

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

VIP-Lipopeptide を組込んだ新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発

～ リポソーム機能性向上のための新規 Linker と VIP- Lipopeptide の合成と評価 ～

東邦大学薬学部・創薬化学講座 真坂 互 ⑥

【目的】

リポソームを修飾する Active Targeting 型 DDS が最近注目されており、高効率かつ自由度の高い表面修飾方法の開発が実用化の鍵を握っている。中でも八木等¹⁾が考案した固相合成可能な“Lipopeptide” (Fig.1) は任意の peptide によるリポソーム表面修飾と機能発現が可能であり有用であるものの、その修飾効率は高いとは言えなかった。本研究では、新規に分子設計した Lipopeptide により peptide 修飾の高効率化を達成し、さらに血管作動性腸ペプチド (VIP) の修飾によるリポソーム機能制御を行うことを目的とした。

【方法】

Lipopeptide 分子設計の見直しを行った。本研究で使用する Lipopeptide 分子は、疎水性相互作用によりリポソーム膜に固定化させる Membrane Anchor Domain、リン脂質でのグリセロ骨格にあたる Glycero mimic Domain、リン酸基にあたる Hydrophilic Charge、ペプチドの機能発現における立体障害を回避するためスペーサーとしての役割を果たす Linker Domain など合理的に設計されている。この中で Linker Domain はリポソームに組み込んだ際、ペプチドを受容体に認識させやすくする役目と Lipopeptide の溶解性などの物性をコントロールする役割を持ち、ペプチドの高効率修飾の可否を左右する特に重要な部分であると考えられた。そこで、Linker Domain の親水性を高めることがリポソームへの修飾率向上に繋がると考え、Lipopeptide に長さの異なる Linker Domain 4 種類(L-1、L-2、L-4、L-X : Fig.2)をそれぞれ組み込んだ Lipopeptide を合成した。

ペプチド修飾リポソームの細胞系評価には血管作動性腸ペプチド (VIP) を用いた。このペプチドは多数の腫瘍で受容体が発現しているとの報告がある²⁾。本ペプチドを表面修飾し、腫瘍細胞に選択的な Active Targeting 型 DDS が可能となりうる“VIP-Lipopeptide 修飾リポソーム製剤”を調製した。VIP 受容体認識能の評価では塩酸ドキソルビシン (DOX) 内包リポソームにペプチド修飾を施し、VIP 受容体過剰発現の報告があるヒト由来骨肉腫細胞株 Saos-2³⁾に対する抗腫瘍細胞活性を指標に評価した。さらに、VIP は神経ペプチド PACAP(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide)と高い相同性を持ち、その受容体には 3 つのサブタイプが存在する。PACAP に結合親和性の高い PAC1 受容体および PACAP 並びに VIP が同等の親和性で結合しうる VPAC1 受容体と VPAC2 受容体である。これらの受容体が活性化されると細胞内シグナル伝達として cAMP を生成して、蛋白質キナーゼ経路を活性化することから、VIP が結合する PACAP 受容体(VPAC2R)を安定発現させた CHO 細胞株 (Chinese Hamster Ovary) からの cAMP 産生量を測定することで受容体の認識能を検証した。

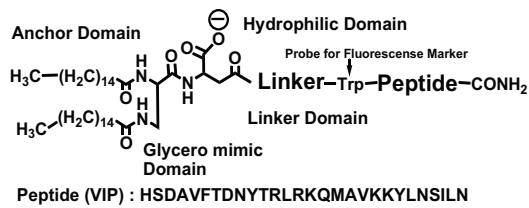


Fig. 1 Lipopeptide

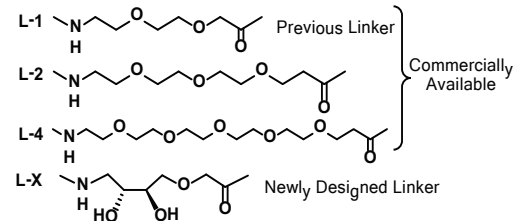
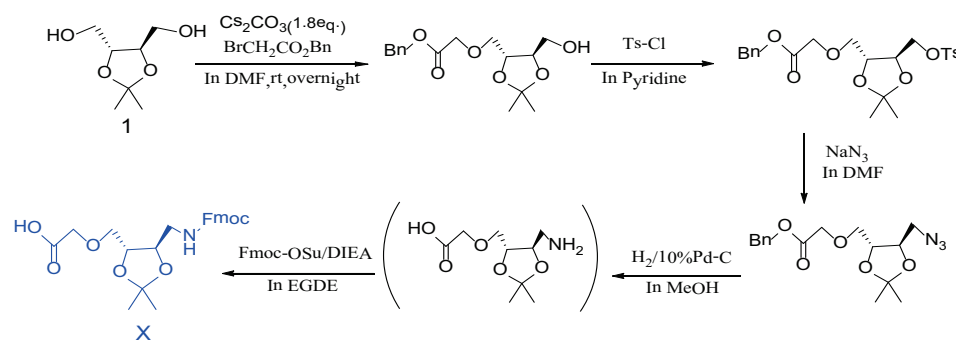


