

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700476

研究課題名(和文)PIC型ベシクルの特徴を活かした汎用性の高い酵素プロドラッグ療法用キャリアの構築

研究課題名(英文)Development of enzyme-loaded nano-sized polyion complex vesicles (PICsomes) for enzyme prodrug therapy

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ポリオンコンプレックス型ベシクル(PICsome)は血中循環性が高いのみでなく、物質の膜透過性に優れていることから『標的部位における酵素・プロドラッグの反応場』として最適でありナノリアクターとして機能すると考えられる。本研究では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを封入した単分散な100 nmのPICsomeを調製し、酵素反応により蛍光を示すプロドラッグを用いて腫瘍において酵素封入PICsomeがIn vivoナノリアクターとして機能することを明らかにした。さらに、マウスの大腸がんを皮下移植した担がんマウスを用いて、制がん剤のプロドラッグと組み合わせる事で、顕著な抗腫瘍効果を得る事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Utilization of enzymes in the body is still a big challenge in the biomedical field. One of promising applications of enzymes for therapeutic application is enzyme prodrug therapy, and development of nano-vehicles for enzymes is one effective clue to establish the golden standard of EPT. We succeed in the preparation of  $\beta$ -galactosidase loaded PICsome with the diameter of 100 nm, maintaining enzyme activity. Exploiting  $\beta$ -gal-loaded PICsomes as an enzyme vehicles, a model prodrug, HMDER- $\beta$ GAL, was successfully converted into highly fluorescent product, HMDER, due to permeation of HMDER- $\beta$ GAL through the vesicle wall. In in vivo experiments using tumor-bearing mice,  $\beta$ -gal-loaded PICsomes were accumulated in the tumor tissue, to produce HMDER. Resulted HMDER was released from PICsomes and distributed into the entire tumor tissues and internalized by cells, and then visualization of tumor tissues was performed.

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：Enzyme/Prodrug Therapy ナノリアクター PICsome 制がん剤

1. 研究開始当初の背景

酵素プロドラッグ療法(EPT)は、もともと不活性であるプロドラッグが疾患部位にのみ存在する酵素の代謝作用を受けて活性代謝物へと変換し組織特異的に薬効を示すことから、このシステムを組み込んだ二段階のドラッグデリバリーシステム(DDS)はとりわけ副作用の低い革新的治療法として期待されている。DDSを利用して効果的にEPTを達成するには、①キャリアが酵素を失活することなく封入でき、②標的部位的に運搬し、③プロドラッグ投与後はプロドラッグがキャリアを通過し効率よく酵素と反応を起こすといった機能が求められるが、本来異物として認識されるべき外来の治療用酵素を標的部に運び、かつ効率良く酵素反応を起こすという一連のシステムを満足し得るナノリアクターが開発されていないのが現状である。

2. 研究の目的

ポリオンコンプレックス型ベシクル(PICsome)は血中循環性が高いのみでなく、物質の膜透過性に優れていることから『標的部位における酵素・プロドラッグの反応場』として最適であると考えられる。本研究では、酵素封入PICsomeのEPT用ナノリアクターとしてのポテンシャルを評価するのみでなく、システムをさらに洗練しがん治療へと展開していくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデル酵素としてβ-ガラクトシダーゼ(β-Gal)を封入したPICsomeを調製し、PICsome 1個あたりの酵素の封入量を蛍光相関分光法で算出する。また酵素反応が起きた時のみに蛍光を発する基質(プロドラッグのモデル)を用い、酵素活性やその寿命について蛍光検出器を用いて検討する。また先行研究よりPIC膜の架橋率により物質の膜透過性を制御できることが明らかとなっているので、架橋率を変えた際の基質の膜透過速度等の基礎物性についてもゲル濾過カラム等を用いて評価する。

(2) 100 nmのPICsomeはEPR効果による腫瘍局所への高い集積性が確認されている。そこで、まずβ-Gal封入PICsome (100 nm)を担がんマウスに尾静脈注射し腫瘍に集積後に、上記の基質を投与し *In vivo* 共焦点顕微鏡(*In vivo* CLSM; 生体内での挙動を生きたままリアルタイムで観察可能な顕微鏡)を用いて観察し腫瘍組織内で酵素封入PICsomeが機能することを明らかにする。

