

200924025A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松村 保広

平成22（2010）年 3月

1/1冊

## 目 次

I. 総括研究報告	
新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究	1
松村 保広	
II. 分担研究報告	
1. 腫瘍脈管の特性に基づく DDS 製剤の開発とトランスレーショナル研究	7
松村 保広	
2. 難治ガン治療のための高分子ミセル型ナノキャリアの開発	11
片岡 一則	
3. オキサリプラチン(L-OHP)のリポソーム製剤化による免疫抑制の回避と がん免疫療法併用の有用性	17
丸山 一雄	
4. 栄養飢餓耐性機構の治療応用	21
土原 一哉	
5. 微生物代謝産物からの抗がん剤の開発に関する研	23
百瀬 功	
6. 腫瘍特異的微小環境適応シグナル伝達を利用した抗がん剤の開発	27
上野 隆	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

研究代表者 松村 保広

（国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部）

敵（がん）との戦いにおいて、収容所（ペトリ皿）に敵を集め弾丸（抗腫瘍剤）で殺すことは容易である、しかしながら、実際のがんとの戦いにおいては、敵は幾多の防御壁を築いており、どこにひそんでいるかさえわからない。現在のがん治療は弾丸を無差別に撃ちまくっているような状況である。そこで、鉄砲をもった兵隊を適地（がん組織）におくりこみ攻撃するというドラッグデリバリーシステム（DDS）の戦略が必要となる。本年度は新しい DDS の創生に加え、上記のような自然耐性にあるがんに対して DDS の剤型がどうあるべきか検討した。

片岡一則 東京大学大学院工学系研究科 教授  
丸山一雄 帝京大学薬学部 教授  
土原一哉 国立がんセンター東病院  
臨床開発センター室長  
上野 隆 順天堂大学医学部 准教授  
百瀬 功 財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究センター沼津創薬医学研究所

ト大腸がん HT29 細胞のオキサリ耐性株に対する耐性克服のメカニズムについて報告する。リポソームに関しては、様々な抗原エピトープに対する CTL を誘導するため、バブルリポソームと超音波の併用によりがん関連抗原をそのまま DC の細胞質内に送達する技術の開発を行った。

#### A. 研究目的

DDS 製剤の薬効、併用効果につき臨床試験へ反映するといった DDS 製剤のトランスレーショナル研究を行っているが、本年度は特に NK012 の併用療法と新しい概念として、がん間質抗体によるデリバリーの評価を報告する。また、新規ミセル製剤として、dichloro (1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) (DACHPt) (オキサリプラチンの中間活性体)を内包した高分子ミセルに関して、薬効薬理試験及びヒ

栄養飢餓耐性の研究に関しては、低栄養環境が既存の抗がん剤の効果に及ぼす影響について、in vitro で検討する。また、栄養飢餓状態の細胞に選択的に毒性を示す化合物を探索することを目的とした。

#### B. 研究方法

- 1) SN-38 内包ミセル NK012 と抗 VEGF 抗体 Avastin(Av)との併用、経口フッ化ピリミジン S-1 との併用を肺がんおよび脳腫瘍で検討した。
- 2) がん関連間質として、マウスコラ

ーゲン 4 に対する抗体を作成し、SN-38 結合コラーゲン 4 抗体複合体の薬効を検討した。

3) 二重蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの構築と細胞内動態解析および、オキサリプラチン耐性細胞における DACHPt 内包ミセルの解毒機構回避メカニズムの検討を行った。

4) バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達した樹状細胞 (DC) の免疫による転移抑制効果を検討した。

5) グルコース欠乏下培養 PANC-1 細胞における DNA microarray による遺伝子発現の解析および同条件下における ER ストレス関連タンパク解析を行った。

6) 低栄養・低酸素培養条件下でのゲムシタピン耐性機序の解明を行った。

7) 栄養飢餓培地 (糖ゼロ) で細胞毒性を示す物質を放線菌およびカビの培養液から探索した。

### C. 研究結果

1) 肺がんにおいては NK012/Av 群が NK012 単独群より有意に高い抗腫瘍効果を認めた。また、NK012/Av は CPT-11/Av より有意に高い抗腫瘍効果を示した。一方、脳腫瘍同所移植モデルにおいては、NK012 単独と NK012/Av との間に有意差はなかった。肺がんにおける S-1 との併用では、NK012/S-1 が CPT-11/S-1 に比べて有意

に高い抗腫瘍効果をもたらすことが認められた。また腸管毒性も NK012/S-1 群のほうが CPT-11/S-1 より軽度であった。

2) EpCAM 陽性細胞皮下移植腫瘍において、抗 EpCAM 抗体とコラーゲン 4 抗体は同程度に腫瘍内に集積し、長時間とどまることも判明した。コラーゲン 4 は正常組織にも分布するが、抗体は高分子であるために正常血管からは容易に漏出しないが、腫瘍血管からは容易に漏出することも明らかにした。SN-38 を付加した SN-38/コラーゲン 4 抗体複合体は SN-38/EpCAM 抗体複合体よりも有意に高い抗腫瘍効果をもたらした。

