

201011001B

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～22年度 総合研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成23（2011）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

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～22年度 総合研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成23（2011）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. 研究成果の刊行に関する一覧表

13

IV. 研究成果の刊行物・別刷

16

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（総合）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, GBM)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有効性を検証し、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。本研究では、この目的を達成するために、(i)高分子ミセル表面への腫瘍血管からがん組織への移行性を高めるリガンド分子の導入と(ii)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の二つの戦略に関して検討を行った。(i)に関しては、腫瘍血管に特異的に結合する環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築し、そのヒトGBM由来U87MG細胞の同所移植モデルに対する有効性を明らかにした。一方、本研究では、より臨床におけるGBMに類似した特徴を有するGBMモデルとして、内皮細胞が α SMA陽性のpericyteで覆われた血管構造を有するマウスGBM由来SR-B10.A細胞の同所移植モデルを確立した。この特徴的な血管構造の臨床的意義に関して、予後情報の判明しているヒトグリオーマ手術摘出病理標本を用いて検討を行ったところ、SR-B10.A腫瘍に見られる α SMA陽性血管周囲細胞の存在程度が高い症例ほど全生存期間が短いことが示された。そこでSR-B10.A脳腫瘍モデルに対して、(ii)のDACHPt内包ミセルとTGF- β 阻害剤の併用治療の可能性を検討したところ、ミセルのがん組織への集積性の向上と腫瘍縮小効果が認められた。

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、研究代表者の片岡と分担者の西山が所属する東京

大学大学院・医学系臨床医工学部門において、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の脳腫瘍モデルに対する治療効果を検証し、東大院・医学系分子病理学(狩野)でDDSの有効性検証のための組織学的評価を行ってきた。さらに北大院・医学系研究科病理学(西原)は、これらの研究成果を臨床へと繋げるために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証を行った。



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. 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ヒト膠芽腫(glioblastoma) U87MG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。

2. cRGD ペプチド搭載 DACHPt 内包ミセルの U87MG 腫瘍に対する制がん活性評価

ヒト glioblastoma U87MG 細胞を BALB/c ノードマウス(♀,6週齢)の皮下に注入することによって U87MG 細胞皮下移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、4mg/kg の DACHPt 換算の DACHPt 内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4 日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。

一方、U87MG 細胞の同所移植モデルに関しては、U87MG 細胞を脳室内に直接注入することによって作製した。このマウスに対して、3mg/kg の DACHPt 換算の DACHPt 内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4 日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。腫瘍体積の測定は、7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)によるMRI撮像によって行った。

3. ヒト脳腫瘍標本における血管構築の解析

本項目では、実際のヒト脳腫瘍標本における血管構築を免疫染色及び電子顕微鏡により検討することで、まずDDSの観点から見た脳腫瘍の特徴を把握することを計画した。

具体的には、比較的抗癌剤への感受性があり予後良好とされているOligodendrogliomaと、抗癌剤感受性が低く予後も不良である、Astrocytic tumorの血管パターンの比較を行った。用いた検体は、当教室にて過去に診断がなされた脳腫瘍切除病理標本20例を用い、免疫染色(血管内皮マーカー; CD31、CD34、壁細胞マーカー; α SMA、Desmin、PDGFR β 、TGF β シグナルの検出;

phospho-Smad2)、及び透過型電子顕微鏡による観察を行った。

4. ヒト脳腫瘍症例の血管パターンと予後との相関の解析

実際のヒト神経膠腫症例の検鏡を行って血管パターンを分類し、その予後を比較することで、血管構築と臨床予後の相関を検討する。具体的には、当教室でGrade IIIまたはIVと診断された悪性神経膠腫55例において、通常のHE染色に加えて α SMA、PDGFR β 、CD31の免疫染色を行い、血管構築から下記の3群に分類した。

G群: 血管の80%以上をGlomeruloid vesselが占める群

C群: 血管の80%以上をChicken wire patternが占める群

GC群: G群とC群の中間

その上で、各群の生存曲線を作成した。染色に用いた抗体は以下表1の通り。

表1. 免疫染色に用いた抗体の一覧

抗体名	メーカー	clone	免疫動物	希釈倍率	抗原賦活化処理
CD31	abcam	Polyclonal	Rabbit	1:100	Target Retrieval Solution, pH 9.0 125°C 10min
actin	Dako Japan	1A4	Mouse	1:100	無処理
desmin	Dako Japan	D33	Mouse	1:100	Dako REAL™ Target Retrieval Solution 125°C 10min
PDGFR β	C-ell Signaling Technology	C82A3	Rabbit	1:150	Target Retrieval Solution, pH 9.0 95°C 温浴 30min

