

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04635

研究課題名(和文) がんの特異的代謝に着目した高機能リガンド分子の設計と診断・治療への展開

研究課題名(英文) Design of functional ligand molecules focused on specific metabolism of cancer cells and their applications for diagnosis and therapy

研究代表者

西山 伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：10372385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、合成高分子を基本骨格として、がん細胞に共通する代謝経路を標的とする新規リガンド分子を開発した。新規リガンド分子は、がん細胞で過剰発現しているグルタミントランスポーター-ASCT2の密度を認識してがん細胞と選択的に相互作用することがin vitroおよびin vivo実験により確認された。これらの結果より、新規リガンド分子は、がん細胞に特異的でかつ汎用性に優れたターゲティング技術として、診断・治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a novel ligand molecule based on the common metabolic pathway to cancer cells (aberrant glutamine metabolism), using synthetic polymers. In vitro experiments confirmed that the ligand molecules, poly(amino acids) having glutamine moieties at the side chain, selectively interact with cancer cells through the multivalent binding to the glutamine transporter ASCT2 overexpressed in cancer cells. Confocal microscopic observation revealed that the ligand molecules are internalized by cancer cells, reaching lysosomal compartments. In vivo experiments demonstrated that the ligand molecules directly injected to the tumor showed longer retention compared with control ligands. These results suggest the utility of the ligand molecules as a versatile targeting technique specific to cancer cells. The novel ligand molecules are expected to be applied to cancer diagnosis and therapy.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：がん細胞 がん代謝 ターゲティング 合成高分子 アミノ酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍(がん)は、国民の死因の第一位であり、その克服は喫緊の課題である。がんの診断・治療薬の開発において、抗体、ペプチド等の標的指向性分子(リガンド分子)を利用した診断・治療分子のターゲティングは極めて有効なアプローチの一つであり、現在、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)が脚光を浴びている。この為、現在、ターゲティングに利用できる腫瘍特異抗原の探索とそれに対する抗体やアプタマーの開発が活発に行われているが、がん特異的かつ汎用性に優れたターゲティング技術は未だ確立されていないのが現状である。

一方、近年、がんを根治することが困難な理由として、がんが有する「治療抵抗性」が大きな注目を集めている。なかでも CD44 や CD133 等を発現するがん幹細胞は、腫瘍内の特異的な微小環境(ニッチ)に半休眠状態で一定の割合で存在し、抗がん剤や放射線治療に対して抵抗性を示す一方で、大量の娘がん細胞を発生することで再発・転移の根源となっていると考えられている。従って、がんの根本治療の実現のためには、治療抵抗性がんおよびがん幹細胞をターゲティングできる診断・治療システムの開発が極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究開始当初の背景を踏まえて、がんの特異的な代謝経路(がん代謝)に着目し、がん細胞(特に、治療抵抗性がん細胞)において細胞内取り込みが亢進しているグルタミンをリガンド分子(以下、がん代謝リガンドと呼ぶ)として利用したがんの革新的診断・治療システムを開発することを目的とした。

近年、がん代謝は、がんの新たな治療標的として非常に高い注目を集めている。この中でグルタミン(Gln)は、Warburg 効果で知られるグルコースの代謝と並んでがん細胞の増殖の維持や治療抵抗性の発現に重要な役割を担っており、リガンド分子として大きな可能性を秘めている(図 1)。Gln 代謝は、細胞構成成分(タンパク質、ヌクレオチド、脂肪酸)の生合成、クエン酸回路のサイクル維持、還元型グルタチオンの生成など、がんの増殖・治療抵抗性に重要な役割を担っていることが近年のメタボローム研究により解明され、非常に注目されている[Nature 496: 101(2013)]。

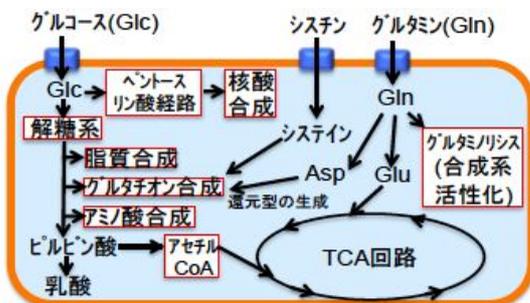


図 1. がん細胞で亢進している代謝経路

がん細胞では、トランスポーターを介した Gln の取り込みが 10-30 倍に亢進しており、FDG と同様に 1-[5-¹¹C]-glutamine 等の PET プローブが開発されている。このように、Gln はがん細胞の標的化リガンドとして極めて有望である。

そこで本研究では、上記の Gln をがん細胞の標的化のためのリガンド分子に応用することを目指した。しかしながら、一般的に、アミノ酸とトランスポーターの親和性定数(Km)は 10⁻³-10⁻⁴M オーダーであり、非常に弱い為にリガンド分子とはなり得ない。そこで本研究では、ポリアミノ酸の側鎖に Gln を導入し、多価結合によってがん細胞と強く相互作用できるリガンド分子の設計を行った。このようなポリマーは、トランスポーター密度の低い正常細胞とは弱い相互作用しか示さないが、トランスポーター密度の高いがん細胞と強く相互作用することが期待される(図 2)。このようなトランスポーターの密度を認識するリガンド分子は、抗原タンパク質 1 分子を標的とする抗体では実現困難であり、がん細胞に共通の代謝経路を標的とすることで、理論的にあらゆるがん細胞を標的化できるものと考えられる。さらに、Gln 代謝はがん幹細胞やその治療抵抗性にも関連することから、がん幹細胞や治療抵抗性がんのターゲティングへの応用も期待される。

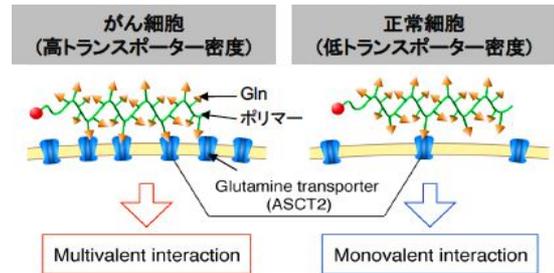


図 2. リガンド分子のトランスポーターを介した細胞との相互作用

3. 研究の方法

1) リガンド分子の合成

11-azide-3,6,9-trioxadecan-1-amine を開始剤とし NCA-Lys(TFA) を開環重合することによって、重合後が 30,50,100 の azide-PLys(TFA) を合成した(Mw/Mn<1.2)。TFA 基を脱保護し、Boc-Glu-OBzl および Boc-Glu(Obzl)-OH の反応により、それぞれ目的とする PLys(Gln)(がん代謝リガンド)および PLys(α-Glu)(コントロールリガンド)の化学構造

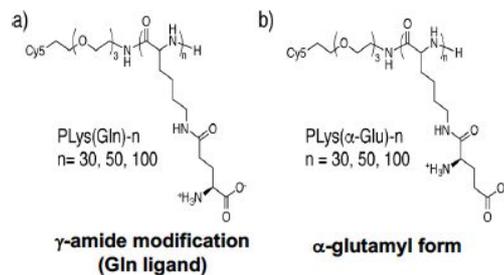


図 3. PLys(Gln)(がん代謝リガンド)と PLys(α-Glu)(コントロールリガンド)の化学構造

び PLys(-Glu)(コントロールリガンド)を合成した(図 3)。末端の azide 基には蛍光色素である Cy5 を導入した。

2) 培養細胞を用いたリガンド分子の評価

がん細胞ではグルタミントランスポーターの一つである ASCT2 が過剰発現していることが知られており、本研究では ASCT2 発現量が低い正常細胞と高発現量のがん細胞のモデルとしてヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞とヒト膵がん由来の BxPC3 細胞を用いてリガンド分子の評価を行った(図 4)。

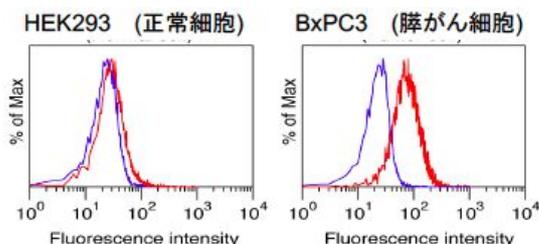


図 4. ASCT2 発現量のフローサイトメトリーによる評価(赤:抗 ASCT2 抗体処理後)

蛍光標識リガンド分子の細胞内取り込み量はフローサイトメトリー(Guava easy-Cyte 6-2L, Merck Millipore 社)によって評価した。トランスポーター特異性に関しては、異なるアミノ酸トランスポーターに対する阻害剤を用いた細胞内取り込み実験により評価した。また、蛍光標識リガンド分子の細胞内局在に関しては、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した(LSM710, Carl Zeiss 社)。

3) リガンド分子の in vivo 評価

BxPC3 細胞の皮下移植モデルに蛍光標識リガンド分子を腫瘍内投与し、腫瘍組織内における蛍光の滞留性をリアルタイム in vivo イメージングシステム(IVIS, Perkin Elmer 社)を利用して評価した。

4. 研究成果

蛍光標識リガンド[PLys(Gln)(がん代謝リガンド)、PLys(-Glu)(コントロールリガンド)]の BxPC3 細胞および HEK293 細胞による培養 3 時間後の取り込み量を評価した(図 5)。その結果、重合度(DP)の増加に伴い、PLys(Gln)の細胞内取り込み量が増加することが確認された。特に、重合度が 100 の場合に取り込み量の増大が顕著であった。また、PLys(Gln)は、HEK293 細胞よりも BxPC3 細胞に効率的に取り込まれることが確認された。PLys(-Glu)の細胞内取り込みにおいても同様な傾向が確認されたが、PLys(Gln)の細胞内取り込み量は PLys(-Glu)のそれよりも顕著であった。これらの結果は、PLys(Gln)の側鎖 Gln 部位ががん細胞表面の高密度の ASCT2 と多価結合を介して細胞内に取り込まれるという仮説(図 2)に矛盾しない結果であった。PLys(-Glu)の重合度に依存した細胞

内取り込みは、glutamate も ASCT2 と弱い相互作用を示すことによるものと思われる[J. Neurochem. 73: 2184(1999)]。次に、重合度が 100 の PLys(Gln)-100 と PLys(-Glu)-100 の BxPC3 細胞および HEK293 細胞による細胞内取り込み量の培養時間依存性を図 6 に示す。この結果より、PLys(Gln)-100 がヒト膵がん由来の BxPC3 細胞に対して培養時間依存的な取り込みを示し、HEK293 ではそのような取り込みを示さないことが確認された。これらの結果は、PLys(Gln)-100 ががん細胞に選択的に細胞内に取り込まれるリガンド分子であることを示唆している。

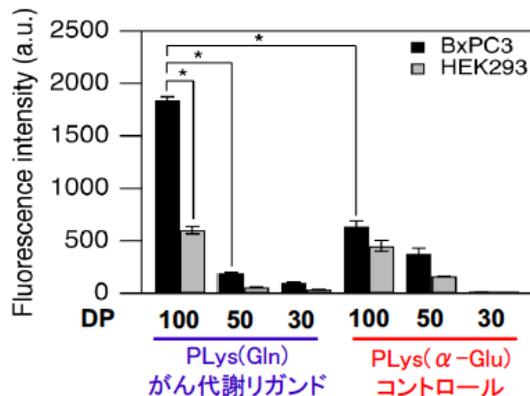


図 5. PLys(Gln)と PLys(alpha-Glu)の細胞内取り込み量の評価(培養後 3 時間後)

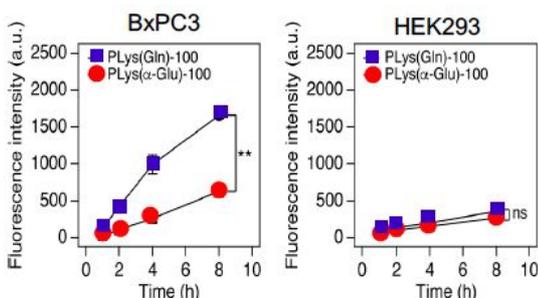


図 6. PLys(Gln)-100 と PLys(alpha-Glu)-100 の細胞内取り込み量の時間依存性の評価

次に、PLys(Gln)-100 の細胞内取り込みのメカニズムを評価するために、4 種類のトランスポーター阻害剤共存下でのリガンド分子の取り込み量を評価した(図 7)。その結果、ASCT2 阻害剤によってのみ濃度依存的に PLys(Gln)-100 の細胞内取り込みが抑制されることが確認され、PLys(Gln)-100 の細胞内取り込みが ASCT2 によるポリマー構造中の Gln の認識を介して起こっていることが示唆された。さらに、リガンド分子の ASCT2 に対する見かけの解離定数(Kd)を評価したところ、Gln は 20 μM、PLys(-Glu)-100 は 250nM、PLys(Gln)-100 は 62nM であった。すなわち、PLys(Gln)-100 は細胞表面の ASCT2 との多価結合によって Gln の 300 倍の親和性を示すものと考えられる。なお、62nM の Kd 値は、DDS のためのリガンド分子としても十分に高い値である。

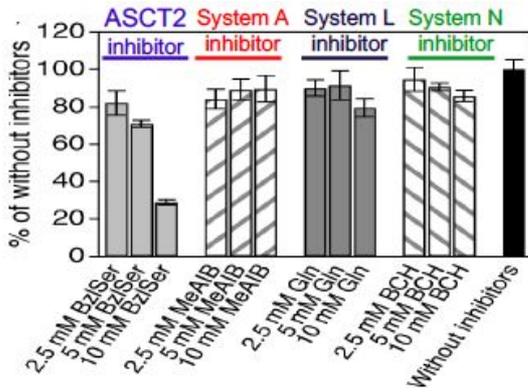


図 7. PLys(Gln)-100 と PLys(α -Glu)-100 の細胞内取り込み量の時間依存性の評価

PLys(Gln)-100 の BxPC3 細胞における細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により評価した結果を図 8 に示す。その結果、4 においては ASCT2 との結合を介した細胞膜との相互作用が示唆され、37 においてはリソソームとの共局在が確認された。この結果は、PLys(Gln)-100 がトランスポーターとの結合を介して細胞に内在化されることを示唆しており、がん代謝リガンドは核酸医薬などの細胞内への薬物送達にも応用できるものと期待される。

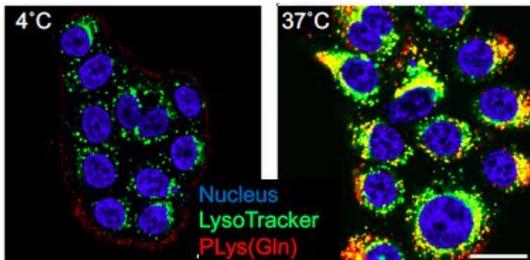


図 8. PLys(Gln)-100 の BxPC3 細胞における細胞内局在

最後に、リガンド分子の *in vivo* 環境におけるがん細胞との相互作用を評価するために、BxPC3 細胞の皮下移植モデルへの腫瘍内投与後の組織内滞留性をリガンドに導入し

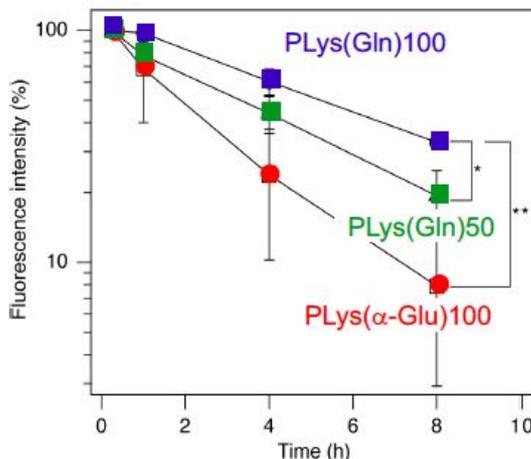


図 9. BxPC3 細胞の皮下移植モデルへの腫瘍内投与後のリガンド分子の滞留性の評価

た蛍光を利用して評価した(図 9)。その結果、PLys(Gln)-100 は、PLys(α -Glu)-100 および PLys(Gln)-50 よりも長期にわたりがん組織に滞留することが確認された。この結果は、がん代謝リガンドが ASCT2 との多価結合を介してがん細胞と強く相互作用するという *in vitro* 実験で立てた仮説に矛盾しない結果であった。

以上のように、本研究では、がん細胞で取り込みが亢進しているグルタミン代謝を標的として、グルタミントランスポーター ASCT2 との多価結合を介して、がん細胞と選択的に相互作用する新規リガンド分子を開発した。このリガンド分子は、がん細胞に共通する代謝経路を標的としていることから、あらゆるがん細胞を標的化することができ、トランスポーターの密度の違いを認識できることから、高いがん細胞特異性が期待できる。研究代表者らは、現在、このシステムのがん診断・治療への応用を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- X. Dou, T. Nomoto, H. Takemoto, M. Matsui, K. Tomoda, N. Nishiyama, Effect of multiple cyclic RGD peptides on tumor accumulation and intratumoral distribution of IRDye 700DX-conjugated polymers. *Sci. Rep.* 8 (1) 8126 (2018) (査読有) (DOI:10.1038/s41598-018-26593-0)
- A.-H. Ranneh, H. Takemoto, S. Sakuma, A. Awaad, T. Nomoto, Y. Mochida, M. Matsui, K. Tomoda, M. Naito, N. Nishiyama, An ethylenediamine-based switch to control the polyzwitterion charge at tumorous pH for effective tumor accumulation of coated nanomaterials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57(18) 5057-5061 (2018) (査読有) (DOI: 10.1002/anie.201801641)
- Y. Anraku, H. Kuwahara, Y. Fukusato, A. Mizoguchi, T. Ishii, K. Nitta, Y. Matsumoto, K. Toh, K. Miyata, S. Uchida, K. Nishina, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, H. Mizusawa, T. Yamasoba, T. Yokota, K. Kataoka, Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nature Commun.* 8 1001 (2017) (査読有) (DOI: 10.1038/s41467-017-00952-3)
- S. Quader, X. Liu, Y. Chen, P. Mi, T. Chida, T. Ishii, Y. Miura, N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, cRGD peptide-installed epirubicin-loaded polymeric micelles for effective targeted therapy against brain tumors. *J. Control. Release* 258 56-66 (2017)

(査読有) (DOI:
10.1016/j.jconrel.2017.04.033)
N. Yamada, Y. Honda, H. Takemoto, T. Nomoto, M. Matsui, K. Tomoda, M. Konno, H. Ishii, M. Mori, N. Nishiyama,
Engineering tumour cell-binding
synthetic polymers with sensing dense
transporters associated with aberrant
glutamine metabolism. Sci. Rep. 7 (1)
6077 (2017) (査読有) (DOI:
10.1038/s41598-017-06438-y.)
M. Naito, R. Azuma, H. Takemoto, M.
Hori, N. Yoshinaga, S. Osawa, R.
Kamegawa, H.J. Kim, T. Ishii, N.
Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka,
Multilayered polyion complexes with
dissolvable silica layer covered by
controlling densities of
cRGD-conjugated PEG chains for
cancer-targeted siRNA delivery. J.
Biomater. Sci. Polym. Ed., 28 (10-12)
1109-1123 (2017) (査読有) (DOI:
10.1080/09205063.2017.1301775)
C. H. Huang, H. Takemoto, T. Nomoto,
K. Tomoda, M. Matsui, N. Nishiyama,
Utility of the
2-nitrobenzenesulfonamide group as a
chemical linker for enhanced
extracellular stability and cytosolic
cleavage in siRNA-conjugated polymer
systems. ChemMedChem 12 (1) 19-22
(2017) (査読有) (DOI:
10.1002/cmdc.201600488)
N. F. Che Harun, H. Takemoto, T. Nomoto,
K. Tomoda, M. Matsui, N. Nishiyama,
Artificial control of gene silencing
activity based on siRNA conjugation
with polymeric molecule having
coil-globule transition behavior.
Bioconjugate Chem. 27 (9) 1961-1964
(2016) (査読有) (DOI:
10.1021/acs.bioconjchem.6b00322)

[学会発表] (計 6 件)

N. Nishiyama, "Development of Smart
Nanodiagnostics for Targeted Cancer
Therapy", 第 2 回 MRI アライアンス国際シ
ンポジウム 2018, National Institutes for
Quantum and Radiological Science and
Technology, Chiba, January 19, 2018 (招待
講演)

N. Nishiyama, "Design of Functional
Polymers for Smart Nanomedicine", 5th
International Symposium on Smart
Biomaterials (18-20 October), Shanghai
University LEHU Building, Shanghai, China,
October 20, 2017 (招待講演)

西山伸宏, "Design of Functional Polymers
for Cancer Diagnosis and Therapy", 化学

系学協会東北大会 高分子コロキウム, 岩
手大学 理工学部, 盛岡市 平成 29 年 9
月 16 日(招待講演)

N. Nishiyama, "Development of smart
polymers and nanodevices for innovative
medicine", International Symposium on
Materials for Chemistry and Engineering
(IMCE2017), Chikushi Hall (C-CUBE),
Kyushu University, Fukuoka, Feb. 3, 2017
(招待講演)

西山伸宏, "ナノテクノロジーが拓く未来医
療 -体内病院の実現を目指して-", 第 11
回 四大学連合文化講演会, 一橋講堂 学
術総合センター, 東京都, 平成 28 年 10 月
28 日 (招待講演)

西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを基盤
とした革新的ナノ診断・治療システムの開
発", 日本薬物動態学会 第 31 回年会, キ
ッセイ文化ホール, 松本市, 平成 28 年 10
月 15 日(招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: グルタミントランスポーターと多価結
合することができるリガンド, 及び当該リ
ガンドを含む組成物

発明者: 西山伸宏, 武元宏泰, 野本貴大, 友
田敬士郎, 松井誠, 山田直生, 本田雄士,
石井秀始, 森正樹, 今野雅充

権利者: 東京工業大学, 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-161774、PCT/JP2017/029552

出願年月日: 平成 28 年 8 月 22 日

国内外の別: 国内、PCT 出願

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bmw.res.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号: 1 0 3 7 2 3 8 5

(2) 研究分担者

武元宏泰 (TAKEMOTO, Hiroyasu)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教
研究者番号: 1 0 7 0 9 2 4 9

野本貴大 (NOMOTO, Takahiro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教
研究者番号: 0 0 7 3 4 7 3 2

(3)連携研究者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)
量子科学技術研究開発機構・放射線医学研
究開発部門・チームリーダー
研究者番号：10319519

(4)研究協力者

なし