

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19680026

研究課題名（和文）生体内バリア回避能を具備したナノキャリアによる革新的ナノ治療の創出

研究課題名（英文）Innovative nano-therapy based on nanocarriers equipped with the ability to circumvent biological barriers

研究代表者

西山 伸宏（NISHIYAMA NOBUHIRO）

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10372385

研究成果の概要（和文）：

本研究では、膵臓がんなどの難治がんの標的治療や核酸医薬を利用したがん分子治療の実現を目指して、機能性高分子の精密設計と分子修飾によって、組織レベルおよび細胞小器官レベルで存在する種々の生体内バリアを回避し、標的部位の特異的環境や外部からの物理刺激に応答して機能発現する高分子ミセル型ナノキャリアを構築した。また、細胞実験および動物実験により、高分子ミセル型ナノキャリアの有効性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To realize the targeting therapy against intractable tumors such as pancreatic tumors and molecular cancer therapy using nucleic acids, we developed novel nanocarriers based on polymeric micelles, which can avoid biological barriers at the tissue and organelle levels and function responding to environmental changes or physical stimuli, by engineering functional polymeric materials. The usefulness of such nanocarriers has been demonstrated by in vitro and in vivo experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2008年度	5,327,810	1,650,000	6,977,810
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	19,427,810	5,880,000	25,307,810

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー、高分子ミセル、がん治療、生体内バリア、光エネルギー

1. 研究開始当初の背景

安全かつ有効な薬物治療を実現する目的において、ナノスケールの薬物送達システム（ナノキャリア）を用いたがん標的治療は、これまでに着実な進歩を遂げ、いくつかのナノキャリアに関して、その有用性が臨床的に実証されている。しかしながら、従来型のナノキャリアでは薬剤や対象疾患が限定されて

おり、膵臓がんなどの難治がんの治療や遺伝子・核酸医薬を利用したがん治療に展開するためには、組織レベルおよび細胞小器官レベルで存在する種々の生体内バリアを回避し、標的部位の特異的環境や外部からの物理刺激に応答して機能発現する特性がナノキャリアに必要であると考えられている。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでにリポソーム等の従来型ナノキャリアとは異なり、環境・刺激応答機能や標的認識機能などのスマート機能を搭載できるナノキャリアとして、性質の異なる高分子が連結されたブロック共重合体の自己会合により形成される高分子ミセルに関する研究を行ってきた。本研究では、高分子ミセル型ナノキャリアを従来型ナノキャリアでは困難であった膵臓がんなどの難治がんの治療や遺伝子・核酸医薬を利用したがんの分子治療に展開するために、組織浸透性などのキャリア特性の最適化と環境応答性や刺激応答性などのスマート機能の賦与を行った。

3. 研究の方法

(1) 難治がんモデルの標的治療のための高分子ミセルの最適化

poly(ethylene glycol)-*b*-poly(glutamic acid) (PEG-P(Glu))と poly(glutamic acid) (P(Glu))と比率を変えて混合し、制がん剤オキサリプラチンの中間活性体である DACHPt と高分子-金属錯体を形成させることによって、粒径が 35nm と 80nm の DACHPt 内包ミセルを調製した。マウス大腸がん C-26 細胞およびヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルマウスに対して、オキサリプラチンおよび上記の DACHPt 内包ミセルを尾静脈より投与し、その制がん活性とがん集積性ならびに腫瘍内分布を評価した。

(2) 細胞内環境応答性を賦与した 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

全身投与が可能な遺伝子ベクターとして、生体適合性に優れた PEG、エンドソーム脱出性を有する poly{N-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp (DET))、DNA と安定なポリイオンコンプレックス (PIC) を形成する poly(L-lysine) (PLys) が連結された PEG-PAsp (DET)-PLys を合成し、DNA を内包した PIC 内核が PAsp (DET) の中間層、PEG の外殻で覆われた 3 層高分子ミセルを構築した。3 層高分子ミセルの機能評価は、*in vitro* による遺伝子導入実験ならびに BxPC3 細胞の皮下移植モデルマウスに対する蛍光タンパク質の遺伝子導入実験により行った。

