

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240075

研究課題名(和文) デンドロン脂質の自己組織化によるオンデマンド多機能統合型デリバリーシステムの創製

研究課題名(英文) Development of on-demand multifunctional delivery systems using dendron lipid assemblies

研究代表者

河野 健司 (Kenji, Kono)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90215187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,400,000円、(間接経費) 11,520,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内導入用デンドロン脂質、温度応答性デンドロン脂質、pH応答性デンドロン脂質、MRI可視化デンドロン脂質などの機能性デンドロン脂質を開発した。そして、それらの機能性デンドロン脂質の自己組織化によって、高効率遺伝子ベクター、pH応答とプロトンスポンジ機能の複合化による高効率細胞内デリバリーナノワクチン、pH応答と温度応答による多重刺激応答型標的細胞内デリバリーシステムなどの必要機能治療用ナノデバイス、を構築した。これらのナノデバイスは、新しい非侵襲医療技術の開拓につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed various types of functional dendron-bearing lipids, which include gene delivery dendron lipids, temperature-sensitive dendron lipids, pH-sensitive dendron lipids, and MR imaging dendron lipids. We found that gene delivery dendron lipids achieved highly efficient gene transfection into culture cells through hydrophobic interaction and proton sponge effect. Temperature-dendron lipids were shown to provide a new type of temperature-responsive vesicles that undergo morphology transition at a specific temperature. pH-Sensitive dendron lipids formed highly pH-responsive vesicles with egg yolk phosphatidylcholine that release contents in the endosome of a cell. MR imaging dendron lipids were useful for detection of bio-distribution and accumulation of liposomes, which can lead to personalized chemotherapy. The dendron lipid technology is expected to contribute development of new efficient noninvasive cancer therapy.

研究分野：総合領域

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：薬物伝達システム ナノ医療

1. 研究開始当初の背景

癌などの難治疾患に対する非侵襲治療法の有効性を高めることが急務である。現在、世界的に、デリバリー精度を高めるために、極めて多様な設計によって、温度応答機能、細胞内デリバリーのためのキャリアや発熱機能をもつ金属ナノ粒子、あるいはイメージング機能などを付与したキャリアの研究が進められている。このようなデリバリー機能を合目的に複合化することで、薬物デリバリーデバイス・治療デバイスとしての機能・性能は飛躍的に向上できると考えられ、機能の多重化の手法について、総括的な研究は行われていない。申請者らはこれまで、高分子と脂質との複合化という、世界的にも独自のアプローチによって高性能・高機能ナノキャリアについて研究を積み重ねてきた。

特に、申請者らが世界で初めて開発した球状高分子デンドリマーと脂質の融合分子であるデンドロン脂質は、球状のヘッド、多数の末端基、カプセル機能、プロトンスポンジ機能を持ち、また、疎水性鎖のために水中で自己集合する。このような特性を利用して、温度応答性デンドロン脂質、MRI可視化デンドロン脂質、デンドロン脂質遺伝子ベクターを開発した。このような研究を経て、デンドロン脂質が最適な機能性コンポーネントであり、その自己組織化によって、機能の複合化と協同化による、類例を見ない高機能な治療デバイスを構築できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、デリバリー・治療用デバイスとして必要な機能をもつ種々のデンドロン脂質を合成して、それらの機能性コンポーネントを自己組織化によって、ナノ微粒子化することによって、合目的な機能を多重化した、複合機能型ナノデバイスの開発について研究を推進する。

具体的には、まず、(A)表面安定化機能デンドロン脂質、(B)刺激(温度またはpH)応答機能デンドロン脂質、(C)物理応答(発熱)機能デンドロン脂質、(D)イメージング機能デンドロン脂質、4種の機能コンポーネント素子を作製する。そして、それらの分子の自己組織化と薬物・核酸医薬・抗原タンパク質によって、()pH応答とプロ

トンスポンジ機能の複合化による高効率細胞内デリバリーナノワクテン、()pH応答と温度応答による多重刺激応答型標的細胞内デリバリーシステムとパーソナル化学治療への展開、()温度応答機能と光誘導発熱機能による化学治療効果(抗癌剤)・物理治療効果(発熱)融合型治療用ナノデバイス、を構築し、その治療デバイスとしての性能を、基礎的な物性実験、腫瘍細胞を用いた *in vitro* 実験およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験によって明らかにする。これらの研究を経て、機能性デンドロン脂質のナノ組織化のアプローチに基づく複合機能型ナノデバイスの構築法を確立し、新しい非侵襲医療技術の開拓に繋げることを試みた。

3. 研究の方法

本研究は、温度応答機能、pH応答機能、発熱機能、およびイメージング機能をもつデンドロン脂質を、4種の機能コンポーネントとして作製した。そして、それらの分子の自己組織化と薬物、核酸、抗原タンパク質の内包化によって、高効率細胞内デリバリーナノワクテン、イメージング機能と温度・pH応答機能によるパーソナル癌化学治療用デリバリーキャリアを構築し、その治療デバイスとしての性能を、基礎的な物性実験、腫瘍細胞を用いた *in vitro* 実験およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験によって検討した。

4. 研究成果

4-1. 遺伝子デリバリーのための新しいデンドロン脂質の開発

これまでに開発されたデンドロン脂質遺伝子ベクターを基にして、その活性向上を目指した。デンドロン部の世代数と末端構造、およびアルキル鎖の飽和度の影響を検討した。

これらのデンドロン脂質の遺伝子導入活性に及ぼすデンドロン世代数の影響について調べた。第1世代から第3世代のデンドロンをもつデンドロン脂質は、その世代数の増大とともに、プラスミドDNAとの複合体形成能が増大した。しかし、これらのデンドロン脂質とプラスミドDNAとの複合体(リポブレックス)をHeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来)に加えて遺伝子(ルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク)発現を調べたところ、その効率は、デンドロン部位の世代数の低下とともに遺

伝子発現効率が增大することがわかった。また、アルキル鎖部分の飽和度の影響を調べ、飽和鎖（オクタデシル基）をもつデンドロン脂質に比べて、不飽和鎖（オレイル基）をもつデンドロン脂質の方が一般に高い遺伝子導入活性を示した。

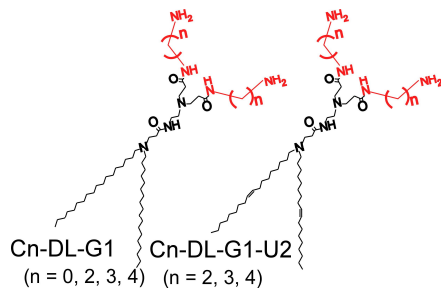


図1. デンドロン脂質の化学構造。

そこで次に、第1世代のポリアミドアミンデンドロンを極性基として、末端構造および飽和度の異なるアルキル鎖をもつ2つのシリーズのデンドロン脂質を合成した(図1)。これらのデンドロン脂質の遺伝子導入活性と末端基疎水性度の相関について調べた(図2)。飽和型デンドロン脂質および不飽和型デンドロン脂質のいずれについても、末端部位のメチレン基の数が3のときに最も高い遺伝子導入活性を示した。このことは、デンドロン脂質末端部位に適切な疎水性度をもたせることで効率の良い遺伝子導入ができることを示している。末端疎水性を最適化した不飽和型デンドロン脂質は、これまで得られたデンドロン脂質の中で最も高い遺伝子導入活性を示したことから、その実用化が期待できる。

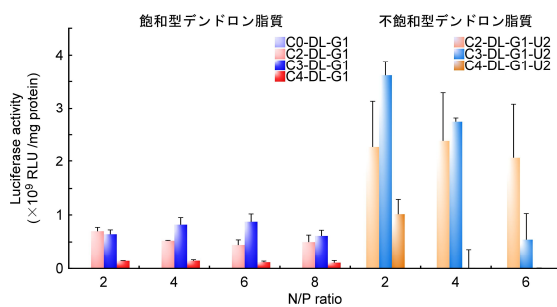


図2. 末端疎水性度の異なる種々のデンドロン脂質の遺伝子導入活性。

4-2. 温度応答性デンドロン脂質の開発

我々はこれまでに、デンドリマーの末端基に温度応答性高分子の側鎖構造を結合することで温度応答性デンドリマーの構築に成功している。そこで、この戦略をデンドロン脂質集合体に拡張することを試みた。デンドロン

