

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882022

研究課題名(和文)腫瘍関連マクロファージをハイジャックする機能性高分子の開発

研究課題名(英文)Development of functional polymers to hijack tumor-associated macrophages

## 研究代表者

野本 貴大(Nomoto, Takahiro)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：00734732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍関連マクロファージに効率的に光増感剤を送り届ける高分子キャリアを開発することを目的とし、ポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸誘導体から形成される親疎水ミセルに光増感剤を内包させ、ポリエチレングリコールの末端に腫瘍関連マクロファージを標的とするペプチドを導入した高分子ミセルを構築した。この高分子ミセルをヒト膵臓がん皮下腫瘍マウスモデルに静脈注射したところ、光増感剤が腫瘍内マクロファージに効率的に送達されていることが明らかとなった。本研究で開発した高分子ミセルは、腫瘍関連マクロファージをターゲットとするデリバリーシステムのプラットフォームになり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at the development of a novel polymeric nanocarrier that can deliver photosensitizer selectively into tumor-associated macrophages. For this purpose, we constructed a polymeric micelle composed of the amphiphilic copolymer that has a hydrophilic poly(ethylene glycol) and a hydrophobic poly(aspartic acid) derivative, and encapsulated photosensitizers into the core of the micelle. The surface of the photosensitizer-loaded micelle was further modified with the peptides targeting tumor-associated macrophages. In vivo study revealed that the micelle delivered the photosensitizer efficiently to macrophages in the tumor after systemic administration to the mouse bearing a subcutaneous tumor. The peptide conjugated-micelle may offer a promising platform to develop macrophage-targeting drug delivery systems.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：高分子ミセル 光増感剤

### 1. 研究開始当初の背景

高分子や脂質をベースとしたナノスケールの薬物送達キャリア（ナノキャリア）は、腫瘍関連血管特有の漏出性の高さや腫瘍組織内の未熟なリンパ管形成を利用し、腫瘍に選択的に集積することが可能であるため、低侵襲的に難治性疾患のがんを治療する方法として注目されている。このようながんへの選択的集積効果を利用したドキシルやアブラキサンといったナノキャリアは現在臨床で使用され副作用の低減に成功しているが、必ずしも十分な治療効果の向上が得られていないことが報告されている [Nat. Mater. 12, 958-962 (2013)]。なぜならば、腫瘍組織は不均一な構造を有しており、血管密度や血流速度が領域によって大きく異なり、治療薬を届けることができない部位が存在するからである。この腫瘍の不均一性は、がんの化学療法の研究・開発において極めて重要な課題となっている [Nat. Rev. Clin. Oncol. 7, 653-664 (2010), Cancer Res. 73, 2412-2417 (2013)]。

申請者は大学院在籍時に臨床の医師らと共同で、生体内におけるナノキャリアの挙動をリアルタイムで観察する生体内顕微鏡システムを開発し、今まで明らかにできなかったナノキャリアの生体内挙動を明確に描出することに成功している (ACS Nano 8, 1161-1172 (2014), Biomaterials 35, 3416-3426 (2014), Macromolecules 46, 6585-6592 (2013), ACS Nano 7, 8583-8592 (2013), ACS Nano 7, 7534-7541 (2013), Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 132, 1347-1354 (2012), J Drug Target 20, 33-42 (2012), ACS Nano 6, 5174-5189 (2012), J. Control. Release 151, 104-109 (2011), Biomacromolecules 12, 3174-3185 (2011), Biomed. Opt. Express 1, 1209-1216 (2010).)。この生体内顕微鏡システムを利用した研究の中で、薬剤が腫瘍深部まで浸透できず不均一に分布してしまうようながん組織の中においても自由に動き回ることができ、腫瘍組織全体に分布している腫瘍関連マクロファージの存在に申請者は着目した [未発表データ]。腫瘍関連マクロファージは、腫瘍内に存在するマクロファージであり、M2マクロファージの表現型を有し、がんの血管新生、成長、転移の促進に寄与している細胞である [Nature 454, 436-444 (2008), Cancer Res. 67, 2649-2656 (2007)]。

そこで、通常ではこのがんの味方をしている腫瘍関連マクロファージに治療薬を送り込み、腫瘍関連マクロファージに治療薬を腫瘍深部まで運ばせて、そこで腫瘍関連マクロファージとともに周辺のがん細胞を殺傷するための薬効を誘導することができれば、薬剤を送り届けることが難しい腫瘍組織深部を効率的に治療できるものと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍関連マクロファージが実際にかんの不均一性を克服する薬物送達キャリアとして利用できるかを検討すべく、腫瘍関連マクロファージに選択的に治療薬を送り込み、腫瘍関連マクロファージに治療薬を腫瘍深部まで運ばせて、そこで細胞殺傷効果を誘導（ハイジャック）することができる高分子キャリアを開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

