

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16337

研究課題名(和文) がん治療への医療実用化を目指した環状ペプチド修飾リポソーム製剤の開発

研究課題名(英文) Development of clinically available cyclic peptide-modified liposomes for cancer treatment

研究代表者

淵上 由貴 (Fuchigami, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・客員研究員

研究者番号：60736403

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、がん治療への医療実用化を目指した環状RGDペプチド修飾PEGリポソーム製剤の開発である。本目的を達成するため、クリック反応を利用して環状ペプチドを結合することができる新規アダプターペプチド脂質の設計と合成を行った。ここでは、がん標的指向化が可能な環状RGDペプチドを取り上げ、環状RGDペプチド修飾脂質を設計・合成し、環状RGDペプチド修飾リポソームを開発した。次に、環状RGDペプチド修飾リポソームの機能評価を行い、マウス大腸癌細胞株colon26に対して、高い細胞結合性を有していることを確認した。また、抗がん剤、ドキシソルピシン封入製剤が高い抗腫瘍効果を有するを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環状ペプチドは直鎖ペプチドに比べて、生体での安定性が高く、実用性がある。一方で、リポソームの認識として用いる際には、脂質の先端に結合させるのが難しい。本研究では、脂質の末端にアルキル基を導入した新規アダプター脂質を設計・合成することに成功した。一方で、クリック反応の反応点であるアジド基を環状ペプチドの末端に導入した。本システムは、環状ペプチドの末端にアジド基を結合させることで、様々な環状ペプチド修飾脂質誘導体の合成を可能にする汎用性の高い方法である。本システムの確立により、様々な環状ペプチドを認識素子とした様々なリポソームや脂質ナノ粒子が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a cyclic RGD peptide-modified PEG liposome formulation for medical realization for cancer therapy. To achieve this objective, we designed and synthesized novel adaptor peptide lipids that can bind cyclic peptides using a click reaction. Here, we focused on cyclic RGD peptides that can be directed to cancer targets, designed and synthesized cyclic RGD peptide-modified lipids, and prepared cyclic RGD peptide-modified liposomes. The cyclic RGD peptide-modified liposomes were then functionally evaluated, and their high cell-binding ability to the mouse colon cancer cell line colon26 was confirmed. We also found that the anti-cancer drug, doxorubicin encapsulated formulation had high anti-tumor effect.

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

## 1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子型のドラッグデリバリーシステム (DDS) は、がん治療において次世代の医薬基盤技術として大きな注目を集めており、その中でリポソーム製剤は、ドキシルをはじめ唯一臨床現場で実用化されている。一方、実用化されているリポソーム製剤は、がん組織の血管透過性と滞留性亢進効果 (EPR 効果) による受動的ターゲティングにとどまっており、標的指向性リガンドを導入した能動的ターゲティングに基づくリポソームの実用化には至っていない。標的指向性リポソームを達成するには、i) 標的臓器・組織への効率的な送達、ii) 標的細胞による特異的な取り込み、iii) 標的オルガネラへの移行、さらに実用化には品質・製剤法を考慮する必要があり、その実現には複雑かつ精密な技術を要する。

ポリエチレングリコール (PEG) は毒性が少なく、リポソーム表面を PEG で修飾することにより水和層 (PEG 層) が形成されるため、リポソームの血中での滞留性は向上することからリポソーム開発におけるゴールドスタンダードとして汎用されている。これまで、低分子化合物、ペプチド、抗体などのリガンドを PEG の先端に導入した能動的ターゲティングが試みられてきたが、リガンドが PEG 層に埋もれてしまいリガンド提示能が低下すること、PEG は幅広い分子量分布を示すためリガンド提示能がばらつくこと、は大きな問題であり、機能面および品質面において克服すべき課題となっている。そこで、本課題の解決のために、リポソームを含むナノ DDS のリガンド修飾法として高機能・高品質 (High Functionality and Quality) 脂質 (HFQ 脂質) の開発に取り組んでいる。非ヘリックス構造を形成するセリンとグリシンの繰り返しペプチド (SG)<sub>n</sub> スペースを計算科学的手法により構築し、リポソーム表面の PEG 層を超える最小限の長さ (3.5 nm 以上) となるように設計した<sup>1)</sup>。この非常にシンプルな方法により、リガンドは PEG 層に埋もれず、PEG 修飾 DDS キャリア上に高効率に提示することが可能であり、これまでに多くの固形がんが発現するインテグリン  $\alpha\beta_3$  を標的とした GRGDS ペプチド修飾 HFQ 脂質修飾リポソームを開発し *in vitro* でその有用性を実証した<sup>2)</sup>。一方、*in vivo* においては、腫瘍血管への局在が認められたものの、代謝安定性、標的指向性に問題があり薬物内封キャリアとしては不十分であることが判明した。

