

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22465

研究課題名(和文)腫瘍滞性電子輸送ポリマーを用いた新規がん治療法の創出

研究課題名(英文)Development of cancer therapies using tumor-accumulating electron-shuttling polymers

研究代表者

金子 真大(Kaneko, Masahiro)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：60881191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜透過性を有した電子輸送ポリマーを利用した新たながん治療法の構築を目指した。マウス結腸がんCT26細胞に対して検証を行ったところ、電子輸送ポリマーによる細胞内からの電子引き抜きはCT26細胞に対して酸化ストレスを介して細胞死を誘導することが明らかになった。さらに、ポリマーを介した電子引き抜きを受けた系では、がん細胞に対する免疫を賦活化する分子群の放出が確認され、電子引き抜きによる処理をされたCT26細胞を注射したマウスでは、腫瘍の形成が阻害される傾向が認められた。この結果は電子輸送ポリマーがCT26細胞へ免疫を誘起する形で細胞を誘導し、抗腫瘍免疫を活性化させたことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、電子輸送ポリマーを介した細胞内からの電子引き抜きによりがん細胞死を誘導する手法を構築し、電子輸送ポリマーががん細胞に対する免疫を誘導する形で細胞を殺傷していることを明らかにした。がん細胞に対する免疫の賦活化は、生き残ったがん細胞の根絶や転移がんを抑制するといった観点からも望ましい。また、電子輸送ポリマーに対する機能性ユニットの導入など、ポリマー分子設計に基づくさらなる治療効果向上が可能だと考えられ、新たながん治療法の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel cancer therapy using electron-shuttling polymers with cell membrane permeability. It was shown that the electron extraction from the mouse colon cancer CT26 cells by the polymers induced cell death through oxidative stress. Moreover, the release of a group of molecular patterns that activate immunity against cancer cells was observed in the group subjected to electron extraction via the polymers. The tumor formation was inhibited in mice injected with CT26 cells treated with electron extraction. These results indicate that the electron-shuttling polymers induced immunogenic cell death in CT26 cells and activated anti-tumor immunity.

研究分野：ポリマーバイオマテリアル

キーワード：がん治療 リン脂質ポリマー 電子移動 酸化ストレス がん免疫

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内における酸化還元状態は、代謝、細胞増殖、細胞死等の細胞機能と密接に関わっている。がん細胞はその強固な増殖特性に起因して、異常な細胞内レドックス状態を示し、正常細胞に比べ細胞内レドックス状態に対する変動に対して脆弱であることが知られている。したがって、細胞内レドックス状態に摂動を与える技術の開発は、がん治療分野において重要である。

申請者は、細胞膜透過性の電子輸送ポリマーを創製することで、細胞内レドックス状態を制御する技術を独自に構築してきた。この電子輸送ポリマーは高い細胞親和性と親水性を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ユニットと、酸化還元活性ユニットにより構成される。このポリマーは細胞内外を自由に拡散し、細胞内の酸化還元活性分子と電子授受を行うことによって、細胞内レドックス状態に対して摂動を与えることができる。Vinyl ferrocene (VFc) をレドックスユニットとする電子輸送ポリマー poly(MPC-co-VFc) (pMFc,  $E = + 0.5 \text{ V vs. standard hydrogen electrode}$ ) は、細胞内酸化還元活性分子に比べて酸化還元電位が高いため、細胞内からの電子引き抜きを媒介することができる。ここで、酸化体 pMFc が電子を受け取ることができる一方、還元体 pMFc は電子を受け取ることができない。つまり、酸化体 pMFc のみが細胞内レドックス状態に変動を与えることになる。申請者は最近、酸化体の pMFc を介した細胞内からの電子引き抜きにより細胞内を酸化的にすることで、ヒト乳がん細胞に細胞死を誘導できることを見出した(Kaneko et al., *Biomacromolecules*, 2019)。このことから、酸化体 pMFc を応用することで、電子輸送ポリマーを用いた腫瘍治療が可能なのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、フェロセンをレドックスユニットとする細胞膜透過性の電子輸送ポリマーを合成し、ポリマーを介した電子引き抜きに基づくがん治療法の開発を目指した。マウス結腸がん CT26 細胞を対象として、pMFc を介した電子引き抜きによる *in vitro* 細胞死誘導、ひいては *in vivo* 腫瘍治療の実現可否を検討した。また、電子輸送ポリマーに腫瘍滞在性ユニットを組み込むことで、がん治療効果が向上するかを検証した。

