

平成22年 5月16日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790140

研究課題名 (和文) 膜透過性ペプチド修飾抗がん剤封入脂質微粒子製剤の開発

研究課題名 (英文) Preparation of lipid nanoparticles modified with cell penetrating peptide for antitumor drug delivery

研究代表者

川野 久美 (KAWANO KUMI)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20366834

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、抗がん剤封入微粒子の抗腫瘍効果を高める目的で、膜透過性ペプチド修飾微粒子や正電荷微粒子の調製を行い、腫瘍集積性や抗腫瘍効果の評価を行った。膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンは正電荷を有し、同様に正電荷を有する微粒子では腫瘍新生血管への薬物集積性が向上し、抗腫瘍効果が亢進した。抗がん剤を効率よく目的部位に送達し集積させることによって、効果が向上することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)： To improve the chemotherapeutic agents accumulation in tumor tissue, lipid nanoparticles was modified with oligoarginine lipid or cationic lipid. These particles showing cationic charge were accumulated in tumor tissue and tumor vasculature, and enhanced the antitumor activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	330,000	2,830,000

研究分野： 薬剤学

科研費の分科・細目： 薬学・医療系薬学

キーワード： 抗がん剤、脂質微粒子、リポソーム、正電荷、腫瘍新生血管、ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤の多くは細胞障害性を有し、治療に有効な血中濃度範囲が狭いために、有害作用を生じることが多い。そのため、腫瘍部位に選択的・優先的に抗がん剤を到達させることが望まれている。その手法の一つとして、

抗がん剤を微粒子製剤化することがあげられる。これは、腫瘍組織に特徴的な血管構造を利用する方法で、Enhanced Permeability and Retention effect (EPR効果)と呼ばれている。すなわち、腫瘍組織に新生する血管は正常組織の血管に比べ血管透過性が亢進し

ているため、微粒子表面をポリエチレングリコール(PEG)のような親水性高分子で保護し血中を長時間滞留する微粒子は、腫瘍組織に漏出しやすく、集積しやすい。

脂質微粒子であるリポソームは、リン脂質二重膜からなるナノサイズの小胞であり、種々の薬物を封入できることから薬物担体として利用されている。また、腫瘍選択性や機能性を付与するために、種々のリガンドや抗体等で修飾することも容易である。

本研究では、抗がん剤封入脂質微粒子を効率的に腫瘍組織やがん細胞内に送達することを目的とし、細胞膜透過性を有する塩基性ペプチドによる微粒子の修飾を検討することにした。近年、HIV-1 Tat ペプチドのような細胞膜透過性を有するペプチドが明らかになり、薬物送達への応用が試みられている。HIV-1 Tat ペプチドや、その塩基性アミノ酸に富むアミノ酸配列をモデルとしたオリゴアルギニンペプチドは、細胞膜透過性の低いタンパク質や核酸、さらには数百ナノメートルサイズの微粒子に結合することによって、それらを効率よく細胞内に送達することが可能である。また、正電荷を有する微粒子は、腫瘍新生血管に集積しやすいことが報告されており、正電荷を有するオリゴアルギニン修飾微粒子は、腫瘍への集積性と細胞内への浸透性を兼ねそなえた微粒子になり得る可能性が考えられる。

2. 研究の目的

抗がん剤封入微粒子製剤の効果をより高めるために、腫瘍への集積性を高め、抗がん剤の作用部位に薬物を効率よく送達させることを目的とする。そのため、オリゴアルギニン修飾微粒子や、オリゴアルギニンと同様に正電荷を有する微粒子による腫瘍集積性や腫瘍新生血管への効果を検討した。さらに腫瘍集積性を高める併用薬の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗がん剤封入微粒子の調製

抗がん剤として、カンプトテシン、ドキソルビシンおよびスニチニブを用いた。カンプトテシンは薄膜法で脂質膜内に保持させ、ドキソルビシンおよびスニチニブはクエン酸緩衝液 (300 mM、pH4.0) を用いた pH 勾配法により能動的に微粒子内に封入した。いずれの微粒子も超音波照射により 100-200nm の粒子径に調整した。

(2) オリゴアルギニン修飾微粒子の体内動態

膜透過性ペプチドとしてオリゴアルギニン (Arg10) を結合した脂質 (図1) を用い、脂質微粒子に修飾した。さらにローダミン脂

質を用いて蛍光標識を行い、マウス尾静脈内から投与し、臓器分布を蛍光顕微鏡で観察した。

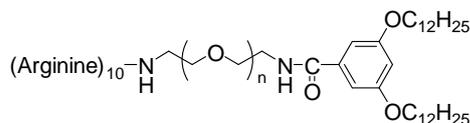


図1 オリゴアルギニン脂質の構造式

(2) 正電荷微粒子による抗腫瘍効果の評価
マウス結腸癌 colon26 担癌マウスを用いて抗腫瘍効果を評価した。腫瘍サイズが約 100mm³ より薬物投与を開始し、抗癌剤封入微粒子を尾静脈内投与後の腫瘍サイズ変化を評価した。

