

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03535

研究課題名(和文) がん組織内環境の多色深部イメージングおよび空間分布制御型DDSの構築

研究課題名(英文) Development of multi color deep imaging of cancer tissues and spatial distribution control of drug delivery

研究代表者

川上 茂 (Kawakami, Shigeru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：20322307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、組織透明化手法を用いた血管・細胞・DDSを同時に観察できる多色深部観察評価系の開発を行った。次に、がん細胞、血管内皮細胞、腫瘍関連マクロファージなどがん組織内に存在する様々な細胞に対して細胞選択的に結合することができる新規高機能・高品質(High Functionality and Quality: HFQ)脂質の設計と合成を行った。さらに、固形腫瘍マウスを用いて、腫瘍組織内における血管・細胞・RGD修飾リポソームの空間分布を観察することに成功した。また、脳および腹膜に対して多色深部観察系を応用し、DDSの空間分布を観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎え、難治性がんに対する画期的な治療薬の開発が強く求められている。本研究で開発した多色深部評価系は、血管・細胞・リポソームの空間分布ができる新しい評価系であり、今後の空間分布制御型DDSの開発を加速させるものである一方、がん組織内における様々な細胞に対する新規HFQ脂質の開発とHFQ脂質で修飾された標的指向型リポソームは、がん微小環境に着目した新しいがん治療薬の開発を促進させるものである。以上、本研究成果は、空間分布制御型DDSとがん微小環境を標的にした新しい概念に基づいたがん治療薬の開発に繋がるものであり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first developed a multi-color deep observation evaluation system that enables simultaneous observation of blood vessels, cells, and DDS using a tissue transparency technique. Next, we designed and synthesized novel High Functionality and Quality (HFQ) lipids that can cell-selectively bind to various cells in cancer tissue, including cancer cells, vascular endothelial cells, and tumor-associated macrophages. Furthermore, we successfully observed the spatial distribution of blood vessels, cells, and RGD-modified liposomes in tumor tissues using mice with solid tumors. We also applied a multicolor depth-field observation system to the brain and peritoneum, and succeeded in observing the spatial distribution of DDS.

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 標的指向化 リポソーム がん ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

一般的に固形がんでは、正常組織に比べて新生血管の増生と血管壁の高い透過性に加えて、組織から高分子物質の排出を担うリンパ系が未発達であるために、ナノ DDS キャリアはがん組織に効果的に集積することができ、ドキシルやアブラキサンなどの DDS 製剤が日本でも承認されている。しかし、適用はカボジ肉腫や卵巣がんに限定されており、膵臓がんやグリオーマなどの難治性がんに対して有効な DDS の開発は十分に進んでいない。これは膵臓がんやグリオーマなどの難治性がんでは、腫瘍微小環境として、がん細胞を取り囲む形で、腫瘍関連マクロファージ、血管・リンパ管構成細胞、繊維芽細胞、コラーゲンなどの間質が豊富に存在し、血管密度が低い上に、間質が動態障壁となるため、深部に存在するがん細胞への薬剤到達性が低いことが原因であると考えられる。また、間質に存在する腫瘍関連マクロファージや繊維芽細胞はがん増殖因子やサイトカインを分泌するがん治療の重要な標的細胞であるため、がん組織環境に着目した DDS の開発は、新たな難治性がん疾患に対する治療戦略に繋がる。がん組織内において血管密度や間質などの微小環境はヘテロであり、DDS 組織内分布は部位差を生じやすい。その対策には、「DDS の組織内空間分布とがん組織内環境の関連性を多色で同時可視化する方法を開発する必要がある」と考えた。