### 3. 研究の方法

2,2'-azobis(isobutyronitrile)(AIBN)を開始剤、MPC と VFc をモノマーとするフリーラジカル重合により pMFc を合成した。また、AIBN を開始剤、MPC、*n*-butyl methacrylate (BMA)、4-vinylphenylboronic Acid (VPBA) をモノマーとして poly(MPC-co-BMA-co-VPBA-co-VFc) (PMBVF) を合成した。CT26 細胞培地に酸化体または還元体の pMFc 及び pMBVF を種々の濃度で添加し、24 時間培養した後、細胞生存率を評価した。また、pMFc を添加した細胞に対して、フローサイトメトリーによりアポトーシス解析及び DAMPs の一つであるカルレティキュリンの発現量の評価を行った。Balb/c マウスを用いて、pMFc による細胞死に伴う免疫誘導効果の検討を行った。酸化体 pMFc を添加して 24 時間培養した CT26 細胞をマウスの左脇腹の皮下にがんワクチンとして注射した。その 1 週間後に右脇腹の皮下に CT26 細胞を注射して、腫瘍形成を観察した。また、pMFc と pMBVF の腫瘍治療効果を検討するため、CT26 腫瘍マウスに対して還元体または酸化体の pMFc を直接注射し、その後の腫瘍体積を追跡した。

### 4. 研究成果

フェロセンをレドックスユニットとする電子輸送ポリマーを用いて、ポリマーが CT26 細胞に与える影響を評価した。まず、pMFc の CT26 細胞に対する細胞膜透過性を検証するため、ローダミン B により蛍光標識された pMFc を合成し、CT26 細胞培地に添加した。培養後に蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、蛍光標識した pMFc を添加した系では、細胞内からポリマー由来の蛍光が確認された。この結果は、pMFc が CT26 細胞の細胞膜を透過し、細胞内に移行したことを示している。次いで、電子を受け取ることのできない還元体および、電子を受け取ることのできる酸化体 pMFc が CT26 細胞に与える影響を検討した。還元体 pMFc は細胞生存率にほとんど影響を与えなかった一方、酸化体 pMFc を添加した系では濃度の向上と共に細胞生存率が低下する傾向が認められた。また、フローサイトメーターを用いた細胞解析により、酸化体 pMFc による電子引き抜きは酸化ストレスを介して CT26 細胞にア

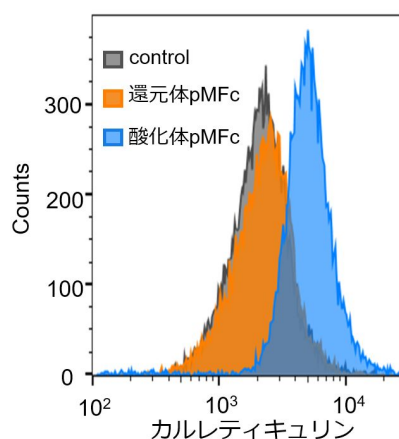


図 1 還元体または酸化体の pMFc と 24 時間培養した CT26 細胞におけるカルレティキュリン発現レベル。

ポトースを誘導したことが明らかになった。また、研究開始当初は予期していなかったが、酸化体 pMFC を添加した系では、カルレティキュリンをはじめとして、がん細胞に対する免疫を賦活化する分子群であるダメージ関連分子パターン<sup>1)</sup>の放出が確認された(図 1)。これを踏まえ、in vivo における免疫誘導効果を検討したところ、酸化体 pMFC により処理された CT26 細胞を注射したマウスでは、CT26 腫瘍の形成が阻害される傾向が認められた。この結果は、酸化体 pMFC が CT26 細胞に免疫を誘導する形で細胞死を誘導し、抗腫瘍免疫を賦活化させたことを示している(図 2)。

