

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82731

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12534

研究課題名(和文) ビタミンCにより活性化される酸化型高分子ミセルを用いた超選択的がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of super-selective cancer therapy by utilizing vitamin C-activatable oxidized polymeric micelles

研究代表者

持田 祐希 (Mochida, Yuki)

公益財団法人川崎市産業振興財団(ナノ医療イノベーションセンター)・川崎市産業振興財団・主任研究員

研究者番号：60739134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白金抗がん剤を内包する高分子ミセルを酸化処理することにより、副作用を抑えながら高い制がん効果を示すことのできる新規酸化型高分子ミセルを開発することに成功した。この酸化型ミセルは、正常組織に対する抗がん剤の分布を最小限に抑えながらも、極めて高い血中滞留性とそれに起因する高いがん組織集積性を示すことが確認され、大腸がんの疾患モデルに対して高い抗腫瘍効果を示した。さらに、この酸化型高分子ミセルとビタミンCの静脈投与を併用することにより、さらに高い抗腫瘍効果が得られることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed novel oxidized polymeric micelles with low side effect and high anticancer efficacy by oxidizing polymeric micelles incorporating platinum anticancer drugs. These oxidized polymeric micelles showed prolonged blood circulation and increased drug accumulation in the tumor tissues, which led to significant anticancer efficacy against colon cancer models, while minimizing the distribution of the anticancer drugs to the healthy tissues. Moreover, stronger anticancer efficacy was observed when the oxidized polymeric micelles were given in combination with parenteral vitamin C.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 高分子ミセル がんの標的治療 金属錯体 酸化還元反応 ビタミンC 白金制がん剤

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤を内包する高分子ミセルのがん標的性を向上させるためには、血中における高分子ミセルの安定性を十分に高めることが必要である。金属原子の配位結合は、金属や配位子の種類によってその安定性を広範に制御できるため、高分子ミセルの架橋安定化に利用できる。我々が開発した白金抗がん剤を内包した高分子ミセルは、白金原子の配位結合によって安定化されているため高い血中安定性を有し、優れたがん標的性を示す。しかし、本ミセルも血中で徐々に分解するため肝臓や脾臓などの正常臓器に対する分布を避けることができず、副作用の観点から投与量が制限され、がんを駆逐するには至っていない。そこで、本研究では、白金原子の配位結合が酸化状態 (+IV 価) で不活性化し、還元状態 (+II 価) で活性化することに着目し、白金抗がん剤を内包した高分子ミセルの血中動態とがん集積後の薬物放出をコントロールする方法を考案した。

2. 研究の目的

(1) 金属の配位結合を架橋点とする高分子ミセルを酸化処理により不活性化することで、血中で分解しない高分子ミセルを構築し、がん組織に対する抗がん剤の集積量を飛躍的に増大させる手法を確立する。

(2) がん組織に集積した酸化型ミセルをビタミンCの静脈投与で還元活性化し、高濃度の抗がん剤で集中的にがん細胞を駆逐しながらも、その抗酸化作用により正常組織への毒性を低減する一挙両得ながん治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 白金抗がん剤と高分子の配位結合によって安定化された高分子ミセルを過酸化水素で酸化することにより、酸化型高分子ミセルを調製し、白金原子の酸化数、白金抗がん剤の内包量、ミセルの粒径分布を解析した。

(2) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの生理条件下における薬物放出挙動ならびに分解挙動を解析した。また、還元剤の存在下におけるこれらの挙動を解析した。

(3) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの細胞殺傷効果をビタミンCの添加の有無の両条件で検証した。

(4) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの生体内挙動を調べるために、血中滞留性、臓器分布、がん組織集積性を評価した。また、酸化型高分子ミセルとビタミンCの併用療法における制がん効果および副作用を検証することで、本研究のコンセプトの実証を行った。