近年、創薬に繋がる基礎研究における研究成果を臨床応用へと結実させることが強く求められている。アカデミア発 DDS 技術を実用化するための重要な点は、基礎研究段階で、(1) データの再現性と信頼性、(2) 技術の独自性と革新性、(3) 特許戦略が必要である。平成 28 年 3 月にリポソーム製剤のガイドラインが発出され、リポソーム研究は基礎研究による理論構築からその研究成果を臨床へ応用できる時代へと突入した。しかし未だ、標的指向型リポソーム製剤に関する品質特性に関する情報は少なく、今後の研究の発展が必要である。研究代表者を含む国内外のリポソーム研究者は、標的指向型リポソームの開発において、リガンドを含む機能性脂質を合成し、機能性脂質の特性に応じた方法でリポソームを調製後、培養細胞や動物の評価により基礎理論を構築する中で研究を推進してきた。しかしながら、標的指向型理論構築に偏っており、データの再現性と信頼性、技術の独自性と革新性とそれを保証するリポソーム製剤の品質特性はほとんど考慮されていない。そこで研究代表者は、この問題を解決するため、規格基準を有する PEG 化リポソーム製剤をベースに再現性のある形で簡便にリガンドを修飾させるために機能性脂質が持つべき要件を定めた Highly Functional, Quality 脂質 (HFQ 脂質)の開発を進めている(表 1)。HFQ 脂質は、(1) 分布幅を持たない単一な分子であり、(2) 標的細胞への高い認識性を有し、(3) ペプチドと脂質で構成されるため安全性に関する懸念が少なく、(4) ポストインサートに必要な水への溶解性を持ち、(5) リガンドペプチドの安定性を考慮しており、各 HFQ 脂質含有製剤は再現性良く調製することができる。

表 1 機能性脂質として HFQ 脂質が満たすべき要件

	従来の機能性脂質	HFQ 脂質
分子量分布	PEG の場合、広い分子量分布	無し
合成法	液相合成法、固相合成法	固相合成法
標的細胞への認識性	リガンド・スパーサー構造に依存	高い
水へ溶解性	可溶性/不溶性、どちらも	可溶性のみ
リポソームへの修飾法	様々な方法	ポストインサート法
リガンド安定性	リガンド分子に依存	安定/安定化

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性がん組織内環境の多色深部イメージングとその評価系を基盤とした空間分布制御型 DDS 技術体系の構築を目指すことである。そのために、まず、固形腫瘍モデルマウスを用いてがん組織内の血管・細胞・DDS を同時に評価できる多色深部評価系の開発を行った。次に、がん細胞、腫瘍血管内皮細胞、腫瘍関連マクロファージなど腫瘍内組織の様々な細胞を標的とすることができる新規 HFQ 脂質の設計と合成を行った。また、本物質を用いて機能性分子で PEG リポソームへ導入した標的指向型リポソーム製剤を開発した。さらに、難治がんである脳腫瘍や腹膜播種に対する空間分布制御型 DDS の開発を目的として、脳や腹膜に対する多色深部観察評価系の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) RGD 修飾 HFQ 脂質とがん組織内多色深部観察評価系の開発

RGD-PEG₂₀₀₀-DSPE の合成: CGRGDS と mal-PEG₂₀₀₀-DSPE を 100 mM HEPES ブッファーに添加した。このペプチド溶液と mal-PEG₂₀₀₀-DSPE 溶液 (2 : 1 mol 比) を穏やかに混合し、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (RGD ペプチドの 5 eq.) を添加した。pH を 7.0 に調整した後、4 で 48 時間反応させ、余剰の未反応ペプチドを透析で除去した (MWCO=6,000-8,000)。合成された生成物を凍結乾燥し、MALDI-TOF-MS で評価した。

