

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21156

研究課題名(和文) 低侵襲な放射線癌治療を可能にする次世代型DDSキャリアのin vivoへの応用

研究課題名(英文) in vivo applications of next-generation DDS carrier for achieving less-invasive radiation therapy

研究代表者

西村 勇哉 (Nishimura, Yuya)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：40728218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が開発してきたドラッグデリバリー用キャリア(B型肝炎ウイルス由来のバイオナノカプセル; BNC)は、in vitroにおいて一定の成果を挙げてきた。そこで、今後臨床応用を目指すために、in vivoでの有効性を検証した。担癌マウスを用いた抗癌剤ドキソルビシンの送達では、抗腫瘍効果が確認された。また、放射線増感作用のある無機ナノ粒子(PAATiOx)を送達したときの体内分布を測定すると、腫瘍への集積が確認された。そこで、X線照射との併用治療を行った結果、抗腫瘍効果が確認され、その有効性を示すことができた。つまり、in vivoにおいてもこのキャリアが有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed bio-nanocapsule derived from hepatitis B virus as a carrier for drug delivery system and achieved some progress in vitro. Therefore, to apply this carrier in a clinical application, we demonstrated availability in vivo. As the result, delivery of anticancer drug (doxorubicin) showed antitumor effect in mouse xenograft models. Next, we measured time course of biodistribution of PAATiOx with radiosensitization efficacy and showed accumulation within the tumor. Then, in combination with X-irradiation, antitumor effect was observed. Therefore, we indicated that this carrier is available in vivo.

研究分野：バイオプロダクション

キーワード：ドラッグデリバリーシステム バイオナノカプセル 抗癌剤ドキソルビシン 放射線増感剤 ナノ粒子  
放射線治療 Affibody in vivo

### 1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアに必要とされる主な能力は、薬剤を封入して安定化させる、標的の細胞のみに送達する、薬剤の機能を細胞内で発現させることである。これら全ての能力を併せ持つ万能な天然キャリアは存在せず、ウイルスベクター・非ウイルスベクターそれぞれの特徴を活かしながら、個々の課題について様々な研究がなされている。しかし、DDSの完成型を目指すには、これら全ての能力を完備した万能型DDSキャリアを開発する必要がある。申請者がこれまで開発を進めてきたDDS用キャリア(B型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質由来のバイオナノカプセル)は、*in vitro*において一定の成果を挙げてきていた。しかし、今後臨床応用を目指すためには、*in vivo*での有効性を示すことが不可欠であった。

### 2. 研究の目的

*in vivo*での機能を検証するために、実際に治療効果のある抗癌剤を担癌マウスに送達し、キャリアの有効性を評価する。

さらに、このキャリア内に放射線増感剤として期待される無機ナノ粒子を封入する。これにより、放射線のみからの従来の治療より低侵襲な放射線治療を確立し、難治性癌の新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) バイオナノカプセル(BNC)の表面に提示させるAffibodyはHER2に結合する $Z_{HER2}$ だけではなく、EGFRに結合する $Z_{EGFR}$ やIGF1Rに結合する $Z_{IGF1R}$ などが開発されている。これらのAffibody提示BNCを取り揃えることで、肝癌以外の各種癌細胞を標的化することができる。そこで、 $Z_{EGFR}$ -BNCを構築し、膵臓癌などに発現しているEGFR発現細胞への特異的な薬剤送達を評価した。

(2) 現状最も有効である $Z_{HER2}$ 提示BNCを用いて*in vivo*での薬剤送達の検証を行った。抗癌剤ドキソルピシンを封入した粒子を担癌マウスの尾静脈から投与し、その抗腫瘍効果を標的癌組織の縮小を観察することで確認した。

(3) 無機ナノ粒子とBNCのハイブリッド化によって放射線治療への応用を検討する。放射線増感剤として期待される無機ナノ粒子をBNCで標的癌組織に送達することで、従来より低侵襲な放射線治療が可能かどうかを確認する。担癌マウスの尾静脈から投与した粒子の体内分布を測定することで腫瘍への集積効率を検証した。また、X線治療との併用による腫瘍の縮小効果を観察した。

### 4. 研究成果

(1)  $Z_{EGFR}$ -BNCの標的細胞への結合能力  
[Z1907]<sub>2</sub>-BNCの細胞標的能力評価

EGFRを認識するAffibody:  $Z_{EGFR}$ としてZ1907を選択し、そのダイマーをBNC表面に提示させた。酵母*S.cerevisiae*を宿主として産生した[Z1907]<sub>2</sub>-BNCの粒子径は約86nmであった。

