

ペプチドリガンドを搭載した ドラッグデリバリーシステム (DDS) の創製

西山 伸宏

近年のペプチド設計技術の飛躍的な進歩によってさまざまな機能性ペプチドが開発され、画期的な診断・治療薬を創出するためのキーテクノロジーとして期待されている。なかでもペプチドリガンドを導入したナノDDSの開発は、受動的ターゲティング型のナノDDSでは十分な集積が期待できない臓器・組織への薬剤送達や細胞内で機能発現するオリゴ核酸やタンパク質の細胞内送達においてきわめて重要となる。本稿では、具体的なペプチドリガンドとして、広く研究され、悪性脳腫瘍に対する治療薬として承認されている環状RGDペプチドを例にあげ、環状RGDペプチド搭載高分子ミセル型ナノDDSによる悪性脳腫瘍への抗がん剤送達と細胞内へのオリゴ核酸送達の研究結果を中心に、ペプチドリガンドの効果を紹介する。

1. はじめに

ナノテクノロジーの医療応用としてナノ粒子型のドラッグデリバリーシステム (ナノDDS) が大きな注目を集めている。リポソームや高分子ミセルに抗がん剤を内包した第一世代のナノDDSは、すでに一部が実用化され、いくつかのシステムが目下臨床試験中である。これらの第一世代ナノDDSのがん組織への集積は、がん組織における血管透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築に基づく enhanced permeability and retention (EPR) 効果¹⁾ によって説明されており、受動的ターゲティング (passive targeting) と呼ばれている。一方、近年、標的指向性分子 (リガンド分子) を導入した能動的ターゲティング (active targeting) 型のナノDDSの研究開発が活発に行われており、上記の第一世代型ナノDDSと比較して、i) 標的組織への効率的な移行、ii) 標的細胞による取り込み、iii) 細胞小器官

(オルガネラ) のターゲティングが可能になる。i) に関しては、がん組織のみならず受動的ターゲティングが期待できない臓器・組織への薬剤送達において重要である。また、細胞内で機能発現する核酸やタンパク質の送達においては、ナノDDSの設計にii) とiii) を考慮する必要がある。能動的ターゲティングのリガンド分子としては、抗体 (フラグメント)、ペプチド、アプタマーが利用されている。そこで本稿では、上記i) ~iii) を達成するためのナノDDS設計の具体例として、筆者らが研究を進めてきた環状RGDペプチドをリガンド分子として搭載した高分子ミセルを紹介する。

高分子ミセルは、性質の異なる2種類の高分子が連結されたブロック共重合体の自己組織化により形成されるコア-シェル型のナノ粒子である (図1)^{2,3)}。高分子ミセルは、

東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所 (横浜市緑区長津田町 4259, R1-11)

Development of targetable drug delivery systems with peptide ligands

Nobuhiro Nishiyama (Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, R1-11, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8503, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890039

© 2017 公益社団法人日本生化学会

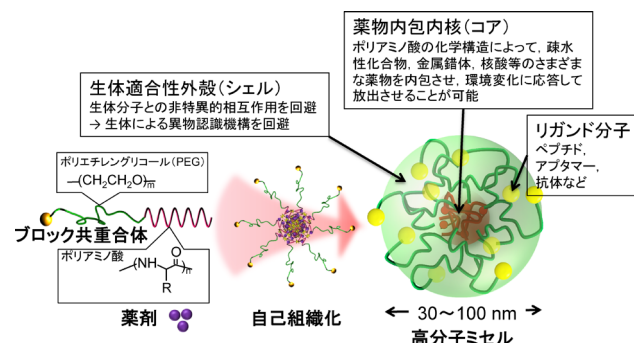


図1 高分子ミセル型ナノDDSの模式図

疎水の相互作用、静電的相互作用、金属錯体形成などの利用によって、疎水性分子、荷電性高分子、金属錯体等のさまざまな化合物を安定に内包でき、さらにそれらの分子の制御放出が可能である。また、高分子ミセルは、全身投与において、上述のEPR効果によって固形がんにも効率的に集積することが知られており、抗がん剤等の薬剤の副作用を低減させ、薬効を高めることができる。現在までに、抗がん剤を内包した高分子ミセルは、5品目の製剤が臨床試験へと進んでおり、早期の実用化が期待される。