脂質のデンドロン末端にイソブチルアミド基を結合し、その水中で形成されるデンドロン脂質集合体の温度応答性を調べた。その結果、これらのデンドロン脂質集合体は、低温においては分散するが、特定の温度において凝集する、温度応答挙動を示した。また、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた形態観察から、このデンドロン脂質集合体は、温度に回答してベシクル構造からヘキサゴナル構造に転移することがわかった。これは、ベシクル表面上に配列した温度応答性基が特定の温度において脱水和することで、その表面特性が変化し、構造転移したものと考えられる。この様に、デンドロン脂質を用いることで、温度に鋭敏に回答して構造転移する新しいタイプの温度応答性分子集合体を得ることに成功した。

温度応答性デンドロン脂質集合体の薬物キャリアとしての応用を検討するために、薬物保持機能や細胞との相互作用の温度制御について検討した。このデンドロン脂質集合ベシクルに蛍光色素カルセインを複合化し、HeLa細胞との相互作用について検討した。転移温度以下においてはデンドロン脂質ベシクルは細胞に取り込まれなかったが、転移温度以上においては、細胞に効率よく取り込まれ、また複合化させたカルセイン分子が細胞内部に放出されることがわかった。

温度応答性デンドロン脂質ベシクルの薬物キャリアへの応用を目指し、生体適合性に優れた温度応答性基としてオリゴエチレングリコール鎖を導入したデンドロン脂質を作製した。いずれのデンドロン脂質集合体も特定の

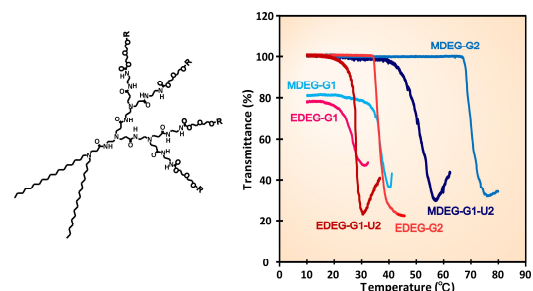


図3. オリゴエチレングリコールを結合したデンドロン脂質の化学構造とその集合体の温度応答挙動。末端のRはメチル基あるいはエチル基。

温度において凝集し温度応答特性を示した。また、末端基がメチル基のものに比べてエチル基のものは転移温度が低下する傾向を示し、また、デンドロン部位の世代数が大きくな

るとともに、転移温度は上昇する傾向を示した(図3)。オリゴエチレングリコール結合温度応答性デンドロン脂質ベシクルも、加温によって細胞への結合が強く促進されたことから、薬物キャリアとしての利用が期待される。

4-3. 温度応答性デンドロン脂質を用いたデュアルシグナル応答性ベシクルの開発

温度応答性デンドロン脂質とアニオン性リン脂質との混合脂質を水溶液中に分散させると、その転移温度は、pHによって変化した。また、ベシクルの転移温度は、その脂質組成によってコントロールすることができた。これは、デンドロン脂質の内部3級アミンの荷電状態がpHによって変化するためである(図4)。このベシクルは、中性条件下、体温において転移温度以下カルセインを内部に封入したが、微弱酸性において転移温度が体温以下に低下すると急激に転移して内包物を一気に放出した。また、同条件において細胞との相互作用を観察したところ、微弱酸性において強く細胞に結合して内包物を細胞内に導入することがわかった(図5)。このベシクルは、腫瘍などの微弱酸性環境において細胞に結合して薬物を細胞内に導入する腫瘍特異性キャリアとしての利用が期待できる。

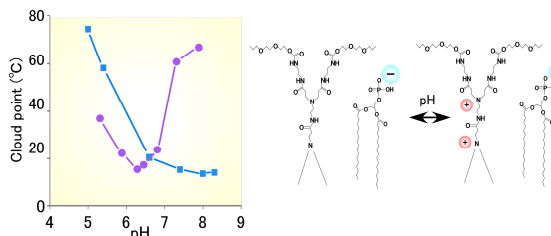


図4 .デュアル応答性ベシクルの転移温度のpH依存性とそのメカニズム。

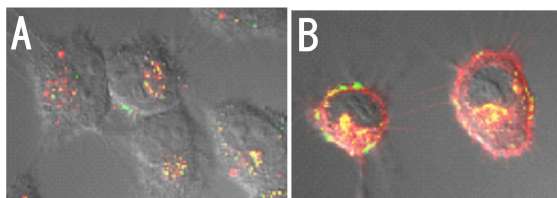


図5 .デュアルシグナル応答性ベシクルとHeLa細胞との相互作用。A: pH7.4、B: pH6.8.ベシクル膜はDil(赤色)、カルセインは緑色で示される。

4-4 . pH応答性デンドロン脂質ベシクルの開発と免疫治療への応用

デンドロン脂質の末端にpH応答性基としてメチルグルタル酸(MGIu)基やシクロヘキサン

カルボン酸(CHex)基を導入することで、pH応答性デンドロン脂質を合成した(図6)。これらのデンドロン脂質は水中でミセル様集合体を形成し、また、弱酸性で強く凝集した。これらのpH応答性デンドロン脂質と卵黄ホスファチジルコリンからなるリポソームは、pH6以下において内包物を放出し、特にCHex基をもつデンドロン脂質は強いpH応答性を示した(図7)。

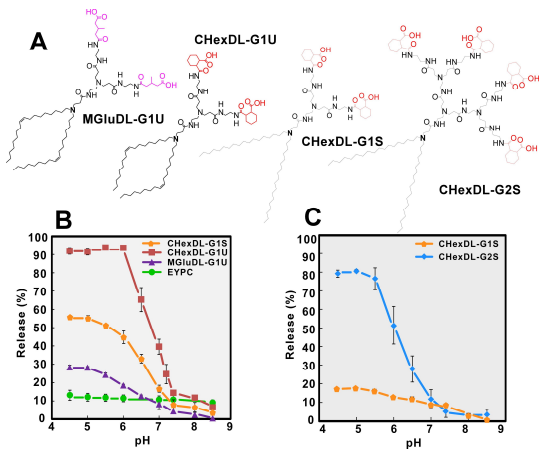


図7 . pH 応答性デンドロン脂質の構造(A)とそれらと卵黄ホスファチジルコリンの混合ベシクルの pH 応答性内包物(カルセイン)放出挙動。末端基およびアルキル鎖の異なる pH 応答性デンドロン脂質(B)および世代数の異なる pH 応答性デンドロン脂質(C)含有ベシクルのカルセイン放出挙動。

これらのpH応答性ベシクルの細胞内デリバリーシステムとしての機能について検討した。膜脂質をローダミン脂質でラベル化したカルセイン内包ベシクルを作製し、HeLa細胞に取り込ませた後、細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図8)。いずれのベシクルも細胞に取り込まれたが、細胞内部におけるカルセイン放出挙動が異なることがわかる。pH応答性をもたない卵黄ホスファチジルコリンベシクルやpH応答性が弱いMGIu基をもつデンドロン脂質ベシクルは、細胞内部においてカルセインを放出しない。しかし、鋭敏なpH応答性を示したCHex基をもつデンドロン脂質ベシクルは、細胞内部でカルセインを放出した。また、カルセインの蛍光はベシクルと同じ位置に存在することから、ベシクルはエンドソーム内部においてカルセインを放出していることがわかった。

