

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790056

研究課題名(和文) 生体イメージングのための脂質ナノディスクの開発

研究課題名(英文) Development of lipid nanodisk for bioimaging applications

研究代表者

田中 将史 (Tanaka, Masafumi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：造影剤や放射性同位元素を用いた画像診断において、それらを目的部位に集積させることが、診断の正確性や安全性を高めるうえで重要である。本研究では、生体内にも存在するリポタンパク質(いわゆる善玉コレステロール)に類似した構造をもつ脂質ナノディスクを調製し、物理化学的特性評価を行うとともに、機能性修飾による腫瘍細胞への集積を目指した。その結果、機能性を付与することで一部、腫瘍細胞への集積性向上が認められたが、今後さらなる検証を加えることで、イメージングツールとしてのより洗練されたデザインが可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent developments of bioimaging techniques in the field of medical sciences, especially in radionuclide imaging such as magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET), make these techniques essential for highly advanced medicine. However, to enhance the accuracy and safety of these diagnostic imaging, accumulation of contrast agents or radioisotopes to a target disease site is currently one of the great issues. In the present study, we prepared lipid nanodisk mimicking a plasma lipoprotein for physicochemical characterization and aimed to enhance the accumulation in tumor cells by functional modifications. We have partly succeeded in improving tumor accumulation, but further consideration will enable us to develop more sophisticated lipid nanodisks.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：脂質ナノディスク アポリポタンパク質 生体イメージング フラグメントペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

脂質ナノディスクとは、リポソームと同じく脂質二分子膜構造でありながら、その周囲をアポリポタンパク質が取り囲んだ生体内にも存在する脂質タンパク質複合体である。細胞膜に類似した構造をもつリポソームは生体適合性に優れ、ドラッグキャリアとして実用化されている。同様に、HDLに類似した構造をもつ脂質ナノディスクも生体適合性に優れていると予想され、機能性を高めることでナノバイオツールとして応用可能であると考えられる。しかしながら、生体イメージングツールとしての開発を視野に入れた脂質ナノディスクに関する検討はほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

機能性を有するリン脂質誘導体やアポリポタンパク質類似ペプチドを用いて脂質ナノディスクを作製し、その物理化学的特性を調べるとともに、機能性と生体適合性を兼ね備えたイメージングツールとしての応用を目指すことを目的とする。イメージングのターゲットとしてまずは腫瘍細胞に過剰発現するとされる葉酸レセプターと LDL レセプターを選択する。

## 3. 研究の方法

(1) 合成ペプチドのディスク粒子形成能評価  
アポ A-I 分子の脂質結合領域を含むペプチドおよびアポ E 分子の LDL レセプター結合領域を含むペプチド (LpA ペプチド) を作製する。リン脂質 (ジミリスチルホスファチジルコリン) からなるマイクロメートルサイズのリポソームに、膜可溶化能のあるペプチドを添加すると、十ナノメートル程度のディスク粒子が自発的に形成される。粒子サイズの変化に伴う吸光度 (濁度) の変化をモニターすることで、各ペプチドのディスク粒子形成能を評価する。

(2) 粒子調製条件の検討と粒子物性の評価  
脂質ナノディスクの調製方法として、自己集合法と界面活性剤除去法の主に2つある。自己集合法は簡便であるが、使用可能なリン脂質分子種が制限されるという欠点をもつ。構成脂質として機能性を有するリン脂質誘導体なども用いることから、一般性を考慮して界面活性剤除去法による粒子調製を行う。ゲルろ過分析、組成分析、粒子サイズ測定、円二色性 (CD) スペクトル測定、熱変性測定により、調製した脂質ナノディスクの物性を評価する。

(3) 機能性リン脂質誘導体の合成

アミノ PEG 化リン脂質 (アミノ PEG 化 DSPE) に、縮合剤の存在下、葉酸を反応させ

る。薄層クロマトグラフィーおよびニンヒドリン試験により縮合反応の進行を確認する。遠心分離および透析により、副生成物や未反応の葉酸を除去し、目的物の生成を確認する。

(4) インジウム ( $^{111}\text{In}$ ) 標識条件の検討

キレート剤を結合したリン脂質 (DTPA-DSPE) を脂質ナノディスクに導入し、インジウム ( $^{111}\text{In}$ ) を反応させる。インキュベーション時間や温度を変化させて標識を行い、ゲル濾過によって未反応の  $^{111}\text{In}$  を分離する。リン脂質と  $^{111}\text{In}$  それぞれのゲル濾過プロファイルの結果に基づき、 $^{111}\text{In}$  の標識条件を検討する。

