

2014 年度 課程博士学位論文

細胞質送達素子を搭載した
多段階制御型がん治療ナノ DDS の創製

京都薬科大学大学院薬学研究科

薬品物理化学分野

板倉 祥子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1). Shoko Itakura, Susumu Hama, Takashi Ohgita, and Kentaro Kogure :

Development of nanoparticles incorporating a novel liposomal membrane destabilization peptide for efficient release of cargos into cancer cells. *PLoS One.*, **9**, e111181 (2014). [第 3 章]

- 2). Shoko Itakura, Susumu Hama, Hisahumi Ikeda, Naoto Mitsuhashi, Eiji Majima, and Kentaro Kogure :

Effective capture of proteins inside living cells by antibodies indirectly linked to a novel cell-penetrating polymer-modified protein A derivative. *FEBS J.*, **282**, 142-152 (2015). [第 1 章]

目次

略語表.....	1
要旨.....	3
序論.....	5
本論	
第 1 章 細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の細胞質デリバリーシステムの開発	
1-1 緒言.....	14
1-2 実験方.....	17
1-2-1 材料・機器	
1-2-2 細胞培養	
1-2-3 CPP-pAd の合成	
1-2-4 CPP-pAd と抗体の複合体作製	
1-2-5 FACS による抗体導入活性評価	
1-2-6 CLSM による抗体の細胞内動態の観察	
1-2-7 抗 NPC 抗体の免疫染色による局在評価	
1-2-8 レポーター遺伝子アッセイ	
1-2-9 溶血試験	
1-2-10 細胞死評価	
1-3 実験結果.....	24
1-3-1 CPP-pAd による細胞内への抗体導入活性	
1-3-2 CPP-pAd により導入された抗体の細胞内動態観察	
1-3-3 導入された抗体の標的タンパク質への結合評価	
1-3-4 細胞内取り込み経路の検討	
1-3-5 細胞質への送達メカニズムの解析	
1-3-6 血清存在下及び細胞毒性の評価	
1-4 考察.....	33
1-5 小括.....	35
第 2 章 体内動態及び細胞内動態制御可能な DDS の開発	
2-1 緒言.....	38
2-2 実験方法.....	40
2-2-1 材料・機器	
2-2-2 細胞培養	
2-2-3 SAPSP-lipo、Cationic-lipo、PEG-lipo の調製	

2-2-4	<i>In vivo</i> イメージング	
2-2-5	pDNA 封入リポソームを用いた体内動態評価	
2-2-6	siRNA のトランスフェクション	
2-2-7	CD スペクトル解析	
2-2-8	FACS による SAPSP-lipo の細胞への取り込み評価	
2-2-9	CLSM による SAPSP-lipo の細胞内動態の観察	
2-2-10	蛍光偏光度測定による膜流動性評価	
2-2-11	溶血試験	
2-2-12	膜融合能評価	
2-2-13	スペクトルイメージングによる FRET 解析	
2-3	実験結果.....	48
2-3-1	SAPSP の設計と SAPSP-lipo の構築	
2-3-2	<i>In vivo</i> イメージングによる SAPSP-lipo の腫瘍への集積評価	
2-3-3	SAPSP-lipo の pH に応答した細胞への取り込み評価	
2-3-4	SAPSP 単独での細胞内取り込み評価	
2-3-5	SAPSP 単独と SAPSP-lipo のペプチド構造変化	
2-3-6	SAPSP-lipo の細胞への結合様式の解析	
2-3-7	SAPSP-lipo の細胞内取り込み経路の解析	
2-3-8	SAPSP-lipo の細胞膜との直接的な相互作用	
2-3-9	SAPSP-lipo の膜融合による取り込み評価	
2-3-10	FRET を利用したスペクトルイメージングによる膜融合活性の解析	
2-3-11	SAPSP-lipo の安定性及び血清、イオン強度の及ぼす影響	
2-4	考察.....	64
2-5	小括.....	68
第 3 章 細胞内で効率的に薬物放出可能な DDS の開発		
3-1	緒言.....	70
3-2	実験方法.....	72
3-2-1	材料・機器	
3-2-2	細胞培養	
3-2-3	細胞から膜画分の抽出	
3-2-4	γ -セクレターゼ活性評価	
3-2-5	LMDP-lipo の調製	
3-2-6	LMDP の γ -セクレターゼによる切断活性評価	
3-2-7	カルセイン漏出試験	
3-2-8	CLSM による細胞内薬物放出観察	
3-2-9	Time-lapse imaging	
3-2-10	FACS による presenilin-1 の発現評価	
3-3	実験結果.....	77

3-3-1	LMDP-lipo の細胞内薬物放出システム	
3-3-2	LMDP の γ -セクレターゼによる切断評価	
3-3-3	LMDP-lipo の構築	
3-3-4	LMDP-lipo に組み込んだ LMDP の切断評価	
3-3-5	LMDP-lipo の γ -セクレターゼ存在下での粒子径変化	
3-3-6	LMDP-lipo の γ -セクレターゼ特異的な薬物放出	
3-3-7	LMDP-lipo の細胞内薬物放出	
3-3-8	Time-lapse imaging による LMDP-lipo の細胞内薬物放出挙動の観察	
3-4	考察	90
3-5	小括	93
第 4 章 核酸の細胞質内での効率的な放出システムの開発		
4-1	緒言	96
4-2	実験方法	98
4-2-1	材料・機器	
4-2-2	細胞培養	
4-2-3	SAPSP/siRNA、STR-R8/siRNA の作製	
4-2-4	R8D-lipo の調製	
4-2-5	Ethidium Bromide (EtBr) intercalate assay	
4-2-6	siRNA の電気泳動	
4-2-7	siRNA のトランスフェクション	
4-2-8	Time-lapse imaging による細胞内 siRNA 放出観察	
4-2-9	<i>In vitro</i> 翻訳	
4-3	実験結果	102
4-3-1	SAPAP を利用した siRNA コアの作製	
4-3-2	pH 変化によるコアからの siRNA の放出評価	
4-3-3	Time-lapse imaging による細胞内での siRNA 放出観察	
4-3-4	SAPSP コアの遺伝子発現抑制効果	
4-3-5	SAPSP コアの mRNA の翻訳への影響	
4-4	考察	109
4-5	小括	111
総括		114
引用文献		118
謝辞		132

略語表

ABC	Accelerated blood clearance
BSA	Bovine serum albumin
CD	Circular dichroism
CHEMS	Cholesterol hemisuccinate
Chol	Cholesterol
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DDS	Drug delivery system
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DOPE	Dioleoyl glycerophosphoethanolamine
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
DXR	Doxorubicin
EPC	Egg phosphatidylcholine
EPR	Enhanced permeability and retention
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FHV	Flock house virus
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid
HER2	Human EGFR-related 2
HVJ-E	Hemagglutinating virus of Japan- envelope
MDR	Multi drug resistance
MEM	Minimum essential medium
MEND	Multifunctional envelope-type nano device
MFIR	Mean fluorescence intensity ratio
mRNA	Messenger RNA
MS	Mass spectrometry
NBD-PE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine -N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
NLS	Nuclear localization sequence
NPC	Nuclear pore complex
PA	Phosphatidic acid

PBS	Phosphate-buffered saline		
pDNA	Plasmid deoxyribonucleic acid		
PEG	Polyethylene glycol		
PEG ₂₀₀₀ -DSPE	N-(Carbonyl -methoxypolyethyleneglycol 2000) -1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine		
PLL	Poly-L-lysine		
PFA	Paraformaldehyde		
RES	Reticuloendothelial system		
Rh-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine sulfonyl)	rhodamine	B
RISC	RNA-induced silencing complex		
RLU	Relative light unit		
RNAi	RNA interference		
R-PE	R-phycoerythrin		
STR-R8	Stearylated octaarginine		
SAPSP	Slightly acid pH sensitive peptide		
SDS	Sodium dodecyl sulfate		
siRNA	Small interfering RNA		
VEGF	Vascular endothelial growth factor		
TAT	Trans-activator of transcription		
TMA-DPH	N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl) phenylammonium p-toluenesulfonate		

要旨

1. 緒言

がん化学療法において、がん細胞の細胞質へ薬物を効率的に送達可能なドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発が求められている。最大限の薬効が期待できる DDS を開発するためには、腫瘍組織への送達に加えて、がん細胞内の動態および薬物放出を精密に制御することにより、薬物の作用部位である細胞質に如何に効率的に薬物を送達するのかが重要である。そこで、本研究では、体内動態から細胞における薬物放出までの各過程を制御可能な機能性素子を設計し、それらを DDS に搭載することで、細胞質へ効率的に薬物送達可能ながん治療ナノ DDS を構築することを目的とした。

2. 細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の細胞質デリバリーシステムの開発

抗体は標的タンパク質に対して特異的に結合することが可能であるため、がん治療においても多くの抗体が、分子標的薬として臨床使用されている。しかし、細胞内へ効率的に抗体を送達可能な DDS が開発されていないために、これまでの抗体医薬品の標的は主に分泌タンパク質や膜タンパク質に限定されている。一方、オミックス解析の進展により、がん治療の標的として有望な多くの細胞内タンパク質が見出されてきたこともあり、これらの機能を制御するために、抗体の簡便な細胞内送達法の開発が望まれている。そこで、私は抗体の Fc 領域と特異的に結合する protein A 誘導体（pAd）に細胞膜透過性ポリマー（CPP）を化学修飾させた新規の抗体導入キャリアー（CPP-pAd）を企業との共同研究により開発した。CPP-pAd は抗体と混合するだけで、抗原結合部位を保持した状態で抗体に細胞膜透過性を付与することが可能である。蛍光ラベル化抗体を用いて CPP-pAd による抗体導入活性を市販の抗体導入試薬と比較した結果、顕著に高い導入活性が認められただけでなく、CPP-pAd は細胞質まで抗体を送達可能なことが明らかとなった。また、CPP-pAd を用いて細胞内に導入された抗核膜孔複合体抗体は、その標的部位の核膜へ集積しており、さらに核膜孔を介した NF- κ B の核移行を阻害することで細胞機能を抑制することが確認された。したがって、CPP-pAd は、抗体を簡便かつ高効率に細胞内へ送達可能であることが示唆された。

3. 体内動態及び細胞内動態制御可能な DDS の開発

CPP-pAd のような細胞膜透過性素子と薬物を連結させた DDS を全身投与型 DDS へ応用するためには、血中での安定性の向上や腫瘍への特異的送達のために体内動態制御素子を修飾することが必要である。リポソームは、生体適合性に優れ、標的化素子の修飾も可能であることから全身投与型キャリアーとして有用であると考えられている。現在、がん治療 DDS として、血中滞留性が高く、enhanced permeability and retention effect（EPR 効果）を利用して腫瘍組織へ集積可能である polyethylene glycol（PEG）修飾リポソーム（PEG-lipo）が主に用いられている。しかし、PEG-lipo は細胞内へ取り込まれにくいいため、細胞質への薬物送達効率が低いことが課題である。そこで、私は血中滞留性が高いだけでなく、細胞内へ取り込まれやすい新規の DDS を開発するために、リポソームの表面電荷に着目した。すなわち、血中ではリポソームの表面電荷を負電荷にすることで、生体成分との相互作用を回避できるが、腫瘍環境の低 pH に応答して正電荷に反転させることでがん細胞への取り込みが向上するので

はないかと考えた。しかし、これまでに腫瘍の微弱低 pH に応答する素子はなかったため、新たに slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP) を設計し、SAPSP をリポソームに修飾することで、微弱低 pH に応答して電荷が反転するリポソーム型 DDS を開発した (SAPSP-lipo)。担がんマウスへ SAPSP-lipo を尾静脈内投与した結果、PEG-lipo と同程度の腫瘍集積性が認められた。さらに、SAPSP-lipo の pH 変化による細胞への取り込みをフローサイトメトリーにより評価したところ、pH 7.4 に比べ、pH 6.5 以下では約 13 倍取り込みが向上した。また、SAPSP-lipo は一部膜融合を介して効率よく細胞質まで送達されることが示唆された。したがって、SAPSP-lipo は高い腫瘍集積性と効率的な細胞質送達が期待できる新規の DDS であることが示された。

4. 細胞内で効率的に薬物放出可能な DDS の開発

SAPSP-lipo のようなリポソーム型 DDS の場合、リポソームからの薬物放出が非効率的であるために、送達薬物の利用率が低く、最大限の薬効発現が得られない。そのために、がん細胞において、特異的かつ速やかに薬物を放出可能な DDS の開発が期待されている。そこで、私は細胞膜プロテアーゼである γ -セクレターゼが、がん細胞において高い活性を有することに着目し、 γ -セクレターゼによって切断されるペプチド liposomal membrane disturbance peptide (LMDP) をリポソーム膜に組み込むことで (LMDP-lipo)、細胞に取り込まれる時にリポソーム膜構造が乱れ、内封薬物が放出するのではないかと考えた。LMDP-lipo はプロテアーゼ存在下で、LMDP の切断および内封カルセインの漏出が認められた。また、培養細胞においても、細胞内に内封カルセインの放出が観察され、この放出はプロテアーゼ阻害剤によって抑制された。さらに、エンドサイトーシス阻害剤存在下でも細胞内への放出が認められた。したがって、LMDP-lipo はがん細胞の形質膜上に存在する γ -セクレターゼに応答して内封薬物を放出可能であることが示唆された。さらに、がん治療用内封薬物として核酸医薬に着目した。リポソーム型 DDS へ siRNA などの核酸医薬を封入するためには、siRNA を正電荷ポリマーで凝縮することが主要な方法の 1 つである。しかし、このような凝集体は強力な静電的相互作用のため、細胞質での凝集体からの siRNA 放出効率が低いことが課題である。そこで、私はこの課題を解決するために、pH 変化に応答して電荷が反転する SAPSP を siRNA の凝縮剤に利用することを発想した。酸性条件下で正電荷を有する SAPSP を siRNA と混合し、凝集体を構築した結果、細胞質 pH (pH 7.4) において、SAPSP が負電荷へ反転することで、静電的相互作用が減弱し、効率的に siRNA が放出されることが示された。さらに、SAPSP と siRNA の凝集体をリポソーム内へ封入した結果、凝縮剤として正電荷ペプチドを利用した場合に比べて、RNAi 効果が増強された。したがって、LMDP、SAPSP を用いることで、細胞内に低分子薬物や核酸を効率的に放出可能であることが示唆された。

5. 総括

本研究では、がん細胞の細胞質へ薬物を効率的に送達するために、新たに設計した膜透過性ポリマーや腫瘍環境応答性素子 SAPSP、LMDP を利用したがん治療 DDS を開発した。これらは、DDS キャリアーの体内動態から薬物放出の各過程における障壁を多段階的に突破することで、薬効発現が向上することが示唆された。近年、特異的な抗がん効果を示す核酸や抗体などを細胞質へ効率的に送達可能な DDS 開発が急務の中で、多段階的に特異的かつ効率的な送達が可能これらの機能性素子を組み合わせた DDS の開発は、副作用の少ないがん治療システムの開発に大きく貢献すると考えられる。

序 論

序論

がんの発生は DNA の変異によって引き起こされ¹⁾、その過程は多段階的であると考えられている。イニシエーションでは正常細胞の DNA の突然変異が起き、その細胞が変異によって選択的に増殖する状態となったプロモーション、そして、増殖、浸潤、転移能などを獲得したプログレッションの段階でがんが進行していく^{2,3)}。治療方法としては現在、外科的手術、放射線療法、化学療法に大別でき、局所的ながんであれば、手術や放射線療法での治療が可能であるが、すでに進行しており転移を伴う場合などは、抗がん剤による全身治療が必要となる。

従来の化学療法剤として、代謝拮抗剤やアルキル化剤、抗がん性抗生物質、微小管阻害剤などがある。これらは、主に DNA に作用し、直接的または間接的に DNA の合成や複製を阻害することで、がん細胞を死滅させる⁴⁾。しかし、これらは、正常細胞にも作用するため、副作用が強く現れ易く、また長期使用による耐性獲得も問題である。ドキソルビシンに代表されるアントラサイクリン類やタキサン類の抗がん剤は、多剤耐性遺伝子 (MDR1) にコードされる P 糖タンパク質などの薬物排出ポンプの基質となることが知られており、MDR1 発現細胞では、細胞内に取り込まれたこれらの抗がん剤が排出されてしまうことで薬効が低下する^{5,6)}。その他にも、DNA 修復の増強や細胞内取り込みの低下などの要因で耐性が生じることが報告されている⁷⁾。そこで、これらを克服し、薬物治療の効率を向上させるためには、腫瘍へ特異的に送達するだけでなく、がん細胞内における送達場所を制御することが必要であり、体内動態及び細胞内動態を制御可能なドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が求められている。

1986 年に松村、前田により enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)⁸⁾ が提唱されて以来、がん治療 DDS は大きく進歩した。EPR 効果は、腫瘍組織の新生血管が、正常組織の血管に比べて透過性が高く、さらにリンパ管が未発達であることから、約 40 kDa 以上の高分子は漏れやすく排除されにくいいため、腫瘍組織に集積されるという現象である⁹⁾。EPR 効果を利用したナノ粒子の腫瘍内送達量は、ナノ粒子の血中滞留性に依存する¹⁰⁾。そこで、腫瘍組織へ抗がん剤を送達するため、高分子ミセルやリポソームなどに血中滞留性を付与したナノ粒子が開発された。その素子の一つとして、水溶性高分子である polyethylene glycol (PEG) が、血清タンパク質との吸着を抑制し、reticuloendothelial system (RES) への捕獲から回避することで、高い血中滞留性を示すことから汎用されている。PEG を修飾したリポソームは、未修飾のリポソームに比べ、血中からの消失時間が顕著に延長し、腫瘍への集積が向上したことが報告されている¹¹⁾。また、腫瘍への集積のみならず、細胞内へ薬物を送達することも重要である。腫瘍組織へ集積された後、従来の低分子薬物の場合、リポソームに封入された薬物が細胞外で放出されても、単純拡散などで細胞内に取り込まれるため、一定の効果は得られる。しかし、抗がん剤のほとんどが、がん細胞内の DNA に作用するため、より高濃度の抗がん剤を細胞内に送達することが抗がん効果の増強に繋がると考えられる。そのために、薬物を封入した状態の DDS を細胞内に効率的に取り込ませる試みがなされている。膜透過性ペプチドとして知られているオクタアルギニンペプチド (R8) を、ドキソルビシン (DXR) を封入した PEG リポソームに修飾した場合に、R8 未修飾に比べて、細胞内の DXR 濃度が著しく上昇し、抗腫瘍効果が向上したことが報告されている¹²⁾。また、細

胞内への取り込みを増大させることで、細胞内における有効薬物濃度を確保できるため、耐性細胞での薬効も期待できる¹³⁾。このように、従来の抗がん剤においても、抗がん剤の作用部位である細胞質内までを送達制御した DDS を開発することで、特異的な抗がん効果を誘導することや、耐性細胞を効果的に死滅させることが可能であると考えられる。しかし、現状の DDS を利用した場合の腫瘍への送達効率は低く、血中滞留性キャリアーによる EPR 効果を介した腫瘍への送達も投与量の約 10 % 程度¹⁴⁾ であるだけでなく、腫瘍と同様の血管構造を有する炎症や感染症部位にも集積することが報告されている¹⁵⁾。すなわち、現状の DDS を利用するだけでは、腫瘍特異的な薬効を期待することは困難であると考えられる。

その打開策として、がんの治療標的に対して特異的に機能制御可能な薬物を DDS によって送達する戦略が挙げられる。近年のゲノミクス、プロテオミクス研究等の進展により、様々ながん関連遺伝子やタンパク質が明らかとなりつつあり、治療のターゲット候補が多数見出されている^{16,17)}。これらを特異的に制御可能な抗体などの分子標的薬や核酸を抗がん剤として利用する研究が盛んに行われている。

既に、分子標的抗がん剤は、現時点で 50 を超える製剤が世界で承認されている。Imatinib や Gefitinib などの低分子分子標的薬は、細胞内のシグナル伝達分子等を標的として阻害することが可能であるが¹⁸⁾、標的以外にも作用し、オフターゲット効果による毒性を示す可能性が懸念される。また、モノクローナル抗体は分子標的薬の約 4 割を占めており、がん治療の分野でも human EGFR-related 2 (HER2) や vascular endothelial growth factor (VEGF) に対する抗体等が臨床で使用されている。しかし、抗体は細胞内への侵入が困難であるため、その標的は細胞外タンパク質に限定されるのが現状である。そのために、がん進展に関与する細胞質タンパク質の機能制御可能な抗体を効率的に細胞質に送達可能な DDS が求められている。

また、non-coding RNA ががんの進展や転移に大きく関与していることが報告され¹⁹⁾、RNA レベルでも治療標的として多くの候補が見出されてくるようになってきた。そこで、分子標的薬では補うことができないような標的に対しても効果が期待できることから、アンチセンス、アプタマー、siRNA、デコイなどの核酸医薬の応用開発も進められている。しかし、現在、核酸医薬品として世界で承認に至ったのは、アンチセンス薬の Vetravene[®]、Kynamuro[®]、RNA アプタマーの Macugen[®] の 3 製剤に過ぎない。さらに、その適応は、Vetravene[®]、Macugen[®] では眼科領域での局所投与であり、がん治療分野での全身投与可能な核酸医薬はまだ上市されていない。その原因として、核酸医薬は、生体内における安定性が極めて低いことが挙げられる。例えば、裸の siRNA は、血中でヌクレアーゼによって速やかに分解されるために、その血中半減期は約 2 分であることから²⁰⁾、血中安定性を向上する必要がある。また、核酸は水溶性高分子のため、単独では細胞内に取り込まれにくいことから、全身投与で細胞内に送達することは非常に困難である。そのため、核酸の血中安定性を確保しつつ、細胞内へ効率的に送達可能な技術が求められている。

このような背景のもと、分子標的薬や核酸などの特異性の高い薬物を用いたがん治療 DDS の開発は急務となっている。核酸の生体内における安定性を向上させるためには、核酸を化学修飾することでヌクレアーゼ耐性を付与する試みもなされており、例として、核酸のリン酸結合のホスホロチオエート化及び糖の 2'-MOE 化により、その血中半減期を飛躍的に延ばすことに成功したアンチセンス薬の Kynamuro[®] が挙げられる²¹⁾。しかし、このように核酸に直接化学修飾を施す

ことで、機能性が低下することが知られているため、精密な核酸設計が必要である。また、このような機能性核酸は、単独では細胞内に取り込まれにくく、さらに細胞内のオルガネラを突破する術を有しないため、作用部位の細胞質や核内への送達効率が低い。そのため、核酸の血中安定性を確保し、効率的な細胞内送達が可能ナノ粒子等のナノ粒子の開発が盛んに進められている。そこで、リポソーム等のナノ粒子を用いた DDS が着目されており、現在、血中滞留性キャリアーを利用した EPR 効果による腫瘍集積技術だけに留まらず、薬物の作用部位にまで活性を維持した状態で効率的に送達可能な技術革新が求められている。そのためには、腫瘍組織への送達に加えて、がん細胞内におけるナノ粒子の動態制御だけでなく、これまで軽視されがちであった細胞内における薬物放出までも考慮した DDS を開発することが重要である。

ナノ粒子の腫瘍組織への送達は、上記でも述べたように EPR 効果による送達に頼らざるをえないのが現状である。しかし、最も汎用されている PEG 修飾リポソームでも、PEG に対する抗体が産生されることで二回目投与時に肝臓のマクロファージへの取り込みが促進する accelerated blood clearance (ABC) 現象が報告されている^{22,23)}。また、EPR 効果も腫瘍血管密度や性質に大きく影響し、スキルス胃がんや膵臓がんなどでは、密度が疎であり血管壁が厚いため^{24,25)}、血管からの漏出による集積が得られにくい(図 1)。このような特徴をもつ膵臓がんに対しては、厚い血管壁を縮小することが可能な TGF- β 阻害剤の併用により、高分子ミセルの送達効率が改善されることで抗腫瘍効果が顕著に増大することが報告されている²⁶⁾。現状ではナノ粒子の体内動態を制御するためには、血中滞留性の付与は必須であるが、キャリアーのみではなく、受け手の腫瘍内における組織環境を改善することで腫瘍内送達を改善できる可能性も示唆されている。

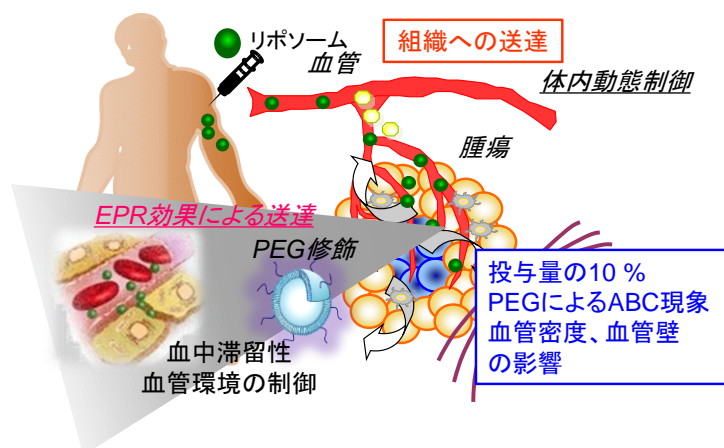


図 1. 腫瘍組織への送達

現在のがん治療 DDS では EPR 効果を利用した組織への送達が主流である。PEG 修飾により、血中滞留性を付与したナノ粒子が汎用されているが、送達効率、ABC 現象などの問題もある。

腫瘍内に送達されたナノ粒子は、細胞内に取り込まれた後、目的の場所まで到達する必要がある。ナノ粒子は細胞膜と相互作用することで細胞膜と結合後、一般的にエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。しかし、ナノ粒子がエンドソーム内に留まったままでは、小胞内に多くの分解酵素を含むライソソームと融合することで、ナノ粒子あるいは内封薬物が細胞質へ送達される前に分解されてしまう。そのために、ライソソームと融合する前にエンドソームから脱出することが薬効を発揮するために必要である(図 2)。そのために、ナノ粒子の細胞への結合及びエンドソーム脱出に着目した DDS 開発が行われている。細胞膜との結合に関しては、マイナス電荷を有する細胞表面との静電的相互作用が期待できるカチオン性脂質やペプチドが広く利用されている。日本新薬株式会社は、独自のカチオン性脂質とレシチンを混合したカチオニックリポ

ソーム LIC-101 を開発し²⁷⁾、2002 年に転移性肝がんへの適応で臨床試験が開始され、核酸用カチオニックリポソームとして世界で初めてヒトに対して投与されるまでに至った。

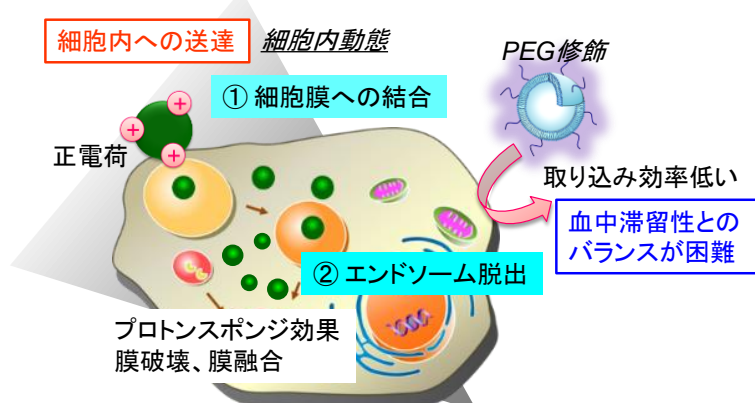


図 2. 細胞内への取り込み

細胞膜への結合とエンドソーム脱出の段階がある。カチオン性のナノ粒子にエンドソーム内低 pH でのプロトンスポンジ効果や膜融合能を付与したものが良く利用されているが、血中体滞留性とのバランスが問題である。

また、ナノ粒子のエンドソームからの脱出戦略として、エンドソーム膜との直接相互作用（膜融合、膜破壊）、またはプロトンスポンジ効果がこれまでに利用されている。エンドソームにはプロトンポンプが存在し、ATP 依存的に小胞内にプロトンを輸送する機構により酸性に保たれている²⁸⁾。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン由来の人工ペプチド GALA は、この酸性条件下で立体構造変化により、細胞膜と直接相互作用し、膜融合活性を示す²⁹⁾。この GALA をリポソームに修飾することで、エンドソーム脱出効率が向上し、封入した pDNA の遺伝子発現効率が增大することが報告されている^{30,31)}。また、プロトンスポンジ効果とは、エンドソーム内の酸性環境でプロトンの緩衝作用により、プロトンとそれに伴う Cl⁻ のエンドソーム内への流入が促進されることで、浸透圧上昇によってエンドソーム膜が破壊され、ナノ粒子のエンドソーム脱出が達成される効果であり、ヒスチジンのイミダゾール基やアミンを有する化合物を利用した場合に誘導されることが知られている^{32,33)}。ナノ粒子のエンドソーム脱出戦略にプロトンスポンジ効果を利用した DDS の一つとして、ヒスチジンを組み込んだ標的化ペプチドを修飾したリポソームが報告されており、本リポソームは pH 緩衝作用が認められ、ヒスチジンなしの場合と比較して封入した pDNA の遺伝子発現効率が示されている³⁴⁾。上述のような細胞内取り込み促進因子やエンドソーム脱出因子を DDS に搭載することでナノ粒子の細胞内動態を制御可能であるため、*in vitro* においては、DDS に内封した薬物の薬効を増強させることが可能である。一方で、細胞内動態を制御するだけでは、全身投与型製剤として利用することは困難であり、DDS の体内動態も制御する必要があることから、細胞内取り込み効率の高いカチオニックリポソームに PEG を修飾した DDS などが多数開発された^{14,35)}。しかし、このような PEG 修飾 DDS の場合、PEG のかさ高い水和層が DDS の細胞への結合の障害となるために、細胞への導入効率が低下する「PEG ジレンマ」が存在する^{36,37)}。さらに、正電荷リポソームに PEG を修飾しても、中性のリポソームに修飾した場合に比べて、生体成分と相互作用しやすいため、細網内皮系に捕捉されてしまい、その血中滞留性は劣ることが報告されている¹⁴⁾。すなわち、血中滞留性と細胞への導入活性のバランスを考慮した DDS 開発が必要である。最近、siRNA の DDS として、脂質をベースとした lipidnanoparticle (LNP) が、静脈内投与の適応で臨床試験を開始するに至った。LNP は、エンドソーム内低 pH 応答性を示し、膜融合により効率よく siRNA を細胞質へ送達可能である³⁸⁾。

しかし、LNP に修飾する PEG の密度がその体内動態及び細胞内動態に影響を及ぼし、高い PEG 修飾率では高い血中安定性を示す反面、膜融合性が低下する。一方、PEG 修飾率を低くした場合、免疫が誘導されてしまうことが課題として挙げられている³⁹⁾。この課題を克服するために、LNP や正電荷リポソームでは、PEG の密度や構成脂質を最適化することで、体内動態と標的細胞への導入活性のバランスに優れた DDS の開発が可能であることが示唆されている^{39,40)}。

その一方で、細胞質内に送達されたキャリアーからの薬物放出システムに関する報告は少ない。低分子薬物であれば、エンドソーム内酸性下での崩壊する DDS や⁴¹⁾、エンドソーム脱出と同時に内封薬物を放出する DDS などを利用することが可能であるが、核酸の場合、同様のシステムを利用することは困難である。なぜならば、一般的に核酸をリポソーム内に封入する場合、カチオン性のポリマー等と静電的相互作用により複合体を形成した後に、その複合体を脂質膜で覆う手法がよく用いられているため⁴²⁾、例え上述のシステムによってエンドソームを脱出できたとしても、核酸はカチオン性ポリマーとの複合体として存在するため、送達核酸が機能を発揮するためには、核酸のポリマーからの解離が必須である。この核酸の解離を促進するために、これまでに、がん細胞内の酵素 protein kinase C α (PKC α) の基質配列を組み込んだカチオン性ポリマーと核酸との複合体キャリアーが報告されている。このキャリアーは、カチオン性ポリマー中の基質が、PKC α によってリン酸化されるため、ポリマーの正電荷が緩和されることで、核酸との静電的相互作用が減弱し、核酸を細胞質へ放出することが可能であり、遺伝子発現効率の向上も認められることが報告されている^{43,44)}。このように細胞内で薬物の放出を促進することも薬効向上に重要であると考えられる (図 3)。

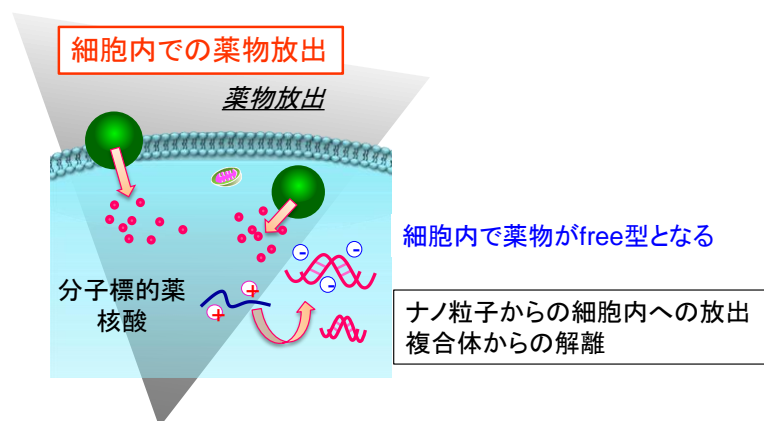


図 3. 細胞内での薬物放出
細胞内で薬物が free 型となることが重要である。そのために、細胞内でナノ粒子から放出され、複合体から分子標的薬や核酸などの薬物が解離するためのシステムが必要である。

以上のように、体内動態、細胞内動態、薬物放出の各過程を別個に制御可能な機能性 DDS が多数報告されていることから、血中から細胞質までのいずれの過程においても DDS の障壁が存在することは明白である。それにもかかわらず、全ての過程を制御できよう設計した DDS ほとんど報告されていない。そこで、本研究では、体内動態から細胞内における薬物放出までの各過程を制御可能な機能性素子を設計し、それらを DDS に搭載することで、多段階的に障壁を突破し、細胞質へ効率的に薬物送達可能ながん治療ナノ DDS を構築することを目的とした (図 4)。そのために、各過程における障壁を突破するためのコンセプトの立案から、それに基づいた DDS を設計し、機能性評価を行い、得られた知見を以下に 4 章にわたり論述する。

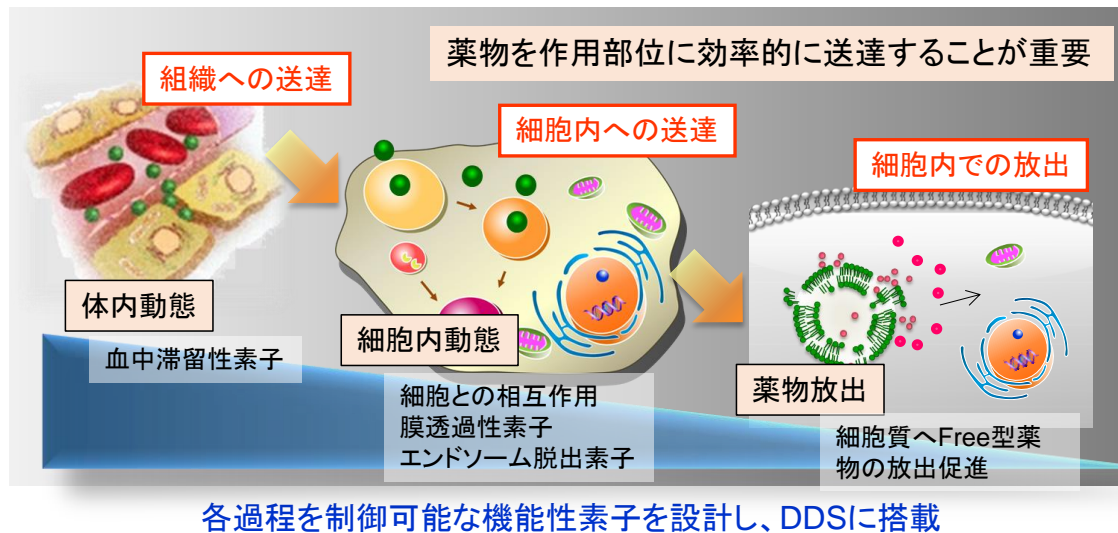


図 4. がん治療 DDS の創製

がん治療 DDS では、薬物を作用部位である細胞質に如何に効率的に送達できるかが重要である。そのために、組織への送達のみならず、細胞内動態、細胞内での薬物放出の各過程の障壁を突破できるような機能性素子を設計し、DDS に搭載することで、細胞質への効率的な薬物送達が可能となる DDS の構築を目的とした。

第 1 章

細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の 細胞質デリバリーシステムの開発

第1章 細胞膜透過性ポリマーを用いた抗体の細胞質デリバリーシステムの開発

1-1 緒言

核酸や抗体などの機能性高分子は、特異性が高いために、副作用を抑えつつ、高い効果が期待できることから医薬品として応用するための研究開発が盛んに進められている。これらが細胞内での標的に対して機能性を発揮するには、作用部位である細胞質にまで効率的に送達されなければならない。本章では、これらの機能性高分子のモデルの一つとして抗体を用いて、その細胞質へのデリバリーシステムの開発を目的とした。

抗体は、4本鎖のY字型を基本構造とし、免疫担当細胞に認識されるFc領域と、抗原を認識する部位を含むFab領域から構成されるタンパク質である。抗体は標的タンパク質に対して特異的に結合することが可能であるため、副作用が低く、さらに、生体安定性も高いことから、疾患原因タンパク質を標的とした診断、治療への応用が期待されている。抗体にはその定常領域の違いによりIgM、IgG、IgD、IgE、IgAの5種類が存在するが、その中でも、IgGは、血中で最も多く存在し（約70~75%）、液性免疫の中心的な役割を担っている（図1-1a）。抗体は生体内では、侵入した異物に抗原特異的に結合することで、マクロファージなどの貪食細胞や補体を活性化したり、異物を中和したりする働きを有し、血中半減期が長く、安定性が高いことからIgGが広く用いられ、現在、抗体医薬品として承認されているのはIgGのみである。1975年にKohle、Milsteinにより、抗体を産生するB細胞と無限に増殖能をもつミエローマを融合させるハイブリドーマ技術が確立され⁴⁵⁾、モノクローナル抗体を人工的に産生可能となり、臨床応用への期待が高まった。しかし、マウス由来の細胞のために免疫原性が問題となったが、生産技術の進歩により、ファージディスプレイ法^{46,47)}や、トランスジェニックマウスを用いる方法⁴⁸⁾でヒト抗体を産生することが可能となったことから、近年、抗体は大変魅力的な分子標的薬として着目されている。

がん治療においても、多くの抗体が分子標的治療薬として臨床使用、開発が進行している。現在、HER2に対する抗体のトラスツズマブ（ハーセプチン[®]）が乳がん、VEGFに対する抗体のベバシズマブ（アバスタ[®]）が乳がん及び大腸がん、epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する抗体のセツキシマブ（アービタックス[®]）が大腸がん及び頭頸部がんの治療薬として臨床使用されている。しかし、抗体は約150 kDaと分子量が大きいため、裸の抗体は細胞内へ侵入することができず、現在の抗体医薬の標的は分泌タンパク質や受容体などの膜タンパク質に限られている。一方で、オミックス解析の進展により、がん治療の標的として有望な多くの細胞内タンパク質が見出されてきたことから、これらの機能を制御するためには、抗体の効率的な細胞内送達法の開発が望まれている。

これまでには、細胞内への抗体導入法の一つとして、エンベロープ型のウイルスであるセンダイウイルスHVJ (hemagglutinating virus of Japan) を利用した報告がある⁴⁹⁾。すなわちHVJの外膜HVJ-E (HVJ Envelope) を用いて、抗体を内封することで、膜融合を介して直接細胞内に抗体を送

達することが可能であり、抗体導入試薬として市販されている。しかし、HVJ-E はウイルス由来であることから、細胞毒性や安全性の面で問題があり、がん治療 DDS として利用しにくい。そのため、ウイルスを用いずに、低毒性で簡便かつ高効率に抗体を細胞内に送達することが可能な DDS の開発が望まれている。

これまでに、trans-activator of transcription (TAT) ペプチド、オリゴアルギニン、penetratin 等の膜透過性ポリマーを利用し、タンパク質やペプチド等の高分子をこれらの膜透過性素子に連結させることで細胞内に送達可能な DDS が多数報告されてきた⁵⁰⁾。そこで、この手法を抗体導入キャリアーに応用し、膜透過性ポリマー (CPP) と protein A 誘導体 (pAd) を利用した新規の抗体導入キャリアー (CPP-pAd) をプロテノバ株式会社との共同研究により開発した (図 1-1b)。

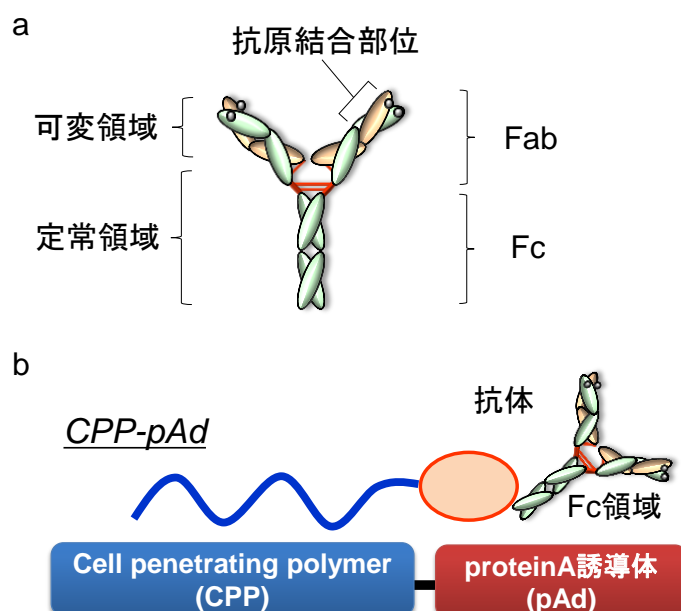


図 1-1. IgG 抗体と CPP-pAd の構造
(a) IgG 抗体の基本構造。4 本鎖の Y 字型を基本とし、Fab と Fc 部位からなる。(b) CPP-pAd と抗体複合体の概略図。膜透過性ポリマーの CPP と抗体の Fc 部位と特異的に結合する protein A 誘導体の pAd を連結させた。

pAd は、wild type の protein A の IgG 結合部位のアミノ酸と CPP を修飾する部位のアミノ酸配列に配向性が制御可能となるようにリジン配置を配置し、様々なサブタイプの IgG の Fc 領域との親和性を向上させたものであり⁵¹⁾、プロテノバ社が独自に開発した protein A 誘導体である。CPP は、図 1-2a に示すように、5 つのトリアルギニンユニットからなる枝分かれのカチオン性ポリマーと、膜融合性脂質として人工遺伝子キャリアー等にもよく利用されている DOPE⁵²⁾ を疎水性部位に使用した構造で、共同研究者の池田らにより開発され⁵³⁾、これまでに様々なサイズの分子を低毒性で高効率に細胞内に導入に成功している。本研究では、この CPP と pAd を化学修飾することで CPP-pAd を合成した。合成後に得られた反応溶液について MS 解析を行い、[free CPP+H] (m/z 4629.6)、[free pAd+H] (m/z 7803.2) 及びリンカー部位の質量の合計となる m/z 12576.1 に検出されたピークが CPP-pAd であると考えられた (図 1-2b)。また、この結果から、CPP と pAd はモル比として 1 : 1 で修飾されることが示唆された。この CPP-pAd と抗体の複合体は、図 1-1b の概略図のような構造をとっていると推察され、pAd により様々なタイプの IgG と Fc 領域特異的に結合することができ、抗原結合部位を保持したまま、CPP によって細胞内に送達可能であると考えられる。また、抗体と CPP-pAd を混合するのみで簡便に抗体複合体を調製することが可能であり、

抗体ごとに化学修飾する必要がないことも利点として挙げられる。

本章では、抗体の細胞内送達素子として新たに開発した CPP-pAd による抗体導入活性及びその機能性について評価した。

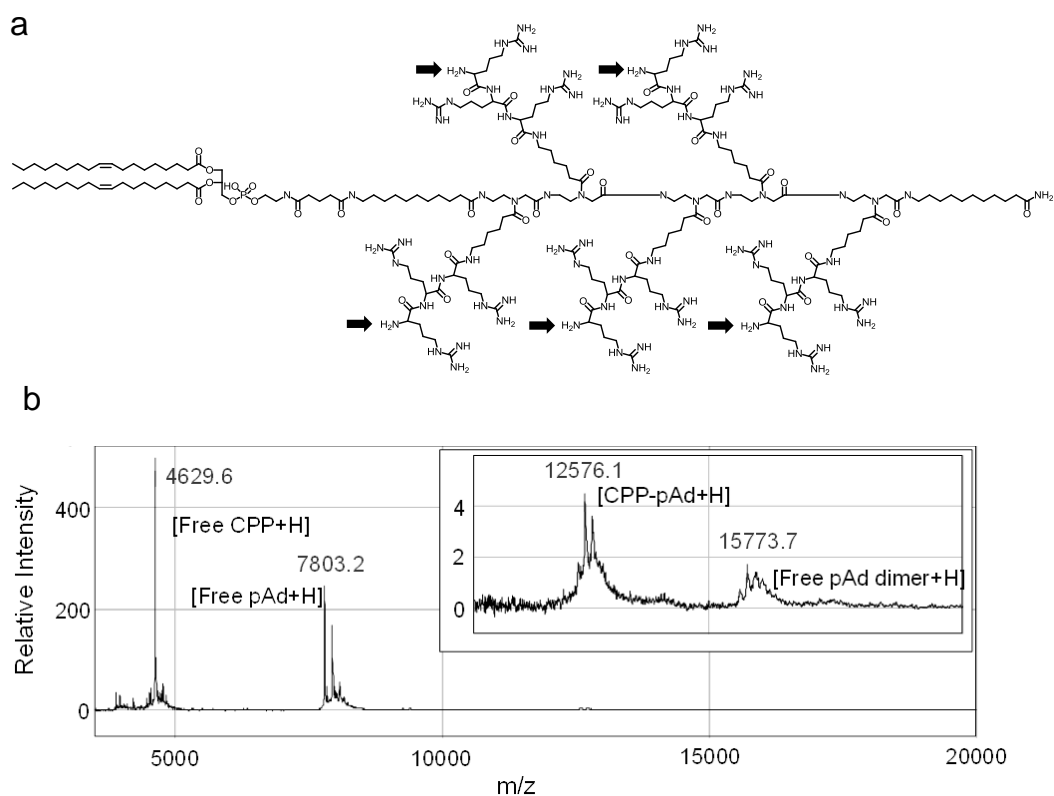


図 1-2. CPP の構造と CPP-pAd のマスペクトル解析による合成評価

(a) CPP の構造。黒色矢印で示した 5 つの第 1 級アミンのうちの 1 つが pAd と反応すると考えられる。(b) SELDI-TOF-MS 解析によるマスペクトルの図。m/z 10500-19950 は拡大した図を中に示した。m/z 12576.1 のピークが CPP-pAd であると考えられる。

1-2 実験方法

1-2-1 材料・機器

1) 材料

MEM は Life Technologies (Carlsbad, CA, U.S.A.)より購入した。MEM NEAA solution、sodium pyruvate solution、penicillin-streptomycin solution、2.5% trypsin、NaHCO₃、Tumor necrosis factor- α human recombinant (TNF- α) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。HeLa 細胞 (JCRB9004) はヒューマンサイエンス研究資源バンク (Osaka, Japan) より購入した。FBS は Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, U.S.A.)より購入した。ダルベッコ PBS (-) は日水製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。L-Glutamine は MP Biomedicals より購入した。Bente tip filter、MF Milipore MCE Menmbrene は MILLIPORE (Billerica, MA, U.S.A.) より購入した。セルバンカーは日本全薬工業 (Fukushima, Japan) から購入した。R-phycoerythrin goat anti-mouse IgG (H+L)、LysoSensor Green DND-189、Alexa Fluor[®] 546 carboxylic acid, succinimidyl ester、Alexa Fluor[®] 488 carboxylic acid, succinimidyl ester、Vectashield[®] mounting medium with DAPI、anti-mouse IgG Alexa fluor[®] 594 F(ab')₂ fragment は Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, U.S.A.) より購入した。Mouse monoclonal anti-nuclear pore complex proteins、hoechst 33342、holo-transferrin human、hydroxylamine hydrochloride、bovine serum albumin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)より購入した。Polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulins/TRITC は DaKo より購入した。Mouse isotype control IgG1 κ antibody は eBioscience (San Diego, CA, U.S.A.) より購入した。7-AAD、96 well imaging plate は Becton Dickinson (BD) より購入した。96 Cell BIND Plate は Costor より購入した。Glass base dish (35mm) は IWAKI より購入した。Lab-Tek II chamber slide (8well) は Nunc より購入した。FuGENE HD[®]、Reporter Lysis Buffer (5 \times)、Luciferase Assay System は Promega より購入した。BCA Protein Assay Kit は Thermo Scientific より購入した。ルシフェラーゼ活性測定用チューブはアシストから購入した。Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System は TaKaRa より購入した。抗体導入試薬 HVJ-E (GenomONE-Cab[®]) は石原産業株式会社 (Osaka, Japan)より購入した。CPP-pAd、CPP、pAd はプロテノバ株式会社 (Kagawa, Japan) から御供与頂いた。pTAL-NF- κ B-luc は、当研究室で精製したものを用いた。

2) 機器

遠心機はスウィング式卓上小型遠心機 2410 (KUBOTA)、プレート専用遠心機 PlateSpin (KUBOTA)、日立微量高速遠心機 himac CF 15RX (HITACHI) を使用した。フローサイトメーターは FACS caliber flow cytometer (Becton Dickinson) を使用した。共焦点レーザー顕微鏡は LSM 510 META (Carl Zeiss Co.,Ltd.) または Nikon A1 CLSM (Nikon Instruments Inc., Melville, U.S.A.) を使用した。ルシフェラーゼ活性測定は Luminescencer-PSN (AB-2200 ATTO) を使用した。吸光度、蛍光強度の測定は PLATE manager Infinite M200 (TECAN) を使用した。

