

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04473

研究課題名(和文) 骨転移の診断・治療の効率化を目指したセラノスティクス型骨標的化ナノ薬物担体の開発

研究課題名(英文) Development of theranostics-type bone-targeted nanodrug carrier for the efficient diagnosis and treatment of bone metastasis

研究代表者

勝見 英正 (Katsumi, Hidemasa)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30434666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラギン酸(Asp)修飾に基づく骨標的化技術に基づき、イメージング分子、治療用放射性核種及び抗癌剤を効率よく骨転移部位に送達可能なナノ粒子を創製することを目指した。Asp修飾分岐ポリマーの末端基に親水基と疎水基を結合することで、水中でナノ粒子化する両親媒性ポリマーを作製した。放射標識体を用いた体内動態評価やSPECT/CTによる臓器分布イメージングの結果、マウス静脈内投与後のAsp修飾ナノ粒子は骨へ選択的に移行することが示された。骨転移モデルマウスにおいて、抗癌剤搭載Asp修飾ナノ粒子または治療用放射性核種搭載Asp修飾ナノ粒子の投与により下肢骨における癌増殖が顕著に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨転移は難治性癌性疼痛等の骨関連事象を伴い患者のQOLの低下ひいては死期を早めることから、その診断・治療法の開発が切望される。本研究では、抗癌剤やイメージング用・治療用放射性核種などを効率良く骨へ送達可能な薬物ナノ粒子を開発することに成功した。これらの知見は骨転移診断・治療法の開発に対して有用な情報を提供するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Based on bone targeting technology based on aspartic acid (Asp) modification, we aimed to develop nanoparticles that can efficiently deliver imaging molecules, therapeutic radionuclides and anticancer agents to bone metastases site. By conjugating the hydrophilic group and the hydrophobic group to the terminal group of the Asp-modified branched polymer, we prepared an amphipathic polymer that becomes nanoparticles (micelles) in solution. Anticancer drugs selectively distributed to bone by using Asp-modified nanoparticles after intravenous injection in mice. In tissue distribution imaging by SPECT/CT, bone-selective pharmacokinetics of  $[^{111}\text{In}]$ Asp-modified nanoparticles were observed. In bone metastasis model mice, administration of anticancer drug-loaded Asp-modified nanoparticles and  $[^{90}\text{Y}]$  Asp-modified nanoparticles was found to significantly suppress tumor growth in the lower limb bone.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：薬学 ドラッグデリバリーシステム ターゲティング 骨 セラノスティクス

## 1. 研究開始当初の背景

骨は肺・肝臓に匹敵する癌転移好発臓器であり、特に乳癌、前立腺癌などは骨に高頻度に転移する。骨転移は、耐え難い骨痛、病的骨折、運動制限、高カルシウム血症などを併発するため、癌患者の QOL を著しく低下させ、死期を早めることから、その抑制法の開発が切望されている。

従来の骨転移治療においては、放射線治療、外科的治療、鎮痛薬の投与などが行われてきたが、いずれも骨に転移した癌の脊髄圧迫による痛みの抑制を目的とした対症療法であった。また、骨は、薬物が移行しにくい組織構造であることから、抗癌剤の骨移行性は不十分であり、通常の化学療法による骨転移治療は極めて困難である。近年、転移した癌の増殖を促進する破骨細胞の機能を抑制するゾレドロン酸（ビスホスホネート系薬物）や核医学治療用の塩化ラジウム-223 が、骨転移に対する治療薬として使用されるようになったが、単独で十分な効果が得られることは稀であり、骨、特に骨転移の病的部位へ抗癌剤などの治療薬を効率的に送達させるデリバリーシステムを構築することによる新治療法の実現が課題である。

一方、ガンマシンチグラフィ、SPECT、PET や MRI などを用いた画像診断では、標的部に集積する化合物をイメージング分子（造影剤、プローブ）で標識して、その分布を画像化することで病態を診断する。しかしながら、既存のイメージング分子は未だ機能性や標的性が十分に確立されているとは言い難いのが現状である。そのため、イメージング分子の標的化の向上により高感度化及び高解像度化するドラッグデリバリーシステム (DDS) 開発に期待が高まっている。

また治療と診断を一体化したセラノスティクスは新しい治療/診断コンセプトをもたらすと期待されているが、骨疾患を標的としたセラノスティクスは上述のようにイメージング分子や薬物の体内動態制御に課題があるため開発が遅れているのが現状である。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに生体由来の各種カルボン酸のなかで、アスパラギン酸が骨ターゲティング素子として最も有望であることを明らかにしている（文献）。そこで本研究では、上記課題を解決するため、アスパラギン酸修飾に基づく骨標的化技術に基づき、イメージング分子、放射性治療用核種及び抗癌剤を効率よく骨転移部位に送達可能なナノ粒子を創製することを目指した。