EGFR発現細胞への標的能力を評価するために、Alexa Fluor 488標識した[Z1907]<sub>2</sub>-BNCを標的細胞(HeLa、A431)と非標的細胞(MCF-7)に添加し、3時間後の蛍光強度を検出した。その結果、両方の標的細胞で濃度依存的な蛍光強度が確認され、非標的細胞では蛍光はほとんど確認されなかった。次に、標的細胞への取り込みを確認するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時変化を観察した。その結果、HeLa細胞には30分後に結合し、120分後に細胞内へ取り込まれている様子が確認された。これらの結果から、[Z1907]<sub>2</sub>-BNCはEGFR発現細胞を認識し、その細胞内に特異的に取り込まれることが示された。

#### エンドソーム脱出能力の評価

細胞質内への薬剤放出を可能にするため、[Z1907]<sub>2</sub>-BNCとエンドソーム脱出能力をもつリポソーム(LP)を融合し、複合粒子を構築した。薬剤モデルとして緑色蛍光分子カルセインをLPに封入し、その表面に[Z1907]<sub>2</sub>-BNCを融合させることで、[Z1907]<sub>2</sub>-BNC/LP(cal)とした。この粒子を標的細胞HeLaに添加し、エンドソーム脱出の様子を共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察した(図1)。その結果、3時間後ではカルセインがエンドソーム内にあり、24時間後では、細胞質全体が緑色になる様子が観察された。つまり、カルセインがエンドソームから脱出し、細胞質内に放出された。

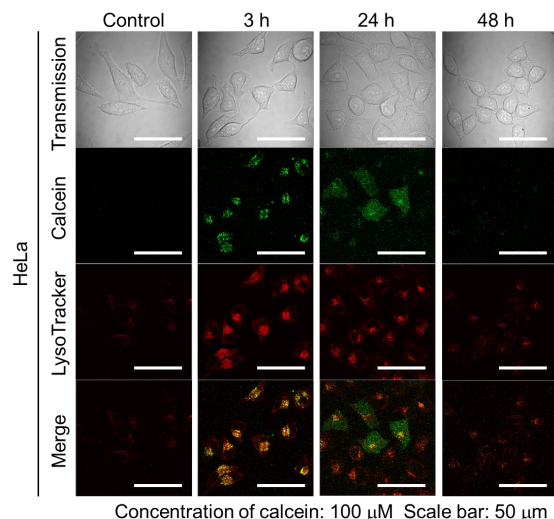


図1. 共焦点レーザー顕微鏡による[Z1907]<sub>2</sub>-BNC/LP(cal)のエンドソーム脱出の経時観察

#### 抗癌剤送達による細胞傷害性評価

[Z1907]<sub>2</sub>-BNC/LPの細胞標的性とエンドソーム脱出能力が示されたため、抗癌剤(ドキソルピシン: dox)を送達することで、標的細胞特異的な傷害が可能か検討した。dox単

体では HeLa と MCF-7 のどちらの細胞でも細胞死を引き起こした。LP(dox)は細胞への結合能力がなく、どちらの細胞においても細胞死は確認されなかった。しかしながら、[Z1907]2-BNC/LP(dox)では標的細胞でのみ細胞死が確認された。つまり、EGFR を発現する細胞を標的とし、薬剤を細胞質内へ送達するキャリアの開発に成功した。

## (2) ドキソルピシンによる抗腫瘍効果

### *in vitro* 検証

細胞質内で活性を示す抗癌剤のドキソルピシン (dox) を封入したリポソーム (LP) の表面に  $Z_{HER2}$ -BNC を融合させた  $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox) を作製した。この粒子を標的癌細胞 (SKOV3) と非標的細胞 (HeLa) に添加し、細胞傷害率を測定した。その結果、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox) は標的細胞に対して強い抗腫瘍効果を示し、非標的細胞にはほとんど効果を示さなかった。つまり、細胞特異的に薬剤を送達し、細胞質内に薬剤を放出することに成功した。

### *in vivo* 検証

標的細胞 (SKOV3) を担癌させたマウスの尾静脈からリン酸緩衝液 (PBS), dox, LP(dox),  $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox) をそれぞれ 5 日おきに投与し、腫瘍体積の変化を測定した (図 2)。その結果、dox, LP(dox) の群はコントロールである PBS とほぼ同等の腫瘍体積の増加が見られた。それに対し、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox) は腫瘍体積の増加が著しく抑制された。つまり、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP は尾静脈からの投与でも標的である腫瘍に到達し、その癌細胞内で薬剤効果を発揮させることが示唆された。