1-2-2 細胞培養

本章ではヒト子宮頸がん細胞 HeLa を用いて実験を行った。

1) 試薬調製

【非働化 FBS】

FBS (-20℃) を 4℃ で解凍し、56℃、30 分インキュベートした。

【MEM】

メディウム瓶はあらかじめオートクレーブ滅菌 (121℃、2 気圧、20 分) し、乾燥させた。MEM 9.5 g、NaHCO₃ 3.7 g を秤量し適量の超純水に溶解し、30 分以上室温で攪拌後、880 mL にメスアップした。それをクリーンベンチ内で Bente tip filter (0.22 μm) を用いて滅菌済みのメディウム瓶に濾過し 440 mL ずつ分注した。MEM NEAA、sodium pyruvate を各 5 mL 添加し、血清含有 MEM には非働化 FBS を 50 mL 添加し (10%)、4℃ 保存した。以降は、血清不含有 MEM を MEM (-)、血清含有 MEM を MEM (+) とした。

【PBS (-)】

ダルベッコ PBS (-) を 4.8 g を秤量し、超純水 500 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌 (121℃、2 気圧、20 分) 後、4℃ 保存した。

【10×トリプシン溶液 (0.25 %トリプシン溶液)】

EDTA・2Na・2H₂O 0.19 g、NaCl 0.63 g、NaH₂PO₄・2H₂O 0.19 g を適量の超純水に溶解し、NaOH で pH 7.2 に合わせ、80 mL にメスアップした。オートクレーブ滅菌 (121℃、2 気圧、20 分) を行い、2.5 % trypsin を 20 mL 加えて 100 mL とし、4℃ 保存した。

2) 細胞の立ち上げ

あらかじめ 37℃ 恒温槽で温めた MEM (+) をコニカルチューブに 9 mL 入れ、細胞ストックを 37℃ 恒温槽で半融解したものを加えた。1,500 rpm、2 分遠心分離し、上清を除去した後、10 mL MEM (+) を加えて懸濁することにより細胞を洗い、遠心分離を行った。MEM (+) で再懸濁後、10 cm dish に播種し、37℃、5 % CO₂ でインキュベートし、翌日に培地を交換した。

3) 細胞の継代

MEM (+)、PBS (-) は 37℃ に恒温槽で温めたものを使用した。培養細胞のメディウムを除去し、PBS (-) で洗浄した。10×トリプシン溶液を PBS (-) で希釈し、5 mL 添加し、37℃ で数分インキュベートし、細胞を dish からはがした。5 mL MEM (+) を加えコニカルチューブに回収して、遠心分離 (1,500 rpm、2 分) した。上清を除去し、MEM (+) 10 mL で懸濁した。懸濁液の一部をトリパンプルー染色後、血球計数板を用いて細胞数を計数した。再度 1,500 rpm、2 分遠心分離し、適当な密度になるように新しい dish に播種した。

4) 細胞の凍結

70～80 % コンフルエントの対数増殖期の細胞を用いてストックの調整を行った。細胞の回収は上記 3) の継代と同様の方法で行い、細胞懸濁液を細胞数計数して再度 1,500 rpm、2 分遠心分離し

た。上清を徐去し、 $0.5\sim 1.5\times 10^6$ cells/mL/tube となるように、細胞をセルバンカー（4℃で解凍）で懸濁し、1.5 mL サンプルチューブに入れ、-80℃で凍結し、保存した。液体窒素で保存する場合は、-80℃で凍結した後、24 時間以上経ってから液体窒素に移し保存した。

1-2-3 CPP-pAd の合成

CPP-pAd は、CPP を片山化学工業株式会社（Osaka, Japan）から御供与頂き、プロテノバ株式会社により pAd と化学修飾により合成した。その合成方法を以下に示した。pAd、100 mM disuccinimidyl suberate (DSS) (DMSO 溶液)、CPP をそれぞれ PBS で溶解した。まず、6 倍量の DSS 溶液を pAd 溶液に添加し、室温で 30 分インキュベートした。その反応液に、さらに 12 倍量の CPP 溶液を加え、室温で 1 時間インキュベートした。その後、等量の 50 mM glycine 溶液を添加し、pAd と CPP の反応を停止させた。得られた反応物を Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) - Time-of-Flight mass spectrometer (TOFMS) により、ProteinChip SELDI System (Bio-Rad Laboratories) を使用して解析した。

1-2-4 CPP-pAd と抗体の複合体作製

CPP-pAd と抗体は特に記載のない場合は、PBS (-)で 0.1 mg/mL に希釈した抗体 20 μ L に CPP-pAd を 1 μ L 添加し（モル比として 1 : 1）、ピペッティングし、室温で 1 時間インキュベートした（CPP-pAd/抗体）。抗体溶液に保存剤として sodium azide が添加されている場合は、細胞毒性があるため、PBS (-)で置換して用いた。抗体の PBS (-)置換は、slide-A-Lyzer[®] Mini Dialysis Units (Thermo scientific)を用い、PBS (-) 500 mL で 30 分、500 mL で 30 分、1 L で 1 時間、4℃で透析することにより行った。得られた抗体溶液は 4℃保存した。

1-2-5 FACS による抗体導入活性評価

1) 試薬調製

【FACS Buffer】

PBS(-) を 2.4 g 秤量し、適量の超純水で溶解し 245 mL にメスアップした。オートクレーブ滅菌（121℃、2 気圧、20 分）後、FBS を 5 mL 添加した（2 % FBS/PBS (-)）。4℃で保存した。

2) FACS 解析

12 well プレートに HeLa 細胞を 5×10^4 cells/well で播種し、37℃、5 % CO₂ でインキュベートした。24 時間後、MEM (-)または MEM (+) 1mL 中に CPP-pAd 及び HVJ-E と抗体の複合体を抗体量として 2 μ g/well (0.013 μ M) となるように添加した。37℃、5 % CO₂、2 時間インキュベート後、PBS (-)で洗浄し、細胞をトリプシン処理により回収した。その後、FACS Buffer で 3 回洗浄し、400 μ L FACS Buffer に 5 μ L 7-AAD/ 1×10^6 cells の割合で 7-AAD を添加したもので懸濁し、死細胞を染色し、FACS caliber flow cytometer 及び Cell Quest software を用いて解析した（カウント数: 1000

～10000 cells)。R-PE (Ex : 490nm, Em : 578nm)は FL-2、7-AAD (Ex:555nm, Em:655nm)は FL-3 で検出した。

細胞内取り込み経路の評価では、上記と同様の方法に、以下の操作を加えた。エネルギーの関与については、4℃で 30 分プレインキュベートした。エンドサイトーシス経路の検討については、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤として 0.4 M sucrose 含有 DMEM (-)で 30 分、マクロピノサイトーシス阻害剤として 5 mM amiloride 含有 DMEM (-)で 10 分、それぞれ 37℃、5 % CO₂ でプレインキュベートした。その後、CPP-pAd/抗体を抗体量として 2 µg/well (0.013 µM)となるように添加し、各条件下で 2 時間インキュベート後、FACS 解析を行った。

得られた蛍光強度から、以下の式に従って Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR)を算出し、抗体の細胞への取り込み量を評価した。

$$MFIR = CPP - pAd \text{ の蛍光強度} / \text{抗体のみの蛍光強度}$$

1-2-6 CLSM による抗体の細胞内動態の観察

1) 試薬調製

【100×Hoechest33342】

Hoechest33342 (MW : 561.93 g)を 1.4 mg/mL となるように滅菌水に溶解し、遮光して 4℃保存した (終濃度 : 2.5 mM)。

【10×PBS (-)】

NaCl 80 g、KCl 2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 29 g、KH₂PO₄ 2 g を秤量し、適量の超純水に溶解し、1 L にメスアップした (1.3 M NaCl、27 mM KCl、81 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O、14.7 mM KH₂PO₄)。オートクレーブ滅菌 (121℃、2 気圧、20 分) 後、4℃保存した。

【Alexa488 ラベル化 transferrin】

透析 buffer (0.1 M NaHCO₃、0.05 M NaCl、pH 8.3) は、16.8 g NaHCO₃、5.8 g NaCl を秤量し、適量の超純水に溶解し、NaOH で pH 8.3 に調整後、2 L にメスアップした。1×PBS (-)は 10×PBS (-)を超純水で希釈し、2 L 調製した。1.5 M Hydroxylamine (pH8.5)は hydroxylamine hydrochloride を 521.2 mg 秤量し、適量の PBS (-)で溶解し、NaOH で pH8.5 に調整し、5 mL にメスアップした (用時調製)。Transferrin は PBS (-)で 10 mg/mL になるように溶解した。

まず、transferrin 溶液 500 µL を透析膜 Dialysis Membrane Size 20 (Wako) を用いて透析 buffer で透析した (500 mL で 30 分、500 mL で 30 分、1 L で 1 時間、4℃)。その後、transferrin 溶液を回収し、1 mg/mL Alexa Fluor® 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (無水 DMSO に溶解) を 50 µL (1/10 体積) でボルテックスしながら添加した。遮光し、攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。1.5 M Hydroxylamine (pH 8.5) を 50µL (蛍光色素と等量) 加え、攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートすることにより反応を停止させた。さらに、PBS (-)で透析し、未反応の蛍光色素を除去した (500 mL で 30 分、500 mL で 30 分、1 L で 1 時間、4℃、遮光)。得られた Alexa488 ラベル化 transferrin は -20℃で保存した。

【Alexa546 ラベル化抗 NPC 抗体】

Alexa488 ラベル化 transferrin と同様の方法を用いて行ったが、一部の操作は以下のように変更した。透析膜は slide-A-Lyzer® Mini Dialysis Units (Thermo Scientific)を用い、抗体量 1 µg に対して 0.02 mg/mL Alexa Fluor® 546 carboxylic acid, succinimidyl ester を 0.4 µg で添加し、反応させた。得られた Alexa546 ラベル化抗 NPC 抗体は 4°C で保存した。

2) CLSM による細胞内動態観察

0.002 % PLL 溶液でガラス部位をコートした 35 mm ガラスボトム dish に HeLa 細胞を 1×10^5 cells/2mL/dish で播種し、5 % CO₂、37°C でインキュベートした。24 時間後、MEM (-) 1 mL に、CPP-pAd/抗体、HVJ-E/抗体（メーカーの手順通りに調製）を抗体量として 4 µg/well (0.027 µM) となるように添加し、37°C、5 % CO₂、2 時間インキュベートした。途中、1.5 時間で LysoSensor Green™ DND-189 (Ex:443 nm, Em:505 nm, pKa = 5.2)を 2 µL（最終濃度 0.25 µM）インキュベート中の培地に添加し、30 分インキュベートした（エンドソーム・ライソソーム染色）。その後、MEM (+) で洗浄し、1 mL の MEM (+)に 100×Hoechst33342 (Ex : 355 nm, Em : 465 nm)を 10 µL 添加し、室温で 10 分、遮光しながらインキュベートし、MEM (+)で 2 回洗浄した（核染色）。MEM (+) 1 mL を添加し Zeiss LSM 510 META を用いて観察を行った。観察には油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC)を用いた。Malti track (DAPI/FITC/Cy3) を用い、アルゴンレーザー (488 nm)、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)、Diode レーザー (405 nm)を用いて励起し、観察した。また、transferrin との局在観察の場合は、上記と同様の方法を用い、CPP-pAd/抗体を抗体量として 4 µg/well (0.027 µM)、Alexa488 ラベル化 transferrin を 50 µL 添加し、37°C、5 % CO₂、30 分インキュベート後、核を染色し、Nikon A1 CLSM を用いて観察した。観察には、油浸対物レンズ (Plan Apo VC 60X 1.4 N.A.) を用い、405 nm、488 nm、561 nm のレーザーをそれぞれ Hoechst 33342、Alexa488、R-PE の励起に使用した。

抗 NPC 抗体の細胞内局在観察の場合は、まず、0.002 % PLL 溶液で底をコートした 96 well imaging plate (BD Falcon)に HeLa 細胞を 5×10^3 cells/100µL/well で播種し、5 % CO₂、37°C でインキュベートした。24 時間後、5 % BSA を溶解した MEM (-) 100 µL に、CPP-pAd と Alexa546 ラベル化抗 NPC 抗体の複合体を抗体量として 1.5 µg/well (0.1 µM)となるように添加し、37°C、5 % CO₂、2 時間インキュベートした。上記と同様に核を染色後、Nikon A1 CLSM を用いて観察を行った。観察には、油浸対物レンズ (Plan Apo VC 60X 1.4 N.A.)を用い、405 nm、561 nm のレーザーをそれぞれ Hoechst33342、Alexa546 の励起に使用した。

1-2-7 抗 NPC 抗体の免疫染色による局在評価

1) 試薬調製

【4% PFA/PBS (1L) 】

蒸留水 800 mL に 4 N NaOH を 400~500 µL 添加し、PFA 40 g をホットスターラーで 60°C~70°C に保ちながら、30 分以内に溶解した。その後、氷冷し 10× PBS 100 mL 添加し、pH が 7.2~7.5 になっていることを確認した。そして、1L にメスアップし、濾過滅菌後 4°C で保存した。

2) 免疫染色による抗 NPC 抗体の局在観察

Lab-Tek II chamber slide (8well)を 0.002 % PLL で各 well をコートし、HeLa 細胞を 1×10^4 cells/200 μ L/well で播種した。5 % CO₂、37°Cでインキュベートし、24 時間後、MEM (+) 200 μ L 中に CPP-pAd 及び HVJ-E と抗 NPC 抗体の複合体を抗体量として 1.2 μ g/well (0.04 μ M)となるように添加し、5 % CO₂、37°Cで 2 時間インキュベートした。その後、PBS (-)で 2 回洗浄し、4 % PFA/PBS を 200 μ L/well 添加し、室温で 15 分インキュベートして細胞を固定した。スライドガラスをはずし、PBS (-)で 5 分、2 回洗浄した。1 % TritonX-100/PBS を 200 μ L/well 添加し、室温で 10 分インキュベートした。PBS (-)で 5 分、2 回洗浄後、2 % FBS/PBS 200 μ L/well 添加し、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去し、2 次抗体 anti-mouse IgG Alexa fluor[®] 594 F(ab')₂ fragment (Ex : 590 nm, Em : 617 nm) (0.5% FBS/PBS で 500 倍希釈) または Polyclonal Rabbit Anti-mouse Immunoglobulins/TRITC (Ex : 541 nm, Em : 572 nm) (0.5% FBS/PBS で 20 倍希釈) を 50 μ L/well 添加し、37°C、1 時間インキュベートした。PBS (-)で 5 分、3 回洗浄後、蒸留水で 5 分、2 回洗浄した。そして、Vector shield mounting MEDIUM With DAPI (Ex : 372 nm, Em : 456 nm)で封入し、Zeiss LSM 510 META または Nikon A1 を用いて CLSM で観察した。Zeiss LSM 510 META での観察には、油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC)を用いた。Malt track (DAPI/Cy3)を用い、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)、Diode レーザー (405 nm)を用いて励起し、観察した。Nikon A1 CLSM での観察には、油浸対物レンズ (Plan Apo VC 60X 1.4 N.A.)を用い、405 nm、561 nm のレーザーをそれぞれ Hoechst33342、Alexa594 の励起に使用した。

1-2-8 レポータージーンアッセイ

HeLa 細胞を 96 well plate (BD Falcon) に 4×10^3 cells/well で播種し、37 °C、5 % CO₂、24 時間インキュベートした。FuGENE HD[®]を用いて、pTAL-NF- κ B-Luc を 0.05 μ g/well で MEM (+)中でトランスフェクションし (pDNA : FuGENE = 1 : 3)、37°C、5 % CO₂、6 時間インキュベートした。上清を除去し、CPP-pAd と抗 NPC 抗体または negative control 抗体との複合体を MEM (+) 50 μ L/well に抗体量として 0.8 μ g/well (0.1 μ M)で添加し、さらに 6 時間インキュベートした。その後、TNF- α の MEM (+)溶液を最終濃度が 5 ng/mL となるように抗体を処理した培地に追加して添加し、追加で 6 時間インキュベートした。エンドソーム酸性化阻害条件での評価の場合は、pTAL-NF- κ B をトランスフェクション後、25 mM NH₄Cl の MEM (+)溶液に培地交換し、37°C、5 % CO₂、30 分ブレインキュベート後、25 mM NH₄Cl 存在下で CPP-pAd/抗体を添加した。37°C、5 % CO₂、6 時間インキュベートし、ルシフェラーゼ活性を以下のように測定した。上清を除去し、PBS (-)で洗浄した後、Reporter Lysis Buffer 75 μ L/well 添加し、-80°Cで 30 分以上凍結させた。その後、氷上で融解し、細胞を回収して 15,000 rpm、4°C、5 分遠心分離し、上清を回収してサンプル溶液とした。サンプル溶液 20 μ L を測定用チューブに入れ、基質 (室温に戻して使用) を 50 μ L 添加し、ルシフェラーゼ活性を Luminescenser-PSN により測定した。また、タンパク濃度を BCA Protein Assay Kit を用いて、推奨プロトコールに従い定量した。ルシフェラーゼアッセイより得られた値をタンパク質量で除することにより、RUL/mg protein を算出した。

1-2-9 溶血試験

抗凝固剤として、trisodium citrate dihydrate 22 mg/mL、citric acid monohydrate 8 mg/mL、D (+)-glucose 22 mg/mL となるように超純水に溶解し、ACD 液 (acid citrate dextrose solution) を調製した。ラット (Wistar/ST、雄、6 週齢) をネンブタールで麻酔後、開腹し、左心室よりヘパリン溶液 (1000 units/mL) でコートしたシリンジで採血した。速やかに、採取した血液量の 1/5 体積の ACD 液を加え、転倒混和した (4°C で 1 週間程度保存可能)。高速遠心機で 10,000 rpm、10 分、4°C で遠心分離後、スイング式遠心機で 4,000 rpm、10 分、室温で遠心分離した。上清及び赤血球画分上部の白色沈殿 (白血球、血小板) を可能な限り除去した。得られた赤血球画分の 3 倍体積の PBS (-) を加え、転倒混和し、4,000 rpm、10 分、室温で遠心分離し、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返す、洗浄し、得られた赤血球画分と等量の PBS (-) を加え、赤血球懸濁液とした。赤血球懸濁液 250 μ L に低張緩衝液 (PBS (-) の 10 倍希釈液) を 1 mL 加え、溶血させ、3,000 rpm、5 分遠心分離した。上清の 540 nm (ヘモグロビンの吸光波長) における吸光度を測定し、吸光度が 2.0~2.5 になるように希釈した場合の希釈倍率で赤血球懸濁液を PBS (-) で希釈し、赤血球試験液とした。CPP-pAd を 0.5、1.0 pmol/ μ L となるように pH 7.4、pH 5.5 に調整した PBS (-) で希釈した。その溶液 40 μ L に赤血球試験液を 10 μ L 加え、混和させながら 37°C、2 時間インキュベートした。3,000 rpm、4°C、5 分で遠心分離し、上清の 540 nm での吸光度を Biostep nano で測定し、以下の式により溶血率を算出した。

$$\text{溶血率 (\%)} = OD_{540\text{-}CP} / OD_{540\text{-}低} \times 100$$

$OD_{540\text{-}CP}$: CPP-pAd での吸光度 (540 nm)
 $OD_{540\text{-}低}$: 低張溶液での吸光度 (540 nm)

1-2-10 細胞死評価

96-well Cell BIND Plates (Corning) に HeLa 細胞を 3×10^3 cells/well で播種し、37°C、5 % CO_2 で 24 時間インキュベートした。PBS (-) で洗浄し、MEM (-) 中に CPP-pAd/抗体、HVJ-E/抗体を抗体量として 0.2 μ g/well (0.013 μ M) で添加し、37°C、24 時間インキュベートした。細胞生存率を WST-1 アッセイにより評価した。MEM : WST-1 = 10 : 1 の割合で混合したメディウムを 110 μ L/well で添加し、37°C、5 % CO_2 で 2 時間インキュベートした。その後、PLATE manager により 450 nm (reference : 630 nm) で吸光度を測定し、以下の式により cell viability を算出した。

$$\text{cell viability} = OD_{450\text{nm}-630\text{nm}}(\text{抗体導入}) / OD_{450\text{nm}-630\text{nm}}(\text{未処理})$$

1-3 実験結果

1-3-1 CPP-pAd による細胞内への抗体導入活性

CPP-pAd の抗体導入活性を検討するために、蛍光ラベル化抗体を用いて、フローサイトメトリー（FACS）解析により抗体の取り込み効率を評価した。

はじめに、CPP-pAd と抗体の複合体の最適比を検討するため、CPP-pAd : 抗体を 1 : 9、1 : 3、1 : 1、3 : 1、9 : 1 のモル比で混合することで調製した複合体の細胞内取り込み効率を評価した。その結果、CPP-pAd に対し、抗体を増加させるに従い取り込み効率が増大し、CPP-pAd : 抗体 = 1 : 1 のモル比の時に最大となり、さらに増加させると取り込み効率は減少した（図 1-3a）。したがって、1 : 1 が最適なモル比であることが示された。次に、細胞へ添加する抗体量の導入活性への影響について検討するために、CPP-pAd と抗体の最適混合比の 1 : 1 で複合体を調製し、様々な抗体量における細胞内取り込みを評価した。比較として市販の抗体導入試薬である HVJ-E を用いた。その結果、CPP-pAd、HVJ-E いずれも抗体量依存的に取り込み効率が増大したが、取り込み効率は CPP-pAd の方が高く、 1.3×10^{-15} mol/cell の抗体量では、CPP-pAd は HVJ-E と比較して約 10 倍以上の顕著に高い導入活性を示した（図 1-3b）。したがって、CPP-pAd は市販の導入試薬と比べても抗体を非常に効率的に細胞内に導入可能であることが示唆された。さらに、CPP、pAd 単独と抗体の混合のみでは全く抗体導入活性は認められなかったことから、CPP、pAd の両方が機能して導入されていることが示唆された（図 1-3c）。

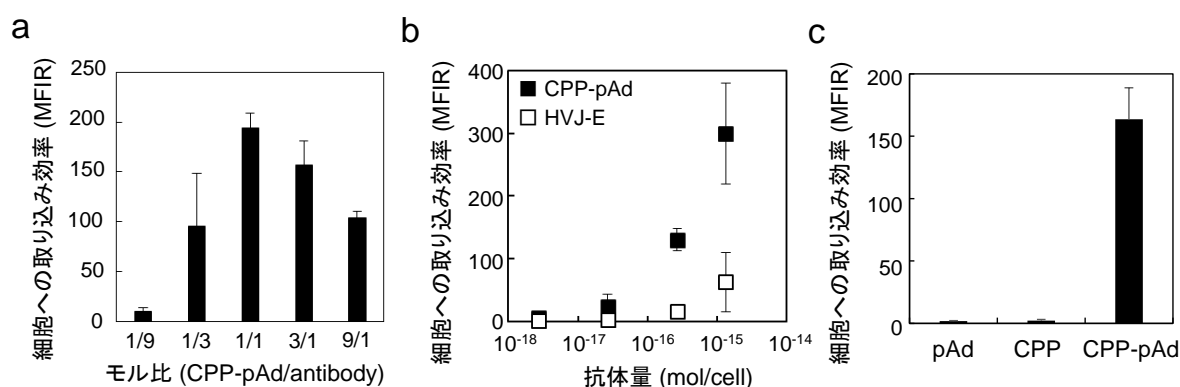


図 1-3. FACS による細胞への取り込み効率の評価

CPP-pAd または HVJ-E と R-PE ラベル化抗体で複合体を作製し、HeLa 細胞に添加し、37°C、2 時間インキュベート後、FACS 解析により取り込み量を評価した。MFIR は抗体のみの場合の蛍光強度で各サンプルの蛍光強度を除することで算出した。(a) CPP-pAd と抗体のモル比の取り込みへの影響。CPP-pAd と抗体を示したモル比で複合体を作製し、FACS 解析を行った。(抗体量 0.013 μ M) (b) 抗体量の取り込み効率への影響。図示の抗体量で添加し、FACS 解析を行った。(抗体:CPP-pAd=1:1) また、市販の抗体導入試薬 HVJ-E も同様に図示の抗体量で添加した。(c) pAd、CPP 単独での取り込みへの影響。CPP のみ、pAd のみと抗体を CPP-pAd と同様に混合し、取り込み効率を評価した。(抗体量 0.013 μ M) データは平均 \pm S.D.で表した。(n=3)

1-3-2 CPP-pAd により導入された抗体の細胞内動態観察

1-3-1 の FACS 解析により、CPP-pAd は高い抗体導入活性が示されたため、その導入された抗体の細胞内動態を CLSM 観察により評価した。

CPP-pAd により導入された抗体（赤）は、細胞内に取り込まれており、緑のエンドソームに局在し黄色のドットとして認められるものの他に、赤の抗体が単独でも観察されたことから、抗体が細胞質にまで送達されていることが示唆された。一方、HVJ-E では抗体が細胞内にはほとんど認められず、細胞膜表面上に付着し、凝集していた（図 1-4）。

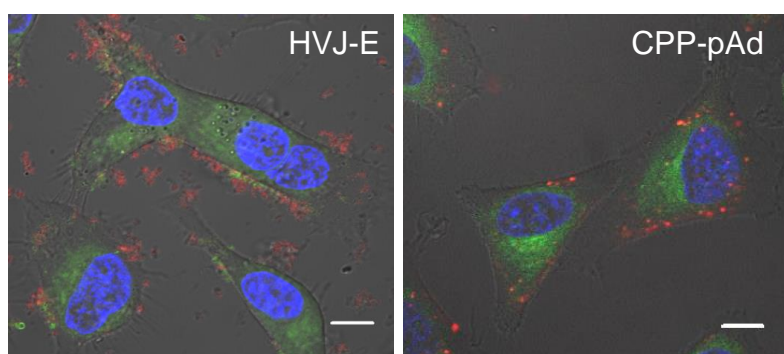


図 1-4. 導入された抗体の CLSM による細胞内動態観察

CPP-pAd、HVJ-E を R-PE ラベル化抗体と複合体を作製し、HeLa 細胞に添加し、37°C、2 時間インキュベート後、CLSM により観察した。（抗体量 0.027 μ M）赤：抗体（R-PE）、青：核（Hoechst33342）、緑：エンドソーム、ライソソーム（LysoSensor Green DND-189）bar：10 μ m

1-3-3 導入された抗体の標的タンパク質への結合評価

CPP-pAd により、抗体が細胞質に送達されることが示されたため、その導入された抗体が標的タンパク質と結合するのかについて核膜孔複合体（NPC）に対する抗体を用いて評価した。NPC は孔を形成し、核膜を貫通して存在するタンパク質であり、細胞質と核の間の RNA やタンパク質等の分子輸送に関与している⁵⁴⁾。

まず、抗 NPC 抗体を導入し、その細胞内局在を評価した。抗体導入後、4 % PFA で固定処理し、免疫染色により抗体を検出したところ、CPP-pAd では、赤で示される抗体が NPC の存在する核膜特異的に局在している様子が観察された。一方で、HVJ-E では、核膜への局在は認められたものの、非特異的な局在も多く、細胞毒性も認められた（図 1-5a）。また、CPP-pAd あるいは HVJ-E で処理した 100 個以上の細胞に対して、抗 NPC 抗体が核膜に局在した細胞の割合を算出したところ、CPP-pAd では 25.4 % (33/130 cells)、HVJ-E では 46.4 % (51/110 cells)であった。その代表的な広域図を図 1-5b に示した。したがって、CPP-pAd によって導入された抗体は標的タンパク質への結合活性を示し、それは、HVJ-E に比べると効率は劣るものの、細胞毒性が低く、特異性が高いことが示唆された。

しかし、このような固定処理を行った場合、本来の局在と異なることが報告されており⁵⁵⁾、固定による影響を考慮する必要がある。そこで、抗 NPC 抗体を直接 Alexa594 で蛍光ラベル化し、生細胞での抗体の局在を観察した。その結果、生細胞においても、同様に核膜に局在することが観察され、確かに抗 NPC 抗体は NPC に結合することが示された（図 1-5c）。しかし、その効率は固定した場合に比べて低いだけでなく、細胞質にドット状の抗体が多く観察されたことから、固

定処理による影響は否定できないことが示唆された。

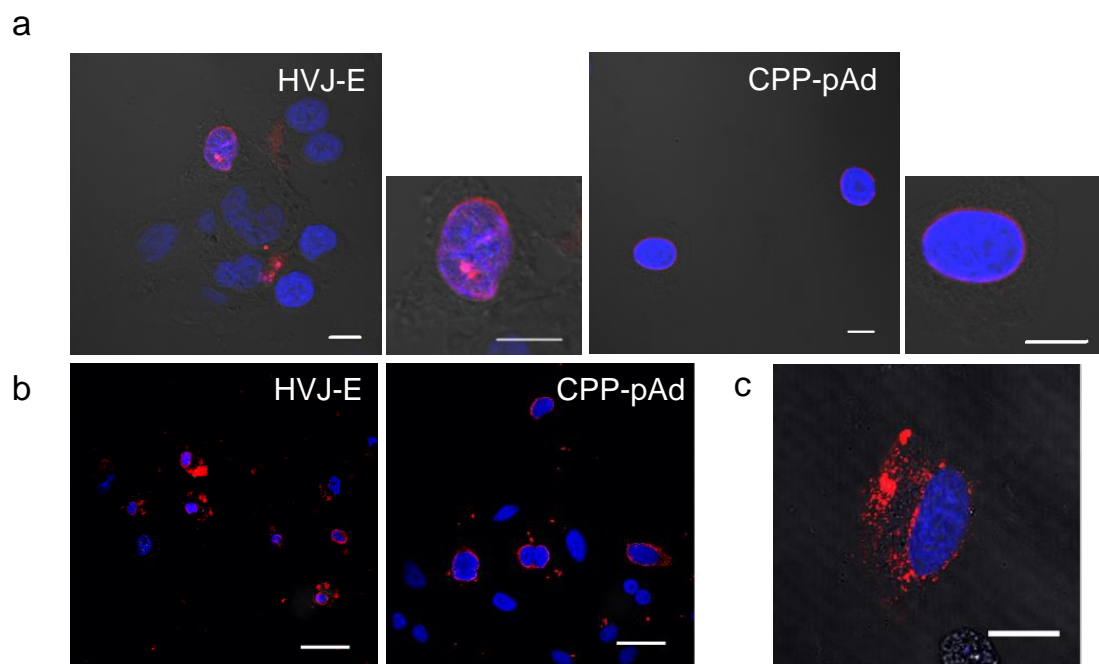


図 1-5. CLSM 観察による抗 NPC 抗体の機能性評価

CPP-pAd または HVJ-E と抗 NPC 抗体の複合体を作製し、HeLa 細胞に添加し、37℃、2 時間インキュベート後、CLSM 観察により評価した。(a) 4% PFA で固定処理後、免疫染色により抗 NPC 抗体の局在を観察した。(抗体量 0.04 μ M) 各サンプルの右図は拡大図を示した。青：核 (DAPI) 赤：抗体 (Alexa594) Bar：10 μ m (b) (a)と同じ条件で、広域図を示した。Bar：50 μ m (c) 抗 NPC 抗体を蛍光ラベル化し、生細胞で観察した。青：核 (Hoechst33342) 赤：抗体 (Alexa546) Bar：20 μ m

次に、導入された抗 NPC 抗体が NPC に結合していることを確かめるために、NF- κ B のレポータージーンアッセイにより評価した。NF- κ B は活性化されると NPC を介して核内に移行し、遺伝子発現を誘導する。この NF- κ B の応答配列をルシフェラーゼ配列の上流に挿入した pDNA (pTAL-NF- κ B-Luc) を用いて、NF- κ B の核内移行をルシフェラーゼの発現量で評価した。pTAL-NF- κ B-Luc または NF- κ B 応答配列を含まない pTAL-Luc を HeLa 細胞に導入し、様々な濃度で TNF- α 刺激を行った。pTAL-Luc ではいずれの TNF- α 濃度でもほとんどルシフェラーゼ発現が認められなかったのに対し、pTAL-NF- κ B-Luc では、TNF- α 濃度依存的にルシフェラーゼ発現が増大した (図 1-6a)。したがって、pTAL-NF- κ B-Luc の導入によるルシフェラーゼ発現は TNF- α 依存的であり、pTAL-NF- κ B-Luc を用いることで、TNF- α によって NF- κ B の活性化が評価できることが示唆された。つまり、導入された抗 NPC 抗体が NPC に結合すると、活性化 NF- κ B の核移行が物理的に抑制され、NF- κ B 応答配列に結合できないため、ルシフェラーゼ発現が抑制されると考えられる。このような細胞固定処理を行わずに、高感度に評価可能なレポータージーンアッセイを用いて NF- κ B の核内移行を間接的に評価した。図 1-6b に示したように、CPP-pAd により抗 NPC 抗体を導入した結果、コントロール抗体を同様に導入した場合に比べ、約 40%ルシフェラーゼ活性が抑制された。したがって、抗 NPC 抗体が NPC に結合したことにより、NF- κ B の核

移行が阻害された可能性が示唆された。

以上、抗 NPC 抗体を用いた結果から、CPP-pAd により、抗体の標的タンパク質への結合活性を保持したまま導入することが可能であることが示唆された。

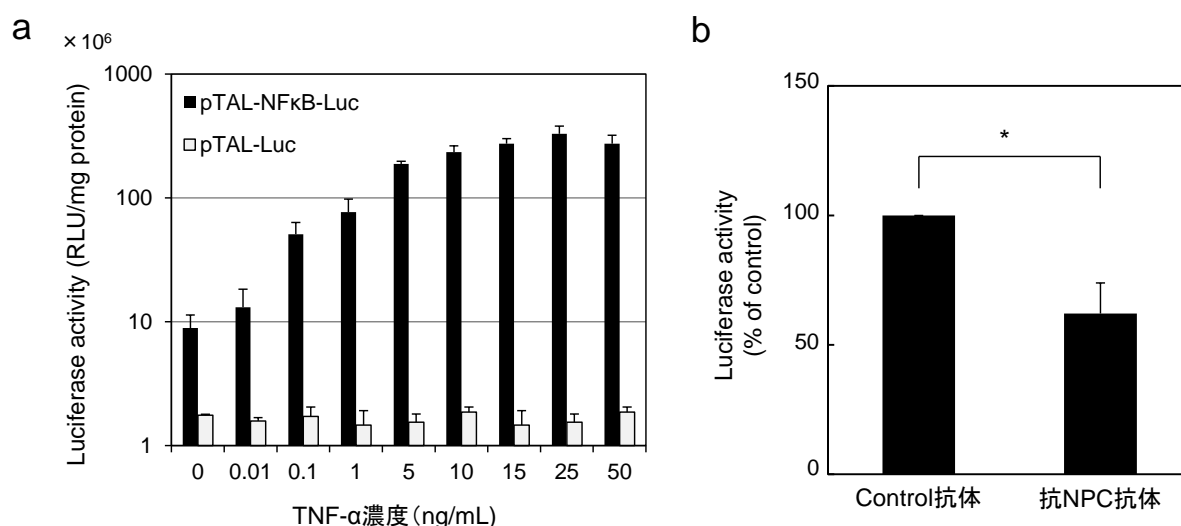


図 1-6. レポーター遺伝子アッセイ

(a) TNF-α 依存的な NF-κB の活性評価。NF-κB 応答配列を挿入した pTAL-NF-κB-Luc (■)、挿入していない pTAL-Luc (□) を HeLa 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を評価した。(b) CPP-pAd と抗 NPC 抗体またはコントロール抗体とで複合体を作製し、pTAL-NF-κB-Luc をトランスフェクションした HeLa 細胞に添加し (抗体量 0.1 μM)、37°C、12 時間インキュベート後、ルシフェラーゼ活性を測定した。抗体導入後 6 時間後に TNF-α 刺激を行った。結果はコントロール抗体導入に対する割合で示した。データは平均 ± S.D. で示した。(*, P<0.05, n=3)

1-3-4 細胞内取り込み経路の検討

CPP-pAd は細胞質に効率的に抗体を導入し、機能性を示すことが明らかとなったため、その取り込み経路について検討を行った。膜透過性ペプチドとして知られているオリゴアルギニンペプチドでは、エネルギー依存的なエンドサイトーシスによる取り込みと、エネルギー非依存的に細胞膜を直接透過する取り込み経路の存在が報告されている^{55,56)}。そこで CPP-pAd がどちらの経路を介して細胞質へ抗体を送達するのかを検討するために、はじめに、細胞内取り込みのエネルギー依存性の関与を、低温条件の 4°C での取り込みを FACS 解析によって評価した。その結果、CPP-pAd は、4°C 条件で著しく取り込み効率が減少した (図 1-7a)。したがって、CPP-pAd の細胞内取り込みにはエネルギー依存的なエンドサイトーシス経路が関与することが示唆された。

次に、エンドサイトーシスには、複数の経路が存在することが知られていることから、各種マーカー及び阻害剤を用いて、エンドサイトーシス経路の詳細な検討を行った。エンドサイトーシスの中でも、最も広く知られた主要な経路であるクラスリン介在性エンドサイトーシスについて検討するため、そのマーカーである transferrin と CPP-pAd/抗体の局在を、インキュベート開始から 30 分後に、CLSM 観察により評価した。その結果、細胞内に緑で示される transferrin と赤の抗

体が共局在し、黄色のドットが多数観察された（図 1-7b）。さらに、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤の sucrose 存在下で有意に抑制された（図 1-7c）。これらの結果より、CPP-pAd による抗体の取り込みにはクラスリン介在性エンドサイトーシス経路が関与していることが示唆された。また、図 1-7b では、細胞内に黄色のドットの他に、赤の抗体が単独でドットとして観察されたことから、クラスリン介在性エンドサイトーシス以外の経路も存在する可能性が示唆された。これまでに、アルギニン含有ペプチドの取り込み経路の一つとして特殊なエンドサイトーシス経路のマクロピノサイトーシスが知られており^{57,58)}、CPP もアルギニンに富む構造をしているため、マクロピノサイトーシス経路の可能性が考えられた。そこで、その阻害剤である amiloride の存在下で細胞への取り込みを評価した結果、CPP-pAd の取り込みは有意に抑制された（図 1-7d）。したがって、取り込みにマクロピノサイトーシス経路も関与していることが示唆された。また、図 1-7e のヒストグラムでは、sucrose、amiloride のいずれの阻害剤の存在下でも CPP-pAd の蛍光強度の高いピークが一部で認められ、各経路の阻害条件下でも一部取り込まれていることから、両経路の存在が示唆された。

以上の結果より、CPP-pAd はクラスリン介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの両経路により抗体を細胞内に送達されることが示唆された。

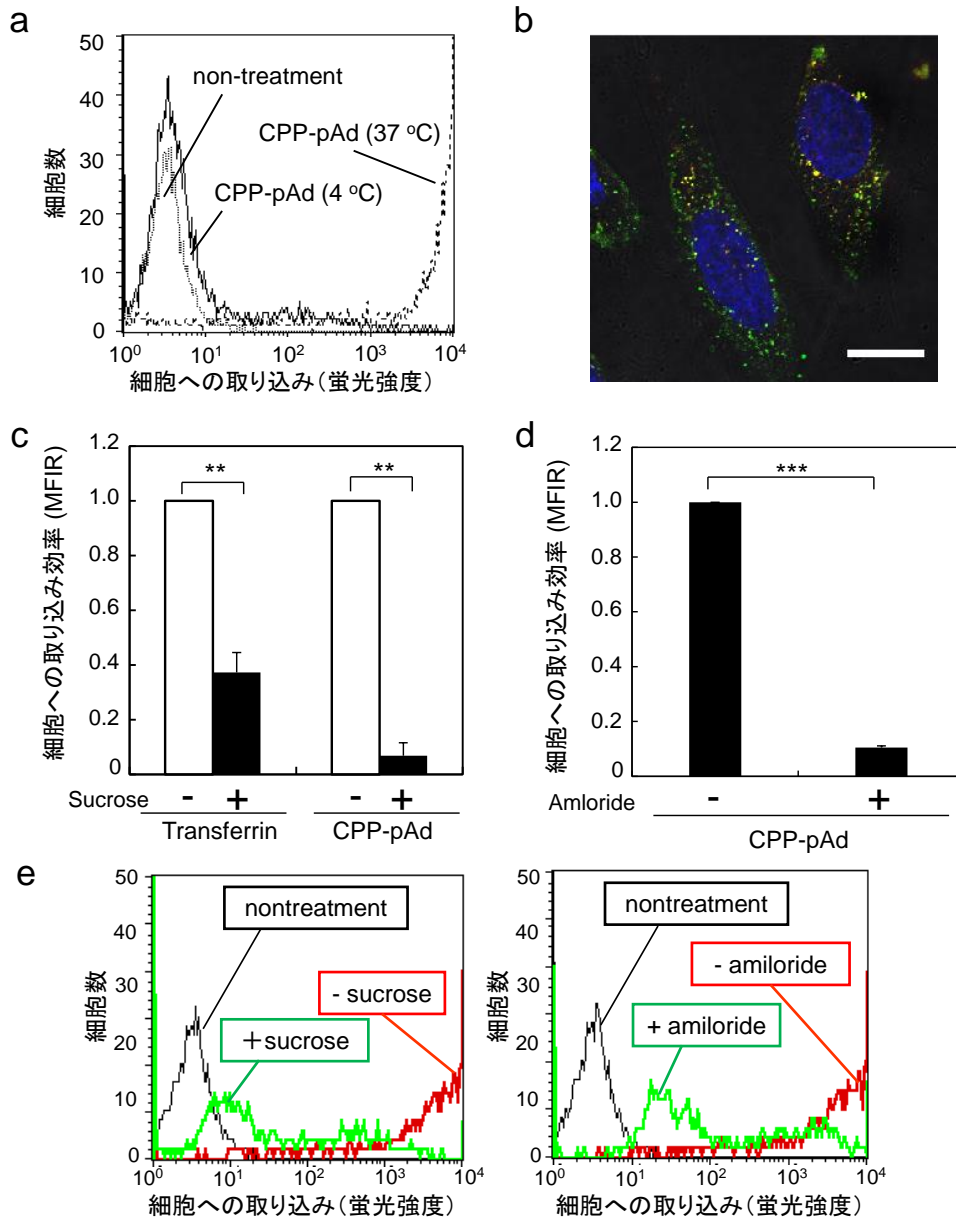


図 1-7. 細胞内取り込み経路の評価

CPP-pAd と R-PE ラベル化抗体の複合体を作製し、HeLa 細胞に添加、各条件でインキュベートし、取り込み経路を評価した。(a) 温度の影響。37°C または 4°C で 2 時間インキュベートし、FACS 解析により取り込みを評価した。太点線：37°C 実線：4°C 細点線：未処理 (b) Transferrin との局在解析。CPP-pAd/抗体と Alexa 488 ラベル化 transferrin を共処理し、30 分インキュベート後の細胞内動態を CLSM により観察した。青：核(Hoechst33342) 赤：抗体(R-PE) 緑：Transferrin (Alexa 488) Bar：20 μ m (c) クラスリン介在性エンドサイトーシスの関与の評価。0.4 M sucrose 存在下で 37°C、2 時間インキュベート後、FACS 解析により取り込みを評価した。Transferrin (クラスリン介在性エンドサイトーシスマーカー) も同様に評価した。(d) マクロピノサイトーシスの関与の評価。5 mM amiloride 存在下で 37°C、2 時間インキュベート後、FACS 解析により取り込みを評価した。データは平均 \pm S.D. で示した。(**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, $n = 3-4$) (e) sucrose、amiloride 存在下の FACS 解析の結果をヒストグラムで表した。

1-3-5 細胞質への送達メカニズムの解析

1-4-4 で、CPP-pAd の取り込み経路として、クラスリン介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの関与が示されたが、取り込まれた後の細胞質への送達メカニズムについては明らかとなっていない。各エンドサイトーシスで取り込まれた CPP-pAd は、そのままでは、分解酵素を含むライソソームに送達されて分解されてしまうため、抗体が機能を発揮するためには、エンドソームから脱出して細胞質に送達されなければならない（図 1-8）。1-3-2、1-3-3 の検討で、CPP-pAd は細胞質にまで抗体を送達可能であることが明らかとなったことから、エンドソームから脱出していると考えられる。

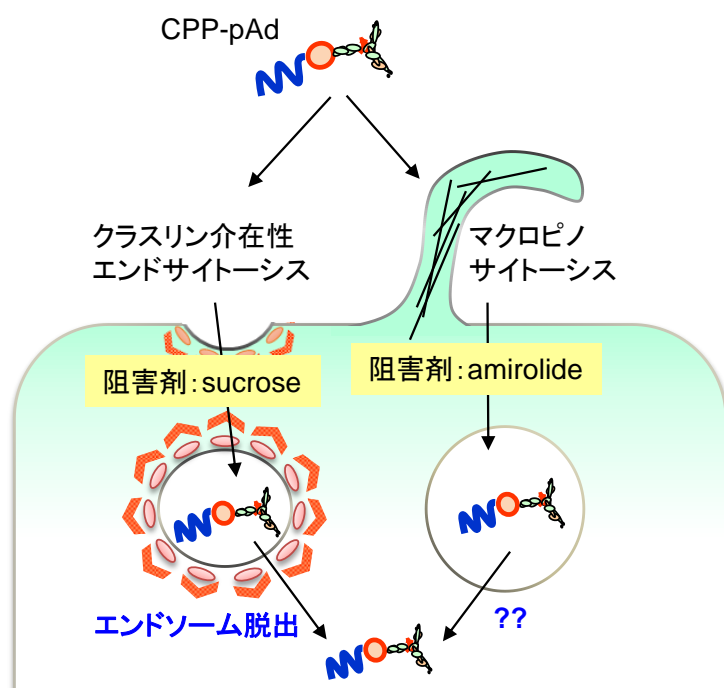


図 1-8. 細胞質送達の概要
CPP-pAd はクラスリン介在性エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスの両経路で取り込まれる。細胞質送達にはそれぞれの小胞からの脱出が必要である。

マクロピノサイトーシス経路については、これまでに、膜透過ペプチドとして広く知られているアルギニンペプチドを利用したキャリアで報告され、効率的な細胞質送達が認められている^{59,60)}。これまでに、マクロピノサイトーシスで取り込まれた場合、ライソソームにおける分解を回避しやすいなど、キャリアの取り込み経路として有利であると考えられているが⁶¹⁾、そのメカニズムについての詳細は明らかとなっていない。そこで、各種キャリアの主要な取り込み経路であり、エンドソーム脱出機構に関しても多くの研究がなされているクラスリン介在性エンドサイトーシスに着目し、CPP-pAd の脱出メカニズムについて検討した。ペプチドやポリマーを基盤としたキャリアの主なエンドソーム脱出機構として、エンドソーム内の酸性環境におけるエンドソーム膜との直接的な相互作用（膜融合、膜破壊）と、含有アミンによるプロトンスポンジ効果の 2 つが挙げられる。直接的な相互作用としては、インフルエンザウイルス由来ペプチドの GALA がエンドソーム脱出素子として広く知られており²⁹⁾、エンドソーム内 pH でペプチドが構造変化することでエンドソーム膜に挿入し、不安定化させることで脱出可能なメカニズムである。また、プロトンスポンジ効果は、ヒスチジンやポリエチレンジアミンのエンドソーム脱出機構とし

て知られており、アミンがエンドソームの酸性環境でプロトンを吸収し、pH 緩衝剤として働くため、プロトンと共に Cl⁻ の流入が促進され、浸透圧の上昇により膜が破裂することで脱出可能となる^{32,62)}。そこで、CPP-pAd のエンドソーム脱出について、この 2 つのメカニズムの関与について検討した。

まず、CPP による直接的なエンドソーム膜との相互作用の可能性について検討した。そのために、膜破壊の評価に用いられている溶血試験⁶³⁾を行った。キャリアーが赤血球と直接相互作用する場合、赤血球膜が破壊され、溶血することが知られている。生理的条件の pH 7.4 とエンドソーム内の pH 5.5 条件で CPP-pAd の溶血試験を行った結果、溶血はほとんど認められず、pH による差も認められなかった (図 1-9a)。したがって、CPP が直接エンドソーム膜と相互作用することにより脱出する可能性は低いと考えられた。

次に、CPP はその構造中にアミンを含むため、プロトンスポンジ効果の可能性について検討した。1-3-3 で示したレポータージーンアッセイ (図 1-6) を利用して、エンドソーム酸性化阻害剤 NH₄Cl の影響を評価した。NH₄Cl 存在下ではエンドソーム内へのプロトンの流入が抑制されることで、プロトンスポンジ効果が抑制されるため、導入した抗 NPC 抗体がエンドソームを脱出することができず、図 1-6 で認められたルシフェラーゼ活性の抑制が阻害されると考えられる。図 1-6 と同様の評価を NH₄Cl 存在下で行った結果、コントロール抗体に比べて、抗 NPC 抗体導入によるルシフェラーゼ活性の有意な抑制は認められなかった (図 1-9b)。したがって、抗 NPC 抗体がエンドソームを脱出することができなかったため、NF-κB の核移行阻害が抑制されたと考えられ、CPP-pAd の抗体の細胞質送達にはプロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出が関与していることが示唆された。