4. 研究成果

(1) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの調製と構造解析： ポリエチレングリコール - ポリグルタミン酸ブロック共重合体と白金抗がん剤ダハプラチンを 37 で反応させることにより、ダハプラチン内包ミセルを得た。続いてダハプラチン内包ミセルを 100 等量の過酸化水素と反応させることで、酸化型ダハプラチン内包ミセルを調製し、透析と限外濾過により精製した。動的光散乱法によって粒径分布を解析したところ、酸化型ミセルは、非酸化型ミセルと同様に単分散で 29 nm の粒径を有していた(表 1)。また、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によってミセル内に担持されたダハプラチンの量を定量したところ、酸化型ミセルと非酸化型ミセルは同等の薬物担持量であることが示された。さらに X 線吸収微細構造解析を行った結果、酸化型ミセルは内包する白金原子の 59% が +IV 価、39% が +II 価の酸化数を有することが明らかになった(表 1)。

表 1 酸化型ミセルの構造

ミセル	粒径 (nm)	多分散度	%Pt (IV)
非酸化型	30	0.05	59
酸化型	29	0.07	-

(2) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの薬物放出挙動とミセル構造解離挙動： リン酸緩衝生理食塩水における白金錯体の放出挙動とミセル構造の解離挙動について ICP-MS と静的光散乱法で解析したところ、非酸化型ミセルは白金錯体を徐放しながらミセル構造の解離が緩やかに進行したのに対し、酸化型ミセルは薬物放出とミセル構造の解離が完全に抑制された(図 1・2)。ところが、72 時間後にはがん細胞内と同濃度(5 mM)のアスコルビン酸ナトリウム(ビタミンCのナトリウム塩)を加えたところ、白金錯体の放出とミセル構造の解離が速やかに進行した(図 1・2)。この結果は、酸化型ミセルはアスコルビン酸ナトリウムによって速やかに還元活性化されることを示唆する。

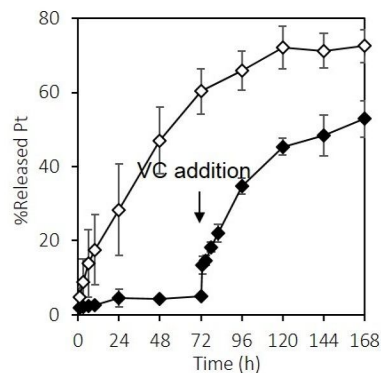


図 1 リン酸緩衝生理食塩水中における白金抗がん剤の放出挙動

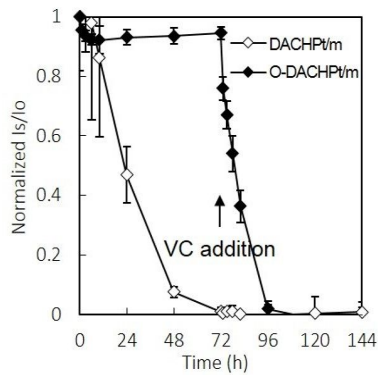


図2 リン酸緩衝生理食塩水中におけるミセル構造の解離挙動

(3) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの生物学的機能評価 (*in vitro*): ビタミンCに対して比較的強い耐性を持つマウス大腸がん細胞 (C-26) を用いて、酸化型ミセル単独ならびに酸化型ミセルとビタミンCの併用による細胞毒性を評価したところ、酸化型ミセル単独でも細胞毒性を示すことが明らかになったが、ビタミンCとの併用によりその細胞毒性が増強されることが明らかになった。

(4) 白金抗がん剤を内包する酸化型高分子ミセルの生物学的機能評価 (*in vivo*): マウスに対してC26細胞を移植することで担がんマウスを構築し、酸化型ミセルの血中滞留性、臓器分布、がん集積性を経時的に追跡したところ、酸化型ミセルは非酸化型ミセルと比べて、より長い時間血中を循環し、がん組織に対する白金抗がん剤の送達量を増大させた。一方で、酸化型ミセルは肝臓及び脾臓に対する集積を回避することが示され、がん組織選択性に優れていることが明らかになった。また、同様のモデルに対して酸化型ミセルと非酸化型ミセルの肝毒性、腎毒性、血液毒性を評価したところ、酸化型ミセルは非酸化型ミセルと比べて肝毒性と血液毒性が抑えられることが判明した。さらに、酸化型ミセルと非酸化型ミセルを同様のモデルに対して投与し、腫瘍サイズの経時変化を調べたところ、酸化型ミセルは非酸化型ミセルと比べて、非常に高い制がん効果を示すことが明らかになった (図3)。そして、ミセル投与後48時間後にアスコルビン酸ナトリウムを腹腔内投与すると、制がん効果はさらに向上することを示唆する結果が得られた (図3)。以上の結果は、ダハプラチン内包ミセルを酸化処理することで、副作用を低減しながら制がん効果を向上させることができることを示し、アスコルビン酸ナトリウムと併用することでその効果をさらに向上させることができることを示唆する。