リポソームの調製: DSPC、コレステロール、mPEG₂₀₀₀-DSPE をメタノールに溶解し、RGD-PEG₂₀₀₀-

脂質をクロロホルムとメタノール(1:1, v/v)に溶解した。蒸発乾固後、滅菌水中で65℃に加熱し、プローブソニケーターで3分間超音波処理した。RGD-(SG)_n/PEG化リポソームは、PEG化リポソームとRGD-(SG)_nミセルを60℃で1時間インキュベートすることによって調製した。さらに、Cy5.5-PEG₂₀₀₀-DSPE, DiO, DiIを添加して、脂質膜を蛍光標識した。サンプルは0.45 μmのフィルターでろ過した。リポソームの粒子径とゼータ電位は、Zetasizer Nano ZS instrumentを用いて測定した。細胞培養: Colon-26細胞は東北大学医用細胞資源センターから入手し、10%熱不活性化牛胎児血清(FBS), 100 U/mL penicillin, および100 μg/mL streptomycinを添加したRPMI-1640培地を用いて培養を行った。細胞は5% CO₂, 37℃の条件下で培養した。細胞間結合実験: 25 μM Cy5.5 標識リポソームを含む無血清培地で3時間培養し、洗浄後、トリプシン処理、遠心分離し、PBSに懸濁させた。その後、flow cytometerを用いてリポソームが結合した細胞を分析した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡による細胞内局在の観察: 2×10⁵個の細胞を35 mm ガラスベースディッシュにプレATINGし、24時間インキュベートした。25 μM Cy5.5 ラベル化リポソームで3時間処理し、細胞を洗浄した後、200 nM LysoTracker Green DND-26で1時間処理した。4%パラホルムアルデヒド(PFA)で光輝化した後、細胞をDAPIで処理した。共焦点画像は、LSM710共焦点顕微鏡を用いて観察し撮影した。エンドサイトーシス経路の解析: 細胞を24穴プレート(5×10⁴ cells/cm²)に播種し、24時間培養した。細胞を0.4 M スクロースおよび200 μM ゲニステインで30分間前処理した。その後、25 μM の5.7% RGD-(SG)₅/PEG化リポソームを各阻害剤の存在下で30分間処理した。また、エンドサイトーシスが起らない4℃による細胞への取り込みの影響を評価するために、25 μM 5.7% RGD-(SG)₅/PEG化リポソームを4℃で30分間処理した。過剰量のGRGDSペプチドを用いた競合阻害実験では、100倍モル濃度のGRGDSペプチドで30分間前処理した後、5.7% RGD-(SG)₅/PEG化リポソームをペプチド存在下で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞をトリプシン処理し、遠心分離し、PBSに再懸濁した。その後、フローサイトメーターを用いて細胞を分析した。

動物および腫瘍モデル: 担癌マウスは、25 μL のPBSに分散させた1×10⁶個の細胞をマウスの右脇腹に皮下投与し、腫瘍が直径10 mmに達した時点で実験を開始した。すべての動物実験はマウスを用いた動物実験に関しては、長崎大学動物実験委員会に計画書を提出し、同委員会の承認を受けて実施した。

体内・組織内分布の解析: Cy5.5 標識 PEG 化リポソーム、5.7% RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム、または5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームを25 mg/kgでColon 26腫瘍マウスに静脈内投与した。注射後24時間目にマウスを屠殺し、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、腫瘍を採取した。これらの蛍光強度は、640 nm 励起フィルターおよびCy5.5 発光フィルターを備えたIVIS イメージングシステムで測定した。DiI 標識 PEG 化リポソーム、5.7% RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム、5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームを25 mg/kgでColon 26腫瘍マウスに静脈内投与した。投与後24時間目に尾静脈から採血した。心臓からヘパリン添加PBS(10 units/mL)10 mLとPBS 50 mLで灌流した。心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、腫瘍を採取し、重量を測定した。組織サンプルは、200 μLの生理食塩水でホモジナイズした。血漿または組織のホモジネートにメタノール、飽和塩化ナトリウム、クロロホルム(1:1:3)を添加した。試料を遠心分離し、有機層を回収した。蛍光光度計を用いて蛍光強度を測定した。腫瘍組織切片の免疫組織化学的解析は、DiO 標識 PEG 化リポソーム、5.7% RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム、または5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームを25 mg/kgの脂質投与量でcolon26腫瘍担体マウスに静脈内投与した。投与後24時間で、腫瘍を灌流後に回収した。組織切片(10 μm)を4%PFAで固定し、抗CD31抗体で2時間免疫組織化学的に染色した。リポソームの腫瘍内空間分布の評価では、PEG化リポソーム、5.7% RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム、5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソーム投与後3時間または24時間に、ヘパリン添加PBS(10 units/mL)10 mLとPBS 50 mLで心臓から灌流させた。4%PFAで灌流後、腫瘍を摘出し、4%PFAに一晩浸した後、ScaleSQで洗浄、10×対物レンズを装着した共焦点顕微鏡でサンプルを観察した。

(2) がん細胞や間質細胞を標的としたHFQ脂質の設計と合成

ヒトグリオーマ細胞を標的としたVTW修飾HFQ脂質の設計と合成:

