

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700526

研究課題名（和文）リンパ行性転移に対するナノキャリアの診断及び治療

研究課題名（英文）Targeting ability of systemically administered drug-loaded polymeric micelles against lymph node metastasis

研究代表者

カブラル オラシオ (Cabral Horacio)

東京大学・大学院工学系研究科・講師

研究者番号：10533911

研究成果の概要（和文）：本研究では白金錯体抗がん剤を内包する高分子ミセルを用いて初期段階のリンパ節転移に対する全身投与型のドラッグデリバリーシステム（DDS）を開発した。B16-F10-Luc マウスメラノーマ細胞を用いて初期段階の腋窩リンパ節の転移がんモデルを樹立し、このモデルに対して (1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) とブロック共重合体 PEG-block-poly(L-glutamic acid) (PEG-P(Glu)) から調製された DACHPt ミセルを投与したところ、有意な抗腫瘍効果を示すことを確認した。さらに同ミセルのサイズ効果について検討したところ、70nm のミセルと比較して 30nm のミセルがより腫瘍深部へと浸透し、腫瘍細胞の増殖を抑制することを見出した。このようなミセルのサイズ効果によるリンパ節転移の抑制は、これまでに報告例がなく DDS の研究分野にとって重要な発見である。また、同様の試みをスキルス性胃がんのリンパ節転移へ展開させたところ、上記と同じく 30nm のミセルで高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。スキルス性胃がんならびにそれらの転移はこれまで治療が困難な腫瘍として知られているが、本発見はこれらのがんに対する新たな治療戦略を提示することになり、今後の更なる発展が期待されている。

研究成果の概要（英文）：Tumor spread to distant organs and lymph nodes is the most threatening aspect of cancer. Current therapeutic strategies against lymphatic metastases show low efficiency and high morbidity. Here, the targeting ability of systemically administered drug-loaded polymeric micelles against lymph node metastasis was evaluated for developing an efficacious therapy against lymphatic metastasis. Thus, a model of early lymph node metastasis was developed by using bioluminescent murine melanoma B16-F10-Luc cells, injected in the forepaw of mice, while the micelles were prepared by the complex formation between the carboxylic moieties of PEG-b-poly(glutamic acid) copolymer and (1,2-diaminocyclohexane) platinum(II), the parent complex of oxaliplatin. Micelles accumulated in metastatic lymph nodes regardless of the presence of primary tumor, achieving significant antitumor effect. Moreover, the size of the micelle affected their targeting ability against lymph node metastasis, as micelles with 30-nm diameter were more efficient than micelles with 70-nm diameter. This size effect was also observed against the lymph node metastasis of a bioluminescent orthotopic model of human scirrhus gastric cancer. The ability of 30-nm micelles to target lymph node metastases may provide a novel approach for early diagnosis and efficient therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合領域

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：ドラッグデリバリー、リンパ節転移、高分子型ミセル

1. 研究開始当初の背景

リンパ節転移や遠隔転移の予防や治療は、がん治療に於いて最も克服が困難である問題となっている。医療現場に於いては転移性腫瘍への処置として、放射線療法や化学療法、もしくはこれらの併用療法が行われているが、転移の場所やステージなどによって治療効果に差が生じている。そのため、転移性の腫瘍に対して選択的に薬物を送達させ、効率よく治療を行える新たなシステムの開発が急務となっている。

がんのリンパ節への転移を考えた場合、これらは原発部位からがん細胞の一部が剥離され、次にリンパ管通してリンパ節へ到達することにより起こる。一方で、リンパ系と血流のリンパ節における循環は、密接にかかわっていることから、血流・リンパを介した薬物輸送が達成できれば、リンパ節転移の治療が可能になると考えられた。血流を介した全身投与型の薬物移送に関しては、申請者らは過去の研究に於いて高分子ミセル型のドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発し、種々の固形がんに対する全身投与型の治療法を確立してきた。そこで本研究では制がん剤を内包する高分子型ミセルを開発し、リンパ節転移に対する効果について検討した。

2. 研究の目的

本研究ではポリエチレングリコール (PEG) とポリグルタミン酸 (P(Glu)) からなるブロックポリマーを白金制がん剤 (DACHPt) と反応させることによって高分子ミセル (DACHPt/m) を調整する。これまでの研究に於いて、このミセル調整時にグルタミン酸ホモポリマーを添加することで、ミセルのサイズを制御できることが見出されている。そこで本研究では、サイズの異なる DACHPt/m を調整し、それらのリンパ節転移に対する効果について検討することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) リンパ節転移を治療するための制がん剤内包高分子ミセルの最適化

