

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20513

研究課題名（和文）ポリフェノール構造を基盤とした細胞内抗体送達システムの開発

研究課題名（英文）Development of intracellular antibody delivery system based on polyphenol structure

研究代表者

本田 雄士（Honda, Yuto）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：90907742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞質内抗原と結合する細胞内抗体は細胞死などを誘導できることから新規治療分子としての利用が検討されている一方、細胞質移行量は極めて低く、活性が制限されている。本研究では、抗体の細胞質移行を促進するため、ポリフェノール高分子を基盤とした薬物送達システムを構築した。合成したポリフェノール導入高分子と金属イオンを抗体と混合することで抗体複合体が形成されることを見出し、この複合体は細胞実験および動物実験において抗体の細胞質移行性を向上させた。さらに、がん治療用抗体複合体をマウスに投与すると、がんの増殖を治療用抗体単体と比較して優位に抑制した。本抗体複合体は新たな治療分子としてのポテンシャルを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内抗体は細胞質内抗原と結合し、細胞死など誘導すること新規治療分子としての利用が検討されている一方、細胞質移行量は極めて低く、活性が制限されており、医薬品としての検討がほとんど行われていなかった。本研究では、ポリフェノール高分子を基盤とした薬物送達システムによって細胞内抗体の細胞質移行を促進させ、治療効果を示すことに成功した。本技術は、細胞内抗体の医薬品としての有用性を向上させるものであり、新たな医薬品を創出するプラットフォーム技術になる可能性があり、社会的意義が大きい。また、ポリフェノール分子と金属イオンの緩衝効果を利用した薬物送達システムは報告されておらず、学術的にも意義があるといえる。

研究成果の概要（英文）：Intrabodies that bind to antigens in the cytoplasm and induce the cell death are attracting attention as novel therapeutic molecules. However, the amount of intracellular transfer is extremely low, and the activity has not been fully demonstrated. In this study, we constructed a drug delivery system based on polyphenol-conjugated polymers to promote the cytoplasmic transfer of antibodies. We found that antibody-loaded complexes were formed by mixing the synthesized polyphenol-conjugated polymers and metal ions with antibodies, and these complexes improved the cytoplasmic transfer of antibodies in vitro and in vivo. Furthermore, the systemically administrated complex containing cancer therapeutic antibody exhibited the suppression of cancer growth compared with the systemically administrated therapeutic antibody alone. These results indicate that this antibody complex has potential as a new therapeutic molecule.

研究分野：生体材料学、薬物送達学

キーワード：細胞内抗体 エンドソーム脱出 高分子複合体 ドラッグデリバリーシステム ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

抗体は抗原と特異的に結合することで、細胞増殖の抑制、細胞死を誘導できることから、がんなど様々な疾病の治療に用いられている。例えば、抗体の一つであるトラスツズマブは、がん細胞上に発現する増殖因子受容体の一つである HER2 と結合し、細胞増殖を抑制することで、乳がん患者の奏効率の向上させることから、抗体医薬として承認されている。がんの増殖に関与しているがん関連抗原や、免疫誘導やたんぱく質分解を促す受容体は、がん細胞質内にも多く局在していることが近年報告され、これらを標的化できる細胞内抗体が新たな治療分子として注目されている [1]。しかし、細胞内抗体を治療分子として用いる技術的な壁として抗体の低い細胞質移行が存在する。極性が低く親水性である抗体医薬品は標的細胞のエンドソーム内に取り込まれてもエンドソーム膜を突破できず、細胞質に移行できる割合が限りなく低い。この問題によって、ほとんどの抗体が細胞質内に存在する標的抗原と結合できず、その活性は制限されている。これらの問題を解決するため、エンドソームから細胞質への移行(エンドソーム脱出)を誘発させるカチオン性のペプチドやポリマーを用いる方法も一部検討されているが[2]、細胞毒性や抗体との複合体形成が困難など実用に至るまでに解決すべき問題が散見されている。このような背景から、カチオン分子に頼らない、新しいエンドソーム脱出機能を備えた細胞内抗体送達キャリアの構築が求められている。このような背景から本研究では、(i) 抗体の細胞質移行を促進し、(ii) 細胞質内で抗体をリリース可能でありつつ、(iii) 毒性が低く、抗体と安定した複合体を形成させる次世代型抗体医薬品への展開を目指す。

2. 研究の目的

上記の機能を満たした送達システムを構築するため、本研究ではポリフェノール/金属イオンの複合体形成能に着目した。ポリフェノール構造分子と金属イオンは水溶液中で今後することで錯体形成し、その錯体はエンドソームから細胞質へと移行(エンドソーム脱出)することが報告されている[3, 4]。これは、ガロイル構造分子/金属イオン複合体が細胞のエンドソーム内に取り込まれると、その緩衝効果によって、大量のプロトンがエンドソーム内に流入させることで、エンドソーム内の浸透圧を上昇させエンドソーム膜破壊を促し、細胞質に移行するためである(図1b)。従来のカチオン性のペプチドやポリマーを用いたエンドソーム脱出方法では、カチオン分子由来の細胞毒性が誘起されてしまうことが問題であったが、このシステムはアニオン性であり、細胞毒性の抑制が期待できる。さらに、ガロイル構造分子がタンパク質と生体内でも安定した複合体を形成し、細胞に取り込まれると細胞内環境に応答し、タンパク質をリリースできることを以前の研究から発見しており、ガロイル構造は抗体の抗原認識を阻害しないことを確認済みである[5]。本研究では、これらの知見を組み合わせ、細胞内のエンドソーム膜から脱出しつつ、抗体をリリースすることで細胞内活性を大幅に増加させる細胞内抗体/ポリフェノール構造分子/金属イオン(MPN)複合体の構築およびその機能性評価を実施した。

3. 研究の方法

本研究期間内において、[1]ポリフェノール導入ポリマーの合成、[2]抗体複合体の構築、[3]細胞実験、[4]動物実験を実施し、抗体送達システムのコンセプト確立を行った。

4. 研究成果

[1]. ポリフェノール導入ポリマーの合成：ポリフェノール導入高分子として、2種類のポリマーの構築した(図1)。1つ目が PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体(PEG-*b*-poly-*L*-lysine, PEG-P(Lys))の Lys 側鎖にポリフェノール分子である没食子酸(Gallic acid, GA)を導入した PEG-P[Lys/(Lys-GA)](図1a)である。PEG-P[Lys/(Lys-GA)]は側鎖の GA 量を精密制御することが出来るため、分子構造の最適化が容易に可能である。2つ目が PEG の末端に没食子酸構造が分子10個で構築されたタンニン酸(TA)を導入した PEG-TA(図1b)である。TA はすでに抗体と相互作用して複合体を形成することを報告済みである[5]。PEG-P[Lys/(Lys-GA)]は開環アニオン重合と側鎖の脱保護によって PEG-P(Lys) ブロック共重合体を合成した後、側鎖に GA を縮合させることで合成を完了した。PEG-TA は、緩衝溶液中で MeO-PEG-NH₂ と TA を混合させ、pH 調整を行うことで合成した。これらの合成確認は、¹H-NMR, サイズ排除クロマトグラフィー, UV-vis 測定によって行った。

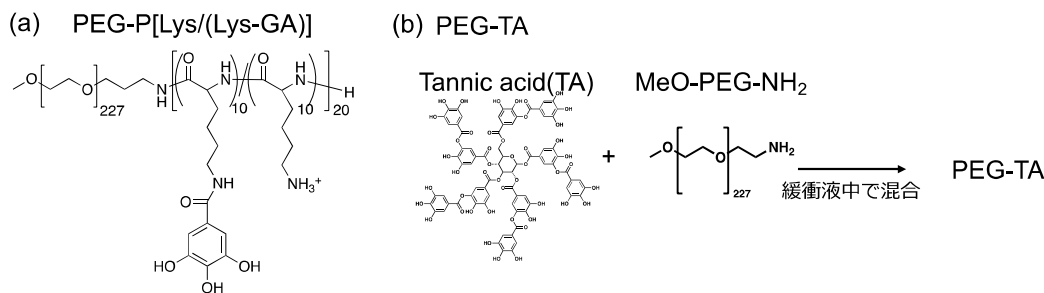


図1. ポリフェノール導入高分子((a)PEG-P[Lys/(Lys-GA)], (b)PEG-TA)の化学構造式.

[2]. 複合体の形成および物性評価：合成した 2 種類のポリフェノール導入高分子を 3 価の鉄イオン(Fe^{3+})と蛍光標識 IgG 抗体と水溶液中で混合させ、抗体搭載 MPN 複合体を形成させた。その MPN 複合体形成は蛍光分光相関法によって評価した。PEG-P[Lys/(Lys-GA)]を用いて調製した IgG 抗体/PEG-P[Lys/(Lys-GA)]/ Fe^{3+} の粒子サイズは約 20 nm を示し、IgG 抗体単体(約 14 nm)と比較してサイズが増加した。同様に、PEG-TA を用いて構築させた IgG 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} の粒子サイズは約 30 nm を示し、IgG 抗体単体と IgG 抗体/PEG-P[Lys/(Lys-GA)]/ Fe^{3+} より大きい粒子径を示した。IgG 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} (以下、IgG 抗体 MPN 複合体)は大きい粒子径を示した上に、その形成がより安定したことから、以後 PEG-TA を用いて抗体 MPN 複合体の評価を実施した。次に IgG 抗体 MPN 複合体のモロフォロジーを電子顕微鏡で観察したところ、球形の IgG 抗体 MPN 複合体形成が確認された(図 2a)。さらに抗体サンプルのゼータ電位を測定したところ、抗体単体では約-16 mV と負電荷を示した一方、IgG 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体ゼータ電位は-7.1 mV と 0 mV 付近に近づいた。これは、IgG 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体の表面がニュートラルに近い PEG 鎖に覆われたことを示唆する結果である。次に、抗体 MPN 複合体の pH 応答性を評価した。pH 7.4 と 6.8 では粒子径が約 30 nm を示した一方、pH6.0 および 5.5 では粒子径が約 10 nm と抗体単体と同等となった(図 2b)。このことから、エンドソーム pH(5.5-6.0)で複合体から抗体がリリースされることが示唆された。次に、本 MPN 複合体の緩衝効果を評価するため、各サンプルを溶解させた pH7.4 PBS 溶液に 0.1M の塩酸を加えた際の pH 変化について測定した。抗体単体溶液は、PBS 溶液と同等の pH 変化曲線を示した。一方、IgG 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体は強力な緩衝効果を示した(図 2c)。さらに、この緩衝効果はエンドソーム pH 付近(5.0-6.0)で特に強力に示したことから、緩衝効果によってエンドソーム脱出を図るポテンシャルを持っていることがうかがえる。

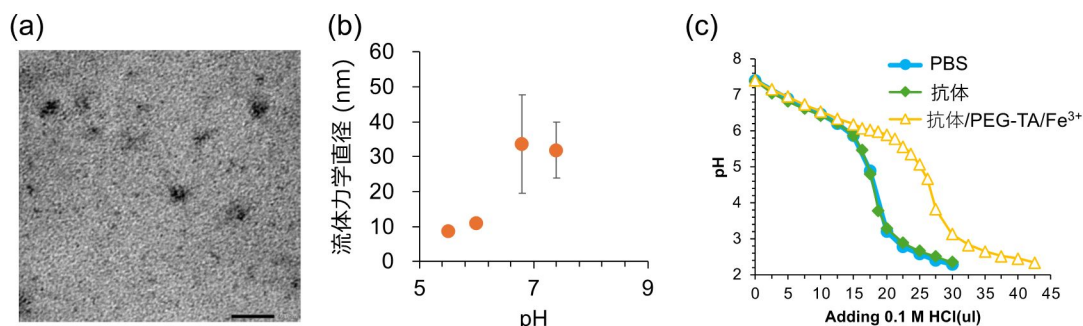


図 2. 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体の(a)電子顕微鏡画像、(b)pH 応答性、(c)緩衝効果

[3]. 細胞実験：抗体サンプルの細胞内取り込みを評価した。マウス乳がん細胞(4T1 細胞)と抗体サンプルを培地中で 24 時間インキュベートさせた後に、フローサイトメリーにて抗体由来の蛍光強度を測定した(図 3a)。その結果、抗体単体と比較して、抗体 MPN 複合体の取り込み量は増加した。これは、表面がポリマーで安定的に覆われたことで、表面電位がニュートラルに近づいたためだと考えられる。次に、抗体複合体の細胞内挙動観察および搭載した抗体の抗原認識能について評価した。この評価において、抗体として細胞核小胞複合体(Nucleic pore complex, NPC)を認識する Anti-NPC 抗体を用いた。Anti-NPC 抗体単体をインキュベートさせたところ、抗体(赤色)のほとんどが細胞膜表面およびエンドソーム(緑色)と共存していることが確認された(図 3b)。一方、PEG で表面が覆われている Anti-NPC 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体は、核(青色)と共存している様子が観察された(図 3b)。これらより、この MPN 複合体はエンドソーム脱出し、細胞質に移行すると同時に、エンドソーム pH に応答して Anti-NPC 抗体をリリースしていることが示唆された。この抗体サンプルとエンドソームおよび核の共存効率を定量化したところ、Anti-NPC 抗体/PEG-TA/ Fe^{3+} MPN 複合体のエンドソームとの共存効率は抗体単体と比べて下がっている一方(図 3c)、核との共存効率は上がっていた(図 3d)。このことから、MPN 複合体はエンドソーム脱出を促進させた後、抗体をリリースして、抗原認識していることが示された。

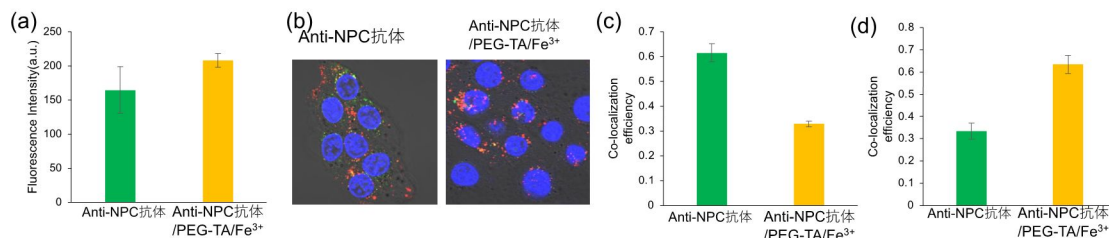


図 3. 細胞試験 (a)細胞内取り込み、(b)抗体 サンプルの細胞内局在観察(抗体：赤、エンドソーム：緑、細胞核:青)、(c)抗体とエンドソームの共局在効率、(d)抗体と核の共局在効率

[4]. 動物実験：腫瘍組織内での MPN 複合体に搭載した Anti-NPC 抗体の局在および抗原認識能に関して検討した。 Anti-NPC 抗体サンプル投与してから 48 時間後に、腫瘍を摘出し、腫瘍内での抗体の局在を蛍光顕微鏡にて切片観察することで評価した。Anti-NPC 抗体は核との共在をほとんど示さなかった(図 4a)。一方、Anti-NPC 抗体/PEG-TA/Fe³⁺ MPN 複合体は核と共在しており、In vivo においても MPN 複合体は腫瘍内でエンドソーム脱出能および抗原認識能を持っていることが示された(図 4b)。次に、本抗体送達システムの治療効果を評価するため、Anti-NPC 抗体に代えて、がん抑制遺伝子である p53 を分解するタンパク質の分解機能を抑制する治療用抗体を搭載させた MPN 複合体を用いて抗腫瘍効果を評価した。マウス乳がん細胞皮下移植マウスに対して治療用抗体サンプルを 3 回投与しつつ、腫瘍サイズの経時変化を測定することで、腫瘍増殖抑制効果を検討した。治療用抗体単体では有意な腫瘍増殖抑制効果は確認されなかった。これは、抗体が腫瘍内に集積しても細胞質へ移行できないため活性が制限されたためであると考えられる。一方、治療用抗体/PEG-TA/Fe³⁺ は治療用抗体単体と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果を示した(図 5a)。これは、腫瘍組織内に集積した後に細胞質へ移行させたため、搭載した治療用抗体が活性を示したためだと考えられる。また、サンプル投与による有意な体重減少などは見られなかったことから顕著な副作用はないと言える(図 5b)。最後に、この MPN 複合体の抗腫瘍効果が搭載した治療用抗体によって p53 の分解が抑制されたものであるかを確認するため、腫瘍切片を p53 抗体にて免疫染色して評価を実施したところ、治療用抗体搭載 MPN 複合体を投与したマウスの腫瘍切片から p53 抗体のマーカが検出された(図 5c)。これより、この腫瘍抑制効果は p53 が機能したことによるものと十分しめすことが出来た。

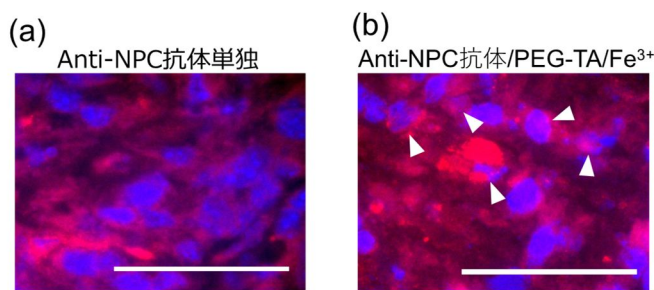


図 4. 抗体サンプルの腫瘍組織内局在(赤:抗体, 青:細胞核). (a)Anti-NPC 抗体, (b) Anti-NPC 抗体/PEG-TA/Fe³⁺ MPN 複合体

効果を評価するため、Anti-NPC 抗体に代えて、がん抑制遺伝子である p53 を分解するタンパク質の分解機能を抑制する治療用抗体を搭載させた MPN 複合体を用いて抗腫瘍効果を評価した。マウス乳がん細胞皮下移植マウスに対して治療用抗体サンプルを 3 回投与しつつ、腫瘍サイズの経時変化を測定することで、腫瘍増殖抑制効果を検討した。治療用抗体単体では有意な腫瘍増殖抑制効果は確認されなかった。これは、抗体が腫瘍内に集積しても細胞質へ移行できないため活性が制限されたためであると考えられる。一方、治療用抗体/PEG-TA/Fe³⁺ は治療用抗体単体と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果を示した(図 5a)。これは、腫瘍組織内に集積した後に細胞質へ移行させたため、搭載した治療用抗体が活性を示したためだと考えられる。また、サンプル投与による有意な体重減少などは見られなかったことから顕著な副作用はないと言える(図 5b)。最後に、この MPN 複合体の抗腫瘍効果が搭載した治療用抗体によって p53 の分解が抑制されたものであるかを確認するため、腫瘍切片を p53 抗体にて免疫染色して評価を実施したところ、治療用抗体搭載 MPN 複合体を投与したマウスの腫瘍切片から p53 抗体のマーカが検出された(図 5c)。これより、この腫瘍抑制効果は p53 が機能したことによるものと十分しめすことが出来た。

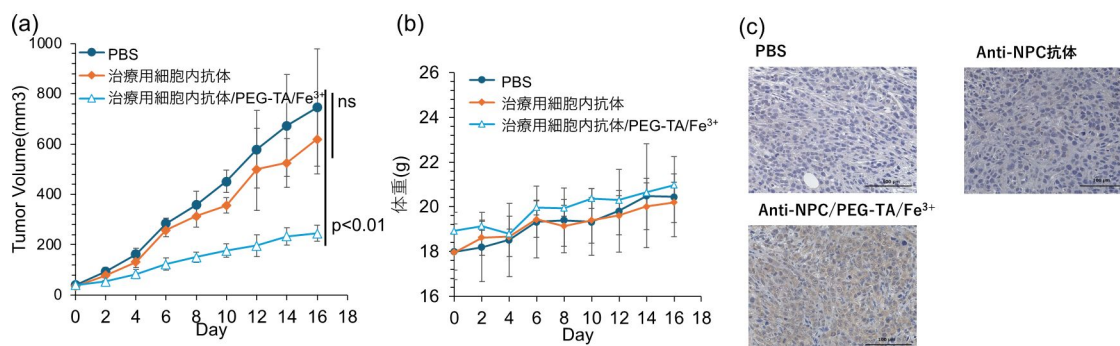


図 5. 抗腫瘍効果 (a)腫瘍増殖曲線(0, 4, 8 日目に乳がん細胞皮下移植マウスに対してサンプルを静脈内投与), (b)体重変化, (c)p53 免疫染色切片観察

今回、ポリフェノール導入高分子と金属イオンを組み合わせることで抗体の細胞質移行を促進する新規薬物送達システムを構築することに成功した。これらの結果を元に、2024 年 2 月に特許の出願を行った。今後は、本システムの対象疾病拡大および活性をさらに向上させるために、本 MPN 複合体に組織特異的に標的化する分子を搭載させ、評価を実施する予定である。

参考文献

[1] Dean Clift *et al.*, 2017, Cell 172, 1–15
 [2] Misao Akishiba *et al.*, 2017, Nat. Chem, 9, 751-761
 [3] Hiroataka Ejima, *et al.*, 2013, Science 341, 154
 [4] Jingqu Chen, *et al.*, 2019, ACS Nano, 13, 11653–11664
 [5]Yuto Honda *et al.*, 2021, ACS Appl. Bio Mater., 4, 10, 7402–7407

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sung Yi Jung, Guo Haochen, Ghasemizadeh Aria, Shen Xin, Chintrakulchai Wanphiwat, Kobayashi Motoaki, Toyoda Masahiro, Ogi Koichi, Michinishi Junya, Ohtake Tomoyuki, Matsui Makoto, Honda Yuto, Nomoto Takahiro, Takemoto Hiroyasu, Miura Yutaka, Nishiyama Nobuhiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Cancerous pH responsive polycarboxybetaine coated lipid nanoparticle for smart delivery of siRNA against subcutaneous tumor model in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4339 ~ 4349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15554	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Honda Yuto, Onodera Sayaka, Takemoto Hiroyasu, Harun Noor Faizah Che, Nomoto Takahiro, Matsui Makoto, Tomoda Keishiro, Sun Yudi, Miura Yutaka, Nishiyama Nobuhiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Thermo-Responsive Polymer-siRNA Conjugates Enabling Artificial Control of Gene Silencing around Body Temperature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 157 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-022-03414-8	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuto Honda, Haruna Haraguchi, Rui Ko, Takeru Tsuda, Yutaka Miura, Nobuhiro Nishiyama
2. 発表標題 Metal-Phenolic Network-Based Polymeric Nanocarrier Enhances Endosomal Escape and Anti-Tumor Effect of Intracellular Antibodies.
3. 学会等名 第40回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 黄若言, 津田雄流, 本田雄士, 三浦裕, 西山伸宏
2. 発表標題 金属-ポリフェノール錯体を基盤とした高分子複合体型CRISPR-Cas9 RNP送達システムの構築
3. 学会等名 第40回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体分子送達システム	発明者 本田雄士、西山伸 宏、黄若言、原口陽 菜	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-018594	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------