

《若手研究者紹介》



動態制御に基づいたナノ粒子製剤の合理的な設計・開発

大河原 賢 一* Ken-ichi Ogawara

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系

1. はじめに

今回、このような形でコラム執筆の機会を得た。折角なので、小職の研究者としての「生き立ち」を振り返りながら、自身の研究の立ち位置、あるいは今後の方向性について思案する良い機会としたい。

私は学部4回生になると同時に当時、宮嶋孝一郎教授が主宰されていた京都大学薬学部薬品物理化学教室に所属し、「ヘパリン封入りポソームの動脈硬化部位血管内皮細胞選択的送達に関する研究」に参加する機会を与えられ、研究者としての「いろは」を学んだ。これまで、ナノ粒子の体内動態制御を通じた薬物キャリアとしての応用を念頭に研究を続けてきたこと、留学先で血管内皮細胞をターゲットとして研究を行ったこと、現在、腫瘍内血管内皮細胞の機能調節により、ナノ粒子の局所動態を制御することを目指して研究を進めていることを併せて、当時は四苦八苦しながら進めた研究者人生最初のテーマに、「偶然」という言葉では済ますことの出来ない、何か「縁深い」ものを感じる。講座配属の際、抽選の結果、希望していた薬剤学教室に所属出来なかった経緯もあり、大学院からは橋田 充教授の主宰される薬剤学講座(その後薬品動態制御学分野に改称)の一員となる。大学院では西川元也助手(現・病態

*1994年京都大学薬学部卒業。1996年同大学院薬学研究科修士課程修了。同年10月より岡山大学薬学部助手。2000年に学位(薬学博士)を取得(京都大学)。2001年よりオランダ王国Groningen大学博士研究員(1年半)。2009年より岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬物動態制御学分野准教授。2007年度日本薬学会中国四国支部奨励賞、2011年度日本薬学会奨励賞受賞。連絡先: 〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1
E-mail: ogawara@pharm.okayama-u.ac.jp

情報薬学分野准教授)の研究グループに参加し、主に糖修飾高分子の肝取り込みの薬動学的解析を行った。岡山大学に移ってからは、ナノ粒子の肝移行を決定づける支配因子を系統的に整理すると共に、その知見を基盤としたナノ粒子製剤の合理的なデザインを目標に研究を続けている。更にこの数年は、抗がん剤内封ナノ粒子製剤の設計・開発にも注力している。本稿では、岡山大学での研究成果を中心に、その一部を紹介させていただく。

2. ナノ粒子表面に吸着する
血清タンパク質の重要性

最適なナノ粒子製剤の設計・開発においては、目的に対応した形で、ナノ粒子の体内動態を厳密に制御することが必須となる。ナノ粒子の体内動態に影響を与える因子として、これまでに血液成分に代表される生体側因子の重要性を報告したのも見受けられるものの、やはりナノ粒子の体内動態はその粒子サイズ、電荷、あるいは表面疎水性といった微粒子側の特性を基盤として整理される傾向があった。しかし上述したように循環血液中に投与されたナノ粒子は、実際にはまず血液中のタンパク質等との相互作用を受けるため、その表面特性は大きく変化することが予想される。そこで私は、モデルナノ粒子として、粒子径50 nmの polystyrene nanosphere (NS-50) と lecithin-coated NS-50 (LNS-50) を用い、ナノ粒子の表面疎水性の差違が及ぼす、血液中での存在状態および体内動態への影響について検討を加えた。まず、緩衝液中あるいは血清中における両ナノ粒子の表面疎水性を上述した方法により評価したところ、緩衝液中での表面疎水性は、NS-50の

方が高いものの、血清中における見かけの表面疎水性は、逆に LNS の方が高くなっていること、さらに血清中において、NS-50 の表面に、より多くの血清タンパク質が吸着していることが明らかとなった。一方、両ナノ粒子の体内動態特性には大きな違いが確認された。つまり、血清中における見かけの疎水性がより高い LNS-50 において、顕著に高い血中滞留性が認められた。この結果は、従来からの認識、つまり微粒子側の有する物性のみでは説明しきれない現象であった。さらにこの高い血中滞留性は、主要な取り込み臓器である肝臓に対する親和性の低さに起因したものであることが明らかとなった。そこで次に、これら両ナノ粒子の肝臓による取り込み特性について肝灌流実験を用いて検討を加えた。その結果、NS-50 の肝臓への取り込みには形質膜に存在する機能性タンパク質が関与した機構、つまりレセプター介在性の取り込み機構が存在するのに対し、LNS-50 の場合にはそのような機構はほとんど関与していないことが示唆された。そこで次に、この両微粒子の肝移行特性の違いを決定づけている因子として、ナノ粒子表面に吸着した血清タンパク質の質的な違いに着目した¹⁾。両ナノ粒子表面に吸着した血清タンパク質を SDS-PAGE により解析した結果、いくつかの特定の血清タンパク質において、両ナノ粒子間でその吸着パターンに大きな違いが認められることが明らかとなった (図 1)。

