

令和元年6月13日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03185

研究課題名(和文)骨代謝の正常化と転移性骨腫瘍の治療に有効なポリマー医薬の創出

研究課題名(英文)Development of a macromolecular prodrug for the treatment of bone

研究代表者

岩崎 泰彦(Iwasaki, Yasuhiko)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：核酸と同様な主鎖構造を有するポリリン酸エステル(PPE)は生分解性を示し、側鎖に様々な官能基を導入できることからバイオマテリアル設計のための分子プラットフォームとして有用である。本研究によって、リン酸ジエステル骨格を持つPPEが生体骨に対し高い親和性を示すことを明らかにすることができた。また、このポリマーが骨のリモデリングに関係する破骨細胞の分化も抑制することもわかり、骨粗鬆症や骨転移の治療に有効な薬物担体となり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行により骨親和性と骨リモデリングに作用するポリマーを新たに提案することができた。このポリマーは我が国が抱えている社会的な課題である健康寿命の増進に資することが期待され、研究成果の社会的意義は極めて大きいと言える。また、これまでのプロドラッグ設計では生体不活性なポリマーと薬剤を複合化する手法が取られていたが、本研究で得られたポリマーは生理活性を示すため学術的にもユニークであり、同ポリマーを用いたプロドラッグ研究が今後多く展開されると思われる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the effects of poly(ethylene sodium phosphate) (PEPNa), which is a kind of polyphosphoesters (PPEs), on bone cell viability and activity. PEPNa exhibited excellent short-term biocompatibility with osteoblasts. In contrast, selective inhibition of osteoclast adhesion and function was observed following cultivation with PEPNa. Moreover, we have demonstrated that PEPNa shows good affinity for bone in vivo. Due to the molecular diversity of PPEs, various types of polymeric prodrugs for bone disease treatment can be designed based on PEPNa.

研究分野：生体材料学

キーワード：ポリリン酸エステル 生分解性 骨 骨リモデリング プロドラッグ 開環重合 生体適合性 生体模倣

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

世界的に高齢化が進行している状況において、骨粗鬆症の患者は、わが国でおよそ1千万人（総人口の10%弱）に達しており、70歳を超えると約半数にその症状が認められる。一方、厚生労働省の統計にもあるように、現在の死亡原因の1位は癌であり、肺癌、乳癌、前立腺癌の多くの患者は、高い確率で骨転移を併発する。骨に転移した癌細胞は破骨細胞を活性化し、骨吸収が促進される。そのため、骨転移患者は骨粗鬆症を発症する。このような骨疾患に対し、現在、ビスホスホネートが第一選択薬として利用されている。ビスホスホネートは骨指向性に優れ、特に、血管壁の透過性が亢進している骨腫瘍部位に集積し、さらに破骨細胞の働きを脆弱化することによって、骨転移にともなう合併症、骨痛や骨折を抑制する。しかし、ビスホスホネートに明確な抗癌活性は認められず、また、長期連続投与による腎障害、顎骨壊死、骨肉腫の発生増加などの副作用も問題視されており、新たな骨治療薬の創出は急務である。

2. 研究の目的

本研究は、骨粗鬆症や転移性骨腫瘍の治療に有効なポリマー医薬の創出を目的として企画された。研究期間を3年とし、ポリマー医薬の分子設計から骨治療薬としての機能評価まで系統的に進めた。具体的には①ポリリン酸エステル(PPE)系ポリマー医薬の設計と合成、②ポリマー医薬が骨系細胞の生育に与える影響の調査③小動物を用いたポリマー医薬の体内動態制御④骨疾患モデル動物を用いた薬理学的基礎評価、について検討した。PPEは核酸と同様な構造をもち、血中半減期の延長に伴う投与量の軽減と体内蓄積が懸念される有機リン構造を持たない。このため、骨治療の第一選択薬であるビスホスホネートにおいて問題とされている腎障害や顎骨壊死などの副作用の抑制にもつながると考える。

