

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650237

研究課題名（和文） 抗腫瘍作用を示すアミノ酸結合高分子ナノ構造体の創製

研究課題名（英文） Creation of the anti-neoplastic acrylate-nanopolymer with amino acid

研究代表者

城武 昇一（SHIROTAKE SHOICHI）

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20143274

研究成果の概要（和文）：

必須アミノ酸とn-ブチルアクリレートを用いて、新規アミノ酸結合ナノアクリルポリマー粒子を69種類合成した。本ナノ粒子は、ヒトT細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、大腸癌、膵臓癌、肝臓癌に対して、濃度・時間依存性の抗腫瘍効果を示した。強い抗腫瘍活性を示したナノポリマー結合アミノ酸は、概ねGly, Asp, Asn, Hisである。

本ナノ粒子は、カスパーゼ8の活性化に続いてカスパーゼ3が活性化され、DNA切断によってアポトーシス様の細胞死が誘導された。ヌードマウス移植抗腫瘍実験において、腫瘍塊形成を顕著に抑制した。生分解性の本ナノ粒子は、がんの治療およびがんの予防にも期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：

New nanopolymers with amino acid were newly synthesized by using essential amino acids and n-butylcyanoacrylate medicine.

This nano particle showed antitumor effects dependent on time and concentration to the lymphatic tumor cell and epithelium tumor cell strains. The antineoplastic effect Such nano-particles, showd strong effect, were those coupled with Gly, Asp, Asn, and His.

This nano particle activated caspases 8 and caspases 3 were activated, then the apoptosis's cell death is induced subsequently by DNA cleavage. In vivo, this nano particle inhibited notably tumorigenesis by transplantation to a nude mice.

This nano polymer coupled with amino acid is hopeful as a new treatment of cancers also cancer prevention.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：(1) 抗ガン物質探索、(2) ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

がんの根治は人類最大の夢であり、がん研究の軌跡は各研究者の人生そのものである。発ガン機構の解明から遺伝子治療や化学療法最適化など基礎から臨床へと研究が進み、治療（緩解）成績は確かに向上してきたが、そのゴールはまだまだ遙かに遠いのが現状である。本申請者らは、絨毛癌肺転移再発症例の臨床に於いて、化療緩解後に転移巣陰影は消失しないがマーカーは低単位を持続し、十数年間を経た現在においても再々発に至っていない複数の症例を診ている。本事例と実験化学療法における癌細胞の挙動研究から、①癌化学療法には危険な臨床限界があり、②治療成績向上のためには癌細胞に対してより特異的で且つ化療以外の別手段が望まれ、③癌細胞自らが増殖を抑制することを誘導出来れば癌共存下に生活し寿命を全うする究極な治療方法を創製することが可能であると気づいた。

## 2. 研究の目的

がん細胞の増殖と密度（細胞間接着）との逆相関関係から、ガン細胞表面にもその増殖と関連した空間的（糖鎖）センサーが存在し、そのセンサーを人工的に刺激することが出来れば癌の増殖を任意に制御出来るとの仮説を立てた。

平成 20-21 年度科学研究費補助金支援の基に完成した抗菌シアノアクリレート高分子による抗細胞技術（2007-337382, PCT 出願）を、培養リンパ腫瘍株の増殖抑制に試用した。本アミノ酸抱合粒子はアポトーシスを誘導して癌細胞を傷害できることが判り、ガンの治療と再発予防に寄与できると考えられる。そこで、化学療法が期待できない非ホジキンスリンパ腫や膵臓ガンなど、化学療法に抵抗性のガン細胞株を用いて、抗腫瘍効果と高次構造体の物理化学的特性との関連を明らかにする。その結果、最適な抗腫瘍活性を有するアミノ酸抱合ナノ構造体を作製し、その設計図面を世界に公表することが本研究の到達目標である。

## 3. 研究の方法

本研究は、①網目構造にナノレベルの相違を有するアミノ酸抱合アクリル系ナノ粒子を合成し、②その抗腫瘍活性をヒト培養リンパ腫細胞株 (H9, YCU2) と上皮系の HeLa, HEK, 培養膵臓癌細胞株 (AsPC-1, BxPC-3) を用いて MT Assay および細胞増殖抑制曲線から求める。③必須アミノ酸を始め 22 種の主なアミノ酸をそれぞれ抱合したナノ粒子の物理化学的特性と抗腫瘍活性との関係をランダムスクリーニング技法から求め、④それぞれガン種別の最適な抗腫瘍活性を示す高分子構造体の処方設計を完成するものである。そして、⑤完成した抗腫瘍構造体のガン細胞増殖抑制作用の機序について解明し、⑥さらなる培養ガン細胞株を用いて実用化

