

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08600

研究課題名(和文) 活性酸素消去による転移性前立腺癌治療を目指した体内動態制御型白金ナノ粒子の創製

研究課題名(英文) Development of delivery system of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers for the treatment of metastatic prostate cancer

研究代表者

勝見 英正 (Katsumi, Hidemasa)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30434666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、効率的な活性酸素消去による転移性前立腺癌治療法の構築を目指して、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な金属ナノ粒子の体内動態制御法ならびに前立腺癌細胞への取り込み促進法を確立した。すなわち、活性酸素消去能を有する白金ナノ粒子に金を混合した合金粒子を調製することでナノ粒子表面にポリエチレングリコール(PEG)などの体内動態制御を目的とした機能性分子を導入する方法を構築することに成功した。また、前立腺癌で選択的にPEGがナノ粒子から脱離することで、ナノ粒子の前立腺癌細胞への取り込みが促進するシステムの構築にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are involved in the metastatic prostate cancer. To prevent metastatic prostate cancer, we developed polyethylene glycol (PEG) modified platinum-gold alloy nanoparticles, which exhibited ROS-scavenging activities and high plasma retention after intravenous injection. The high plasma retention of nanoparticles with PEG modification has some advantages for the targeted delivery of nanoparticles to the prostate tumor through enhanced permeability and retention (EPR) effect. However, the cellular uptake by prostate cancer cells could be limited by steric hindrance of PEG after the delivery of nanoparticles. Therefore, to enhance the cellular uptake and efficacy of nanoparticles in prostate cancer cells, we developed a prostate cancer-specific cleavable PEG system using PSA-sensitive cleavable peptide. These technologies are promising approaches for preventing metastatic prostate cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬学 薬剤学 薬物送達システム ナノ粒子 白金 前立腺癌 化学修飾

1. 研究開始当初の背景

近年、前立腺癌は検診方法の普及、診断能の向上、食生活の欧米化、人口の高齢化などにより罹患率、死亡率ともに増加傾向にある。また、厚生労働省の調査では近年の推計年間患者数は18万人を超えており、男性がんの中で患者数は第1位となっていることからその対策は急務である。

前立腺癌の進展及び病態には、男性ホルモンであるアンドロゲンとその受容体であるアンドロゲンレセプターが深く関与していることから、前立腺癌治療においてはアンドロゲングナルを抑制する内分泌療法(去勢治療、抗アンドロゲン剤)が広く行われている。特に有転移患者においては、外科的手術は不可能であるため内分泌療法が第一選択となるが、それらの患者の多くは数年後に内分泌療法に対する耐性を示し、去勢抵抗性前立腺癌に移行する。現在の医療においては、去勢抵抗性前立腺癌に対する治療法はドセタキセルを用いた抗癌化学療法のみでありその予後は極めて悪いのが現状である。このような背景から、これまでも去勢抵抗性前立腺癌に対する様々な新薬の開発が試みられてきたが、生存期間延長効果はいずれも数ヶ月程度であり効果も限定的である。したがって、転移性前立腺癌における去勢抵抗性に対する問題は抜本的に解決されておらず、転移性前立腺癌に対する革新的な治療法の実現が強く望まれる。

近年、転移性前立腺癌の進展、病態及び去勢抵抗性獲得に活性酸素種が深く関与していることが報告されている。活性酸素には、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなど様々な種類があり、これら活性酸素が癌転移を促進する接着分子やタンパク分解酵素などの多くのメディエーターの発現を亢進することにより癌細胞の浸潤・転移能を増強することが明らかとされつつある。また、これら活性酸素による慢性的な酸化ストレスによって、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞が去勢抵抗性前立腺癌へと変化すること、さらに、酸化ストレスによってアンドロゲンレセプターの発現が誘導されることが報告されている。したがって、こうした活性酸素を消去可能な抗酸化剤を医薬品として体外から投与し、癌転移を促進するメディエーターやアンドロゲングナルを複合的に阻害することによる効率的な転移性前立腺癌治療が期待されている。これまでも、低分子の抗酸化剤であるN-acetyl-cysteineなどを投与することによる治療効果が報告されているが、これらの既存の抗酸化剤は特定の活性酸素種のみを消去するものが多く、その効果も一過性である。また、投与後の抗酸化剤の血中からの消失は比較的速く、治療に十分量の抗酸化剤を標的部である前立腺癌細胞に送達させるのが困難である。