3. 研究の方法

1) リン酸ジエステル型ポリマー(PEP·Na)の新規合成法の確立と化学修飾

PEP·Naの合成において従来法では、トリメチルアミンの臭気や多量なイオン交換樹脂が必要になることなど幾つかの問題点があげられる。そこで、異なる側鎖を持つ環状リン酸エステルモノマーを合成し、従来法の改善を試みた。

2) PEP·Naの生体適合性評価

PEP·Naの生体適合性をMC3T3-E1細胞を用い評価した。対象試料に生体由来高分子のポリリン酸(polyP)を選択した。

3) PEP·Naが破骨細胞分化に与える影響の評価

ウシ骨片上にヒト末梢血単核球を播種し、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF:破骨細胞生存因子)とNF-κB活性化受容体リガンド(RANKL:破骨細胞分化誘導因子)を含む分化培地に所定濃度のポリマーを添加し、2週間培養を行なった。この時、PEP·Naを培地に添加し、末梢血単核球の破骨細胞への分化に与える影響を調べた。破骨細胞への分化は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色により確認した。また、破骨細胞の骨吸収機能に与えるポリマーの影響を明らかにするために、接着した細胞を固定し、蛍光染色することにより細胞のアクチンリングを共焦点レーザー顕微鏡により観察する。さらに、細胞培養後の骨スライスを界面活性剤の溶液に浸し細胞成分を完全に除去した後に、走査型電子顕微鏡を用いてスライス表面に形成されたピット(溶解痕)を観察する。

4) PEP·Naの体内動態

蛍光色素を担持したPEP·Naを合成し、研究機関の倫理委員会の承認を受け、小動物体内におけるポリマーの動態を追跡した。蛍光ポリマーを所定の濃度でリン酸緩衝液(PBS)に溶解し、マウスの尾静脈から溶液を注入し、in vivoイメージングシステム(IVIS)でポリマーの動態を追跡した。

5) 生理活性プロドラッグの設計

新たな生理活性プロドラッグの創出を目指し、タンパク質とPEP·Naとの複合体を調製した。化学修飾によるタンパク質の失活を考慮し、両親媒性のPEP·Naとモデルタンパク質のアルブミンをPBS中で混合し、加熱することにより複合体を調製した。複合体の形態、酵素耐性、ミネラル親和性をそれぞれ評価した。

4. 研究成果

- 1) PEP·Na の合成
 PEP·Na の合成では、新たにアリル基を側鎖に持つポリマーを合成し、ナトリウムベンゼンチオラート による脱アリル化による経路を実施した。しかし、ナトリウムベンゼンチオラートの合成においてチオール化合物由来の臭気が発生し、従来法の根本的な解決には至らなかった。そこで、従来法の合成プロセスに光触媒による脱臭装置を組み合わせ臭気が発生しない合成方法を確立した。イオン交換樹脂の削減については更なる検討を続けている。
- 2) PEP·Na の細胞毒性
 PEP·Na と polyP の IC_{50} はそれぞれ 20.0 mg mL^{-1} (2.09 mM) と 0.9 mg mL^{-1} (0.14 mM) になり PEP·Na の細胞毒性が polyP に比べ約 1 オーダー低いことが明らかとなった。生体高分子である polyP に比べ優れた生体適合性を示す PEP·Na はプロドラッグの設計に適した性質を有していると言える。

- 3) ポリリン酸エステルによる破骨細胞の分化抑制

図 1 a には培養後アクチン染色および TRAP 染色を行なった結果を示す。ポリマー未添加の系では多核巨細胞が確認され、特にアクチン染色では破骨細胞特有のアクチンリングの形成も確認された。一方、PEP·Na を添加した群では多核巨細胞の数が他の群に比べ少なく、単核細胞が多く存在していた。図 1 b は細胞培養後に 3D レーザー顕微鏡で観察した骨片表面を示している。破骨細胞が観察された未添加群の骨表面には多くの吸収窩が観察され、骨吸収が進行していたのに対し、PEP·Na を添加した群では吸収窩の形成が顕著に抑制されていた。PEP·Na がどのような機構で分化を抑制しているかは未だ解明されていないが、同ポリマーによって骨吸収が抑制される可能性が示された。

