

## 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 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650109

研究課題名（和文）

放射線活性化型ナノ粒子による癌治療システムの基盤構築

研究課題名（英文）

Development of Radiation-Activatable Nanoparticles Conjugated with Antitumor Prodrugs

研究代表者

伊藤 健雄 (ITO TAKEO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80378801

研究成果の概要（和文）：

固形癌周辺に形成される低酸素領域を標的として、光や放射線により還元活性化するプロドラッグの開発が注目されている。本研究では、ジスルフィド化合物の金ナノ粒子表面結合特性および還元反応性を応用して、光あるいは放射線により活性化しうるプロドラッグ修飾金ナノ粒子を合成した。種々のラジカル捕捉剤存在下、低酸素条件下で X 線照射し、シタラビンの遊離量を定量した。その結果、水和電子による還元を経て活性化反応が進行することを示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Photo- or Radiation-induced activation of antitumor prodrugs in the hypoxic regions around solid tumor tissues has attained much interest in the past decade. In this study, we prepared gold nanoparticles conjugated with photo- or radiation-activatable prodrugs with the Au-S bond. Quantification of released antitumor agent of cytarabine after hypoxic X-ray irradiation in the presence of various radical scavengers suggested that the reaction proceeds via reduction by hydrated electrons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

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：ナノバイオ材料・ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

癌の化学療法に用いられる薬剤は、腫瘍細胞のみでなく正常組織にも副作用を及ぼすために、薬を適所に輸送するためのドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が進んでいる。とりわけナノ粒子は、そのサイズ効果(Enhanced Permeation and Retention, EPR)によ

り腫瘍付近に蓄積しやすいために、腫瘍標的DDS材料として期待されている。DDS材料として求められる物性は、(I) 特定環境（腫瘍内の低 pH、低酸素領域など）に反応して薬剤を放出すること、あるいは(II) 外部刺激（紫外可視光など）に反応して活性化すること、がある。

我々は以前、I と II の利点を生かして、外部からの放射線刺激によって腫瘍の低酸素環境においてのみ活性化する抗腫瘍性プロドラッグを作りだしている。腫瘍周辺では酸素が不足した雰囲気が存在する。通常、放射線と水との反応により生じる水和電子( $e_{aq}^-$ )は、正常細胞内では酸素により除去されるものの、低酸素領域では生き残る。我々は、薬剤を還元遊離性基で保護したプロドラッグを設計し、この低酸素腫瘍領域で発生する水和電子との反応により抗腫瘍剤をリリースするシステムを報告している。これまでに以下のドローバックを得ている。

- (i) 薬剤放出量は発生電子量、つまり放射線量に比例するために、より大きな効果を得るためには使用放射線量を増やさなければならない。
- (ii) 腫瘍での選択的活性化は成し得るものの、患部への集積能力がないことから薬剤濃度が十分でない。

これらの欠点を補う新たな分子創薬システムが必要とされている。

## 2. 研究の目的

本課題では、これらの問題に対して革新的なブレイクスルーを期待できる、「放射線誘導による薬剤-ナノ粒子複合体の腫瘍選択的活性化システム」を提案した。ナノ粒子(毒性が低い金ナノ粒子)上に抗腫瘍剤(5-フルオロウラシルなど)を一電子還元開裂性リンカーで担持させる。サイズ効果により腫瘍に蓄積すると予想されるこの複合体は、低酸素領域では放射線照射により発生する(水和)電子との反応により、薬剤放出することが可能になる。

関連して、金ナノ粒子表面に薬剤あるいはDNAを結合し、レーザー光による誘導放出が試みられている。しかし、光の組織透過性は数ミリ以下であることから、応用面では期待できない。これに対し放射線は癌の実用的治療に用いられており、体内深くに高精度に照射する技術も確立している。本システムが実現すれば、放射線の癌治療効果を飛躍的に増大させ、治療時の被曝線量を極限までに抑えることができるはずである。

以上、本研究では (I) 放射線活性型の抗腫瘍性薬剤-金ナノ粒子複合体のプロトタイプを合成し、(II) その抗腫瘍性活性を評価するとともに、(III) 金ナノ粒子自体の放射線増感・殺細胞作用の分子メカニズムに関しても知見を得ることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

本課題では、放射線誘導により薬剤を局所的に放出するナノ粒子のプロトタイプを合成するとともに、ナノ粒子の放射線反応がDNAなどの生体分子損傷に及ぼす影響を同時に明らかにするために、(I)腫瘍集積性の粒

径 100 nm 程度の金ナノ粒子と(II)放射線還元により開裂する有機分子リンカー構造を分子設計し、(III)抗腫瘍性薬剤(5-フルオロウラシルなど)をリンカーで表面導入したナノ粒子を合成した。その後、(IV)その複合体の放射線誘導薬剤放出能を、液体クロマトグラフィーや細胞実験により評価するとともに、(V)放射線反応条件下での金ナノ粒子の生体分子断片化反応を調査した。

