

令和元年6月6日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01935

研究課題名(和文) 生体適合性ポリマー “そのもの” を可視化するDDSイメージングの新技术開発

研究課題名(英文) Development of a New DDS Imaging Method for Visualizing Biocompatible Polymer Probes

研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA, Hisatsugu)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・講師

研究者番号：80512764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい腫瘍 DDS イメージング材料の有望な候補として、高い腫瘍集積性と腫瘍選択性を示すホスホリルコリンポリマー (PMPC) に着目し、以下の知見を得た。PMPCのホスホリルコリン構造を劇的に変更した双性イオンポリマー (PMCB, PMSB) プロブのマウス体内動態と腫瘍選択性は、細胞膜脂質の末端構造であるホスホリルコリン部位に特徴的な機能ではなく、側鎖のカチオン・アニオン対の組み合わせ・種類に大きく依存することを明らかにした。さらに、放射線増感機能を有する双性イオンポリマープロブを開発し、腫瘍への高い集積性と高い放射線増感効果を同時に達成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DDSに利用されるポリマーのほとんどは非イオン性のPEGを基盤としており、生体適合性に優れた双性イオンポリマーの腫瘍集積能に及ぼす因子については未解明であった。本研究から、双性イオンポリマーのマウス体内動態と腫瘍選択性は、細胞膜脂質の末端構造に特徴的な機能ではなく、側鎖の双性イオン対の組み合わせ・種類に大きく依存することが明らかとなった。これにより、腫瘍選択性および腫瘍集積性に優れた双性イオンポリマーを基軸としたDDSイメージング材料を開発する上で重要な分子設計指針が得られた。この知見が、腫瘍の診断と治療を同時に達成する腫瘍DDSイメージングの新材料の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have tried to develop a new DDS imaging method using self-traceable zwitterionic polymer probe and multiple-resonance MRI. We have already developed a self-traceable phosphorylcholine polymer (PMPC) probe which forms EPR-relevant, compact nanoparticles and accumulates effectively and selectively in tumor in mice, as revealed by multiple-resonance MRI. In order to shed light on the structure-activity relationship of PMPC, we pay attention to related zwitterionic polymer probes having carboxybetaine (PMCB) or sulfobetaine (PMSB). Physicochemical and pharmacokinetic studies on these probes revealed that PMSB exhibits far less pronounced tumor selectivity for mice, as compared with PMPC and PMCB. This work suggests that selection of betaine type is important for the tumor selectivities of the polymers. We also revealed that a zwitterionic copolymer with a radio-sensitizing unit significantly enhances the radiation sensitivity of tumor in tumor-bearing chicken eggs.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生体適合性ポリマープロブ DDS 生体イメージング 分子プロブ 放射線増感 磁気共鳴イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生体深部での薬物送達 (DDS: Drug Delivery System) を”その場”で画像モニタリングできる DDS イメージングは重要な課題である。生体適合性に優れた合成ポリマーは、バイオマテリアルの分野、特に DDS のキャリア分子として活発に研究されてきた。DDS にイメージング機能を加えるためには、生体適合性ポリマーを放射性的遷移金属錯体や蛍光分子などでラベルする必要があるが、このラベル化により DDS 材料がもつ本来の体内動態が変化するという問題が指摘されていた。DDS に適用可能な生体適合性ポリマー ”そのもの” を可視化することができれば、その意義は極めて大きいと考えられる。