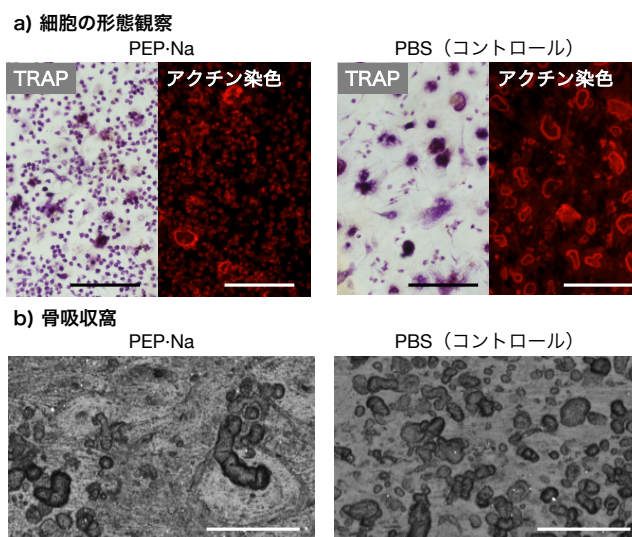


図 2 a)破骨細胞分化の文化に及ぼす PPE の影響
 b)細胞培養後の骨片表面に形成された吸収窩。ポリマー濃度：0.5mg/mL；スケールバー：200 μm。

- 4) ポリリン酸エステルの骨指向性

PEP·Na を可視化するために少量の蛍光プローブを担持させた蛍光性 PEP·Na を合成した。僅かなアルキンを側鎖にもつ PEP·Na にアジド化 Cy5 をクリック反応で導入した。所定量の蛍光性 PEP·Na をリン酸緩衝液 (PBS) に溶かし、マウス尾静脈から注入した。比較対象として Cy5 のみを PBS に溶解したものを用いた。試料注入後では蛍光ポリマーと蛍光プローブともに血管を通じ全身に送られる様子が蛍光イメージング解析によって明らかとなった。マウスの蛍光強度は時間とともに減少した。75 時間後の蛍光イメージ像では Cy5 のみを添加した群では体内からの蛍光シグナルがほとんど消失したのに対し、蛍光性 PEP·Na を注入群では背骨、下肢、尾骨など皮膚からの距離が近い骨からシグナルが確認され、これらのシグナルは注入後 3 週間以上経過しても認められた (図 2)。以上のことから PEP·Na は *in vitro* だけでなく *in vivo* においても高い骨親和性を示すことが明らかとなった。

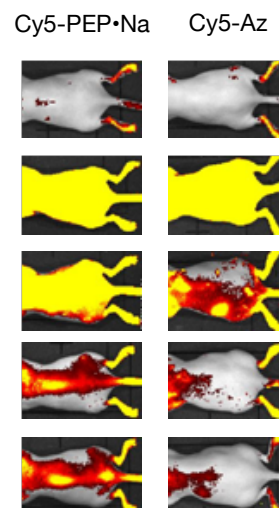


図 3 PEP·Na の体内動態 (Cy5-PEP·Na: 蛍光修飾ポリマー；Cy5-Az: 蛍光プローブのみ)。

- 5) 生理活性プロドラッグの設計

ポリリン酸エステルのユニークな特徴としてミネラルとの親和性が挙げられる。末端にコレステリル基を有する PEP·Na はタンパク質と混合し加熱することにより複合体を形成する。この複合体は PEP·Na の静電反発により、加熱してもタンパク質は凝集せず、熱変性も抑制される。タンパク質分解酵素に対する耐性も改善され、PEP·Na はタンパク質の構造および機能を安定化する。さらに、PEP·Na を複合化したタンパク質は血清タンパク質の影響を受けることなくヒドロキシアパタイトに良好に吸着した。

6) まとめ

本研究課題を遂行することにより、PEP·Na が優れた生体適合性を有し、骨に対し親和性を示すことを明確にすることができた。PEP·Na に代表される PPE の側鎖には様々な官能基を付与できるため薬物や生理活性物質の担持も可能となる。本研究課題で得られた成果をさらに発展させ、運動器疾患の治療に資するポリマー医薬の実用化に向け研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① Kunomura S, Iwasaki Y. Immobilization of polyphosphoesters on poly(ether ether ketone) (PEEK) for facilitating mineral coating, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, 2019;30:861-876. (査読有り)
DOI:10.1080/09205063.2019.1595305
- ② Otaka A, Iwasaki Y. Endocytosis of poly(ethylene sodium phosphate) by macrophages and the effect of polymer length on cellular uptake, *J. Ind. Eng. Chem.* 2019;75:115-122. (査読有り)
DOI:10.1016/j.jiec.2019.03.010
- ③ Noree S, Iwasaki Y. Thermally assisted generation of protein-poly(ethylene sodium phosphate) conjugates with high mineral affinity, *ACS Omega* 2019;4:3398-3404. (査読有り)
DOI:10.1021/acsomega.8b03585
- ④ Iwasaki Y., Yokota A, Otaka A, Inoue N, Yamaguchi A, Yoshitomi T, Yoshimoto K, Neo M. Bone-targeting poly(ethylene sodium phosphate), *Biomater. Sci.* 2018;6:91-95. (査読有り)
DOI:10.1039/C7BM00930E
- ⑤ Hirano Y, Iwasaki Y. Bone-specific poly(ethylene sodium phosphate)-bearing biodegradable nanoparticles, *Colloids Surf., B*, 2017;153:104-110. (査読有り)
DOI:10.1016/j.colsurfb.2017.02.015
- ⑥ 岩崎泰彦. ポリリン酸エステルによるインテリジェントバイオマテリアルの創出, 高分子論文集 2017;74:172-181. (査読有り)
DOI:10.1295/koron.2016-0067

〔学会発表〕 (計 3 3 件)

- ① Y. Iwasaki, Polyphosphoesters as a versatile framework for polymeric biomaterials, 2018 Global Conference on Biomedical Engineering in Conjunction with Annual Meeting of Taiwanese Society of Biomedical Engineering (GCBME), TAIWAN (2018.11) Invited lecture
- ② Y. Iwasaki, Bone targeting polyphosphoesters as antiresorptive agents, International Conference on Emerging Healthcare Materials 2018, KOREA (2018.11). Invited lecture
- ③ 岩崎泰彦, リン含有バイオミメティックポリマーの合成と機能—血液適合性表面の設計から骨リモデリングの制御まで—, 第 27 回日本次世代人工腎臓研究会, 東京 (2018.9). (依頼講演)
- ④ Y. Iwasaki, Polyphosphoesters as a versatile platform for polymeric biomaterials, 14th Japan-Belgium Symposium on Polymer Science, BELGIUM (2018.9). Invited lecture
- ⑤ Y. Iwasaki, A. Yokota, A. Otaka, M. Neo, Bone-targeting polyphosphoesters and their interaction with bone cells, 256th ACS National Meeting & Exposition, USA (2018.8).

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 岩崎泰彦, 温度応答性ポリリン酸エステル, 「刺激応答性高分子ハンドブック (宮田隆志監修)」, NTS, pp.369-377(共著) (2018.12) .

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: リン酸ジエステル-リン酸トリエステル共重合体およびその合成方法ならびに骨標的薬物輸送担体

発明者: 岩崎泰彦、大高晋之、横田淳司、根尾昌志

権利者: 関西大学

種類：特許
番号：特願 2017-143922
出願年：平成 29 年
国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://biomat.chemmater.kansai-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：上田 正人
ローマ字氏名：UEDA, Masato
所属研究機関名：関西大学
部局名：化学生命工学部
職名：教授
研究者番号（8 桁）：40362660

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：NOREE, Susita
ローマ字氏名：(NOREE, Susita)

研究協力者氏名：井上 直之
ローマ字氏名：(INOUE, Naoyuki)

研究協力者氏名：平野 佑弥
ローマ字氏名：(HIRANO, Yuya)

研究協力者氏名：久野村 駿
ローマ字氏名：(KUNOMURA, Shun)