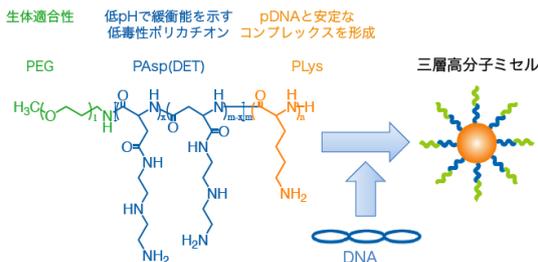


図 1. 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクター

(3) 光応答性を賦与した 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

上記(2)の 3 層高分子ミセルの中間層にアニオン性のデンドリマーフトロシアニン (DPc) を搭載することによって、エンドソーム内の低 pH 環境下で選択的に DPc がリリースされ、DPc によるエンドソーム膜の傷害によって、光照射選択的に遺伝子をエンドソームから細胞質に移行させることができるシステムの構築を行った。本システムの機能評価は、ゲル電気泳動、電気泳動光散乱の測定、ゲルろ過クロマトグラフィー分析などの基本物性の解析と培養細胞に対する遺伝子導入実験により行った。

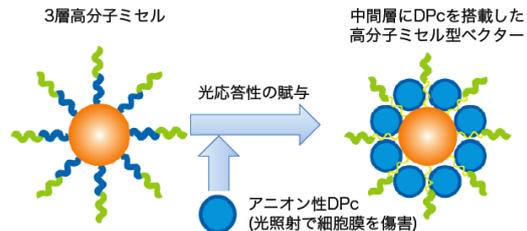


図 2. 光応答性 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクター

(4) 光を利用した制がん剤デリバリーシステムの開発

制がん剤カンプトテシン (CPT) に 3-(2-pyrynyldithio) propionic acid を反応させることによって SH 基を導入し、側鎖に SH 基を導入した PEG-poly(glutamic acid) と反応させることによって、ジスルフィド (SS) 結合を介して CPT を導入した高分子ミセルを開発した。この CPT 内包ミセルと DPc 内包ミセルを同時に細胞に作用させ、DPc 内包ミセルによるエンドソーム膜の光傷害作用を利用して、光選択的に CPT 内包ミセルをエンドソームから細胞質に移行させることができるシステムの構築を行った。CPT 内包ミセルは、還元的環境の細胞質内で SS 結合が開裂することにより選択的に CPT を放出するために本システムにより CPT 内包ミセルの制がん活性を光照射により制御することが可能となる。

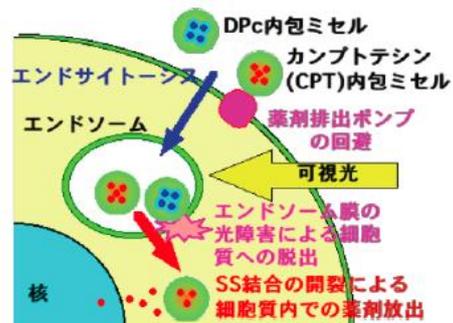


図 3. CPT 内包ミセルと DPc 内包ミセルを利用した光選択的制がん剤デリバリー

本研究では、このコンセプトを実証するた

めに、培養細胞および担がんマウス(マウス大腸がん C-26 細胞)を用いた制がん活性試験と組織切片中の CPT の蛍光顕微鏡観察による腫瘍組織内でのミセルからの CPT のリリースを評価した。