研究代表者はこれまで、低侵襲性で生体深部の情報が得られる MRI 技術の革新的高度利用法の開発に関する研究を進めてきた (*ACS Chem. Biol.* **2012**, 7(3), 535–542; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(2), 799–806; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2675–2678; *Sensors* **2015**, 15(12), 31973–31986)。一連の研究過程で開発に成功した「多重共鳴 MRI 法」は、生体深部での ”安定同位元素ラベル化プローブ” の機能を低侵襲かつ選択的に可視化・画像化することが可能である。本手法では、 $^1\text{H}$  核の磁気共鳴シグナルを  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$  と移動させ、最終的に発生した  $^1\text{H}$  シグナルを観測する。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  という結合は生体内に極わずかであるため、内在性夾雑物の中から、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  で二重ラベルしたプローブ由来の  $^1\text{H}$  核 ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  の  $^1\text{H}$  核) のみを高精度に画像化することができる。研究代表者は、細胞膜脂質の一部であるホスホリルコリン骨格を  $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$  でラベルした双性イオンポリマー ( $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) プローブを開発し、本プローブが腫瘍に極めて効率よく集積する様子 (腫瘍集積率: ca. 30%ID) を多重共鳴 MR 画像化することに成功した。この PMPC の高い腫瘍選択性は、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果の発現に適したコンパクトな分子サイズを有することに加え、異物認識を逃れる高い生体適合性を有することに起因すると考えられるが、その構造-活性相関に関しては、未解明な点が残されていた。

他方、腫瘍への DDS によく用いられる両親媒性 (疎水性/親水性) ポリマーとして、疎水性自己会合した高分子ミセル、またはナノゲルなどが用いられてきた。しかしながら、いずれも非イオン性のポリエチレングリコール (PEG) を基盤としており、生体適合性に優れた双性イオンポリマーを活用した腫瘍 DDS イメージングプローブの例はほとんどない。

従って、「多重共鳴 MRI 法」の超選択性を応用し、生体適合性に優れた双性イオン構造を基盤とした“安定同位元素ラベル化双性イオンポリマー”の DDS 化が可能となれば、腫瘍 DDS イメージングの新しいコンセプトが実現できると考えた。

## 2. 研究の目的

このような背景を踏まえ、本研究では、生体適合性に優れた双性イオン構造を基盤とした“安定同位元素ラベル化双性イオンポリマー”を多重共鳴 MRI で可視化できる新しい腫瘍 DDS イメージング材料および手法の構築を究極の目標とした。それに向けて、まず本研究課題では検討項目として下記の3つを設定した。高い腫瘍集積性を示す双性イオンポリマープローブの分子設計指針を得るため、(1) 膜脂質構造であるホスホリルコリンの構造を劇的に変更した双性イオンポリマープローブの探索、(2) 各種双性イオンポリマープローブの体内動態・腫瘍選択性に及ぼすベタイン側鎖の構造的影響の解明、さらに (3) 双性イオンポリマーを基軸とした新規放射線増感剤の開発と DDS イメージングプローブへの展開である。

## 3. 研究の方法

### (1) 膜脂質構造であるホスホリルコリンの構造を劇的に変更した双性イオンポリマープローブの探索

双性イオン型ポリマープローブの腫瘍選択性は、分子サイズの精密制御と双性イオン対構造に起因すると予想される。そこで、高い腫瘍集積性を有する双性イオンポリマープローブの分子設計指針を得るため、膜脂質構造であるホスホリルコリンのベタイン性に着目した。まず、PMPC のホスホリルコリン (リン酸-アンモニウムベタイン) 構造を劇的に変更した、カルボキシベタイン部位 (アンモニウム-カルボン酸ベタイン) およびスルホベタイン部位 (アンモニウム-スルホン酸ベタイン) を側鎖にもつポリマーを新たに設計・合成する。

### (2) 双性イオンポリマープローブの体内動態・腫瘍選択性に及ぼすベタイン側鎖の構造的影響の解明

末端に近赤外蛍光色素を導入した3種の双性イオン型ポリマープローブのマウス体内動態および腫瘍選択性を *in vivo* 蛍光イメージング法を用いて比較することにより、双性イオン型ポリマーのベタイン側鎖構造の重要性について検討する。

