

令和 元年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0357

研究課題名（和文）腫瘍微小環境応答性ペプチド搭載核酸キャリアーの開発と肝転移がん治療への展開（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of nucleic acids carriers equipped with tumor microenvironment-sensitive peptides for the therapy of metastatic liver cancer (Fostering Joint International Research)

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） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：腫瘍深部に存在するがん幹細胞は、がん転移および治療耐性の原因であり、がん幹細胞を効果的に死滅させることが可能な新たな治療法の開発が求められている。本研究では、腫瘍へ効率的に送達されるだけでなく、腫瘍深部のがん幹細胞を標的可能な腫瘍環境応答性薬物キャリアーにがん幹細胞の生存維持に重要なシグナル伝達経路を阻害可能な低分子薬物あるいは核酸を搭載することで、がん幹細胞に対して有効なナノメディシンを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したナノメディシンは、腫瘍透過性が高だけでなく、腫瘍微小環境下のがん細胞特異的に薬物送達可能なナノ粒子を基盤としているため、既存の送達方法に比べて、がん幹細胞へ効果的に薬物を送達できることが期待される。また、現在精力的にがん幹細胞の特性解析が行われているが、本ナノ粒子は低分子薬物に限らず、核酸を効率的に細胞質へ送達可能であり、がん幹細胞に細胞死を誘導することができる。今後、がん幹細胞に有効な標的分子が見出されることで、それらの機能を阻害可能な薬物を搭載したナノメディシンによる高い治療効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells, which exist at deep region of tumor, have been implicated in tumor metastasis and chemotherapy resistance. Therefore, it is required to develop a novel therapy that can induce potent cytotoxicity in cancer stem cells. In this study, low-molecular drugs or nucleic acids, which can inhibit the essential signaling pathway for the survival and maintenance of cancer stem cells, were encapsulated into tumor microenvironment-sensitive drug carriers that can achieve the targeting to cancer stem cells as well as effective tumor delivery. These nanoparticles are expected as a nanomedicine for the therapy of cancer stem cells.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 腫瘍微小環境 幹細胞

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

肝転移がんに対する革新的な治療法を開発するためには、転移の主要原因である腫瘍微小環境を巧みに利用することで、1) 転移巣に特異的に薬物を送達し、2) がん細胞を死滅させるだけでなく、2) 腫瘍微小環境を制圧し、3) 転移および増殖の核であるがん幹細胞をも効果的に死滅させることが必要である。基課題の基盤研究 C (平成 27 年度開始) において、腫瘍微弱低 pH 応答性ペプチドに組織透過性ペプチドを連結させた CTR-SAPS を修飾させたリポソーム型薬物キャリアーの機能性評価を行い、本キャリアーは腫瘍微小環境応答して、がん細胞内の細胞質へ効率的に核酸を送達可能だけでなく、高い組織透過性も有することが期待できるため、血管から離れた領域の腫瘍深部のがん細胞を標的とすることが可能である。腫瘍深部に形成される微小環境下のがん細胞は、がん幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) へ転換しやすいことが知られている。この CSC は既存の治療法に対して耐性を示すだけでなく、増殖および転移の核となるため、CSC を標的とした治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

基課題において開発する薬物キャリアーを利用して、CSC に対するナノメディシンを開発するために、CSC の生存・維持に重要な Hedgehog 経路および Akt-mTOR 経路を阻害可能な薬物をキャリアーに搭載し、CSC に対する殺細胞効果、および CSC の特性である tumor sphere 形成阻害を評価することを目的とした (図 1)。すなわち、Hedgehog 経路阻害剤のシクロパミンの水溶性誘導体 IPI926 が細胞外でキャリアーから放出されて作用できるように、腫瘍低 pH 応答性ペプチド SAPS を修飾した SAPS-IPI926 を生理的 pH において静電的相互作用によって正電荷リポソームに修飾することを試みた。効率的な Akt-mTOR 経路阻害のために、ペプチド型 Akt 阻害剤 Aktin にライソソーム内酵素切断配列 (LEC) を連結させたペプチドにステアリン酸を修飾することで (ステアリル化 LEC-Aktin)、薬物キャリアーに搭載することを試みた。また、CTR-SAPS を修飾したリポソームの腫瘍内透過メカニズムの解析およびリポソーム比べて柔軟性の低い脂質ナノ粒子 (LNP) に CTR-SAPS を修飾した場合のスフェロイド透過性を併せて評価した。

