

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26888014

研究課題名(和文)新規プラスチックナノメディシンによる抗腫瘍新生血管療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel plastic nanomedicine for anti-angiogenic cancer therapy.

研究代表者

小出 裕之(Koide, Hiroyuki)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：60729177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：N-isopropylacrylamide (NIPAm) を主成分とした多官能性ナノ粒子(NPs)は、官能基の導入量を最適化することで、標的生体高分子と強い結合を生み出す。本研究では、新生血管構築の主要タンパク質である vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) に相互作用を示すNPsの開発を試みた。その結果、ヘパリン類似モノマーのNPsへの過度な組み込みは、VEGF165との親和性を低下させることが明らかになった。抗VEGF-NPsが*in vitro*においてVEGF165-受容体間の相互作用を阻害し、VEGF165依存的な細胞増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Synthetic polymer hydrogel nanoparticles (NPs) capable of capturing and/or releasing target biomacromolecules are of interest as alternative bioaffinity ligands. Recently, poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAm) based NPs have been prepared with the capacity to bind and neutralize the hemolytic toxin melittin. These NPs were found to neutralize the toxicity of melittin *in vivo*. Here, we focused on developing a synthetic NP for anticancer therapy by capturing and inhibiting the vascular endothelial growth factor (VEGF). NP affinity for VEGF165 was found to be very sensitive to the relative amounts of functional monomers. An optimized NP containing sulfated N-acetylglucosamine monomers strongly inhibited VEGF165-dependent VEGFR-2 phosphorylation and cell growth *in vitro*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がん ナノ粒子 VEGF 血管新生 高分子

1. 研究開始当初の背景

合成高分子ナノ粒子 (NPs) とは、機能性モノマーがフリーラジカルランダム共重合により合成される 50~80 nm 程度の微粒子である。NPs は、機能性モノマーの性質により、標的生体高分子と水素結合、静電的相互作用、疎水性相互作用を介して結合する、いわばプラスチック人工抗体である。それぞれのモノマーの結合力は強くはないが、個々の結合をあわせることで、標的生体高分子とより強い結合を可能にする。我々はこれまでに、*N*-isopropylacrylamide (NIPAm) を主成分とし、*N*-*tert*-butylacrylamid (TBAm)、Acrylic acid (AAc)、*N,N'*-Methylenebisacrylamide (Bis) を用い、蜂毒メリチンに対する高分子 NPs を、重合時にあらかじめ標的ペプチドを加えておくインプリント技術により合成し、蜂毒メリチンに対して強く、特異的に結合する高分子 NPs の合成に成功している。インプリント技術によりつくり出した高分子 NPs は、*in vitro* においてメリチンによる赤血球の溶解を阻害した。さらに、マウスを用いた *in vivo* 検討においても、NPs が血液中にて標的ペプチドであるメリチンを認識、捕捉、そして中和することで、マウスの致死率を顕著に減少させることを明らかにしてきた。しかしながら、NPs のインプリント重合には鋳型となるタンパク質が大量に必要なため、高価なタンパク質や大量合成には不向きである。しかし我々は、タンパク質表面の組成を理解し、NPs の組成を最適化することで、非インプリント NPs においても、*in vivo* で活性を示す NPs の合成に成功している。

がんは、正常組織と比較して増殖速度が異常に早く、無限増殖するため、既存の血管からでは増殖に十分な栄養を得られない。そのため、がん細胞自身が vascular endothelial growth factor (VEGF) や fibroblast growth factor (FGF)、platelet-derived growth factor (PDGF) など多くの増殖因子を産生し、がんの周辺に新たな血管を誘導する。この現象は血管新生と言われ、1970 年代に Folkman が発見した事象である。すべての固形がんの成長は、血管新生に依存していると考えられており、血管新生を阻害することで、がんへの酸素や栄養素の供給を遮断し、がん細胞をアポトーシスに導くことができる (抗腫瘍新生血管療法)。実際に、増殖因子である VEGF に対する抗体、bevacizumab (Avastin®) は現在臨床で用いられており、また臨床試験中の抗体医薬品も数多い。血管新生は様々な増殖因子により誘導されるが、中でも VEGF-A が中心的な役割を担っていることが知られている。さらに VEGF-A は、アミノ酸数の違いにより数種類のサブタイプが存在しているが、血管新生には 165 個のアミノ酸からなる VEGF₁₆₅ による寄与が大きい。

2. 研究の目的

本研究では、プラスチック人工抗体

の新展開として、新たにヘパリン類似化合物を合成し、高分子 NPs の構成成分として加えることで、がんの増殖に必須な現象、血管新生の主要因子 VEGF に結合する新規プラスチック人工抗体を合成し、高価で不安定な抗体医薬品に変わる、安価で安定な新規がん治療薬の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子の合成

