

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号： 12601  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2009～2011  
 課題番号： 21591864  
 研究課題名（和文）高分子ナノミセルによる悪性脳腫瘍への選択的・効率的なドラッグデリバリーの開発  
 研究課題名（英文）Development of selective and efficient drug delivery system for malignant brain tumors using polymeric nanomicelles.  
 研究代表者  
 稲生 靖（INO YASUSHI）  
 東京大学・医科学研究所・准教授  
 研究者番号： 50372371

## 研究成果の概要（和文）：

ブロックポリマーの組成や分子長などを精密に設計した高分子ナノミセルを薬剤のキャリアとして使用し、コアに抗癌剤を封入して悪性脳腫瘍の治療に使用する際の効果を増強する方法の開発を行った。血管透過性を修飾する薬剤の併用やリガンド分子のミセル外層への搭載など、脳腫瘍治療においても効果の期待できる方法の検討を行った。また、ミセル化薬剤の腫瘍内到達を体外から計測する方法についても検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

We performed a basic research on the method to enhance the efficacy of polymeric nanomicelles as a drug delivery system. The polymeric nanomicelles consist of block polymers which were meticulously designed to achieve highly selective accumulation to solid tumors. The effect of co-administration of chemicals which modify permeability of tumor vasculatures, or the effect of loading tumor cell specific ligands to outer layer of the micelles were studied. A new technology for detecting in vivo distribution of the micelle was also tested.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学、ドラッグデリバリーシステム

## 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の予後は近年の画像診断・手術技術などの進歩にもかかわらずほとんど改善していない。特に膠芽腫(glioblastoma)の5年生存率は依然数%程度に過ぎず、膵臓癌などと並び最も予後不良な疾患の一つである。脳の機能温存のため浸潤部を含めた広範囲切除は一般に不可能であり、放射線照射も腫

瘍再発抑制および生存期間延長は認められるものの、効果持続期間は月単位で治癒は期待できない。化学療法剤の中では、最近導入された **Temozolomide** が有効なアルキル化剤として期待されているが、感受性のない症例や投与後の再発も依然多く、新規化学療法の開発に向けてのアプローチが期待を持って続けられている。

高分子ミセル製剤は抗癌剤のドラッグ・デリバリー・システムとして有用なキャリアである。親水性のポリエチレングリコール(PEG)とポリアスパラギン酸(および他のアミノ酸)からなるブロック共重合体を、重合分子数を一定に保つべく精密に合成する。これに cisplatin や dach platin (Dichloro (1,2-diamino cyclohexane) platinum(II))などの疎水性の抗癌剤を結合させると、水中で安定なミセル粒子を形成する。この高分子ミセルは、外側が水和した PEG であり、内側が薬剤を保持した疎水性の連鎖の核(コア)となっている。コアにある薬剤はブロック共重合体と結合した状態では非活性である。血管内に投与された高分子ミセルは長時間にわたり循環血液中にとどまりつつ、透過性の亢進している新生腫瘍血管を経てミセル化製剤は腫瘍部に集積する。その後、イオン勾配、細胞内 pH、光照射など種々の物理要因を刺激としてユニットポリマーに解離し、コアの薬物を活性型として放出する。ユニットポリマーは腎より排泄され、体内に蓄積する危険はない。脳腫瘍に対してもマウスモデルにおいては腫瘍内集積や有効性が他のミセル化抗癌剤で報告されており、効果が有望視されている。

研究分担者らは高分子ミセル化抗癌剤が有効性を高めつつ毒性を軽減することを複数の薬剤および疾患モデルにおいて明らかにし、臨床試験にまで進んでいる化合物もある。薬剤放出を腫瘍特異的にするための分子スイッチとして超音波・光・pH などの物理的刺激の利用や、RGD 配列の導入をはじめ化学的修飾などの独創的なアプローチで先駆的手段を開発している。

## 2. 研究の目的

これらの知見をもとに発展させ、脳腫瘍モデルにおいて高分子ミセル化製剤からコア薬剤を特異的かつ有効に放出する機構を開発し、その検証を行うことを研究の主目的とした。抗腫瘍効果の増強と毒性の軽減から、安全域の広いドラッグ・デリバリー・システムの開発を目指す。具体的には、研究連携者らが開発した、細胞内の pH に反応してコアの薬剤を放出する機構を応用し、pH 反応性ミセルによる脳腫瘍の治療法の開発を第一の目的とした。

また、従来型の Cl<sup>-</sup>イオン濃度勾配反応型のミセルにおいても、ブロックポリマーの設計を改良し粒子径を 40nm 程度にすることで網内系への非特異的取り込みが低下し、毒性が軽減することが判明している。従来型のものでは毒性の残存が大きかった DachPlatin ミセルについて、改良型のものを使用して安全性および有効性の評価を行う。粒子径が小さくなったことは脳血液関門の通過に関しては有利となり、脳腫瘍の治療には好都合で