4. 研究成果

(1) 難治がんモデルの標的治療のための高分子ミセルの最適化

高分子ミセルの粒径と *in vivo* 機能の関連を明らかにするために、サイズの異なる 35nm と 80nm の DACHPt 内包ミセルを調製し、それらのヒト膵臓がん BxPC3、マウス大腸がん C-26 細胞の皮下移植モデルに対する制がん活性を評価した。その結果、BxPC3 の皮下腫瘍モデルに対しては、35nm のミセルのみが優れた制がん活性を示したが、C-26 の皮下腫瘍モデルに対しては、35nm と 80nm のミセルは同等の制がん活性を示すことが確認された。これらの結果は、固形がんに対するナノキャリアの集積性および組織浸透性は、がんの組織構築とナノキャリアのサイズに大きく依存することを示唆しているものと考えられる。そこで次に、35nm および 80nm の DACHPt 内包ミセルを異なる蛍光色素で標識し同時にマウスに投与した時の蛍光の分布の違いを評価したところ、C-26 モデルではサイズによる分布の違いは確認されなかったが、BxPC3 モデルでは 80nm のミセルが腫瘍血管の辺縁部に局在したのに対して 35nm のミセルはがん組織の深部にまで浸透することが明らかになった(図 4)。さらに、Spring-8 を利用した組織切片の蛍光 X 線解析によって Pt の分布を評価したところ、上記と同様に 35nm のミセルの投与によってより深部まで Pt が分布していることが明らかとなった。以上のように本研究によって、膵臓がん等の難治がんモデルに対してがん組織の深部にまで薬剤を送達するためにはナノキャリアのサイズが極めて重要であることが明らかとなった。

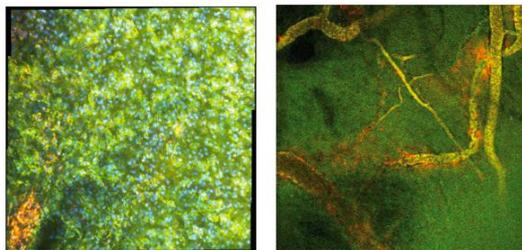


図 4. マウス大腸がん C-26(左)およびヒト膵臓がん BxPC3 モデル(右)におけるサイズの異なる DACHPt 内包ミセル(緑: 35nm, 赤: 80nm)の腫瘍内分布

(2) 細胞内環境応答性を賦与した 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

PEG-PAsp(DET)-PLys と DNA の PIC 形成に関して、エチジウムブロミド(EtBr)の蛍光測定を行った結果、PLys セグメントが DNA と選択的に PIC を形成することが示唆され、またデータ電位測定により、PAsp(DET)からなるカチオン性中間層が形成されることが示唆された。そこで、ヒト肝がん Huh-7 細胞を用いた *in vitro* 実験を行った結果、3 層高分子ミセルは、中間層の PAsp(DET)のエンドソーム脱出能によってエンドソームから細胞質へと脱出することが確認され、PEG-PLys より形成されるミセル型ベクターより優れた遺伝子導入活性を示すことが確認された。さらに、ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルマウスに対して 3 層高分子ミセルを *i.v.* 投与した後のがん組織内におけるレポーター遺伝子(蛍光タンパク質 EGFP)の発現評価を行った結果、がん組織の間質において明確な EGFP の蛍光が観察された(図 5)。以上のように、本研究では、生体適合性に優れた PEG、エンドソーム脱出性を有する PAsp(DET)、DNA と安定な PIC を形成する PLys の 3 種類の機能性高分子を連結することによって、全身投与後に生体内で高い安定性を示す一方で、標的細胞内で効率的に細胞質内に移行し、DNA を遺伝子発現させることができる新規遺伝子ベクターを構築することに成功した。

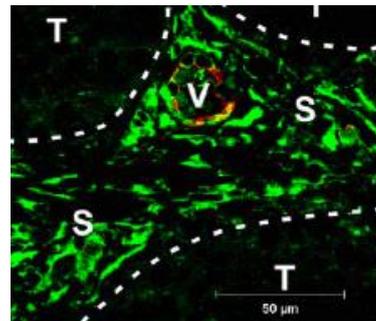


図 5. ヒト膵臓がん BxPC3 モデルにおける 3 層高分子ミセルの遺伝子発現(赤: PECAM, 緑: EGFP, V: 血管, S: 間質, T: がん細胞)