3) 二重蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの細胞内挙動の解析から DACHPt ミセルはミセル体のまま細胞にとりこまれ、細胞内で解離するものと考えた。また、後期エンドソーム/リソソーム環境で DACHPt がリリースされることにより、細胞質内解毒機構を回避していることがわかった。

4) バブルリポソームと超音波の併用により抗原 Alexa-B16BL6 を送達した DC の免疫により、B16BL6 細胞の顕著な肺転移抑制が確認された。

5) グルコース欠乏によるカスパーゼなどアポトーシス関連遺伝子の発現は影響なかった。一方、ER ストレスタンパクは著明に増加していた。

6) 低栄養、低酸素条件ではゲミシタピンを投与してもカスパーゼ活性は著明に減弱しており、DNA 損傷後のアポトーシス経路の阻害は低栄養におけるゲミシタピン耐性機構と考えた。

7) 栄養飢餓培地でのスクリーニングにより細胞毒性物質として、既知の Penicillic acid および Papyracillic acid を見出した。アミノ酸欠乏下において強い毒性を示した。

#### D. 考察

肺がんではNK012/AvがNK012単独より抗腫瘍効果は高かったが、同所移植脳腫瘍ではNK012とNK012/Avでは抗腫瘍効果に有意差はなかった。薬理学的には Av の併用が脳腫瘍同所移植では NK012 の腫瘍内集積を抑制するという結果であったので、このことが Av の抗腫瘍直接効果を相殺するということが示唆された。DDS 製剤と Av をはじめとする血管透過を抑えたり、血管そのものを破壊する薬剤との併用においては注意を要する。

がん関連間質に対する抗体を利用したターゲティング方法は、始まったばかりであるが、がん細胞を直接狙ういわゆるミサイル治療を凌駕する可能性が示唆された。今後間質分子の選定、抗がん剤の選定、抗がん剤と抗体との結合方法など詳細な検討をしていく必要がある。

DACHPt 内包ミセルはエンドサイトーシスによって取り込まれた後、後期エンドソーム/リソソームから活性型 DACHPt を放出することによって、細胞質内解毒機構を回避し、Pt 耐性細胞においても、高い細胞毒性を示すことができるものと考えている。

バブルリポソームと超音波の併用ががん免疫療法における有用な抗原送達システムになることが示唆された。

栄養飢餓選択的細胞毒性を示す化合物を新たに見出した。これらの解析を行った結果、ミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する化合物は栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことがわかった。膀胱癌細胞を生体内のがん組織の微小環境を模倣した低栄養・低酸素環境で培養することで生じるゲムシタピン耐性が、アポトーシスの異常により生じていることを明らかにした。PI3K 阻害剤および PKC, Chk1 等を阻害する UCN-01 の併用によって耐性が一部解除され、腫瘍特異的微小環境におけるゲムシタピンの効果増強を目指した分子標的療法の可能性が示唆された。

#### E. 結論

DDS 製剤は欧米でいくつか承認されてきており、現在日本発の DDS 製剤が日米欧で臨床開発に突入した。本研

究で得られた知見が各臨床治験プロトコールに盛り込まれた。今後は臨床データを真摯に受止め、トランスレーショナルな観点からさらなる併用治療の研究を展開すべきである。がん間質ターゲット治療は新しいがん治療の方向性をしめすものとして、抗がん剤・間質抗体複合体のデザインにおいて、臨床のがん組織に近い腫瘍モデルを用いて、詳細に検討していくべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci.* 2009 Apr;100(4):572-9.
2. Matsumura Y. NK012. *Drugs of the Future.* 2009;34(4):276-81.
3. Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Koga Y, Saito Y, Matsumura Y. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer.* 2009 Jun 1;124(11):2505-11.
4. Nagano T, Yasunaga M, Goto K, Kenmotsu H, Koga Y, Kuroda J, Matsumura Y. et al. Antitumor activity of NK012 combined with cisplatin against small cell lung cancer and intestinal mucosal changes in tumor-bearing mouse after treatment. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul

1;15(13)

5. Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Koga Y, Kenmotsu H, Sugino T, Matsumura Y. et al. Antitumor effect of NK012, a 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-incorporating polymeric micelle, on U87MG orthotopic glioblastoma in mice compared with irinotecan hydrochloride in combination with bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 15;16(2):521-9.
6. Saito Y, Yasunaga M, Kuroda J, Koga Y, Matsumura Y. Antitumor activity of NK012, SN-38-incorporating polymeric micelles, in hypovascular orthotopic pancreatic tumour. *Eur J Cancer.* 2009 Feb;46(3):650-8.
7. Nagano T, Yasunaga M, Goto K, Kenmotsu H, Koga Y, Kuroda JI, Matsumura Y. et al. Synergistic antitumor activity of the SN-38-incorporating polymeric micelles NK012 with S-1 in a mouse model of Non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2009 Mar 2.
8. H Kenmotsu MY, J Kuroda, Y Koga, A Takahashi, T Nagano, K Goto, Y Nishiwaki, Y Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer.* 2010;in press.
9. 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)
10. Suzuki R, Maruyama K. Effective in vitro and in vivo gene delivery by the combination of liposomal bubbles (bubble liposomes) and ultrasound exposure. *Methods Mol Biol.*; 605: 473-486 (2010)
11. Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K., Mori S, Manabu F. Morphological study of acoustic liposomes using transmission electron microscopy. *J Electron Microsc* (Tokyo).; Nov 11 (2009)
12. Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release.*; 142 :245-250 (2010)
13. Tsuchihara K. et al. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res.* 37:2249-63. 2009.
14. Tsuchihara K et al. Autophagy and cancer: Dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett.* 18:130-8. 2009.
15. Momose, I., Ohba, S., Tatsuda, D., Kawada. M., Masuda. T., Tsujiuchi. G., Yamori. T., Esumi. H., Ikeda, D. Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (3): 460-466 (2010).
16. Momose, I., Kunimoto, S., Osono, M., Ikeda, D. Inhibitors of insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase are preferentially cytotoxic to nutrient-deprived pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (1): 171-176 (2009).
17. Iijima, M., Momose, I., Ikeda, D. TP-110, A new proteasome inhibitor, down-regulates IAPs in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res.* 29 (4): 977-985 (2009).
18. Watanabe, T., Momose, I., Abe, M. Abe, H., Sawa, R., Umezawa, Y., Ikeda, D., Takahashi, Y., Akamatsu, Y. Synthesis of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (8): 2343-2345 (2009).

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

研究代表者 松村 保広

国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部

現在のがん治療は弾丸（抗がん剤）を無差別に撃ちまくっているような状況である。そこで、鉄砲をもった兵隊を適地（がん組織）におくりこみ攻撃するというドラッグデリバリーシステム（DDS）の戦略が必要となる。本年度は、SN-38 内包ミセル NK012 と他剤との併用およびがん間質デリバリーの開発研究を行った。

#### A. 研究目的

DDS 製剤のシスプラチン内包ミセル、NC-6004 およびタキソール内包ミセル、NK105 および SN-38 内包ミセル、NK012 の非臨床モデルにおける薬効、併用効果につき臨床試験へ反映するといった DDS 製剤のトランスレーショナル研究を行っているが、本年度は特に NK012 の肺がんおよび脳腫瘍同所移植系を用い経口フッ化ピリミジン S-1 あるいは抗 VEGF 抗体 Avastin(Av)との併用効果の評価を行った。スキルス胃がんは腫瘍血管が少なく、かつ、腫瘍間質に富む。この間質の存在は薬剤のがん細胞へのデリバリーの障壁となると考えられる。実際、胃がんだけでなく、膵がんも間質が多く、抗がん剤が効きにくいがんの一つである。大腸がんや肺がんなども間質が発達していて、血管が豊富で間質が少ないがんは乳がんや卵巣がんなどで、これらは、抗がん剤が効きやすい。非

臨床ではヒト細胞株の皮下移植モデルが使用されるが、これは細胞がヒト由来であるというだけであり、実際のヒトのがんと比べると、腫瘍脈管も間質もあきらかに異なり、ほとんどの皮下移植腫瘍は、ヒトのリンパ腫に近い組織形態をしている。このような背景から、がん細胞ではなくがん間質をターゲットとする抗体に SN-38 を付加した、抗がん剤・間質抗体複合体を作成し、薬効試験を行った。

#### B. 研究方法

1) 肺がんに対する NK012 と Av との併用：ヒト非小細胞肺腺がん PC-14 および A549 のヌードマウス皮下移植モデルにおいて、NK012/Av と CPT-11/Av の抗腫瘍効果の比較を行った。またヒト脳腫瘍 U87MG ヌードマウス脳同所移植モデルにおいても同様な研究を行った。

2) ヒト肺がん非小細胞肺がん PC-14

および EBC-1 皮下移植モデルにおいて、NK012(5mg/kg 週 1 回 2 回投与) あるいは CPT-11(10mg/kg 週 1 回 2 回投与)と S-1(10mg/kg/日 10 日投与)を行った。

3) 抗マウスラットコラーゲン 4 抗体にポリエチレングリコール鎖にエステル結合された SN-38 をマレイミド基を介して付加した (抗体 1 分子に対し 7 個の SN-38 が付加)。CPT-11 と抗腫瘍効果の比較をヒト膀胱がん Suit-2 皮下移植腫瘍に対して行った。

