

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08062

研究課題名（和文）スマートポリマーを基盤とするがんのラジオセラノスティクス薬剤の創製

研究課題名（英文）Development of cancer-targeted radiotheranostics drugs based on smart polymers

研究代表者

佐野 紘平（Sano, Kohei）

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00546476

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）：本研究では、がんの高精度な核医学診断と治療を融合したラジオセラノスティクスに資するポリマー型薬剤の開発を目的として、スマートポリマーとして熱応答凝集性を示すポリマーを利用することとし、その放射性標識体を新規に合成した。がん細胞への取り込みおよび体内動態を評価し、がんを標的とする診断用薬物キャリアとして最適な分子構造を選定するとともに、がんの加温処置と組み合わせることで、放射性標識ポリマーをがんへ高く集積させることに成功した。一部のポリマーについては、高いがん治療効果を示したことから、熱応答凝集性ポリマーを基盤とした放射性薬剤を用いるがん標的ラジオセラノスティクスの可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代ドラッグデリバリーシステム製剤の開発に対する期待は高く、がんの化学療法において、抗がん剤の生体内分布を量的かつ時空間的に制御し、がん特異的な治療効果を達成することは、がんの根治に繋がるのみならず、正常組織における副作用を低減し、患者の苦痛の軽減と療養生活の質の維持向上に貢献するものと考えられている。実際、本研究課題において、ポリマーを基盤とする放射性薬剤開発を推進し、温熱療法との組み合わせにより、高いがん集積性および高い治療効果を示す可能性を明らかとした。ポリマーに対する化学修飾の容易性の観点から、今後様々な抗がん剤を導入し、より高いがん治療効果を示す薬剤開発へと繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop polymer-based drugs that contribute to both highly accurate nuclear medicine diagnosis and therapy of cancers, known as radiotheranostics. We synthesized novel radiolabeled polymers that exhibits thermoresponsive aggregation as a smart polymer. The uptake by cancer cells and biodistributions were evaluated to select the optimal molecular structure as a diagnostic drug carrier targeting cancers. By combining it with hyperthermia treatment, we successfully achieved high accumulation of radiolabeled polymers in cancer tissues. Some of the polymers demonstrated a significant therapeutic effect against cancers, indicating the potential of using thermoresponsive polymer-based radiopharmaceuticals in cancer-targeted radiotheranostics.

研究分野：放射線科学

キーワード：セラノスティクス イメージング がん治療 ポリマー

## 1. 研究開始当初の背景

ポリエチレングリコール (PEG) に代表される水溶性高分子 (水溶性ポリマー) は、高い生体適合性、広範囲の分子量を利用できる利便性、官能基の導入を可能とする修飾簡便性などの利点を有する。現在、PEG は、低分子化抗体などの医薬品の可溶化剤や安定化剤として臨床利用されているだけでなく、ナノ粒子製剤 (リポソーム) の表面を被覆することにより、それらの細網内皮系への取り込みが抑制され、長い血中滞留性を達成できることから、薬物の体内動態制御の観点においても非常に重要な役割を果たす。実際、臨床医薬品として上市される多くのナノ製剤の表面には PEG 修飾が施されている。

しかしながら、PEG をはじめとする水溶性ポリマー自体が、病変部位 (がん) への集積性を示すか否かについては殆ど明らかにされておらず、未開拓の研究領域である。申請者はこれまでに、世界に先駆けて、水溶性ポリマー (PEG、ポリオキサゾリン (POZ)、ポリサルコシン (PSar) (図 1) の誘導体

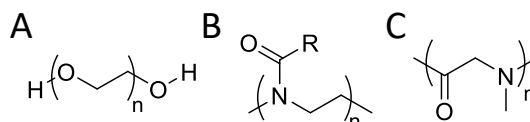


図 1.ポリマーの化学構造 (A: PEG、B: POZ、C: PSar)

について放射性標識体および蛍光標識体を合成し、それらのがん集積性について、生体イメージングの手法による評価を進めてきた。興味深いことに、PEG や POZ は Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により経時的かつ緩徐にがん部位へ集積した一方で、PSar は投与後早期から高いがん集積性を示し、水溶性ポリマーの分子構造的特徴ががん集積性に影響を及ぼす可能性を認めた。これらの研究を進める中で、種々の分子構造的特徴を有する水溶性ポリマーが如何なる機構でがん組織 (細胞) 内に取り込まれ、また、その放射性標識体のがんの核医学診断用プローブになりうるのか、について疑問を抱いた。

一方、水溶性ポリマーにはその分子構造的特徴を活かした様々な物理化学的性質、すなわち、(1) 化学的な多機能修飾性や (2) 熱応答凝集性 (凝集温度) をもつ「スマートポリマー」が存在する。特に、ポリマーの熱応答凝集性を利用すれば、(A) 小線源療法および (B) 内用療法用薬剤 (図 2) として展開できるのではないかと考えた。すなわち、(A) 凝集温度が室温以上かつ体温以下のポリマーの場合、腫瘍内に投与された放射性標識ポリマーは凝集・滞留することから、小線源療法薬剤としての高いがん治療効果が期待できる。また、(B) 凝集温度が体温以上かつ 42°C (温熱療法適用温度) 以下の場合、がんの温熱療法との組合せにより、静脈内投与されたポリマーが凝集作用を介してがん組織に高く集積、保持され、内用療法用薬剤としての利用が期待できる。そこで、本研究では、新規水溶性ポリマーの熱応答凝集性を利用して、がんの放射線療法用薬剤の創薬基盤を構築できるかについて、特に (B) 内用療法について検証することとした。

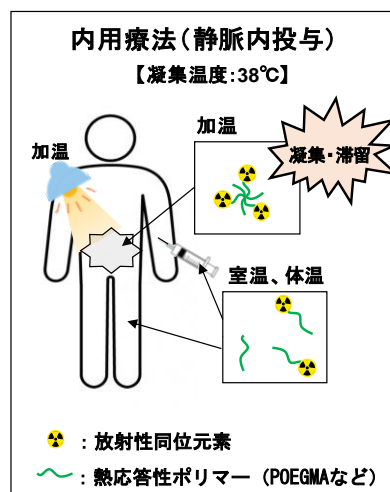


図 2. 水溶性ポリマーの熱応答凝集性を利用する新規がん治療戦略

## 2. 研究の目的

上記の研究背景のもと、代表者は、PEG、POZ、PSar を含む種々の生体適合性ポリマーの放射性標識体についてインビトロおよびインビボでがんへの集積性を評価し、その取込みに対する分子構造的な特徴を見出すことを計画した。本研究では特に、POZ および側鎖に水溶性官能基を「ブラシ状」に配列した、低毒性のポリオリゴエチレングリコールメタクリレート (POEGMA) 誘導体を新規に開発し、ラジオセラノスティクス用薬剤としての有効性を評価することとした。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、放射性標識スマートポリマーを基盤とするがんのラジオセラノスティクス法の構築を目指し、以下の検討を実施した。

### (1) 水溶性ポリマーを基盤とする放射性標識体の設計、合成および物性評価

POEGMA 誘導体 (図 3) の重合度  $m$ 、 $n$  およびエチレングリコール (EG) 鎖長  $x$ 、 $y$  の値を変化させ、種々の凝集温度を有する POEGMA 誘導体を合成した。分子量は NMR により算出した。次に、ポリマーの末端にキレート剤 (DOTA 誘導体) を導入した。これまで合成に成功し

てきた POZ-DOTA とともに、 $\gamma$ 線放出金属核種である  $^{111}\text{In}$  との錯体を合成した。POZ については  $\beta^-$ 線放出金属核種である  $^{90}\text{Y}$  を用いた標識も実施した。また、各ポリマーに FITC を反応させ、蛍光標識体を合成した。いずれのポリマーについても LCST を測定した。

#### (2) 細胞内取り込み機構評価

種々の蛍光標識 POEGMA 誘導体について、マウス結腸がん細胞 (Colon26) に対する取り込み量を  $37^\circ\text{C}$  の条件で評価し、高い取り込みに寄与するポリマー骨格を調べた。また、放射性標識 POEGMA 誘導体および POZ 誘導体について、 $37^\circ\text{C}$  および  $42^\circ\text{C}$  の条件で取り込みを比較することにより、加温による取り込み促進効果について検証した。

#### (3) 体内放射能分布評価

POEGMA 誘導体の放射性標識体について、Colon26 担がんマウスに投与し、1、3、6、24 時間後における放射能分布を臓器摘出法により評価し、がん診断薬として有効な POEGMA 誘導体を選定した。

