

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20692

研究課題名(和文)セラノスティクスを志向した多機能性キレートナノメディシンの開発

研究課題名(英文)Development of multi-functional chelating nanomedicines as theranostics

研究代表者

金 雅 覧 (Kim, Ahram)

筑波大学・数理工学系・研究員

研究者番号：00794679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：体内金属イオン濃度の調整は重要な生体機能の一つであるが、その人為的な制御は極めて難しい。金属錯体を造影剤として用いるバイオイメージング法が注目を集めたが、金属イオンが代謝されず残留するなど重大なリスクを抱える。また、金属代謝異常症に起因する属中毒症など、様々な難病に対しては、キレート剤の投与により体内で錯体の生成を誘導し、排出を促進させるキレーション療法が行われているものの、その効率が極めて低い上、排出系に深刻な副作用を起こす。本研究では、これらの問題点を克服し、目的の金属イオンを送達、または、異常蓄積された金属イオンを捕獲・排出する、安全かつ有効なナノメディシンの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属錯体はMRI法などの造影剤として、キレート剤はキレーション療法に用いられているものの、それぞれ金属イオンが残留する重大なリスクや、極めて低い治療効果が問題となっている。本研究は、極めて安全に金属イオンの送達、または捕獲する画期的なナノメディシンの開発に成功した。今後、様々な難治性疾患の診断・治療への応用が強く期待される。

研究成果の概要(英文)：Spatiotemporal regulation of metal ions is an important biological process. Nevertheless, when it comes to a dysfunctional deficiency or accumulation of metal ions, it is extremely difficult to regulate them by using conventional drugs. Metal chelates have been used as contrast agents in bioimaging methods. However, permanent deposition of toxic metal ions, such as gadolinium, has been reported. Furthermore, metal ion overload has been one of the serious incurable diseases, because although chelation therapy has been employed, the conventional chelating agents possess not only an unreasonably low efficacy and strong toxicity against the excretion system. In this study, to resolve the aforementioned problems, highly innovative nanomedicines were developed for two contrasting purposes: 1) Metal ion-encapsulating nanoparticles for safe delivery of metal ions, and 2) Metal ion-capturing nanoparticles for safe chelation therapy.

研究分野：Materials Engineering

キーワード：配位結合 キレート分子 金属イオン フェントン反応 キレーション療法 高分子 ナノ粒子 ドラッグデリバリーシステム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

金属イオンやその錯体を造影剤とするバイオイメージング法が広く普及されているが、その安全性が問題となっている。例えば、ガドリニウム造影剤である Gd-DTPA (図 1) を使った MRI 検査を行った後、数年以上経っても体内にガドリニウムが残存し検出された例が報告されるなど、副作用を起こす可能性が示唆されている中、近年米 FDA ではガドリニウム造影剤の使用が必要不可欠な場合のみ使用することを勧告する他、厚生労働省も該当造影剤の使用上の注意を改訂し (平成 29 年 11 月)、必要な場合に限り最小限の量を投与することを今後の方針とした。投与したガドリニウムが体内に長期間残存する根本的な理由は、ガドリニウム錯体の結合安定性が不十分であるため生理条件下でガドリニウムイオンが解離し、全身に拡散してしまうことが考えられる (図 2)。また、ガドリニウムが全身に拡散されるため、ターゲットの組織まで届けられるのは僅かな量に過ぎないので、投与量を増やす必要が生じるなど、悪循環に陥ってしまう。

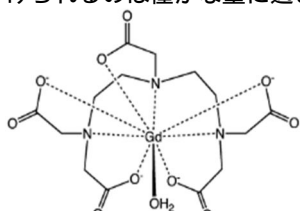


図 1. Gd-DTPA の構造

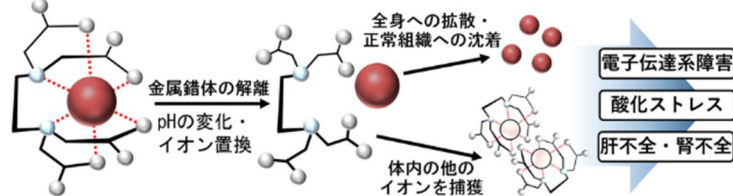


図 2. 既存の金属錯体の不安定性に起因する問題点

これらの問題点を克服するため、ガドリニウムを含む様々な金属の錯体が開発されているが、安全かつ有効な化合物は未だに確立されていない。一部の研究では金属錯体を高分子化することで投与後の体内動態を制御し、ターゲットの部位までの送達効率を上げるために工夫されて来たが、金属イオンが容易に漏出したり、または血中で直ちに凝集するため免疫機構により素早く排除されるだけで造影剤としての機能が低下されるなど、多くの問題を抱えている。一方で、汚染された食品の摂取による重金属中毒、ウィルソン病など遺伝的欠損による金属代謝異常症、または輸血依存性の鉄過剰症は、金属の異常蓄積を伴う疾患であり、確実な治療法が確立されていないため、難病とされている。キレート剤の投与により体内で錯体の生成を誘導し金属イオンの排出を促進させる、キレーション療法が行われているものの、市販のキレート剤はどれも低分子化合物であり腎臓により迅速に排出されるため、目的の組織まで届けられる効率は極めて低く、排出を必要とする特定の金属イオンに対しての選択性も無い。特に、錯体を形成した後も金属の酸化還元能は維持され、その結果排出の過程で肝臓や腎臓にダメージを与え、死亡にまで至るとの報告もされている。そのため、従来のキレーション療法を画期的に改善できる、新たなキレート剤の開発が求められている。我々は長年、薬物送達システムに関する研究を遂行する過程で、生体分解性の親-疎水ブロック共重合体からなるナノ粒子を作製してきた。近年、上述した既存のガドリニウム造影剤の問題を改善するため、ガドリニウム内包のフラーレンを搭載したナノ粒子を開発した。生体適合性が高く分散安定性の高いナノ粒子は、腫瘍組織内の新生血管の高い漏れ出し (透過性) や未発達のリンパ系に基づく回収機構の欠如のようなマイクロ環境の特徴により、腫瘍組織内に受動的に集積していくメカニズム (Enhancement Permeation and Retention, EPR 効果) が知られている。本研究では上述した背景を踏まえて、体内金属イオンを制御する新しいナノメディシンの構築を目指し、(1)ガドリニウムのみならず様々な金属イオンを安定に封入・送達するシステム、また、(2)異常蓄積した金属イオンを捕獲・排出するシステムの開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、生体適合性高分子のポリエチレングリコール (PEG) と、キレート能を有する高分子セグメントを結合させ、ブロック共重合体を合成し、金属イオンの導入と共にナノ粒子の作製を図った (図 3 右上)。キレートサイトに導入された金属イオンは、1:2 の 6 配位構造をとることが期待されるため、金属イオンの漏出を高度に抑制できる。さら

