

200912019A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 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 (片岡 一則)	1
---	---

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 (西山 伸宏)	7
2. マウス脳腫瘍モデルの構築と DACHPt 内包ミセルの <i>in vivo</i> 機能評価 (稲生 靖)	12
3. マウス脳腫瘍モデルの組織学的評価 (狩野 光伸)	15
4. ヒト脳腫瘍組織の分子病理学的検討 (西原 広史)	19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	24
-----------------	----

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成22（2010）年 5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）
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(glioblastoma)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制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。本年度は、マウスglioblastomaモデルにおいて、DACHPt内包ミセルの血管内腔からがん組織への移行性を高めるための治療戦略としてTGF- β 阻害剤の併用効果の可能性について検討を行った。その結果、臨床検体とモデルの両者においてTGF- β シグナルが活性化しており、TGF- β 阻害剤の併用によりミセルのがん集積性が向上することが確認された。また、トランスサイトosisの利用によるがん組織への能動輸送を目指したシステムとして、環状RGDペプチドをリガンド分子として搭載したDACHPt内包ミセルを開発した。さらに、開発した高分子ミセルの血管内腔からがん組織への移行性を評価するためのin vitroモデルの構築を行った。

A. 研究目的

膠芽腫(glioblastoma, GBM)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開発する高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めることを目的として、腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることのできる薬剤の併用や腫瘍血管内皮細胞特異的にトランスサイトosisを誘起するリガンド分子のミセル表面への導入に基づく新規治療戦略の開発を目指している。

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・稲生が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・狩野がDDSの有効性検証のための組織学的評価を行った。さらに、北大院・医学系研究科病理学

・西原が実際のヒト手術検体標本の解析を行い、モデルの妥当性の検討を行った。

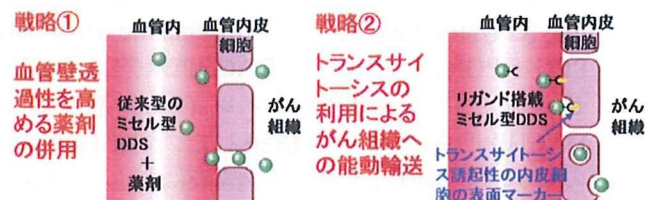


図1. マウスGBMモデルへの高分子ミセル型DDSのデリバリー戦略

B. 研究方法

1. ヒトグリオーマの病理検体における腫瘍血管の解析

本項目では、実際のヒトの腫瘍病理標本における血管構築を免疫染色により検討した。具体的には、比較的抗がん剤への感受性があり予後が良好とされているOligodendrocytomaと、抗がん剤への感受性が低く予後も不良であるAstrocytomaの血管パターンの比較を行った。用いた検体は、北大院・医学系研究科病理学教室において過去に診断がなされた脳腫瘍病理標本20例を用い、CD34(血管内皮マーカー)、 α -Smooth Muscle Actin(SMA)、Desmin(血管壁細胞マーカー)、phospho-Smad2(TGF- β シグナル)の免疫染色を行った。(倫理面への配慮)

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・危険性が及ぶことはない。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の下に研究を遂行する。同時に、これらの研究活動を北大院・医学系研究科病理学教室のホームページに公表し、もし患者から自身の検体の使用停止の申し入れがあった場合には速やかにその検体の使用を中止することとしている。また、成果発表等の際には個人を特定できないよう最大の配慮をした。

2. マウスGBMモデルの解析とTGF- β 阻害剤の併用効果の検証

前年度に確立したマウス glioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルに関して、本年度は、p-Smad2の免疫染色を行った。その結果、血管内皮細胞においてp-Smad2の発現が認められた為に、TGF- β 阻害剤を同時に投与した時の30nmの蛍光(Alexa680)標識DACHPt内包ミセルの24時間後のがん組織への集積を組織切片の蛍光顕微鏡観察により評価した。

3. 環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの開発

本項目では、ペプチドや抗体等のリガンド分子を導入するために、マレイミド基導入 poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-glutamic acid) (MAL-PEG-*b*-PGlu)を合成し、DACHPt水溶液を反応させることにより表面にマレイミド基を有するDACHPt内包ミセルを構築した。cRGDリガンドの導入は、調製したミセル溶液に対し、マレイミド基に対して2倍モル量のN末端にCysを有するcRGDリガンドを加え、37°Cで24時間反応させることにより行った。調製したcRGD導入DACHPt内包ミセルの機能評価は、蛍光相関分光法(FCS)による蛍光ラベル化インテグリンとの相互作用の解析と培養がん細胞に対する細胞毒性評価により行った。がん細胞としては、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現している乳がん細胞MDA-MB-435S細胞と $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現量の少ないヒト肝がんHuH-7細胞を使用し、末端にリガンド分子を導入してないミセルとの細胞毒性の比較を行った。

4. DDSのBTB透過能評価のためのin vitroモデルの構築

in vitroにおけるBTBモデルとして、トランスウェルの外側(裏側)に周皮細胞を培養し、その4日後にトランスウェルの内側(上側)にマウス脳微小血管内皮細胞(BMEC)を培養し、さらにその1日後にdish上で正常アストロサイトおよびアストロサイトーマ細胞を培養した(図2)。このようにして

構築したBTBモデルの機能に関して、Trans Epithelial Electric Resistance (TEER)の測定を行った。

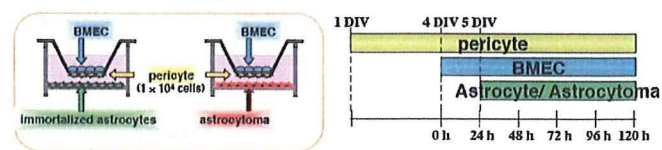


図2. トランスウェルを利用したin vitro BTBモデルの構築

C. 研究結果

1. ヒトグリオーマの病理検体における腫瘍血管の解析

ヒトの腫瘍病理標本における血管構築の観察を行った結果、Oligodendrocytomaの病理標本においてChicken wire vascular networkと呼ばれる細い血管網の発達が見られ、Astrocytomaの病理標本においてGBMに特徴的な肥厚したGlomeruloid vesselが確認された。さらに免疫染色を行った結果、Chicken wire血管は、CD34陽性の一層の内皮細胞がPDGFR- β 陽性、SMA陰性の一層の周皮細胞で覆われた血管構造を有しており、Glomeruloid vesselは、CD34陽性の一層の内皮細胞がSMA陽性、Desmin陰性の肥厚した周皮細胞で覆われた血管構造を有することが確認された。以上の結果より、OligodendrocytomaとAstrocytomaの腫瘍血管には、周皮細胞の量の違いと同時にSMAの染色性という質的な違いが存在することが確認された。また、p-Smad2の免疫染色においては、Glomeruloid vesselにおいてTGF- β シグナルが活性化していることも確認された。一方、GBMの予後に関して血管構築による分類を行った結果、肥厚血管が多く見られる症例では予後が不良となることが判明した。これは腫瘍血管の構築が治療抵抗性因子の一つとなっていることを示唆しているものと思われる。

