

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08942

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対する革新的抗がん剤デリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of Innovative Anticancer Drug Delivery System for Malignant Glioma

研究代表者

椎野 顯彦 (Shiino, Akihiko)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授

研究者番号：50215935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らは経静脈投与でBBBを透過し悪性神経膠腫(GBM)細胞に特異的に取り込まれるペプチドである2つの分子標的プローブをファージディスプレイ法で発見し特許を取得した。このペプチドをナノエマルジョン(NE)の表面に付与し、NEに抗癌剤を内包させることにより、GBMの分子標的抗癌剤を作成した。人由来のGBM幹細胞をマウスの脳に移植する patient-derived xenograft (PDX)モデルにおいて、抗腫瘍効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GBMの5年生存率は10%以下、平均余命は1～1.5年と予後不良である。この腫瘍は、浸潤性に進展するため切除範囲と脳の機能温存が対立し、手術で完全に摘出できない。血液脳関門(BBB)に守られ抗癌剤が届きにくい、という特徴があり、ヒトのがんで最も治療が困難な疾患の1つである。研究者らは、頸静脈経路で腫瘍に特異的に輸送できるdrug delivery system(DDS)であるNEを開発した。本研究の特徴は、NE内に任意の抗癌剤を包埋できるので、多様な遺伝子変化をもつGBMに最も有効な抗癌剤カクテルを輸送できることにある。これまでに、このようなDDSの開発事例の報告はない。

研究成果の概要(英文)：We developed two molecularly targeted peptide probes using a phage display method. The probes pass through the blood brain barrier (BBB) and are specifically incorporated into malignant glioma (GBM) cells when administered intravenously. The peptides were attached to the surface of nanoemulsions (NEs), and the NEs were encapsulated with anticancer agents to create molecularly targeted anticancer agents for GBM. The antitumor effect was confirmed in the patient-derived xenograft (PDX) model, in which human-derived GBM stem cells are transplanted into the mouse brain.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性神経膠腫 分子標的 抗癌剤 drug delivery system がん幹細胞 ファージディスプレイ 血液脳関門

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は極めて予後の悪い疾患であり、手術、放射線、化学療法を実施しても平均余命は1年半程度である。この腫瘍は浸潤性に進展するため正常脳との境界は不鮮明で、手術による摘出が困難であり、放射線治療と抗がん剤(テモゾロミド)を組み合わせても、その効果は平均2.5ヶ月の延命に過ぎない。脳腫瘍において化学療法を難しくする原因の1つは、血液脳関門による抗癌剤の侵入阻止であり、抗癌剤の高濃度投与と副作用発現とのジレンマに陥る。このような背景から、血液脳関門を透過して腫瘍細胞に特異的に取り込まれる drug delivery system (DDS)の開発が必要とされている。

細胞には提示された特定の標識に反応する性質があり、血液脳関門を形成する血管内皮や腫瘍細胞の表面にもこのような標識が存在し、これがゲートとして作用して特定のものだけが腫瘍細胞に取り込まれる。この標識に対するプローブの開発の目的でバクテリオファージを利用した、ファージディスプレイ法をバイオパンニングした結果、ヒト由来の悪性神経膠腫に特異的に取り込まれ、かつ、血液脳関門を透過するペプチドシーケンスを発見し特許を取得した。

このプローブに抗癌剤(geldanamycin)を化学結合させ、ヒト由来の悪性神経膠腫から腫瘍幹細胞を取り出し、マウスの脳に移植したPDXモデルで、生体内での抗腫瘍効果を調べたが、顕著な効果が得られなかった。その後の研究で、この原因が腫瘍細胞がもつ endocytosis-endosome 機構によるものであることが判明した。これに対して、pH-dependent membrane active peptide (PMAPs)をさらに化学結合させることにより、一定の成果が得られた。しかしながら、既存の抗癌剤をプローブに化学結合させるためには、抗癌剤の合成も必要であり、コストもかかる。また、悪性神経膠腫は遺伝子レベルで多様性に富むため、遺伝子ごとにオーダーメイドの抗癌剤カクテルが必要と考えた。そこで、これまでよりも容易に伝達できる担体の開発に取り組むことにした。

