

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15513

研究課題名(和文)オートファジーを活用した肺がん骨転移を制御可能なリポソーム製剤の開発

研究課題名(英文) Design and evaluation of rapamycin loading liposome for lung cancer therapy

研究代表者

小野寺 理沙子 (ONODERA, Risako)

熊本大学・薬学部・特任助教

研究者番号：60720399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、リポソームの表面特性に着目し、表面電荷や表面修飾を施すことで、肺がん治療を目指した経肺投与可能なリポソーム製剤を構築することである。脂質組成の異なる数種のリポソームに加え、表面修飾を施したリポソームを調製した。その中で、強負電荷リポソームは、肺内で安定に存在し、マクロファージ選択的に細胞内に取り込まれることが示唆された。さらに、*in vivo*においても経肺投与後、速やかに肺胞マクロファージに取り込まれ、肺内から消失することが示唆された。肺がんモデルマウスにおいて、がん細胞選択性を有するラパマイシン葉酸修飾リポソームは経肺投与後、優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肺がん治療において、経肺投与可能かつマクロファージ選択性を有する抗がん剤は上市されていない。本申請課題では、リポソーム表面への電荷の付与および表面修飾を施すことで、肺がん治療を目指した経肺投与可能なリポソーム製剤の開発が可能であることが示唆された。さらに、肺がんモデルマウスにおいて、尾静脈投与と比較して経肺投与の有用性が明らかとなった。これら本研究課題で得られた知見は、リポソームの経肺投与製剤の構築に際し、有用な基礎的資料になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to make an attempt to confer a cancer cell-selectivity or macrophage-selectivity to liposome, we newly prepared various liposome, and evaluated the potential as its novel drug carrier for lung cancer. Negatively charged liposomes gave high stability in BALF. High negatively charged liposomes were useful for uptake into macrophage. Furthermore, rapamycin loaded folate (FA)-modified liposome showed the potent antitumor activity in LL2 cells-bearing mice. In conclusion, the present study demonstrated the potentials of negatively charged liposomes and FA-modified liposomes as a novel anticancer drug carrier for lung cancer therapy.

研究分野：製剤学

キーワード：リポソーム 経肺投与製剤 表面電荷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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 80% 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、5 年生存率は 20% 未満と予後不良である。さらに、肺がんは骨転移の頻度が高く、NSCLC 患者の約 30-40% は骨転移を生じると言われている。骨転移を誘導する重要な因子として、腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) の破骨細胞への分化亢進が考えられている。マクロファージは活性化様式の違いにより、抗炎症性を有する M2 型と炎症性を有する M1 型の 2 種に大別されるが、多くの TAM は M2 型への活性化を受けている。M2 型マクロファージは、がん組織において血管新生の亢進や抗腫瘍免疫の抑制に関与することから、TAM を M2 型から M1 型へ変換可能となれば、抗腫瘍効果の向上が期待できる。また近年、マクロファージの M1 型から M2 型への極性転換にオートファジーの関与が報告されている。このことから、NSCLC 治療において、マクロファージ選択性を有し、オートファジーを誘導可能な抗がん剤の開発は、治療効果の向上および骨転移の制御が期待できる。

申請者はこれまで、脂質二重膜から構成されるリポソームが細胞との親和性が高く、効率的に細胞内に取り込まれることから、リポソームを薬物キャリアとして用いることで、経肺投与後の薬物の肺内滞留性を改善できる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オートファジー誘導剤を内封した肺胞マクロファージ選択的薬物キャリアの構築を行う。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺がん治療および骨転移制御を企図し、経肺投与可能な肺胞マクロファージ選択性を有するリポソーム製剤を構築することである。生体適合性に優れたリポソームの表面特性に着目し、表面電荷の有無や表面修飾を施すことでマクロファージ選択性およびがん細胞選択性を付与する。さらに、オートファジー誘導剤を内封することで肺がん治療および骨転移の制御を目指した経肺投与可能な各種リポソーム製剤の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種リポソームの調製

リポソームの調製には薄膜水合法を用いた。脂質組成を変化させることで、表面電荷の異なる 4 種のリポソームを調製した。それぞれの脂質組成は、非電荷リポソームでは、DSPC : コレステロール (CHOL) = 8 : 1、負電荷リポソームでは、DSPC : CHOL : DCP = 8 : 1 : 1、強負電荷リポソームでは、DSPC : CHOL : DCP = 8 : 1 : 2、正電荷リポソームでは、DSPC : CHOL : SA = 8 : 1 : 1 とした。また、PEG 修飾正電荷リポソームでは、DSPC : CHOL : SA = 7.91 : 1 : 1 のリポソームを調製した後、DSPE-PEG2000 水分散液と等量混合し調製した。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を調製した。

#### (2) ラット気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中におけるリポソームの安定性

Wistar 系雄性ラット (6 週齢) を用い、麻酔下、腹部大動脈を放血させ、右心室より生理食塩水を注入し、肺を灌流した。頸部を正中線に沿って切開することで気管を露出させ、気管にカテーテルを挿入し、リン酸緩衝液を用いて気管支肺胞洗浄を行い BALF を得た。得られた BALF と各種リポソーム懸濁液を等量混合し、粒子径を指標に BALF 中でのリポソームの安定性を評価した。

