the preparation of bacterial ghost. In addition, we confirmed the existence of flagellar filament component protein, FliC, in the ghost. Based on these results, we concluded that we succeeded in the preparation method of bacterial ghost. Furthermore, we developed the nanoparticles, of which surface was modified with tumor penetrable functional peptide AT1002 and polyethyleneglycol, and succeeded in observation of penetration of the nanoparticles into cancer cell spheroids.

研究分野：薬物送達学、生物物理化学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍指向性の DDS キャリアー開発は、盛んであり、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果を利用した PEG 化ナノ粒子による受動的腫瘍標的化および特異的抗体を用いた腫瘍細胞標的化粒子など様々なキャリアーが開発されてきた。しかし、腫瘍深部の領域（腫瘍微小環境）に、より積極的に薬物を送達可能なキャリアー、すなわち微小環境の特性に感応し、それを指向して腫瘍内部に侵入可能なキャリアーは未だ開発されていない。自ら環境を感知し自走できるバクテリアのようなキャリアーが理想である。申請者らは、これまで様々な癌治療用 DDS キャリアーを開発してきた。例えば、抗癌成分（ビタミン E 誘導体）からなるキャリアー（Hama S 他 J Control Release 2012）、癌細胞の膜酵素に切断され膜融合で細胞質に薬物送達可能なリポソーム（Itakura S 他 PLOS ONE in press）等である。他方申請者らは、バクテリア細胞装置（タンパク質分泌装置）の構造と回転に関する生物物理学的解析から、細胞装置の回転が膜内外のプロトン勾配によること、粘性高分子により細胞装置の回転が阻害されることを世界で初めて明らかにした（Ohgita T 他 FASEB J. 2013、Ohgita T 他 Open Biol 2013）。バクテリアは、同様にプロトン駆動力により細胞装置（べん毛）を回転させ、菌体の自走性を獲得している（Gabel CV & Berg HC. PNAS 2003）。申請者らは、腫瘍微小環境（弱酸性）、バクテリア細胞装置のプロトン勾配依存性回転、リポソーム型キャリアー開発のノウハウ、を統合して、べん毛を組み込んだ自走性リポソームを構築し、さらに細胞間隙開裂機能を有するコレラ毒素由来ペプチド AT1002 (Phe-Cys-Ile-Gly-Arg-Leu-Cys-Gly-NH<sub>2</sub>) を表面修飾すれば、腫瘍微小環境低 pH 領域を指向して組織内奥へ自走侵入する理想的な癌治療用 DDS が構築可能ではないかと発想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍内 pH 変化を感知し、低 pH 領域（腫瘍微小環境）に向かって自走する DDS キャリアーの開発である。バクテリアは、内外のプロトン勾配に基づいて細胞装置（べん毛等）を回転させることで自走する。申請者らは、これまでにバクテリア細胞装置のプロトン勾配による回転について検討してきた。一方、申請者らは、リポソーム型 DDS キャリアー開発に関する数多くの実績を有するとともに、ユニークなキャリアーを開発してきた。しかし、自ら標的部位に自走できるキャリアーは開発されていない。そこで、バクテリアべん毛を組み込むことで、腫瘍微小環境を指向する自走型の新しい DDS キャリアーが構築できるのではないかと考えるに至った。本研究では、自走で腫瘍内部に侵入可能な新しくユニークな DDS キ

ャリアー開発を試みる。

### 3. 研究の方法

本研究は、腫瘍内への自走侵入型 DDS キャリアーの構築とそれによる癌治療の達成を目標として、(1) バクテリアべん毛の単離と薬物封入リポソームへの組み込み、(2) 細胞間隙開裂ペプチド AT1002 によるリポソーム表面の修飾と環境 pH 感応自走性の検証、(3) 担癌マウスにおける自走キャリアーの腫瘍組織内動態の検証と腫瘍成長抑制効果の検討、を期間内（平成 27 年度・28 年度）に実施する。平成 27 年度は、バクテリアべん毛の単離とリポソームへの組み込み、外部 pH に応じた運動性の検証を、平成 28 年度は、AT1002 ペプチド修飾ポリアミン高分子封入べん毛組み込みリポソームの構築、外部 pH 依存的なスフェロイド内部への自走侵入の検証、さらには担癌マウスへのキャリアー投与による腫瘍組織内動態の検証と、腫瘍成長抑制効果の検討を行うことで、最終的に自走侵入型癌治療用 DDS キャリアーの開発を目指した。