2. 研究の目的

これまでの研究で endocytosis された抗癌剤を endosome から脱出させることは、PMAPs を化学結合させるなど、研究開発が容易ではないことが判明した。そこで腫瘍の endosome を回避する目的で、担体を腫瘍細胞膜へ直接融合させることにした。このような DDS の担体には、リポソーム、ミセル、ナノエマルジョン(NE)などがあり、このうちドキシル(リポソーム)は抗癌剤として既に承認されている。パクリタキセルやシスプラチンをミセルに内包した新規抗癌剤も開発されつつある。しかしBBBを透過するためにはNEのような小分子の担体が必要で、事実NEはBBBを透過するとの報告がある^{1,2,3}。本研究では、1)これまでに開発した悪性神経膠腫特異プローブを用いたNEを作成し、2)このNEに特定の抗癌剤を包埋し、3)これが血液脳関門を保った脳悪性神経膠腫モデルにおいて、抗腫瘍効果を示すかどうかを検証する。

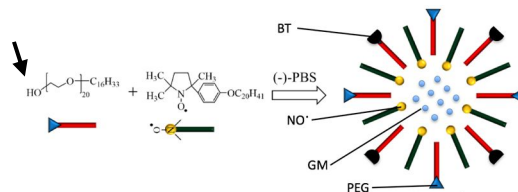
3. 研究の方法

分子標的NEの作成

NEは均一な粒子として生成しないと自ら融合-崩壊してしまうが、研究チームは直径9~17nmの安定したNEの合成に成功している。アルキル長鎖+疎水性ニトロキシドラジカルと非イオン性界面活性剤をリン酸緩衝液中で混合することにより、安定な磁性NE粒子を調製することに成功し、電子スピン分光法と動的光散乱法により構造を確認した⁴。この磁性NEは、1)リン酸緩衝液中で長期間安定、2)界面活性剤とラジカル部のアルキル長鎖が水中で入れ子構造を形成、3)ラジカル部が保護され長時間にわたってビタミンC還元耐性を示す、4)粒子内に疎水性ドラッグを内包できる、といった特性をもつ。以下に合成方法を記載する。

ペプチドプローブとアルキル長鎖の合成は、図の三角部位にあるOH基(矢印)を利用して本学で開発したBT-33ペプチドを化学結合させる。このように作成した長鎖とニトロキシドラジカル長鎖によるNEを合成は、非イオン性界面活性剤をリン酸緩衝液中で混合して組み立てる。合成したNEの粒子構造を電子スピン分光(EPR)法、動的光散乱(DLS)、小角中性子散乱(SANS)で確認する。

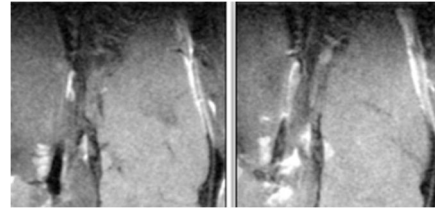
合成したNEが実際に頸静脈経由で腫瘍特異的に取り込まれるか、PDXモデルマウスにおいて確認する。



図のOH基(矢印)を利用してBTをアルキル長鎖に結合させ、これをNEの表面に配置することによりBBB透過と神経膠腫特異性を確保する。腫瘍細胞が貪食し始めると、ナノエマルジョンは細胞膜に融合し、NE中心に内包されている抗癌剤(図ではGM)を腫瘍の細胞質内に放出する。図のNO[•]がMR増強効果をもたらす

4. 研究成果

生体適合性の高い界面活性剤と疎水性のある低分子量の 2,2,5-trimethyl-5-(4-alkoxy)phenylpyrrolidine-N-oxyl radical からなる堅牢な金属フリー磁性 NE (平均粒子径 20nm 以下) を、pH7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で調製した。NE の構造は、電子常磁性共鳴分光法、動的散乱および小角中性子散乱測定によって特徴づけられた。このナノエマルジョンは、高いコロイド安定性、低い細胞毒性、過剰なアスコルビン酸に対する十分な還元耐性、PBS 中のプロトン縦緩和時間 (T1) 加重 MR 画像における十分なコントラスト増強効果を *in vitro* (および予備的に *in vivo*) で示した。さらに、疎水性の抗がん剤であるパクリタキセルをナノ粒子の内部に封入することができ、得られたパクリタキセル負荷のナノエマルジョンは、HeLa 細胞に効率的に取り込まれ、細胞増殖を抑制することができた。



