

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590054

研究課題名(和文) リガンドの新規修飾方法によるがんターゲティングナノ製剤の開発

研究課題名(英文) Development of targeting liposomal drugs using functional coating a folate-polymer conjugate

研究代表者

米谷 芳枝 (MAITANI, Yoshie)

慶應義塾大学・薬学部・研究員

研究者番号：10231581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：リポソームとリガンド高分子との新規な修飾方法を確認して、がんターゲティングナノ粒子製剤を開発した。Layer-by-layer (LBL) 法を応用して、葉酸結合率の異なる2種類の葉酸結合ポリ-L-リシンを合成して、負電荷のドキソルビシン封入リポソームに静電的に被覆した。この製剤は葉酸受容体高発現KB細胞に対して選択的な取り込みと細胞毒性を示した。また、従来の葉酸PEG修飾リポソームとは異なり、葉酸修飾率の高い高分子被覆リポソームのほうが、低い修飾率のものよりKB細胞に取り込まれ、修飾方法によって葉酸の表面分布状態が異なることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The tumor targeting of anticancer drugs is important in chemotherapy to reduce serious side-effect for patients. Folate-polymer-coated liposomes were developed for targeted chemotherapy using doxorubicin (DXR) as a model drug. Folate-poly(L-lysine) (F-PLL) conjugates were synthesized. DXR-loaded anionic liposomes were coated with F-PLL, using Layer-by layer method. In KB cells overexpressing folate receptors, F-PLL-coated liposomal DXR increased the cellular association and cytotoxicity compared with that of PLL-coated liposomes. Differently in folate-PEG modified liposome, higher folate conjugated PLL-coated liposome showed higher KB cellular uptake, suggesting different distribution of folate at the surface of liposomes.

Folate-targeted liposomes were prepared successfully by coating the folate-polymer-conjugate F-PLL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ターゲティング ナノ製剤 リポソーム リガンド がん治療 葉酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗がん薬のナノ粒子製剤として、血中滞留性リポソーム製剤が既に販売されている。さらに、この製剤にがん細胞ターゲティング能を付与することによって、がん集積性を改善し、高い治療効果が期待できる。

(2) 腫瘍選択的リガンドで修飾したリポソーム製剤については開発段階である。リガンド修飾は受容体に多価性認識されるので、リガンドとナノ粒子との結合状態が受容体への認識性に影響することも明らかになっている。申請者は、これまでに受容体に認識されやすい葉酸修飾ナノ粒子製剤を設計してきた。

2. 研究の目的

がん化学療法の究極的な製剤は、腫瘍への選択性を付与したターゲティング製剤である。本研究では、リポソームの新規葉酸修飾方法としてコーティング技術の一つである Layer-by-layer (LBL) 法を応用した方法を確立して、がんターゲティングリポソーム製剤の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) リガンド結合高分子化合物の合成: 葉酸とポリ-L-リシン (PLL, MW: 30,000~70,000) から EDC を用いた脱水縮合反応により、葉酸結合 PLL を合成した。

(2) リガンド修飾リポソーム製剤化: ドキソルビシン(DXR)を pH 勾配法でリポソーム (HSPC, DPPC, コレステロール, 硫酸

コレステロール) に封入し、合成した葉酸結合 PLL、または PLL で被覆した。さらにこの被覆リポソームを負電荷高分子 (コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸) で被覆した。pH 感受性リポソーム(DPPC, DOPE) も調製した。葉酸 PEG 修飾リポソームでは、DXR 封入リポソームに葉酸 PEG 脂質溶液を添加後、インキュベーションした。

(3) 葉酸修飾リポソーム製剤の評価では、葉酸受容体の高発現した KB 細胞の取り込みをフローサイトメーター、共焦点顕微鏡や DXR の細胞毒性から調べた。In vivo では、担がん動物に製剤を静脈内投与して、体内動態と抗腫瘍効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 葉酸結合ポリ-L-リシンの合成: 高葉酸結合率のポリ-L-リシン(F-PLL)の収率は 96%、低葉酸結合率のポリ-L-リシン(F-PLL (low))は 62%であった。葉酸と PLL 結合は ¹H NMR と UV で確認した。F-PLL では葉酸が PLL の epsilon -アミノ残基に対し 50%結合するように添加したが、得られた F-PLL の葉酸結合率は 16.7 mol%であった。また、F-PLL (low) では葉酸が PLL のアミノ残基に対し 30%結合するように添加したが、葉酸結合率は 9.5 mol%であり、それぞれ添加量の約 1/3 の結合率となった。葉酸 PEG₅₀₀₀ 脂質は収率 61%、葉酸結合率は 105%であった。粒子径~120nm の F-PLL と F-PLL (low) の被覆リポソームでは、それぞれ 6.9mol%、4.5mol%の葉酸修飾率に相当した。

(2) 葉酸高分子被覆リポソーム製剤の調製：総脂質濃度 6.66 mg/mL の DXR 封入負電荷リポソーム懸濁液 500 μ L に、1 mg/mL の正電荷 F-PLL または PLL 水溶液 500 μ L を添加して静電的に表面吸着させた(図 1)。葉酸高分子の被覆はリポソームの表面電位が負電荷から正電荷に反転することによって確認した。

