

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02584

研究課題名（和文）ポリグリセロール修飾ナノ粒子の腫瘍選択的集積の原因究明と材料設計指針の再構築

研究課題名（英文）Investigation of nanomaterial design for preferential tumor accumulation

研究代表者

小松 直樹（Komatsu, Naoki）

京都大学・人間・環境学研究科・教授

研究者番号：30253008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ナノダイヤモンド（ND）と磁性酸化鉄ナノ粒子（SPION）をポリグリセロール（PG）で被覆し、さらにカルボキシ基、アミノ基、スルホン酸、ホスホニウムなどの各種官能基で修飾したナノ粒子に対し、まず、タンパク質コロナの生成量について検討を行った。その結果、負電荷をもつカルボキシ基は、タンパク質コロナの生成はなく、一方、正電荷をもつアミノ基には、タンパク質コロナの生成が認められた。それに伴い、細胞への取り込みも促進された。したがって、ポリグリセロール修飾ナノ粒子の腫瘍選択的集積には、負電荷をもつ官能基などを用いることで、タンパク質コロナの生成を制御することが重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリグリセロール修飾ナノ粒子の腫瘍選択的集積の原因が明らかになれば、それがナノ製剤の新たな設計指針となり、ナノ医療の分野にパラダイムシフトを起こすことが可能である。一方、この研究成果は、癌の早期発見や治療にも繋がり、社会的にも経済的にも大きなインパクトがあると考えている。

研究成果の概要（英文）：First, protein corona formation was examined for nanodiamond (ND) and magnetic iron oxide nanoparticles (SPION) coated with polyglycerol (PG) and further modified with various functional groups such as carboxy groups, amino groups, sulfonate, and phosphonium. The results showed that negatively charged groups such as carboxy one did not produce protein corona, while positively charged amino groups produced protein corona. The cellular uptake is found to be facilitated proportionally by the amount of corona proteins. Therefore, it is important to control the formation of protein corona by using negatively charged functional groups for tumor-selective accumulation of polyglycerol-functionalized nanoparticles.

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：ナノ粒子 ポリグリセロール 癌 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ医療と呼ばれる新しい分野が、特にがん治療において注目を集めている。一般に、ナノ粒子をキャリアとする腫瘍への抗がん剤の送達においては、血流にのったナノ粒子が正常組織中の血管からは遊出せず、腫瘍組織中の血管から遊出し、そこに滞留するという、EPR (enhanced permeation and retention) 効果 (図1) により、抗がん剤の選択的送達が可能となり、副作用を抑制するとともに、がん治療の効果を高めると言われてきた。しかしながら、ごく最近、固形腫瘍へのナノ粒子の送達に関して、2005-2015年に発表されたデータを詳細に分析した総説が発表された (S. Wilhelm, et al., *Nat. Rev. Mater.*, 2016)。そこでは、投与量に対して平均 0.7% のナノ粒子しか腫瘍に到達していない、という衝撃的な数字が報告された。その主な原因としては、生体内でナノ粒子を制御することの困難さが挙げられている。その後、EPR 効果の限界を主張する論文も発表されるなど (Y. Nakamura, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2016)、現在、ナノ医療は岐路に立たされているとも言える。

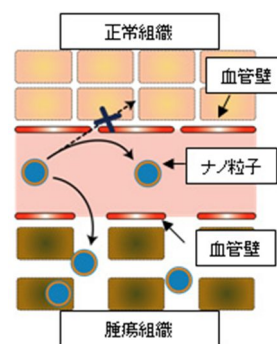


図1 EPR 効果によるナノ粒子の腫瘍への集

2. 研究の目的

このような現状において、申請者らはごく最近、蛍光ナノ粒子を用いた生体腫瘍イメージングに成功した (図2、F. Yoshino, N. Komatsu, et al., *Small*, 2019)。具体的には、まず、申請者らが確立した合成法に基づき、ポリグリセロール (PG) で被覆した、直径 50 nm のナノダイヤモンド (ND) に近赤外蛍光色素 cyanine7 (Cy7) を結合させることにより、蛍光ナノ粒子