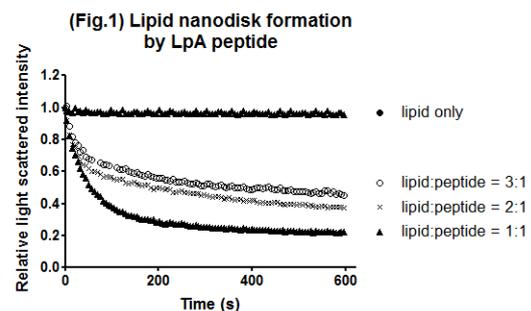
(5) 腫瘍細胞への集積性評価

24 穴あるいは 6 穴プレート上に腫瘍細胞 (葉酸レセプターを介する取り込みは MCF7、LDL レセプターを介する取り込みは HepG2) を播種し、1 日間あるいは 2 日間前培養する。リポソームあるいは脂質ナノディスクと一定時間インキュベーション後、上清を回収し、細胞を可溶化する。 $^{111}\text{In}$  で標識した脂質ナノディスクは カウンタで、ローダミン (蛍光) 標識した脂質ナノディスクは蛍光光度計で、取り込み割合を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 合成ペプチドのディスク粒子形成能評価

アポ A-I ペプチドはリン脂質に対して少なくとも 4 分の 1 (重量比) 以上でディスク粒子の形成が認められた。また、新規に合成した LpA ペプチドを用いた場合も、リン脂質に対して少なくとも 3 分の 1 (重量比) 以上でディスク粒子が形成されることが明らかとなった (Fig.1)。

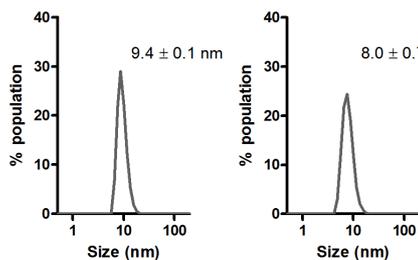


(2) 粒子調製条件の検討と粒子物性の評価

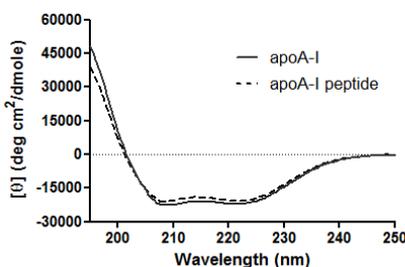
まず初めに、アポ A-I ペプチドを用いて脂質ナノディスクを作製し、全長アポ A-I を用いた脂質ナノディスクとの物性比較を行った。ジミリスチルホスファチジルコリンを脂質成分として用いた場合、アポ A-I ペプチドを用いた脂質ナノディスクは、粒子径、ペプチドの二次構造、熱安定性の点において、アポ A-I を用いた場合と同等の物性を示すことが判明した (Fig.2a-c)。また、脂質をパル

ミトイルオレイルホスファチジルコリンに変更した場合も同様の結果が得られたことから、脂質の種類に関わらずアポ A-I ペプチドにより脂質ナノディスクを作製できる可能性が示された。また、LpA ペプチドもアポ A-I ペプチドと同じ濃度条件で粒子径やペプチドの二次構造の点において、同等の物性を示す脂質ナノディスクを得ることに成功した。

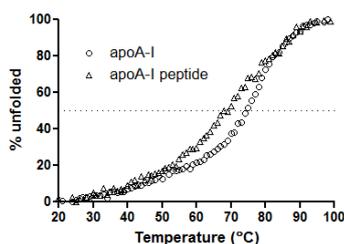
(Fig.2a) Comparison of particle sizes of lipid nanodisks (left: apoA-I, right: apoA-I peptide)



(Fig.2b) CD spectra of apoA-I and apoA-I peptide bound to lipid nanodisks



(Fig.2c) Thermal denaturation of apoA-I and apoA-I peptide bound to lipid nanodisks