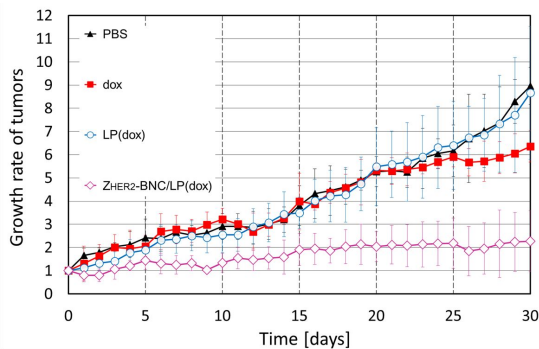


図2. SKOV3細胞担癌マウスへのドキソルピシン尾静脈投与による抗腫瘍効果の観察

## (3) 無機ナノ粒子と X 線の併用治療

### 無機ナノ粒子の毒性と放射線増感効果

放射線増感剤として使用する無機ナノ粒子 (ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子: PAATiOx) 自体の毒性を評価するために、細胞に 1, 24, 48 時間接触させ、WST-8 アッセイによって細胞生存率を測定した。その結果、1 mg/mL の粒子濃度でも 1 時間の接触では細胞死は確認されなかった。このことから、X 線照射のない条件下で、粒子自体の毒性によって細胞が傷害される可能性は低いことが

示された。

また、PAATiOx の放射線増感効果を確認するために、X 線照射後の細胞のコロニーアッセイによって細胞傷害性を確認した。X 線照射のみの群と比較して、粒子を併用した場合の細胞傷害率は高かった。つまり、PAATiOx による X 線増感効果が示された。

### X 線併用治療による標的がん細胞の傷害

まず、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiOx) の標的細胞への結合能力を確認するために共焦点レーザー顕微鏡で観察した。 $Z_{HER2}$ -BNC を利用することで、10 分後には標的細胞への結合が確認された。PAATiOx のみでは 30 分後でも細胞への結合は確認されなかった。

また、標的細胞に粒子を添加し、洗浄処理後に X 線照射を行うことで、標的細胞への結合と傷害能力をコロニーアッセイで確認した。 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiOx) は PAATiOx よりも高い傷害性を示したため、標的細胞への結合と放射線増感作用が確認された。

### ナノ粒子の体内分布

標的癌細胞 (SKOV3) を担癌させたマウスの尾静脈から各ナノ粒子を 10 mg/mL as PAATiOx の濃度で 100  $\mu$ l 投与し、1 時間、1 日、1 週間後に各臓器を摘出した。そして、ICP-AES を用いた原子スペクトル解析によって各臓器に含まれる Ti の量を検出した (図 3)。

粒子の投与量に対する集積量を組織ごとに見ると、肝臓への集積率が多かったが、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiOx) の腫瘍への集積も検出された。また、単位質量あたりの組織に含まれる量と比較すると、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiOx) は腫瘍への集積量が非常に多いという結果を示した。つまり、ナノ粒子は肝臓でほとんどトラップされてしまいが、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP を利用することで腫瘍に高濃度に集積することが確認された。

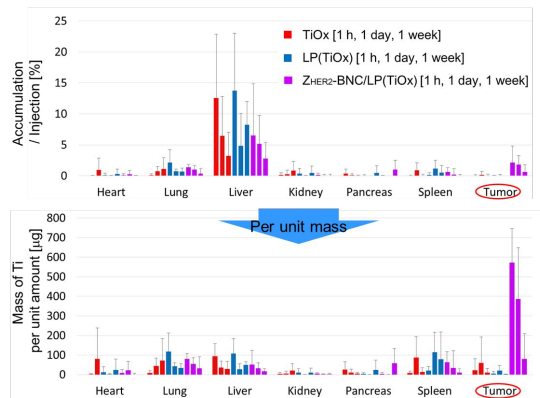


図3. 各粒子投与後 (1 h, 1 day, 1 week) の各組織における PAATiOx の集積量 (上図) 投与量に対する集積量の割合 (下図) 各組織の単位質量あたりに含まれる PAATiOx の量