3. 研究の方法

各種ペプチドは、Fmoc 固相法によって合成した。リポソームは単純水和法およびブタノール (BuOH) 希釈法、脂質ナノ粒子は BuOH 希釈法によって調製し、粒子径およびゼータ電位を測定した。リポソームおよび LNP の透過性を評価するために、Nano Culture Plate MH pattern, Low-binding を用いて、ヒト黒色腫細胞 A375 を 1%マトリゲルとともに 3 日間培養することでスフェロイドを構築し、蛍光標識リポソームおよび蛍光標識 siRNA 封入 LNP の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Tumor sphere 形成評価のために、ultra-low adherent 96-well plate を用いて、薬物処理した細胞を Insulin-Transferrin-Selenium, B27, bFGF および EGF 含む培地中で 7-10 日間培養した後、形成された tumor sphere を顕微鏡下でカウントした。細胞死は、ヨウ化プロピジウム染色後、フローサイトメトリーによって評価した。

4. 研究成果

(1) CTR-SAPS 修飾ナノ粒子のスフェロイド透過性評価

CTR-SAPS は、腫瘍内微弱低 pH に応答してペプチドの総電荷が負から正に反転するペプチド SAPS に組織内透過促進ペプチドを連結させることで、腫瘍透過性と微弱低 pH 応答性を併せ持つペプチドである。腫瘍の *in vitro* モデルであるスフェロイドを用いて、オリジナル SAPS 修飾リポソーム (SAPS-lipo) と CTR-SAPS 修飾リポソーム (CTR-SAPS-lipo) の透過性を比較した結果、緑色蛍光ラベルした CTR-SAPS-lipo がスフェロイド深部に観察された (図 2(A))。CTR 部位のペプチドは細胞膜タンパク質の Neuropilin-1 を介して組織透過を促進することが報告されているので、CTR-SAPS-lipo のスフェロイド透過に対する Neuropilin-1 阻害剤の影響を検討した。オリジナル SAPS-lipo は細胞-細胞外マトリックスの間隙を利用してスフェロイド内を透過するため、Neuropilin-1 阻害剤共存下であっても透過は阻害されなかった (図 2(A))。一方、CTR-SAPS-lipo のスフェロイド内透過は、Neuropilin-1 阻害剤によって阻害されたことから (図 2(A))、CTR-SAPS-lipo のスフェロイド内透過に Neuropilin-1 の関与する

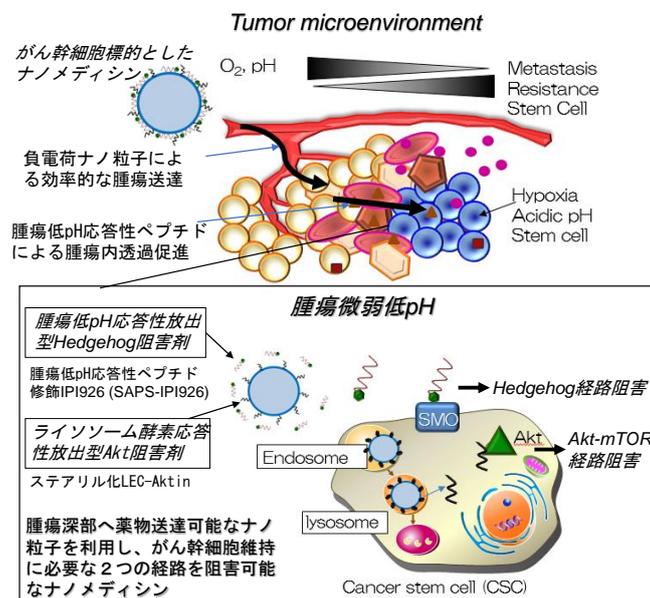


図 1. 研究開始当初の研究全体像

ことが示唆された。したがって、CTR-SAPS は異なる 2 つの経路を介して薬物キャリアーの腫瘍内透過を促進することができる新規のペプチドであることが示唆された。