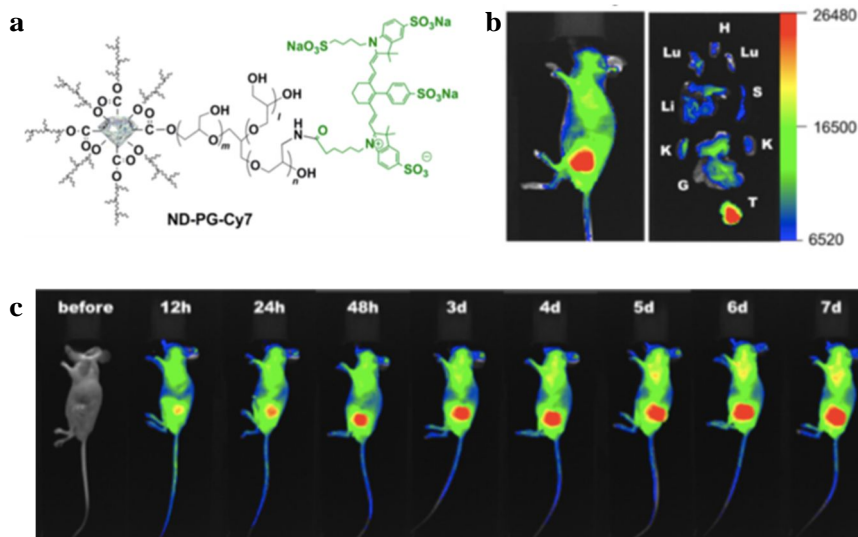


図2 ND-PG-Cy7 の構造 (a)、腫瘍の蛍光イメージングの in vivo 像 (b 左) と ex vivo 像 (b 右)、腫瘍の蛍光画像の経時変化 (c)
(b) T: 腫瘍, Li: 肝臓, S: 脾臓, K: 腎臓, G: 胃腸, Lu: 肺, H: 脳

子 ND-PG-Cy7 (図2 a) を合成した。これを担がんマウスの尾静脈より投与し、生体蛍光イメージング装置 (OPT, (株) 島津製作所) により経時変化を追跡したところ、図2 c に示すように、蛍光ナノ粒子が1週間にわたって、腫瘍に選択的に集積していく様子が観察された。これまでの研究では、ナノ粒子が肝臓や脾臓のマクロファージに貪食され、必ずこれらの臓器にも相当量のナノ粒子の集積がみられた。したがって、申請者らが用いた ND-PG-Cy7 は、これらの臓器、あるいはマクロファージによる捕捉を巧みに回避するステルス性を有していると結論づけられる。実際、ND-PG-Cy7 のマウスの血中における半減期は 58 時間と、他のナノ粒子に比べ著しく長く、これも ND-PG-Cy7 の優れたステルス性を反映した結果と考えられる (F. Yoshino, Y. Zou, N. Komatsu, et al., *Small*, 2019)。

以上のことを踏まえ、本研究では、なぜこのナノ粒子は腫瘍に選択的に集積したか、あるいは、それを可能とした主な要因と考えられる優れたステルス性はなぜ得られたか、について検討を行い、最終的には、ポリエチレングリコール (PEG) を基軸として考えられてきたがんの診断・治療におけるナノ粒子の設計指針の見直し、再構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ND-PG-Cy7 で優れたステルス性が得られた要因を明らかにするため、ND や磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION) などの各種ナノ粒子 (NP) とそれらを PG, PEG で修飾した NP-PG, NP-PEG について、1) それらの合成と化学構造の定性・定量、2) 血漿、血清中でのタンパク質コロナの生成とその定性・定量、3) マクロファージによる捕食の有無とその定量、4) マウ

スの腫瘍、肝臓、脾臓などへの生体内分布、
 に関して比較検討する。

まず、NP を、式 1 に従い PG で、アミド結合を介して PEG で修飾し、NP-PG, NP-PEG を合成する(図 3-1)。合成した NP-PG, NP-PEG に対し、溶液 NMR、IR による定性分析と元素分析(京大元素分析センター) TGA による定量分析を行う。特に、TGA で決められる高分子層とコア(NP)の重量比を NP-PG と NP-PEG で揃えるため、それに適した反応条件を模索する。