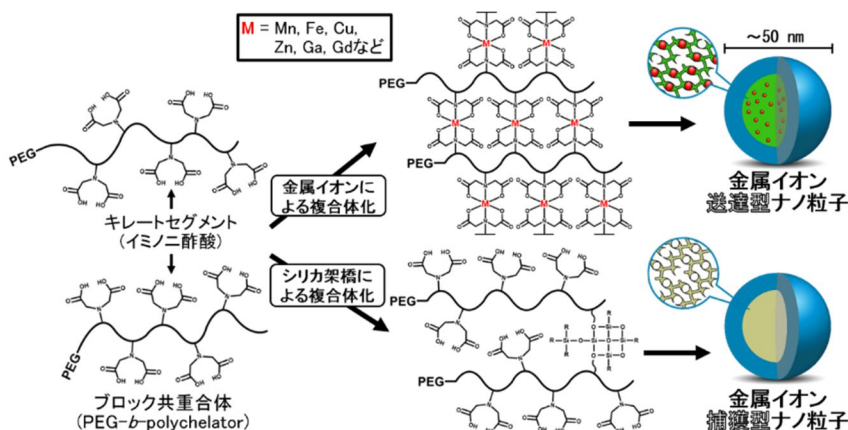


図 3. 金属イオン送達型 (右上) 及び金属イオン捕獲型 (右下) ナノ粒子の設計

さらに、金属イオンを導入させず、キレート能を保ったまま安定化するナノ粒子を作製するため、シランカップリング剤を用いて分子間をシリカにより架橋する (図 3 右下)。ここで、シリカのみでなくジスルフィド (-SS-) やジアミン (-N-R-N-) をも架橋剤として検討し (図 4)、血中安定性や生体分解性を制御することで、材料の最適化を行った。このような分子設計は、血中を滞留しながら過剰な金属イオンを捕獲する、ナノ粒子型の新しいキレート剤としての応用が可能である。特に、通常のキレート剤は金属イオンと結合し錯

体となった後も金属イオンの酸化・還元能が維持されるため、排出の過程で正常組織にダメージを与える恐れがあるが、ナノ粒子の中に閉じ込められた金属イオンは、PEG鎖の遮蔽効果により周りの環境との相互作用が抑えられ、従来よりも安全なキレーション療法の確立が可能となる。

3. 研究の方法

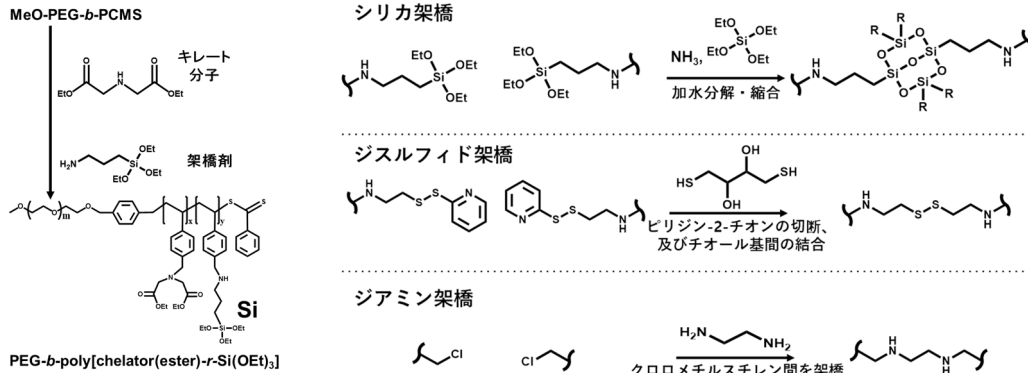


図4. 金属イオン捕獲型ナノ粒子を安定化させるための架橋構造(左)合成スキーム(右)架橋剤の導入

水溶性ポリエチレングリコール(PEG)とポリクロロメチルスチレンとのブロック共重合体(PEG-b-PCMS)を合成し、そのPCMSセグメントの側鎖にキレート分子となるイミノ二酢酸を導入し、PEG-b-polychelatorを合成した。続いて、様々な金属イオンを導入し、金属イオン送達型のナノ粒子を作製した。さらに、金属イオン捕獲型ナノ粒子に関しては、図4に示した通り、PEG-b-polychelatorに架橋剤を導入し、金属イオン捕獲型のナノ粒子をも作製した。これらのナノ粒子に導入された金属イオンの封入安定性は、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)により評価した。ナノ粒子の血漿における安定性は、蛍光分子を導入した高分子を用いて、蛍光相関分光法(FCS)により確認した。また、ナノ粒子の細胞毒性は、血管内皮細胞や肝臓洞内皮細胞など、初代培養細胞に対してを評価した。