初年度目：べん毛の単離・リポソームへの組み込み・外部 pH 感応運動性の検証：

(1) バクテリアべん毛の単離：バクテリアべん毛の単離法は、すでに確立されており（DEPamphilis M. L. & Adler J. J. Bacteriol 1971）、完全な形でべん毛を単離できる。この方法に従って、大腸菌スフェロプラストを調製し、TritonX-100 処理後、硫酸アンモニウム処理によって沈殿させたものを CsCl 密度勾配遠心分離することで、べん毛を単離することなく単離されているか否かを確認する。さらに、単離したべん毛が目的の構造を有しているか否かは、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて観察することにより確認する。

(2) リポソームへの単離べん毛の組み込み：卵黄ホスファチジルコリン、ホスファチジン酸（負電荷：血中滞留性確保のため）および疎水性量子ドットを TritonX-100 水溶液（pH7.4）によって溶解し、リン脂質／界面活性剤混合ミセル懸濁液を調製する。必要に応じて、バクテリア由来脂質を加える。上記単離べん毛に同濃度の TritonX-100 水溶液（pH7.4）を添加し、可溶化する。リン脂質／界面活性剤混合ミセル懸濁液とべん毛可溶化溶液を混合する。混合液を多孔質バイオビーズカラムに供し、界面活性剤を吸着除去する。この操作を数回繰り返すことで、TritonX-100 を除去し、べん毛組み込みリポソームを調製する。得られたリポソームは、動的散乱法によって、粒子径を測定する。さらに、原子間力顕微鏡（AFM）を用いてリポソームにべん毛が組み込まれていることを確認する。

(3) 外部 pH に応じた運動性の検証：2 つの方法で、べん毛組み込みリポソームの運動性

を検証する。1 つ目は、蛍光顕微鏡観察下、2) で得られたべん毛組み込みリポソーム懸濁液に、1N HCl 水溶液を少量添加し、pH を低下させた時の運動性の変化を観察する方法である。べん毛の回転運動が無い場合、べん毛組み込みリポソームはブラウン運動による不規則な動きを行うはずだが、外液 pH の酸性化でリポソーム内外のプロトン勾配が生じた場合に、方向性のある運動を行うか否かでべん毛の回転を評価する。2 つ目は、ポリリジンコートしたスライドガラス上に抗べん毛フィラメント抗体を結合させ、そこにべん毛組み込みリポソームを添加しべん毛フィラメントをスライドガラス上に固定する。外液 pH を酸性化したときのリポソーム蛍光シグナル回転の有無の観察からべん毛の回転を評価するものである。これら 2 つの方法を用いて、リポソームに組み込まれたべん毛の運動性を検証する。

2 年度目：AT1002 修飾ポリアミン高分子封入べん毛組み込みリポソームの構築と、キャリアの機能性評価

(1) AT1002 修飾ポリアミン高分子封入べん毛組み込みリポソームの構築：コア粒子封入の場合、これまでに界面活性剤除去法を改良した SUV\*-fusion 法が適することを見出している (小暮他 特願 2004-360640 (2004)、Sasaki K. Kogure K. 他 Int J Pharm 2005)。  
①ポリアミン高分子としてポリエチレンジアミン PEI を用い、オリゴ DNA (20mer 程度) との静電的相互作用に基づく凝縮化によりカチオン性コア粒子を作成する。②アニオン性脂質を含む脂質/界面活性剤混合ミセルと単離べん毛の混合懸濁液の希釈により界面活性剤濃度を下げること、界面活性剤を豊富に含むアニオン性リポソーム (SUV\*) (一部べん毛組み込み SUV\*が共存) を調製する。③両者を混合するとコア粒子表面に SUV\*が静電相互作用により結合する。④この状態から多孔性ビーズを用いて界面活性剤を除去すると、SUV\*同士が融合しコア粒子が脂質膜で被覆される。作成後、AFM にてべん毛組み込みを確認する。⑤AT1002 のステアリル化修飾体を委託合成したものを、蛍光ラベル化べん毛組み込みリポソーム懸濁液に添加し、脂質膜表面をペプチド修飾することで完成させる。