環状RGDペプチドは、 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに選択的な結合を示すことが知られている。これらのインテグリンは、体内で広範に発現しているが、環状RGDペプチドは静脈内に投与された場合、がんや炎症部位の増殖性の血管内皮細胞に選択的に結合する⁴⁾。環状RGDペプチドは、がんや炎症部位の血管内皮細胞の増殖を抑制する効果を有することから、Cilengitide[®]の名称で膠芽腫に対するオーファンドラッグとして欧州で承認されている⁵⁾。また、*in vivo* ファージディスプレイ法によりがん集積性のペプチドを探索するとその多くのペプチドが環状のRGD配列を有することも報告されており、環状RGDペプチドはがんを標的とする能動的ターゲティングにおいて最も広く利用されているペプチドである。

2. 環状RGDペプチド搭載ナノDDSによる悪性脳腫瘍のターゲティング

グリオーマ（神経膠腫）に代表される悪性脳腫瘍は、き

わめて難治性であることが知られており、グレード4の膠芽腫の5年生存率はわずか10%である。膠芽腫（glioblastoma: GBM）の治療法としては、可能な限り外科的切除を行い、放射線治療および化学療法が適用される。化学療法ではテモゾロミドが標準的に使用されているが、全生存期間中央値において、放射線治療単独群が12.1か月であったのに対して、テモゾロミド併用群は14.6か月であり、わずか2.5か月の生存期間の延長しか得られていない⁶⁾。GBMの有効な治療法の実現を目指してナノDDSの開発も行われているが、GBMは他の固形がんと比較してEPR効果に基づく受動的ターゲティングにより十分ながん集積量が得られにくい。これは、脳毛細血管に存在する血液脳関門（blood-brain barrier: BBB）と同様に悪性脳腫瘍において血液脳腫瘍関門（blood-brain tumor barrier: BBTB）が形成されているためであると考えられている⁷⁾。BBTBは、低分子量のMRI造影剤であるマгнеビストによる悪性脳腫瘍のイメージングが可能であるように低分子量の薬剤に対しては障壁となりにくい、抗体やナノDDSにおいては障壁となり、BBTBの克服は解決すべき大きな課題である。

そこで筆者らは、白金製剤オキサリプラチン活性体であるダハプラチン内包高分子ミセルの表層PEG（ポリエチレングリコール）末端に環状RGDペプチドを導入した能動的ターゲティング型ナノDDSを構築した⁸⁾。前述のように、Cilengitide[®]として承認されている環状RGDペプチドは悪性脳腫瘍の新生血管に特異的に結合することができる⁴⁻⁶⁾。また、多くのがん細胞においても $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの過剰発現が認められており、環状RGDペプ

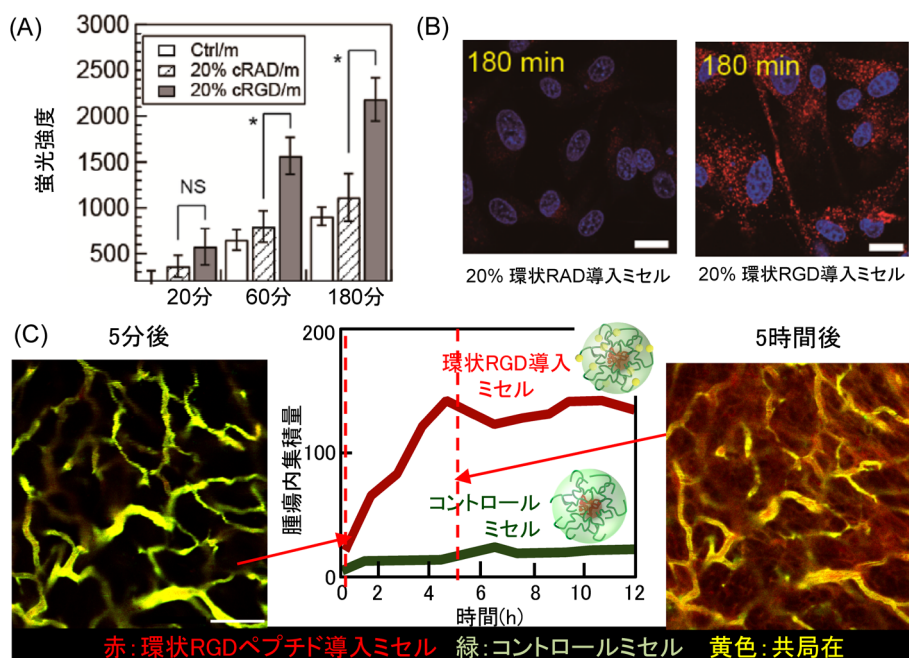


図2 環状RGDペプチド導入ミセルによる悪性脳腫瘍モデルへのドラッグデリバリー

(A)環状RGDペプチド導入ミセル (cRGD/m) のU87MG細胞による取り込み量, (B)環状RGDペプチド導入ミセルの細胞内分布 (青:細胞核, 赤:ミセル), (C)環状RGDペプチド搭載ミセルの悪性脳腫瘍モデルへの集積。環状RGDペプチド搭載ミセル(赤)はリガンドを導入していないミセル (コントロールミセル, 緑)と比較して速やかにがん組織に移行することが確認された。文献8より改変して引用。

チドはがん細胞の標的化にも有用である⁹⁾。そこで、ヒトGBM由来U87MG細胞による取り込みを評価した結果、ミセル表面のPEG末端への環状RGDペプチド導入率が5%では取り込み量に変化はみられなかったが、10%、20%ではペプチド導入率の増加に伴いミセルの細胞取り込み量が増大し、40%では細胞取り込み量は20%のそれと同等であった⁸⁾。環状RGDペプチドを20%導入したミセルは、 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ インテグリンには結合しないコントロールの環状RADペプチドを導入したミセルとの比較において、3時間のインキュベーションで2.5倍の取り込み量を示した(図2A)。また、環状RGDペプチドを導入したミセルは環状RADペプチドを導入したミセルより迅速に細胞に内在化されることも確認された(図2B)。以上の結果より、環状RGDペプチド導入ミセルのGBM細胞に対するターゲティング能が明らかになった⁸⁾。

一方、U87MG細胞の固形がんモデルを用いた体内動態評価において、環状RADペプチドを導入したコントロールミセルと比較して、環状RGDペプチド導入ミセルはがん組織に効率的に移行し、腫瘍組織内に均一に分布することが確認された(環状RGDおよび環状RADペプチドの導入率は20%、図2C)。ここで注目すべき点として、環状RGDペプチド導入ミセルのがん組織への集積は5時間以内にプラトーに達していることがあげられる。このような迅速ながん組織への移行は24~48時間を要する受動的ターゲティングでは説明することができない。また、U87MG細胞の固形がんモデルは、タイトジャンクションのマーカであるClaudin-5および α -SMA陽性の血管内皮細胞から構築されており、*in vivo* 共焦点顕微鏡観察では環状RGDペプチド導入ミセルの腫瘍血管内皮細胞への結合が示唆された。このことから、環状RGDペプチド導入ミセルはトランスサイトーシス等の能動輸送経路によってBBTBを通過し、がん組織に移行しているものと考えられる。これらの効果によって、環状RGDペプチド導入ダハプラチン内包高分子ミセルは、U87MG細胞の同所移植モデルに対しても顕著な抗腫瘍効果を示すことが確認された(図3)⁸⁾。

