

研究報告書

「適応進化的に機能創発するナノキャリアの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成20年10月～平成25年1月

研究者: 松村 幸子

1. 研究のねらい

ナノキャリアはナノテクノロジーの応用の出口として期待されている分野の一つであり、特に、がんの予防、診断、治療への応用が期待されている。本研究では、がんを標的として、腫瘍環境を利用して分子や粒子の集合状態をコントロールし、機能を生み出すナノキャリアの開発を目指した。ナノキャリアは薬物やイメージング剤を体内で効果的に運搬し機能させるためのものであるが、そのサイズは、性能を決める重要な因子の一つである。ナノサイズの物質は、毛細血管を通ることができ体内を循環できるが、サイズの違いによって、臓器や組織、がんへの浸透性や集積性、排出されやすさなどが異なる。その上で、キャリアの表面電荷や修飾分子などによって体内挙動が変化する。したがって、キャリアが特定のサイズや形態に固定されず、体内で変化することができれば、効率の良いデリバリーや新しい機能を生み出すことが可能になる。本研究ではキャリアのサイズを制御することに焦点をあて、二つのアプローチから研究を進めた。

一つ目は抗がん剤キャリアを目指した、ナノ粒子を集合化させて腫瘍部位で大きくなるキャリアの開発である。小さい粒子はがん組織への浸透性に優れている反面、排出もされやすい。そこで、小さい粒子を腫瘍環境に反応して大きくすることで滞留性を向上させ、薬物の高濃度化や長期放出を可能にするキャリアの開発を目指した。

二つ目のアプローチは、もっと小さいペプチド分子の自己集合を利用した、磁気共鳴画像(MRI)の造影剤キャリアの開発である。小分子ペプチドは、分子設計によってナノサイズの集合体を非共有結合で形成させることができ、環境応答性や機能性分子も組み込むことが可能である。非共有結合による集合体は、環境に反応して大きく変化するキャリアとなる可能性があることから、ペプチド集合体を利用して造影剤の能力を制御することを目指した。現在の臨床で造影剤として多用されているガドリニウム(Gd)錯体は、非常にまれではあるが重篤な副作用を引き起こす。そこで、より毒性が低いと期待されているマンガン(Mn)錯体を用いて、高性能かつ安全性の高い造影剤の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「ナノ粒子の集合化」と、「ペプチド分子の自己集合」という、二つのアプローチから研究を進めた。ナノ粒子をもとにしたキャリアでは、腫瘍部位で集合化することで長く滞留することが可能なキャリアの開発を目指し、腫瘍環境に反応して集合化するナノ粒子を作製した。集合化をイメージングによって評価できるように、鉄貯蔵タンパク質のフェリチンをキャリア素材として用いた。フェリチンは中空粒子で、内部の酸化鉄は MRI の造影剤として利用でき

る。フェリチン表面にペプチドやポリマーを化学修飾することで、腫瘍環境で高発現している酵素に反応してフェリチンを集合化させることに成功した。フェリチンの集合化は、MRI において、緩和時間を短縮する効果を増強した。すなわち、溶液中での集合化をMRIで検出できることを示した。抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivo MRI でキャリアの体内動態や集合化を評価するためのもととなるシステムをつくることができた。

二つ目のペプチド集合体を利用したキャリアでは、MRI 造影剤の金属錯体をペプチド集合体中に集積化することで、造影能力を向上させることに成功した。適切にアミノ酸配列を設計したペプチドは、非共有結合によってナノサイズの集合体を形成し、金属錯体を集積化した。Gd 錯体に加え、より毒性が低い Mn 錯体を用いてペプチド集合体を作製し、錯体単体より緩和能が向上することを明らかにした。またマウスでのイメージングが可能で、体内滞留時間が延長させた。リガンドを導入したペプチド集合体は受容体特異的にがん細胞に結合したことから、細胞レベルでの腫瘍ターゲティングに成功した。ペプチド集合体を利用することで錯体の造影能を制御できる可能性が示され、がんの診断のための MRI 造影剤キャリアとして、ペプチド集合体が有望であることを示すことができた。