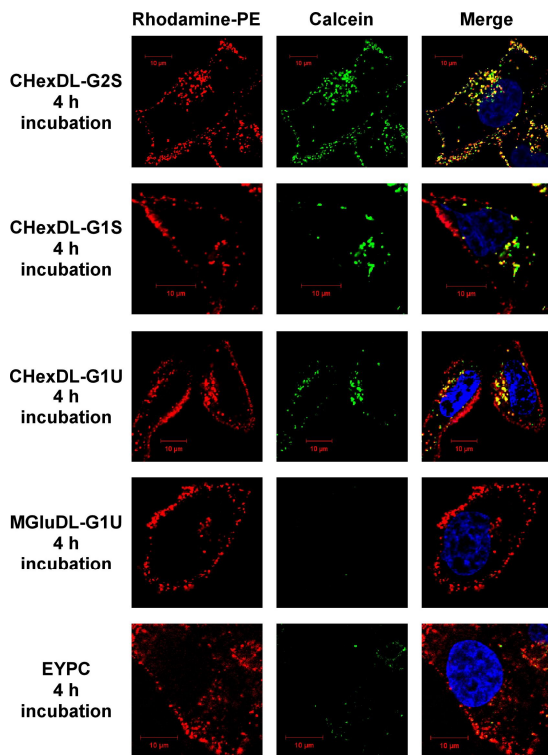


図8 . pH 応答性デンドロン脂質/卵黄ホスファチジルコリンベシクルの細胞内におけるカルセイン放出挙動。

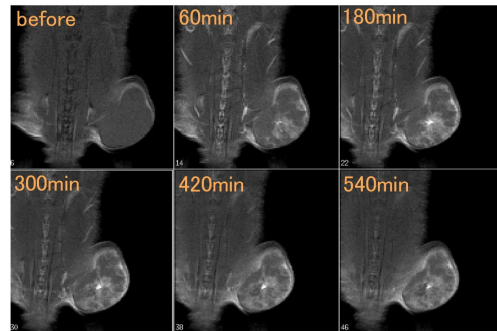
さらに、これらのpH応答性デンドロン脂質ベシクルのがん免疫治療への応用について検討した。卵白アルブミン (OVA) を内包したデンドロン脂質ベシクルを、EG7.OVA細胞腫瘍をもつマウスに投与し、その腫瘍縮退効果を調べた。その結果、特に高いpH応答性を示したCHexデンドロン脂質ベシクルを投与することで効果的に腫瘍が縮退した。pH応答性デンドロン脂質ベシクルが免疫を制御する樹状細胞に取り込まれてそのエンドソーム内部で抗原たんぱくを放出することで効率よく抗腫瘍免疫を誘導したものと考えられる。この結果は、pH応答性デンドロン脂質ベシクルがワクチンデリバリーシステムとして有用であることを示している。

4 - 5 .MRI造影デンドロン脂質を用いる多重機能ベシクルの開発

MRIで検出できるデンドロン脂質として、ガドリニウムキレート を 8 残基結合したG3デンドロン脂質を合成し、ポリエチレングリコール修飾リポソームに導入した。また、腫瘍血管への特異性を有するcRGDを担持させた。このリポソームをCol on26細胞腫瘍をもつマウスに投与し、その腫瘍での集積挙動をMRIによって追跡した (図9) 。その結果、時間の経

過とともに腫瘍部位におけるMRIのシグナル強度が増大し、リポソームの集積が起こっていることがわかった。また、cRGDを担持させていないリポソームを投与した場合、腫瘍におけるMRIシグナル強度が顕著に低かったことから、このリガンドがリポソームの腫瘍集積性を向上させていることがわかった。

