

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15334

研究課題名(和文)カプセル形状が細胞取込に及ぼす影響の解明および魚雷型カプセルを用いたがん治療

研究課題名(英文)Study of cellular uptake and cancer therapy with torpedo-shaped nanocapsule

研究代表者

上田 一樹 (Ueda, Motoki)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：10615040

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)：両親媒性ポリペプチドからなる長さの異なる複数の筒状集合体を調製し、材料のアスペクト比が細胞取込挙動に及ぼす影響を調査した。その結果、80 nmの直径、200 nmの長さの集合体が最も素早い細胞内取込を示し、その理由がクラスリン介在性エンドサイトーシスに適したサイズであることを明らかにした。この筒状集合体に抗がん剤を内包し、筒の口を別のシート状集合体で蓋をすることでカプセル化し、胆がんマウスに投与した結果、腫瘍集積および抗腫瘍成長抑制効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、無機粒子などを用いてその形状およびアスペクト比が及ぼす効果について報告されてきたが、今回初めて中空材料においてアスペクト比の制御および薬剤内包に成功し、実際に球状材料などに比べて素早い細胞内取込を示すことを明らかにし、DDSキャリアとしての有用性を示した。本研究はDDS分野において材料形状がもたらす機能の重要性を示すものであり、「形状・アスペクト比」が、これまでに確立されてきた「サイズ」「表面電荷」「表面修飾」に続く薬剤輸送キャリアの設計指針の一つとなることを決定する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Multiple tubular assemblies with the same diameter and different lengths were prepared from amphipathic polypeptide and were used to study the effect of the aspect ratio of the material on cellular uptake behavior. The results showed that tubular assembly with a diameter of 80 nm and a length of 200 nm showed the fastest cellular uptake, due to its suitable size for the clathrin-mediated endocytosis pathway. After an anticancer drug was encapsulated in this tubular assembly, the mouths of the tube were sealed with another sheet-like peptide assembly. This drug-loaded assembly was administered to cancer-bearing mice. As a result, the tumor accumulation and the therapeutic effect of the drug-loaded assembly were confirmed.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ペプチド集合体 アスペクト比 ドラッグデリバリー ソフトマター がん治療 両親媒性ポリペプチド 細胞内取込 エンドサイトーシス

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1981年以來、がんは日本の死亡原因の1位であり、世界においても微生物感染症、心疾患と並び疾患による死亡原因の上位にあがっている。そのためがん治療に向けた多くの研究が世界的に行われている。がん治療法としては従来の、外科手術、放射線治療、化学療法(抗がん剤)に加え、免疫療法(がんワクチン)、中性子線療法、温熱療法などが近年注目されている。外科手術を除いたこれらに共通する点は、薬剤やプローブや無機粒子のようなキー(鍵)となる分子・物質を生体内へ導入、腫瘍部位へ輸送することで治療可能になるという点である。そのため、がん治療の研究では、これらの分子を安全に安定に輸送するためのキャリア開発が盛んに行われている。特に、生体適合性があり毒性が低いポリマー材料、金属粒子、分子集合体、天然のカプシドなどを用いた研究は数多く、様々な材料がキャリアとして設計され報告されている。

これらのキャリア設計において重要な性質が①血中滞留と②腫瘍集積である。これまで様々な報告からポリエチレングリコール(PEG)鎖などの親水性ブラシでキャリア表面を覆うことで免疫系を回避し高い血中滞留性が得られることが報告されており、すでに解決した問題となっている。一方で、腫瘍集積には未だ課題が残っている。腫瘍組織への集積としてはリガンド修飾によるアクティブターゲティングやEPR効果の利用によるパッシブターゲティングなどがあり、一定の解決が見られているが、腫瘍組織から腫瘍細胞への侵入については未解明な部分も多く「細胞内への薬剤輸送」が注目されている。