ジパルミトイルリジン-KSSeK3-(SG)₅-VTWTPQAWFQWV (VTW-(SG)₅-K3-脂質)、ジパルミトイルリジン-KSS-(SG)₅-K2-VTWTPQAWFQWV (VTW-K2-(SG)₅-脂質)、ジパルミトイルリジン-KSS-(SG)₅-VTWTPQAWFQWV (VTW-(SG)₅-脂質) およびジパルミトイルリジン-ESS-(SG)₅-E3-VTWTPQAWFQWV (VTW-E3-(SG)₅-脂質) はSPPSを用いて合成した。Fmocの脱保護は20%ピペリジンで20分間処理した。Fmoc-アミノ酸のカップリングは、HBTU/HOBt/DIPEA存在下で30分間行った。Fmoc-Lys(Fmoc)eOHのカップリングとFmoc基の脱保護後、HBTU/HOBt/DIPEA存在下でLys残基のアミノ基にパルミチン酸(10 eq.)をカップリングした。反応完了を確認するためにカイザーテストを実施した。脂質はTFA/TIS/H₂O(95/2.5/2.5)で3時間切断・脱保護し、粗生成物はジエチルエーテルで沈殿させた。生成物を水に分散させ、水に対して4日間透析後にアセチル化ペプチドを除去し、凍結乾燥した。この化合物をMALDI-TOF-MSで分析した。

腫瘍関連マクロファージを標的としたマンノース修飾HFQ脂質の設計と合成:

Man-(SG)₅-SSR-K(Pal)₂の合成: K-(SG)₅-SSR-K(Pal)₂をFmoc固相ペプチド合成法を用いて調製した。Fmoc基を20%ピペリジンで20分間脱保護した後、Fmocアミノ酸を用いたカップリン

グ反応を HBTU/HOBT/DIPEA で 30 分間行った。未反応のアミノ基は 25% 無水酢酸でキャッピングした。Fmoc-Lys(Fmoc)-OH のカップリング反応後、Fmoc 基を脱保護し、パルミチン酸 (10 eq) を HBTU/HOBT/DIPEA と 4 時間 2 回反応させ、トリフルオロ酢酸 (TFA)/TIS/H₂O (94/2.5/2.5) 溶液を加えて 3 時間反応して樹脂から開裂させた。粗生成物を 5 日間透析した。IME-thiomannoside (10 eq) と K(SG)₅-SSK-K (Pal)₂ (1 eq) をピリジン (2 mL)、ジメチルスルホキシド (1 mL) およびトリメチルアミン (20 μL) から成る混合液で 24 時間反応させた。生成物を濃縮し、残渣に水を加え、48 時間の透析を行い、凍結乾燥させた。

Man(S)-(SG)₅-SSK-K(Pal)₂ の合成：Man(S)-(SG)₅-SSK-K(Pal)₂Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて Man(S)-(SG)₅-SSK-K(Pal)₂ を調製した。HBTU/HOBT/DIPEA を用いて N-Fmoc-O-(2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- α , β -D-mannopyranosyl)-L-serine を生成する反応は 4 時間行い、他のアミノ酸を含む反応は 30 分間行った。未反応のアミノ基は 25% 無水酢酸でキャッピングした。カップリング後 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH のカップリング後、Fmoc 基を脱保護し、パルミチン酸 (10 eq) を HBTU/HOBT/DIPEA で 4 時間、4 回反応させ、0.01 M CH₃ONa/NMP-MeOH (17:3) で 30 分、脱アセチル化を行った。

(3) 腫瘍に対してアポトーシスを誘導するペプチド NuBCP-9 の細胞内送達法の開発と評価：

8、10、12、14 分子のアルギニン (R) と NuBCP-9 を結合させた誘導体を合成し、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞における細胞結合、細胞内取り込み、アポトーシス誘導効果を評価した。方法は上記のものに準じて行った。

(4) 組織内多色深部観察評価系の脳および腹膜における DDS 空間分布評価

がんは様々な臓器において発生する。とりわけ、脳腫瘍や腹膜播種は難治であり、DDS 開発が強く求められる。様々な臓器における組織内多色深部観察評価系の開発は、当該臓器を対象とする DDS 開発において有益である。そこで本研究で開発した上記の多色深部評価系を脳ならびに腹膜組織の DDS 空間分布評価へ応用した。