### C. 研究結果

1) 肺がんにおいては NK012/Av 群が NK012 単独群より有意に高い抗腫瘍効果を認めた。また、NK012/Av は CPT-11/Av より有意に高い抗腫瘍効果を示した。一方、脳腫瘍同所移植モデルにおいては、NK012 単独と NK012/Av との間に有意さはなかった。NK012 単独も NK012/Av も CPT-11/Av に比べて有意に高い抗腫瘍効果をしめした。この結果について薬理学的に検討したところ、肺がんで NK012 の腫瘍内濃度は Av の有無で有意差はなかったが、同所移植脳腫瘍では、Av の併用により NK012 の腫瘍内濃度が有意に低下するが CPT-11 には Av の併用の有無で同じ腫瘍内濃度に有意差はなかった。

2) 肺がんにおける S-1 との併用では、

NK012/S-1 が CPT-11/S-1 に比べて有意に高い抗腫瘍効果をもたらすことが認められた。また腸管毒性も NK012/S-1 群のほうが CPT-11/S-1 より軽度であった。

3) 種々のヒト腫瘍細胞移植において、抗コラーゲン 4 抗体はコントロール抗体に比べて長く腫瘍内にとどまることを証明した。また EpCAM 陽性細胞皮下移植腫瘍において、抗 EpCAM 抗体とコラーゲン 4 抗体は同程度に腫瘍内に集積し、長時間とどまることも判明した。コラーゲン 4 は正常組織にも分布するが、抗体は高分子であるために正常血管からは容易に漏出しないが、腫瘍血管からは容易に漏出することも明らかにした。SN-38 を付加した SN-38/コラーゲン 4 抗体複合体は SN-38/EpCAM 抗体複合体よりも有意に高い抗腫瘍効果をもたらした。

### D. 考察、

SN-38 はそもそも、その抗腫瘍効果が時間依存性である。NK012 のように、選択的腫瘍集積性が高く、また、長時間徐放的にミセル内の低分子抗がん剤をリリースし、腫瘍内全体に長時間 SN-38 の分布を維持する DDS 製剤は抗腫瘍メカニズムの理にかなっていると考える。ただし、高分子故に、Av との併用は Av が腫瘍血管透過性を抑えるので、マイナスに働くと考えた。

本研究では肺がんでは NK012/Av が NK012 単独より抗腫瘍効果は高かったが、同所移植脳腫瘍では NK012 と NK012/Av では抗腫瘍効果に有意差はなかった。薬理的には Av の併用が脳腫瘍同所移植では NK012 の腫瘍内集積を抑制するという結果であったので、このことが Av の抗腫瘍直接効果を相殺するということが示唆された。DDS 製剤と Av をはじめとする血管透過を抑えたり、血管そのものを破壊する薬剤との併用においては注意を要する。

がん関連間質に対する抗体を利用したターゲティング方法は、始まったばかりであるが、がん細胞を直接狙ういわゆるミサイル治療を凌駕する可能性が示唆された。今後間質分子の選定、抗がん剤の選定、抗がん剤と抗体との結合方法など詳細な検討をしていく必要がある。

#### E. 結論

ミセルに関しては今後、本研究で得られた知見をもとに併用療法の臨床開発をすすめるべきである。がんが間質ターゲット治療に関しては、がん治療のパラダイムシフトにつながると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsumura Y, Kataoka K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci.* 2009 Apr;100(4):572-9.
2. Matsumura Y. NK012. *Drugs of the Future.* 2009;34(4):276-81.
3. Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Koga Y, Saito Y, Matsumura Y. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer.* 2009 Jun 1;124(11):2505-11.
4. Nagano T, Yasunaga M, Goto K, Kenmotsu H, Koga Y, Kuroda J, Matsumura Y. et al. Antitumor activity of NK012 combined with cisplatin against small cell lung cancer and intestinal mucosal changes in tumor-bearing mouse after treatment. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 1;15(13):4348-55.
5. Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Koga Y, Kenmotsu H, Sugino T, Matsumura Y. et al. Antitumor effect of NK012, a 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-incorporating polymeric micelle, on U87MG orthotopic glioblastoma in mice compared with irinotecan hydrochloride in combination with bevacizumab. *Clin*

Cancer Res. 2009 Jan 15;16(2):521-9.

6. Saito Y, Yasunaga M, Kuroda J, Koga Y, Matsumura Y. Antitumour activity of NK012, SN-38-incorporating polymeric micelles, in hypovascular orthotopic pancreatic tumour. Eur J Cancer. 2009 Feb;46(3):650-8.

7. Nagano T, Yasunaga M, Goto K, Kenmotsu H, Koga Y, Kuroda JI, Matsumura Y. et al. Synergistic antitumor activity of the SN-38-incorporating polymeric micelles NK012 with S-1 in a mouse model of Non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2009 Mar 2.