さらに Western blotting により、NS-50 表面には、オプソニンが格段に多く吸着していることが明らかとなった。一方、顕著に高い血中滞留性を示した LNS-50 表面には、NS-50 表面にはほとんど認められない、ある特定の血清タンパク質が吸着していることも合わせて明らかとなった。以前、我々の研究により、血清タンパク質中にはナノ粒子の肝取り込み抑制効果を示すタンパク質が存在していることが明らかになっていることを合わせ、この LNS-50 に特異的に吸着しているタンパク質は、製剤学的な応用の観点から非常に興味深い。

今回紹介させていただいた結果を一例として、我々は微粒子キャリアの体内動態あるいは肝臓移行特性の決定因子として、吸着血清タンパク質の種類的重要性を多方面から示した²⁾。その過程で、微粒子の血液中における表面特性は、各種血液中成分との相互作用により、必ずしも微粒子自身の表面特性

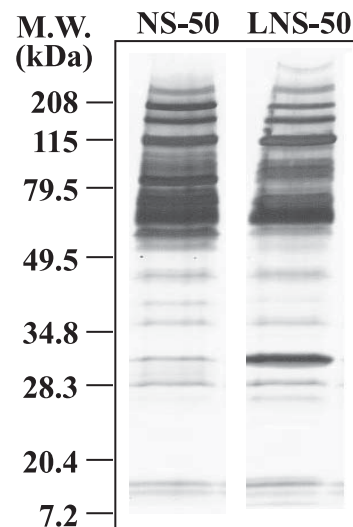


図 1 NS-50, LNS-50 表面に吸着した血清タンパク質の SDS-PAGE による泳動パターン

を反映しないことも併せて明らかとなった。よって微粒子自身の物理化学的特性は、血液中での各種血液成分との相互作用に影響を及ぼすことによって、その体内動態に対して間接的な支配因子となっている可能性が考えられた。

3. ナノ粒子の腫瘍組織への移行性に及ぼす腫瘍局所環境の重要性

ナノ粒子を利用したがん治療においては、腫瘍組織の組織学的な特性を利用し、血中滞留性に優れるナノ粒子に抗がん剤を内封することにより、抗がん剤の効率的なパッシブターゲティングが可能となることが知られている (EPR 効果)。そのため、これまでは、ナノ粒子の血中滞留性を上昇 (細網内皮系組織への移行を減弱) させることに主眼を置き、多くの抗がん剤内封ナノ粒子の設計・開発が試みられてきた。しかしながら、実際の抗腫瘍効果は、ナノ粒子製剤の血中滞留性のみならず、がん種固有の微小環境に依存したナノ粒子の腫瘍組織移行性、ナノ粒子あるいは内封薬物の腫瘍組織内における局所動態、さらには用いた抗がん剤に対するがん細胞の感受性など、多くの因子が複雑に絡み合っ決定されている。したがって、ナノ粒子を利用したがん治療の最適化を達成するためには、ナノ粒子の血中滞留性の改善のみならず、ナノ粒子の腫瘍組織への移行性ならびに内封抗がん剤の腫瘍組織内での局所動態を司る腫瘍組織の組織学的・機能学的な特徴を充分に理解することが必要となる。私は、こうした背景に

着目し、ナノ粒子を利用したがん治療に影響を及ぼす諸因子を系統的に検討することにより、実質的な抗腫瘍効果決定因子の解析を進めることにした³⁾。紙面の都合もあり、詳細をお示しすることは出来ないが、得られた結果を総括すると、EPR効果を利用したナノ粒子製剤の抗腫瘍効果には、内封抗がん剤に対するがん細胞の感受性のみならず、ナノ粒子の腫瘍組織へのデリバリー効率が実質的な支配因子として機能していること、またナノ粒子の腫瘍組織へのデリバリー効率に影響を与える因子として、腫瘍組織内の血管密度、並びに血管透過性といった、腫瘍局所の微小環境が挙げられることを示す重要な知見であった³⁾。