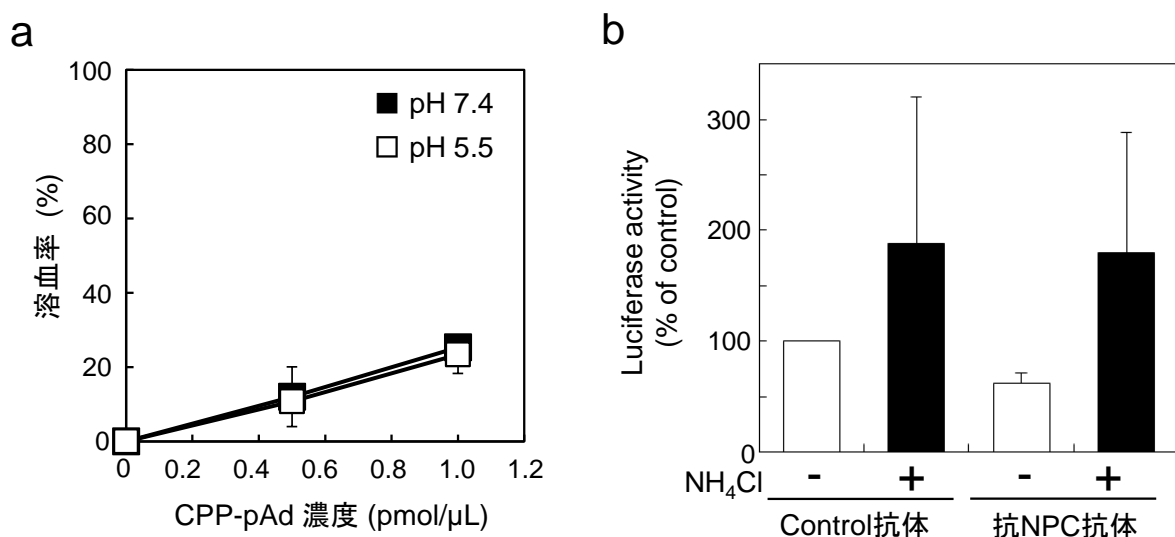


図 1-9. 細胞質送達メカニズム

(a) 溶血試験。pH 7.4、pH 5.5 条件で赤血球と示した濃度の CPP-pAd を混合し、37°C、2 h インキュベート後、蛍光強度測定した。低張溶液で膜破壊した場合の蛍光強度を 100%とした場合の割合を溶血率とした。(b) レポータージーンアッセイ。図 1-6 と同様の方法で、2.5 mM NH₄Cl 存在下で行った。(抗体量 0.1 μM) データは平均 ± S.D.で示した。(n=3)

1-3-6 血清存在下及び細胞毒性の評価

これまでに、細胞レベルの *in vitro* における評価を行ってきたが、CPP-pAd の *in vivo* への応用を考えた場合、血中に存在するイムノグロブリンと置換されることにより、導入したい抗体の導入活性が低下する可能性が考えられる。そこで、血清存在下での細胞への取り込みを FACS により評価した。その結果、50%の血清存在下においても、若干の低下は認められるものの、CPP-pAd は高い導入活性を示した (図 1-10a)。したがって、血中においても送達したい抗体が他の抗体に置換される可能性は低いことが示唆された。

さらに、CPP-pAd は生細胞に高効率で導入可能であることが重要であるため、細胞毒性について検討した。抗体導入に限らず、細胞への導入活性が高いキャリアーの多くは細胞毒性も高いことが知られている。そこで CPP-pAd の細胞毒性を、WST-1 アッセイを用いて評価した結果、未処理と比較して、HVJ-E では細胞生存率が有意に減少したのに対し、CPP-pAd では未処理と同程度の生存率を示した (図 1-10b)。また、細胞形態を観察した結果、HVJ-E では導入後に、細胞同士が融合したような明らかな細胞形態の変化が認められたのに対して、CPP-pAd では未処理細胞と同様の細胞形態であった (図 1-10c)。これらの結果により、CPP-pAd は細胞毒性を示すことなく、細胞内に抗体を効率的に導入可能であることが示唆された。

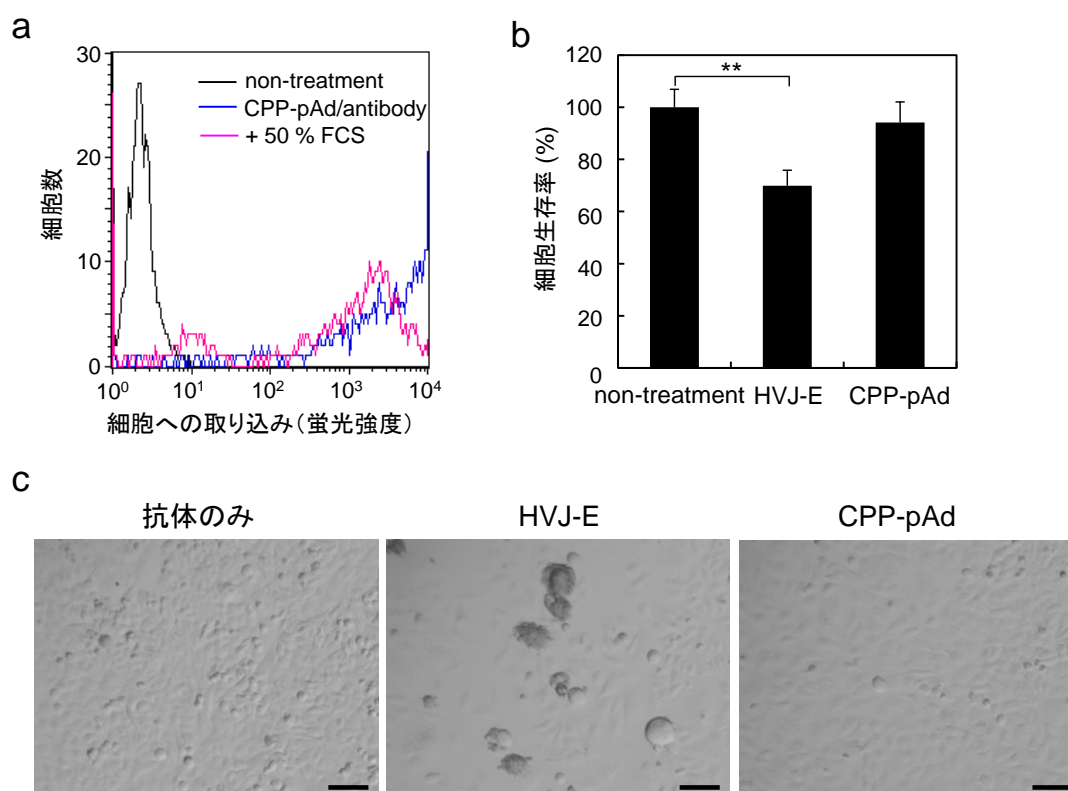


図 1-10. 血清存在下での取り込みと細胞毒性評価

(a) 血清存在下での取り込み評価。R-PE ラベル化抗体を用いて、CPP-pAd/抗体を HeLa 細胞に血清 (50% FCS) 存在下で添加し、37°C、2 時間インキュベート後、取り込みを FACS により評価した。(抗体量 0.013 μ M) (b) WST-1 アッセイ。CPP-pAd または HVJ-E と抗体の複合体を HeLa 細胞に添加し、37°C、24 時間インキュベート後に WST-1 アッセイにより細胞生存率を算出した。(*, $P < 0.01$, $n = 3$) (c) 細胞形態観察。抗体のみ、HVJ-E または CPP-pAd の抗体との複合体を HeLa 細胞に添加し、37°C、24 時間インキュベート後、顕微鏡観察した。Bar : 100 μ m

1-4 考察

本章では、がん治療において着目されている細胞内タンパク質に対して、その機能を抗体によって制御することを目指して、抗体の効率的な細胞質送達方法を開発するために、膜透過性ポリマー (CPP) と protein A 誘導体 (pAd) を利用した新しいキャリアーCPP-pAd を構築した。CPP-pAd は市販の抗体導入試薬の HVJ-E と比べても著しく高い導入活性を示し (図 1-3)、さらに、抗体の細胞質送達 (図 1-4) 及び標的タンパク質への結合も認められたことから (図 1-5, 6)、CPP-pAd は抗体導入キャリアーとして有用であることが示唆された。

この CPP-pAd の特徴は膜透過性素子と抗体の結合に pAd を利用しているところにある。pAd は Fc 領域に特異的に結合するため、抗体は抗原結合部位を保持した状態で CPP と複合体を形成することが可能であり、それが細胞内での標的タンパク質への結合活性に寄与していると考えられる。しかし、抗体との複合体形成時に抗体が静電的相互作用等により CPP 部位にも非特異的に結合することも考えられるが図 1-3c に示すように、単独 CPP あるいは pAd と抗体を混合した場合では導入活性は認められなかったことから、抗体が CPP と相互作用している可能性は低く、pAd へ特異的に結合していると考えられる。また、この結果より、CPP-pAd の抗体導入には CPP、pAd の両方が機能していることが明らかとなった。それに加え、図 1-3a に示すように、CPP-pAd と抗体をモル比 1:1 で混合した場合に導入活性が最大であったことから、CPP-pAd は抗体と図 1-1b に示すようなコンセプト通りの複合体を形成していることが推察される。すなわち、CPP-pAd は細胞内導入活性を示す CPP と抗体結合活性を示す pAd が、互いの機能を阻害することなく、独立して機能することで高い導入活性を示すことが示唆された。

これまでも、膜透過性ペプチドを用いて抗体を細胞内に送達させるためのキャリアーが多数開発されてきた。Zhao らにより、膜貫通による輸送を促進するペプチド MTS (membrane transport sequence) と抗体を結合させることで抗体を細胞内に送達可能なキャリアーが報告されている^{64,65)}。これは、細胞毒性もほとんど示さずに高効率に導入可能であるが、MTS と抗体を直接修飾しているため、目的の抗体ごとに合成が必要である。CPP-pAd は、pAd を用いることで、このように抗体ごとに合成する必要もなく、抗体と混合し、1 時間インキュベートするのみで、調製の面でも優れていると考えられる。

抗 NPC 抗体の導入により、核膜への局在が認められ、導入された抗体の機能性が認められた (図 1-5a,b)。免疫染色では固定処理による局在変化が懸念されたが、生細胞での導入でも核膜への抗体の局在が認められた。しかし、生細胞観察では免疫染色の場合と比べて、核膜への局在量は少なく、また、抗体の局在も異なっていた (図 1-5c)。これは、免疫染色の場合は、二次抗体にポリクローナルの F(ab')₂ 抗体を用いており、分子量も小さく、様々なエпитープ部位に結合可能なため、直接蛍光ラベル化した whole の抗 NPC 抗体を導入した場合よりも、高感度で観察できたのではないかと考えられた。また、生細胞の場合は細胞質に抗体がドットとして観察される割合が多く、固定処理による局在変化は否定できない結果であった。これは、抗体がエンドソーム内に留まっている状態であり、固定の場合は、その影響で脱出が促進した可能性が考えられた。しかし、レポータージーンアッセイにより、固定処理せずに抗 NPC 抗体の導入による NF- κ B の核移行阻害が示唆されたことから、確かに抗体は細胞質に送達され、抗原に結合していることが認めら

れた (図 1-6b)。CPP-pAd のエンドソーム脱出をさらに促進させることができれば、抗体による機能阻害をより効率的に誘導することが可能であると考えられる。

また、CPP-pAd の効率的な細胞質への送達には、MTS のような細胞膜を直接透過する機序があるのではないかと期待したが、4℃のエネルギー抑制条件下では取り込みはほとんど抑制され (図 1-7a)、エネルギー依存的な取り込みであることが明らかとなった。さらに、その経路としてクラスリン介在性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスの関与が示唆された (図 1-7b,c,d)。どちらの経路の寄与が大きいかは阻害剤による実験のみでは明確には分らない。クラスリン介在性エンドサイトーシスは、クラスリンと複合体を形成し、形質膜が陥没するようにして取り込まれるエンドサイトーシスの主要な取り込みメカニズムであり^{66,67)}、ポリマー等を利用したエンドソーム膜の破壊やプロトンスポンジ効果がエンドソーム脱出戦略として用いられているが、CPP-pAd がクラスリン介在性エンドサイトーシスで取り込まれた場合、プロトンスポンジ効果がエンドソーム脱出に関与していることが示唆された (図 1-9)。一方、マクロピノサイトーシスは、アクチンにより形質膜が細胞外に突出することで、外来高分子を細胞外液ごと細胞内に取り込まれたため、数 μm レベルの比較的大きい小胞が形成される特殊な経路であり^{68,69)}、キャリアーの取り込み経路として着目されている。この経路を誘導する素子の一つとしてオクタアルギニンペプチド (R8) が知られているが、これは、R8 が細胞膜上のプロオグリカンに静電的相互作用で結合し、細胞表面におけるペプチドの濃縮がマクロピノサイトーシス誘導に重要であると考えられている⁵⁷⁾。データには示していないが、R8 の他に、アルギニン豊富な膜透過性ペプチドとして知られているウイルス由来ペプチドの TAT、FHV と pAd を修飾したキャリアーにおいても同様に抗体導入活性を評価したが、CPP-pAd を上回る導入活性を示すキャリアーはなかった。CPP のカチオン性領域は、側鎖上に 5 つのトリアルギニンユニットが配置された構造をしており、R8 や TAT、FHV のような直鎖上のペプチドとはその立体構造が異なると考えられる。CPP ではその網目構造が細胞膜へアルギニンの濃縮に有利に働くことで、CPP-pAd はマクロピノサイトーシスによって効率的に細胞内へ取り込まれたのではないかと推察された。マクロピノサイトーシス経路で取り込まれた粒子は、ライソソームでの分解を回避可能であるため、細胞質送達に有利であることが報告されている⁶¹⁾。マクロピノソームからのキャリアーの脱出機構は不明な点が多いが、様々な経路で取り込まれたアデノウイルスの各小胞からの脱出効率を比較した報告では、マクロピノソームが最も内封物質を漏出しやすい膜構造である可能性が示唆されている⁷⁰⁾。さらに、脂質膜に膜融合性脂質の DOPE を組み込んだリポソームにアルギニンペプチドを修飾した場合では、マクロピノサイトーシスからの脱出が促進される可能性も報告されている⁶¹⁾。CPP はポリアルギニンと DOPE からなる構造であるため、アルギニンによりマクロピノサイトーシスを誘起していると考えられるが、さらに疎水性部位の DOPE がマクロピノソーム膜と相互作用することにより CPP-pAd の脱出を促進しているのではないかと考えられた。

1-5 小括

本章では、生細胞内に抗体を効率的に導入するための機能性素子として膜透過性素子と protein A を利用した CPP-pAd を開発した。CPP-pAd は市販の抗体導入試薬と比べても、顕著に高い導入活性を示し、細胞質にまで送達することが可能であることが明らかとなった。また、抗 NPC 抗体を CPP-pAd により導入した結果、NPC の存在部位である核膜に局在が認められ、NF- κ B の核内移行が阻害された。細胞内取り込みには、クラスリン介在性エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスが関与していることが示唆された。さらに、血清存在下でも高い取り込み効率を示し、細胞毒性はほとんど認められなかった。これらの結果から、CPP-pAd は抗体の機能性を保持した状態で、効率的に抗体を細胞質へ送達可能であり、低毒性かつ簡便であることから抗体導入素子として有用性が高いことが示された。このような素子を利用し、細胞内のがん関連タンパク質を治療標的とすることで、特異性が高く、効率的ながん治療法開発へ応用することが可能であると考えられる。

第 2 章

体内動態及び細胞内動態制御可能な **DDS** の開発

第2章 体内動態及び細胞内動態制御可能な DDS の開発

2-1 緒言

第1章では、CPP-pAd を用いることで、これまで困難であった抗体の効率的な細胞質への送達が可能であることを示した。しかし、このような膜透過性素子と薬物を連結したキャリアーを *in vivo* 系に適用することは難しい。その理由として、CPP のようなカチオン性キャリアーを静脈内投与した場合、血清成分と CPP が相互作用するために膜透過性素子の機能性が低下することで、効率的な細胞内取り込みが期待できないだけでなく、細網内皮系に捕捉されやすいため、EPR 効果を利用した薬物の腫瘍への特異的な送達が難しいため、細胞内への導入活性を維持した状態で、全身投与型製剤として応用するためには、細胞内送達素子の機能を損なわずに、体内動態も制御可能な新たな機能性素子を用いた DDS を開発することが必要である。

そこで、著者らは、CPP などの機能性素子と薬物を単純に直接連結するのではなく、体内動態や細胞内動態を制御可能な機能性素子が、最適の場所及びタイミングで機能を発揮できるように DDS を開発するために、リポソームに着目した。リポソームは、脂質二重膜からなる小胞であり、従来の低分子薬物から機能性高分子化合物までを封入可能である。さらに、生体適合性に優れるだけでなく、血中滞留性素子や標的化素子を簡便に修飾することが可能である。リポソームは、既に DDS 分野で広く利用されており、上述のような問題を克服可能であるため、全身投与型のがん治療 DDS を開発するための基盤キャリアーとして大変魅力的である^{71,72)}。これまでに、腫瘍へ特異的に薬物を送達するため、パッシブターゲティング型とアクティブターゲティング型の2種のリポソーム型キャリアーが開発されてきた。パッシブターゲティング型として、序論でも述べたように、血中滞留性が高く、EPR 効果の期待できる PEG を修飾したキャリアーが挙げられる^{11,73,74)}。しかし、キャリアーに PEG を修飾することで、PEG のかさ高い立体構造のために、細胞との親和性が低下し、細胞内に取り込まれにくくなることが問題である。例えば、核酸を封入した PEG 修飾キャリアーは、PEG 未修飾キャリアーに比べて、遺伝子導入効率が著しく低いことが報告されている⁷⁵⁾。そのため、このようなパッシブターゲティング能を有する PEG を修飾しただけでは、特に細胞内に取り込まれなければ効果を発揮できない核酸のような機能性高分子への応用は難しく、期待した薬効は得られないと考えられる。そこで、がん細胞の表面タンパク質に対する抗体やリガンドをリポソーム表面に修飾したアクティブターゲティング型キャリアーが開発された。これらのキャリアーは腫瘍特異的な送達が可能であるだけでなく、抗体やリガンドを修飾したキャリアーが、がん細胞表面のタンパク質に結合することで、エンドサイトーシス経路によって効率的に細胞内に取り込まれることから、高い薬効が得られる^{35,76)}。その一例として、がん細胞において発現が亢進しているトランスフェリン受容体を標的とした、トランスフェリン修飾リポソームが挙げられる⁷⁷⁾。しかし、このアクティブターゲティング型キャリアーの代表であるトランスフェリン修飾リポソームも万全ではなく、最近、標的化素子のトランスフェリンが血中の血清タンパク質と相互作用することで、その標的化能が大きく低下することが報告された⁷⁸⁾。したがって、より効率的な腫瘍への送達を目指すためには、可能な限り血清成分との相互作

用を回避することで、高い血中滞留性が得られるように体内動態を制御することと、腫瘍組織に到達後のがん細胞に積極的に取り込まれるように細胞内動態を制御することの両方が必要であると考えられる。

そこで、本章では、生体成分との相互作用を回避可能で、かつ細胞内に取り込まれやすい DDS を開発することを目的とした。そのために、リポソームの表面電荷に着目した。つまり、生理的条件下では負電荷に荷電させることで生体成分との相互作用を回避し、腫瘍へ送達された後に正電荷に表面電荷が転換することで細胞との親和性が向上するのではないかと考えた (図 2-1)。このコンセプトに基づいたキャリアを構築するため、腫瘍微小環境の低 pH を利用した。がん細胞は増殖が速く、血管新生が追い付かず低酸素、低栄養、低 pH などの特殊な環境を形成することが知られているが⁷⁹⁾、著者は電荷反転の引き金として、腫瘍低 pH に着目した。腫瘍環境の低 pH は、腫瘍の種類により多少の違いはあるものの、大抵は pH 6.5 付近の微弱な低 pH を示すことが報告されている^{80,81)}。そこで、この腫瘍微小環境の低 pH に応答して、表面電荷が反転するようリポソームの構築を目指した。しかしながら、pH 6.5 付近の腫瘍環境の微弱な低 pH に応答可能な素子はこれまでになかったため、新たな機能性素子として slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP) を設計し、この SAPSP をリポソームに修飾することで、微弱低 pH 応答性キャリアを開発した (SAPSP-lipo)。

本章では、SAPSP の設計及び SAPSP-lipo の機能性について評価することで、得られた知見を示した。

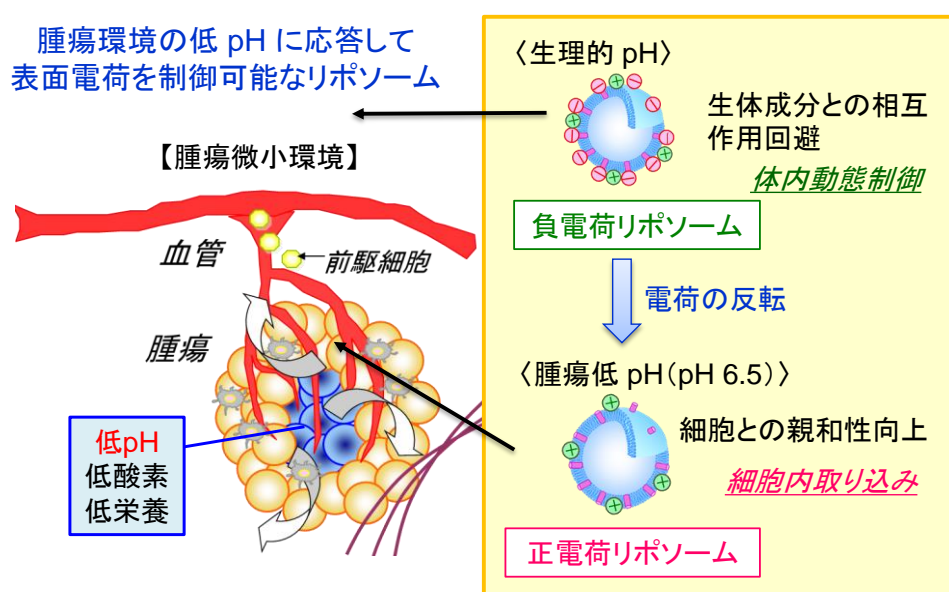


図 2-1. 腫瘍環境微弱低 pH 応答性キャリアのコンセプト

生理的条件下の血中から EPR 効果により腫瘍組織へ送達された後に、腫瘍環境の低 pH (pH 6.5) に応答して負電荷から正電荷に表面電荷が反転することで、キャリアの組織への送達と細胞内取り込みが制御可能である。

円二色性分散計 J-720WI（日本分光株式会社）を使用した。蛍光偏光の測定は BEACON®2000 Variable Temperature Fluorescence Polarization System（ハイブリッド有限会社）を使用した。*in vivo* イメージングは、Las-4000mini（GE ヘルスケア・ジャパン）を使用した。ロータリーエバポレーターは Rotary Vacuum Evaporator N-N Series (EYELA)を使用した。クライオプレスはマイクロテック・ニチオンのクライオプレス CP-100W を使用した。リアルタイム PCR は、7500 リアルタイム PCR システム及び Step one リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems)を使用した。凍結乾燥機は FD-1000 (EYELA)を使用した。

その他の機器は、第 1 章と同じものを使用した。

2-2-2 細胞培養

本章ではマウスメラノーマ細胞 B16-F1 細胞、マウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて実験を行った。これらの細胞の培養には DMEM を用いた。以下にその調製方法を示した。

【DMEM】

DMEM を 4.75 g 秤量し、超純水で溶解し 430 mL にメスアップ後、室温で 30 分以上攪拌し、オートクレーブ滅菌（121℃、2 気圧、20 分）した。その後、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌した 3 % L-Glutamine を 9 mL、同様に濾過滅菌した 10 % NaHCO_3 溶液を適量（約 6 mL）加えた。血清含有 DMEM には非働化 FBS を 50 mL（10 %）添加し、4℃保存した。以降では、血清不含有 DMEM を DMEM (-)、血清含有 DMEM を DMEM (+)とした。

その他、細胞の立ち上げ、継代、凍結方法は第 1 章と同様に行った。

2-2-3 SAPSP-lipo、Cationic-lipo、PEG-lipo の調製

1) 試薬調製

【脂質、ペプチド溶液】

EPC、DOTAP、Chol は、それぞれ 10 mM となるように EtOH に溶解し、-20℃保存した。DSPE-PEG₂₀₀₀ は 5 mM となるように、EtOH/ CHCl_3 =1/1 (v/v)の混合溶液で溶解し、-20℃保存した。SAPSP は 5 mM となるように滅菌水に溶解し、分注して-20℃保存した。

2) リポソームの調製

脂質を EPC/DOTAP=7.6/1 (mol/mol) となるようそれぞれガラスの試験管に添加し、vortex 後、 N_2 ガスで dry up した。 CHCl_3 で再溶解し、 N_2 ガスで dry up することにより脂質膜を作製した。次に PBS (-)を添加し、5 分以上室温で水和した。バスタイプソニケーターで超音波処理し、Cationic-lipo とした（最終脂質濃度 10 mM）。その後、総脂質量の 5 mol %となるように SAPSP を添加し、室温で 30 分インキュベートした。作製したリポソームの物性は PBS (-)で希釈し、Zetasizer Nano で粒子径、ゼータ電位を測定した。なお、異なる pH 条件下での物性は、各 pH となるよう

に HCl で調整した PBS (-) で希釈して測定した。PEG-lipo の調製は、pDNA 封入による体内動態解析では EPC/DOTAP/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ = 4/3/3/5 (mol/mol/mol/mol%)、*in vivo* イメージングでは EPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ = 1.85/1.0/0.15 (mol/mol/mol) の組成で混合し、2) と同様の方法で行った (脂質最終濃度 10 mM)。

2-2-4 *In vivo* イメージング

1) 試薬調製

【DiO ラベル化リポソームの調製】

2-2-3 と同様の方法で、脂質溶液に、総脂質量の 10 mol % となるように DiO 溶液 (1 mg/mL) を添加して調製した (脂質最終濃度 10 mM)。

2) *In vivo* イメージングによる組織分布の観察

B16-F1 細胞を、細胞懸濁液/ECM gel=5/1 (v/v) となるように氷上で ECM gel を混合して 2×10^7 cells/mL の細胞懸濁液とした。エーテル麻酔下のヘアレスマウス (Hos:HR-1、7 週齢、雄) の背部に、細胞懸濁液を 100 μ L/匹 (2×10^6 cells/匹) で皮下投与して担がんマウスを作成した。がん移植 5 日後 (腫瘍体積 100 mm³ 前後) で、DiO (Ex: 470 nm, Em: 501 nm) ラベル化 SAPSP-lipo、PEG-lipo を 200 μ L/匹で尾静脈内投与した。24 時間後に、腫瘍及び、肝臓、腎臓、肺、脾臓を摘出し、PBS (-) で洗浄した後、*in vivo* イメージングシステムによりリポソームの組織分布を観察した。

2-2-5 pDNA 封入リポソームを用いた体内動態評価

1) pDNA 封入リポソームの調製

HEPES を秤量し、適量の超純水で溶解し、1N NaOH で pH 7.4 に合わせた後、10 mM となるようにメスアップし、0.22 μ m フィルターで濾過滅菌した。調製した 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) を用いて、pDNA、protamine を 0.1 mg/mL に希釈した。負電荷コアを作製するため、以下の式に従い、N/P=1.0 となるように pDNA と protamine の混合比を決定した (pDNA : Protamine = 0.613 : 1)。この比で protamine (0.1 mg/mL) に pcDNA3.1-Luc (0.1 mg/mL) を vortex 下で添加し、コアを作製した。2-2-3 と同様の方法で脂質膜を調製し、作製したコアを添加して水和後、超音波処理により pDNA 封入 SAPSP-lipo、PEG-lipo を作製した。

$$N/P \text{ ratio} = \frac{C_{pro} \times \frac{n_R}{MW_{pro}}}{C_D \times \frac{n_P}{MW_D}}$$

C_{pro} : protamine 濃度 (0.1 mg/mL)

C_D : pDNA 濃度 (0.1 mg/mL)

n_R : protamine 中の Arg 残基数 (21)

n_P : pDNA の 1 塩基対あたりの PO₄⁻ 数 (2)

MW_{pro} : protamine の分子量 (4249.7)

MW_D : pDNA の 1 塩基対あたりの平均分子量 (約 660)

2) pDNA 封入リポソームを用いた pDNA の定量による組織分布の評価

2-2-4 の 2) と同様に B16-F1 細胞の担がんマウスを作製し、がん移植 5 日後、pDNA 封入

SAPSP-lipo、PEG-lipo（脂質最終濃度 10mM）をそれぞれ 200 μ L/匹（pDNA 量として 12.4 μ g/匹）尾静脈内投与し、投与 24 時間後に腫瘍及び、肝臓、腎臓、肺、脾臓を摘出した。臓器を凍結破碎し、投与した pDNA を Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit を用いて、メーカーの手順に従い抽出した。抽出してきた DNA を、QIA quick PCR Purification Kit により精製し、リアルタイム PCR により定量した。濃度既知の pDNA で検量線を作成し、絶対定量法で pDNA 濃度を算出した。pDNA 抽出に用いた臓器 1mg 中の pDNA のコピー数を以下の式に従い算出し、pDNA の組織分布を評価した。なお、pDNA 量は、下記 4) に示す方法で算出した抽出効率で補正した値を用いた。

$$\text{コピー数} = \text{pDNA の mol 数} \times \text{アボガドロ数} = \frac{\text{pDNA の質量 (g)}}{\text{pDNA の分子量}} \times 6.02 \times 10^{23}$$

4) pDNA 抽出効率

pDNA 封入 SAPSP-lipo 及び pDNA 封入 PEG-lipo をそれぞれ 16.1 μ L (pDNA 量として 1.0 μ g) ずつと、凍結破碎したマウスの肝臓 20 mg を混合したものについて、pDNA を抽出することで抽出効率を評価した。pDNA の抽出は、Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit を用い、メーカーの推奨プロトコールに従って行った。抽出した pDNA を、上記 3) と同様の方法でリアルタイム PCR により定量し、得られた pDNA 量を添加した pDNA 量(1.0 μ g)で除することにより、抽出効率を算出した。

2-2-6 siRNA のトランスフェクション

1) siRNA 封入 SAPSP-lipo の調製

2-2-5 の 2)と同様の方法で、コアを anti-luciferase siRNA と STR-R8 で作製したものに変更して調製した。負電荷コアを作製するために、以下の式に従い、N/P=1.05 となるように siRNA と STR-R8 の混合比を決定した (siRNA:STR-R8=0.613:1)。この比で STR-R8 (0.1mg/mL) に siRNA (0.1 mg/mL) を vortex 下で添加し、作製した。

$$N/P \text{ ratio} = \frac{C_{R8} \times \frac{n_R}{MW_{R8}}}{C_{siR} \times \frac{n_P}{MW_{siR}}}$$

C_{R8} : STR-R8 濃度 (0.1 mg/mL)
 C_{siR} : siRNA 濃度 (0.1 mg/mL)
 n_R : STR-R8 中の Arg 残基数 (8)
 n_P : siRNA の 1 塩基対あたりの PO_4^- 数 (2)
 MW_{R8} : STR-R8 の分子量 (1533)
 MW_{siR} : siRNA の 1 塩基対あたりの平均分子量 (約 660)

2-2-3 の 2)と同様の方法で、作製した siRNA コア溶液を水和に用いた SAPSP-lipo を作製することで siRNA 封入 SAPSP-lipo とした。

2) トランスフェクション

Luciferase 発現 B16-F1 細胞を 24well プレートに 8×10^3 cells/well で播種し、37°C、5 % CO_2 で

24 時間インキュベートした。インキュベート後、PBS (-)で洗浄し、siRNA 量として 24 pmol/well となるように、siRNA 封入 SAPSP-lipo、PEG-lipo を pH 調整 DMEM (-) 250 μ L 中に添加した。37°C、5 % CO₂ で 4 時間インキュベート後、培地を DMEM (+) 500 μ L に交換し、さらに 44 時間インキュベートした。その後、第 1 章の 1-2-8 と同様の方法でルシフェラーゼ活性の測定を行い、RLU/mg protein を算出した。

2-2-7 CD スペクトル解析

SAPS ペプチド単独及び SAPS ペプチド修飾ナノ粒子をペプチド濃度が 20 μ M になるように pH 6.5 の PBS (-)において調整し、円二色性分散計 J-720WI でスペクトルを測定した。測定条件は以下に示した。測定波長：190～260 nm、積算回数：4、走査速度：50 nm/min、time constant：1 sec、step resolution：0.1 nm

2-2-8 FACS による SAPSP-lipo の細胞への取り込み評価

1) 試薬調製

【Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo】

SAPSP-lipo (10 mM) の総脂質量の 1 mol% となるように Rh-PE 溶液を脂質溶液に添加し、2-2-3 と同様の方法で調製した。

【pH 調整培地】

DMEM (-)に PBS (-)を 50 % (v/v)混合し、37°Cに温め、HCl で各 pH に調整し、0.22 μ m のフィルターで濾過滅菌した（用時調製）。

2) FACS 解析

12well プレートに B16-F1 細胞を 5×10^4 cells/1mL/well で播種し、5 % CO₂、37°C で 24 時間インキュベートした。FACS 解析は 1-2-5 と同様の方法を用い、各実験に応じて以下に示すように変更を加えた。Rhodamine (Ex:557 nm, Em:571 nm) は FL-2 で検出した。

SAPSP-lipo 及び SAPSP 単独の取り込みの評価は、各 pH 調整培地（pH 7.4、6.5、6.0、5.5）に交換後、SAPSP-lipo の取り込み評価の場合は 1 mol% Rho-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 25 μ L/well 添加し、5 % CO₂、37°C で 1 時間インキュベートし、FACS 解析を行った。SAPSP 単独の場合は、1 μ M ビオチン化 SAPSP を 2.5 μ L/well 添加し（5 nM）、4°C、30 分インキュベート後、1 μ M Qdot 655 streptavidin を 2.5 μ L/well 添加した（5 nM）。さらに、5 % CO₂、37°C で 1 時間インキュベートし、FACS 解析を行った。Qdot 655 (Em:655 nm)は、FL-3 で検出した。

静電的相互作用による細胞膜との結合の評価は、1 unit/mL ヘパリン含有 pH 調整培地 500 μ L に交換した後、4°C、30 分インキュベートし、上清除去後、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 25 μ L/well 添加した。4°C で 1 時間インキュベート後、FACS 解析を行った。

エンドサイトーシス阻害による細胞内取り込み経路の評価は、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤として 0.4 M sucrose 含有 pH 調整培地に交換後、5 % CO₂、37°C、30 分、マクロピノサイトーシス阻害として 5 mM amiloride 含有 pH 調整培地に交換後、5 % CO₂、37°C、10 分、

それぞれプレインキュベートした。その後、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 25 μ L/well 添加し、さらに 1 時間インキュベート後、FACS 解析を行った。

エネルギー非依存的細胞内取り込みの評価の場合は、pH 調整培地 (0.4M sucrose 含有) に交換した後、4°C、30 分、プレインキュベートし、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 25 μ L/well 添加した。さらに 4°C、1 時間インキュベート後、FACS 解析を行った。

2-2-9 CLSM による SAPSP-lipo の細胞内動態の観察

0.002 % PLL 溶液でガラス部位をコートした 35 mm ガラスボトム dish に B16-F1 細胞を 1×10^5 cells/2mL/dish で播種し、5 % CO₂、37°C で 24 時間インキュベートした。pH 調整培地に交換後、以下の操作を行った。SAPSP-lipo の細胞内動態の観察には、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 50 μ L/dish 添加し、5 % CO₂、37°C で 1 時間インキュベートした。SAPSP 単独の細胞内動態観察には、1 μ M ビオチン化 SAPSP を 5 μ L/dish 添加し、4°C で 30 分インキュベートした。その後 PBS (-) で細胞を洗浄後、1 μ M Qdot 655 streptavidin を 5 μ L/dish 添加し、5 % CO₂、37°C で 1 時間インキュベートした。エンドソーム・ライソソーム、及び核の染色は 1-2-6 と同様の方法を用いたが、エンドソーム・ライソソームの染色は LysoTracker Green™ DND-26 (Ex:504 nm, Em:511 nm) を使用した。Zeiss LSM 510 META で観察を行い、レンズは油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC) を用いた。Malti track (DAPI/FITC/Cy3) を用い、アルゴンレーザー (488 nm)、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)、Diode レーザー (405 nm) を用いて励起し、観察した。

エネルギー非依存的経路による細胞内取り込みの観察の場合は、0.002 % PLL 溶液でガラス部位をコートした 96 well imaging plate に 5×10^3 cells/100 μ L/well で播種し 5 % CO₂、37°C で 24 時間インキュベートした。pH 調整培地に交換後、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo または Cationic-lipo を 5 μ L/well 添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。PBS (-) で 3 回洗浄後、2 % グルタルアルデヒドを添加し 4°C で 1 時間インキュベートして固定した。PBS(-) で 3 回洗浄後、核を染色した。Zeiss LSM 510 META で観察を行い、レンズは油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC) を用いた。Malti track (DAPI/Cy3) を用い、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)、Diode レーザー (405 nm) を用いて励起し、観察した。

2-2-10 蛍光偏光度測定による膜流動性評価

1) TMA-DPH、DPH 含有 DMPC リポソームの作製

TMA-DPH/DMPC=1/500 (mol/mol)、DPH/DMPC=1/300 (mol/mol) で混合し、2-2-3 と同様の方法で脂質膜を作製した。脂質膜は真空デシケーター内で overnight した後、PBS (-) で 5 分水和し、バスタイプソニケーターで超音波処理してリポソーム液とした。その後、TMA-DPH 含有リポソームを VIVASPIN 500 により限外濾過し、未封入 TMA-DPH を分離し精製した。

2) 膜流動性の測定

作製した DPH 及び TMA-DPH 含有 DMPC リポソームと SAPS-lipo を リポソーム/ペプチド=50/1

(v/v)となるように pH 7.4 及び pH 6.5 の PBS(-)において混合し、BEACON® 2000 Fluorescence Polarization System を用いて 15℃における蛍光偏光度を測定した。下記の式にしたがって異方性値を算出した。

$$\text{異方性 } (r) = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}}$$

I_{VV} : 垂直の偏光で励起し、垂直の偏光成分の示す蛍光強度
 I_{VH} : 水平の偏光で励起し、垂直の偏光成分の示す蛍光強度
 G : I_{HV}/I_{HH}
 $\left[\begin{array}{l} I_{HV} \text{ 垂直の偏光で励起し、水平の偏光成分の示す蛍光強度} \\ I_{HH} \text{ 垂直の偏光で励起し、垂直の偏光成分の示す蛍光強度} \end{array} \right]$

2-2-11 溶血試験

1-2-9 と同様の方法で行い、必要に応じて次のように変更した。各 pH (7.4、6.5、6.0、5.5) に調整した PBS (-)と赤血球懸濁液を決定した希釈倍率で希釈し、赤血球試験液とした。160 µL のリポソーム溶液と各 pH の赤血球試験液 40 µL を混合し、37℃、1 時間、混和させながらインキュベートした。その後、遠心分離 (3000 rpm、4℃、5 分) し、得られた上清の 540 nm での吸光度を Plate manager (TECAN)で測定した。

$$\text{溶血率 } (\%) = OD_{540 \cdot \text{lipo}} / OD_{540 \cdot \text{低}} \times 100$$

$OD_{540 \cdot \text{lipo}}$: リポソーム (各サンプル) での吸光度 (540 nm)
 $OD_{540 \cdot \text{低}}$: 低張溶液での吸光度 (540 nm)

2-2-12 膜融合能評価

1) 脂質膜と内水層の二重ラベル化リポソームの調製

2-2-3 と同様の方法を用い、総脂質量の 3 mol% の NBD-PE を加えて脂質膜を作製し、0.5 mM Acid Red 52 (Rhodamine B)の PBS (-)溶液を添加し、リポソームを作製した (脂質最終濃度 0.55 mM)。作製したリポソームを SephadexTMG-25 Super fine を使用してゲル濾過した後、VIVASPIN 500 を用いて限外濾過することにより、未封入 Rhodamine B を分離し精製した。

2) CLSM 観察による膜融合能評価

0.002 % PLL 溶液でコートした 96 well imaging plate に 5×10^3 cells/100 µL/well で播種し 5 % CO₂、37℃で 24 時間インキュベートした。PBS (-)で Wash 後、pH 調製培地 (0.4M sucrose 含有) に交換し、NBD-PE (Ex:460 nm, Em:535 nm)と Rhodamine B (Ex:565 nm, Em:585 nm)の二重ラベル化リポソームを 5 µL/well 添加し、4℃で 1 時間インキュベートした。その後 DMEM (+)で 3 回洗浄し、DMEM (+) 100 µL を添加し、観察した。Zeiss LSM 510 META で観察を行い、レンズは油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC)を用いた。Malti track (FITC/Cy3)を用い、アルゴンレーザー (488 nm)、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)を用いて励起し、観察した。

2-2-13 スペクトルイメージングによる FRET 解析

1) 脂質膜の二重ラベル化リポソームの調製

2-2-3 と同様の方法を用い、脂質に総脂質濃度の 3 mol% NBD-PE (Ex:460 nm, Em:535 nm)、1 mol% Rh-PE (Ex: 560 nm, Em:583 nm)を添加し、脂質膜を二重ラベル化したリポソームを調製した。

2) スペクトルイメージング

0.002 % PLL 溶液でガラス部位をコートした 96 well imaging plate に 5×10^3 cells/100 μ L/well で播種し 5 % CO₂、37°C で 24 時間インキュベートした。pH 調整培地に交換し、二重ラベル化 SAPSP-lipo または Cationic-lipo を 5 μ L/well 添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。その後、DMEM (+)で 3 回洗浄し、LSM 510 META を用いて、スペクトル情報を取得した。FRET の評価は以下のように行った。FRET のドナーNBD を励起するために 488 nm の波長のレーザーを照射し、506-634.5 nm 間のスペクトル情報を得た。この時、ダイクロイックミラーは HFT405/488 を用いた。取得した画像の中で細胞膜に局在するドットを選択し、そのスペクトル情報より下記の式に従って膜融合の指標 relative fluorescence intensity を算出した。

$$\text{Relative fluorescence intensity} = \frac{FI_{530}}{FI_{590}} \quad \begin{array}{l} FI_{530} : 530\text{nm の蛍光強度 (NBD)} \\ FI_{590} : 590\text{nm の蛍光強度 (Rh)} \end{array}$$

2-3 実験結果

2-3-1 SAPSP の設計と SAPSP-lipo の構築

図 2-1 のコンセプトに基づき、腫瘍環境の微弱な低 pH に応答して表面電荷が負から正に転換するリポソームを構築するために、塩基性アミノ酸の histidine (His) に着目した。His は酸性環境下でプロトン化されることで正電荷を有するアミノ酸であり、これまでも pH 応答性素子として His を利用したペプチドやポリマーが多数開発されているが⁸²⁾、これらは、エンドソーム内の酸性環境である pH 5~6 付近で応答性を示すために、エンドソーム脱出促進素子として利用されているものがほとんどである。その理由として、His の pKa は 6.04 であり、腫瘍環境の pH 6.5 ではプロトン化されにくいいため、より低い pH 条件にならないと効果を発揮できないと考えられる。そこで、著者は His の pKa を上昇させることはできないかと考えた。セリンプロテアーゼである subtilisin では、その活性部位の His の pKa が、周囲の電荷状態によりシフトすることが報告されている⁸³⁻⁸⁵⁾。この pKa シフトのメカニズムとして、His 周囲が負電荷を帯びている場合は、His のプロトン化状態が安定であるために、pKa は上昇するのに対して、正電荷が多い場合は逆にプロトン化状態が不安定となることで pKa が低下すると考えられている。この pKa シフトを利用することで His の pKa を制御したペプチド型の微弱低 pH 応答性素子を開発するためには、His を含むペプチドの立体構造を考慮し、His に近接するアミノ酸の物性が重要であると考えられる。そこで、His の近傍に酸性アミノ酸を配置することで、その静電的相互作用からプロトン化された His が安定化され、pKa が上昇すると予想し、立体構造を考慮した上で His の近傍に glutamic acid (Glu) を配置したペプチド slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP) を設計した (図 2-2a)。

この SAPSP をカチオン性リポソームに修飾することで、腫瘍環境の微弱な低 pH に (pH 6.5) に応答可能なリポソームを作製した (SAPSP-lipo)。SAPSP-lipo は、生理的条件の pH 7.4 では負電荷の SAPSP がリポソーム表面の正電荷をマスクするために負電荷リポソームとなり、腫瘍環境の微弱な低 pH (pH 6.5) では SAPSP 中の His がプロトン化され、SAPSP の総電荷が正に反転することで、正電荷を有するリポソーム表面との静電的反発が誘起されることにより、リポソームの正電荷が露出し、正電荷リポソームとなると考えられる (図 2-2b)。SAPSP をリポソームの総脂質量の 5 mol% の濃度で修飾した場合、表面電荷の指標であるゼータ電位は、pH 7.4 では約 -15 mV であったのが、pH 6.5 で +5 mV 付近に上昇したことから、腫瘍環境の微弱な低 pH に応答して電荷の反転が可能であることが示唆された (図 2-2c)。また、SAPSP のスクランブル配列

(SAPSP-S) を同様に修飾した場合には、His と Glu は SAPSP と同数であるにも関わらず、いずれの pH でもゼータ電位の大きな変化は認められなかった。このことから、SAPSP-lipo の表面電荷の反転には、SAPSP の配列が重要であることが示された (図 2-2c)。また、粒子径については、pH 7.4 では 170 nm 付近で、ばらつきも小さいが、プロトン化が起きていると考えられる pH 6.5 ではばらつきも大きく、粒子径が不均一に増大したリポソームが多く存在していることが示唆された。さらに pH を 6.0、5.5 と下げた場合では、このような現象は認められなかった (表 2-1)。

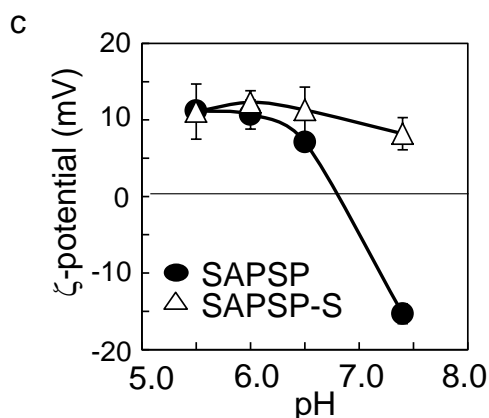
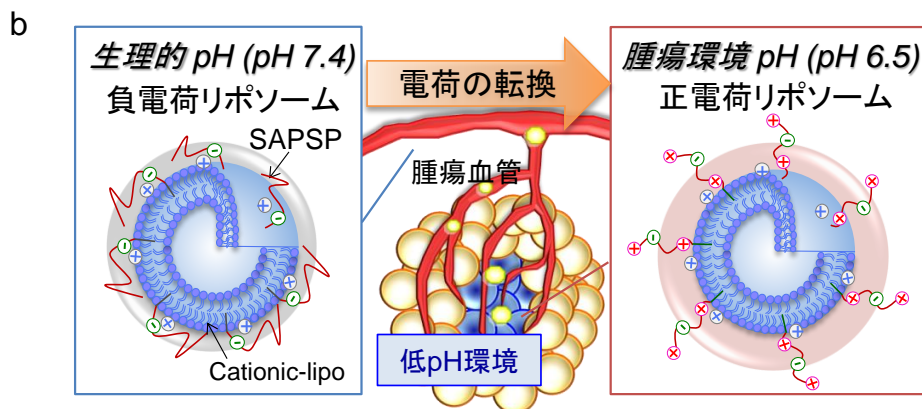
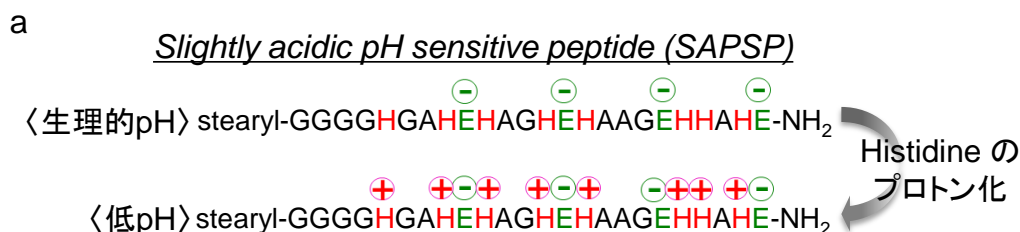


図 2-2. SAPSP-lipo のコンセプト

(a) SAPSP の配列。腫瘍環境の微弱低 pH に応答して His がプロトン化されるように Glu を配置した。H : His E : Glu (b) SAPSP-lipo のキャリアーコンセプト。Cationic-lipo に 5 mol% SAPSP を修飾した。pH 7.4 では負電荷の SAPSP により表面がマスクされ、腫瘍環境の低 pH (pH 6.5) では SAPSP が正電荷となることで、脂質の正電荷が露出する。(c) SAPSP-lipo 及びそのスクランブル配列を修飾した SAPSP-S-lipo のゼータ電位。各 pH に調整した PBS (-) 中で測定した。データは mean ± S.D. で示した。(n=3)

表 2-1. SAPSP-lipo の粒子径

pH	7.4	6.5	6.0	5.5
Size (nm)	173 ± 7.6	265 ± 43	198 ± 15	158 ± 5.4

各 pH に調整した PBS (-) 中で測定した。データは mean ± S.D. で表した。(n=3)

2-3-2 *In vivo* イメージングによる SAPSP-lipo の腫瘍への集積評価

生理的条件の pH 7.4 において、負電荷ナノ粒子である SAPSP-lipo が実際に腫瘍へ集積するのかを検討した。

まず、蛍光ラベル化 SAPSP-lipo を用いて、*in vivo* イメージングにより評価した。リポソームの脂質膜を DiO で蛍光ラベル化し、B16-F1 担がんマウスに尾静脈投与 24 時間後の各臓器における蛍光分布を観察した。比較として、血中滞留性の高い PEG 修飾リポソーム (PEG-lipo) も同様の方法で行った。その結果、SAPSP-lipo 投与で腫瘍組織において蛍光が観察され、その蛍光強度

は PEG-lipo と同程度であった。したがって、SAPSP-lipo は腫瘍へ集積することが示唆された (図 2-3a)。次に、ルシフェラーゼをコードする pDNA をリポソーム内に封入し、上記と同様に投与後、各臓器の pDNA 量をリアルタイム PCR により定量した。その結果、SAPSP-lipo は PEG-lipo と比べて若干劣るものの、内封した pDNA の腫瘍への集積が認められた (図 2-3b)。