一方、溶液中に白金を安定に分散させた白

金ナノ粒子は、1)触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能であること、2)体内動態制御による前立腺癌細胞への高い送達を実現することで、白金ナノ粒子を利用した効率的な転移性前立腺癌治療が期待できる。

これまでに筆者らは、様々な活性酸素種に対して優れた活性酸素消去能を有する白金ナノ粒子を開発することに成功し、その白金ナノ粒子が静脈内投与後、肝臓に選択的に分布することを報告した(引用文献1)。しかし、本研究の転移性前立腺癌を標的とする場合には、原発巣が前立腺に存在すること、転移好発部位が骨であることを考慮すると、白金ナノ粒子の肝臓選択的な体内動態特性は不都合となり、治療効果を得るには化学修飾による体内動態制御のアプローチが必要不可欠となる。また、白金ナノ粒子の癌細胞への取り込みの観点では、体内動態制御のための化学修飾は、病巣部位送達後、プロドラッグのように病巣部位の酵素などにより切断され粒子表面上から外れることが好ましいと考えられる。そこで本研究では、白金ナノ粒子の前立腺癌細胞選択的送達とその局所での優れた細胞内取り込みを同時に実現する化学修飾技術を開発し、前立腺癌治療に有用な体内動態制御型白金ナノ粒子の創製を試みる。

2. 研究の目的

近年、患者数が急増している転移性前立腺癌は、標準治療である内分泌療法に対する耐性(去勢抵抗性)が治療上大きな問題となっており耐性獲得後の有効な治療法も限られることから、その新規治療法の実現が切望される。本研究は転移性前立腺癌の進展、病態及び去勢抵抗性獲得に活性酸素が深く関与している点に着目し、触媒反応を利用して様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な白金ナノ粒子の体内動態制御による転移性前立腺癌の治療法の構築を目的とするものである。前立腺癌選択的に優れた活性酸素消去能を示す金属ナノ粒子を開発し、転移性前立腺癌治療への応用の可能性について検証する。

3. 研究の方法

(1) 白金ナノ粒子の作製

塩化白金イオンに対してクエン酸及びアスコルビン酸を水中で反応させることにより作製した。

(2) 合金(金属)ナノ粒子の作製

テトラクロリド金(III)酸、テトラクロリド白金(II)酸カリウムに対してクエン酸及びアスコルビン酸を水中で反応させることにより作製した。

(3) ポリエチレングリコール(PEG)修飾金属ナノ粒子の作製

(2)で調製した金属ナノ粒子に、PEG-SHを添加することでPEG修飾金属ナノ粒子を得た。

(4) 金属ナノ粒子の活性酸素消去能の評価
スーパーオキシドアニオン消去能：スーパーオキシドアニオンに対する消去効率を化学発光法を用いて評価した。すなわち、キサンチン及びキサンチンオキシダーゼの混合溶液に金属ナノ粒子を添加し、溶液中のスーパーオキシドアニオンの減少量を指標にスーパーオキシドアニオンに対する消去能を評価した。

過酸化水素消去能：過酸化水素に対する消去効率を過酸化水素特異的検出プローブである BES-H2O2 を用いた蛍光プローブ法により評価した。すなわち、過酸化水素溶液に金属ナノ粒子を添加し、溶液中の過酸化水素の減少量を指標に過酸化水素に対する消去能を評価した。

ヒドロキシラジカル消去能：ヒドロキシラジカルに対する消去効率をヒドロキシラジカル特異的検出プローブ HPF を用いた蛍光プローブ法により評価した。すなわち、紫外線照射下、過酸化水素溶液に金属ナノ粒子を添加し、溶液中のヒドロキシラジカルの減少量を指標にヒドロキシラジカルに対する消去能を評価した。

