

# 研究報告書

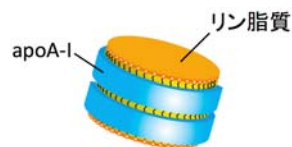
## 「生体ナノ粒子を模倣した医療用金属ナノ粒子の創製」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：村上 達也

### 1. 研究のねらい

本研究のねらいは、金属ナノ粒子を医療分野で利用するため、金属ナノ粒子と血清蛋白質 apolipoprotein A-I (apoA-I) の複合型ナノ粒子を作製する方法を確立することにある。これにより既存の合成高分子とは異なる原理で、高い生体適合性を金属ナノ粒子に付与することを目指す。



ApoA-I は血中でリン脂質と結合し、ディスク状構造体(ナノディスク, ND)を形成する(図 1)。さらに内部にコレステロールを貯蔵すると、ディスク状から球状へと構造が変化する。すなわちリン脂質部分を金属ナノ粒子に置き換えたような構造体を作製することができれば、ND を模倣できると考えた。ここで apoA-I は、金属ナノ粒子に水溶液中分散性を含めた生体適合性を付与することが期待される。さらに apoA-I を機能化すれば、apoA-I を介して金属ナノ粒子に特定組織集積性や細胞内侵入機能を付与することも可能である。このように生体適合化した金属ナノ粒子を生体内の特定部位に配置させ、金属ナノ粒子が反応する外部刺激(磁場、光など)と組み合わせれば、時空間制御された応答(熱、活性酸素など)を得ることができる。これによりピンポイントの薬物治療が可能となる。

図1 NDの構造。ディスク状リン脂質二重膜に apoA-I が巻き付いている。

### 2. 研究成果

本研究では、以下の3つの項目、(1)NDのサイズコントロール、(2)細胞膜透過ペプチド(tat)融合 apoA-I からの ND 作製とその細胞膜透過活性、(3)各種 apoA-I 変異体の ND を介した金属ナノ粒子表面への吸着、について検討した。生体に存在する ND のサイズは約 10nm であるため、より様々なサイズの金属ナノ粒子を内包するために、サイズコントロールさせることが必要と考えた。並行して tat ペプチド融合 ND の機能評価を、疎水性抗癌剤を用いて行った。これら2つの予備研究成果を基に、金属ナノ粒子表面への各種 apoA-I 変異体を吸着させることを検討した。

#### (1) ND のサイズコントロール

ApoA-I は 243 アミノ酸からなり、 $\alpha$ ヘリックスがコンパクトに折りたたまれた構造を有する。これに対して N 末端 43 アミノ酸残基を欠損させた変異体 (apoA-I(44-243)) はリング状である。このリング状構造が金属ナノ粒子表面への吸着に適していると予想し、apoA-I(44-243)とリン脂質 (POPC) を混合して作製した ND (ND(44-243)) を用いて予備研究を行った。用いた ND(44-243) の平均粒子径は 19 nm である。

抗癌剤であるドキソルビシン (DXR) を ND(44-243) に内包させた。DXR 内包は、3 種の反応温度 (37, 50, 60°C)、3 種の反応時間 (0.5, 1, 1.5 hr) の計 9 条件で行った。この結果、反応条件をシビアにすればする程、DXR 内包量が増大し、さらに興味深いことに、平均粒子径も 200 nm 以上にまで増大した(図 2)。平均粒子径から見積もった粒子体積を DXR 内包量に対してプロットすると、直線関係が見られ、ND(44-243) は DXR 内包に伴って膨張できることが示唆された。この ND(44-243) の性質は、ND(44-243) よりも粒子径の大きい金属ナノ粒子の被覆(内包)において有用だと考えられる。さらに ND のドラッグデリバリー応用という点でも有利である。これはメゾスケール (5-100 nm) の生体適合性ナノ粒子は、癌・炎症部位に集積すること

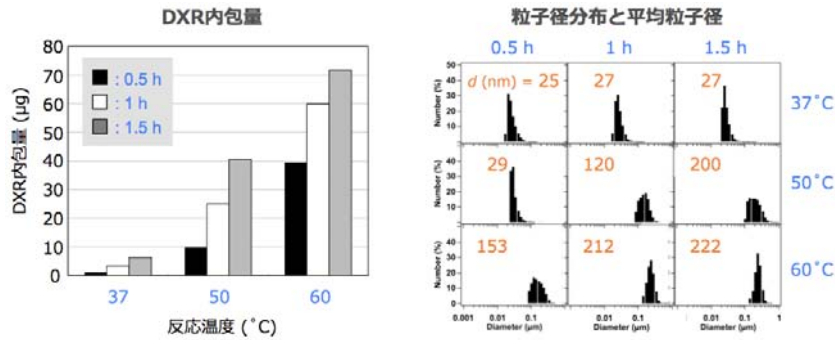


図2 DXR内包によるND(44-243)のサイズコントロール。反応温度および反応時間の増大とともに、DXR内包量は増加し、それにつれてDXR内包ND(44-243)の平均粒子径も増大した。

が知られているためである。

このサイズコントロールには、ND(44-243)を作製する時の apoA-I(44-243)に対するリン脂質(POPC)の混合モル比が重要であることが分かった。図3に示すように、この混合モル比を100から250に増加させるに従って、DXR内包時のND熱安定性が増し、それによってDXR内包量が大きく向上した。結果としてサイズコントロールに必要なDXR内包が達成されたと考えられる。

さらにこのサイズコントロールがDXR以外の薬物でも可能か検討した。用いた薬物は、シスプラチン(制癌剤, CDDP)、5-フルオロウラシル(制癌剤, 5-FU)、デキサメタゾン(抗炎症薬, DEX)、トリコスタチンA(制癌剤, TSA)、All-trans retinoic acid(制癌剤, ATRA)、そして亜鉛フタロシアニン(制癌剤, ZnPc)、の計6種である。これらの中で、親水性制癌剤であるCDDPと5-FUは、ND(44-243)に内包すらされなかった一方で、疎水性度の高いZnPcとATRAは、ほぼ定量的にND(44-243)に内包され、内包量依存的なサイズコントロールを可能にすることが明らかとなった(図4)。尚、中間の疎水性度を有するDEXとTSAは、内包のみ可能であった。

以上の結果を金属ナノ粒子被覆の観点からまとめると、次のようになる。

ApoA-I(44-243)に対するリン脂質(POPC)の混合モル比を250として作製したND(44-243)は、疎水性物質を効率よく内包することから、金属ナノ粒子表面を疎水性物質であらかじめ被覆しておくことが必要だと考えられる。またND(44-243)のサイズは可変であり、このことは粒子径の大きい金属ナノ粒子の被覆に有用であることが予想される。

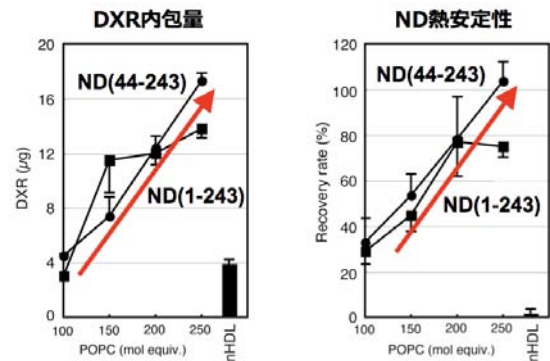


図3 ND作製時のPOPC量に依存したDXR内包量とND安定性。生化学研究で用いられるNDは、モル比100で作製される。nHDLは血中より分離精製した成熟

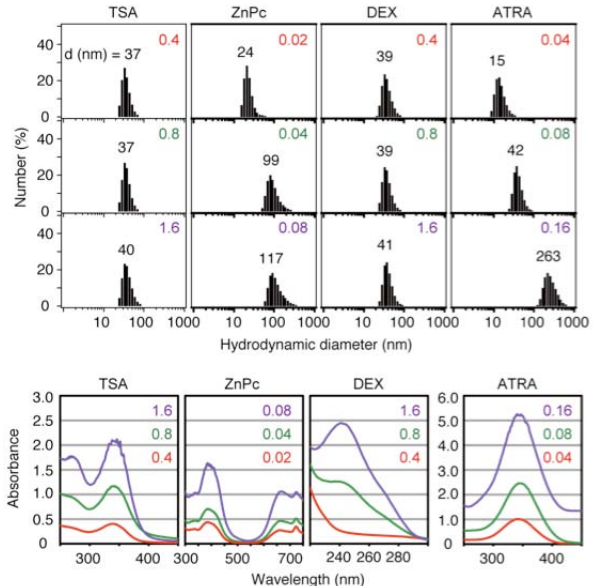


図4 ZnPcとATRAによる内包量依存的なサイズコントロール。上図は薬物内包ND(44-243)の平均粒子径(黒字)と粒子径分布、下図は内包薬物由来の吸収スペクトルを表す。図中の数字(カラー)は内包反応時の薬物濃度(mg/mL)を表し、下図においては薬物内包ND(44-243)の吸収スペクトルの色と一致させている。

## (2) 細胞膜透過ペプチド(tat)融合 apoA-IからのND作製とその細胞内移行活性

Tat ペプチドはウイルス由来の塩基性ペプチドである。Tat ペプチドを apoA-I(44-243)の C 末端に融合した変異体(apoA-I(44-243)tat)を遺伝子工学的手法により作製し、POPC と混合して ND(ND(44-243)tat)の作製を試みた。DLS 測定の結果、平均粒子径 19 nm の ND が生成したことを確認した。この ND(44-243)tat による金属ナノ粒子被覆に向けた機能評価を行った。

まず ND(44-243)tat の細胞膜透過活性を共焦点レーザー顕微鏡により検討した。ND(44-243)tat および ND(44-243)それぞれのタンパク質部分を FITC (緑色蛍光色素)でラベルし、ヒト培養細胞に作用させた。図 5 に示すように、細胞内 FITC 蛍光は、ND(44-243)処理細胞に比べて、ND(44-243)tat 処理細胞で大きく増加していた。すなわち ND(44-243)tat は、その tat 機能により細胞内移行活性が付与されたと考えられる。さらに、ND(44-243)tat のリン脂質部分を赤色蛍光色素 (DiI) でラベルすると、細胞内での DiI と FITC の局在は完全には一致しなかった(図 5D)。このことは、ND(44-243)tat の少なくとも一部は細胞内で分解されることを示唆している。

ND(44-243)tat には、ND(44-243)同様、DXR を内包することができた。また ND(44-243)tat に内包された DXR は、癌細胞内に送達された。そこで DXR 内包 ND(44-243)tat と DXR 内包 ND(44-243)の抗腫瘍効果を、培養癌細胞と癌モデルマウスを用いて比較検討した。その結果、いずれの評価系においても ND(44-243)tat は高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった(図 6)。これらの結果は、DXR が癌細胞内へ送達され、癌細胞がより長期間 DXR に曝されたことに起因すると考えられる。しかし一方で DXR 内包 ND(44-243)tat と DXR 内包 ND(44-243)の活性差は、細胞内送達 DXR 量の差(約 10 倍)から考えると小さく、ND(44-243)tat により細胞内に送達された DXR はエンドソームにトラップされていると考えられる。

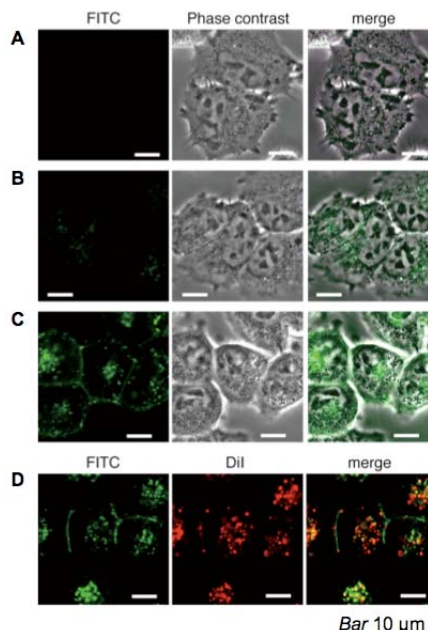


図 5 各種蛍光ラベル ND で処理した培養細胞の共焦点蛍光画像。A. 無処理, B. FITC (緑色蛍光)ラベル ND(44-243)処理, C. FITC ラベル ND(44-243)tat, D. FITC & DiI (赤色蛍光)ラベル ND(44-243)tat。

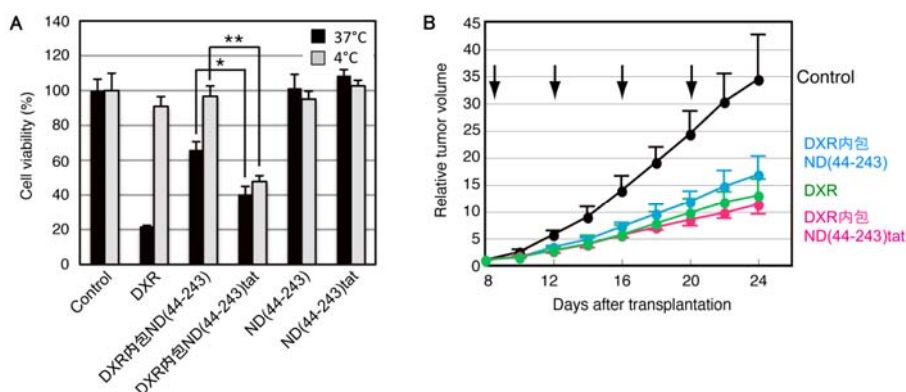


図 6 DXR 内包 ND(44-243)tat の抗腫瘍効果。A. 培養細胞(ヒト肺癌細胞 NCI-H460), B. 癌モデルマウス。DXR の抗腫瘍効果により、細胞生存率(A)、腫瘍体積(B)が低下する。

以上の結果を金属ナノ粒子被覆の観点からまとめると、ND(44-243)tat は、ND(44-243)同様、疎水性表面を有する金属ナノ粒子を効率よく内包し、内包された金属ナノ粒子を細胞内へ送達できると予想される。

### (3) ND(44-243)tat による金属ナノ粒子の被覆

用いた金属ナノ粒子は、マグネタイト(mag)と金ナノロッド(AuNR)である。両者とも生理的条件下、例えば等張リン酸緩衝液(PBS)中では、迅速に塩析により凝集沈殿する。両者を ND へ内包させるため、前項で得られた知見を元に、表面を脂質(オレイン酸)で予め被覆した。オレイン酸被覆体のゼータ電位を測定すると、いずれも-60 mV 以下の負の値を示した。

この mag と AuNR のオレイン酸被覆体に ND(44-243)tat を添加すると、ゼータ電位はいずれも大きく正方向に触れ、ND(44-243)tat の金属ナノ粒子表面への吸着が示唆された。平均粒子径は ND(44-243)tat 添加前に比べると小さくなる傾向があり、分散性の向上も示唆された。重要なことに、ND(44-243)tat 処理した mag と AuNR は、いずれも PBS 中で沈殿を形成せず、良好な分散性を有することが示唆された。またいずれの金属ナノ粒子も細胞内へ移行した(図 7)。

以上の結果から、ND(44-243)は、脂質被覆金属ナノ粒子と混合するだけで、その表面に吸着して金属ナノ粒子を生理的条件下で分散安定化できることが明らかとなった。さらに ND(44-243)に機能性ペプチドを導入することにより、金属ナノ粒子の分散化と機能化を同時に行えることが明らかとなった。

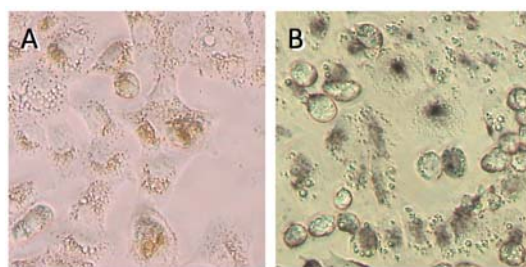


図 7 ND(243)tat 被覆 mag(A)あるいは AuNR(B)で処理した NCI-H460 細胞の明視野画像。A では細胞内の茶色部分に取り込まれた mag、B では暗紫色部分に取り込まれた AuNR を表す。

## 3. 今後の展開

本研究から、生体に存在する ND を機能化することにより、生体適合性の新しい金属ナノ粒子表面修飾剤を開発できる可能性が示唆された。今後は、ND(44-243)および ND(44-243)tat を含む各種 ND で被覆された金属ナノ粒子の生体適合性を実験動物レベルで評価し、既存の合成高分子と比較することが必要である。また ND 単独でも、内包薬物量に応じたサイズコントロールという興味深い現象を示し、ND(44-243)および ND(44-243)tat をベースとする新しいドラッグキャリアの開発も行う予定である。

## 4. 自己評価

当初の目標では、ND(44-243)あるいは ND(44-243)tat で被覆された金属ナノ粒子の生体適合性を実験動物レベルで検証し、さらに転移癌モデルを用いた薬効評価を行うことになっていたが、さきかけ期間中で得られた成果は、培養細胞レベルのものにとどまった。これは ND(44-243)および ND(44-243)tat の予備評価の中で興味深い知見が得られたため、それに注力したことが影響している。しかしこの「脱線」のお陰で、新たな研究展開を見いだすことができたと考えている。

## 5. 研究総括の見解

金属ナノ粒子を医療分野に適用させるために、従来とは異なる発想である、生体分子で被覆して“生体分子として見える”ようにする独自の戦略に立ち、金属ナノ粒子と血清蛋白質である apoA-I の複合型ナノ粒子を創生することで、高い生体適合性を付与することを目指した。まず、様々なサイズの金属ナノ粒子が内包できることを目的として、N 末端 43 アミノ酸残基を欠損させた apoA-I の変異体であるリング状 apoA-I(44-243)を用い、これとリン脂質を混合して作製したナノディスク ND(44-243)に各種の制癌剤を内包させる実験により、ND のサイズコントロールの可能性を検討した。その結果、疎水性度の高い制癌

剤が定量的に内包されNDサイズコントロールが可能であることを見出し、これには apoA-I(44-243)に対するリン脂質の混合モル比が重要な因子であり、ND(44-243)が粒子径の大きい金属ナノ粒子の被覆に有用であることを明らかにした。また細胞膜透過性ペプチドである Tat ペプチドを融合した変異体 apoA-I(44-243)tat を作り ND(44-243)tat を作製することで、細胞内移行活性を確認し、同時に制癌剤の内包を確認して、培養癌細胞と癌モデルマウスを用いて高い抗腫瘍効果があることを明らかにした。そしてオレイン酸被覆体マグネタイトや Au ナノロッドの金属ナノ粒子を用いて、ND(44-243)tat を添加することで、ND(44-243)tat 吸着金属ナノ粒子が形成され、生理的条件下で分散安定化できることを明らかにし、かつこれらの金属ナノ粒子の培養細胞中での細胞内移行も確認した。いずれも ND(44-243)あるいは ND(44-243)tat で被覆された金属ナノ粒子の生体適合性を培養細胞レベルで実証できたことで、金属ナノ粒子を医療分野で利用可能とする基本プロセスを創出した意義は大変大きく、多大な貢献が行えたと言える。今後は、これら金属ナノ粒子の実験動物レベルによる生体適合性検証など、実用化に向けての技術の有用性と新しいドラッグキャリアの開発に期待したい。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. T. Murakami, W. Wijagkanalan, M. Hashida, K. Tsuchida, Intracellular drug delivery by genetically engineered high density lipoprotein nanoparticles, *Nanomed. (London)* **2010**, *5*, 867-879.
2. T. Murakami, K. Tsuchida, M. Hashida, H. Imahori, Size control of lipid-based drug carriers by drug loading, *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 789-791.
3. A. S. D. Sandanayaka, O. Ito, M. Zhang, K. Ajima, S. Iijima, M. Yudasaka, T. Murakami, K. Tsuchida, Photoinduced electron transfer in Zinc phthalocyanine loaded on single-walled carbon nanohorns in aqueous solution, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1-6.
4. J. Miyawaki, S. Matsumura, R. Yuge, T. Murakami, S. Sato, A. Tomida, T. Tsuruo, T. Fujinami, H. Irie, K. Tsuchida, S. Iijima, K. Shiba, M. Yudasaka, Biodistribution and ultrastructural localization of single-walled carbon nanohorns determined in vivo with embedded Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> labels, *ACS NANO*, **2009**, *3*, 1399-1406.
5. M. Zhang, T. Murakami, K. Ajima, K. Tsuchida, A. S. Sandanayaka, O. Ito, S. Iijima, M. Yudasaka, Fabrication of ZnPC/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14773-14778.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 2件

発 明 者: 村上 達也、今堀 博、橋田 充

発明の名称: 微小医療材料

出 願 人: 京都大学

出 願 日: 2009/6/2

### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### ・総説

1. 村上 達也 「生体ナノ粒子を利用したドラッグキャリア開発」 *Drug Delivery System 学会誌*, **2009**, *24*, 636-637.
2. 村上 達也 「機能性リポ蛋白質」 *機能性 DDS キャリアの製剤設計(シーエムシー出版)*, **2010**, pp150-157.

・招待講演

1. 村上 達也 「ナノ粒子の表面修飾による生体適合化と医療応用」, 表面科学合同講演会 (大阪, 2010.11.4)
2. Tatsuya Murakami “Engineered Phospholipid Nanodiscs for Drug Delivery”, APTSJ Global Education Seminar West 10-1 (Kyoto, 2010.10.29)
3. Tatsuya Murakami “Development of Size-controlled and Genetically Engineered Phospholipid Nanodiscs for Drug Delivery Systems”, 4<sup>th</sup> Annual Symposium on Nanobiotechnology (Munich, 2010.10.5)
4. 村上 達也 「ナノ粒子の表面修飾による生体適合化とドラッグデリバリーシステムへの応用」, 日本接着学会東北支部講演会 2009 (仙台, 2009.11.13)