

平成30年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25462690

研究課題名(和文) 高分子ミセル型ナノメディシンを用いた革新的な頭頸部腫瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Polymeric Micelle for a Novel Nano-Medicine Therapy Against Head and Neck Cancer

研究代表者

木村 美和子 (Kimura, Miwako)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：00376435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：平成25-26年度：ヒト下咽頭がん由来細胞株(FaDu)を用い、マウス下咽頭がん同所移植モデルの構築に成功した。またFaDuのluciferase恒常発現株を作成した。IVIS(in vivo蛍光・発光イメージングシステム)を用いて下咽頭がんモデルマウスの生着、増大、治療効果について定量する手法を確立した。平成27-28年度：出産により研究を一時中断。

平成29年度：リガンド搭載高分子ミセルによるテーラーメイド・ドラッグデリバリーシステムを構築した。IVISで高分子ミセルの腫瘍集積効果、増殖抑制効果を検討した。In vivo共焦点レーザー顕微鏡で高分子ミセルの体内動態および腫瘍内分布を検討した。

研究成果の概要(英文)：2013-2014: The orthotopic hypopharyngeal tumor mouse model was established using the human hypopharyngeal carcinoma-derived FaDu cell line. The luciferase-stable FaDu cell line was also acquired. IVIS (in vivo bioluminescence/fluorescence imaging system) were utilized to monitor the hypopharyngeal tumor model during cell engraftment, tumor progression, and treatment response.

2014-2015: Maternity and parental leave.

2016-2017: Tailor-made drug delivery system was developed by ligand-functionalized polymeric micelles. Tumor accumulation and anti-tumor activity of the micelle was assessed using the IVIS. Pharmacokinetics and tumor distribution of the micelle was investigated using the intravital confocal laser scanning microscopy.

研究分野：生体医工学、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

頭頸部腫瘍の中でも咽頭癌、喉頭癌、口腔癌は治療による発声や嚥下、咀嚼などへの影響から QOL の低下が顕著な癌である。頭頸部腫瘍の治療の主体は、手術、放射線、抗がん剤の治療を組み合わせる集学的治療であるが、手術は頭頸部を整容的に著しく損なう上、発声・嚥下などの身体的機能にも高度の影響を及ぼし、身体的・心理的に侵襲が大きく、それ故 QOL の大幅な低下を来す。副作用の少ない抗がん剤のみでこれらの癌を根治させることが可能であれば、整容的に著しく損なわれることもなく、発声・嚥下等の身体的機能も保たれ理想的な治療法となり得る。それ故、治療効果が高く、身体的機能に影響を及ぼさず、治療による副作用の発現率の低い抗がん剤の早急な開発が望まれている。

腫瘍組織では、正常組織に比べ、血管透過性が亢進しているため、高分子や微粒子が血管より流出しやすく、また、リンパ系が未発達なため、腫瘍組織に到達した物質は蓄積しやすい特性を持つ。このような特性は EPR 効果 (Enhanced permeation and retention effect) と呼ばれている。近年、この EPR 効果に基づいた腫瘍組織への集積効果を利用して設計された DDS 剤の開発が進んでおり、がんに対する標的治療薬として臨床の現場で有効性が示されつつある。しかし、依然として治療抵抗性を示す症例は多く、副作用の報告も少なくない。更に安全で効果的な DDS 剤を開発するためには、これまでの EPR 効果に基づく DDS を改良して、それを超えるデリバリー戦略が必要である。日本における死亡原因の第一位はがんであり、これに対する革新的なナノ DDS 剤の開発は我が国の将来にとって最も重要な基盤研究の一つと位置づけられ、工学、化学、医学のテクノロジーを集結したここ数年での重点的な研究の必要がある。

申請者らのグループはこれまでに、ヒト下咽頭癌細胞 (FaDu) をマウスの下咽頭へ同所移植し、下咽頭癌の疾患モデルマウスを構築に成功した (図 1)。通常、動物モデルは咽頭