このように合成した NP-PG, NP-PEG と NP を血漿、もしくは血清中に加え、37°C で静置し、遠心分離の後、一部を水中に分散させ、粒子径とゼータ電位について、コロナ形成前後で比較する(図 3-2)。残りは、表面に吸着したコロナタンパク質を SDS(ドデシルスルホン酸ナトリウム)水溶液中に溶かし出し、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)、BCA(bicinchoninic acid)分析、液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)により定性、定量する。以上の実験により、NP-PG が NP-PEG, NP に比べ、タンパク質コロナの生成をどの程度有効に阻害するのか、また、コアと高分子層の重量比とタンパク質コロナ生成阻害との相関について明らかにする。

次に、NP-PG, NP-PEG, NP のステルス性を評価するため、マクロファージによる捕食について、in vitro で検討する(図 3-3)。先に合成した NP-PG, NP-PEG と NP を血漿タンパク質、マクロファージと培養し、培養液を分離したのち、マクロファージを洗浄し、京大総合解剖センター所有の透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、マクロファージに取り込まれたナノ粒子の多寡を評価する。また、マクロファージからの抽出液中のナノ粒子を ND の場合は、光散乱による消光スペクトル、SPION などの含金属ナノ粒子の場合は、京大ナノハブ拠点所有の誘導結合プラズマ質量分析計(ICP/MS)により定量する。以上の in vitro 実験でステルス性が確認されたナノ粒子を担がんマウスの尾静脈より投与し、一定時間後に腫瘍、肝臓、脾臓などを取り出し、それらからナノ粒子を抽出し、in vitro の場合と同様、消光スペクトル、あるいは、ICP/MS により定量することで生体内分布を明らかにする(図 3-4)。図 3 に示したように、NP-PG 上のタンパク質量は、NP, NP-PEG のそれに比べ著しく少ないと予想され、それに伴って、マクロファージへの捕食も回避されると期待される。担がんマウスを用いた実験では、肝臓、脾臓をすり抜け、腫瘍に集積するという、図 2 の結果が再現されるものと確信している。

4. 研究成果

Scheme 1 に示したように、まず、ナノダイヤモンド(ND)と磁性酸化鉄ナノ粒子(SPION)をポリグリセロール(PG)で被覆し、さらにカルボキシ基、アミノ基、スルホン酸、ホスホニウムなどの各種官能基で修飾した。これらナノ粒子に対し、タンパク質コロナの生成量について検討を行った。その結果、Figure 1 に示したように、負電荷をもつカルボキシ基は、タンパク質コロナの生成はなく、一方、正電荷をもつアミノ基には、タンパク質コロナの生成が認められた。それに伴い、細胞への取り込みも促進された。したがって、ポリグリセロール修飾ナノ粒子の腫瘍選択的集積には、負電荷をもつ官能基などを用いることで、タンパク質コロナの生成を制御することが重要であることを明らかにした。