#### (3) 各種リポソームの細胞内取り込み

ラット肺胞マクロファージ細胞株 (NR8383 細胞)、ヒト肺がん上皮細胞株 (A549 細胞) およびマウス肺がん細胞株 (LL2 細胞) を播種し、蛍光標識した各種リポソーム懸濁液添加した。一定時間インキュベートした後、フリーサイトメトリーを用いて各種リポソームの細胞内取り込みを測定した。

#### (4) 健常ラットにおける各種リポソームの経肺投与後の肺内滞留性

Wistar 系雄性ラット (6 週齢) を 24 時間絶食後、麻酔下にてインドシアニンググリーン (ICG) で蛍光標識した各種リポソームをマイクロスプレイヤーを用いて経気管内投与した。その後、経時的に *In vivo* imaging system (IVIS) により蛍光観察を行い、得られた画像の肺局所における蛍光強度を ROI ツールにより数値化した。

#### (5) 肺がんモデルマウスにおける葉酸修飾リポソームの経肺投与後の肺内滞留性

C57BL/6N 雄性マウス (7 週齢) の尾静脈内に一定数の LL2 細胞を静脈内投与し、2 週間飼育することで肺がんモデルマウスを作製した。作製した肺がんモデルマウスを用いて (4) と同様の実験操作により葉酸修飾リポソームの経肺投与後の肺内滞留性を評価した。

#### (6) 肺がんモデルマウスを用いたリポソームの抗腫瘍効果評価

C57BL/6N 雄性マウス (7 週齢) を用い (5) に記載の方法により肺がんモデルマウスを作製

した。麻酔下、各種リポソーム懸濁液をマイクロプレイヤーを用いて経気管内投与または尾静脈内投与し、経時的に観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種リポソームの調製

リポソームの構成成分として、過去の検討において良好な吸入特性を示したジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) を用いた。リポソームを正および負に帯電させる脂質として、ステアリルアミン (SA) およびジセチルホスフェイト (DCP) をそれぞれ用いた。また、負電荷を持つリポソームは、DCP の添加量を変えることで、負電荷および強負電荷を持つリポソームを調製した。PEG 修飾剤には、DSPE-PEG2000 を用いた。リポソームは薄膜水合法により調製を行い、粒子径はエクストルーダーを用いて 100 nm 程度に制御した。PEG 修飾はポストインサージョン法により行った。

いずれのリポソームも平均粒子径 100-150 nm 程度の均一な粒度分布を示した。負電荷リポソームのゼータ電位は、約 -50 mV の値を示し、強負電荷リポソームでは、約 -60 mV であった。一方、正電荷リポソームは、約 40 mV の値を示した。また、PEG 修飾リポソームのゼータ電位は、DSPE-PEG 由来の負電荷により、約 -30 mV の値を示した。また、正電荷リポソームに PEG を修飾したところ、僅かな電位の低下が見られたが正電荷を維持した。

##### (2) ラット気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中におけるリポソームの安定性

一般に、粒子径の大きな物質は粘液と相互作用しやすく、粘液線毛クリアランスを受けやすいことから、肺内滞留性が低い事が知られている。そのため、粘液線毛クリアランスを回避するリポソーム製剤の設計には、リポソームと粘液との相互作用を評価することが重要である。そこで、本申請課題で調製した表面特性が異なる各種リポソームの肺内環境下における安定性を評価した。

BALF に各種リポソームを添加し、粒子径を測定したところ、非電荷リポソーム、負電荷リポソームおよび強負電荷リポソームでは、粒子径の大きな変化は認められず、これらリポソームは肺内環境下において安定に存在する事が示唆された。一方、正電荷リポソームでは粒子径の増大が確認された。これは BALF 中に存在するムチンやサーファクタントタンパク質などがリポソーム表面に吸着し、凝集したためだと考えられる。そこで、正電荷リポソーム表面を PEG で修飾すると、1 mol% PEG 修飾リポソームにおいて、BALF 中での粒子径の増大が抑制された。これらの結果より、正電荷リポソームは粘液と相互作用を起こしやすいが、少量の PEG を修飾することで BALF 中での凝集を抑制し、粘液線毛クリアランスを回避できる可能性が示された。

さらに、より積極的な肺がん治療用キャリアの開発を企図し、過去に調製したがん細胞選択性を有する葉酸修飾リポソームにおいても肺内環境下における安定性を評価した。その結果、葉酸修飾リポソームは、BALF 中においても安定に存在する可能性が示された。これは、葉酸修飾リポソームが負に帯電していることに加え、スパーサーである PEG がリポソーム表面に水和層を形成しているためにムチンやタンパク質などの吸着が抑制されたためだと考えられる。これらの結果より、葉酸修飾リポソームは、肺内環境下において安定性に優れることが示唆された。