金属イオン送達型のナノ粒子を応用した新しい抗がん剤として、PEG-b-polychelator、グルコースオキシダーゼ(GOD)、ポリリジン、鉄(II)イオンの4つのコンポーネントを混合し、ポリオンコンプレックス(PIC)ミセル型のナノフェントンリアクター(図5)を作製した。GODを有するコア部分がグルコースを過酸化水素に変換し、続いて過酸化水素はPEG-b-polychelatorの側鎖に封入された鉄イオンによってフェントン反応を起こす。

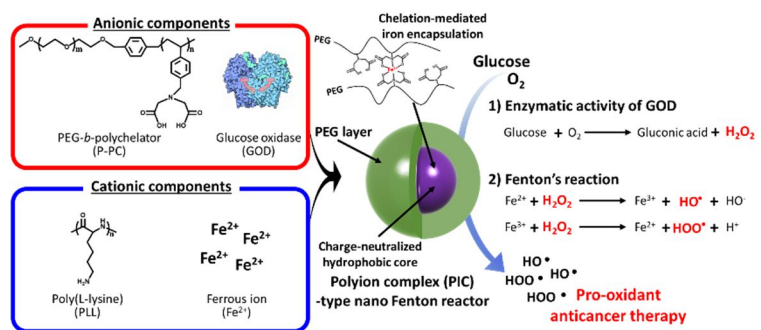


図5. ナノフェントンリアクターの作製

その結果、ヒドロキシラジカルが過剰に生成され、がん細胞を攻撃する仕組みとなっている。ナノ粒子中の鉄イオンの封入安定性を確認するため、ナノ粒子を37°Cのトリス緩衝生理食塩水(TBS)中に透析し、透析膜内部の鉄濃度の経時変化をICP-MSで定量した。ナノ粒子中のGODの封入安定性に関しては、ナノ粒子を同じく37°CのTBS中に透析し、透析膜内部の溶液を超音波により分離した後、上澄み中に存在する蛍光ラベル化したGODの量を定量する事で確認した。また、マウス大腸がん細胞(C26)の担がんマウスに対してナノ粒子を尾静脈投与し、ナノ粒子の抗がん効果をも検証した。また、図4のシリカ架橋型を導入した金属イオン捕獲型のナノ粒子(SiChNP)は、高濃度の塩や酵素に対する安定性をFCS法により評価し、ナノ粒子の鉄イオン捕獲能ならびに高濃度の鉄イオンに対して正常細胞を保護する効果をも検証した。また、LIVE/DEAD細胞生存率アッセイを用いて、ナノ粒子の鉄イオンに対するの保護効果を、既存キレート剤と比較した。

4. 研究成果

(1) 金属イオン送達型ナノ粒子：ナノフェントンリアクターによる抗がん療法

コントロールナノ粒子を含めて、表1に示した組成に従い、4つの異なるナノ粒子を作製した。これらのナノ粒子の粒径・ゼータ電位ならびにその分布(図6、表2)を動的光散乱法(DLS)・電気泳動光散乱法(ELS)により測定した。全てのナノ粒子において、30 nm前後の粒径ならびに中性に近いゼータ電位を示した。各コンポーネント単独の散乱光強度は極めて低い上、ゼータ電位は陽性または陰性となっているが、ナノ粒子の散乱光強度

表1. ナノ粒子(NP)-I, II, III, IVの組成

表記	PEG-b-polychelator	GOD	Poly(L-lysine)	Fe ²⁺
NP-I	+	-	+	-
NP-II	+	+	+	-
NP-III	+	-	+	+
NP-IV	+	+	+	+

は大幅に増加し、中性に近いゼータ電位を持つことから、狙い通りに複合体化されナノ粒子となっている事が確認された。

鉄を有するナノ粒子 (NP-III, NP-IV) の鉄の封入安定性および GOD を有するナノ粒子 (NP-II, NP-IV) の GOD の封入安定性を分析した結果、鉄イオンと PEG-b-polychelator のみを混合した粒子より、ポリリジンを加えた NP-III, NP-IV において鉄の封入安定性が大幅に向上された。