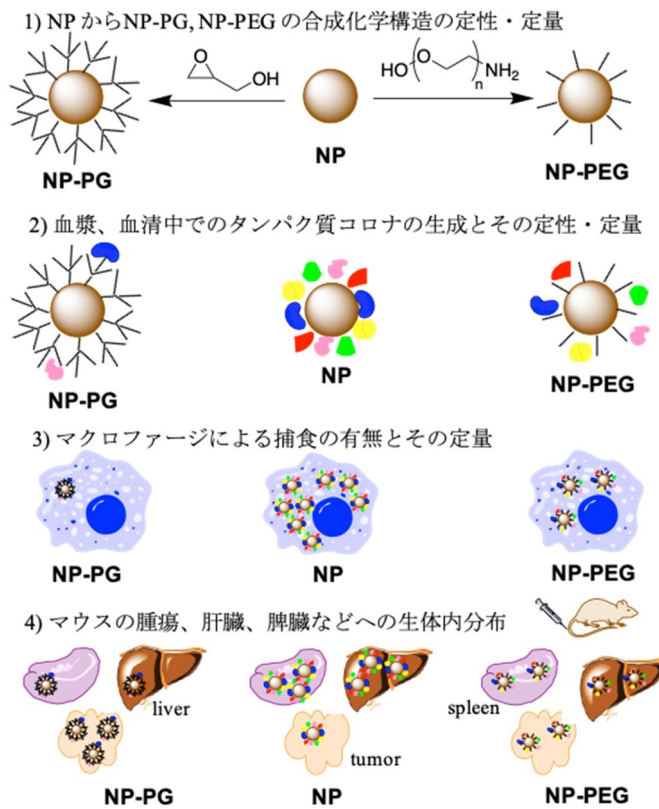
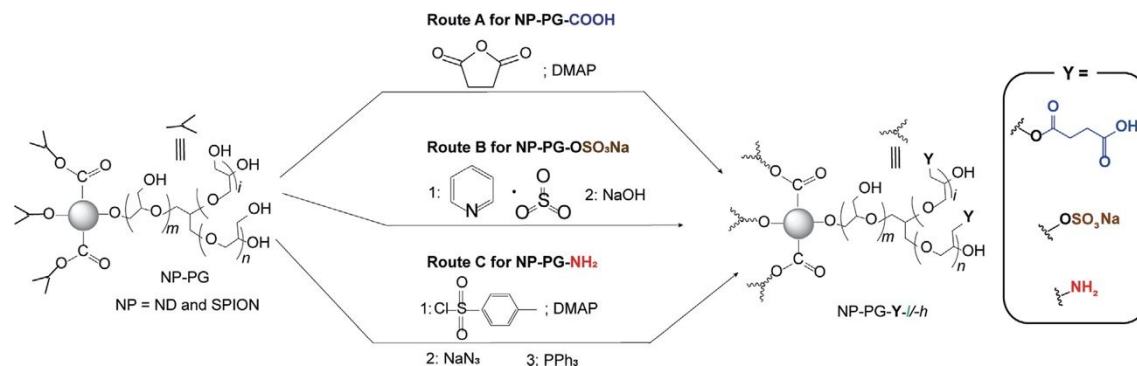


図 3 本研究の概要：NP, NP-PG, NP-PEG の比較検討



Scheme 1. Functionalization of NP-PG with carboxy, sulfate and amino groups at low (*l*) and high (*h*) contents.