(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当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限の配慮をした。

5. 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(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) に関しての免疫染色を行い、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、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。

6. マウスGBMモデルに対するTGF-β阻害剤の併用効果の検証

マウスglioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルにおいては、蛍光標識ミセルの集積性が著しく低下していることが確認されたために、本項目では、研究分担者の狩野らによって見出された内皮細胞がαSMA陽性のPericyteで被覆された腫瘍血管の透過性を一過的に高めることができるTGF-β阻害剤の併用効果を検討した。解析の病理学的方法論としては、マウスから摘出した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 once 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。

さらに、本項目では、SR-B10.A同所移植モデルに対するDACHPt内包ミセルとTGF-β阻害剤の併用によるがん治療効果をMRIにより検証した。MRI撮影については、7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)を使用した。

C. 研究結果

1. 環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルの開発

はじめに、N₃-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N₃-PEG-*h*-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α_vβ₃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α_vβ₃インテグリンの相互作用が示唆された。さらに、U87MG細胞に対するDACHPt内包ミセルの細胞毒性を評価した結果、オキサリプラチン、リガンドなしDACHPt内包ミセルおよび環状RGD導入DACHPt内包ミセルの3時間接触後の細胞毒性(50%細胞増殖阻止濃度(IC₅₀)は、それぞれ60、>373、102 μMであった。この結果より、cRGD導入DACHPt内包ミセルはα_vβ₃インテグリンへの結合を介してU87MG細胞に効率的に取り込まれ、リガンドを導入していないミセルよりも高い細胞毒性を示したものと考えられる。

2. cRGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルのU87MG腫瘍に対する制がん活性評価

オキサリプラチン、リガンドなしDACHPt内包ミセルおよびcRGD搭載DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性をFig.2に示す。この結果より、オキサリプラチンとリガンドなしDACHPt内包ミセルは有意な制がん活性を示さなかったが、環状RGD導入DACHPt内包ミセルは顕著な制がん活性を示すことが確認された(P<0.05)。

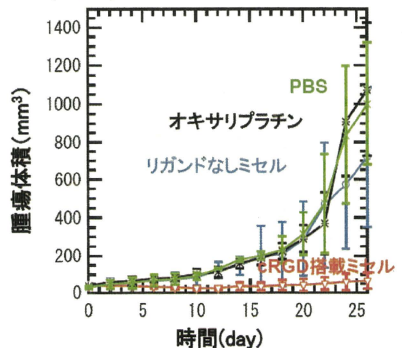


図2. 環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性

一方、cRGD搭載DACHPt内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性をMRIによって評価した結果を図3に示す。この結果より、環状RGD導入DACHPt内包ミセルは、無処置群と

比較して腫瘍体積を1/6に抑制することが確認された。

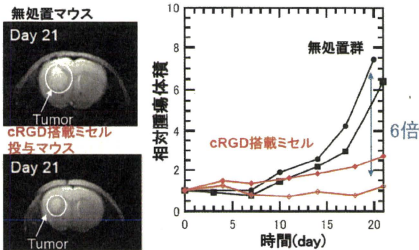


図3. 環状RGD導入DACHPT内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性

3. ヒト脳腫瘍標本における血管構築の解析

① ヒト脳腫瘍病理検体の免疫染色

Astrocytic tumorの代表であるGlioblastoma (GBM)では、従来血管内皮の増生からなるとされているglomeruloid vesselという肥厚血管を認める。一方、oligodendroglial tumorでは、Chicken wire vascular networkと呼ばれる細い血管網の発達が特徴である。まずこれらの血管構造を免疫組織化学的に検討し、構成細胞の同定を行った。

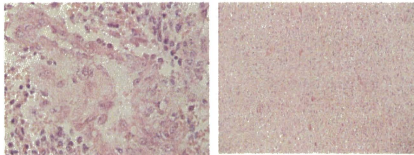


図4. 左がGlomeruloid血管、右がChicken wire血管

その結果、Glomeruloid vesselを構成する細胞の大部分は、 α SMA陽性、PDGFR β 陽性の、いわゆるPericyteが大部分で、CD34陽性の血管内皮細胞は血管内腔を1層覆うのみで、増生は顕著ではなかった(図5参照)。

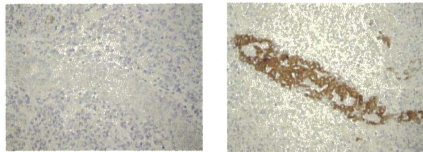


図5. 左は血管内皮 (CD34)、右はPericyte (Actin) 大部分はActin陽性のPericyteで構成されている。

一方、Chicken wire vascular networkを構成する細い血管については、一層の血管内皮 (CD34陽性)の外層に、一層のPDGFR β 陽性の薄いPericyteが見られるが、この細胞には α Actinは陰性であった(図6)。