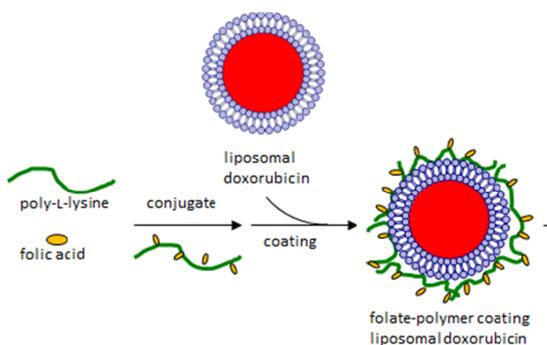


図 1 . 葉酸結合ポリ-L-リシン被覆リポソーム

(3) 葉酸高分子被覆リポソーム製剤の *in vitro* 評価：製剤は葉酸受容体高発現 KB 細胞に対して選択的な取り込みと細胞毒性を示した。また、葉酸修飾率の高い F-PLL で被覆したリポソームが、低い修飾率の F-PLL (low) 被覆リポソームより KB 細胞に取り込まれた(図 2)。この結果は、葉酸 PEG 修飾リポソームでは最適葉酸修飾率が比較的低い 0.03 mol%であったことと異なった。細胞内取り込みでは、F-PLL 被覆リポソーム製剤は葉酸 PEG 修飾リポソームとほぼ同じであったが、細胞毒性は 15 倍低い結果となった。

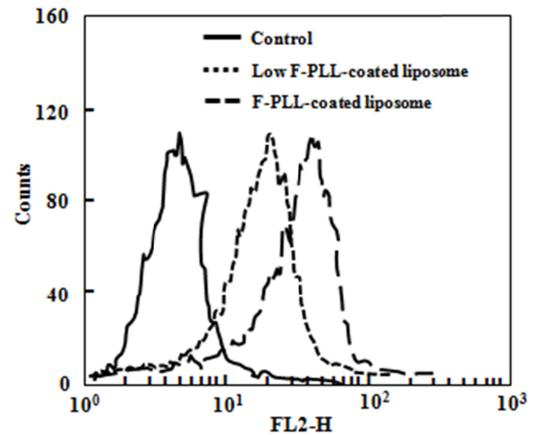


図 2. F-PLL または low F-PLL 被覆リポソームの KB 細胞内取り込み

(4) *in vivo* での腫瘍集積性と薬物動態試験：マウスに各リポソーム製剤を静脈内投与して体内動態を調べた。その結果、F-PLL 被覆リポソーム製剤は、未被覆リポソームとほぼ同様な血中濃度パターンを示した。しかし、高投与量を投与すると毒性がみられた。これは、F-PLL 被覆リポソーム製剤はリシンによって正電荷製剤になっているためと推察された。

薬効試験では、KB 担がんマウスに F-PLL 被覆リポソーム製剤を静脈内投与して、抗腫瘍効果を評価した結果、未修飾製剤と有意な差は見られなかった。従って、F-PLL リポソーム製剤は細胞内に受容体を介して取り込まれた後に、十分に放出していない可能性が考えられた。

F-PLL 被覆リポソーム製剤の表面を負電荷高分子でさらに被覆して、負電荷リポソームにすることや、負電荷 pH 感受性リポソームに F-PLL 被覆することによって、製剤の安全性や薬物の放出も改善できる可能性も検討した。

LBL法を応用した葉酸高分子被覆ナノ製剤の新規調製法を確立して、がんターゲティングナノ粒子製剤を開発した。従来の葉酸 PEG 修飾リポソームとは異なり、葉酸修飾率の高い高分子被覆リポソームのほうが、低い修飾率のものより KB 細胞に取り込まれ、葉酸の表面分布状態が修飾方法によって異なることが推察された。リガンド高分子被覆法は、リポソームのような脂質粒子だけでなく、他の粒子にも利用できることから、有用性は高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

K. Kawano, Y. Hattori, H. Iwakura, T. Akamizu and Y. Maitani, Combination therapy with gefitinib and doxorubicin inhibits tumor growth in transgenic mice with adrenal neuroblastoma: *Cancer Medicine*, 査読有, 2(3):286-295 (2013). doi: 10.1002/cam4.76

K. Watanabe, M. Kaneko and Y. Maitani. Functional coating of liposomes using a folate-polymer conjugate to target folate receptors: 査読有, *Int. J. Nanomedicine*, 7: 3679-3688 (2012). doi: 10.2147/IJN.S32853

Y. Iwase and Y. Maitani. Dual functional octreotide-modified liposomal irinotecan leads to high therapeutic efficacy for medullary thyroid carcinoma xenografts: 査読有, *Cancer Sci.*, 103 (2): 310-316 (2012). doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02128.x.

[学会発表] (計 4 件)

伊東賢之介、野村優、服部喜之、米谷芳枝、ヒアルロン酸コーティングpH感受性リポソームのCD44ターゲティング能と薬物放出性 日本薬剤学会 第28年会名古屋 2013年5月23-25日

金子洵、渡辺和男、米谷芳枝、葉酸結合ポリマーコーティングリポソームの開発 日本薬学会 第132年会北海道、2012年3月28-31日

Y. Maitani and K. Kawano, Functional nanoparticles for cancer chemotherapy: The 10th France-Japan DDS Symposium, Bordeaux, France, October 10-13, 2012.

Y. Maitani, Functional nanoparticles for cancer therapy: The 18th International Symposium on Microencapsulation, Antalya, Turkey, September 12-14, 2011.

[図書] (計 1 件)

Y. Maitani: Folate receptor-mediated therapeutics: Vitamin-Binding Proteins : Functional Consequences, edited by K. Dakshinamurti, CRC Press/Taylor & Francis Group, pp. 229-239 (2013).

6. 研究組織

研究代表者

米谷 芳枝(MAITANI Yoshie)
慶應義塾大学・薬学部・研究員
研究者番号：10231581