4. オランダ留学時の研究テーマ

学位を取得して暫くしたころ、オランダ王国グローニンゲン大学に博士研究員として、1年半研究に没頭できる機会を得た。与えられたテーマは、ウイルスベクターのアクティブターゲティングに関するものであり、最初は戸惑ったが、結果的に非常に多くの事を学ばせていただいた。この経験が無ければ、留学後の研究が現在の方向へと展開することは無かったと思う。

遺伝子治療の最適化を考える場合、標的細胞に選択的かつ効率よく送り込むことのできるデリバリーシステムを構築することが不可欠となる。遺伝子のデリバリーにおける律速段階は、形質膜、エンドソーム膜および核膜の透過過程であるが、ウイルスは、これらの障害をすべて克服して、自己の遺伝情報を核内に送達させることができる天然の遺伝子デリバリーシステムであると考えられる。近年、血管内皮細胞ががん、あるいはリウマチ性関節炎、潰瘍性大腸炎等の慢性炎症性疾患の症状の維持・悪化において中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている。血管内皮細胞が血管壁に局在するという解剖学的特性を合わせ考えると、この血管内皮細胞を標的とした、全身循環系を介したがんの遺伝子治療は、非常に有望な治療戦略であると考えられる。そこで我々は、非常に高い遺伝子導入効率を有するアデノウイルスをベクターとして用いることにより、腫瘍・炎症組織内血管内皮細胞を標的細胞とした多機能性アデノウイルスベクターの開発を目指した。

アデノウイルスが有する最大の問題点は、静脈内

投与後の速やかな肝臓への移行（他臓器における低い遺伝子発現効率）と、それに起因する肝毒性である。留学当時、遺伝子工学技術を用いた「アデノウイルスの構造修飾」による肝移行の抑制が数多く試みられていたが、いずれも満足な結果とは言い難かった。しかも肝臓への取り込みを担っているとされるアデノウイルス表面の fiber knob と肝臓実質細胞表面の coxsacki adenovirus receptor (CAR) との相互作用の減弱を目的とした fiber knob 改変型アデノウイルスにおいても、その肝臓への移行は、十分に抑制されるに至っておらず、アデノウイルスの肝臓への移行機構は予想以上に複雑であることが示唆されていた。私は、アデノウイルスが直径約 80 nm の粒子である点に着目し、これまでに行ってきた「ナノ粒子の体内動態制御」に関する研究成果を基盤として、アデノウイルスの体内動態制御を試みた。即ち、アデノウイルス表面を、リポソームの体内動態制御において幅広く用いられている二官能性 polyethylene glycol (PEG) で化学的に表面修飾することにより、fiber knob と CAR との相互作用、血液成分との相互作用、さらには免疫系細胞による認識を、それぞれ減弱することにより、肝臓をはじめとする、アデノウイルスの主要な移行臓器・組織への移行の抑制を目指した。さらに、腫瘍・炎症組織血管内皮細胞への指向性を付与するために、これら標的細胞に過剰発現している $\alpha\beta 3$ -integrin あるいは E-selectin に対する認識素子を PEG の他方末端に導入した。つまり、本研究では、ベクターの化学修飾により、「ステルス性」、「免疫原性の減弱」、「腫瘍・炎症組織血管内皮細胞への標的指向性」を同時達成することを目指している。

In vitro 実験において、腫瘍あるいは炎症組織血管内皮細胞指向型アデノウイルスを用いることにより、fiber knob と CAR の相互作用が著しく減弱し、細胞内侵入経路が CAR を介した経路から、標的分子を介した経路へとシフトしたことを示唆する結果が得られた。さらに E-selectin 抗体を認識素子として搭載した炎症組織血管内皮細胞指向型アデノウイルスを用いて行った *in vivo* 実験においては、アデノウイルスを PEG 修飾することにより、静脈内投与後の血中滞留性が顕著に増大することが示された。また、ベクター静脈内投与後に炎症部位皮膚を免疫染色した結果、化学修飾型アデノウイルスが炎

