

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：83206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12093

研究課題名（和文）細胞膜由来小胞の作製とドラッグデリバリー担体としての利用

研究課題名（英文）Preparation of cell membrane-derived vesicles and their application to drug delivery system

研究代表者

小木曾 英夫 (Ogiso, Hideo)

富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・副主幹研究員

研究者番号：30466734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自家がん細胞由来細胞膜を取得し、これをナノ粒子製剤にコートすることにより、がん細胞の自己親和性を利用したターゲティング効果を得る目的で、その作成方法を検討した。その結果、抗がん剤担持ナノ粒子の作製方法と、このナノ粒子に細胞膜をコートする方法を確立した。しかしながら、このナノ粒子製剤は、自家がん細胞のみならず、正常細胞にも取り込まれた。すなわち、これまでに最適化した作製条件では、十分な細胞選択性を有するナノ粒子製剤は得られていない。自家がん細胞選択性を付与するために、非特異的接着因子の影響を低減させるなどの、さらなる改良が必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すでに臨床で用いられている低分子抗がん剤は、一定の効果があるものの、副作用が強く、そのため投与量を制限しながら利用されており、十分な制がん効果が得られていないことが問題とされている。このため副作用を低減しながら効果を高めることのできるドラッグデリバリーシステムがひとつの解決法と考えられており、本研究の成果は、新しいドラッグデリバリーシステムの可能性を示すものであり、効果的な抗がん剤ナノ粒子製剤の開発の足掛かりになる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to obtain cell membranes derived from autologous cancer cells and coat them onto nanoparticle preparations, in order to obtain a targeting effect using the self-affinity of cancer cells. As a result, we established a method for producing nanoparticles loaded with anticancer drugs and a method for coating these nanoparticles with cell membranes. However, this nanoparticle preparation was taken up not only by autologous cancer cells but also by the other normal cells. In other words, the nanoparticle preparations have not provide targeting effect, under the optimized preparation conditions so far. It was found that further improvement, such as reducing the effect of non-specific adhesion factors, is necessary to provide autologous cancer cell selectivity.

研究分野：生体膜の研究、質量分析による生体分子の解析

キーワード：細胞膜 自家がん細胞 ドラッグデリバリー ターゲティング 抗がん剤 ナノ粒子製剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤の溶解性を増しながら副作用を軽減し主作用を高めるためのドラッグデリバリーシステムとして、リポソーム製剤やナノ粒子製剤が開発されている。さらには、人工リポソームに特定のタンパク質やDNA, RNAを結合させるなどした種々の機能性リポソームの開発なども盛んに行われている。一方で、新薬開発研究において、生理活性の強い化合物でありながら難溶性のため開発が滞るケースがあり、この問題を解決する方法のひとつとして、リポソーム等のナノ製剤化技術が多方面で検討されている。

これとは全く別の流れとして、赤血球膜や血小板膜、もしくは癌細胞から膜成分を分離し、制癌剤を濃縮保持したナノ粒子の表面に、これら生体膜をコートすることによって、血中滞留時間の延長効果や癌組織へのターゲティングの効果を得ようとする試みがある(Hu et al., Nature, 2015, 526, 118-21. Fang et al., Nano Lett., 2014, 14, 2181-8. Cheung et al., Small, 2016, 12, 2321-33)。赤血球や血小板のような細胞膜を主成分とする血球細胞を利用する方法では、細胞膜成分をコートしたナノ粒子の作製は可能であるが、自家癌細胞を想定した有核癌細胞の膜成分を材料とした報告では、原料とする生体膜は細胞膜(形質膜)のみならず、オルガネラ膜成分にも由来しており、コートされたナノ粒子表面は、細胞表面を忠実に再現した状態にはなっていないと推察される。この原因は、そもそも通常の有核培養細胞から細胞膜を高収率かつ高純度で分離して取得することが難しいためである。