癌のような深部事象を経時的に高解像度観測することが難しいとされている。しかし、申請者らのグループは下咽頭に移植された癌をモニターするために、ヒト下咽頭癌細胞 FaDu に luciferase 発現株を作成し、その細胞を IVIS (in vivo 蛍光・定量トモグラフィ装置) を用い、生体内深部にある下咽頭癌を無侵襲・リアルタイムでモニターする手法を確立した (図 2)。また、ヒト下咽頭癌細胞 (FaDu) を用いて作成した腫瘍を用いた共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態観察の手技にも精通しており、最適な条件で実験することが可能である。

2. 研究の目的

頭頸部腫瘍へナノ DDS 剤が到達するためには、ナノ DDS 剤が血流から癌組織の細胞外マトリックスを浸透する必要がある。そこで我々はオキサリプラチン活性体である DACHPt を内包する高分子型ミセルのサイズを様々に変えることにより、頭頸部腫瘍により最適なミセル分子のサイズを決定する。更にその条件に上乘せとして、高分子型ミセルの表層へ、マレイミドなどの各種官能基を導入し、そこへリガンド分子として、カベオレ介在経路によって内在化することが見いだされている環状 RGD ペプチド、tumor-homing ペプチドである iRGD、Angiopep などと結合させたりリガンド搭載高分子型ミセルを開発する。これらのミセルを用いて、FaDu や TU686、OSC-4 などのヒト頭頸部腫瘍細胞を用いた増殖抑制試験、フローサイトメーターを用いたミセルの取り込み試験、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内動態の確認を行う。最適化されたミセルを用いて、頭頸部腫瘍同所移植モデルに対する治療効果を IVIS と in vivo 共焦点レーザー顕微鏡で判定し、腫瘍・血管タイプに応じたりリガンド分子の組み合わせを決定する。このようにして、頭頸部腫瘍に対して最適なりリガンド分子を選択できるテーラーメイド・ドラッグデリバリーシステム (T-DDS) を確立する。

3. 研究の方法

【平成 25 年度】

高分子ミセルを構成するブロックポリマーを合成し、オキサリプラチン活性体を内包させ、DDS キャリア表面へリガンド分子を導入する。高分子ミセルの調整に関しては、ブロックポリマーの組成比、内包薬物の仕込み比などを任意に変更することで、ミセルの粒径を 20nm から 100 nm の範囲内で自由に調整することが可能である (*J. Control. Release* 101,223(2005))。粒径については動的光散乱測定(DLS)、静的光散乱即的(SLS)、ゲルパーミエーション・クロマトグラフィー(GPC)を用いて評価する。内包薬物量に関しては ICP-MS を用いて測定する。リガンド分子の導入は、DDS キャリア調整後にキャリア表面でのマイケル付加、クリックならびにラジカルカップリング反応を利用して実施する。これらの化学的な技術については、研究協力者である東京大学医学部臨床医工学部門助教三浦裕氏、東京大学工学部マテリアル工学講師 Cabral H. 氏から協力を得られる体制が整っている。

ペプチドリガンド分子としては、過去の研究から最も効果が期待される分子、血管内皮細胞に過剰発現している $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状型の RGD ペプチド (*Bioconjugate Chem.*, 18, 1415(2007))、tumor-homing ペプチドである iRGD、Angiopep を使用する。これらの高分子型ミセルの生物学的評価、すなわち、血液中における安定性、毒性試験に関して *in vitro* で詳細に検討を行い、各機能の最適条件を探る。具体的には、毒性試験に関しては、FaDu や OSC-4 などの頭頸部腫瘍由来のがん細胞に対する増殖抑制作用を *in vitro* で評価を行い、本研究のミセルが有用であることを確認する。本研究で最も有望と考えられる環状 RGD とトランスフェリン受容体に対する Fab を導入したミセルは、腫瘍の新生血管に過剰発現する $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを環状 RGD で特異的に認識して結合、続いて Fab によるトランスサイトーシスにて血管内皮を通過した後、腫瘍本体を攻撃できると推測される。一方で、腫瘍の血管形態に着目した設

計のミセルでは、腫瘍の新生血管の形態や性質に合わせて、ミセルの粒径を調整し、リガンド分子の種類、組み合わせ、導入個数を変化させる。これらの条件を多数準備し、*in vitro* にて頭頸部腫瘍に対する最も強く効果を発揮する最適条件を探し出す。