2. マウスGBMモデルの解析とTGF- β 阻害剤の併用効果の検証

前年度に確立したマウス glioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルに関して、p-Smad2の免疫染色を行った結果、正常脳血管の内皮細胞はp-Smad2陰性であったが、脳腫瘍血管の内皮細胞はp-Smad2陽性であった(図3)。この結果より、TGF- β 阻害剤は、脳腫瘍血管に選択的に作用し、血管透過性を変化させる可能性が考えられたため、30nmの蛍光標識DACHPt内包ミセルとTGF- β 阻害剤を同時にSR-B10.A同所移植モデルマウスに投与し、ミセルのがん組織への集積を蛍光顕微鏡観察により観察した。その結果、前年度に確認されたように、当該モデルにおけるDACHPt内包ミセルのがん組織集積性は非常に低いことが確認されたが、本年度の結果では、TGF- β 阻害剤の併

用によって、蛍光標識DACHPt内包ミセルががん組織に集積することが確認された(図4)。

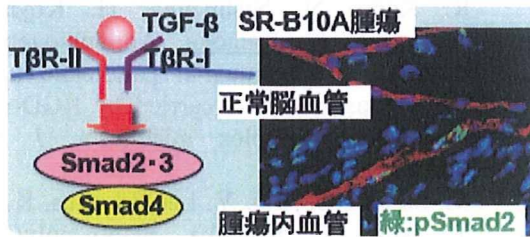


図3. マウスglioblastoma SR-B10. A同所移植モデルにおける活性化TGF-βシグナル(p-Smad2)の検出

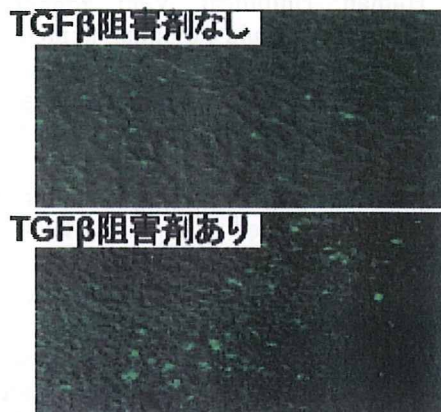


図4. SR-B10. A同所移植モデルにおける蛍光標識DACHPt内包ミセルのがん組織への集積 (i. v. 投与24時間後)

3. 環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの開発

はじめに、 N_3 -PEG-NH₂を開始剤する γ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxy anhydride (BLG-NCA)の開環重合によりアジド基を有する新規ブロック共重合体 N_3 -PEG-*b*-Gluを合成し、 α 末端の官能基変換を経てマレイミド基を導入した。得られた新規ブロック共重合体を用いて表面にマレイミド基を有するDACHPt内包ミセルを調製した結果、表面に官能基を導入していないミセルとほぼ同等の粒径および粒径分布を有する高分子ミセルの調製が可能であった。次に、N末端にCysを有するcRGDを反応させることによって調製したcRGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの相互作用をFCSにより評価した結果、拡散時間の増加が認められ、ミセル表面のcRGDペプチドと $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの相互作用が示唆された。さらに、MDA-MB-435S細胞およびHuH-7細胞に対するDACHPt内包ミセルの細胞毒性を評価した結果、リガンドを導入していないDACHPt内包ミセルの細胞毒性に関してはMDA-MB-435S細胞とHuH-7細胞の間に有意な差は見られなかったが、cRGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの細胞毒性に関してはMDA-MB-435S細胞に対してHuH-7細胞の17倍の細胞毒性を示した。この結果は、cRGDペ

プチド搭載DACHPt内包ミセルが $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合を介してMDA-MB-435S細胞に効率的に取り込まれたことに起因するものと思われる。

4. DDSのBTB透過能評価のためのin vitroモデルの構築

トランスウェルを用いて調製したin vitro BTBモデル(図2)のバリア機能をTEER測定により評価を行ったところ、TEER値は周皮細胞の存在により顕著に増加することが確認され(data not shown)、さらにdish上にアストロサイトマ細胞を培養することによって、正常アストロサイトを培養した場合よりも顕著にトランスウェルのTEER値が増大することが確認された(図5)。この結果は、in vivoのglioblastomaモデルの腫瘍血管の環境と同じように内皮細胞に周皮細胞が結合し、その周囲にアストロサイトマが存在する環境を再現することによって、内皮細胞のバリア機能が高まることを示唆しているものと考えられる。

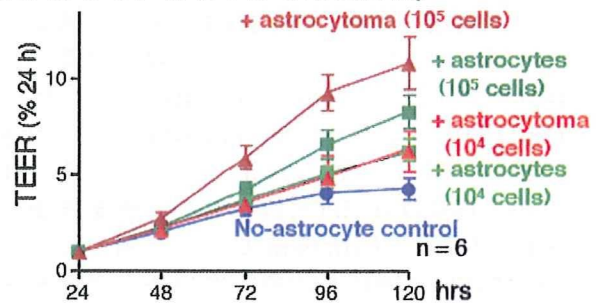


図5. in vitro BTBモデルのTEER値の変化

D. 考察

本研究では、研究代表者の片岡らが開発する高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めることを目的として、腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることのできる薬剤の併用や腫瘍血管内皮細胞特異的にトランスサイトosisを誘起するリガンド分子のミセル表面への導入に基づく新規治療戦略の開発を目指している。このような目的においては、ヒトへの応用を視野に入れたモデル構築が重要であるが、本年度の研究において、ヒトの膠芽腫と同様な腫瘍血管構築を有するマウスGBM細胞(SR-B10.A)の同所移植モデルに対してTGF-β阻害剤の併用により、ナノキャリア(株)とDebioPhram社によって第I相臨床治験が実施されているDACHPt内包ミセルのがん集積性を高めることに成功した。また、TGF-βシグナルは腫瘍血管に特異的に活性化していることも確認され、以上の結果より、TGF-β阻害剤と高分子ミセルの併用は、BTBを越えて脳腫瘍に薬剤を選択的に送達するための有効な戦略になりうると考えられる。この結果に基づいて、H22年度においては、MRIを利用したマウスGBMモデルのDACHPt内包ミセルによる治療効果の検証を行うことを計