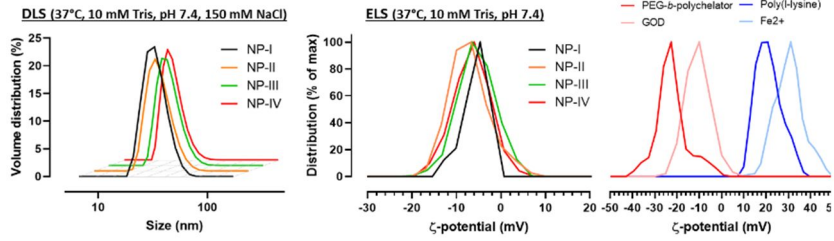


図 6. 金属イオン送達型のナノ粒子を用いたナノフェントンリアクターの作製

表 2. ナノ粒子 (NP)-I, II, III, IV の DLS, ELS 測定結果のまとめ

試料	粒径 (nm)		散乱光強度 (kcps)	多分散度	ゼータ電位 (mV)
	体積平均	数平均			
PEG-b-polychelator	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	280 ± 70	-	-22.2 ± 7.1
GOD	5 ± 3	4 ± 1	1110 ± 420	.41	-10.6 ± 5.6
Poly(L-lysine)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	390 ± 180	-	+21.2 ± 5.8
Fe ²⁺	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1380 ± 520	-	+30.4 ± 6.4
NP-I	33 ± 2	28 ± 1	16320 ± 410	.07	-5.7 ± 2.8
NP-II	31 ± 1	27 ± 1	17000 ± 270	.08	-7.2 ± 4.4
NP-III	34 ± 1	28 ± 2	21300 ± 180	.09	-5.5 ± 4.2
NP-IV	33 ± 2	28 ± 1	22400 ± 160	.09	-6.6 ± 4.0

また、GOD の封入安定性は、鉄イオンを加えた NP-IV の方が鉄イオン無しの NP-II を大きく上回り、鉄の錯体による分子間の結合はナノ粒子の安定性に大きく向上させる事が示唆された。次に、マウス大腸がん細胞 (C26) を皮下移植した担がんモデルマウスにおいて、ナノ粒子の抗がん効果ならびにナノ粒子投与によるマウスの体重変化を確認した (図 7)。分子設計の狙いの通り、PEG-b-polychelator、グルコースオキシダーゼ (GOD)、ポリリジン、鉄 (II) イオンの 4 つのコンポーネントを全て有する NP-IV において、腫瘍の成長を有意に抑制する結果となった (図 7A)。ここで重要なポイントとしては、鉄イオンが封入されていない NP-II において、投与の直後に顕著な体重の低下が見られた事である (図 7B)。NP-II は、GOD の封入安定性が比較的に低いため、ナノ粒子が腫瘍に届けられる前に、血中での GOD の漏れ出しが予想される。血中に存在する GOD はグルコースを過酸化水素に変換し、正常組織を無作為に攻撃すると予想される。すなわち、本研究のナノフェントンリアクター (NP-IV) の分子設計は、GOD とフェントン反応を用いた抗がん療法において、安全性を保つための必要不可欠なものであると言える。生存率 (図 7C) や生存期間中央値 (図 7D) のデータにおいても、NP-IV が他のナノ粒子やコントロール群を大幅に上回る結果となった。腫瘍内に鉄イオンが届けられた事を検証するため、腫瘍の凍結切片を作成し、プルシアンブルーによる染色を行った (図 7E)。鉄イオンを有する NP-III および NP-IV の投与群において腫瘍組織に鉄イオンが存在する事が確認された。

