

機能性ペプチドを利用したドラッグデリバリーシステムの開発

がん組織で治療薬が効果を発揮するためには、これらを適切に患部に送達するシステム（ドラッグデリバリーシステム、DDS）が必要である。がん組織では正常組織に比べ血管の透過性が著しく亢進し、特定のサイズを持った化合物は血管から流出しやすくなる現象（EPR効果）が良く知られている。しかし、内圧の高いがん組織や正常血管近くに存在するがん細胞にはEPR効果は期待できないことから、新しいDDSの開発が望まれている。そこで我々は、腫瘍血管に作用する機能性ペプチドに注目し新たなDDSの構築を進めている。

①NRP1を介した細胞膜透過ペプチド融合タンパク質の腫瘍血管透過メカニズム

腫瘍組織内では正常組織に比べ血管透過性が亢進しているため、血中に投与された薬剤やイメージングプローブは血管外へ流出しやすくなっている。また、リンパ系も未発達であり、結果的に腫瘍組織に到達した物質は腫瘍内に蓄積することが知られている。このような特性はEnhanced permeability and retention (EPR)効果と呼ばれ、腫瘍へのDDSにおいて重要な因子となっている。

さらに近年では、EPR効果に加えて、受容体NRP1を介した腫瘍血管透過システムが報告されている。NRP1は通常、血管内皮細胞の膜上に存在し、VEGF165やSema3Aなどのリガンドと複数の塩基性アミノ酸を介して結合すると、細胞間の間隙が広がり、血管透過性が向上することが知られている（図1）。このメカニズムを利用してDDSを実現するために、塩基性アミノ酸を含む配列を持つiRGDという環状ペプチドが開発された。iRGDを担がんマウスに投与するとNRP1に結合して血管漏出性が亢進し、薬剤のデリバリー効率が向上することが示された [Science 2010, 328, 1031-1035]。

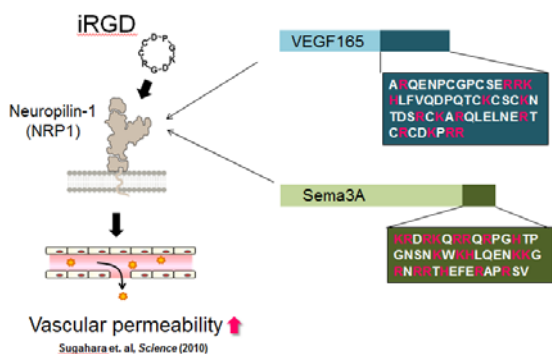


図1. NRP1による血管漏出性制御

この報告で我々が注目したのは、NRP1との場合には塩基性アミノ酸が重要であるという点である。塩基性アミノ酸を多く持つペプチドは細胞膜透過ペプチド(CPP/PTD)と呼ばれ、タンパク質、核酸、ナノパーティクル、リポソームなど、様々な物質を細胞内にデリバリーできることが報告されている。

我々もこれまでにCPPを融合した光イメージングプローブPOH-Iを開発している。このプローブを担がんマウスの血中に投与すると脳血流閉門や血管を透過して全身組織へと運ばれ、次第に腫瘍組織へ集積することが確認できている（図2）。しかし、血管透過の際にCPPがどのように作用しているかは全く不明であった。

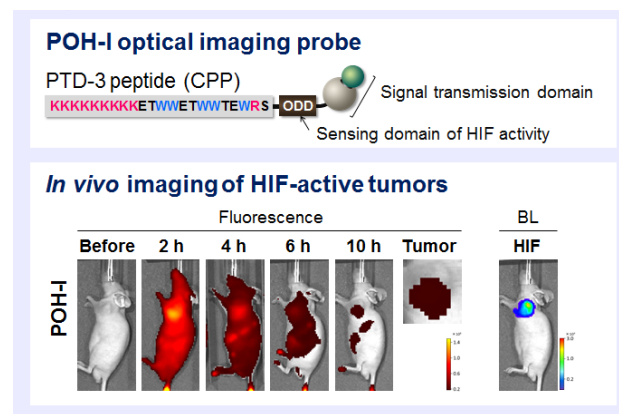


図2. 担がんマウスの光イメージング

そこで我々は、CPPもiRGDのようにNRP1へ結合し、血管漏出性を向上させる機能があるのではないかと仮説を立て、CPP、CPP融合タンパク質を用いた結合アッセイと、CPP融合プローブを使った生体イメージングによりこの仮説を検証した。