(3) (2)で腫瘍内で機能する事を明らかにした酵素封入PICsomeシステムを用いて、実際に制がん剤のプロドラッグを合成し、抗腫瘍評価を検討する。具体的にはドキシソルビシンのプロドラッグを用いてマウスの大腸がんの

治療を検討する。

4. 研究成果

(1) 既存のPICsomeの内水相への物質封入法を基に、Dylight488で蛍光ラベル化したβ-Galを封入し、動的光散乱測定(DLS)、透過型電子顕微鏡(TEM)、蛍光相関分光法(FCS)を用いて評価した。その結果、直径が100 nmで単分散なDylight488-β-Gal封入PICsome(Dylight488-β-Gal@PICsome)の調製が確認され、PICsome1個辺り約2個のβ-Galが封入されている事が確認された(図1)。

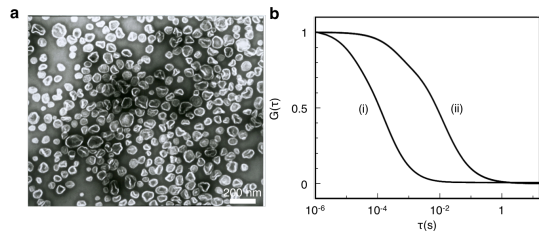


図1. β-Gal@PICsomeの物性評価。a. TEM像、b. FCS測定。(i) Dylight488-β-Gal、(ii) Dylight488-β-Gal@PICsome

また酵素反応前には蛍光を示さず、反応後に蛍光示す基質HMDER-βGALを用いて、PICsomeに封入したβ-Galの酵素活性を評価した。具体的にはLineweaver-burk plotより酵素活性の指標となるミカエリスメンテン定数とVmaxを算出したところ、いずれの値もβ-Gal単体(Km=43.3 μM, Vmax=105.3 nM/s)とβ-Gal@PICsome(Km=82.9 μM, Vmax=110 nM/s)で大きな差異が確認されなかったことから、酵素をPICsome内に活性を維持したまま封入であることが明らかになった(表1)。

表1. β-Gal単体およびβ-Gal封入PICsomeのKmおよびVmax

	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (nM/s)
β-galactosidase	43.3	105.3
β-gal@PICsomes	82.9	110.0

(2) (1)で詳細な物性評価を行なった直径100 nmのβ-Gal@PICsomeをマウスの大腸がんを皮下移植した担がんマウスに尾静脈投与(i.v.)し、投与から48時間後にHMDER-βGALをi.v.投与し、IVRTCLSM、*In vivo*イメージング装置で観察した。その結果、腫瘍に集積したβ-Gal@PICsomeを中心に反応後の基質由来の蛍光生成が確認された(図2)。これらの結果より、β-Gal@PICsomeが腫瘍内で*In vivo* ナノリアクターとして機能することが明らかとなった。

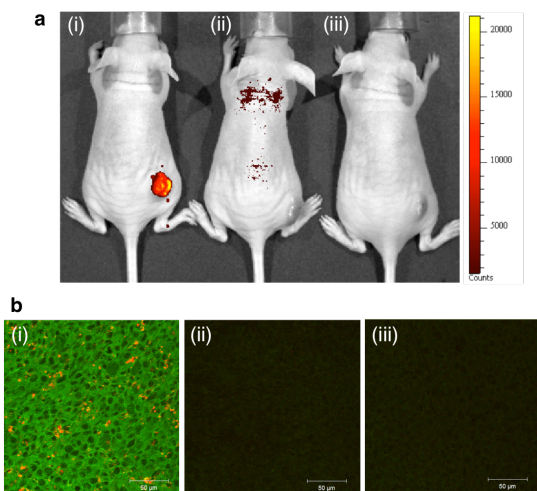


図 2. a. IVIS イメージ、b. IVRTCLSM イメージ。(i)  $\beta$ -Gal@PICsome+HMDER- $\beta$  GAL、(ii)  $\beta$ -Gal+HMDER- $\beta$  GAL、(iii) HMDER- $\beta$  GAL。緑: HMDER、赤:  $\beta$ -Gal@PICsome

