

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20700400

研究課題名（和文）腫瘍部到達後にサイズと表面性状を自発的にリモデルするナノ粒子製剤
キャリアの作製研究課題名（英文）Development of a nanocarrier that can change its character responding
to a tumor environment

研究代表者

松村 幸子（MATSUMURA SACHIKO）

公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白創製研究部・研究員

研究者番号：90414052

研究成果の概要（和文）：薬物や造影剤を運搬するキャリアとして注目されているナノ粒子に、腫瘍環境に応答するしくみをもたせた。腫瘍環境で特に多く発現している酵素が基質ペプチドを切断する活性を利用し、その酵素があるとはじめて細胞に侵入することができるようになるナノ粒子を作製した。ナノ粒子には、炭素とタンパク質という、素材・サイズ・性質の異なる2種類のナノ粒子を用いた。

研究成果の概要（英文）：Nanoparticles are fascinating as a carrier for drugs and imaging agents. In this study, nanoparticles having responsivity to a tumor environment are constructed. Upon sensing an activity of enzyme, which is highly expressed in many types of tumors, the nanoparticles can obtain the ability to enter cells. Two kinds of nanoparticles, that is carbon- or protein-based ones, are studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	0	0	0
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ペプチド科学、ドラッグデリバリー

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー、ナノ粒子、ペプチド、がん、環境応答性、マトリックスメ
タロプロテアーゼ、カーボンナノチューブ、フェリチン

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム（DDS）において、薬物を担持・運送する「キャリア」としてナノ粒子が注目されており、様々な素材のナノ粒子を用いた研究が展開されている。ナノ粒子を腫瘍部に集積させるために、「EPR効果」と「ステルス化」は臨床的に有効性が確認されつつあり、ナノキャリア研究において広く用いられている概念である。EPR効果とは、正常組織に比べて血管に隙間

が多く、リンパ系も未発達な腫瘍組織においては、ナノ粒子が蓄積しやすい現象のことである。またステルス化とは、ナノ粒子が異物として認識されないように、ポリエチレングリコール（PEG）などの高分子で表面を被覆することである。さらに、がん細胞を認識する抗体やタンパク質、糖などのリガンドをキャリアに付与し、がん細胞への指向性を与える「能動的ターゲティング」も試みられている。しかし、このような「血管から腫瘍部へ

の集積」に焦点をあてたキャリア設計が、「腫瘍組織内」での設計指針としても適切かどうか疑問である。腫瘍組織の特性として、腫瘍血管の血流は著しく遅く、組織内での分子の移行は主に拡散によっている。このような状況下では粒子のサイズは小さいほうが運動性は高く、組織内への浸透性も高い。またナノ粒子表面のステルス化は、血しょう中のタンパク質のナノ粒子への結合を抑制することを狙ったものであるため、標的とするタンパク質との親和性も弱める可能性がある。親水的で柔軟な表面はがん細胞表面との接着性も弱い。したがって、「血管から腫瘍部への集積」を効率化するキャリアの特性は、腫瘍部への集積後は、むしろ負の要因として働いているのかもしれない。血管から腫瘍部に到達後に適した性状に自発的にリモデルすることのできるナノ粒子ができれば、効率的な運搬が可能な高性能キャリアになると考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍環境特異的に性質を変化させるナノ粒子を作製し、評価することを目的とする。ナノ粒子に腫瘍特異的な変化を誘導するために、マトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) の基質ペプチド切断活性を利用する。MMP は細胞外マトリックスを分解する酵素群で、分泌型 MMP-2 はがんの転移・浸潤、血管新生に深く関与し、腫瘍部特異的に発現が亢進していることが知られている。MMP-2 の基質ペプチドをナノ粒子表面に修飾すれば、腫瘍部で MMP-2 が基質を切断し、ナノ粒子表面に劇的な変化を起こすことが期待できる。ナノ粒子表面には、MMP-2 基質ペプチドのほか、PEG や機能性ペプチド (腫瘍指向性ペプチドや細胞膜透過性ペプチド等) を合理的な設計に基づき複合化し、MMP-2 によってナノ粒子の表面性状が変化するようにする。作製したナノ粒子の粒径等をまずは水溶液中で調べ、これが MMP-2 依存的に変化するかを調べる。次に導入した機能性ペプチドが細胞に対して実際に機能するか、それを MMP-2 でコントロールできるかを、培養がん細胞を用いて調べる。さらにマウスを用いた評価へと進め、薬剤キャリアとしての設計指針のさらなる改善点を見出す。

3. 研究の方法

キャリアとして有望と考える素材の異なる2種類のナノ粒子を用いる。ナノ粒子に付与する機能として細胞膜透過性に着目し、細胞への侵入能力の付与、および、腫瘍環境因子である MMP-2 による侵入能力の on/off 制御を行う。