4. 研究成果

(1) RGD 修飾 HFQ 脂質とがん組織内多色深部観察評価系の開発

RGD-(SG)_n-Lipid と RGD-PEG₂₀₀₀-Lipid の合成と分子量評価：

MALDI-TOF-MS 分析により、RGD-(SG)_n-lipid (n=3、5、7) の単一な分子量ピークを確認した。一方、MALDI-TOF-MS 分析により、RGD-PEG₂₀₀₀-lipid の幅広い分子量範囲が観察した。

リポソームの調製と物理化学的特性：

PEG 化リポソームでは、10% の PEG₂₀₀₀-脂質をリポソーム表面に修飾した。RGD-PEG₂₀₀₀-脂質の量は、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームと同様の RGD ペプチド濃度となるようにあわせた。1.5、3、5.7% RGD-(SG)₅-lipid の PEG 化リポソームへの挿入効率はそれぞれ 85.5 ± 10.0、94.4 ± 8.4、87.9 ± 2.5% であった。RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームのサイズは、RGD の密度に応じて大きくなった。3% RGD-(SG)_n/PEG 化リポソームの細胞結合に及ぼす SG スペースの長さの影響を評価した。3% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームおよび 3% RGD-(SG)₇/PEG 化リポソームの細胞結合率は、対照である PEG 化リポソームおよび 3% RGD-(SG)₃/PEG 化リポソームよりも有意に高いことが明らかとなった。また、3% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームと 3% RGD-(SG)₇/PEG 化リポソームでは、同程度の細胞結合性がみられ、以降の実験では、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームを選択した。

RGD 密度が及ぼす細胞結合への影響：

RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームおよび RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの RGD 表面密度 (1.5、3.0、5.7%) の細胞結合に及ぼす影響を評価した。1.5、3.0、5.7% の RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームで処理した細胞は、PEG 化リポソームで処理した細胞と比較して、細胞結合がわずかに増加した。一方、1.5、3.0、5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームでは、細胞結合が顕著に増加した。PEG 化リポソーム、RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの Colon-26 細胞の細胞内分布を共焦点顕微鏡で調べたところ、RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームは RGD 表面密度が最も高いものでも取り込みは最小だった。一方、3.0% および 5.7% の RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームで処理した Colon-26 細胞は、RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームで処理した細胞より大きな蛍光を示した。RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームと RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームは、後期エンドソーム/リソソームと共局在し、5.7% RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームではリソソームへの局在程度がより大きくなっていることが確認された。

エンドサイトーシス経路の解析：

RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの細胞内取り込み機構を阻害剤との同時併用により評価した。スクロースとゲニステインは、それぞれクラスリンおよびカベオリンを介したエンドサイトーシスを阻害するために使用された。遊離 RGD ペプチドは、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームのインテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合を競合阻害するために使用された。スクロース、ゲニステイン、低温インキュベーション、および遊離 RGD ペプチドは、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの細胞への取り込みを有意に阻害した。これらの結果は、RGD (SG)₅/PEG 化リポソームはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に結合し、クラスリンおよびカベオリンを介したエンドサイトーシスにより効率的に内在化され、その後リソソームへ輸送されることを示唆するものである。