(A) cRGD (+) - Gd liposome



(B) cRGD (-) - Gd liposome

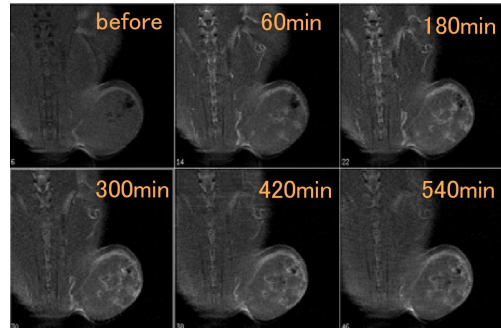


図9 .ガドリニウムデンドロン脂質を含有する cRGD 担持 (A) または非担持 (B) PEG 修飾リポソームの腫瘍への集積の経時変化。

さらに、このリポソームに抗癌剤ドキソルビシンを包埋し、また、温度応答性ポリマーで修飾して温度応答性を付与した。このリポソームを担癌マウスに投与し、8時間後に腫瘍局所を加温すると、腫瘍が強く抑制された。局所加温を行わない場合やcRGDをもたないリポソームを投与した場合、抗腫瘍効果は顕著に低かったことから、リポソームの効果的な集積と局所加温による病巣での抗癌剤の放出が強いがん抑制効果を発現するのに必要であることがわかる。

本研究を遂行することで、細胞内部へのデリバリーや癌局所へのデリバリーを実現するデンドロン脂質技術を新たに創製することができた。これらのナノバイオ技術は、パーソナル医療や非侵襲医療の実現に貢献するものと期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

X. Li, K. Takeda, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, “Preparation of PEG-modified PAMAM dendrimers having gold nanorod core and their application to photothermal therapy”, **J. Mater. Chem. B**, **2**, 4167-4176 (2014). (査読有)

X. Li, M. Takashima, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, “PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugate-hybridized gold nanorod for combined photothermal-chemotherapy”, **Biomaterials**, **35**, 6576-6584 (2014). (査読有)

S. Watarai, T. Iwase, T. Tajima, E. Yuba, K. Kono, Y. Sekiya, Application of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes for development of mucosal vaccines, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **158**, 62-72 (2014). (査読有)

K. Kono, E. Murakami, Y. Hiranaka, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, K. Sakurai, Thermosensitive molecular assemblies from PAMAM dendron-based lipids, **Angew. Chem. Int. Ed.**, **50**, 6332-6336 (2011). (査読有)

K. Kono, S. Nakashima, D. Kokuryo, I.Aoki, H. Shimomoto, S. Aoshima, K. Maruyama, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, Y. Ishizaka, Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy, **Biomaterials**, **32**, 1387-1395 (2011). (査読有)

〔学会発表〕(計 48件)

K. Kono, Dendron lipids for preparation of functional carrier systems, 8th International Dendrimer Symposium (Invited), 2013.6.23, Madrid, Spain.

K. Kono, K. Takeda, X. Li, E. Yuba, A. Harada, Dually functionalized dendrimers by temperature-sensitive surface modification and gold nanoparticles loading for photothermal therapy, ICBS2013, 2013.3.19, Tsukuba, Japan

K. Kono, Preparation of highly pH-responsive liposomes and their use as gene vector and vaccine, IUPAC 8th International Conference on Novel Materials and Synthesis (Invited), 2012.10.14, Xi'an, China.

K. Kono, Stimuli-sensitive liposomes for drug delivery, CIMTEC2012 (Invited), 2012.6.10, Montecatini Terme, Italy.

K. Kono, Design of stimuli-sensitive dendrimers, dendrimer-gold hybrids and dendrimer-based assemblies for biomedical applications, The 7th International Dendrimer Conference (Invited), 2011.6.29, Washington DC, USA

〔図書〕(計 3 件)

E. Yuba, K. Kono, Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals, Springer Science, New York, pp. 197-220 (2014)

河野健司、先端バイオマテリアル、エヌ・ティー・エス、pp. 347-357 (2012).

弓場英司、河野健司、ドラッグデリバリーシステムの新展開 II - 核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術 -、シーエムシー、pp. 189-197 (2012).

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：pH 応答性化合物、それを含有する組成物及びキット、並びにそれらの使用

発明者：河野健司

権利者：大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2012-110915

出願年月日：2012 年 5 月 14 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka9/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 健司 (KONO, Kenji)

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90215187

(2)研究分担者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)

放射線医学総合研究所・分子イメージング

研究センター・チームリーダー

研究者番号：10319519

渡来 仁 (WATARAI, Shinobu)

大阪府立大学・大学院生命環境研究科・

准教授

研究者番号：10319519