(3) Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) 法を用いた血管透過性の評価

血管透過性や腫瘍内の血漿体積といった血管の機能を評価するために DCE-MRI を行った。腫瘍の MRI を撮像しながら MRI 造影剤を投与し、腫瘍の画像強度変化を造影剤の濃度変化として求めた。これをコンパートメントモデルで解析することにより、腫瘍内血漿体積 (Vp) と血管透過性のパラメータである K^{trans} を算出した。

(4) Transforming growth factor β (TGF- β) 受容体阻害剤の併用による微粒子の腫瘍集積性に対する効果

TGF- β 受容体阻害剤は近年、腫瘍血管の周皮細胞を減少させて、微粒子製剤の血管透過性を高めることが報告されている。そこで TGF- β 受容体阻害剤 A-83-01 の微粒子集積性に対する効果を DCE-MRI 法により評価した。

4. 研究成果

(1) 各抗がん剤を封入した微粒子の調製を行った。カンプトテシンは疎水性の高い薬物であり、脂質微粒子の脂質膜内に保持させた。脂質：薬物=30:1 (重量比) の時、80-90% で封入された。ドキソルビシンの封入には一般的に用いられる pH 勾配法で 95% 以上が封入された。さらにスニチニブにおいてもクエン酸緩衝液を用いた pH 勾配法により、脂質：薬物=2:1 (重量比) において 90% 以上の高い封入率で微粒子に封入された。いずれも粒子径を 100-200nm に調整することで、血中滞留性を有する微粒子とした。

(2) オリゴアルギニン修飾微粒子の体内動態を検討するために、微粒子にローダミン脂

質で蛍光標識を行い、マウス尾静脈内より投与して体内分布を検討した。臓器の凍結切片を作成し蛍光顕微鏡で観察したところ、オリゴアルギニン未修飾の微粒子に比べ、肝臓や脾臓での集積性が顕著に増大した。これはオリゴアルギニン修飾した微粒子表面が生体の異物排除機構によって認識されやすく、結果として肝臓や脾臓に集積したと考えられた。よって腫瘍へ十分量の薬物を送達できない可能性が示唆され、さらに生体内動態の制御法の検討が必要であると考えられた。

(3) 正電荷リポソームの抗腫瘍効果

オリゴアルギニンと同様に正電荷を有する微粒子を用いて、抗がん剤の抗腫瘍効果を評価した。カンプトテシンは、トポイソメラーゼ I を阻害する抗がん薬であり、また血管新生阻害効果を有するとの報告もあり、正電荷リポソームに封入することで抗腫瘍効果が高められると考えられる。そこで、正電荷脂質である DOTAP を含有する微粒子にカンプトテシンを封入した。これを、マウス結腸癌 colon26 担癌マウスに投与して抗腫瘍効果を評価したところ、腫瘍成長を抑制することが明らかになった (図 2)。

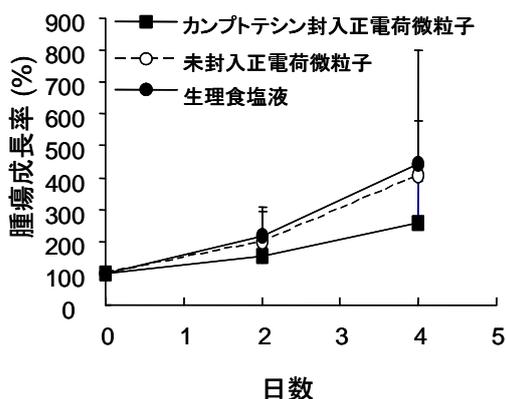


図 2 カンプトテシン封入微粒子の colon26 担癌マウスに対する抗腫瘍効果

この微粒子の腫瘍新生血管に対する影響を調べるために、DCE-MRI 法で腫瘍血管の透過性を評価した。しかし、透過性には差は見られなかった。そこで、腫瘍への集積量を確認したところ、微粒子の分布に比べて薬物の分布が顕著に減少していた。すなわち、微粒子に薬物が保持されにくく、十分量を腫瘍に集積させることが困難であったと考えられた。

そこで、腫瘍へ十分量の薬物を到達させるために、薬物を微粒子内に内封することにした。抗がん剤スニチニブは、血管内皮成長因子受容体などのチロシンキナーゼ阻害活性を有し、腫瘍血管に集積させることで抗腫瘍効果をより増強できると考えられる。そこで、