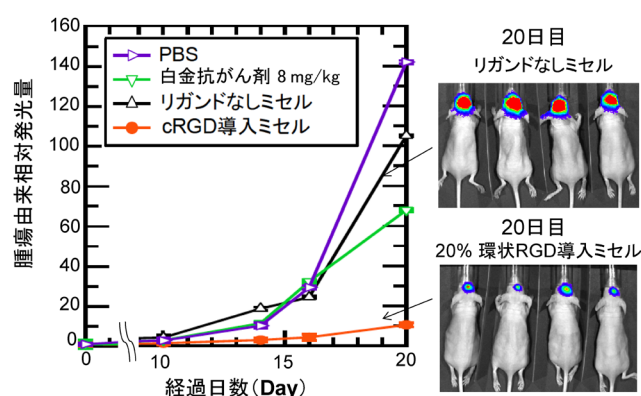


図3 環状RGDペプチド導入白金抗がん剤(ダハプラチン)内包高分子ミセルによるU87MG細胞の同所移植モデルの治療文献8より改変して引用。

3. 環状RGDペプチド搭載ナノDDSによるオリゴ核酸送達

疾患の分子メカニズムが遺伝子レベルで明らかにされ、オリゴ核酸(アンチセンス, siRNA, miRNA)といった核酸医薬は次世代のバイオ医薬品として期待されている。しかしながら、これらのオリゴ核酸は、体内で核酸分解酵素により速やかな分解を受ける一方で、細胞膜の透過性が低く、医薬品として実用化するためにはナノDDSの開発がきわめて重要となる。すなわち、上記のオリゴ核酸は作用部位が細胞質内に存在するために、ナノDDSの設計においては、全身レベルと細胞レベルの二段階の送達を考慮しなくてはならない。このような背景において、筆者らは、PEG-ポリカチオンブロック共重合体とアニオン性のオリゴ核酸のポリイオンコンプレックス(PIC)形成を駆動力とするコア-シェル型のオリゴ核酸内包高分子ミセルの開発を行ってきた¹⁰⁾。高分子ミセルは、上記の二段階の送達を実現するために、構成要素である高分子材料に標的指向機能や環境応答機能を付与することが可能であるが、本稿では、オリゴ核酸送達における環状RGDペプチドの効果に焦点を当てて解説する。

オリゴ核酸が標的細胞内に効率的に機能発現するためには、細胞質や核などの標的オルガネラに到達する必要がある。一般的に、ウイルスを含むナノ粒子は、エンドサイトーシスと呼ばれる小胞輸送によって細胞内に取り込まれるが、この過程にはクラスリン介在型、カベオラ介在型、マクロピノサイトーシスなどのいくつかの異なる経路が存在することが知られており、ウイルスの種類によってもこの経路が異なることが知られている¹¹⁾。このような細胞内取り込み経路は取り込まれた分子の標的オルガネラへの到達性にも大きな影響を及ぼし、ナノDDSの設計においても重要である。このナノDDSの細胞内取り込み経路を制御するアプローチとしては、ペプチドリガンド分子の利用がきわめて有効である。その例として、膜透過性ペプチドとして知られるオクタアルギニン(R8)を搭載したナノDDSは、通常のクラスリン介在型エンドサイトーシス経路とは異なり、マクロピノサイトーシス経路で細胞内に取り込まれることが報告されている¹²⁾。マクロピノソームは他の輸送小胞と比較して漏れやすい膜構造を有するものと考えられており、ナノDDSは効率的に細胞質に移行することができる¹²⁾。一方、アデノウイルスは、細胞表面のCAR(coxsackievirus adenovirus receptor)を認識し、インテグリンを介して内在化することが知られている¹¹⁾。そこで我々は、環状RGDペプチドを導入したsiRNA内包高分子ミセルを構築し、ヒト子宮頸がん由来HeLa-Luc細胞による取り込みを評価した¹³⁾。その結果、リガンド分子を導入していないミセルは、LysoTrackerを用いた細胞内分布の評価においてエンドソーム/リソソームへの局在が示唆されたが、環状RGDペプチド導入ミセルはリガンドを導入していないミセルやLysoTrackerとは共局在を示さず、