体内・組織内分布の解析：

RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームと RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの両方で、静脈内投与後 24 時間で脾臓への集積が認められ、腎臓への集積は減少した。RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームと RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの腫瘍集積に変化はなかったが、灌流マウスでは RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの腫瘍集積が PEG 化リポソームや RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームより高いことが分かった。組織洗浄後、腫瘍組織におけるリポソームの空間的分布を共焦点顕微鏡で評価した。投与後 3 時間で、緑色蛍光の強度は以下の順序で観察された。PEG 化リポソーム < RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソーム < RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの順であった。また、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームが腫瘍組織だけでなく、腫瘍血管にも結合することを明らかにした。投与後 24 時間でも同様の蛍光パターンが観察され、リポソームの蓄積量が多かった。PEG 化リポソームの多くは腫瘍血管の周囲に認められたが、RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームおよび RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームは腫瘍組織と腫瘍血管の両方でみられた。しかし、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの空間分布は、RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームと明らかに異なっていた。RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームの緑色蛍光は主に腫瘍血管に分布し、一部のリポソームは腫瘍組織内にも分布した。一方、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームは、血管外や腫瘍組織の深部に多く分布した。さらに、RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの腫瘍血管および腫瘍組織との共局在性が免疫組織化学分析によっても示され、組織透明化のデータと一致した。全体として、腫瘍組織における RGD-(SG)₅/PEG 化リポソームの蛍光は RGD-PEG₂₀₀₀/PEG 化リポソームからの蛍光よりも強かった。

(2) がん細胞や間質細胞を標的とした HFQ 脂質の設計と合成

ヒトグリオーマ細胞を標的とした VTW 修飾 HFQ 脂質の設計と合成：

VTW ペプチドは疎水性を示すため、VTW-(SG)₅-lipid は水中に分散できなかった。そこで、電荷の異なるアミノ酸残基（リジンとグルタミン酸）を持つ VTW-(SG)₅-脂質誘導体を設計・合成し、水への分散性を比較した。水への分散性はリジン(K)の数が増えるにつれて増加し、VTW-K3-(SG)₅-lipid は全誘導体中最大の水への分散性(100%、0.30 mM)を示すことが明らかとなった。興味深いことに、スペーサーの後ろに K を 3 分子導入すると (VTW-(SG)₅-K3-脂質)、水への分散性が低下する(68%、0.20mM)。K の代わりに E を導入した場合 (VTW-E3-(SG)₅-脂質)、水中での分散性が著しく低下した(25%、0.07 mM)。また、Lys 残基の位置は重要な因子であり、VTW と (SG)₅ 脂質の間に K3 を加えることで、分散性が向上する可能性が示された。

腫瘍関連マクロファージを標的としたマンノース修飾脂質の設計と合成：

マンノシル化脂質に高い水分散性を与えるために、極性アミノ酸(グルタミン酸またはアルギニン)または伸長した SG スペーサーを含むペプチド配列を使用し、Bachem ペプチド計算機を用いてペプチド正味電荷をシミュレーションした。K-(SG)₅-SS-E-K(pal)₂ と K-(SG)₁₀-SS-E-K(pal)₂ の正味の電荷はゼロであった。C-末端リジンと(SG)₅の間に 1 または 2 分子のグルタミン酸(E)残基を導入すると、正味の負の電荷が付与された。また、K-(SG)₅-SS-E-K(pal)₂ のグルタミン酸(E)残基をアルギニン(R)に置換することにより正電荷が付与され、K-(SG)₅-SS-R-K(pal)となった。これらの脂質は Fmoc 固相ペプチド合成法で作製し、水への分散性を評価した。正電荷を持つ K-(SG)₅-SS-R-K(pal)₂ のみが 0.2 mM 以上の濃度で水中での高い分散性を有していることが明らかとなった。K-(SG)₅-SS-R-K(pal)₂ と IME thio-mannoside の液相抱合をジメチルスルホキシドとトリメチルアミンを含むピリジン中で 24 時間行い、マンノシル化脂質 Man-(SG)₅-SSR-K(Pal)₂ を収率 8.2% で得た。この生成物を HPLC-UV システムおよび質量分析計で分析したところ、副生成物に起因するピークが豊富に検出された。そこで、Fmoc 固相ペプチド合成法にマンノースコンジュゲーションを導入し、マンノース化脂質の収率および品質を向上させた。その結果、正電荷を持つ新規マンノース化脂質 Man(S)-(SG)₅-SSK-K(Pal)₂ が設計された。Fmoc-マンノース-セリン (Man(S)) 誘導体である N-Fmoc-O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- α , β -D-マンノピラノシル)-L-セリンはマンノースから二段階反応で合成され、収率は 17% であった。HBTU/HOBT/DIPEA を用いて Fmoc-mannose-serine 残基のカルボキシル基と樹脂のアミン基を反応させた。ペピリジンを用いて Fmoc 基を除去した後、(SG)₅-SSK-K を含むペプチド鎖を伸長させ、最終的にパルミチン酸とカップリングさせた。アミノ酸の Fmoc 基とマンノースのアセチル基を脱保護することで、目的の Man(S)-(SG)₅-SSK-K(pal)₂ が収率 40.8% で得られた。