(2) 外部 pH 依存的なスフェロイド内部への自走侵入の検証：マウスメラノーマ B16-F1 細胞を PrimeSurface 等の特殊プレートを用いてスフェロイド化したものに、蛍光標識 AT1002 修飾べん毛組み込みリポソームを添加し、共焦点レーザー顕微鏡によりスフェロイド中のリポソーム動態を観察する。1N HCl 添加により外部 pH を低下させた場合と生理的 pH 条件とでスフェロイド中のリポソーム動態と蛍光量を比較し、外部 pH 依存的な自走侵入の有無を検証する。

(3) 担癌マウスへのキャリアー投与による

腫瘍組織内動態の検証：ヘアレスマウスの背部皮下に、B16-F1 細胞/マトリゲル懸濁液を注入して腫瘍を形成し、腫瘍径が数 mm 程度になった後、尾静脈から蛍光標識 AT1002 修飾べん毛組み込みリポソームを投与する。一定時間後に腫瘍組織切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡観察により腫瘍組織内動態を検証する。腫瘍組織内低 pH 領域の指標として低酸素領域 (低 pH 領域とほぼ同じ) マーカー HIF-1 $\alpha$  および Carbonic anhydrase IX の発現を免疫染色により評価し、リポソーム存在領域と低酸素領域 (低 pH 領域) との関連を検証する。

(4) 担癌マウスへのキャリアー投与による腫瘍成長抑制効果の検討：腫瘍成長抑制作用を有する siRNA (例えば抗 VEGF) を、オリゴ DNA の代わりに用い、siRNA 封入 AT1002 修飾べん毛組み込みリポソームを作成する。担癌マウスに尾静脈内投与し、経日的な腫瘍径測定により腫瘍成長抑制効果を評価する。一ヶ月後、腫瘍周辺血管形成を検証するとともに、腫瘍組織切片の TUNEL 染色より腫瘍内アポトーシスの有無を検証する。

#### 4. 研究成果

本研究の目的は、腫瘍内 pH 変化を感知し、低 pH 領域 (腫瘍微小環境) に向かって自走する DDS キャリアーの開発である。バクテリアは、内外のプロトン勾配に基づいて細胞装置 (べん毛等) を回転させることで自走する。我々は、これまでの実績に基づき、バクテリアべん毛を組み込むことで、腫瘍微小環境を指向し腫瘍内部に侵入可能な自走型の新しい DDS キャリアーの開発を試みている。初年度は、過去の報告を基に大腸菌 JM109 株を用いてバクテリアゴーストの調製を行った。その結果、ゴーストの調製には試薬濃度等のより詳細な検討が必要であることを見出した。他方、初年度は、大腸菌からのべん毛単離を検討し、精製後のべん毛を SDS-PAGE 解析を行うことで、一部構成因子を欠損しているものの、べん毛を単離することに成功していた。2 年度目は、バクテリオファージ  $\Phi$ X174 由来 Lysis protein E を大腸菌 DH5 $\alpha$  株に発現させ、菌体内容物を漏出させることで、バクテリアゴーストの調製を検討した。得られたペレット画分中のタンパク質量および DNA 量を定量し、ゴーストができていることを確認した。また、調製したゴースト画分にべん毛フィラメント構成タンパク質 FliC が存在することをウエスタンブロッティングによって確認した。これらのことから、初年度に困難であったバクテリアゴーストの調製法を確立することができた。また、細胞間隙を開裂して腫瘍組織中に浸透させるための機能性素子である AT1002 を表面修飾したナノ粒子を構築し、がん細胞スフェロイドを用いた系において、AT1002 だけでなくポリエチレングリコール (PEG) を同時修飾することで、スフェロイド内に効率よくナノ粒子を浸透さ

せることに成功した。当初計画を完遂できなかったが、その足掛かりとなる材料を揃えることができた。

#### 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 1 件)

- ① Jung H, Shimatani Y, Hasan M, Uno K, Hama S, Kogure K. Development of flexible nanocarriers for siRNA delivery into tumor tissue. Int J Pharm. 516(1-2), 258-265 (2017) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 鄭 賢卿、島谷悠里、Mahadi HASAN、宇野晃平、濱 進、小暮健太郎. 柔軟構造によって腫瘍組織に浸透可能な siRNA キャリアーの開発. 日本薬学会第 137 年会 仙台国際センター (宮城県・仙台市) 2017 年 3 月 25 日

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小暮 健太郎 (KOGURE, Kentaro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：70262540

##### (2) 研究分担者

扇田 隆司 (OHGITA, Takashi)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：80737263

##### (3) 連携研究者

後藤 直正 (GOTO, Naomasa)  
京都薬科大学・薬学部・学長  
研究者番号：30121560