

## 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：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18927

研究課題名(和文)新規作用機序を有する肺がん幹細胞選択的リポソーム製剤の構築

研究課題名(英文) Design and evaluation of folate-modified liposome as a lung-cancer stem cell selective carrier for autophagy inducer or inhibitor drugs

研究代表者

小野寺 理沙子 (ONODERA, RISA KO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60720399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、新規作用機序を有する肺がん幹細胞選択的抗がん剤を構築することである。薬物キャリアであるリポソームに、肺がん幹細胞リガンドである葉酸を修飾した葉酸修飾リポソームを調製し、肺がん幹細胞選択的薬物キャリアを構築することである。種々の検討結果より、葉酸修飾リポソームは、葉酸レセプターを介して細胞内に取り込まれた後、オートファジー誘導剤であるラパマイシンの抗腫瘍効果を増強させることが示唆された。さらに、ラットへ経肺投与後、優れた肺内滞留性を有することが明らかとなった。以上の結果より、葉酸修飾リポソームは、肺がん幹細胞選択的経肺投与製剤キャリアとして優れた性質を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to make an attempt to confer a lung-cancer stem cell-selectivity to liposome, we newly prepared folate-modified liposome (FA-modified ssLip), and evaluated the potential as its novel lung-cancer stem cell-selectivity carrier for autophagy induced drug or inhibitor drug. Rapamycin loaded FA-modified ssLip showed the potent antitumor activity in KB cells (FR- (+)) compared to rapamycin alone and unmodified ssLip. Furthermore, FA-modified ssLip improved retention of indo cyanine green in lung after pulmonary administration to rats. In conclusion, the present study demonstrated the potentials of FA-modified ssLip as a novel lung-cancer stem cell-selectivity carrier for autophagy induced drug and inhibitor drug.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん 経肺投与製剤 リポソーム オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

肺は、肺がん、慢性閉塞性肺疾患など、今後増加が予想される難治性疾患を抱える臓器である。なかでも、肺がんのうち約 75% を占める非小細胞肺がん (NSCLC) は、アポトーシスを誘導する既存の抗がん剤および放射線療法に対して感受性が低いことが知られており、この原因として、化学療法や放射線療法後に残存したがん幹細胞の関与が考えられている。さらに近年、NSCLC の薬剤耐性には、オートファジー誘導能の欠損が関与していることが報告されている。また、肺がん細胞表面には、葉酸受容体- $\alpha$  (FR- $\alpha$ ) が 70-90% 発現していることが報告されている。一方、肺がん治療において最適とされる経肺投与により低分子薬物を投与する場合、肺での滞留時間が短いことに加え、全身循環による副作用が懸念される。一方、これまで我々は、薬物キャリアとしてリポソームを用いることで、経肺投与後の低分子薬物やペプチド性薬物が効率的に細胞内に取り込まれ、肺で持続的に効果を示すことを報告している。そこで本申請課題では、経肺投与キャリアとして有用性が期待されるリポソームに、各種オートファジー誘導剤を内封し、その表面を葉酸で修飾することで肺がん細胞選択的にオートファジーを誘導可能な抗がん剤の構築を行う。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規作用機序を有する肺がん幹細胞選択的抗がん剤を構築することである。細胞との親和性が高く、肺での滞留性が向上することを明らかとしているリポソームを用い、さらにその表面を葉酸で修飾することで、肺がん幹細胞選択性を有する薬物キャリアを構築する。さらに、葉酸修飾リポソーム内に各種オートファジー誘導剤または阻害剤を内封させることにより、肺がん幹細胞選択的に抗腫瘍活性を示す抗がん剤を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種オートファジー誘導剤または阻害剤封入葉酸修飾リポソームの調製

リポソームの調製には薄膜水和法を用いた。脂質組成は、DSPC : コレステロール = 8 : 1 とした。薬物は、オートファジー誘導剤としてニコロスマイドまたはラパマイシン、オートファジー阻害剤として 3-メチルアデニンまたはウォルトマンニンを用いた。得られた多重膜リポソームをエクストルーダー処理することで、サブミクロンサイズの微細化リポソーム (ssLip) を調製した。その後、ポストインサージョン法を用いて葉酸修飾リポソーム (FA-modified ssLip) を調製した。調製粒子の粒子径およびゼータ電位は ZETASIZER Nano ZS を用いて測定した。

#### (2) 各種オートファジー誘導剤または阻害剤封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍活性

KB 細胞 (FR 高発現細胞) および A549 細胞 (FR 低発現細胞) に対する抗腫瘍活性は、細胞内ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標に WST-1 法により評価した。

#### (3) 各種薬物封入葉酸修飾リポソームの細胞内取り込み

クマリン-6 で標識した未修飾リポソームまたは葉酸修飾リポソーム含有無血清培地にて 2 時間処理後、クマリン-6 封入未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームの細胞内取り込みを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