はじめに、2種類のCPP(PTD-3ペプチドとTATペプチド)を合成し、蛍光色素を結合させて蛍光標識ペプチドを作成した。また、同じPTD-3ペプチドとTATペプチドを蛍光タンパク質EGFPに融合させて精製した。これらのペプチドあるいはタンパク質を、NRP1を高発現しているMDA-MB-231乳がん細胞株(MDA細胞)と反応させ、蛍光測定により結合を評価した。その結果、PTD-3ペプチドもTATペプチドもMDA細胞への結合が確認でき、この結合はNRP1の中和抗体の添加によって阻害されることが分かった（図3）。CPP融合タンパク質の場合も同様に、MDA細胞

に結合し、NRP1 中和抗体の添加により結合が阻害されたことから、CPP は NRP1 に特異的に結合することが明らかになった (図 3)。

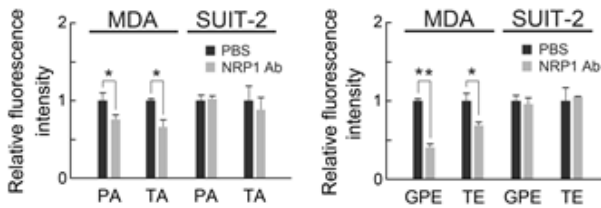


図 3. CPP の NRP 発現細胞への結合

PA: PTD-3 ペプチド、TA: TAT ペプチド、
GPE: PTD-3 融合 EGFP、TE: TAT 融合 EGFP、
MDA: NRP1 高発現細胞株、SUIT-2: NRP1 低発現細胞株

次に、CPP を融合した POH-I プローブを用いて、NRP1 への結合の役割を生体内で検証した。事前に NRP1 中和抗体を投与した担がんマウスと投与していない担がんマウスを用意し、それぞれにプローブを投与して腫瘍への集積量を光イメージングにより評価した。その結果、プローブのみを投与した場合はこれまでと同様に、腫瘍への特異的な集積が確認できたが、中和抗体を事前投与すると集積が抑制された (図 4)。このことから、NRP1 との結合がプローブの腫瘍への集積に重要であることが分かった。

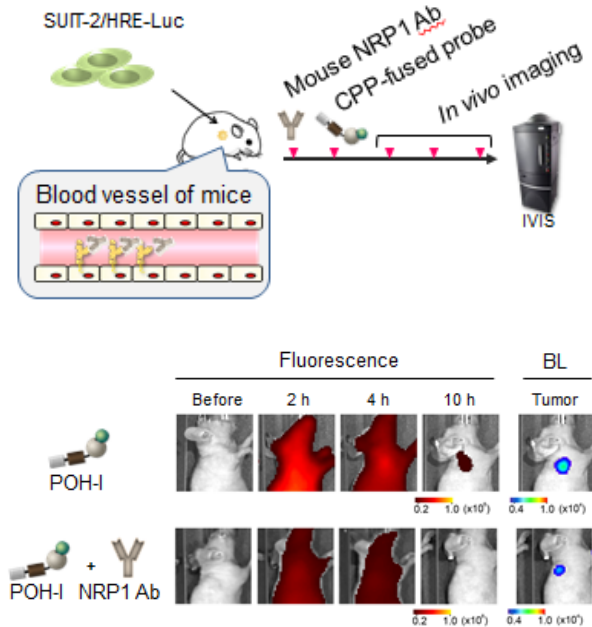


図 4. 担がんマウスの光イメージング

事前に NRP1 中和抗体を投与した担がんマウスに POH-I プローブを投与した。

さらに、中和抗体ではなく、iRGD ペプチドの効果イメージングで評価すると、iRGD の共投与によりプローブの腫瘍への集積は抑制されたことから、生体内で CPP と iRGD は NRP1 への結合において競合することが示唆された (図 5)。