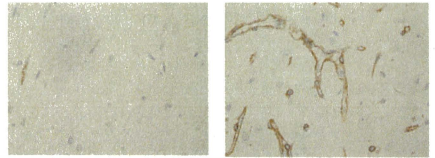


図6. Chicken wire 血管の染色。左は α SMA、右はPDGFR β 。

以上の結果から、両者の血管壁には、Pericyteの量の違いと同時に、 α Actinの染色性という質的な違いが認められることが判明した。これは今までには報告されていない事項である。

② 電子顕微鏡による脳腫瘍特異的血管の観察

上記で認められたPericyteの質的差異の原因を探索するために、電子顕微鏡による観察を行った。用いた資料は、ホルマリン固定病理検体をグルタルアルデヒドで再固定したものである。その結果、Glomeruloid血管に見られる肥厚したPericyteには、不規則なFilamentが多数認められたのに対して(図7)、Chicken wire血管のPericyteではそのようなFilamentは全く認められなかった(図8)。このFilamentが α Actinの染色性の差異の原因になっていることが示唆された。これは、Pericyteの成熟度を表している可能性が考えられる。すなわち、Glomeruloid血管のPericyteは比較的成熟し、Actin線維を形成しているが、Chicken wire血管のPericyteは未熟あるいは未分化な細胞で、Actin線維の合成を行っていない、ということが想定される。

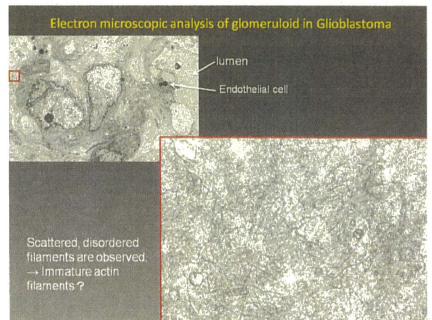


図7. Glomeruloid血管の電子顕微鏡像

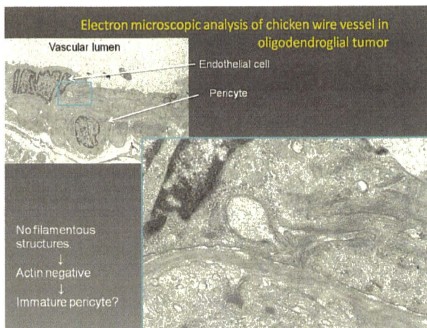


図8. Chicken wire血管の電子顕微鏡像

4. ヒト脳腫瘍症例の血管パターンと予後との相関の解析

55例の分類の結果と、各グループの診断の内訳を表2に示す。3群はほぼ均等に分類された。

表2. ヒト脳腫瘍症例の内訳

	Total	AO	AOA	GBM with oligo	AA	GBM
C群	18	5	7	1	5	0
GC群	20	3	3	1	1	12
G群	17	0	1	3	1	12
Total	55	8	11	5	7	24

AO: anaplastic oligodendroglioma,
AOA: anaplastic oligoastrocytoma,
GBM: glioblastoma, AA: anaplastic astrocytoma

次に、各グループの生存曲線を図9に示す。その結果、Chicken wire patternの血管を殆ど持たない群(G群)は、20%以上の割合でChicken wire patternの血管を有する群(GC + C群)に比して、有意に予後不良であることが判明した。尚、この結果を、これらの解析に用いた母体となる症例群における従来のWHO gradingによる予後曲線と比較すると、Grade IIIとIVに相当する差異が認められることが判明し、Chicken wire vascular networkの存在が予後良好因子となることが示唆された。

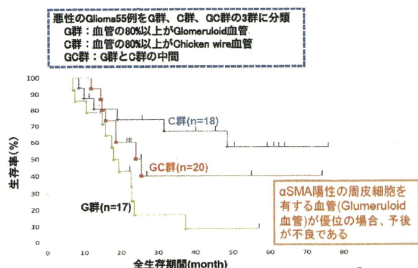


図9. 悪性神経膠腫55例における血管パターンに

よる分類と生存曲線

5. 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-B10.A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-B10.A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見出されており(図5, 6)、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)、pericyteのマーカーであるαSMAの免疫染色も行った(図10)。その結果、マウスグリオーマSR-B10.A細胞は厚いpericyteは存在しないが、PECAM-1陽性の内皮細胞がαSMA陽性のpericyteで覆われた構造を有しており、さらにtight junction分子を発現していることから、血液-脳腫瘍関門(BTB)を再現した脳腫瘍モデルとなるものと考えられた。