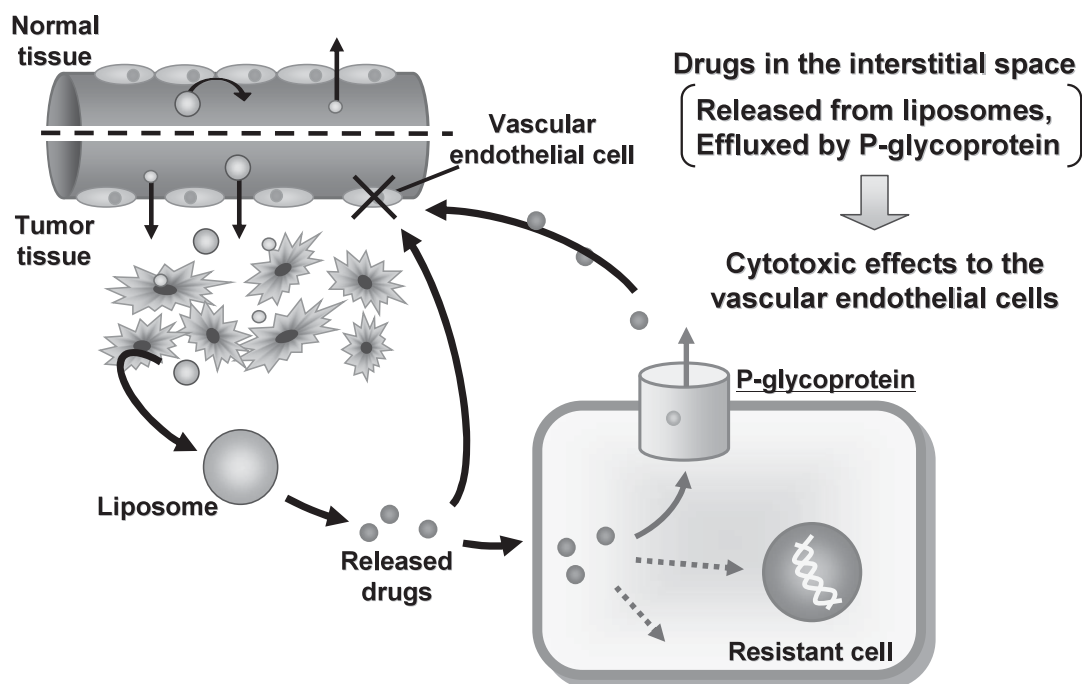


図2 耐性株において認められた *in vivo* 抗腫瘍効果の発現メカニズム

症部位皮膚内血管内皮細胞に選択的に移行することが示唆された。さらに、静脈内投与48時間後の炎症部位皮膚におけるルシフェラーゼ活性は、非炎症部位皮膚に比べ有意に高く、この結果は、化学修飾型アデノウイルスを用いることにより、標的細胞への移行効率のみならず、標的細胞における遺伝子発現効率が改善できることを示唆するものであった。今回、紙面の都合もあり、詳細は論文を参照していただきたい⁴⁾。

5. がん治療における新規治療戦略について

近年、抗がん剤開発の進展により、多種多様な抗がん剤が臨床において用いられているが、抗がん剤特有の重篤な副作用により、多くの場合は低用量、且つ長期的な投与を余儀なくされている。しかしながら、その長期的な投与により、がん細胞が抗がん剤に対する耐性を獲得し、薬物の有効性が徐々に低下することが臨床的にもしばしば認められ、がん化学療法における重大な問題となっている。現在多くの耐性化メカニズムが提唱されているが、その中でも抗がん剤の長期暴露により、薬剤排出トランスポーターであるP-糖タンパク質(P-gp)ががん細胞上に発現誘導されることが、がん治療上での耐性獲得における主要な要因の一つと考えられている。このP-gpの発現誘導により耐性化したがん細胞に対

する耐性克服を目的として、P-gp阻害剤と抗がん剤の併用、微粒子性担体の利用によるP-gpを介した細胞外排出の回避、P-gpをコードするMDR1遺伝子の発現抑制など、多くのアプローチが試みられているが、依然として十分な効果が認められるには至っていない。そこで私は、マウス結腸がん由来がん細胞Colon-26(C26)を用いて、抗がん剤ドキソルビシン(DOX)に対して耐性を示すP-gp高発現株(C26/DOX)を樹立し、それにより作成した固形がんモデルマウスにおける*in-vivo*抗腫瘍効果を指標として、その耐性克服を目指し種々の検討を行った。

まず、DOX水溶液の静脈内投与を行ったところ、C26/control及びC26/DOX固形がんモデルマウスに対して*in-vivo*抗腫瘍効果は認められず、その一方でDOXによる毒性作用として、顕著な体重減少が認められた。そこで次にPEG修飾リポソームにDOXを内封した、DOX内封PEG修飾リポソーム(PL-DOX)を調製し、検討に用いた。C26/control及びC26/DOX固形がんモデルマウスにPL-DOXを静脈内投与したところ、*in-vitro*での結果とは異なり、C26/DOX固形がんモデルマウスにおいてもC26/control固形がんモデルマウスと同程度の高い腫瘍増殖抑制効果及び生存日数の延長効果が認められることが明らかとなった。最初に学生から結果を見せてもらった時には、正直戸惑ったが、本結果の背後に