そこで、申請者らは、インテグリン  $\alpha\beta_3$  を標的とする代謝安定性の高い RGD モチーフの導入や RGD ダイマーリガンドを修飾した HFQ 脂質を構築することで、*in vivo* で高いがん組織への標的指向性を示す環状 RGD 脂質修飾リポソームを開発できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vivo* での高いがん標的指向性を有するインテグリン  $\alpha\beta_3$  標的 HFQ 脂質修飾リポソームの開発、実用化に向けたインテグリン  $\alpha\beta_3$  標的 HFQ 脂質修飾リポソームの製造法および品質確保を達成し、がん治療において有効な環状 RGD ペプチド修飾リポソーム製剤を開発することである。そのために以下の研究を実施した<sup>3)</sup>。まず水に高分散性を示し、環状ペプチド末端に結合させたアジド基の部分と結合できるアルキル基で修飾した HFQ 脂質の合成を行った。次に、末端にアジド基を導入した環状 RGD ペプチドとクリック反応により、HFQ 脂質に結合させた環状 RGD ペプチド修飾脂質を得た。また、新規環状 RGD ペプチド修飾リポソームを調製し、がん細胞への結合・細胞取り込み特性、また、抗がん剤であるドキシソルピシン封入製剤を用いた際の抗腫瘍効果を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 環状 RGD 修飾 HFQ 脂質の合成：ペプチド固相合成法により、アジド基は Fmoc-Lys(N2)-OH を、プロパルギル基は Fmoc-Gly(propargyl)-OH を導入することでアジド標識環状 RGD ペプチド (cRGDfK(-azide)) およびアルキン標識アダプター脂質 (propargyl)glycine-(K)<sub>n</sub>-SG 脂質 (n = 0, 1, 2) を合成した。合成したペプチドおよび脂質をそれぞれ水または DMSO に溶解させ、硫酸銅・五水和物とアスコルビン酸ナトリウム存在下で反応させることで環状 RGD 修飾 HFQ 脂質である cRGD-KK-SG 脂質を合成した。反応効率は、逆相カラム高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によりピーク面積から算出し、生成物の質量は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いて確認した。

(2) 各種リポソームの調製と物理化学的特性の評価：PEG リポソームは、DSPC・コレステロール・mPEG<sub>2,000</sub>-DSPE・Cy5.5-PEG<sub>2,000</sub>-DSPE (60:35:4.5:0.5, mol ratio) を脂質組成とした。調製法は脂質薄膜法を採用し、水和溶媒として滅菌水を選択した。PEG リポソームと cRGD-KK-SG 脂質を滅菌水中で混合・バイオシェーカーを用いた振盪により (150 rpm/min、1 時間、60 ) cRGD-KK-SG/PEG リポソームを調製した。各種リポソームは、10×PBS (-) の添加により最終的に 1×PBS (-) に分散させた。

ドキシソルピシン封入 PEG リポソーム (Dox-PEG リポソーム) は、リモートローディング法を用いて調製した。DSPC・コレステロール・mPEG<sub>2,000</sub>-DSPE (60:35:5, mol ratio) からなるリポソームを、250 mM 硫酸アンモニウムを分散媒として調製した。PD-10 カラムを用いて外水層を 1×PBS (-) に置換した後、ドキシソルピシンと PEG リポソームを薬物と脂質の比率 1/12.5 (w/w) で