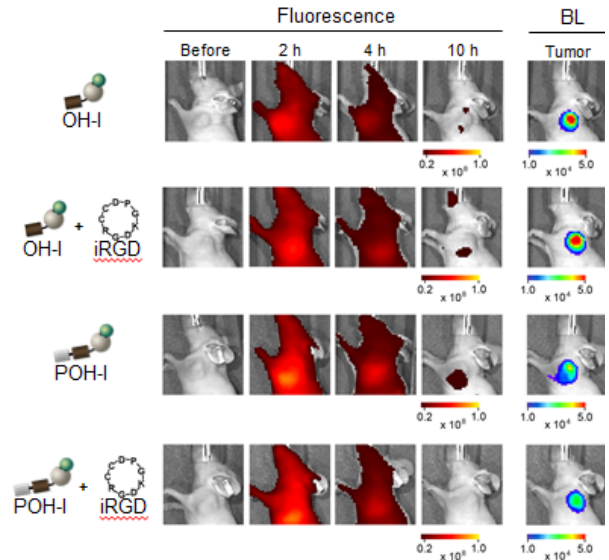


図 5. 担がんマウスの光イメージング

担がんマウスに POH-I プローブと iRGD を共投与した。

次に、CPP による血管漏出性への影響を検証するために、CPP 融合タンパク質を投与後に色素を投与し、色素の腫瘍組織への漏出量を測定した。その結果、驚いたことに、iRGD を投与すると報告通り血管漏出性が上昇したが、CPP 融合タンパク質は漏出性を上昇させなかった (図 6)。つまり、CPP は iRGD とは違った方法で血管を透過する機能を持つことが示唆された。

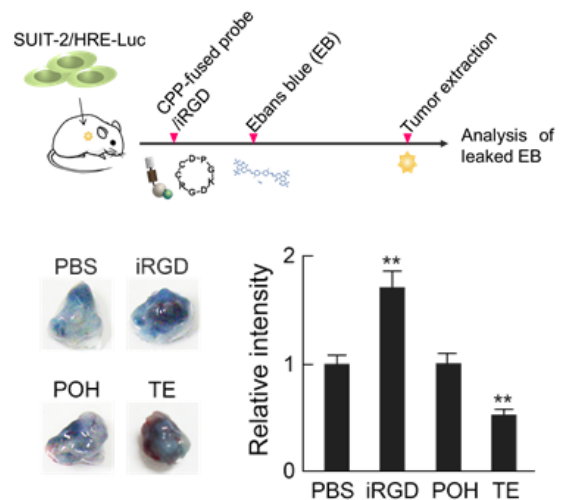


図 6. 血管漏出性評価

この血管透過メカニズムを明らかにするために、血管内皮細胞株をトランスウェルに播種し、VEGF-A あるいは CPP 融合プローブで刺激し、FITC デキストランの下層への透過量を測定することで、血管透過性を評価した。その結果、VEGF-A は FITC デキストランの透過量を有意に増加させたが、CPP 融合プローブはデキストランの透過量を変化させずに、自身のみ下層へと透過することが分かった (図 7)。

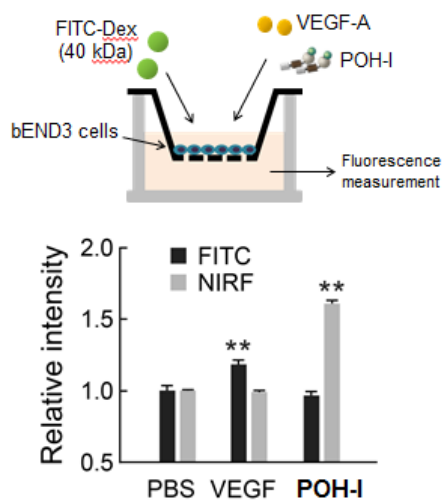


図 7. 血管透過アッセイ

VEGF-A や iRGD のように細胞間の間隙を広げて血管漏出性を上昇させるメカニズムではこのような結果にはならないことから、CPP には間隙を変化させずに細胞を透過できるトランスサイトシスの機構があるのではないかと予測される。

この原理を応用することで、特異性の高い薬剤輸送が可能になると期待でき、今後、詳細にメカニズムを明らかにすることで、従来法よりも効率の良い DDS の開発に繋げたい。

[論文]

J Control Release 2015, **201**, 14-21

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592386>