### (3) 双性イオンポリマーを基軸とした新規放射線増感剤の開発と DDS イメージングプローブへ

## の展開

高い生体適合性と高い腫瘍選択性を示すことが明らかになった双性イオンポリマーを基本骨格とし、放射線治療効果をも高める放射線増感剤と双性イオンポリマーとの複合化を検討する。マウス大腸癌細胞を漿尿膜上に移植した担癌発育鶏卵を用いて、本材料の放射線増感効果を評価する。十分な増感効果が得られた材料に安定同位元素 ( $^{13}\text{C}$  核) を導入することにより、多重共鳴 MRI で画像化可能な新規 DDS イメージング材料への展開を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 膜脂質構造であるホスホリルコリンの構造を劇的に変更した双性イオンポリマープローブの探索

原子移動ラジカル重合 (ATRP) により3種類の双性イオン型ポリマー (PMPC、PMCB、PMSB) を合成した後、スクシンイミジル基を有する近赤外蛍光色素 800RS との反応により、ポリマー末端に 800RS を導入した3種類の新規双性イオン型ポリマープローブ (800RS-PMPC、800RS-PMCB、800RS-PMSB) の合成に成功した (図1)。各プローブの粒径を動的光散乱 (DLS) 法により測定した結果、いずれのプローブも 10~12 nm の粒径を示した。さらに、各プローブのウシ血清アルブミン (BSA) に対する結合能について、水晶共振子マイクロバランス (QCM) 法により評価した結果、いずれのプローブの BSA への吸着量は検出限界以下であった。これらの結果から、3種類の双性イオン型ポリマー PMPC、PMCB、PMSB は、いずれも非会合性のコンパクトなナノ粒子を形成し、高い生体適合性を示すことが明らかとなった。

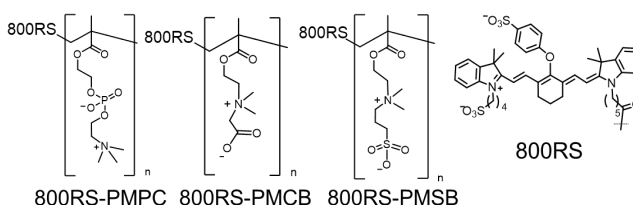


図1 近赤外蛍光色素800RSを導入した双性イオンポリマープローブの構造

### (2) 双性イオンポリマープローブの体内動態・腫瘍選択性に及ぼすベタイン側鎖の構造的影響の解明

双性イオンポリマープローブのベタイン側鎖構造が体内動態および腫瘍集積性に及ぼす影響を明らかにするため、マウス大腸癌細胞 colon 26 を右肩に担癌したマウスに、3種のプローブをそれぞれ尾静脈投与し、48時間後にマウス全身の *in vivo* 蛍光イメージングを行った。その結果、800RS-PMPC および 800RS-PMCB を投与したマウスの腫瘍部位からは、プローブ由来の強い蛍光発光が確認されたのに対し、800RS-PMSB を投与した場合の腫瘍部位の蛍光強度は微弱であった (図2)。

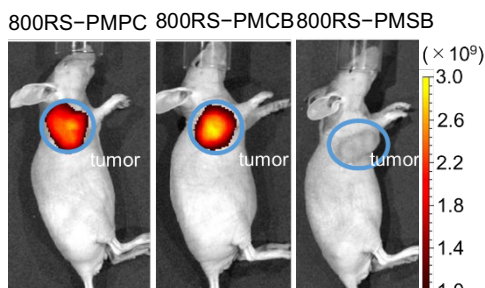


図2 双性イオンポリマーを投与した担癌マウスの *In vivo* 蛍光画像。

次に、3種のプローブのマウス体内動態について検討した結果、800RS-PMPC および 800RS-PMCB に比べ、800RS-PMSB は血中から速やかにクリアランスされ、血中滞留性が極めて低いことが明らかになった。一方、プローブの尿中排泄量には顕著な差はなかった。さらに、プローブの臓器分布を調べた結果、800RS-PMPC および 800RS-PMCB では、肝臓への蓄積は抑制され、腫瘍への選択的な集積が確認された。一方、800RS-PMPC では、腫瘍選択的な集積量が大きく低下し、おもに肝臓と脾臓に蓄積した (図3)。