リポソームは内部に水相を含む柔軟性の高い構造を有するため、スフェロイド透過における粒子サイズの影響を検討することが困難である。そこで、赤色蛍光ラベル化 siRNA を用いて、比較的強固な構造を有する脂質ナノ粒子 (LNP) を調製し、CTR-SAPS 修飾 LNP (CTR-SAPS-LNP) のスフェロイド透過性を検討した。図 2 (B) に示すように、CTR-SAPS-LNP の粒子径は、pH7.4 において、約 80 nm であり、表面電荷は -15.4 mV であり、pH6.5 では負電荷が緩和され、-6.6 mV であった。赤色蛍光ラベル化 siRNA を用いて調製した CTR-SAPS-LNP のスフェロイド透過性をオリジナル SAPS-LNP と比較した結果、CTR-SAPS-LNP はスフェロイド深部まで送達された。80 nm サイズのナノ粒子は腫瘍内透過性が低いことが報告されているが、CTR-SAPS を修飾することで、高い腫瘍内透過性が期待できると考えられる。

(2) LEC-Aktin 修飾リポソームの構築と Aktin または IPI926 の tumor sphere 形成に対する影響

ペプチド型 Akt 阻害剤 Aktin の N 末端にライソソーム内酵素切断配列 LEC として GFLG 配列を導入し、リポソーム膜への挿入のために N 末端にステアリン酸を修飾したステアリル化 LEC-Aktin を合成し、リポソームへ修飾した。表 1 に示すように、単純水和法で LEC-Aktin 修飾した場合、脂質に対して LEC-Aktin 2.5 mol% 以上では凝集し、リポソームが調製できなかった。一方、1 mol% LEC-Aktin を修飾した場合は、粒子径約 180 nm のリポソームを調製することができた。また調製を変えて、ブタノール BuOH 希釈法で調製した場合は、粒子径約 70 nm のリポソームを調製することができた。LEC-Aktin 修飾リポソームの機能性を確認するために、LEC-Aktin 修飾リポソームで処理した細胞の溶解液を用いて、リン酸化 Akt 量を ELISA キットにより定量したが、リン酸化 Akt 量の減少は認められなかった。そこで、Aktin 自身の機能性を評価するために、Aktin の N 末端に細胞透過性ペプチド TAT を修飾した TAT-Aktin の tumor sphere 形成に対する影響を評価した。がん幹細胞が存在する場合に tumor sphere 形成は促進されることが知られている。図 3 に示すように、高濃度 (100 μ M) の TAT-Aktin で処理した場合でも、tumor sphere 形成阻害が認められなかったため、Aktin はがん幹細胞に対する死滅効果は低いことが示唆された。そこで、リポソームに搭載するシクロパミンの水溶性誘導体 IPI-926 の tumor sphere 形成に対する影響も検討した。IPI-926 単独で処理した場合、濃度依存的に tumor sphere 形成が阻害されたことから、IPI926 はがん幹細胞に対する抑制効果が高いことが示唆された (図 3)。

(3) リポソーム膜からの SAPS 放出

がん細胞における細胞外 pH が低いことを利用して、細胞外でリポソームから放出可能な SAPS-IPI926 設計した。実際に微弱低 pH 下で SAPS が放出されるのかどうかを検討するために、リポソーム膜挿入部位のステアリン酸を含まない蛍光標識 SAPS をリポソーム表面に修飾し、pH の異なる緩衝液中でインキュベートした後、放出 SAPS を限外ろ過により分離し、蛍光強度を測定した。図 4 に示す