8. H Kenmotsu MY, J Kuroda, Y Koga, A Takahashi, T Nagano, K Goto, Y Nishiwaki, Y Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. Cancer. 2010;in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

## 難治ガン治療のための高分子ミセル型ナノキャリアの開発

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授

本研究では、難治ガンの標的治療を目的として、高分子ミセル型ナノキャリアの最適化と高機能化を目指している。前年度までにオキサリプラチン中間活性体 DACHPt を内包した高分子ミセルがオキサリプラチン耐性大腸がん (HT29/ox) に対して優れた薬効を示すことが確認された為に、本年度はそのメカニズム検証を行った。その結果、DACHPt 内包ミセルは HT29/ox で過剰発現が認められるメタロチオネイン等による細胞質内での解毒作用を回避でき、それによって高い薬効を示すことが示唆された。

### A. 研究目的

親水性高分子と疎水性高分子が連結されたブロック共重合体は、水中で自律的に会合し粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを形成する。高分子ミセルは、内核に制ガン剤などの疎水性薬剤を内包させることができ、表面が生体適合性の PEG で覆われているために生体内で異物として認識されず血中を長期滞留することができる。さらに、高分子ミセルは、Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果(腫瘍では血管壁の透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築によって高分子物質が集積しやすい環境が形成されている効果)によって固形ガンに選択的に集積し、優れた制ガン活性を示すことが実証されている。このような高分子ミセル型 DDS は、これまでに制ガン剤アドリアマイシン、タキソール、シスプラチン、SN-38 を内包したシステムの臨床治験が国内外で

実施されており、ガン標的治療において有望なキャリアであると考えられている。

そこで本研究では、高分子ミセルを構成するブロック共重合体の最適化と機能の創り込みによって、従来型ミセルと比較して高機能化された高分子ミセルを構築し、転移ガンなどの難治ガンの治療を実現することを目指している。本研究では、前年度までにオキサリプラチン中間活性体 DACHPt を内包した高分子ミセルがオキサリプラチン耐性大腸がん (HT29/ox) に対して優れた薬効を示すことが確認された為に、本年度はそのメカニズム検証を行った。

### B. 研究方法

1) 二重蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの構築と細胞内動態解析

細胞内におけるミセルの局在と崩壊を解明するために、PEG-poly(L-glutamic acid)[PEG-P(Glu)]ブロック共重合体の PEG 末端および P(Glu)末端のそれぞれに Bodipy FL および Bodipy TR を導入した。このようにして合成された Bodipy FL-PEG-P(Glu)-Bodipy TR と DACHPt を[DACHPt]/[Glu]=1 で反応させることによって、約 30nm の蛍光標識 DACHPt 内包ミセルを構築した。本システムでは、ミセル内核で Bodipy TR が濃度消光を示すために、ミセル状態におい

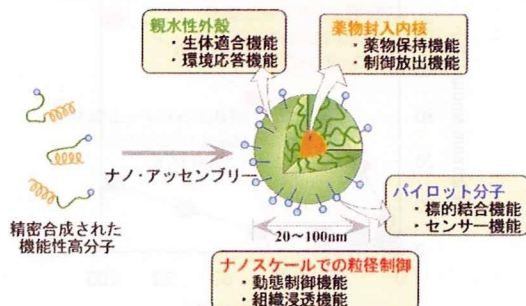


図 1. 高分子ミセル型 DDS の概念図

では Bodipy FL のみが蛍光を発するが、ミセルの崩壊によって Bodipy TR の蛍光が増大するために、ミセルの局在と崩壊を同時に評価することが可能である。次に調製した蛍光標識 DACHPt 内包ミセルをヒト大腸がん HT29 細胞と培養し、細胞内における Bodipy FL と Bodipy TR の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss confocal LSM510 microscope) により評価した。

2) 細胞内環境におけるミセルからの DACHPt のリリース評価

DACHPt 内包ミセルを初期エンドソーム、後期エンドソーム/リソソーム環境と同じ pH、Cl<sup>-</sup>濃度の緩衝液中で、透析を行い、外液中の Pt 量を ICP-MS によって定量した。

3) 細胞内および DNA 結合 Pt 量の定量

DACHPt 内包ミセルと HT29 細胞を 6-24 時間培養し、培地交換後に細胞溶解液および DNA を回収した。その後、細胞溶解液および DNA に含まれる Pt 量を ICP-MS によって定量した。

4) HT29 細胞および HT29/ox 細胞における metallothionein (MT1Q), methionin synthase (MTR) の遺伝子およびタンパク質発現解析

