

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19937

研究課題名（和文）腫瘍微小環境応答型抗がん剤の「in situ精密合成」

研究課題名（英文）In situ precision synthesis of tumor microenvironmentally responsive anticancer drug

研究代表者

王 秀鵬（Wang, Xiupeng）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70598789

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍微小環境応答型抗がん剤のin situ精密合成に挑戦した。腫瘍微小環境応答により局所的に銅イオンを供給できる薬物前駆体（銅担持メソポーラスシリカナノ粒子）を考案した。この結果、断酒薬ジスルフィラムの経口投与と銅担持メソポーラスシリカナノ粒子の腫瘍内投与または静脈投与を組み合わせ、動物実験で腫瘍サイズの制御による延命効果を確認した。また、断酒薬ジスルフィラム-銅担持メソポーラスシリカ粒子の腫瘍内投与と免疫チェックポイント阻害剤の腹腔内投与の併用は、単独より高い抗腫瘍効果を示し、相乗的な抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤治療は全身のがん細胞に効果を発揮する標準的治療法であるが、副作用等の課題が残されている。本研究では、断酒薬ジスルフィラムと銅担持メソポーラスシリカナノ粒子の組み合わせで、非毒性の断酒薬ジスルフィラムの代謝産物が銅イオンをキレート化することにより、殺腫瘍薬の生成を確認し、動物実験で腫瘍サイズの制御による延命効果を確認した。抗がん剤をin situ合成することにより、治療効果の向上や副作用の軽減が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We proposed a system for the in situ synthesis of chemotherapy drugs by converting nontoxic substances into antitumor chemotherapy drugs in a specific tumor microenvironment. For that purpose, we fabricated copper-loaded mesoporous silica nanoparticles as exogenous copper supply systems. Oral disulfiram administration in combination with intratumoral or intravenous copper-loaded mesoporous silica administration caused an obvious anti-tumor effect in vivo. In addition, the combination of intratumoral disulfiram-copper-loaded mesoporous silica administration and intraperitoneal immune checkpoint inhibitor administration showed higher antitumor effect than either drug alone, demonstrating a synergistic antitumor effect.

研究分野：人間医工学およびその関連分野

キーワード：がん治療 ナノ粒子 多孔質材料

### 1. 研究開始当初の背景

近年の著しい医学の進歩にもかかわらず、がんは依然として現代人の死亡原因の第1位である。抗がん剤治療は全身のがん細胞に効果を発揮する標準的治療法であるが、正常な細胞にも影響を与えるため、副作用等の課題が残されている。

40年前、すべての抗がん治療を打ち切られた骨髄転移がん患者に対し、飲酒欲求を抑える断酒薬ジスルフィラムのみが継続された。驚くべきことに、数年後この患者の腫瘍はほぼ消失していた。最近になって、断酒薬ジスルフィラムの抗がんメカニズムとして、非毒性のジスルフィラムの代謝産物が銅イオンをキレート化することで毒性複合体（抗がん性薬物）を形成する現象（in situ 非毒性→毒性遷移）が解明された(Skrott, et al. Nature 2017)。しかし、この非毒性→毒性遷移に必要な銅イオンを腫瘍特異的に送達する技術がないため、ジスルフィラム単独投与でのがん治療効果は十分ではない。

### 2. 研究の目的

銅イオンを腫瘍組織にのみ送達することができれば、投与されたジスルフィラムの代謝産物と銅イオンのキレート化（in situ 非毒性→毒性遷移）により、抗がん剤の腫瘍微小環境内での「in situ 精密合成」を実現できると着想した。本研究では、腫瘍特異的に銅イオンを送達するためのナノ粒子（薬物前駆体）を創製し、ジスルフィラムとの併用における抗腫瘍効果を、in vitro 及び in vivo 実験で実証することを目的とする。また、必要とされる腫瘍微小環境内において抗がん剤を in situ 合成するので、抗がん剤の治療効果と副作用の軽減を改善できると期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非毒性薬物前駆体の合成と評価