細胞内輸送における主要な手法はエンドサイトーシスを利用する方法である。エンドサイトーシスとは細胞表面に接着した物質を細胞が能動的に細胞内部へと取り込む食作用のことであるが、その取込速度や取込量が物質の形状に依存することが2000年代後半より報告されて始めている[1]。特に金ナノロッド[2]、タバコモザイクウイルス[3]、ポリスチレン粒子[4]およびシリカ粒子[5]を用いた研究から高いアスペクト比(長さ÷直径)を有することが取込速度を加速することが報告されている。つまり棒状の物質の方が球状より速く細胞に取り込まれるということである。しかしながらこれらの研究はあくまで基礎研究であり、キャリアとエンドサイトーシスといった医療応用に直結するものではなかった。つまり薬剤担持能を持たない物質で行われた研究であった。これは一重にナノ構造の形状制御が困難だからである。

これまでに研究代表者は中空のロッド状集合体「魚雷型ナノカプセル」の開発に成功している。これは両親媒性分子の自己集合により形成された材料である。魚雷型ナノカプセルの構成はいたってシンプルであり、筒状と2つの半球状の分子集合体で構成されている。両親媒性ポリペプチドで形成される筒状集合体の開口部を異なる両親媒性ポリペプチドからなるシート状集合体で閉じることで魚雷型ナノカプセルを得ることが可能である。この魚雷型ナノカプセルは内水相を有しているため親水性薬物の内包が可能であると予想される。

2. 研究の目的

本研究課題では、これらの魚雷型ナノカプセルをはじめとした高いアスペクト比を有する材料を用いて、アスペクト比が細胞内取込挙動に及ぼす影響の調査(テーマA)、および、魚雷型ナノカプセルへの薬剤内包と*in vivo*における腫瘍細胞内取込・抗腫瘍成長抑制効果の評価(テーマB)を目的としている。

3. 研究の方法

(テーマA)

- 両親媒性ポリペプチドから筒状集合体を調製し、加熱により筒状集合体を成長・伸長させ、加熱時間の最適かによって長さを制御して、異なる長さを有する複数の筒状集合体を調製した。長さは透過型電子顕微鏡による観察にて評価した。
- 異なる長さを有する複数の筒状集合体を用いて細胞取込実験を行い、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーから細胞取込速度と集合体の長さの関係を調査し、細胞に素早く取り込まれる材料の長さ(アスペクト比)を明らかにした。
- 特定の細胞内取込機構の阻害剤を用いて細胞取込実験から、筒状集合体の取込メカニズムを解明し、アスペクト比が及ぼす影響についてより詳細に議論した。

(テーマB)

- ◆ テーマAにて得られた素早く細胞内に取り込まれる長さの筒状集合体と、異なる両親媒性ポリペプチドから調製されるシート状集合体を、共集合化させることによって魚雷型ナノカプセルを調製し、透過型電子顕微鏡により評価した。
- ◆ 魚雷型ナノカプセルを用いて抗がん剤ドキシソルビシンおよび水溶性蛍光剤の内包評価・漏出評価を分光学的手法にて行った。
- ◆ 魚雷型ナノカプセルにドキシソルビシンを内包し、近赤外蛍光プローブによる標識を行った後、胆がんマウスに投与し、近赤外蛍光イメージングによって腫瘍集積を確認、投与後の腫瘍サイズの変化から成長抑制効果の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 魚雷型ナノカプセルの開発および、それを用いた細胞取込実験を行い、カプセルのアスペクト比と取込速度の関係の調査 (テーマ A)