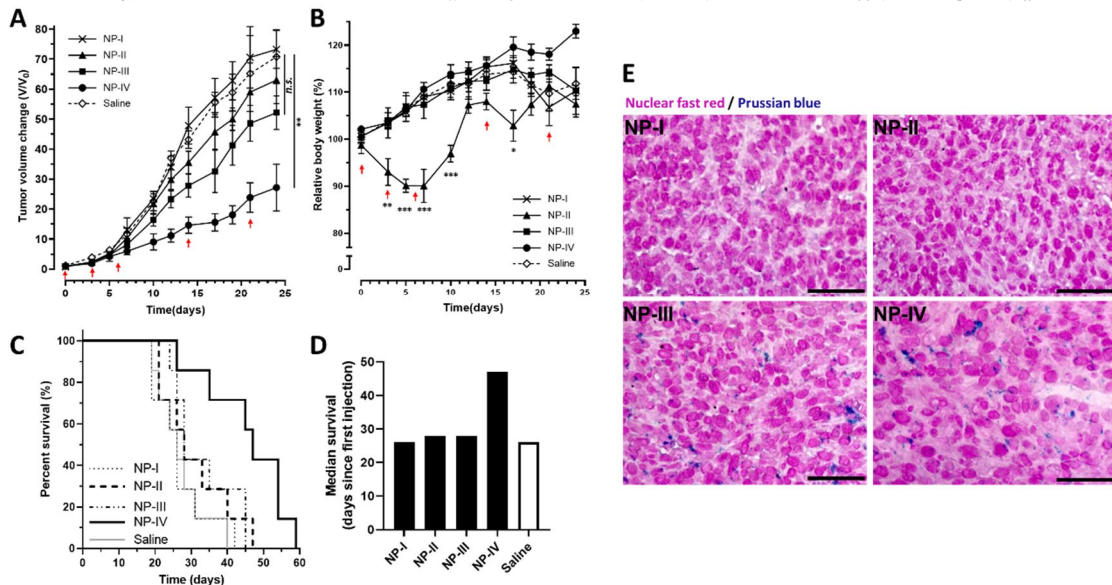


図 7. ナノフェントンリアクターによる抗がん療法の (A) 腫瘍の体積、(B) 体重変化、(C) 生存率、(D) 生存期間中央値。赤い矢印は尾静脈投与を行った日を示す。(E) ナノ粒子投与後の腫瘍組織のプルシアンブルーによる染色。

(2) 金属イオン捕獲型ナノ粒子: SiChNP によるキレーション療法

金属イオン捕獲型のナノ粒子においては、金属イオンの捕獲の有無に関係なく、分子構造を維持する事が重要である。そのため、異種の電荷が駆動力となって形成されるポリイオンコンプレックス (PIC) より、高い安定性が必要となる。本研究では、シランカップリング剤により分子間を架橋し、酵素や pH 変化による分解を回避し、血中を安定に滞留しながら過剰な鉄イオンを捕獲するナノ粒子 (SiChNP) を作製した。高濃度のイオンや血漿中でのナノ粒子の安定性を確認するため、静的光散乱法 (SLS) ならびに蛍光相関分光法 (FCS) による測定を行った。図 8 左の通り、SiChNP は、鉄イオンの有無、または高濃度の塩の有無に関係なく、架橋されていない PEG-b-polychelator に比べて非常に高い安定性を示した。また、90% のウシ胎児血清 (FBS) と混合し 37 °C でインキュベーションさせたナノ粒子 (図 8 右) において、SiChNP や鉄イオンの存