腫瘍特異的な微小環境応答により局所的に銅イオンを供給できる薬物前駆体（銅担持メソポーラスシリカナノ粒子、MS-Cu）はトリエタノールアミン、p-トルエンスルホン酸セチルトリメチルアンモニウム、テトラエトキシシラン、硝酸銅を使用して合成した。ジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子（PEG-MS-Cu）は銅担持メソポーラスシリカナノ粒子、ジスルフィド結合したポリエチレングリコールを使用して合成した。断酒薬ジスルフィラム/銅担持メソポーラスシリカ（DSF/MS-Cu）は銅担持メソポーラスシリカナノ粒子、ジスルフィラムを使用して合成した。合成された薬物前駆体の物理化学的性質を x 線回折装置、透過電子顕微鏡などで評価した。

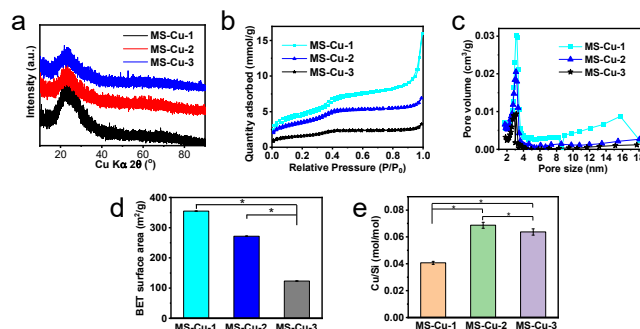
#### (2) In vitro での評価

前項の研究で選定される薬物前駆体と断酒薬ジスルフィラムを種々の濃度で頭頸部がん（MOC 1 と MOC2）細胞、ルイス肺癌（LLC）細胞の培養系に添加した。細胞数を定量することで、これらの細胞に対する毒性/非毒性を評価した。

#### (3) In vivo での治療効果評価と安全性評価

がん細胞をマウスの背部皮下に注入し、担がんモデルマウスを作製した。薬物前駆体を静脈内投与或は腫瘍内投与、断酒薬ジスルフィラムを経口投与或は腫瘍内投与した後、腫瘍の進展抑制などを指標として、治療効果を評した。病理組織学的検査により、正常組織に対する影響を評価した。

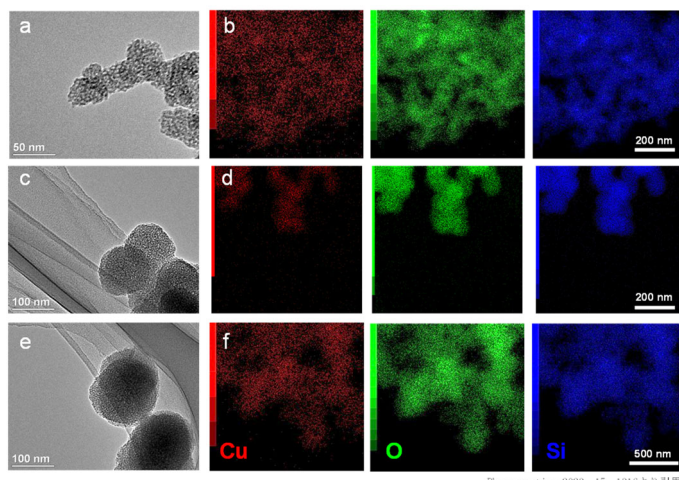
### 4. 研究成果



Pharmaceutics 2023, 15, 1316より引用

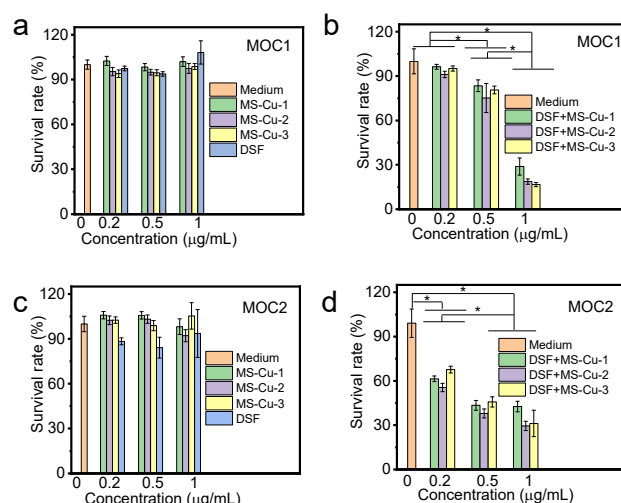
Fig. 1 Physicochemical characterization of MS-Cu nanospheres with different particle size. XRD patterns (a), N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms (b), pore size distributions (c), BET surface areas (d), and Cu/Si mol ratio (e) of MS-Cu-1, MS-Cu-2, and MS-Cu-3 nanospheres.