を目指した抗腫瘍効果の評価を行い、次の実用化研究につなげる計画である。

完成した高分子抗腫瘍構造体の処方設計は学術雑誌をはじめ電子媒体を用いて世界に公表する。

#### 4. 研究成果

グリシン等必須アミノ酸22種類と、静脈瘤治療薬や外科用瞬間縫合剤のn-ブチルアクリレート・医薬品ヒスタクリルを用いて新規アミノ酸結合ナノアクリルポリマーを69種類合成した。本ナノ粒子は、系ガン細胞株のヒトT細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、また上皮系ガン細胞株の大腸癌、膵臓癌、肝臓癌に対して濃度・時間依存性の抗腫瘍効果を示し、その強さは既存の抗ガン剤と同レベルであり各抱合されたアミノ酸の種類に依存することが判明した。その中でも、グリシン抱合ナノ粒子は細胞株に依らず強い抗腫瘍効果を示した、一方アルギニン結合ナノ粒子の腫瘍作用はほとんど観られなかった。この抗腫瘍効果は、アミノ酸を使わない所謂空ナノ粒子と遊離のアミノ酸をただ単に混合した条件では全く認められず、アミノ酸を結合したナノ粒子に特異な抗腫瘍作用であることが判明した。各癌腫に対して強い抗腫瘍活性を示したナノ粒子結合のアミノ酸は概ねGly, Asp, Asn, Hisである。

本ナノ粒子は癌細胞と接合し、デスリガンドレセプターを介してイニシエーターカスパーゼ8の活性化からエフェクターカスパーゼ3を活性化し、DNA切断によってアポトーシス様の細胞死を誘導してガン細胞を障害する。

ヌードマウスを用いたがん移植抗腫瘍効果の検討に於いて、がんの腫瘍形成を本ナノ粒子が顕著に抑制し、その抗腫瘍効果においてはがんの治療およびがんの予防効果にも

期待が持てることが判明した

本ナノ粒子は生分解性で且つ細胞に取り込まれないので、細胞内残留性がなく、マウスを用いた安全性試験に於いて全く問題がなかった。

本研究はナノ構造体の接合がもたらす細胞機能のモジュレーションであり、化学療法耐性な再発ガンの治療と転移再発予防が可能となるばかりか、副作用の強い抗ガン剤を用いない抗腫瘍手段のバイオニアから、難治性がんの細胞治療を可能とするナノ医療の開発研究への礎石となる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① S. Shirotake, A New Antibacterial Nano-polymer Using Acrylic Adhesives Induces Drug-resistant Bacteria to Auto-destruct., CONVERTECH & e-Print, 1, 56-59 (2011).
- ② Y. Tomita, A. R. Kaneko, K. Hashiguchi, and S. Shirotake, Effect of anionic and cationic n-butylcyanoacrylate nanoparticles on NO and cytokine production in R264.7 cells., Immunopharm. Immunotoxicol., 11, 1-8 (2011).
- ③ 城武昇一、新しい抗菌機序を有するナノポリマーと抗生物質耐性菌への応用、コンバーテックジャパン, 2, 112-116 (2010).

[学会発表] (計8件)

- ① 古川由希子、小川寛子、清水尚登、金子晃子、城武昇一；抗菌ナノ粒子を用いた新しい消毒スプレー、日本薬学会第132

- 年会、北海道大学(札幌)、2012, 3, 29.
- ② 金子晃子、中山智洋、中野益代、中澤正年、城武昇一；抗菌ナノ粒子を用いた新しい消毒スプレー、日本薬学会第132年会、北海道大学(札幌)、2012, 3, 29.
- ③ 金子晃子、中川原章平、城武昇一；アクリル系ナノ重合体が示す抗腫瘍作用とアミノ酸抱合処方による抗腫瘍効果の制御、日本薬学会第131年会、ツインメッセ静岡(静岡)、2011, 3, 29.
- ④ 中川原章平、金子晃子、城武昇一；アクリル系ナノ重合体による腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用、日本薬学会第131年会、ツインメッセ静岡(静岡)、2011, 3, 29.
- ⑤ 中山智洋、清水尚登、大塚和人、城武昇一；抗生物質多剤耐性グラム陽性菌の自己融解を誘導する抗菌ナノ構造体の創製、日本薬学会第131年会、ツインメッセ静岡(静岡)、2011, 3, 29.
- ⑥ 上原政樹、原 明日香、大村雅子、中山智洋、城武昇一；多剤耐性グラム陽性菌を抗菌するナノ構造体の合成、日本薬学会第131年会、ツインメッセ静岡(静岡)、2011, 3, 29.
- ⑦ 中川原章平、金子晃子、城武昇一、：抗腫瘍作用を示すアクリル系ナノ重合体の創製、第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場(大阪)、2010, 9, 23.
- ⑧ 金子晃子、中川原章平、城武昇一、：アミノ酸抱合ナノ重合体の T-lymohoma 細胞に対する抗腫瘍効果、第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場(大阪)、2010, 9, 23.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

- ①名称：「高次構造体が示す抗細胞効果の新

規調整技法」

発明者：城武昇一

権利者：同上

種類：特許出願

番号：2011-078781

出願年月日：2011年3月31日

国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

- ①名称：シアノアクリレート系ポリマー粒子

及びその製造法

発明者：城武昇一

権利者：横浜市立大学

種類：特許

番号：4963221

取得年月日：2012年4月6日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

城武 昇一 (SHIROTAKE SHOICHI)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20143274

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：