(2) 詳細

研究テーマ①「集合化するナノ粒子キャリアの開発」

腫瘍環境に応答して集合化することでサイズが大きくなるナノ粒子キャリアの作製を行った。当初、もともと水中で凝集しやすい性質をもつ、カーボンナノ粒子の一つであるカーボンナノホーンを用いて研究を開始した。表面を化学修飾して安定に水中に分散するものを作製し、これをもとに環境応答的に集合化するシステムを作ろうとした。しかし、カーボンナノホーン表面に、目的の機能をもつように分子を化学修飾したが、十分に安定に水溶液中に分散させることができなかった。そこで、発想を逆にし、もともと水中で分散しているタンパク質ナノ粒子を用い、この表面に集合化因子を化学修飾することで集合化させることにした。この際、集合化をイメージングで評価できるようにするために、全身のイメージングも可能なMRIを利用することを考え、タンパク質ナノ粒子のフェリチンを用いることにした。鉄貯蔵タンパク質のフェリチンは直径約 12 nm の中空粒子で、内部の酸化鉄粒子は水分子の緩和時間(T_2)を短縮させる効果があり、MRI の造影剤として利用できる。またフェリチンは、内部空間に鉄以外の物質、例えば抗がん剤も担持できるため、抗がん剤治療へも展開しやすいと考えた。

フェリチンをもとに、腫瘍環境因子に応答して集合化する仕組みを作った(図1)。腫瘍環境因子として、多くの腫瘍で発現が亢進していることが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ-2(MMP-2)を利用し、フェリチン表面に親水性のポリエチレングリコール(PEG)、MMP-2 の基質ペプチド、疎水性分子を化学修飾した。はじめ、フェリチンの最表面は親水性のPEGが覆っているが、MMP-2 が基質ペプチドを切断すると疎水性分子が露出し、疎水的な効果でフェリチンが集合化する仕組みである。作製

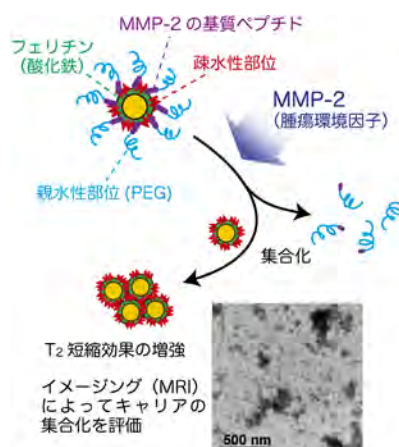


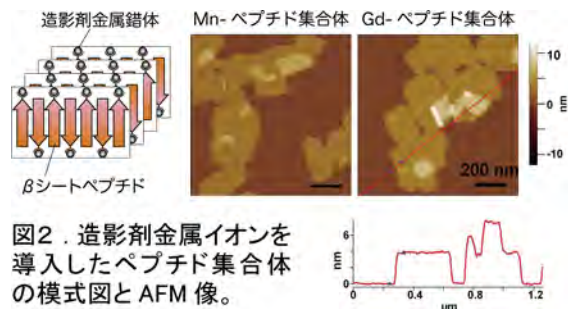
図1 腫瘍環境因子によって集合化するナノ粒子キャリア（フェリチン）。

した修飾フェリチンは、そのままでは水溶液中で分散状態を保っているが、MMP-2 を添加すると、基質ペプチドが切断されて集合化することが、動的光散乱測定や電子顕微鏡観察などにより確認された。MRIで緩和時間(T_2)を測定すると、未修飾フェリチンではMMP-2 を添加しても T_2 に変化はなかったが、修飾フェリチンでは T_2 が 11%短縮し、期待どおりに造影能が増強された。以上の結果から、キャリアであるフェリチンを腫瘍環境因子に応答して集合化させ、これをMRIで評価できることがわかった。抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivoでのキャリアの動態評価、抗腫瘍効果を評価するための基礎となるシステムをつくることができた。

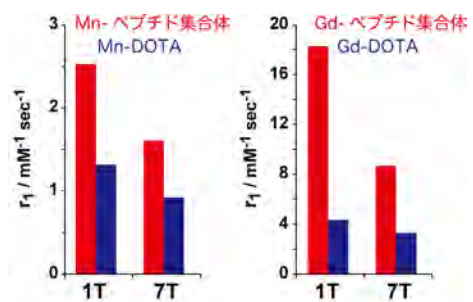
研究テーマ②「自己集合ペプチドを利用したキャリアの開発」

非共有結合でナノサイズの集合体を作製し、MRI造影剤の金属錯体を集積化するために、短いペプチドで集合体形成が可能な β シートペプチドを用いることにした。以前に報告しているアミノ酸配列をもとに、ゲルを形成しにくく、制御された集合体を形成するように、新たに 12 残基からなる β シートペプチドを設計し、その末端に金属結合部位を導入した複数種類のペプチドを合成した。その中で、金属結合部位としてDOTAを導入したペプチドは、MnあるいはGdイオンと安定にキレート錯体を形成する

