

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 18 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21790049

研究課題名（和文） がん微小環境応答性の細胞内取り込み促進型ナノ粒子の構築および抗腫瘍作用の検討

研究課題名（英文） Development of tumor microenvironment responsive nanoparticles and investigation of the antitumor effect.

研究代表者

濱 進 (HAMA SUSUMU)

京都薬科大学薬学部・助教

研究者番号：60438041

研究成果の概要（和文）：腫瘍の低 pH に応答して細胞内取り込みが促進されるナノ粒子を構築するために、新規微弱低 pH 応答性ペプチド(SAPSP)をカチオン性リポソームに修飾した (SAPS-lipo)。SAPS-lipo は pH 6.5 において表面電荷が負から正に反転することにより、細胞内取り込みが促進された。さらに siRNA を封入したナノ粒子は pH 6.5 において高い RNAi 効果を誘導した。本ナノ粒子は、腫瘍低 pH に応答性を示す新規 DDS である。

研究成果の概要（英文）：Novel charge-invertible nanoparticles were developed that can respond to the acidic pH of a tumor. We designed a unique peptide (referred to as a slightly acidic pH sensitive peptide: SAPSP), as a pH responsive device for intelligent nanoparticles consisting of cationic liposomes. The cellular uptake of SAPSP-modified liposomes (SAPS-lipo) increased at tumoral pH (pH 6.5) due to conversion of the liposomal surface charge from negative to positive. In addition, siRNA-encapsulated SAPSP-lipo induced a significant knock down effect, but only at pH 6.5. These results indicate that SAPSP-lipo represents a novel intelligent drug delivery system that can respond to tumoral pH for use in cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：物理系薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：がん微小環境・ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

がん治療の薬物キャリア開発において、組織レベルおよび細胞レベルでの制御が必要である。これまでに、細胞レベルでは、カチオン性のキャリアが細胞への導入効率が高いことから *in vitro* 実験においては広く用いられてきたが、生体

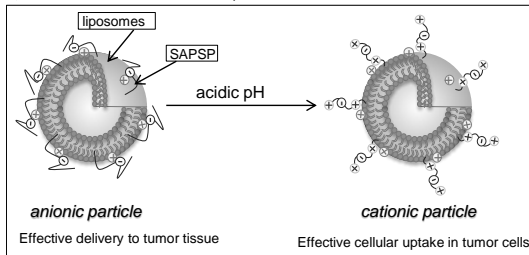
成分との相互作用が高く血中滞留性が低いために、全身投与型のキャリアとして利用することは困難である。一方、血中滞留性の高いポリエチレングリコール (PEG) を修飾したキャリアは、細胞への導入効率が低いことが問題であり、各々のキャリアーシステムにおいてジ

レンマを抱えており、それを解消できるような新しいコンセプトに基づくキャリアの開発が必要である。そこで、正常組織とは異なる特徴をもつ腫瘍微小環境、特に腫瘍低 pH に着目し、この腫瘍低 pH を利用して膜物性を制御することができれば、腫瘍へのターゲティングを目指した新規薬物キャリアの開発に繋がると考えられる。すなわち、生理的条件下においては生体成分との相互作用が低いマイナスの表面電荷を有し、腫瘍環境においては低 pH に応答して表面電荷がプラスに転換することにより腫瘍細胞への親和性が向上し、細胞内への取り込みが促進される。これまでに、低 pH に応答して表面電荷が反転する薬物キャリアを開発するために、pH 応答性負電荷脂質であるコレステロールコハク酸とカチオン性脂質から構成されるリポソームを構築した結果、pH 5.5 において、表面電荷が負から正に反転することにより、細胞内取り込みが促進された。しかし、多くの腫瘍の pH は約 6.5 であるため、より微弱な低 pH に応答するキャリアの開発が必要である。

2. 研究の目的

腫瘍低 pH に応答して、表面電荷が反転する薬物キャリアを開発するために、低 pH 応答性デバイスとして、新規微弱低 pH 応答性ペプチドを搭載した薬物キャリアを開発し (図 1)、その機能性を評価することを目的とした。

図 1. SAPSP 修飾リポソーム



3. 研究の方法

新規微弱低 pH 応答性ペプチド (SAPSP) 修飾リポソーム (SAPSP-lipo) は 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) と egg phosphatidylcholine (EPC) から構成されるカチオン性リポソームに SAPSP を修飾することにより調製した。SAPSP-lipo の各 pH 緩衝液中での粒子径および表面電荷は、ゼータサイザーナノを用いて測定した。また蛍光標識した SAPSP-lipo をマウスメラノーマ細胞 (B16-F1) へ添加し、一定時間後の細