これらの結果から、SAPSP-lipo は PEG を修飾しなくても腫瘍へ集積することが示された。

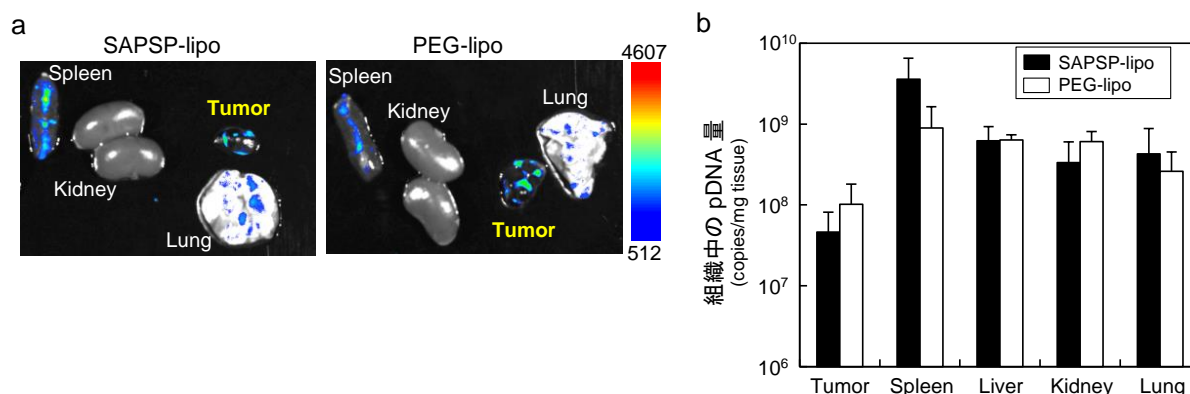


図 2-3. SAPSP-lipo 及び PEG-lipo の組織分布

(a) *in vivo* イメージング。担がんマウス (B16-F1 細胞) に、脂質膜を DiO で蛍光ラベル化した SAPSP-lipo、PEG-lipo を尾静脈内投与後、24 時間後の各臓器の蛍光をイメージングにより評価した。(b) pDNA (Luc) 封入した SAPSP-lipo、PEG-lipo を (a) と同様に投与し、24 時間後、各臓器から DNA を抽出し、投与した pDNA をリアルタイム PCR により定量した。データは組織 1 mg あたりのコピー数を算出し、mean \pm S.D. で表した。(n=3)

2-3-3 SAPSP-lipo の pH に応答した細胞への取り込み評価

作製した SAPSP-lipo は腫瘍へ集積することが認められたので、次に、pH に応答して電荷が正電荷となることで細胞に取り込まれるのかについて検討した。

まず、脂質膜を Rh-PE で蛍光ラベル化した SAPSP-lipo を用いて、図示の各 pH に調整した培地中で B16-F1 細胞への取り込みを FACS により評価した。その結果、pH 7.4 に対して、pH 6.5 では約 13 倍の取り込み増大が認められた (図 2-4a,b)。次に、取り込まれた SAPSP-lipo の細胞内動態を解析するために、同様に蛍光ラベル化した SAPSP-lipo を用いて、CLSM 観察により評価した。その結果、赤で示される SAPSP-lipo は、細胞の中にまで取り込まれており、さらに、緑で示されるエンドソーム、ライソソームと共局在し、黄色で観察されているのみではなく、赤のドットが単独で細胞内に観察されたことから、は、細胞質にまで送達されていることが示唆された (図 2-4c)。そこで、SAPSP-lipo により細胞質に薬物が送達されるのかを確認するため、siRNA を封入し、その遺伝子発現抑制効果 (RNAi 効果) を評価した。siRNA は細胞質で mRNA を分解することで RNAi 効果を示すため、細胞質に送達されなければ効果を発揮できないと考えられる⁸⁶⁾。B16-F1 細胞の Luciferase 安定発現株 (B16-F1-Luc) に、anti-luciferase siRNA を封入した SAPSP-lipo を添加した結果、Control siRNA を封入した場合に比べて、pH 7.4 では変化なかったのが、pH 6.5 においては約 60 % 以上の RNAi 効果が認められた (図 2-4d)。したがって、SAPSP-lipo に封入した siRNA は pH 6.5 で機能性を発揮し、腫瘍環境の微弱低 pH に応答して細胞質に内封送達を送達可能であることが示唆された。

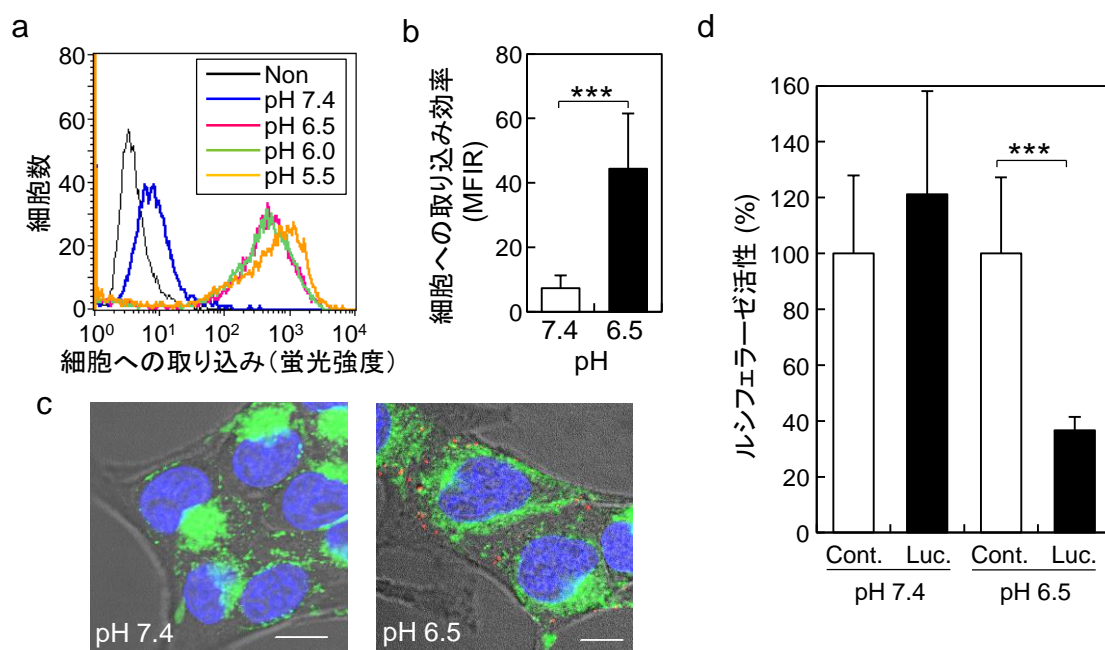


図 2-4. SAPSP-lipo の細胞内取り込みと遺伝子発現抑制効果

1 mol% Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を表示の各 pH に調整した培地中で B16-F1 細胞に添加し、5 % CO_2 、37°C、1 時間インキュベートした。(a) FACS 解析を行い、細胞への取り込みとして蛍光強度をヒストグラムで表した。(b) pH 7.4、6.5 の取り込みについて FACS 解析を行った。結果は MFIR を算出し、mean \pm S.D. で表した。(***, $P < 0.001$, $n = 3$) (c) CLSM 観察により細胞内動態を観察した。青：核 (Hoechst33342) 赤：SAPSP-lipo (Rh-PE) 緑：エンドソーム・ライソソーム (LysoTracker Green DND-26) Bar：10 μ m (d) anti-luciferase siRNA 封入 SAPSP-lipo の RNAi 効果。B16-F1-Luc 細胞に pH 7.4、6.5 に調整した培地中で anti-luciferase siRNA 封入 SAPSP-lipo を添加し、5 % CO_2 、37°C、48 時間インキュベート後、ルシフェラーゼ活性を測定した。データは、control siRNA を封入した場合のルシフェラーゼ活性を 100 % とし、mean \pm S.D. で表した。(***, $P < 0.001$, $n = 3$)

また、SAPSP-lipo は微弱低 pH 下のがん細胞特異的に取り込まれるのかを検討するために、正常細胞のマウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて、同様に FACS により取り込み効率を評価した。その結果、pH 7.4 に比べて、pH 6.5 では約 10 倍取り込み効率が增大した (図 2-5)。この結果から、SAPSP-lipo の取り込みは、がん細胞特異的なものではなく、pH に依存した取り込みであることが示唆された。

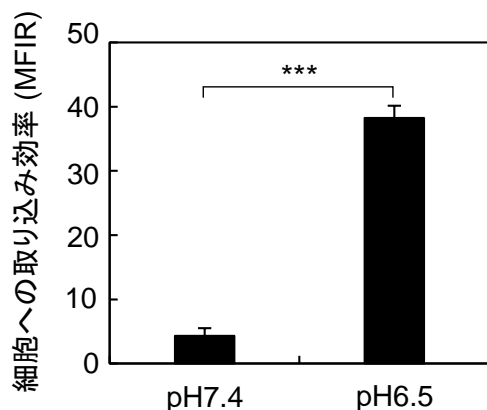


図 2-5. SAPSP-lipo の正常細胞での取り込み

1 mol% Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を pH 7.4、6.5 に調整した培地中で NIH3T3 細胞に添加し、5 % CO_2 、37°C、1 時間インキュベート後、FACS 解析を行った。結果は MFIR を算出し、mean \pm S.D. で表した。(***, $P < 0.001$, $n = 3$)

2-3-4 SAPSP 単独での細胞内取り込みの評価

2-3-3 では pH 6.5 において、SAPSP-lipo が、がん細胞の細胞質へ送達可能であることが示されたが、その機能性は SAPSP によるものなのかを明らかにするために、SAPSP 単独での細胞内動態を解析した。SAPSP 単独でも SAPSP-lipo と同様の細胞内動態であれば、SAPSP 自身に pH 変化に応じた細胞質送達能があると考えられる。

SAPSP の細胞内動態を観察するために、ビオチン化 SAPSP と Qdot 655 ラベル化 streptavidin の複合体を B16-F1 細胞に添加した。まず、FACS 解析により細胞内取り込みを評価した結果、SAPSP の取り込み効率は、pH 6.0 までは pH 7.4 と同程度であったが、pH 5.5 まで pH を低下させた場合に増大した (図 2-6a)。次に、pH 7.4 及び pH 5.5 条件下で CLSM 観察を行ったところ、pH 5.5 で細胞内への取り込みが認められたが、赤の SAPSP はほとんどが緑で示されるエンドソーム・ライソソームと共局在し黄色のドットとして観察された (図 2-6b)。これらの結果から、単独 SAPSP の微弱低 pH に対する応答性は低く、たとえ pH 5.5 程度の低い pH 下であっても細胞質送達能がないことが示唆された。したがって、SAPSP がリポソーム膜と相互作用することで、SAPSP-lipo の微弱な低 pH に応答した細胞質送達が可能となると考えられる。

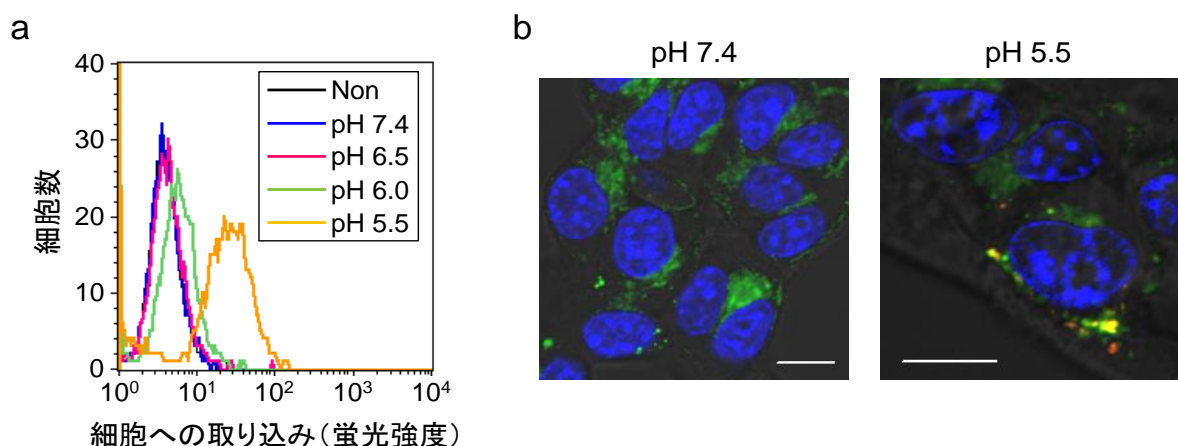


図 2-6 . SAPSP の細胞内取り込み

ビオチン化 SAPSP を表示の各 pH に調整した培地中で B16-F1 細胞に添加し、5 % CO₂、37°C、1 時間インキュベートした。(a) FACS 解析を行い、細胞への取り込みとして蛍光強度をヒストグラムで表した。(b) CLSM により細胞内動態を観察した。青：核 (Hoechst 33342) 赤：SAPSP (Qdot 655) 緑：エンドソーム・ライソソーム (LysoTracker Green DND-26) Bar : 10 μm

2-3-5 SAPSP 単独と SAPSP-lipo のペプチド構造変化

2-3-4 において、SAPSP-lipo の低 pH に応答した細胞内取り込みには、SAPSP とリポソーム膜との相互作用が重要であることが示唆された。すなわち、SAPSP が脂質膜と相互作用することでペプチドの構造変化がもたらされ、その特殊な構造変化が SASPS-lipo の機能に関与している可能性が考えられた。

そこで、pH に応答した SAPSP の構造変化を検討するために、SAPSP 単独と SAPSP-lipo のペプチド構造を CD スペクトルにより解析した。CD スペクトルはペプチドの 2 次構造を解析するた

めに広く用いられている方法で、そのスペクトルパターンで2次構造の有無や種類などの情報を簡便に取得することができる^{87,88)}。 α -ヘリックス構造の場合は、196 nm 付近に正の極大、207、222nm 付近に二つの負の極大ピークを示し、 β -シート構造の場合は、197 nm 付近と 216 nm 付近にそれぞれ正と負の極大ピーク、また、ランダム構造の場合は、196 nm 付近に負の極大ピークを示す。本研究では、SAPSP 単独及び SAPSP-lipo の各 pH でのスペクトルを、平均残基モル橢円率：MRE ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) により算出した。SAPSP 単独の場合では、pH 7.4、6.5 ではランダムコイル型を示し、両者のスペクトルにほとんど変化は認められなかったが、pH 6.0 においてピークが上昇変化したことから、pH 6.0 付近でプロトン化により構造変化が誘起されていることが示唆された。一方で、SAPSP-lipo の場合は、いずれの pH でもランダムコイル型のスペクトルを示したが、pH 7.4 から 6.5 でピークの上昇が認められたことから、pH 7.4 から pH 6.5 で SAPSP の構造が変化していることが示唆された (図 2-7)。これらの結果から、リポソーム膜と SAPSP との相互作用により SAPSP の構造が変化し、その変化が物性や取り込みに関与している可能性が示唆された。

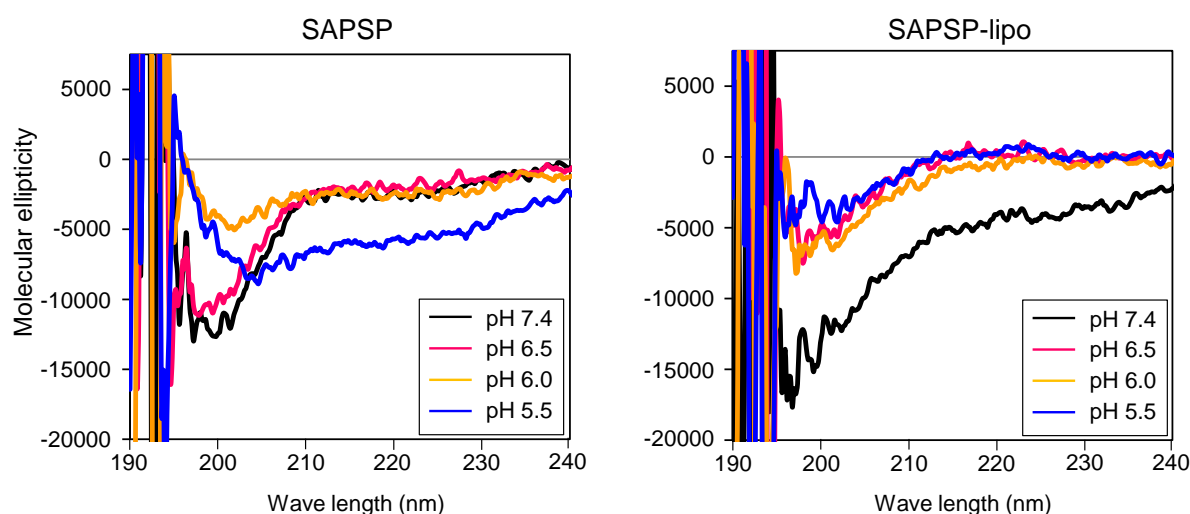


図 2-7 . SAPSP 単独、SAPSP-lipo の pH による CD スペクトル変化

SAPSP 単独 (左図)、SAPSP-lipo (右図) の示された各 pH での CD スペクトル。それぞれの場合においてペプチド濃度 20 μM で測定した。

2-3-6 SAPSP-lipo の細胞への結合様式の解析

SAPSP-lipo の細胞への取り込みについて詳細に調べるために、その第一段階である細胞への結合様式について検討した。はじめに BLAST によるホモロジー検索を行った結果、SAPSP 配列と相同性が高い配列は特に見つからず、SAPSP-lipo は細胞の特異的タンパク質を介して結合している可能性は低いと考えられた。

一般的に、カチオン性のナノ粒子の場合は、細胞膜表面に存在するヘパラン硫酸との静電的相互作用により細胞膜と結合することが知られている^{89,90)}。ヘパラン硫酸は、負電荷を帯びた多糖で、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖成分である。そのコアタンパク質の局在により、シンデカンやグリピカンなどのような細胞膜表面に存在するものや、パーレカンなどのような基底膜に存在するものがある⁹¹⁾。そこで、SAPSP-lipo の細胞との結合にこのヘパラン硫酸を介した静電的相互作用が関与しているか検討するために、ヘパリンを用いた。ヘパリンは、ヘパラン硫酸の一種であり、ヘパラン硫酸を介した静電的結合を競合的に抑制することが可能である。このヘパリンで前処理し、静電的相互作用による結合を抑制した場合の pH 6.5 における SAPSP-lipo と細胞との結合活性を FACS により評価した (図 2-8a)。また、静電的相互作用で結合するカチオンリポソーム (Cationic-lipo) も同様に評価した。その結果、Cationic-lipo ではヘパリンの前処理によりほぼ完全に細胞結合活性が抑制された。一方で、SAPSP-lipo ではヘパリンによる抑制は約 30 % 程度であったことから、SAPSP-lipo の細胞への結合には静電的相互作用以外の結合様式も関与していることが示唆された (図 2-8b)。

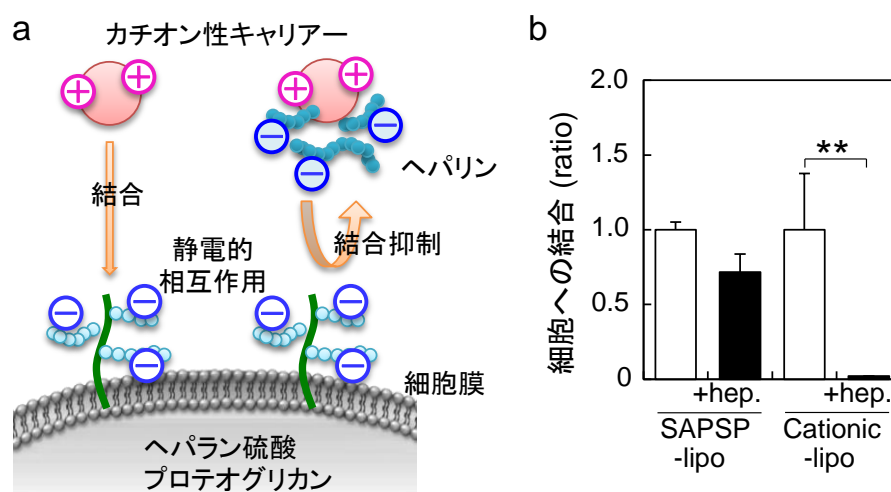


図 2-8. ヘパリン処理での細胞への結合評価

(a) カチオン性キャリアーのヘパラン硫酸への結合とヘパリン処理による抑制の概要図。
(b) ヘパリンで前処理した後、1 mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo または Cationic-lipo を B16-F1 細胞に添加し、4°C、pH 6.5 で 1 時間インキュベート後、FACS によりリポソームの細胞への結合を評価した。結果は、ヘパリン前処理していない MFIR を 1 とした場合の割合で示した。データは mean \pm S.D.として示した。(**, $P < 0.01$, $n = 3$)

そこで、SAPSP の微弱低 pH における構造変化により、細胞の脂質膜と相互作用しているのではないかと考えた。これまでも、低 pH に応答してペプチド構造が変化することにより、細胞膜を貫通するように透過するペプチドなどが報告されていることから^{92,93)}、SAPSP も、pH 6.5 で構造変化することで、細胞の脂質膜に挿入されるような形式で細胞へ結合するのではないかと考えた。そこで、生体膜モデルリポソームを用いて、蛍光偏光法により膜流動性を評価することで SAPSP の細胞膜への挿入状態を検討した。この方法により、Hunt JF らは、 α -ヘリックス構造をとるペプチドがモデル脂質膜に挿入されることを明らかにしている⁹⁴⁾。本研究では、蛍光物質として 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) 及び N,N,N-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)

phenylammonium p-toluenesulfonate (TMA-DPH)を用いたが、これらは同一構造の発蛍光性骨格を有し、蛍光特性は一致している。しかし、その脂質膜内における局在は異なり、脂溶性の DPH が脂質膜深部に局在するために、疎水部の流動性を解析することができるのに対し、カチオン性部位を有する TMA-DPH はリン脂質のアニオン性極性部と相互作用するために脂質膜表面に局在し、親水部の流動性を解析するために用いられている (図 2-9a) ^{95,96)}。これらの DPH 及び TMA-DPH の蛍光偏光の変化を解析することで、脂質膜内のペプチドや膜たんぱく質の存在を高感度に感知できるため、細胞膜内における SAPSP の存在状態を推測することが可能であると考えられる ⁹⁷⁻⁹⁹⁾。そこで、DPH または TMA-DPH で標識した 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) リポソームを生体膜モデルとして用いて、SAPSP-lipo と混合後の蛍光偏光を測定することにより、SAPSP の生体膜への挿入状態を検討した。また、コントロールとして、上記 (図 2-8b) で示されたように、主に静電的相互作用によって生体膜と結合し、膜に挿入されないと考えられる Cationic-lipo を用いた。その結果、DPH 標識したリポソームでは pH 7.4、pH 6.5 いずれの条件下でも SAPSP-lipo と Cationic-lipo 間で変化は認められなかった (図 2-9b)。一方で、TMA-DPH 標識したリポソームでは、pH 6.5 において、SAPSP-lipo の蛍光偏光度が、Cationic-lipo に比べて、有意に増大した (図 2-9c)。

したがって、SAPSP-lipo 表面の SAPSP が細胞膜の親水性部位に挿入されることで、SAPSP-lipo が細胞に結合することが示唆された。

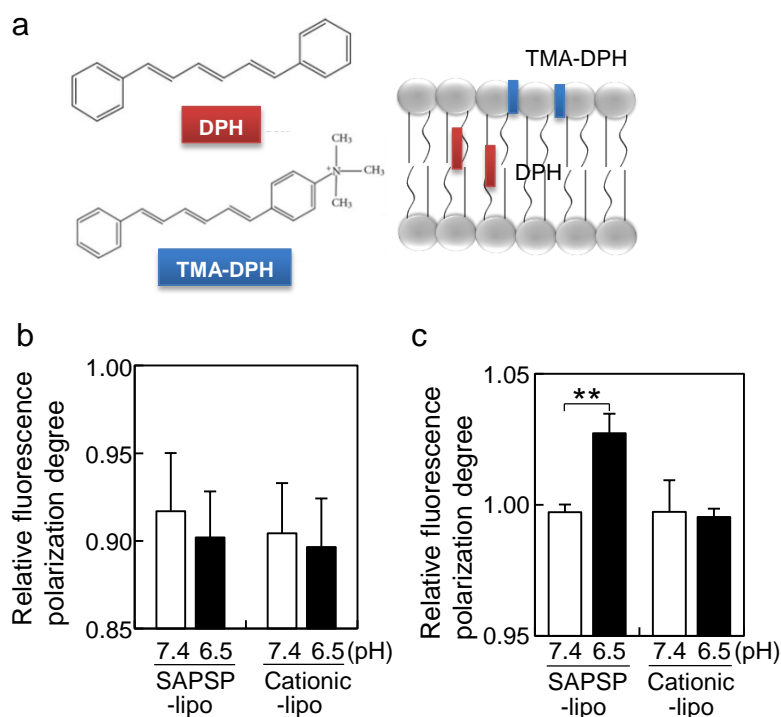


図 2-9. 蛍光偏光法による膜流動性評価

DPH または TMA-DPH を含有した生体膜モデルリポソームである DMPC リポソームに、SAPSP-lipo または Cationic-lipo を混合し、pH 7.4、pH 6.5 でそれぞれの蛍光偏光度を測定した。縦軸は DMPC のみの偏光度を 1 とした場合の比率を示した。(a) 蛍光物質 DPH と TMA-DPH の構造と脂質膜内の局在。DPH は疎水部、TMA-DPH は親水部に存在する。(b) DPH 含有 DMPC リポソーム (疎水性部位を反映) (c) TMA-DPH 含有 DMPC リポソーム (親水性部位を反映) それぞれのデータは mean \pm S.D. として示した。(**, $P < 0.01$, $n = 3$)

2-3-7 SAPSP-lipo の細胞内取り込み経路の解析

これまでの検討で、SAPSP-lipo は微弱な低 pH に応答して細胞質に送達されることが示されたので、この細胞内への取り込み経路について詳細に検討した。一般に、リポソームの細胞内への取り込み経路は、エネルギー依存的な経路と、エネルギー非依存的な経路に大別される。エネルギー依存的経路との代表として、エンドサイトーシス経路があり、さらにクラスリン介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシスに細分される^{100,101)}。エネルギー非依存的経路としては、膜融合や膜透過など、細胞内に直接取り込まれる経路が考えられる (図 2-10)。

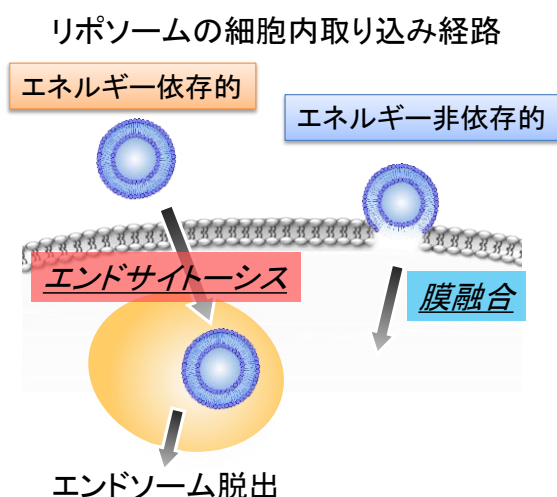


図 2-10 . リポソームの細胞内取り込み経路
一般的にエネルギー依存的な経路とエネルギー非依存的な経路に大きく分けられる。エネルギー依存的な経路として、エンドサイトーシスにより取り込まれ、そこから脱出する経路、エネルギー非依存的な経路として、膜融合などによる直接的な取り込み経路が考えられる。

まず、エネルギー依存的なエンドサイトーシス経路について検討するために、エンドサイトーシスの主要な経路であるクラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤 sucrose、及びマクロピノサイトーシスの阻害剤 amiloride 存在下での SAPSP-lipo の取り込み効率を FACS により評価した。その結果、SAPSP-lipo の細胞内取り込みは sucrose 存在下で有意に抑制されたが、amiloride 存在下では取り込みに変化は認められなかった (図 2-11a,b)。したがって、SAPSP-lipo はクラスリン介在性エンドサイトーシス経路を介して、細胞内に取り込まれることが示唆された。

次に、エネルギー非依存的な経路について検討するために、低温条件の 4℃ 下における SAPSP-lipo の細胞内取り込みを、FACS を用いて評価した。その結果、エネルギー依存的経路で取り込まれることが知られている Cationic-lipo は、4℃ でインキュベートすることによって細胞への取り込みが有意に抑制されたのに対し、SAPSP-lipo では 37℃ と同程度の細胞内取り込みが認められた (図 2-12a)。そこで、4℃ 条件でも SAPSP-lipo が細胞内に取り込まれているかを調べるために、蛍光ラベル化 SAPSP-lipo を用いて、CLSM 観察により評価した。その結果、赤で示される SAPSP-lipo が 4℃ 条件下でも確かに細胞内に取り込まれている様子が観察された (図 2-12b)。したがって、SAPSP-lipo の細胞内取り込みには、エンドサイトーシスのみならず、エネルギー非依存的な経路も関与することが示唆された。

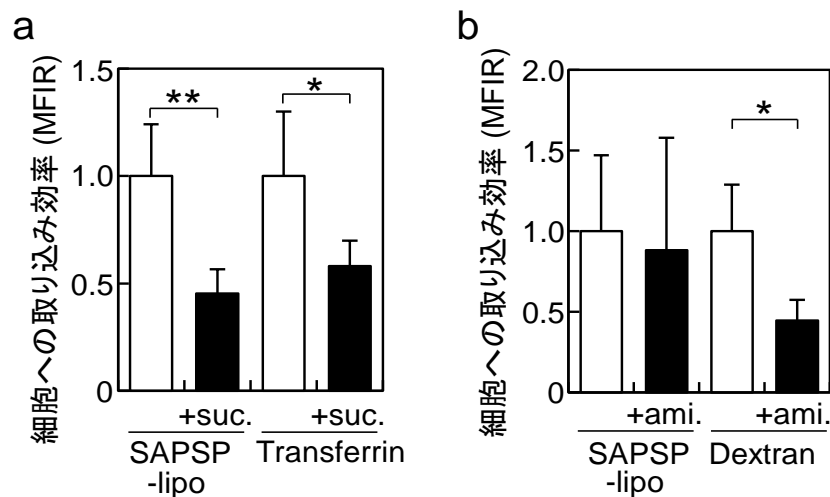


図 2-11. エンドサイトーシス経路による取り込み評価

エンドサイトーシスの各阻害剤で前処理後、1mol % Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を pH 6.5 条件下で B16-F1 細胞に添加し、4℃で 1 時間インキュベート後、FACS により細胞内取り込みを評価した。(a) クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤の sucrose 存在下での評価。コントロールとして transferrin を用いて同様に行った。(b) マクロピノサイトーシス阻害剤の amiloride 存在下での評価。コントロールとして dextran を用いて同様に行った。結果は、阻害剤非存在下での MFIR を 1 とした場合の割合で示した。データは mean \pm S.D.として示した。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, $n = 3$)

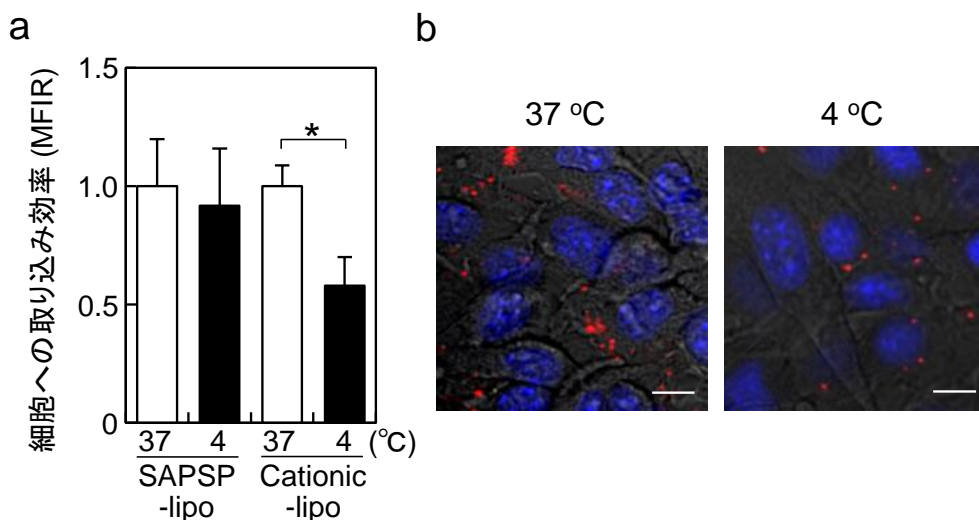


図 2-12. SAPSP-lipo の細胞内取り込みのエネルギー非依存的経路の関与

(a) pH 6.5 条件下で 1 mol% Rh-PE ラベル化 SAPSP-lipo を 37℃または 4℃で 1 時間インキュベート後、FACS により細胞への取り込みを評価した。コントロールとして Cationic-lipo を用い、同様に評価した。結果は、37℃での取り込みを 1 とした場合の割合で示した。データは mean \pm S.D.として示した。(*, $P < 0.05$, $n = 3$) (b) 4℃条件下で (a) と同様の方法でインキュベート後、グルタルアルデヒドにより固定し、CLSM 観察により細胞内取り込みを評価した。青：核 (Hoechst33342) 赤：SAPSP-lipo (Rh-PE) Bar : 10 μ m

2-3-8 SAPSP-lipo の細胞膜との直接的な相互作用

SAPSP-lipo の細胞内への取り込みにエネルギー非依存的な経路が関与していることが示唆されたため、まず、SAPSP-lipo と生体膜との直接的な相互作用について検討した。本評価は、第 1 章の図 1-9a と同様に、赤血球画分を用いた溶血試験により行った。SAPSP が直接細胞膜に相互作用することが、細胞内への取り込みの促進に影響している場合、赤血球が溶血すると予想される。比較として、生体膜と静電的相互作用することでエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれる Cationic-lipo でも同様に評価した。その結果、低 pH においても、Cationic-lipo と同様、SAPSP-lipo でも溶血率に大きな変化は認められなかったことから、SAPSP の膜に対する直接的な相互作用が取り込みに関与している可能性は低いと考えられる（図 2-13）。

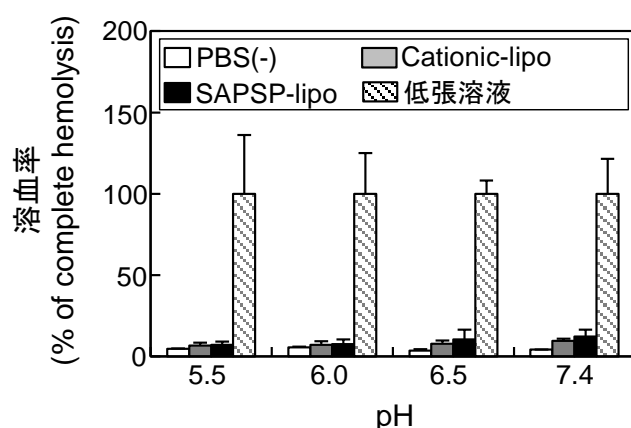


図 2-13. 溶血試験

表示の pH 条件で赤血球試験液と SAPSP-lipo、Cationic-lipo を混合し、37°C、1 h インキュベート後、吸光度を測定した（540 nm）。低張液で完全に膜破壊した場合の吸光度を 100 %とし、その割合で表した。

2-3-9 SAPSP-lipo の膜融合による取り込み評価

次に、SAPSP-lipo の細胞内取り込みメカニズムとして膜融合に着目した。SAPSP-lipo の脂質膜を NBD-PE で蛍光ラベル化し、さらに内水相に Rhodamine を封入することで、SAPSP-lipo の膜融合能を評価した。このような二重ラベル化リポソームが、細胞膜に結合している状態では、リポソーム膜の NBD の緑と内封 Rhodamine の赤が重なり黄色のドットとして観察され、膜融合が誘起された場合は、脂質膜の緑が消失し、内封 Rhodamine の赤が細胞内に拡散する様子が観察されると予想される（図 2-14a）。本研究では、エネルギー依存的経路を抑制するために、4°C 条件下で実験を行い、二重ラベル化 SAPSP-lipo の pH 6.5 における細胞内挙動を CLSM で観察した。また、エンドサイトーシスで取り込まれる Cationic-lipo も同様に二重ラベル化して行った。その結果、Cationic-lipo の場合は、細胞膜上に黄色のドットが多数観察され、リポソームの状態で結合していることが示唆された。一方、SAPSP-lipo は、黄色のドットのみならず、赤色が単独で観察され、ドット状や、細胞内に薄く拡散している様子が認められたことから、一部、脂質膜の NBD が消失し、膜融合が誘起されている可能性が示唆された（図 2-14b）。

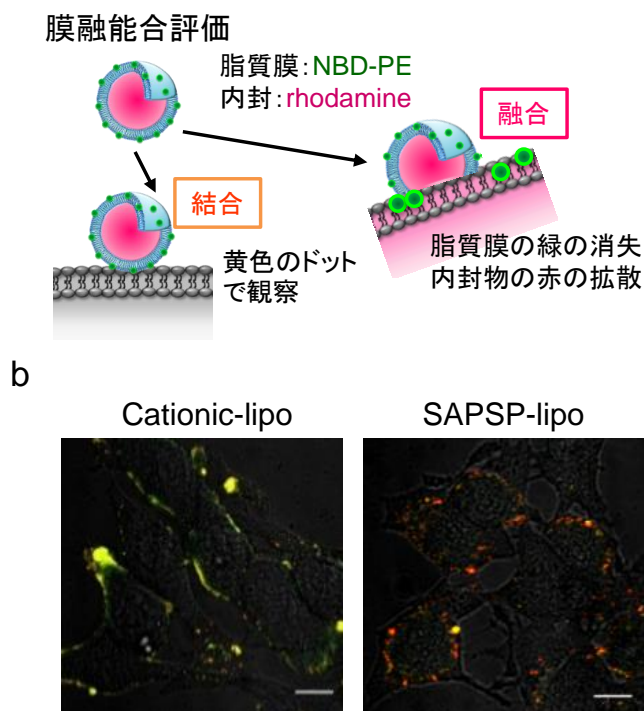


図 2-14. SAPSP-lipo の膜融合能評価
(a) 二重ラベル化リポソームによる膜融合能評価の概要図。細胞に結合状態では黄色のドットで、膜融合が起きた状態では脂質膜の緑が消失し、内封物の赤の蛍光が観察されと考えられる。(b) 脂質膜を NBD-PE でラベル化し、Rhodamine を内封したリポソームを 4℃、pH 6.5 条件で 1 時間インキュベート後、CLSM により細胞内取り込みの様子を観察した。緑：リポソーム膜 (NBD-PE) 赤：内水層 (Rhodamine) Bar : 10 μ m

2-3-10 FRET を利用したスペクトルイメージングによる膜融合活性の解析

2-3-9 で、SAPSP-lipo は細胞膜と膜融合することで細胞質に送達されている可能性が示唆されたので、その膜融合活性について、fluorescence resonance energy transfer (FRET) を利用した CLSM のスペクトルイメージングにより評価した。

FRET は、一方の蛍光分子 (ドナー) の蛍光スペクトルと他方の蛍光分子 (アクセプター) の吸収スペクトルの重なりが大きい場合、十分に近接した条件で、ドナーの励起エネルギーが直接移動しアクセプターの蛍光を励起する現象である。図 2-15a に示すように、NBD (Ex:470 nm, Em:530 nm) と Rhodamine (Rh) (Ex:560 nm, Em:590 nm) では、NBD の蛍光スペクトルと Rh の吸収スペクトルは重なり、それぞれ FRET のドナー、アクセプターとなることが知られている。FRET が生じるには分子間の距離が重要であり、その距離は分子によって異なるが、NBD と Rh では約 10 nm 以下であることが知られており^{102, 103)}、その場合には、NBD の励起波長 (470 nm) で励起させると、FRET が誘起され、NBD の蛍光 (530 nm) は消失し、Rh の蛍光 (590 nm) が検出される (図 2-15a)。この NBD と Rh の FRET をリポソームの膜融合活性の評価に利用する方法はこれまでも報告されている¹⁰⁴⁻⁴⁰⁶⁾。リポソームの脂質膜を NBD-PE、Rh-PE でラベル化することで、リポソームの状態では NBD と Rh が十分に近接しているため、FRET が起こり、NBD の蛍光は消失する。一方、リポソームと細胞間で膜融合が起きた場合は、リポソームの脂質膜が細胞膜と一緒になるため、NBD と Rh は細胞膜に拡散し、両分子間の距離が増大することで FRET が解消され、NBD の蛍光が回復すると考えられる (図 2-15b)。

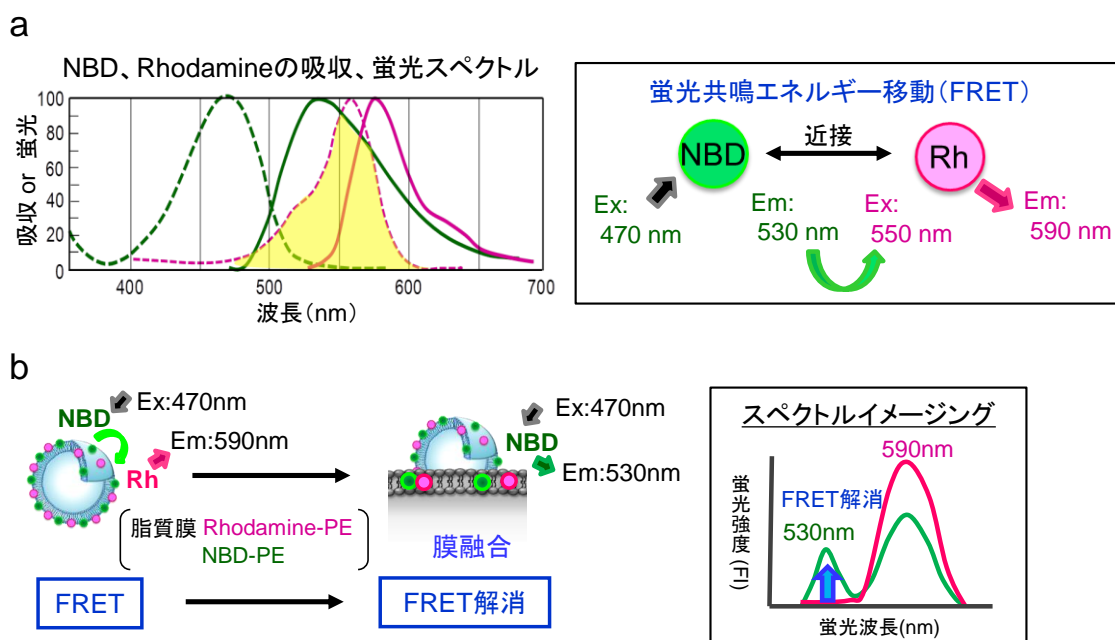


図 2-15. FRET を利用した膜融合活性評価

(a) NBD、Rh-PE の吸収、蛍光スペクトル (左図)。緑点線 : NBD 吸収、緑実線 : NBD 蛍光、赤点線 : Rh 吸収、赤実線 : Rh 蛍光。黄色の部分 が NBD の蛍光と Rh の吸収の重なりを示す。右図は NBD と Rh の FRET の概要図。 (b) NBD、Rh ラベル化リポソームにより FRET を利用した膜融合活性評価の概要図 (左図)。右図は FRET 解消時のスペクトルイメージングを示した。

そこで、この FRET 解消を CLSM のスペクトルイメージングを用いて NBD の 530 nm の蛍光の回復を観察することで膜融合能を評価した。スペクトルイメージングは、画素ごとに、波長情報を持たせて画像を取得する方法であり、波長ごとの蛍光強度が得られる。SAPSP-lipo と、そのコントロールとして膜融合能を有さない Cationic-lipo について、それぞれ脂質膜を NBD-PE、Rh-PE でラベル化し、4℃、pH 6.5 条件下で B16-F1 細胞に添加し、細胞膜上に観察されるドットについてスペクトル情報を取得した。その結果、Cationic-lipo では、NBD の蛍光の回復はほとんど認められず、リポソーム膜の維持した状態で細胞に結合していることが示された。一方で、SAPSP-lipo は、細胞膜表面の一部では 530 nm 付近の NBD 蛍光強度が上昇し、FRET の解消が認められたことから、膜融合が起こっていることが示唆された (図 2-16a,b)。そこで、細胞ごとに細胞膜表面上のドットのスペクトル情報から、590 nm に対する 530 nm の相対蛍光強度 (relative fluorescence intensity) を算出することで、FRET 解消率を評価した。さらにこれらの平均相対蛍光強度 (FRET 解消率) を各細胞で比較し、膜融合活性を評価した。その結果、Cationic-lipo に比べ、SAPSP-lipo では、平均相対蛍光強度 (FRET 解消率) は高いことが示された (図 2-16c)。したがって、SAPSP-lipo は一部、細胞膜上での膜融合活性を有し、細胞質に効率よく送達されていることが示唆された。

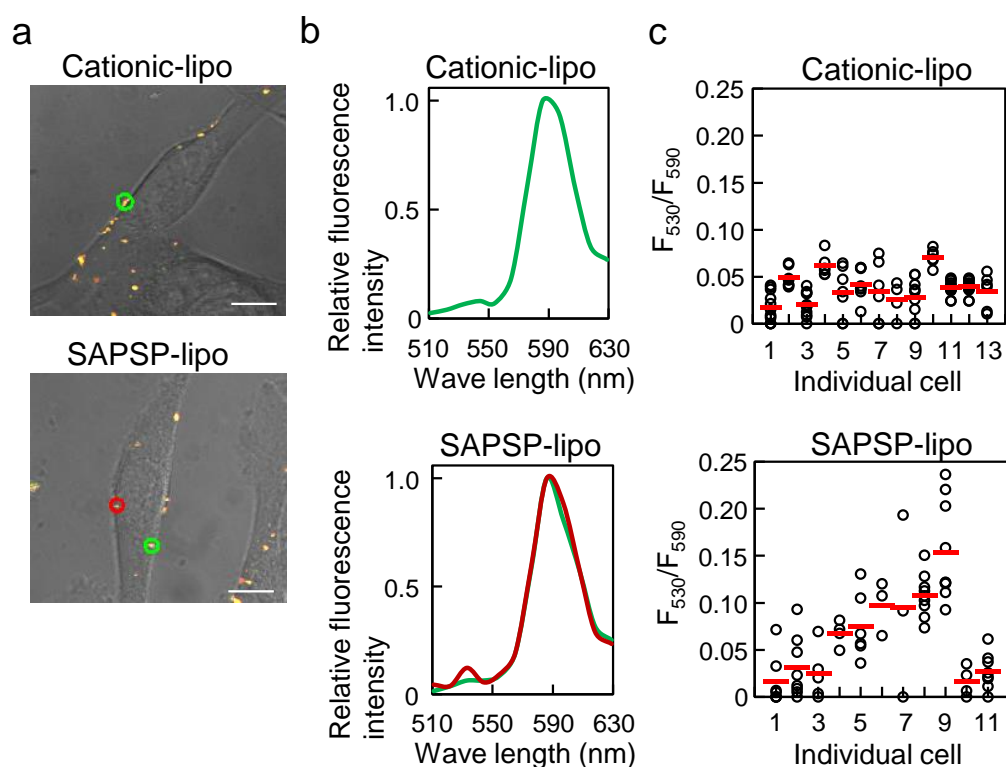


図 2-16. スペクトルイメージングによる FRET 解消率 (膜融合活性)

3.5 mol% NBD-PE 及び 1mol % Rh-PE で脂質膜をラベル化した SAPSP-lipo を B16-F1 細胞に添加し、sucrose 存在下、4 °C、1 時間インキュベート後、CLSM のスペクトルイメージングにより細胞内で FRET を観察した。コントロールとして Cationic-lipo も同様に行った。(a) 細胞表面のリポソームのドットをプロットした。(b) プロットした各ドット (a) のスペクトルイメージング。最大の蛍光強度に対する相対蛍光強度で表した。(c) 1 細胞ごとの平均相対蛍光強度。相対蛍光強度は 590 nm に対する 530 nm の蛍光強度を算出した。それぞれ、10 細胞以上で評価した。赤線は各細胞の平均を示す。

2-3-11 SAPSP-lipo の安定性及び血清、イオン強度の及ぼす影響

SAPSP-lipo は腫瘍環境の低 pH に応答して機能性を発揮することが示唆されたが、表面電荷の変化を利用していることから、*in vivo* 系に応用するためには、その物性の安定性や血清、イオン強度の影響について検討する必要がある。

まず、SAPSP-lipo の物性に対する温度と時間の影響について検討した。SAPSP-lipo を、各 pH に調整した PBS (-) に懸濁し、インキュベート後、表面電荷の指標となるゼータ電位を測定した。その結果、37°C においては、pH 7.4、pH 6.5 のどちらの pH においてもほとんど温度による変化はなく、また時間依存的な変化も認められなかった (図 2-17a)。しかし、4°C の条件下では、表面電荷は速やかに変化し、pH 7.4 では約 10 mV 程度、pH 6.5 では約 5 mV 程度ゼータ電位が上昇した。しかし、この条件における時間依存的な変化は認められなかった (図 2-17b)。

