

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19700406
研究課題名 (和文) 転移性乳癌細胞を標的とした新規ドラッグデリバリーシステムの構築
研究課題名 (英文) Construction of Novel Drug Delivery Systems Targeted to Metastatic Breast Cancers
研究代表者
児島 千恵 (KOJIMA CHIE)
大阪府立大学・21 世紀科学研究機構 (その他部局等)・講師
研究者番号：50405346

研究成果の概要：

癌は現在死亡数のトップの疾患であり、その治療法の開発は不可欠である。そこで、研究代表者は転移性乳癌細胞を標的とした新規ドラッグデリバリーシステム材料の作製を行っている。本研究では、抗癌剤を担持したナノ粒子とコラーゲンからなるハイブリッドゲルを作製した。このゲル上に乳癌細胞を三次元培養したところ、転移性の低い乳癌細胞と比べて、転移性の高い乳癌細胞に対して高い抗癌活性が見られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物送達、ゲル、ナノ医療、高分子材料、乳癌

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の統計によると、日本の三大死因は悪性新生物 (癌)、心疾患、脳血管疾患である。特に、癌による死亡数は年々増加傾向にあり、癌治療技術の発展は急務である。その中で、女性においては乳癌の罹患率が最も高いことから乳癌に対する DDS 材料の開発が求められていた。

2. 研究の目的

乳癌の治療では、多くの場合、乳房を切除するという外科的処置を行う。しかし、女性

にとって乳房の損失は精神的に大きな苦痛を伴うため、可能な限り乳房温存に努めると共に、シリコンや生理食塩水バッグなどによる乳房の復元が行われている。また、乳癌細胞は転移性が高く、予後の悪さと関連していることが知られている。乳房温存と癌の再発は同義の関係にあるので、乳癌の治療においては手術と薬物療法の併用が効果的となる。そこで、本研究では、転移性乳癌細胞を標的とした新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) を提案する。

癌細胞は転移する際、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を分泌して細胞外基質

を分解しながら浸潤した後、基底膜を分解して血管に入り、全身へと送り出される。癌の転移に深く関与している MMP-9 はコラーゲン分解酵素として働くため、兎島はコラーゲンに薬物運搬体を埋め込んだハイブリッド材料の作製と機能評価を行った。もし転移性癌細胞が再発した場合は、その細胞が特異的に産生する MMP によって分解され、薬物運搬 dendriマーがゲルから放出される。そして、癌組織における pH の低下に反応して内包薬物を放出し、選択的に転移性癌細胞を死滅させることができる。このように、本システムでは単に薬物をゲルから徐放するのではなく、癌細胞の転移と癌組織での pH 変化に反応して、癌細胞により選択的に薬物送達を行うことができる。

本研究では、薬物運搬 dendriマーを合成し、薬物運搬 dendriマーハイブリッドゲルを作製する。そして、薬物運搬体および薬物の放出挙動を検討するとともに、転移性乳癌細胞への選択的な薬物送達について検討する。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点について研究を行った。

- (1) 薬物運搬 dendriマーの合成
- (2) コラーゲンハイブリッドゲルの作製
- (3) コラーゲンハイブリッドゲルの薬理活性評価

上記の点について、順に詳細を示す。

(1) 薬物運搬 dendriマーの合成

薬物運搬 dendriマーの合成スキームを図 1 に示す。エチレンジアミンコアのポリアミドアミン dendriマー (第 4 世代) の末端にアミノ基と側鎖を保護したグルタミン酸 (Boc-Glu(OBzl)) を縮合させ、その後トリフルオロ酢酸で Boc 基を除去した。そして、分子量 2000 のポリエチレングリコールモノメチルエーテルの片末端をニトロフェニル化したものを反応させた。次に、グルタミン酸の側鎖にヒドラジンを反応させた後、抗癌剤アドリアマイシンを結合させた。作製した化合物は NMR、UV-Vis スペクトル、HPLC によって同定した。さらに、pH の低下に伴うアドリアマイシンが解裂は生理的 pH である pH 7.4 と pH 5.5 で透析を行い、その外相に透過したアドリアマイシン量を測定することによって評価した。

(2) コラーゲンハイブリッドゲルの作製

氷冷下で I 型および IV 型コラーゲン (3mg/ml) を 1 : 1 で混合したコラーゲン溶液にアルカリ性の再構成液と 10 倍濃度の培地、さらに薬物運搬 dendriマーの溶液を加え、37°C で 1 時間インキュベーションするこ

