

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651135

研究課題名(和文) ナノダイヤモンド臨床適用への挑戦

研究課題名(英文) A challenge to apply nanodiamond into clinical medicine

研究代表者

茶野 徳宏 (Chano, Tokuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40346028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：Polyglycerol親水性基被覆によりnanodiamond (ND) のin vivo適用化に成功し、更に、粒径均一化によってpassive targetingに成功した。

親水性基末端にRGD-ペプチドを付加(ND-RGD)し、癌細胞へのactive targetingを可能とし、更に、抗癌剤CDDPをエステル結合にてNDに担持させること(CDDP-ND-RGD)によって、非特異的CDDP毒性を排除し、RGDペプチド結合integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3担持癌細胞(U-87MG)特異的に毒性を発揮できるよう薬物修飾を行い、active targeting therapyに成功した。

研究成果の概要(英文)：In vivo application of nanodiamond (ND) by polyglycerol hydrophilic covering was succeeded, and the diametrical selection caused a further success in passive targeting.

RGD-peptide addition to ND (ND-RGD) could allow active targeting to cancer cells, and further, ester linkage between anticancer agent (CDDP) and ND-RGD could specifically enhance the cell death of U-87MG cells, which bare integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3. Such strategy as CDDP-ND-RGD can succeed anti-cancer active targeting therapy to eliminate non-specific CDDP toxicities, and to improve the cancer-specificity of the drug.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ材料解析・評価 生体内イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者、茶野は、本研究開始以前より、がん研究、臨床病理学的研究、並びに、疾患動物解析、治療学的動物実験に携わっていた (Chano T, et al. *Oncogene* 2002; *Nat Genet* 2002; *Brain Res* 2007; *Int J Cancer* 2009; *PLoS One* 2010; *Cancer Res* 2011)。更に、連携研究者、小松らはナノダイヤモンド nanodiamond (ND) 化学修飾とサイズ制御に関して研究を続けてきていた (Komatsu N, et al. *Small* 2008; *Chemical Engineering* 2006; *New Diamond* 2006)。両者のこのような背景を生かし、医療応用を目標とした多機能 ND の開発 (Takimoto T, Chano T, et al. *Chem Mater* 2010 22: 3462-3471) を更に進めることを企画した。

本研究では、創成した ND の薬物動態学的特徴、病態 imaging 能力、drug delivery system (DDS) 治療適用性、そして、生体毒性を明らかにし、ND の医療用ナノデバイスとしての適用を検証し、多機能 ND の有用性、安全性と危険性、適用疾患選択性、使用制限、等を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

医療現場で用いられている薬剤は標的指向性や徐放性に乏しく、これを補うべく、タンパク質、リポソーム等の応用が進行中である。しかし、全くの人工的素材からなる多機能性ナノデバイスはほとんどなかった。

本研究では、薬物をリポソーム中に入れるだけ、タンパク質に混ぜ込むだけといった原始的、受動的な作りではなく、目的の機能を高度にプログラム化して付加させた多機能ナノダイヤモンド nanodiamond (ND) を創生し、医療応用することを目指した。ND に標的指向ペプチド、標識物質や薬剤を担持させる、また、ND コア内にイオン注入を行う、等により、新しい多機能 ND を合成し、こ

れを更に担がんマウスに投与することで、薬理動態、病理動態を解析し、病態 imaging や DDS (drug delivery system) 治療に適用可能か否かを検証してゆくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

表面化学修飾やコア内イオン注入によってナノダイヤモンド nanodiamond (ND) を革新的なマルチモーダルプローブ、薬剤キャリアー分子として創成し、その薬物動態学的特徴、in vivo imaging 能力、DDS 治療応用性、そして、生体毒性、等を検証することを企画した。これにより、医療用ナノデバイスとしての多機能 ND の可能性と制限を詳細にしたいと考え、以下を企画した。

### (1). 多機能ナノダイヤモンド (ND) の合成

ND の表面修飾、コア内イオン注入を行ない、標的指向性、薬剤徐放性など、更に多機能化する。

Polyglycerol 親水性基の被覆により ND の水溶化、in vivo 適用化を行う。癌組織については 10-100nm のナノ粒子が取り込まれやすい EPR 効果も報告されていたので、先ず、ND のサイズ粒径制御を行い、EPR 効果を利用した癌組織への集積性を検証した。

また、親水性基の末端に、integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 結合特異性のある RGD-ペプチドを付加することによって、integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 担持性癌細胞組織への標的化を進めた。

### (2). 多機能 ND の in vivo 薬理動態解析、病理解析

合成した多機能 ND を in vitro では培養細胞 (HeLa 細胞、U-87MG 細胞)、in vivo では U-87MG 担癌マウスに投与した。そして、その薬理動態、病態分布を解析した。小動物用 in vivo 蛍光イメージャー (島津 Clairvivo OPT) にて、蛍光標識 ND の分布、