(3) (2)より酵素@PICsome が腫瘍内においてナノリアクターとして機能する事が明らかになったので、制がん剤であるドキソルビシンのプロドラッグを合成し、マウスの大腸がんを皮下移植したマウスを用いて抗腫瘍効果を評価した。(2)と同様の投与スケジュールでプロドラッグを投与し、腫瘍のサイズを計測した所、 $\beta$ -Gal@PICsome を投与した群においてのみ腫瘍の成長抑制が確認され、顕著な高腫瘍効果が見られた(図 3)。

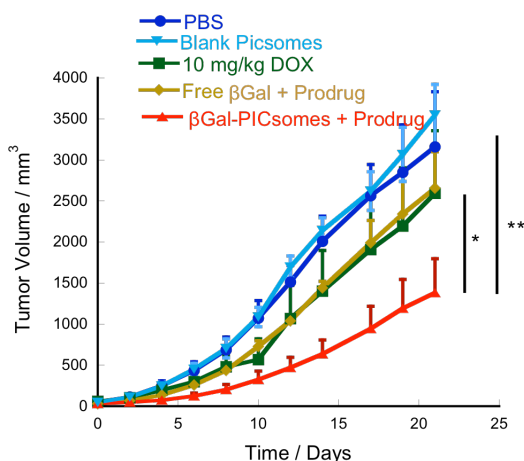


図 3. 時間変化に伴う腫瘍の体積推移

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① A. Wibowo, K. Osada, H. Matsuda, Y. Anraku, H. Hirose, A. Kishimura, K. Kataoka, Morphology control in water of polyion complex nanoarchitectures of double-hydrophilic charged

block copolymers through composition tuning and thermal treatment. *Macromolecules* 査読有り、2014, **47** (9) 3086-3092. DOI: 10.1021/ma500314d

② S. Chuanoi, A. Kishimura, W. -F. Dong, Y. Anraku, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Structural factors directing nanosized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) to form a pair of block anioner/homo cationers: Studies on the anioner segment length and the cationer side-chain structure. *Polym. J.* 査読有り、2014, **46** (2) 130-135. DOI: 10.1038/pj.2013.82

③ H. Chen, L. Xiao, Y. Anraku, P. Mi, X. Liu, H. Cabral, A. Inoue, T. Nomoto, A. Kishimura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyion complex vesicles for photo-induced intracellular delivery of amphiphilic photosensitizer. *J. Am. Chem. Soc.* 査読有り、2014, **136** (1) 157-163. DOI: 10.1021/ja406992w

④ D. Kokuryo, Y. Anraku, A. Kishimura, S. Tanaka, M. R. Kano, J. Kershaw, N. Nishiyama, T. Saga, I. Aoki, K. Kataoka, SPIO-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPIO-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsomes). *J. Control. Release* 査読有り、2013, **169** (3) 220-227. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.016

⑤ Y. Anraku, A. Kishimura, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Living unimodal growth of polyion complex vesicles via 2D supramolecular polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* 査読有り、**135** (4) 1423-1429 (2013) DOI: 10.1021/ja3096587

[学会発表] (計 14 件)

① Y. Anraku, M. Kamiya, S. Tanaka, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, S. Fukushima, A. Kishimura, M. R. Kano, Y. Urano, N. Nishiyama, K. Kataoka Development of enzyme-loaded nano-sized polyion complex vesicles (PICsomes) for enzyme prodrug therapy FIRST 合同国際シンポジウム 難治がんを克服する一次世代の診断、治療が描く未来 Overcoming Intractable Cancer- a new path to the future 伊藤国際学術研究センター、文京区、東京都 2014/2/21

② Y. Anraku, A. Kishimura, M. Kamiya, S. Tanaka, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, M. R. Kano, Y. Urano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Development of enzyme-loaded nano-sized polyion complex vesicles (PICsomes) for enzyme/prodrug therapy、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀、江戸

川、東京、2013/11/25

③ 安楽泰孝、岸村顕広、片岡一則、ポリイオンコンプレックス(PIC)型ベシクルのユニークな動的挙動とその機能、第 62 回高分子学会討論会、金沢大学角間キャンパス、金沢、石川、2013/9/11

