

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2016

課題番号：15KK0327

研究課題名（和文）ガン温熱化学療法に有効なナノキャリアの開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Design of effective nanocarriers for cancer thermotherapy(Fostering Joint International Research)

研究代表者

森本 展行 (Morimoto, Nobuyuki)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00313263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,400,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：ガン温熱化学療法に適したナノキャリアの開発を一对の正負の荷電性基を側鎖に有したスルホベタインを主成分としたポリマーの精密設計により行った。ポリマーへの抗ガン剤の修飾部位を検討したところ、重合の末端への導入が最も効率が良く、一方の端にはカルボキシ基の存在が有効であった。またこれらのポリマーは正常神経・グリア細胞へも効率的に導入しえることを見いだすとともに、ミトコンドリアへの選択性が付与でき、かつその代謝活性を損なわないことを明らかとし、今後のナノキャリアの設計指針を示した。

研究成果の概要（英文）：Development of nanocarriers for cancer thermal chemotherapy was carried out by precise design of copolymers based on sulfobetaine monomer, having a pair of positively and negatively charged groups in the side chain. The modification position of sulfobetaine copolymers by anticancer drug, doxorubicine, was examined and substitution at the terminus of the polymer showed the most efficient internalization to cancer cells. In addition, the presence of carboxy group at the -terminus was effective compared to that of other functional groups. These polymers can be efficiently internalized into nerve cells and glial cells, and rhodamine modification enhanced the selective localization to mitochondria without reduction of its metabolic activity. These findings will give us a guideline for further development of nanocarriers.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノキャリア 刺激応答性 スルホベタインポリマー 温熱化学療法

1. 研究開始当初の背景

ガン温熱療法は、生体よりやや高い熱（～42℃）を患部一帯に加温することで、低pH環境のガン細胞を選択的に死滅させる手法である。正常細胞の免疫能の亢進を期待しえることに加え、副作用がなく多数回の治療を行うことができ、他の治療法との併用も可能である。中でも投薬治療との併用による温熱化学療法は薬剤投与の減量も視野にいれられるため、副作用の軽減や温度増強などによる治療回数の軽減など今後一層期待される手法となりえよう。温熱療法としてのナノ粒子は、磁性ナノ粒子を用いて発熱体、あるいは画像診断に用いる研究が国内外で多く展開されている。しかし温熱化学療法への中空ナノ粒子の展開は、リポソームを用いた例が報告される程度である。これらの背景から、温熱化学療法に特化したナノキャリアの開発が、画期的なガン治療につながると想起するに至った。

採択され進行中の研究課題では、これらを複合化させた温熱化学療法を従来と比べ飛躍的に有効な手段とすべく、ガン温熱化学療法に特化した薬物ナノキャリアの開発を目指している。いずれも生体適合性に優れたユニットであるポリエチレングリコール (PEG) とスルホベタインメタクリレート (SB) からなるポリマーを合成し、このポリマーより、SBの有する会合能および上限臨界溶液温度を利用して、加熱に対して崩壊や構造変化により薬物を放出しえる分子会合体を調製している。さらに、分子会合体にガン細胞への標的指向性を付与するとともに、温熱療法で利用される周波数帯で自ら緩和してガン細胞に与えるダメージを増幅しえる分子集合体の創製を目指し、化学療法に適応しえる熱応答性ポリマーの設計と評価を繰り返し実施してきた。各水溶液中での知見から、当初考えていた PEG-SB のブロックコポリマーは、ポリマーソーム様の中空構造では不安定であり、中実の多層膜構造が安定状態であることを明らかとした。この多層膜ミクロスフィアが従来にはない構造を有していることを見いだすとともに、その内部に抗がん剤やオリゴ核酸・ペプチドを導入する技術を開発した。また、この採択研究の申請時に利用していた SB では、生理条件下において多層膜ミクロスフィアをミセル様のナノ粒子に構造変化させてしまい、多層膜構造を安定に保持するのが難しいことがわかった。そこで SB 構造中のアルキル鎖を延長することで疎水性相互作用を強化したところ、粒径制御が困難となりまた温度応答性もシャープでなくなることが判明した。また π - π スタッキングを期待して SB にピリジニウム基を導入すると、凝集力が著しく増大するため、サンプル調製に困難を極めるとともに、SB のブロック鎖長を短くしても生理条件下での温度応答性は失われた。このため、ランダムコポリマーからなるナノスフィアを調製して検討に加え、細胞との相互作用について評価を行っている。細胞毒性評価を行ったところ、

