

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13032

研究課題名(和文) 内因性アルブミンの血管透過性・がん標的化能を活用する新規がん標的化ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) The development of nanoparticles recruiting blood vessel penetration and tumor targeting functions of endogenous albumin

研究代表者

鈴木 亮佑 (SUZUKI, Ryosuke)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80611540

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)：本研究は血管内皮を透過させるために50 nm以下に粒子径を制御する必要がある。脂質-高分子複合ナノ粒子(LPN)において超微小粒子径と封入された疎水性薬物の徐放性を両立させるためには、調製装置であるマイクロリアクタの性能を向上させる必要があった。

Y字型または十字型の合流部をもち、合流部から混合流路までを最小限にした新規マイクロリアクタを開発した。当該マイクロリアクタは疎水性の高い高分子からなるLPNの粒子径を劇的に減少させただけでなく、他のものよりも小さなLPNを構築した。同時に、物理化学的性質の観点から脂質および高分子の組成を詳細に最適化する必要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い混合性能を得るために必要な流路構造を明らかにした点に本研究の学術的意義がある。開発したマイクロリアクタは液体からナノ粒子を形成させるための基盤技術として様々な構造のナノ粒子に利用できるだけでなく、大量生産に向けて新たなマイクロリアクタを設計するための素地ともなる。企業との共同開発による創出は本マイクロリアクタの普及を容易にする。siRNAといったオリゴ核酸を医薬品として実用化するためにナノ粒子が重視されていることを考慮すると、本成果はナノ粒子化技術レベルの向上によって医薬品研究に貢献する点で社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Penetration of nanoparticles through vascular endothelium requires to control their sizes to less than 50 nm. To achieve both of the ultrasmall size and sustained drug release for lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPN), it was essential to improve the performance of microfluidics as the assembly device. Then, we developed microfluidics of Y- or cross-type junction and minimal-length connection to mixing channels. This microfluidics assembled ultrasmall LPN from highly hydrophobic biodegradable polymers, but also achieved one of highest mixing performance in the world. Additionally, we revealed that LPN composition should be further optimized from the view of physicochemical properties.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：マイクロリアクタ マイクロ流体デバイス 脂質-高分子複合ナノ粒子 がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんナノ化学療法は、腫瘍血管に生じる大きな間隙を長期血中循環性ナノ粒子に通過させる EPR 効果を用いることが非常に多い。当該戦略にとってナノ粒子の粒子径は極めて重要であり、100 nm 以下のより小さなナノ粒子はがん集積性や漏出した腫瘍血管からの浸透距離を増大させることが知られている。この知見に基づき、申請者は難水溶性薬物に適した脂質-高分子複合ナノ粒子 (LPN)を開発してきた。異種素材の併用は循環時安定性・高封入能の両立を、調製条件の調節は自在な粒子径制御性を可能にすることを初めて明らかにした。本 LPN は粒子径が小さくなるほど、封入したレスベラトロール誘導体の多面的抗腫瘍活性を強く発揮させた。しかし、本 LPN を含め EPR 効果は 2 つの限界に直面している。それは 40 nm のナノ粒子ですら腫瘍への蓄積性が低い、正常構造に近い腫瘍血管を有する微小転移巣 (< 100 μm^3)への到達が困難なことであり、これらの限界を克服してがんナノ化学療法の効率を高めることが急務である。

上記問題点の根本的な克服には、粒子径を 40 nm より小さくするだけでは不十分であり、がん細胞に対する高い親和性ととも腫瘍血管間隙に依存しない血管透過性を兼ね備えたがん標的化リガンドが必要であると考えられる。このことから、申請者は血清タンパク質の 60-70%を占めるアルブミンに着目した。アルブミンは gp60 を介した血管内皮細胞透過性、細胞外マトリクス関連タンパク質の secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC)と結合しがん細胞に取り込まれる性質を有する。そこで、LPN 脂質膜上ポリエチレングリコール (PEG)鎖の先端に高アルブミン結合性クマリン誘導体を修飾し血中の内因性アルブミンをリクルートさせてその動態を利用する戦略を構築した。