正電荷微粒子にスニチニブを内封した。colon26 担癌マウスで抗腫瘍効果を評価したところ、中性微粒子に比べ正電荷微粒子において腫瘍増殖を抑制した (図 3)。

微粒子にローダミン脂質を用いて蛍光標識を行い、腫瘍内の分布を確認したところ、中性リポソームに比べて正電荷微粒子において高い集積性が認められた。

以上の結果より、正電荷微粒子に抗がん剤を安定に保持させ、腫瘍部位へ送達することによって、薬物の効果を亢進できることが示唆された。

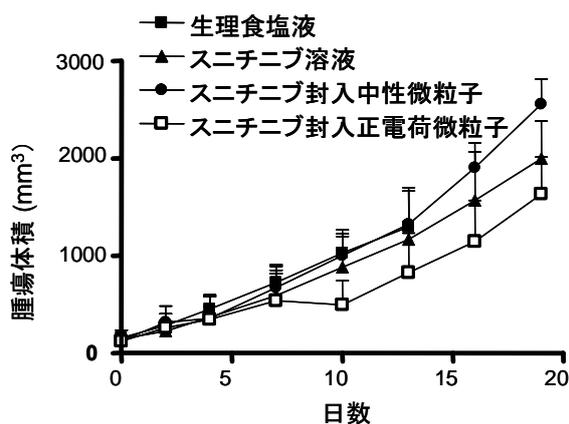


図 3 スニチニブ封入微粒子の colon26 担癌マウスに対する抗腫瘍効果

(4) 静脈内投与した微粒子は血流により腫瘍へ送達されるため、血管の乏しい部位や血流の不十分な腫瘍へ到達させるには限界がある。そこで微粒子の腫瘍への集積性を高めるために、腫瘍血管構造を変える併用薬を用いて集積量を評価した。抗がん剤ドキシソルピシンを封入した微粒子を用い、TGF- β 受容体阻害剤である A-83-01 を低用量 (0.5mg/kg) で投与し、腫瘍集積性を評価した。A-83-01 を併用することにより、投与 24 時間後の微粒子の腫瘍集積量は約 1.7 倍増加することが明らかになった。(図 4)。

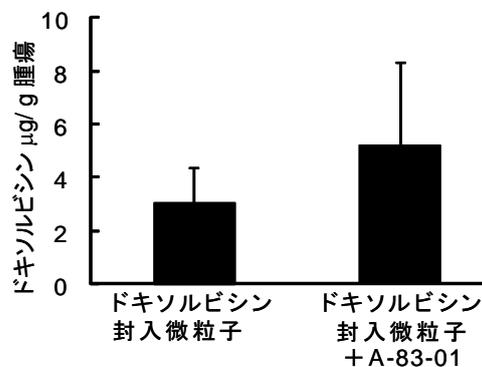


図 4 微粒子投与 24 時間後の腫瘍集積性

そこで、A-83-01 の腫瘍血管に対する効果を DCE-MRI 法により評価した。A-83-01 処置により V_p や K^{trans} が増大し、血管体積の増加や血管透過性の亢進が明らかとなった (図 5)。DCE-MRI 法で通常用いられる低分子の造影剤に比べ、微粒子化した MRI 造影剤を用いて評価するとより顕著な V_p や K^{trans} の変化が観察された。これらの結果より、A-83-01 は微粒子の血管透過性に対してより大きく影響すると考えられる。

微粒子造影剤を用いた DCE-MRI 法により、微粒子の血管透過性や腫瘍血管に対する作用を評価することが可能になった。これらの知見を利用することで、微粒子の腫瘍集積性を高め、抗腫瘍効果を亢進させる治療法の開発が可能であると考えられる。

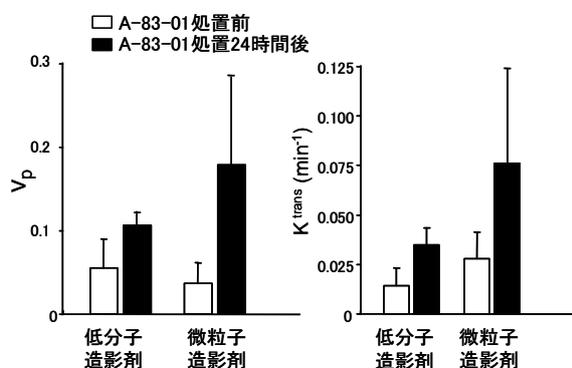


図 5 colon26 担癌マウスにおける A-83-01 処置による腫瘍内血漿体積 (V_p) および血管透過性 (K^{trans}) の変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *British Journal of Cancer*, 査読有り、101(11), 2009, 1884-1890.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川野 久美 (KAWANO KUMI)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20366834

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：