## 3. 研究の方法

アスパラギン酸修飾ナノ粒子の合成：

アスパラギン酸 (Asp) 修飾ナノ粒子は Asp 修飾分岐状ポリマーを HBTU-HOBt 法に則って合成した。すなわち、分岐状ポリマーに対して HBTU、HOBt を加え Boc-Asp(OtBu)-OH をカップリング反応させた。室温でインキュベートした後、反応混合液を溶媒除去し精製した後、TFA で脱保護した。得られた Asp-分岐状ポリマーに対してアミノ基反応型活性化 PEG (PEG-NHS) を反応させた。次に、PEG-Asp-分岐状ポリマーに対して、疎水基を導入することで、Asp-分岐状ポリマーに親水基と疎水基が導入された両親媒性ポリマーを得た。臨界ミセル形成濃度は、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) と Asp 修飾ナノ粒子溶液を混合し蛍光強度を測定することで測定した。

体内動態の評価：

マウスにおける Asp 修飾ナノ粒子の体内動態評価には  $^{111}\text{In}$  標識体を用いた。 $^{111}\text{In}$  標識 Asp 修飾ナノ粒子を投与後、経時的に血漿中及び各臓器中の放射活性をガンマカウンターで測定した。また、投与後 24 時間の [ $^{111}\text{In}$ ] Asp 修飾ナノ粒子の臓器分布を SPECT/CT を用いたイメージングにより観察した。

骨転移抑制効果の評価：

C57BL/6 マウスの左心室内に B16BL6/Luc 細胞を投与することにより骨転移モデルを作製した。癌細胞接種後に抗癌剤搭載 Asp 修飾ナノ粒子または治療用放射性核種 [ $^{90}\text{Y}$ ] を搭載した Asp 修飾ナノ粒子を尾静脈投与した。投与後 2 週間目に麻酔下にて、Luciferin 溶液を腹腔内投与し *in vivo* IVIS イメージングシステムで癌増殖を観察した。IVIS 撮像後マウスを安楽死させ、下肢骨を摘出した。その後下肢骨を lysis buffer 中でホモジネートし遠心分離後、その上清と Luciferin 溶液を混合し、癌細胞由来の Luciferase 発光を指標に癌細胞数を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨標的化能を示すアスパラギン酸 (Asp) 修飾ナノ粒子の開発

分岐状ポリマーの表面アミノ基に対して、Boc-Asp(OtBu)-OH を HBTU-HOBt 法でカップリング反応、脱保護させることで Asp 修飾分岐ポリマーを合成した。さらに、Asp 修飾分岐ポリマーの末端基に親水基の PEG と疎水基を結合することで、水中でナノ粒子化 (ミセル化) する両親媒性ポリマー (高分子ミセル) を作製した。調製した高分子ミセルの安定性 (臨界ミセル濃度) を DPH の蛍光強度で評価したところ、Asp 修飾分岐ポリマーは、生体内でも十分ミセルを形成する臨界ミセル濃度を示した。

##### (2) 骨標的化ナノ粒子を利用した抗癌剤の骨標的化

骨指向性を有する Asp 修飾分岐ポリマーに疎水基を導入することで両親媒性ポリマーとし、水中でナノ粒子 (高分子ミセル) を形成させた。そのナノ粒子の疎水性コアに脂溶性抗癌剤を封入し、放射標識体を用いてマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、ナノ粒子を利用することで抗癌剤が骨へ選択的に移行することが示された。また、ナノ粒子は、骨の代謝回転が活性化されている部位 (骨吸収部位) に特に集積することが確認された。さらに、抗癌剤とナノ粒子の体内動態がほぼ同様の推移を示したことから、抗癌剤は血中においてナノ粒子からほとんど放出されることなく骨へ効率良く移行したと考えられた。また、癌細胞を左心室内投与することにより作製した骨転移モデルマウスにおいて、抗癌剤搭載ナノ粒子は下肢骨における癌増殖を顕著に抑制した。以上のことから、抗癌剤の骨標的化ならびに骨転移治療における骨標的化ナノ粒子の有用性が示された。

##### (3) 骨標的化ナノ粒子を利用した治療用放射性核種の骨標的化

上記骨標的化ナノ粒子による  $^{90}\text{Y}$  (治療用放射性核種) の骨標的化ならびにその骨転移治療効果について評価した。SPECT/CT を用いた臓器分布イメージングの評価において、マウス静脈内投与後の  $^{111}\text{In}$  Asp 修飾ナノ粒子は骨へ効率よく移行し、特に骨転移の病巣部位である関節部に集積することが明らかとなった (図 1)。そこで、 $^{111}\text{In}$  を  $^{90}\text{Y}$  に変更した  $^{90}\text{Y}$  Asp 修飾ナノ粒子を調製し、 $^{90}\text{Y}$  の骨標的化による骨転移治療の可能性を評価した。その結果、骨転移モデルマウスにおいて、 $^{90}\text{Y}$  Asp 修飾ナノ粒子の投与により下肢骨の関節部における癌増殖が顕著に抑制されることが認められた。以上より、Asp 修飾ナノ粒子は骨転移をはじめとする骨疾患治療において有望な骨標的化薬物キャリアであることが示された。