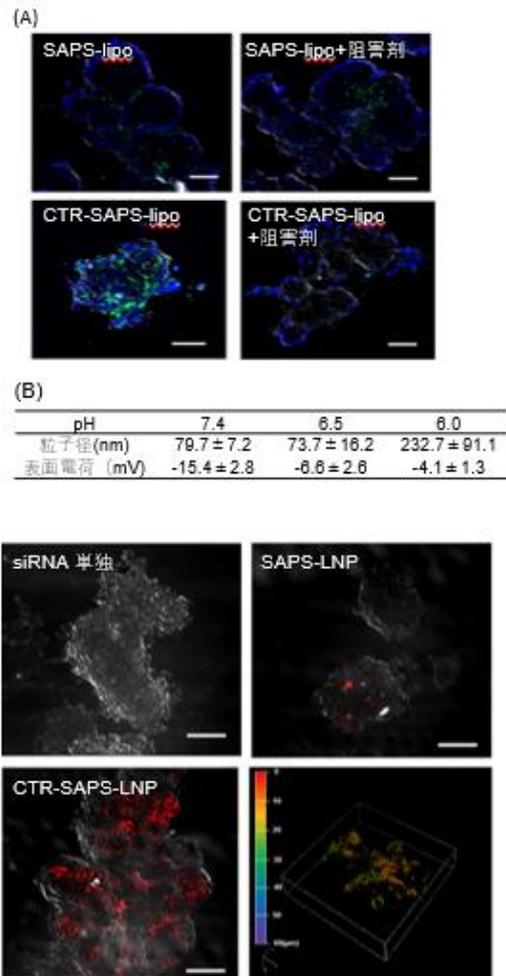


図 2. スフェロイド透過性

(A) SAPS, CTR-SAPS-lipo のスフェロイド透過性に対する Neuropilin-1 阻害剤の影響、(B) LNP の物性、(C) LNP のスフェロイド透過性

	粒子径 (nm)	表面電荷 (mV)
10 mol% LEC-Aktin-lipo (単純水和)	1.04X10 ⁴	-7.5
5 mol% LEC-Aktin-lipo (単純水和)	9.19X10 ³	-0.28
2.5 mol% LEC-Aktin-lipo (単純水和)	2.97X10 ³	4.7
1 mol% LEC-Aktin-lipo (単純水和)	179	8.2
1 mol% LEC-Aktin-lipo (BuOH 希釈)	68.9	12

表 1. LEC-Aktin 修飾リポソームの物性

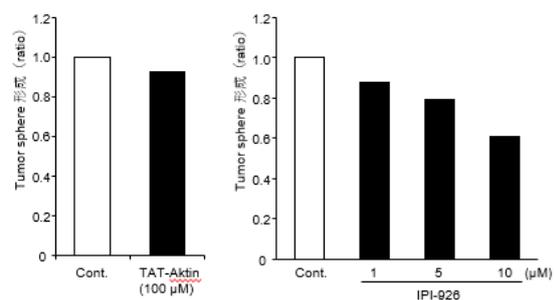


図 3. Tumor sphere 形成に対する TAT-Aktin または IPI-926 の影響

ように、pH 7.4 における放出率は約 30%であり、pH を低下した場合においても、放出率の増大が認められなかった。SAPS 自身は非常に弱い静電的相互作用によって、リポソーム表面に存在しており、pH 7.4 において、十分な SAPS がリポソーム表面に修飾できていないために、低 pH 下における SAPS 放出促進が認められなかったと考えられる。

(4) Akt 阻害剤 PHT427 封入 CTR-SAPS-lipo の細胞死誘導効果

上述の (2) で示したように、ペプチド型 Aktin の CSC に対する効果は低かったため、他の Akt 阻害剤として脂溶性低分子化合物の PHT427 をリポソーム膜に封入した CTR-SAPS-lipo(PHT427)を調製し、その殺細胞効果を PHT427 単独処理と比較した。CTR-SAPS-lipo(PHT427)は、生理的環境の pH7.4 において、PHT427 単独処理に比べて、殺細胞効果は低かった。一方、腫瘍微弱低 pH 下では、PHT427 単独処理に比べて、高い殺細胞効果を示し、その効果は pH7.4 に比べて約 2 倍高かった。これらの結果は、CTR-SAPS-lipo に Akt 阻害剤を封入することで、単独に比べて高い殺細胞効果が期待できるだけでなく、腫瘍環境下のがん細胞を効果的に死滅させることが可能であることを示す。

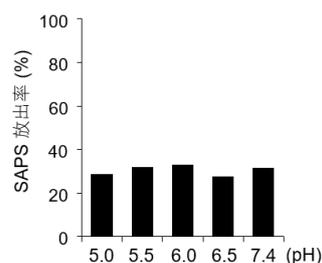


図4. リポソームからのSAPS放出

(5) Tumor sphere 形成に対する anti-Gli1 siRNA の影響

上述の (3) で示したように、SAPS の電荷反転を利用した hedgehog 阻害剤の細胞外放出は、SAPS 自身の再設計が必要であると考えられ、現在検討中である。Hedgehog シグナル伝達経路を阻害するためには、細胞膜上の SMO を阻害するか、もしくは hedgehog シグナル伝達経路によって活性化される転写因子 Gli1 を阻害することが有効であると考えられている。そこで、Gli1 を阻害するために、anti Gli1 siRNA を封入した脂質ナノ粒子 SAPS-LNP(anti Gli1) を調製した。SAPS-LNP の物性は表 2 に示す。SAPS-LNP の tumor sphere 形成に対する影響を検討した結果、未処理およびコントロール siRNA(anti-Luc siRNA)を封入した SAPS-LNP に比べて、tumor sphere 形成が阻害された(図 6)。これらの結果は、SAPS-LNP によって送達された anti Gli1 siRNA が CSC を死滅させたことを示唆する。