胞への取り込みをフローサイトメトリーにより、細胞内動態は共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により評価した。SAPSP-lipo の体内動態を解析するために、plasmid DNA を封入した SAPSP-lipo を担癌マウスへ尾静脈投与し、一定時間後に回収した血液、腫瘍および各臓器から plasmid DNA 抽出し、Real time PCR により SAPSP-lipo の体内分布を検討した。

4. 研究成果

カチオン性リポソームに SAPSP を最適比で修飾したリポソームの表面電荷は pH 7.4 では負電荷であったが、腫瘍低 pH (6.5) では正電荷を示し、微弱低 pH に応答した表面電荷の反転が認められた (表 1)。

表 1. 各 pH 緩衝液中における SAPSP 修飾

pH	7.4	6.5	6.0	5.5
Diameter (μm)	173±7	265±43	198±14	158±5
ζ-potential (mV)	-15.3±1.3	7.1±0.8	10.7±1.9	11.2±1.2

リポソームの粒子径および表面電荷

次に、B16-F1 細胞における蛍光標識 SAPSP-lipo の取り込みをフローサイトメトリーで評価した結果、SAPSP-lipo は pH 7.4 に比べて微弱低 pH において約 10 倍以上細胞内取り込みが促進された (図 2)。

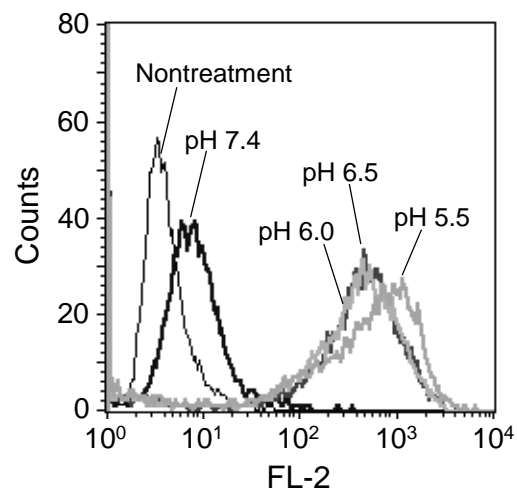


図 2. SAPSP 修飾リポソームの細胞内取り込み

また、SAPSP-lipo の細胞内動態を CLSM 観察により評価した結果、エンドソーム・ライソソームマーカーの LysoTracker との共局在は認められず、SAPSP-lipo は細胞質に効率的に送達されることが明らかとなった。

一方、SAPS ペプチド単独では、リポソーム修飾型とは異なり、pH5.5において細胞内取り込みが認められ、さらに取り込まれた SAPS はエンドソーム・ライソソームに局在していた。これらのことから、SAPS-lipo の微弱低 pH 応答性および効率的な細胞質送達は、SAPS とリポソーム膜との相互作用によるものであると考えられる。実際に、SAPS 単独の場合と SAPS-lipo のペプチド構造を CD スペクトル解析した結果、SAPS-lipo において、微弱低 pH で著しい構造変化が認められた(図 3)。

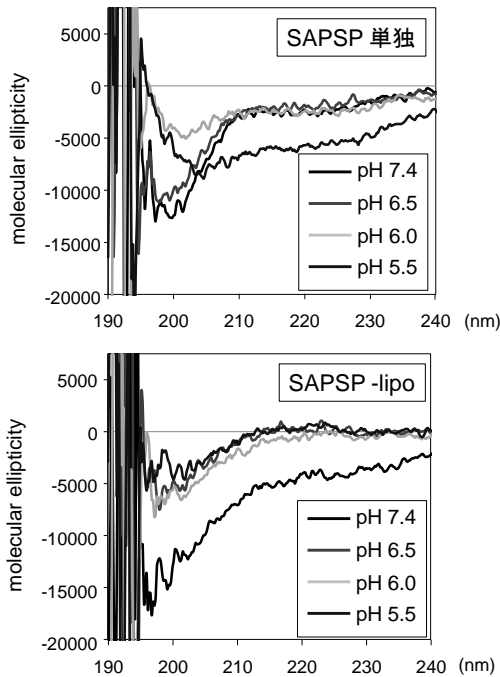


図 3. SAPS 単独および SAPS-lipo の CD スペクトル

このことから、リポソーム膜表面で制御された pH 応答性のペプチド構造変化が、微弱低 pH 応答性の細胞内取り込み、および効率的な細胞質送達に与与することが推察された。