存在するメカニズムに関して考えられる可能性を一つ一つ検証して行くことにした。

まず、PEG 修飾リポソームの体内動態特性の評価、並びに血管内皮細胞のマーカー分子である CD31 の免疫組織化学染色により腫瘍組織内血管分布性の評価を行った結果、両固形がんモデルマウス間で PEG 修飾リポソームの腫瘍組織内への蓄積性、及び腫瘍組織内の血管分布性に差は認められなかった。次に TUNEL 染色法により腫瘍組織内で誘発されるアポトーシスの程度を両固形がんモデルマウスにおいて検討した結果、C26/DOX 固形がんモデルマウスの腫瘍組織内で誘発されるアポトーシスの程度が、C26/control 固形がんモデルマウスと比較して顕著に低いことが明らかとなった。このことは、C26/DOX において認められた高い *in-vivo* 抗腫瘍効果に、DOX のがん細胞への直接作用以外の機構が関与している可能性を示唆するものであった。そこで、腫瘍組織内の血管内皮細胞に対する DOX の殺細胞効果の関与を考え、まず血管内皮細胞のモデルとして汎用される、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の DOX に対する *in-vitro* 感受性を MTT アッセイにより検討した。その結果、HUVEC に対する DOX の IC₅₀ 値は、C26/control に対する値とほぼ同等であり、HUVEC が DOX に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。さらに腫瘍組織内の血管内皮細胞とアポトーシスを起こしている細胞の蛍光二重染色を行ったところ、C26/DOX 固形がんモデルマウスの腫瘍組織内において、血管内皮細胞とアポトーシスを起こしている細胞に分布の一致が認められる特徴的な箇所が高い割合で認められた。この結果は、C26/DOX 固形がんモデルマウスにおいて認められた高い *in-vivo* 抗腫瘍効果に、腫瘍組織内に到達した DOX の腫瘍組織内血管内皮細胞に対する殺細胞効果、及びそれに伴う血管新生の阻害作用が関与していることを示唆するものである (図 2)⁵⁾。

現在は、これらの知見を基盤として、血管新生阻害作用を有する分子標的薬をナノ粒子製剤化し、抗がん剤耐性を獲得した腫瘍に対する、血管新生阻害効果に基づいた新規治療戦略の立案を進めているところである。その過程で、腫瘍組織内の微小環境が

本製剤の効果発現の重要な因子となっていることも見出しており、「敵を知る」ことの重要性を再認識した次第である。今後は、治療に先立った患者個々の腫瘍組織内微小環境の特性把握に基づいた、使用薬剤あるいはナノ粒子製剤の合理的な選択によるがん治療戦略の最適化を目指し、研究を進めていきたい。

6. おわりに

本稿でご紹介した研究成果は、岡山大学名誉教授・木村聰城郎先生、岡山大学教授・檜垣和孝先生、グローニンゲン大学 Prof. G. Molema を始めとした多くの先生方のご指導・ご助言の所産であり、ここに深謝いたします。また、研究は多くの優秀な学生によって進められており、実験担当学生諸子にこの場をお借りして御礼申し上げます。最後に大所高所よりご支援、ご鞭撻を賜っております恩師、京都大学大学院薬学研究科教授・橋田 充先生に衷心より御礼申し上げ、拙稿の結びとさせていただきます。

引用文献

- 1) K. Furumoto, K. Ogawara, S. Nagayama, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura, Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition, *J. Control. Release*, **83**, 89–96 (2002).
- 2) K. Ogawara, K. Higaki, T. Kimura, Major determinants in hepatic disposition of polystyrene nanospheres: Implication for rational design of particulate drug carriers, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**, 277–306 (2002).
- 3) K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki, T. Kimura, Determinants for *in-vivo* anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors, *Int. J. Pharm.*, **359**, 234–240 (2008).
- 4) K. Ogawara, M. G. Rots, R. J. Kok, H. E. Moorlag, A. van Loenen, D. K. F. Meijer, H. J. Haisma, G. Molema, A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*, *Human Gene Therapy*, **15**, 433–443 (2004).
- 5) K. Ogawara, K. Un, K. Tanaka, K. Higaki, T. Kimura, *In vivo* anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells, *J. Control. Release*, **133**, 4–10 (2009).