##### (3) 各種リポソームの細胞内取り込み

リポソームの表面電荷が各種細胞内取り込みに与える影響を検討した。まず、NR8383 細胞を用いて検討した結果、非電荷リポソームおよび負電荷リポソームでは、細胞内取り込みに大きな差は認められなかった。一方、強負電荷リポソームでは、非電荷リポソームと比較して細胞内取り込みが有意に増大した。この理由として、マクロファージ細胞表面上に存在するスカベンジャーレセプターがリポソームの負電荷を認識した可能性が考えられる。さらに、正電荷リポソームにおいても、非電荷リポソームと比較して細胞内取り込みが有意に増大したが、これは細胞表面とリポソームとの静電的相互作用によりリポソームの細胞表面への吸着が上昇したためだと考えられる。実際、正電荷リポソーム表面を 1 mol% の PEG で修飾した PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みは、非電荷リポソームと同程度まで抑制された。これらの結果より、強負電荷リポソームおよび正電荷リポソームは、肺胞マクロファージ選択的に細胞内に取り込まれることが示唆された。さらに、PEG によるリポソーム表面の修飾は、肺胞マクロファージへの取り込みを抑制することが示唆された。

次に、A549 細胞における各種リポソームの細胞内取り込み量を評価した結果、いずれの負電荷リポソームにおいても、非電荷リポソームと比較して細胞内取り込みは減少することが示唆された。これは細胞膜と静電的な反発によるものと考えられる。一方、正電荷リポソームでは、非電荷リポソームと比較して、細胞内取り込みが有意に増大した。これは負電荷を帯びる細胞表面と正電荷リポソームとの静電的な相互作用により、細胞内への取り込みならびに細胞表面への吸着が上昇したためだと考えられる。これらの結果より、リポソーム表面を強負電荷にすることで肺胞マクロファージ選択性を有するリポソームが調製可能であることが示唆された。

さらに、がん細胞選択性を有する葉酸修飾リポソームを用いて LL2 細胞における葉酸修飾リポソームの細胞内取り込みを評価したところ、未修飾リポソームと比較して細胞内取り込み量

が有意に上昇し、さらに葉酸添加によりその取り込みは抑制された。これらの結果より、葉酸修飾リポソームは葉酸受容体を介して細胞内に取り込まれることが示唆された。

#### (4) 健常ラットにおける各種リポソームの経肺投与後の肺内滞留性

先述の検討により、強負電荷リポソームが肺胞マクロファージ選択的に取り込まれる可能性が示唆された。そこで、*in vivo* においてリポソームの表面電荷が経肺投与後の肺内滞留性に与える影響を評価した。

ラットに各種リポソームを経肺投与後、IVIS を用いて肺内滞留性を評価した。その結果、非電荷リポソームおよび負電荷リポソームでは、投与 48 時間後においても肺内からリポソーム由来の強い蛍光が観察され、肺内滞留性に優れることが示唆された。一方、正電荷リポソームでは、投与 1 時間後であってもリポソーム由来の蛍光は弱く、24 時間後にはほとんど蛍光が観察されなかった。これは正電荷リポソームが肺内において凝集を起こしやすいことや肺胞マクロファージに貪食されやすいためだと考えられる。さらに、強負電荷リポソームでは、投与 1 時間後においては肺内からリポソーム由来の強い蛍光が観察されたが、投与 6 時間後には肺内からの蛍光が消失した。これは強負電荷リポソームが速やかに肺胞マクロファージ選択的に取り込まれたために、肺内滞留性が低下したものと考えられる。これらの結果より、*in vivo* においても強負電荷リポソームは肺胞マクロファージ選択性を有することが示唆された。

#### (5) 肺がんモデルマウスにおける葉酸修飾リポソームの経肺投与後の肺内滞留性

肺がんモデルマウスにおける葉酸修飾リポソーム経肺投与後の肺内滞留性を評価したところ、未修飾リポソームは、投与 72 時間後においても高い肺内滞留性を示したのに対し、葉酸修飾リポソームでは、経時的にリポソーム由来の蛍光強度が減弱した。これは、葉酸修飾リポソームが肺がん細胞表面に高発現している葉酸受容体を介して肺がん組織へ取り込まれたためであると考えられる。

#### (6) 肺がんモデルマウスを用いたリポソームの抗腫瘍効果評価

肺がんモデルマウスに、オートファジー誘導剤であるラパマイシンを封入した葉酸修飾リポソームを経肺投与または尾静脈内投与し、経時的に観察した。その結果、ラパマイシン封入葉酸修飾リポソームは、いずれの投与経路においても未修飾リポソームと比較してマウスの生存日数を有意に延長することが示唆され、さらに経肺投与は尾静脈内投与して有用性に優れることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 森岡駿介, 小野寺理沙子, 田原耕平, 竹内洋文, 肺がん治療を目的としたオートファジー誘導剤封入葉酸修飾リポソームの有用性評価, 日本薬学会 138 年会, 2018.
- (2) 森岡駿介, 小野寺理沙子, 田原耕平, 竹内洋文, 肺がん治療を目的としたオートファジー誘導剤封入葉酸修飾リポソーム経肺投与製剤の構築, 第 34 回日本 DDS 学会, 2018.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。