また、SAPS-lipo は効率的に細胞内に送達されたことから、細胞質で機能する薬物のモデルとして、siRNA の導入効率を検討した。Luciferase 安定発現細胞に、SAPS-lipo を用いて、anti-luciferase siRNA をトランスフェクションした結果、生理的 pH に比べて、pH6.5 において著しい RNAi 効果が認められたことから、微弱低 pH 下で取り込まれた SAPS-lipo は細胞質へ効率的に内封薬物を送達することが可能であることが確認できた。

さらに体内動態解析により、

SAPS-lipo は PEG 修飾リポソームと同等の腫瘍集積を示しただけでなく(図 4)、SAPS-lipo は腫瘍内の血管から離れた領域に分布していたことから、PEG 修飾リポソームとは異なる腫瘍内動態を示すことが明らかとなった。

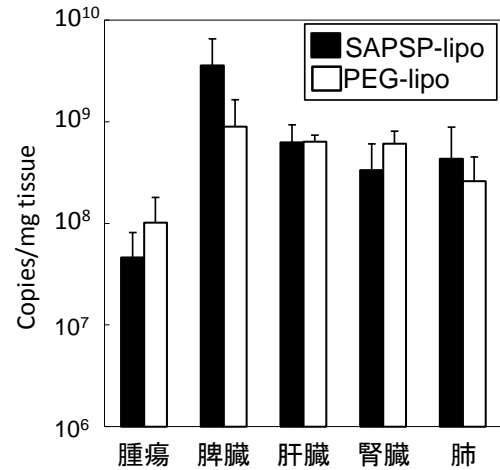


図 3. SAPS-lipo および PEG-lipo の体内分布

本研究で構築した SAPS 修飾リポソームは腫瘍低 pH に応答して膜物性が変化することにより、体内・細胞内動態制御可能な新規の癌治療用薬物キャリアであると考えられる。従来の低 pH 応答性キャリアは、pH 5.5 程度の低 pH でなければ応答性を示さず、さらに細胞外で薬物を漏出するタイプが主である。一方、SAPS 修飾リポソームは、PEG と同程度の腫瘍集積を示すだけでなく、腫瘍内 pH と同程度の pH 6.5 において、細胞内へ取り込まれ、内封薬物を細胞質へ送達可能であることから、SAPS 修飾リポソームは、細胞質を標的可能な癌治療のための全身投与型薬物キャリアとして期待される。

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 3 件)

- ① Hama S, Utsumi S, Fukuda Y, Nakayama K, Okamura Y, Tsuchiya H, Fukuzawa K, Harashima H, Kogure K. Development of a Novel Drug Delivery System consisting of an Antitumor Agent Tocopheryl Succinate. *J. Control. Release.* 査読有. *in press.*
- ② Hama S, Arata M, Nakamura I, Kasetani T, Itakura S, Tsuchiya S, Yoshiki T, Kogure K. Prevention of

Tumor Growth by Needle-free Jet Injection of anti-C7orf24 siRNA. *Cancer Gene Ther.* 査読有. *in press*.

- ③ Kigasawa K, Kajimoto K, Nakamura T, Hama S, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *J. Control. Release.* 査読有. 150, 2011, 256-265.

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 濱 進、ナノ粒子の膜物性制御による腫瘍低 pH 下の癌細胞への効率的な薬物送達、第 9 回がんとハイポキシア研究会、2011 年 11 月、東京。
- ② 中井麻友美、腫瘍の低い pH を利用した新規薬物キャリアーの開発、第 27 回日本 DDS 学会学術集会、2011 年 6 月、東京。
- ③ 濱 進、核酸医薬を封入したトコフェロールコハク酸ナノ粒子の機能性評価、日本ビタミン学会第 63 回大会、2011 年 6 月、広島。
- ④ 小暮 健太郎、腫瘍環境応答性の表面物性を有するナノキャリアーの開発、日本膜学会第 33 年会境界領域シンポジウム、2011 年 5 月、東京。
- ⑤ 濱 進、腫瘍の低 pH 環境に応答して細胞親和性が向上する薬物キャリアーの開発、遺伝子・デリバリー研究会 第 10 回シンポジウム、2010 年 6 月、札幌。
- ⑥ 板倉祥子、腫瘍内低 pH に応答する新しい薬物キャリアーの開発、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山。
- ⑦ 板倉祥子、腫瘍環境に応答可能な新規薬物送達キャリアーの開発、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム、2009 年 7 月、大阪。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：pH 応答性ペプチドを含むナノ粒子

発明者：小暮健太郎、濱 進

権利者：大鵬薬品工業株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2012/060905

出願年月日：2012 年 4 月 24 日

国内外の別：国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/bukka/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱 進 (HAMA SUSUMU)

「京都薬科大学・薬学部・助教」

研究者番号：60438041