前年度に実施したがん細胞パネルを用いた DACHPt 内包ミセルの薬効試験において、得られた 50%増殖阻止濃度(IC50)値と Pt 制がん剤の薬効関連遺伝子の発現量の関係を NCI データベースのデータを基に解析した結果、オキサリプラチンの薬効と MT1Q と MTR の発現量は逆相関の関係にあり、DACHPt 内包ミセルの薬効はそれらの分子の発現量と関係しないことが明らかになった。そこで、本項目では、HT29 細胞および HT29/ox 細胞における MT1Q, MTR 遺伝子およびタンパク質発現量をそれぞれリアルタイム PCR および Western blotting により評価した。

5) 蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの in vivo 挙動の解析

蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの血流中における安定性を生きたままのマウスの耳介における動脈および静脈内の蛍光を共焦点顕微鏡により評価した。

## C. 研究結果

1) 蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの細胞内動態解析

蛍光標識 DACHPt 内包ミセルと HT29 細胞と培養し、細胞内における Bodipy FL と Bodipy TR の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により評価した(図 2)。その結果、Bodipy FL の蛍光は 6 時間後より確認されたが、Bodipy TR の蛍光は 24 時間後から確認され、時間の経過に伴って強度が増大した。この結果より、DACHPt 内包ミセルはミセルの状態 で細胞内に取り込まれ、細胞内環境で解離するものと考えられる。

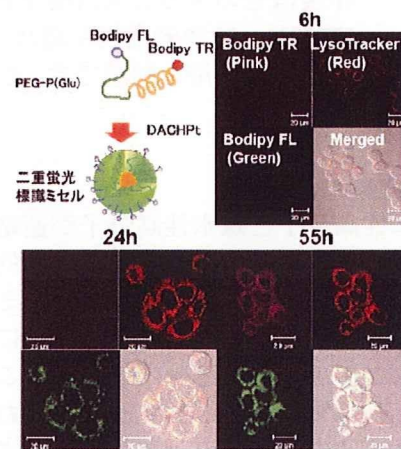


図 2. HT29 細胞における二重蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの蛍光変化

2) 細胞内環境におけるミセルからの DACHPt のリリース評価

初期エンドソーム、後期エンドソーム環境下におけるミセルからの DACHPt のリリースを評価した(図 3)。その結果、初期エンドソーム条件下と比較して後期エンドソーム環境下で効率的にミセルから DACHPt がリリースされることが明らかになった。

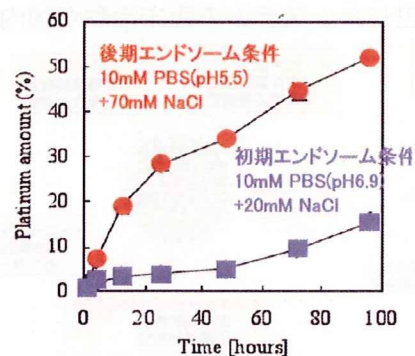


図 3. DACHPt 内包ミセルからの Pt のリリース評価

### 3) 細胞内および DNA 結合 Pt 量の定量

オキサリプラチンおよび DACHPt 内包ミセルを HT29 細胞と 6-24 時間培養し、細胞溶解液および DNA に含まれる Pt 量を定量した(図 4)。その結果、細胞溶解液中の Pt 量はオキサリプラチンの方が DACHPt 内包ミセルよりも高い値を示したが、DNA 中の Pt 量に関しては差が認められなかった。以上より、DACHPt 内包ミセルにおいては細胞内に取り込まれた DACHPt が効率的に DNA と結合していることが示唆された。

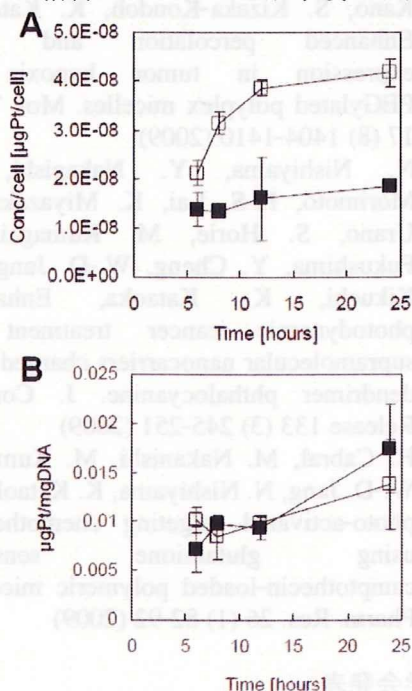


図 4. 細胞溶解液および DNA に含まれる Pt 量 (□: オキサリプラチン; ■: DACHPt 内包ミセル)

### 4) HT29 細胞および HT29/ox 細胞における MT1Q, MTR の発現解析

MT1Q, MTR 発現量をリアルタイム PCR および Western blotting により評価した。その結果、HT29/ox 細胞は、HT29 細胞と比較して有意に高い MT1Q, MTR の発現量を示すことが確認された(図 5)。