PEG-block-poly(L-glutamic acid) PEG-P(Glu) と poly(L-glutamic acid) とを比率を変えて混合し、制がん剤オキサリプラチンの中間活性体である DACHPt と高分子-金属錯体を形成させることによって、粒径が 30nm と 70nm の DACHPt 内包ミセルを調整した (図 1)。

(2) リンパ節転移モデル実験動物の確立

マウスメラノーマ細胞 (B16F10-Luc) を footpad に移植することにより、腋窩リンパ節へ腫瘍が転移したモデルマウスを確立し、実験に使用した。リンパ節転移を伴うヒトスキルス胃がん (OCUM-2MLN-Luc) 同所移植モデルを確立し、実験に使用した。ミセルならびにコントロールとなるオキサリプラチンは尾静脈より投与した。

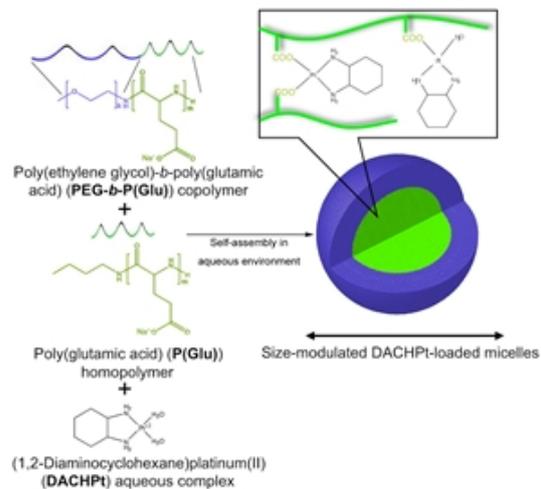


図 1. サイズの異なる制がん剤内包高分子ミセルの調整方法

4. 研究成果

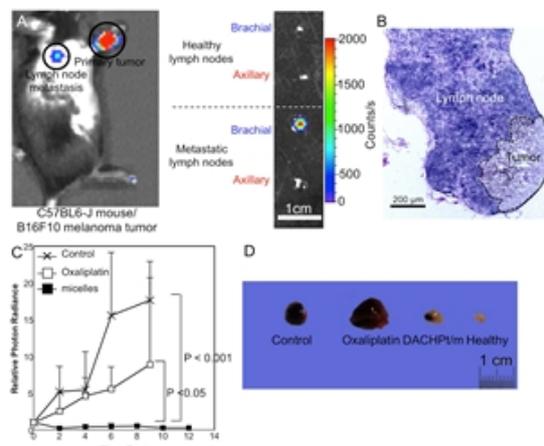


図 2. B16F10 メラノーマのリンパ節モデルとミセルによる治療効果

(1) リンパ節転移の研究を開始するにあたり、我々は B16F10 メラノーマ細胞を C57BL/6-J マウスの footpad に移植することにより、再現性よくリンパ節転移を発現させる動物モ

デルを確立した (図 2 A, B)。これらのモデルに対して、粒径 30nm の DACHPt/m とオキサリプラチンを尾静脈より投与し (二日おきに一回、計三回投与) したところ、30nm-DACHPt/m の群で有意に転移を抑制することが確認できた。

(2) 次にマウスメラノーマ (B16F10-Luc) の腋窩リンパ節転移に対するサイズの異なる DACHPt/m の抗腫瘍効果について検討した。生体イメージングシステム (IVIS) による検討から、30nm の DACHPt/m は 70nm や無処置群 (control) と比較して有意にリンパ節転移の増殖を抑制することが確認された (図 3 A)。24 時間後におけるリンパ節内の白金制がん剤量を ICP-MS に定量評価したところ、30nm-DACHPt/m と 70nm-DACHPt/m の集積性は同等であった (図 3 B)。これらの現象を組織学的な側面から確認するため、30nm-DACHPt/m を緑色の蛍光試薬でラベル化し、一方で 70nm-DACHPt/m を赤色の蛍光試薬でラベル化した。このような場合、腫瘍内の 30nm (緑) と 70nm (赤) ミセルの蛍光シグナを比較することでそれぞれのミセルの腫瘍集積性について評価可能になる。図 3 C に示すように各ミセルのリンパ節における分布を確認したところ、緑色のシグナルが腫瘍 (青) 近辺に確認できた。一方で赤色のシグナルはリンパ節に均一に分布した。これらの結果は、30nm の DACHPt/m がリンパ節内の腫瘍へ特異的に集積することを示している。