ことが確認された。このMnあるいはGdを結合したペプチドは β シート構造を形成し、均一な高さのシート状のペプチド集合体を形成した(図2)。ペプチド集合体の緩和能について、7Tおよび 1Tの磁場のMRIで緩和時間(T_1)を測定し、緩和能(r_1)を算出した。Mn、Gdのいずれの場合も、ペプチド集



合体はDOTAとの錯体単体より r_1 が大きくなり、錯体の造影能力を向上させることに成功した(図3)。またランダムコイルペプチドに錯体を導入したものよりも大きな値であり、得られた向上効果は β シート構造に基づくペプチド集合体に依存するものと推察された。1Tと 7Tで得られた値を比較すると、1Tにおける r_1 向上効果が 7Tのときに比べて高いことから、造影剤金属錯体がペプチド集合体に結合していることで分子運動が遅くなり、 T_1 が短縮されたことが大きな要因と推測された。



Mn を導入したペプチド集合体をマウスの尾静脈から投与し、in vivo MRI を行ったところ、急性毒性を示すことなく投与でき、体内でも造影可能であることがわかった。肝臓、脾臓、腎臓においてシグナルの上昇がみられ、錯体単体を投与したときより体内滞留時間が大幅に延長した。徐々に尿として排出され、24 時間後にほぼシグナルが消失していたことから、体外に排出されたと推察された。

さらにがんへのターゲティング能力を付与するために、リガンドとしてNGR配列を導入したペプチド集合体を作製した。NGR は、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞に発現している CD13 に結合することが知られている。NGR-ペプチド、蛍光色素(FAM)を導入したペプチド、Gd 錯体を

導入したペプチドの3成分を混合してペプチド集合体を作製し、培養培地に添加した。このペプチド集合体は、CD13 を発現している HT1080 細胞に結合し、発現していない HT29 細胞にはほとんど結合しなかった(図4)。また NGR を導入していないペプチド集合体は、いずれの細胞にも結合しなかった。HT1080 細胞において、ペプチド集合体は細胞内に取り込まれ、一部はライソソームに存在していた。これらの結果から、in vitro において、CD13 を標的としたがん細胞へのターゲティングが可能であることが示された。

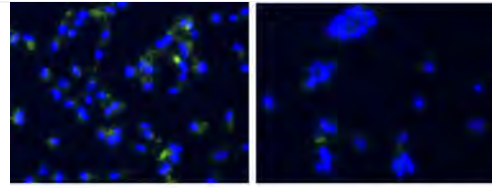


図4. リガンド導入ペプチド集合体のがん細胞への結合。(左) 標的受容体を発現しているがん細胞、(右) 発現していないがん細胞。緑：ペプチド集合体、青：細胞核。

3. 今後の展開

研究テーマ①のサイズが大きくなるキャリアでは、キャリアとするフェリチンナノ粒子の集合化を MRI で評価可能なことを示すことができた。次は、マウスに投与して in vivo MRI を行い、体内でのキャリアの挙動、集合化を調べていく予定であり、リガンドの導入による腫瘍へのターゲティングや、体内の凝集因子を利用することで、腫瘍環境に応答した集合化の促進を目指す。腫瘍部位で集合化することは、薬物の高濃度化や長期放出として抗がん剤治療にメリットがあると考えられるので、フェリチン内部には抗がん剤を入れることで抗腫瘍効果が期待できる。MRI によるキャリアの動態評価と同時に進めることで、より効率的にキャリア開発を進めることができると考えている。

研究テーマ②では、ペプチド集合体を用いることで、金属錯体単体より造影能力を向上させることに成功した。現時点で、Mn 導入ペプチド集合体の緩和能は、既存造影剤の Gd 錯体の約半分にまで高めることができており、マウスにおいても造影可能であることを示した。細胞レベルでのターゲティングにも成功しており、in vivo でのターゲティングが期待できる。小分子ペプチドは生体適合性に優れ、分解、排出されやすい素材であるのに加え、化学合成により様々な分子とのコンジュゲートが可能で、多様な機能設計が可能である。造影能をさらに強化することや、腫瘍環境因子を利用して集合体の形成／崩壊を制御することも可能であると考えている。腫瘍環境に応じて造影能を変化させるダイナミックな MRI も可能な、高性能かつ安全性の高い造影剤の開発へと展開できる。

