

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390340

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効率的なドラッグ・遺伝子デリバリー

研究課題名(英文) Development of efficient drug and gene 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

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および遺伝子のキャリアとして使用し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検討を行った。また、高分子ナノミセルを単純ヘルペスウイルス1型によるウイルス療法に応用する際に必要な事項に関して検討を行った。リガンドとしてRGDペプチドを搭載した抗癌剤内包ミセルにおいて、対照ミセルに比し、腫瘍内集積効率の向上と抗腫瘍効果の増強が得られることが示された。

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 and gene delivery system. The polymeric nanomicelles consist of block polymers which were designed to achieve selective and efficient accumulation to solid tumors including brain tumors. In order to use the polymeric nanomicelles in combination with oncolytic HSV-1 virus therapy, several in vivo mice tumor models were studied, mainly using marker gene expressing HSV-1. When RGD peptide was used as a ligand to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins, the functional micelle showed improved accumulation to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin expressing tumor tissue and enhanced antitumor effect in vivo

研究分野：悪性脳腫瘍学・ウイルス療法・遺伝子治療

キーワード：悪性脳腫瘍 ドラッグ・デリバリー

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年生存率は数%程度にとどまっており、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中の再発も依然多く、新規治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。これに疎水性の抗癌剤を化学結合させると、水中で会合して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ように設計されている。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腫瘍部に集積する。その後、イオン勾配、細胞内 pH、光照射、あるいは誘導酵素など種々の物理・化学・生物学的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。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、脳腫瘍モデルにおいて高分子ミセル化製剤をより効率的に腫瘍内に集積させる方法と、ミセルの自然崩壊を防止しつつコア薬剤を特異的かつ有効に放出する方法の開発を研究の目的とする。従来型の Cl⁻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 程度に厳密に制御することで、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最近判明しており、従来型のミセルでは毒性が残存していた **DachPlatin** ミセルについて、改良型ミセルの使用と血管透過性修飾薬剤の併用などにより、効果的な投与のタイミングなどの評価を行う。

さらに、複製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** において、腫瘍内局所への直接投与のみでなく、静脈内からの全身投与を行うべく、その問題点の分析と改善方法の開発を第二の研究目的とする。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、およびサイトカインの誘導などの免疫反応などの克服が必要と予想されるが、ウイルス粒子をブロックポリマーで修飾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** リガンド搭載高分子化により腫瘍特異的な感染を誘導する方法についても検討する。

3. 研究の方法

本研究においては、分担者研究者の研究室で調製された高分子ナノミセル製剤を使用し、マウス腫瘍モデルにおける毒性および抗腫瘍効果を主として *in vivo* において評価する。抗腫瘍効果は生存期間のほか、蛍光ラベルしたミセルの局在など病理組織学的にも評価

する。機能性ミセルとしては、主に腫瘍および腫瘍血管特異的に高発現するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を認識する RGD ペプチドをリガンドとして搭載するミセルを調製し評価する。ウイルス療法における静脈内投与径路の評価に関しては、マーカー遺伝子（ルシフェラーゼなど）を発現するウイルス療法用 HSV-1 を使用し、マウス腫瘍モデルにおけるウイルスの分布や抗腫瘍効果の検討を行う。

4. 研究成果

研究代表者は研究期間の直前に現所属に異動した。動物実験および遺伝子組換えウイルスを使用する実験に関しては、所定の計画書および申請書の提出を行い、審査を受け、承認を得たのちに開始した。

まず、ペプチド付加型のブロック共重合体のブロック共重合体全体に対する割合を変化させることにより、ミセルとしての物理化学的性質やペプチドそのものの毒性について検討した。その結果、ペプチド付加型の割合を 20% にすることとした。次にブロック共重合体に Arg-Gly-Asp(RGD) ペプチドを付加したミセルと、対照として非機能性のペプチド Arg-Ala-Asp(RAD) を付加したミセルを作成し、比較検討した。 $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを発現する U87MG グリオーマ細胞株において、蛍光ミセルを用いて *in vitro* で観察したところ、通常のみセルおよび対照ペプチド搭載ミセルに比し、蛍光ミセルの速やかな細胞内取り込みが見られた。siRNA により $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリン発現を消失させた U87MG 細胞においては、RGD ペプチドによる効果も消失した。*in vivo* での治療効果においては、U87MG 皮下腫瘍モデルと脳内腫瘍モデルのいずれにおいても、RGD ペプチド 20% 搭載ミセルは、対象ミセルおよびミセル化しない薬剤に比し有意に優れた腫瘍増殖抑制効果を示した^{論文3)}。

HSV-1 ウイルス療法における静脈内投与に関しては、マウス腫瘍モデルにおいてルシフェラーゼ発現型 HSV-1 を用いて検討を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T: The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32 (33): 3840-3845, 2013.
2. Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* 132 (2): 485-494, 2013
3. Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K.: Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier. *ACS Nano* 7(10): 8583-92, 2013.
4. Takai H, Masuda K, Hiraoka K, Echizen K, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Ogawa H, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T: 5hmC plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the

methylosome. Cell Reports 9(1): 48-60,
2014

[学会発表] (計 4 件)

1. Ino Y, Fukuhara H, Takahashi M, Nakatsubo T, Todo T: Oncolytic HSV-1 virus therapy targeting glioblastoma-derived cancer stem cells. The 19th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy 2012 年 6 月 21-24 日 Niagara Falls, Canada
2. 稲生 靖: 悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の研究開発 日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム 2012 年 11 月 21 日、神戸
3. 伊藤元一、稲生 靖、田中実、伊藤博崇、藤堂具紀: がん治療用ウイルスとマイクロ RNA 阻害剤を併用した悪性グリオーマ治療の開発 第 31 回日本脳腫瘍学会学術総会 2013 年 12 月 8-10 日、宮崎
4. 伊藤博崇、稲生靖、田中実、藤堂具紀: Generation of a therapeutic antibody expressing oncolytic herpes simplex virus 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25-27 日、横浜

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
(平成 25 年 4 月まで)

(3) 連携研究者

西山 伸宏 (NISHIYAMA, Nobuhiro)
東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号 : 10372385

藤堂 具紀 (TODO, Tomoki)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号 : 80272566