上記の腫瘍関連マクロファージのハイジャックを達成するため、i) 全身投与可能である（ステルス機能）、ii) 腫瘍関連マクロファージに選択的に結合する（ターゲット機能）、iii) 結合した細胞にかんを殺傷するための治療効果を付与することができる（アタック機能）、という3つの機能を統合して高分子キャリアを構築することを目指した。

i) のステルス機能は、生体物質の非特異的吸着を抑制して確実に腫瘍関連マクロファージまでハイジャックポリマーを届けるのに必要である。本研究では、既に米国食品医薬品局に承認されている生体適合性材料の poly(ethylene glycol) (PEG) を導入することでこの機能を搭載することを試みた。

ii) のターゲット機能は、腫瘍関連マクロファージに選択的に結合できる標的リガンドを導入することで搭載することを試みた。標的リガンドには、ペプチド YEQDPWGVKWWY [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 15919-15924 (2013)] を使用する。この配列を有するペプチド（以下 M2-peptide と呼ぶ）は、腫瘍関連マクロファージに多く見られる表現型である M2 マクロファージへの選択性が非常に高いことが報告されている。

iii) のアタック機能は細胞傷害性の治療薬を導入することで搭載することとした。ここで、腫瘍関連マクロファージを薬物送達キャリアとして利用する場合、運ばれる治療薬は腫瘍関連マクロファージを殺さず、標的部位にたどり着いてからはじめて細胞傷害性を発揮できるものが望ましい。そこで、本研究では光によって活性化され細胞傷害性の活性酸素を産生し治療効果を誘導することができる光増感剤を採用した。光で活性化された光増感剤は標的細胞そのものを殺傷するだけでなく、周辺の細胞にもバイスタンダー効果で治療効果をもたらすことが報告されているため [Photochem. Photobiol. 73, 378-387 (2001), Radiat. Res. 172, 74-81 (2009)]、腫瘍深部において腫瘍関連マクロファージとともに周辺のがん細胞を殺傷するものと期待される。

### 4. 研究成果

#### (1) 高分子コンジュゲート型キャリア

平成 26 年度は腫瘍関連マクロファージを

標的とした高分子コンジュゲート型のキャリアの設計及び合成を行った。具体的には、PEG 誘導体の片末端側にポリアミノ酸鎖を伸長させ、その側鎖に光増感剤を結合させるための反応と、PEG のもう一方の末端に M2-peptide を結合させるための反応の条件を見出し、種々のポリアミノ酸を用いて、光増感剤の導入率を変えて、得られた高分子コンジュゲートの物性を評価した。その結果、ポリアスパラギン酸誘導体をベースとしたポリマーでは、光増感剤の導入効率を高めることが難しい一方で、ポリグルタミン酸誘導体をベースとしたポリマーではポリアスパラギン酸誘導体よりも効率よく光増感剤を導入することが可能であることが分かった。また、高分子コンジュゲートの吸光スペクトルは、結合前の光増感剤の吸光スペクトルと極めて類似したものを示し、合成過程において光増感剤が分解していないことが示唆された。しかしながら、光増感剤の導入率を高くしすぎると高分子コンジュゲートの水への溶解性が低下し、凝集体を形成することがゲル浸透クロマトグラフィによる分析の結果から示された。

#### (2) 高分子ミセル型キャリア

平成 26 年度に得られた結果を踏まえて、平成 27 年度では、まず、光増感剤の導入量をさらに高めた高分子キャリアとして、高分子ミセル型のキャリアの設計と作成を行った。腫瘍関連マクロファージを標的とした高分子ミセル型キャリアの作成にあたっては、親水性 PEG と疎水性ポリアスパラギン酸誘導体を連結させたブロック共重合体と光増感剤を有機溶媒に溶解し、透析法により光増感剤内包高分子ミセルを調製し、その後、PEG 末端へ M2-peptide を導入した。また、コントロールとして M2-peptide を導入しない、表層がメトキシ基となる高分子ミセルも調製した。それぞれのミセルの粒径を動的光散乱により測定したところ、約 60 nm のサイズを示すことが分かった(図 1)。

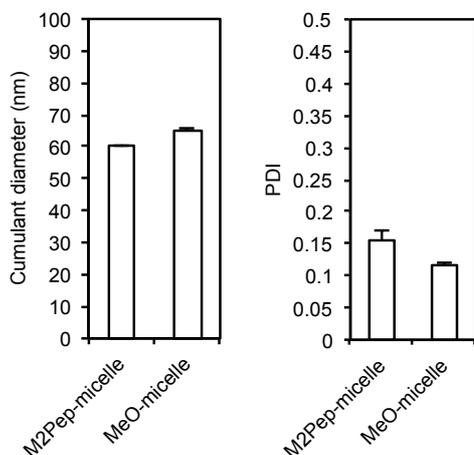


図 1. 動的光散乱により測定した M2-peptide 結合高分子ミセル (M2Pep-micelle) とメトキシ高分子ミセル (MeO-micelle) の粒径.