(5) 体内動態特性の評価

マウスに金属ナノ粒子を静脈内投与した後、経時的に血漿ならびに各主要臓器を回収し、サンプル中白金量を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いて測定した。

(6) Prostate cancer-specific cleavable PEG システムの開発

前立腺癌が分泌する酵素 (PSA) により選択的に切断されるペプチドを介して PEG とナノ粒子を結合させることで、PSA 特異的に PEG が粒子表面から脱離するシステムを設計した。すなわち、PEG-NHS にリジンのアミノ基を Dde で保護したペプチドのアミノ基末端を結合し脱保護した後、脂質を介してモデルナノ粒子に結合させた。

4. 研究成果

本研究では、活性酸素消去能を有する金属ナノ粒子の体内動態制御を目的として、金属ナノ粒子への化学修飾法の開発に取り組んだ。すなわち、独自に開発した活性酸素消去能を有する白金ナノ粒子への化学修飾を試みた。様々な官能基を利用して白金ナノ粒子への PEG などの機能性分子の導入を試みたが、白金は反応性に乏しく導入効率が極めて低かった。そこで、様々な官能基との反応性に優れる金と白金の合金粒子を作製し、金を介した化学修飾法を新たに開発した。すなわち、合金粒子へ PEG 誘導体を添加したところ、合金粒子表面に高効率に PEG が結合した PEG 修飾合金ナノ粒子が得られた。以上のように金との合金ナノ粒子を調製することで、金属ナノ粒子表面に機能性分子を導入する方法を

新たに構築することに成功した。

調製した PEG 修飾合金ナノ粒子の粒子径は約 40 nm であり、化学発光法ならびに蛍光プローブ法を利用した活性酸素消去能評価において、PEG 修飾合金ナノ粒子は未修飾合金ナノ粒子とほぼ同等の消去能を示した。これらのことから、合金粒子には様々な活性酸素に対して消去活性があり、その消去活性は機能性分子の修飾の影響を受けないことが示された。

マウス静脈内投与後の体内動態について評価したところ、未修飾金属ナノ粒子はマウス尾静脈内投与後、速やかに肝臓中へ移行し、投与量の 80%以上が肝臓中へ集積した。これは肝臓のクッパー細胞へ取り込まれたことによるものと推察される。一方、PEG 修飾金属ナノ粒子は、静脈内投与後、高い血中滞留性を示し緩やかに血中から消失した。PEG が形成する水和層が金属粒子表面を覆うことによりクッパー細胞への取り込みが抑制されたことによるものと考えられる。PEG 修飾による血中滞留性の向上により、enhanced permeation and retention (EPR) 効果を介した前立腺癌への金属ナノ粒子の送達効率が促進されるものと期待される。このような、活性酸素消去能を有する金属ナノ粒子の化学修飾法による体内動態制御はこれまで、ほとんど報告例がないことから、本研究で開発した化学修飾法は、効率的な活性酸素消去を目的とした金属ナノ粒子の DDS 開発に対して有用な基盤技術になるものと考えられる。

一方、PEG 修飾は血中滞留性を向上するものの、PEG 鎖による立体障害により癌細胞内への取り込みには不利に働く。そこで次に、前立腺癌において、PEG 修飾ナノ粒子の細胞内取り込みが増強するシステムの構築を目指して、前立腺癌で選択的に PEG がナノ粒子から脱離する prostate cancer-specific cleavable PEG システムの構築を試みた。前立腺癌が分泌する酵素 (PSA) により選択的に切断されるペプチドを介して PEG とナノ粒子を結合させることで、PSA 特異的に PEG が粒子表面から脱離するシステムを設計した。PEG-NHS にリジンのアミノ基を Dde で保護したペプチドのアミノ基末端を結合し脱保護した後、脂質を介してモデルナノ粒子に結合させた。反応効率を向上させる反応条件や保護基の種類などを工夫して、安定に合成可能な合成プロトコルを確立した。本ナノ粒子の粒子径や表面電荷は、通常の PEG 修飾を施したナノ粒子とほぼ同等であり、ペプチド導入による顕著な物性変化は認められなかった。これらナノ粒子の細胞内取り込みについて評価したところ、本ナノ粒子の前立腺癌細胞 (LNCap 細胞) への取り込みは通常の PEG 修飾を施したナノ粒子と比較して有意に高く、癌細胞増殖に関与する分子の発現も顕著に抑制した。以上のように、prostate cancer-specific cleavable PEG システムを開発することで、ナノ粒子の細胞内取り込み