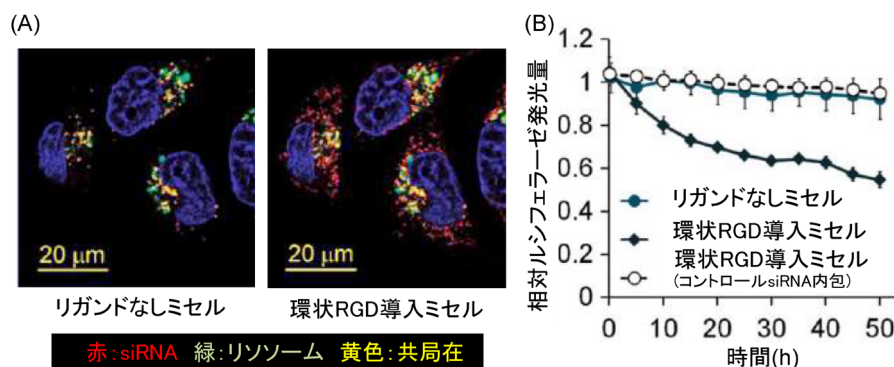


図4 環状RGDペプチド導入ミセルによるがん細胞へのsiRNAデリバリー
(A)環状RGDペプチド導入siRNA内包ミセルの細胞内分布, (B) HeLa-Luc細胞におけるsiLucによる遺伝子ノックダウン効率の評価. 文献13より改変して引用.

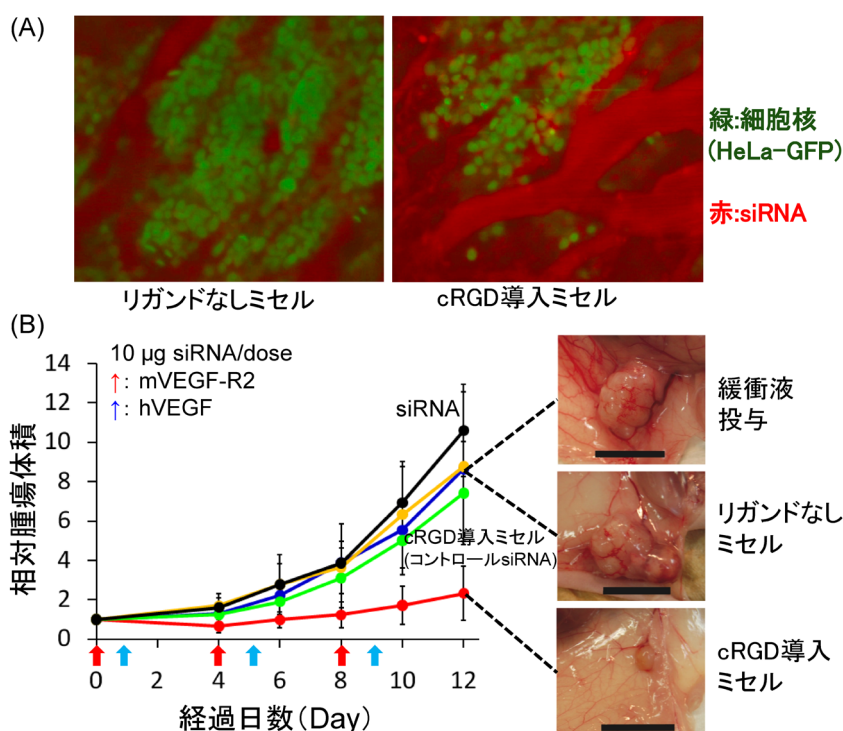


図5 環状RGDペプチド導入siRNA内包ミセルの*in vivo*評価
(A)環状RGDペプチド導入siRNA内包ミセルの固形がんへの集積, (B) siVEGF-R2およびsiVEGF内包ミセルの全身投与による固形がん (HeLa-Luc) モデルの治療. 文献13より改変して引用.

細胞質内に分布することが確認された (図4A). 細胞内取り込み量に関しては, 環状RGDペプチドの導入による取り込みの増大はみられたものの, 細胞内分布の差異の方が顕著であった. そこで, HeLa-Luc細胞のLuc遺伝子に対するsiRNA (siLuc) を使用して遺伝子ノックダウン効率を評価したところ, リガンドを導入していないミセルやコントロールのsiRNAを内包した環状RGDペプチド導入ミセルでは有意な遺伝子ノックダウン効果は確認されなかったが, siLucを内包した環状RGDペプチド導入ミセルは数時間後から50時間にかけて持続的な遺伝子ノックダウン効果を示した (図4B). HeLa-Luc細胞の固形がんモデルを用いた*in vivo*評価においては, リガンドを導入していないミセルと比較して, 環状RGDペプチド導入ミセルは顕

著ながん組織への集積を示し, *in vivo*共焦点顕微鏡観察ではsiRNAが細胞質内に移行していることが確認された (図5A). これらの結果より, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) およびその受容体 (VEGF-R2) に対するsiRNAを高分子ミセルに内包させ, HeLa-Luc細胞の固形がんモデルに対する治療効果を検討したところ, 環状RGDペプチド導入ミセルにおいてのみ顕著な抗腫瘍効果が確認された (図5B)¹³⁾.