#### (4) オートファジー誘導剤封入葉酸修飾リポソームのオートファゴソーム形成能

オートファジー誘導剤であるラパマイシン封入未修飾リポソームまたは葉酸修飾リポソームを含有する無血清培地にて 24 時間処理後、オートファゴソームのマーカーである LC-3 の蛍光強度を指標に、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### (5) 経肺投与後の葉酸修飾リポソームの肺内滞留性

Wistar 系雄性ラットを 24 時間絶食後、インドシアニンググリーンで標識した、未修飾リポソームまたは葉酸修飾リポソームをマイクロスプレイヤーを用いて経肺投与した。その後、経時的に *in vivo* imaging system (IVIS<sup>®</sup>) を用いて未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームの肺内滞留性を観察し、ROI ツールを用いて数値化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種オートファジー誘導剤または阻害剤封入葉酸修飾リポソームの調製

未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームは、葉酸の修飾濃度に依らず平均粒子径 100-150 nm 程度の均一な粒度分布を示した。また、葉酸修飾リポソームでは、葉酸の修飾濃度依存的にゼータ電位が負にシフトしたことから、リポソーム葉面に葉酸が修飾したことが示された。また、いずれの薬物を封入した場合においても、粒子径は維持されたことから、各種薬物はリポソームの粒子物性に影響を与えないことが明らかとなった。

#### (2) 各種オートファジー誘導剤または阻害剤封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍活性

各種薬物封入未修飾リポソームまたは葉酸修飾リポソームを KB 細胞および A549 細胞に 24 時間適応後の抗腫瘍活性を WST-1 法により評価した。

図 1 は、オートファジー誘導剤である、ラパマイシン封入未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームを KB 細胞 (FR- $\alpha$  (+)) に 24 時間適用後の抗腫瘍活性を示した。未

修飾リポソームでは、ラパマイシンの腫瘍活性を増強させなかったのに対して、葉酸修飾リポソームでは、各種薬物単独と比較して、有意に高い抗腫瘍活性を示した。また、データには示さないが、オートファジー阻害剤であるウォルトマンニンにおいても同様の傾向が認められた。一方、A549 細胞では、いずれのリポソームにおいても薬物の抗腫瘍活性は増強しないことが示された。

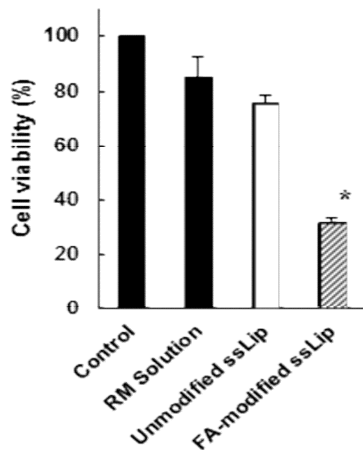


図 1. KB 細胞におけるラパマイシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍活性

### (3) 各種薬物封入葉酸修飾リポソームの細胞内取り込み

前項において、各種薬物封入葉酸修飾リポソームは、FR- $\alpha$  高発現細胞選択的に薬物の抗腫瘍活性を増強したことから、葉酸修飾リポソームの抗腫瘍活性に FR- $\alpha$  を介した細胞内取り込みの関与が示唆された。そこで本項では、葉酸修飾リポソームの細胞内取り込みに及ぼす FR- $\alpha$  の影響を検討した。

未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームいずれにおいても、クマリン-6 由来の蛍光が観察されたが、葉酸修飾リポソームにおいて最も蛍光強度が増大した (図 2)。さらに、FR- $\alpha$  競合阻害剤である葉酸を添加すると、未修飾リポソームでは細胞内のクマリン-6 の蛍光強度はあまり変化しなかったが、葉酸修飾リポソームでは葉酸添加により、その蛍光強度が著しく低下した。

これらの結果より、葉酸修飾リポソームは、FR- $\alpha$  を介して細胞内に取り込まれ、薬物の抗腫瘍活性を増強することが示された。

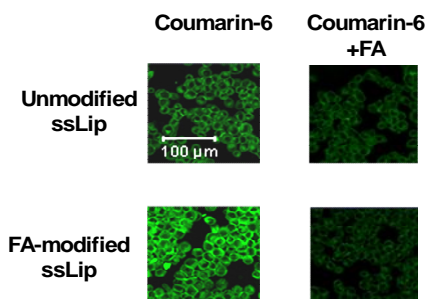


図 2. 葉酸修飾リポソームの細胞内取り込みに及ぼす葉酸添加の影響

### (4) オートファジー誘導剤封入葉酸修飾リポソームのオートファゴソーム形成能

前項での検討より、ラパマイシン封入葉酸修飾リポソームは KB 細胞において、薬物の抗腫瘍活性を増強することが明らかとなった。そこで、本項では、ラパマイシン封入葉酸修飾リポソームにより誘導される細胞死がアポトーシスであるか否かについて検討した。なお、アポトーシス誘導能は、Caspase3/7 の活性を指標に、オートファジー誘導能はオートファゴソームのマーカー分子である LC3-II 由来の蛍光を指標に観察した。