(3) 光応答性を賦与した 3 層高分子ミセル型遺伝子ベクターの構築

3 層高分子ミセルに DPc を添加した後に、ゲル電気泳動、データ電位測定、ゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った結果、ミセル構造が解離することなく DPc が 3 層ミセルの中間層に搭載されることが示唆された。そこで、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞に対する *in vitro* での遺伝子導入を行った結果、DPc を搭載した 3 層高分子ミセルは僅かな光照射量で遺伝子導入効率を約 100 倍まで上昇させることが確認された(図 6)。また、共焦点顕微鏡による蛍光標識 DNA の細胞内分布の観察結果からは、光照射により効率的なミセルのエンドソーム脱出が誘起されていることが示唆された。以上の結果より、本システムによ

り光照射部位でミセルによる遺伝子導入効率を高めることができるものと考えられる。本システムは、将来的には、がんの光線力学治療 (PDT) において可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) 等の分泌型の制がん性タンパク質を同時に遺伝子導入することにより、PDT 後に生存したがん細胞を完全に死滅させることのできる新規コンセプトに基づく PDT へと展開していきたいと考えている。

(4) 光を利用した制がん剤デリバリーシステムの開発

本システムの *in vivo* における有効性を C-26 細胞の皮下移植モデルを用いて検証した。CPT 内包ミセルと DPc 内包ミセルをマウスに対して同時に 2 日おきに 3 回静脈内投与し、投与 24 時間後に 25J/cm² の fluence で固形がんに対して光照射を行った結果、光照射を行っていない条件では有意な制がん活性は認められなかったが、光照射を行った場合に CPT 単独よりも優れた制がん活性が確認された。そこで、光照射選択的に CTP 内包ミセルから CTP がリリースされることを確認するために、光照射 1 時間後および光照射を行っていないマウスからがん組織および肝臓を採取し、組織中の CPT の蛍光を観察することによって CPT のリリースを評価した。その結果、光照射を行ったがん組織においてのみ CPT のリリースが起こっていることが確認された (図 6)。以上のように、本システムを利用すれば、ナノキャリアに搭載された制がん剤を光照射部位のみで活性化することができ、安全性に優れたがん治療が実現されるものと考えられる。

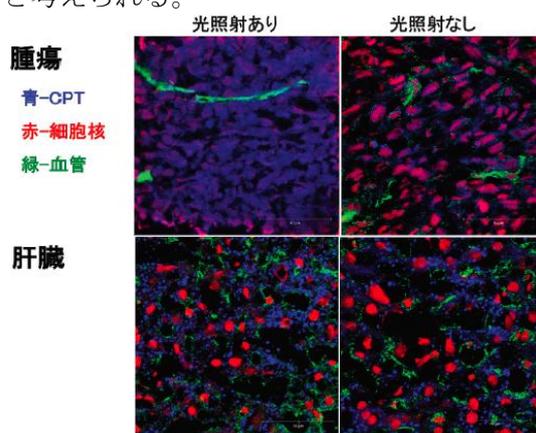


図6. 腫瘍および肝臓におけるCPT 内包ミセルからのCPT のリリース [青: CPT, 赤: 細胞核, 緑: 血管内皮細胞(PECAM-1)]

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 36 件)

1. K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials* 31 (17) 4764-4770 (2010) [査読有]
2. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 7 (2) 501-509 (2010) [査読有]
3. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010) [査読有]
4. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M. R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.*, 17 (8) 1404-1410 (2009) [査読有]
5. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009) [査読有]
6. N. Nishiyama, Y. Morimoto, W. -D. Jang, K. Kataoka, Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61 (4) 327-338 (2009) [査読有]
7. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P. -S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W. -D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release* 133 (3) 245-251 (2009) [査読有]
8. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W. -D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles.