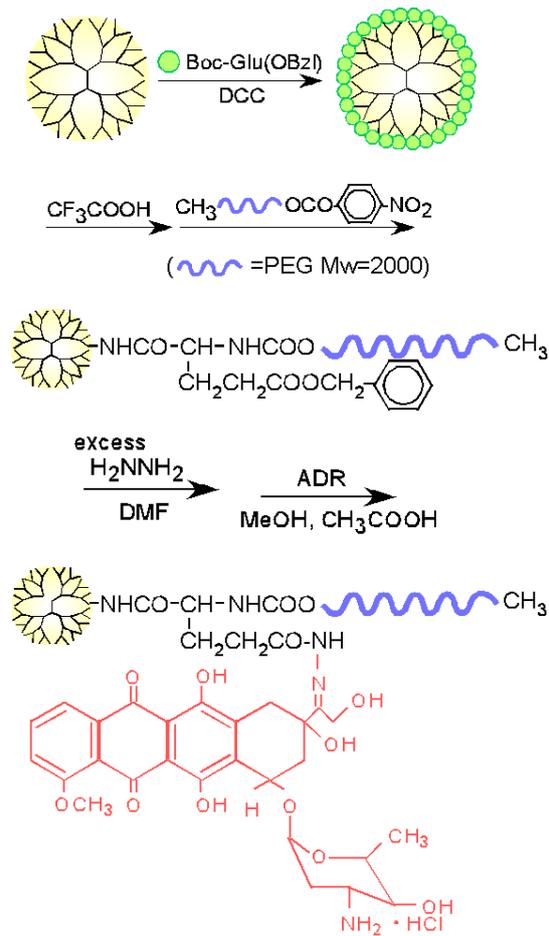


図 1、薬物運搬 dendriマーの合成

とによって、コラーゲンハイブリッドゲルを作製した。ハイブリッドゲルに取り込まれたアドリアマイシンの量は上層の水溶液の蛍光を測定することによって見積もった。比較として、アドリアマイシンを包埋したコラーゲンゲルの作製も合わせて行った。

(2) コラーゲンハイブリッドゲルの薬理活性

転移性の高い乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞と転移性の低い乳癌細胞である MCF-7 細胞を用いて、上記のハイブリッドゲルの薬理活性を比較した。コラーゲンハイブリッドゲル上にそれぞれの細胞を三次元培養し、24 時間後の細胞毒性を評価した。比較として、dendriマーに結合していないフリーの薬物を包埋したコラーゲンゲルについても同様に検討した。また、培養皿上での細胞毒性についても合わせて検討した。

4. 研究成果

¹H NMR スペクトルより、第 4 世代のポリアミドアミン dendriマーの全ての末端にグルタミン酸とポリエチレングリコールを結

合した dendrimer を合成した。その dendrimer にヒドラゾン結合を介して 33 分子のアドリアマイシンを結合できた。結合したアドリアマイシンは pH 7.4 では dendrimer と結合しているが、pH 5.5 では dendrimer から放出されることがわかった。

上記で作製した dendrimer や抗癌剤の 95% 以上を埋包したコラーゲンゲルを作製できた。このハイブリッドゲルからの抗癌剤の放出挙動について検討したところ、薬物担体と比較して薬物運搬 dendrimer の方が薬物の拡散が抑制されていることが示された。

このハイブリッドゲルの細胞毒性を調べたところ、転移能が低い MCF-7 細胞と比べて、転移能が高い MDA-MB-231 細胞の方がより高い細胞毒性を示した。フリーの薬剤を包埋したコラーゲンゲルでは、いずれの細胞でも細胞毒性を示したのに対して、薬物結合 dendrimer 包埋ゲルでは転移性癌細胞に対して選択的な細胞毒性を示した。培養皿上での細胞毒性は細胞間でほとんど変わらないことから、この細胞毒性の差異はコラーゲンゲルの分解によるものであると考えられる。

以上のことから、転移性癌細胞に対する新しい DDS 材料の開発に成功した。

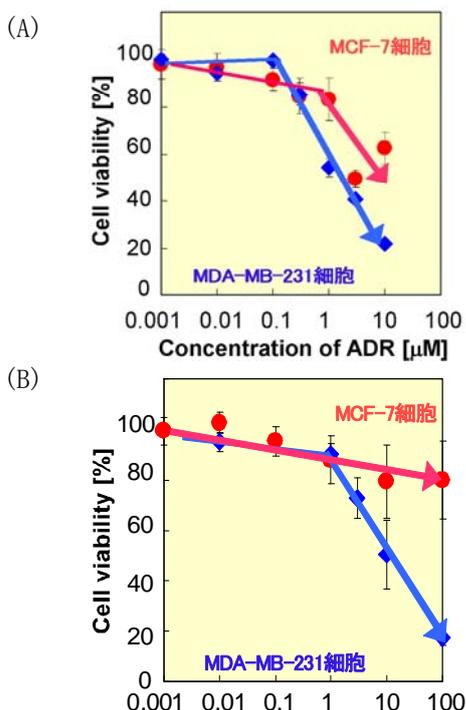


図2、コラーゲンハイブリッドゲルの薬理活性
(A) フリーのアドリアマイシン (ADR)、(B) アドリアマイシン結合 dendrimer を包埋したゲル。青が転移能が高い MDA-MB-231 細胞、赤が転移能が低い MCF-7 細胞を示している。

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 5 件)

- 1) C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, K. Kono, "A collagen-mimic dendrimer capable of controlled release", *J. Am. Chem. Soc.*, in press. (査読あり)
- 2) C. Kojima, K. Yoshimura, A. Harada, Y. Sakanishi, K. Kono, "Synthesis and Characterization of Hyperbranched Poly(glycidol) Modified with pH- and Temperature-Sensitive Groups", *Bioconjugate Chem.*, in press. (査読あり)
- 3) C. Kojima, Y. Toi, A. Harada, K. Kono, "Aqueous Solubilization of Fullerenes Using Poly(amidoamine) Dendrimers Bearing Cyclodextrin and Poly(ethylene Glycol)", *Bioconjugate Chem.*, **19**, 2280-2284 (2008). (査読あり)
- 4) K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, "Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin", *Biomaterials*, **29**, 1664-1675 (2008). (査読あり)
- 5) C. Kojima, Y. Toi, A. Harada, K. Kono, "Preparation of polyethylene glycol-attached dendrimers encapsulating photosensitizers for application to photodynamic therapy", *Bioconjugate Chem.*, **18**, 663-670 (2007). (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 児島千恵, 西阪瑛子, 末廣智幸, 原田敦史, 河野健司 「薬物結合ポリマーとコラーゲンのハイブリッドゲルによる転移性腫瘍細胞への DDS」、日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008、2008. 11. 18、東京
- 2) 津村清子, 児島千恵, 原田敦史, 河野健司 「コラーゲン dendrimer の三重ヘリックス形成性と機能評価」、日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008、2008. 11. 17、東京
- 3) 津村清子, 児島千恵, 西阪瑛子, 原田敦史, 河野健司 「コラーゲンペプチドを結合した dendrimer によるハイドロゲルの作製」、第 57 回高分子討論会、2008. 9. 26、大阪
- 4) 児島千恵, 津村清子, 原田敦史, 河野健司 「コラーゲンペプチドを結合した dendrimer によるハイドロゲルの作製」、第 57 回高分子討論会、2008. 9. 25、大阪
- 5) 西阪瑛子, 児島千恵, 原田敦史, 河野健司 「抗癌剤結合 dendrimer 埋包コラーゲンゲルの作製と転移性癌細胞の選択的細胞

毒性効果」、第 57 回高分子討論会、2008. 9. 25、大阪

6) C. Kojima, E. Nishisaka, N. Hayashi, A. Harada, K. Kono 「Preparation and cytotoxic activity of poly(ethyleneglycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin.」、4th American Academy of Nanomedicine、2008. 9. 2、ポトマック (米国)

7) 児島千恵, 津村清子, 原田敦史, 河野健司 「コラーゲンペプチドを結合した dendroliマーによるハイドロゲルの作製」、第 24 回日本 DDS 学会学術集会、2008. 6. 30、横浜

8) 西阪瑛子, 児島千恵, 原田敦史, 河野健司 「癌転移に応答する抗癌剤結合 dendroliマー埋包ゲルの作製」、第 24 回日本 DDS 学会学術集会、2008. 6. 30、横浜

9) C. Kojima, Y. Umeda, N. Nakamura, T. Mukaiyama, H. Horinaka, K. Kono 「Preparation of gold nanoparticles grown in biocompatible dendrimer」、8th World Biomaterials Congress 2008、2008. 6. 1、アムステルダム (オランダ)

10) 津村清子, 児島千恵, 原田敦史, 河野健司 「様々な世代数のコラーゲンペプチド結合 dendroliマーを用いたハイドロゲルの作製」、第 57 回高分子学会年次大会、2008. 5. 28、横浜 (招待講演)

11) 児島千恵 「ドラッグデリバリーのための機能性 dendroliマーの作製」、第 57 回高分子学会年次大会、2008. 5. 27、横浜 (招待講演)

12) C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, K. Kono 「Synthesis and Characterization of Collagenous Dendrimers」、The 10th Pacific Polymer Conference、2007. 12. 5、神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: コラーゲン医薬品組成物及びその製造方法

発明者: 児島千恵他

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-061573

出願年月日: 平成 21 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

http://www.nanosq.21c.osakafu-u.ac.jp/ttsl/c_kojima.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児島 千恵 (KOJIMA CHIE)
大阪府立大学・21 世紀科学研究機構 (その他部局等)・講師
研究者番号: 50405346

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書