

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	松浦 みなみ
主 論 文 題 名： アミノ酸トランスポーターを標的とした温度応答性蛍光プローブ及び薬物キャリアの開発				
(内容の要旨) 【背景】近年、診断と治療の融合を意味するセラノスティクスという概念が注目されている。正常細胞と異なり、がん細胞の代謝は、悪性度の獲得及び維持のためにリプログラミングされているため、診断・治療においては、がん細胞特異的な様々なターゲットが検討されている。 L型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) は、グルコーストランスポーター1 等と同様に、がん細胞における発現の増加が知られている。LAT1 は、アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基及び $\alpha$ -カルボキシル基の電荷を認識し、leucine、phenylalanine 及び tyrosine のような分岐アミノ酸や芳香族アミノ酸を選択的に輸送する。腫瘍組織では、肺、結腸、乳房、グリア細胞、前立腺及び卵巣臓などで高発現しており、過剰発現は転移の予後因子でもある。LAT1 を標的とする診断方法として、PET プローブが開発されている。また、SPECT やホウ素中性子補足療法で用いられるプローブも、腫瘍部位への集積において LAT1 が関与しているほか、LAT1 の阻害により抗腫瘍効果が得られることや、LAT1 を標的とする薬物担体が報告されている。しかし、これらのプローブや薬物担体は、一部の正常細胞において発現する LAT1 にも認識されるため、誤診断やがんの発見が遅れる可能性があり、標的腫瘍組織へターゲティングされた後に標的がん細胞のみへ作用する制御の付与が必要と考えられる。そこで、制御因子として温度を用いた、LAT1 を標的とした温度応答性蛍光プローブ及び薬物キャリアの開発を行うこととした。  検討1：がん細胞イメージングを目的とした LAT1 標的型温度応答性蛍光プローブ 【目的】本検討では、がん細胞イメージングを目的として、外部環境の温度による細胞内取り込みを制御可能な温度応答性ポリマーに基づく LAT1 標的蛍光プローブを設計し、ポリマープローブと LAT1 との親和性を評価した。 【方法】可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、温度応答性ポリマーである poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide-co- <i>N,N</i> -dimethylacrylamide) (P(NIPAAm-co-DMAAm)) を合成した。ポリマー末端へアミノ酸を修飾することにより、L-phenylalanine-P(NIPAAm-co-DMAAm) (Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm)) 及び L-tyrosine-P(NIPAAm-co-DMAAm) (Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)) を得た。合成したポリマーは、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、相転移挙動、サイズ及びゼータ電位測定により、評価した。 合成したポリマーとがん細胞に発現する LAT1 との親和性を評価するために、ポリマーあるいは LAT1 阻害剤である 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) の存在下で、LAT1 の基質である L-[ <sup>3</sup> H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験を行った。ウエスタンブロッティング及び免疫染色により、LAT1 発現が確認された HeLa 細胞をモデルがん細胞として用いた。 Fluorescein-5-maleimide (FL) をポリマーの末端に結合し、蛍光ポリマープローブを合成した。インキュベーション温度及び LAT1 認識が蛍光プローブの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べるために、P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL または Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL を HeLa 細胞に添加し、LCST 以下 (34°C) または LCST 以上 (40°C) でインキュベートした。インキュベーション後、共焦点顕微鏡で観察を行った。また、フローサイトメトリーにより、蛍光ポリマープローブの時間依存的な細胞内取り込みを評価した。さらに、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL の細胞内取り込みにおける LAT1 の関与を確認するために、LAT1 の基質である L-leucine または L-phenylalanine 存在下における蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みを評価した。				

【結果・考察】P(NIPAAm-co-DMAAm)、Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)の LCST は、各々37.3°C、39.3°C及び36.3°C、平均分子量は、12,100~18,200 であった。L-phenylalanine やL-tyrosine の修飾により、LCST はわずかに変化した。PBS 中で温度応答性の鋭敏な溶解度変化を示した。

HeLa 細胞を用いた L-[<sup>3</sup>H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験において、P(NIPAAm-co-DMAAm)とインキュベートした場合、L-[<sup>3</sup>H]-leucine の細胞内への取り込み量は、減少しなかった。よって、アミノ酸が修飾されていないP(NIPAAm-co-DMAAm)は、LAT1 を介した L-[<sup>3</sup>H]-leucine の取り込み輸送を阻害しないことが示唆された。また、L-phenylalanine を修飾した Phe-P(NIPAAm-co-DMAAm)も同様に、L-[<sup>3</sup>H]-leucine の取り込み輸送を阻害しなかった。対照的に、L-tyrosine を修飾した Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)は、L-[<sup>3</sup>H]-leucine の取り込みを阻害した。L-phenylalanine を修飾したポリマーは、 $\alpha$ -カルボキシル基のみを有し、L-tyrosine を修飾したポリマーは、 $\alpha$ -アミノ基と $\alpha$ -カルボキシル基を有する。 $\alpha$ -アミノ基の正電荷と $\alpha$ -カルボキシル基の負電荷が、LAT1 の基質認識に関与していることが報告されており、本研究の結果と一致した。いずれのポリマーも、LCST 以上及びLCST 以下で、L-[<sup>3</sup>H]-leucine 阻害効果の差は、観察されなかった。従って、ポリマーの親水性/疎水性の物性変化に関わらず、LAT1 はポリマー末端の L-tyrosine を認識することが示唆された。

共焦点顕微鏡画像において、LCST 以下では、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みは観察されなかったが、LCST 以上では、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みが確認された。これは、蛍光ポリマープローブの親水性/疎水性の物性変化に起因する。LCST 以下では、蛍光ポリマープローブは親水性であり、細胞膜との親和性は低く、細胞内へ取り込まれなかったと考えられる。一方、LCST 以上で蛍光ポリマープローブが疎水性になると、細胞膜との親和性が向上し、細胞内取り込みが促進された。また、蛍光ポリマープローブはライソソームに局在しており、エンドサイトーシスによる取り込みが示唆された。フローサイトメトリー測定においては、アミノ酸を修飾していないP(NIPAAm-co-DMAAm)-FL をインキュベートした細胞では、LCST 以上及び以下における蛍光強度に有意差はなかった。よって、蛍光ポリマープローブの疎水性変化が、細胞へのプローブの取り込みを誘導するには、不十分であったことが示唆された。一方、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL では、LCST 以下と比較して、LCST 以上でインキュベートした細胞は、30 分後には2 倍の蛍光強度が観察された。さらに、インキュベーション時間の延長により、LCST 以上でインキュベートした細胞の蛍光強度は、LCST 以下と比較して増加した。以上の結果より、ポリマープローブの疎水性と、LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との間の親和性の効果が、ポリマープローブの細胞内取り込みを促進することが示唆された。また、LAT1 を介して細胞内へ取り込まれるアミノ酸と Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL をインキュベートすると、アミノ酸を添加していない場合よりも蛍光強度は低くなり、LAT1 の Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL の細胞内取り込みへの関与が示唆された。

#### 検討2：がん治療を目的とした LAT1 標的型温度応答性薬物キャリア

【目的】本検討では、LAT1 標的型温度応答性薬物キャリアの創製を目指し、3-*sn*-phosphatidylcholine, from egg yolk (EPC) 及び dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) からなるリポソームに LAT1 親和性部位を有する温度応答性ポリマーを修飾し、リポソームの温度依存性及び LAT1 認識による選択的な細胞内取り込み能を評価した。

【方法】温度応答性ポリマーである P(NIPAAm-co-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)に DOPE を修飾した。温度応答性ポリマーへの L-tyrosine 及び DOPE による温度応答性への影響を調べるために、ポリマーの相転移挙動を示差走査熱量測定 (DSC) で評価した。

DOPE 修飾温度応答性ポリマー、EPC 及び DOPE からなる温度応答性リポソームを作製した。比較対照として、未修飾リポソーム及び polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームを作製した。相転移挙動、サイズ測定及びゼータ電位によって、物性を評価した。

インキュベーション温度及び LAT1 認識がリポソームの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べるために、5(6)-carboxyfluorescein (CF) を内封した未修飾リポソーム、PEG 修飾リポソーム、P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームまたは Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームを HeLa 細胞に添加し、LCST 以下 (37°C) または LCST 以上 (42°C) でインキュベートした。インキュベーション後、共焦点顕微鏡で観察を

行った。また、フローサイトメトリーにより、リポソームの時間依存的な細胞内取り込みを評価した。さらに、doxorubicin (DOX) を内封した Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの細胞内取り込みを評価した。

【結果・考察】DSC の結果より、いずれのポリマーも相転移に伴う吸熱ピークが観察され、P(NIPAAm-co-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.9°C及び 37.1°Cであった。P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.6°C及び 38.0°Cであり、DOPE 修飾後のポリマーでも吸熱ピーク値は観察された。修飾前後の吸熱ピーク温度の差は、1°C以内であり、温度応答性ポリマーへの L-tyrosine 及び DOPE 修飾は、温度応答特性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

リポソーム懸濁液の透過率測定の結果より、未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームは、温度による透過率変化を示さなかった。対して、温度応答性ポリマー修飾リポソームは、40°C付近で透過率の劇的な減少を示した。これは、リポソームに修飾された温度応答性ポリマーが、38°C付近で相転移して疎水性となり、疎水性相互作用によりリポソームが互いに凝集、沈殿し、リポソーム懸濁液中の透過率の低下がもたらされたことによる。また、作製したリポソームの粒径は、25°Cで 130.5~145.1 nm の範囲であり、*in vivo* 細胞取り込みに適したサイズであった。PDI 値は 0.12 以下であり、作製したリポソームが均一なサイズを有することを確認した。

共焦点顕微鏡画像において、42°Cのインキュベートで細胞内へ取り込まれたリポソームは、ライソソームと共局在しており、取り込み経路はエンドサイトーシスである可能性が示唆された。PEG 修飾リポソームや P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームでは、内封由来の蛍光が観察されたのに対し、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、多くがライソソームに局在し、LAT1 に認識されることにより、細胞内取り込みが促進されることが示唆された。フローサイトメトリー測定においては、未修飾リポソーム、PEG 修飾リポソーム及び P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、LCST 以上及び以下でインキュベートした細胞間で、蛍光強度の有意差は観察されなかった。対照的に、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの蛍光強度は、インキュベーション時間と共に、42°Cで著しく増加した。この結果より、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの細胞内取り込みは、修飾ポリマーの疎水性と LAT1 と末端 L-tyrosine との親和性の効果により、促進されることが示唆された。

また、DOX 内封 Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、温度依存的な細胞内取り込みを示し、温度制御により DOX の抗腫瘍活性を制御可能な薬物キャリアである可能性が示唆された。

【結論】LAT1 によって認識、温度にตอบสนองして細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する蛍光性ポリマープローブ及びリポソームを開発した。HeLa 細胞における L-[<sup>3</sup>H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験の結果は、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が L-[<sup>3</sup>H]-leucine の取り込みを阻害することを示した。ポリマー末端に修飾した L-tyrosine の $\alpha$ -アミノ基と $\alpha$ -カルボキシル基により、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が LAT1 に認識されることが示唆された。

ポリマーの末端に FL を修飾した蛍光ポリマープローブ、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾リポソームは、いずれも LCST 以下での細胞内取り込みは観察されなかった。対照的に、LCST 以上では、細胞内への取り込みが確認された。フローサイトメトリー測定の結果では、LAT1 認識部位を有さない蛍光プローブやリポソームとのインキュベーションに対し、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾リポソームは、細胞内で高い蛍光強度を示した。また、LCST 以上でインキュベートした際の蛍光強度は、LCST 以下に対して有意差を示し、ポリマーの疎水性及び LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との親和性の相乗効果が、細胞内取り込みを促進することが示唆された。

LAT1 標的型の温度応答性蛍光ポリマープローブ及び薬物キャリアは、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞内取り込みを示し、LAT1 発現に関与する悪性腫瘍及びがん細胞の環境にตอบสนองするイメージングや薬物デリバリーに有用であることが示唆された。