

2024 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	遠心沈降法作製リポソームを用いた血管新生医薬品に関する研究
キーワード	①ドラッグデリバリーシステム、②再生医療、③ナノマイクロ科学

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	ショウ イチナギサ 章 逸汀
配付時の所属先・職位等 (令和6年4月1日現在)	立教大学理学部化学科・助教
現在の所属先・職位等	同上
プロフィール	千葉大学大学院医学薬学府4年博士後期課程で博士(医学)を取得後、東京大学大学院総合文化研究科で博士研究員として2年間取り組んだのち、2023年4月より現職に至る。ドラッグデリバリーシステムを基盤とした、リポソームなどのコロイド医薬品開発の研究を一貫して取り組んできた。最近ではマイクロサイズスケールのリポソームに着目し、マイクロ流路を用いた均質かつハイスループットのリポソーム作製法の開発や、様々な生体分子を用いた機能化リポソームの作製をメインテーマとする研究を進めている。

1. 研究の概要

血管は生体の臓器や組織などの活動を維持するために重要な器官である。そのため、生体組織内で血管がない部分については、再生医療の観点で構築する手法が求められている。血管は、血管内皮増殖因子(VEGF)と呼ばれるタンパク質が分布している箇所へ、新たに血管を伸ばしていく特性(血管新生)がある。しかし生体内にこのタンパク質を投与しても早い段階で分子が拡散してしまうので、血管新生に至るまで十分に留まらせることができない。

本研究では、申請者がこれまで取り扱ってきた細胞膜成分のカプセル(リポソーム)の作製技術を用いて VEGF のモデル分子となるデキストランを内包し、経時的にリポソームから放出される様子を観測した。この結果から VEGF を内包して生体内に投与した場合でも、同様な徐放現象が期待される。また本研究の成果は VEGF のような分子だけでなく、様々なタンパク質を用いるリポソーム医薬品の知見に貢献できるものである。

2. 研究の動機、目的

血管は養分や酸素、免疫細胞等のリソースを全身に運搬、網羅させる重要な器官である。しかし、心筋梗塞や脳梗塞のような血管の機能が失われる病気は、失われた箇所の機能は回復しない。現在は機器検査を通して未然に血管の詰まりの状態を検出し、予防措置的に生活習慣の改善で未然に発症を防ぐか、もしくはステントと呼ばれる血管を拡張する医療器具を血管に挿入して治療する方法が取られる。しかし、後者は脳のような適応できない生体組織も存在し、その上で挿入後も再度血管が詰まる可能性も存在しており、根本的な解決に至る治療法の確立には至っていない。また最近では、機能を失った組織を再生させる再生医療に基づいた研究も進められており、例えば心臓に体外で人工的に培養したシート状の心筋細胞を移植することで、心臓の機能を回復させる治療法(Y. Sawa et.al., *Circ J*, 79(5), 991-999, 2015)の試みや、細胞をインクとしたプリンターによる 3D バイオプリンティング技術(X. Ma et. al.,

Adv Drug Deliv Rev, 132, 235-251, 2018) により移植用の人工臓器をプリントする基礎研究が進められている。しかしこれらの課題点として、人工的に作製した組織や臓器には血管が含まれておらず、生体に定着させて機能させるために、血管を生やす必要がある。

血管が詰まる疾患は既存血管の「劣化」で正常な機能がなくなること、心筋シートや3D バイオプリントは作製した組織に血管がないことが問題であり、いずれも「血管を新しく生やすこと(血管新生)」が解決策の共通キーワードであると捉えられる。血管新生にはそれを誘導するタンパク質として VEGF が必要だが、VEGF 投与しただけでは、短時間で生体内拡散してしまう。本研究の実施者はこれまでナノマイクロ科学関連の技術を用いた研究に取り組んできており、中でも細胞膜から構成されるカプセルであるリポソームやマイクロ流体デバイスを用いて、医薬品の開発に取り組んできた。タンパク質のような高分子はリポソームの膜から漏れ出ることなく内包したままにできる。また、リポソームは血中から血管を新生させたい箇所に送達することも留まらせることも可能である。そこで、血管新生を誘導するタンパク質である血管内皮増殖因子(VEGF)をリポソームに内包して血管を新生させたい箇所に送り届け、Fig. 1 で示すように少しずつ放出(徐放)できれば、血管新生を誘導できるのではないかと考えた。なお、徐放のためにはリポソームが一定期間壊れずに内包物を放出し続ける状態が望ましい。そこで本研究では VEGF と同じ分子量である、タンパク質モデル分子の FITC 標識デキストラン (FITC-Dex) を使用し、内包した FITC-Dex を徐放するリポソームの形成を目指した。

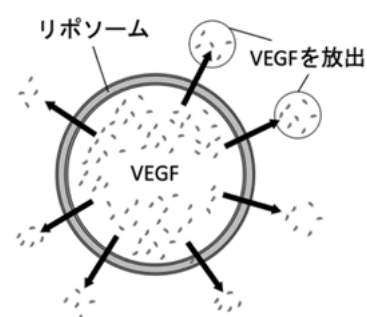


Fig. 1 VEGF 内包リポソームの放出のイメージ図

3. 研究の結果

これまでの研究成果について以下に示した。

(1) 微量溶液による遠心沈降法リポソーム作製法の確立

市販の VEGF は少量かつ高価であり、またリポソームに濃縮された状態で内包するため、遠心沈降法を微量で行うリポソームの作製法を検討した。リポソームに内包する 100 mg/mL の FITC-Dex の溶液量を 1 μ L $\sim$ 200 μ L として、遠心速度は 6000 g で固定して検討したところ、最終的に FITC-Dex を含む溶液を 10 μ L 用いるだけで Fig. 2 で示すようにリポソームを作製できた。またリポソームの数密度を確認したところ、 120 ± 56 個/ μ L (1 mL あたり 12 万個相当) であった。

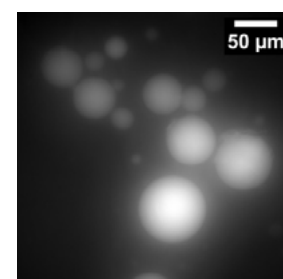


Fig. 2 10 μ L の溶液量で作製した FITC-Dex 内包リポソームの蛍光顕微鏡画像

(2) マイクロ流体デバイスを用いたリポソームの捕捉と観察系の確立

リポソームの物質放出の観測は FITC-Dex の蛍光の消失で評価可能である。また生体に投与した場合は、組織液の流れがあるため、流体内での変化の様子を観察する必要がある。したがって、Fig. 3 で示したリポソームを捕捉する構造を無数に配列した流体装置(マイクロ流体デバイス)はフォトリソグラフィ技術を用いて作製した。各捕捉構造は実際にリポソームを流して観察したところ、Fig. 4 で示すような顕微鏡画像が観測され、捕捉することができた。

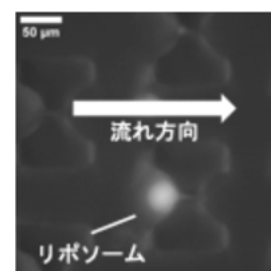
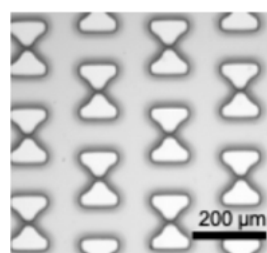
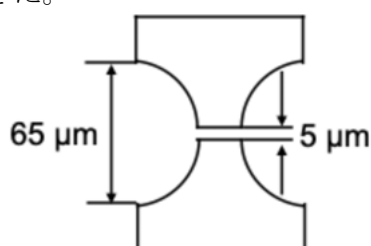


Fig. 3 リポソームを捕捉可能なマイクロ流体デバイス(左: 捕捉構造の設計値と右: 顕微鏡で撮像したデバイス内構造物の配列の様子)