在に関係なく、その拡散係数を48時間まで安定に維持する事が確認された。従って、SiChNPは強酸性や分解酵素に露出される経口投与において、急激な分解・腎臓による迅速な排出が抑えられ、血中に徐々に放出され、長時間に渡って血中に過剰に存在する不要な金属イオンを捕獲できると予想される。キレーション療法に用いられている既存キレート剤の重大な弱点として、非常に短い血中の半減期により、数年間に渡って毎日の投与が必要とされるのが問題となっている中、このような分子設計はキレーション療法の効率、安全性を飛躍的に向上させると期待できる。次に、金属イオン捕獲型ナノ粒子の鉄イオン捕獲能を検証し(図9A,B)、高濃度の鉄イオンに対しての細胞を保護する効果(図9C)をも確認した。鉄イオンとナノ粒子を混合し、超遠心によりナノ粒子と低分子を分離させ、上澄みの鉄濃度を定量した結果、PEG-b-polychelatorとSiChNPの両方において、定量的に鉄イオンを捕獲出来る事が確認された。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を鉄イオン(25 μM)にのみ曝露させるよりも、PEG-b-polychelator(50 μM chelator)やSiChNP(50 μM chelator)を追加で曝露させる(鉄イオン曝露の1時間後)方が、細胞の生存率を高める結果となった。これは、ナノ粒子が鉄イオンを捕獲しナノ粒子の中に閉じ込める事によって、鉄イオンによる酸化ストレスが抑えられた結果だと予想される。

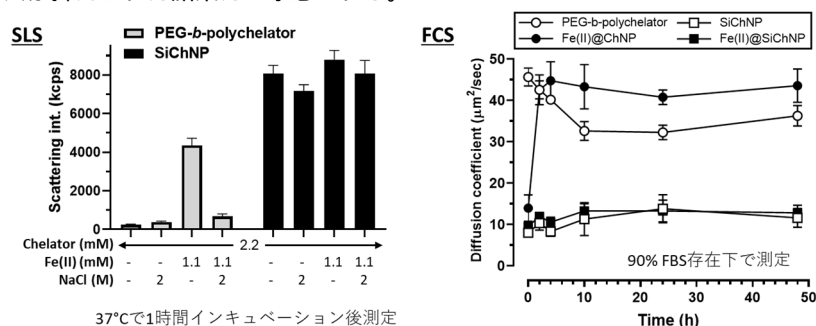


図8. 金属イオン捕獲型ナノ粒子の安定性. (左) 高濃度の塩の影響. 37 °C で1時間インキュベーション後、SLS法による測定. (右) 90%FBS存在下、37 °Cでの拡散係数の経時変化.

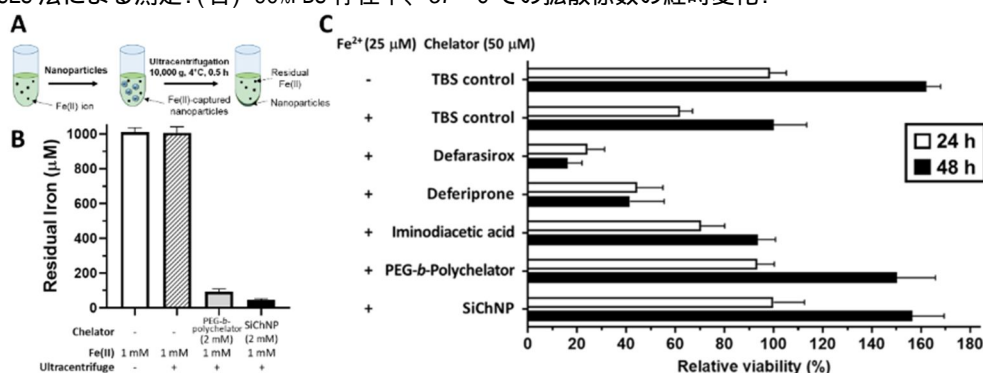


図9. (A)鉄イオン捕獲能を評価するための実験設計、(B)鉄イオン捕獲能の比較、(C)鉄イオンに曝露させたHUVEC細胞の生存率およびキレート分子・キレートナノ粒子による保護効果.