4. 自己評価

ナノ粒子を集合化させる抗がん剤キャリアは、腫瘍環境因子でキャリアを集合化させ、イメージングで評価できることを示すことができた。体内でのイメージング、さらに抗がん剤治療にまで研究を進めることができなかったが、すぐれた抗腫瘍効果を生み出すために腫瘍部位でキャリアを集合化させるという本研究のコンセプトの効用を明確にするためには、キャリアの体内挙動を把握することが必要である。そのための基礎となるシステムをつくることができたと考えている。

ペプチド集合体を血中投与型のキャリアとして利用しようとする試みは、世界的にもまだ報告が少なく挑戦的な課題である。本研究では、現在の主流である Gd 造影剤より安全性が高く、かつ高性能の MRI 造影剤の開発を目指し、Mn 錯体をペプチド集合体に導入した。現行の Gd

造影剤の半分程度にまで Mn 錯体の造影能を向上させ、体内滞留時間が延長することを示すことができた。ペプチド集合体を用いることで、錯体単体とは異なる造影能を発揮できることがわかり、ペプチド集合体の分子設計によって造影能を制御することが期待できる。研究期間内に腫瘍環境応答性を加えるところまで研究を進めることができなかったが、腫瘍環境に応答して造影能を変化させるダイナミックな造影剤の開発に向けた基盤ができたと考えている。

5. 研究総括の見解

分子や粒子の集合状態をコントロールして機能するがん標的ナノキャリアの開発を目指して二つのアプローチで研究を進めた。研究テーマ①「集合化するナノ粒子キャリアの開発」では、粒子を腫瘍環境に応答して大きくすることで滞留性を向上させ、薬物の高濃度化や長期放出を可能にするキャリアの開発を目指した。化学修飾したフェリチンを合成し、マトリックスメタロプロテアーゼ-2(MMP-2) が基質ペプチドを切断するとフェリチンが腫瘍環境因子に応答して集合化できることを見出した。研究テーマ②「自己集合ペプチドを利用したキャリアの開発」では非共有結合によるペプチド集合体形成を利用して造影剤の能力を制御することを目指し、Mn や Gd を導入した 12 残基からなる β シートペプチドは造影能力を向上させること、急性毒性を示すことなく体内撮影が可能であることを見出した。また、臓器内においてシグナルの上昇、体内滞留時間の大幅延長が見出され、in vitro において、CD13 を標的としたがん細胞へのターゲティングも可能であることが示された。

以上の成果は抗がん剤キャリアの開発に向けて、in vivo でのキャリアの動態評価、抗腫瘍効果を評価するための具体的システムを作れたものと評価され、治験をふくめた今後の発展に期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. S. Matsumura, I. Aoki, T. Saga, K. Shiba, A tumor-environment-responsive nanocarrier that evolves its surface properties upon sensing matrix metalloproteinase-2 and initiates agglomeration to enhance T_2 relaxivity for magnetic resonance imaging. *Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 1970-1974.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 松村 幸子、青木 伊知男、芝 清隆

発明の名称: 新規ペプチド複合体及び造影剤

出 願 人: がん研究会、放射線医学総合研究所、JST

出 願 日: 2012 年 3 月

出 願 番 号: 出願手続き中

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)



1. S. Matsumura, I. Aoki, K. Shiba, Design and construction of the ferritin-based MRI contrast agent that can self-assemble into oligomers upon sensing a tumor specific protease, 9th Australian Peptide Conference, 2011.10.16-20
2. 松村幸子、芝 清隆、腫瘍特異的酵素によってサイズ変化する MRI 造影剤の作製、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3
3. 松村幸子、宮脇仁、弓削亮太、佐藤重男、富田章弘、湯田坂雅子、飯島澄男、芝清隆、カーボンナノ粒子の体内分布評価と表面修飾、第 58 回高分子討論会、2009.9.16
4. S. Matsumura et al., Bioapplication of the Surface Modified Carbon Nanohorns for Drug Delivery Systems, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009.7.26-30
5. 松村幸子、宮脇仁、弓削亮太、佐藤重男、富田章弘、鶴尾隆、湯田坂雅子、飯島澄男、芝清隆、ナノ粒子の体内分布評価に向けたカーボンナノ粒子の作製、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、2009.7.3