2種の両親媒性ポリペプチド glycolic acid-poly(Sar)_n-b(L-Leu-Aib)₆-OMe (SL12) および glycolic acid-poly(Sar)_n-b(L-Leu-Aib)₈-OMe (SL16) を合成した (Sar はサルコシン、Leu はロイシン、Aib はアミノイソ酪酸)。魚雷型カプセルは、両親媒性ポリペプチド SL12 からなる筒状集合体の開口部に、両親媒性ポリペプチド SL16 を自己集合化させ、球状集合体を形成させることで中空のロッド状集合体として得られた。具体的には、SL12 を水中に分散させ、90 度 1 時間加熱することで直径 80 nm 長さ 200 nm の筒状集合体を得た。加熱時間を 3 時間、5 時間と長くすることで、直径 80 nm はそのまま長さのみ 300、500 nm と伸長することを確認した。この筒状集合体分散液に SL16 を分散させることで、SL16 は筒状集合体の開口部に相互作用、自己集合化し、筒の口を半球でキャップした形状の魚雷型カプセルが得られた。長さの異なる筒状集合体を用いることで長さの異なる魚雷型カプセルが得られた。SL16 のみを水中に分散させると、直径 80 nm の球状集合体であった。

長さの異なる筒状集合体および球状集合体を用いて細胞取込実験を行った。直径はいずれも 80 nm で、長さは 100、200、300、500 nm の筒状集合体を使用した。HeLa 細胞に対して、1 時間後の取込量を蛍光強度から評価したところ、筒状集合体はいずれも球状集合体より多く細胞に取り込まれた。特に 200 nm が最大の取込量であり、最適なアスペクト比が存在することがわかった (図 1)。阻害剤を用いた実験から細胞に取り込まれる機構はいずれの集合体もクラスリン介在性エンドサイトーシスであった。この取込機構は 200 nm 程度以下の物質を取り込むと知られているため、200 nm が細胞内輸送に最適なサイズであることと一致した。

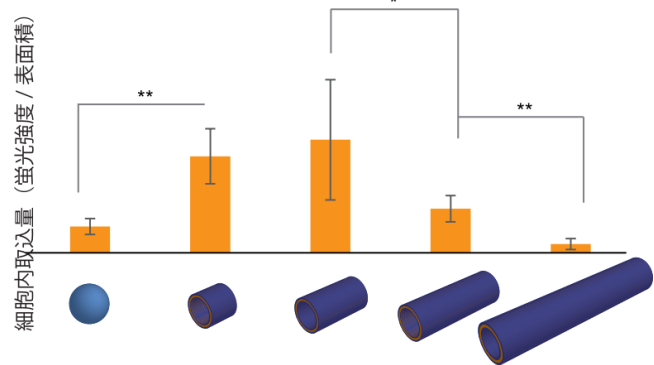


図 1. HeLa 細胞に対する各形状の細胞内取込量

(2) 魚雷型ナノカプセルを用いて、抗がん剤ドキシソルビシンや水溶性蛍光剤の内包能・徐放能の評価、担がんマウスを用いた動物実験による抗腫瘍成長抑制効果の評価 (テーマ B)

魚雷型カプセルは、両親媒性ポリペプチド SL12 からなる筒状集合体の開口部に、両親媒性ポリペプチド SL16 を自己集合化させ、球状集合体を形成させることで中空のロッド状集合体として得られた (図 2)。この時カプセル化収率はおよそ 40・80%とばらつきがあった。この魚雷型ナノカプセル調製時の水系溶媒に、水溶性抗がん剤 (ドキシソルビシンおよびシスプラチン) あるいは水溶性蛍光剤 (ヨウ化プロピジウム) を溶解させておく手法で、内包させることに成功した。また、生体内に存在する分解酵素プロテアーゼ K を加えるとペプチドで形成されているため魚雷型カプセル自体が破壊され、内包されていた蛍光剤が放出されることを確認した。