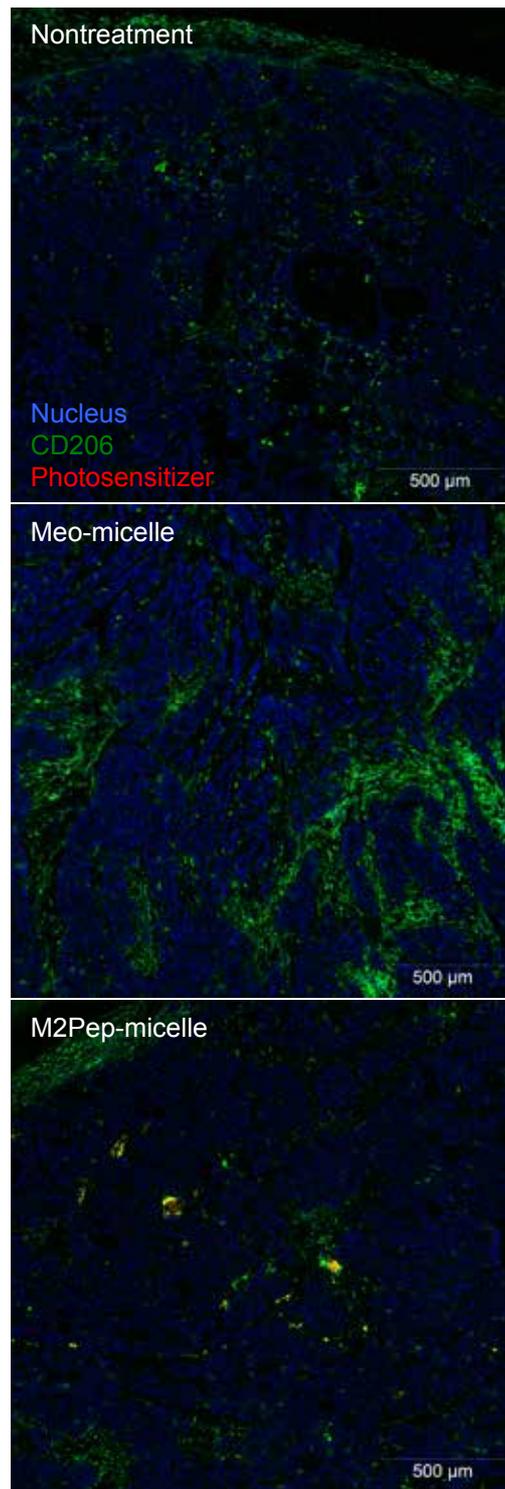


図 2. マウス皮下のヒト膵臓がん腫瘍の切片. メトキシ高分子ミセル (MeO-micelle), M2-peptide 結合高分子ミセル (M2Pep-micelle) を静脈投与してから 24 時間後に腫瘍を取り出し、凍結切片を作成した後、免疫染色を行った. 青: Hoechst33342, 緑: CD206 (マクロファージマーカー), 赤: 光増感剤.

(3) in vitro, in vivo 試験

腫瘍関連マクロファージ標的高分子ミセルを培養マクロファージと接触させた結果、高分子キャリアが培養マクロファージに取り込まれることがフローサイトメトリーにより確認された。

続いて、高分子ミセルを、ヒト膵臓がん皮下腫瘍マウスモデルに静脈注射したところ、高分子ミセルが腫瘍内に効率的に集積することが見出された。また、その腫瘍から凍結切片を作成し免疫染色した結果、光増感剤が腫瘍内マクロファージに効率的に送達されていることが明らかとなった（図2）。

以上の結果から、本研究で開発した高分子ミセルは、腫瘍関連マクロファージをターゲットとするデリバリーシステムのプラットフォームになり得ることが示唆された。

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1件)

Nomoto T., Fukushima S., Kumagai M., Miyazaki K., Inoue A., Mi P., Maeda Y., Toh K., Matsumoto Y., Morimoto Y., Kishimura A., Nishiyama N., Kataoka K. Calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid nanocarriers with pH-responsive on/off switch for photodynamic therapy. *Biomater. Sci.* 4, 826-838 (2016). 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 野本貴大、光応答性有機無機ハイブリッドナノメディシン、第18回次世代医工学研究会、東京、2016年1月29日
2. 野本貴大、福島重人、熊谷康顕、町谷香織、松本有、大庭誠、長田健介、西山伸宏、片岡一則、全身投与後の光選択的遺伝子導入を可能とする三層構造高分子ミセル、東京、2016年1月8日
3. T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle for light-induced gene transfer, Lahaina, Maui, Hawaii, USA, 2015年12月18日

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 貴大 (NOMOTO, Takahiro)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：00734732