すなわち、800RS-PMPC プローブだけでなく、800RS-PMCB も優れたマウス体内動態、生体適合性、および腫瘍選択性を示したが、他方、800RS-PMSB の血中滞留性および腫瘍選択性は著しく低いという結果を得た。

この結果により、双性イオン型ポリマープローブのマウス体内動態と腫瘍選択性は、細胞膜脂質の末端構造であるホスホリルコリン部位に特徴的な機能ではなく、ベタイン側鎖のカチオ

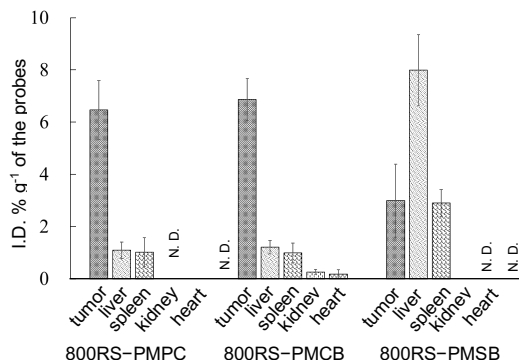


図3 担癌マウス内の双性イオンポリマーの体内分布 (投与48時間後)。

ン-アニオン対の組み合わせ・種類に大きく依存するという非常に興味深い結果が示唆された。

### (3) 双性イオンポリマーを基軸とした新規放射線増感剤の開発と DDS イメージングプローブへの展開

腫瘍組織には酸素の供給が行き届いていない低酸素領域が存在し、放射線治療に対する感受性を低下させ、腫瘍の悪性度や転移能を高めることが知られている。腫瘍低酸素領域に対し、放射線治療の抗腫瘍効果を向上させるため、これまで種々の放射線増感剤が開発されてきた。しかしながら、従来の小分子放射線増感剤は腫瘍への選択性および集積性が低く、その有効性は限定的であった。これは、増感剤の構造が腫瘍集積に最適化されていないこと、あるいは、増感剤の生体適合性や生物学的利用能が十分でないことなどが主な原因であると考えられている。

そこで、本テーマでは、上述の双性イオンポリマー PMPC を基本骨格とする新規放射線増感剤を開発するとともに、多重共鳴 MRI で腫瘍を可視化する DDS イメージングプローブへの展開を目的とし、放射線増感機能性部位である 2-ニトロイミダゾール (NI) 基を導入した PMPC-NI コポリマーの分子設計を行い、ATRP 法と Huisgen 環化反応を用いて、ポリマー側鎖に NI 基が導入された PMPC-NI コポリマーの合成に成功した (図 4)。

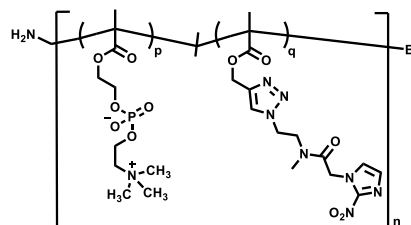


図 4 PMPC-NI コポリマーの構造。

次に、colon 26 を担癌した発育鶏卵を用いて PMPC-NI コポリマーの放射線増感効果を評価した (図 5)。担癌発育鶏卵に、PMPC-NI コポリマー (70 nmol/egg) を静脈投与し、6 時間後に X 線 (2 Gy) を照射した。いずれの鶏卵も約 80%以上の生存率を示し、PMPC-NI コポリマーは急性毒性を示さないことがわかった。X 線照射 3 日後に、腫瘍を摘出し、その重量を測定することにより、腫瘍の増殖抑制効果を評価した。その結果、PMPC-NI コポリマーを投与した鶏卵腫瘍は未投与群と比較して増殖が顕著に抑制され、その増殖抑制効果は、従来の増感剤であるエタニダゾールを高濃度投与 (14  $\mu$ mol/egg) した場合に匹敵した。すなわち、PMPC-NI コポリマーは従来増感剤に比べて、約 1/200 の低投与量でも顕著な放射線増感効果を発揮することが明らかとなった。



