

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18380

研究課題名(和文) 生体模倣設計に基づいた抗がん性ナノ粒子の設計と評価

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of peptide-mimetic anti-cancer nanoparticles

研究代表者

高橋 治子 (Takahashi, Haruko)

広島大学・統合生命科学研究所(理)・助教

研究者番号：70775767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：固形がん深部に存在する休眠状態のがん細胞は、増殖性の高いがん細胞を標的とする既存薬に対して抵抗性を示すため、これらに対し有効な抗がん剤の開発が喫緊の課題となっている。本研究では、がん細胞が正常細胞に比べ負に帯電していることから、負電荷の細胞膜を破壊するhost-defense peptides (HDP)を模倣したポリマーを合成し、その機能を検討したところ、がん細胞膜特異的に膜破壊を誘導し、抗がん活性を示すことを明らかとした。さらに、この膜破壊機構は細胞の増殖状態に依存しないため、従来の抗がん薬が効かないドーマントながん細胞に対しても効果を示し、新しい抗がん剤としての利用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生体のペプチドを模倣することより、「固形がんの深部まで到達可能」で、固形がん内の「休眠状態(ドーマント)のがんにも有効」な新しい抗がん性ポリマーの設計指針を確立した。この抗がん性ポリマーは、従来の抗がん薬とは異なり、がん細胞膜にアタックする機構を利用した、ポリマーならではの機能を利用した次世代の抗がん性材料として高いポテンシャルが期待できる。これにより、これまで治療の難しかった固形がん中のドーマントながん細胞に対する、新しいアプローチ法を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：The discovery of anti-cancer agents effective against non-proliferative dormant cancer cells is a significant challenge in cancer biology and drug development fields because currently used drugs target only actively proliferating cancer cells. We have developed new anti-cancer polymers that mimic the mode of action of host-defense peptides (HDPs) with anticancer activity. These polymers are synthetic methacrylate polymers with cationic and amphiphilic properties to recapitulate the biophysical traits of the HDPs. We designed the polymer compositions and structures to target highly expressed anionic lipids exposed on the cancer cells and act by disrupting the integrity of cancer cell membranes, causing cell death. Because this mechanism is not dependent on cell proliferation, our polymers have shown potent activity against dormant cancer cells and in vitro 3D tumor models. Our new polymer design approach has paved the way for discovery of novel anti-cancer therapeutics.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：抗がん性ポリマー ドーマント がん微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん全体の 8 割以上を占める固形がんは、血液以外の様々な臓器において塊をつくりながら増殖するがんの総称であり、遺伝子的・機能的に不均一ながん細胞によって構成されている。その中には、細胞増殖をしない休眠状態(ドーマント)のがん細胞も存在し、がん組織の深部に存在している。がんは無秩序な細胞増殖に伴って組織化するが、その組織化のプロセスは不規則であり、異常な増殖能による形質転換により、薬剤耐性なども獲得しやすい。このようながん組織全体の不均一性が、抗がん薬を用いた化学療法による固形がんの治療を困難にしている。特に、固形がんの深部に存在するドーマントながん細胞は、増殖性の高いがん細胞をターゲットにする既存の抗がん薬に対して抵抗性を示し、長期間体内に潜伏後、転移を引き起こすことが知られ、これらに対して有効な抗がん剤の開発が喫緊の課題となっている。これまで、既存の抗がん薬をがん細胞に効率的に送達するナノ創薬の研究・開発が精力的に進められ、認可薬も出ているが、**①固形がんの深部まで到達すること、および②がん細胞の抗がん薬抵抗性**という課題に対する有用な解決策は、未だ得られていなかった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、**①固形がんの深部まで到達可能で、②抗がん薬に対し抵抗性をもつがん細胞にも有効な抗がん活性(メカニズム)を有する抗がん剤の開発には、どのような高分子設計が必要か?**という未解決課題に対し、新しい設計指針による抗がん性ナノ粒子の開発に取り組んだ。具体的には、Host Defense Peptide(HDP)と呼ばれるペプチドの膜活性特性に着目し、がん細胞特異的に細胞膜を破壊可能な高分子構造を模索することで、**生体内で積極的にがん細胞に作用し、抗がん活性を示す抗がん性ナノ粒子の開発とその機能評価を目的**とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、主に Host Defense Peptide(HDP)を模倣した膜活性ポリマーの合成、抗がん性ポリマーの活性メカニズムの解析および休眠状態を含むがん細胞への抗がん活性の評価、および複雑な環境での活性検討を可能にするがん微小環境モデルの開発と機能評価を行った。

まず、メタクリロイル基の可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により、生体内の HDP の物理化学的性質を模倣した、側鎖にカチオン性基と疎水性基をもつカチオン性両親媒性ランダムコポリマーを合成した。このとき、様々なカチオン性モノマーのスペーサーの数や、重合数、カチオン性・疎水性セグメントの比率を有するポリマーを系統的に合成した。合成したポリマーに対し、ヒト由来前立腺がん細胞株(PC-3, DU-145, C4-2B)およびヒト初代正常細胞(皮膚微小血管内皮細胞(HDMEC), 皮膚線維芽細胞(NHDF), 前立腺上皮細胞(HPrEC))をモデル細胞として、がん細胞に高い抗がん性を示し、正常細胞に毒性を示さないポリマー構造を明らかとした。

次に、最適化した構造を持つポリマーを用いて、ポリマー添加後の細胞膜の変化について、細胞からのタンパク質漏出実験や光学顕微鏡・走査型顕微鏡(SEM)を用いた観察により評価した。また、細胞集団から、休眠状態のがん細胞をフローサイトメーターで回収し、細胞増殖状態・休眠状態それぞれでの抗がん活性を評価した。さらに、単層で培養したがん細胞と 3 次元培養をしたがんスフェロイドに対する抗がん活性を評価した。

がん細胞と正常細胞を独立に検討するのみでは、抗がん性ナノ粒子の真の有用性を詳細に検討することは難しい。そこで、がん細胞のみならず、周辺に存在する細胞も含めたがん微小環境に対して、抗がん活性を評価するため、がんスフェロイドの周囲に間質細胞(線維芽細胞)を配した 3 次元 *in vitro* がん-間質チップ(がん微小環境モデル)を開発した。

### 4. 研究成果

#### (1) Host Defense Peptide(HDP)を模倣した膜活性ポリマーの合成

メタクリロイル基の可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により、HDP を模倣したカチオン性両親媒性ランダムコポリマー(P-1~P-5)を合成した(図 1)。ヒト前立腺がん細胞・正常細胞を用いて合成した抗がん性ポリマーの活性を検討したところ、カチオン性基を約 70%、疎水性基を約 30%含有する分子量約 2,500 のポリマー P-5 が最もがん細胞に選択性(高い抗がん活性と低い毒性)を示すことが明らかとなった(図 2)。

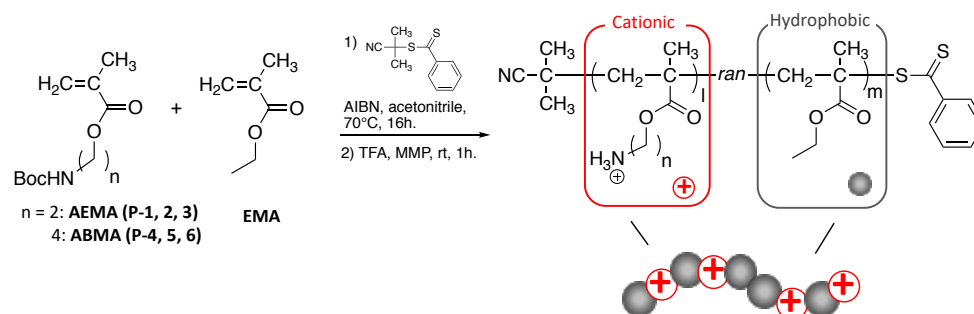


図 1. 合成した抗がん性ポリマーの構造

## (2) 活性メカニズムの解析およびがん細胞(休眠状態を含む)への抗がん活性の評価

最も高い活性を示した P-5 ポリマーを用いて、ポリマー添加後のがん細胞からのタンパク質の漏出実験、および顕微鏡観察を行ったところ、P-5 ポリマーを添加した細胞は細胞膜が破壊され、細胞内からタンパク質が漏れ出し、細胞が収縮して最終的に細胞死(ネクロシス)を起こしていることが明らかとなった。これらの結果から、負電荷の脂質ホスファチジルセリン(PS)を細胞膜の外側に露出しているがん細胞の膜に選択的に結合し、細胞膜を破壊して細胞死を誘導する本抗がん性ポリマーの活性メカニズムを明らかとした(図3)。

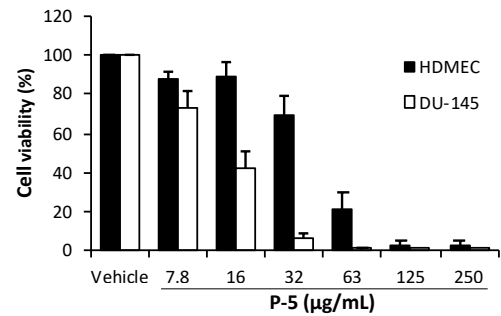


図2. P-5 ポリマーのヒト前立腺がん細胞(DU-145)およびヒト正常皮膚微小血管内皮細胞(HDMEC)に対する細胞死誘導能

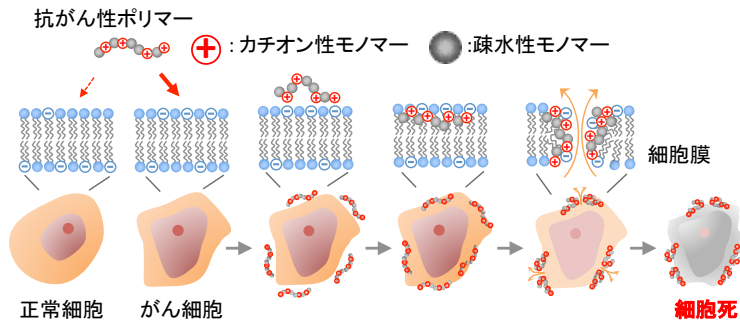


図3. 抗がん性ポリマーの活性メカニズム。カチオン性・両親媒性構造を持つポリマーは、負に帯電しているがんの細胞膜に選択的に結合する。ポリマーは、細胞膜の中に突き刺さるようにして侵入し、細胞膜の調和を乱して孔をあける。これにより細胞質が漏れ出し、最終的にがん細胞の細胞死を引き起こす。

この活性メカニズムから、従来の抗がん薬が標的としているがん細胞の活発な増殖とは無関係に、負に帯電したがん細胞膜をターゲットできると考えられたため、がん細胞集団から休眠状態のがん細胞をフローサイトメーターで回収し、細胞膜を評価したところ、増殖状態のがん細胞と同程度 PS を細胞表面に露出していることを確認した。そこで、この休眠状態のがん細胞に対する抗がん活性を検討したところ、従来の抗がん薬である(膜活性を示さない)ドセタキセルは通常(増殖時)の 50 倍量を添加しても 60%以上の細胞が生存したのに対し、P-5 ポリマーを添加した場合は通常(増殖時)と同じ添加量でほぼ 100%細胞膜が破壊され、死滅した(図4)。

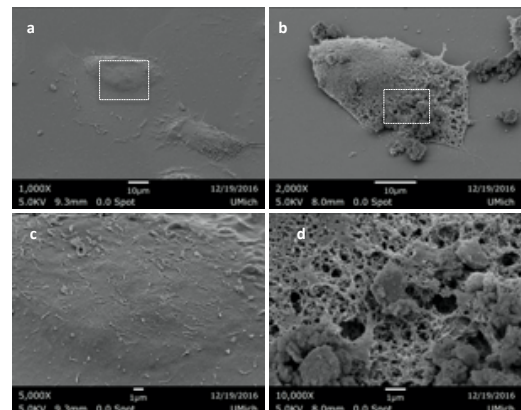


図4. 未処理(a, c)と P-5 処理後(b, d)の休眠状態のヒト前立腺がん細胞(PC-3)の走査型電子顕微鏡(SEM)像。(c), (d)はそれぞれ(a), (b)の拡大図。

また、単層(2次元)に培養した細胞に対して抗がん活性を示すのみならず、3次元的な細胞塊(スフェロイド)に対して添加した場合、細胞塊から細胞がバラバラに乖離し、塊を溶かすように活性を示し、細胞膜を破壊する機構が進むことで、固形がんの深部まで到達し、最終的に組織全体に対して効果を示す可能性が強く示唆された。以上、(1), (2)の研究成果を **2019年 Scientific Reports 誌に発表した**(図1~図4は当該論文より改定して掲載)。

## (3) がん微小環境モデルの開発と機能評価

(1), (2)までの検討で、当初予想していた、HDP の構造を模倣することにより、がん細胞膜選択的な膜破壊活性を示す抗がん性ポリマーを設計する基本指針を確立し、この抗がん性ポリマーは、従来の抗がん剤が効かない休眠状態のがん細胞に対しても抗がん活性を示し、また立体的な細胞塊を形成したがん細胞に対しても効果があることを示すことができた。今後、より実効性の高い抗がん性ポリマーの達成には、3次元的ながん組織に対し、細胞膜を破壊しながら浸透し、深部への到達が可能であるか、詳細な検討が必須である。そこで、がんスフェロイドの周囲に間質細胞を配した3次元 *in vitro* がん-間質チップ(がん微小環境モデル)を開発した。このチップは、がん細胞や周辺細胞の変化の様子を顕微鏡下でライブ観察することが可能であり、培養液中に抗がん性ポリマーを添加し、ポリマーのがん組織内へ浸潤する動態や、がん縮退への効果を時間経過に対して定性的・定量的に評価できる。さらにがん細胞塊や周辺組織の細胞を回収し、細胞の生死や遺伝子発現を定量的に測定することも可能であった。このがん微小環境をモデル化した新規抗がん剤機能評価システムについては、論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haruko Takahashi, Kenji Yumoto, Kazuma Yasuhara, Enrico T. Nadres, Yutaka Kikuchi, Russell S. Taichman, Kenichi Kuroda	4. 巻 9
2. 論文標題 Anticancer polymers designed for killing dormant prostate cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-018-36608-5">https://doi.org/10.1038/s41598-018-36608-5</a>	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruko Takahashi
2. 発表標題 Molecular engineering of antimicrobial polymers to target biofilms
3. 学会等名 ACS 257th National Meeting & Exposition（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋治子
2. 発表標題 ヒト細胞の3次元培養によるがん微小環境の構築と解析
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 3次元in vitro培養系によるがん微小環境理解のための組織構成的アプローチ
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 3次元共培養法によるがん 周辺線維芽細胞相互作用の時空間的解析
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 In vitroにおけるがんおよび周辺細胞の微小環境形成過程の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 In vitro 3次元培養によるがん関連線維芽細胞形成過程の解析
3. 学会等名 第2回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----