画している。

一方、トランスサイトシスを誘起するリガンド分子を搭載した高分子ミセルの開発に関しては、表面にマレイミド基を導入した高分子ミセルの調製法を確立することができた。マレイミド基には、チオール基を有するペプチドや抗体フラグメントなどを導入することが可能であり、ユニバーサル型ミセルとしての展開が可能である。とりわけ本年度は、腫瘍血管に特異的に発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合し、カベオレ介在型エンドサイトシスを誘起することが報告されている環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルの構築を行い、*in vitro*における $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合とそれを介した細胞毒性の増強を確認することができた。また、トランスウェルを利用することによって、*in vivo*のglioblastomaモデルの腫瘍血管の環境と同じように内皮細胞に周皮細胞が結合し、その周囲にアストロサイトマが存在する環境を再現した*in vitro* BTBモデルの構築にも成功することができた。これらの結果に基づいて、H22年度においては、環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの*in vitro* BTBモデルの通過能の検討を行う予定である。さらに、環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの機能評価をマウスGBM細胞の同所移植モデルを用いて行い、*in vivo*における機能や治療における有用性を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

本年度は、ヒトグリオーマの病理検体における腫瘍血管の解析を行い、GBMに特徴的なGlomeruloid vesselの構造を明らかにするとともに、SR-B10.A細胞同所移植モデルを用いた検討により、TGF β 阻害剤がミセルの血管内腔からがん組織への移行性を高める可能性を示唆することができた。また、ミセルをがん組織にデリバリーするための異なるアプローチとして、リガンド分子を搭載した高分子ミセルの調製スキームを確立した。本年度は、特に環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを開発し、その機能を*in vitro*において確認した。さらに、トランスウェルを利用することにより*in vitro*のBTBモデルを構築することができた。最終年度となる次年度は、TGF β 阻害剤とDACHPt内包ミセルの併用ならびに環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの機能に関して、*in vivo*実験を中心に行う予定である。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G:研究発表

1. 論文発表

1. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles . J. Control. Release in press
2. M. Sanjoh, S. Hiki, Y. Lee, M. Oba, K. Miyata, T. Ishii, K. Kataoka, pDNA/poly(L-lysine) Polyplexes Functionalized with a pH-Sensitive Charge-Conversional Poly(aspartamide) Derivative for Controlled Gene Delivery to Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Macromol. Rapid Commun. in press
3. H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. J. Control. Release in press
4. K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. Biomaterials 31 (17) 4764-4770 (2010)
5. K. Itaka, T. Ishii, Y. Hasegawa, K. Kataoka, Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. Biomaterials 31 (13) 3707-3714 (2010)
6. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1 . Mol. Pharm. 7 (2) 501-509 (2010)
7. K. Itaka, K. Osada, K. Morii, P. Kim, S. -H. Yun, K. Kataoka, Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. J. Control. Release 143 (1) 112-119 (2010)
8. H. Shimizu, Y. Hori, S. Kaname, K. Yamada, N. Nishiyama, S. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, A. Yamada, K. Kataoka, T. Fujita, siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. J. Am. Soc. Nephrol. 21 (4) 622-633 (2010)
9. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. Angew. Chem. Int. Ed. 49 (14) 2552-2555 (2010)
10. S. Hiki, K. Kataoka, Versatile and selective synthesis of "Click Chemistry" compatible heterobifunctional poly(ethylene glycol)s possessing azide and alkyne functionalities. Bioconjugate. Chem. 21 (2) 248-254 (2010)

11. M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka, Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release* 140 (3) 306-311 (2009)
 12. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* 21 (34) 3520-3525 (2009)
 13. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M. R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.* 17 (8) 1404-1410 (2009)
 14. M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol Ther.* 17 (7) 1180-1186 (2009)
 15. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009)
 16. Y. Matsumoto, K. Itaka, T. Yamasoba, K. Kataoka, Intranuclear fluorescence resonance energy transfer analysis of plasmid DNA decondensation from nonviral gene carriers. *J. Gene. Med.* 11 (7) 615-623 (2009)
 17. 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)
2. 学会発表
(国内学会)
1. 片岡一則、ポリエチレングリコール-ポリアミノ酸ブロック共重合体を基盤とする高分子ミセル型 DDS の開発 (第 25 回日本 DDS 学会 学術集会、2009/7/3-7/4、東京ドームホテル、東京) 招待講演
 2. 片岡一則、健康サステイナブル社会を先導するナノバイオマテリアル ~ピンポイント DDS への展開~ (第 58 回高分子討論会、2009/9/16-9/18、熊本大学工学部黒髪地区、熊本県) 招待講演
 3. 片岡一則、ポリペプチドを用いた新規高分子材料開発 ~医療、膜、繊維等への展開~ (NEDO 第一回環境化学セミナー、2009/10/29、NEDO 日比谷オフィス、東京) 招待講演
4. 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 18 回ポリマー材料フォーラム、2009/11/26-11/27、タワーホール船堀、東京) 招待講演
(国際学会)
 1. K. Kataoka, Supramolecular Structures as Carriers in Gene and Drug Delivery ~Challenge to Smart Molecular Therapy~ (Biomaterials Asia 2009, 2009/4/5-4/8, Regal Airport Hotel, Hong Kong, China) Invited Lecture
 2. K. Kataoka, Smart Nanocarrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery ~A Future for the Pharmaceutical Industry~ (2nd European Conference for Clinical Nanomedicine, 2009/4/27-4/29, Messe Schweiz, Hall l'Entree, Basel, Switzerland) Keynote Lecture
 3. K. Kataoka, Supramolecular Assemblies of Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (International Symposium Celebrating the 50th Anniversary of the Journal "Polymer", 2009/6/7-6/9, The Congress Centrum Mainz, Mainz, Germany) Plenary Lecture
 4. K. Kataoka, Importance of Nanotechnology in Healthcare in the 21st Century - The Japanese Perspective ~Towards Smart Molecular Therapy~ (2nd ESF/UB European Summer School in Nanomedicine, 2009/6/12-6/16, Quinta da Marinha, Cascais, Lisbon, Portugal) Plenary Lecture
 5. K. Kataoka, Supra-macromoleuclar Nanodevices for Smart Molecular Therapy (73rd Prague Meeting on Macromolecules (PMM 2009), 2009/7/5-7/9, Prague, Czech Republic) Invited Lecture
 6. K. Kataoka, Nanotherapeutics through Polymer Chemistry: Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (34th FEBS Congress, 2009/7/4-7/9, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic) Invited Lecture
 7. K. Kataoka, Nanotherapeutics through Polymer Chemistry ~Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery~ (2nd TERMIS World Congress, 2009/8/31-9/3, Lotte Hotel World, Seoul, Korea) Keynote Lecture
 8. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanocarriers for Gene and Drug Delivery ~Challenges to Intracellular Nanomedicine~ (22nd European Conference on Biomaterials, 2009/9/7-9/11, Lausanne, Switzerland) Keynote Lecture
 9. K. Kataoka, Interface Aspects of Polymeric Drug Delivery Systems~Challenges in Gene Delivery~ (22nd European Conference on Biomaterials, 2009/9/7-9/11, Lausanne, Switzerland) Invited Lecture
 10. K. Kataoka, Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (2nd Swiss-Japanese Symposium on Bionanotechnology, 2009/9/10-9/11, Aigle Castle, Switzerland) Invited Lecture

