

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016017

研究課題名（和文） 高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子デリバリー

研究課題名（英文） Polymeric micelle nanocarrier for drug and gene delivery

研究代表者

片岡 一則 (KATAOKA KAZUNORI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：00130245

研究成果の概要（和文）：

本研究では、難治がんの標的治療の実現を目指して、細胞内低 pH 環境応答性と標的細胞結合能を賦与した制がん剤内包高分子ミセルを開発し、その有効性を担がんマウスを用いた動物実験により明らかにした。また、遺伝子デリバリーに基づくがんの分子治療の実現に向けて、細胞内還元的环境下で選択的に開裂する結合を介して内核が架橋安定化された高分子ミセル型ベクターを構築し、がんの血管新生阻害治療における有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To realize the targeting therapy against intractable tumors, we developed functional polymeric micelles integrated with the sensitivity to intracellular low pH conditions and the ability to bind the specific cells for the delivery of antitumor agents, and demonstrated their effectiveness in the in vivo study using tumor-bearing mice. Also, to establish the molecular cancer therapy based on gene delivery, we developed a non-viral gene vector based on polymeric micelles stabilized through the cross-linking cleavable under the intracellular reductive conditions, and succeeded in their application to antiangiogenic cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,300,000	0	9,300,000
2006年度	9,300,000	0	9,300,000
2007年度	9,300,000	0	9,300,000
2008年度	9,300,000	0	9,300,000
2009年度	9,300,000	0	9,300,000
総計	46,500,000	0	46,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー、ナノキャリア、高分子ミセル、がん化学療法、遺伝子治療、siRNA、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いたターゲティング治療は、着実な進歩を遂げ、がん治療分野において実用

化されてきていた。その一方で、難治がんの治療のためには、現状のDDSの効能・効果は必ずしも十分とは言えず、組織浸透性に優れ、標的指向性や環境応答性などのスマート機

能を具備した DDS の開発が必要であるものと思われた。特に、遺伝子・siRNA などの核酸医薬を in vivo 環境で有効に機能発現させるためには、全身レベルでのターゲティングに加え、オルガネラレベルでのターゲティングが必要であり、そのための高機能化 DDS の開発が必要不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、ブロック共重合体が形成する高分子ミセル(図 1)をキャリアとして用いる事によって、制がん剤の血中滞留性の延長と固形ガンへの選択的集積を実現し、優れた制がん活性を発現させることに成功してきた。その実績を踏まえて本研究においては、(1) 環境応答性や標的認識能を賦与した制がん剤内包高分子ミセルを開発し、固形がんの標的治療を展開する、(2) 細胞外における高い安定性と細胞内における効率的な機能発現を実現する遺伝子内包高分子ミセルを開発し、固形がん治療における有効性を検証する、という二大目標を達成することを目指した。特に項目(2)においては、レポーター遺伝子を用いたキャリアの機能評価に留まらず、臨床的に意味のある動物実験モデルを対象として、遺伝子導入に基づく治療効果の検証を行うことを目標とした。この様な高分子ミセル型 DDS 開発の推進は、現在のがん化学療法における治療効果とコンプライアンスの向上を実現し、さらには、核酸医薬を用いたがん分子療法の実用化をも促進するものと期待され、がん治療領域の進展に多大な貢献をなすものと思われる。

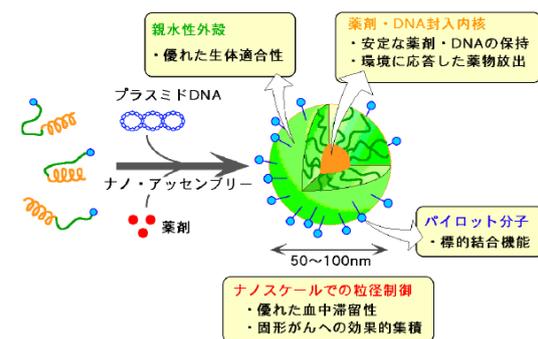


図 1. 薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ミセル型ナノキャリア

3. 研究の方法

(1) pH 応答型アドリアマイシン(ADR)内包ミセルの開発と膵臓がん治療への展開

本項目では、ナノキャリアがエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後に、

エンドソーム/リソソーム内の低 pH 環境下で選択的に制がん剤アドリアマイシン(ADR)を放出するシステムの構築を目指して、poly(ethylene glycol)-poly(β -benzyl L-aspartate) (PEG-PBLA)のアミノリシス反応により PBLA 側鎖にヒドラジド基を導入し、ADR の C-13 位のカルボニル基との間で形成されるヒドラゾン結合を介して ADR が内核に導入された高分子ミセルを開発した(図 2)。調製された ADR 内包ミセルは、65nm の粒径を有しており、pH7.4 においては ADR を放出しないが、pH5.0 において選択的に ADR を放出することが確認された。次に、pH 応答型 ADR 内包ミセルの膵臓がんモデルの治療における有用性を検討した。具体的には、ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対して ADR 内包ミセルを i. v. 投与し、その治療効果ならびに ADR の腫瘍内分布を評価した。ここでは、ADR 内包ミセルのがん集積性を高めるために、transforming growth factor- β (TGF- β) 阻害剤の併用効果についても検討を行った。

(2) 標的指向性リガンドを搭載した pH 応答型 ADR 内包ミセルの開発と機能評価

上述の pH 応答型 ADR 内包ミセルの表面にリガンド分子を導入するために、4-(diethoxymethyl)-benzylalcohol を開始剤としてエチレンオキシド(EO)と BLA を重合し、末端にベンジルアセタール(AceBz)基を有する AceBz-PEG-PBLA を合成した。次にリガンド分子としてグルタミン酸残基の γ -カルボキシル基にヒドラジド基を導入した Fo1-Hyd と上記の AceBz-PEG-PBLA を反応させることによって、PEG 末端に folate を有するブロック共重合体を合成した。このブロック共重合体に上記(1)と同様な方法によりヒドラゾン結合を介して ADR をミセル内核に導入することによって、表面に folate を有する ADR 内包ミセルを調製した(図 2)。本システムの体内動態ならびに制がん活性試験は、ヒト口腔がん KB 細胞を用いて行った。

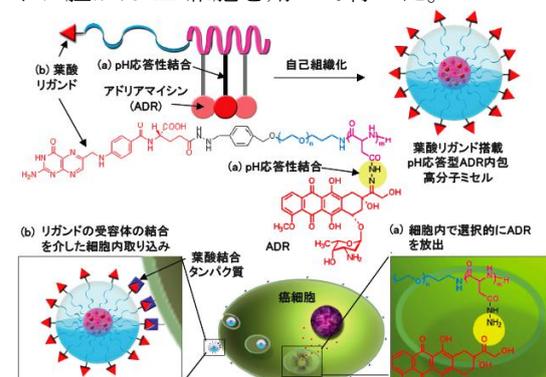


図 2. 葉酸リガンドを搭載した pH 応答型 ADR 内包高分子ミセル

(3) 白金錯体制がん剤(DACHPt)内包ミセルの

開発とその最適化

オキサリプラチンの活性中間体である DACHPt と PEG-pol(L-glutamic acid) (PEG-PGlu) の水中における高分子-金属錯体形成を利用して、DACHPt 内包ミセルを構築した。ここでは、PGlu 重合度が 20, 40 および 80 と異なる PEG-PGlu から DACHPt 内包ミセルを構築し、マウス大腸がん C26 細胞の皮下移植モデルを用いて、体内動態試験および制がん活性評価を行うことにより、PGlu 鎖長の最適化を行った。また、最適化されたミセルに関して、上記のヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対する治療における有用性を検討した。

(4) 高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築とがん遺伝子治療への展開

本研究では、全身投与による遺伝子デリバリーに向けて、細胞外における高い安定性と細胞内における効率的な DNA の放出を実現するために、PEG-poly(L-lysine) (PEG-PLys) の PLys 側鎖に SH 基を導入し、細胞内還元的環境下で開裂するジスルフィド (SS) 架橋により内核が安定化された高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築した。本システムには、具体的な治療遺伝子として、可溶性の VEGF receptor-1(soluble fms-like tyrosine kinase-1: sFlt-1) を発現するプラスミド DNA を搭載し、ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対する血管新生阻害に基づく制がん活性を評価した。

4. 研究成果

(1) pH 応答型アドリアマイシン (ADR) 内包ミセルの開発と膵臓がん治療への展開

ヒドラゾン結合は、生理的 pH(7.4) では安定であるが、酸性環境下では解離に向かって平衡がシフトするために、本システムは血中では ADR を安定に保持する一方で、がん組織の低 pH 環境下で ADR を放出する低 pH 環境応答型の DDS として機能するものと考えられる。実際に、pH 応答型 ADR 内包ミセルは、マウス大腸がん C26 細胞に皮下移植モデルを用いた動物実験において、優れたがん集積性と制がん活性を示すことが明らかになった。次に、本システムを難治がんの標的治療へと展開するために、pH 応答型 ADR 内包ミセルのヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対する有効性をフリーの ADR とドキシル (ADR の PEG 修飾リポソーム製剤) との比較により検証した。その結果、すべての薬剤の投与群において有意な制がん活性は確認されなかった。そこで、膵臓がんモデルにおいて高分子量のデキストランのがん集積性を高める効果が確認されていた TGF- β 阻害剤を併用したところ、pH 応答型 ADR 内包ミセルとドキシルは有意な制がん活性を示し、ミセルの効果

はドキシルの効果よりも有意に優れていることが確認された。この結果に基づいて、腫瘍内における ADR の分布を評価したところ、TGF- β 阻害剤を投与していない条件では、がん組織への ADR の集積は必ずしも十分とは言えないが、TGF- β 阻害剤の投与によって ADR 内包ミセルとドキシルのがん集積性が高まり、特に、ADR 内包ミセルの投与においてはがん組織に強い ADR の蛍光が観察された (図 3)。以上の結果より、pH 応答型ミセルと TGF- β 阻害剤の併用治療は、難治がんの治療において有効な戦略となりうるものと考えられる。

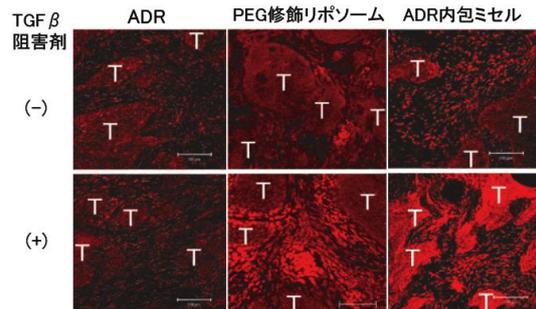


図 3. ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルにおける ADR の腫瘍内分布 (T で目印を付けた部分ががん組織であり、それ以外は間質組織)

(2) 標的指向性リガンドを搭載した pH 応答型 ADR 内包高分子ミセルの開発と機能評価

本研究では、上記の pH 応答型 ADR 内包ミセルの表層にリガンド分子として葉酸分子を導入し、リガンド搭載ミセルの in vitro および in vivo における有用性を検討した。その結果、in vitro 実験では、葉酸結合タンパク質 (受容体) を過剰発現している KB 細胞によってリガンド搭載ミセルが効率的に細胞内に取り込まれ、高い細胞毒性を示した。この結果に基づいて、KB 細胞の皮下移植モデルに対して、リガンド搭載ミセルのがん集積性をリガンドを導入していない ADR 内包ミセルとの比較により検証したところ、両者に有意な差は認められなかった。この結果は、DDS が標的であるがん細胞に到達するためには、血管外に漏出しなくてはならないことを考えると当然の結果であると言える。一方、制がん活性に関しては、葉酸リガンド搭載 ADR 内包ミセルは、1/2 - 1/3 の ADR 濃度でリガンドを搭載していない ADR 内包ミセルと同等の制がん活性を示した。この結果は、リガンド搭載ミセルが受容体を介してがん細胞によって効率的に取り込まれたためであると考えられる。このように、リガンド分子は、血球細胞や血管内皮細胞を標的とする場合を除いて、ミセル型ナノキャリアの体内動態に影響を及ぼさないが、がん組織での滞留性および標的細胞によるミセルの取り込みの向上に寄与し、がん標的治療の薬効を高める

ことが示唆された。

(3) 白金錯体制がん剤(DACHPt)内包ミセルの開発とその最適化

本研究では、PGlu 重合度が 20, 40 および 80 と異なる PEG-PGlu から DACHPt 内包ミセルを構築した。その結果、PGlu 重合度に関係なく、約 40nm の高分子ミセルの形成が確認された。そこで、マウス大腸がん C26 細胞の皮下移植モデルを用いて、DACHPt 内包ミセルの体内動態試験および制がん活性評価を行った。その結果、PGlu 重合度が 40 および 80 の場合において、肝臓および脾臓におけるミセルの集積が認められ、制がん活性試験においてはミセル 6mg/kg を 1 日おきに 3 回投与する投与条件で体重減少および毒性死が認められたが、PGlu 重合度が 20 の DACHPt 内包ミセルは、肝臓および脾臓に対する集積が低く、有意な制がん活性を示す一方で上記の投与条件においても致死的な毒性を示さなかった。以上の結果より、PGlu 重合度が 20 の DACHPt 内包ミセルががん標的治療において最も有望であるものと思われた。そこで、本研究では、この組成の DACHPt 内包ミセルを BxPC3 細胞の皮下移植モデルの治療へと展開した。その結果、TGF- β 阻害剤を用いない条件においても DACHPt 内包ミセルは、BxPC3 モデルに対して優れた制がん活性を示すことが確認された。さらに、ミセルおよび DACHPt の腫瘍内分布を、それぞれ蛍光標識ポリマーの蛍光顕微鏡観察および蛍光 X 線解析による Pt の検出により評価したところ、DACHPt 内包ミセルは間質、がん組織を深く浸透し、がん組織内で均質な分布を示すことが確認された。この結果は、DACHPt 内包ミセルが ADR 内包ミセル(70nm)よりも粒径が小さい 40nm の粒径を有することに起因するものと考えられる。これらの研究成果に基づいて、現在、DACHPt 内包ミセルは、臨床試験に進んでおり、難治がんの標的治療のための DDS として実用化が期待される。

(4) 高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築とがん遺伝子治療への展開

本研究により開発された SS 架橋型高分子ミセルは、約 100nm の粒径を有しており、ゼータ電位はほぼ中性であったことから、DNA を内包した内核が PEG で覆われた二層構造を有していることが示唆された。In vitro での sFlt-1 の発現実験では、最適な SH 基導入率が存在し、SH 基導入率が 5%の場合に最も高い sFlt-1 の遺伝子発現が確認された。一方、SH 基導入率が 36%の場合においては、内核の過度の安定化によって sFlt-1 の発現効率は検出限界以下であった。一方、マウスに投与した時の血中滞留性を評価したところ、SS 架橋の導入によって、血中滞留性が向上するこ

とが確認された。そこで、BxPC3 細胞の皮下移植モデルマウスに対して SS 架橋ミセルを 0, 4, 8 日に三回投与し(pDNA の投与量 20 μ g/mouse)、その後の腫瘍体積を評価したところ、SH 基導入率が 11%の PEG-PLys より形成された SS 架橋ミセルは最も優れた制がん活性を示し、その効果は、膵がんの標準治療薬として用いられているゲムシタビン(100 mg/kg)や血管新生阻害剤として使用されている VEGF 抗体ベバシズマブ(50 mg/kg)よりも優れていることが確認された。また、治療後の腫瘍組織の血管密度を PECAM-1 の免疫染色により評価したところ、SS 架橋ミセルの投与によって血管密度が有意に低下することが確認され、本研究で得られた治療効果が sFlt-1 による血管新生の阻害によるものであることが確認された。現在、ベバシズマブは metastatic colon cancer や non-small cell lung cancer に対する治療薬として認可され、現在もその適応を増やしているが、ベバシズマブには致死性の重篤な副作用があり、薬価が高いという問題も抱えている。これに対して、本研究では、安全性に優れた非ウイルスベクターである高分子ミセルによる sFlt-1 の遺伝子導入によって、皮下移植モデルに対して優れたがん治療効果を確認することができた。遺伝子治療は、抗体医薬と比較して、少ない投与量で持続的な効果が期待でき、上記のアバスチンの使用において問題となっている副作用を低減させることが期待でき、繰り返し投与を必要としないために医療経済的にも大きなメリットを有しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 65 件)

1. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. J. Control. Release in press [査読有]
2. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. Mol. Pharm. 7 (2) 501-509 (2010) [査読有]
3. M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka,

- Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release* 140 (3) 306-311 (2009) [査読有]
4. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M.R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.* 17 (8) 1404-1410 (2009) [査読有]
 5. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008) [査読有]
 6. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008) [査読有]
 7. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008) [査読有]
 8. K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122 (3) 252-260 (2007) [査読有]
 9. H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121 (3) 146-155 (2007) [査読有]
 10. Y. Bae, N. Nishiyama, K. Kataoka, In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. *Bioconjugate Chem.* 18 (4) 1131-1139 (2007) [査読有]
 11. M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (9) 3460-3465 (2007) [査読有]
 12. Y. Bae, W. -D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol. BioSyst.* 1 (3) 242-250 (2005) [査読有]
- [学会発表] (計 154 件)
1. K. Kataoka, Block copolymer micelles and vesicles as nanocarriers for gene and drug delivery (The 10th US-Japan symposium on Drug Delivery System, 2009/12/16-12/20, Lahaina, Maui, Hawaii, USA) Plenary Lecture
 2. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (1st Annual Conference of the American Society for Nanomedicine, 2009/10/22-10/25, Bolger Center, Potomac, Maryland, USA) Keynote Lecture
 3. 片岡一則、健康サスティナブル社会を先導するナノバイオマテリアル ～ピンポイント DDS への展開～ (第 58 回高分子討論会、2009/9/16-9/18、熊本大学工学部黒髪地区、熊本県) 招待講演
 4. 片岡一則、ポリエチレングリコール-ポリアミノ酸ブロック共重合体を基盤とする高分子ミセル型 DDS の開発 (第 25 回日本 DDS 学会学術集会、2009/7/3-7/4、東京ドームホテル、東京) 招待講演
 5. K. Kataoka, Smart Nanocarrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery ~A Future for the Pharmaceutical Industry~ (2nd European Conference for Clinical Nanomedicine, 2009/4/27-4/29, Messe Schweiz, Hall 1 ' Entree, Basel, Switzerland) Keynote Lecture

〔図書〕（計 42 件）

1. 宮田完二郎、片岡一則：抗がん剤を運ぶシステム：高分子ミセル型 DDS、現代化学 (464) 44-48 (2009)
2. 西山伸宏、片岡一則：ナノテクノロジーの癌医療への応用 高分子ミセル型抗癌剤の開発、癌と化学療法 36 (3) 357-361 (2009)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 28 件）

名称：カチオン性のポリ(アミノ酸)およびその使用

発明者：西山伸宏、片岡一則、宮田完二郎、石井武彦、呉寿栄、キム ヒュンジン

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許権

番号：特願 2009-31799

出願年月日：2009 年 2 月 12 日

国内外の別：国内

名称：TGF- β シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組み合わせ使用

発明者：宮園浩平、狩野光伸、ベー ユンスー、西山伸宏、片岡一則

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許権

番号：12/223463

出願年月日：2006 年 8 月 30 日

国内外の別：国外

〔その他〕

(1) 受賞実績 <計 6 件>

2009 年 7 月 NIMS Award 2009

2008 年 6 月 Controlled Release Society Founders Award

(2) 報道関連 <計 12 件>

2009 年 5 月 10 日 日本経済新聞 サイエンス：がん患部 直接たたけ

2007 年 1 月 22 日 読売新聞 夕刊 偶然の球体患部狙い撃ち

ホームページ等

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/research/research2-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 一則 (KATAOKA KAZUNORI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：10372385

(2) 研究分担者

山崎 裕一 (YAMASAKI YUICHI)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：00322678

西山 伸宏 (NISHIYAMA NOBUHIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10372385

長田 健介 (OSADA KENSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・特任講師

研究者番号：10396947

宮田 完二郎 (MIYATA KANJIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50436523

岸村 顕広 (KISHIMURA AKIHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：70422326

石井 武彦 (ISHII TAKEHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・特任助教

研究者番号：80415075

(3) 連携研究者

なし