④ 安楽泰孝、岸村顕広、神谷真子、田中さやか、野本貴大、藤加珠子、松本有、狩野光伸、浦野泰照、西山伸宏、片岡一則、PIC 型ベシクルの特徴を活かした酵素プロドラッグ療法用キャリアの構築、遺伝子・デリバリー研究会 第 13 回夏期セミナー、Hawaii Prince Hotel Waikiki, Honolulu, Hawaii, USA、2013/7/24

⑤ Y. Anraku, M. Kamiya, S. Tanaka, T. Nomoto, K. Toh, Y. Matsumoto, A. Kishimura, M. R. Kano, Y. Urano, N. Nishiyama, K. Kataoka Development of enzyme-loaded PICsomes for enzyme/prodrug therapy 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA 2013/7/21

⑥ 安楽泰孝、岸村顕広、神谷真子、田中さやか、野本貴大、藤加珠子、松本有、狩野光伸、浦野泰照、西山伸宏、片岡一則、汎用性の高い酵素プロドラッグ療法用キャリアを指向した血中滞留型中空ナノ粒子 (PICsome) の構築、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ、京都市、京都府、2013/7/4

⑦ Y. Anraku, A. Kishimura, D. Kokuryo, S. Tanaka, M. Kamiya, K. Tou, T. Nomoto, Y. Matsumoto, I. Aoki, M. Kano, Y. Urano, K. Kataoka Development of nano-sized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) as a versatile delivery carrier for biomedical application FRONTIERS2013 - Joint EPFL/University of Tokyo Symposium on "Frontiers in Nanomedicine and Imaging" Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland 2013/6/21

⑧ 安楽泰孝、岸村顕広、神谷真子、田中さやか、野本貴大、藤加珠子、松本有、狩野光伸、浦野泰照、西山伸宏、片岡一則、PIC 型ベシクルの特徴を活かした酵素プロドラッグ療法用キャリアの構築、第 62 回高分子年次大会、京都国際会館、京都市、京都府、2013/5/29

⑨ Y. Anraku, Development of enzyme-loaded PICsomes as an in vivo reactor, Nanobio FIRST International Symposium between Sweden and Japan Achieving medical innovation by nanobio Bench to Bedside, Bedside to Bench, Ito Hall, Ito International Research Center, The University of

Tokyo, Tokyo, Japan, 2013/3/5

⑩ Y. Anraku, A. Kishimura, D. Kokuryo, S. Tanaka, M. Kamiya, K. Toh, T. Nomoto, Y. Matsumoto, I. Aoki, M. Kano, Y. Urano, K. Kataoka, Development of nano-sized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) for versatile DDS carriers, 2012 MRS Fall Meeting, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, USA 2012/11/26

⑪ Y. Anraku, A. Kishimura, K. Kataoka, Development of nano-sized polyion complex vesicles (Nano-PICsome) for versatile DDS carriers, NanoBio Seattle 2012 (The Fourth International NanoBio Conference), Bell Harbor International Convention Center, Seattle, USA 2012/7/23

⑫ 安楽泰孝、岸村顕広、田中さやか、神谷真子、狩野光伸、浦野泰照、片岡一則、In vivo ナノリアクターへの展開を指向した酵素封入 PICsome の機能評価、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター、北海道、2012/7/4

⑬ 安楽泰孝、汎用性の高い DDS キャリアを指向した中空型ナノデバイスの開発、ナノバイオ国際共同研究教育拠点 第 1 回若手国内シンポジウム Nanobio 第 5 回若手ネットワークシンポジウム、甲南大学フロンティアサイエンス学部レクチャールーム、2012/6/8

⑭ 安楽泰孝、田中さやか、岸村顕広、狩野光伸、長田健介、片岡一則、架橋率・サイズの異なるポリイオンコンプレックス型中空粒子(Nano-PICsome)の基礎物性および体内動態評価、第 61 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、神奈川県、2012/5/29

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：物質充填静電結合型ベシクル  
発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、後藤晃範

権利者：科学技術振興機構

種類：特願

番号：2013-041186

出願年月日：2013.03.1

国内外の別：国内

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安楽 泰孝 (ANRAKU, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号：60581585