2. 研究の目的

内因性アルブミンをナノ粒子表面上にリクルートさせ、その血管透過性とがん細胞への取り込みを活用した戦略の創出を試みる。第一に、高いがん標的化能に最適な組成を見出す。本戦略は、クマリン誘導体による内因性アルブミンのリクルートと細胞内輸送小胞より小さな LPN 粒子径が要となる。細胞内取り込み量・生体内分布に基づく最適化を SPARC 陽性がん細胞について行い、抗がん活性への影響を評価する。第二に、がん細胞のアルブミン取り込み機構を解明する。本経路の詳細は不明である。阻害実験によって細胞内取り込み経路を特定し、その経路における候補から主寄与タンパク質を特定することで本戦略の体系化を図る。第三に、アルブミンの標的化能を SPARC 陰性がんでも有効にする。SPARC 陰性の原因の多くは、当該遺伝子の高度メチル化による転写抑制である。DNA 脱メチル化剤を用いてこの抑制を解除し、SPARC 陰性がんにもアルブミンの標的化能を有効とさせることを試みる。in vitro 培養細胞系での概念実証に続き、マウス皮下移植モデルにて有用性を評価する。

本研究は前被採択課題「がん低酸素領域を送達範囲内に収める難水溶性薬物搭載粒子径可変ナノキャリアの開発」において開発した LPN を基盤として計画を遂行する予定だった。当該課題は 2 液を常に一定に混合するマイクロリアクタの開発と処方最適化によって 30 nm からなる LPN の構築を達成した。しかしながら、開発した LPN は封入された疎水性薬物を極めて早い速度で放出してしまうことが新たな課題であった。より疎水性の高い生分解高分子を使うことで薬物保持性を高めることは解決策の一つであるが、粒子径の増大が新たな課題となってしまう。血管内皮をトランスサイトシスによって透過させるためには粒子径の増大を可能な限り回避する必要がある。上述の相反する課題を解決するためには、LPN 調製装置であるマイクロリアクタの性能向上によって薬物保持性向上が期待される高疎水性生分解高分子を従来と同じ粒子径とすることが必要である。

3. 研究の方法

3-1. マイクロリアクタの流路設計とその評価

研究代表者が以前に開発したマイクロリアクタは、クロスコネクタ内でアセトン溶液を両側から水溶液と合流させた後、若干の連絡流路を経て混合流路へつながっていた。新たに設計したマイクロリアクタは 2 液合流部と混合流路の間にある連絡流路を最小限に短縮させた。さらに、2 液合流部は、従来型流路を踏襲した十字型に加えてアセトン・水各溶液を 1 方向ずつから合流させる Y 字型の 2 種類とし、それぞれのマイクロリアクタを LTF-RS2, LTF-RS1 とした。本設計に基づき、当該マイクロリアクタはドイツ Little Things Factory GmbH が製造し供与を受けた。

LTF-RS1 および LTF-RS2 の性能を従来型マイクロリアクタと比較した。はじめに、前被採択課題で最適化した条件について LPN を調製し粒子径を比較した。カルボキシ末端および低分子量のポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA)および疎水性薬物として TMS (3,4',5-Trimethoxy-trans-stilbene)をアセトンへ溶解させた。濃度はそれぞれ 1.0 および 0.2 mg/mL とし、LPN の性質を評価する時は TMS 濃度を 0.1 mg/mL とした。リン脂質である POPC (1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) および DSPE-PEG2000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000])を 4%エタノール水溶液へ懸濁させた。濃度はそれぞれ 0.1 および 0.3 mg/mL とした。各溶液の入ったシリンジをマイクロリアクタ流路へ接続した後、シリンジポンプによって水溶液およびアセトン溶液を 10 mL/min で流すことで LPN を調製した。十字型合流部からなる従来型マイクロリアクタおよび LTF-RS2 はそれぞれの水溶液流速を 5.0 mL/min とした。ガラスピーカーに採った LPN に対して加温振盪 (37 °C, 2 h)を行うことで有機溶媒を除去した。室温に戻した後、限外ろ過によって未封入 TMS

の除去と LPN 濃縮を行った。動的光散乱法により LPN の粒子径および多分散度指数 (PDI) を測定した。二番目に、先と同じ流速条件において PLGA の疎水性が LPN 物性に及ぼす影響を評価した。末端基の影響を評価するために、オクチルエステル末端からなる低分子量の PLGA について LPN を調製した。分子量の影響を評価するために、低分子量から高分子量までのオクチルエステル末端 PLGA4 種類について LPN を調製した。後者の評価についてはロット差による分子量の影響を考慮し、各分子量 2 ロットについて同一の評価を行った。三番目に、流速および流速比が LPN の物性に及ぼす影響を評価した。水溶液/アセトン溶液流速比を 1 に固定し、合計流速を 1.0 から 20 mL/min まで変化させた。合計流速を 20 mL/min に固定し、水溶液/アセトン溶液流速比を 0.5 から 19 まで変化させた。四番目に、他のマイクロリアクタ (またはマイクロ流体デバイス) と LPN 粒子径に基づく性能の比較を行った。最も分子量が大きなオクチルエステル末端 PLGA を用いて、PLGA に対する脂質の質量比を固定した上で PLGA 濃度を 1.0 から 5.0 mg/mL まで高くすることで LPN を調製した。他のマイクロリアクタで調製される LPN の粒子径は文献から概算した。最後に、2 液混合性能を定性的に評価した。最適化した LPN 調製条件においてアセトン溶液を coumarin 6 で蛍光標識した。水溶液/アセトン溶液流速比を 1 とした上で合計流速を 1.0 から 20 mL/min まで変化させ、流路内における蛍光の変化を撮影した。

3-2. LPN の性質評価

はじめに封入特性 (回収率・封入率・導入効率) を評価した。回収率は理論値に対する凍結乾燥後 LPN 量の百分率として算出した。封入率は理論値 TMS 濃度に対する精製後 LPN 中 TMS 濃度の百分率として算出した。導入効率は凍結乾燥後 LPN 量に対する TMS 量の百分率として算出した。TMS 濃度は検量線に基づいて TMS の蛍光強度を測定することで定量した。二番目に、LPN を構成する脂質および高分子の組成が *in vitro* 放出プロファイルおよび細胞毒性に及ぼす影響を評価した。脂質組成の検討にあたり、DSPE-PEG2000 を 44%mol (従来比率) または 25%mol とした。PLGA 組成の検討にあたり、高分子量・オクチルエステル末端の PLGA について乳酸/グリコール酸比率を 50/50 (従来比率) または 75/25 とした。*In vitro* 放出プロファイルは LPN についてリン酸緩衝生理食塩水 (37 °C) 中で透析を行い、透析膜内の TMS 濃度を経時的に測定することで評価した。得られた放出プロファイルから 50% の TMS を放出する時の時間を算出した。細胞毒性はマウス乳がん 4T1 細胞を用いて評価した。1-100 μ M TMS に相当する LPN を添加し、48 時間後 Resazurin assay により細胞生存率を算出した。得られた細胞生存率から IC₅₀ 値を算出した。三番目に、透過型電子顕微鏡により LPN の構造を観察した。調製した LPN を極低温法またはネガティブ染色法で観察した。

4. 研究成果

4-1. マイクロリアクタの流路設計とその評価

LPN 粒子径に基づき、新たに開発した LTF-RS1 (Y 字型合流部) および LTF-RS2 (十字型合流部) を従来型マイクロリアクタと比較した。低分子量・カルボキシ末端の PLGA を用いた時、従来型マイクロリアクタで調製した LPN の粒子径は 31.6 nm であった。一方、LTF-RS1 および LTF-RS2 ではそれぞれ 26.7・27.3 nm であり、4-5 nm 程度ではあるが粒子径が減少した。PDI は 0.118 に対し 0.066・0.061 であり、粒子径よりも明瞭に減少した。2 液合流部-混合流路間距離の最小化は、粒子径にはあまり影響を及ぼさない一方で形成される LPN の均一性向上に有効であることが示唆された。しかし、PLGA 末端基をオクチルエステルとした時、LPN の粒子径は 66.3 nm から 47.6・48.9 nm へと大幅に減少した。PDI の減少傾向はカルボキシ末端 PLGA と同様であった。この結果は、連絡流路の最小化が粒子径を小さくすることにも有用であることを示す。PLGA 末端基によって粒子径の大きな差が発生した原因として、水溶液の組成が挙げられる。カルボキシ末端 PLGA の場合、pH 6.0 のクエン酸緩衝液によってカルボキシル基のイオン化を図っていた。オクチルエステル末端 PLGA の場合、その必要がないため超純水を使用していた。後者の場合、LPN の粒子径を小さくする要因はアセトン溶液と水溶液の混合過程のみである。そのため、連絡流路の長短が LPN の粒子径に対して顕著に影響を与えたと考えられる。

二番目に、オクチルエステル末端 PLGA について分子量が LPN 粒子径に及ぼす影響を評価した。PLGA ロット間による多少の差はあったものの、先に用いた低分子量 PLGA から分子量が大きくなるほど LPN 粒子径は減少する傾向にあった。最も大きな分子量の PLGA を用いた LPN は 37.7 nm となった。PLGA の分子量に関係なく LPN の PDI は約 0.06 でほぼ一定だった。この結果はマイクロリアクタを使用しない LPN 調製法と同様の傾向になることを明らかにしている。

三番目に、流速および流速比が LPN 粒子径に及ぼす影響を評価した。水溶液/アセトン溶液流速比を 1 で固定した時、合計流速を下げるほどに LPN 粒子径は指数関数的に増大し、最も低い 1.0 mL/min では約 140 nm にまでなった。PDI は流速によって多少の変化があったものの、0.07-0.10 の間であった。合計流速を 20 mL/min で固定した時、水溶液/アセトン溶液流速比 0.5 では LPN 粒子径が約 45 nm であった一方、1, 3 および 9 では約 39 nm でほぼ一定であった。19 では 0.5 と同程度にまで増大した。PDI は流速比 1-9 の間では 0.1 以下で一定であり、19 でのみ約 0.14 に増大した。この結果は、流速比が 1-9 の間であれば合計流速によって形成される LPN の粒子径をダイナミックに制御できることを明らかにしている。

四番目に、LPN の粒子径に基づいて既に報告のあるマイクロリアクタ (マイクロ流体デバイス) と比較を行った。比較は、流路内で微小な渦を発生させる Microvortex mixer (Kim Y, et

al. Nano Lett. 2012)、アセトニトリル溶液と水溶液を交互に4方向から渦を形成させるよう流入させる Multiinlet vortex mixer (Fang RH, et al. Langmuir. 2012)、合流させた2液を流路内の凹凸で混合する Staggered heringbone mixer (Gdowski A, et al. J Nanotechnology. 2018)の3者について行った。文献から概算したLPN粒子径は、それぞれ55, 80および100-120 nmであった。アセトン溶液中PLGA濃度を1, 2.5, 5.0 mg/mLとした時、LTF-RS1によって形成されたLPNの粒子径はそれぞれ38, 51および74 nmであった。本比較は先に報告のあるどのマイクロリアクタよりも小さくLPNを形成できることを示唆している。

最後に、LTF-RS1およびLTF-RS2の混合性能を可視化によって評価した。Coumarin 6は水に不溶の蛍光物質であるため、2液の混合が完了した時にその蛍光が一樣となる。従来型マイクロリアクタの場合、いずれの合計流速においても2液は混合流路への流入までに一相になっていた。一方、LTF-RS1およびLTF-RS2は混合流路へ流入するまでは二相に分離した状態を維持していた。合計流速1.0 mL/minでは流出口に到達しても蛍光は一樣にならなかったが、2.5 mL/min以上の合計流速では流出口に到達するまでに全てが一相になっていた。さらに、合計流速を上げるほどに一相になるまでの距離が短くなり、最大の20 mL/minで最も短くなった。この時、Y字型合流部をもつLTF-RS1は十字型合流部をもつLTF-RS2よりも僅かではあるがより短い距離で一相になった。この結果は、上述した低分子量・オクチルエステル末端PLGAを用いた時と傾向が一致する。したがって、より短い距離で2液の混合を完了することがより小さなLPNを得ることにつながっていると考えられる。