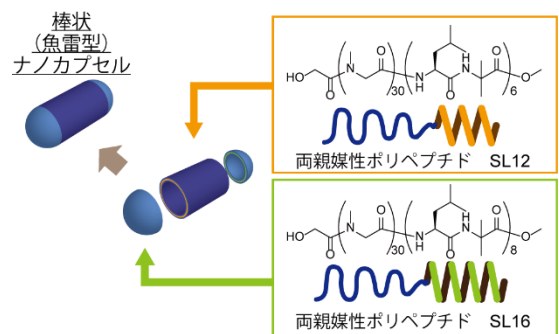


図 2. 魚雷型ナノカプセルの概略図

次に、動物実験により直接 DDS としての評価を行った。市販の抗がん剤であるシスプラチンを内包した 200、300、500 nm の魚雷型ナノカプセルと 100 nm の球状ナノカプセルを担がんマウスに尾部静脈より注射にて投与したところ、抗がん剤のみ、抗がん剤内包球状カプセルの場合と比較して、魚雷型ナノカプセルにおいて有意に強い抗腫瘍成長抑制効果がみられた。各カプセルに近赤外プローブを標識し、投与後の近赤外イメージングを行うことでカプセル材料の体内動態を評価した。その結果、魚雷型ナノカプセルが球状ナノカプセルと比較して速やかに腫瘍部位へ集積する性質を持つことが明らかとなった。

(1)と(2)の結果を論文 (ACS Nano, 2019) にまとめた[6]。

● 魚雷型カプセルの改良 (追加テーマ)

(1)と(2)の成果で研究開始時の研究目的は達成された。これらの研究で得られた知見を元に、魚雷型ナノカプセルを用いたがん治療という主目的を達成に向けて、魚雷型ナノカプセルの改良について以下の研究(3)~(6)を行った。

- (3) 市販のステルスリポソームを比較に用いた体内動態評価
- (4) 肝臓集積を軽減するため高密度ポリサルコシンプラシで表面修飾された魚雷型ナノカプセルの開発
- (5) 魚雷型ナノカプセルの調製効率の向上の研究
- (6) 魚体型ナノカプセルのアスペクト比の精密制御を目指した筒状集合体の直径制御の研究

(3) 市販のステルスリポソームを比較に用いた体内動態評価

近赤外蛍光プローブで標識した魚雷型ナノカプセル、球状ナノカプセル、市販のステルスリポソームを胆がんマウスに投与し、近赤外蛍光イメージングによって経時的に体内動態を評価した。結果、球状ナノカプセルに比べて魚雷型ナノカプセルは、24~48時間にかけてヒト乳がん細胞 (MDA-MB-453)、マウス乳がん細胞 (4T1)、マウスリンパ腫細胞 (EL4) において高い腫瘍集積性が確認された。一方で、ステルスリポソームとの比較から、肝臓集積が比較的多いことも明らかとなった。

(4) 肝臓集積を軽減するため高密度ポリサルコシンプラシで表面修飾された魚雷型ナノカプセルの開発

魚雷型ナノカプセルの肝臓集積を抑制するため、表面ポリサルコシン密度を向上させた魚雷型ナノカプセルの開発を行った。疎水部の両端に親水鎖が結合したボラ型の両親媒性ポリペプチド glycolic acid-poly(Sar)_n-b-(L-Leu-Aib)₆-poly(Sar)_n-glycolic acid (SL12S)の合成を行った。SL12 と SL12S の混合比を変えることで理論的に表面ポリサルコシンの密度を制御することが可能である。SL12:SL12S = 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10 の構成比にて筒状集合体を調製した。透過型電子顕微鏡により直径および長さを確認した。SL12S の比率が増加するほど、200 nm の筒状集合体を得るための加熱処理時間が増加した。これは SL12S により表面ポリサルコシン密度が増加したことで筒状集合体が安定化し、伸長が緩やかになったことによるものと考えられる。

(5) 魚雷型ナノカプセルの調製効率の向上の研究

(2)において魚雷型ナノカプセルの調製効率は 40-80%程度であったため、調製効率の改善を行った。従来 SL12、SL16 の組み合わせで魚雷型カプセルを調製していたが、SL16 単一系集合体の形成が、SL12 と SL16 複合体による魚雷型カプセルの調製効率が低下させていた。そこで、臨界ミセル化濃度が高く単一系集合体を形成しづらい N 端フリーの両親媒性ポリペプチド poly(Sar)_n-b-(L-Leu-Aib)₆-OMe (iSL12)を合成し、SL12 と組み合わせで魚雷型ナノカプセルの調製を行った。SL12 : iSL12 = 2:1 のとき 95%以上の収率での魚雷型ナノカプセル調製に成功した (図 3)。