磁性 NE をマウスに静脈投与前後の T1 強調 MRI 矢状断。下垂体(矢印)や筋肉組織が造影されていることがわかる。

この NE の長鎖にファージディスプレイ法で見つけたペプチドを予定通り化学結合させ、上記と同様に均一な NE の合成に成功した。NE 自体に細胞毒性があるため、NE 単独での投薬量の設定後に、NE にゲルダナマイシン (GM) を内包した分子標的抗癌剤を作成した。この抗癌剤をヒト由来悪性神経膠腫から癌幹細胞を分離して作成した PDX モデルマウスに 5 日間投与した。溶媒投与では抗腫瘍効果が限局的であったのに対し、NE 単独投与で腫瘍の縮小効果が認められた。一方 NE 内包 GM 投与では、NE 単独投与と同程度の腫瘍の縮小効果に留まった。このことから、NE が腫瘍細胞と融合することにより抗腫瘍効果を示すのに対し、内包した GM による付加的な抗腫瘍効果は得られないことが判明した。

本実験期間中に十分な腫瘍の縮小効果が得られなかった原因として、既存の抗癌剤の選択の問題があると考え、今後はエピゲノムの制御を含めた抗癌剤の開発をする予定である。

1. Tan SF, et al. Characterisation, in-vitro and in-vivo evaluation of valproic acid-loaded nanoemulsion for improved brain bioavailability. *J Pharm Pharmacol*. 2017
2. Shah L, et al. CNS delivery and pharmacokinetic evaluations of DALDA analgesic peptide analog administered in nano-sized oil-in-water emulsion formulation. *Pharm Res*. 2014.
3. Ganta S, et al. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Mol Membr Biol*. 2010.
4. Nagura K, Takemoto Y, Moronaga S, Uchida Y, Shimono S, Shiino A, Tanigaki K, Amano T, Yoshino F, Noda Y, Koizumi S, Komatsu N, Kato T, Yamauchi J, Tamura R. Preparation of Robust Metal-Free Magnetic Nanoemulsions Encapsulating Low-Molecular-Weight Nitroxide Radicals and Hydrophobic Drugs Directed Toward MRI-Visible Targeted Delivery. *Chemistry*. 7;23(62):15713-15720. 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shitara Satoshi, Fujiyoshi Akira, Hisamatsu Takashi, Torii Sayuki, Suzuki Sentarou, Ito Takahiro, Arima Hisatomi, Shiino Akihiko, Nozaki Kazuhiko, Miura Katsuyuki, Ueshima Hirotsugu, for the SESSA Research group	4. 巻 50
2. 論文標題 Intracranial Artery Stenosis and Its Association With Conventional Risk Factors in a General Population of Japanese Men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 2967 ~ 2969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.119.025964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 椎野 顯彦	4. 巻 71
2. 論文標題 増大特集 人工知能と神経科学 人工知能を用いた神経画像診断	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 733 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201345	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiyoshi Akira, Miura Katsuyuki, Ohkubo Takayoshi, Miyagawa Naoko, Saito Yoshino, Miyazawa Itsuko, Shiino Akihiko, Kadota Aya, Kadowaki Sayaka, Hisamatsu Takashi, Torii Sayuki, Takashima Naoyuki, Tooyama Ikuo, Ueshima Hirotsugu	4. 巻 -
2. 論文標題 Proteinuria and Reduced Estimated Glomerular Filtration Rate are Independently Associated With Lower Cognitive Abilities in Apparently Healthy Community-Dwelling Elderly Men in Japan: A Cross-sectional Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Epidemiology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2188/jea.JE20180258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisamatsu T., Miura K., Fujiyoshi A., Kunimura A., Ito T., Miyazawa I., Torii S., Shiino A., Nozaki K., Kanda H., Arima H., Ohkubo T., Ueshima H., on behalf of the Shiga Epidemiological Study of Subclinical Atherosclerosis (SESSA) Research Group	4. 巻 26
2. 論文標題 Association between excessive supraventricular ectopy and subclinical cerebrovascular disease: a population based study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.13970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Khan Md Maruf Haque, Fujiyoshi Akira, Shiino Akihiko, Hisamatsu Takashi, Torii Sayuki, Suzuki Sentaro, Kunimura Ayako, Segawa Hiroyoshi, Kadota Aya, Ohkubo Takayoshi, Nozaki Kazuhiko, Miura Katsuyuki, Ueshima Hirotsugu, for the SESSA Research Group	4. 巻 -
2. 論文標題 The Association Between Coronary Artery Calcification and Subclinical Cerebrovascular Diseases in Men: An Observational Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.51284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamagawa Toshihiro, Lundh Torbjorn, Shigetoshi Kenji, Nitta Norihisa, Ushio Noritoshi, Inubushi Toshiro, Shiino Akihiko, Karlsson Anders, Inoue Takayuki, Mera Yutaka, Hino Kodai, Komori Masaru, Morikawa Shigehiro, Sawajiri Shuji, Naka Shigeyuki, Honma Satoru, Kimura Tomoko, Uchimura Yasuhiro, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Correlation between musculoskeletal structure of the hand and primate locomotion: Morphometric and mechanical analysis in prehension using the cross- and triple-ratios	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0232397 ~ 0232397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto Yusa, Zaytseva Elena, Suzuki Katsuaki, Yoshioka Naoki, Takanishi Yoichi, Funahashi Masahiro, Uchida Yoshiaki, Akita Takuya, Park Jayeong, Sato Shuichi, Clevers Simon, Coquerel G?rard, Mazhukin Dmitrii G., Shimono Satoshi, Sugiyama Masahito, Takahashi Hiroki, Yamauchi Jun, Tamura Rui	4. 巻 24