#### (4) 蛍光イメージング実験

(3) で見出した、高いがん集積性を示す POEGMA 誘導体の蛍光標識体について、Colon26 担がんマウスに投与し、インビボ蛍光イメージング装置 (IVIS) を用いた蛍光観察を実施した。

#### (5) がんの加温処置との組み合わせによる放射能集積性評価

Colon26 担がんマウスのがん部位をあらかじめ  $43^\circ\text{C}$  で 15 分間加温した後、凝集温度が  $38^\circ\text{C}$  の放射性標識 POEGMA 誘導体を静脈内投与し、その 1 時間後に生体内放射能分布を評価した。

#### (6) インビボ共焦点蛍光顕微鏡を用いた POEGMA 誘導体のがん組織内局在評価

(5) と同様の方法でがん部位を加温し、蛍光標識 POEGMA 誘導体のがん組織内局在について、インビボ共焦点蛍光顕微鏡 (Cellvizio) を用いて評価した。

#### (7) $^{90}\text{Y}$ 標識 POZ を用いたがん治療実験

Colon26 担がんマウスを用い、事前にごん部位を加温した後、 $^{90}\text{Y}$  標識 POZ 誘導体を投与し、さらにごん部位を  $42^\circ\text{C}$  で 1 時間加温した。その後、がんのサイズを経時的に測定することで抗がん効果を調べるとともに、副作用評価として体重測定および血球数測定を実施した。

## 4. 研究成果

本研究では、熱応答凝集性ポリマーである POZ およびポリマー側鎖に EG 鎖をブラシ状に配列した構造を有する POEGMA 誘導体について、それらの放射性標識体 ( $^{111}\text{In}$  標識体) と蛍光標識体 (FITC 標識体) を合成した。いずれも高い収率と純度で得ることに成功した。POZ 誘導体については  $^{90}\text{Y}$  標識体を高い放射化学的純度で合成することに成功した。POZ 誘導体の LCST は約  $38^\circ\text{C}$  であることを確認した。POEGMA 誘導体については、LCST に濃度依存性があることを確認したことから、実験目的に合わせて使用する POEGMA 誘導体濃度を変更した。

まず、POEGMA 誘導体について、 $37^\circ\text{C}$  におけるマウス結腸がん細胞 (Colon26) への取り込みを蛍光顕微鏡により評価した結果、比較対照である PEG 誘導体と比べて顕著に高い細胞内取り込みを認めた。これにより、POEGMA 誘導体のがん細胞への取り込みにおける能動的な輸送経路の関与が示唆された。また、 $37^\circ\text{C}$  と  $43^\circ\text{C}$  の条件で取り込みを比較した結果、インキュベーション 3、6 時間後において、 $37^\circ\text{C}$  の条件と比較して  $43^\circ\text{C}$  の加温条件下でポリマーの取り込みが有意に増加したことから、POEGMA の細胞内への取り込み促進効果に対する POEGMA の凝集作用の関与が示唆された。

続いて、Colon26 細胞を移植した担がんマウスに放射性標識 POEGMA 誘導体を投与し、生体内放射能分布を評価した。その結果、POEGMA 誘導体の分子量が増加するにつれて、血中滞留性が延長する傾向を認めるとともに腎臓への集積が低減し、肝臓や脾臓への集積が増加した。また、20 kDa 以上の分子量域において、POEGMA 誘導体はがんへ高く集積し、主に EPR 効果を介したがん集積が示

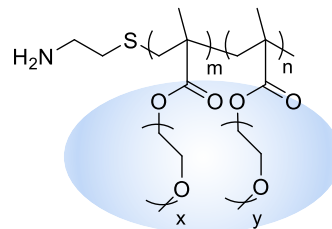


図 3. 新規に開発する POEGMA の化学構造式。側鎖に水溶性官能基 (エチレングリコール) がブラシ状に配列

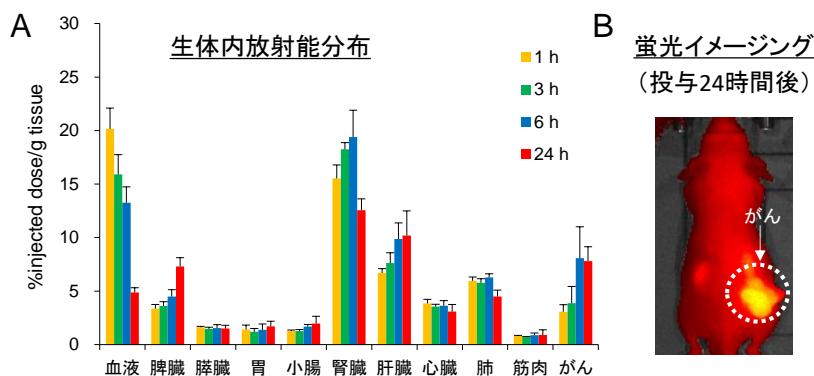


図 4. POEGMA 誘導体 (x, y = 2, 3) の生体内放射能分布 (A) およびインビボ蛍光イメージング (B)