Fig. 2 Linker Domain

【結果および考察】

4種類の Linker Domain のうち L-X については Scheme 1 に示したとおり、出発物質 1 の 2,3 -O-Isopropylidene-D-threitol より 4 工程にて目的物質である化合物 L-X を合成した⁴⁾。



Scheme 1 Synthesis of New Linker (L-X)

これらリンカーを用い、ペプチド自動合成機にて Fmoc 固相合成法により各 VIP-Lipopeptide を得た。HPLC により精製し、MALDI-TOFMS にて同定を行った。

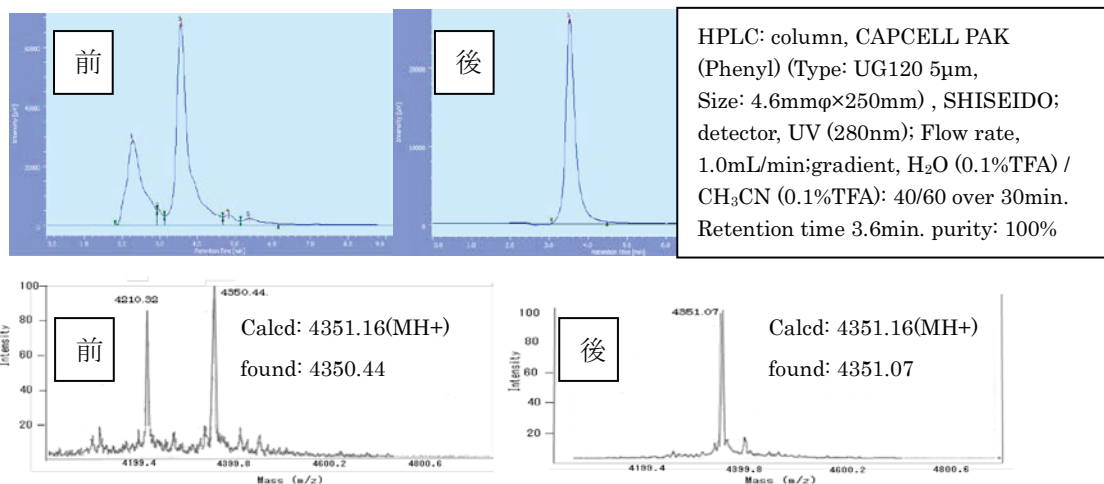


Fig.3 HPLC and MALDI-TOFMS of VIP-Lipopeptide-LX before and after purification

今回合成した VIP-Lipopeptide の中から VIP-Lipopeptide-LX を HPLC にて精製した結果と MALDI-TOFMS で同定した結果を代表例として Fig.3 に示した。他の VIP-Lipopeptide も同様に処理したところ HPLC および MALDI-TOFMS 共に化合物の構造を支持する結果が得られた。Bangham 法でリポソームを調製後、Post Insertion 法により合成したこれら VIP-Lipopeptide をリポソームに修飾した。さらに、pH 勾配法によって DOX を内包させ、VIP-Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームを得、超遠心分離法により精製した。同様に

Fmoc 固相合成法、Bangham 法、Post Insertion 法により VIP-Lipopeptide 修飾リポソームを合成し、超遠心分離法で精製した。Post Insertion 法後の VIP-Lipopeptide-L-1、L-2、L-4 および L-X それぞれの VIP 修飾率は、リポソームの脂質モル濃度に対し 0.59~0.88 mol% で修飾することが出来た (Table 1)。Linker が長鎖である L-2・L-4 の方が短鎖である L-1・L-X より修飾率が約 30%高くなっており、短鎖リンカーにおいては立体障害による修飾率低下の影響が考えられた。リンカー部位の分子設計は、ペプチド部分を脂質膜から遠ざける長鎖であることが望ましく、親水性の増大は修飾率の向上に寄与しないことが明らかになった。