60、1時間インキュベートした。Dox-PEG リポソームと未封入のドキソルビシンを分離する際、PD-10 カラム処理時に外水層を 5% グルコースに置換した。cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは、Dox-PEG リポソームと cRGD-KK-SG 脂質を 5% グルコース中で混合しバイオシェーカーで振盪させ (150 rpm/min、1 時間、60 ) 調製した。最後に漏出したドキソルビシンを除去するために PD-10 カラムを通し、外水層を 1×PBS (-) に再度置換した。ドキソルビシン封入率の測定は、蛍光分光光度計を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 590 nm でドキソルビシンの蛍光を測定した。ドキソルビシン封入率は、以下の式で算出した。

ドキソルビシン封入率 (%) = (最終 PD-10 カラム処理後の Dox-PEG リポソーム) / (最初の PD-10 カラム処理前の Dox-PEG リポソーム) × 100

物理化学的特性は、Zetasizer Nano ZS システムを使用して測定した。

(3) 細胞結合性、細胞内局在、細胞取り込み機構の評価：Colon-26 細胞は 24 ウェルプレートまたは 35 mm ガラスベースディッシュに播種した ( $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)。24 時間インキュベートした後、無血清培地中で各種リポソームとインキュベートし、評価をおこなった。細胞結合性評価では、フローサイトメトリーを用いて平均蛍光強度を算出した。細胞内局在評価では、リソソームマーカーである Lysotracker Red DND-99 および DAPI による核染色を施した後に、LSM800 共焦点顕微鏡を用いて撮像した。細胞内取り込みにおけるエンドサイトーシス経路の解析については、阻害剤または 4 条件下で 30 分間前処理した細胞を用いて、cRGD-KK-SG/PEG リポソームと阻害剤存在下、または 4 条件下でさらに 30 分間インキュベートした。その後、フローサイトメトリーを用いて解析した。

(4) 細胞生存率の評価：Colon-26 細胞を 96 ウェルプレートで培養した ( $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)。血清培地中でドキソルビシンまたは Dox-PEG リポソーム存在下で 2 時間培養し、ドキソルビシン除去後に WST-8 アッセイを行った。

#### 4. 研究成果

(1) 合成の最適化：まず、CuAAC 反応に用いるアルキン標識アダプター脂質を設計した。ペプチド脂質の配列は、疎水性アンカー、親水性の KSS-(SG)<sub>5</sub> スペーサー、オリゴリジン部位、(プロパルギル)グリシンという 4 部位で構成されている。水分散性を効果的に高めるために、SG 配列と (プロパルギル)グリシン部分の間にオリゴリジンを適宜追加した。3 種類の水分散特性を有する (propargyl)glycine-(K)<sub>n</sub>-SG 脂質 (n = 0 - 2) を合成し、cRGDfK(-azide) と反応させた。(propargyl)glycine-(K)<sub>n</sub>-SG 脂質 (n = 1, 2) は 0.2 mM 以上の濃度で水中に分散したが、反応後は、cRGD-KK-SG 脂質のみ 0.2 mM という高い水分散性を示し、反応効率は 22.4% であった。高効率に cRGD-KK-SG 脂質を得るため、cRGDfK(-azide) とアスコルビン酸ナトリウムの量や反応時間を変え、反応条件の最適化を行った。硫酸銅・五水和物の濃度は、過剰添加時には還元型 Cu (I) の沈殿により反応効率が低下するため、(propargyl)glycine-KK-SG 脂質と等量のモル数に固定した。反応効率の最適化を行うことで、88.5% の反応効率で最良の結果を得た。

(2) cRGD-KK-SG/PEG リポソームの物理化学的特性：PEG リポソームと cRGD-KK-SG 脂質を 3~9 mol% の濃度で混合し、Cy5.5 標識 cRGD-KK-SG/PEG リポソームを調製した。各リポソームの平均粒子径は 90~100 nm の範囲であり、多分散性指数 (PdI) は約 0.20 であり、高品質な製剤を調製できた。cRGD-KK-SG/PEG リポソームのゼータ電位は、PEG リポソームと比較してリジンの影響と思われるわずかに上昇する結果となった。

(3) 大腸がん細胞株 Colon-26 細胞への細胞結合特性の評価：Cy5.5 標識 cRGD-KK-SG/PEG リポソームの細胞結合特性は、インテグリン  $\alpha\beta 3$  発現 Colon-26 細胞で評価された。cRGD-KK-SG/PEG リポソームは、PEG リポソームと比較して修飾量の増加に伴い結合性が上昇した。9 mol% cRGD-KK-SG/PEG リポソームが最も強く結合し、PEG リポソームの約 7 倍であった。一方、cRGD の対照として用いた cRAD を有する 9 mol% cRAD-KK-SG/PEG リポソームでは、PEG リポソームと同程度の結合性を示した。

(4) 大腸がん細胞株 Colon-26 細胞への細胞内局在とエンドサイトーシス経路の解析：Cy5.5 標識 PEG リポソーム、cRAD-KK-SG/PEG リポソーム、および cRGD-KK-SG/PEG リポソームの細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。PEG リポソームと cRAD-KK-SG/PEG リポソームの共焦点画像は、リポソームのシグナルは観察されなかった。cRGD-KK-SG/PEG リポソームでは、リポソームのシグナルが強く観察され、リソソームと一部、共局在していた。次に、Cy5.5 標識 9 mol% cRGD-KK-SG/PEG リポソームのエンドサイトーシス経路解析を各阻害剤存在下または 4 条件下で実施した。クラスリンおよびカベオラを介した経路は、それぞれスクロースおよびゲニステインによって阻害された。エネルギー依存性経路は 4 条件下で阻害された。cRGD-KK-SG/PEG リポソームの細胞結合性は、各種阻害剤または 4 条件下で減少した。これらの知見から、cRGD-KK-SG/PEG リポソームはクラスリンまたはカベオラを介したエンドサイトーシス経路によって Colon-26 細胞のリソソームに局在することが示唆された。

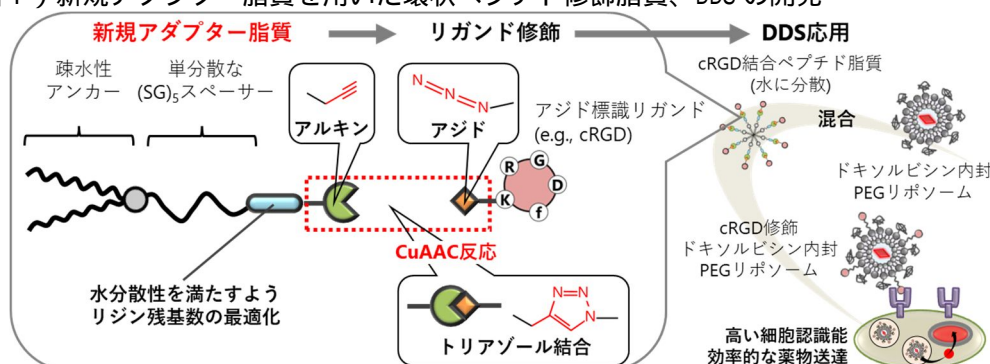
(5) ドキソルビシン封入 PEG リポソームの調製：リモートローディング法により Dox-PEG リポソームを調製し、cRGD-KK-SG 脂質を後修飾した。9 mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは PdI 0.2 以下の単分散な製剤として調製できた。ドキソルビシン封入率は 15% 低下したものの、80% 以上を維持した。

(6) Colon-26 細胞へのドキソルビシン送達性と細胞毒性の評価：9 mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームのドキソルビシン送達効果を検証するため、Colon-26 細胞を用いた細胞結合性および

び細胞内局在の評価を行った。9 mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは、PEG リポソームの8.9 倍の結合性を示し、ドキソルピシン単剤の取り込みよりも高い値であった。PEG リポソームの共焦点画像では、ドキソルピシン由来のシグナルは観察されなかった。一方、9mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは、明瞭にドキソルピシン由来のシグナルが観察され、細胞内全体に局在していた。一方、ドキソルピシン単剤では、9 mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームとは異なり、ほぼ全てのドキソルピシンが核に局在した。また、9 mol% cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームの細胞傷害性は、Dox-PEG リポソームよりもはるかに高く、その効果は 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度でドキソルピシン単剤に匹敵する効果であった。これら結果から、cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは、ドキソルピシン送達のための DDS キャリアとして優れた細胞傷害性をもたらすことが示唆された。