本研究では、薬物前駆体として、組成・サイズ等を制御した銅担持メソポーラスシリカナノ粒子などの合成を行った。合成した銅担持メソポーラスシリカナノ粒子の直径は、30~40 nm、60~80 nm、100~150 nmと確認した(図1)。合成した銅担持メソポーラスシリカナノ粒子のCu/Siモル比は0.041~0.069、比表面積は123~355 m<sup>2</sup>/gと確認した(図1)。TEM-EDS 高分解能マッピングにより、銅はメソポーラスシリカの中に均一分布していることを確認した(図2)。



Pharmaceutics 2023, 15, 1316より引用

Fig. 2 TEM (a, c, e) and STEM-EDX (b, d, f) images of MS-Cu nanospheres with different particle size. MS-Cu-1 (a, b), MS-Cu-2 (c, d), MS-Cu-3 (e, f).

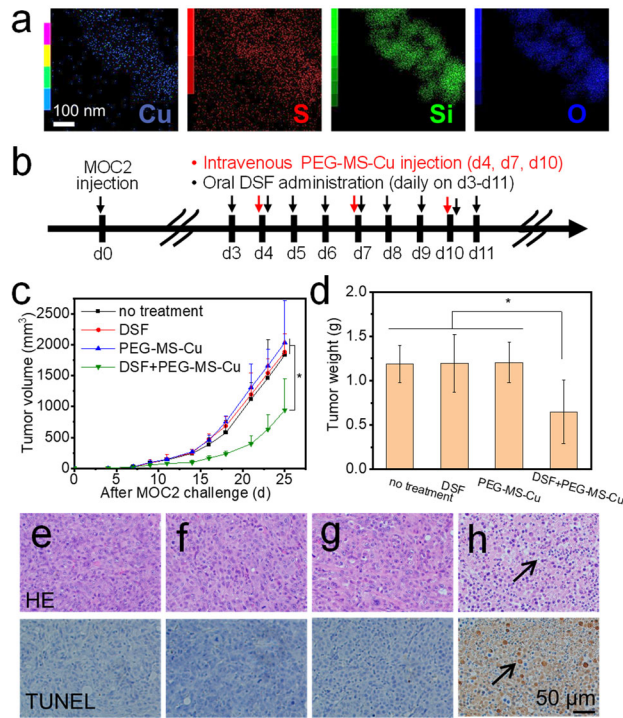


Pharmaceutics 2023, 15, 1316より引用

Fig. 3 Cytotoxicity of only MS-Cu nanospheres (a, c), only DSF (a, c), and combination of MS-Cu nanospheres and DSF (b, d) against MOC1 (a, b) and MOC2 (c, d) cells in vitro.

銅担持メソポーラスシリカナノ粒子(薬物前駆体)と断酒薬ジスルフィラムを種々の濃度で頭頸部がん細胞(MOC1とMOC2)の培養系に添加した。24時間培養した後、がん細胞の生存率をCell Counting Kit-8により測定した。その結果、1 μg/mL以下の微量の銅担持メソポーラスシリカナノ粒子(薬物前駆体)と断酒薬ジスルフィラムの併用で、頭頸部がん細胞MOC1とMOC2に対する顕著な増殖抑制効果を確認できた。一方、同じ濃度の銅担持メソポーラスシリカナノ粒子(薬物前駆体)あるいは断酒薬ジスルフィラムの単独添加では、細胞毒性はほとんど見られなかった(図3)。

In vitroの結果に基づき選定された組成・サイズを制御した薬物前駆体候補材料(銅担持メソポーラスシリカナノ粒子)の体内評価を行った。TEM-EDS 高分解能マッピングにより、銅、PEG、MSはジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子の中に均一分布していることを確認した(図4a)。