本成果を論文 (*Biomacromolecules*, 2022) にまとめた [7]。

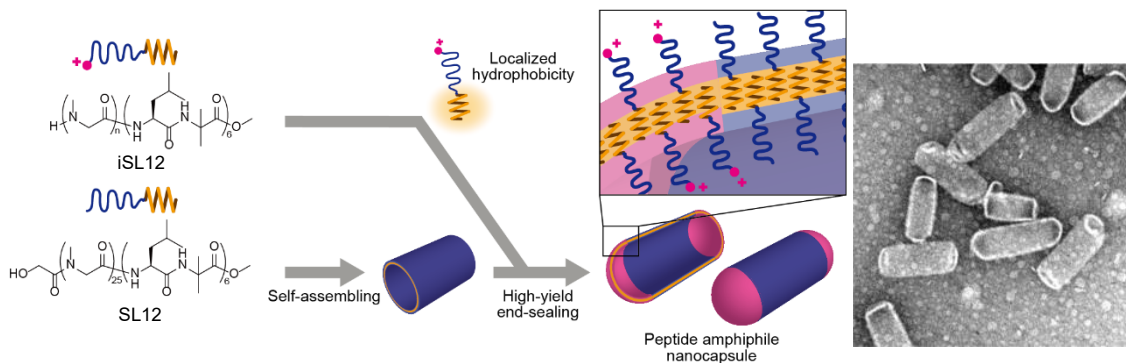


図 3. SL12 と iSL12 による魚雷型ナノカプセルの概略図と透過型電子顕微鏡像

(6) 魚体型ナノカプセルのアスペクト比の精密制御を目指した筒状集合体の直径制御の研究

魚雷型ナノカプセルの長さの制御は 100~1000 nm と成功していた一方で、直径は 80 nm のものに限定されていた。そこで 2 つの手法にて筒状集合体の直径制御を検討した。一つは、両親媒性ポリペプチドの疎水部のアミノ酸配列がペプチド膜の曲率を決定していると予想し、疎水鎖長を長くすることで物理的に曲率低下を目指した。具体的には、長い疎水部を有する両親媒性ポリペプチド glycolic acid-poly(Sar)_n-b-(L-Ala-Aib)-(L-Leu-Aib)₆-(L-Ala-Aib)-OMe (SA2L12A2)を合成し、SA2L12A2 から形成される集合体を透過型電子顕微鏡にて観察した。結果、直径 120 nm を有する筒状集合体の調製に成功した。

本成果を論文 (*Int. J. Mol. Sci.*, 2021) にまとめた[8]。

もう一つは、アルコールをペプチド膜に挿入することで、分子配向を乱し、ペプチド膜の曲率を低下させるという戦略で直径制御を目指した。実際、メタノール、エタノール、プロパノールと

水の混合溶液中で筒状集合体を調製することで、アルコールの分子サイズに応じてそれぞれ、90, 100, 110 nm 径の筒状集合体を得られることを明らかにした。
本成果を論文 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2020) にまとめた[9]。