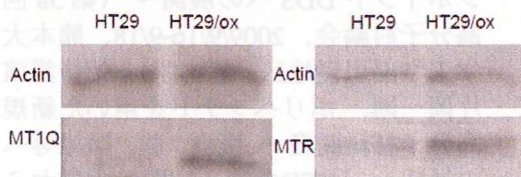


図 5. HT29 細胞および HT29/ox 細胞における MT1Q, MTR の発現 (Western blotting)

### 5) 蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの in vivo 挙動の解析

蛍光標識 DACHPt 内包ミセルの血流中における安定性を耳介における動脈および静脈内の蛍光の共焦点顕微鏡により評価した。その結果、投与 12 時間後の血中においても Bodipy FL 由来の蛍光のみが確認され、DACHPt 内包ミセルは血中で安定に存在することが明らかになった。

### D. 考察

前年度までに、DACHPt 内包ミセルがオキサリ耐性大腸がん (HT29/ox) に対して優れた薬効を示すことが確認された為、本年度はそのメカニズム検証を行った。図2においては、DACHPt 内包ミセルはミセルの状態では細胞内に取り込まれ、細胞内環境で解離することが示唆された。一方、図3においては、初期エンドソーム条件下と比較して後期エンドソーム環境下で効率的にミセルから DACHPt がリリースされることが確認された。これらの結果より、DACHPt 内包ミセルはミセルの状態ではエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、初期エンドソームでは DACHPt をリリースしないが、後期エンドソーム/リソソームで DACHPt をリリースし、最終的にはミセルが解離するものと考えられる。図4の Pt の細胞内取り込み量、DNA 結合量の評価では、DACHPt 内包ミセルはオキサリプラチンよりも低い細胞内取り込み量を示したが、DNA 結合量は同等であった。すなわち、オキサリプラチンは細胞膜中の拡散およびトランスポーターを介して細胞内に取り込まれるために、エンドサイトーシスによって取り込まれるミセルよりも効率的に細胞内に移行するものと考えられる。一方、DACHPt 内包ミセルは、細胞による取り込み量は低いが、内在化した DACHPt は効率的に DNA と反応していることが示唆された。この結果は、図2, 3において確認された DACHPt 内包ミセルが核近傍の後期エンドソーム/リソソーム環境で効率的な Pt のリリースを示すことにより説明される。さらに、前年度までの研究において、DACHPt 内包ミセルがオキサリプラチンよりも優れた薬効を示した要因として、

細胞質内の白金の解毒機構を担っているMT1Q, MTR遺伝子の関与が示唆された為、図5では、HT29細胞およびHT29/ox細胞におけるMT1Q, MTRの発現量解析を行った。その結果、HT29/ox細胞において、MT1Q, MTRの発現が亢進していることが確認され、DACHPt内包ミセルは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソーム環境で選択的にDACHPtがリリースすることにより細胞質内の解毒機構を回避していることが示唆された。また、このような細胞小器官レベル薬剤デリバリーにおいては、ミセルがその形態を維持した状態で患部に到達することが必要とされるが、本研究では、蛍光標識DACHPt内包ミセルの血流中における安定性を耳介における動脈および静脈内の蛍光の共焦点顕微鏡により評価した。その結果、投与12時間後の血中においてもDACHPt内包ミセルは血中で安定に存在することが明らかになった。

#### E. 結論

本年度は、DACHPt内包ミセルの優れた制ガン効果のメカニズムについて詳細な検討を行った。その結果、DACHPt内包ミセルは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソーム環境で選択的にDACHPtをリリースすることにより細胞質内の解毒機構を回避していることが示唆された。この結果は、DDSによって薬効を高めることができることを示唆する結果であり、DDSの新しい可能性を示している。今後、リガンド分子の導入などのDDSキャリアの機能修飾によって、細胞内取り込みと細胞内薬剤分布を制御することにより、さらに薬効に優れたDDS製剤の創製が可能となるものと思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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)

2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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

(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**

1. 片岡一則, 宮田完二郎, 西山伸宏, 石井武彦, 呉寿榮, 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

## 厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

### 分担研究報告書

#### 新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

分担研究者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：樹状細胞（DC）を用いたがん免疫療法は、がんの転移・再発の予防をも可能とする新規がん治療戦略として期待されている。これまでに我々は、超音波によるバブルリポソームのキャビテーションを利用した DC への新規抗原送達法を開発した。そこで本方法のがん転移に対する有効性を評価するため、メラノーマ細胞由来抗原を送達した DC の免疫したところ、メラノーマ細胞の肺転移抑制効果を得ることができた。このことより、本システムが、がんの転移・再発の予防をも可能とする有用な抗原送達法であることが示唆された。