### (3) 機能性リン脂質誘導体の合成

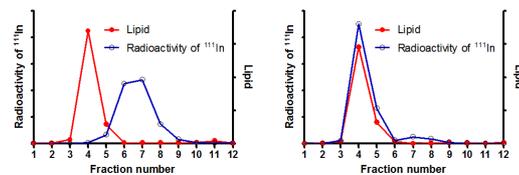
リン脂質への機能性付与を目的として、PEG 化 DSPE に葉酸修飾を行った。反応後、クロロホルム/メタノール/水混液 (75 : 36 : 6) を展開溶媒とするシリカゲル 60 F254 薄層クロマトグラフィー上に反応物とは異なるスポット ( $R_f=0.55$ ) の生成を認め、ニンヒドリン試験では陰性を示した。生成物中の葉酸由来の UV 吸収から、葉酸修飾リン脂質をほぼ 100% の収率で得られたことを確認した。なお、PEG 化していない DSPE のアミノ基に葉酸修飾を試みたが、NMR と質量分析にて目的物の生成は確認されなかった。

### (4) インジウム ( $^{111}\text{In}$ ) 標識条件の検討

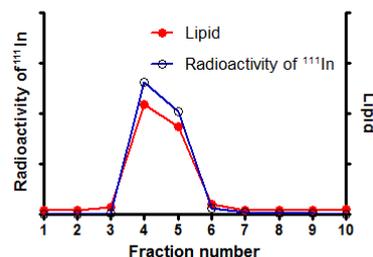
まず、リポソームを用いて検討を行った。

DTPA-DSPE を含まないリポソームは  $^{111}\text{In}$  と非特異的な相互作用による結合を示さず、DTPA-DSPE を含むリポソームに対して  $^{111}\text{In}$  がキレート形成して結合することが示された (Fig.3a)。次に、脂質ナノディスクが 37 度と比較して 4 度でより安定であるという結果を踏まえ、安定性に影響を及ぼさない標識条件を検討した。その結果、4 度で 24 時間インキュベーションすることで効率よく標識することが可能であると分かった。実際、この条件で脂質ナノディスクを標識したところ、粒子径に影響することなく  $^{111}\text{In}$  を標識することに成功した (Fig.3b)。

(Fig.3a) Gel filtration profile of liposomes (left: without DTPA-DSPE, right: with DTPA-DSPE)



(Fig.3b) Gel filtration profile of lipid nanodisks



### (5) 腫瘍細胞への集積性評価

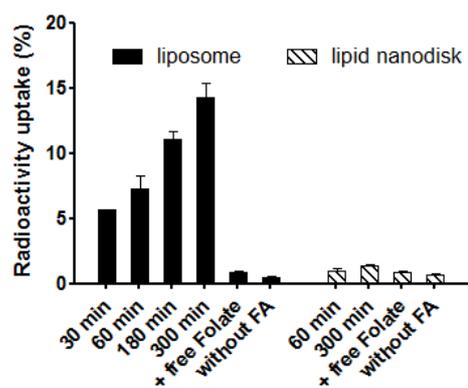
リポソームは葉酸修飾によって MCF7 細胞への時間依存的な取り込みが認められた。また、この取り込みが遊離の葉酸を培地に添加することで阻害されたことから、葉酸レセプターを介した取り込みであることが示唆された。しかしながら、アポ A-I ペプチドを用いた脂質ナノディスクは葉酸修飾したにもかかわらず MCF7 細胞への取り込みは認められなかった (Fig.4)。

一方、大腸菌発現によって得た全長アポ E を用いた脂質ナノディスクは通常培養条件においても HepG2 細胞への取り込みが認められたが、LDL レセプターの発現が増加するとされる条件においては取り込みが約 2 倍に増加した。同様に、LpA ペプチドを用いた脂質ナノディスクは、脂質濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においては培養条件の違いにより取り込みが約 4 倍に増加した。しかしながら、LpA ペプチドを用いた脂質ナノディスクの場合、レセプターへの結合と細胞内への内在化が起こるとされる 37 度に比べ、レセプターへの結合のみが起こるとされる 4 度における取り込みが多いという結果となった。

今後、葉酸修飾リン脂質の割合や脂質ナノディスクの構成脂質組成を変化させてさら

なる検討を行っていく予定である。

(Fig.4) Particle uptake by MCF7 cells



## 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)

[学会発表](計2件)

武吉美咲, 田中将史, 向高弘 「アポリポ蛋白質 A-I と細胞膜との相互作用における構成脂質組成の影響」

日本薬学会第133年会

2013年03月29日

横浜

星川梢, 辻野奈緒美, 田中将史, 齋藤博幸, 向高弘 「アポ E 含有脂質ナノディスクの腫瘍細胞への集積性評価」

第63回日本薬学会近畿支部大会

2013年10月12日

京田辺

[その他]

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biophys/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 将史 (MASAFUMI TANAKA)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904