Table 1 Modification ratio of various VIP-Lipopeptide (mol%)

VIP-Lipopeptide (Linker)	Linker1	Linker2	Linker4	LinkerX
VIP 修飾率 (VIP 濃度/脂質濃度)	0.64	0.88	0.72	0.59

Saos-2 細胞株を用い、それぞれの VIP-Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームについて WST Assay を行い、腫瘍細胞生存率 (IC₅₀) の結果を Table 2 に示した。いずれの VIP-Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームも VIP-Lipopeptide 未修飾 DOX 内包リポソーム (Plane) より活性が強かった。Plane に対し、その活性の強さを IC₅₀/Plane で示し比較検討したところ、VIP 修飾率の低い Lipopeptide-L-1・L-X 修飾 DOX 内包リポソームは 1.8~2.2 倍であったが、VIP 修飾率の高い Lipopeptide-L-2・L-4 修飾 DOX 内包リポソームは 5.8~6.1 倍抗腫瘍細胞活性が増加しており、VIP リガンド修飾量依存的な抗腫瘍作用が発揮された。高効率修飾はペプチド機能発現に重要であることが再確認された。

Table 2 Cytotoxicity of various Liposome formulation (n=8)

	Free DOX	Linker 1	Linker 2	Linker 4	Linker X	Plane
IC ₅₀ (mM)	0.0249	0.311	0.116	0.111	0.380	0.672
IC ₅₀ /Plane	27	2.2	5.8	6.1	1.8	1.0

(IC₅₀/Plane は IC₅₀ で比較したときの Plane に対する活性の強さの比率)

VIP-Lipopeptide-L2 修飾リポソームを用い VPAC2 受容体発現 CHO 細胞株に対する受容体認識能を cAMP の産生量を RIA 法にて測定し評価した。Fig. 4 のグラフは VIP ペプチド水溶液 (Fug 中 VIP) および Linker-L2 を有する VIP-Lipopeptide-L2 修飾リポソーム (Fug 中 L2) により誘導される cAMP の産生量を CHO (Wild) の産生量と比較し、比で示したものである。野生株の CHO 細胞 (CHO (Wild)) ではいずれも cAMP の産生が低値であったのに比べ、VPAC2 受容体を発現している CHO 細胞 (CHO (VPAC2)) では L2 による cAMP の産生量は VIP ペプチド水溶液の 77% に達した (100nM 添加時)。ここで使用した VIP-Lipopeptide-L2 修飾リポソームの VIP 修飾率は 0.86 mol% であった。VPAC2 受容体発現細胞選択的かつ濃度依存的に cAMP を産生したことから、Linker-L2 を組み込んだ

Lipopeptide 修飾リポソームは、PACAP/VIP 受容体を認識していると考えられた。

CHO 細胞 (VPAC2R) に対する VIP ペプチドの作用は 1nM 濃度程度ですでに飽和したと考えられる (CHO(VPAC2R) -VIP : Fig. 4)。これと比較すると Linker-L2 を組み込んだ Lipopeptide 修飾リポソームの cAMP 産生作用は弱かった。ナノ粒子表面に固定した基質が多価で細胞表面と結合することによる高い cAMP の産生を期待したが異なる結果となった。この理由として、ペプチドのレセプター認識部位が Lipopeptide との結合でマスクされている可能性や、リポソーム自体の立体障害による結合定数の低下が考えられた。L4 やさらに長鎖のリンカーの採用ならびにペプチド C-N 末端の逆転によって解決が可能となる可能性がある。