最後に、ウシ大動脈内皮細胞(BA0EC)を非常に高い濃度の鉄イオン(1mM)に曝露させた後、さらに1時間インキュベーションし、既存のキレート剤、またはSiChNPを加え24時間インキュベーションし、LIVE/DEAD細胞生存率アッセイを用いて生細胞・死細胞を判別した(図10)。SiChNPの細胞保護効果は高濃度の鉄イオン(1mM)に対して高濃度のキレート剤(2mM)を加えたときに特に顕著になり、既存のキレート剤であるEDTAやDefarasiroxを加えると細胞がほぼ全滅した反面、PEG-b-polychelatorやSiChNPはほぼ全ての細胞が生存する結果となった。これは、特に急性・重症の鉄中毒症において、PEG-b-polychelatorやSiChNPを投与する事で、高濃度のキレート剤を用いたキレーション療法が可能になる事を示唆する。

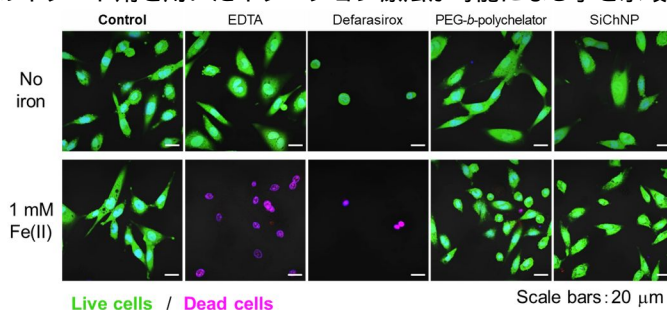


図10. ナノ粒子の鉄イオンに対する保護能. 全ての画像において、鉄イオン濃度は1mM、キレート剤ならびにPEG-b-polychelatorやSiChNPの濃度は2mMに相当する条件でインキュベーションした.

本研究課題を通じて、金属をイオン安全に送達するナノ粒子、また、金属イオンを安全に捕獲するナノ粒子の開発に成功した。本研究の成果は今後、体内の金属イオンを制御する画期的なナノメディシンとして、様々な難治性疾患への応用が強く期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ahran Kim, Minoru Suzuki, Yoshitaka Matsumoto, Nobuyoshi Fukumitsu, Yukio Nagasaki
2. 発表標題 Sialic acid-targeting polymeric nanoparticles as self-assembling BNCT drug
3. 学会等名 3rd GLowing Polymer Symposium in Kanto
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金雅覽, 米元千秋, チトフェリシアノ, シャスニバピータ, 長崎幸夫
2. 発表標題 放射線治療における副作用の低減を目指した抗酸化ナノ粒子の設計と評価
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsumoto, Ahran Kim, Nobuyoshi Fukumitsu, Minoru Suzuki, Yukio Nagasaki, Hideyuki Sakurai
2. 発表標題 In vivo evaluation of a phenylboronic acid-installed, actively targeted novel BNCT agent against melanoma-bearing mouse model
3. 学会等名 The 58th PTCOG Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本孔貴, 金雅覽, 福光延吉, 鈴木実, 長崎幸夫, 櫻井英幸
2. 発表標題 フェニルボロン酸修飾高分子ナノ粒子はシアル酸過剰発現B16メラノーマに対して優れたBNCT治療効果を発揮する
3. 学会等名 第58回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ahran Kim, Minoru Suzuki, Yoshitaka Matsumoto, Nobuyoshi Fukumitsu, Yukio Nagasaki
2. 発表標題 Targeting hypersialyated B16 melanoma using a phenylboronic acid-installed polymeric nanoparticle towards a novel BNCT agent
3. 学会等名 第69回高分子年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米元千秋, 金雅覽, チトフェリシアノ, シヤスニパヒータ, 長崎幸夫
2. 発表標題 放射線治療における副作用の低減を目指した抗酸化ナノ粒子の設計と評価
3. 学会等名 第69回高分子年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

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