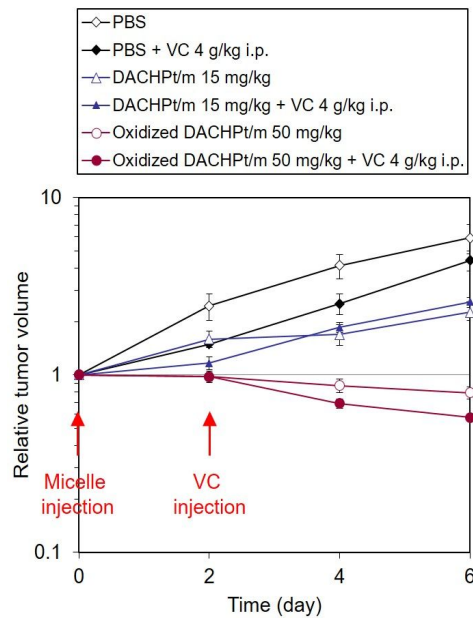


図3 酸化型ミセル及びアスコルビン酸ナトリウム併用による抗腫瘍効果

## 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8件)

P. Mi, D. Kokuryo, H. Cabral, H. Wu, Y. Terada, T. Saga, I. Aoki, N. Nishiyama, K. Kataoka, A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy. *Nat. Nanotechnol.* 11 (8) 724-730 (2016) (DOI: 10.1038/nnano.2016.72), 査読有

Y. Matsumoto, J. W. Nichols, K. Toh, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Miura, R. J. Christie, N. Yamada, T. Ogura, M. R. Kano, Y. Matsumura, N. Nishiyama, T. Yamasoba, Y. -H. Bae, K. Kataoka, Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. *Nat. Nanotechnol.* 11 (6) 533-538 (2016) (DOI: 10.1038/nnano.2015.342), 査読有

M. Wang, Y. Miura, K. Tsuchihashi, K. Miyano, O. Nagano, M. Yoshikawa, A. Tanabe, J. Makino, Y. Mochida, N. Nishiyama, H. Saya, H. Cabral, K. Kataoka, Eradication of CD44-variant positive population in head and neck tumors through controlled intracellular navigation of cisplatin-loaded nanomedicines. *J.*

*Control. Release* 230 26-33 (2016) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.03.038)、査読有

N. Dewi, P. Mi, H. Yanagie, Y. Sakurai, Y. Morishita, M. Yanagawa, T. Nakagawa, A. Shinohara, T. Matsukawa, K. Yokoyama, H. Cabral, M. Suzuki, Y. Sakurai, H. Tanaka, K. Ono, N. Nishiyama, K. Kataoka, H. Takahashi, In vivo evaluation of neutron capture therapy effectivity using calcium phosphate-based nanoparticles as Gd-DTPA delivery agent. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142 (4) 767-775 (2016) (DOI: 10.1007/s00432-015-2085-0)、査読有

J. Makino, H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, M. Wang, H. Kinoh, Y. Mochida, N. Nishiyama, K. Kataoka, cRGD-installed polymeric micelles loading platinum anticancer drugs enable cooperative treatment against lymph node metastasis. *J. Control. Release* 220 PartB 783-791 (2015) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.017)、査読有

N. Q. Vinh, S. Naka, H. Cabral, H. Murayama, S. Kaida, K. Kataoka, S. Morikawa, T. Tani, MRI-detectable polymeric micelles incorporating platinum anticancer drugs enhance survival in an advanced hepatocellular carcinoma model. *Int. J. Nanomedicine* 10 4137-4147 (2015) (DOI: 10.2147/IJN.S81339)、査読有