ナノ粒子はそれぞれの機能性モノマーを 50 ml の超純水に溶解後、サーファクタントである sodium dodecyl sulfate (SDS)、ラジカル発生剤である ammonium persulfate (APS) を加えて、65°C にて 3 時間、窒素存在下で反応させることで合成した。合成したナノ粒子は、4 日間透析し、精製した。粒子径及び表面電荷はゼータサイザーナノ ZS を用いて測定した。

(2) ナノ粒子と VEGF₁₆₅ の相互作用解析

それぞれのナノ粒子と VEGF₁₆₅ との相互作用は quartz crystal microbalance (QCM) を用いて解析した。QCM cell の金基板をピラン八溶液により洗浄後、3,3'-Dithiodipropionic acid (1 mM, 0.1 mL) を添加し、24 時間インキュベートした。金基板を超純水にて洗浄後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (100 mg/ml) と *N*-hydroxysuccinimide (100 mg/ml) の混合液 (1:1) を添加し、金基板に *N*-hydroxysuccinimidyl esters をはやすことで活性化した後、VEGF₁₆₅ を添加し固相化した。また、非特異的な相互作用を抑制するために、VEGF₁₆₅ 固相後に bovine serum albumin (BSA) を添加した。その後、溶液を PBS に置換し、ナノ粒子の濃度が 1.99、5.9、13.6、28.3、55.2、100.6、168.43 µg/ml となるように添加し、モニタリングした。

(3) ナノ粒子による VEGF₁₆₅ 依存的な VEGF 受容体のリン酸化及び細胞増殖抑制試験

ナノ粒子による、VEGF₁₆₅ 依存的な受容体のリン酸化及び細胞増殖の抑制に関する検討は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC をプレートに播種してから 24 時間後、成長因子及び血清非含有の培地で 12 時間インキュベート後、VEGF₁₆₅ (20 ng/mL) 及びナノ粒子を添加した。VEGF 受容体 (VEGFR-2) のリン酸化の評価には、VEGF₁₆₅ 添加から 2 時間後に細胞を溶解し、ウエスタンブロッティング法によって VEGFR-2 及びリン酸化 VEGFR-2 タンパク質の発現量を確認した。細胞増殖抑制試験に関しては、VEGF₁₆₅ 添加から 48 時間後に生細胞数を MTT assay により評価した。

(4) ナノ粒子による VEGF₁₆₅ 依存的な血管新生阻害効果

In vitro における VEGF₁₆₅ 依存的な

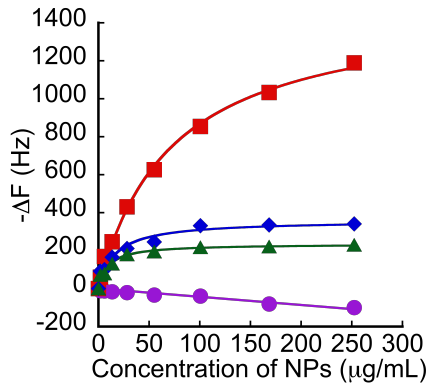


Figure 1. Quartz crystal microbalance (QCM) analysis of VEGF₁₆₅-NP interaction.

Surface of QCM was functionalized with VEGF₁₆₅ and solutions of NPs containing various amounts of 3,4,6S-GlcNAc were added to the QCM cells. Purple; 0% 3,4,6S-GlcNAc NPs, red; 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs, blue; 5% 3,4,6S-GlcNAc NPs, green; 10% 3,4,6S-GlcNAc NPs.

血管新生阻害効果は、HUVEC の遊走、浸潤及び管腔形成試験により評価した。3'-O-acetyl-2'-7'-bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorecein, diacetoxymethylester により蛍光標識した HUVEC を FluoroBlok™ Insert に播種から 24 時間後に VEGF₁₆₅ (20 ng/mL) 及び NPs (30 μg/ml) を添加し、Insert の下部に移動した細胞数を数えることで遊走能を評価した。浸潤能に関しては、Insert にマトリゲル (125 mg/insert) コートした後に、蛍光標識 HUVEC を播種し、マトリゲルを浸潤し、Insert の下部に移動してきた細胞数を数えることで評価した。

管腔形成試験は、プレートにマトリゲル (4 mg/mL) をコートした後に、HUVEC を播種した。播種直後に VEGF₁₆₅ (20 ng/mL) 及び NPs (30 μg/ml) を添加し 12 時間後の管腔形成能を評価した。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子と VEGF₁₆₅ との相互作用解析