疾患モデルマウスに関しては、下咽頭癌同所移植モデルを中心に作成する。これまでは、Olympus 社製の内視鏡 (径 1.2mm の針状硬性鏡 MK Modular Mini-Scopes) を用いてマウス下咽頭を確認し、細径ガラス注射器で腫瘍細胞懸濁液を下咽頭梨状陥凹部の粘膜下に注射していたが、頸部の固定や喉頭展開が不十分であるため、咽頭腔の小さいヌードマウスでは視野が不良の場合がある等の短所があり、大量の同所移植モデル作成は困難であった。そこで、本研究提案では Solve 社製マウス挿管台を用いてマウスを十分に保定し、同社製クリニウスラット・マウス気管内挿管セットを用いて、喉頭展開し固定することで良好な視野が得られると考える。硬性内視鏡の視野も補助として用いることで、より効率的なモデルマウス作成が可能となり、様々な条件設定でより迅速に実験を遂行することができる。

【平成 26 年度】

前年度までに検討した最適条件でサイズを調整され、リガンドを搭載した高分子型ミセルを用いて、*in vivo* で詳細に検討を行い、テラーメイド・ドラッグデリバリーシステム (T-DDS) を構築する。血管内皮細胞に過剰発現している $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状型の RGD ペプチドやトランスサイトーシス誘起性のトランスフェリン受容体に対する Fab などの異なる複数のリガンド分子を導入した DDS キャリアを用いて、細胞内動態について詳細に検討し、治療効果、その効果のメカニズムを明らかにする。

In vivo の実験では、平成 25 年度に検討した方法で頭頸部腫瘍細胞の Luc 導入細胞や GFP 導入細胞を同所へ移植した疾患モデルを使

用し、IVIS Imaging system や in vivo 共焦点レーザー顕微鏡にて DDS キャリアの体内動態、腫瘍増殖抑制効果を明らかにする。In vivo 共焦点レーザー顕微鏡にて DDS キャリアの体内動態を確認する際には、Dorsal Skin fold Chamber 内に培養した腫瘍を移植する方法、もしくは、同所移植した腫瘍を露出させて Skin Flap を作成する方法を用いて視野を固定した後に in vivo 共焦点顕微鏡にて観察する。また、蛍光ラベル化されたミセルを用いて生体内での動態を直接的に観察することで、ミセルの逐次的な腫瘍浸透性についても考察する。

【平成 27・28 年度】

前年度までの実験結果を踏まえて、再現性を得るための確認実験を行う。また、in vivo 共焦点レーザー顕微鏡や IVIS imaging system の他に、マクロ MRI、SPECT を用いてリアルタイムでの DDS キャリアの集積、治療効果についても検討する。以上の検討を通して、本研究提案では、これまで治療が困難であった頭頸部腫瘍について有効なナノ DDS 医薬を創成し、ミセル表面のリガンド分子により Active Targeting を可能にし、腫瘍や新生血管の性質や形態に応じてリガンド分子の種類や導入量を制御することで、テーラーメイド・ドラッグデリバリーシステムを構築する。

4. 研究成果

平成 25-26 年度：ヒト下咽頭がん由来細胞株 (FaDu) を用い、マウス下咽頭がん同所移植モデルの構築に成功した。また FaDu の luciferase 恒常発現株を作成した。以上によって、IVIS (in vivo 蛍光・発光イメージングシステム) を用いて下咽頭がんモデルマウスの生着、増大および治療効果について経時的に定量する手法を確立した。

平成 27-28 年度：出産により研究を一時中断した。

平成 29 年度：リガンド搭載高分子ミセルを用いてテーラーメイド・ドラッグデリバリーシステムを構築した。IVIS で高分子ミセルの腫瘍集積効果、増殖抑制効果を検討した。ま

た、in vivo 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、高分子ミセルの体内動態および腫瘍内分布について検討した。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 1 件)

【声とことばの異常-検査所見と診断のポイント】 声の異常 声の評価の進め方、木村美和子、JOHNS34 巻 2 号 153-156(2018 年 2 月)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 美和子 (Kimura Miwako)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号 : 00376435

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()