### *in vivo* での X 線併用効果

標的癌細胞 (SKOV3) を担癌させたマウスの尾静脈から各ナノ粒子を 10 mg/mL as PAATiOx の濃度で 150  $\mu$ l 投与し、1 日後に 5 Gy の X 線を照射した (図 4)。

X 線未照射の群では一様に腫瘍体積の増加

が確認された。5 Gy の X 線を照射すると、コントロールの PBS を投与した群でも抗腫瘍効果が確認された。PAATiOx または LP(PAATiOx)と X 線の併用ではこのコントロールと差がなく、X 線の治療効果のみでナノ粒子の影響がみられなかった。しかしながら、Z<sub>HER2</sub>-BNC/LP(PAATiOx)と X 線の併用はこれらの群よりも高い抗腫瘍効果を示した。つまり、X 線の治療効果を増大させた。以上の結果から、放射線増感剤である PAATiOx を標的の腫瘍に送達し、X 線照射による治療効果を高めることに成功した。

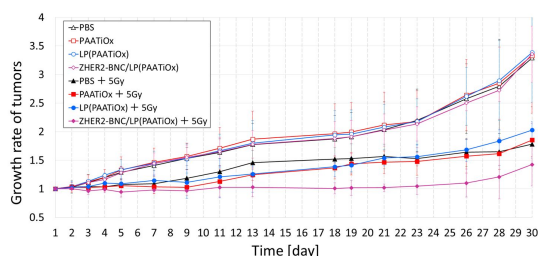


図4. SKOV3細胞担癌マウスへのPAATiOx尾静脈投与とX線の併用による抗腫瘍効果の観察

これらの研究成果により、in vivo においても腫瘍特異性と治療効果を示すことができた。今後、臨床応用可能な DDS キャリアへと昇華させるためには、安全性を評価していかなければならない。また、本研究により、ナノ粒子と X 線の併用治療の可能性を示すことができた。既に確立されている X 線治療の効果をさらに向上させ、かつ低侵襲な治療法として期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yuya Nishimura, Ryosuke Ezawa, Jun Ishii, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Affibody-displaying bio-nanocapsules effective in EGFR, typical biomarker, expressed in various cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27(2), 336-341, 2017, <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.038>.

Kenta Morita, Serika Miyazaki, Chiya Numako, Shinya Ikeno, Ryohei Sasaki, Yuya Nishimura, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for use as a novel radiosensitizer. *Free Radical Research*, 50(12), 1319-1328, 2016, <http://doi.org/10.1080/10715762.2016.1241879>.

Masao Nakayama, Ryohei Sasaki, Chiaki Ogino, Tsutomu Tanaka, Kenta Morita, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Zhenquan Tan, Yuya Nishimura, Hiroaki Akasaka,

Kazuyoshi Sato, Chiya Numako, Seiichi Takami and Akihiko Kondo. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol*. 11(91), 2016, DOI:10.1186/s13014-016-0666-y.

[学会発表](計4件)

Yuya Nishimura, Takahiro Suzuki, Kenta Morita, Masao Nakayama, Sachiko Inubushi, Chiya Numako, Chiaki Ogino, Ryohei Sasaki, Akihiko Kondo. Less-invasive anticancer efficacy by a combination of bio-nanocapsule/liposome complex and radiation therapy. *International Biotechnology Symposium 2016*, 2016.10.24-27, Melbourne (Australia).

西村 勇哉, 鈴木 貴弘, 森田 健太, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, HER2 受容体発現細胞を標的とした DDS キャリアの抗腫瘍効果の評価、生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2016、2016.7.16-17、ホテルコンチネンタル府中(東京都府中市)

西村 勇哉, 鈴木 貴弘, 森田 健太, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, Affibody 提示バイオナノカプセル/リポソーム融合粒子を用いた in vivo での抗腫瘍効果、化学工学会 第 81 年会、2016.3.13-15、関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市)

Yuya Nishimura, Jun Ishii, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Specific drug delivery for target cancer tumor using affibody-displaying bio-nanocapsule/liposome complex. *Pacificchem 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, 2015.12.15-20, Honolulu, Hawaii (USA).

[図書](計1件)

西村 勇哉, 森田 健太, 鈴木 貴弘, 荻野 千秋, 近藤 昭彦, 無機とバイオの融合ナノ粒子による新しいがん治療戦略、粉砕 THE MICROMERITICS No.60 2017. 2016, 60, 13-19.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 勇哉 (NISHIMURA, Yuya)  
神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・特命助教  
研究者番号：40728218