4-2. LPNの性質評価

疎水性がより高いPLGAで構築したLPNが *in vitro* 放出プロファイルおよびTMSによる細胞毒性へ及ぼす影響を評価した。回収率・封入率・導入効率はそれぞれ約96%, 約80%および約5.5%であった。LPNは24時間ではほぼ全てのTMSを放出した。4T1細胞に対する IC_{50} 値は5.0 μ Mだった。しかし、高分子量・オクチルエステル末端PLGAからなるLPNで得られた上述の結果は、低分子量・カルボキシ末端PLGAからなるLPNと比較して同等であった。このことは、より疎水性の高い高分子の使用が薬物保持性を向上させるという当初の仮説に対し、PLGAの分子量および末端基では疎水性薬物の保持性を向上できないことを示唆する。そこで、残る条件である、PLGAの乳酸/グリコール酸比を検討した。過剰のPEG化脂質が界面活性効果を持ちうることを考慮し、より低いDSPE-PEG2000比率についても検討した。乳酸/グリコール酸比=75/25からなるPLGAおよびDSPE-PEG2000比25%molの併用は僅かに *in vitro* 放出プロファイルを改善した一方、 IC_{50} 値を低減させるには至らなかった。この結果は、疎水性薬物の保持性を改善するためにはコアとなる高分子の疎水性をさらに向上させると同時に、PEG化脂質以外の脂質についても検討が必要であることを示している。

さらに、極低温透過型電子顕微鏡によるLPN構造の直接観察は新たな事象を明らかにした。高分子量・オクチルエステル末端のPLGAを用いたLPNは、低分子量・カルボキシ末端のPLGAと比較してより明瞭なコアシェル構造からなることが観察された。これは2液を混合することで脂質と高分子が別種類ではなくハイブリッドのLPNに構成されていることを示唆する。しかしながら、LPNは個々の粒子が数珠状につながっている構造をとることが明らかとなった。この現象はネガティブ染色でも同様に観察されたことから、観察方法に起因しないと考えられた。数珠状につながったLPNは体内・細胞内動態に悪影響を及ぼすため、個々に分散した状態へする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二 |
| 2. 発表標題 マイクロリアクタを用いた脂質-高分子複合ナノ粒子の超極小・単分散化 |
| 3. 学会等名 日本薬剤学会 第33年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Ryosuke Suzuki, Chihong Song, Shuichi Kishimoto, Kazuyoshi Murata, Shoji Fukushima |
| 2. 発表標題 Physicochemical and biochemical characterization of ultrasmall lipid-polymer hybrid nanoparticles |
| 3. 学会等名 18th Symposium for Gene・Design and Delivery (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二 |
| 2. 発表標題 マイクロリアクタを用いた超極小・単分散脂質-高分子複合ナノ粒子の開発 |
| 3. 学会等名 第34回 日本DDS学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二 |
| 2. 発表標題 sub-100 nm粒子径制御技術を用いたフィトケミカルの抗腫瘍活性促進 |
| 3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会 第17回 シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮佑、岸本修一、福島昭二 |
| 2. 発表標題 マイクロリアクタを用いた超極小脂質-高分子複合ナノ粒子の創成 |
| 3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会 第17回 夏期セミナー |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Suzuki R, Song C, Murata K |
| 2. 発表標題 Junction Type of Microfluidic Devices Critically Contributes to Assemble Ultrasmll Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles |
| 3. 学会等名 2019 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Suzuki R, Song C, Murata K |
| 2. 発表標題 Designing the junction type of microfluidic devices for assembling ultrasmall lipid-polymer hybrid nanoparticles |
| 3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木 亮佑、ソン チホン、村田 和義、福島 昭二 |
| 2. 発表標題 混合性能を向上させたマイクロリアクタによる脂質-高分子複合ナノ粒子の超極小化 |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|