申請者はこれまでに、一貫して生体膜の分析研究に従事してきており、細胞膜構成分子の構造機能解析の経験を積んできている。その中で細胞膜を分離取得する技術を確立している。この分離細胞膜を生体材料として応用することを目指して、細胞膜を材料とした小胞の作製に取り組んでおり、膜タンパク質機能や膜酵素活性を保持したまま、細胞膜を由来とする小胞(plasma membrane-derived vesicles, PMV)を取得することに成功している。ただしPMVは収量が低いことから、細胞膜タンパク質の機能解析のための利用に留まっている。このPMVが任意の培養細胞から効率的に大量に取得できるようになれば、これまでとは異なる新しいドラッグデリバリー担体としての材料になるものと期待された。

2. 研究の目的

PMVを材料としたドラッグデリバリーシステムを開発する。(1)培養細胞から分離した細胞膜を材料とすることで、表面抗原や膜酵素活性を保持しているため、材料となる細胞種の性質をそのまま反映した機能性ナノ粒子が得られる。(2)自己細胞を材料とすることで、免疫応答の回避や血中滞留時間の延長等の効果が期待できる。(3)自家癌組織から採取された癌細胞を材料とすることで、自家癌細胞の表面抗原を保持したPMV化制癌剤を作製することが可能となり、既に報告のあるホモタイプ結合のメカニズムに基づいた、癌組織へのターゲティング効果が期待できる。これらの性質を有したナノ粒子製剤の作製方法を確立する。

3. 研究の方法

動物培養細胞(がん細胞と正常細胞)を材料とし、コロイダルシリカビーズ法を用いて、効率的に大量に細胞膜を取得する方法を検討した。次に抗がん剤のナノ粒子製剤を作製し、その表面にがん細胞由来細胞膜の性質を付与する方法を検討した。確立した方法によって得られた、がん細胞の細胞表面を模倣した抗がん剤ナノ粒子製剤について、抗がん剤が細胞選択的に取り込まれるかを検証した。

4. 研究成果

種々のがん細胞および正常細胞を検討した結果、膵がん由来のPanc1細胞を材料とすることによって、細胞膜を効率的に取得できたため、以降はPanc1に絞って検討した。抗がん剤ナノ粒子の作製方法については、(1)がん細胞から取得した細胞膜を材料としてベシクルを再形成させ、これに水溶性薬剤を封入することを試みたが、薬剤の封入量が少なく、ベシクルが不安定であったことから、この方法は困難と判断した。(2)脂溶性抗がん剤に絞り、エマルションによる方法を検討した。脂溶性抗がん剤をオイルエマルション化したナノ粒子を作製することは出来たものの、培養細胞の培地に添加し希釈したとき、その粒子構造が壊れることが示唆されるデータが得られた。希釈状態であっても構造安定性が高い常温個体エマルションを検討したが、培地中希釈状態で安定な粒子を得ることはできなかった。(3)ミセル化による方法を検討した。脂溶性抗がん剤を特定の混合比のリン脂質とともにミセル化し、ナノ粒子を作製することが出来た。この粒子表面にがん細胞由来細胞膜をコートすることにより、ナノ粒子を安定化できるか検討したが、やはり培地中希釈状態では、その構造が壊れることが示唆された。(4)特定のタンパク質に薬剤を担持する方法を検討した。その結果、抗がん剤担持タンパク質ナノ粒子を得ることができた。このナノ粒子は培地中希釈状態でも比較的安定であった。この粒子にがん細胞由来細胞膜をコートし、細胞選択的な取り込み効果の有無を検討したが、コントロールとして用いた正常細胞にも積極的に取り込まれ、細胞選択的な親和性を示さなかった。このことは、取得したがん細胞

由来細胞膜が自己親和性のみならず、あらゆる細胞への親和性を持っていたことに起因すると考えている。すなわち、取得したがん細胞由来細胞膜には、非特異的接着因子がある程度含まれており、選択的親和性効果を得るためには、がん細胞の培養条件を変えることによって、非特異的接着因子の影響を低減させた上で細胞膜を調製する必要があるとの結論に至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------