VEGF₁₆₅ の特徴としては、配列中に受容体との結合ドメインの他に、ヘパリンとの結合ドメインを有している点あげられる。ヘパリンは高度に硫酸化された N-acetylglucosamine (GlcNAc) であり、負に帯電している。そこで、ナノ粒子の構成成分として硫酸基が結合した負電荷モノマーを組み込むことで、VEGF₁₆₅ に結合するナノ粒子が合成できるのではないかと考えた。

ナノ粒子は、NIPAm を主成分として、疎水性モノマーである TBAm、架橋剤である Bis、そして負電荷の硫酸モノマーである 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid (AS) を用い、約 100 nm のナノ粒子を合成した。ナノ粒子は、TBAm 40 mol%、Bis 2 mol% とし、AS を 0、1.7、5、10 mol% となるよう

に 4 種類合成した。また、NIPAm は AS の mol% に応じて、総 mol% が 100% となるように添加した。すると、AS の比率に関係なく、全てのナノ粒子において振動数変化 (ΔF) はみられず、AS を含むナノ粒子は VEGF₁₆₅ に対して結合性を示さなかった。つまり、硫酸基が結合したモノマーをナノ粒子に組み込んでも、必ずしも VEGF₁₆₅ に対して親和性のあるナノ粒子の開発に繋がらないことが明らかになった。そこで、よりヘパリンの構造に類似するよう糖鎖エピトープ (GlcNAc) をデザインし、その 3,4,6 位に硫酸基をつけた 3,4,6 tri-sulfate GlcNAc (3,4,6S-GlcNAc) モノマーを合成し、AS 含有ナノ粒子の場合と同様に 4 種類のナノ粒子を合成した。その結果、3,4,6S-GlcNAc を 1.7% 組み込んだナノ粒子 (1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs) が VEGF₁₆₅ に対して高い親和性を示した (図 1)。しかし、興味深いことにナノ粒子内の 3,4,6S-GlcNAc モノマー含有量を 1.7% から 5% (5% 3,4,6S-GlcNAc NPs)、10% (10% 3,4,6S-GlcNAc NPs) と増加させると VEGF₁₆₅ との相互作用が減弱していく結果が得られた。つまり、ナノ粒子内の 3,4,6S-GlcNAc の比率増加に伴い、VEGF₁₆₅ との結合が強くなるのではなく、最適な添加量が存在することが明らかになった。

(2) ナノ粒子による VEGF₁₆₅ の活性阻害

VEGF₁₆₅ は、レセプター結合ドメインを介して VEGF 受容体 (VEGFR-2) に結合することで、受容体が自己リン酸化し、細胞の増殖を促進する。しかし、VEGF₁₆₅ 配列中

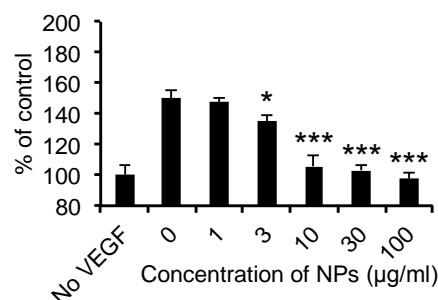


Figure 2. Inhibition of VEGF₁₆₅-dependent cell growth by 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs.

HUVECs were seed on gelatin-coated 96 well plate. Then, the culture medium was changed to endothelial basal medium-2 without fetal bovine serum and growth factors. Twelve hours after the changing of medium, the cells were treated with 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs and VEGF₁₆₅ (20 ng/mL) for 48 h. Tetracolor ONE™ was added to each well in accordance with the manufacturer's instructions. The amount of formazan formed in 3 h was measured. Significant differences: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. 0 μg/mL.

には、受容体結合ドメインとヘパリン結合ドメインが存在し、ナノ粒子はヘパリン結合ドメインに結合するように設計している。そのため、ナノ粒子が VEGF₁₆₅ に結合することで VEGF₁₆₅ と VEGFR-2 の相互作用が阻害され、細胞増殖が阻害されるとは限らない。そこで、ナノ粒子による VEGF₁₆₅ 依存的な細胞増殖抑制効果を、ヒト新生血管モデル細胞 (HUVEC) を用いて検証した。その結果、QCM を用いた相互作用解析の結果と相関するように、3,4,6S-GlcNAc モノマーの導入量が 0、5、10% のナノ粒子 (0、5、10% 3,4,6S-GlcNAc NPs) は VEGF₁₆₅ 依存的な細胞増殖を抑制しなかった。しかし、QCM にて強い相互作用を示した 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs は、コントロールであるナノ粒子未添加群と比較して有意な細胞増殖抑制能を示し、その効果は VEGF₁₆₅ 未添加群と同等の値まで抑制した (図 2)。また、ナノ粒子のみを添加した群においては、4 種類全てのナノ粒子が生細胞数に影響しなかったことから、ナノ粒子自体の毒性は低いことが示された。さらに、VEGF₁₆₅ 依存的な VEGFR-2 のリン酸化も、1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs により抑制されていることを明らかにしている (図 3)。以上より、1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs は VEGF₁₆₅ に結合し、VEGF₁₆₅ と VEGFR-2 の相互作用を阻害することで、VEGF₁₆₅ 依存的な細胞増殖を抑制することが示された。