(1) カーボンナノ粒子を用いたナノキャリア

アの作製：カーボンナノホーンはカーボンナノチューブの仲間で、腫瘍部への受動的なターゲティングが期待できる直径約 100 nm の球状粒子である。カーボンナノホーンは、抗がん剤の担持やフォトサーマル効果による細胞殺傷が可能など、魅力ある素材であるが、そのままでは水系で凝集してしまう欠点がある。まず、カーボンナノホーンに水溶液中での分散性を確保することが本研究での評価を行うために必須であるため、親水性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) による表面修飾を行った。その方法として、カーボンナノホーン結合ペプチドを用いた非共有結合による修飾と、化学反応による共有結合による修飾の2通りについて検討する。さらに細胞膜透過性ペプチドとの複合化を行う。

非共有結合による修飾では、カーボンナノホーン結合ペプチドと PEG の複合体を合成し、水溶液中でカーボンナノホーンと混合することで表面修飾した。カーボンナノホーン結合ペプチドの導入数および PEG の構造 (平均分子量が 5 k あるいは 20 k の直鎖状 PEG、あるいはくし型 PEG) の異なる種々の複合体を合成し、分散化能力を比較検討した。カーボンナノホーンの分散性は、分散液の吸光度の経時変化、および動的光散乱法による粒子径の経時変化により評価した。また、体内においても分散状態を維持できるかを調べるために、マウスの尾静脈中に投与し、投与後 24 時間に肺を摘出し、肺への蓄積を調べた。

共有結合による修飾は、カーボンナノホーン表面のカルボキシル基を足がかりとし、PEG に導入したアミノ基とのアミド形成反応によって行った。カーボンナノホーン分散水溶液の安定性は上記と同様に評価した。また、蛍光色素 (フルオレセイン) を導入した細胞膜透過性ペプチドを化学合成し、PEG 修飾カーボンナノホーンと反応させた。細胞への侵入能力を調べるために、作製した修飾カーボンナノホーンを細胞培養培地中に添加し、細胞を洗浄後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察を行い、修飾カーボンナノホーンが細胞内に存在するかを調べた。

(2) タンパク質ナノ粒子を用いたキャリアの作製：フェリチンは天然の鉄貯蔵タンパク質で、直径約 13 nm の中空粒子を形成している。内部の空間には鉄以外の無機化合物や小分子有機化合物を入れることができ、造影剤や薬物のキャリアとしての資質を有していることから、本研究に適した素材と考え用いることにした。細胞膜透過性ペプチド・MMP-2 の基質ペプチド・ブロッカー (PEG 等) の3成分から構成される分子を設計し化学合成した。この分子をフェリチン表面に修飾すると最表面がブロッカーになり、MMP-2 が基質ペプチドを切断すると、細胞膜透過性ペプチ

ドが表面に出てくるように設計した。この分子をフェリチン表面にクロスリンカーを用いて修飾し、電気泳動（SDS-PAGE および Native PAGE）における移動度、動的光散乱による粒径測定等によって、修飾の成否を評価した。また MMP-2 を添加して同様の実験を行い、MMP-2 によって基質ペプチドが切断されブロッカーが外れるかを調べた。この修飾フェリチンを細胞培養培地に添加し、MMP-2 の有無によるフェリチンの細胞内への侵入の違いを、共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により比較した。

4. 研究成果

(1) カーボンナノ粒子を用いたナノキャリアの作製では、まずカーボンナノホーンに水溶液中での十分な分散能力を付与することがナノキャリアとしての応用に必要不可欠である。そのために、非共有結合および共有結合の2通りによる表面修飾の検討を行った。非共有結合による修飾では、カーボンナノホーン結合ペプチドと PEG の種々の複合体を作製し、これを添加したときのカーボンナノホーンの分散性を比較した。その結果、くし型 PEG に複数個のペプチドを導入したものが、PBS（リン酸緩衝液）中で最も安定にカーボンナノホーンを分散化できることがわかった（図1）。さらにこの方法で分散化し

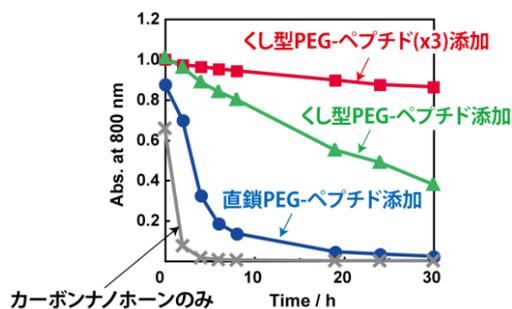


図1. カーボンナノホーン分散水溶液の安定性評価：PBS 中での吸光度の経時変化。

たカーボンナノホーンをマウスの尾静脈に投与し、24 時間後の肺への蓄積を調べたところ、分散化により肺への蓄積をほぼなくすことに成功した。以上の成果を論文にまとめ、Molecular Pharmaceutics 誌にて発表した（雑誌論文①）。一方、共有結合による修飾でも、同様にカーボンナノホーンを水溶液に分散させることができた。細胞によるカーボンナノホーンの取り込み実験では、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察の結果、PEG のみで修飾したカーボンナノホーンはほとんど細胞内に取り込まれなかったが、細胞膜透過性ペプチドを導入したものでは、細胞内にカーボンナノホーンが取り込まれている様子が観察された（図2）。すなわち、カーボンナ