4. おわりに

以上のように, 本稿では, 環状RGDペプチドのリガンド分子としての機能に関して, 前半の悪性脳腫瘍に対す

る抗がん剤の送達では、冒頭で記載したi) 標的組織への効率的な移行とii) 標的細胞による取り込みの促進について、さらに後半のオリゴ核酸送達では、これらに加えてiii) 細胞小器官（オルガネラ）のターゲティングの効果について筆者らが進めてきた高分子ミセル型ナノDDSで得られた結果を中心に解説した。がんの治療抵抗性の原因であると考えられているがん幹細胞では $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが過剰発現しており、環状RGDペプチドによって娘細胞への分化が抑制（未分化状態が維持）されることが報告されている¹⁴⁾。したがって、環状RGDペプチドはがん幹細胞のターゲティングにも有用であると考えられる。一方、近年のペプチド設計技術の飛躍的に進歩によってさまざまな機能性ペプチドが開発されている。これらのペプチドとナノDDS技術の融合によって、体内のあらゆる臓器・組織を標的化することができ、オルガネラレベルでのターゲティングが可能となる画期的なナノ医薬品の創出が期待される。

文 献

- 1) Matsumura, Y. & Maeda, H. (1986) *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392.
- 2) 西山伸宏, 片岡一則 (2015) 細胞工学, **34**, 926–928.
- 3) 西山伸宏, 片岡一則 (2015) 細胞工学, **34**, 929–934.
- 4) Danhier, F., Breton, A.L., & Préat, V. (2012) *Mol. Pharm.*, **9**, 2961–2973.
- 5) Tucker, G.C. (2003) *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **4**, 722–731.
- 6) Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R.O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005) *N. Engl. J. Med.*, **352**, 987–996.
- 7) Ningaraj, N.S. (2006) *Expert Opin. Drug Deliv.*, **3**, 499–509.
- 8) Miura, Y., Takenaka, T., Toh, K., Wu, S., Nishihara, H., Kano, M.R., Ino, Y., Nomoto, T., Matsumoto, Y., Koyama, H., Cabral, H., Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2013) *ACS Nano*, **7**, 8583–8592.
- 9) Zhan, C., Gu, B., Xie, C., Li, J., Liu, Y., & Lu, W. (2010) *J. Control. Release*, **143**, 136–142.
- 10) Miyata, K., Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2012) *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2562–2574.
- 11) Marsh, M. & Helenius, A. (2006) *Cell*, **124**, 729–740.
- 12) Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S., & Harashima, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544–3511.
- 13) Kim, H.-J., Takemoto, H., Yi, Y., Zheng, M., Maeda, Y., Chaya, H., Hayashi, K., Mi, P., Pittella, F., Christie, R.J., Toh, K., Matsumoto, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., & Kataoka, K. (2014) *ACS Nano*, **8**, 8979–8991.
- 14) Hurt, E.M., Chan, K., Serrat, M.A.D., Thomas, S.B., Veenstra, T.D., & Farrar, W.L. (2010) *Stem Cells*, **28**, 390–398.

著者寸描

●西山 伸宏 (にしやま のぶひろ)

東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所教授。博士（工学）。

■略歴 1996年東京理科大学基礎工学部卒業。2001年東京大学大学院工学系研究科材料科学専攻博士課程修了〔博士（工学）〕。2001年米国ユタ大学薬学部博士研究員。03年東京大学医学部附属病院TE部助手。04年東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター助手。06年同講師。09年同准教授を経て、13年より現職。

■研究テーマと抱負 ドラッグデリバリーシステムへの応用を目指して、生体内で狙った機能を発現するスマート材料・デバイスの開発を行っている。

■ウェブサイト <http://www.bmw.res.titech.ac.jp>

■趣味 料理。