PEG-SB のブロックコポリマー、ランダムコポリマーのいずれも毒性の発現はみられないことを確認している。驚いたことに、ランダムコポリマーナノスフィアでは細胞へ迅速に取り込まれ、各種エンドサイトーシス経路の阻害剤を用いても取込量の減少がみられないことから、膜透過の機構により細胞内へ導入されていると解釈している。ドキシソルピシンを安定に化学修飾したナノスフィアを調製したところ、ナノスフィアは効果的に細胞へ取り込まれ、未修飾のドキシソルピシンとほぼ同等の殺細胞効果が示されることを確認している。

2. 研究の目的

これまで行ってきた同名の研究課題にて開発したスルホベタインポリマーベースのナノキャリアの物理化学的な評価とがん細胞に対する細胞毒性評価に加えて、細胞内分布やその時間変化を解析する。またがん細胞のみならず、免疫細胞の応答や神経細胞の活性化など、正常細胞に対しても細胞応答特性の詳細解析を行うことで *in vivo* 実験での副作用についての予測を行う。一方でこれまでに開発してきた薬物キャリアとしての機能を詳細に検討することで熱応答性ポリマーの設計にフィードバックし、温熱化学療法への実用が可能なキャリアの開発を行う。研究内容の特徴として、関連する分野のより幅広くかつ詳細な知識が必要となる。このため、ナノキャリアのベースとなるポリマー合成から物理化学的評価を迅速に行うことはもちろん、ナノキャリア創製後に必要とされる次段階のバイオリジカル・ファーマコロジカルな評価法の専門レベルでの知識・および評価系への展開、さらにその周辺分野の人脈構築を行う。

本申請研究では採択研究の進展に不可欠な海外の先端的な研究者達と協力して進めていく。熱応答型会合性高分子の調製と評価を行える高分子物理化学系の研究室にベースをおきながら、免疫応答および金属・無機ナノ粒子の *in vitro* 評価をメインの研究課題の一つとする薬学系の研究室において、調製したナノスフィアの細胞内動態やがん細胞選択性、また免疫応答、神経細胞応答について評価し、*in vivo* への展開に向け最適な組成のポリマー・ナノスフィアの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) PEG-SB ポリマーの調製：分子量が比較的揃った PEG-SB ポリマーを可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 共重合により水-メタノール系の共溶媒から調製した。得られたポリマーのキャラクタリゼーションは、NMR および GPC により組成比、分子量とその分布を評価した。
(2) PEG-SB ポリマーへのドキシソルピシン修飾・末端官能基化：ポリマー α 末端への修飾は、連鎖移動剤に由来するカルボキシ基を用い水溶液中における縮合反応より行った。 ω 末端への修飾はトリチオカーボネート基をアミノリシス反応よりチオール基に置換後、へ

テロ架橋剤を用いた。一方側鎖への導入は側鎖にスクシイミドエステルを有したモノマーを導入した 3 元共重合体を調製後、ドキソルビシンと反応させることで目的の化合物を得た。

(3) ポリマーと細胞との相互作用は、蛍光分子を修飾したポリマーを用い取込量のフローサイトメーターによる定量的評価および共焦点レーザー顕微鏡による細胞内分布の観察から評価した。またミクログリア細胞におけるミトコンドリア代謝活性を MTT アッセイ法により、細胞内の一酸化窒素含有量の測定は Griess 法を用いてそれぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) PEG-SB ポリマー末端の細胞内導入効率に与える効果と新規スルホベタインポリマーの設計

PEG-SB へドキソルビシンを修飾すると PEG-SB の細胞内への導入挙動が膜透過からエンドサイトーシスを介した挙動が支配的になることが確認された。そのため、より迅速で効果的な細胞内導入を達成すべくドキソルビシンのポリマーへの修飾位置について検討を行った。これまでポリマーの α 末端への修飾に加え、 ω 末端および側鎖へのドキソルビシン修飾を行い HeLa 細胞への導入量をポリマー添加 1 時間後に評価したところ、末端と比較して側鎖導入の場合はおよそ 1.3 倍、 ω 末端修飾の場合には 2.2 倍の導入効率を示した (図 1)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれたドキソルビシン修飾 PEG-SB

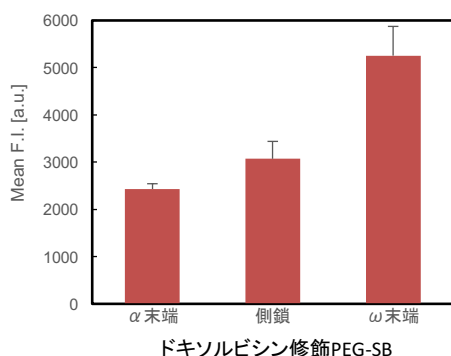


図 1 各部位にドキソルビシンを修飾した PEG-SB の HeLa 細胞への取込量

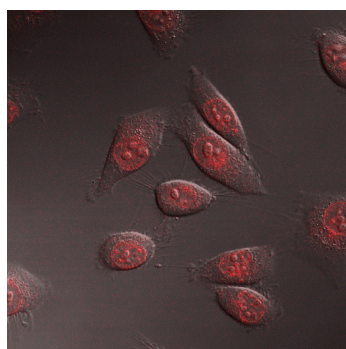


図 2 ω 末端をドキソルビシン修飾した PEG-SB の細胞内分布

の観察を行ったところ、いずれの部位にドキソルビシンを修飾しても添加 1 時間の比較的短時間のうちに細胞内へ移行し、その多くが核に集積されていることが確認された (図 2)。また、 ω 末端へのドキソルビシン修飾 PEG-SB の HeLa 細胞に対する抗ガン活性評価より、 ω 末端修飾によってもドキソルビシンの活性は保持されており、導入効率の分だけ α 末端、側鎖への修飾よりも高い活性を示したと考えられた。

以上の結果より、ドキソルビシンの修飾位置もさることながら、ポリマーの末端官能基自体も細胞内導入へ影響を与えているのではないかと考え、フルオレセインを ω 末端に修飾した PEG-SB を用い、その α 末端カルボキシル基をアミド結合により短鎖アルキルスペースーサーを介してアミノ基、ヒドロキシ基、メチル基をそれぞれ導入してその効果について評価を行った。その結果、カルボキシ基を末端に有した PEG-SB が最も細胞内への導入量が多く、他の末端の PEG-SB と比較しておよそ 1.5 から 3 倍の導入量であった。これら各ポリマーの細胞内分布について観察を行ったところ、カルボキシ基とヒドロキシ基末端を有した PEG-SB では核を含め細胞全体に分布していたのに対し、アミノ基、メチル基末端修飾 PEG-SB についてはエンドソームと考えられる小胞に局在していることが観察された。このことは、アミノ基あるいはメチル基末端を有することで細胞膜との相互作用が増加し、スムーズな細胞内移行が妨げられることでエンドサイトーシス依存的な細胞内導入経路をたどったものであると推察された。分子量が 2 万から 3 万のポリマーに対してわずか末端の一官能基がこれらの挙動を左右することは驚くべき結果であり、このことは今後のポリマー設計に際し重要な知見となりうるため、その詳細について検討を続けていく。また、その一方で末端を持たない環状構造を有した PEG-SB の合成について考案し、Winnik 教授との共同研究を開始している。これに加え、生理塩強度で熱応答性を示すスルホベタインポリマーの設計を継続して行っている。これまでの PEG-SB では生理塩条件下ではイオン-双極子相互作用が支配的となり下限臨界共溶温度 (UCST) を示さないこと、逆にビニルピリジニウム型のスルホベタインコポリマーにより形成されるミセル様ナノ粒子は単独では生理塩条件下で安定性が高すぎて UCST を示さないことを確認している。そこでこれらの中間的な構造であるスルホベタインモノマーを設計し、その合成手法について確立した。今後、ポリマー化の条件検討を行っていく。

その一方で上述のビニルピリジニウム型のスルホベタインコポリマーは室温での溶解塩濃度を詳細に調べることで水中における操作技術の改善に成功し、ポリマーの重合度や濃度、水溶液の pH にも依存するが、NaCl 濃度がおよそ 450 mM の時に室温付近で UCST を示し、この UCST 以上に加熱してミセル