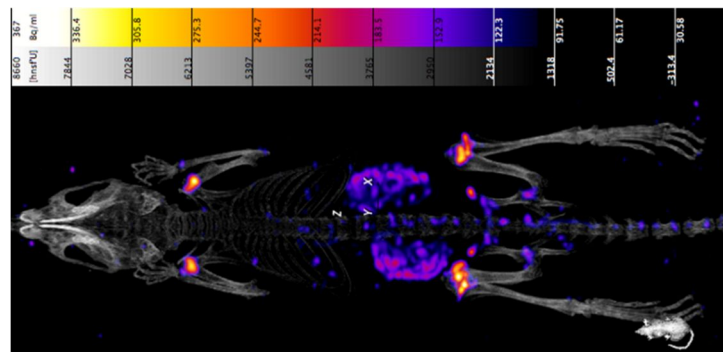


図 1 マウス静脈内投与後の  $^{111}\text{In}$  アスパラギン酸修飾ナノ粒子の SPECT/CT 画像

#### < 引用文献 >

Yamashita S, Katsumi H, Hibino N, Isobe Y, Yagi Y, Kusamori K, Sakane T, Yamamoto A. Development of PEGylated carboxylic acid-modified polyamidoamine dendrimers as bone-targeting carriers for the treatment of bone diseases. *J Control Release*. 262, 10-17 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shugo Yamashita, Hidemasa Katsumi, Erika Shimizu, Yuto Nakao, Ayane Yoshioka, Minako Fukui, Hiroyuki Kimura, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto | 4. 巻<br>157           |
| 2. 論文標題<br>Dendrimer-based micelles with highly potent targeting to sites of active bone turnover for the treatment of bone metastasis                  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics  | 6. 最初と最後の頁<br>85 ~ 96 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ejpb.2020.10.001   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>勝見英正, 森下将輝, 山本 昌                             |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸クラスターを利用したターゲティング型DDSの開発とがんのセラノスティクスへの展開 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本DDS学会学術集会（招待講演）                        |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>勝見英正, 森下将輝, 山本 昌                  |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸修飾を利用した骨または腎臓へのターゲティング型DDSの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会（招待講演）                 |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hidemasa Katsumi, Shugo Yamashita, Erika Shimizu, Yuto Nakao, Masaki Morishita, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto   |
| 2. 発表標題<br>Aspartic acid modified dendrimer-based micelle as a highly potent bone resorption surface-targeting nano-carrier for the efficient treatment of bone metastasis |
| 3. 学会等名<br>7th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2020（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉岡綾音、勝見英正、福井美奈子、高木千聖、山下修吾、木村寛之、湯谷玲子、田中晶子、古林呂之、森下将輝、坂根稔康、山本 昌 |
| 2. 発表標題<br>アスパラギン酸修飾ナノキャリアを用いた抗癌剤の骨標的化による骨転移抑制                          |
| 3. 学会等名<br>第70回日本薬学会関西支部総会・大会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉岡綾音、勝見英正、福井美奈子、高木千聖、山下修吾、木村寛之、森下将輝、坂根稔康、山本 昌 |
| 2. 発表標題<br>アスパラギン酸修飾を利用した骨標的化DDSの開発                      |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部総会・大会                            |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>勝見英正、森下将輝、山本 昌                               |
| 2. 発表標題<br>アミノ酸クラスターを利用したターゲティング型DDSの開発とがんのセラノスティクスへの展開 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140年会（招待講演）                            |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hidemasa Katsumi, Shugo Yamashita, Erika Shimizu, Yuto Nakao, Akiko Tanaka, Tomoyuki Furubayashi, Masaki Morishita, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto         |
| 2. 発表標題<br>Aspartic acid modified dendrimer-based micelle as a highly potent bone resorption surface-targeting nano-carrier for the efficient treatment of bone metastasis |
| 3. 学会等名<br>The Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics in Takasaki   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-----------|--|-----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 山本 昌<br><br>(Yamamoto Akira)<br><br>(00166779)   | 京都薬科大学・薬学部・教授<br><br><br>(34306)  |    |
| 研究<br>分担者 | 木村 寛之<br><br>(Kimura Hiroyuki)<br><br>(50437240) | 京都薬科大学・薬学部・准教授<br><br><br>(34306) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|