

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15973

研究課題名(和文) 外部刺激応答性非ラメラ液晶形成脂質含有リポソームによるsiRNAの体内動態制御

研究課題名(英文) siRNA delivery by non lamella liquid crystal forming lipid containing liposomes

研究代表者

板倉 祥子 (Itakura, Shoko)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：20787387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬など新規モダリティに対するがん治療ドラッグデリバリーシステム(DDS)として、生体内安定性と標的組織、細胞内への送達を共に可能とする戦略が重要である。リン脂質を用いたナノ粒子の開発が進められており、体内動態および細胞内動態を精密に制御可能な設計が求められている。本研究では、新規の非ラメラ液晶形成脂質とラメラ形成脂質を組み合わせたナノ粒子を構築した。本ナノ粒子は、温度変化による膜流動性の向上により細胞膜との相互作用を促進し、内封薬物の細胞内への高い送達認められた。また、外部刺激として980 nmレーザーによる担癌マウスの腫瘍部位の加温により、腫瘍成長抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規非ラメラ液晶形成脂質を組み込んだリポソームにより、腫瘍部位での外部刺激によって非ラメラ液晶形成脂質の高い生体膜との相互作用が発揮され、細胞内への薬物送達を向上することに成功した。全身投与によるナノ粒子製剤の薬物利用率は低いのが現状であるのに対して、外部刺激と組み合わせることで、腫瘍局所での薬物の利用が促進されることが期待される。この成果はsiRNAなど多様な創薬モダリティに対して、細胞内への導入までをコントロールすることでより高効率な癌治療のための薬物デリバリーシステムとして貢献できる。

研究成果の概要(英文)：As a drug delivery system (DDS) for cancer therapy, a strategy for achieving compatibility of in vivo stability and intracellular delivery is important. Development of nanoparticles such as lipid nanoparticle and liposomes has actively explored recently, and they are required to precisely control in vivo kinetics and intracellular kinetics of drug. In this study, the nanoparticles composed of a novel non-lamella liquid crystal forming lipid and conventional lamella forming lipid were constructed. The prepared formulations showed high intracellular delivery of the encapsulated drug, and these were thought to involve improved interactions with the cell membrane due to increased membrane fluidity caused by temperature changes. In addition, the tumor growth inhibition of tumor-bearing mice was observed by heating the tumor site with a 980 nm laser as an external stimulus.

研究分野：薬物送達学

キーワード：リポソーム ドラッグデリバリーシステム 外部刺激 温度応答性 癌治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

siRNA などの核酸医薬は未だ有効な治療薬がないがんや難治性の疾患への応用が期待されている。生体内での利用には血中での分解を回避し、標的組織へ到達後、細胞内にまで効率よく導入されることが必要であるため、体内での核酸の動態を精密に制御可能な DDS の実現が大きな鍵となる。がん治療分野では、リン脂質やポリマーを用いたナノ粒子技術を中心に核酸デリバリーのための DDS 研究が盛んに行われている。ナノ粒子の腫瘍標的化メカニズムとしては、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果がよく知られており (*Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65, 71-9) 高い血中滞留性を有する polyethylene glycol (PEG) を修飾したナノ粒子が腫瘍への集積を示すことから汎用されている。一方で、PEG の修飾による細胞との親和性の低下が報告されており (*Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 89, 259-70) 血中滞留性、細胞との相互作用ともに優れた DDS の設計が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞と高い相互作用を示す新規の非ラメラ液晶形成脂質 (MGE) に着目し、ラメラ構造のリポソームに組み込むことで全身投与を可能とし、近赤外光、温度応答性機能を組み合わせた薬物送達システムの構築を目指す。血中滞留性による腫瘍集積と外部刺激に応答した高感度な薬物の細胞内導入が可能となり、効率的ながん治療 DDS が提供できる。

3. 研究の方法

(1) MGE-NP 作製: 1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DMPC)、cholesterol (Chol)、DSPE-PEG2000 (PEG)、MGE を用い、薄膜水和法を利用して作製した。物性評価: 作製した MGE-NP の粒子径は動的孔散乱法により、表面電荷は光散乱電気泳動法により測定した。作製した粒子の形態は、cryo-TEM 観察により評価した。

(2) 温度感受性評価: 脂質膜のゲル相標識蛍光プローブ (DPH) 液晶相標識消光剤 (TEMPO) を用いて、25 ~ 60°C での蛍光強度比 (F/F0) より膜流動性を評価した。また、温度変化に応答した生体膜との相互作用は、赤血球を膜モデルとし、赤血球凝集および溶血率変化を評価した。