促進により粒子の機能を増強することに成功した。

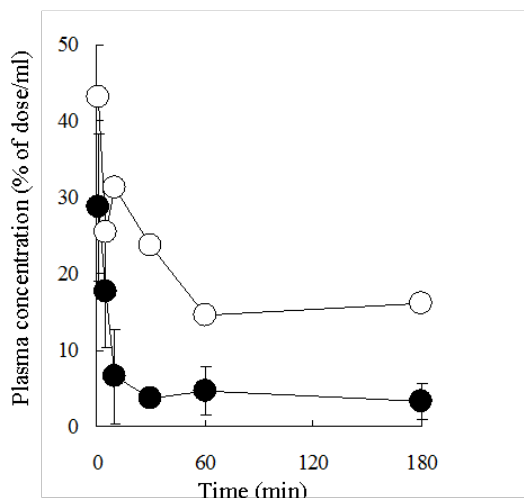
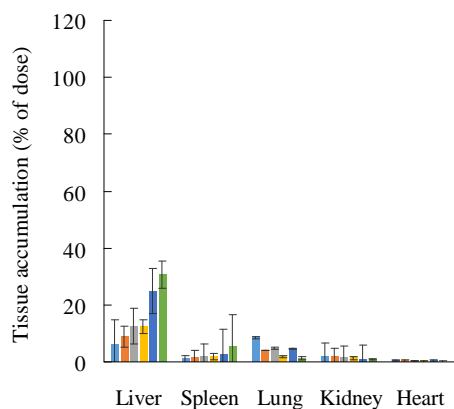


図 1 金属ナノ粒子のマウス静脈内投与後の血漿中濃度

、PEG 修飾金属ナノ粒子；、金属ナノ粒子 マウスに各種金属ナノ粒子を静脈内投与した後、経時的に血液を回収し、血漿中白金量を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いて測定した。

A



B

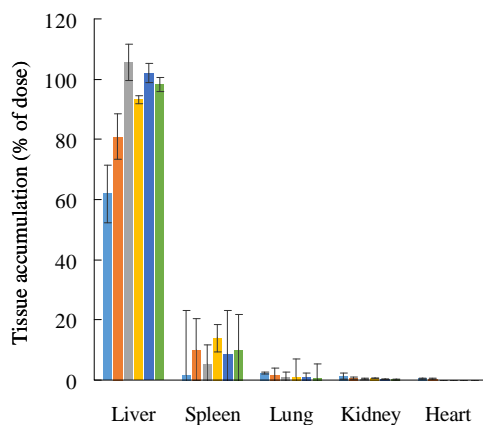


図 2 金属ナノ粒子のマウス静脈内投与後の臓器分布 (A)PEG 金属ナノ粒子, (B)金属ナノ粒子

■ 1 min ■ 5 min ■ 10 min ■ 30 min ■ 60 min ■ 180 min

マウスに各種金属ナノ粒子を静脈内投与した後、経時的に各主要臓器を回収し、サンプル中白金量を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いて測定した。

<引用文献>

Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto 他 Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Metallomics* 6、2014、1050-1056 DOI: 10.1039/c4mt00018h

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)

[学会発表](計 件)

勝見英正、山本 昌 他 Prevention of endotoxin-induced acute lung injury by intrapulmonary administration of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers 42th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2015年07月26日~29日 Edinburgh (UK)

勝見英正、山本 昌 他 Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on peritoneal dissemination of tumor cells. 2016年07月17日~20日 43th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Seattle (USA)

勝見英正、山本 昌 他 Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on hepatic metastasis 2017年5月21~24日 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017, Stockholm (Sweden)

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝見 英正 (KATSUMI, Hidemasa)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30434666

(2)研究分担者

山本 昌 (YAMAMOTO, Akira)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00166779