ある。改良型 DachPlatin ミセルの評価を第二の目的とした。

一方、これらのブロック共重合体は遺伝子導入の手段としても利用できることが研究分担者らにより示されている(N. Nishiyama et al. A novel gene carrier enveloped with dendrimer-based photosensitizer for photochemical transfection in vivo. Nature Mater. 4(12): 934-941, 2005)。研究代表者らは増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型(HSV-1)を用いた oncolytic virus therapy の開発研究に携わっているが、ウイルスの投与経路は腫瘍内局所への直接投与が主な経路とされてきた。静脈内からの全身投与が可能となれば臨床応用の場での可能性が格段に広がると考えられるが、血管内皮をはじめ諸臓器への非特異的吸着や血中の中和抗体による活性の低下が問題と考えられている。ウイルス粒子をミセル内に封入することでウイルス感染を EPR 効果依存的にしたり、さらに RGD 導入高分子化により腫瘍特異的な感染を誘導する可能性についても検討する。Oncolytic virus の血管内投与における高分子ポリマーの応用の開発を第三の研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【平成 21 年度】

研究分担者のもとでミセル製剤の合成・調整を行う。粒子径の評価などの後にミセル製剤は研究代表者に供給される。研究代表者は供給されたミセル製剤の毒性、腫瘍組織内分布、および治療効果の評価を行う。また、評価の結果を研究分担者らに還元し、ミセル製剤の新たな開発の材料とする。

【pH 反応型高分子ミセル化学療法剤の調整】pH の変化に反応して解離しコアの薬剤を放出する高分子ミセルの合成方法に関しては、研究分担者らの研究により確立されている。ミセル化された状態では薬剤不活性であり、毒性を著しく軽減できるため、全身毒性や難溶性のために実用化が困難であった薬剤の使用も可能となる。コアの薬剤としては、化合物として安定であり、蛍光顕微鏡での検出が容易で、臨床でも広く使われている adriamycin をまず使用する。また、研究代表者らが開発を進めている dachplatin ミセルに関しては、血管内停留中の薬剤自然放出による考えられる毒性が残存していた。外層の高分子の設計を変更し、ミセル径を 40nm 程度に縮小することで肝への非特異的取り込みが軽減することに成功し、この新型 dachplatin ミセルの供給を受け評価を行う。ミセルの粒子系や薬剤含有濃度などの評価を行った後、まず培養細胞上で次にマウスに移植した腫瘍内での効果を評価する。

【in vitro および in vivo の治療効果の評価】

マウス脳内に移植可能であることが知られている U87MG、U251MG(以上ヒト神経腫瘍)、SR-B.10 A、Neuro2a、N18(以上マウス神経腫瘍および神経芽腫)などを用いて、それぞれの薬剤に対する感受性/毒性試験を行い、研究に使用する腫瘍モデルを選択する。また、蛍光顕微鏡や細胞のホモジネートの薬物濃度測定などの方法により、実際に細胞内に取り込まれているミセルの量の経時的変化を評価する。使用する系統のマウスについて経尾静脈投与による急性毒性試験を行い、治療実験に使用する薬剤量を決定する。希釈系列の薬剤を投与後、生存期間および体重の変化を指標として最大耐用量を決定する。

〔脳内腫瘍における抗腫瘍効果〕

脳内腫瘍は、腫瘍細胞を定位的にマウスの脳内に注入して作製する。使用するマウスモデルでの生存期間を把握した後に治療スケジュールを決める。腫瘍移植後 5 日目から、隔日 4 回の経尾静脈投与、を通常の治療とする。薬剤投与量は皮下腫瘍の治療実験での結果から決定し、生存日数を指標として効果を比較する。腫瘍および各臓器を摘出し、組織学的評価も行う、脳血液関門を通過しての高分子ミセル製剤の腫瘍内濃度の評価に関連し、TGF beta 阻害剤の併用効果の判定も行う。TGF beta 阻害剤は、血管内皮の透過性を修飾することで、ミセル化製剤の腫瘍内集積を増強することが報告されている (Kano M et al. Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104(9): 3460-3465 (2007))。遊離薬剤投与に比較して優れているかの傍証とするため、腫瘍組織内の薬剤の定量も行う。マウスを屠殺し、脳内腫瘍および血液を採取することによって組織含有量の測定が可能で、その他の製剤に関しても ADR 自身の蛍光や、ミセル外核の合成の際に導入した緑色蛍光から評価する。