(3) MGE-NP の細胞死誘導評価: MGE-NP をマウス乳がん細胞 (4T1 細胞) に添加し、温度変化による細胞死をヨウ化プロピジウム (PI) 染色により評価した。

(4) ドキソルビシン塩酸塩 (DXR) 封入 NP の細胞内への薬物送達評価: DXR 封入 MGE-NP を 4T1/Luc 細胞に添加し、980 nm のレーザー照射後、共焦点レーザー顕微鏡観察により DXR の細胞内局在を評価した。

(5) *in vivo* 抗腫瘍効果評価: DXR を封入した MGE-NP を、4T1 細胞を皮下移植したマウスの尾静脈により投与した。24 時間後にレーザーを照射し、24 時間後に IVIS によりルシフェラーゼ活性を評価した。

4. 研究成果

(1) MGE 含有脂質ナノ粒子の調製

DMPC をベースに MGE を 10、20、30 mol% 混合した粒子を調製した。Table 1 に調製したナノ粒子の粒子径とゼータ電位を示す。調製したナノ粒子は、約 100 ~ 150 nm の粒子径で表面電荷は中性を示した。多分散指数 (PDI) は 0.5 以下の比較的狭い粒度分布を示した。また、cryo-TEM により粒子形態の観察の結果、MGE を 30 mol% 含有した製剤 MGE30-NP (Fig.1a) においても、DMPC-NP (Fig.1b) と同様にシングルラメラ構造を有するリポソームであることが示された。

Table 1. Composition and physicochemical properties of prepared lipid nanoparticles.

	DMPC/Cho/PEG/MGE Molar ratio	Particle size (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
DMPC-NP	60/40/6	139 ± 49	0.27 ± 0.06	-1.2 ± 1.7
MGE10-NP	50/40/6/10	112 ± 14	0.23 ± 0.06	-2.2 ± 2.0
MGE20-NP	40/40/6/20	122 ± 4.4	0.37 ± 0.03	-3.5 ± 2.6
MGE30-NP	30/40/6/30	112 ± 11	0.33 ± 0.05	-2.0 ± 0.9

The data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

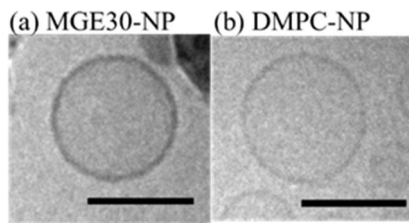


Figure 1. cryo-TEM images

The images of (a) DMPC-NP, (b) MGE30-NP were obtained by 300 kV TEM. Scale bar 100 nm

(2) 温度感受性評価

DMPC-NP、MGE10-NP、MGE20-NP、MGE30-NP の温度変化による膜流動性を蛍光消光法により評価した。いずれも蛍光強度比 (F/F_0) は温度の上昇に伴い低くなり、膜流動性が増加した (Fig. 2a) さらに、温度変化による生体膜との相互作用を赤血球膜モデルで評価した結果、37°C では DMPC-NP、MGE-NP のいずれの粒子においても溶血作用はほとんど認められなかったのに対し、45°C において MGE30-NP で高い溶血作用が認められた (Fig. 2b)。したがって、MGE を含有したナノ粒子は、温度上昇による膜流動性の促進により生体膜との相互作用が亢進していると考えられた。