11. K. Kataoka, Supra-moleuclar Structures as Nanodevices in Gene and Drug Delivery ~Challenges to Smart Molecular Therapy~ (The Norman Bethune International Medical Forum 2009 & 70th Anniversary Celebration for Former Norman Bethune University of Medical Sciences, 2009/9/23-9/26, Changchun, China) Invited Lecture
12. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanodevices from Block Copolymers for Smart Molecular Therapy (2nd Aquitaine Conference on Polymers, 2009/10/13-10/16, Palais des Congres, Arcachon, France) Invited Lecture
13. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (1st Annual Conference of the American Society for Nanomedicine, 2009/10/22-10/25, Bolger Center, Potomac, Maryland, USA) Keynote Lecture
14. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanodevices for Nucleic Acid Delivery (Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, 2009/11/3-11/6, Centennial Hall, Kyushu University Hospital Campus, Fukuoka, Japan) Invited Lecture
15. K. Kataoka, Block copolymer micelles and vesicles as nanocarriers for gene and drug delivery (The 10th US-Japan symposium on Drug Delivery System, 2009/12/16-12/20, Lahaina, Maui, Hawaii, USA) Plenary Lecture

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 片岡一則, 宮田完二郎, 西山伸宏, 石井武彦, 呉寿栄, キム ヒュンジン、カチオン性のポリ(アミノ酸)およびその使用出願、特願 2009-31799

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 准教授

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、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、チオール基を有する種々のリガンド分子を導入できるユニバーサル型ミセルとして、表面にマレイミド基を有するDACHPt内包ミセルを構築した。また、具体的なりガンドとして、環状RGDペプチドをミセル表面に導入し、リガンド導入ミセルの機能評価を行った。

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、チオール基を有する種々のリガンド分子を導入できるユニバーサル型ミセルとして、表面にマレイミド(MAL)基を有するDACHPt内包ミセルを構築した(図1)。また、具体的なりガンドとして、環状RGDペプチドをミセル表面に導入し、リガンド導入ミセルの機能評価を行った。

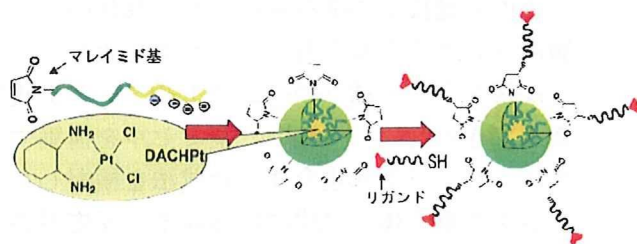


図1. リガンド導入DACHPt内包ミセルの設計

B. 研究方法

1. マレイミド基導入 PEG-*b*-PGlu の合成(図 2)
 N₃-PEG-*b*-PGlu の合成：エチレンオキシドの重合から得られたアジド末端ヘテロ PEG(N₃-PEG-NH₂)(S. Hiki et al., Bioconjugate Chem. 21:248-254 (2010))をマクロ開始剤として、DMF 中 35°Cにて γ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxy anhydride (BLG-NCA)の開環重合を行った。得られたブロック共重合体の ω 末端アミノ基を無水酢酸によりアセチル化した後、アルカリ加水分解により側鎖ベンジル基の脱保護を行った。反応溶液の透析処理および凍結乾燥によりポリマーを回収した。
 MAL-PEG-*b*-PGlu の合成：Pd-C を用いた接触水素化還元により N₃-PEG-*b*-PGlu の末端アジド基をアミノ基へと変換後、活性エステル型のマレイミド化試薬をポリマーの 5 倍モル量加えて攪拌した。未反応のマレイミド化試薬は透析により除去した後、ポリマーは凍結乾燥により回収した。

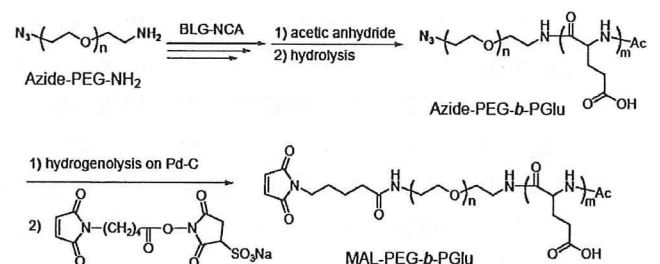


図 2. マレイミド基導入 PEG-*b*-PGlu の合成

2. DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)の調製と cRGD リガンドの導入

MAL-PEG-*b*-PGlu と MeO-PEG-*b*-PGlu を 1:1(w/w)で混合し、DACHPt 水溶液 (5 mM, [DACHPt]/[COO]=1)を加えた。反応溶液は 37°C で 3 日間攪拌させた後、限外ろ過(MWCO: 30,000)により精製した。ミセルの粒径および粒径分布は動的光散乱法(DLS)により測定した。cRGD リガンドの導入は、調製したミセル溶液に対し、マレイミド基に対して 2 倍モル量の cRGD リガンドを加え、37°C で 24 時間攪拌した。未反応の cRGD を遠心濾過(MWCO: 30,000)により除去し、再度 DLS 測定を行った。ミセル溶液を 40%の体積になるまで濃縮した後、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により、ミセルに内包された DACHPt 量を測定した。また、ミセル表層の cRGD 導入を確認するため、蛍光相関分光法(FCS)を用いて蛍光ラベル化インテグリンとの相互作用を検討した。

3. cRGD 導入 DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)の in vitro 細胞毒性評価

$\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現している乳がん細胞MDA-MB-435S細胞と $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現量の少ないヒト肝がんHuH-7細胞に対し、2種類のみセル(cRGD-DACHPt/m、MeO-DACHPt/m)およびOxaliplatinを用いて、MTTアッセイを行った。

C. 研究結果

1. MAL-PEG-*b*-PGluの合成

N_3 -PEG-NH₂の合成では、各反応段階において¹H-NMR, GPC および MALDI-TOF MS による分析を行い、構造解析および末端官能基の変換効率の見積りを行った。これらの結果より、精密な分子量制御(Mn= 12000, Mw/Mn= 1.03)と定量的なアジド基の導入が確認された。次いで、このヘテロ二官能性PEGを用いたブロック共重合体の合成を行ったところ、GPCによる分析では単峰性の溶出曲線が得られ、¹H-NMRから求めたPGluの重合度は約20であった。これらの結果から、アジド基がNCAの重合に影響を及ぼすことはなかったと言える。得られたブロック共重合体の側鎖アルカリ加水分解、アジド基の還元、そしてマレイミド化反応に関しても、¹H-NMRによる分析を行い、副反応なく合成が進行したことが確認された。マレイミド基の導入率は40%前後であった。