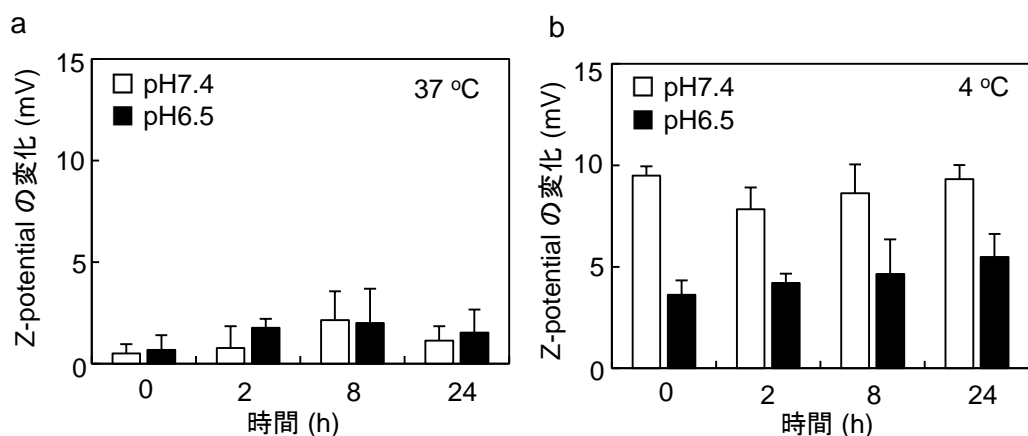


図 2-17. 温度と時間による表面電荷の変化

SAPSP-lipo を pH 7.4、pH 6.5 に調整した PBS(-) 中で、37°C (a) 及び 4°C (b) の条件下で 24 時間インキュベートした。図示の時間にサンプリングし、レーザードップラー法によりゼータ電位を測定した。結果は、調製時の pH 7.4、pH 6.5 の ζ -potential の値と各サンプルの ζ -potential の値の差の絶対値で表した。データは mean \pm S.D. で表した。(n=3)

次に、生体への投与を考え、血清存在下での影響を検討した。表面電荷は FBS の存在下で変化し、FBS 含有量の増大とともに上昇した (図 2-18a)。また、細胞への取り込み効率は 10 % FBS の存在下ではいずれの pH でも若干増大したが、20 % FBS の存在下では pH 6.5 で減少し、pH 7.4 では若干の増大が認められた (図 2-18b)。したがって、いずれの pH においても血清と相互作用している可能性は否定できないが、10 % 程度であれば、pH に応答した取り込みの差は保たれていた。なお、比較として、PEG-lipo においても同様に血清存在下での取り込みを評価したところ、pH による差は認められなかったが、FBS の存在下では、その細胞内取り込みは減少した。さらに、pH 7.4 においても非常に高い取り込みが認められたことから、PEG 修飾リポソームであっても血清の影響を受けることが示唆された (図 2-18c)。

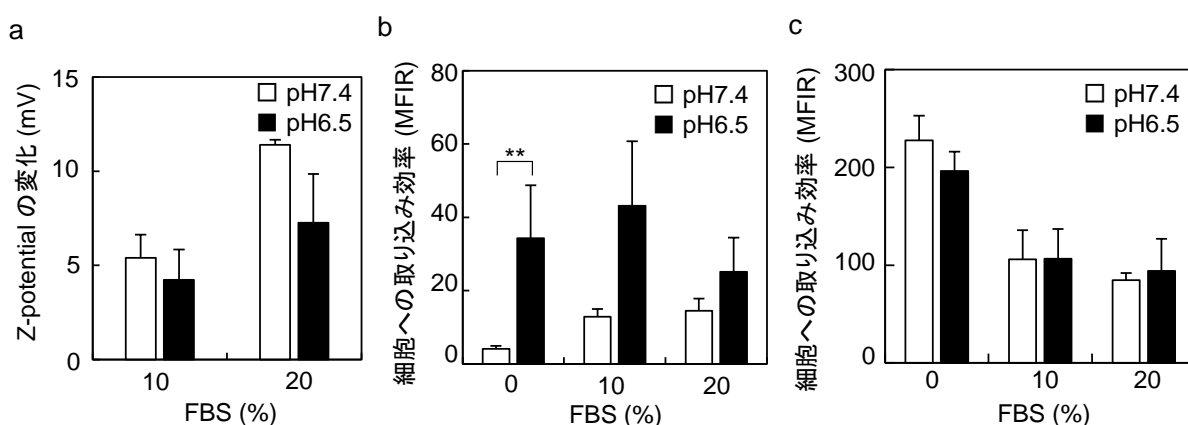


図 2-18. 血清存在下での表面電荷及び細胞への取り込み効率

(a) SAPSP-lipo を pH 7.4、pH 6.5 に調整した PBS(-) 中に 10 % または 20 % FBS 存在下でレーザードップラー法によりゼータ電位を測定した。結果は、FBS(-) の pH 7.4、pH 6.5 の ζ -potential の値と各サンプルの ζ -potential の値の差の絶対値で表した。細胞への取り込み効率は、B16-F1 細胞 pH を調整した培地に SAPSP-lipo (b) または PEG-lipo (c) を添加し、FACS 解析により評価した。データは mean \pm S.D. で表した。(**, $P < 0.01$, n=3)

また、リポソーム膜とペプチド間、またはペプチドと細胞膜間との静電的相互作用には、周囲のイオンの影響を強く受ける可能性が考えられる。これまでに、DOTAP 含有のカチオン性リポソームと DNA との lipoplex において、イオン強度の増大によって DNA のリポソーム間の静電的相互作用が減弱し、lipoplex が不安定化されることや¹⁰⁷⁾、生体膜モデルの負電荷リポソームとカチオン性ペプチドの静電的相互作用においてもイオン強度の影響を強く受けることが報告されている¹⁰⁸⁾。そこで、SAPSP-lipo の表面電荷と細胞取り込みに対するイオン強度の影響を検討した。その結果、表面電荷は NaCl の濃度を増大させても大きな変化はなく、pH による変化もほとんど認められなかったことから、イオン強度による影響は少ないことが示唆された (図 2-19a)。

SAPSP-lipo の細胞内取り込みへのイオン強度の影響を FACS 解析により評価した結果、pH 6.5 での取り込みは NaCl 濃度の増大に伴い減少したが、pH 7.4 においては、0.3 M NaCl 存在下でもほとんど変化は認められなかった (図 2-19b)。比較として、Cationic-lipo でも同様に評価したが、NaCl 濃度の増大に伴い、細胞内取り込みが顕著に減少した (図 2-19c)。したがって、SAPSP-lipo に限らず、正電荷リポソームでも、高いイオン強度では静電的相互作用による細胞結合が抑制されることが示唆された。しかし、生理的条件の NaCl 0.13M (PBS の濃度条件) では SAPSP-lipo は、pH に応答した細胞内取り込みを示すことから、*in vivo* に応用する場合でも大きな問題とならないと考えられる。

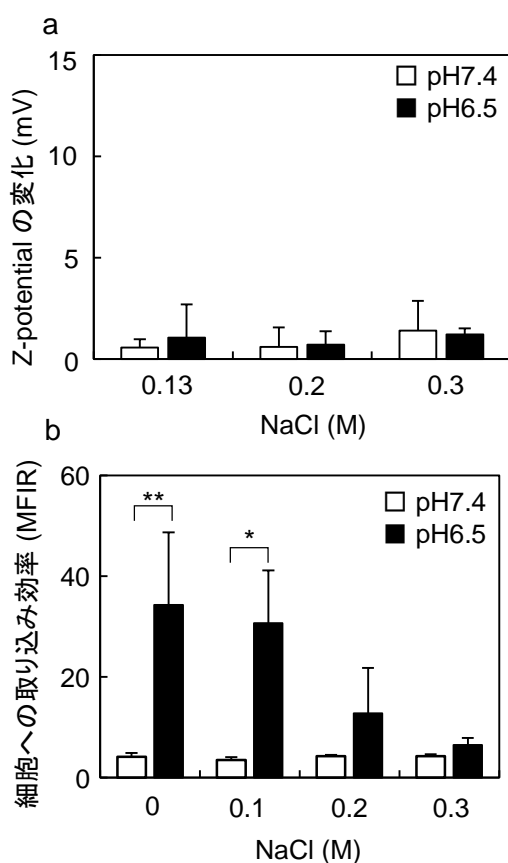


図 2-19. イオン強度が表面電荷、細胞への取り込みに及ぼす影響

(a) SAPSP-lipo を pH 7.4、pH 6.5 に調整した PBS(-) 中に図示の濃度の NaCl 存在下でレーザードップラー法によりゼータ電位を測定した。結果は、PBS(-) の pH 7.4、pH 6.5 の ζ -potential の値と各サンプルの ζ -potential の値の差の絶対値で表した。細胞への取り込み効率は、B16-F1 細胞 pH を調整した培地に SAPSP-lipo (b) または Cationic-lipo (c) を添加し、FACS 解析により評価した。データは mean \pm S.D. で表した。(*, P < 0.05, **, P < 0.01, n = 3)

2-4 考察

本章では、体内動態と細胞内動態を制御可能な DDS を開発するために、腫瘍微弱低 pH (pH 6.5) に応答可能な SAPSP を新たに設計した。SAPSP は His と Glu の配置を制御することで His の pKa を上昇可能としたものである。これまでに、腫瘍環境の低 pH に応答性を示すようなキャリアーは多数開発されてきた¹⁰⁹⁻¹¹²⁾。しかし、その多くが低 pH に応答してキャリアーが崩壊することで薬物の放出を促進させるものであり、低 pH に応答して細胞内取り込みを促進するキャリアーはほとんど報告されていない。本研究では、新規 pH 応答性素子 SAPSP を正電荷リポソームに修飾することで、腫瘍へ送達後に、微弱低 pH に応答して表面電荷が負から正へ反転することで細胞内取り込みが促進する新規キャリアー SAPSP-lipo を開発した。

図 2-3 に示すように、生理的条件下で負電荷を有する SAPSP-lipo は、PEG-lipo と同程度の腫瘍への集積が認められた (図 2-3)。SAPSP-lipo は PEG を全く修飾していないにもかかわらず、腫瘍集積性が高いことは驚くべき結果である。さらに、PEG-lipo は細胞に取り込まれにくいだけでなく、細胞質送達効率が低いいため、核酸医薬のキャリアーとして利用する場合、SAPSP-lipo は PEG-lipo に比べて、高い薬効が期待できると考えられる。リポソームなどのナノ粒子の表面電荷は体内動態へ影響を及ぼす重要な因子の一つである。正電荷のナノ粒子は、血清成分と強く相互作用するために、静脈内投与しても RES に捕捉され、速やかに排出されてしまう^{113,114)}。負電荷のナノ粒子は、そのような相互作用を回避しやすいため、血中滞留性が期待できると考えられる。しかし、負電荷も強すぎると血中滞留性が下がることが報告されている¹¹⁴⁾。ポリマーからなる小胞のポリソームにおいて、負電荷の強さによって血中のクリアランスが異なり、ゼータ電位が約 -10 mV 弱の負電荷ポリソームでは従来の PEG リポソームよりも血中残存率が高かったのに対して、約 -25 mV や約 -40 mV の強い負電荷を有するポリソームでは、24 時間後の血中残存率はその約半以下であり、肝臓への取り込みが上昇する¹¹⁵⁾。また、他にもポリマーを修飾したリポソームにおいて -5 mV 程度¹¹⁶⁾、高分子ミセルにおいても -10 mV 程度¹¹⁷⁾ の弱い負電荷の場合、強い負電荷に比べて肝臓での取り込みが抑制され、血中滞留性が向上したことが報告されている。このような強力な負電荷を有するナノ粒子の肝臓内における取り込みには、負電荷粒子を認識する受容体を有する白血球が肝臓中に存在するために、マクロファージの食作用が促進されている可能性が示唆されている¹¹⁸⁾。SAPSP-lipo の高い腫瘍集積には、生理的条件下で負電荷を有することが寄与していると考えられ、pH 7.4 でのゼータ電位は約 -15 mV 弱であり、上記の知見で血中滞留性が認められたゼータ電位の値とも大きく異なることから、SAPSP 設計時に組み込んだ負電荷アミノ酸の割合も体内動態の制御に適していたと考えられる。本研究において、SAPSP-lipo は静脈内投与により、腫瘍へ集積することは確認できたが、血中クリアランスに関する検討は不十分であり、今後定量的な評価を行うことが必要であると考えている。

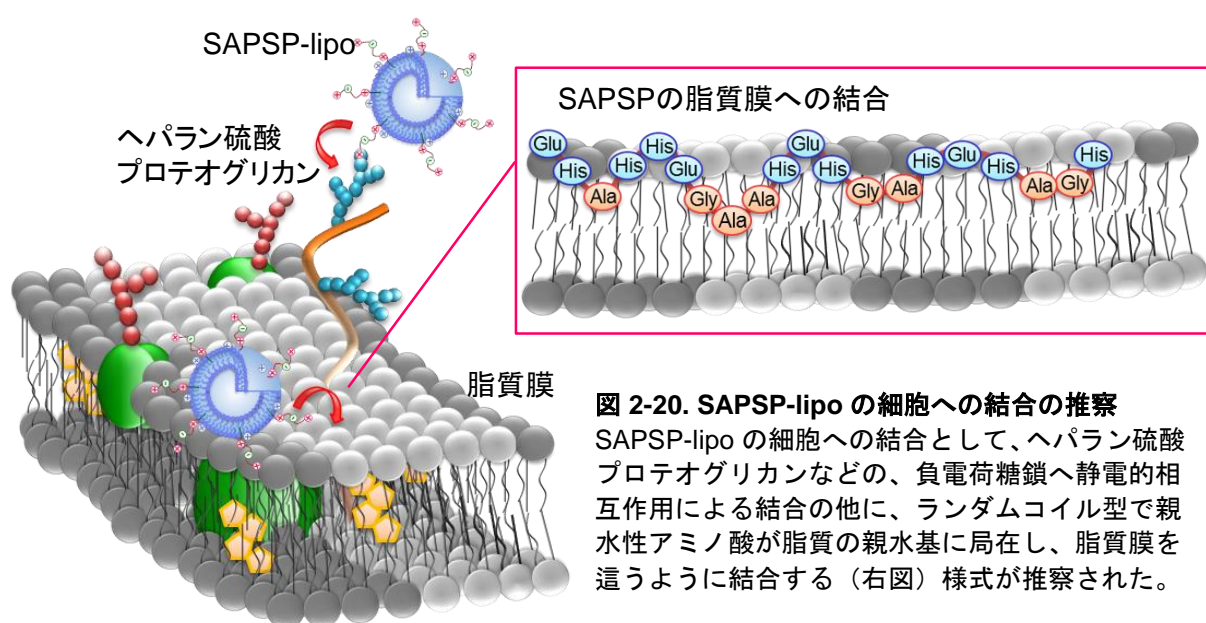
ナノ粒子の体内動態の支配因子は表面電荷だけでなく、粒子径、表面水和層の存在、生体内における免疫反応の有無などの様々な因子が関与することが知られている^{114,119)}。In vitro で血清の影響を評価した結果において、SAPSP-lipo は pH 7.4 においても表面電荷が上昇し、細胞への取り込みが変化したことから (図 2-18)、SAPSP-lipo は血清成分と相互作用すると考えられる。本研究において、SAPSP-lipo が腫瘍へ集積することは確認できたが、SAPSP-lipo の腫瘍集積性を更

に向上させるためには、SAPSP-lipo 表面への血清タンパク質の吸着を抑制することで、オプソニン化を免れるように改善する必要があると考えられる。これまでに PEG が体内動態制御素子として多くの DDS キャリアーに利用されてきたのは、ナノ粒子表面に水和層を形成することで、オプソニン化の回避能に優れているためであり、血清タンパク質との親和性が高い正電荷リポソームであっても、PEG を修飾することで血中滞留性は大幅に改善されることが報告されている¹⁴⁾。

SAPSP はアミノ酸 24 残基のペプチドであり、pH 7.4 でトータル電荷が負電荷であったとしても、正電荷のリポソーム膜のシールド効果は水溶性高分子の PEG に比べたら劣ると推察される。したがって、SAPSP-lipo に親水性を付与すれば、血中滞留性を改善できるのではないかと考えられる。しかし、SAPSP-lipo にかさ高い立体構造を有する PEG を修飾した場合、SAPSP の機能が阻害されることが推察されたため、低分子の親水性化合物を修飾することの方が SAPSP-lipo の親水化には適していると考えられる。これまでに、poly (oxazoline)¹²⁰⁾、polyglycerol¹²¹⁾、poly (N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide)¹²²⁾、poly-N-vinylpyrrolidone¹²³⁾、polyvinyl alcohol¹²⁴⁾、Tris(hydroxymethyl) aminomethane¹²⁵⁾、poly (hydroxyethyl L-glutamine)¹²⁶⁾ などを連結させた脂質誘導体を用いることで、PEG に匹敵する血中滞留性が得られることが報告されている。このような親水性化合物を SAPSP-lipo に修飾すれば、SAPSP の機能を阻害することなく、血中滞留性を改善することができ、SAPSP-lipo の腫瘍集積量が増大するのではないかと考えられる。

また、SAPSP-lipo は微弱低 pH に応答した細胞内取り込みの促進及び細胞質送達が認められた (図 2-4,5)。この pH に応答した細胞への取り込みメカニズムは非常に興味深い。一般的に、正電荷ナノ粒子は、細胞表面上の負電荷に富むヘパラン硫酸などと静電的相互作用することで結合し、クラスリン介在性エンドサイトーシス経路を介して取り込まれる経路が知られている^{89,90)}。SAPSP-lipo も、低 pH 条件では正電荷に反転するため、上述のヘパラン硫酸などと静電的相互作用によって細胞に結合すると考えられるが、SAPSP-lipo はヘパリン存在下でも細胞内取り込みが認められたことから、静電的相互作用以外の結合様式も関与することが示唆された (図 2-8)。また、図 2-11 に示すように、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤 sucrose 存在下において SAPSP-lipo の細胞内取り込みは完全に抑制されず、またマクロピノサイトーシス経路も関与しないことから、SAPSP-lipo はクラスリン介在性エンドサイトーシス以外の経路を介しても細胞内に取り込まれることが示唆された。別の取り込み機構として、細胞膜との膜融合が関与することが、図 2-14,16 の結果から示唆された。これまでに低 pH 条件下で膜融合や膜透過能をもつペプチドとして、GALA や pHLP が報告されている。両者とも、配列中に酸性アミノ酸を含み、低 pH でプロトン化されることで、立体構造が変化することが膜との相互作用の引き金となっている。GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA) はインフルエンザウイルスの膜融合ペプチド由来の人工ペプチドであり、配列中の Glu が低 pH でプロトン化することで、近接のアミノ酸との静電的な反発が崩れ、ランダムコイル型から α -ヘリックス型に変化するために、ペプチドに疎水性の面が形成される²⁹⁾。この疎水性の面が細胞膜との相互作用に重要であり、さらに GALA はその疎水性の面間の疎水性相互作用によって数分子が集合し、ポアを形成することで膜融合活性を示すと考えられている¹²⁷⁾。pHLIP (AAEQNPYIYARYADWLFTPLLLLDLALLVDADEGTCG) も、Asp (アスパラギン酸) が低 pH でプロトン化されることで静電的反発が減り、ランダムコイルから膜貫通ヘリックスに変化する。pHLIP は GALA のようにポアを形成することなく、細胞

膜を貫通することで、pHLIP に結合された薬物等の cargo を細胞質に送達可能であることが示されている^{92,93)}。SAPSP-lipo は、pH 6.5 以下の低 pH で構造変化が誘起されるが、その構造は、どちらかと言えばヘリックス型よりランダムコイル型であった (図 2-7)。さらに、生体膜モデルリポソームを用いた蛍光偏光の結果から、細胞膜の親水性部位と相互作用している可能性が示唆された (図 2-9)。これらのことから、SAPSP は GALA や pHLIP のようなヘリックス構造をとることで、細胞膜の疎水性部位まで貫通するように相互作用しているのではなく、微弱低 pH 下でペプチド内の Ala や Gly の疎水性アミノ酸とその他の親水性アミノ酸の面ができ、細胞膜の表面を這うようにして相互作用しているのではないかと推察される (図 2-20)。



膜貫通や膜透過とは別の機構としては、膜融合が考えられる。リポソーム型キャリアーの場合は、脂質組成に膜融合能を有する脂質を含有させ、細胞膜との融合により内封物を放出する戦略がよく行われている。膜融合性脂質としては、脂質膜二重膜構造には不安定な逆ヘキサゴナル構造をとる DOPE が、膜融合戦略によく用いられている^{52,128)}。しかし、SAPSP-lipo は DPTAP と安定なラメラ構造をとる EPC のみから構成されるリポソームであるため、膜融合能はほとんどないと考えられる。それにもかかわらず、二重ラベル化した SAPSP-lipo での検討及び FRET を利用したイメージングにより膜融合能を有することが示唆された (図 2-14,16)。この機構は明らかではないが、SAPSP の構造変化と細胞膜との相互作用が深く関与していると考えられる。SAPSP 単独の場合では、その pH 応答性の違いに加えて、CD スペクトル変化、細胞内動態もリポソームに修飾した場合とは異なる結果であった (図 2-6,7)。さらに、SAPSP 単独の場合ではエンドソームに留まっている様子からも (図 2-6b)、細胞質送達能は低く、SAPSP 自身が単独の状態で膜融合能を有している可能性は低い。したがって、SAPSP はリポソームの脂質膜と相互作用した場合のみ微弱な低 pH に応答した機能性を発揮すると考えられる。また、SAPSP はカチオン性リポソームに修飾した場合に機能性を発揮したことから、SAPSP がリポソームに修飾した際の SAPSP

の周辺状態が SAPSP の His の微弱な低 pH でのプロトン化を安定化し、構造変化をもたらした結果、上記（図 2-20）のような細胞膜との相互作用を介して、膜融合を誘起しているのではないかと推察された。

この SAPSP とリポソーム膜や細胞膜との相互作用は、イオン強度の影響を受け、0.2 M、0.3 M NaCl の高イオン強度において、SAPSP-lipo は pH 6.5 での細胞への取り込みが抑制された（図 2-19）。カチオン性リポソームと DNA の lipoplex の形成能は、正電荷が高いほどイオン強度の影響を強く受け、PBS と同程度のイオン強度であっても複合体が不安定化することが報告されている¹⁰⁷⁾。SAPSP-lipo の場合は、ステアシル基によってリポソーム膜に保持されているため、SAPSP がリポソームから解離する可能性は低いですが、このような知見から高いイオン強度では脂質膜と SAPSP の相互作用が変化していると推察され、それが pH 6.5 の正電荷状態での細胞への取り込みに影響し、抑制されたのではないかと考えられる。このことから、SAPSP-lipo の細胞への取り込みには、リポソーム膜と SAPSP の相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、ペプチド構造等の何が重要であるのか、その詳細な相互作用を解析することで、SAPSP-lipo の改良や今後の DDS 設計に活かせるのではないかと考えられる。

2-5 小括

本章では、体内動態と細胞内動態を制御可能な DDS を開発するため、リポソーム型キャリアーの表面電荷に着目した。つまり、血中の生理的条件 pH 7.4 では負電荷で、腫瘍環境の微弱な低 pH (pH 6.5) では正電荷に反転するリポソームを構築することを目的とした。そこで、微弱な低 pH に応答する素子として SAPSP を設計し、リポソームに修飾することで、pH 6.5 付近で表面電荷が負から正電荷に転換するリポソームの構築に成功した。この SAPSP-lipo は腫瘍へ集積するだけでなく、pH 6.5 以下の環境下にある細胞の細胞質まで送達されることが明らかとなった。また、その取り込み機構として、エンドサイトーシス経路のみならず、膜融合を介して効率的に細胞質へ送達されていることが示された。これらの結果より、SAPSP は体内動態と細胞内動態を共に制御可能な素子として有用であると期待される。

第 3 章

細胞内で効率的に薬物放出可能な **DDS** の開発

第3章 細胞内で効率的に薬物放出可能な DDS の開発

3-1 緒言

第2章では、新たに機能性素子 SAPSP を開発し、体内動態と細胞内動態を制御可能な微弱低 pH 応答性キャリアー-SAPSP-lipo の構築に成功した。図 2-4c や図 2-14b で SAPSP-lipo の細胞内動態評価により、細胞質に送達され、膜融合も誘起していることが示されたが、細胞質でドットとして観察されるものも多く認められた。リポソームは、特に脂質膜を制御しない限り多重膜構造をとる。そのため、膜融合が起こっても、多重膜の外膜に限定されるために、細胞内においても脂質膜構造が保持されており、内封薬物を放出することができない可能性が考えられた。そのため、リポソーム型キャリアーからの薬物放出を改善する必要がある。

序論でも述べたが、EPR 効果を介した PEG 修飾キャリアーの腫瘍集積も、十分であるとは言い難く、高くても投与量の約 10 %程度にすぎない¹⁴⁾。また、腫瘍血管は腫瘍個々で異なり、脾臓がんのような血管密度の低いがん組織への移行量は更に低いことが報告されている²⁴⁻²⁶⁾。それにもかかわらず、薬物キャリアーを腫瘍組織へ送達するためには EPR 効果の恩恵を受けざるを得ないのが現状である。また、細胞内へ取り込まれたとしても、エンドソームからの脱出効率が不十分であれば、ライソソームで分解されてしまうだけでなく、エンドソームリサイクリングシステムにより細胞外に排出されてしまう可能性も考えられる。Sahay らは、脂質ベースのナノ粒子 (LNP) がリサイクリングシステムにより 24 時間後には約 70 %も細胞外に排出されることを報告している¹²⁹⁾。そのため、抗がん剤を封入したリポソームの抗腫瘍効果を増強するためには、低い腫瘍及び細胞質送達効率を補うことができるだけの、高い薬効発現を誘導することが必要である。キャリアーを用いた場合、その薬効はキャリアーから解離した free 型の薬物量に依存する。すなわち、キャリアーからの薬物放出は、薬効増大のための鍵となるステップである。さらに、副作用軽減のためには、がん細胞特異的な薬物放出が重要である。

これまでに、腫瘍に特異的な環境に応答して薬物放出が促進するキャリアーの開発が行われてきた。例えば、腫瘍環境低 pH や、がん細胞において高発現が認められる酵素に応答して薬物を放出するようなキャリアーが挙げられる¹³⁰⁾。しかし、これらは、細胞外の環境を利用したものであり、低分子の抗がん剤への応用に限定される。核酸医薬は当然のことながら、低分子抗がん剤であっても、作用部位である細胞内まで如何に効率的に free 型薬物を送達するかが、薬効を増強するためには重要であるため、リポソーム型キャリアーに内封した薬物をがん細胞の細胞質へ特異的かつ効率的に free 型の状態で放出可能なシステムの開発が必要であると考えられる (図 3-1a)。

そこで、リポソームが細胞に取り込まれると同時にリポソーム膜の不安定化を誘起する素子を用いることで細胞内への薬物放出が可能なのではないかと考えた。このコンセプトを実現するために、がん細胞膜に高発現している γ -セクレターゼに着目した。 γ -セクレターゼはがん細胞で活性化されており、Notch¹³¹⁾ の膜貫通ドメインを細胞膜内で切断するプロテアーゼである (図 3-1b)^{132,133)}。この基質分解機構を利用して、 γ -セクレターゼの基質となる Notch の膜貫通部位を模倣し

たペプチド liposomal membrane disturbance peptide (LMDP) を脂質膜に組み込むことで、細胞膜に局在する γ -セクレターゼが LMDP を分解することによりリポソーム膜が乱れ、内封薬物の細胞内への放出が期待できると考えた。本章では、このコンセプトに基づき、LMDP を組み込んだリポソーム LMDP-lipo を作製し、その機能性を評価した。

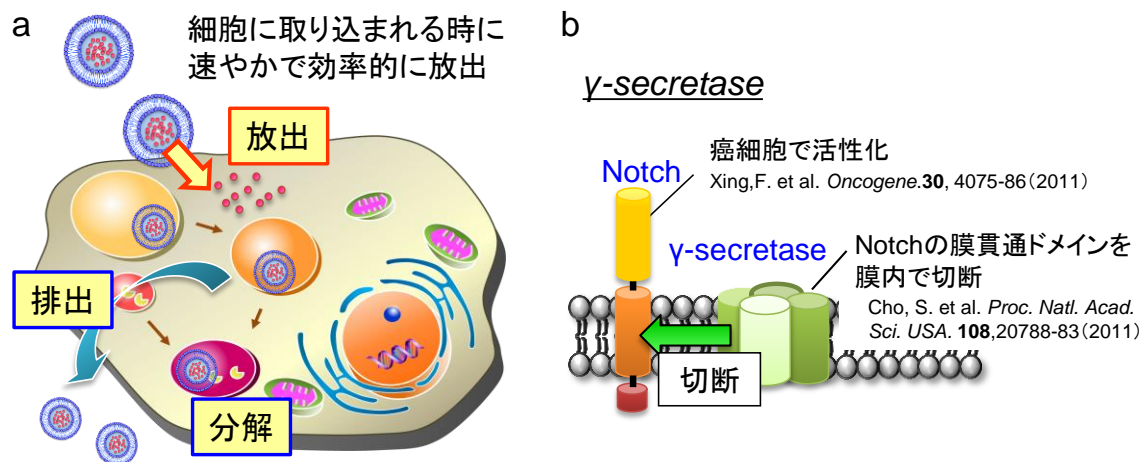


図 3-1. 細胞内薬物放出キャリアーのコンセプト

(a) 細胞内への薬物放出システムのコンセプト図。細胞内での分解や排出を回避するためにも、リポソームから細胞質への速やかで効率的な放出が必要である。(b) γ -セクレターゼの概要図。基質である Notch の膜貫通部位を細胞膜内で切断するプロテアーゼである。

3-2 実験方法

3-2-1 材料・機器

1) 材料

HUEhT-2 細胞 (JCRB1459)は JCRB Cell Bank (Osaka, Japan)より、A549 細胞は Riken Cell Bank (Saitama, Japan)より、MCF-7 細胞は Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)より購入した。MCDB131 は GIBCO より購入した。Endothelial Cell Growth Supplement は BD (Bedford, MA, U.S.A.) より購入した。collagen type I coated dish は IWAKI より購入した。Cell Tracker CM-DiI は Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)より購入した。Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS)、Calcein は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)より購入した。Bio-Beads SM-2 Adsorbents は BIO-RAD (Hercules, CA, U.S.A.)より購入した。Liposomal membrane disturbance device (LMDB : LHLMYVAAAFAVLLFFVGCGLLSRKRR) はスクラム (Tokyo, Japan) に委託合成した。蛍光基質 ペプチド プロローブ (Nma-GGVVIATVK (Dnp) RRR-NH₂) 、 N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT)は、Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan)より購入した。3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate (CHAPSO)、EGTA、HEPES は Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)より購入した。KCl、リン脂質測定キットは和光純薬工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。Complete Mini (Complete protease inhibitor) は Roche Applied Science (Basel, Schweiz) より購入した。Anti-presenilin1 antibody (APS11)は abcam より、Mouse Isotype control IgG1κ antibody は eBioscience (San Diego, CA, U.S.A.) より、Anti-mouse IgG Alexa 488 F(ab')₂ Fragment は invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)より購入した。

2) 機器

ダウンス型ホモジナイザーは Kimble-Chase Kontes Tube (Fisher scientific)を使用し、Tight pestle を用いた。超遠心機は、Optima XL-90 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, U.S.A.)を使用し、スイング型ロータ SW41Ti を用いた。超高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は Alliance system (Waters, Milford, MA, USA)を用いた。

その他の材料、機器は第 1 章、第 2 章と同様のものを用いた。

3-2-2 細胞培養

本章ではヒト肺がん細胞である A549 細胞、ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞、ヒト乳がん細胞である MCF-7 細胞、ヒト血管内皮細胞 HuEhT-2 細胞を用いて実験を行った。培地は、A549 細胞は DMEM、HeLa 細胞、MCF-7 細胞は MEM、HUEhT-2 細胞は MCDB131 を用いた。HUEhT-2 細胞の培養には、collagen type I coated dish を使用した。MCDB131 の調製方法は以下に示した。

【MCDB131】

Endothelial cell growth supplement (ECGS) (100 mg/vial)を 20 mL の MCDB131 で溶解し (5 mg/mL)、分注して-20℃で保存した。L-glutamine を 250 mM となるようにミリ Q に溶解し、0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌した。ヘパリンナトリウムを 2.5 mg/mL となるようにミリ Q で溶解し、0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌した。MCDB131 (液体培地) 500 mL (1 本) に、上記で調製した、5 mg/mL ECGS を 3 mL、250 mM L-glutamine を 20 mL、5mg/mL heparin sodium を 1 mL 添加した (MCDB131 (-): 10 mM L-glutamine、0.03 g/L ECGS、5 mg/L ヘパリンナトリウム)。さらに非働化 FBS を 50 mL 添加し (10 % FBS)、MCDB131 (+)とした。

その他、細胞の立ち上げ、継代、凍結方法は第 1 章と同様に行った。

3-2-3 細胞からの膜画分の抽出

細胞からの膜画分の抽出はこれまでに報告されている方法を応用した¹³³⁾。

1) 試薬調製

【Buffer A】

HEPES 2.39 g を適量のミリ Q に溶解し、pH 7.5 に調整した。KCl 1.86 g、EGTA 0.38 g を添加し、溶解し、ミリ Q で 500 mL にメスアップした。使用前に Complete Mini (protease inhibitor)を 1 錠/10 mL で添加した (終濃度: 20 mM HEPES pH 7.5、50 mM KCl、2 mM EGTA、protease inhibitor)。

【solubilization buffer】

HEPES 0.96 g を適量のミリ Q に溶解し、pH 7.0 に調整した。KCl 2.23 g、EGTA 0.15 g を添加して溶解し、ミリ Q で 200 mL にメスアップした。使用前に、この溶液 10 mL に CHAPSO 0.1 g、Complete Mini 1 錠を溶解した (終濃度: 20 mM HEPES pH 7.0、150 mM KCl、2 mM EGTA、1% (w/v) CHAPSO、protease inhibitor)。

2) 膜画分抽出

培養細胞 HeLa 細胞、A549 細胞、MCF-7 細胞、HUEhT-2 細胞 (約 1×10^8 cells) をトリプシン処理により回収し、PBS (-)で洗浄後、ペレットを液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。以降の操作は氷上で行った。あらかじめ氷冷した Buffer A 10mL で細胞ペレットを懸濁し、ダウンス型ホモジナイザーで Tight pestle を用いて 15 ストロークし、細胞をホモジナイズした。遠心分離し (800×g、4℃、10 分)、上清を回収し、同様に再度ホモジナイズした。遠心分離し (800×g、4℃、10 分)、上清を回収し、先ほどの回収上清と合わせた。その後、超遠心機 Optima XL-90 で遠心分離 (100,000×g、4℃、30 分) を行い、膜画分 (沈殿物) を得た。得られた膜画分を solubilization buffer で溶解し、プチローター(2210)で回転させながら 4℃、1 時間インキュベートし、可溶化した。可溶化した膜画分を超遠心機で遠心分離し (100,000×g、4℃、1 時間)、上清を回収して膜画分溶液とした。総タンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific)により測定した。

3-2-4 γ -セクレターゼ活性評価

γ -セクレターゼ活性を測定するために、蛍光基質ペプチドプローブ (8 μ M) に、3-2-3 で抽出した各細胞の膜画分溶液 (総タンパク質量として 15 μ g) を添加し、37°C で overnight した。その後、遠心分離 (16,100 \times g、15 分、4°C) を行い、上清の蛍光強度を Plate Infinite M200 (TECAN) を用いて測定した (Ex:355 nm, Em:440 nm)。

3-2-5 LMDP-lipo の調製

1) 試薬調製

【30 mM カルセイン溶液】

カルセインを 18.6 mg 秤量し、1N NaOH 約 100 μ L 程度で溶解した後、PBS (-) を加えて 1 mL にした。

2) リポソーム作製

脂質薄膜は 2-2-3 と同様の方法で作製した。EPC のみ、EPC/DOPE/DOTAP = 4/4/1 (mol/mol/mol)、EPC/DOPE/CHEMS = 4.5/4.5/2 (mol/mol/mol) の脂質組成で作製後、PBS (-) または 30 mM カルセインで水和し、バスタイプのソニケーターで超音波処理した (総脂質濃度 10 mM)。得られたリポソーム溶液に 1% となるように Triton X-100 を添加し、プチローターで回転させながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、1 mM LMDP をリポソームの脂質濃度の 3-5 mol% となるように添加し、室温でさらに 1 時間回転させながらインキュベートした。この混合溶液に、SM-2 Bio-beads を Beads/Triton X-100=30 (w/w) の比で添加し、室温で回転させながら 1 時間インキュベートすることで、界面活性剤を除去した。インキュベート後、遠心分離 (16,000 \times g、10 分) を行い、LMDP-lipo 溶液を得た。また、同様の方法で、LMDP を混合せずに作成したリポソームを Control-lipo とした。物性評価として粒子径及びゼータ電位は Zetasizer Nano で測定した。

カルセイン封入の LMDP-lipo の場合は、未封入のカルセインを除去するために、Sephadex G-50 を用いてゲル濾過を行い分離した。Sephadex G-50 は PBS(-) で平衡化して用いた。リポソーム画分を回収し、リン脂質濃度はリン脂質測定キット (Wako) を用いて測定した。測定方法は以下に示した。リン脂質標準液で検量線溶液 (0、75、150、300、596.1 mg/dL) を作成した。サンプル及び検量線溶液 10 μ L に発色試液を 600 μ L 添加し、37°C、5 分インキュベートした。PLATE Infinite M200 (TECAN) を用いて、吸収波長 600 nm (reference : 700 nm) で反応液の吸光度を測定した。

3-2-6 LMDP の γ -セクレターゼによる切断活性評価

LMDP の γ -セクレターゼによる切断を評価するため、まず、蛍光基質ペプチドプローブを用いて競合阻害実験を行った。A549 細胞の膜画分 (総タンパク質量 16.5 μ g) を 0.25% CHAPSO 条件下で 5 μ M の蛍光基質ペプチドプローブと LMDP 濃度として 0、10、50、100、150 μ M の LMDP または LMDP-lipo と混合し、37°C、overnight でインキュベートし、3-2-4 と同様の方法で基質ペ

プチドプローブの切断活性を評価した。

また、HPLC 解析でも LMDP の切断活性を評価した。A549 細胞の膜画分（総タンパク質量 16.5 μg ）と LMDP 濃度として 100 μM の LMDP または LMDP-lipo を混合し、0.25% CHAPSO 条件下で混合し、37°C、1 時間インキュベートした。その後、LMDP-lipo は 1% Triton X-100 で可溶化し、溶液に残っている LMDP を Alliance system (Waters, Milford, MA, USA) を使用して、HPLC により検出した。HPLC の条件は次に示した。カラムは SunFire C18 (5 μm , 4.6 \times 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) を使用した。移動相は、0.1% TFA 水溶液（移動相 A）/ 0.1% TFA アセトニトリル溶液（移動相 B）を用いた。80 % 移動相 A、20 % 移動相 B の組成から、20 分間で 10 % 移動相 A となる条件でグラジエント分析を行った。流速 0.3 mL/分で波長 220 nm で検出した。

3-2-7 カルセイン漏出試験

γ -セクレターゼ活性に依存して内封薬物が細胞内を放出可能であるか検討するため、カルセインを封入した Control-lipo、LMDP-lipo を用いて評価した。カルセインは高濃度で消光するため、リポソームにから放出されると蛍光強度は増大する。カルセイン封入 Control-lipo 及び LMDP-lipo と A549 細胞の膜画分は lipid/protein = 2.0 (w/w) となるように、また、PBS (-) (0 % コントロール)、1% Triton X-100 (100 % コントロール) は膜画分と同量加えた。その後、37°C、1 時間インキュベートし、各サンプルのカルセインの蛍光強度を PLATE Infinite M200 (TECAN) で測定した (Ex : 490 nm, Em : 515 nm)。また、 γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT (10 μM) を A549 細胞の膜画分に添加し、37°C、30 分プレインキュベート後、上記と同様に各サンプルを添加した。得られた蛍光強度からカルセインの漏出率を以下の式より算出した。

$$\text{Calcein Release (\%)} = \left[\frac{(F - F_0)}{(F_{100} - F_0)} \right] \times 100$$

F : 膜画分での蛍光強度
F₀ : PBS(-)での蛍光強度
F₁₀₀ : 1% Triton X-100 での蛍光強度

3-2-8 CLSM による細胞内薬物放出観察

96 well imaging plates (BD Falcon) を 0.002 % PLL でコートし、A549 細胞を 1 \times 10⁴ cells/well で播種した。37°C、5 % CO₂、24 時間インキュベート後、PBS (-) で洗浄した。培地を DMEM (-) 100 μL に交換後、0.2 mol% CM-DiI で脂質膜を蛍光ラベル化し、30 mM カルセインを封入した Control-lipo、LMDP-lipo を総脂質濃度として 50 μg で添加し、37°C、5% CO₂、1 時間インキュベート後、CM-DiI、カルセインの蛍光を CLSM により観察した。観察には、LSM 510 META (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany) を使用し、油浸 63 倍対物レンズ (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC) で、Multi track (FITC/Cy3) を用い、ヘリウムネオンレーザー (543 nm)、アルゴンレーザー (488 nm) で励起した。

γ -セクレターゼの阻害、エンドサイトーシスの各経路阻害条件下での観察は、以下の操作を加えた。50 μM DAPT (γ -セクレターゼ阻害剤)、0.4 M sucrose (クラスリン介在性エンドサイトーシ

ス阻害剤) の DMEM (-) 溶液を 100 μ L/well で添加し、37°C、30 分、2.5 mM amiloride (マクロピノサイトーシス阻害剤) の DMEM (-) 溶液を 100 μ L/well で添加し、37°C、10 分、5 μ g/mL FilipinIII の DMEM (-) 溶液を 37°C、1 時間プレインキュベートした。その後、上記と同様にリポソームを添加し、CLSM 観察を行った。

3-2-9 Time-lapse imaging

0.002%PLL でコートした 35 mm ガラスボトム dish (IWAKI) に A549 細胞を 2×10^5 cells/dish で播種し、37°C、5 % CO₂、24 時間インキュベートした。PBS (-) で洗浄後、DMEM (-) 1mL に培地交換し、LMDP-lipo を総脂質濃度 150 μ g となるように添加し、4°C、10 分インキュベートした。その後、PBS (-) で 3 回洗浄し、細胞と結合していない LMDP-lipo を除去し、DMEM (+) 1mL に培地を交換し、Time-lapse imaging を CLSM により行った。観察には、Nikon A1 CLSM (Nikon Instruments Inc., Melville, USA) を使用し、油浸 63 倍対物レンズ (Plan Apo VC 60X 1.4 N.A.) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件を維持しながら撮影した。カルセイン (Ex:490 nm, Em: 515 nm) 及び DiI (Ex:549nm, Em:565 nm) は、それぞれ 488 nm、561 nm のレーザーで励起した。Time-lapse imaging は 30 秒ごとに 30 分間で画像を取得した。3 dots/cell で 5 細胞でのカルセイン及び DiI の蛍光強度を解析ソフト NIS-Elements software (Nikon Instruments Inc., Melville, USA) を用いて解析した。

3-2-10 FACS による presenilin-1 の発現評価

A549 細胞、MCF-7 細胞、HeLa 細胞、HUEhT-2 細胞をそれぞれ 1×10^6 cells 回収し、1 mL の FACS buffer で 2 回洗浄する。遠心分離 (1500 rpm、5 分) を行い、上清除去後、80% メタノール 100 μ L で懸濁し、室温で 5 分インキュベートして固定処理を行った。その後、遠心分離し (1500 rpm、5 分)、上清除去し、FACS buffer で洗浄した。ブロッキング溶液として PBS (-) /10% FBS/0.3M glycine を 100 μ L 添加し、室温で 30 分インキュベートした。 1×10^6 cells/1 mL ブロッキング溶液となるように調製し、96 well 丸底プレートに 150 μ L/well で移した (1.5×10^5 cells/well)。Anti-presenilin1 antibody (一次抗体)、コントロールとして mouse Isotype control IgG1 κ 抗体を 0.1mg/mL にブロッキング溶液で希釈し、1.5 μ L/well で添加し、懸濁した (1 μ g/ 1×10^6 cells)。22°C、30 分インキュベート後、FACS buffer で 5 分、3 回洗浄した。Anti-mouse IgG Alexa 488 F(ab')₂ fragment (二次抗体) (2 mg/mL) をブロッキング溶液で 2000 倍希釈し、100 μ L/well で添加し、22°C、30 分インキュベートした。その後、FACS buffer で 5 分、3 回洗浄後、FACS buffer 500 μ L に懸濁し、FACS 解析を行った。Alexa 488 は FL-1 で検出した。

3-3 実験結果

3-3-1 LMDP-lipo の細胞内薬物放出システム

リポソームががん細胞内に取り込まれると同時にリポソーム膜の不安定化を介して、効率的に細胞質へ薬物を放出することが可能な薬物キャリアを開発するために、細胞膜プロテアーゼの γ -セクレターゼの基質ペプチドをリポソーム膜に組み込むことを考案した。 γ -セクレターゼはアスパラギン酸プロテアーゼで、細胞膜内の疎水性環境下で基質部位を加水分解するタンパク質である。これは、 γ -セクレターゼの活性中心を presenilin-1 が担い、活性化状態では脂質膜内の疎水的な環境で周囲に親水性のポアを形成することにより、基質が加水分解されることで切断される^{132,134}。そこで、リポソーム膜を乱すには、この膜内で切断活性を示す特徴が利用できるのではないかと考えた。その基質ペプチドとして、 γ -セクレターゼの基質となる Notch の膜貫通部位の疎水性部位と細胞内部位の親水性部位のアミノ酸 29 残基の配列を用いて、liposomal membrane disturbance peptide (LMDP) とした。LMDP をタンパク質の二次構造予測ソフト SOSUI¹³⁵ により予測したところ、N 末側の 23 残基はヘリックス構造をとることで膜を貫通し、C 末側の 6 残基は親水性が高いために、脂質膜外に位置する結果となった (図 3-2a)。したがって、LMDP はリポソームの脂質 2 重膜を貫通するようにリポソーム膜に存在することが示唆された (図 3-2b)。

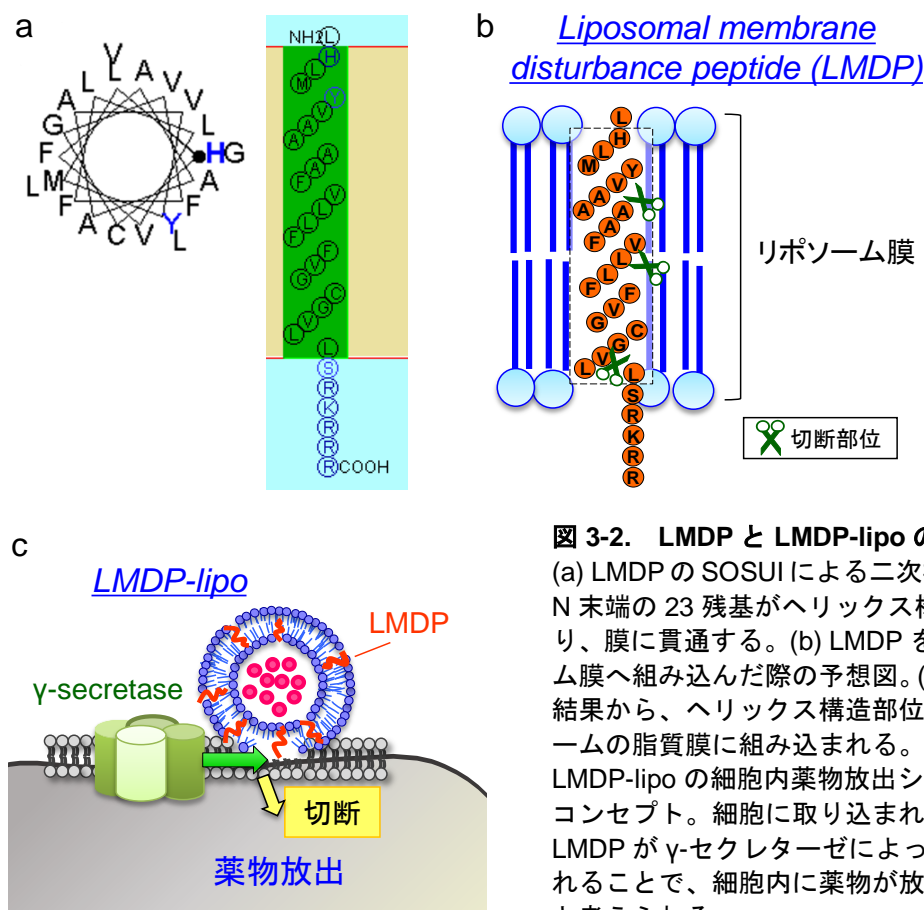


図 3-2. LMDP と LMDP-lipo の概要

(a) LMDP の SOSUI による二次構造予測。N 末端の 23 残基がヘリックス構造となり、膜に貫通する。(b) LMDP をリポソーム膜へ組み込んだ際の予想図。(a) の予測結果から、ヘリックス構造部位がリポソームの脂質膜に組み込まれる。(c) LMDP-lipo の細胞内薬物放出システムのコンセプト。細胞に取り込まれる時に LMDP が γ -セクレターゼによって切断されることで、細胞内に薬物が放出されると考えられる。

また、LMDP は γ -セクレターゼによって 3 か所切断されることが報告されており¹³²⁾、この LMDP を組み込んだリポソーム (LMDP-lipo) は、細胞膜との膜融合を引き金として、LMDP が細胞膜の γ -セクレターゼによって切断されることで脂質二重膜の不安定化が誘起され、内封薬物が細胞内に放出すると考えられる (図 3-2c)。

3-3-2 LMDP の γ -セクレターゼによる切断評価

LMDP が γ -セクレターゼによって切断されることを確認するために、 γ -セクレターゼ活性が高いことが報告されている培養ヒトがん細胞の MCF-7 (乳がん細胞)¹³⁶⁾、HeLa (子宮頸がん細胞)¹³⁷⁾ 及び A549 (肺胞上皮腺がん)¹³⁸⁾、その対照として、正常細胞であるヒト血管内皮細胞の HUEhT-2 について、これらの細胞の膜画分における γ -セクレターゼ活性を、蛍光基質ペプチドプローブを用いて評価した。使用した蛍光基質ペプチドプローブは、 γ -セクレターゼの基質配列を含むペプチドの N 末端に蛍光基 (Nma)、切断部位を挟んで消光基 (Dnp) が導入されている、fluorescence resonance energy transfer (FRET) を利用した消光性蛍光基質である (図 3-3a)。 γ -セクレターゼにより切断されると FRET 解消により蛍光を発するため、 γ -セクレターゼ活性を評価することができる¹³³⁾。その結果、ヒト正常細胞の HUEhT-2 細胞に比べ、HeLa 細胞ではあまり差は認められなかったが、MCF-7、A549 細胞で有意に高い γ -セクレターゼ活性が認められた (図 3-3b)。また、セクレターゼの活性中心となるタンパク質である presenilin-1 の発現を FACS により評価した結果、いずれの細胞においても同程度の presenilin-1 の発現が認められた (図 3-3c)。

