

## 総括研究報告書

### 1. 研究開発課題名：「DDS 技術」

(システム薬理学を基盤とする腫瘍血管指向性糖鎖修飾 DDS の開発)

### 2. 研究開発代表者： 国立大学法人京都大学 大学院薬学研究科 橋田 充

### 3. 研究開発の成果

シアリルルイス X (sLeX) は腫瘍血管に高発現する E セレクチンと結合することが知られる内在性リガンドであるが、合成が複雑なため、リポソームに修飾するリガンドとして実用化するには、結合力および結合選択性が高く、かつ安価に調製できるシステム開発が必要である。そこでまず、sLeX と同等の E セレクチン結合性を有し、かつ構造単純化された 2 種類のシアリルルイス X ミミック msLeX (sLex(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)、sLex(SO<sub>3</sub>Na)) を設計し、工程の大幅削減および大量合成を可能にした。sLeX または msLeX 修飾脂質を合成し、これらを用いたリポソーム調整法の最適化を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞にサイトカイン処理し E セレクチンを高発現させた腫瘍血管内皮モデル細胞に対して、いずれの糖鎖修飾リポソームの取り込み量も未修飾リポソームより有意に高かった。

次に、sLex(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)または sLex(SO<sub>3</sub>Na)修飾脂質を用いて調製したリポソームを担癌モデルマウスに尾静脈投与した後、各臓器への移行量を経時的に測定し、生理学的速度論モデルに基づいて、ドキシソルビシン含有リポソームの体内動態に関する速度論パラメーターを取得した。さらに、細胞周期の停止およびアポトーシス誘導に関する p53 のシグナル伝達ネットワークの数理モデルを開発し、PhysioDesigner 上で連成させて、統合的マルチスケール・シミュレーションを実現した。その結果、sLex(SO<sub>3</sub>Na)-PEG 修飾リポソームの単回静脈投与では、がん組織でリン酸化 p53 発現の振動が起こるものの、24 時間後には元のレベルに戻ることが示された。さらに、各種パラメーターを変動させてリポソームの体内動態をシミュレーションしたところ、がん組織への取り込み量を増大あるいは肝取り込みを減少した場合に、リン酸化 p53 の発現振動が強調される効果が持続する結果が導かれた。これらの結果を踏まえて、がん組織への移行量を増大させることを目的に、超音波造影剤を封入し超音波照射で生じた外部刺激により薬物を細胞へ導入するリポソームを開発した。調製法の最適化により、ガス封入後の粒子径が 500nm の小さなリポソームを得た。さらに担癌モデルマウスに投与後、血中およびがん組織内での安定性を向上させることができた。また、化学安定性に優れかつセレクチンとの親和性も高い新規 msLeX (sLex(CH<sub>3</sub>)) 修飾脂質を設計・合成した。sLex(CH<sub>3</sub>) 修飾脂質を用いて調製したリポソームは、腫瘍血管内皮モデル細胞において、sLeX、sLex(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)または sLex(SO<sub>3</sub>Na)修飾リポソームより取り込みが高かった。

腫瘍血管内皮モデル細胞にドキシソルビシンやパクリタキセルなどの抗がん剤を作用させ、シグナル伝達の初期過程に関連するタンパク質のリン酸化に着目し、リン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、白血球細胞の内皮遊走に関与するタンパク質が多く同定され、その中の約 10 の分子を治療効果のマーカー候補として選出した。ドキシソルビシン内封リポソームの体内動態の結果より、副作用の発現が懸念される肝臓に関して、毒性マーカー探索を行った。正常マウスにリポソームを尾静脈内投与すると、1 時間後に摘出した肝臓において増加しているタンパク質が多く観測された。処理後 1 時間で特に顕著に増加したタンパク質にはリポソームタンパク質が多く、24 時間後ではミトコンドリア局在タンパク質が多いという傾向が見られ、これらは毒性マーカーの候補分子となりうると思われる。

以上、新規リガンドの設計・合成、生理学的速度論モデルに基づく動態解析、プロテオミクスの手法を用いた薬効・毒性マーカー探索を通して、リポソーム設計の指針を得ると共に腫瘍血管内皮細胞に選択的な新規薬物送達システムを開発した。