2. 論文標題 Unique Superparamagnetic-like Behavior Observed in Non- -delocalized Nitroxide Diradical Compounds Showing Discotic Liquid Crystalline Phase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 17293 ~ 17302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201803534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagami Sho, Akita Takuya, Kiyohara Daichi, Uchida Yoshiaki, Tamura Rui, Nishiyama Norikazu	4. 巻 122
2. 論文標題 Molecular Mobility Effect on Magnetic Interactions in All-Organic Paramagnetic Liquid Crystal with Nitroxide Radical as a Hydrogen-Bonding Acceptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7409 ~ 7415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b03839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagura Kota, Takemoto Yusa, Yoshino Fumi, Bogdanov Alexey, Chumakova Natalia, Vorobiev Andrey, Imai Hirohiko, Matsuda Tetsuya, Shimono Satoshi, Kato Tatsuhisa, Komatsu Naoki, Tamura Rui	4. 巻 11
2. 論文標題 Magnetic Mixed Micelles Composed of a Non-Ionic Surfactant and Nitroxide Radicals Containing a D-Glucosamine Unit: Preparation, Stability, and Biomedical Application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 42 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics11010042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 椎野顯彦
2. 発表標題 統合失調症における脳形状の解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎野顯彦
2. 発表標題 Hippocampal sparing ADの画像の特徴とAIによる診断
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎野顯彦
2. 発表標題 シンポジウム 2「最新のイメージング:脳循環の「今」を見る」人工知能を用いた画像解析技術による AD スペクトラムの予測
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎野顯彦
2. 発表標題 Hippocampal sparing ADのAIによる画像診断
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎野顯彦
2. 発表標題 治療継続中の認知症診療の注意点・問題点:再検査はどんな場合に必要か?
3. 学会等名 第3回日本脳神経外科認知症学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Nagura, Y. Takemoto, S. Moronaga, Y. Uchida, S. Shimono, A. Shiino, K. Tanigaki, T. Amano, F. Yoshino, Y. Noda, S. Koizumi, N. Komatsu, T. Kato, J. Yamauchi, R. Tamura
2. 発表標題 Preparation of Robust Metal-Free Magnetic Nanoemulsions Encapsulating Low-Molecular-Weight Nitroxide Radicals and Hydrophobic Drugs Directed Toward MRI-Visible Targeted Delivery System.
3. 学会等名 27th International Liquid Crystal Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R. Tamura
2. 発表標題 Origin and Application of Unique Magnetic Properties of All-Organic Liquid Crystalline Compounds with a Particular Radical Structure.
3. 学会等名 3rd International Conference of Spin Physics, Spin chemistry and Spin Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Nagura, K. Sakamoto, S. Moronaga, A. Bogdanov, N. Chumakova, A. Kh. Vorobiev, H. Imai, T. Matsuda, A. Shiino, T. Amano, F. Yoshino, Y. Noda, S. Koizumi, S. Shimono, Y. Uchida, T. Kato, N. Komatsu, R. Tamura
2. 発表標題 Preparation and Characterization of MRI-Visible Nitroxide-Based Nanoemulsions Encapsulating Hydrophobic Fluorophores or Drugs.
3. 学会等名 第八回ナノカーボンバイオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R. Tamura
2. 発表標題 Unique Magnetic Properties of Organic Radical Soft Materials.
3. 学会等名 5th International Conference: Current Problems of Chemical Physics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 椎野顯彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 IDP出版	5. 総ページ数 256
3. 書名 人工知能を活用した脳MRI画像解析の理論と実践	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田村 類 (Tamura Rui) (60207256)	京都大学・人間・環境学研究科・名誉教授 (14301)	
研究分担者	谷垣 健二 (Tanigaki Kenji) (70362473)	滋賀県立総合病院(研究所)・神経病態研究部門・専門研究員 (84203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関