#### A. 研究目的

現在のがん治療において、外科的療法が多く行われているが、がん転移が術後の予後を悪化させる要因となっており、がん転移に対する治療法の確立が急務とされている。手術時には細胞レベルで転移が起きてしまっていることもあり、このような微小転移を根絶することが重要とされている。このような観点から、樹状細胞（DC）がん免疫療法が、がんの転移に対して有効ではないかと期待されている。しかし、DC に抗原を作用させるだけでは、DC への抗原送達が不十分であり主なエフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞（CTL）を効率よく誘導できない。そこで我々は、超音波によるバブルリポソームのキャビテーションを利用した DC への新規抗原送達法を開発した。本研究では、本送達技術のがん転移予防効果に対する有効性を評価した。

#### B. 研究方法

##### バブルリポソームと超音波の併用による DC への抗原送達効率の評価

アジ化ナトリウムにてエンドサイトーシス経路を阻害したマウス骨髄由来 DC に Alexa633 で蛍光ラベルしたメラノーマ (B16BL6) 細胞由来膜抗原 (Alexa-B16BL6) (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とバブルリポソーム (240  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、Sonopore 4000 により超音波照射 (2  $\text{W}/\text{cm}^2$ , 10 秒 3 回) した。その後、DC への抗原送達効率をフローサイトメトリーにて解析した。

##### バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達した DC の免疫による肺転移抑制効果の検討

マウス骨髄由来 DC に抗原としてメラノーマ (B16BL6) 細胞由来膜抗原 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とバブルリポソーム (240  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、Sonopore 4000 により超音波照

射 (2 W/cm<sup>2</sup>, 10 秒 3 回) した。この DC を 1 週間隔で 2 回背部皮内に免疫し、最終免疫から 1 週間後にマウスメラノーマ細胞である B16BL6 細胞を尾静脈より投与した。2 週間後に摘肺し、肺転移コロニー数を指標に肺転移抑制効果を評価した。

### C. 研究結果

#### バブルリポソームと超音波の併用による DC への抗原送達効率の評価

エンドサイトーシスを阻害した DC に Alexa-B16BL6 をそのまま作用させても DC への抗原送達は認められなかった。一方、バブルリポソームと超音波の併用により Alexa-B16BL6 を送達することで、Alexa-B16BL6 が DC に効率よく送達されることが判明した (図 1)。このことから、バブルリポソームと超音波の併用はエンドサ

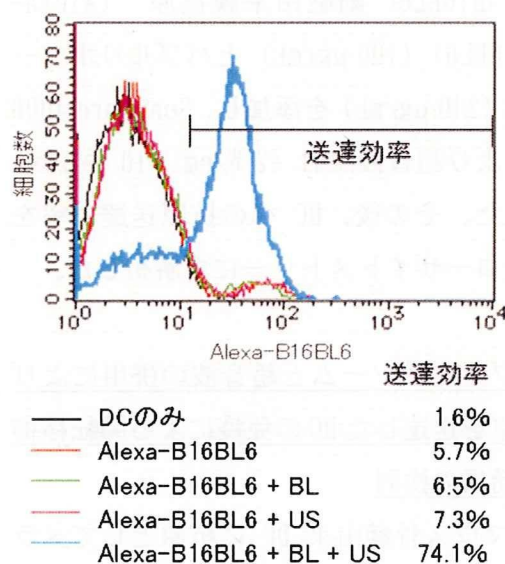


図1 バブルリポソームと超音波の併用による DC への抗原送達効率

イトーシスを介さず DC に Alexa-B16BL6 を送達できる方法であることが示された。

#### バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達した DC の免疫による肺転移抑制効果の検討

バブルリポソームと超音波の併用によりマウスメラノーマ細胞である B16BL6 細胞由来膜抗原を送達した DC を免疫することで、B16BL6 細胞の顕著な肺転移抑制が確認された (図 2)。これは、バブルリポソームと超音波の併用により B16BL6 細胞由来膜抗原送達した DC の免疫により、B16BL6 細胞特異的な抗腫瘍免疫が活性化されたためであると考えられた。

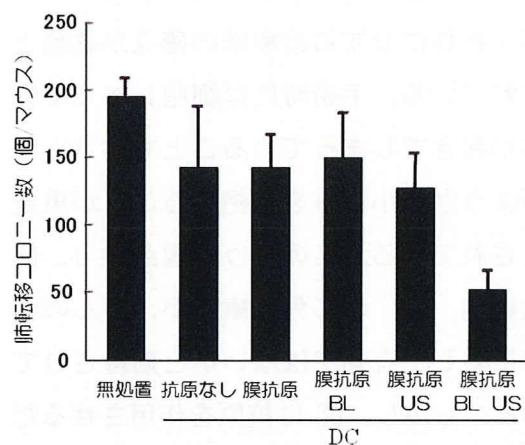


図2 バブルリポソームと超音波の併用により抗原を送達した DC の免疫による肺転移抑制効果

### E. 結論

バブルリポソームと超音波の併用は、実際のがん関連抗原を DC に効率よく送達できた。この DC を免疫することで強