2. DACHPt/mの調製と cRGD リガンドの導入

MAL-PEG-*b*-PGlu と MeO-PEG-*b*-PGlu を 1:1

(w/w)で混合し、DACHPt と反応させることによって表面にマレイミド基を有する DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)を調製した。次に、マレイミド基に対して 2 倍モル量の cRGD リガンドを加え、37°C で 24 時間反応させることによって、表面に cRGD リガンドを導入した DACHPt/m を調製した。調製されたリガンド導入 DACHPt/m の平均粒径および粒径分布(PDI)は、それぞれ 32.8nm および 0.07 であった。これは、リガンドを導入していない DACHPt/m とほぼ同等であり、マレイミド基や cRGD の導入反応がミセルの形成に影響を及ぼさないことが示唆された。

cRGD 導入 DACHPt/m と蛍光ラベル化 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの相互作用に関しては、FCS 測定において拡散時間増加が認められ(表 1)、ミセルと $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの相互作用を示唆する結果が得られた。

表1. FCS測定による拡散時間の測定

サンプル	拡散時間
$\alpha_v\beta_3$	139 μ sec
$\alpha_v\beta_3$ +cRGD-DACHPt/m	1246 μ sec
$\alpha_v\beta_3$ +MeO-DACHPt/m	138 μ sec

3. cRGD 導入 DACHPt/m の in vitro 細胞毒性評価

MDA-MB-435S 細胞と HuH-7 細胞に対する Oxaliplatin、MeO-DACHPt/m、cRGD-DACHPt/m の細胞毒性を評価した結果、Oxaliplatin と MeO-DACHPt/m の細胞毒性に関しては MDA-MB-435S 細胞と HuH-7 細胞の間に有意な差は見られなかったが、cRGD-DACHPt/m の細胞毒性に関しては MDA-MB-435S 細胞に対して HuH-7 細胞の 17 倍の細胞毒性を示した。この結果は、cRGD-DACHPt/m が $\alpha_v\beta_3$ インテグリンへの結合を介して MDA-MB-435S 細胞に効率的に取り込まれたことに起因するものと思われる。

D. 考察

本研究では、BTBをトランスサイトーシスによって通過することのできる高分子ミセルの構築を目的として、現在第一相臨床治験中のDACHPt内包ミセルの表層に任意のリガンド分子を搭載するための基盤技術の構築を行った。具体的には、表層にマレイミド基を有するミセルを設計し、チオール基を介して種々のペプチドやタンパク質等を導入できる“ユニバーサル”型ミセルを構築するために、ブロック共重合体の合成法を検討した。ブロック共重合体の合成には多段階の反応が必要であるが、マレイミド基はその反応性の高さゆえ、

それらの反応条件に対応させることは現実的に困難である。そこで、まず α 末端にアジド基を有するブロック共重合体を合成した後、アジド基を還元して得られるアミノ基にマレイミド誘導体を反応させる設計を考案した。はじめに、開環重合によりアジド基を有する新規ブロック共重合体 N_3 -PEG-*b*-Gluを合成し、 α 末端の官能基変換を経てマレイミド基を導入した。得られた新規ブロック共重合体を用いてDACHPt内包ミセルを調製し、種々の物性評価を行った。その結果、リガンドを導入してない系とほぼ同等の性質を有するDACHPt内包ミセルを構築することができ、ミセル表面に導入したcRGDリガンドが $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して結合能を有することと $\alpha_v\beta_3$ インテグリン過剰発現細胞に対して優れた細胞毒性を示すことが確認された。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは腫瘍血管の血管内皮細胞で過剰発現しており、さらに $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合した分子はカベオレ介在型エンドサイトーシスによって細胞内に移行することが知られていることから、cRGDリガンドは、脳腫瘍の腫瘍血管でトランスサイトーシスを誘起する可能性がある。最終年度にあたる平成22年度においては、cRGD搭載DACHPt内包ミセルのさらなる機能評価を進めていきたいと考えている。

E. 結論

本分担研究では、表層にマレイミド基を有するブロック共重合体の合成法を確立し、リガンド分子としてcRGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築することができた。cRGD搭載DACHPt内包ミセルの機能評価においては、ミセル表面のcRGDリガンドが $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して結合能を有することに加えて、ミセルが $\alpha_v\beta_3$ インテグリン過剰発現細胞に対して優れた細胞毒性を示すことが確認された。本研究成果は、ペプチドや抗体フラグメントなどの種々のリガンド分子を搭載できるユニバーサル型のDACHPt内包ミセルへと展開することができ、Active Targeting型高分子ミセルの基盤技術として、今後の研究に活用していきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release*, in press
- H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown. *J. Control. Release*, in press
- K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials* 31 (17) 4764-4770 (2010)
- M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 7 (2) 501-509 (2010)
- H. Shimizu, Y. Hori, S. Kaname, K. Yamada, N. Nishiyama, S. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, A. Yamada, K. Kataoka, T. Fujita, siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21 (4) 622-633 (2010)
- Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010)
- K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials*, 31 (17) 4764-4770 (2009)
- M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka, Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles combined with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release*, 140 (3) 306-311 (2009)
- M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M. R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.*, 17 (8) 1404-1410 (2009)
- M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced

- pulmonary hypertension in rats. *Mol. Ther.*, 17 (7) 1180-1186 (2009)
11. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* 21 (34) 3520-3525 (2009)
 12. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009)
 13. 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.*, 61 (4) 327-338 (2009)
 14. 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*, 30 (14) 2705-2715 (2009)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
2. 学会発表
 1. 西山伸宏, "高分子ミセルを利用した診断・治療システムの開発", 第 48 回日本生体医工学会大会 オーガナイズドセッション「ナノキャリアーと物理エネルギーを融合したハイブリット標的化診断・治療」, タワーホール船堀, 東京 2009 年 4 月 25 日 (シンポジスト)
 2. 西山伸宏, 片岡一則 "がん標的治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 岡山肝癌研究会, 岡山コンベンションセンター, 岡山 2009 年 4 月 25 日(特別講演)
 3. 西山伸宏, 熊谷康顕, 堀江壮太, 福島重人, 宮崎幸造, 浦野京子, 守本祐司, 張祐銅, 片岡一則, "微小がんの光線力学治療のための診断-治療機能一体型高分子ミセルの開発", 第 58 回高分子学会年次会, 神戸国際会議場・神戸国際展示場, 神戸 2009 年 5 月 27-29 日(予定)
 4. N. Nishiyama, "Block copolymer micelles as smart supramolecular nanodevices for tumor targeting", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 19, 2009 (Invited Lecture)
 5. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, W.-D. Jang, K. Kataoka, "Development of dendrimer phthalocyanine-loaded polymeric micelles for diagnosis and treatment of microcarcinoma", The 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Bella Center, Copenhagen Denmark, July 22, 2009
 6. 西山伸宏, "ナノ技術を利用した DDS", 第 2 回 富山ライフサイエンスシンポジウム, 高志会館「カルチャーホール」, 富山 2009 年 7 月 25 日(招待講演)
 7. 西山伸宏, "高分子ミセル型医薬品の開発", 技術情報協会セミナー 難治性がん治療薬開発に向けた治療の現状・DDS 技術・マーカー開発, 大井町きゅりあん, 東京 2009 年 7 月 31 日(招待講演)
 8. 西山伸宏, 韓ムリ, 大庭誠, カブラル・オラシオ, 狩野光伸, 片岡一則 "がん深部への遺伝子・薬剤デリバリーのためのナノキャリアーの設計", 第 58 回高分子討論会, 熊本大学 黒髪キャンパス, 熊本 2009 年 9 月 17 日(口頭)
 9. 西山伸宏 "Development of polymeric micelles for innovative cancer therapy", 第 68 回 日本癌学会 シンポジウム「ナノテクノロジーがもたらす新規がん治療」, パシフィコ横浜, 神奈川 2009 年 10 月 2 日(招待講演)
 10. 西山伸宏 "ナノテクノロジーが拓く未来医療", 現代科学セミナー, 東京理科大学長万部キャンパス, 北海道 2009 年 10 月 30 日(招待講演)
 11. 西山伸宏, 片岡一則 "全身投与による遺伝子デリバリーのための高分子ナノキャリアー設計", JST 新技術説明会, JST 東京本部, 東京 2009 年 11 月 20 日(依頼講演)
 12. 西山伸宏, 宮田完二郎, 位高啓史, 大庭誠, 石井武彦, 片岡一則 "高機能ポリマー材料を基盤とした遺伝子デリバリーシステムの設計" 第 18 回ポリマー材料フォーラム研究会, タワーホール船堀, 東京 2009 年 11 月 24 日(ポスター)
 13. 西山伸宏, "高分子集合体を基盤とした診断-治療一体型 DDS", 第 3 回 NEDO 特別講座シンポジウム「次世代 DDS が切り拓く未来医療」, 東京女子医科大学 弥生講堂, 東京 2009 年 12 月 12 日(特別講義)
 14. 西山伸宏, "光線力学治療のための光増感剤内包高

子ミセルの開発", 日本薬学会第 130 年会 シンポジウム「異分野技術の融合による次世代の医療基盤技術の構築に向けて」, ホテルグランヴィア, 岡山
2010 年 3 月 29 日(招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 西山伸宏、狩野光伸、Horacio Cabral、片岡一則、Size Controlled Micelle of Plutinium Coordination Complex、米国仮出願 61/225716 (2009.7.15)

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一般に不可能であり、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効率的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、腫瘍血管構築の観点からよりヒト膠芽腫に類似した腫瘍モデルを検討すべく、転移性脳腫瘍モデルについても解析を行った。また、ミセル製剤の体内動態と腫瘍内集積をin vivoで観察するためにMRI装置による解析を開始した。

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かを検証すること、(2) 血液-脳関門または血液-腫瘍関門の分子病理学的特徴を解析し、ミセル化薬剤の腫瘍への到達効率に与える影響を検討すること、そして、(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とし、本年度も引き続き研究を実施した。

B. 研究方法および結果

1. マウス脳腫瘍モデルにおける検討

昨年度に引き続き、汎用されている腫瘍細胞株の脳内移植モデルを主に使用した。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ものとして、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)を使用した。間質組織の腫瘍血管に与える影響の評価の一助として、それぞれの細胞をヌードマウスの脳内に接種することも行った。

分子病理学的腫瘍血管構築に注目しての薬剤腫瘍内到達性の解析をより広く行うにあたり、本年

度は脳以外の臓器由来の腫瘍細胞株で同系のマウスに接種可能であるものについて、脳内移植モデルの検討を行った。腫瘍作成方法としては、単発の腫瘍を再現性よく作成すべく、脳腫瘍細胞株のモデルと同じく脳内への腫瘍細胞の接種法によることとした。

細胞株としては、B16(悪性黒色腫瘍)、RenCa(腎細胞癌)、C26(大腸癌)、LL/2(肺癌)、4T1(乳癌)を使用した。腫瘍細胞と間質との相互作用の影響を観察するためには、接種後2週間程度での観察が必要と考えられるが、接種すべき細胞数に関しての有用な情報は詳細には文献に報告されていないため、まず、種々の細胞数で接種を行って生存期間を検討しつつ、腫瘍血管の病理学的検討も合わせて行うこととした。すなわち、接種後2週目、3週目、またはそれぞれの群の半数が神経症状のため安楽死を必要とした時点で接種脳を摘出し、新鮮凍結ブロックとして分担研究者狩野に送付した。

一方、脳腫瘍株接種モデルにおいて、蛍光ミセルの腫瘍内集積と腫瘍血管構築を一時的に修飾するTGFβ阻害剤投与との関係をより詳細に検討すべく、皮下腫瘍モデルにおける解析を追加した。すなわち、SR-B10.A細胞をB10.Aマウスの皮下または脳内に接種し、それぞれ7日後または10日後に、分担研究者西山らにより調整されたAlexa内包蛍光標識DACHPtミセルを尾静脈経路で投与した。投与と同時にマウス腹腔内にTGFβ阻害剤または対照溶液を投与した。投与48時間後に腫瘍を摘出し、凍結切片作製用に包埋した。包埋凍結組織は分担研究者狩野の研究室に送付し、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. MRI装置を使用しての腫瘍の状態の画像評価

脳内に接種した腫瘍の状態は、体外からは評価が不可能なため、生存期間による解析または一定期間経過後の病理組織学的検討にて従来は評価を行ってきた。今回、小動物用MRI装置による解析が可能となったため、本実験系での評価のための条件設定を行うべく実験を行った。腫瘍モデルとしては、昨年度までの実験の結果、最もヒト膠芽腫の血管構築を再現していたSR-B10.A細胞のB10.Aマウス脳内接種モデルを使用した。

まず、脳内に接種した腫瘍がMRI画像として描出可能であるかを、T1強調画像、T2強調画像、および通常のガドリニウム造影剤使用によるT1強調画像において検討した。現在、抗腫瘍効果判定やGd内包ミセル製剤の取り込み評価などの実験にむけ、結果の解析を行っている。

C. まとめ

本年度は、昨年に引き続きSR-B10.AモデルおよびU87MGモデル(脳内腫瘍および皮下腫瘍)において、ミセル製剤の腫瘍内集積に対するTGFβ阻害剤の影響(効果)についての評価を行った。また、複数のマウス転移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にむけて、血管構築の分子病理学的検討を行った。腫瘍評価にMRI画像装置も取り入れ、次年度はこれらの系を用いて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,
Shibahara J, Louis DN, Reifenberger G, Itami J, Hara R,
Saito N, Todo T Long-term control of disseminated
pleomorphic xanthoastrocytoma with anaplastic features
by means of stereotactic irradiation. *Neuro Oncol.*
11(4): 446-451 (2009)

Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K,
Miyazono K Autocrine TGF- β signaling maintains
tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-
related HMG-box factors *Cell Stem Cell* 5(5): 504-514
(2009)

厚生労働科学研究費補助金（ナノメディシン研究事業）
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。今年度の研究により、ヒト脳腫瘍・脳腫瘍動物モデル・in vitroモデルのすべてにおいて、血管透過性を左右する因子として血管周囲SMA陽性細胞の重要性が示唆された。また、同所脳腫瘍移植モデルの評価にMRIが応用可能であることが示唆された。

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、終局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。このために、実際のヒト脳腫瘍の構築を明らかにし（分担研究者西原担当）、病理組織学的な比較において妥当な動物モデルを選択する。さらに、頭蓋内モデルの病理学的手法以外の検出方法すなわちMRI技術応用の確立も行う。一方、動物モデルではとらえきれない事象の解析のためにin vitroモデルの確立も検討する。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、SR-B10Aマウス脳腫瘍細胞株を用いた同所移植モデルを主に用いて各種解析を行った。またこのモデルの特徴を明らかにするために、本年度は、一般に脳腫瘍動物モデルとして広く用いられているU87MGヒトグリオブラストーマ由来細胞株のマウス同所移植モデル、またこれら細胞株の皮下移植モデルを比較検討した。モデルの構築は分担研究者の稲生により行われた。解析の方法論としては、マウスから摘出した脳または皮下腫瘍を凍結標本化し、これを薄切することにより行った。蛍光標識ミセルの場合は風乾後4%パラホルムアルデヒド

で固定し封入してそのまま観察、またその他の免疫染色については特異的的一次抗体、蛍光標識二次抗体の順に反応させてから観察を行った。観察・撮影にはZeiss社製510Meta共焦点顕微鏡を用いた。脳腫瘍動物モデルに対して投与した蛍光標識ミセルは、主任研究者らにより開発されたものを用いた。

MRI撮影については、研究協力先の放射線医学研究所分子イメージング研究センター先端生体計測研究グループ計測システム開発チームに設置された7T高磁場MRIを用い、また撮影後動物を犠牲死させてホルマリン還流固定を行い、脳を摘出してHE染色を行った。

さらに、BBBのin vitroモデルの構築は、研究協力先の北海道大学大学院薬学研究院薬理学講座において行った。正常ラット脳をより得られた初代培養脳血管内皮細胞および血管壁細胞と、脳腫瘍細胞・正常アストロサイトとして、不死化アストロサイト細胞株と、この細胞株に各種がん化遺伝子を導入した細胞株を用いた。細胞間ジャンクションの形成はTEER (trans endothelial electric resistance) によって計測した。

(倫理面への配慮)

この研究で行った遺伝子組換え実験は東京大学医学部及び研究協力先機関における組み換えDNA実験安全委員会において承認を受け、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及び研究協力先機関における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

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、患者個人に不険性が及ぶことはない。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、本学及び研究協力機関の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、前年度に引き続き解析を行った。

マウスにおける腫瘍モデルとしては、研究分担者である稲生らにより作成された、マウスSRB10A細胞を用いたグリオブラストーマ同所移植モデルに関して、まず免疫組織化学的に解析し比較した。本年度は血管内皮細胞マーカーとしても用いられているMECA32の染色解析をまず行った。MECA32は別名PV-1 (Plasmalemma vesicle protein-1)またはPLVAP (Plasmalemma vesicle associated protein)ともいい、カベオラの膜関連タンパクである。MECA32は一般に開窓構造をもった内皮細胞の表面に存在すると報告されている。骨格筋や心筋においては、通常MECA32は小動脈や毛細血管に発現が限られている。なお心筋では、炎症状態になるとそれまで発現が見られなかった血管でも発現が見られるようになることが知られている。一方中枢神経系においては、発達の過程でMECA32の発現は徐々に消滅し成体では発現が見られない。これにはこの期間に起こる血液脳関門 (BBB) の確立が関連していると考えられている。しかし中枢神経系でも、炎症状態になると内皮細胞におけるMECA32の発現が再開する。これらの前提を踏まえて、SRB10Aを用いた同種同所脳腫瘍モデルにおいて、MECA32の発現解析を行った。結果、まずMECA32の発現は既報通り、正常脳組織には観察されなかった。MECA32は一方で、脳腫瘍内の一部の血管に発現していることが観察された。このうち、腫瘍血管にSMA陽性細胞の存在があると発現が低下する傾向が見られた。従って、SMA陽性細胞が付着した脳腫瘍血管は、少なくともMECA32の関連する開窓構造が少ない可能性が考えられた。

次に、昨年度TGF- β 阻害剤の併用によりSR-B10AモデルにおけるDACHPtミセルの蓄積が増強された知見を受けて、阻害剤のターゲットが我々の既報理論通り腫瘍血管であるかを確認するために、TGF- β シグナルが活性化されると細胞質内でリン酸化し核内に情報伝達をするタンパクであるSmad2の解析を行った。結果、リン酸化Smad2は正常脳組織血管ではほとんど検出されないが、腫瘍

血管に多く検出された。従って、腫瘍血管はTGF- β 阻害剤の標的となることが示唆された。なお、分担研究者西原により、ヒトグリオブラストーマ血管においても主にリン酸化Smad2が発現しているのは腫瘍血管 (主にSMA陽性細胞) であることが今年度明らかにされ、TGF- β 阻害剤を併用したナノDDSによる治療がヒトにおいても有効である可能性が示唆された。

次に、脳腫瘍研究で頻用されている、ヒトグリオブラストーマ由来のU87MG細胞株を用いた同所移植モデルと、SR-B10A同所移植モデルの比較を行った。まずU87MG細胞はヒト由来であるのでヌードマウスを用いた異種同所移植となる。次に、U87MG星細胞種 (アストロサイトーマ) であるが、GFAPは陰性であった。また、SR-B10Aモデルでは血管内皮にのみ発現していたCaveolin1が、腫瘍細胞そのものでも陽性であった。次に、血管の形質であるが、もちろん内皮細胞のPECAM1は陽性であるが、SMA陽性細胞はほぼ存在しなかった。一方、それにもかかわらず、タイトジャンクション分子のClaudin5はある程度発現が観察された。ただし、細胞辺縁にのみ分布しているよりは、細胞表面にびまん性に分布している印象があり、そうであれば機能していない可能性も考えられた。ただし、共焦点顕微鏡の倍率限界で具体的なことは不明である。これ以上の解析には免疫電子顕微鏡などの方法論が必要であろう。また、SMA陽性細胞がほとんど存在していないにもかかわらず、MECA32は陰性であった。このようにSRB10AモデルとU87MGモデルは非常に異なることが判明し、これらから簡潔な比較を行うことは不可能ではあるが、蛍光標識DACHPtミセルを投与した結果、ミセルは腫瘍辺縁部にTGF- β 阻害剤の有無にかかわらず集積が見られた。このことから、ミセルの蓄積と今のところ最も相関する指標は血管周囲SMA陽性細胞の存在程度ということになる。

なお、U87MGを皮下移植したモデルにおいては、SMA陽性細胞の血管被覆はほとんどなく、Claudin5は陰性、ミセル蓄積もTGF- β 阻害剤の有無にかかわらず観察された。これらのことから、ヒトグリオブラストーマの治療法を開発するために現状もっとも妥当と思われるモデルは、SRB10A同所移植モデルと思われ、このモデルを用いた検討を継続することとする。

分担研究者西原の解析により、転移性脳腫瘍、すなわち肺がん・乳がん・大腸がん・腎がんの脳に転移したヒト症例の腫瘍血管は、いずれもSMA陽性細胞に被覆されていることが判明した。そこで、この状況を模倣するモデルがマウスで実現可能かを探るために、分担研究者稲生により、いずれもマウス由来の悪性黒色腫細胞B16F10または肺がんLL/2をC57BL/6マウス脳内に、大腸癌細胞C26または

乳がん 4T1 を Balb/c マウス脳内に移植を試みた。移植後約 20 日ののちに脳を摘出した結果、いずれも腫瘍細胞は生着しており、腫瘍塊を形成していた。これらの血管構築を観察すると、LL/2 移植モデル及び 4T1 移植モデルでは腫瘍血管がヒトと同等に SMA 陽性細胞で被覆されているのが観察された。この結果から、今後、これら 2 モデルを用いて転移性脳腫瘍に対するミセルの薬効を確認していくことを計画している。

脳腫瘍モデルにおけるミセルの蓄積を評価するにあたり、現在は蛍光標識を用いているが、実際に評価できているのは標本中で切片化した一断面であるという問題がある。また、具体的なミセルの薬効を確認するにあたって、前述したように皮下腫瘍モデルが実際のヒト脳腫瘍に比較して不相当であるとすれば、頭蓋内腫瘍の成長及び増殖抑制効果を、動物を生かしたままで何らかの手段で確認する以外に実効的な方法はない。この目的のために、高磁場 MRI による評価を取り入れることとした。研究協力先の放射線医学総合研究所に設置された 7 テスラ高磁場 MRI を、同研究所分子イメージング研究センター先端生体計測研究グループ計測システム開発チーム青木伊知男チームリーダーの全面的な協力をいただき、用いた。本年度はパイロットスタディとして SRB10A、U87MG 同所移植モデルを T2、T1 強調撮影または Gd-DTPA 造影 T1 強調撮影を行った。この結果、いずれの腫瘍も T2 強調画像ではっきりと撮像された。この画像と、撮影後標本化した同じ腫瘍の病理像を比較した結果、T2 High に撮影されている領域は腫瘍細胞の存在部位と対応することが確認された。また Gd-DTPA で造影されることが判明したが、SRB10A モデルにおける造影程度は、U87MG モデルにおける造影程度よりも低く、これまでに得られた血管構築の知見を反映していることが示唆された。

脳腫瘍血管構築における SMA 陽性細胞（ペリサイト）の重要性をさらに解析するために、北海道大学大学院薬学研究院薬理学講座（南雅文教授）に依頼し、ラット脳由来初代培養細胞を用いた *in vitro* モデルの構築を開始した。この結果、内皮細胞およびペリサイトからなるインビトロ BBB モデルは、内皮細胞だけから構成されるモデルに比較して高い TEER 値を示し、さらにペリサイト播種密度依存的により高い TEER 値を示した。ここで、ペリサイトの増殖に関し、腫瘍化アストロサイト由来の条件培地はペリサイトの増殖を促進した。そこで、さらに不死化アストロサイトまたは腫瘍化アストロサイトを共培養し、ペリサイトと内皮細胞が共存する系への TEER 値における影響を解析した。その結果、アストロサイトはインビトロ BBB モデル（BMEC のみ）におけるバリア機能を高め、その作用は腫瘍化アストロサイトにおい

てより顕著であった。

D. 考察

SRB10A モデルにおける MECA32 の発現解析の結果、従って、SMA 陽性細胞が付着した脳腫瘍血管は、少なくとも MECA32 の関連する開窓構造が少ない可能性が考えられた。

TGF- β シグナルの下流でリン酸化された Smad2 を検出した結果、動物モデルでもヒトでも腫瘍血管において特に検出され、TGF- β 阻害剤を併用したナノ DDS による治療がヒトにおいても有効である可能性が示唆された。

U87MG モデルと SRB10A モデルを比較したところ、特に SMA 陽性細胞による血管被覆の観点から、SRB10A モデルを用いるのがよりヒト病態の解析に近いと考えられた。

転移性脳腫瘍のモデルとして、血管構築の観点から、LL/2 または 4T1 細胞の脳内移植モデルの妥当性がある可能性が示唆された。

同所移植脳腫瘍モデルの増殖評価に関して、高磁場 MRI が応用可能であることが示唆された。腫瘍検出方法としては T2 強調画像を用いることが可能であり、また Gd-DTPA による造影効果も用いることができる。

脳腫瘍血管の *in vitro* モデルとして、ラット脳由来初代培養内皮細胞及びペリサイト、そしてアストロサイト細胞株または腫瘍化アストロサイト株の 3 者を同一実験系内に共培養することにより、TEER 値の変化が観測され、3 者すべてが存在するときに内皮のバリア機能が最も高くなる可能性が示唆された。

E. 結論

今年度の研究により、ヒト脳腫瘍・脳腫瘍動物モデル・*in vitro* モデルのすべてにおいて、血管透過性を左右する因子として血管周囲 SMA 陽性細胞の重要性が示唆された。また、同所脳腫瘍移植モデルの評価に MRI が応用可能であることが示唆された。

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- β 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 H