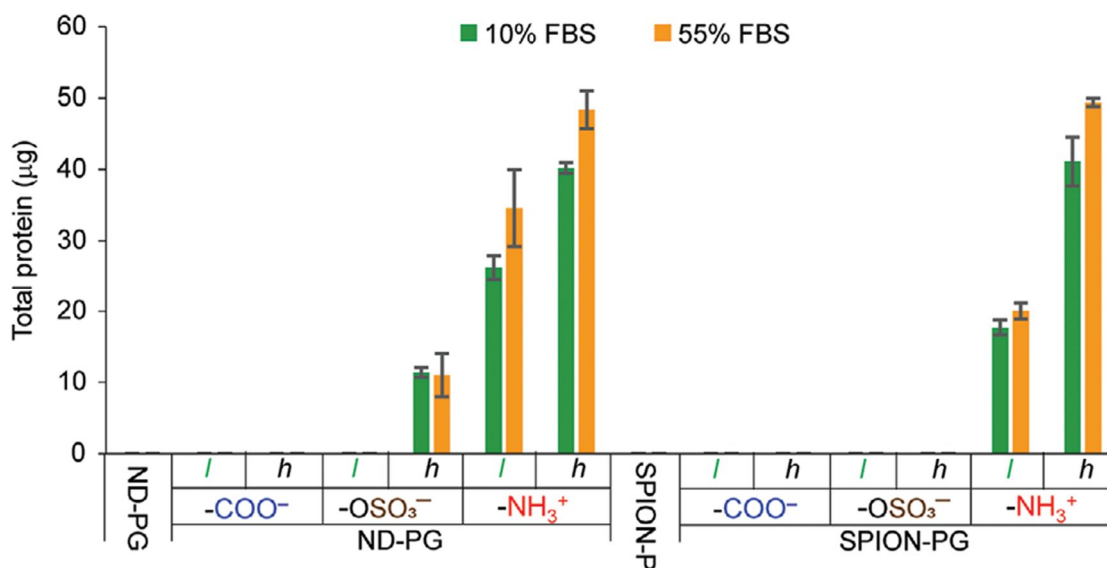


Figure 1. BCA quantification of proteins detached from NPs after their incubation with 10% or 55% FBS. The data are presented as mean value \pm standard deviation of three measurements. The *l* and *h* stand for the low and high content of functional groups, respectively, on the surface of ND-PG and SPION-PG (Table 2).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. 著者名 Komatsu Naoki | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Poly(Glycerol)-Based Biomedical Nanodevices Constructed by Functional Programming on Inorganic Nanoparticles for Cancer Nanomedicine | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research | 6. 最初と最後の頁 106 ~ 116 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.2c00615 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |
| 1. 著者名 Wang Yuquan, Reina Giacomo, Kang Heon Gyu, Chen Xiaoxiao, Zou Yajuan, Ishikawa Yoshie, Suzuki Minoru, Komatsu Naoki | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Polyglycerol Functionalized 10B Enriched Boron Carbide Nanoparticle as an Effective Bimodal Anticancer Nanosensitizer for Boron Neutron Capture and Photothermal Therapies | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Small | 6. 最初と最後の頁 2204044 ~ 2204044 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202204044 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |
| 1. 著者名 Zou Yajuan, Ito Shinji, Fujiwara Masazumi, Komatsu Naoki | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Probing the Role of Charged Functional Groups on Nanoparticles Grafted with Polyglycerol in Protein Adsorption and Cellular Uptake | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Advanced Functional Materials | 6. 最初と最後の頁 2111077 ~ 2111077 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202111077 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |
| 1. 著者名 Zou Yajuan, Nishikawa Masahiro, Kang Heon Gyu, Cheng Guoqing, Wang Wei, Wang Yuquan, Komatsu Naoki | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Effect of Protein Corona on Mitochondrial Targeting Ability and Cytotoxicity of Triphenylphosphonium Conjugated with Polyglycerol-Functionalized Nanodiamond | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics | 6. 最初と最後の頁 2823 ~ 2832 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00188 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. 著者名 Masahiro Nishikawa, Hideo Yagasaki, Shougang He, Naoki Komatsu | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Poly(glycerol-co-glyceric acid) Functionalized Nanodiamonds by Nitroxyl Radical-Catalyzed Oxidation of Primary Alcohols in Poly(glycerol) as Scaffolds for Further Conjugation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 ChemNanoMat | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnma.202300204 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1. 著者名 Zhang Yucai, Kang Heon Gyu, Xu Hua zhen, Luo Honghui, Suzuki Minoru, Lan Qing, Chen Xiao, Komatsu Naoki, Zhao Li | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Tumor Eradication by Boron Neutron Capture Therapy with ¹⁰ B enriched Hexagonal Boron Nitride Nanoparticles Grafted with Poly(glycerol) | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Advanced Materials | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adma.202301479 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Masahiro, Liu Ming, Yoshikawa Taro, Takeuchi Hidekazu, Matsuno Naoyoshi, Komatsu Naoki | 4. 巻 205 |
| 2. 論文標題 Thorough elucidation of synthesis and structure of poly(glycerol) functionalized nanodiamonds | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Carbon | 6. 最初と最後の頁 463 ~ 474 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbon.2023.01.025 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Zou Yajuan, Nishikawa Masahiro, Komatsu Naoki | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Organic chemistry for nanodiamond: Controlled functionalization, quantitative characterization and structure-property relationships | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Carbon Reports | 6. 最初と最後の頁 70 ~ 78 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7209/carbon.010204 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松直樹 |
| 2. 発表標題 Polyglycerol Grafted Nanodiamond Avoids Protein Corona Formation, Evades Macrophage Uptake and Images Tumor Fluorescently |
| 3. 学会等名 Virtual MRS Spring/Fall Meeting (Symposium NM01) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松直樹 |
| 2. 発表標題 Carbon-Based Nanoparticles for Cancer Theranostics: From Fundamental Chemistry to Advanced Biomedicine |
| 3. 学会等名 European Materials Research Society (EMRS) 2022, Spring Meeting (Symposium A) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松直樹 |
| 2. 発表標題 Carbon-Based Nanoparticles for Cancer Theranostics: From Fundamental Chemistry to Advanced Biomedicine |
| 3. 学会等名 New Diamond and Nano Carbon (NDNC) 2022 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|