血管新生では、内皮細胞の遊走及び細胞外マトリックスへの浸潤が重要なステップとなっている。さらに、内皮細胞による管腔形成も、新生血管構築において重要である。そこで、ナノ粒子を用いて、VEGF₁₆₅ 依存的な HUVEC の遊走、浸潤、管腔形成阻害能を評価することで、ナノ粒子の抗腫瘍新生血管効果の評価した。その結果、1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs は、VEGF₁₆₅ 依存的な HUVEC の遊走、浸潤、管腔形成を阻害することが明らかになった。以上より、ナノ粒子の抗腫瘍新生血管傷害療法への有用性が示された。

抗体医薬品は、特異性の高さや、効果については疑う余地がなく、がんだけでなく幅広い疾患に対して開発が進められている。そして、2020 年には世界の抗体医薬品市場は 500 億円にもものぼると言われており、今後更なる抗体医薬品が世に出回することは容易に推測できる。一方で、抗体製剤は開発コストの点から経済的な負担が大きくなってしまふなど、未だ改善点があるのも事実である。今後、更なる研究が進み、本研究結果が将来、高価な抗体に代わる安価な抗体製剤開発に寄与することを期待する。

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)

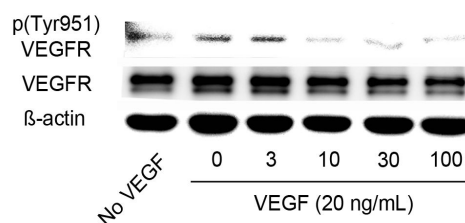


Figure 3. Inhibition of VEGF₁₆₅-dependent VEGFR(Tyr₉₅₁)-2 phosphorylation by 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs.

HUVECs were seeded onto 6 well plates and incubated overnight. Then, the culture medium was changed to EBM-2 that is not containing any growth factors and serum. Twelve hours after the medium change, cells were incubated with EBM-2 containing 20 ng/mL of VEGF₁₆₅ and different concentration of 1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs for 2 h at 37 °C. The cells were then lysed. The cell extracts were separated by SDS-PAGE. Western blotting was performed with anti-β-actin, anti-VEGF receptor-2 or anti-pVEGF receptor-2 [Tyr 951].

(1) Yoshimatsu K, Koide H, Hoshino Y, Shea KJ, Preparation of abiotic polymer nanoparticles for sequestration and neutralization of a target peptide toxin., Nat Protoc. 査読有 2015, (4): 595-604. doi: 10.1038/nprot.2015.032

(2) Koide H, Asai T, Kato H, Yonenaga N, Yokota M, Ando H, Dewa T, Nango M, Maeda N, Oku N., Susceptibility of PTEN-positive metastatic tumors to small interfering RNA targeting the mammalian target of rapamycin., Nanomedicine. 査読有 2015, (1): 185-94. doi: 10.1016/j.nano.2014.09.003.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 小出裕之 : VEGF 結合特性を有する多官能性ポリマーナノ粒子の開発とがん治療への応用、第 3 回創剤カンファレンス静岡(静岡) 講演要旨集 p.10、2014 年 12 月 12 日

(2) 有泉早紀, 小出裕之, 星野友, 西村優里, 三浦佳子, Kenneth J Shea, 奥直人, VEGF 結合ポリマーナノ粒子の抗腫瘍新生血管療法への応用、第 135 年会日本薬学会(神戸) 講演要旨集 p.98、2015 年 3 月 26 日

〔図書〕(計 1 件)

小出裕之, 奥直人, VEGF 結合能をもつナノ粒子の開発と抗腫瘍新生血管療法への応用、シーエムシー出版、ファインケミカル、2015、p22-28

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~radiobio/m>

bc/Home.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小出 裕之 (KOIDE HIROYUKI)
静岡県立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60729177