【平成 22 年度以降】

〔ミセル化抗癌剤の評価〕

平成 22 年度も上記ミセルの評価を継続する。平成 22 年度以降は動物モデルでの評価を中心とする。

〔ミセルを用いた遺伝子導入〕

DDS としてのミセルを用いた治療法として、遺伝子導入の手段としての使用も研究されている。平成 22 年度以降は脳腫瘍への遺伝子導入の手段としてのミセル使用の可能性につき検討を行う。プラスミド DNA 分子も白金製剤と同様に、親水性のポリエチレングリコール(PEG)とポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体とで水中で安定な高分子ミセルを形成する。ミセル粒子の大きさ

はやや大きく 80nm 程度となるが、循環血液内でも長時間安定である。培養細胞上での遺伝子導入効率は少なくともリポフェクション法と同程度であり、血清の存在下でも安定であるという他の導入方法と異なる大きな特徴がある。西山らがミセル化プラスミドの調製を行い、稲生らが遺伝子導入効率を評価する。

〔in vivo での遺伝子導入効率〕

高分子ミセル/プラスミド DNA の遺伝子導入はまず、293 細胞の単層培養上で Luciferase をレポーター遺伝子として検討され、ポリマー/DNA の分子数の比など遺伝子導入に関する因子もいくつか判明している (N. Nishiyama et al. A novel gene carrier enveloped with dendrimer-based photosensitizer for photochemical transfection in vivo. Nature Mater. 4(12): 934-941, 2005)。同様のシステムを用い、血管内投与での遺伝子導入効率を評価する。皮下腫瘍および脳内移植での検討を行う。腫瘍の作製後、経尾静脈的にミセル化プラスミドを投与する。腫瘍および各臓器のルシフェラーゼアッセイにて遺伝子発現を調べる。

〔ミセルによるウイルス DNA 導入〕

プラスミド DNA の導入効果が確認された場合には、ウイルス DNA の導入効率についても検討する。Oncolytic HSV-1 は DNA の状態で腫瘍内に投与されても条件複製型 HSV-1 として抗腫瘍効果を発揮できると予想される。LacZ、GFP、およびルシフェラーゼをマーカーとして持つ HSV-1 のウイルス DNA をコアとするミセルを作製しウイルス DNA 単独を対照として導入効率および腫瘍内での分布を調査する。

#### 4. 研究成果

【平成 21 年度】

高分子ミセル製剤が実際に脳腫瘍治療にとって実用的かを検証するため、マウス脳腫瘍モデルを用いて本研究を行った。

pH 反応型高分子ミセル化学療法剤の調製:平成 21 年度は pH の変化に反応して解離しコアの薬剤を放出する高分子ミセルの合成を分担研究者の片岡らが担当した。本ミセルをアドリアマイシンに応用した薬剤は毒性が著しく軽減していることが、複数のマウスモデルで確認されている。Dach platin ミセルに関しても、毒性軽減の解決方法としての、内核と薬剤の間の化学結合を変化させることによる、腫瘍細胞内の物理的環境(低 pH)などに反応して解離するミセルを設計や、粒子径をより小さく管理することの効果を引き続き検討した。

脳内腫瘍における抗腫瘍効果:本年度は、は U87MG(ヒト神経腫瘍)、SR-B.10

A (マウス神経腫)や LL2 (肺癌)、C26 (大腸癌) 細胞をマウス脳内に接種し、腫瘍の脳組織内への浸潤の程度や腫瘍血管構築について検討を行い、モデルとして U87MG および SR-B.10 A が実際にヒト悪性神経腫に類似していることを確認した。

【平成 22 年度】

DACH-platin 内包高分子ミセル化学療法剤の調製：分担研究者の片岡らの持つミセル粒子径を自在に変化させる技術を用い、粒子径 30nm と 70nm の DACH-platin ミセルの合成を担当した。今までの研究成果から、皮下腫瘍等において 30nm ミセルは腫瘍血管構築に影響されずに集積するものの、腫瘍内での滞留も短い傾向にある。一方、70nm ミセルは血管構築を修飾する薬剤を併用することで毒性を低く維持しつつ腫瘍内への集積が有意に増加し、併用薬剤の効果の消失とともに腫瘍内に薬剤を滞留させることに関与することが示唆されている。本年度は、実際の脳内腫瘍モデルを用いて、皮下腫瘍と同様の手段で抗腫瘍効果の増強が得られるかを、主に SR-B.10 A (マウス神経腫)脳内移植マウスモデルを用いて検証した

【平成 23 年度】

研究分担者の片岡のもとでミセル製剤の合成・調整を行ない、粒子径の評価などの後に供給されたミセル製剤を研究代表者の稲生のところで実験に使用した。本年度は、ミセル製剤の毒性 (体重の変化と生化学データおよび病理学的検討) と、腫瘍組織内分布の評価を行った。