排泄を経時的に追跡した。また、CDDP 担持 ND (CDDP-ND, CDDP-ND-RGB) については、各臓器における Pt 蓄積量を ICP-MS にて定量した。

#### 4. 研究成果

多機能 ND の合成に関しては、polyglycerol 親水性基被覆により nanodiamond (ND) の *in vivo* 適用化に成功した (ND-PG)。更に、粒径均一化によって EPR 効果による、passive targeting に成功した。本内容については平成 24 年度に論文にて発表し得た。

親水性基末端に癌組織特異的 integrin に結合し、細胞内移入可能な RGD-ペプチドを付加し、癌細胞への active targeting を行った (ND-PG-RGD)。薬物修飾についても、抗癌剤 cis-platin (CDDP) をエステル結合にて ND-PG, ND-PG-RGD に担持させることによって、ND-PG-CDDP, ND-PG-RGD-CDDP を作成し、ND-PG-CDDP によって、正常、癌組織、両者に非特異的であった CDDP 毒性を排除し、ND-PG-RGD-CDDP によって、RGD ペプチド結合 integrin avb3 担持癌細胞 (U-87MG) 特異的に CDDP 細胞死毒性を発揮できるよう薬物修飾を行い、active targeting chemotherapy, 癌特異的 drug delivery に成功した。本解析については、結果を論文にて発表し、in press 中である。

創成した多機能 ND の *in vivo* 薬理動態については、赤外、遠赤外蛍光を持つ ND を用いて、担癌腫瘍マウスに尾静脈より静脈内導入することによって現在も解析を進めている。また、薬剤修飾 ND、ND-PG-CDDP, ND-PG-RGD-CDDP についても、U-87MG 担癌マウスによる *in vivo* 実験を行い、腫瘍組織や肝、脾、心、肺、等、各臓器に於ける Pt 蓄積量を ICP-MS にて定量し、解析を進めている。今後、これらの内容についても、

整理の上、論文発表して行く計画である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Zhao L, Xu YH, Qin H, Abe S, Akasaka T, Chano T, Watari F, Komatsu N, Chen X. Platinum on nanodiamond: A promising prodrug conjugated with stealth polyglycerol, targeting peptide, and acid-responsive antitumor drug. **Adv Funct Mater.** 2014. In press. (査読有)  
IF: 9.765
2. Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transition-arrest and cell death in N-GlcNAc<sub>2</sub>-modified protein-producing renal carcinoma cells. **PLoS One.** 2014. 9(5): e96168. (査読有)
3. Inui T, Chano T, Takikita M, Nishikawa M, Yamamoto G, Okabe H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. **PLoS One.** 2013. 8(9): e74398. (査読有)
4. Isono T, Chano T, Okabe H, Suzaki M. Study of Global Transcriptional Changes of N-GlcNAc<sub>2</sub> Proteins-Producing T24 Bladder Carcinoma Cells under Glucose Deprivation. **PLoS One.** 2013. 8(4): e60397. (査読有)
5. Hama Y, Chano T, Inui T, Matsumoto K, Okabe H. Preparation of mouse monoclonal antibody for RB1CC1 and its clinical application. **PLoS One.** 2012. 7(3): e32052. (査読有)

6. Ushida H, Chano T, Minami K, Kita H, Kawakami T, Okabe H, Okada Y, Okamoto K. Therapeutic potential of SOX2 inhibition in embryonal carcinoma. **J Urology**. 2012. 187(5): 1876-1881. (査読有)
7. Tameno H, Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Arai A, Kishimoto M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. Prognostic significance of RB1-inducible coiled-coil 1 in salivary gland cancers. **Head Neck**. 2012. 34(5): 674-680. (査読有)
8. Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa T, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. **Cancer Lett**. 2012. 314(1): 82-91. (査読有)
9. Isono T, Matsumoto T, Wada A, Suzaki M, Chano T. A global transcriptome analysis of a dog model of congestive heart failure with the human genome as a reference. **J Card Fail**. 2012. 18(1): 872-878. (査読有)
10. 茶野徳宏. 診療における新規マーカーの探索と適用. 臨床病理. 60(2): 167-173. 2012. (査読無)
11. Zhao L, Chano T, Morikawa S, Saito Y, Shiino A, Shimizu S, Maeda T, Irie T, Aonuma S, Okabe H, Kimura T, Inubushi T, Komatsu N. Hyperbranched Polyglycerol-Grafted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Functionalization, Size Separation, Magnetic Properties, and Biological Applications. **Adv Funct Mater**. 2012. 22(24): 5107-5117. Epub 2012 Aug 7. (査読有)

IF: 9.765

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

茶野 徳宏 (CHANO Tokuhiro)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40346028

### (2)研究分担者

なし  
研究者番号:

### (3)連携研究者

小松 直樹 (KOMATSU Naoki)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30253008