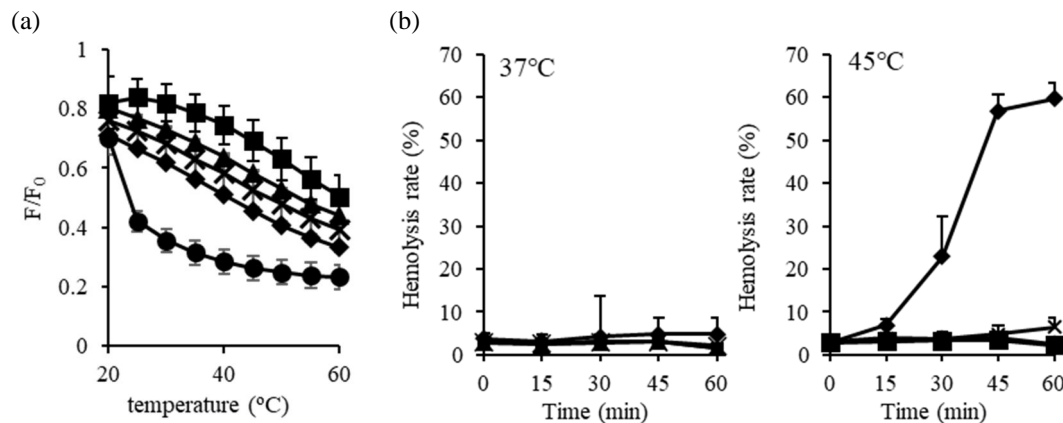


Figure 2. Evaluation of the effect of temperature on membrane fluidity and interaction biomembrane. Fluorescence quenching of DPH labeled nanoparticles by TEMPO (a). The temperature was scanned at 2°C/min. Hemolysis activity of lipid nanoparticles at 37°C and 45°C (b). ◻ : DMPC-NP, ◼ : MGE10-NP, ✖ : MGE20-NP, ◾ : MGE30-NP, ◿ : DMPC only

(3) 細胞死誘導評価

980 nm レーザー20分の照射で 45°C に加温し、MGE30-NP の温度変化による細胞死誘導効果を評価した。DMPC-NP、DMPC-NP+レーザー照射、MGE30-NP においては、20分後まで大きな変化はなかった。MGE30-NP+レーザー照射においては、死細胞の指標である PI 陽性の細胞が多数観察された (Fig. 3)。レーザー照射による温度上昇で、MGE-NP の細胞死誘導効果が認められ、細胞膜と強く相互作用することが示唆された。

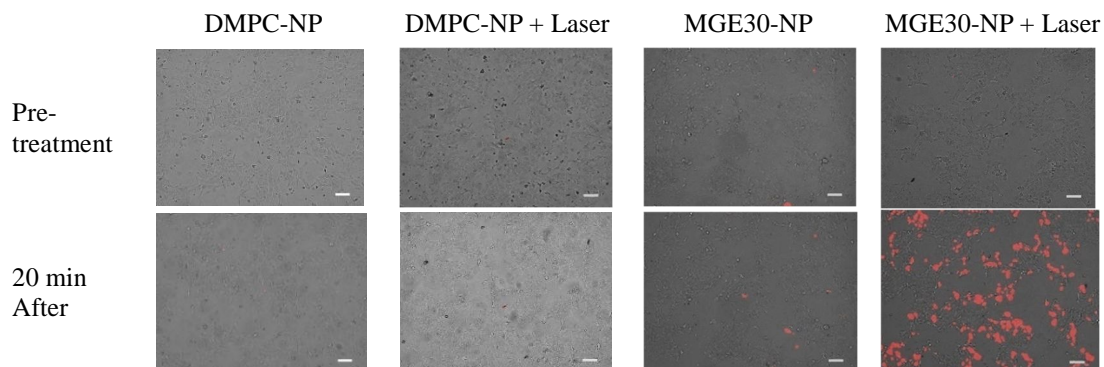


Figure 3. Fluorescence images of PI-positive 4T1/Luc cells treated with DMPC-NP + laser, MGE30-NP + laser. Scale bar, 100 μ m

(4) DXR 封入ナノ粒子による細胞内 DXR 送達の評価

癌細胞との相互作用による DXR の細胞内への送達を評価するため、4T1/Luc 細胞に DMPC_{DXR}-NP、MGE30_{DXR}-NP を添加し、DXR の蛍光を CLSM 観察により評価した。980 nm レーザー照射により加温した結果、DMPC_{DXR}-NP において核へ赤色蛍光の DXR の集積が認められたが、(Fig.

4a) MGE30_{DXR}-NP では核内に強い DXR の蛍光が認められ、核へのより高い集積が示された (Fig.4b)。したがって、MGE を含有することで、内封した DXR の細胞内への送達を促進していると考えられた。