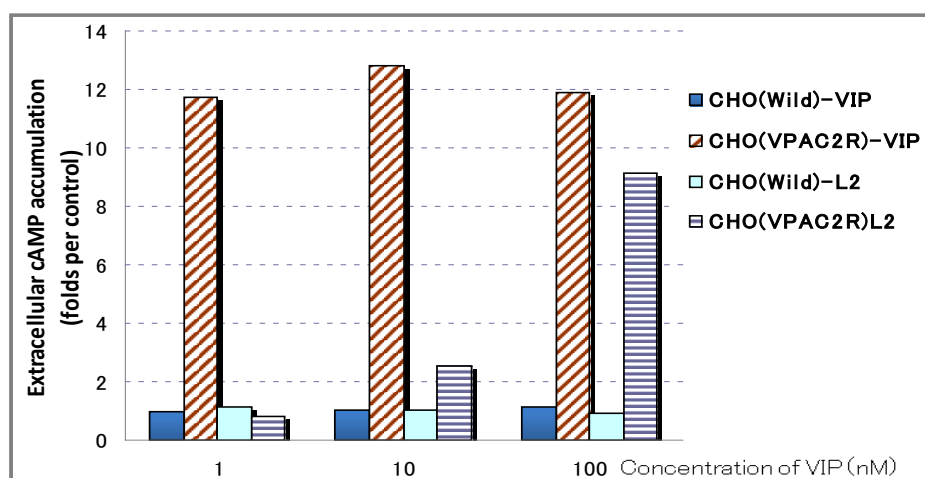


Fig.4 Accumulation of cAMP in the CHO cells VPAC2 Receptor

VIP およびリポソーム未修飾各種 VIP-Lipopeptide (Lipopeptide-Linker) 自身の細胞毒性を確認するため、Saos-2 に対する抗腫瘍細胞活性試験と同様の手法で細胞実験を行った。VIP-Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームによって Saos-2 が約 IC90%濃度(log(mM)≈-1.3)と同様の脂質濃度で VIP および Lipopeptide-Linker を作用させたが、Saos-2 の細胞死はほとんど認められなかった。製剤自体の毒性は低く、Table 2 で示した抗腫瘍細胞活性の向上はペプチド修飾による抗腫瘍細胞活性の向上と考察された。

【結語】

ペプチドの高密度修飾を目的としたリンカー合成研究では、水溶性よりもリンカー長の延長が有効であるとの結論を得た。これらを用いた VIP ペプチド修飾リポソームでは、抗細胞活性の向上のみならず細胞内シグナル伝達の賦活効果を得た。本研究⁵⁾では VIP のようなペプチドをリガンドとして、その受容体をターゲットとする上では幅広い応用が期待できる結果となった。新規 Active Targeting 型 DDS の開発に繋がる成果と考えられる。

- 1) N. Yagi, Y. Yokoyama, et al.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 2590–2593 (2007).
- 2) C. Q. Pan, et al.: *Peptide*, **29**, 479-486 (2008). 3) J.C.Reubi, et al. : *Cancer research*, **56**, 1922-1931(1996). 4) T. Masaka, Y. Yokoyama, et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 1184-1187 (2013).
- 5) T. Masaka, Y. Yokoyama, et al.: *薬学雑誌*, in preparation ; [(4),5)は対象論文]

論文題目：VIP-Lipopeptide を組み込んだ新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発：リポソーム機能性向上のための新規 Linker と VIP-Lipopeptide の合成と評価

論文提出者：真坂 互

近年、リポソーム製剤の臨床応用は目覚ましく、その代表的製剤の一つにドキソルビシン内包 PEG 化リポソーム製剤がある。本製剤は、PEG 化によりマクロファージに捕捉・貪食されにくいため血中半減期を延長させるとともに、標的組織である腫瘍細胞の近傍新生血管の透過性が亢進することを利用して集積させ、ドキソルビシンの腫瘍組織内での濃度を高め、血漿中濃度を抑え副作用の軽減を可能にした **passive targeting** 製剤として使用されている。しかし、このような製剤では、これまでにみられなかった新たな副作用が発現することが報告されている。

真坂氏は、このような欠点を克服するため、**passive targeting** ではなく、がん細胞の表面に特異的に発現する受容体に対して親和性を有するリガンドをリポソームに表面修飾し、がん細胞に特異的に結合することを目指した **active targeting** リポソーム製剤を考案した。すなわち、新たに考案した表面修飾リポソームは、合成が容易で安定なアミド結合のみを有する脂質類似体であり、これをリポソームに組み込んだ新規修飾リポソームとして設計した。

さらに修飾リポソームを用いて、抗腫瘍細胞活性をヒト由来骨肉腫細胞株ならびに VPAC2 受容体発現 CHO 細胞株に対する受容体認識能を cAMP 産生量の評価をもとに行った。