P. Mi, N. Dewi, H. Yanagie, D. Kokuryo, M. Suzuki, Y. Sakurai, Y. Li, I. Aoki, K. Ono, H. Takahashi, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Hybrid calcium phosphate-polymeric micelles incorporating gadolinium chelates for imaging-guided gadolinium neutron capture tumor therapy. *ACS Nano* 9 (6) 5913-5921 (2015) (DOI: 10.1021/acs.nano.5b00532)、査読有

H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto, P. Mi, H. Wu, T. Nomoto, K. Toh, N. Yamada, Y. Higuchi, S. Konishi, M. R. Kano, H. Nishihara, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers. *ACS Nano* 9 (5) 4957-4967 (2015) (DOI: 10.1021/nn5070259)、査読有

[学会発表](計10件)

Y. Mochida, Overcoming biological barriers through rational design of polymeric micelles incorporating anticancer drugs, 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017, Kawasaki City Industrial Promotion Hall, Kawasaki, Kanagawa, Japan, 2017/02/28

Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Assembly of  $\alpha$ -helical polymer chains plays a key role in tumor-targeting performance of platinum-loaded polymeric micelles, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo(ICBS2016), Ito Hall located at The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 2016/11/28

持田祐希、H. Cabral、牧野惇、三浦裕、M. Wang、西山伸宏、片岡一則、環状 RGD ペプチドを修飾した白金制がん剤内包高分子ミセルを用いたリンパ節転移/治療抵抗性がんの治療、第 65 回高分子討論会、神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県・横浜市)、2016/09/16

持田祐希、M. Wang、H. Cabral、三浦裕、西山伸宏、片岡一則、環状 RGD ペプチドを修飾した白金制がん剤内包ミセルのがん幹細胞治療への応用、第 65 回高分子学会年次大会、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)、2016/05/25

Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, A. Francesco, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Highly ordered core structure enhances drug delivery performance of polymeric micelles incorporating platinum anticancer agents, 10th World Biomaterials Congress, Montreal Convention Center, Montréal, Canada, 2016/05/19

Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, A. Francesco, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Secondary structures in the core of platinum-loaded polymeric micelles improve tumor-targeted drug delivery, 2016 international symposium on nanobiotechnology, University of California, California, USA, 2016/02/04

Y. Mochida, M. Wang, Y. Miura, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Cyclic RGD peptide-decorated

polymeric micelles for overcoming refractory cancer with enhanced stemness、第2回 COINS 国際シンポジウム "スマートヘルスケアを実現するイノベーションの最前線"、東京大学伊東国際学術研究センター（東京都・文京区）、2015/11/24

Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, A. Francesco, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Higher-order structure of poly(glutamic acid) enhances drug delivery performance of anticancer platinum-loaded polymeric micelles, The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa, Japan, 2015/10/19

持田祐希、H. Cabral、三浦裕、F. Albertini、長田健介、西山伸宏、片岡一則、白金制がん剤を内包する高分子ミセルの安定性及び機能を決定する内核高次構造、第64回高分子討論会、東北大学川内キャンパス（宮城県・仙台市）、2015/09/17

持田祐希、M. Wang、H. Cabral、三浦裕、西山伸宏、片岡一則、環状 RGD ペプチドを搭載した白金錯体制がん剤内包ミセルのがん幹細胞治療への展開、第64回高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）、2015/05/27

#### 〔図書〕(計1件)

Horacio Cabral、Kazunori Kataoka、Wiley-VCH、Polymeric Micelles for Cancer Therapy, in The Nano-Micro Interface : Bridging the Micro and Nano Worlds、2015、72-75

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：金属とブロック共重合体との錯体を含むミセルを安定化させる方法および安定化されたミセル、並びにミセルからの金属の放出制御法

発明者：持田祐希、片岡一則、カブラル オラシオ

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-165298

出願年月日：平成28年8月26日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

持田祐希 (MOCHIDA, Yuki)

公益財団法人川崎市産業振興財団・ナノ医

療イノベーションセンター・主任研究員  
研究者番号：60739134

##### (2)研究分担者

カブラル オラシオ (CABRAL, Horacio)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号：10533911

##### (3)連携研究者

片岡一則 (KATAOKA, Kazunori)  
公益財団法人川崎市産業振興財団・ナノ医療イノベーションセンター・主幹研究員  
研究者番号：00130245