Pharmaceutics 2023, 15, 1316より引用

Fig. 4 Combination of oral administration of DSF and intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres inhibited MOC2 cell growth in vivo. STEM-EDX images of PEG-MS-Cu nanospheres (a). In vivo antitumor efficacy of combined oral administration of DSF and intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres. Experimental protocol (b), tumor volume (c), and tumor weight at the endpoint (d). HE and TUNEL staining of tumor with no treatment (e), after only oral administration of DSF (f), only intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres (g), and combined oral administration of DSF and intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres (h)

さらに、がん細胞 (MOC2) 移植モデルで抗腫瘍効果を評価した。その結果、ジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子 (PEG-MS-Cu) を単独で投与したマウスと、禁酒薬ジスルフィラムを単独で投与したマウスは急速な腫瘍増殖を示し、25 日目の腫瘍体積は  $1800\text{mm}^3$  を超え、重量は  $1.1\text{g}$  を超えた。断酒薬ジスルフィラムの経口投与とジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子 (PEG-MS-Cu) の静脈投与を組み合わせたところ、腫瘍の増殖が大幅に遅くなり、25 日目の腫瘍体積は  $1000\text{mm}^3$  未満、重量は  $0.7\text{g}$  未満だった。断酒薬ジスルフィラムの経口投与とジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子 (PEG-MS-Cu) の静脈投与を組み合わせたところ、腫瘍細胞核の縮小と断片化を伴うアポトーシスも確認した (図 4)。このように、断酒薬ジスルフィラムの経口投与とジスルフィド結合したポリエチレングリコール-銅担持メソポーラスシリカナノ粒子 (PEG-MS-Cu) の静脈投与の組み合わせは、腫瘍細胞の増殖抑制効果と、腫瘍サイズの制御による延命効果がある事を確認した。病理組織学的検査により、正常組織に対する影響は確認されなかった (図 5)。また、断酒薬ジスルフィラムの経口投与と銅担持メソポーラスシリカナノ粒子の腫瘍内投与の組み合わせで腫瘍サイズの制御による延命効果がある事も確認した (図 6)。

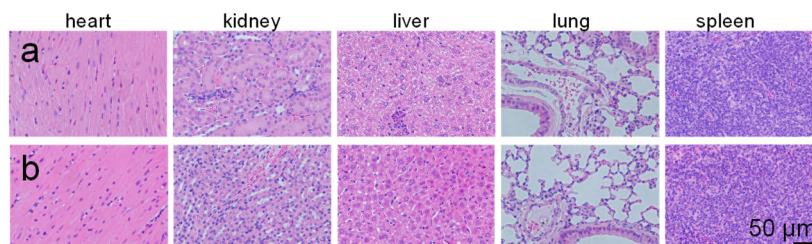


Fig. 5 Combination of oral administration of DSF and intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres showed no obvious toxicity to normal tissues in vivo. Histological sections of heart, kidney, liver, lung, and spleen of mice without any treatment (a), and with combined oral administration of DSF and intravenous administration of PEG-MS-Cu nanospheres (b).

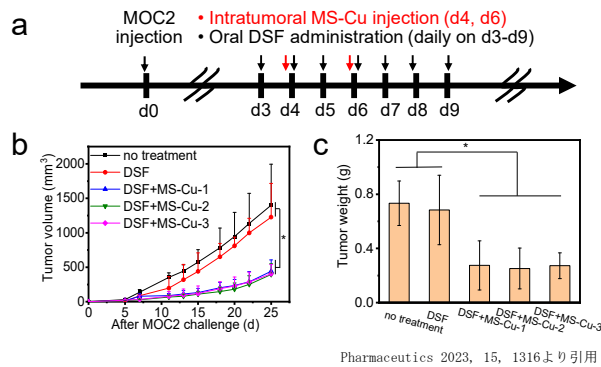


Fig. 6 In vivo antitumor efficacy of combined oral administration of DSF and intratumoral administration of MS-Cu nanospheres. Experimental protocol (a), tumor volume (b), and tumor weight at the endpoint (c)

さらに、薬物前駆体候補材料（銅担持メソポーラスシリカナノ粒子、MS-Cu）ナノ粒子は、細胞内活性酸素種（ROS）生成、細胞内酸素生成、および細胞内グルタチオン（GSH）枯渇の増加により、腫瘍微小環境を制御できると示した（図7）。断酒薬ジスルフィラム/銅担持メソポーラスシリカ（DSF/MS-Cu）と免疫チェックポイント阻害薬（抗CTLA-4抗体）の組み合わせは腫瘍増殖をさらに阻害し、銅担持メソポーラスシリカナノ粒子と免疫チェックポイント阻害剤の相乗効果がある事を示した（図8）。

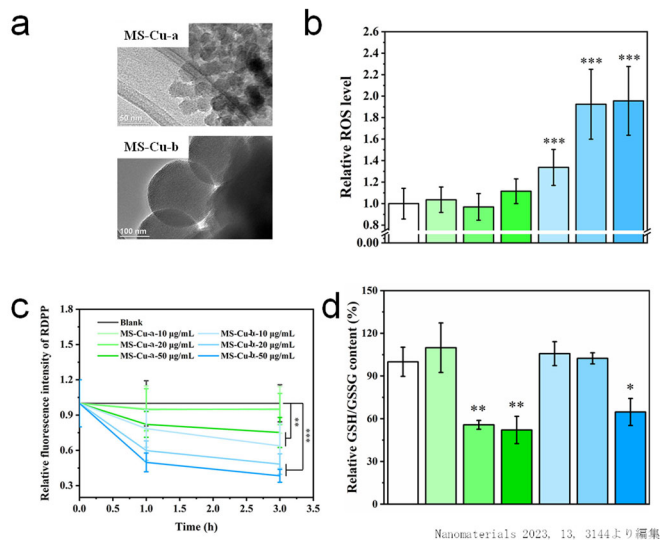


Fig. 7 TEM images (a), intracellular ROS generation (b), intracellular oxygenation (c) and intracellular relative GSH/GSSG content (d) in LLC cells incubated with MS-Cu-a and MS-Cu-b nanospheres.

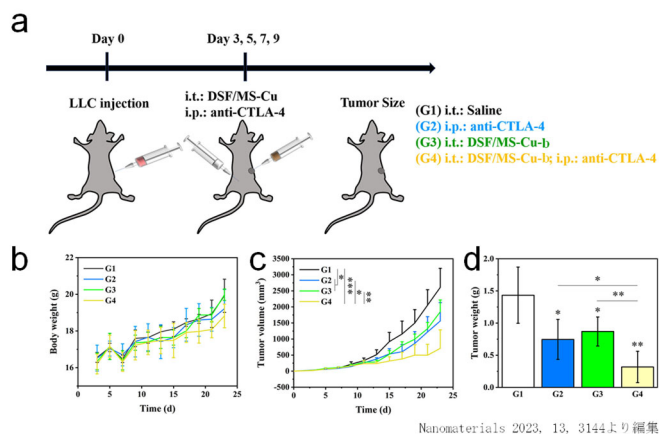


Fig. 8 The combination of DSF/MS-Cu and anti-CTLA-4 antibody further inhibited tumor growth, showing the synergistic effect of DSF/MS-Cu and immune checkpoint inhibitors. Experimental protocol (a), body weight (b), tumor volume (c), and tumor weight (d)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Wang Xiupeng, Oyane Ayako, Inose Tomoya, Nakamura Maki	4. 巻 15
2. 論文標題 In Situ Synthesis of a Tumor-Microenvironment-Responsive Chemotherapy Drug	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1316 ~ 1316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15041316	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 Yuan Xinyuan, Wang Xiupeng	4. 巻 13
2. 論文標題 An In Situ Chemotherapy Drug Combined with Immune Checkpoint Inhibitor for Chemoimmunotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 3144 ~ 3144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano13243144	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王 秀鵬、大矢根 綾子、猪瀬 智也、中村 真紀
2. 発表標題 腫瘍微小環境応答型抗がん剤のin situ合成
3. 学会等名 第21回LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2023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
研究分担者	大矢根 綾子  (Oyane Ayako)  (50356672)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・総括研究主幹    (82626)	

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
---------	---------