(3) 腫瘍に対してアポトーシスを誘導するペプチド NuBCP-9 の細胞内送達法の開発と評価：

NuBCP-9 と様々な Rn (n = 8, 10, 12, 14) を結合させ、細胞への取り込み特性を調査・比較検討した。その結果、Rn と結合した NuBCP-9 は、主にクラスリンを介したエンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスにより細胞への取り込みを促進し、その取り込み経路に違いはなかった。しかし、細胞毒性試験では、NuBCP-9-R12 と NuBCP-9-R14 のコンジュゲートは非特異的な細胞毒性を増強することが示された。NuBCP-9-R10 は最も高い取り込み効率を示し、それに応じてアポトーシスを強く誘導することが明らかとなった。

(4) 組織内多色深部観察評価系の脳および腹膜における DDS 空間分布評価への応用

組織内多色深部観察評価系を脳ならびに腹膜の評価に応用し、脳ならびに腹膜における DDS 空間分布の評価に適用できる汎用的方法であることを確認した。今後、脳腫瘍や腹膜播種における空間分布制御型 DDS の開発に有益な情報となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Suga Tadaharu, Kato Naoya, Hagimori Masayori, Fuchigami Yuki, Kuroda Naotaka, Kodama Yukinobu, Sasaki Hitoshi, Kawakami Shigeru	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of High-Functionality and -Quality Lipids with RGD Peptide Ligands: Application for PEGylated Liposomes and Analysis of Intratumoral Distribution in a Murine Colon Cancer Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4481 ~ 4490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Wei, Suga Tadaharu, Hagimori Masayori, Kuroda Naotaka, Fuchigami Yuki, Kawakami Shigeru	4. 巻 41
2. 論文標題 Investigation of Intracellular Delivery of NuBCP-9 by Conjugation with Oligoarginines Peptides in MDA-MB-231 Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1448 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hagimori Masayori, Chinda Yorinao, Suga Tadaharu, Yamanami Kazuto, Kato Naoya, Inamine Tatsuo, Fuchigami Yuki, Kawakami Shigeru	4. 巻 123
2. 論文標題 Synthesis of high functionality and quality mannose-grafted lipids to produce macrophage-targeted liposomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 153 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejps.2018.07.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Koyo, Yonezawa Keita, Fumoto Shintaro, Miura Yusuke, Hagimori Masayori, Nishida Koyo, Kawakami Shigeru	4. 巻 11
2. 論文標題 Application of Direct Sonoporation from a Defined Surface Area of the Peritoneum: Evaluation of Transfection Characteristics in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 244 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics11050244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suga Tadaharu, Watanabe Masanori, Sugimoto Yuri, Masuda Tomonari, Kuroda Naotaka, Hagimori Masayori, Kawakami Shigeru	4. 巻 49
2. 論文標題 Synthesis of a high functionality and quality lipid with gp130 binding hydrophobic peptide for the preparation of human glioma cell-targeted PEGylated liposomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 668 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2018.12.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Koki, Fuchigami Yuki, Hagimori Masayori, Fumoto Shintaro, Maruyama Kazuo, Kawakami Shigeru	4. 巻 137
2. 論文標題 Ultrasound-responsive nanobubble-mediated gene transfection in the cerebroventricular region by intracerebroventricular administration in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejpb.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Shigeru, Suga Tadaharu	4. 巻 140
2. 論文標題 Development of Nano-DDS Carriers for Control of Spatial Distribution Using Multi-color Deep Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 633 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00218-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Koyo, Ogawa Koki, Kawaguchi Maho, Fumoto Shintaro, Mukai Hidefumi, Kawakami Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppression of Peritoneal Fibrosis by Sonoporation of Hepatocyte Growth Factor Gene-Encoding Plasmid DNA in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 115 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13010115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 菅 忠明、萩森政頼、黒田直敬、川上 茂