図 5 発育鶏卵にマウス腫瘍を移植した腫瘍移植鶏卵モデルの作成。

以上の結果から、腫瘍選択性および腫瘍集積性に優れた双性イオンポリマーを基軸とした放射線増感剤・DDS イメージング材料を開発するための重要な分子設計指針が得られた。今後、PMPC-NI コポリマーの側鎖ホスホリルコリン部位に  $^{13}\text{C}$  核を導入した PMPC-NI コポリマーを利用することにより、多重共鳴 MRI を用いる腫瘍の診断と放射線治療が同時に可能な腫瘍 DDS イメージング材料への展開が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- (1) Kondo, T.; Kimura, Y.; Yamada, H.; Aoyama, Y. "Polymeric  $^1\text{H}$  MRI Probes for Visualizing Tumor *In Vivo*" *Chem. Rec.* **2017**, *17*(6), 555–568. DOI: 10.1002/tcr.201600144. (査読あり)
- (2) Shinohara, Y.; Endo, Y.; Abe, C.; Shiba, I.; Ishizuka, M.; Tanaka, T.; Yonemura, Y.; Ogura, S.; Tominaga, M.; Yamada, H.; Uto, Y. "Development of a Novel Schiff Base Derivative for Enhancing the Anticancer Potential of 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy" *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *20*, 182–188. DOI: 10.1002/j.pdpdt.2017.10.014. (査読あり)
- (3) Yamada, H.; Kameda, T.; Kimura, Y.; Imai, H.; Matsuda, T.; Sando, S.; Toshimitsu, A.; Aoyama, Y.; Kondo, T. " $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched L-Dopa as a Triple-Resonance NMR Probe to Monitor Neurotransmitter Dopamine in the Brain and Liver Extracts of Mice" *ChemistryOpen* **2016**, *5*(2), 125–128. DOI: 10.1002/open.201500196. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 14 件)

- (1) 小巻尚紀・山田久嗣・木村祐・孫安生・山東信介・青山安宏・近藤輝幸、"ベタイン型ポリマープローブを用いる腫瘍選択的蛍光イメージング: ベタイン構造に依存した体内動態および腫瘍選択性の検討"、第 98 回日本化学会春季年会 (日本大学船橋キャンパス、千葉県、船橋市、3 月 20 日、2018 年)
- (2) 宮崎豊久・楠橋由貴・羽生紋佳・嶋田宏輝・山田久嗣・近藤輝幸・宇都義浩、"2-ニトロイミダゾール基を導入した新規ホスホリルコリンポリマーの合成と機能評価"、第 98 回日本化学会春季年会 (日本大学船橋キャンパス、千葉県、船橋市、3 月 21 日、2018 年)

- (3) 小巻尚紀・山田久嗣・松本夏季・木村祐・孫安生・青山安宏・近藤輝幸、”腫瘍選択性因子の解明に向けた新規カルボキシベタイン型ポリマープローブの開発と構造・体内動態”、第12回日本分子イメージング学会学術集会 (横浜大榎橋ホール、神奈川県、横浜市、5月26日、2017年)
- (4) 小巻尚紀・山田久嗣・松本夏季・木村祐・孫安生・青山安宏・近藤輝幸、”新規ベタイン型ポリマープローブの合成と機能評価”、第97回日本化学会春季年会 (慶応大学日吉キャンパス、神奈川県、横浜市、3月16日、2017年)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：近藤 輝幸

ローマ字氏名：(KONDO, Teruyuki)

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院工学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：20211914

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。