〔改良型 Dachplatin ミセル化学療法剤の調整〕本年度は改良型 Dachplatin ミセルの評価と、血管透過性薬剤併用による腫瘍内薬剤分布の検討を引き続き行った。Dachplatin ミセルは、血管内停留中の薬剤自然放出による考えられる毒性が残存していたが、外層の高分子の設計を変更し、ミセル径を 40nm 程度に縮小することで肝への非特異的取り込みが軽減すると考えられ、この改良型 dachplatin ミセルの供給を受け、組織内分布を Pt 原子に注目することで測定した。一方、ミセル径 70nm とやや大きいミセルに関しては、TGF- $\beta$  阻害剤やその他の kinase 阻害剤との併用することによって、ミセルの腫瘍内滞留性が改善するかを検討した。TGF- $\beta$  阻害剤やその他の kinase 阻害剤の一過性使用により、血管透過性が一時的に増加し、高分子薬剤の腫瘍内到達が増加することが示されたものの、間質の影響を受けやすい皮下腫瘍モデルでは少しではあるが併用の効果が表れやすかったのに対し、脳内腫瘍モデルでは、皮下腫瘍の結果から予想されていたほどの効果は得られず、腫瘍経辺縁部での薬剤集積

増加にとどまった。in vivo の治療効果に関しては、分担研究者片岡らの協力を得て、in vivo imaging の手法を用いて薬剤の集積の定性的評価を行った。これらの腫瘍内集積の改善はしかし、脳腫瘍の治療効果の改善に直結する in vivo 実験結果には至らなかった。この点については今度さらなる研究が必要であることが示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- ① Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T. Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma. *Cancer*. 査読有、巻なし、2011、電子版、DOI : 10.1002/cncr.27372
- ② Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem*. 査読有、Vol.286, No.48, 2011, pp.41434-41441, DOI : 10.1074/jbc.M111.300863
- ③ 藤堂具紀、稲生靖、悪性脳腫瘍の遺伝子治療、*BIO Clinica*、査読無、26 巻、4 号、2011、pp.33-37
- ④ Muraguchi T, Tanaka S, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tado koro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A. NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells by induction of oligodendroglial differentiation. *Cancer Res*. 査読有、Vol.71, No.3, 2011, pp.1135-1145, DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-10-2304
- ⑤ Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、Vol.108, No.30, 2011, pp.12384-12389, DOI : 10.1073/pnas.0906930108
- ⑥ 稲生靖、藤堂具紀、悪性神経腫に対するヘルペスウイルス療法、*Clinical Neuroscience*、査読無、29 巻、2 号、2011、pp.229-231
- ⑦ 稲生靖、藤堂具紀、悪性脳腫瘍のウイルス療法、*Biotherapy*、査読無、24 巻、6 号、2010、pp.443-447
- ⑧ Ino Y, Todo T. Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47 $\Delta$ ) for malignant glioma. *Gene Therapy and Regulation*. 査読有、Vol.5, No.1, 2010, pp.101-111
- ⑨ 稲生靖、藤堂具紀、悪性脳腫瘍に対するウ

ウイルス療法、日本臨床(増刊号 新時代の脳腫瘍学—診断・治療の最前線)、査読無、68巻、2010、pp.473-477

- ⑩稲生靖、藤堂具紀、悪性脳腫瘍に対するウイルス療法、感染・炎症・免疫、査読無、40巻、1号、2010、pp.81-83
- ⑪Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF- $\beta$  signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. Cell Stem Cell. 査読有、Vol.5、No.5、2009、pp.504-514、DOI : 10.1016/j.stem.2009.08.018.
- ⑫稲生靖、藤堂具紀、悪性脳腫瘍に対するウイルス療法、BRAIN and NERVE、査読有、61巻、7号、2009、pp.442-446
- ⑬Koga T, Morita A, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Shibahara J, Louis DN, Reifemberger G, Itami J, Hara R, Saito N, Todo T. Long-term control of disseminated pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features by means of stereotactic irradiation. Neuro-Oncolog. 査読有、Vol.11、No.2、2009、pp.446-451、DOI : 10.1215/15228517-2008-112.

[学会発表] (計4件)

- ①藤堂具紀、稲生靖、悪性グリオーマのウイルス療法、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋
- ②藤堂具紀、稲生靖、A clinical study of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47 $\Delta$ ) in patients with recurrent glioblastoma、第17回日本遺伝子治療学会、2011年7月15-17日、福岡
- ③Todo T, Ino Y. Oncolytic HSV-1 (G47 $\Delta$ ) efficiently kills glioblastoma-derived cancer stem-like cells The 18<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy、2010年5月17-20日、Travemuende, Germany.
- ④藤堂具紀、稲生靖、脳腫瘍に対するウイルス療法開発に見る我が国のトランスレーショナルリサーチ、第10回日本分子脳神経外科学会、2009年9月19日、岡山

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

稲生 靖 (INO YASUSHI)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：50372371

### (2)研究分担者

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

### (3)連携研究者

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  
藤堂 具紀 (TODO TOMOKI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80272566