- Pharm. Res. 26 (1) 82-92 (2009) [査読有]
9. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008) [査読有]
 10. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008) [査読有]
 11. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive non-viral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008) [査読有]
 12. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversional ternary polyplex with endosome disruption moiety: a new paradigm for the efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008) [査読有]
 13. K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122 (3) 252-260 (2007) [査読有]
 14. H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121 (3) 146-155 (2007) [査読有]
 15. M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (9) 3460-3465 (2007) [査読有]
- [学会発表] (計 43 件)
1. 西山伸宏, "光線力学治療のための光増感剤内包高分子ミセルの開発", 日本薬学会第 130 年会 シンポジウム「異分野技術の融合による次世代の医療基盤技術の構築に向けて」, ホテルグランヴィア, 岡山 2010 年 3 月 19 日(招待講演)
 2. 西山伸宏, "高分子集合体を基盤とする生体ナノ環境可視化システム", 生体ナノ環境の時空間制御を目指して, 北海道大学大学院薬学研究院・臨床薬学講義室, 北海道 2010 年 1 月 5 日(招待講演)
 3. 西山伸宏, "Development of polymeric micelles for innovative cancer therapy", 第 68 回 日本癌学会 シンポジウム「ナノテクノロジーがもたらす新規がん治療」, パシフィコ横浜, 神奈川 2009 年 10 月 2 日(招待講演)
 4. 西山伸宏, 韓ムリ, 大庭誠, カブラル・オラシオ, 狩野光伸, 片岡一則 "がん深部への遺伝子・薬剤デリバリーのためのナノキャリアの設計", 第 58 回高分子討論会, 熊本大学 黒髪キャンパス, 熊本 2009 年 9 月 17 日(口頭)
 5. N. Nishiyama, "Block copolymer micelles as smart supramolecular nanodevices for tumor targeting", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 19, 2009 (Invited Lecture)
 6. 西山伸宏, 片岡一則, "高分子集合体を基盤とした遺伝子・siRNA デリバリーシステムの創製", 第 24 回日本 DDS 学会学術総会, 六本木アカデミーヒルズ, 東京 2008 年 6 月 29 日(招待講演)
 7. N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of functional drug delivery system based on polymer assemblies", 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD), Noordwijk aan Zee, The Netherlands, April 2, 2008 (Invited Lecture)
 8. 西山伸宏, 熊谷康顕, 堀江壮太, Sarma Tridib, 程域, 張祐銅, 中岸義典, 守本祐司, 片岡一則, "固形がんの光力学治療のための dendroliamer フタロシアニン内包高分子ミセルの開発", 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会, 千里ライフサ

イエンスセンター，大阪 2007 年 11 月 27 日(口頭)

9. N. Nishiyama, K. Kataoka, "Stimuli-responsive drug and gene nanocarriers based on supramolecular assemblies", 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS), Long Beach, California, July 11, 2007 (Invited Lecture)

[図書] (計 15 件)

1. 西山伸宏, 片岡一則 第4章 機能性 DDS キャリアの応用・実用化研究 9. 光応答型 DDS 機能性 DDS キャリア製剤設計(編集 岡田弘晃), CMC 出版 (東京), 269-278 (2008)
2. 西山伸宏, 片岡一則 II 章 5. ナノテクノロジーを利用した DDS 癌の分子標的治療(編集 鶴尾隆), 南山堂, 28-34 (2008)
3. 西山伸宏 第II部 第1章 ナノDDS 医療 ナノテクノロジー-最先端医学とナノテクノロジーの融合- 杏林図書, 88-97 (2007)

○出願状況 (計 4 件)

名称: カチオン性のポリ(アミノ酸)およびその使用

発明者: 西山伸宏, 片岡一則, 宮田完二郎, 石井武彦, 呉寿栄, キム ヒョンジン

権利者: 国立大学法人東京大学

種類: 特許権

番号: 特願 2009-31799

出願年月日: 2009 年 2 月 12 日

国内外の別: 国内

[その他]

(1) 受賞実績

2007 年 5 月 高分子学会 高分子研究奨励賞
2009 年 7 月 日本 DDS 学会 第一回日本 DDS 学会奨励賞(基礎)

(2) 報道関連

2010 年 2 月 23 日 毎日新聞 薬の運搬 自在に設計

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 伸宏 (NISHIYAMA NOBUHIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10372385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし