

2008/2034A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの  
創成と脳腫瘍標的治療への展開

平成20年度 研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成21（2009）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの  
創成と脳腫瘍標的治療への展開

平成20年度 研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成21（2009）年 4月

## 目 次

|  |       |    |
|--|-------|----|
| I. 総括研究報告<br>血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と脳腫瘍標的治療への展開 | ----- | 1  |
| 片岡 一則  |       |    |
| II. 分担研究報告   |       |    |
| 1. リガンド導入DACHPt内包高分子ミセルの構築                                   | ----- | 6  |
| 西山 伸宏  |       |    |
| 2. マウス脳腫瘍モデルの構築とDACHPt内包ミセルのin vivo機能評価                      | ----- | 11 |
| 稲生 靖   |       |    |
| 3. マウス脳腫瘍モデルの組織学的評価  | ----- | 14 |
| 狩野 光伸  |       |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表  | ----- | 17 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷  | ----- | 19 |

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総括研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と  
脳腫瘍標的治療への展開

研究代表者 片岡一則 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 教授

研究要旨

本研究では、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を目的として、脳腫瘍血管構築の特異性を明らかにしながら、脳腫瘍同所移植モデルに対する高分子ミセル型製がん剤の集積性および治療効果を検証し、より効果に優れた脳腫瘍治療薬を開発することを目指している。初年度にあたる本年度は、血管内腔からがん組織へと効率的に移行するDDSとして、PEG末端にリガンド分子を導入するための官能基を有するDACHPt内包ミセルの調製を行った。また、マウス脳腫瘍モデルを構築し、蛍光標識ミセルの集積性を評価した。さらに、上記の脳腫瘍モデルの組織学的評価を行う一方で、本研究の結果を臨床に結びつけることを目的として、ヒト病理標本の血管構築の解析を行った。

A. 研究目的

膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍は、血液-腫瘍関門(BTB)が存在するために薬剤の集積性が著しく低下しており、その治療のためには従来型DDSのがん集積メカニズムであるEPR効果(腫瘍組織では、血管の透過性が亢進しており、リンパ系が未発達であるため、高分子物質が集積しやすい環境が形成されているという効果)を超越した新しい薬剤のデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、研究代表者の片岡らが世界に先駆けてコンセプトを打ち出した高分子ミセル型DDSの表層に腫瘍血管内皮細胞特異的にトランスサイトーシスを誘起するリガンド分子を搭載し、ミセルの血管内腔からがん組織への移行を促進することによって、脳腫瘍への薬剤の送達効率を高め、画期的な治療効果を実現することを目指している。

このような目標を達成するために、本研究では、研究代表者の片岡が統括する東京大学大学院・医学系臨床医工学部門と工学系マテリアル工学専攻において、ミセル型DDSの創製から生物学的評価までを行う一方で、東大病院脳神経外科(稲生)でDDSの脳腫瘍モデル(同所移植モデル)に対する治療効果を検証し、東大院・医学系分子病理学専攻(狩野)でDDSの有効性検証のための組織学的評価を行っている。

B. 研究方法

1. 末端に官能基Xを有するPEG-P(Glu)の合成とDACHPt内包ミセルの調製

本項目では、DACHPt内包高分子ミセルのシェ

ルを構成するPEG末端にペプチドや抗体フラグメントなどのリガンド分子を導入するために、PEGの $\alpha$ 末端に官能基Xを有するPEG-P(Glu)ブロック共重合体の合成を行った。この合成は、(i)官能基Xとヒドロキシル基を有する化合物を開始剤とするエチレンオキシド(EO)の重合、(ii)PEGの $\omega$ 末端の-OH末端の-NH<sub>2</sub>末端への変換、(iii)-NH<sub>2</sub>末端からの $\gamma$ -ベンジル-L-グルタメート N-カルボン酸無水物(BLG)の重合、(iv)PBLGの脱保護の4つのステップによって行った。また、DACHPt内包ミセルの調製は、PEG-P(Glu)のGlu残基とPtのモル比が1:1になるように混合した後、37°Cで5日間反応させることによって行った。

2. マウス脳腫瘍モデルの作製と組織学的評価およびヒト脳腫瘍標本との比較

マウス脳腫瘍モデルの作製は、移植後の腫瘍血管の新生には間質組織の反応も重要と考えられたため、免疫機能が正常である同系マウスの腫瘍モデルのなかで脳内移植が可能であることが知られているB10.Aマウス由来の細胞株SR-B10.A(glioblastoma)を用いることとした。その結果、マウス脳内への定位的移植によりほぼ100%の確実性で腫瘍の生着が得られた。

次に、腫瘍組織の凍結切片の免疫染色による解析を行った。具体的には、通常血管の透過性に関係するtight junction分子や血液脳関門に寄与する分子と言われているZO-1(Zona occludens 1 protein / tight junction protein 1)、VE-CAD



(Vascular Endothelial Cadherin/Cadherin-5)、CLDN-5 (Claudin-5)、OCLN(Occludin)、もしくは血液脳関門のマーカーとなるといわれている分子である GLUT-1 (glucose transporter type 1/Slc2a1/solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1)、ミセルのtranscytosisを介した輸送を考慮してcaveolaeの構成タンパクであるCAV-1 (Caveolin-1)、グリオーマのマーカーとしてastrocyteのマーカーであるGFAP (glial glucose transporter type 1 fibrillary acidic protein) に関する免疫染色を行い、脳の正常血管とグリオーマモデル中で新生した血管を比較した。さらに、西原 (北海道大学大学院医学研究科探索病理学) らとの共同研究によって、ヒトのastrocytoma系の脳腫瘍内部の血管構造の解析を行い、マウス脳腫瘍モデルとの比較を行った。

### 3. 脳腫瘍モデルに対する蛍光標識DACHPt内包ミセルの集積性の評価

30nmの蛍光(Alexa680)ラベルしたDACHPt内包ミセルを投与し、その組織への蓄積分布を組織学的に解析した。蛍光ミセルを脳腫瘍モデルマウス (SR-B10A細胞株を同所移植し6日経過したもの)の尾静脈内に投与し、投与後24時間、48時間で脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し、蛍光ミセルの各臓器への蓄積を凍結切片の蛍光顕微鏡観察によって解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 末端に官能基Xを有するPEG-P(Glu)の合成とDACHPt内包ミセルの調製

(i)-(iv)のステップで合成を行うことによって、P(Glu)の重合度が15のX-PEG-P(Glu)を合成することができた。得られたポリマーの  $M_w/M_n$  は1.1以下であった。また、X-PEG-P(Glu) 12k-15と末端にメトキシ基を有するMeO-PEG-P(Glu) 12k-20を1:1で混合し、DACHPtと5日間反応させることによって、34.9nmのDACHPt内包ミセルを調製することができた。

#### 2. マウス脳腫瘍モデルの作製と組織学的評価およびヒト脳腫瘍標本との比較

SR-B10A細胞の同所移植モデルの解析の結果、血管におけるtight junction分子の発現に関しては正常部分とグリオーマ部分での顕著な違いは見られなかった。しかし同所移植されたSR-B10A細胞はGFAP陽性ながら、正常astrocyteと違い、形態が球状であることが確認された。また血液脳関門マーカーの一つ、Glut-1の分布に関してはグリオーマ内部において異なることが見出され、正常部分に比べグリオーマ内部の血管にはGlut-1の発現は低いことがわかった。一方、ヒト脳腫瘍標本

の解析の結果、astrocytoma系の脳腫瘍内部の血管は厚いpericyteで覆われているのが特徴であり、またoligodendrocytoma系の脳腫瘍では細い血管が特徴であることが今回新たに見出された。この知見とマウスモデルを比較するために、血管を構成する血管内皮細胞のマーカーであるPECAM-1 (CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule-1)、血管壁細胞 (以下pericyte) のマーカーである $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin) の免疫染色も行った(図1)。その結果、マウスグリオーマSR-B10A細胞はastrocytoma系細胞株にもかかわらず、新生血管には厚いpericyteは存在せず、よりoligodendrocytoma系の脳腫瘍の血管に近いものである事がわかった。しかしながら、前述のように、SR-B10A細胞の同所移植モデルは、tight junction分子を発現しており、血液-脳腫瘍関門(BTB)を再現した脳腫瘍モデルの一つとして、DACHPtミセルの集積性の評価を行った。

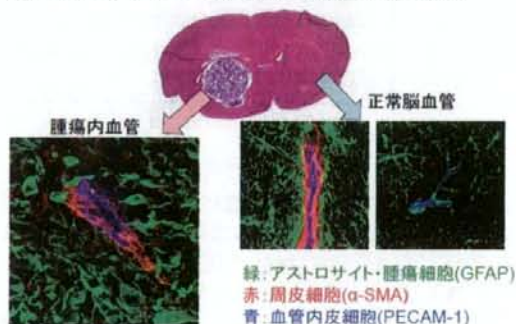


図1. マウスGlioblastoma SR-B10A細胞の同所移植モデルの解析

#### 3. 脳腫瘍モデルに対する蛍光標識DACHPt内包ミセルの集積性の評価

蛍光標識DACHPt内包ミセルの各臓器に対する集積性を凍結切片の蛍光顕微鏡観察によって評価したところ、肝臓、脾臓への集積は認められたが、SR-B10A細胞の同所移植モデルにおいては集積が全く認められなかった。一方、SR-B10A細胞の皮下移植モデルにおいては、蛍光標識DACHPt内包ミセルの集積が認められたことから、上述のように、同所移植されたSR-B10A細胞は、血液-脳腫瘍関門(BTB)を再現した脳腫瘍モデルとして妥当であることが明らかになった。

### D. 考察

本研究では、ナノキャリア(株)とDebioPhram社によって2009年度より臨床治験が開始されたDACHPt内包ミセルにリガンド分子を導入することによって、悪性脳腫瘍の標的治療を実現することを目指している。トランスサイトーシスを誘導するリガンド分子としては、環状RGDペプチドやトランス



フェリン受容体に対する抗体(フラグメント)を用いることを計画しており、これらのリガンド分子をミセル表面に導入するために、平成20年度は新規ブロック共重合体の合成法を確立し、PEG末端に官能基Xを有するDACHPt内包ミセルの調製を行った。従って、平成21年度は官能基Xを利用して環状RGDペプチドおよび抗トランスフェリン受容体(TfR)抗体をミセル表面に導入する予定である。一方、本研究では、研究終了後3年以内の臨床応用を目指している為に、ヒトへの応用を視野に入れたモデル構築が重要である。そこで、グリオーマのヒト臨床検体の腫瘍血管について免疫染色による解析を行った。その結果、比較的抗癌剤に感受性が高いoligodendrocyte系の腫瘍の場合は、CD34陽性の内皮細胞の存在は認められたが、actin陽性の周皮細胞の存在は認められなかったのに対して、化学療法への抵抗性が強いとされるastrocyte系の腫瘍血管は、一層の内皮細胞と $\alpha$ -SMA陽性・Desmin陰性の平滑筋細胞とは異なる未熟な周皮細胞の厚い層で覆われていることが明らかになった。これまで血液-腫瘍関門(BTB)の実体は明らかにされていなかったが、このような特異的な血管の構築がBTBの構築に大きく寄与しているものと考えられる。一方、我々は、移植後の腫瘍血管の新生には間質組織の反応も重要と考え、マウスglioblastoma SR-B10.A細胞の同所移植モデルを作製し、その組織学的解析と蛍光標識DACHPt内包ミセルの集積性の評価を行った。その結果、周皮細胞を伴う血管構造に加え、血管内皮細胞間にはClaudin-5等のタイトジャンクション分子も存在することが確認され、さらに蛍光標識DACHPt内包ミセルが集積できなかったことから、同所移植されたSR-B10.A細胞は、血液-脳腫瘍関門(BTB)を再現した脳腫瘍モデルとして妥当であるものと考えられた。したがって、今後は、本モデルを用いて腫瘍の組織構築とDDSの集積性の関連性を明らかにする一方で、リガンド分子を搭載したDACHPt内包ミセルによって、このモデルの治療を実現したいと考えている。

#### E. 結論

本年度は、表面にペプチドや抗体および抗体フラグメントを導入するための官能基Xを有するDACHPt内包ミセルの構築とBTBを再現した脳腫瘍モデルの構築を行った。今度は、リガンド搭載DACHPt内包ミセルを用いて、この脳腫瘍モデルの標的治療を実現することによって、がんの中でも特に治療が困難な悪性脳腫瘍に対して画期的な治療法を創出したいと考えている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(欧文)

1. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H.-J. Kim, J.-H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge conversional PIC micelles—an efficient protein nanocarrier into cytoplasm. *Angew. Chem., Int. Ed.*, in press
2. W. Dong, A. Kishimura, Y. Anraku, C. Sayan, K. Kataoka, Monodispersed polymeric nanocapsules: Spontaneous evolution and morphology transition from reducible hetero-PEG PICmicelles by controlled degradation. *J. Am. Chem. Soc.*, in press
3. W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Improving multipotent differentiation efficiency of mesenchymal stem cells using 3D spheroids method on micropatterned substrates. *Biomaterials*, in press
4. S. Matsumoto, R.J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules*, 10 (1) 119-127 (2009)
5. A. Kishimura, S. Liamsuan, H. Matsuda, W. Dong, K. Osada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, pH-Dependent permeability change and reversible structural transition of PEGylated polyion complex vesicles (PICsomes) in aqueous media. *Soft Matter*, 5 (3) 529-532 (2009)
6. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release*, 133
7. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharm. Res.* 26 (1) 82-92 (2009)
8. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
9. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)



10. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)
  11. S. Wu, N. Nishiyama, M. R. Kano, K. Itaka, U. -I. Chung, K. Kataoka, Enhancement of Angiogenesis through Stabilization of Hypoxia Inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain 2 Gene. *Mol Ther.* 16 (7) 1227-1234 (2008)
  12. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
  13. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)
  14. K. Sugisaki, T. Usui, N. Nishiyama, W-D Jang, Y. Yanagi, S. Yamagami, S. Amano, K. Kataoka, Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (3): 894-899 (2008)  
(和文) なし
2. 総説  
(欧文)
1. K. Itaka, K. Kataoka, Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, in press  
(和文)
1. 西山伸宏, 片岡一則: シスプラチン内包高分子ミセル, *MebioOncology* 5 (1) 49-57 (2008)
  2. 位高啓史, 片岡一則: 医療ナノテクノロジーから医療システムイノベーションへ、学術の動向 13 (9) 74-77 (2008)
  3. 位高啓史, 片岡一則: 高分子ナノミセル型キャリアのドラッグデリバリーシステムへの展開、臨床血液 49 (5) 287-293 (2008)
  4. 宮田完二郎, 片岡一則: DDS・遺伝子治療とナノテクノロジー、分子細胞治療 7 (1) 26-33 (2008)
3. 学会発表  
(国内学会)
1. 片岡一則, ナノバイオ・インテグレーションが拓く未来医療 ～高分子ミセル型ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, ナノ学会第6回大会, 九州大学医学部百年記念講堂、福岡, 2008.5.7, 基調講演
  2. 片岡一則, 遺伝子治療実用化に向けたインテリジェント超分子ナノデバイスの構築, 遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター、豊中市, 2008.5.9, 招待講演
  3. 片岡一則, 遺伝子治療実用化に向けた高分子ミセル型ナノデバイスの創製, 日本薬剤学会第23年会, 札幌コンベンションセンター、札幌市, 2008.5.22, 招待講演
  4. 片岡一則, Supramolecular Nanodevice Assembled from Smart Block Copolymers as Non-viral Gene Vector, 第14回日本遺伝子治療学会, 札幌医科大学、札幌, 2008.6.14, 招待講演
  5. 片岡一則, ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計, 第7回国際バイオフォーラム, 東京ビッグサイト、東京, 2008.7.4, 特別講演
  6. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション, 第24回日本 DDS 学会学術集会, 六本木ヒルズ、東京, 2008.6.29, 招待講演
  7. 片岡一則, ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計, 第7回国際バイオフォーラム, 東京ビッグサイト、東京, 2008.7.4, 特別講演
  8. 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー～ピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計～, 第57回高分子討論会, 大阪市立大学杉本キャンパス、大阪市, 2008.9.26, 招待講演
  9. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 「オミクス・ナノバイオ・機能性食品科学」講演会, 東京大学鉄門記念講堂、東京, 2008.10.3, 招待講演
  10. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション, 第170回フォトポリマー懇話会, 東京理科大学森戸記念館、東京, 2008.10.15, 招待講演
  11. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション, 創剤フォーラム第14回シンポジウム, グランドヒル市ヶ谷、東京, 2008.10.22, 招待講演
  12. 片岡一則, がん治療における高分子ミセル製剤の基礎, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場、名古屋市, 2008.10.29, 招待講演
  13. 片岡一則, Recent Progress in Drug and Gene Delivery Systems for Cancer Treatment, 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場、名古屋市, 2008.10.29,



招待講演

14. 片岡一則, 未来型 DDS に向けた高分子ナノキャリア設計, 日本 DDS 学会 水島裕先生・瀬崎仁先生追悼シンポジウム, 東京ガーデンパレス, 東京, 2008.11.5, 招待講演
15. 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー ~ピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計~, 信州大学線維学部セミナー, 信州大学線維学部、上田市、長野県, 2008.11.6, 招待講演
16. 片岡一則, ナノ治療イノベーションに向けた超分子ナノデバイス設計, 第3回耳鼻咽喉科臨床研修会, 東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科 医局、東京, 2008.11.20, 招待講演
17. 片岡一則, 高分子ミセル型超分子ナノデバイスによる遺伝子デリバリー, 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線 in 神戸 ~臨床応用に向けた課題と今後展開~, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター、神戸, 2008.12.8, 基調講演
18. 片岡一則, ドラッグデリバリーシステム開発の最前線 ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~, ヒューマンサイエンス振興財団 情報委員会講演会, (財)ヒューマンサイエンス振興財団会議室、東京, 2008.12.10, 招待講演 (国際学会)
1. K. Kataoka, Supramolecular Devices as Smart Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, Baeyer Lecture Hall, High-tech Campus, LMU Munich, Germany, 2008.6.20, 招待講演
2. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery, TERMIS-EU 2008, Alandega Congress Center, Porto, Portugal, 2008.6.24, 基調講演
3. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, The 42nd IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2008), Taipei International Convention Center, Taipei, ROC, 2008.7.2, 招待講演
4. K. Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery - Challenge to intracellular nanomedicine -, IUPAC 48th Microsymposium "Polymer Colloids: From Design to Biomedical and Industrial Applications", Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic, 2008.7.21, 基調講演
5. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation, NanoGagliato 2008, Gagliato, Italy, 2008.7.31, 招待講演
6. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, 8th International Biorelated Polymers Symposium - 236th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, USA, 2008.8.18, チュートリアル
7. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation -Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery-, ASMEW International Symposium, Waseda University, Tokyo, 2008.8.28, 招待講演
8. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery -Challenges to Intracellular Nanomedicine-, Gordon Research Conference "Biointerface Science", Aussois, France, 2008.9.17, 招待講演
9. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenges to Smart Molecular Therapy-, 4th STIPOMAT Conference, Lacanau, France, 2008.9.22, 招待講演
10. K. Kataoka, Supramolecular Assemblies from Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 8th France-Japan Drug Delivery Symposium, Cannes, France, 2008.10.7, 招待講演
11. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery - Challenge to Smart Molecular Therapy -, NanoDDS '08, University of Toronto, Toronto, Canada, 2008.10.19, 招待講演
12. K. Kataoka, Polymeric Micelles and Polymersomes from Polyamino Acid-based Block Copolymers -From Chemistry to Biomedical Application-, Macromolecular Colloquium at University of Bayreuth, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany, 2008.11.26, 招待講演
13. K. Kataoka, Multimolecular-Assembly of Smart Block Copolymers as Nanocarrier for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, LMU Munich, Germany, 2008.11.28, 招待講演
- G. 知的所有権の出願・取得状況
  1. 片岡一則、石井篤史、西山伸宏、加藤泰己、宮田完二郎、キム ヒョンジン、武元宏泰、非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願 2008-059886
  2. 片岡一則、LEE, Yan、宮田完二郎、大庭誠、電荷変換型三元系ポリブレックス、アメリカ (Provisional 出願) 61/126,077
  3. 片岡一則、ジャン ミンゼン、石井篤史、西山伸宏、松本悟、ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、PCT/JP2008/070154



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と  
脳腫瘍標的治療への展開  
(リガンド導入DACHPt内包高分子ミセルの構築)

分担研究者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 講師

研究要旨

本研究では、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を目的として、表面にcRDGペプチドや抗体フラグメントなどのリガンド分子を搭載したDACHPt内包ミセルの構築を目指している。本年度は、リガンド分子を導入するための末端に官能基を有するブロック共重合体の合成とDACHPt内包ミセルの調製を行い、それらの基本スキームを確立することができた。

A. 研究目的

近年、腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因するEPR効果を基盤とするがん標的治療型DDSの臨床での有効性が示されているものの、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍においては、血液-脳腫瘍関門(BTB)が存在するものと考えられており、EPR効果を超越したデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、オキサリプラチン活性体であるDACHPtを内包した高分子ミセルにペプチドや抗体フラグメントなどのリガンド分子を搭載し、がん組織の血管内皮細胞に特異的なトランスサイトシスを介して、血管内腔からがん組織への効率的な薬剤デリバリーを実現することを目指している。本年度は、リガンド分子を導入するための末端に官能基を有するブロック共重合体の合成とDACHPt内包ミセルの調製を行った。

B. 研究方法

1. 末端に官能基を有するPEG-P(Glu)ブロック共重合体の合成

(合成1) 官能基Xとヒドロキシル基を有する化合物にカリウムナフタレンを添加し活性化した後、テトラヒドロキシフラン(THF)中でエチレンオキシド(EO)を重合した。25℃で2日間反応させ、エーテル再沈後、ベンゼン凍結乾燥によって、 $\alpha$ 末端に官能基Xを有するX-PEG-OHを合成した。

(合成2) X-PEG-OHに、THF中トリエチルアミン存在下でメタンスルホニルクロライドを添加し、4時間反応させることによってメシル化を行い、エーテル再沈により精製後、25%アンモニア水溶液中で4日間反応させることによってX-PEG-NH<sub>2</sub>を合成した。

(合成3) X-PEG-NH<sub>2</sub>を開始剤として、ジメチルスルホキシド(DMSO)中で $\gamma$ -ベンジル-L-グルタメ

ート N-カルボン酸無水物(BLG)を重合することによって、X-PEG-PBLGブロック共重合体を合成した。

#### (合成4)

水酸化ナトリウム(NaOH)水溶液中でX-PEG-PBLGを脱保護することによって、目的とするX-PEG-P(Glu)を合成した。

### 2. 表面に官能基を有するDACHPt内包ミセルの調製

DACHPt nitrate錯体とX-PEG-P(Glu)をmili-Q水に溶解し、Glu残基とPtのモル比が1:1になるように混合した(DACHPt濃度 5mM)。この溶液を37℃で5日間反応させることによってDACHPt内包ミセルを調製した。調製したDACHPt内包ミセルの粒径分布は動的光散乱測定(DLS)によって評価した。

### C. 研究結果

#### 1. 末端に官能基を有するPEG-P(Glu)ブロック共重合体の合成

合成(1)においては、分子量が11,600(12k)および18,300(18k)のX-PEG-OHを合成した(収率85%以上)。得られたポリマーの分子量分布( $M_w/M_n$ )はそれぞれ1.02および1.03であった。次に、合成(2)においては-OH基がほぼ100%-NH<sub>2</sub>に変換され、収率90%以上であった。合成(3),(4)においては、P(Glu)の重合度が15のX-PEG-P(Glu)を合成することができた。得られたポリマーの  $M_w/M_n$ は1.1以下であった。

#### 2. 表面に官能基を有するDACHPt内包ミセルの調製

本研究において合成したX-PEG-P(Glu) 12k-15と末端にメトキシ基を有するMeO-PEG-P(Glu) 12k-20を1:1で混合し、DACHPtと5日間反応させることによって、34.9nmのDACHPt内包ミセルを調製することができた(図1)。

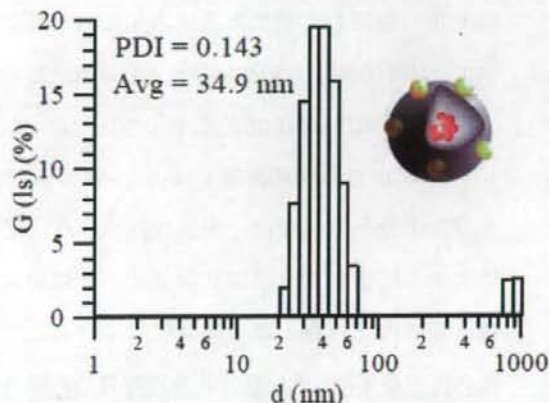


図1. 末端に官能基Xを有するDACHPt内包ミセル

### D. 考察

本研究では、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を実現するために、がん組織の血管内皮細胞に特異的なトランスサイトosisを介して、血管内腔からがん組織への効率的な薬剤デリバリーを可能にする高分子ミセルの構築を目指している。このためには、トランスサイトosisを誘起するペプチドや抗体および抗体フラグメントをミセル表面に導入する必要があり、本年度はそれらのリガンド分子を導入するための官能基Xを表面に有するDACHPt内包ミセルの構築を行った。ここで利用した官能基XはUV光の照射によって脱保護が可能のため、ミセル調製後にUV照射によって活性化し、ペプチドおよび抗体および抗体フラグメン



トを添加することによって、定量的かつ簡便にミセル表面にリガンド分子を導入することができる。また、ミセル表面のリガンドの密度は、リガンド分子の添加量およびX-PEG-P(Glu)とMeO-PEG-P(Glu)の混合比によって任意に調整することが可能であり、複数のリガンド分子と同時に添加することによってマルチリガンドを搭載したDACHPt内包ミセルの調製も可能である。本年度の成果に基づいて、H2Iは実際にリガンド分子の導入反応を行い、リガンド搭載DACHPt内包ミセルのin vitroおよびin vivoにおける機能評価を行っていく予定である。リガンド分子としては、トランスフェリン受容体に対する抗体および抗体フラグメントに加え、腫瘍血管の内皮細胞上に過剰発現していることが知られている $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチドを使用することを計画している。我々は、これまでの研究において、環状RGDペプチドを搭載したナノ粒子がカベオレ介在型エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを確認しており、環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルは腫瘍血管の内皮細胞に選択的に結合し、トランスサイトーシスによって血管内腔からがん組織へと移行することが期待される。

## E. 結論

本年度は、表面にペプチドや抗体および抗体フラグメントを導入するための官能基Xを有するX-PEG-P(Glu)ブロック共重合体の合成とDACHPt内包ミセルの調製を行い、それらの基本スキームを確立することができた。今後は、実際にリガンド分子を搭載したDACHPt内包ミセルの調製を行い、

そのin vitroおよびin vivoにおける機能評価を行っていく予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Improving multipotent differentiation efficiency of mesenchymal stem cells using 3D spheroids method on micropatterned substrates. *Biomaterials*, in press
2. S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules*, in press
3. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release* 133 (3) 245-251 (2009) [Selected as Cover Picture]
4. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharm. Res.* 26 (1) 82-92 (2009)
5. O. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide crosslinks directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
6. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)
7. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor tissue. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)
8. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N.

- Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive non-viral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)
9. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversional ternary polyplex with endosome disruption moiety: a new paradigm for the efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
  10. S. Wu, N. Nishiyama, M. R. Kano, Y. Morishita, K. Miyazono, K. Itaka, U. Chung, K. Kataoka, Enhancement of angiogenesis through stabilization of hypoxia inducible factor-1 by silencing prolyl hydroxylase domain 2 gene. *Mol. Ther.*, 16 (7) 1227-1234 (2008)
  11. K. Sugisaki, T. Usui, N. Nishiyama, W.-D. Jang, Y. Yanagi, S. Yamagami, S. Amano, K. Kataoka, Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (3) 894-899 (2008)
2. 総説
1. N. Nishiyama, Y. Morimoto, W.-D. Jang, K. Kataoka, Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, in press
  2. 西山伸宏, 片岡一則 シスプラチン内包高分子ミセル *MebioOncology*, 5(1): 49-57 (2008)
  3. 西山伸宏, 片岡一則 第4章 機能性 DDS キャリアの応用・実用化研究 9. 光応答型 DDS 機能性 DDS キャリア製剤設計(編集 岡田弘晃), CMC 出版 (東京), 269-278 (2008)
  4. 西山伸宏, 片岡一則 II 章 5. ナノテクノロジーを利用した DDS 癌の分子標的治療(編集 鶴尾隆), 南山堂, 28-34 (2008)
  5. 西山伸宏, 片岡一則 Key words: Drug Delivery System カレントセラピー, 26(5): 80-81 (2008)
  6. 西山伸宏, 片岡一則 人工ウイルスの実現に向けた高分子ミセル型ベクターの設計 *細胞工芸学*, 27(1): 56-61 (2008)
3. 学会発表
1. 西山伸宏, "光線力学治療のための dendrimer 型光増感剤内包高分子ミセルの開発", 光・量子デバイス研究会, 理化学研究所 鈴木梅太郎ホール, 和光市 2009 年 2 月 14 日(教育講演)(予定)
  2. 西山伸宏, "環境応答性キャリアの設計・光応答性キャリアの設計", NEDO 講座「刺激応答システム」講座, 東京女子医科大学, 東京 2008 年 12 月 18 日(特別講義)
  3. 西山伸宏, "光を利用したドラッグデリバリーシステムの開発", 第 29 回日本レーザー医学会総会, 東京工科大学 八王子キャンパス, 東京 2008 年 11 月 15 日(依頼講演)
  4. 西山伸宏, 松本悟, 宮田完二郎, 武元宏泰, クリストフェー・ジェームス, 大庭誠, 山崎裕一, 片岡一則, "PEG-ポリカチオンブロック共重合体と siRNA による超分子組織体形成とその機能特性", 第 57 回高分子討論会, 大阪市立大学, 大阪 2008 年 9 月 25 日(口頭)
  5. 西山伸宏, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 宮崎幸造, 浦野京子, 張祐銅, Lai Ping-Shan, 守本祐司, 片岡一則, "空間構造を規制した超分子集合体の細胞内動態制御に基づく革新的光力学治療", 第 57 回高分子討論会, 大阪市立大学, 大阪 2008 年 9 月 24 日(口頭)
  6. 西山伸宏, "ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", バイオメディカルカリキュラム講義, 東京女子医科大学, 東京 2008 年 9 月 18 日(特別講義)
  7. N. Nishiyama, "Development of smart nanocarriers based on block copolymer assemblies", CNSI-CNBI Symposium on NanoBiotechnology, Iron Gate Memorial Hall, The University of Tokyo, September 9, 2008 (Invited Lecture)
  8. 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを利用した DDS の開発", DDS 講座, 星薬科大学, 東京 2008 年 7 月 17 日(特別講義)
  9. 西山伸宏, 片岡一則, "高分子集合体を基盤とした遺伝子・siRNA デリバリーシステムの創製", 第 24 回日本 DDS 学会学術総会, 六本木アカデミーヒルズ, 東京 2008 年 6 月 29 日(招待講演)
  10. 西山伸宏, "光を利用したドラッグデリバリーシステム", 第 5 回バイオメディカルフォトリクス先端技術調査委員会, 島津製作所 本社・三条工場, 京都 2008 年 6 月 16 日
  11. 西山伸宏, "革新的 DDS と光ファイバー技術を融合した光線力学治療システムの技術開発", 第 47 回日本生体医工学会大会 NEDO ワークショップ「次世代 DDS 型治療システムへの期待と課題」, 神戸国際会議場, 神戸 2008 年 5 月 8 日
  12. 西山伸宏, "医工連携による革新的な DDS の創出", バイオ・ナノテクフォーラム イブニングセミナー 第一回 テーマ「ナノテクノロジーを活用する薬物・遺伝子送達技術の最前線」, 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, 東京 2008 年 4 月 17 日(招待講演)
  13. N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of functional drug delivery system based on polymer assemblies", 10th European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD), Noordwijk aan Zee, The Netherlands, April 2, 2008 (Invited Lecture)



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 西山伸宏、片岡一則、石井篤史、加藤泰己、宮田完二郎、キム ヒョンジン、武元宏泰、非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願 2008-059886
2. 西山伸宏、片岡一則、ジャン ミンゼン、石井篤史、松本悟、ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウム<sub>2</sub>の有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、PCT/JP2008/070154

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と  
脳腫瘍標的治療への展開  
（マウス脳腫瘍モデルの構築とDACHPt内包ミセルのin vivo機能評価）

分担研究者 稲生 靖

東京大学医学部附属病院 トランスレーショナルリサーチセンター（脳神経外科）特任准教授

研究要旨

悪性脳腫瘍は、機能温存のため外科的切除による治癒は通常不可能であり、放射線治療や化学療法にも抵抗性で難治性である。本研究では、血液-脳関門または血液-腫瘍関門を選択的かつ効率的に通過し、薬剤を標的腫瘍内に集積させるキャリアとしてのミセル製剤の開発と実用化を目指す。本年度はマウス脳腫瘍モデルにおける腫瘍血管構築の分子病理学的解析と、蛍光標識ミセルの集積性の評価を行なった。

A. 研究目的

本研究では、研究代表者片岡らが開発し、すでに複数の固形癌に対して動物実験モデルにおける集積性と有効性が示されている高分子ミセル化化学療法剤（抗癌剤）について、(1)悪性脳腫瘍の治療に対しても効率的なドラッグデリバリーシステムであることを検証すること、(2) 血液-脳関門または血液-腫瘍関門のためにミセル化薬剤の腫瘍への到達効率が低下している場合には、その分子病理学的機構を明らかにし、(3)関門を通過して有効な腫瘍到達を得るために最適な機能性ミセルの開発を行なうこと、を目的とする。分担研究者は主にマウスモデルにおいて、これらを検証することを目的に本年度の研究を実施した。

B. 研究方法および結果

1. マウス脳腫瘍モデルの作製

ヒトの悪性神経膠腫の血管構築および周辺正常脳組織への浸潤性を再現できるマウスモデルとしては、腫瘍が自然発生するトランスジェニックマウスのモデルも存在する。しかしながら、腫瘍発生までに数ヶ月飼育観察する必要があること、腫瘍発生率が低く腫瘍の有無をMRIなどで確認しつつ実験に供する必要があることから実用性低い。そこで今回は汎用されている腫瘍細胞株の脳内移植モデルを使用した。移植後の腫瘍血管の新生には間質組織の反応も重要と考えられることから、免疫機能が正常である同系マウスの腫瘍モデルのなかで脳内移植が可能であることが知られているA/Jマウス由来の細胞株Neuro2a(neuroblastoma)とB10.Aマウス由来の細胞株SR-B10.A(glioblastoma)を用いることとした。また、使用可能な細胞株の種類がより多い、ヒト由来の細胞株のヌードマウス移植モデルも試みることに



し、U87MG(glioblastoma)を使用した。

A/Jマウスは今回使用するoxaliplatinの毒性が強く、低容量で死亡することが予備実験段階で判明したため、今回Neuro2a細胞株は除外した。SR-B10.AとU87MGに関してはそれぞれ対応するマウス脳内への定位的移植によりほぼ100%の確実性で腫瘍の生着が得られた。無治療群の平均生存期間(予備実験で確認)の時点で、分担研究者西山らにより調整されたAlexa内包蛍光標識DACHPtミセルを担癌マウスに投与し、投与後24時間後および48時間後に腫瘍を摘出し、凍結切片作製用に包埋した。分担研究者狩野の研究室に試料を送付し、以後の解析を依頼した。なお、陽性対照として肝への取り込みを評価した。

## 2. 蛍光標識DACHPt内包ミセルの脳腫瘍モデルへの取り込み

前述のモデルにおいて、肝および皮下腫瘍への取り込みの程度および推移から、投与後24時間後の評価が有益と判断し、以後はこのタイミングで試料の採取を行った。腫瘍内においては、いずれのモデルでも腫瘍の辺縁部に若干の蛍光ミセルの取り込みが見られる程度であった。腫瘍全体の中のPtの量にて評価を行なった以前の報告では、正常脳組織に比し有意にDACHPtミセルの腫瘍内への取り込みは高かったが、本手法によりそれは腫瘍辺縁部に局限していることが明らかにされた。腫瘍構築血管の透過性改善のため、分担研究者狩野らの開発したTGF $\beta$ 阻害剤による血管透過性修飾の併用を行なった。その併用効果および腫瘍血管構築の指標となる分子病理学的指標の解析は、分担研究者狩野のところへ試料を送付し解析中である。

ある。

## 3. *in vivo*での抗腫瘍効果

DACHPtミセルそのものの*in vivo*での抗腫瘍効果の確認のため、SR-B10.A細胞の皮下腫瘍での効果確認を行なった。B10.Aマウスの皮下にSR-B10.A細胞を接種し、DACHPtミセルおよび対応する薬剤(oxaliplatin)の3日ごと4回投与スケジュールでの治療実験を行った。B10.Aに対しての毒性は軽度で、体重減少をほとんど見ることなく治療効果を得ることができた(図1)。皮下腫瘍モデルにおいてはoxaliplatinそのものの効果も優れていたため、DACHPtミセルはこの皮下腫瘍治療モデルにおいてはoxaliplatinと同等に有効であるとの結果となった。

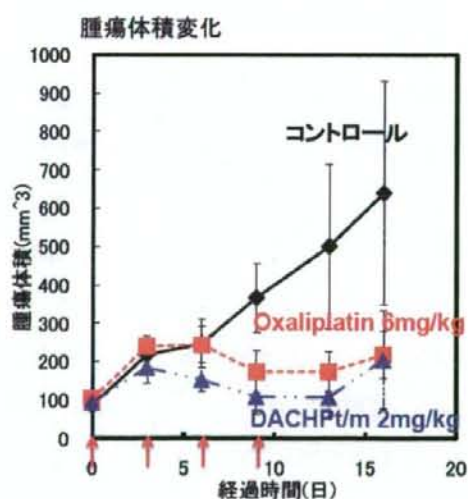


図1. SR-B10.A細胞の皮下腫瘍に対するOxaliplatinおよびDACHPt内包ミセルの制がん活性

## C. まとめ

本年度は、複数のマウス脳腫瘍モデルにおいて、腫瘍内へのミセル化薬剤の到達性の評価を行い、

また血管構築の分子病理学的検討にも取り組んだ。  
従来型のミセルでは脳腫瘍内への有効な到達を得ること困難であることが示され、本研究のモデルとして評価に適切であることが示唆された。次年度はこの系を用い、機能的ミセルの有効性を試す。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Koga T, Morita A, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, *et al.*

Long-term control of disseminated pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features by means of stereotactic irradiation. *Neuro Oncol.* 2009 (in press)



血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と脳腫瘍標的治療への展開  
（マウス脳腫瘍モデルの組織学的評価）

研究分担者 狩野 光伸 東京大学大学院医学系研究科 講師

#### 研究要旨

EPR効果を利用した従来のDDS治療薬の癌への集積は、癌組織によって異なるため、集積効果が著しく低下する癌では十分な効果を得られない。脳腫瘍は、従来のDDS治療薬の効果が低い癌であり、Blood Tumor Barrier (BTB)の存在も疑われる。本研究では、脳腫瘍血管構築の特異性を明らかにしながら、血管内皮細胞のトランスサイトosisによるミセル型DDSの高い集積性を利用し、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指す。本年度は同所移植による腫瘍モデルの構築と解析、およびヒト病理標本を用いた脳腫瘍血管構築の解析を開始した。

#### A. 研究目的

脳腫瘍はBlood Tumor Barrierの存在が疑われ、従来のDDS治療薬の効果が低い癌である。一般に、EPR効果を利用した従来のDDS治療薬の癌への集積は、癌組織によって異なるため、集積効果が著しく低下する癌では十分な効果を得られない。本研究は、脳腫瘍血管の構築を明らかにしながら、最終的には血管内皮細胞のトランスサイトosisによるミセル型DDSの高い集積性を利用し、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指す。

#### B. 研究方法

実際のヒト脳腫瘍標本における血管構築を免疫染色により検討することで、まず現在用いられているモデルの妥当性を検討した。また、脳腫瘍動物モデルに対してこのように構築された薬剤を投与し、組織標本化した上で薬剤分布を確認した。この目的には、主任研究者らにより開発された蛍光標識ミセルを投与して腫瘍組織内での分布を解析し、癌組織深部に対するミセルの到達度を検証した。また脳腫瘍モデルにおける腫瘍血管関連因子の免疫染色と薬剤分布の比較などを行い、DDSの集積の機序と血管構造の関連を明らかにした。

#### （倫理面への配慮）

この研究で行なう予定の遺伝子組換え実験は平成20年10月21日の東京大学医学部組み換えDNA実験安全委員会において承認を受けた医学部分子病理学教室の「TGF- $\beta$ シグナルの機能解析などを目的としたプラスミド・アデノウィルス・レトロウィルス・レンチウィルスの培養細胞および遺伝子改変マウス等への導入実験」に含まれており、適切な拡散防止措置が取られた。また、動物実験は東京大学動物実験

実施規則に則って動物愛護の観点から適切に行った。また、本研究で用いられるヒト病理検体はすべて研究開始前に人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性及ぶことはない。しかし、人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針に基づき、本学倫理委員会の承認を得た。また、成果発表等の際には個人を特定できないよう最大限の配慮をした。本研究計画ではヒトES細胞を用いる予定はない。

#### C. 研究結果

従来の投薬治療を妨げていると言われる血液脳関門・血液腫瘍関門に重点を置き解析を行った。マウスにおける腫瘍モデルとしては、同じく研究分担者である稲生らにより樹立されたマウスのグリオーマ（astrocyteの癌化細胞）同所移植モデルに関して、我々はこれを免疫組織化学的に解析した。使用した細胞はSR-B10A細胞株で、B10.Aマウスの脳内へ同種同所移植をしたモデルである。まず、通常の血管の透過性に関係するtight junction分子や血液脳関門に寄与する分子と言われているZO-1 (Zona occludens 1 protein/tight junction protein 1)、VE-CAD (Vascular Endothelial Cadherin/Cadherin-5)、CLDN-5 (Claudin-5)、OCLN(Ocludin)、もしくは血液脳関門のマーカーとなるといわれている分子であるGLUT-1 (glucose transporter type 1/Slc2a1/solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1)、ミセルのtranscytosisを介した輸送を考慮してcaveolaeの構成タンパクであるCAV-1 (Caveolin-1)、グリオーマのマーカーとしてastrocyteのマーカーであるGF



AP (glial glucose transporter type 1 fibrillary acidic protein) に関する免疫染色を行い、脳の正常血管とグリオーマモデル中で新生した血管を比較した。解析の結果、血管におけるtight junction分子の発現に関しては正常部分とグリオーマ部分での顕著な違いは見られなかった。しかし同所移植されたSR-B10A細胞はGFAP陽性ながら、正常astrocyteと違い、形態が球状であることが確認された。また血液脳関門マーカーの1つ、Glut-1の分布に関してはグリオーマ内部において異なることが見出され、正常部分に比べグリオーマ内部の血管にはGlut-1の発現は低いことがわかった。さらに研究協力者の西原(北海道大学大学院医学研究科探索病理学)らにより、ヒトのastrocytoma系の脳腫瘍内部の血管は厚いpericyteで覆われているのが特徴であり、またoligodendrocytoma系の脳腫瘍では細い血管が特徴であることが今回新たに見出された。この知見とマウスモデルを比較するために、血管を構成する血管内皮細胞のマーカーであるPECAM-1 (CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule-1)、血管壁細胞(以下pericyte)のマーカーである $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin)の免疫染色も行った。結果、マウスグリオーマSR-B10A細胞はastrocytoma系細胞株にもかかわらず、新生血管には厚いpericyteは存在せず、よりoligodendrocytoma系の脳腫瘍の血管に近いものである事がわかった。本研究では引き続きこのグリオーマ同所モデルを使用していく予定であるが、上記の知見からも、このマウスモデルと比較して、ヒトのastrocytoma系腫瘍に対しての治療は一層の困難さを伴う事が予測される。このため、今後もよりヒトのastrocytomaに近いモデルの確立を同時に検討していく事になった。また、血管透過性に関して今後も解析する分子等を追加し、蛍光ミセルの投与と平行してより詳細な検討をしていく予定である。

次に、実際に30nmの蛍光ラベルしたDACHPt内包ミセル(DACHPt/m Alexa680)を投与し、その組織への蓄積分布を組織学的に解析した。蛍光ミセルを脳腫瘍モデルマウス(グリオーマ細胞株を同所移植し6日経過したもの)の尾静脈内に投与し、投与後24時間、48時間で脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し(モデル作製、投与から摘出は分担研究者稲生らが行った)、蛍光ミセルの各臓器への蓄積を解析した。このモデルに投与した蛍光ラベルDACHPt内包ミセルは肝臓、脾臓などに多く集積しているが、グリオーマ腫瘍内には集積していなかった。このことから脳腫瘍内の血管には正常部分と同程度の血液脳関門機能があることがうかがわれた。

また、本研究のミセル型DDSの血液脳関門透過への効果のみならず、あらゆる癌への普遍的な透過効果、脳に対するコントロール実験としての検討、さらに使用しているSR-B10A細胞の皮下での血管

形成能解析を目的として、同じSR-B10A細胞株を皮下に移植した皮下腫瘍を作製した。これら皮下腫瘍に関して免疫染色によって組織学的に解析した結果、脳の正常部分・腫瘍部分で陽性であったCLDN-5、ZO-1は、皮下腫瘍では陰性であった。

前述した様に、グリオーマ同所接種マウスへの蛍光ミセル尾静脈投与と実験の解析により、蛍光ミセルの血液脳関門透過は困難である事がわかり、透過性を向上させる試みが必要になった。

ここで、我々がこれまでに報告した(Kano et al., PNAS 2007, Cancer Sci. 2009)ように、血管透過性を向上させるために投薬時にTgf $\beta$  inhibitorを同時投与する手法がある。この原理は、TGF- $\beta$ シグナル阻害により血管を覆うpericyteを減らしjunctionを緩めることで、血管の物質透過性を増強させるというものである。阻害剤としてはTGF- $\beta$ 受容体(A LK5, TGF- $\beta$  type I receptor kinase)の阻害剤を用いている。正常血管では上記のような効果が見られず、腫瘍でのみその効果が認められる原因としては、腫瘍においては血管の新生が活発でTGF- $\beta$ リガンドの分泌が多く、これらの効果に対してより感受性があるためではないかと考えられるが、詳細は明らかにされていない。この手法により蛍光ミセルのグリオーマ内部の血液脳関門に対する透過性を向上させるかに関して検討する実験を行った。グリオーマ同所モデル、同グリオーマ株皮下接種モデルに対し、蛍光ミセルのみ、もしくは蛍光ミセルとTGF- $\beta$  inhibitorの同時投与を行った。投与から24時間後、脳、皮下腫瘍、肝臓を摘出し解析を行った(モデル作製、投与から摘出は稲生らにより分担実験)。肝臓においては、同所移植・皮下移植モデルともに、蛍光ミセルの分布がTGF- $\beta$  inhibitor投与時・非投与時ともに確認された。皮下腫瘍内部でもTGF- $\beta$  inhibitor投与時・非投与時ともに同様に蛍光はみられた。しかしグリオーマ脳腫瘍内部においては、TGF- $\beta$  inhibitor非投与時では全く蛍光は確認できなかった。ところがTGF- $\beta$  inhibitor投与時においては、蛍光ミセルの分布が確認できた。これらの結果から、血液脳関門においても、TGF- $\beta$  inhibitorの併用による血管透過性向上効果があることが、示唆された。TGF- $\beta$  inhibitorの併用は今後のミセル投与実験にも有益であるが、グリオーマ脳腫瘍内部において蛍光ミセルの分布が少量であったことが観察されたため、さらにTGF- $\beta$  inhibitorの投与量を高めた実験、もしくは血管透過性を向上させる更なる手法が必要になるとと思われる。

#### D. 考察

本研究のために樹立したSRB10A細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルは、同所モデルで特にヒトグリオブラストーマにおける血管構築に近い構造を呈することが考えられた。しかし皮下モデルでは、いかに脳腫



瘍細胞を用いていたとしても、血管構築やナノ粒子の蓄積の面から、脳腫瘍のモデルとしては充分でないことが考えられた。

## E. 結論

今年度の研究により、マウスにおける脳腫瘍モデルの樹立が行われ、このモデルを用いた研究結果の応用範囲が、ヒト脳腫瘍の血管構築の解析により明らかにされ始めた。本研究において樹立した同所脳腫瘍モデルにおいて、TGF $\beta$ 阻害剤併用の有効性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

M. Oka, C. Iwata, H. I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M. R. Kano, and K. Miyazono. Inhibition of endogenous TGF- $\beta$  signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood*. 111(9):4571-9 (2008)

Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Sep;28(9):1634-9.

Wu S, Nishiyama N, Kano MR, Morishita Y, Miyazono K, Itaka K, Chung UI, Kataoka K. Enhancement of Angiogenesis Through Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain-2 Gene. *Mol Ther*. 16(7):1227-34 (2008)

Miyata K, Oba M, Kano MR, Fukushima S, Vachutinsky Y, Han M, Koyama H, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polyplex Micelles from Triblock Copolymers Composed of Tandemly Aligned Segments with Biocompatible, Endosomal Escaping, and DNA-Condensing Functions for Systemic Gene Delivery to Pancreatic Tumor Tissue. *Pharm Res*. 25(12):2924-36 (2008)

Kano MR, Komuta Y, Iwata C, Oka M, Shirai Y, Morishita Y, Ouchi Y, Kataoka K, Miyazono K. Comparison of the effects of the kinase inhibitors, Imatinib, Sorafenib, and TGF- $\beta$  receptor inhibitor, on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci*. 100(1):173-80 (2009)

Komuro A, Yashiro M, Iwata C, Morishita Y, Johansson E, Matsumoto Y, Watanabe A, Aburatani H, Miyoshi H, Kiyono K, Shirai Y, Suzuki HI, Hirakawa K, Kano MR, Miyazono K. Diffuse-type Gastric Carcinoma: Progression, Angiogenesis, and Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *J Natl Cancer Inst*, in press (2009)

狩野光伸・宮園浩平 血管におけるTGF- $\beta$ ファミリーシグナル 医学のあゆみ2008:223(12); 1037-1042

狩野光伸 腫瘍発育、血管新生、治療反応性への動脈硬化と血管老化の影響 分子細胞治療2008:7(1)79-80

狩野光伸・宮園浩平 EMT制御と分子標的薬 実験医学2009:27(5)653-660

## 2. 学会発表

狩野光伸、西原広史、岩田要、片岡一則、宮園浩平、「腫瘍血管新生制御が薬剤送達に影響を与える際の組織学的要因の解明」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日

古室暁義、岩田要、岡雅子、森下保幸、八代正和、平川弘聖、狩野光伸、宮園浩平、「スキルス胃癌の増殖・進展におけるTGF- $\beta$ の役割」、日本病理学会、金沢、2008年5月16日

狩野光伸、「ナノ粒子を使って難治がんを治すには?—医学研究との接点」、ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム、三島、2008年6月12~13日  
Kano, MR. Manipulation of TGF- $\beta$  signaling for cancer treatment. 28th Sapporo Cancer Seminar International Symposium. 2008年6月26-27日

狩野光伸、西原広史、西山伸宏、片岡一則、宮園浩平、「難治性固形腫瘍に対するナノDDS治療の実現化」、日本DDS学会、東京、2008年6月30日

狩野光伸、「難治性固形癌における腫瘍血管構築と治療応用」、Vascular Biology Innovation Conference、東京、2008年8月23~24日

狩野光伸、「「難治」癌を治すにはどうしたらよいか」、聖路加国際病院内科フォーラム、東京、2008年8月29日

狩野光伸、「ナノDDSで難治癌を治療する」、分子情報生命科学スクーリング2008:文部科学省「キーテクノロジー研究開発の推進(ナノテクノロジー・材料を中心とした融合新興分野研究開発)」生命分子の集合原理に基づく分子情報の科学研究ネットワーク拠点、和光(理化学研究所)、2008年9月29~30日  
Kano, MR., Optimal manipulation of tumor vasculature for treatment of intractable solid tumors using nanoparticles. 日本癌学会総会、名古屋、2008年10月28~30日

狩野光伸「固形癌の血管構築と薬剤送達」、放射線医学総合研究所分子病態イメージング研究グループ講演会、千葉、2008年12月10日

狩野光伸「難治性固形癌の血管構築解析と治療法の開拓」、北海道大学 探索病理学講座セミナー(第1回)・腫瘍病理学分野セミナー(第3回)・口腔病態学講座・病理病態学分野セミナー・大学院歯学研究科セミナー、札幌、2009年2月2日

狩野光伸「脈管制御を応用した難治がん治療法の開拓」第7回次世代バイオマテリアル研究会、東京、2009年3月9日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

片岡一則、熊谷康顕、狩野光伸、関野正樹、松浦哲也、宮園浩平、西山伸宏、腫瘍撮像用MRI造影剤、特開2008-28027

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 雑誌

| 発表者氏名                                  | 論文タイトル名  | 発表誌名                      | 巻号  | ページ       | 出版年  |
|--|--|---------------------------|-----|-----------|------|
| Y. Lee,<br>K. Kataoka,<br>et al.       | Charge conversional<br>PIC micelles-an efficient<br>protein nanocarrier into<br>cytoplasm.   | Angew. Chem.,<br>Int. Ed. |     | 印刷中       | 2009 |
| S. Matsumoto,<br>K. Kataoka,<br>et al. | Environment-responsive<br>block copolymer micelles<br>with a disulfide<br>cross-linked core for<br>enhanced siRNA<br>delivery.   | Biomacromole<br>cules     | 10  | 119-127   | 2009 |
| N. Nishiyama,<br>K. Kataoka,<br>et al. | Enhanced photodynamic<br>cancer treatment by<br>supramolecular<br>nanocarriers charged with<br>dendrimer<br>phthalocyanine.  | J. Control.<br>Release    | 133 | 245-251   | 2009 |
| H. Cabral,<br>K. Kataoka,<br>et al.    | A photo-activated<br>targeting chemotherapy<br>using glutathione<br>sensitive camptothecin-<br>loaded polymeric<br>micelles.   | Pharm. Res.               | 26  | 82-92     | 2009 |
| M. Oba,<br>K. Kataoka,<br>et al.       | Polyplex micelles with<br>cyclic RGD peptide<br>ligands and disulfide<br>cross-links directing to<br>the enhanced transfection<br>via controlled<br>intracellular trafficking.   | Mol. Pharm.               | 5   | 1080-1092 | 2008 |
| K. Miyata,<br>K. Kataoka,<br>et al.    | Polyplex micelles from<br>triblock copolymers<br>composed of tandemly<br>aligned segments with<br>biocompatible,<br>endosomal escaping, and<br>DNA-condensing<br>functions for systemic<br>gene delivery to<br>pancreatic tumor. | Pharm. Res.               | 25  | 2924-2936 | 2008 |