

博士論文 (要約)

論文題目

ペプチドリガンドを表層に有する
ポリイオンコンプレックス型ベシクル
の調製と薬物送達用キャリアへの展開

(Preparation of peptide-ligating polyion
complex vesicles for drug delivery carriers)

氏名 川村 渉

薬物送達システム(Drug delivery system; DDS)は、「薬剤を標的部位に望ましいタイミングで送達する体内動態制御の技術」の総称であり、一般的な低分子薬剤投与のみでは達成できない高薬効・低副作用を実現するものである。全身投与型 DDS ではこれらの体内動態制御において、sub-micrometer サイズの DDS キャリアを用いることが多く、中でも高分子からなるミセルや中空粒子型ナノカプセル(ベシクル)は最も盛んに研究されている。これは、高分子からなる DDS キャリアは、化学構造や重合度の調整によるサイズ・表面状態・薬剤封入及び徐放の制御を行うことで、生体内の防御機構(免疫系や細網内系など)からの回避、標的部位への特異的な集積及び外部環境に応答した機能性発現が期待できるためである。

中でもベシクル構造体はその内部空間に様々な物質を化学結合などによらずに内包することが期待できる。低分子薬剤のみならず、タンパク質やナノマテリアルなどを内包し、標的部位のみで機能性を発現する Nano-device としての研究は次世代型 DDS において最も重要なもののうちのひとつとなる。

Polyion complex vesicle (PICsome)はこのようなベシクルの一種であり、二種類のポリマー(アニオン性ブロックコポリマー及びカチオン性ホモポリマー)からなる。PICsome はその表面が水分子との親和性が高い Polyethylene glycol (PEG)により被覆されており、また、構築時のポリマー濃度によるサイズ制御(100-400 nm)や、アニオン性ブロックコポリマーとカチオン性ホモポリマーの側鎖間の架橋による膜構造の透過性制御・安定化により優れた生体的合成を有する。これらの特徴により、PICsome は血中滞留性・体内動態・水溶性高分子の透過性などの最適化が可能なキャリアとして盛んに研究されている^{1,2}。本 PICsome は Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)によるがん組織(C26 など)への集積が確認されているが、EPR 効果の低い疾患(脳腫瘍、すい臓がんなど)や EPR 効果による集積が期待できない疾患などが数多く存在する。PICsome のナノデバイスとしての優れた特性を用いることで治療／診断可能と考えられる疾患は数多く存在し、これには更なる体内動態の制御が必要不可欠である。更なるサイズ制御(特に小粒径化)及び標的指向性ペプチドリガンドの導入による体内動態の最適化は最も有望な手法の一つであり、現在盛んに研究されている。

本論文では DDS キャリアにおいて最も重要な粒径と表面状態を、キャリアサイズの小粒径化及び環状 RGD(cRGD)ペプチド修飾により達成し、得られる cRGD-PICsome の細胞内・体内動態を詳細に検討した。その後、アプリケーションの一例として、核磁気共鳴画像法(MRI)用にその内部に鉄ナノ微粒子(SPIO)を封入した SPIO 封入 cRGD-PICsome による新生血管ターゲティングによる脳腫瘍のイメージングを検討した³。

PICsome の材料面での改良のうち、特に小粒径化(Small PICsome)は腫瘍浸透性⁴や肝臓などの細網内系からの回避という点で重要である。しかし、これまでの研究では 100 nm 以下の PICsome の構築は困難であった。本研究では、PICsome 構築時の緩衝溶液の pH を調整することで、得られる PIC のポリマー比を意図的に操作し、結果 PEG 比率を操作した。動的光散乱法(DLS)及び透過型電子顕微鏡(TEM)による観察により、そのサイズ下限を 50 nm にまで縮小することに成功した。

次に、cRGD の PICsome 表面への導入を試みた。cRGD は現在最も研究されている標的指向性ペプチドリガンドの一種であり、細胞表面に存在する細胞間接着分子の一つである $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを特異的に認識する。本インテグリンはがん細胞や新生血管表面に過剰発現しており、cRGD による認識を介してがんや加齢黄斑変性(AMD)などへの適応が研究されている。しかし、cRGD の導入では腫瘍部位への親和性と網内系(肝臓、脾臓等)への取込みのバランスをとる必要がある。本研究では cRGD の導入量を積極的に調節し、腫瘍集積に最も適した PICsome 表面への cRGD の導入量確定を試みた。cRGD の定量的導入のため、始めに所定の割合で cRGD 導入部位を持つブロックコポリマーを混ぜ込んだ PICsome を構築し、そこに凍結融解法⁵を用いることで定量的に cRGD 導入 PICsome を行った (Fig. 1)。得られた PICsome の同定は、¹H NMR, DLS 及び TEM により行い、当初の目的通りの定量的 cRGD 導入 PICsome の構築に成功した。