2. 発表標題 Integrin v 3指向性ペプチドをリガンドとする高機能・高品質脂質の開発：PEGリポソームへの応用と腫瘍内空間分布の解析
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 西村光洋、米澤敬大、淵上由貴、麓 伸太郎、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルを利用した腹腔内組織への遺伝子導入法における遺伝子発現特性評価と腹膜線維症治療への応用
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 菅 忠明、渡邊公則、増田智成、黒田直敬、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 疎水性ペプチドをリガンドとするヒトグリオーマ指向型の高機能・高品質脂質の設計とリポソームへの応用
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 川上 茂、菅 忠明
2. 発表標題 高機能・高品質（HFQ）脂質を用いた標的指向型DDS 製剤の開発
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅 忠明、萩森政頼、渡邊公則、増田智成、黒田直敬、川上 茂
2. 発表標題 リボソームの標的指向化を企図した高機能・高品質 (HFQ) 脂質の開発：相異なる物性を示すペプチドをリガンドとするHFQ脂質の設計・評価
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会 第18回夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadaharu Suga, Masayori Hagimori, Yuri Sugimoto, Naotaka Kuroda, Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Synthesis of a RGD modified high functionality and quality lipid for the preparation of RGD-grafted PEGylated liposomes in tumor targeting
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 Masayori Hagimori, Tadaharu Suga, Yorinao Chinda, Kazuto Yamanami, Naoya Kato, Tatsuo Inamine, Yuki Fuchigami, Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Synthesis of high functionality and quality mannose-grafted lipids and its application for macrophage-targeted liposomes
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 菅 忠明、増田智成、三浦雄介、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 難治性癌の組織構造とDDSの空間分布解析を目的とした組織内多色イメージング法の開発
3. 学会等名 第1回超分子薬剤学FGシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川昂輝、淵上由貴、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 超音波応答性ナノバブルを用いた脳室組織への遺伝子導入法における脳室内遺伝子発現分布の評価
3. 学会等名 日本超音波医学会第28回九州地方会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村光洋、萩森政頼、三浦雄介、麓伸太郎、兒玉幸修、佐々木 均、川上 茂
2. 発表標題 多色深部イメージングを利用した腹膜組織における遺伝子発現・核酸送達評価法の開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅 忠明、内山詩乃、増田智成、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 膵癌深部への送達を目的とする微小な膵癌指向型リポソーム製剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 茂、菅 忠明
2. 発表標題 多色深部イメージングを利用した空間分布制御型ナノDDSの開発
3. 学会等名 日本薬学会139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadaharu Suga and Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Development of ligand-modified liposomes for cancer-targeted delivery system
3. 学会等名 APSTJ Global Education Seminar 2018 3rd (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyo Nishimura, Maho Kawaguchi, Shintaro Fumoto, Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Suppression effect on peritoneal fibrosis by HGF gene encoding CpG-free plasmid DNA using nanobubbles with ultrasound irradiation
3. 学会等名 19th Symposium for Gene, Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村光洋、小川昂輝、麓伸太郎、川上 茂
2. 発表標題 腹膜線維症病態時の組織構造と遺伝子発現分布の組織内空間的評価による腹腔内組織への超音波応答性DDSの開発
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田智成, 菅 忠明, 向井英史, 川上 茂
2. 発表標題 がん組織における間質・血管・DDSキャリアの新規多色深部イメージング法の開発
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 茂
2. 発表標題 脳を標的としたリポソーム・脂質ナノ粒子のDDS技術の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 茂
2. 発表標題 標的指向DDS開発と組織透明化評価
3. 学会等名 創剤研究コンソーシアム 2021年度 第2回研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap: https://researchmap.jp/skawakam

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
研究分担者	麓 伸太郎 (Fumoto Shintaro) (70380988)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	萩森 政頼 (Hagimori Masayori) (40446125)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授 (17301)	

	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
研究 協力者	淵上 由貴 (Fuchigami Yuki)		
研究 協力者	菅 忠明 (Suga Tadaharu)		
研究 協力者	西村 光洋 (Nihimura Koyo)		
研究 協力者	小川 昂輝 (Ogawa Koki)		
研究 協力者	増田 智成 (Masuda Tomonari)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関