唆された。特に 20 kDa の POEGMA 誘導体が比較的がんへ高く集積し、良好ながん対正常組織比を示したことから、これを用いてポリマー側鎖の EG 鎖長の影響について評価した。EG 鎖長が長い POEGMA 誘導体 (x = 2, 8) は肝臓へ高く集積した。一方、EG 鎖長に依らず、POEGMA 誘導体はがんへ高く集積したが、特に EG 鎖長が比較的短い POEGMA 誘導体が良いがん対正常組織比を示した。これらの検討を踏まえ、分子量が 20 kDa かつ EG 鎖長が (x, y = 2, 3 もしくは 2, 4) の POEGMA 誘導体が、がん診断用薬剤のキャリアとして有効である可能性を示した (図 4A)。そこで、最適化された POEGMA の蛍光標識体を担がんマウスに投与し、プローブのがんへの集積をインビボ蛍光イメージングにて評価した結果、投与後早期にがんが明瞭に描出された (図 4B)。なお、上記の研究成果は、ACS Applied Polymer Materials 誌 (2022) へ論文報告した。

続いて、がんの加温処置と組み合わせた場合における POEGMA 誘導体のがん集積性について評価した結果、非加温時と比較して 2 倍程度送達量が改善される結果を得た。さらに、インビボ共焦点蛍光顕微鏡を用いた検討において、加温処置を施していないがん組織では、FITC 標識 POEGMA 由来の蛍光シグナルが主に血管内に均一に認められた一方で、加温したがん組織においては、血管内および血管近傍に FITC 標識 POEGMA 由来の蛍光スポットを多数観察できた。これらの結果より、がん部位への POEGMA 誘導体の集積増加には、POEGMA の凝集作用を介した滞留性の改善が寄与する可能性を示した。

POZ については、がん組織を加温処置した場合、熱に応答した凝集効果を介して、がんへのポリマー送達量が 2 倍程度増加することを報告している (Mol Pharm, 2018)。本研究では、まず、加温されて形成されたポリマー凝集体が、がん細胞に取り込まれるのかインビトロで評価した。凝集温度が 38°C のポリマーの蛍光標識体を合成し、それをがん細胞へ添加した後、37°C あるいは 42°C の条件でインキュベートし、細胞内への取り込みについて蛍光顕微鏡を用いて観察した。興味深いことに、POZ 誘導体は 42°C の環境において、ファゴサイトーシス経路を介してがん細胞内へ顕著に高く取り込まれることを明らかにした。

また、治療用放射性同位元素であるイットリウム-90 (<sup>90</sup>Y) で標識した POZ 誘導体を新たに合成し、これを用いたがん治療実験を実施した。非処置群、加温群 (<sup>90</sup>Y 標識 POZ の投与なし) あるいは <sup>90</sup>Y 標識 POZ 投与群 (加温処置なし) と比較して、加温処置と <sup>90</sup>Y 標識 POZ の投与を組み合わせた群でがんの成長がより効果的に抑制された。また、そのがん成長抑制効果は投与放射線量依存的であった。<sup>90</sup>Y 標識 POZ 投与群を含むすべての群において、体重の減少は見られず、また、白血球数にも大きな減少は認められなかった。以上の結果より、温熱療法と <sup>90</sup>Y 標識 POZ の投与を組み合わせることで、重篤な副作用を伴うことなく、高いがん治療効果を達成できる可能性が示された。なお、上記の研究成果は、RADIOISOTOPES 誌 (2023) へ論文報告した。

さらに、POZ 誘導体について、がん組織への標的性を付与するために、葉酸 (FA) 誘導体を導入した FA-POZ を新たに合成し、その蛍光標識体が卵巣がんの検出に有効である可能性を示すことに成功した。今後、FA-POZ の投与と加温処置と組み合わせることで、がんへの薬物送達性がより改善される可能性が期待できる。なお、これらの研究成果は、ACS Applied Polymer Materials 誌 (2021) へ論文報告した。

以上、本研究は、特に POEGMA 誘導体および POZ 誘導体を用いたがんのセラノスティクス薬剤の開発を行い、がん診断および治療に対して一定の効果を示したことから、当初の目標を達成できたものとする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sano Kohei, Suzuno Natsuka, Bao Ling, Haratake Yoshie, Kijima Kohei, Munekane Masayuki, Yamasaki Toshihide, Mukai Takahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of a Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-Based Fluorescence Imaging Probe Targeting the Folate Receptor in Tumor Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Polymer Materials	6. 最初と最後の頁 4889 ~ 4895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsapm.1c00670	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 Sano Kohei, Ishida Yumi, Tanaka Toshie, Mizukami Tatsuya, Nagayama Tomono, Haratake Yoshie, Munekane Masayuki, Yamasaki Toshihide, Mukai Takahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhanced Delivery of Thermoresponsive Polymer-Based Medicine into Tumors by Using Heat Produced from Gold Nanorods Irradiated with Near-Infrared Light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5005 ~ 5005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13195005	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 Sano Kohei, Umemoto Koki, Miura Haruka, Ohno Satoshi, Iwata Kyohei, Kawakami Rin, Munekane Masayuki, Yamasaki Toshihide, Citterio Daniel, Hiruta Yuki, Mukai Takahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Feasibility of Using Poly[oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate] as Tumor-Targeted Carriers of Diagnostic Drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Polymer Materials	6. 最初と最後の頁 4734 ~ 4740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsapm.2c00312	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 Sano Kohei	4. 巻 72
2. 論文標題 Development of Seed-type Radiopharmaceuticals Based on In Vivo Aggregation of Water-soluble Polymer for Cancer-targeted Radiotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RADIOISOTOPES	6. 最初と最後の頁 43 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3769/radioisotopes.72.4	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kohei Sano, Tatsuya Mizukami, Toshie Tanaka, Katsushi Takahashi, Yoshie Haratake, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai
2. 発表標題 Internal radiotherapy of tumors using radiolabeled thermoresponsive polymers via self-aggregation under hyperthermic conditions
3. 学会等名 SNMMI 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Sano, Tatsuya Mizukami, Toshie Tanaka, Katsushi Takahashi, Yoshie Haratake, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai
2. 発表標題 Internal radiotherapy of tumors using radiolabeled polymers that thermoresponsively self-aggregate under hyperthermic conditions
3. 学会等名 CJKSRS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 悠、佐野 紘平、山崎 俊栄、宗兼 将之、澤田 和紀、チッテリオ ダニエル、蛭田 勇樹、向 高弘
2. 発表標題 Poly[oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]を母体とするがんの蛍光イメージングプローブの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 紘平
2. 発表標題 がんのセラノスティクスを目指した水溶性ポリマーを基盤とするDDS製剤の開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Sano, Masayuki Munekane, Toshihide Yamasaki, Takahiro Mukai
2. 発表標題 Polyoxazoline-based fluorescence imaging probe targeting folate receptor in cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 紘平、石田 有美、水上 達也、田中 寿枝、原武 芳江、宗兼 将之、山崎 俊栄、向 高弘
2. 発表標題 放射性標識熱応答凝集性ポリマーと光応答性金ナノロッドを組み合わせたがん治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅本 晃暉、佐野 紘平、三浦 悠、大野 哲史、岩田 匡平、田中 寿枝、宗兼 将之、山崎 俊栄、チッテリオ ダニエル、蛭田 勇樹、向 高弘
2. 発表標題 水溶性ポリマーPOEGMAのがん診断用薬剤キャリアとしての有効性評価：ポリマーの物理化学的特性が体内動態に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野 紘平
2. 発表標題 水溶性ポリマーを基盤とするがんのラジオセラノスティクス薬剤の開発
3. 学会等名 第59回アイソトープ・放射線研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉林堅次、佐野紘平 他（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 239
3. 書名 中分子創薬に向けたDDS開発の新展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸薬科大学 薬品物理化学研究室 ホームページ <a href="https://www.kobepharma-u.ac.jp/biophys/index.html">https://www.kobepharma-u.ac.jp/biophys/index.html</a>
--

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
研究協力者	蛭田 勇樹  (Hiruta Yuki)  (60710944)	慶應義塾大学・理工学部・講師    (32612)	

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
---------	---------