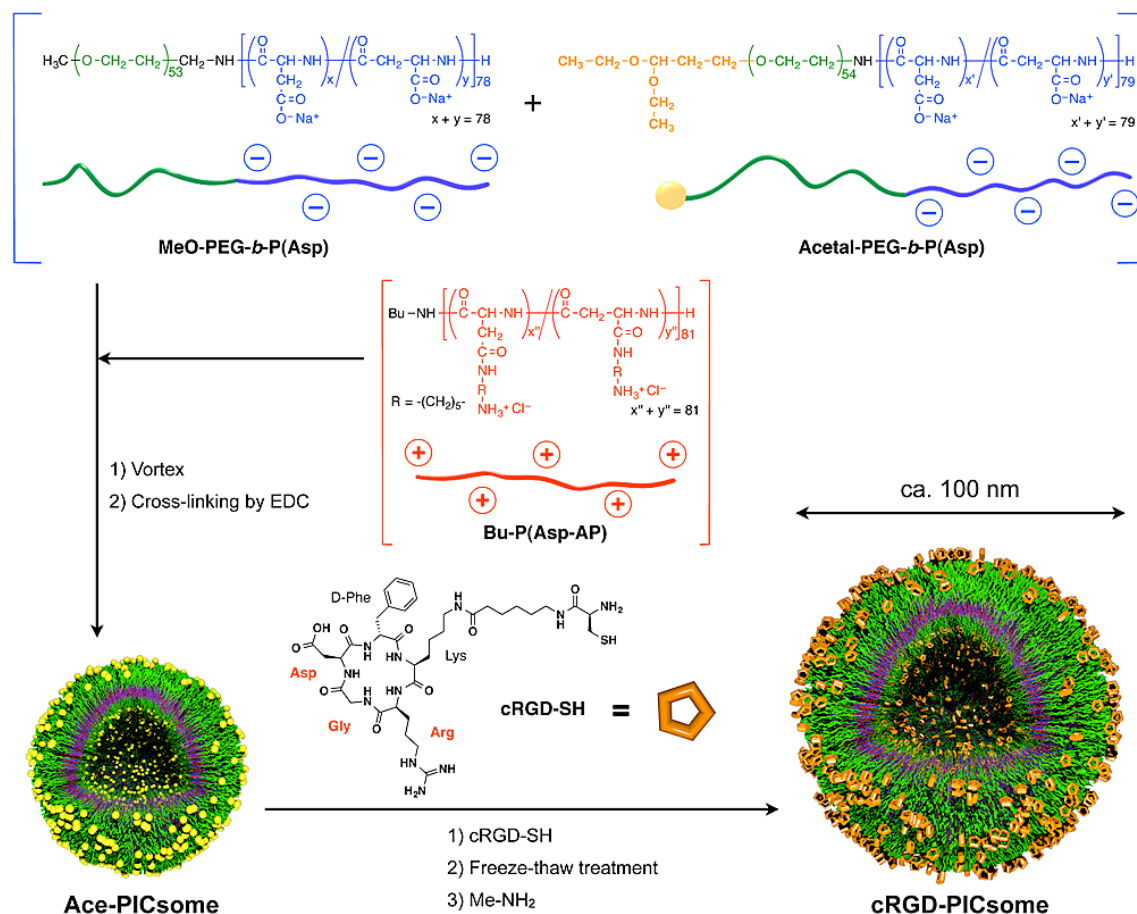


Fig. 1. cRGD-PICsome 構築スキーム

以上の物性面からの PICsome の改良のうち、特に 100 nm の cRGD 導入 PICsome(PICsome 表面への cRGD 導入量: 0, 25, 50 and 100% mol ratio)について機能性の評価を行った。細胞内動態の評価では、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)及びヒト脳腫瘍(U87MG)を用い、cRGD の影響を分

析した。cRGD の導入により、細胞取込み量の向上が確認され、cRGD の導入量に依存して cRGD-PICsome の取込み量の向上が有意に確認された。中でも 100%-cRGD-PICsome を用いた場合、Ctrl-PICsome と比べ、HUVEC への 24 時間後の取込み量が約 30 倍に上昇した。本取込みは各種阻害実験により、cRGD が介するクラスリン介在型エンドサイトーシスであることが判明した。

動物実験ではヒト脳腫瘍皮下移植マウスを用い、cRGD 導入及び導入量差による体内動態の変化を観察した。cRGD の導入量に依存した血中滞留性の低下が確認され、これは cRGD による肝臓及び脾臓への PICsome の取込み上昇に起因すると考えられる。腫瘍集積性は、Ctrl-PICsome (= 0%-cRGD-PICsome) と比べ、25%-、50%-cRGD-PICsome がより高い集積性を示した。中でも 50%-cRGD-PICsome は投与後 3 時間の時点で集積が飽和し、Ctrl-PICsome と比べると有意に集積量が大きくなった。これは、cRGD 導入による血中滞留性の低下と腫瘍親和性の釣合いによる結果である。細胞実験で確認されたように cRGD は導入量に依存した標的組織(がん及び新生血管) 親和性を持つ。cRGD によるがん組織部位及び新生血管への親和性の向上と血中滞留性の低下の兼ね合いにより、50%-cRGD-PICsome が最も早い腫瘍集積性及び高い集積量を示した。25%-cRGD-PICsome も比較的高い腫瘍集積性を示した。一方、Ctrl-PICsome (= 0%-cRGD-PICsome) は良好な血中滞留性を持つものの、腫瘍への親和性が低いため腫瘍集積性は低い。同様に、100%-cRGD-PICsome は Ctrl-PICsome とほぼ同等の腫瘍集積性しか示さないが、これは 100%-cRGD-PICsome は高い親和性を持つものの、血中滞留性が他の PICsome と比べて非常に低いため、十分な効果を発揮する前に他の臓器に集積してしまうためである。本 50%-cRGD-PICsome と Ctrl-PICsome(cRGD 未導入)の体内動態を生体内リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡で確認すると、Ctrl-PICsome は血中を凝集することなく長時間滞留するのに比べ、50%-cRGD-PICsome は腫瘍表面の新生血管のみに特異的に集積している様子が観察された。本結果は、cRGD-PICsome による新生血管ターゲティングを示している。

以上の新生血管ターゲティングを有効活用するため、アプリケーションへの応用の一例として、MRI 用造影剤 SPIO(鉄ナノ微粒子、一般名 Ferucarbotran)封入型 50%-cRGD-PICsome を構築し、機能性の評価を行った。MRI にてヒト脳腫瘍をマウスに移植し、造影能を評価した。皮下移植及び同所(脳)移植にて、腫瘍のイメージングに成功した。特に同所移植モデルでは、増殖が活発であると思われる腫瘍辺縁部位の新生血管に効率的に集積している様子が観察されており、イメージングによる腫瘍の形態のみならず、性質(増殖性)の評価に成功していると考えている。

本論文では、材料面からのサイズ及びリガンド導入の重要性を言及し、また、機能性評価についても一例ではあるが証明している。特に cRGD 導入による新生血管ターゲティング及び MRI への適応はこれまでの PICsome にはない特徴であり、重要な知見である。これらの物性面からの改良及び機能性は、そのサイズ・リガンド・内包物を組み合わせることで、新生血管ターゲティングはもちろんのこと、その他の様々な疾患にも容易に適応できる。例えば、サイズ及びリガンド導入により、小粒径リガンド導入 PICsome は標的組織深部への送達が可能である一方、大粒径リガンド導入 PICsome は組織表面のみへの送達に効果を発揮する。これらの選択性は標

的組織選択性のみならず、標的組織内部での分布をも調節できることを意味し、治療効率や標的組織の性質診断への活用が期待できる。

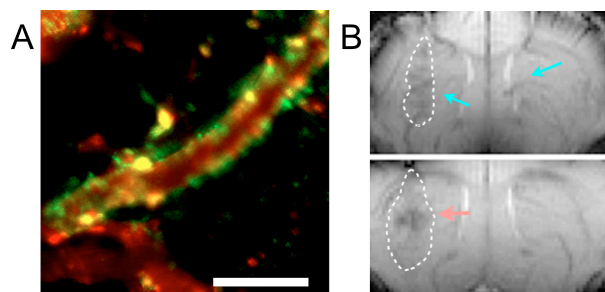


Fig. 2. PICsome 体内動態 (投与 6 時間後) A. 生体内顕微鏡 (赤, Ctrl-PICsome; 緑, 50%-cRGD-PICsome), B. MRI 図 [上図, Ctrl-PICsome (青矢印, 脳血管部位); 下図, 50%-cRGD-PICsome (赤矢印, 新生血管部位)]

参考文献

- 1) Y. Anraku, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1631, (2010).
- 2) Y. Anraku, et al. *Chem. Commun.* 6054, (2011).
- 3) D. Kokuryo et al. *J. Control. Release* **3**, 220, (2013)
- 4) H. Cabral, et al. *Nature Nanotech.* **6**, 815, (2011).
- 5) H. Takemoto, et al. *Bioconjugate Chem.* **23**, 1503 (2012).