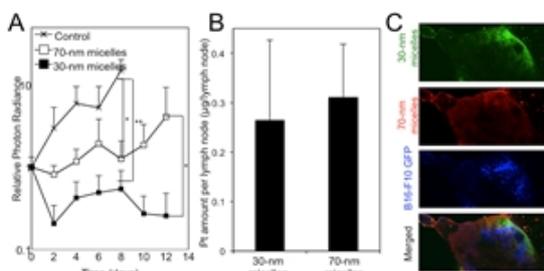


図 3. サイズの異なる DACHPt/m のリンパ節転移に対する集積性の違い

(3) 難治がんである膵臓がんと同様に血管密度が低く間質が豊富であることに加え、リンパ節転移を伴う同所移植ヒトスキルス胃がんモデルに対して、サイズの異なる DACHPt/m の有効性を検証した。その結果、30nm-DACHPt/m 投与群における腫瘍の重量が、70nm-DACHPt/m 投与群に対して有意に小さいことが確認された (図 4 A)。また、その原因が腫瘍に対するミセルの集積性に起因することが確認された (図 4 B)。これらの結果は、転移がんに対してミセルのサイズを小さく制御することが重要であることが示唆

した初めての例である。

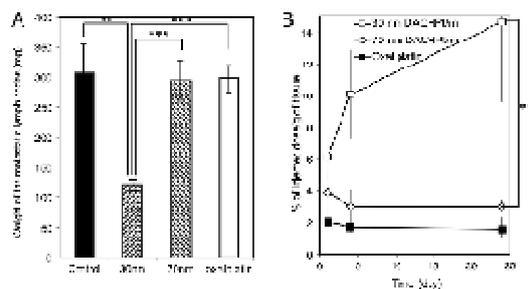


図 4. OCUM-2-MLN-Luc スキルス性胃がんのリンパ節転移に対する DACHPt/m の抗腫瘍効果ならびに腫瘍への集積

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 4 件)

(1) Mi Peng, Horacio Cabral, Daisuke Kokuryo, Mohammad Rafi, Yasuko Terada, Ichio Aoki, Tsuneo Saga, Takehiko Ishii, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging, *Biomaterials*, 査読有, 34 巻, 2013, 492-500

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.030

(2) Kensuke Osada, Horacio Cabral, Yuki Mochida, Sangeun Lee, Kazuya Nagata, Tetsuya Matsuura, Megumi Yamamoto, Yasutaka Anraku, Akihiro Kishimura, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Bioactive Polymeric Metallosomes Self-Assembled through Block Copolymer-Metal Complexation, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 134 巻, 2012, 13172-13175
DOI: 10.1021/ja304615y

(3) Mohammad Rafi, Horacio Cabral, Mitsunobu R. Kano, Peng Mi, Caname Iwata, Masakazu Yashiro, Kosei Hirakawa, Kohei Miyazono, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis, *Journal of Control Release*, 査読有, 159 巻, 2012, 189-196
DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.038

(4) Takahiro Nomoto, Yu Matsumoto, Kazuko

Toh, R. James Christie, Kanjiro Miyata, Makoto Oba, Horacio Cabral, Mami Murakami, Shigeto Fukushima, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Evaluation of the Dynamics of Drug Delivery Systems (DDS) Using Intravital Real-Time Confocal Laser Scanning Microscopy, Yakugaku Zasshi, 査読有、132 巻、2012、1347-1354
DOI: なし

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Sabina Quader, Horacio Cabral, Yuki Mochida, Takehiko Ishii, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Intracellular delivery of proteasome inhibitor MG132 by using polymeric micelles for effective cancer therapy, 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba ICBS2013, 2013 年 3 月、つくば国際会議場

(2) 牧野惇, Horacio Cabral, 松本有、三浦裕、狩野光伸、西山伸宏、片岡一則、がんのリンパ行性転移に対する高分子ミセル型 DDS のターゲティング能に関する研究、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012 年 7 月、札幌コンベンションセンター

(3) 三浦裕, Horacio Cabral, 西山伸宏、片岡一則、悪性脳腫瘍を標的としたリガンド介在型ドラッグデリバリーシステムの開発、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012 年 7 月、札幌コンベンションセンター

(4) Horacio Cabral, Yu Matsumoto, Mitsunobu R. Kano, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Size-mediated accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumors, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012 年 7 月、札幌コンベンションセンター

(5) Hailiang Wu, Horacio Cabral, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Targeting of early inflammatory metastatic sites by using drug-loaded polymeric micelles, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012 年 7 月、札幌コンベンションセンター

(6) Sabina Quader, Horacio Cabral, Takehiko Ishii, Yutaka Miura, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Developing pH-responsive Polymer Micelles for the intracellular delivery of Proteasome inhibitor M132 for effective cancer therapy, The 9th International Polymer

Conference (IPC 2012)、2012 年 12 月、神戸コンベンションセンター

(7) Yuki Mochida, Francesco Albertini, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Structure and enhanced pharmacokinetics of antitumor platinum-loaded micelles regulated by secondary structure in their core, The 9th International Polymer Conference (IPC 2012)、2012 年 12 月、神戸コンベンションセンター

(8) Peng Mi, Horacio Cabral, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Calcium Phosphate Hybrid Micelles Incorporating Gd-DTPA with Enhance Relaxivity for Magnetic Resonance Imaging, The 9th International Polymer Conference (IPC 2012)、2012 年 12 月、神戸コンベンションセンター

(9) Jooyeon Ahn, Yutaka Miura, Hirokuni Uchida, Horacio Cabral, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Preparation of antibody introduced micelle consist of well defined end-functiolized P(ethylene oxidel)-b-poly(amino acid), The 9th International Polymer Conference (IPC 2012)、2012 年 12 月、神戸コンベンションセンター

(10) 笹野将人、安楽泰孝、岸村顕広、Horacio Cabral、西山伸宏、片岡一則、疎水性薬剤を内包したポリイオンコンプレックス型ベシクル PICsome の開発、第 61 回高分子討論会、2012 年 9 月、名古屋工業大学

(11) 持田祐希、Francesco Albertini, Horacio Cabral、三浦裕、長田健介、西山伸宏、片岡一則、 α ヘリックス構造形成に基づく PEG-ポリグルタミン酸ブロック共重合体/制がん剤ダハプラチン内包高分子ミセルの機能向上、第 61 回高分子討論会、2012 年 9 月、名古屋工業大学

(12) 持田祐希、Francesco Albertini、Horacio Cabral、三浦裕、長田健介、西山伸宏、片岡一則、白金錯体制がん剤内包ミセルのコア高次構造が形態及び薬剤機能に及ぼす影響、第 61 回高分子年次大会、2012 年 5 月、パシフィコ横浜

(13) Yuki Mochida, Francesco Albertini, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori

Kataoka, Formation and sustained-dissociation of antitumor platinum-loaded micelles regulated by secondary structure in their core, 9th World Biomaterials Congress, 2012年6月、Chengdu (China)

(14) Peng Mi, Horacio Cabral, Sachiko Kaida, Daisuke Kokuryo, Nobuhiro Nishiyama, Ichio Aoki, Kazunori Kataoka, Gd-DTPA loaded polymeric micelle with high relaxivity for in vivo cancer diagnosis, 9th World Biomaterials Congress, 2012年6月、Chengdu (China)

(15) Sabina Quader, Horacio Cabral, Takehiko Ishii, Yutaka Miura, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Preparation and Characterization of pH-responsive Polymeric Micelles Incorporating the Proteasome Inhibitor MG132 for Efficient Cancer Therapy, The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012年7月、Centre des congrès de Québec, Québec City (Canada)

(16) Peng Mi, Daisuke Kokuryo, Michiaki Kumagai, Horacio Cabral, Ichio Aoki, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, PEGylated Polyanion Hybrid Calcium Phosphate Micellar MRI Probe for In Vivo Noninvasive Solid Tumor Diagnosis, 16th International Symposium on RECENT ADVANCES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS, 2013年2月、Salt Lake City (USA)

(17) Horacio Cabral, Jun Makino, Takahiro Nomoto, Mitsunobu R. Kano, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Polymeric Micelles Can Treat Lymph Node Metastasis After Intravenous Injection, NanoBio Seattle 2012 (The Fourth International NanoBio Conference), 2012年7月、Seattle (USA)

(18) Yuki Mochida, Francesco Albertini, Horacio Cabral, Yutaka Miura, Kensuke Osada, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Secondary Structure of PEG-b-Poly(Glutamic Acid) Copolymer Determines the Drug Delivery Efficiency of Cisplatin-Loaded Polymeric Micelles, 16th International Symposium on RECENT ADVANCES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS, 2013年2月、Salt Lake City (USA)

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

カブラル オラシオ (Cabral Horacio)
東京大学・大学院工学系研究科・講師
研究者番号：10533911

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし