

氏名	寺田武
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第596号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	癌指向性を有する新規リポソーム製剤の設計と評価・解析に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 赤池 昭紀

### 論文内容の要旨

抗がん剤による癌化学療法では、その効果増強および副作用軽減が強く望まれており、現在、薬剤を腫瘍選択的に送達するための薬物送達システム(DDS)の開発研究が活発に行われている。脂質二重膜で構成されるリポソームは、水溶性薬物および脂溶性薬物のいずれをも担持でき、かつ機能性分子で容易に表面修飾できることから、抗がん剤のDDSキャリアとして注目されている。現在、Doxil®に代表されるポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームを利用した抗がん剤が上市されているが、より選択的かつ効果的に癌組織に薬物を送達するためには、癌指向性リガンド等を用いて能動的にターゲティングすることが必要と考えられている。本研究では、こうしたターゲティング型DDSキャリアの設計においてはリガンドとレセプターとの相互作用を詳細に解析できる実験評価法の開発が不可欠と考え、まず表面プラズモン共鳴法(SPR法)による分子間相互作用解析法をDDS評価に応用することを検討した。さらに、癌細胞指向性を有する新規リポソーム製剤を設計し、その評価および解析を行った。

#### I. 表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いたターゲティング型薬物送達システムの機能評価に関する基礎的検討

SPR法は、薄膜試料によって生じる光の共鳴角変化を測定する方法であり、さまざまな分子の相互作用研究に利用されている。本章では、このSPR法のDDS評価系としての有用性を検討するために、肝臓ターゲティングを目的に設計された糖修飾タンパク質あるいはリポソームをモデルとして、それらのレセプターとなる血清マンナン結合タンパク質(MBP)やアジアロ糖タンパク質レセプター(AGPR)との相互作用を解析した。マンノース修飾ウシ血清アルブミン(Man-BSA)とMBPとの結合では、マンノース修飾数が多いほど解離速度定数( $k_d$ )が低下する傾向が認められ、両分子の間に多点での強固な結合が形成されることが示唆された。一方、マンノース残基の見かけ濃度で定義した結合速度定数( $k_a$ )は修飾数に依らず一定であり、結合過程は単なる確率過程であることが示された。 $k_a$ 値は、修飾率が同程度にした異なるタンパク質の間でもほぼ同じ値を示した。しかしながら、 $k_d$ 値はタンパク質毎に異なり、単に修飾率だけが解離速度の決定因子でないことが示された。以上の傾向は、ガラクトース修飾BSAとASGPRとの結合実験でも同様であった。マンノース修飾リポソームの検討において、糖含量を同じにしてもコレステロール(Chol)含有が異なるとMBPからの解離速度が異なることが示され、マイクロ環境での糖残基の密度が解離速度に関係することが推察された。以上、SPR法の利用により、従来あまり議論されなかったDDSキャリアと標的分子との結合の詳細を解析することが可能になった。

#### II. Fibroblast Growth Factor ReceptorsをターゲットとしたPEG修飾リポソーム製剤の開発

腫瘍組織にはbasic fibroblast growth factor(bFGF)が増殖因子として比較的高いレベルで維持され、メラノーマなど多くの癌細胞ではFGF Receptors(FGFRs)が高発現していることが知られている。そこで、リポソーム製剤に癌指向性を付与する目的で、basic FGFとFGFRとの相互作用を阻害すると知られているペプチドKRTGQYKL(residues 119-126 of bFGF)でリポソームの表面修飾することを考案した。まず予備検討として、このFGFR指向性ペプチドとFGFR1キメラとの結合特性をSPR法により解析した。その結果、FGFR1キメラとは直接相互作用せず、bFGFとの結合を介して

FGFR1 キメラと結合することが示された。次に、このペプチドを末端に有する脂質を合成してリポソームに導入した。SPR 法あるいは水晶発振子バイオセンサー法による検討の結果、FGFR 指向性ペプチド修飾リポソームも bFGF を介して FGFR1 キメラに結合することが確認された。さらに、このリポソームは、FGFRs を高発現する NIH3T3 細胞において bFGF 共存下顕著に取り込まれた。しかしながら、bFGF 非存在下においてもある程度取り込まれる結果となった。そこで、非特異的な取り込みを抑制するためにリポソームに PEG 修飾を施したところ、bFGF 非存在下での細胞取り込みが顕著に減少し、bFGF 存在下との差を鮮明にすることに成功した。bFGF による取り込み促進効果は、NIH3T3 細胞以外にも A549 細胞や B16BL6 細胞で認められたのに対し、FGFRs の発現が低い CHO-kl 細胞では認められず、FGFR 指向性ペプチドと PEG で修飾したリポソームは、FGFRs を高発現する癌細胞への標的指向化に有効なキャリアとなり得ることが示唆された。

### Ⅲ. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) による分解性を有した PEG 脂質誘導体の設計とターゲティング型リポソームへの応用

リポソームの PEG 修飾は癌細胞への取り込みも少なからず低下させるので、より効果的なデリバリーを達成するためには本問題を解決することが望まれる。そこで、MMP-2 が癌組織に多く存在することに着目し、MMP-2 により PEG 鎖が切断されるように設計した PEG 脂質を合成し、この脂質をリポソームに導入することを考案した。まず、MMP-2 感受性のペプチド GPLGIAQ の N 末に PEG を、C 末に DOPE を結合させた PEG 脂質 (PEG-PD) を合成した。PEG-PD 含有リポソームを B16BL6 細胞の培養上清とインキュベーションしたところ、分解により生じる末端アミノ基が検出された。次にモデル実験として、PEG-PD を含有するガラクトース修飾リポソームを調製し、ASGPR を高発現する HepG2 細胞への取り込みに対する MMP-2 の影響を検討した。PEG-PD 含有ガラクトース修飾リポソームを MMP-2 で 24 時間前処理したところ、MMP-2 の処理濃度に依存してリポソームの取り込みが増大する結果が得られた。また、B16BL6 細胞の培養上清で前処理しても同様にリポソームの取り込み増大が観察された。以上は、MMP-2 で PEG-PD が分解されることによりリポソームの表面にガラクトースが露出し、AGPR を介してリポソームが取り込まれるようになったものと解釈された。

以上、本研究では、SPR 法で詳細な解析を行った bFGF 結合ペプチドを用い、癌細胞指向性を付与した新規 PEG 修飾リポソームを設計し、癌細胞選択性を示すことに成功した。また、MMP-2 感受性の PEG-PD を導入することにより、癌組織での取り込み効率を改善できる可能性を示した。これらの知見は、癌をターゲットとしたリポソーム製剤の開発に対して有益な基礎的知見を提供するものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

癌化学療法では、抗癌剤を腫瘍選択的に送達可能な薬物送達システム (DDS) の開発が活発に行われている。中でも、脂質二重膜で構成されるリポソームは、水溶性薬物および脂溶性薬物のいずれをも担持できかつ機能性分子で容易に表面修飾できることから注目を集め、現在、Doxil<sup>®</sup> に代表されるポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム製剤が上市されているが、さらに効果の増強を求めて癌指向性リガンド等を用いた能動的ターゲティングの開発が進められている。申請者は、ターゲティング型 DDS キャリアの設計に不可欠な、リガンドとレセプターとの相互作用の解析評価法として、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) による分子間相互作用解析法を DDS 評価に応用し、さらに、癌細胞指向性を有する新規リポソーム製剤を設計して評価を行った。

SPR 法の DDS 評価系としての有用性を検討するために、糖修飾タンパク質をモデルとして、それらのレセプターとの相互作用を解析し、それぞれタンパク質の糖修飾数と解離速度定数 ( $k_d$ )、結合速度定数 ( $k_a$ ) の関係を明らかにした。一方、マンノース修飾リポソームにおいては、ミクロ環境で糖残基の密度が解離速度に与える影響が示唆され、SPR 法により高分子あるいは微粒子性 DDS キャリアと標的分子との結合解析が可能となった。

次に、腫瘍組織に basic fibroblast growth factor (bFGF) が増殖因子として比較的高いレベルで維持され、メラノーマなど多くの癌細胞で FGF Receptors (FGFRs) が高発現していることに着目して、basic FGF と FGFR との相互作用を阻害するペプチド KRTGQYKL (residues 119-126 of bFGF) を認識素子として用いるリポソーム修飾を考案した。FGFR 指

向性ペプチドと FGFR1 キメラとの結合特性を SPR 法により解析した結果、本ペプチドが FGFR1 キメラとは直接相互作用せず bFGF との結合を介して FGFR1 キメラと結合することが明らかとなったことから、本ペプチドを末端に有する脂質を合成してリポソームに導入し、SPR 法あるいは水晶発振子バイオセンサー法により検討した結果、FGFR 指向性ペプチド修飾リポソームも bFGF を介して FGFR1 キメラに結合することが確認された。さらに、このリポソームが、FGFRs を高発現する NIH3T3 細胞において bFGF 共存下顕著に取り込まれるものの、bFGF 非存在下においても取り込みが認められ、この非特異的取り込みの抑制には PEG 修飾が有効であることが示された。

以上で、FGFR 指向性ペプチドと PEG で二重に機能性を付加したリポソームの癌指向性キャリアとしての有用性を示唆する結果を得たが、PEG 修飾は癌細胞への取り込みも低下させるので、次に matrix protease の一種である MMP-2 が癌組織に多く存在することに着目し、MMP-2 により PEG 鎖が切断されるように設計した PEG 脂質を合成して、本脂質のリポソームへの導入により PEG 修飾効果に時間制御機能を導入することを考案した。まず、MMP-2 感受性のペプチド GPLGIAGQ の N 末に PEG を C 末に DOPE を結合させた PEG 脂質 (PEG-PD) を合成し、PEG-PD 含有リポソームを B16BL6 細胞の培養上清とインキュベーションしたところ、ペプチド部分の分解が確認された。次に、PEG-PD を含有するガラクトース修飾リポソームを調製し、ASGPR を高発現する HepG2 細胞への取り込みに対する MMP-2 の影響を検討した結果、MMP-2 による PEG-PD 分解によりリポソーム表面にガラクトースが露出し、ASGPR を介してリポソームが取り込まれることが確認された。

以上、本研究では、SPR 法による解析を基盤に、bFGF 結合ペプチドで癌細胞指向性を付与した新規 PEG 修飾リポソームを設計し、癌細胞選択性を得ることに成功した。また、MMP-2 感受性の PEG-PD を導入することにより、癌組織でのみ認識素子が露出する高度な指向性付与機構により顕著な取り込み効率の改善を得た。以上の知見は、今後の抗癌剤リポソーム製剤の開発に対し、有益な設計指針を提供するものと思われる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年2月28日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。