(7)まとめ：本研究では、新規アダプター脂質である(propargyl)glycine-KK-SG 脂質を設計し、CuAAC 反応を用いて水分散性の高い  $\alpha\text{v}\beta_3$  標的 cRGD-KK-SG 脂質の合成に成功した。cRGD-KK-SG/PEG リポソームは、PEG リポソームと cRGD-KK-SG 脂質の水系溶媒中での混合により調製した。さらに、cRGD-KK-SG/PEG リポソームがクラスリンおよびカベオラを介したエンドサイトーシスにより、修飾量およびペプチド配列に依存して Colon-26 細胞に取り込まれることを明らかにした。さらに、cRGD-KK-SG/Dox-PEG リポソームは、Colon-26 細胞におけるドキソルピシンの送達および細胞傷害性を増強する可能性が示された。新規アダプター脂質誘導体である(propargyl)glycine-KK-SG 脂質は、クリック反応を利用した様々な環状ペプチド修飾脂質合成に応用できる汎用性の高い材料であると考えている(図1)。以上、本研究は、今後の環状ペプチド修飾 PEG リポソーム開発への貴重な知見となることを期待される。

(図1) 新規アダプター脂質を用いた環状ペプチド修飾脂質、DDS の開発



(引用論文)

- 1) Suga, T., Fuchigami, Y., Hagimori, M., Kawakami, S., **2017**. Ligand peptide-grafted pegylated liposomes using HER2 targeted peptide-lipid derivatives for targeted delivery in breast cancer cells: the effect of serine-glycine repeated peptides as a spacer. *Int. J. Pharm.* 521, 361–364.
- 2) Suga, T., Kato, N., Hagimori, M., Fuchigami, Y., Kuroda, N., Kodama, Y., Sasaki, H., Kawakami, S., **2018**. 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. *Mol. Pharm.* 15, 4481–4490.
- 3) Kato, N., Sato, T., Fuchigami, Y., Suga, T., Longjian, G., Tsurumaru, M., Hagimori, M., Mukai, H. and Kawakami, S., **2022**. Synthesis and evaluation of a novel adapter lipid derivative for preparation of cyclic peptide-modified PEGylated liposomes: application of cyclic RGD peptide, 176, 106239

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Naoya, Sato Takumi, Fuchigami Yuki, Suga Tadaharu, Longjian Geng, Tsurumaru Masako, Hagimori Masayori, Mukai Hidefumi, Kawakami Shigeru	4. 巻 176
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of a novel adapter lipid derivative for preparation of cyclic peptide-modified PEGylated liposomes: application of cyclic RGD peptide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 106239 ~ 106239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2022.106239	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 匠、菅 忠明、加藤直也、淵上由貴、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 環状RGDペプチドをリガンドとする高機能・高品質脂質の合成法の開発と環状RGD修飾リポソームの細胞取り込み特性の評価
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤直也、佐藤 匠、菅 忠明、松本 慎、野田健太、淵上由貴、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 新規環状RGDペプチド修飾脂質を用いた環状RGD修飾リポソームの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 匠、淵上由貴、菅 忠明、加藤直也、萩森政頼、川上 茂
2. 発表標題 がん標的指向性 DDS キャリアの実用化を目的とした環状ペプチドをリガンドとする高機能・高品質脂質の開発
3. 学会等名 第9回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也, 淵上由貴, 佐藤 匠, 菅忠明, 萩森政頼, 向井英史, 川上 茂
2. 発表標題 PEGリボソームに後修飾可能なインテグリン標的化のための環状RGD修飾脂質の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	川上 茂  (Kawakami Shigeru)		
研究協力者	加藤 直也  (Naoya Kato)		
研究協力者	菅 忠明  (Suga Tadaharu)		
研究協力者	佐藤 匠  (Sato Takumi)		

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