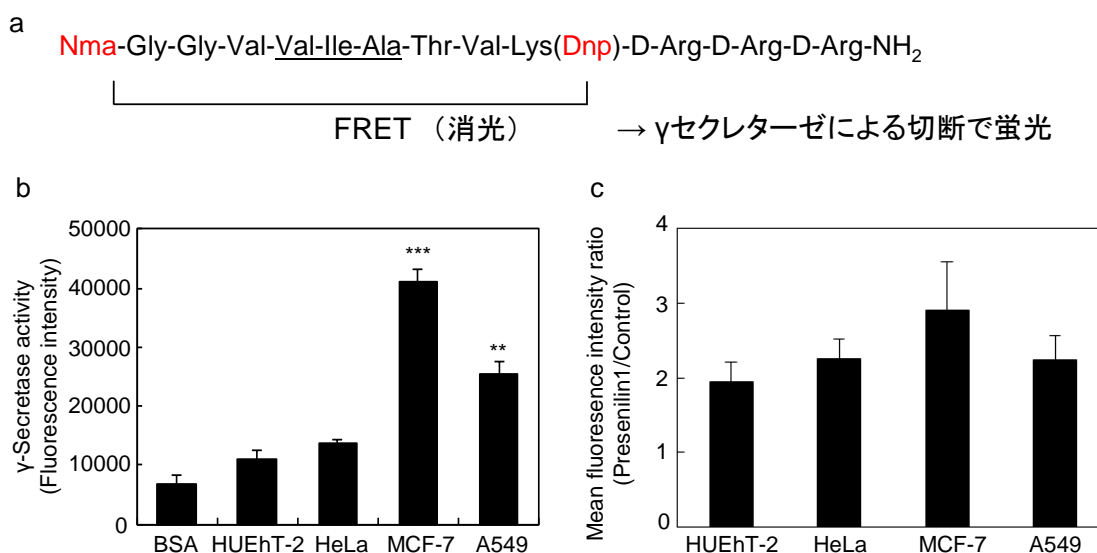


図 3-3. 細胞の γ -セクレターゼ活性

(a) 蛍光基質プローブ配列。蛍光基 (Nma) は消光基 (Dnp) との FRET が γ -セクレターゼによる切断で解消し蛍光が回復する。下線部が切断部位。(b) 細胞の γ -セクレターゼ活性。蛍光基質ペプチドプローブと図示の各細胞の膜画分と LMDP を混合し、37°C で overnight 後、ペプチドの蛍光強度を測定した (Ex:355 nm Em:440 nm)。データは mean \pm S.D. として示した。(**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, $n = 3$) (c) Presenilin-1 の発現。図示の細胞を固定、透過後、presenilin-1 及び control 抗体で処理し、さらに二次抗体 (anti-mouse IgG Alexa488 F(ab')₂ fragment) で処理し、FACS 解析を行った。データは control に対する presenilin-1 の蛍光強度の比として表し、mean \pm S.D. で示した。(n=3)

各細胞膜画分の γ -セクレターゼの比活性 (γ -セクレターゼ活性/presenilin-1 発現) を算出した結果、他の細胞株に比べて、MCF-7 及び A549 細胞では、ほぼ同程度の高い比活性を有することが示された。また、A549 細胞は MCF-7 細胞に比べて細胞質面積が広く、細胞内放出を評価しやすいことから、本研究では LMDP-lipo の薬物放出能を評価するために、A549 細胞を用いた。

まず、LMDP と γ -セクレターゼとの相互作用を評価するために、 γ -セクレターゼを含む A549 細胞の膜画分を用いて蛍光基質ペプチドプローブの切断に対する LMDP の競合阻害を評価した。A549 細胞の。LMDP が γ -セクレターゼと相互作用している場合は、基質ペプチドの切断が競合的に阻害され、 γ -セクレターゼ活性が抑制されると予想される (図 3-4a)。その結果、蛍光基質プローブの切断を介した蛍光強度の増大は、LMDP の濃度依存的に有意に減少した (IC_{50} ; 29 μ M)。この結果は、LMDP が γ -セクレターゼと相互作用することを示しており、LMDP が γ -セクレターゼの基質となり得ることが示唆された (図 3-4b)。さらに、LMDP と同程度のアミノ酸残基数のペプチド (30 残基) を用いて同様の検討をした場合には、蛍光強度に有意な減少は認められなかったことから、LMDP の配列特異的に γ -セクレターゼによって認識されていることが示唆された (図 3-4c)。

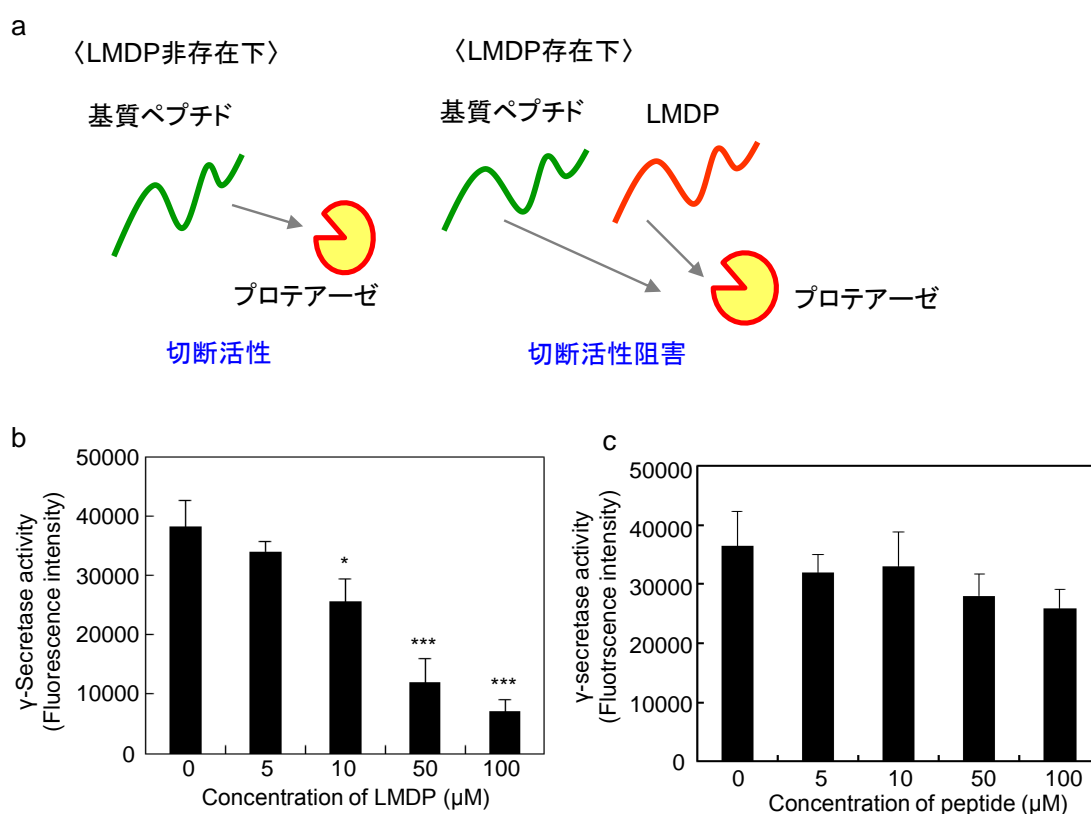


図 3-4. LMDP と γ -セクレターゼの相互作用

(a) 基質ペプチドを利用した競合阻害による LMDP と γ -セクレターゼの相互作用の評価。LMDP が γ -セクレターゼと相互作用している場合、競合的に基質ペプチドの切断が阻害されると考えられる。(b) LMDP 存在下での γ -セクレターゼ活性。図示の濃度で LMDP を添加した場合の基質ペプチドの切断による γ -セクレターゼ活性をペプチドの蛍光強度測定により評価した (Ex:355 nm, Em:440 nm)。データは mean \pm S.D.として示した。(*, $P<0.05$, ***, $P<0.001$, $n=3$) (c) γ -セクレターゼの基質とならないペプチド (30 残基) を用いて (b) と同様に蛍光強度により評価した。(n=3)

そこで、 γ -セクレターゼによる LMDP の切断を HPLC 解析により評価した。その結果、 γ -セクレターゼ活性の高い A549 細胞の膜画分存在下で LMDP のピーク面積が約 23 % 減少したことから、LMDP が切断されていることが確認できた (表 3-1)。また、その代表的なクロマトグラムを図 3-5 に示した。以上の結果より、合成した LMDP は、 γ -セクレターゼ活性の高い A549 細胞の膜画分により切断されることが示された。

表 3-1. HPLC 解析による LMDP の切断評価

Sample	peak area ($\mu\text{V}/\text{sec}$)	cleavage efficiency (%)
LMDP	142557 \pm 23868	-
LMDP+ membrane fraction	108204 \pm 32792	22.6 \pm 10.5

データは mean \pm S.D.として示した。(n=3)

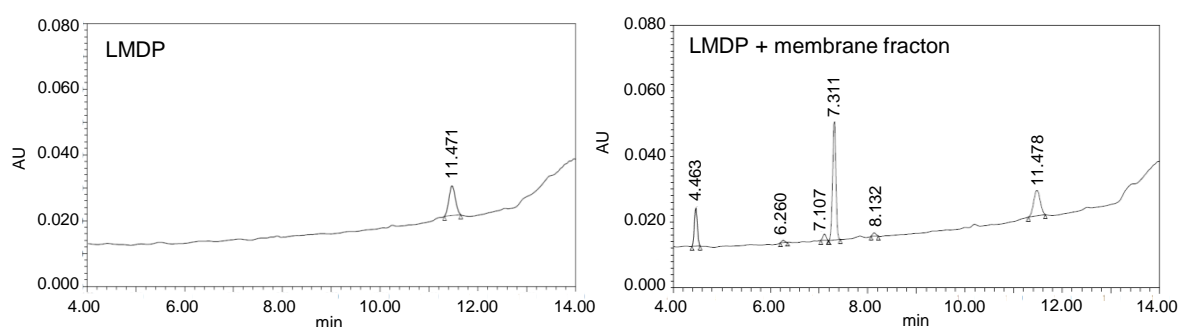


図 3-5. HPLC 解析のクロマトグラム

表 3-1 の HPLC 解析における LMDP 及び LMDP と膜画分を混合した場合の代表的なクロマトグラムの図。保持時間 11.5 分付近のピークが LMDP を示す。

3-3-3 LMDP-lipo の構築

LMDP を脂質膜に組み込んだリポソームは、界面活性剤 (1% Triton X-100) で可溶化した LMDP を、リン脂質と混合後、界面活性剤除去法により調製した。それに、モデル薬物としてカルセインを内封し、 γ -セクレターゼ活性を有する A549 細胞の膜画分存在下でのカルセインの漏出について検討した。その結果、egg phosphatidylcholine (EPC) からなるリポソームに LMDP を組み込んだ場合、LMDP を含まない Control-lipo に比べて、内封カルセインの漏出率にほとんど差は認められなかった (図 3-6)。そこで、リポソームの脂質組成の最適化する必要があると考えた。 γ -セクレターゼは、細胞膜内で基質タンパク質の膜貫通ドメインを切断するため、安定なラメラ構造を形成する EPC 単独から構成されるリポソーム中の LMDP は、細胞膜内の γ -セクレターゼと接触しにくいと考えられる。そこで、リポソームに膜融合能を付与することで、細胞膜との融合を介

して膜に存在する γ -セクレターゼがリポソーム膜に組み込んだ LMDP と接触し、切断活性を示すことができるのではないかと考えた。そこで、脂質組成として膜融合脂質である L-dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) を混合した。さらに、リポソームの表面電荷の影響を検討するため、EPC/DOPE に 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) または cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) を混合することで正電荷、負電荷の膜融合性リポソームを作製し、各々に LMDP を組み込んだ。その結果、負電荷を有する EPC/DOPE/CHEMS リポソームにおいて、LMDP を組み込んだ場合に、膜画分存在下において内封カルセインの漏出が約 3 倍促進された (図 3-6)。一方、カチオン性脂質の DOTAP を混合した EPC/DOPE/DOTAP リポソームにおいては、LMDP を組み込んだ場合でもカルセイン漏出の促進は認められなかった (図 3-6)。各組成でのリポソームの物性は表 3-2 に示したとおりであり、いずれのリポソームの粒子径は 100 nm~200 nm 付近であった。以上の結果より、EPC に DOPE と CHEMS を加えた脂質組成が LMDP の機能性を発揮するために適していると考えられ、この組成に LMDP を組み込んだリポソームを LMDP-lipo とした。

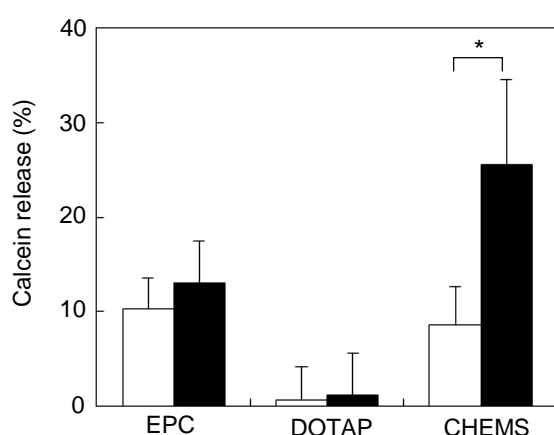


図 3-6. LMDP-lipo の脂質組成の検討

リポソームの脂質組成として EPC、EPC/DOPE/DOTAP (DOTAP)、EPC/DOPE/CHEMS (CHEMS) に LMDP を組み込み、内水層にカルセインを封入し、A549 細胞の膜画分とインキュベート後、カルセインの蛍光強度を測定した (Ex:490 nm, Em:520 nm)。漏出率は、Triton X-100 でリポソームを崩壊させた場合の蛍光強度を 100% とし、その割合で表した。データは mean \pm S.D. として示した。(*, $P < 0.05$, $n = 3$)

表 3-2. 様々な脂質組成の LMDP-lipo の物性

Lipid composition		Size (nm)	Z-potential (mV)	Pdl
EPC	Control	197 \pm 30	0.83 \pm 3.0	0.23 \pm 0.03
	LMDP	171 \pm 67	-1.1 \pm 2.8	0.26 \pm 0.13
EPC/DOPE/DOTAP	Control	148 \pm 52	12.6 \pm 4.3	0.27 \pm 0.09
	LMDP	112 \pm 19	7.5 \pm 0.7	0.25 \pm 0.16
EPC/DOPE/CHEMS	Control	126 \pm 12	-14.4 \pm 5.2	0.14 \pm 0.02
	LMDP	133 \pm 20	-9.0 \pm 3.8	0.21 \pm 0.07

データは mean \pm S.D. として示した。($n = 3$)

3-3-4 LMDP-lipo に組み込んだ LMDP の切断評価

LMDP-lipo の薬物放出メカニズムを検討するため、まず、LMDP をリポソームに組み込んだ場合でも、LMDP が γ -セクレターゼと相互作用し、切断されるのかを評価した。図 3-4 と同様に、LMDP-lipo の γ -セクレターゼによる蛍光基質プロブの切断に対する競合阻害を評価した（図 3-7a）。その結果、 γ -セクレターゼを含む膜画分に LMDP-lipo を添加した場合にも、蛍光ペプチドプロブの切断は有意に阻害された（図 3-7b）。この阻害活性は、LMDP 単独に比べて低かったが（ IC_{50} ; 81 μ M）、リポソーム膜中の LMDP は γ -セクレターゼに対して、蛍光プロブと競合的に相互作用しており、 γ -セクレターゼの基質となり得ることが示唆された。

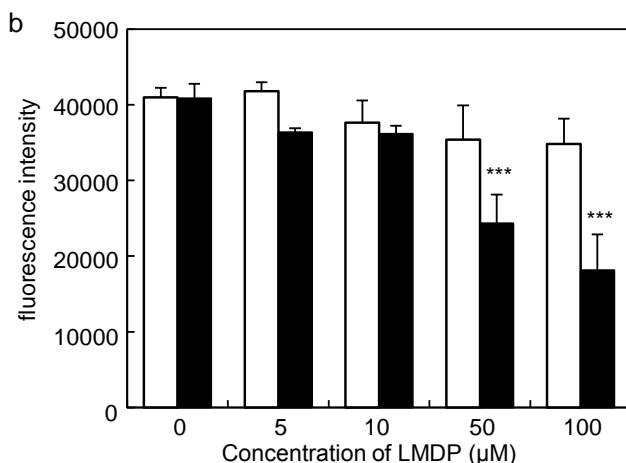
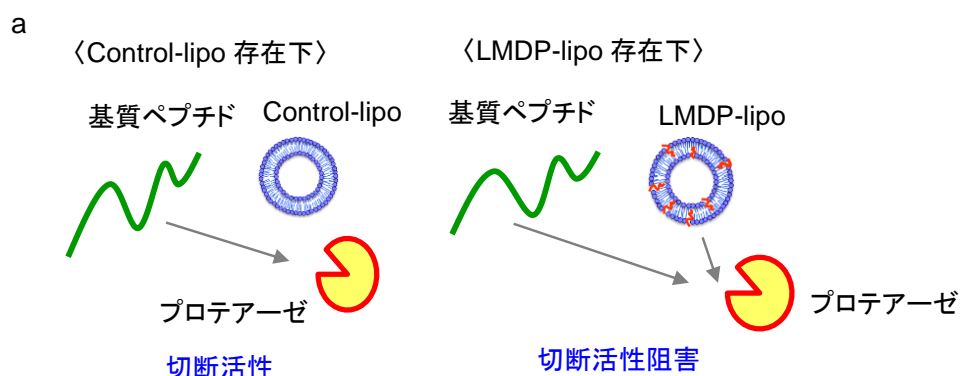


図 3-7. LMDP-lipo と γ -セクレターゼの相互作用

(a) 基質ペプチドを利用した競合阻害による LMDP-lipo と γ -セクレターゼの相互作用の評価。(b) LMDP-lipo または Control-lipo 存在下での γ -セクレターゼ活性。図示の濃度でリポソームを添加した場合の基質ペプチドの切断による γ -セクレターゼ活性をペプチドの蛍光強度測定により評価した (Ex:355 nm Em:440 nm)。データは mean \pm S.D.として示した。(***, $P < 0.001$, $n=3$) 白棒 : Control-lipo 黒棒 : LMDP-lipo

そこで、LMDP-lipo の γ -セクレターゼ含有膜画分存在下での LMDP の切断活性を HPLC により評価した。その結果、リポソーム中の LMDP のピーク面積は、約 37 %減少し、 γ -セクレターゼを含む膜画分共存下で切断されることが示された（表 3-3）。また、その代表的なクロマトグラムを図 3-8 に示した。

また、LMDP はリポソームの総脂質に対して、3-5 mol% で添加して調製しているが、界面活性剤除去の際に過剰量は除かれ、全量組み込まれてはいないと考えられる。そこで、表 3-1、3-2 の HPLC 解析から、LMDP のみのピーク面積から LMDP-lipo のピーク面積の割合を算出した結果、LMDP-lipo の場合は、総脂質量に対して 2.3 ± 0.2 mol% の LMDP が組み込まれていることが示唆された。

表 3-3. LMDP-lipo の HPLC 解析による LMDP の切断活性

Sample	peak area ($\mu\text{V}/\text{sec}$)	cleavage efficiency (%)
LMDP-liposome	110608 ± 38188	-
LMDP-liposome + membrane fraction	67823 ± 20184	36.8 ± 7.0

データは mean \pm S.D.として示した。

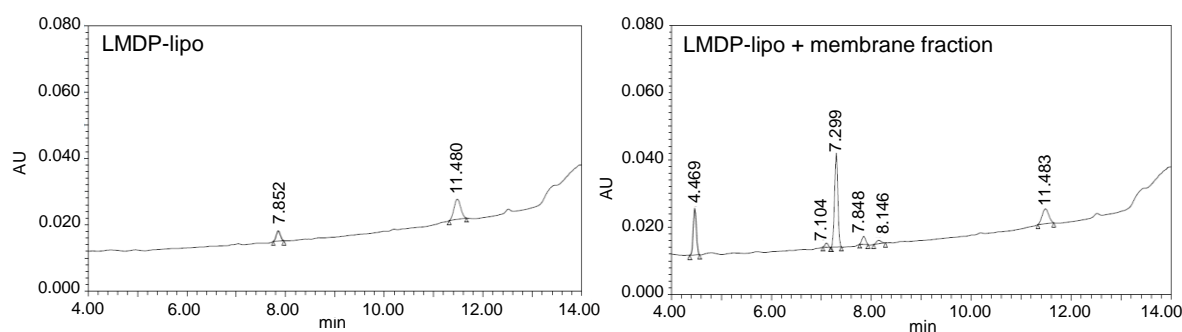


図 3-8. HPLC 解析のクロマトグラム

表 3-3 の HPLC 解析における LMDP-lipo 及び膜画分存在下での LMDP-lipo の代表的なクロマトグラムの図。保持時間 11.5 分付近のピークが LMDP を示す。

3-3-5 LMDP-lipo の γ -セクレターゼ存在下での粒子径変化

次に、LMDP-lipo の γ -セクレターゼを含む膜画分存在下での粒子径変化を評価した。さらに、 γ -セクレターゼ阻害剤である N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) (図 3-9a) の存在下での粒子径変化への影響も評価した。DAPT の γ -セクレターゼ活性の阻害効果は図 3-3a の基質ペプチドプローブを用いた方法において、DAPT の添加により γ -セクレターゼ活性が約 60%抑制されることを確認した (図 3-9b)。

図 3-10a に示すように、LMDP-lipo の粒子径は膜画分の存在下で control-lipo に比べて、粒子径の分布がブロードであった。これは、 γ -セクレターゼ阻害剤の DAPT で処理することで抑制された (図 3-10a)。また、分散性の指標である polydispersity index (PDI) は、LMDP-lipo のみに比べ、膜画分存在下で有意に増大し、この増大は DAPT の処理で抑制された (図 3-10b)。さらに、膜画分の有無でリポソームの主要ピークの存在率を比較した。その結果、LMDP-lipo のみでの主要ピークの存在率は、膜画分存在下で有意な減少が認められた(図 3-10c)。これらの変化は DAPT 共存下では抑制され、さらに Control-lipo では認められなかった。以上の結果から、LMDP が γ -セクレターゼによって切断された結果、リポソーム膜の不安定化が誘起されたことにより、粒子径が変化し、粒度分布が乱れたと考えられた。

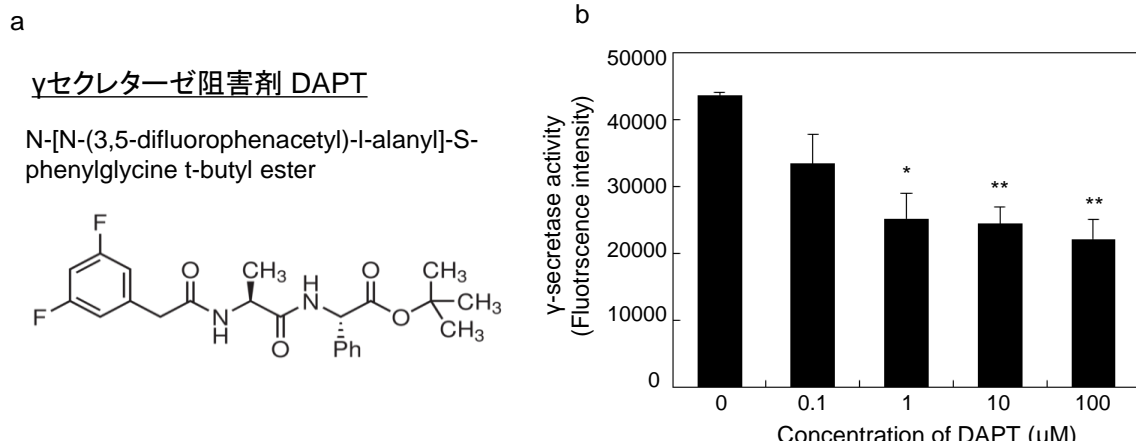


図 3-9. γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT の阻害効果

(a) DAPT の構造式。(b) A549 細胞の膜画分と DAPT を図示の濃度で 37°C、30 分プレインキュベート後、蛍光基質ペプチドプローブと 37°C、overnight でインキュベートし、ペプチドの蛍光強度測定により評価した。データは mean \pm S.D.として示した。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ versus 0 μ M DAPT, $n=3$)

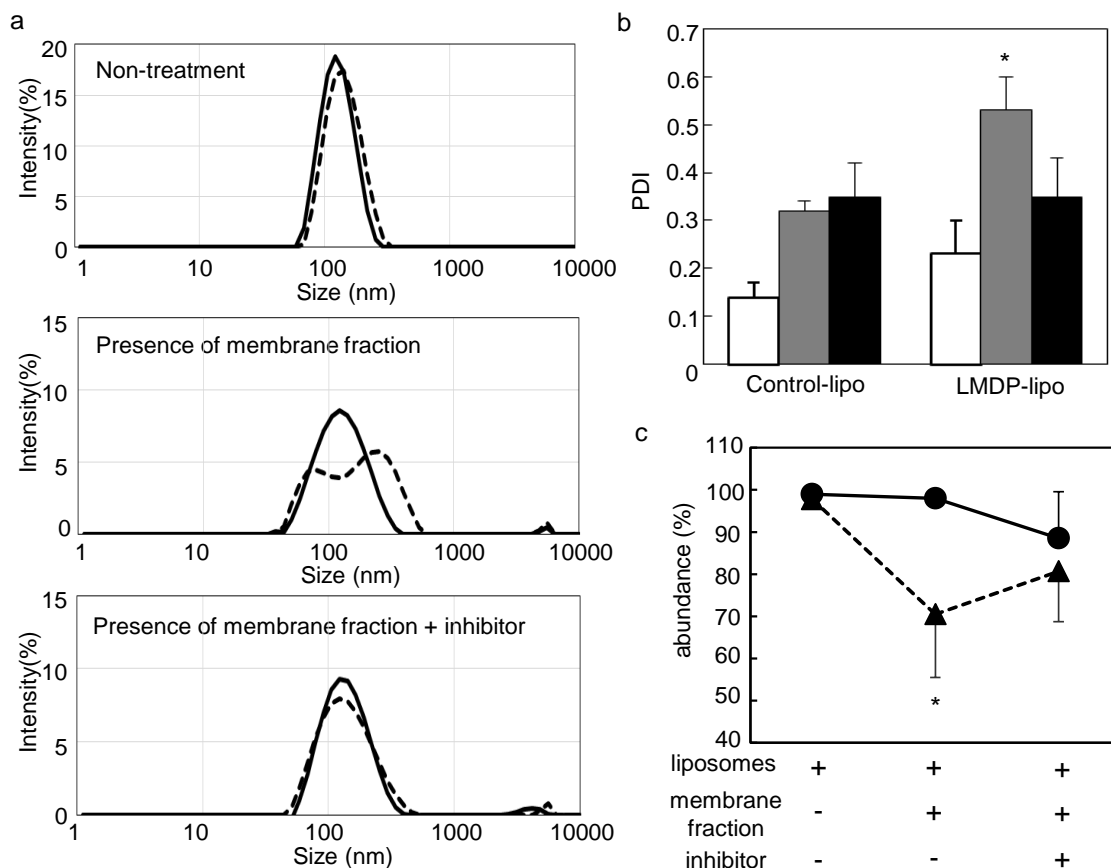


図 3-10. LMDP-lipo のプロテアーゼ存在下での粒子径変化

(a) 粒子径分布。Control-lipo (実線) 及び LMDP-lipo (点線) を未処理 (上図)、A549 細胞膜画分存在下 (中図)、膜画分+阻害剤 DAPT 存在下 (下図) でそれぞれ動的光散乱法により測定した。(b) (a) における PDI。白棒: 未処理、灰色棒: 膜画分存在下、黒棒: 膜画分+阻害剤 DAPT (c) (a) における主ピークの存在率 (%)。黒丸/実線: Control-lipo、黒三角/点線: LMDP-lipo (a) は代表的な図、(b) 及び (c) は mean \pm S.D.として示した。(*, $P < 0.05$ versus notreatment, $n=3$)

3-3-6 LMDP-lipo の γ -セクレターゼ特異的な薬物放出

カルセインを内封した LMDP-lipo と HUEhT-2 細胞、A549 細胞、HeLa 細胞、MCF-7 細胞から単離した各々の膜画分を混合することで、 γ -セクレターゼ活性に依存した薬物放出を検討した。図 3-3 で示した各細胞の γ -セクレターゼ活性と比較すると、 γ -セクレターゼ活性の高い A549 細胞、MCF-7 細胞の膜画分とカルセイン内封 LMDP-lipo を混合した場合、Control-lipo に比べて、カルセイン漏出が促進された。このカルセイン漏出の促進は、 γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT の処理で有意に抑制された (図 3-11)。一方、 γ -セクレターゼ活性の低い正常細胞の HUEhT-2 細胞及び HeLa 細胞の膜画分ではカルセインの有意な漏出促進は認められなかった (図 3-11)。これらの結果より、LMDP-lipo は、がん細胞で高い活性を有する γ -セクレターゼ特異的に内封薬物を放出可能であることが示唆された。

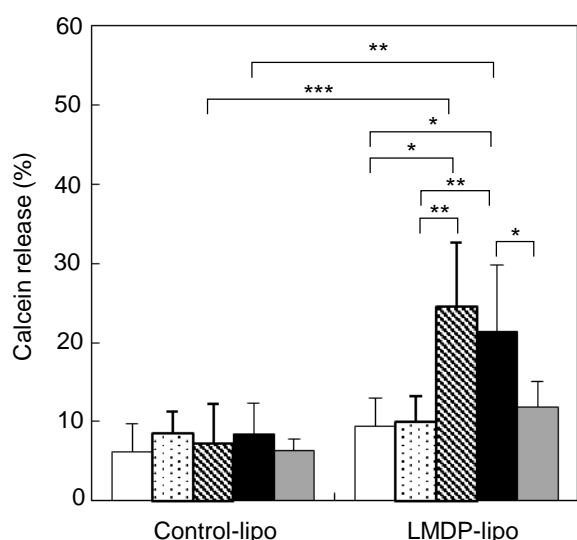


図 3-11. LMDP-lipo のカルセイン漏出
カルセインを封入した Control-lipo または LMDP-lipo と HUEhT-2 細胞 (白棒)、HeLa 細胞 (点棒)、MCF-7 (斜線棒)、A549 細胞 (黒棒) の膜画分及び DAPT (10 μ M) で処理した A549 細胞の膜画分 (灰色棒) をそれぞれ混合し、37°C、1 時間インキュベート後、カルセインの蛍光測定により漏出率を算出した。データは mean \pm S.D.として示した。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, $n = 3-7$)

3-3-7 LMDP-lipo の細胞内薬物放出

LMDP-lipo は細胞膜画分中の γ -セクレターゼに応答して内封薬物の放出が可能であることが示されたので、次に培養細胞を用いて LMDP-lipo からの薬物放出について評価した。 γ -セクレターゼ活性の高い A549 細胞を用いて、LMDP-lipo の脂質膜を CM-DiI で蛍光ラベル化し、その内水相にカルセインを封入した二重ラベル化体を調製し、LMDP-lipo の細胞内におけるカルセイン放出を CLSM 観察により評価した (図 3-12)。その結果、Control-lipo に比べて、LMDP-lipo では緑で示すカルセインの細胞内への拡散が認められた。さらに、Control-lipo では、細胞内にリポソームと内封カルセインの共局在を示す黄色のドットが多く認められたのに対し、赤のドットの LMDP-lipo は、細胞膜に多く局在し、緑のカルセインとの共局在が減少していた (図 3-13a,b)。さらに、LMDP-lipo からのカルセイン放出は、 γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT 処理により抑制された (図 3-13c)。したがって、LMDP-lipo は培養細胞においても、 γ -セクレターゼに応答して、内封カルセインを放出することが示唆された。

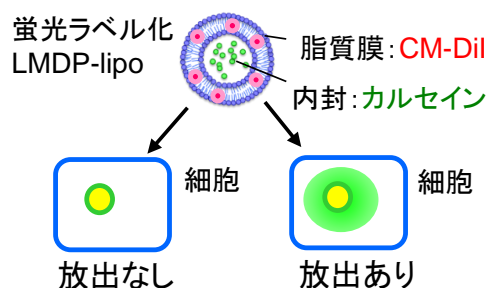


図 3-12. LMDP-lipo の細胞内カルセイン漏出
脂質膜を CM-Dil でラベル化し、カルセインを内封したリポソームを用いることで、リポソーム（脂質膜）の局在と内封薬物の挙動が観察できると考えられる。

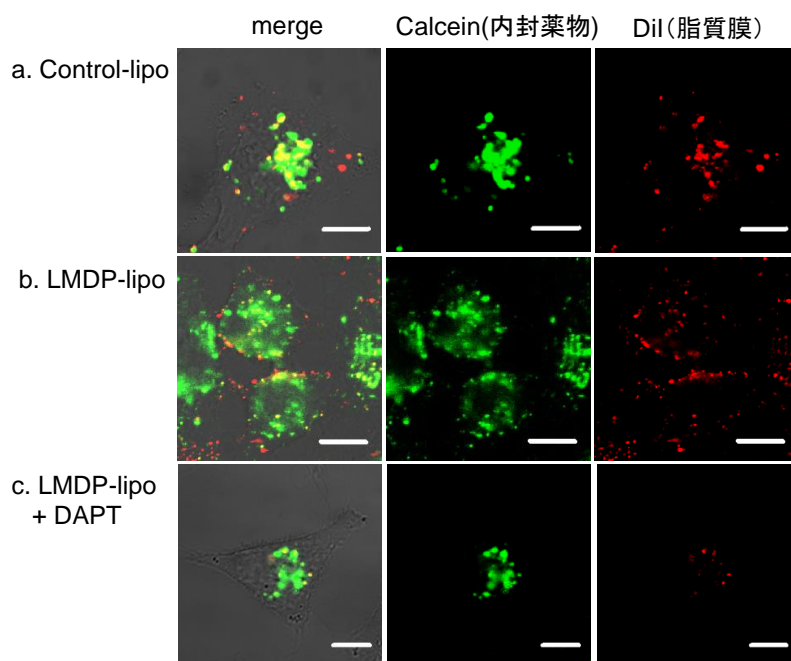


図 3-13. LMDP-lipo の培養細胞における内封薬物放出
脂質膜を Dil でラベル化し、カルセインを内封した Control-lipo (a)、LMDP-lipo (b)、50 μ M DAPT 存在下での LMDP-lipo (c) を A549 細胞に添加し、37°C、1 時間インキュベート後、CLSM 観察により評価した。赤：Dil（脂質膜）、緑：カルセイン（内封物）、Bar：10 μ m

また、 γ -セクレターゼは細胞形質膜だけでなく、エンドソーム膜にも存在しており¹³⁹⁾、さらに、脂質組成にはエンドソーム内低 pH 環境で膜融合活性を有する DOPE 及び CHEMS¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾ を含有していることから、LMDP-lipo はエンドソーム膜との膜融合を介して、内封カルセインを細胞内に放出している可能性が懸念された。そこで、エンドサイトーシス阻害剤を用いて、同様の評価を行った。リポソームのようなナノ粒子は一般的にエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれるが、その中でも主要な経路として、クラスリン介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシスの 3 経路に大別される（図 3-14a）^{100,101)}。クラスリン介在性エンドサイトーシスが最も典型的な経路として知られているが、粒子サイズや表面修飾、細胞膜との相互作用等により、他の経路を介する可能性も十分考えられる。そこで、sucrose（クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤）、amiloride（マクロピノサイトーシス阻害剤）、filipinIII（カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤）を用いて、これらのエンドサイトーシス経路による LMDP-lipo の細胞内取り込みを抑制した条件下での薬物放出を評価した（図 3-14b）。その結果、いずれの阻害剤で処理した場合でも、LMDP-lipo から内封カルセインの細胞内への放出は抑制されなかった（図 3-15a,b,c）。したがって、LMDP-lipo は細胞形質膜の γ -セクレターゼによって LMDP が切断されることで、細胞内にカルセインを放出することが示唆された。

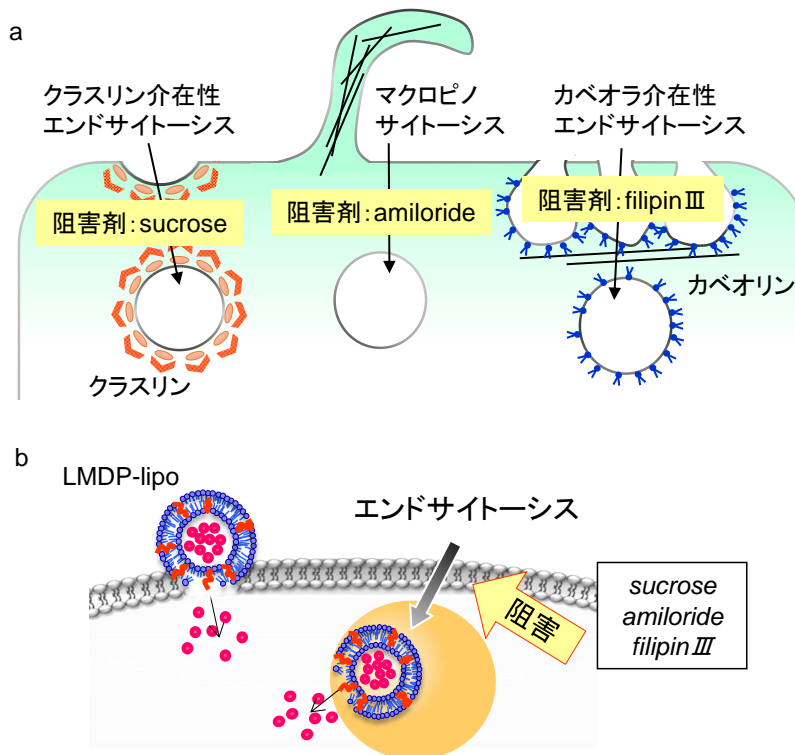


図 3-14. エンドサイトーシス経路とその阻害

(a) エンドサイトーシスの主要な 3 経路とその阻害剤。クラスリン介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシス経路があり、それらの阻害剤として、それぞれ sucrose、amiloride、filipin III がある。(b) LMDP-lipo が細胞の形質膜上で放出可能であることを、(a) の各経路阻害剤存在下で検討する。

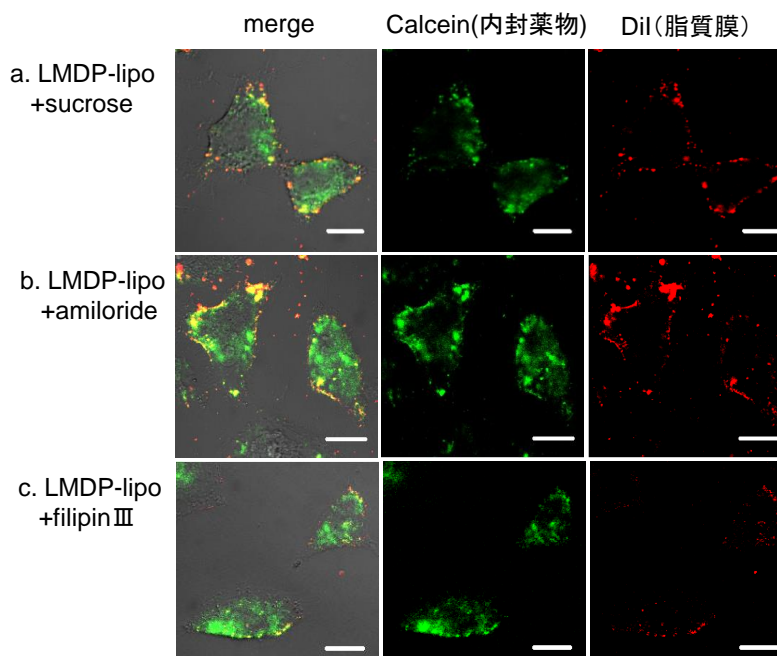


図 3-15. LMDP-lipo のエンドサイトーシス阻害下での内封薬物放出

エンドサイトーシスの各経路の阻害剤で前処理した A549 細胞に、脂質膜を Dil でラベル化し、カルセインを内封した LMDP-lipo を 0.4 M sucrose (a)、2.5 mM amiloride (b)、5 μ g/mL filipin III (c) の存在下で A549 細胞に添加し、37°C、1 時間インキュベート後、CLSM 観察により評価した。赤: Dil (脂質膜)、緑: カルセイン (内封物)、Bar: 10 μ m

3-3-8 Time-lapse imaging による LMDP-lipo の細胞内薬物放出挙動の観察

さらに、この放出特性を詳細に調べるため、CLSM の Time lapse 撮影により観察した。図 3-12 と同様にリポソーム膜を CM-DiI でラベル化し、カルセインを封入した LMDP-lipo を A549 細胞に添加し、30 秒ごとに画像を取得した。その結果、細胞に取り込まれたリポソームは、始めは脂質膜にカルセインが内封されているため、黄色のドットとして観察されるが、時間の経過と共に赤の脂質膜が消失し、緑の内封カルセインが細胞内に拡散している様子が観察された (図 3-16)。

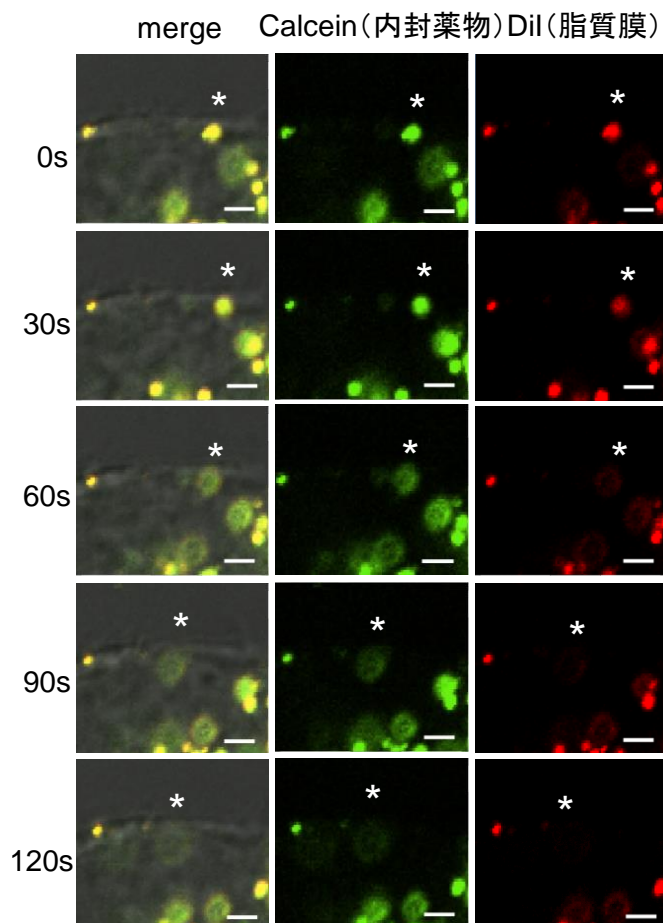


図 3-16. LMDP-lipo の Time-lapse imaging によるカルセインの細胞内放出観察

(a) DiI で脂質膜をラベル化し、カルセインを封入した LMDP-lipo を A549 細胞に添加し、5% CO₂、37°C でインキュベートした。CLSM により、30 秒間隔で画像を取得した。

赤：CM-DiI (脂質膜) 緑：カルセイン (内封物) bars：2 μm

そこで、放出と時間との関係をより詳細に評価するために、画像解析ソフト NIS-Elements (Nikon) を用いて、細胞形質膜上のリポソーム 1 ドット毎に、そのドット中心から一定の距離 (0, 2, 4 μm) における DiI 及びカルセインの蛍光強度変化を追跡した (図 3-17a)。その結果、リポソームの指標である DiI の蛍光強度は、中心の 0 μm においては 0 sec の時点で高かったのが、時間経過に伴い DiI の蛍光強度は次第に低下し、120 秒後には約 88 % 減少した。また、中心から 2 μm、4 μm 離れた位置ではほとんど蛍光は認められなかった (図 3-17b)。このことから、LMDP-lipo は細胞膜との融合により蛍光脂質が希釈されることで、蛍光が消失したことが示唆された。一方、内封したカルセインは、0 sec では DiI と同様に中心付近の 0 μm で蛍光強度が高かったのが、時間経過と共に低下し、120 sec では、蛍光強度が約 68 % 減少した。また、中心から 2 μm、4 μm の位置における蛍光強度は、時間の経過と共に高くなった (図 3-17b)。このことから、内封したカル

セインは、始めはリポソームに内封されているためリポソームとカルセインが共局在していたが、リポソーム (DiI) と細胞形質膜との融合に伴い、カルセインが放出されることが示唆された。また、LMDP-lipo からのカルセイン放出は、LMDP-lipo が細胞と接触後約 30 秒から認められたことから、LMDP-lipo は非常に短時間で薬物放出可能であることが示唆された。

以上より、LMDP-lipo は、 γ -セクレターゼの高活性細胞において、細胞質内に内封薬物を放出することが可能であることが示された。

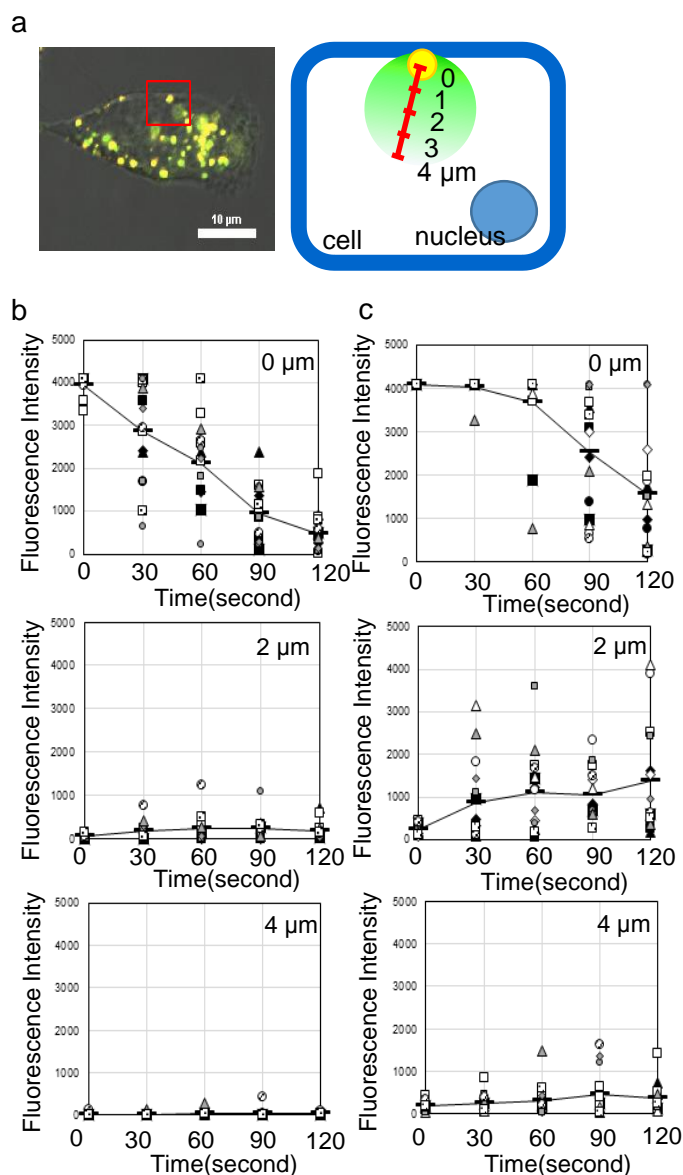


図 3-17. 細胞内放出挙動の蛍光定量による評価

図 3-16 の DiI 及びカルセインの蛍光強度を時間追跡し定量することで、細胞内放出を観察した。

(a) 画像解析による蛍光定量の概略図。CM-DiI とカルセインの蛍光強度をリポソームのドットの中心を 0 とし、2、4 μm で測定した。3 dots/cell で 5 cells を解析した結果を、縦軸を蛍光強度、横軸を時間でドットごとにプロットした。画像解析ソフト NIS-Elements を用いて、CM-DiI (b)、カルセイン (c) それぞれで解析した。

3-4 考察

本章では、がん細胞内に特異的かつ効率的に free 型薬物を送達するために、がん細胞で高活性な γ -セクレターゼの基質ペプチド (LMDP) をリポソーム膜不安定化素子として膜内に組み込んだ LMDP-lipo を構築し、その機能性について示した。

これまでに、リポソームからの薬物の放出のために、がん細胞で高活性の分泌型酵素である elastase や matrix metalloprotease (MMP) の基質を利用して、その基質分解によって、がん細胞選択的にリポソーム膜の崩壊や膜融合を引き起すような薬物キャリアーが開発されてきた^{143,144)}。しかし、これらの薬物キャリアーの場合、細胞外で内封薬物が放出されるために、利用できる薬物が限定されるだけでなく、放出効率が低いと考えられる。そこで本研究では、キャリアーが細胞内と取り込まれると同時に薬物放出する可能なシステムを開発するために、がん細胞膜に存在し、膜内で基質を分解する γ -セクレターゼに着目した。 γ -セクレターゼは、細胞の分化や増殖を制御している Notch シグナルに重要な役割を果たしているプロテアーゼであり、がん細胞では、その Notch シグナルの異常な活性化が報告されている^{145,146)}。Notch は 1 回膜貫通型の受容体であり、細胞膜に存在する γ -セクレターゼが Notch の膜貫通部位を膜内で切断し、その細胞内断片が核に移行することで転写因子として働くことで、シグナルが伝達される^{147,148)}。そのため、 γ -セクレターゼは Notch シグナルに不可欠なプロテアーゼであり、シグナルが異常亢進しているがん細胞では活性が高いことが報告されている^{149,150)}。正常細胞を含む数種類の細胞で FACS により γ -セクレターゼの活性中心タンパク質である presenilin-1 の発現を確認したところ、いずれの細胞でも発現が認められ、細胞間で大きな差は認められなかったが、 γ -セクレターゼ活性の評価では、正常細胞の HUEt-2 に比べ、がん細胞で 2~4 倍高い活性を示した (図 3-3b,c)。