ラパマイシン単独、ラパマイシン封入未修飾リポソームおよび葉酸修飾リポソームは、いずれにおいても LC3-II 由来の蛍光が観察されたが、葉酸修飾リポソームにおいて最も蛍光強度が増大した (図 3)。一方、いずれのサンプルにおいても Caspase3/7 由来の蛍光は観察されなかった。

これらの結果より、葉酸修飾リポソームは、ラパマイシンのオートファジー誘導能を向上させることで、細胞障害活性を増強することが示唆された。

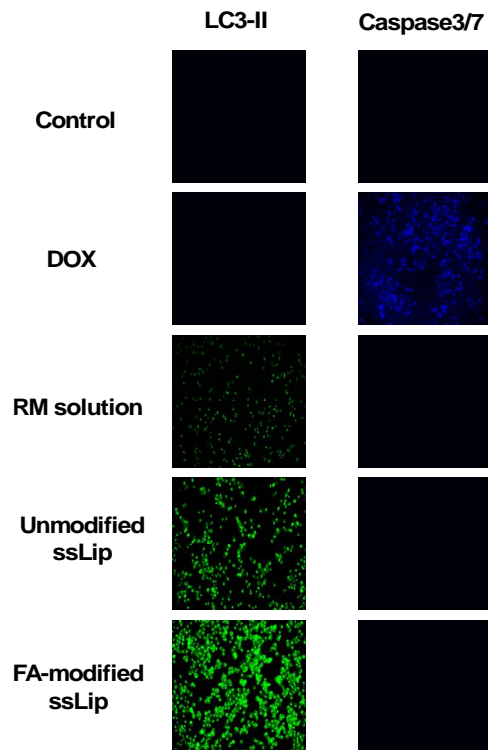


図 3. ラパマイシン封入葉酸修飾リポソームのオートファゴソーム誘導能

(5) 経肺投与後の葉酸修飾リポソームの肺内滞留性

インドシアニンググリーンを用いて標識した未修飾リポソームまたは葉酸修飾リポソームをラットへ経肺投与後、経時的に IVIS<sup>®</sup>により肺内滞留性を評価した。

図 4 に示したように、葉酸修飾リポソームは、投与 72 時間後まで優れた肺内滞留性を有することが明らかとなった。これは、1) リポソーム表面が葉酸修飾により負にシフトしたことで、粘膜クリアランスから回避が可能となったこと、2) PEG 修飾により肺胞マクロファージからの貪食を抑制できたこと、に由来すると考察できる。

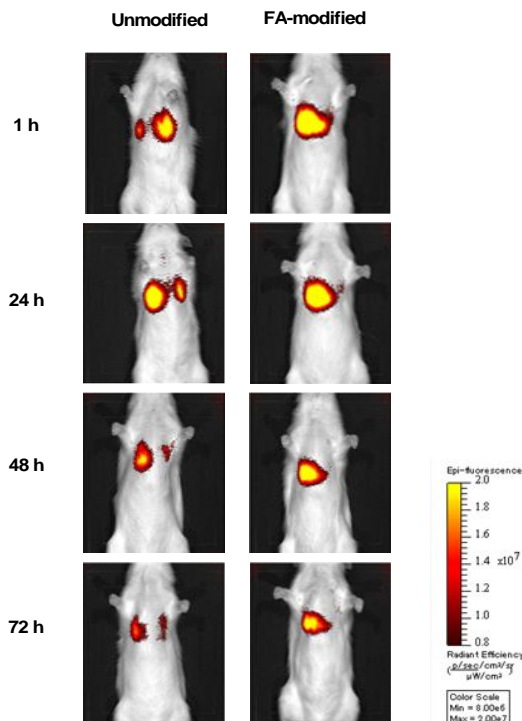


図 4. ラットへ経肺投与後の葉酸修飾リポソームの肺内滞留性

今回、申請研究では担がんマウスを用いた抗腫瘍効果を検討する予定であったが、*in vitro*での抗腫瘍活性評価が主体となった。担がんマウスを用いた検討は、モデルマウスの作成が完了し、予備検討の段階であったことから、今後も継続して研究を行う予定である。

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)

[学会発表](計 1 件)

肺がん治療を目的としオートファジー調整剤封入葉酸修飾リポソームに関する研究、森岡駿介、宇仁田真秀、小野寺理沙子、田原耕平、竹内洋文、第 33 回日本 DDS 学会、京都市勧業館みやこめッセ、2017/7/6-7.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 理沙子 (ONODERA RISAKO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60720399