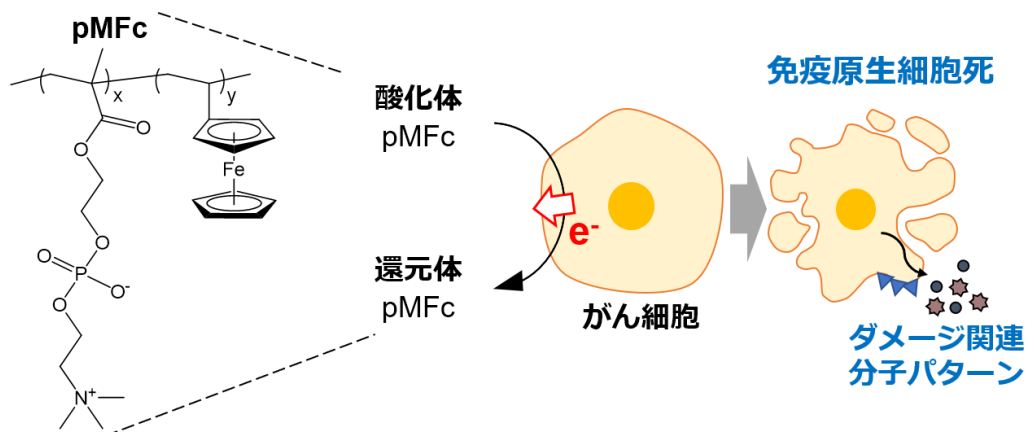


図 2 電子輸送ポリマーpMFC による免疫原性細胞死誘導の模式図。

pMFC の直接注射による in vivo 腫瘍治療効果を検討した。マウス CT26 腫瘍モデルマウスを複製し、還元体または酸化体 pMFC を腫瘍に対して直接注射し、治療効果を評価した。その結果、酸化体 pMFC を注射した群でのみ、腫瘍の成長が抑制される個体や腫瘍が完治する個体が見られた。一方で、酸化体 pMFC を注射しても腫瘍成長が抑制されない個体も見られたことから、治療効果の不足が懸念された。

pMFC による腫瘍治療効果不足の一因として、腫瘍に注射されたポリマーが腫瘍部位にとどまらず、他の組織への拡散を推測した。この仮説のもと、ポリマーの腫瘍への滞在性を向上させるため、ボロン酸ユニットを導入した電子輸送ポリマーpMBVFc を合成し治療効果を検討した。ボロン酸は、がん細胞表面に多く存在するシアル酸部位に対して結合する能力を有しているため、ボロン酸ユニットの導入により腫瘍組織への滞留性が向上することが期待された。還元体または酸化体 pMBVFc を CT26 細胞培地に添加し、培養後に細胞生存率を評価したところ、pMFC と同様に酸化体 pMBVFc を添加した系でのみ濃度の向上と共に細胞生存率が低下する傾向が認められた。続いて、酸化体の pMBVFc を CT26 腫瘍に対して直接注射し、治療効果を検証したところ、酸化体 pMFC を用いた際と比較して治療効果の向上は認められなかった。これは、単位ポリマー量あたりに殺傷できるがん細胞数が限られていたためだと考えられる。腫瘍組織におけるがん細胞数は in vitro 実験のがん細胞数よりも大きいため、in vivo における治療効果が不足したと考えられる。したがって、電子輸送ポリマーを用いたがん治療においては、まず単位ポリマー量あたりに殺傷できるがん細胞数を向上させることが重要だと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子真大
2. 発表標題 細胞内レドックス状態の制御に向けたレドックスリン脂質ポリマーの創製
3. 学会等名 2020年度未来の化学工学を創る会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子真大、山口明生、井藤彰
2. 発表標題 レドックスリン脂質ポリマーによるがん治療法の開発
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口明生、金子真大、井藤彰
2. 発表標題 酸化還元活性リン脂質ポリマーによるがん細胞の免疫原性細胞死誘導
3. 学会等名 化学工学会 第52回秋季大会
4. 発表年 2021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
---------	---------