LMDP-lipo はこのような膜タンパク質 γ -セクレターゼの基質ペプチド LMDP をリポソーム膜に組み込むことで構築した。がん細胞に特異的な DDS キャリアーとして、抗体やペプチドなどのリガンドを修飾したようなキャリアーはこれまでも多数報告されているが^{76,77)}、それらは薬物放出を制御することはできない。LMDP-lipo はリポソームからの薬物放出の鍵となる脂質膜構造を変化させることにより、がん細胞特異的な薬物放出が可能ではないかと考え設計した。

γ -セクレターゼの基質 LMDP の γ -セクレターゼによる切断活性を、基質ペプチドとの競合阻害及び HPLC による LMDP の定量によって評価した。その結果、競合阻害活性は、ペプチド単独の方が、LMDP-lipo より IC₅₀ で約 2 倍阻害効果が高かった。一方で、HPLC による LMDP の定量的結果では、ペプチド単独よりもリポソームに組み込んだ LMDP-lipo の方が、切断率が高い結果となった (表 3-1,2)。これまでに、細胞の膜画分における γ -セクレターゼ活性は、細胞膜の構成脂質である PC や PE を混合した場合に増大したことが報告されている¹⁵¹⁾。また、同様に膜内領域で酵素活性を示す膜タンパク質のプロテアーゼである romboïd でも、リポソームに再構成することで、界面活性剤で可溶化した場合に比べて、高いプロテアーゼ活性が示すことも報告されている¹⁵²⁾。これらのことから、膜タンパク質であるプロテアーゼは、膜内で活性を示すことから、脂質膜に組み込まれた状態である方が、活性が高いと考えられる。したがって、表 3-1,2 の結果も LMDP が脂質膜に組み込まれている LMDP-lipo の状態では、LMDP 単独よりも γ -セクレターゼと相互作用する割合は少なかったかもしれないが、脂質が存在することで、LMDP の切断活性

は高くなったのではないかと考えられる。

LMDP-lipo の脂質組成を検討した結果、EPC 単独や、DOTAP 含有リポソームよりも、EPC/DOPE/CHEMS から構成されるリポソームにおいて、内封カルセインの漏出が促進された (図 3-6)。これは、 γ -セクレターゼは細胞膜内でプロテアーゼ活性を示すため、リポソームと細胞膜との接触が重要であると考えられ、DOPE をリポソーム組成に加えて膜融合性を付与することで効率よく機能性を発揮できたと考えられる。また、LMDP は C 末端が nuclear localization signal (NLS) 配列となっており、アルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸が豊富であるため、静電的反発を誘起するような正電荷リポソーム膜への組み込みは阻害されることが考えられる。一方、負電荷脂質の CHEMS を含むリポソームでは、LMDP と CHEMS が親水性部位において静電的相互作用するために、他の組成よりもリポソーム膜に LMDP が効率的に組み込まれることで、リポソーム膜に対する LMDP の効果が増強した結果、内封カルセインの漏出が促進されたのではないかと推察された。LMDP-lipo からのカルセイン漏出は、正常細胞の HUEhT-2 に比べ、 γ -セクレターゼ活性の高いがん細胞の A549 では、Control-lipo に対する LMDP-lipo の上昇率 (LMDP-lipo の漏出/Control-lipo の漏出) が 2 倍以上高かった。したがって、 γ -セクレターゼ活性の高いがん細胞特異的に放出可能であることが示唆された。さらに、 γ -セクレターゼ阻害剤 DAPT の処理により LMDP-lipo からのカルセイン放出は抑制された (図 3-11)。DAPT は、 γ -セクレターゼのアロステリック部位に結合して触媒部位の構造を変化させることで、基質の活性部位への結合を阻害する¹⁵³⁾。そのため、DAPT 処理によって γ -セクレターゼの活性中心への LMDP の結合が阻害されることが推察されることから、LMDP が γ -セクレターゼの活性中心へ結合することも LMDP-lipo の薬物放出の促進に影響している可能性がある。しかし、presenilin-1 の発現が同程度でも γ -セクレターゼ活性の高い細胞において、LMDP-lipo からのカルセイン放出が促進したことから、 γ -セクレターゼの活性中心への LMDP の結合に加えて、その切断活性も重要であると考えられる。

作製した LMDP-lipo は、Control-lipo と比べて、培養細胞の A549 細胞においても、 γ -セクレターゼに依存した細胞内カルセインの放出が認められた (図 3-13)。しかし、この脂質膜組成中には、低 pH で膜融合能をもつ DOPE/CHEMS を用いており、エンドソーム内の酸性環境下における膜融合を介した放出の可能性が懸念された。DOPE は親水性部位に対して疎水性部位が大きい逆ヘキサゴナル構造をとる脂質であり、DOPE のみでは安定な脂質二重膜構造を形成できないが、CHEMS などの電荷を有する両親媒性脂質を混合することで、その膜構造が安定化される。これまでに、CHEMS のカルボキシル基がエンドソーム内の低 pH でプロトン化することで負電荷が消失し、リポソーム膜が不安定化され、膜融合が誘起されることから、DOPE と CHEMS から構成されるリポソームは、エンドソーム膜と効率的に膜融合することで、エンドソームから脱出可能であるため、遺伝子キャリアーとして広く利用されている¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾。そのため、Control-lipo からのカルセイン放出は、膜融合に依存していると考えられる。一方、LMDP-lipo では、細胞膜へ局在しやすいだけでなく、内封カルセインの放出能が Control-lipo に比べて高かった。さらに、エンドサイトーシス経路による細胞内取り込みを抑制した場合でも、細胞内におけるカルセイン放出が認められたことから (図 3-15)、LMDP-lipo からのカルセイン放出機構には、単にエンドソーム膜との膜融合が関与するだけでなく、細胞形質膜との膜融合を介して LMDP が切断されることでリポソーム膜構造が乱れることが関与することが示唆された。

さらに、この LMDP-lipo の放出のタイムコースを詳細に検討した結果、LMDP-lipo は粒子として細胞膜に結合し、取り込まれてから約 2 分程度で速やかにカルセインの拡散する様子が観察された (図 3-16,17)。一般的にナノ粒子がエンドサイトーシスで取り込まれても、ライソソームでの分解や、細胞膜上にリサイクリングされることがが、ナノ粒子の細胞質送達効率の低下を招く一因であると考えられている。ポリスチレンナノ粒子では、細胞に取り込まれてから 30 分程度で初期エンドソームから後期エンドソームに移行し、ライソソームに移行するのには約 4 時間程度かかることが報告されている¹⁵⁴⁾。また、siRNA キャリアーとしてよく用いられている LNP では、取り込みから約 1 時間程度でリサイクリングエンドソームへの局在が増え始め、約 6 時間後に siRNA は細胞外に排出されることが報告されている¹²⁹⁾。LMDP-lipo は、図 3-16,17 に示されるように細胞形質膜との融合時、もしくはエンドサイトーシス経路で取り込まれた場合でも、エンドソーム膜上 γ -セクレターゼにより LMDP が切断されるために、初期エンドソームにおいて、速やかな薬物放出が達成されることが示唆された。したがって、LMDP-lipo は、上記のような分解やリサイクリングを回避することが可能であるため、細胞質へ内封薬物を効率的に放出することが可能なキャリアーであると考えられる。

LMDP-lipo を *in vivo* へ応用する場合、血中滞留性を付与することが必須であると考えられる。しかし、汎用されている PEG のような水溶性高分子では、細胞膜との相互作用が阻害されてしまうため、LMDP の機能性が損なわれると考えられる。さらに、LMDP-lipo は脂質二重膜の形成に不安定な DOPE を含有しており、DOPE 含有リポソームでは、PEG を修飾した場合でも、安定なラメラ構造を形成可能な PC を基盤とするリポソームに比べて、血中安定性が低いことも報告されている¹²⁸⁾。また、LMDP-lipo はリポソーム膜にペプチドを組み込んでいるため、薬物の内封率も低く、生理的条件でも内封薬物が漏れやすいことも課題として挙げられる。そこで、LMDP-lipo を *in vivo* に応用するためには、第 2 章で開発した SAPSP の利用が有用であると考えられる。すなわち、LMDP-lipo の表面を SAPSP で修飾することで、効率的な腫瘍送達が期待できるだけでなく、リポソームに修飾した SAPSP は膜融合能も有するために、LMDP の機能性を保持しつつ脂質膜をより安定な組成に変更することも可能であると考えられるため、血中安定性と細胞内への薬物放出の相反する機能を 1 つのキャリアーに同時に付与できると期待される。

3-5 小括

本章では、がん細胞内へ薬物を特異的に放出するシステムとして、がん細胞で高活性な γ -セクレターゼによって切断される LMDP を膜不安定化素子としてリポソーム膜に組み込んだキャリアー (LMDP-lipo) を開発した。LMDP-lipo は、 γ -セクレターゼによる LMDP の切断を介してリポソーム膜構造が乱れることで、細胞内へ低分子薬物の効率的に放出可能であることが示された。また、LMDP-lipo は細胞形質膜と相互作用すると同時に、速やかに薬物を放出することが可能であるため、細胞内小胞による分解や排出機構を回避可能であるために、既存のキャリアーに比べて、細胞質へ free 型薬物を効率的に放出可能であることが示唆された。以上より、LMDP-lipo は腫瘍組織へ送達された薬物が特異的かつ最大限の薬効を発揮することが期待できるだけでなく、第 2 章で構築した SAPSP と組み合わせることで、体内動態から細胞内放出までも制御できる基盤キャリアーとしても期待される。

第 4 章

核酸の細胞質内での効率的な放出システムの開発

第4章 核酸の細胞質内での効率的な放出システムの開発

4-1 緒言

第3章では、低分子薬物の細胞内への効率的な放出システムを構築したが、核酸のような高分子を医薬品として利用する場合にも、細胞質での効率的な放出は重要である。近年、遺伝子発現の網羅的解析などの発展に伴い、疾患の遺伝子レベルでの解明が進展し、その情報に基づき、医薬品の開発は従来の低分子医薬品から、より特異性の高い医薬品の開発にシフトされてきている。特に、疾患関連タンパク質を狙い撃ちすることができる分子標的薬が盛んに開発されてきているが、これらの標的は疾患原因因子の約20%程度であるため、タンパク質のみを標的とした治療法には限界があると考えられている¹⁵⁵⁾。そこで、疾患関連核酸を治療標的とした医薬品を開発するために、機能性核酸及びそのDDS研究が急速に展開されている¹⁵⁶⁾。特に、核酸医薬品として注目されているsiRNAのキャリアー開発は急務であるが、現在のsiRNAキャリアーの課題の1つとして非効率的なsiRNA放出が挙げられる。そこで本章では、siRNAの細胞質放出を促進可能な新規キャリアーを構築することを目的とした。

1998年にFireらによってRNA interference (RNAi) が初めて報告されてから¹⁵⁷⁾、siRNAは医療分野への応用が期待され、多くの研究開発が行われてきた。現時点では、siRNA製剤は上市には至っていないものの、海外では多数の品目が臨床試験段階にあり、近い将来ヒトへの応用が現実的となってきた。siRNAは20塩基程度の短い2本鎖RNAであり、細胞質のRNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、相補的な配列のmRNAを分解することで、標的タンパク質の発現を特異的に抑制することができる¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾。したがって、siRNAが遺伝子発現抑制効果を発揮するためには、細胞内に取り込まれるだけでなく、細胞質まで送達されなければならない。しかし、siRNAは負電荷の水溶性高分子であることから細胞膜透過性に乏しい上、生体内で容易にヌクレアーゼによって分解されるために、これらの問題を解決可能なsiRNAキャリアーの開発が必須である。これまでに、siRNAをリポソーム内に封入し、さらに体内動態制御素子や細胞内動態制御素子を組み込むことで、ヌクレアーゼによるsiRNAの分解を回避し、細胞質へsiRNAを送達可能なリポソーム型siRNAキャリアーが多数開発されてきた^{41,161)}。しかし、これらのキャリアーを利用しても、疾患部位の細胞内への送達可能なsiRNA量には限界があるため、細胞質へ送達されたsiRNAの効果を更に増強するための改良が必要である。一般的にリポソームへsiRNAを封入する場合、カチオン性ポリマーとsiRNAを静電的相互作用により凝集化させたsiRNAコアを作製し、そのsiRNAコアを脂質膜でコーティングする方法がよく用いられている⁴²⁾。しかし、凝縮剤としてカチオン性ポリマーを用い場合、非常に強固なsiRNAコアが形成されるため、siRNAキャリアーによって細胞質にsiRNAコアが送達されたとしても、siRNAがコアから放出されず、RISCに認識されにくいことから、mRNAの分解反応が起こりにくいと考えられる。すなわち、RNAi効果は細胞質内のfree型siRNA量に依存するため、siRNAキャリアーによって送達されたsiRNAが高いRNAi効果を誘導するためには、細胞質でsiRNAがコアから放出されたfree型となることが重要である(図4-1a)。そこで、細胞質におけるsiRNA放出を促進可能な新

規システムを構築するために、第2章で開発した pH 応答性電荷反転型ペプチド SAPSP を凝縮剤として利用することで、細胞内 pH 変化にตอบสนองして siRNA を効率的に細胞質内へ放出可能なキャリアを開発できるのではないかと考えた。つまり、低 pH 条件で正電荷を有する SAPSP は siRNA と静電的相互作用によって容易にコアを形成することができると予想された。この siRNA コアが細胞質に送達された場合、細胞質 pH (pH 7.4) にตอบสนองして、SAPSP が負電荷に反転するため、siRNA との静電的反発が誘起されることで siRNA コアから siRNA が放出されるだろうと考えられた(図 4-1b)。そこで、SAPSP を凝縮剤として用いて、低 pH 条件で siRNA コアを作製し、本コアを脂質膜の枚数を制御したリポソームに封入した siRNA を構築し、細胞質内における siRNA の放出及び RNAi 効果に関して、pH 非応答性ポリカチオンのステアシル化オクタアルギニン (STR-R8) から構成される siRNA コアと比較評価した。

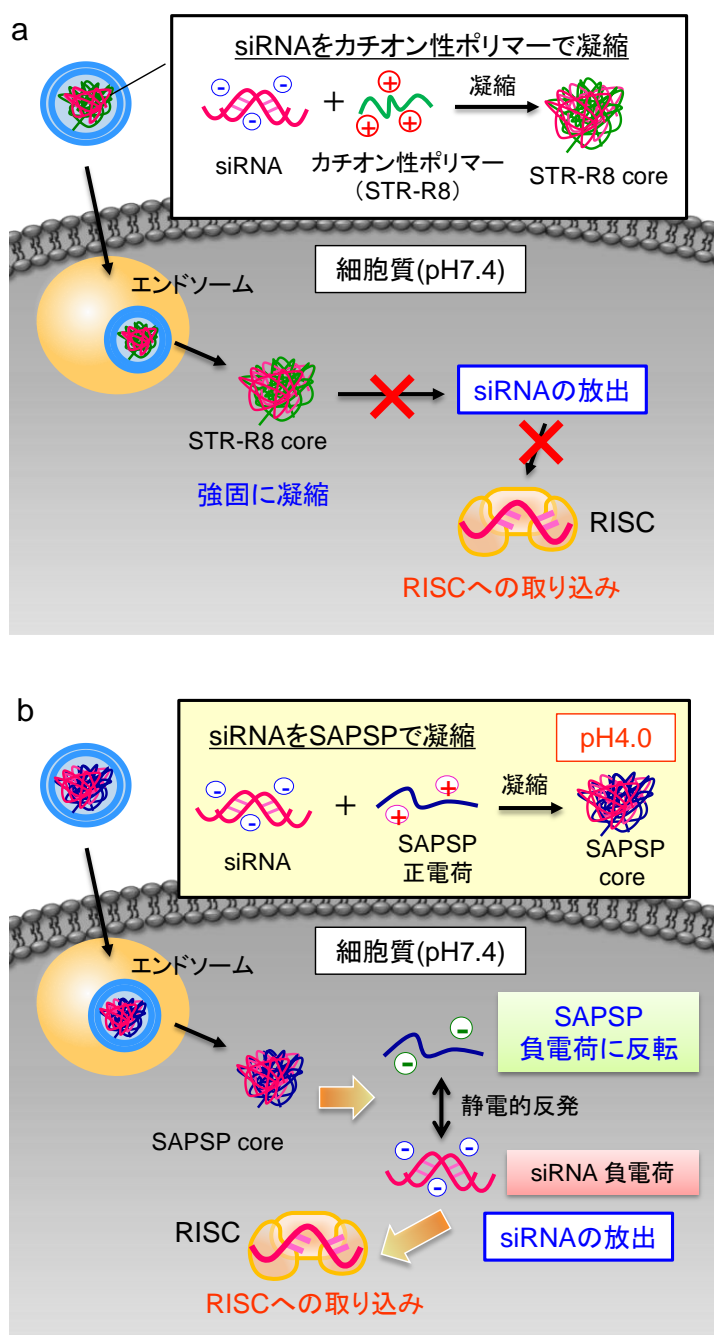


図 4-1. SAPSP を用いた siRNA コアのコネプト

(a) 従来の STR-R8 を用いた siRNA コア。カチオン性ポリマーの場合、細胞質で強固に凝縮されているため、siRNA は放出されにくいと考えられる。(b) SAPSP を用いた siRNA コア。SAPSP は細胞質 pH にตอบสนองして電荷が負電荷となることで、siRNA との静電的反発により放出が促進されることが考えられる。

4-2 実験方法

4-2-1 材料・機器

1) 材料

3-sn-Phosphatidic acid (PA)はSigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)より購入した。Agarose S、ethidium bromide (EtBr)、glycerol は和光純薬工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。Lipofectamine 2000、SYBER Gold nucleic acid gel stain はInvitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)より購入した。Rabbit Reticulocyte Lysate (Nuclease Treated)、Luciferase control RNA、luciferase assay system はPromega (Madison, WI, U.S.A.)より購入した。Stearyl-R8 (stearyl-RRRRRRRRR-NH₂)、slightly acidic pH sensitive peptide (SAPSP : stearyl-GGGGHGAHEHAGHEHAAGEHHAHE-NH₂)、NBD-SAPSP (Stearyl-SAPSP-GC-NBD-NH₂) はスクラム (Tokyo, Japan) により委託合成した。Anti-luciferase siRNA (21-mer, 5'-GCGCUGCUGGUGCCAACCCTT-3', 5'-GGGUUGGCACCAGCAGCGCTT-3')、negative control siRNA (21-mer, 5'-UAUUGCGUCUGUACACUCATT-3', 5'-UGAGUGUACAGACGCAAUATT-3')、Alexa 546 labeled siRNA (21-mer, 5'-Alexa546-UAUUGCGUCUGUACACUCATT-3', 5'-Alexa546-UGAGUGUACAGACGCAAUATT-3') はInvitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)より合成されたものを購入した。

2) 機器

プローブタイプソニケーターは URTRASONIC PROCESSOR Q125 (Qsonica, newtown, CT, U.S.A.)を使用した。電気泳動槽は、i-MyRun.NC IMR-303 (コスモ・バイオ株式会社, Tokyo, Japan) を使用した。ゲル撮影装置は STAGE-1000 (AMZ System Science, Osaka, Japan)を使用した。

その他の材料、機器は第 1 章、第 2 章、第 3 章と同様のものを用いた。

4-2-2 細胞培養

本章ではマウスメラノーマ細胞の B16-F1 細胞を用いて実験を行った。培養方法は 2-2-2 と同様に行った。

4-2-3 SAPSP/siRNA、STR-R8/siRNA の作製

10 mM HEPES となるように HEPES をミリ Q に溶解し、1N NaOH または 1N HCl を添加して pH 7.4 及び pH 4.0 に調整し、0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌した。siRNA、SAPSP、STR-R8 をそれぞれ適切な濃度に 10 mM HEPES buffer (pH4.0)で希釈した。

siRNA の正電荷コアを作製するため、以下の式に従って、様々な N/P 比で siRNA と SAPSP の混合比を算出した。検討後は N/P=5.5 とし、混合比を決定した (siRNA : SAPSP = 1 : 5.5)。また、STR-R8 コアも N/P=5.5 に合わせて以下の式に従って、混合比を決定した (siRNA : STR-R8 = 1 :

3.2)。この比で SAPSP または STR-R8 に siRNA を vortex 下で添加し、コアを作製した。物性評価として粒子径とゼータ電位を Zetasizer Nano (Malvern Ins. Ltd.)で測定した。

$$N/P \text{ ratio} = \frac{C_{\text{pep}} \times \frac{n_{H \text{ or } R}}{MW_{\text{pep}}}}{C_{\text{siRNA}} \times \frac{n_p}{MW_{\text{siRNA}}}}$$

C_{pep} : SAPSP または STR-R8 濃度
 C_{siRNA} : siRNA 濃度
 n_H : SAPSP 中の H 残基数 (8)
 n_R : STR-R8 中の R 残基数 (8)
 n_p : pDNA の 1 塩基対あたりの PO_4^- 数 (2)
 MW_{pep} : ペプチドの分子量
 MW_D : siRNA の 1 塩基対あたりの平均分子量 (約 660)

4-2-4 R8D-lipo の調製

siRNA コアのリポソームへの封入はこれまでに報告された方法を応用した¹⁶²⁾。脂質薄膜を DOPE/PA=7/2 (mol/mol) で作製し、10 mM HEPES buffer (pH 4.0) を添加し、室温で 5 分水和後、バスタイプソニケーター (UTRASONIK 14B) で 5 分以上超音波処理し、作製したリポソーム溶液を回収した。その後、さらにプローブタイプソニケーター (ULTRASONIC PROCESSOR Q125) を使用して氷上で 20 分間超音波処理し (Amplitude : 50 %)、SUV を調製した (総脂質濃度 : 0.825 mM)。遠心分離 (15,000 rpm、5 分、4°C) 後、上清を回収し、この操作を 3 回繰り返した。得られた SUV 溶液と作製したコアを、SUV/コア=2/1 (v/v) で、vortex 下で SUV にコアを滴下して、fusion 法によりリポソームにコアを封入した D-lipo を作製した (総脂質濃度 0.55 mM)。その後、STR-R8 を脂質濃度の 10 mol% で添加し、室温で 30 分インキュベートすることで R8 を修飾し、R8D-lipo を作製した。

4-2-5 Ethidium Bromide (EtBr) intercalate assay

siRNA コアの作製とコアからの siRNA のリリースを EtBr の蛍光強度を測定することにより評価した。EtBr の pH 7.4 または pH4.0 HEPES buffer (10 mM) 溶液を SAPSP コア、STR-R8 コアに EtBr/siRNA = 0.245/0.5 (w/w) の比で添加し、室温で 10 分インキュベートした。その後、EtBr の蛍光強度を PLATE manager Infinite M200 (TECAN) により測定した (Ex:520 nm, Em:590 nm)。

4-2-6 siRNA の電気泳動

1) 試薬調製

【泳動 buffer】

pH 7.4 及び pH 4.0 の泳動 buffer として、50 mM リン酸 buffer (pH 7.4)、50 mM クエン酸 buffer (pH4.0) を作製した。50 mM リン酸 buffer (pH 7.4) は、50 mM Na_2HPO_4 と 50 mM NaH_2PO_4 を調製し、pH を測定しながら、50 mM Na_2HPO_4 に 50 mM NaH_2PO_4 を pH 7.4 となるまで加えた (Na_2HPO_4 810 mL に NaH_2PO_4 200 mL くらいの割合)。50 mM クエン酸 buffer (pH 4.0) は、50 mM クエン酸溶液を調製し、pH を測定しながら、50 mM クエン酸に上記で用いた 50 mM Na_2HPO_4 を pH4.0

となるまで加えた（クエン酸 500 mL に Na_2HPO_4 550 mL くらいの割合）。

【10×sample buffer】

上記で調製した泳動 buffer の 50 mM リン酸 buffer (pH 7.4) 及び 50 mM クエン酸 buffer (pH 4.0) に 50 % Glycerol を加え、10×sample buffer とした。

2) アガロースゲル電気泳動

三角フラスコにアガロースを 1 g 秤量し、pH 7.4 及び pH 4.0 泳動 buffer 100 mL を加え、電子レンジで加温し、溶解した。触れるくらいに冷ましてから、ゲルトレイとコームをセットしたゲルスタンドに溶液を流し、固めた（1% Agarose gel）。4-2-3 と同様の方法で SAPSP コア、STR-R8 コアを作製し、10×sample buffer を 1/10 量加えて懸濁し、siRNA 量として 0.3 µg/well で作製したゲルにアプライした。また、SDS 添加サンプルは、10×sample buffer に 10 % となるように SDS を溶解させ、各コアに加えて懸濁し、同量の siRNA 量で 0.3 µg/well アプライした（最終濃度：1% SDS）。pH 7.4 または pH 4.0 の泳動 buffer 中で 100V、30 分電気泳動した。泳動後、ゲルを SYBER Gold (Ex:300 nm, Em:537 nm) 溶液（pH 7.4 buffer で原液を 10000 倍希釈）に浸して室温で 30 分振とうしながらインキュベートし、ゲル撮影装置（STAGE-1000）で撮影した（UV 100%）。

4-2-7 siRNA のトランスフェクション

B16-F1 のルシフェラーゼ安定発現株 (B16-F1-luc) を 96 well plate に DMEM (+) で 2×10^3 cells/well を播種した。37°C、5% CO_2 、24 時間インキュベート後、PBS (-) で洗浄し、DMEM (-) 100 µL に培地交換した。その後、siRNA として 50 nM の SAPSP コア、STR-R8 コアを封入した R8D-lipo を添加した。また、トランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (LFN2000) は $\text{LFN2000} : \text{siRNA} = 3.8 : 1$ の比で試薬の手順書に従って混合し、B16-F1-luc に同様に添加した。37°C、5% CO_2 、3 時間インキュベート後、トランスフェクションした培地を除去し、PBS (-) で 3 回洗浄し、DMEM (+) 100 µL を添加した。さらに 37°C、5% CO_2 、9 時間インキュベートした。その後、4-2-8 と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。RLU/mg protein で算出し、それぞれのサンプルの遺伝子発現抑制効果を以下の式に従って算出した。

$$\text{Gene knock down efficiency (\%)} = \left[1 - \left(\frac{R_{\text{Luc}}}{R_{\text{Cont}}} \right) \right] \times 100$$

R_{Luc} : anti-luciferase siRNA
の RUL/mg protein
 R_{Cont} : negative control siRNA
の RUL/mg protein

4-2-8 Time-lapse imaging による細胞内 siRNA 放出観察

0.002 % PLL でコートした 35 mm ガラスボトム dish (IWAKI) に B16-F1 細胞を 2×10^5 cells/dish で播種し、37°C、5 % CO_2 、24 時間インキュベートした。PBS (-) で洗浄後、DMEM (-) 1 mL に培地交換し、SAPSP コアを封入した R8D-lipo（総脂質濃度 0.55 mM）を 80 µL（Alexa546-siRNA 量として 0.88 µg）となるように添加し、37°C、15 分インキュベートした。その後、ヘパリンナト

リウム(20 units/mL) 含有 PBS (-)で3回洗浄し、DMEM (+) 1mL に培地を交換し、100×Hoechst 33342 10μL 添加し、室温で 10 分インキュベートした (遮光)。その後、ヘパリンナトリウム(20 units/mL)含有 PBS (-)で洗浄し、DMEM (+)で洗浄後、DMEM (+) 1 mL 添加して Time-lapse imaging を CLSM により行った。観察には、Nikon A1 CLSM (Nikon Instruments Inc., Melville, USA)を使用し、油浸 63 倍対物レンズ(Plan Apo VC 60X 1.4 N.A.)を用いて 37°C、5% CO₂ 条件を維持しながら撮影した。Hoechst 33342 (Ex:355 nm, 405 nm)、NBD (Ex:460 nm, Ex:535 nm)、Alexa546 (Ex:554 nm, Em:570 nm) は、それぞれ 405 nm、488 nm、561 nm のレーザーで励起した。Time-lapse imaging は 3 分ごとに 2 時間で画像を取得した。

4-2-9 *In vitro* 翻訳

In vitro 翻訳は Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega)を用いて、基本的にメーカーの手順に従って行った。Luciferase mRNA 1 μL (mRNA 量として 1 μg)を SAPSP コアまたは STR-R8 コア 12 μL (siRNA 量として 1 μg) と混合し、氷上で 10 分間インキュベートした。その後、Rabbit Reticulocyte Lysate 35 μL、Amino Acid Mixture Minus Leucine (1 mM) 0.5 μL、Amino Acid Mixture Minus Methionine (1mM) 0.5 μL、Ribonuclease inhibitor (40 U/μL) 1 μL を加え、懸濁し (総量 50 μL)、30°C、90 分インキュベートした。室温に戻した Luciferase assay substrate 50 μL と得られた反応液を 2.5 μL を混合し、1-2-8 と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。

4-3 実験結果

4-3-1 SAPSP を用いた siRNA コアの作製

まず、SAPSP を凝縮剤に用いた siRNA コアの作製と最適化を行った。第2章でも用いたように、SAPSP は、配列に Glu と His を含んでおり、生理的 pH (pH 7.4) では負電荷を示すが、低 pH では正電荷に反転する (図 2-2a)。この SAPSP を用いて siRNA コア (SAPSP コア) を作製するために、SAPSP が正電荷を示す低 pH 条件 (pH 4.0) において様々な N/P (nitrogen/phosphate) 比で SAPSP と siRNA を混合し、物性評価及び ethidium bromide (EtBr) intercalate assay による凝縮度合の検討を行った。コアを封入するリポソームには負電荷脂質を用いるため、siRNA コアは正電荷となるよう最適な N/P 比を検討した。図 4-2a に示したように、N/P=5 以上において siRNA コアの粒子径は小さくなり、また、ゼータ電位は、N/P=4 以上から正電荷を示した (図 4-2b)。これらの検討より、本研究では、粒子径が 100 nm 以下で、十分な正電荷を示す N/P=5.5 を最適な混合比とした。また、調製した siRNA コアの凝縮度合を、EtBr intercalate assay により評価した。EtBr は核酸の二本鎖にインターカレートすることで蛍光が増大する。そのため、siRNA がポリカチオンによって強固に凝縮されている場合、EtBr が siRNA にインターカレートされないため、EtBr の蛍光が減少する。本評価は核酸コアの凝縮度合の評価によく用いられている方法である (図 4-2c)¹⁶³⁾。その結果、free の siRNA (N/P=0) においては、十分に高い EtBr の蛍光強度が認められたが、N/P=4.0 以上では、EtBr の蛍光強度が free 型に比べて、約 25% まで減少した。この結果より、N/P=5.5 で調製した SAPSP コアは十分に凝縮された複合体を形成していることが示された (図 4-2d)。この SAPSP コアの比較として pH 非応答性カチオン性ペプチドのステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) を用いて調製した siRNA コア (STR-R8 コア) も同様に N/P=5.5 で作製した。これらの物性は表 4-1 に示した。

表 4-1. SAPSP コア及び STR-R8 コアの物性 (pH4.0)

	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
SAPSP コア pH4.0	90±9	0.23±0.06	22±6
STR-R8 コア pH4.0	87±9	0.28±0.04	17±3

データは mean ± S.D.として示した。(n=6)

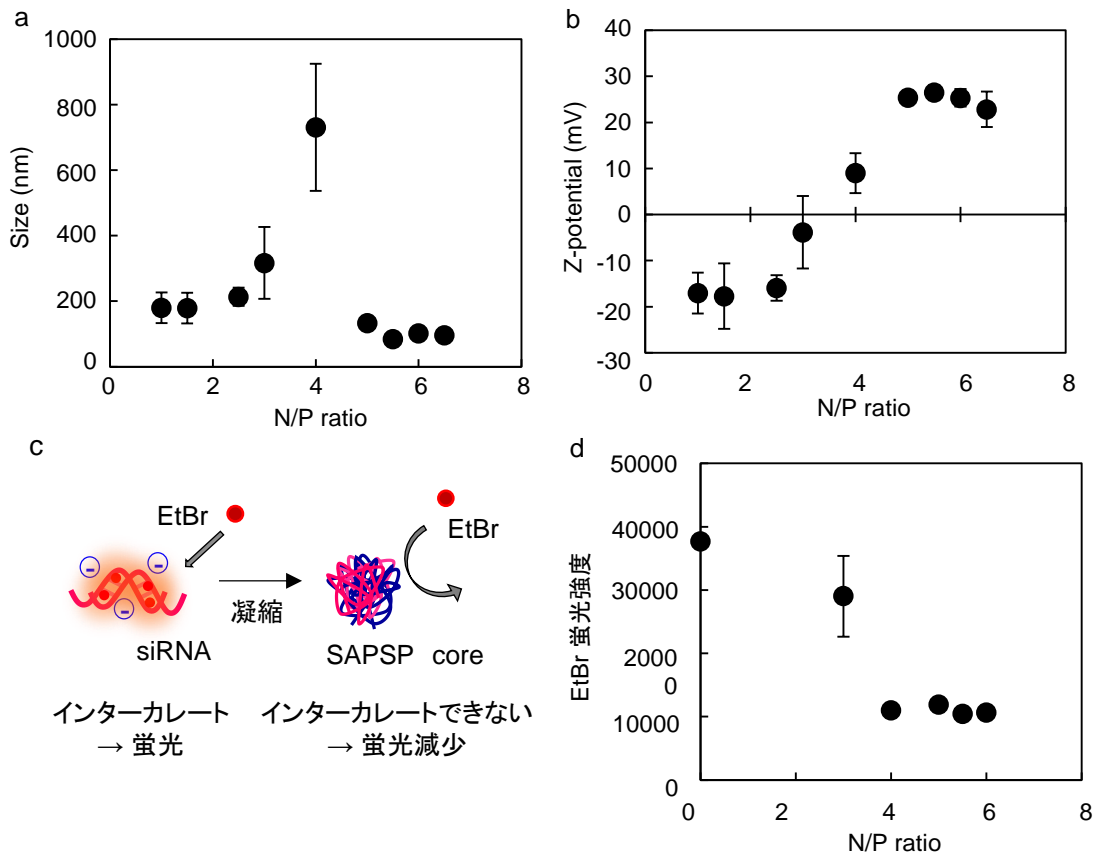


図 4-2 . SAPSP コアの作製

(a) N/P 比による粒子径の変化。図示の N/P 比で siRNA と SAPSP を作製し、動的光散乱法で粒子径を測定した。データは mean±S.D.で示した。(n=3) (b) N/P 比によるゼータ電位の変化。(a) の時のゼータ電位をレーザードップラー法により測定した。データは mean ± S.D.で示した。(n=3) (c) EtBr intercalate assay の概略図。siRNA は SAPSP による凝縮で EtBr の蛍光が減少する。(d) EtBr intercalate assay. 図示の N/P 比で作製した SAPSP コアを EtBr と室温で 10 分インキュベート後、EtBr の蛍光強度を測定した。(Ex:520 nm Em:590 nm) データはすべて mean ± S.D.で示した。(n=3)

4-3-2 pH 変化によるコアからの siRNA の放出評価

4-3-1 での検討から N/P 比を 5.5 で作製した SAPSP コアの細胞質 pH (pH 7.4) に応答した siRNA 放出を検討するために、EtBr intercalate assay を行った。図 4-2c でも示したように、SAPSP コアが強固に凝縮されている場合は EtBr の蛍光強度は低下するが、SAPSP コアが細胞質環境の pH 7.4 に変化させることによって脱凝縮された場合は、高い強度を示すと考えられる (図 4-3a)。その結果、STR-R8 コアでは pH 4.0 で顕著に減少した EtBr の蛍光は、pH 7.4 の条件下でもほとんど変化しなかったのに対して、SAPSP コアでは pH 7.4 において、pH 4.0 の場合に比べて、90 %以上の蛍光回復が認められた (図 4-3b)。そこで、この EtBr の蛍光回復が確かに siRNA のリリースを示しているのかを検討するために、pH 4.0、pH 7.4 の緩衝液中で siRNA コアをアガロースゲル電気泳動に供した。コアの状態では siRNA は泳動されないが、コアから siRNA が放出された場合、siRNA は泳動されると考えられる。その結果、STR-R8 コアは pH 4.0、pH 7.4 いずれの pH 条件で

もウェルの部位に留まり、siRNA は泳動されなかった。一方、SAPSP コアの場合は、pH 4.0 では泳動されなかったが、pH 7.4 条件では naked siRNA と同程度の位置まで siRNA が泳動された (図 4-3c)。さらに、siRNA と SAPSP、STR-R8 の静電的相互作用を調べるために、これらのコアを、負電荷イオンを有する sodium dodecyl sulfate (SDS) で処理した場合も電気泳動を行った。その結果、どちらのコアも pH に関係なく naked siRNA と同様に泳動された (図 4-3c)。したがって、SAPSP-コア中の siRNA は低 pH においては SAPSP との静電的相互作用により凝縮されているが、細胞質 pH 下では、SAPSP の電荷が正から負へ反転することで、siRNA との静電的反発が誘起されるため、SAPSP コアから siRNA がほぼ完全に放出されることが示唆された。

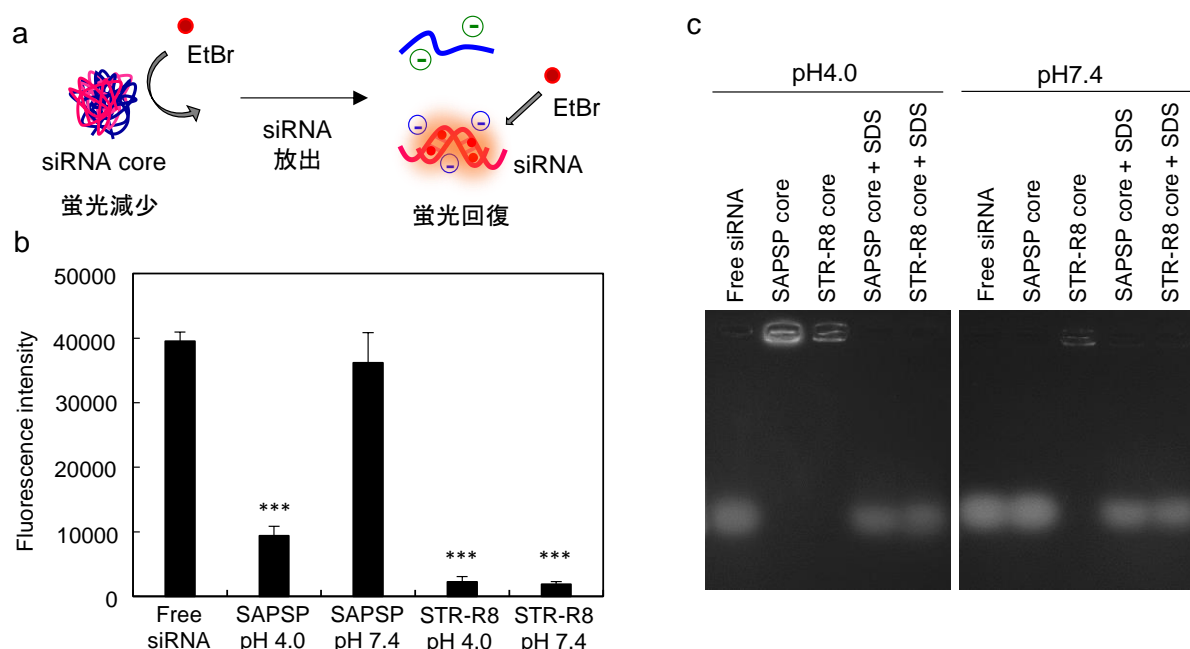


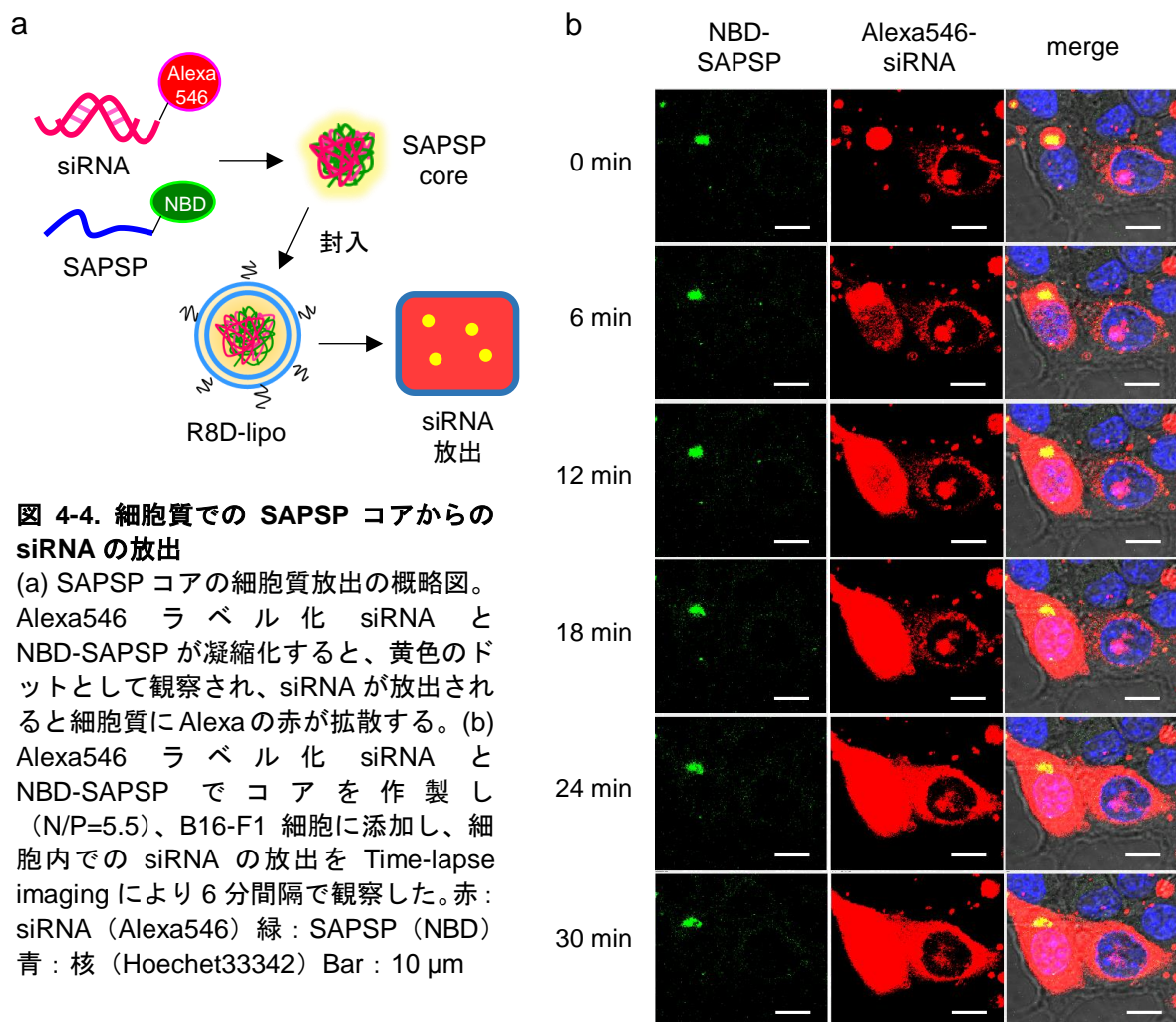
図 4-3 . SAPSP コア及び STR-R8 コアからの siRNA のリリース評価

(a) コアから siRNA がリリースされると EtBr がインターカレートでき、蛍光が回復する。(b) EtBr intercalate assay。N/P=5.5 で SAPSP コア、STR-R8 コアを作製し、pH 7.4 及び pH 4.0 条件で EtBr と室温で 10 分インキュベート後、EtBr の蛍光強度を測定した。(Ex:520 nm, Em:590 nm) データはすべて mean \pm S.D. で示した。(n=3) (c) 電気泳動。1% Agarose ゲルに SAPSP コア、STR-R8 コア及びそれぞれに 1% SDS を添加したサンプルを、pH 4.0 (クエン酸緩衝液) または pH 7.4 (リン酸緩衝液) の条件下で電気泳動を行った (100V、1h)。SYBER Gold (Ex:300 nm, Em:537 nm) で染色後、観察した。

4-3-3 Time-lapse imaging による細胞内での siRNA の放出観察

SAPSP コアは、細胞質環境の pH 7.4 において効率的に siRNA を放出することが示されたので、次に、細胞内で実際に放出されるのかを検討した。そのために、NBD で蛍光ラベル化した SAPSP (NBD-SAPSP)、Alexa Fluor 546® でラベル化した siRNA (Alexa546-siRNA) を用いて CLSM 観察により評価した。細胞内での siRNA の放出を観察するために、siRNA コアを細胞質へ送達する必要がある。そこで、本研究では、膜融合性脂質の DOPE と負電荷脂質の PA から構成される SUV (small unilamellar vesicles) を融合させることで脂質膜の枚数を制御したりリポソーム内に siRNA コ

アを封入した。本方法は、秋田らにより開発され、2枚の脂質膜から構成されるリポソームを調製することができるため、水和法で形成される多重膜リポソームに比べてエンドソーム膜との膜融合が効率的であるため、細胞質への siRNA の送達効率が向上することが報告されている¹⁶²⁾。さらに、細胞内取り込みを促進させるために、リポソーム膜表面に膜透過性ペプチドとして広く利用されている STR-R8 を修飾することで、R8 修飾 Double-lamellar liposome (R8D-lipo) を調製した。この R8D-lipo に、二重蛍光標識 SAPSP コアを封入し、細胞内での siRNA の放出を追跡するため、CLSM を用いて Time-lapse imaging により観察した。siRNA が凝縮化したコアの状態の場合は、SAPSP の緑と共局在し、黄色のドットで観察されるが、siRNA がコアから放出されると、細胞内に赤の蛍光が拡散して観察されると考えられる (図 4-4a)。その 6 分間隔の取得画像を図 4-4b に示した。始めは赤で示される siRNA も緑の SAPSP も細胞内にドットとして観察され、コアのまま取り込まれているが、時間の経過と共に、赤の siRNA が細胞内に拡散し始め、30 分後には細胞質全体に赤の蛍光が観察された。R8D-lipo 添加後、37℃で 15 分インキュベートし、ヘパリン含有 PBS で洗浄することで取り込まれていないリポソームを除去し、これ以上のリポソームの取り込みを抑制した状態で Time-lapse 観察を開始した。したがって、細胞を用いた場合においても、SAPSP コアから siRNA が細胞質内に放出されることが示唆された。



4-3-4 SAPSP コアの遺伝子発現抑制効果

SAPSP コアにより細胞質へ siRNA が効率的に放出されることが明らかとなったため、次に、遺伝子発現抑制効果を評価した。ルシフェラーゼ安定発現 B16-F1 細胞を用いて、R8D-lipo により SAPSP コア、STR-R8 コアを細胞質に送達し、ルシフェラーゼ活性を指標として、遺伝子発現抑制効果を評価した (図 4-5a)。なお、R8D-lipo は 4-3-3 と同様に調製し、それぞれの物性は表 4-2 に示した。結果は、各サンプルで Negative control siRNA の導入におけるルシフェラーゼ活性を 100% (遺伝子発現抑制効率 0%) として、各サンプルで anti-luciferase siRNA を導入した場合のルシフェラーゼ活性の抑制率をノックダウン効率として表した。その結果、STR-R8 コアと比較し、SAPSP コアでは遺伝子発現抑制効率が約 2 倍増大し、transfection 試薬として広く使用されている Lipofectamine2000 (LFN2000) で導入した場合と同程度の抑制効果を示した (図 4-5b)。したがって、SAPSP コアは細胞質で siRNA を効率よく放出することにより、遺伝子発現抑制効果が向上することが示された。

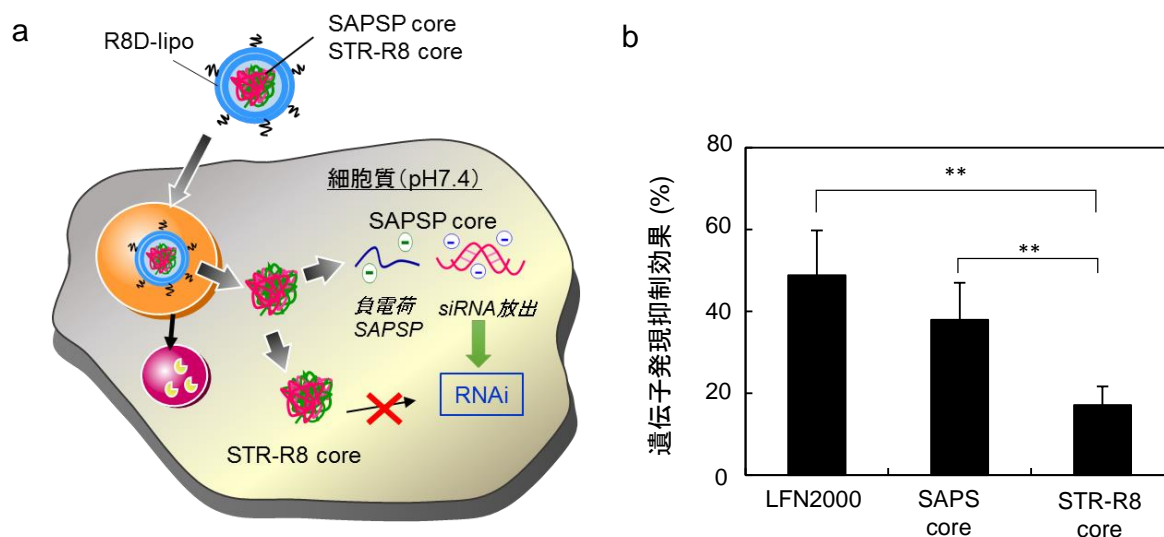


図 4-5 . SAPSP コア及び STR-R8 コアの遺伝子発現抑制効果 (RNAi 効果)

(a) 遺伝子発現抑制効果の評価の概要図。siRNA コアを D-lipo に封入し、細胞内へ送達後、SAPSP では siRNA が効率よく放出されることで RNAi 効果が向上すると考えられる。(b) Control siRNA、anti-luciferase siRNA を用いた SAPSP コア、STR-R8 コアを作製し (N/P=5.5)、D-lipo に封入した。ルシフェラーゼ安定発現株の B16-F 細胞 (B6-F1-luc) に添加し、37°C、5% CO₂、10 時間インキュベート後、ルシフェラーゼ活性を測定した。データは、control siRNA に対する anti-luciferase siRNA でのルシフェラーゼ発現抑制率を算出し、%で表した。データは mean ± S.D.として示した。(**, P<0.01, n=4)

表 4-2. D-lipo 及び R8D-lipo の物性 (pH 7.4)

sample	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
D-lipo (SAPSP)	193±54	0.30±0.06	-15±1
R8D-lipo (SAPSP)	262±55	0.19±0.03	21±3
D-lipo (STR-R8)	216±40	0.31±0.12	-16±2
R8D-lipo (STR-R8)	225±38	0.23±0.07	27±11

データは mean±S.D.として示した。(n=6)

4-3-5 SAPSP コアの mRNA の翻訳への影響

これまでの検討により、SAPSP コア中の SAPSP が細胞質環境の pH 7.4 で負電荷になることで siRNA が放出されることにより、高い RNAi 効果が誘導可能であることが示された。次に、細胞質内に残存する SAPSP の内在性 mRNA への影響について検討した。Rabbit Reticulocyte Lysate による *in vitro* translation system を用いて、Control siRNA を用いた SAPSP コアまたは STR-R8 コアを添加した場合の mRNA (luciferase) の翻訳活性を評価した。SAPSP または STR-R8 が mRNA に影響する場合は翻訳が阻害され、ルシフェラーゼ活性が抑制されることが考えられる (図 4-6a)。コアを添加せずに mRNA 単独のルシフェラーゼ活性を 100 %コントロールとし、それぞれのコアを添加した場合の活性をコントロールに対する割合で示した。その結果、free siRNA のみを添加した場合では、コントロールと同程度のルシフェラーゼ活性であったことから、本システムにおいて、siRNA は mRNA の翻訳に影響を及ぼさないことが示された。そこで、本システムに SAPSP コアあるいは STR-R8 コアを添加した結果、STR-R8 コアでは 95 %以上もルシフェラーゼ活性が低下したが、SAPSP コアの場合はわずか 10 %以下の低下しか認められず、mRNA の翻訳はほとんど阻害されなかった (図 4-6b)。したがって、カチオン性ペプチドを用いた場合に比べ、SAPSP は細胞質で負電荷となることで、効率的に siRNA が放出されるだけでなく、mRNA の翻訳活性を阻害する可能性が低いことが示された。

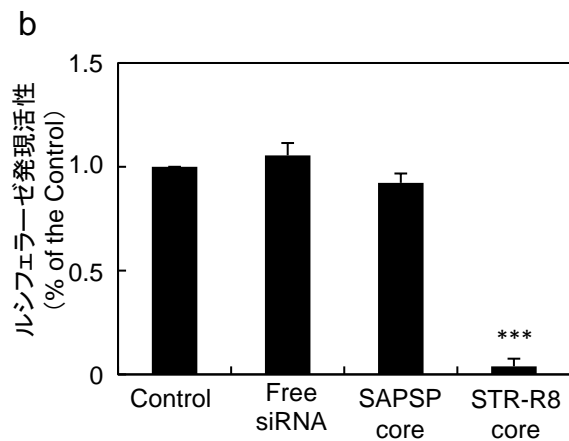
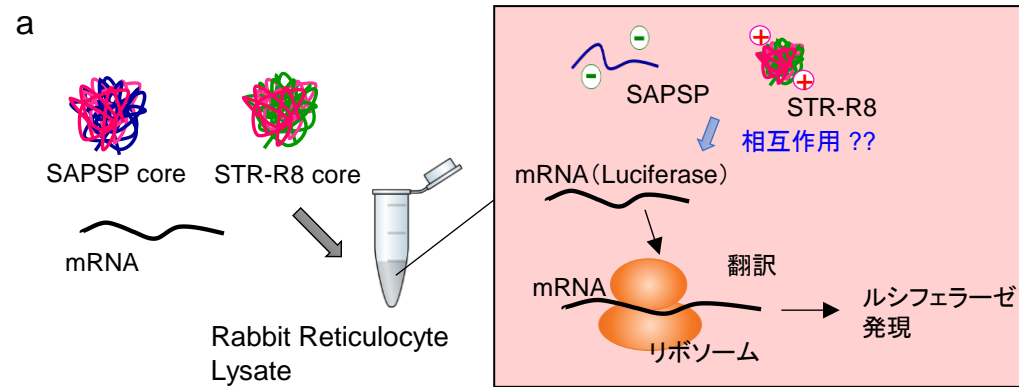


図 4-6 . *In vitro* 翻訳

(a) SAPSP、STR-R8 による mRNA 阻害の *in vitro* 翻訳を用いた評価の概略図。

(b) SAPSP コア及び STR-R8 コアと mRNA (Control luciferase mRNA) を混合し、10 分氷上でインキュベート後、Rabbit Reticulocyte Lysate による *in vitro* translation system を用いて mRNA の翻訳活性をルシフェラーゼ活性測定により評価した。結果は、Control (mRNA のみ) のルシフェラーゼ活性に対する各サンプルのルシフェラーゼ活性の割合で示した。データは mean \pm S.D.として示した。(**, $P < 0.001$, $n=3$)

4-4 考察

siRNA 医薬の成功の鍵は効率的なデリバリーシステムの開発である。これまでに、siRNA の全身投与製剤として多くの人工キャリアーが開発されてきたが、その導入効果その低い送達効率のため、十分な治療効果が得られていないのが現状である。siRNA は、細胞質で RISC に取り込まれて機能を発揮するため¹⁶⁴⁾、キャリアーによって送達された siRNA が細胞質で free 型として放出されることが重要である。そこで本研究では、siRNA の放出を促進させるために、著者らが開発した pH 応答性電荷反転型ペプチド SAPSP を利用することを考えた。

これまでに、負電荷を有する核酸と静電的作用によって簡便に粒子形成可能な各種の正電荷ポリマーや脂質が *in vitro* あるいは *in vivo* 用の核酸キャリアーとして用いられてきた^{165,166)}。代表例としてポリエチレンイミン (PEI) が挙げられるが、PEI はエンドソーム内の酸性環境でプロトンスポンジ効果によってエンドソーム膜が破壊されるために、細胞質送達を促進する効果を有することが報告されている^{32,62)}、しかし、カチオン性リポソームを用いた lipoplex に比べて、PEI は電荷密度が高いため、複合体から核酸の放出性が劣ることが報告されている¹⁶⁷⁾。また、lipoplex は細胞内に取り込まれた後、エンドソーム膜との flip-flop によって、リポソーム膜をエンドソーム内に残存した状態で、細胞質に核酸を放出可能であることが報告されている¹⁶⁸⁾。そのため、lipoplex は核酸と強固に相互作用するカチオン性ポリマーに比べて、細胞質へ free 型核酸を送達されやすいキャリアーであるため、高い導入効果が期待できる。しかし、lipoplex の *in vivo* への応用を考えた場合、血中タンパク質と相互作用しやすいため標的組織への送達効率が低いだけでなく、lipoplex では核酸が剥き出しで存在するため、ヌクレアーゼによる分解を回避することは困難である。このような問題を解決するためには、リポソームが有用であると考えられる。しかし、リポソーム内に siRNA を高効率で封入するためには、siRNA をカチオン性ポリマーやペプチド等で凝集化する必要がある。しかし、この siRNA コアからの siRNA 放出が siRNA の機能発現における律速段階の 1 つである。リポソームは物性を簡便に制御できるだけでなく、各種の機能性素子を組み込むことも可能であるため、上述した siRNA コアからの siRNA 放出効率を改善することができれば従来のカチオン性キャリアーに比べて、高い RNAi 効果を誘導することが期待できる DDS となり得ると考えられる。

そこで、本研究では細胞質で siRNA の放出を促進可能な siRNA コアを形成するための凝集剤として pH 応答性ペプチド SAPSP を利用した。SAPSP が正電荷を有する pH 4.0 で siRNA と最適な比で混合することで siRNA コアを作製した。この SAPSP コアは、細胞質条件の pH 7.4 で EtBr の蛍光が 90 %以上回復し、電気泳動でも naked siRNA と同程度の泳動が認められたことから、siRNA は SAPSP コアから、ほぼ完全に放出されていることが示された (図 4-3b,c)。また、SAPSP は STR-R8 と比べ、コア作製条件の pH 4.0 において EtBr の蛍光強度が高かったことから (図 4-3b)、SAPSP は STR-R8 よりも siRNA とルーズなコア構造を形成することが示唆された。これは、SAPSP は、負電荷を有するグルタミン酸と、ヒスチジンが不連続に配置されているため、アルギニンが連続している STR-R8 よりも正電荷密度が低くなっているためではないかと推察された。一方で、ステアリル化オクタヒスチジン (STR-H8) を用いた siRNA コアでも、同様に、ヒスチジンの電荷の消失によって siRNA を放出可能であることが報告がされている¹⁶⁹⁾。低 pH で STR-H8 は

STR-R8 と同程度に siRNA が強く凝集化され、pH 7.4 での siRNA 放出は約 40 % 程度であった。これは、STR-H8 は、ヒスチジンが連続しているため、電荷密度が高くなり、強く凝集化することができるが、一方で pH 変化による脱プロトン化効率は低いことが予想され、siRNA が放出されにくかったと推察される。SAPSP はヒスチジンとグルタミン酸が不連続に配置されているため、電荷密度も低く、siRNA とルーズな凝集体を形成することで、脱プロトン化も比較的容易なのではないかと考えられる。したがって、SAPSP コアからの高効率な siRNA の放出の引き金は、SAPSP が pH 変化に応答して負電荷へ反転することであるが、SAPSP コアのルーズな構造も siRNA の放出に有利に働いている可能性が示唆された。

SAPSP コアからの siRNA の高効率な放出は培養細胞においても観察され (図 4-4)、さらに、SAPSP コア をリポソーム型キャリアーに封入した場合、STR-R8 コアに比べ、ルシフェラーゼの遺伝子発現抑制効果が 2 倍増大した (図 4-5)。したがって、SAPSP コアが細胞質 pH に応答して siRNA を効率的に放出することが siRNA 効果の増強に繋がることが示された。

さらに、SAPSP の凝縮剤としての利点は、siRNA の放出に限ったことではない。図 4-6 では、SAPSP コアと STR-R8 コアを *in vitro* 翻訳システムにおいて翻訳活性を比較した。その結果、STR-R8 コアではタンパク質合成が、約 95 % も阻害されたのに対し、SAPSP コアではほとんど変化なかった。これは、正電荷の STR-R8 は細胞質で mRNA と静電的相互作用をすることにより翻訳を阻害するが、SAPSP は負電荷となることで、mRNA と相互作用しないために、翻訳阻害を回避できることが示唆された。細胞質には siRNA の標的以外の mRNA も存在し、タンパク質が合成されているため、カチオン性のポリマー等は、STR-R8 で認められたように、非特異的な mRNA との相互作用によるタンパク質合成の阻害が懸念されるが、細胞質で負電荷となる SAPSP は、そのような阻害が起こりにくいことが示唆された。また、標的以外の mRNA の阻害だけではなく、標的 mRNA についても同様であると考えらる。さらに、カチオン性の脂質ベースのトランスフェクション試薬である LFN2000 は、転写後の過程において、mRNA と相互作用し、タンパク質合成を阻害することが報告されている¹⁷⁰⁾。SAPSP コアの場合は、コアを正電荷とすることで、リポソームの表面電荷を負電荷にすることができ、脂質膜が細胞質に残ったとしても、mRNA に対する影響は少ないと考えられ、特異性及び低毒性の点で、優れた siRNA キャリアーであると考えられる。

これらの結果より、SAPSP コアを封入したリポソーム型キャリアーを用いることで、細胞質送達のみならず、細胞内放出も制御することで、より効果的に RNAi 効果を誘導することが可能であることが示された。つまり、細胞質内で siRNA が free 型となることが重要であり、また、キャリアーに用いた素材が siRNA や mRNA を阻害しないことが siRNA の機能性発揮を亢進すると考えられる。この SAPSP を用いた siRNA コアのシステムは、封入する脂質膜や機能性素子を目的に合わせて多様に変化させることができるため、第 2 章や第 3 章の DDS との組み合わせることで、生体内で高い RNAi 効果を誘導することが可能な核酸キャリアーが開発されることを期待する。

4-5 小括

本章では、核酸の細胞質で効率的に核酸を放出するシステムを開発するために、第2章で開発した pH 応答性ペプチドの SAPSP を利用した。SAPSP の pH 変化による電荷の反転を利用することで、低 pH 条件での siRNA の凝縮と、生理的 pH での凝集体からの siRNA の放出が可能であることが示された。このシステムにより、従来凝縮剤として用いられてきたカチオン性ペプチドから形成される STR-R8 コアに比べ、SAPSP コアでは細胞質 pH (pH 7.4) で効率的に siRNA がリリースされ、その RNAi 効果が向上することが明らかとなった。pH 応答性ペプチド SAPSP を siRNA との凝集剤に利用することで、細胞質 pH に応答して siRNA が放出され、高い RNAi 効果を誘導することができるシステムを構築することができた。SAPSP は、第2章で示したような体内動態と細胞内動態の制御のみならず、細胞質内での核酸の動態も制御可能であることが示唆された。これは、siRNA と SAPSP の静電的相互作用を利用したものであり、siRNA に限らず、負電荷を有する他の核酸等にも応用可能であり、核酸医薬品のためのキャリアー基材として、広く応用されることを期待する。

総括

総括

本研究では、活性型薬物をその作用部位である細胞質へ効率的に送達可能な DDS を構築するために必要な体内動態、細胞内動態、及び細胞質における薬物放出の各過程制御可能な機能性素子を開発し、それらを薬物キャリアーに搭載することで、革新的ながん治療 DDS を構築することを目的とした。

第 1 章では、特異性の高い薬物としてがん治療への応用も期待されている抗体の細胞質デリバリーシステムの開発を行った。アルギニンを含む膜透過性ポリマー CPP と抗体の Fc 領域との親和性を高めた protein A 誘導体を連結させた CPP-pAd を設計した。これは、細胞質へ効率的に抗体を送達可能であり、送達された抗体が細胞内標的タンパク質と結合することも確認された。しかし、このようなキャリアーは血中滞留性や標的化が困難であり、生体への応用は限られるため、第 2 章では、体内動態と細胞内動態を制御可能な素子として新たに腫瘍環境の低 pH 応答性ペプチド SAPSP を開発した。これをリポソームに修飾することで、表面電荷が負電荷から正電荷への反転が認められ、腫瘍への集積性と細胞内への取り込みが制御可能な DDS の構築に成功した。さらに、リポソーム型キャリアーによって送達された薬物による薬効発現の律速段階の一つは、リポソームからの薬物放出過程であるため、第 3 章ではがん細胞膜に発現しているプロテアーゼによって切断されるペプチド LMDP を脂質膜に組み込んだリポソームを開発した。これは、がん細胞の形質膜上のプロテアーゼによって切断されることで、細胞へ取り込まれると同時に速やかに内封薬物を放出可能であることが示された。さらに、核酸 (siRNA) キャリアーによって細胞質に送達された後の核酸放出を促進するために、第 2 章で開発した SAPSP を利用した siRNA コアを開発した。これは、低 pH (pH 4.0) で正電荷の SAPSP で調製した siRNA コアが細胞質の pH (pH 7.4) に応答して負電荷となることで siRNA との静電的相互作用が減弱し、効率的に siRNA を放出可能であることが示唆された。このように、体内動態から薬物放出までの各過程の障壁を突破することで、特異的な抗がん効果を示す核酸や分子標的薬等を細胞質内に活性型として送達することが可能であると考えられる。これらの素子を DDS に搭載することで、薬物送達の問題点が解決され、効果的ながん治療法の開発に繋がることを期待する。

現在では、DDS 製剤の臨床応用が盛んに行われつつあり、リポソーム製剤としては日本では 3 品目が上市されているに過ぎないが、世界では 10 以上の製剤が上市されている。米国 FDA によって、2002 年に「リポソーム製剤に関するガイドライン (案)」が公表されたことをきっかけとして、ガイドラインの整備も進められてきた。核酸医薬の発展や近年の実用化に向けた開発の進歩からも、今後 DDS 製剤は確実に増えていくことが予想される。製剤化においては、有効性のみならず品質や安定性、安全性も重要であるが、新規開発した機能性素子等はこれまで使用されていない「添加物」に相当する。そのため、様々な機能性素子を多数組み合わせることで複雑化すればするほど、「添加物」も多くなるため、品質の確保が困難となり、毒性も懸念されるだろう。本研究のコンセプトである体内動態、細胞内動態、細胞内での薬物放出の各過程を制御することは、これまで生体内での有効性の面で困難であった薬物の実用化への道を切り開くものとして期待されるが、各過程を突破可能な機能性素子を単純に組み合わせるのではなく、各過程を複数制

御可能な単一素子を開発することが、実用化する上で重要であると考えられる。本研究で開発した **SAPSP** は腫瘍への集積と細胞内取り込みの 2 重の機能性を有しており、改善の余地はあるものの体内動態と細胞内動態の両過程を制御可能な機能性素子であると考えている。この **SAPSP** に、生体内での安定性と標的部位での崩壊の両方の機能を付与することは決して容易ではないが、各過程を制御可能な機能性素子の開発情報を新規機能性素子の設計にフィードバックすることで、薬物送達における全ての障害を突破可能な単一の機能性素子の開発に繋がると信じている。これらの知見が今後のがん治療 **DDS** 製剤の進歩に貢献できることを期待する。

引用文献

引用文献

- 1) Lord C. J., Ashworth A., The DNA damage response and cancer therapy., *Nature*, **481**, 287-294 (2012).
- 2) Bertram J. S., The molecular biology of cancer., *Mol. Aspects Med.*, **21**, 167-223 (2000).
- 3) Hennings H., Glick A. B., Greenhalgh D. A., Morgan D. L., Strickland J. E., Tennenbaum T., Yuspa S. H., Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **202**, 1-8 (1993).
- 4) Espinosa E., Zamora P., Feliu J., González Barón M., Classification of anticancer drugs-a new system based on therapeutic targets., *Cancer Treat. Rev.*, **29**, 515-523 (2003).
- 5) Nielsen D., Maare C., Skovsgaard T., Cellular resistance to anthracyclines., *Gen. Pharmacol.*, **27**, 251-255 (1996).
- 6) Robert J. Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches., *Eur. J. Clin. Invest.*, **29**, 536-545 (1999).
- 7) Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S., Drug resistance in cancer: an overview., *Cancers (Basel)*, **6**, 1769-1792 (2014).
- 8) Matsumura Y., Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs., *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986).
- 9) Maeda H., Nakamura H., Fang J., The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 71-79 (2013).
- 10) Oku N., Namba Y., Long-circulating liposomes., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **11**, 231-270 (1994).
- 11) Klibanov A. L., Maruyama K., Torchilin V. P., Huang L., Amphipathic polyethylene glycols effectively prolong the circulation time of liposomes., *FEBS Lett.*, **268**, 235-237 (1990).
- 12) Biswas S., Deshpande P. P., Perche F., Dodwadkar N. S., Sane S. D., Torchilin V. P., Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: an effective treatment strategy for non-small cell lung cancer., *Cancer Lett.*, **335**, 191-200 (2013).
- 13) Iyer A. K., Singh A., Ganta S., Amiji M. M., Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 1784-1802 (2013).
- 14) Abu Lila A. S., Ishida T., Kiwada H., Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes., *Pharm. Res.*, **27**, 1171-1183 (2010).
- 15) Maeda H., The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect., *Cancer Sci.*, **104**, 779-789 (2013).
- 16) Guo S., Zou J., Wang G., Advances in the proteomic discovery of novel therapeutic targets in cancer., *Drug Des. Devel. Ther.*, **7**, 1259-1271 (2013).

- 17) Roti G., Stegmaier K., Genetic and proteomic approaches to identify cancer drug targets., *Br. J. Cancer*, **106**, 254-261 (2012).
- 18) Traxler P., Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures., *Expert Opin. Ther. Targets*, **7**, 215-234 (2003).
- 19) Ricciuti B., Mecca C., Crinò L., Baglivo S., Cenci M., Metro G., Non-coding RNAs in lung cancer., *Oncoscience*, **1**, 674-705 (2014).
- 20) Morrissey D. V., Lockridge J. A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Jeffs L. B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B., Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1002-1007 (2005).
- 21) Crooke S. T., Geary R. S., Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **76**, 269-276 (2013).
- 22) Ishida T., Kiwada H., Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes., *Int. J. Pharm.*, **354**, 56-62 (2008).
- 23) Abu Lila A. S., Kiwada H., Ishida T., The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage., *J. Control. Release*, **172**, 38-47 (2013).
- 24) Takahashi Y., Cleary K. R., Mai M., Kitadai Y., Bucana C. D., Ellis L. M., Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer., *Clin. Cancer Res.*, **2**, 1679-1684 (1996).
- 25) Sofuni A., Iijima H., Moriyasu F., Nakayama D., Shimizu M., Nakamura K., Itokawa F., Itoi T., Differential diagnosis of pancreatic tumors using ultrasound contrast imaging., *J. Gastroenterol.*, **40**, 518-525 (2005).
- 26) Kano M. R., Bae Y., Iwata C., Morishita Y., Yashiro M., Oka M., Fujii T., Komuro A., Kiyono K., Kaminishi M., Hirakawa K., Ouchi Y., Nishiyama N., Kataoka K., Miyazono K., Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 3460-3465 (2007).
- 27) Yano J., Hirabayashi K., Nakagawa S., Yamaguchi T., Nogawa M., Kashimori I., Naito H., Kitagawa H., Ishiyama K., Ohgi T., Irimura T., Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 7721-7768 (2004).
- 28) Van Dyke R. W., Acidification of lysosomes and endosomes., *Subcell. Biochem.*, **27**, 331-360 (1996).
- 29) Li W., Nicol F., Szoka F.C. Jr., GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 967-985 (2004).
- 30) Nakase I., Kogure K., Harashima H., Futaki S., Application of a fusogenic peptide GALA for intracellular delivery., *Methods Mol. Biol.*, **683**, 525-533 (2011).
- 31) de Lima M. C., Simões S., Pires P., Gaspar R., Slepishkin V., Düzgüneş N., Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection., *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 103-109 (1999).
- 32) Benjaminsen R. V., Mattheijer M. A., Henriksen J. R., Moghimi S. M., Andresen T. L., The possible

- "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH., *Mol. Ther.*, **21**, 149-157 (2013).
- 33) Midoux P., Pichon C., Yaouanc J. J., Jaffrès P. A., Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers., *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 166-178 (2009).
 - 34) Shigeta K., Kawakami S., Higuchi Y., Okuda T., Yagi H., Yamashita F., Hashida M., Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte-selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells., *J. Control. Release*, **118**, 262-270 (2007).
 - 35) Maruyama K., Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 161-169 (2011).
 - 36) Mishra S., Webster P., Davis M. E., PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles., *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 197-111 (2004).
 - 37) Hatakeyama H., Akita H., Kogure K., Oishi M., Nagasaki Y., Kihira Y., Ueno M., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid., *Gene Ther.*, **14**, 68-77 (2007).
 - 38) Gomes-da-Silva L. C., Fonseca N. A., Moura V., Pedroso de Lima M. C., Simões S., Moreira J. N., Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges., *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1163-1171 (2012).
 - 39) Kumar V., Qin J., Jiang Y., Duncan R. G., Brigham B., Fishman S., Nair J. K., Akinc A., Barros S. A., Kasperkovitz P. V., Shielding of lipid nanoparticles for siRNA delivery: Impact on physicochemical properties, cytokine induction, and efficacy., *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **3**, e210 (2014).
 - 40) Li Y., Wang J., Gao Y., Zhu J., Wientjes M. G., Au J. L., Relationships between liposome properties, cell membrane binding, intracellular processing, and intracellular bioavailability., *AAPS J.*, **13**, 585-597 (2011).
 - 41) Tseng Y. C., Mozumdar S., Huang L., Lipid-based systemic delivery of siRNA., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 721-731. (2009).
 - 42) Kogure K., Moriguchi R., Sasaki K., Ueno M., Futaki S., Harashima H., Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method., *J. Control. Release*, **98**, 317-23 (2004).
 - 43) Toita R., Kang J. H., Kim J. H., Tomiyama T., Mori T., Niidome T., Jun B., Katayama Y., Protein kinase C alpha-specific peptide substrate graft-type copolymer for cancer cell-specific gene regulation systems., *J. Control. Release*, **139**, 133-139 (2009).
 - 44) Tomiyama T., Toita R., Kang J. H., Asai D., Shiosaki S., Mori T., Niidome T., Katayama Y., Tumor therapy by gene regulation system responding to cellular signal., *J. Control. Release*, **148**, 101-105 (2010).
 - 45) Köhler G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity., *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
 - 46) Marks J. D., Hoogenboom H. R., Bonnert T. P., McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., By-passing

- immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage., *J. Mol. Biol.*, **222**, 581-597 (1991).
- 47) Griffiths A. D., Production of human antibodies using bacteriophage., *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 263-267 (1993).
 - 48) Green L. L., Transgenic mouse strains as platforms for the successful discovery and development of human therapeutic monoclonal antibodies., *Curr. Drug Discov. Technol.*, **11**, 74-84 (2014).
 - 49) Kondo Y., Fushikida K., Fujieda T., Sakai K., Miyata K., Kato F., Kato M., Efficient delivery of antibody into living cells using a novel HVJ envelope vector system., *J. Immunol. Methods*, **332**, 10-17 (2008).
 - 50) Futaki S., Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 547-558 (2005).
 - 51) Majima E., Shima A., Hara Y., European patent 1992692 (2007).
 - 52) Hafez I. M., Cullis P. R., Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 139-148 (2001).
 - 53) Ikeda H., Tonosaki M., U. S. Patent 6809190B2 (2004).
 - 54) Patel S. S., Belmont B. J., Sante J. M., Rexach M. F., Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex., *Cell*, **129**, 83-96 (2007).
 - 55) Futaki S., Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms., *Biopolymers*, **84**, 241-249 (2006).
 - 56) Kosuge M., Takeuchi T., Nakase I., Jones A. T., Futaki S., Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans., *Bioconjug. Chem.*, **19**, 656-664 (2008).
 - 57) Nakase I., Tadokoro A., Kawabata N., Takeuchi T., Katoh H., Hiramoto K., Negishi M., Nomizu M., Sugiura Y., Futaki S., Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis., *Biochemistry*, **46**, 492-501 (2007).
 - 58) Potocky T. B., Silvius J., Menon A. K., Gellman S. H., HeLa cell entry by guanidinium-rich beta-peptides: importance of specific cation-cell surface interactions., *ChemBiochem.*, **8**, 917-926 (2007).
 - 59) Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H., Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA., *J. Control. Release*, **119**, 360-367 (2007).
 - 60) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., Octaarginine-modified liposomes: enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking., *Int. J. Pharm.*, **354**, 39-48 (2008).
 - 61) Khalil I. A., Kogure K., Futaki S., Harashima H., High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544-3551 (2006).
 - 62) Akinc A. Thomas M., Klivanov A. M., Langer R., Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis., *J. Gene Med.*, **7**, 657-663 (2005).
 - 63) Belokoneva O. S., Villegas E., Corzo G., Dai L., Nakajima T., The hemolytic activity of six arachnid

- cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers., *Biochim. Biophys. Acta*, **1617**, 22-30 (2003).
- 64) Zhao Y., Lou D., Burkett J., Kohler H., Chemical engineering of cell penetrating antibodies., *J. Immunol. Methods*, **254**, 137-145 (2001).
 - 65) Zhao Y., Brown T. L., Kohler H., Müller S., MTS-conjugated-antiactive caspase 3 antibodies inhibit actinomycin D-induced apoptosis., *Apoptosis*, **8**, 631-637 (2003).
 - 66) Lamaze C., Schmid S. L., The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 573-580 (1995).
 - 67) Takei K., Haucke V., Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger., *Trends. Cell Biol.*, **11**, 385-391 (2001).
 - 68) Swanson J. A., Watts C., Macropinocytosis., *Trends. Cell Biol.*, **5**, 424-428 (1995).
 - 69) Lim J. P., Gleeson P. A., Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps., *Immunol. Cell Biol.*, **89**, 836-843 (2011).
 - 70) Meier O., Boucke K., Hammer S. V., Keller S., Stidwill R. P., Hemmi S., Greber U. F., Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake., *J. Cell Biol.*, **158**, 1119-1131 (2002).
 - 71) Eloy J. O., Claro de Souza M., Petrilli R., Barcellos J. P., Lee R. J., Marchetti J. M., Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery., *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **123**, 345-363 (2014).
 - 72) Allen T. M., Liposomes. Opportunities in drug delivery., *Drugs*, **54**, 8-14 (1997).
 - 73) Drummond D. C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D. B., Papahadjopoulos D., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors., *Pharmacol. Rev.*, **51**, 691-743 (1999).
 - 74) Francis G. E., Delgado C., Fisher D., Malik F., Agrawal A. K., Polyethylene glycol modification: relevance of improved methodology to tumour targeting., *J. Drug Target*, **3**, 321-340 (1996).
 - 75) Mishra S., Webster P., Davis M. E., PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles., *Eur. J. Cell Biol.*, **83**, 97-111 (2004).
 - 76) van der Meel R., Vehmeijer L. J., Kok R. J., Storm G., van Gaal E. V., Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 1284-1298 (2013).
 - 77) Suzuki R., Takizawa T., Kuwata Y., Mutoh M., Ishiguro N., Utoguchi N., Shinohara A., Eriguchi M., Yanagie H., Maruyama K., Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome., *Int. J. Pharm.*, **346**, 143-150 (2008).
 - 78) Salvati A., Pitek A. S., Monopoli M. P., Prapainop K., Bombelli F. B., Hristov D. R., Kelly P. M., Åberg C., Mahon E., Dawson K. A., Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface., *Nat. Nanotechnol.*, **8**, 137-143 (2013).
 - 79) Catalano V., Turdo A., Di Franco S., Dieli F., Todaro M., Stassi G., Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay., *Semin. Cancer Biol.*, **23**, 522-532 (2013).

- 80) Peppicelli S., Bianchini F., Calorini L., Extracellular acidity, a "reappreciated" trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy., *Cancer Metastasis Rev.*, **33**, 823-832 (2014).
- 81) Engin K., Leeper D. B., Cater J. R., Thistlethwaite A. J., Tupchong L., McFarlane J. D., Extracellular pH distribution in human tumours., *Int. J. Hyperthermia*, **11**, 211-216 (1995).
- 82) Midoux P., Pichon C., Yaouanc J. J., Jaffrès P. A., Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers., *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 166-178 (2009).
- 83) Thomas P. G., Russell A. J., Fersht A. R., Tailoring the pH dependence of enzyme catalysis using protein engineering., *Nature*, **318**, 375-376 (1985).
- 84) Russell A. J., Thomas P. G., Fersht A. R., Electrostatic effects on modification of charged groups in the active site cleft of subtilisin by protein engineering., *J. Mol. Biol.*, **193**, 803-813 (1987).
- 85) Oort A., Katgert P., Windhorst R. A., A direct determination of linear-size evolution of elliptical radio galaxies., *Nature*, **328**, 500-501 (1987).
- 86) Tijsterman M., Plasterk R. H., Dicers at RISC; the mechanism of RNAi., *Cell*, **117**, 1-3 (2004).
- 87) Kerman A., Ananthanarayanan V. S., Conformation of a double-membrane-spanning fragment of a G protein-coupled receptor: effects of hydrophobic environment and pH., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1199-1210 (2007).
- 88) Liu L. P., Deber C. M., Guidelines for membrane protein engineering derived from de novo designed model peptides., *Biopolymers*, **47**, 41-62 (1998).
- 89) Wiethoff C. M., Smith J. G., Koe G. S., Middaugh C. R., The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans., *J. Biol. Chem.*, **276**, 32806-32813 (2001).
- 90) Mounkes L. C., Zhong W., Cipres-Palacin G., Heath T. D., Debs R. J., Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26164-26170 (1998).
- 91) Kirn-Safran C., Farach-Carson M. C., Carson D. D., Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans., *Cell Mol. Life Sci.*, **66**, 3421-3434 (2009).
- 92) Andreev O. A., Karabadzha A. G., Weerakkody D., Andreev G. O., Engelman D. M., Reshetnyak Y. K., pH (low) insertion peptide (pHLIP) inserts across a lipid bilayer as a helix and exits by a different path., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 4081-4086 (2010).
- 93) Deacon J. C., Engelman D. M., Barrera F. N., Targeting acidity in diseased tissues: Mechanism and applications of the membrane-inserting peptide, pHLIP. *Arch. Biochem. Biophys.*, **565C**, 40-48 (2015).
- 94) Hunt J. F., Rath P., Rothschild K. J., Engelman D. M., Spontaneous, pH-dependent membrane insertion of a transbilayer alpha-helix., *Biochemistry*, **36**, 15177-15192 (1997).
- 95) Kinosita K. Jr., Kawato S., Ikegami A., A theory of fluorescence polarization decay in membranes., *Biophys. J.*, **20**, 289-305 (1977).

- 96) M'Baye G., Mély Y., Duportail G., Klymchenko A. S., Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration., *Biophys. J.*, **95**, 1217-1225 (2008).
- 97) Zoonens M., Reshetnyak Y. K., Engelman D. M., Bilayer interactions of pHLIP, a peptide that can deliver drugs and target tumors., *Biophys. J.*, **95**, 225-235 (2008).
- 98) Plénat T., Boichot S., Dosset P., Milhiet P. E., Le Grimmeléc C., Coexistence of a two-states organization for a cell-penetrating peptide in lipid bilayer., *Biophys. J.*, **89**, 4300-4309 (2005).
- 99) Tiriveedhi V., Butko P., A fluorescence spectroscopy study on the interactions of the TAT-PTD peptide with model lipid membranes., *Biochemistry*, **46**, 3888-3895 (2007).
- 100) Sahay G., Alakhova D. Y., Kabanov A. V., Endocytosis of nanomedicines., *J. Control. Release*, **145**, 182-195 (2010).
- 101) Khalil I. A., Kogure K., Akita H., Harashima H., Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32-45 (2006).
- 102) Struck D. K., Hoekstra D., Pagano R. E., Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion., *Biochemistry*, **20**, 4093-4099 (1981).
- 103) Liu R., Sharom F. J., Proximity of the nucleotide binding domains of the P-glycoprotein multidrug transporter to the membrane surface: a resonance energy transfer study., *Biochemistry*, **37**, 6503-6512 (1998).
- 104) Yuba E., Harada A., Sakanishi Y., Kono K., Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes., *J. Control. Release*, **149**, 72-80 (2011).
- 105) Akita H., Kudo A., Minoura A., Yamaguti M., Khalil I. A., Moriguchi R., Masuda T., Danev R., Nagayama K., Kogure K., Harashima H., Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process., *Biomaterials*, **30**, 2940-2949 (2009).
- 106) Yamada Y., Akita H., Kamiya H., Kogure K., Yamamoto T., Shinohara Y., Yamashita K., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H., MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1778**, 423-432 (2008).
- 107) Madeira C., Loura L. M., Prieto M., Fedorov A., Aires-Barros M. R., Effect of ionic strength and presence of serum on lipoplexes structure monitored by FRET., *BMC Biotechnol.*, **8**, 20 (2008).
- 108) Lemeshko V. V., Competitive interactions of amphipathic polycationic peptides and cationic fluorescent probes with lipid membrane: experimental approaches and computational model., *Arch. Biochem. Biophys.*, **545**, 167-178 (2014).
- 109) Wu X. L., Kim J. H., Koo H., Bae S. M., Shin H., Kim M. S., Lee B. H., Park R. W., Kim I. S., Choi K., Kwon I. C., Kim K., Lee D. S., Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy., *Bioconjug. Chem.*, **21**, 208-213 (2010).
- 110) Bersani S., Vila-Caballer M., Brazzale C., Barattin M., Salmaso S., pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine) decorated liposomes for the delivery of gemcitabine to cancer cells., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **88**, 670-682 (2014).

- 111) Wang H., Yang L., Rempel G. L., Preparation of pH-responsive polymer core-shell nanospheres for delivery of hydrophobic antineoplastic drug ellipticine., *Macromol. Biosci.*, **14**, 166-172 (2014).
- 112) Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V. P., Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity., *J. Control. Release*, **160**, 264-273 (2012).
- 113) Li S., Tseng W. C., Stolz D. B., Wu S. P., Watkins S. C., Huang L., Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection., *Gene Ther.*, **6**, 585-594 (1999).
- 114) Drummond D. C., Noble C. O., Hayes M. E., Park J. W., Kirpotin D. B., Pharmacokinetics and *in vivo* drug release rates in liposomal nanocarrier development., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 4696-4740 (2008).
- 115) Lee J. S., Ankone M., Pieters E., Schiffrers R. M., Hennink W. E., Feijen J., Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing mice: comparison with stealth liposomes., *J. Control. Release*, **155**, 282-288 (2011).
- 116) Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H., Kawashima Y., Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and RES uptake in rats., *J. Control. Release*, **68**, 195-205 (2000).
- 117) Yamamoto Y., Nagasaki Y., Kato Y., Sugiyama Y., Kataoka K., Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge., *J. Control. Release*, **77**, 27-38 (2001).
- 118) Troster S. D., Kreuter J., Contact angles of surfactants with a potential to alter the body distribution of colloidal drug carriers on poly(methyl methacrylate) surfaces, *Int. J. Pharm.*, **45**, 91-100 (1988).
- 119) Romberg B., Oussoren C., Snel C. J., Hennink W. E., Storm G., Effect of liposome characteristics and dose on the pharmacokinetics of liposomes coated with poly(amino acid)s., *Pharm. Res.*, **24**, 2394-2401 (2007).
- 120) Woodle M. C., Engbers C. M., Zalipsky S., New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes., *Bioconjug. Chem.*, **5**, 493-496 (1994).
- 121) Maruyama K., Okuizumi S., Ishida O., Yamauchi H., Kikuchi H., Iwatsuru M., Phosphatidylpolyglycerols prolong liposome circulation *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, **111**, 103-107 (1994).
- 122) Whiteman K., Poly(HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice., *J. Liposome Res.*, **11**, 153-164 (2001).
- 123) Torchilin V. P., Levchenko T. S., Whiteman K. R., Yaroslavov A. A., Tsatsakis A. M., Rizos A. K., Michailova E. V., Shtilman M. I., Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification., *Biomaterials*, **22**, 3035-3044 (2001).
- 124) Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H., Kawashima Y., Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats., *J. Control. Release*, **75**, 83-91 (2001).
- 125) Xu H., Wang K. Q., Deng Y. H., Chen da W., Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *Biomaterials*, **31**, 4757-4763 (2010).

- 126) Romberg B., Metselaar J. M., deVringer T., Motonaga K., Kettenes-van den Bosch J. J., Oussoren C., Storm G., Hennink W. E., Enzymatic degradation of liposome-grafted poly(hydroxyethyl L-glutamine). *Bioconjug. Chem.*, **16**, 767-774 (2005).
- 127) Nir S., Nicol F., Szoka F. C. Jr., Surface aggregation and membrane penetration by peptides: relation to pore formation and fusion., *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 95-101 (1999).
- 128) Simões S., Moreira J. N., Fonseca C., Düzgüneş N., de Lima M. C., On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 947-965 (2004).
- 129) Sahay G., Querbes W., Alabi C., Eltoukhy A., Sarkar S., Zurenko C., Karagiannis E., Love K., Chen D., Zoncu R., Buganim Y., Schroeder A., Langer R., Anderson D. G., Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling., *Nat. Biotechnol.*, **31**, 653-658 (2013).
- 130) Pak C. C., Ali S., Janoff A. S., Meers P., Triggerable liposomal fusion by enzyme cleavage of a novel peptide-lipid conjugate., *Biochim. Biophys. Acta*, **1372**, 13-27 (1998).
- 131) Shih IeM., Wang T. L., Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy., *Cancer Res.*, **67**, 1879-1882 (2007).
- 132) Bulic B., Ness J., Hahn S., Rennhack A., Jumpertz T., Weggen S., Chemical Biology, Molecular Mechanism and Clinical Perspective of γ -Secretase Modulators in Alzheimer's Disease., *Curr. Neuropharmacol.*, **9**, 598-622 (2011).
- 133) Farmery M. R., Tjernberg L. O., Pursglove S. E., Bergman A., Winblad B., Näslund J., Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain., *J. Biol. Chem.*, **278**, 24277-24284 (2003).
- 134) Tomita T., Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by γ -secretase., *J. Biochem.*, **156**, 195-201 (2014).
- 135) Gomi M., Sonoyama M., Mitaku S., High performance system for signal peptide prediction: SOSUI signal., *Chem-Bio. Inf. J.*, **4**, 142-147 (2004).
- 136) Cho S., Lu M., He X., Ee P. L., Bhat U., Schneider E., Miele L., Beck W. T., Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 20778-20783 (2011).
- 137) Hayashi I., Takatori S., Urano Y., Miyake Y., Takagi J., Sakata-Yanagimoto M., Iwanari H., Osawa S., Morohashi Y., Li T., Wong P. C., Chiba S., Kodama T., Hamakubo T., Tomita T., Iwatsubo T., Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin., *Oncogene*, **31**, 787-798 (2011).
- 138) Chen Y., Li D., Liu H., Xu H., Zheng H., Qian F., Li W., Zhao C., Wang Z., Wang X., Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells., *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 14-21 (2011).
- 139) Pasternak S. H., Bagshaw R. D., Guiral M., Zhang S., Ackerley C. A., Pak B. J., Callahan J. W., Mahuran D. J., Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane., *J. Biol. Chem.*, **278**, 26687-26694 (2003).
- 140) Lehtinen J., Hyvönen Z., Subrizi A., Bunjes H., Urtti A., Glycosaminoglycan-resistant and

- pH-sensitive lipid-coated DNA complexes produced by detergent removal method., *J. Control. Release*, **131**, 145-149 (2008).
- 141) Vanić Z., Barnert S., Süß R., Schubert R., Fusogenic activity of PEGylated pH-sensitive liposomes., *J. Liposome Res.*, **22**, 148-157 (2012).
 - 142) Momekova D., Rangelov S., Yanev S., Nikolova E., Konstantinov S., Romberg B., Storm G., Lambov N., Long-circulating, pH-sensitive liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **32**, 308-317 (2007).
 - 143) Yingyuad P., Mével M., Prata C., Kontogiorgis C., Thanou M., Miller AD. Enzyme-triggered PEGylated siRNA-nanoparticles for controlled release of siRNA., *J. RNAi. Gene. Silencing.*, **10**, 490-499 (2014).
 - 144) Banerjee J., Hanson A. J., Gadam B., Elegbede A. I., Tobwala S., Ganguly B., Wagh A. V., Muhonen W. W., Law B., Shabb J. B., Srivastava D. K., Mallik S., Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9., *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1332-1339 (2009).
 - 145) Ranganathan P., Weaver K. L., Capobianco A. J., Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time., *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 338-351 (2011).
 - 146) Carvalho F. L., Simons B. W., Eberhart C. G., Berman D. M., Notch signaling in prostate cancer: A moving target., *Prostate*, **74**, 933-945 (2014).
 - 147) Wolfe M. S., The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble., *Biochemistry*, **45**, 7931-7939 (2006).
 - 148) Capaccione K. M., Pine S. R., The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival., *Carcinogenesis*, **34**, 1420-1430 (2013).
 - 149) Maraver A., Fernandez-Marcos P. J., Herranz D., Cañamero M., Muñoz-Martin M., Gómez-López G., Mulero F., Megías D., Sanchez-Carbayo M., Shen J., Sanchez-Cespedes M., Palomero T., Ferrando A., Serrano M., Therapeutic effect of γ -secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK., *Cancer Cell*, **22**, 222-234 (2012).
 - 150) Chen Y., Li D., Liu H., Xu H., Zheng H., Qian F., Li W., Zhao C., Wang Z., Wang X., Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells., *Cancer Biol. Ther.*, **11**, 14-21 (2011).
 - 151) Fraering P. C., Ye W., Strub J. M., Dolios G., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., van Dorsselaer A., Wang R., Selkoe D. J., Wolfe M. S., Purification and characterization of the human gamma-secretase complex., *Biochemistry*, **43**, 9774-9789 (2004).
 - 152) Dickey S. W., Baker R. P., Cho S., Urban S., Proteolysis inside the membrane is a rate-governed reaction not driven by substrate affinity., *Cell*, **155**, 1270-1281 (2013).
 - 153) Morohashi Y., Kan T., Tominari Y., Fuwa H., Okamura Y., Watanabe N., Sato C., Natsugari H., Fukuyama T., Iwatsubo T., Tomita T., C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) ., *J. Biol. Chem.*, **281**, 14670-14676 (2006).

- 154) Sandin P., Fitzpatrick L. W., Simpson J. C., Dawson K. A., High-speed imaging of Rab family small GTPases reveals rare events in nanoparticle trafficking in living cells., *ACS Nano*, **6**, 1513-1521 (2012).
- 155) Verdine G. L., Walensky L. D., The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 7264-7270 (2007).
- 156) Kole R., Krainer A. R., Altman S., RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 125-140 (2012).
- 157) Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*., *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
- 158) Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498 (2001).
- 159) Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J., Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference., *Nature*, **409**, 363-366 (2001).
- 160) Deerberg A., Willkomm S., Restle T., Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute 2 protein., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 17850-17855 (2013).
- 161) Hong C. A., Nam Y. S., Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics. *Theranostics*, **4**, 1211-1232 (2014).
- 162) Akita H., Kudo A., Minoura A., Yamaguti M., Khalil I. A., Moriguchi R., Masuda T., Danev R., Nagayama K., Kogure K., Harashima H., Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process., *Biomaterials*, **30**, 2940-2949 (2009).
- 163) Eastman S. J., Siegel C., Tousignant J., Smith A. E., Cheng S. H., Scheule R. K., Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes., *Biochim. Biophys. Acta*, **1325**, 41-62 (1997).
- 164) Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T., Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi., *Cell*, **110**, 563-574 (2002).
- 165) Grayson A. C., Doody A. M., Putnam D., Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro*., *Pharm. Res.*, **23**, 1868-1876 (2006).
- 166) Günther M., Lipka J., Malek A., Gutsch D., Kreyling W., Aigner A., Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting *in vivo* and siRNA delivery to the lung., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**, 438-449 (2011).
- 167) Bettinger T., Carlisle R. C., Read M. L., Ogris M., Seymour L.W., Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells., *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3882-3891 (2001).
- 168) Xu Y., Szoka F.C. Jr., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection., *Biochemistry*, **35**, 5616-5623 (1996).
- 169) Toriyabe N., Hayashi Y., Harashima H., The transfection activity of R8-modified nanoparticles and

- siRNA condensation using pH sensitive stearylated-octahistidine., *Biomaterials*, **34**, 1337-1343 (2012).
- 170) Hama S., Akita H., Iida S., Mizuguchi H., Harashima H., Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex., *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1533-1543 (2007).

謝辭

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えてくださり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都薬科大学 薬品物理化学分野 教授 小暮 健太郎先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導、有益な御助言、御激励を賜り、日々の論議を通じて研究に対する姿勢を御教示頂きました、京都薬科大学 薬品物理化学分野 講師 濱 進先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、京都薬科大学 薬品物理化学分野 助教 扇田 隆司先生に心より感謝致します。

本論文を審査して頂き、有益なご助言を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 教授 山本 昌先生、ならびに京都薬科大学 生化学分野 教授 中山 祐治先生に深謝致します。

抗体導入の研究を遂行するにあたり CPP-pAd を御供与頂き、有益なる御助言、御教示を賜りました、プロテノバ株式会社 代表取締役社長 真島 英司博士、三橋 尚登氏、ならびに CPP の開発と CPP に関する有益なる御助言、御教示を賜りました、東京家政大学 家政学部 環境教育学科 准教授 池田 壽文先生に心から御礼申し上げます。

SAPSP の研究を遂行するにあたり、深い御理解と有益なる御助言、御教示を賜りました、大鵬薬品工業株式会社に厚く御礼申し上げます。

特別研究員 DC2 に採用頂き、研究奨励金、特別研究員奨励費の支給により、研究活動に専念できる環境と研究遂行のための経済的支援を賜りました日本学術振興会に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力、御助言を頂きました、京都薬科大学 薬品物理化学分野 卒業生 中井 麻友美氏、中山 佳代子氏、森本 智士氏、5 年次生 鈴木 智子氏に深く感謝致します。さらに、彼らをはじめとし、研究室生活において、多大なる御協力、御支援、御激励を頂きました、京都薬科大学 薬品物理化学分野の卒業生を含む皆様に心より感謝致します。

日々の研究室を支え、終始温かい励ましを頂きました、京都薬科大学 薬品物理化学分野 現臨時教育補助教員 石塚 文緒氏、ならびに元臨時教育補助教員 富岡 佳代氏に心より感謝致します。

2013 年度 リジョナルプロジェクト 女子大学院生 奨学金給付生に採用頂き、生活面での経済的支援を賜りました、国際ソロプチミストアメリカ日本中央リジョンに深く感謝致します。

最後に、研究に専心できる環境を与え、長年の学生生活を終始暖かく見守り、経済的にも精神的にも支え続けてくれた、父 明宏、母 恵利子、祖母 柴田 昌美に心より感謝致します。

2015 年 2 月 板倉 祥子