本論文は主に 2 部から成る。以下それぞれの内容について述べる。

1 新規 VIP-Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームの調製

active targeting を目的として、がん細胞の表面に特異的に発現する受容体に親和性を有するリガンドで表面修飾したドキソルビシン内包リポソーム製剤の分子設計を行った。新規に設計したリポソームの Linker domain は、ペプチドの受容体認識とリポソームへの修飾率にも影響する。そこで、入手可能な分子鎖長の異なるリンカーであるモノエチレングリコールエーテル体(L1)、ジエチレングリコールエーテル体(L2)、テトラエチレングリコールエーテル体(L4)、および新規に合成した親水性リンカーの 2-(((4R,5R)-(((9H-fluoren-9-yl) methoxy) carbonyl)amino) methyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)acetic acid の 4 種類で置換した Lipopeptide を調製した。ペプチド部位は、ある種のがん細胞に特異的に発現することが知られており、腫瘍細胞への標的 DDS の構築が可能と考え、血管作動性腸ペプチド (VIP: Vasoactive Intestinal Peptide) を選択し、Fmoc 固相合成法で合成し、分取 HPLC 法で精製した。つぎに Bangham 法でリポソームを調製後、Post Insertion 法で合成した VIP-Lipopeptide をリポソームに修飾した。さらに PH 勾配法でドキソルビシンを内包させ、超遠心分離法で精製した。Post Insertion 後の 4 種の VIP-Lipopeptide のリポソームへの修飾率は 0.6~0.9mol% であった。VIP-Lipopeptide 修飾リポソームへのドキソルビシン濃度は、1mmol/L ~21mmol/L であり、長鎖のリンカーよりも短鎖のリンカーを用いた方が高い内包率を示した。

2 各種 Lipopeptide 修飾 DOX 内包リポソームの抗腫瘍細胞活性の検討

4種の Linker を組み込んだ Lipopeptide 修飾ドキシソルビシン内包リポソームの抗腫瘍細胞活性をヒト由来骨肉腫細胞株(Saos-2:Osteogenic sarcoma)を用い in vitro で WST Assay により Saos-2 の腫瘍細胞生存率で評価した。Saos-2 を用いたのは VIP 受容体を過剰発現しているとの報告があり、抗がん剤のドキシソルビシン製剤が骨肉腫に使われており、取り扱い易いなどの理由のためである。抗腫瘍活性は、ドキシソルビシン単体>Linker4 ≒ Linker2>Linker1>LinkerX>未修飾リポソームの順であった。未修飾リポソームに対する各リポソームの IC₅₀は 1.8~6.1 倍であり、LinkerX に比べ長鎖にリンカーの方が効果が高いことが分かった。VIP は神経ペプチド PACAP(Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide)と高い相同性を示す。PACAP 並びに VIP が同等の親和性で結合する VPAC1 受容体、VPAC2 受容体が活性化されると細胞内シグナル伝達を通して ATP から cAMP に変換され細胞外に流出するため、受容体との親和性を評価できる。VIP-Liposome-L2 修飾リポソームを VPAC2 受容体発現 CHO 細胞株に対する受容体認識能を cAMP 産生量として評価した。VIP-Liposome-L2 修飾リポソームでは濃度依存的に cAMP を産生することが分かった。

以上述べたように、真坂氏は、がん細胞の表面上に発現する受容体に対して親和性を有する血管作動性腸ペプチド(VIP)で表面修飾し、がん細胞に特異的に結合する active targeting リポソーム製剤の分子設計を行った。すなわち、新たに考案した表面修飾リポソームは、合成が容易で安定なアミド結合のみを有する脂質類似体であり、これをリポソームに組み込み修飾リポソームを設計した。今回は特にペプチドの機能発現における立体障害を回避するため Linker Domain の長さで親和性の異なる 4 種の Lipopeptide 修飾ドキシソルビシン内包リポソームを調製し、これら新規リポソームを用いて抗腫瘍細胞活性をヒト由来骨肉腫細胞株(Saos-2)での腫瘍細胞生存率、VPAC2 受容体発現 CHO 細胞株で活性を評価した。Linker 部分は親和性よりも、鎖長が腫瘍活性に影響し、より長鎖の Lipopeptide がより高い効果を示した。さらにドキシソルビシンの抗腫瘍活性は未修飾リポソームより高いことから受容体認識を有することも確認された。十分な抗腫瘍効果を発揮するには、さらに指向性の高い修飾リポソームの開発が必要と思われるが、Targeting Liposome の研究としては十分な内容としてまとめられている。

本テーマに関係する学術論文を既に公表しており、博士(薬学)に値すると判断する。

2014年2月26日

寺田勝英