Fig. 4 捕捉されたリポソームの様子

(3) FITC-Dex の放出に関する検討

リポソーム内より分子を放出させるため、リポソームの脂質膜に配合されているコレステロールと結合して脂質膜上にナノサイズの微小孔を形成するストレプトリジン 0 (SL0) を用いた。作製したリポソーム分散液に 100 ng/ml の SL0 をプレパラート上で同量添加したところ、Fig. 5 で示すように 30 分後程度から蛍光が消え始めたリポソームが観測されるようになった。また 1 日経ったのちも蛍光が消えずに残っているリポソームも見られた。物質の放出が見られたことから、(2) で作製したマイクロ流体デバイスにリポソームを捕捉して、改めて SL0 を流しながら観測したところ、Fig. 6 のようにプレパラートと同様に短時間で放出が進むリポソームと長時間内包したままのリポソームの両方の現象が観測された。したがって、VEGF のような高分子を徐放可能なリポソームの形成を実証した。

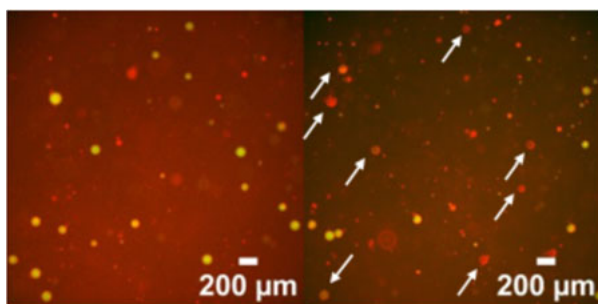


Fig. 5 SL0 添加直後のプレパラートの様子 (左)、30 分後の様子 (右) (画像は蛍光画像で、赤: リポソームの脂質膜、緑: FITC-Dex を示す、白矢印は FITC-Dex が抜け出ているも

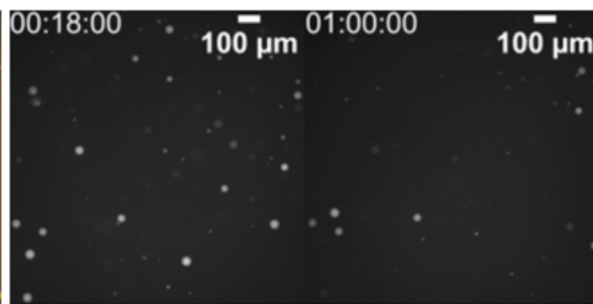


Fig. 6 マイクロ流体デバイスで捕捉されたリポソームを FITC-Dex の蛍光で観測した顕微鏡画像 (左: リポソームを捕捉後 SL0 を流し始めの様子、右: SL0 を流してから 42 分後の様子)

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究ではリポソームからタンパク質のような高分子が徐放される様子が観測できました。今回の研究期間内では至りませんでしたが、これからはモデル分子ではなく VEGF を内包して、まずは臓器チップ上で血管新生の様子を観測したいです。

また本研究課題ではまだ走り始めなので既に出来たものを内包する想定で研究を進めました。近年では試験管内でタンパク質を合成する技術として無細胞タンパク合成法が確立されています。もちろんリポソームに内包して、中でタンパク質をつくる研究も盛んに行われています。これの良いところは、生体の中にタンパク質を合成するもと (アミノ酸) が無数にあるので、より長期間タンパク質を放出できることが期待されます。将来的には本研究で得られた知見も踏まえて、患者さんのクオリティオブライフを保ちつつ、安全で安心な治療ができるような医薬品の実現に貢献していけるよう尽力していきます。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

この度は若手研究者奨励金を授与いただき誠にありがとうございました。改めてご寄付いただいた企業様はじめ支援者様方には心より御礼を申し上げます。研究者として、自身の取り組みを科学の発展に貢献するだけでなく、社会へ一般化 (実装) することは、一つの使命であると考えておりますが、それ以前に貴重な研究費がなければ、何も始まらないものです。今回はご支援をいただき、おかげさまで私が取り組む研究の大きな第一歩を踏み出すことができました。まだまだ課題が山積しており、ゴールへの道のりは長いですが、実用化を念頭に、一步ずつ着実に邁進してまいります。今後ともご支援のほどよろしくお願い申し上げます。