様粒子を解離させ、ここにドキシソルビシンあるいは磁性ナノ粒子を共存させて UCST 以下まで冷却することでこれらの分子/粒子を内包することに成功している。興味深いことに粒径の変化は温度に依存しないものの、内包したドキシソルビシンは温度に対して放出速度が異なることを見いだしている。これはスルホベタインポリマー間の双極子-双極子相互作用が加温により弱まることで内包されていたドキシソルビシンが放出されると考えている。これらの詳細な挙動解析を行うが、内包によりナノ粒子のサイズが増大するため、効果的な重合度のポリマー選択や内包量の調整、放出挙動の詳細な検討が今後の課題である。

(2) PEG-SB ポリマーの正常神経・グリア細胞内への導入とリポ多糖刺激ミクログリア細胞に与える影響

PEG-SB は HeLa 細胞へ取り込まれることを示し、抗ガン剤修飾したポリマーでも効率的に取り込むために、そのさらなる効率の向上の検討を上述しているが、一方でこの PEG-SB は HeLa 細胞のみならず、HL-60 細胞や HepG2 細胞にも迅速かつ効率的に細胞内へ移行しうることを見明らかとしてきた。このポリマーの正常細胞への取込挙動をマウス大脳皮質由来のプライマリ正常神経細胞およびグリア細胞について検討を行った。これらの細胞に対しても効果的な導入が確認され、フルオレセインを修飾した PEG-SB では細胞全体にポリマーが認められるのに対し、ローダミン B を修飾したポリマーでは、ミトコンドリアへの迅速な選択的移行が確認された。このことはガン細胞のみならずミトコンドリア病への適用の可能性を示している。脳内の免疫を司るミクログリア細胞株を用いた実験によっても同様のことが示された。ミクログリア細胞に対してリポ多糖により刺激してもポリマーの添加によりミトコンドリアの代謝活性は低下しないこと、一方で炎症に関与する一酸化窒素の産生を有意に抑制しうることを見明らかとした(図 3)。このことは免疫細胞の活性化に基づくガン免疫療法とは異なる、免疫正常化を促すことのできるナノキャリアの設計に繋がると期待できる。これらの評価については引き続き Maysinger 教授と共同して展開していく。

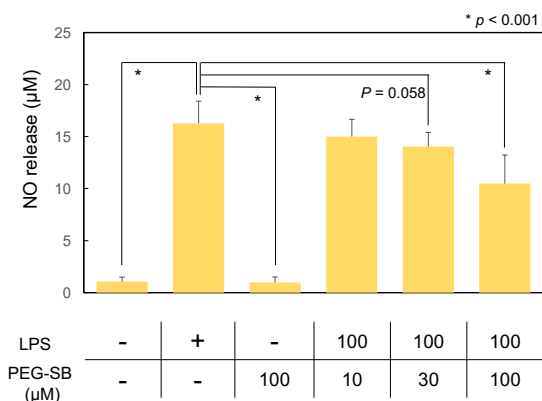


図 3 リポ多糖で刺激したミクログリア細胞からの NO 産生

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. N. Morimoto, M. Wakamura, K. Muramatsu, S. Toita, M. Nakayama, W. Shoji, M. Suzuki, F. M. Winnik. Membrane translocation and organelle-selective delivery steered by polymeric zwitterionic nanospheres. *Biomacromolecules*. **17**, 1523-1535, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00172
2. M. Tsugita, N. Morimoto, M. Tashiro, K. Kinoshita, M. Nakayama. SR-B1 Is a Silica Receptor that Mediates Canonical Inflammasome Activation. *Cell Reports* **18**, 1298-1311, 2017. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.004.

[学会発表] (計 2 件)

1. 武井里歩、若村 優、中山 勝文、東海林 互、森本 展行、鈴木 誠. 細胞膜透過型スルホベタインポリマーの細胞内導入キネティクス解析. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016. 2016 年 11 月 21 日~2015 年 11 月 22 日. 福岡国際会議場(博多).
2. 大石佳史、後藤祐輔、森本 展行、鈴木 誠. 生理的塩濃度で安定な新規スルホベタイン PEG ブロックコポリマーナノスフィアの創製. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016. 2016 年 11 月 21 日~2015 年 11 月 22 日. 福岡国際会議場(博多).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本展行 (MORIMOTO, Nobuyuki)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00313263

(2) 研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

Francoise M. Winnik

モントリオール大学・化学科・教授

[その他の研究協力者]

Dusica Maysinger

マギル大学・薬理治療学科・教授

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60282109