## 4. 研究成果

(1) 放射線活性型ナノ粒子複合体の合成  
本研究では、ナノ粒子のうち生体毒性が低いことがわかっている金ナノ粒子に注目して分子修飾を行った。金ナノ粒子は球状で粒径~50 nm程度の大きさのものを既知の方法により調製し、透過型電子顕微鏡(TEM)により形状観察を行ったところ、比較的粒度分布が低い金ナノ粒子であることがわかった。このサイズの粒子は腫瘍蓄積性を示すと考えられ、現時点では合成上の簡便さから球状粒子がもっとも適当であると考えた。

(2) 合成した金ナノロッドの溶液内分散性と腫瘍細胞指向性を高めるために、ポリエチレングリコールおよびアルキルアミン構造で表面修飾した金ナノロッドを合成し、その表面電位、分散性、腫瘍細胞内取込能を調べた。その結果、作製した表面修飾金ナノロッドは、低酸素細胞周辺のpHにおいて正の表面電位を示し、腫瘍細胞内に効率良く取り込まれることがわかった。

(3) 放射線開裂型リンカーの有機合成  
これまでに、放射線誘起により一電子還元開裂しうる有機化合物構造をいくつか見出していることから、それらのうちリンカーとして応用可能な構造を設計した(図1)。金ナノ粒子表面への固定にはチオール基を含む分子が最も有用であることから、Au-S結合の放射線還元反応性を利用して、水和電子により開裂遊離するリンカー構造を設計した。このAu-S結合の還元開裂反応は水和電子のみでなく、同時に生成する水素原子によっても反応が進行する可能性が示唆されていることから、水和電子生成量以上の薬剤放出が見込める。

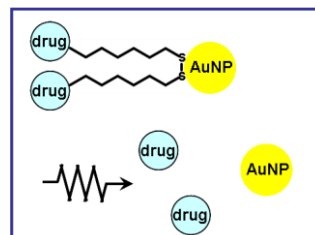


Figure 1. The strategy of radiation-induced hypoxia selective activation of antitumor agent-gold nanoparticle hybrids.

当初、抗がん剤として5-フルオロウラシルを含む薬剤放出システムの合成を目指したが、合成上の問題により、同じく抗がん作用を示すシタラビンを遊離しうる分子構造の合成を試み、成功した。

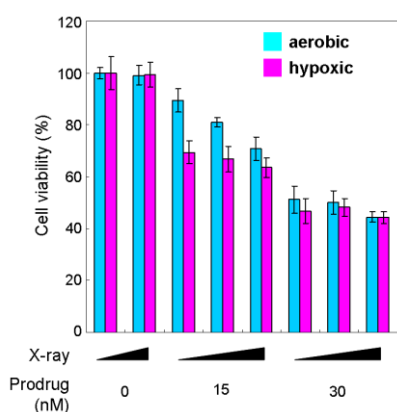
(4) 放射線誘起抗腫瘍性薬剤遊離能の評価  
上記で合成したシタラビン誘導体の放射線誘起による薬剤放出活性を *in vitro* (水溶液中) で評価した。腫瘍細胞雰囲気をもした低酸素あるいは無酸素水溶液中における照射を行った。その際、水和電子( $e_{aq}^-$ )の寄与を明らかにするために、ラジカル捕捉剤(*t*-ブチルアルコール、イソプロパノール、 $N_2O$  など)共存条件下での評価を行った(表 1)。その結果、還元雰囲気における水和電子発生環境において効率の良いシタラビン遊離が認められたことから、低酸素選択的薬剤としての選択的活性が期待された。

**Table 1.** G values for decomposition of the prodrug and formation of cytarabine upon X-ray irradiation.

Reactive species	G values (nmol/J)	
	Formation of cytarabine	Decomposition of prodrug
•H, $e_{aq}^-$	38.1 (79.7%) <sup>b)</sup>	47.8
•H, $e_{aq}^-$ , ROS <sup>a)</sup>	12.0 (35.5%)	33.8
$e_{aq}^-$	117.6 (186.4%)	63.1
$e_{aq}^-$ , ROS	9.1 (55.2%)	16.5
•H, •OH	45.2 (68.7%)	65.8
•H	28.9 (97.0%)	29.8
•H, •OH, $e_{aq}^-$	36.4 (88.8%)	41.0
•H, •OH, $e_{aq}^-$ , ROS	11.5 (39.5%)	29.1

<sup>a)</sup> Reactive oxygen species, <sup>b)</sup> selectivities based on G values for decomposition of prodrug.

(5) 放射線照射による細胞毒性調査  
腫瘍細胞(ヒト肺がん細胞 A549)に対する、プロドラッグの放射線治療効果を評価した。所定濃度のシタラビン誘導体に低酸素、あるいは有酸素条件下で放射線を所定線量照射した後、A549細胞の生存率をWST法により測定した。その結果、照射線量の増加に伴う

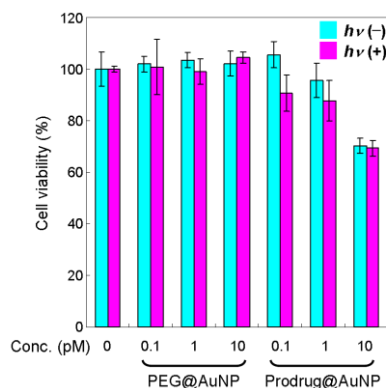


**Figure 2.** A549 cell viability after incubation with various concentrations of prodrug for 72 hr. Prodrug solution was irradiated with X-ray up to 10 Gy prior to incubation with cells.

細胞生存率の低下、低酸素条件下での僅かな増感効果が認められた。別途、シタラビン誘導体を生体還元性物質グルタチオンと反応させ、生成物の HPLC 分析を行ったところ、シタラビンの遊離が認められた。従って、本実験における低酸素選択性の低さは、グルタチオンなどの細胞内還元物質により、シタラビン誘導体が還元活性化されたためと考えられる。

#### (6) 光照射による細胞毒性調査

放射線(X線)自身も殺細胞効果があることから、薬剤遊離能と細胞生存率の相関を知ることは難しい。そこで、表面修飾した金ナノ粒子への光照射によりシタラビン誘導体を遊離させ、細胞毒性を評価することにした。金ナノ粒子を含む水溶液に波長 532 nm のレーザー光を 10 分間照射した後、A549細胞の生存率を測定した。その結果、シタラビン誘導体により表面修飾した金ナノ粒子について、若干の光照射効果が認められたことから、先述の放射線増感効果の僅かな差は、放射線照射による低酸素感受性の違いではなく、シタラビン遊離によるものであることが推察された。



**Figure 3.** A549 cell viability after incubation with AuNPs for 72 hr. AuNPs solution was irradiated with 532 nm laser for 10 min prior to incubation with cells.

#### (10) まとめ

ジスルフィド結合を有するプロドラッグを合成し、水和電子や細胞内酵素による還元反応を経て効率よく活性化することを明らかにした。今後、金ナノ粒子をプロドラッグにより表面修飾することで、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待される。

#### 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 2 件)

Ito, T.; Kusaka, E.; Isobe, Y.; Nishimoto, S. Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with pH-Responsive Polymers and Evaluation of

the Cellular Uptake. (Reviewed) Proceedings of 2011 MRS Fall Meeting, **2012**, 1416, DOI: 10.1557/opl.2012.666.

Tanabe, K.; Ishizaki, J.; Ando, Y.; Ito, T.; Nishimoto, S. Reductive activation of 5-fluorodeoxyuridine prodrug possessing azide methyl group by hypoxic X-irradiation. (Reviewed) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1682-1685.

[学会発表] (計 10 件)

① 日下絵里子・伊藤健雄・五十部悠・西本清一、細胞内におけるナノ粒子表面の修飾構造変換、日本化学会第 92 春季年会、2012/3/26、慶応大学日吉キャンパス

② Ito, T.; Kusaka, E.; Isobe, Y.; Nishimoto, S. Synthesis of Gold Nanoparticles coated with pH-responsive Polymers and evaluation of the cellular uptake, 2011 MRS fall meeting, 2011/11/28, Hynes Convention Center, Boston, USA.

③ 日下 絵里子・伊藤 健雄・五十部 悠・西本 清一、細胞内酵素作用による金ナノ粒子表面での修飾構造変換反応とその蛍光検出、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011/9/13、つくば国際会議場「エポカルつくば」

④ 五十部 悠・伊藤 健雄・日下 絵里子・赤松 香奈子・田邊 一仁・西本 清一、pH 応答性ポリマー修飾金ナノロッドの合成とその腫瘍細胞内取り込み能の評価、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011/9/12、つくば国際会議場「エポカルつくば」

⑤ 日下絵里子、伊藤健雄、五十部悠、西本清一、細胞内酵素作用による修飾金ナノ粒子の表面物性変換、ナノ学会第 9 回大会、2011/6/2、北海道大学

⑥ 伊藤健雄、五十部悠、日下絵里子、西本清一、アルキルアミン修飾金ナノロッドの合成と腫瘍細胞内への取り込み評価、ナノ学会第 9 回大会、2011/6/2、北海道大学

⑦ 日下絵里子・伊藤健雄・五十部悠・西本清一、細胞内酵素作用により蛍光分子を放出する金ナノ粒子の合成とその機能、日本化学会第 91 春季年会、2011/3/26、神奈川大学

⑧ 五十部悠・伊藤健雄・日下絵里子・赤松香奈子・西本清一、金ナノロッドの表面電荷が腫瘍細胞内取り込み能に及ぼす影響、

日本化学会第 91 春季年会、2011/3/29、神奈川大学

⑨ Y. Isobe; T. Ito; K. Akamatsu; E. Kusaka; S. Nishimoto Synthesis of pH-responsive gold nanorods and its cellular uptake, Pacificchem 2010, 2010/12/16, Honolulu, Hawaii, USA.

⑩ 五十部悠、伊藤健雄、日下 絵里子、赤松 香奈子、西本清一、腫瘍を標的とする金ナノロッドの細胞内取り込みに及ぼす表面電荷の影響、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、2010/9/15、九州大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 健雄 (ITO TAKEO)  
京都大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：80378801

### (2) 研究分担者

( )  
なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

西本 清一 (NISHIMOTO SEI-ICHI)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：10115909