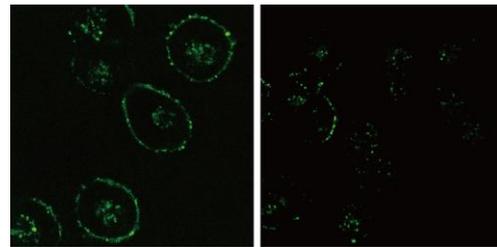


図2. カーボンナノホーンの細胞内への侵入（共焦点蛍光顕微鏡像）：ポリエチレングリコールと細胞膜透過性ペプチドで修飾したカーボンナノホーン（左）。ポリエチレングリコールで修飾したカーボンナノホーン（右）。

ノホーン表面の細胞膜透過性ペプチドの有無によってカーボンナノホーンの細胞への侵入挙動が変化することが示された。今後、以下に述べるようなブロッカー分子で細胞膜透過性ペプチドの機能を抑えておき、MMP-2 への応答性を付与することで、カーボンナノホーンの細胞への侵入を MMP-2 で制御できると期待できる。ちなみに、その他の細胞実験、マウスへの投与実験を通じて、毒性を示す結果は得られていない。カーボン素材としたナノキャリアでは、近年、グラフェンが注目されてきており、本研究の手法はグラフェンにも適応可能であることから、さらなる応用展開が期待できる。

(2) タンパク質ナノ粒子を用いたキャリアの作製では、フェリチン表面に、細胞膜透過性ペプチド・MMP-2 の基質ペプチド・ブロッカーの3成分から構成される分子を修飾し、MMP-2 の活性により細胞膜透過性を on/off できるスイッチ機能をもたせたフェリチンの作製を行った。修飾したフェリチンの粒径は約 22 nm となり未修飾に比べて大きくなった。また修飾分子に導入した蛍光色素、電気泳動等の結果からも、目的とする修飾フェリチンが作製できたことを確認することができた。作製した修飾フェリチン溶液に MMP-2 を添加すると、基質ペプチドが切断されてブロッカーが除去されることを、電気泳動のバンドシフト、粒径変化等により確認することができた。がん細胞を培養する培地に修飾フェリチンを添加し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、MMP-2 とインキュベートしたフェリチンはがん細胞に取り込まれた。MMP-2 によりブロッカー分子が除去され、細胞膜透過性ペプチドの機能によりフェリチンががん細胞に侵入できるようになったと考えられる。がん環境因子のひとつである酵素に応答して細胞透過性を on/off できる可能性が示唆された。

以上のように、カーボンとタンパク質という2つの全く異なる素材で検討を進めたが、どちらも近年ナノキャリアとして国内外で研究が盛んに進められている素材である。キャリアの研究では、ますますの高性能化が争われており、環境応答性は重要な因子の一つ

である。本研究を通じて、フェリチンでは MMP-2 に対する応答性の付与に目処がついた。またこの知見をもとに、カーボンナノ粒子のほうでも応答性を付与できることが期待できる。さらに検討を進め、体内の腫瘍環境で機能するものへと改善を進める予定である。本研究の手法は、標的分子を用いたり、MMP-2 以外の酵素に応答できるようにしたりすることなどの改変を行うことで、将来的には様々な体内環境に対応するナノキャリアへと展開できるものである。

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)

- ①. Matsumura S, Sato S, Yudasaka M, Tomida A, Tsuruo T, Iijima S, Shiba K. Prevention of carbon nanohorn agglomeration using a conjugate composed of comb-shaped polyethylene glycol and a peptide aptamer. *Molecular Pharmaceutics*. 査読有、6 (2)、2009、441-447、DOI: 10.1021/mp800141v

[学会発表] (計 3 件)

- ①. Matsumura S, Miyawaki J, Yuge R, Sato S, Tomida A, Tsuruo T, Yudasaka M, Iijima S, Shiba K. Bioapplication of the surface modified carbon nanohorns for drug delivery systems. 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009 年 6 月 20 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ②. 松村 幸子、佐藤 重男、湯田坂雅子、富田 章弘、鶴尾 隆、飯島澄男、芝 清隆、PEG-ペプチド複合体によるカーボンナノホーンの分散化効果と肺への蓄積、第 35 回記念フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、平成 20 年 8 月 28 日、東京工業大学 大岡山キャンパス (東京)
- ③. 松村 幸子、湯田坂雅子、飯島澄男、芝 清隆、体内投与のためのカーボンナノホーンの分散化の検討、第 24 回日本 DDS 学会学術集会、平成 20 年 6 月 29 日、六本木アカデミーヒルズ 40 (東京)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 幸子 (MATSUMURA SACHIKO)

公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白

創製研究部・研究員

研究者番号：90414052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし