

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	CHANTARASRIVONG CHANIKARN
論文題目	Development and evaluation of novel structurally simplified sialyl LewisX mimic-decorated liposomes for targeted drug delivery to E-selectin-expressing endothelial cells. (E-セレクチン発現内皮細胞への標的指向化薬物送達を目的とした新規構造単純化シアリルルイスXミミック修飾リポソームの開発と評価)		
<p>E-selectin is a transmembrane glycoprotein that is expressed at extremely low levels in resting endothelial cells but is strongly induced via transcriptional regulation by inflammatory cytokines, such as TNF-<math>\alpha</math> and IL-1<math>\beta</math>. Induced expression of E-selectin is involved in recruitment of leukocytes in inflamed tissues as well as formation of tumor microenvironment. Therefore, augmented expression of E-selectin in endothelial cells is an attractive target for targeted delivery of specific drugs to inflamed endothelia including tumor vasculature. E-selectin-directed drug delivery systems have mostly utilized sialyl LewisX (sLeX), a natural ligand of E-selectin. In the thesis study, novel sLeX analogues were designed with structural simplification to overcome drawbacks of process-intensive chemical synthesis of native sLeX. Liposomes decorated with different sLeX mimics were developed and evaluated for their capability for targeted drug delivery to E-selectin-expressing endothelial cells. Details of the study will be discussed over the following three chapters.</p> <p><b>Chapter 1: Development and functional characterization of liposomes decorated with structurally simplified sLeX mimics</b></p> <p>Four kinds of pegylated-liposomes were prepared with different ligands, including native sLeX, 3'-sulfo sLeX mimic, 3'-carboxymethyl sLeX mimic (3'-CM sLeX mimic), and 3'-(1-carboxy)ethyl sLeX mimic (3'-CE sLeX mimic). Their functional characteristics were evaluated in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) activated with inflammatory cytokines as a model of inflamed endothelium. While all developed liposomes were similar in particle size and charge, the 3'-CE sLeX mimic liposomes demonstrated the highest uptake in stimulated HUVECs, even being more potent than native sLeX liposomes. Confocal fluorescence microscopy confirmed endocytic internalization of the liposomes. Inhibition studies using anti-selectin antibodies revealed that the uptake of the liposomes is mediated primarily by overexpressed E-selectin on stimulated HUVECs. Molecular dynamic simulation studies demonstrated that the 3'-CE sLeX mimic is more strongly bound to E-selectin than native sLeX and other sLeX mimics because of the higher probability of hydrogen-bond formation. Therefore, 3'-CE sLeX mimic liposomes have a greater potential for targeted drug delivery to E-selectin-expressing endothelial cells.</p> <p><b>Chapter 2: Transport characteristics of 3'-(1-carboxy)ethyl sialyl LewisX mimic liposomes in tumor spheroids with a perfusable vascular network</b></p> <p>Tumor spheroids with a perfusable vascular network were prepared as an in vitro model that allows to analyze the local disposition behavior in solid tumors. A spheroid was prepared with three different cells, namely HUVECs, lung fibroblast, and MCF-7 breast cancer cell line, and then loaded into microfluidic devices. The endothelial cells in the spheroid formed a continuous vascular network with angiogenic sprouts branchedly elongated from open microchannels of the device. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) confirmed high expression</p>			

of E-selectin in the spheroid supplemented with inflammatory cytokines. Real-time imaging of fluorescent-labeled liposomes shows that 3'-CE sLeX mimic liposomes significantly distributed along endothelial cells and their vicinity in the spheroid under flow condition. In contrast, control pegylated liposomes showed low retention due to weak binding. These results suggest that the 3'-CE sLeX mimic liposomes can specifically interact with E-selectin expressing endothelial cells in in vivo-mimic condition.

### **Chapter 3: Anti-angiogenic drug delivery to E-selectin expressing endothelial cells by using 3'-(1-carboxy)ethyl sialyl LewisX mimic liposomes**

Everolimus (EVE), a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, was loaded in 3'-CE sLeX mimic liposomes and investigated for anti-angiogenic activity in inflammatory cytokines-treated HUVECs. Cellular uptake of EVE/3'-CE sLeX mimic liposomes increased steadily and almost caught up with the uptake of plain EVE at 3 h, which was higher than the uptake in control pegylated liposomes. Inhibition of uptake by anti-E-selectin antibody suggested involvement of E-selectin-mediated endocytotic processes. Cell migration and capillary tube formation of HUVECs, referring to their angiogenic activity, were suppressed significantly by the EVE/3'-CE sLeX mimic liposomes compared to the control. In addition, Thr389 phosphorylation of pS6 kinase, as a marker of mTOR activity, was remarkably suppressed to less than endogenous levels by the EVE/3'-CE sLeX mimic liposomes. These results show that the EVE/3'-CE sLeX mimic liposomes were intracellularly taken up by E-selectin and prompted anti-angiogenic effects of EVE involved in the mTOR signaling pathway. However, moderate retention of EVE in the liposomes might limit the targeting ability of 3'-CE sLeX mimic liposomes.

In conclusion, I have succeeded in developing novel structurally simplified sLeX mimic-decorated liposomes for targeted drug delivery to E-selectin-expressing endothelium. Among the liposomes developed, 3'-CE sLeX mimic liposomes could be potential carriers that deliver drugs to inflamed endothelium including tumor vasculature.

(論文審査の結果の要旨)

E-セレクトインは、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ といった炎症性サイトカインにより血管内皮細胞で発現誘導され、炎症組織における白血球の遊走やがん微小環境の形成に関与する。その選択的な発現様式により、E-セレクトインは、腫瘍血管や炎症血管への薬物ターゲティングのための標的分子として注目されてきた。しかし、天然リガンドであるシアリルルイスXの化学合成は工程が多く煩雑であるという問題点があった。こうした背景のもと、本研究では、構造単純化したシアリルルイスX誘導體（以下、sLeXミミック）の設計・合成、およびE-セレクトインを発現する血管内皮細胞への薬物ターゲティングを目的としたリポソーム製剤の開発を行った。

まず、天然sLeXに加え、3'-スルホ基、3'-カルボキシメチル基、3'-(1-カルボキシ)エチル基を有するsLeXミミックをそれぞれリガンドとするリポソームを調製し、炎症性サイトカインで刺激したヒト臍帯血管内皮細胞（HUVECs）を用いて取り込み実験を行った。その結果、3'-(1-カルボキシ)エチルスLeXミミック（3'-CE sLeXミミック）修飾リポソームが天然sLeX体よりも優れ、最大の取り込み速度を示すことを明らかにした。さらに、共焦点レーザー蛍光顕微鏡法および取り込み阻害実験により、3'-CE sLeXミミック修飾リポソームがエンドサイトーシスにより取り込まれ、それがE-セレクトインを介することを確認した。また、分子動力学シミュレーション法を用い、E-セレクトインとの結合において3'-CE sLeXミミックが最も水素結合を形成しやすいことを証明した。

次に、固形腫瘍のモデルとして、HUVECs、肺線維芽細胞、MCF-7乳がん細胞からなり、灌流可能な血管網を有する腫瘍スフェロイドをマイクロ流体デバイス上に作成した。スフェロイドを炎症性サイトカインで処理することによりE-セレクトインの発現が上昇することを確認した上で、蛍光標識した3'-CE sLeXミミック修飾リポソームを灌流すると、本リポソームが血管内皮細胞およびその周囲に高く分布することを見出した。一方ポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームはほとんど分布しないことから、3'-CE sLeXミミック修飾リポソームがin vivo固形腫瘍のモデル系でもE-セレクトイン発現内皮細胞に効率よく取り込まれることを明らかにした。

最後に、mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害剤であるエベロリムス（EVE）を内包する3'-CE sLeXミミック修飾リポソームを調製した。3'-CE sLeXミミック修飾リポソーム封入されたEVEは、HUVECsに経時的に取り込まれ、その取り込みが抗E-セレクトイン抗体により阻害されることを確認した。さらに、HUVECsの細胞運動および血管形成を指標にEVEの抗新生血管形成作用を調べたところ、PEG修飾リポソームに比べ3'-CE sLeXミミック修飾リポソームに封入されたほうが高い効果を示すことを明らかにした。また、pS6キナーゼのThr389のリン酸化が内因性レベルまで抑制されることも確認した。これらの結果より、3'-CE sLeXミミック修飾リポソームによるEVEの保持能はあまり高くないものの、EVEの細胞取り込みを促進することによってmTORシグナル経路を介した治療効果を改善することを明らかにした。

以上、本論文では構造単純化sLeXミミック修飾リポソームを開発し、E-セレクトイン発現内皮細胞への薬物ターゲティングに成功した。中でも、3'-CE sLeX ミミック修飾リポソームが炎症血管や腫瘍血管への薬物送達に有望なことを明らかにした。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。