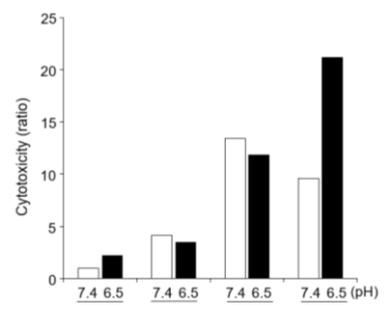


図5. Akt阻害剤PHT427の細胞死誘導効果

	粒子径 (nm)	表面電荷 (mV)	封入率 (%)
Cationic LNP (cont)	107.2	11.3	92.1
SAPS-LNP (cont) pH 7.4	89.5	-15.1	
SAPS-LNP (cont) pH 6.5	116.1	-3.8	
Cationic LNP (anti-Gli1)	81.2	15.4	94.6
SAPS-LNP (anti-Gli1) pH7.4	80.6	-14.5	
SAPS-LNP (anti-Gli1) pH6.5	151.2	-2.9	

表2. SAPS-LNPの物性

本研究では、高い腫瘍内透過性を示す腫瘍微弱低 pH 応答性リポソームに CSC 機能阻害を可能とする Akt 阻害剤あるいは anti Gli1 siRNA を搭載することで、腫瘍深部に存在する CSC を効果的に死滅させることができることを示した。今後、CTR-SAPS-lipo に Akt 阻害剤と anti Gli1 siRNA を共封入することで、がん幹細胞に対するより効果的なナノメディシンの開発が期待できる。

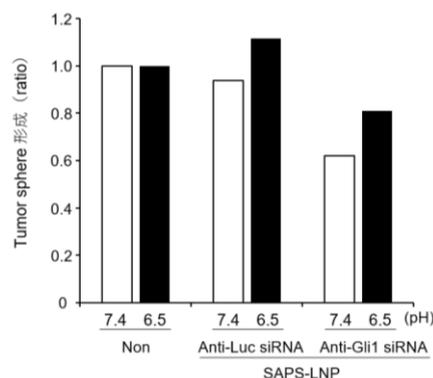


図6. Tumor sphere 形成に対する anti-Gli1 siRNA の影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hama S. Develop liposome-based drug carriers in response to tumor microenvironment. *Impact* (2018)12, 73-75. 査読なし。

[学会発表] (計 4 件)

1. Hama S., Suzuki S., Itakura S., Kogure K. Tumor-penetrable nanoparticles for delivering drugs into cells in response to tumor microenvironment. BIT' s 8th Annual World Congress Of Nano Science and Technology 2018 (2018 年)
2. Hama S., Itakura S. Development of a tumor-penetrable drug carrier in response to tumor microenvironment. 第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年)
3. 板垣渚, 松井諒, 板倉祥子, 濱 進. 微弱低 pH 応答性リポソームの腫瘍内透過における iRGD 修飾の影響. 日本薬剤学会 第 33 年会 (2018 年)
4. 丸川裕己, 板倉祥子, 斎藤博幸, 宗慶太郎, 濱 進. 新規血中滞留性素子を搭載した腫瘍低 pH 応答性リポソームの開発. 日本薬学会第 138 年会 (2018 年)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ：京都薬科大学薬品物理化学分野：<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/bukka/>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Jindrich Kopecek

ローマ字氏名：

所属研究機関名：University of Utah

部局名：Center for Controlled Chemical Delivery

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：Mahadi Hasan

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：板垣 渚

ローマ字氏名：Nagisa Itagaki

研究協力者氏名：丸川 裕己

ローマ字氏名：Hiroki Marukawa

研究協力者氏名：渡邊 優哉

ローマ字氏名：Yuya Watanabe

研究協力者氏名：亀井 一帆

ローマ字氏名：Kazuho Kamei

研究協力者氏名：前田 静香

ローマ字氏名：Shizuka Maeda

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。