<引用文献>

- [1] E. Blanco et al., *Nat. Biotechnol.* **2015**, 23, 941–951, S. Shukla et al., *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, 4, 874–882, Y. Geng et al., *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 249–255.
- [2] C. Kinnear et al., *Nanoscale.* **2016**, 8, 16416–16426, H. Wang et al., *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* **2016**, 12, 439–448 (2016), Y. Qiu et al., *Biomaterials.* **2010**, 31, 7606–7619.
- [3] X. Liu et al., *Sci. Rep.* **2016**, 6, 24567–24577, L. A. Dykman, et al., *Chem. Rev.* **2014**, 114, 1258–1288.
- [4] S. Barua et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110, 3270–3275.
- [5] H. Meng et al., *ACS Nano.* **2011**, 5, 4434–4447, X. Huang et al., *Biomaterials*, **2010**, 31, 438–448.
- [6] M. Ueda et al., *ACS Nano*, **2019**, 13 (1), 305–312.
- [7] K. Son et al., *Biomacromolecules*, **2022**, accepted (DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00153)
- [8] M. A. Abosheasha et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22(21), 12075.
- [9] N. Avanashiappan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 50, 20994–21003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M. Ueda, S.Y. Seo, B.G. Nair, S. Muller, E. Takahashi, T. Arai, T. Iyoda, S. Fujii, S. Tsuneda, Y. Ito	4. 巻 13
2. 論文標題 End-sealed high aspect ratio hollow nanotube encapsulating anticancer drug - Torpedo-shaped peptidic nanocapsule	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 305-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnano.8b06189	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 該当する

1. 著者名 Abosheasha Mohammed A., Itagaki Toru, Ito Yoshihiro, Ueda Motoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Tubular Assembly Formation Induced by Leucine Alignment along the Hydrophobic Helix of Amphiphilic Polypeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12075 ~ 12075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222112075	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 該当する

1. 著者名 Nandakumar Avانشiappan, Ito Yoshihiro, Ueda Motoki	4. 巻 142
2. 論文標題 Solvent Effects on the Self-Assembly of an Amphiphilic Polypeptide Incorporating α -Helical Hydrophobic Blocks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 20994 ~ 21003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c03425	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 M. Ueda, M. Abosheasha, T. Itagaki, Y. Ito
2. 発表標題 Nanotube formation induced by 12-residue helix of repeated Leu-Aib sequence
3. 学会等名 ACS National Meeting Spring 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Nandakumar, Y. Ito, M. Ueda
2. 発表標題 Solvent Effects on Self-Assembly of Amphiphilic Polypeptide Having α -Helical Hydrophobic Block
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Abosheasha, T. Itagaki, Y. Ito, M. Ueda
2. 発表標題 Nanotube formation of amphiphilic polypeptide having hydrophobic helix composed of repeated Leu-Aib sequence
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nandakumar, Y. Ito, M. Ueda
2. 発表標題 Peptide assembly as a model system in which co-solvent influences its morphology
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Nandakumar, Y. Ito, M. Ueda
2. 発表標題 Controlled Assembly of Amphiphilic Helical Polypeptide in Kosmotropic Mixtures
3. 学会等名 CEMSupra 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Nandakumar, M. Ueda, Y. Ito
2. 発表標題 Solvation-Dependent Nanostructure Formation of Amphiphilic Block Polypeptide
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoki Ueda
2. 発表標題 Nanotube Formation Induced by 12-residue helix of repeated Leu-Aib sequence
3. 学会等名 ACS national meeting spring 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Avanasshiappan Nandakumar
2. 発表標題 Solvent effects on peptide assembly process to understand the behavior of biological water
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motoki Ueda
2. 発表標題 Solvent effects on the self-assembly of an amphiphilic polypeptide having α -helical hydrophobic block
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motoki Ueda
2. 発表標題 Nanotube Formation of Amphiphilic Polypeptide Having Hydrophobic Helix Composed of Repeated Leu-Aib Sequence
3. 学会等名 第58回日本ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mohammed A. Abosheasha
2. 発表標題 Shape Control of Self-Assembly by Amphiphilic Polypeptides Having Various Amino Acids on Terminal of Hydrophobic Helix
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motoki Ueda
2. 発表標題 Peptide assembly as a model system in which co-solvent influences its morphology
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Ueda, Y. Ito
2. 発表標題 Morphological effect for cellular uptake of torpedo-shaped peptidic nanocapsule
3. 学会等名 ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Ueda, Y. Ito
2. 発表標題 Morphological Effect of Rod-Shaped Nanocarrier for Intercellular Delivery
3. 学会等名 アジアバイオマテリアル学会 (国際学会)
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

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