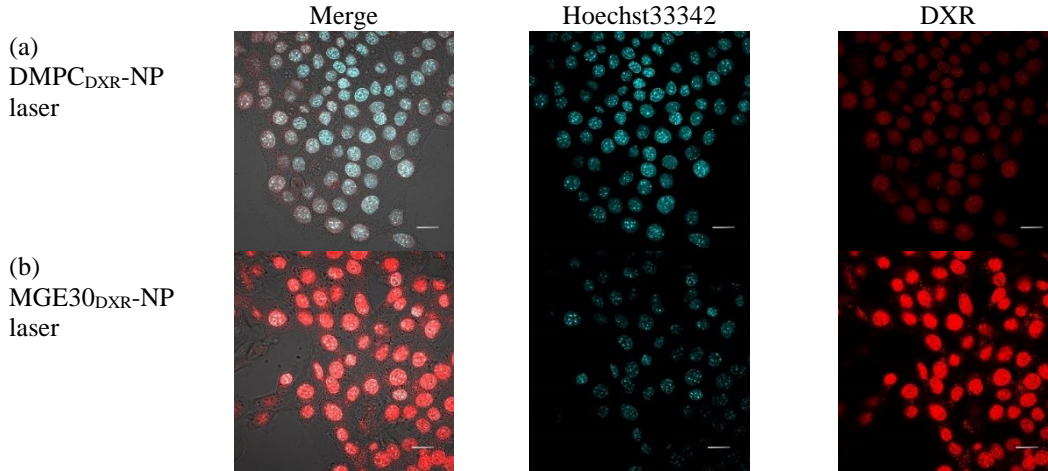


Figure 4. Cellular uptake and intracellular location of DXR were evaluated by CLSM. 4T1/Luc cells were treated with DMPC_{DXR}-NP (a), MGE30_{DXR}-NP (b). Intracellular DXR (red) images were obtained after 980 nm Laser irradiation. The nuclei were stained with Hoechst33342 (blue). Scale bars, 20 μ m.

(5) 抗腫瘍効果の評価

4T1/Luc 細胞移植マウスにおいてルシフェラーゼ発光を指標に抗腫瘍効果の評価した。抗癌剤のドキソルビシン塩酸塩 (DXR) を内封した DMPC-NP、MGE30-NP を投与後、左腫瘍にのみ 980 nm のレーザーを照射した。経時的な腫瘍の発光を *in vivo* imaging system により評価した結果、DMPC-NP と比較して MGE30-NP において腫瘍成長抑制効果が高い傾向が得られた (Fig.5)。以上の結果より、MGE を含有させることで *in vivo* においても温度の上昇による細胞死誘導効果を示し、薬物送達キャリアとして機能することが示唆された。

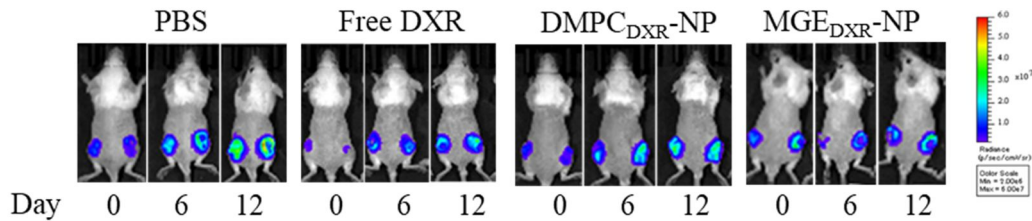


Figure 5. Anti-tumor activity by DXR encapsulated MGE containing nanoparticles. DMPC-NP and MGE30-NP were injected intravenously into mice transplanted 4T1/Luc at right and left side. At 24 h after, the left side of tumor was treated with laser for 30 sec. Representative luminescence images of mice.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 祐也、板倉 祥子、藤堂 浩明、高山 幸三、杉林 堅次
2. 発表標題 生体膜親和性を制御可能な温度応答性ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石 盛裕、板倉 祥子、藤堂 浩明、長谷川 裕也、高山 幸三、杉林 堅次
2. 発表標題 核酸の細胞内送達を目指した新規脂質含有ナノ粒子製剤の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板倉 祥子、白石 盛裕、石川 結理、高山 幸三、土黒 一郎、藤堂 浩明、杉林 堅次
2. 発表標題 核酸の細胞内送達における非ラメラ液晶形成脂質含有ナノ粒子の有用性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川 裕也、板倉 祥子、高山 幸三、杉林 堅次、藤堂 浩明
2. 発表標題 近赤外光照射による温度変化に応答して細胞死を誘導可能な脂質ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 マイクロ流体技術による核酸-脂質ナノ粒子複合体の調製と特性評価
2. 発表標題 石川結理、板倉祥子、高山幸三、杉林堅次、藤堂浩明
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉 祥子、高山 幸三、杉林 堅次、藤堂 浩明
2. 発表標題 マイクロ流体技術により調製した脂質ナノ粒子と核酸複合体の特性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関