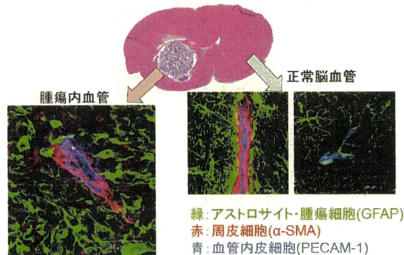


図10. マウスGlioblastoma SR-B10.A細胞の同所移植モデルの解析

そこでSR-B10.A細胞の同所移植モデルマウスに対して蛍光標識DACHPt内包ミセルを全身投与し、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-B10.A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-B10.A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、SR-B10.A細胞の同所

移植モデルは、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。

6. マウスGBMモデルの解析とTGF-β阻害剤の併用効果の検証

上述のようにマウスglioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルは、Glomeruloid血管と同様なαSMA陽性のpericyteで被覆された血管を有しており、さらに蛍光標識ミセルの集積性が著しく低いことから、本モデルはヒト膠芽腫のモデルとしての妥当であることが示唆された。すなわち、本モデルに対して高分子ミセルによる標的治療を実現するためには、血管の透過性を向上させる試みが必要であるものと考えられた。そこで本研究では、SR-B10.A腫瘍と同様に内皮細胞がpericyteで覆われた血管構造を有する膝臓がんモデルにおいて腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることが確認されているTGF-β阻害剤 (M. R. Kano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 3460-3465 (2007)) の併用効果の検討を行った。

まず、SR-B10.A同所移植モデル動物に対して、TGF-β阻害剤LY364947を1mg/kg投与し、その24時間後に動物を犠牲死させ、脳を摘出して解析を行った。ここでは、血管内皮細胞と認識されるPECAM1陽性細胞と、血管壁細胞と認識されるSMA陽性細胞を、共染色により同時に解析した。この結果、過去の報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2007)) における膝癌モデル組織におけるTGF-β阻害剤投与後の血管構築の変化と同様に、SMA陽性の周皮細胞に被覆された血管の割合が、TGF-β阻害剤の投与によって低下することが示された(図11)。

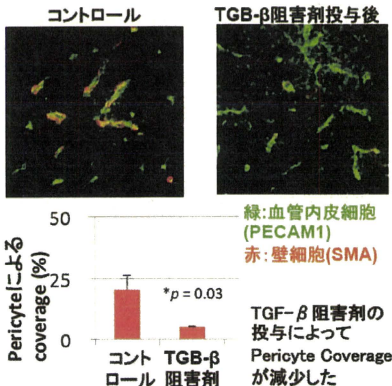


図11. TGF-β阻害剤によるSR-B10.A同所移植モデルにおける血管構築の変化

次に、SR-B10.A同所移植モデルにTGF-β阻害剤を投与した時のミセルのがん集積性の変化を検討した。その結果、蛍光色素で標識したDACHPt内包ミセルの投与24時間後におけるがん集積性が向上することが確認された(図12)。

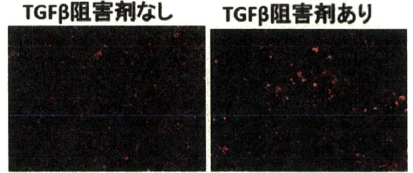


図12. TGF-β阻害剤によるSR-B10.A同所移植モデルにおける蛍光標識ミセルの集積性の変化

これらの結果に基づいて、SR-B10.A同所移植モデルに対するDACHPt内包ミセルの治療効果をMRIにより検証した(図13)。その結果、無治療個体に対しては、腫瘍増殖の抑制効果と、生存の延長が認められた(図14)。治療個体は治療開始後30日以上生存したのに対して、無治療個体は10日で死亡した。

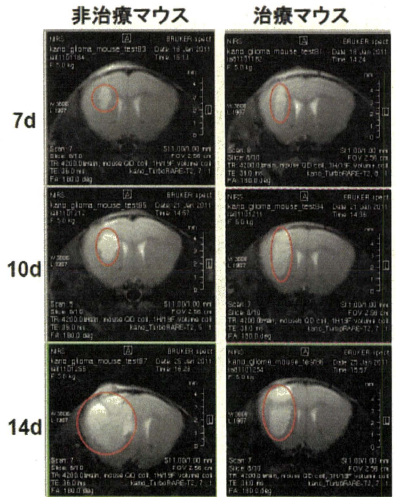


図13. TGF-β阻害剤とDACHPt内包ミセルの併用治療後のSR-B10.A同所移植モデルのMRI

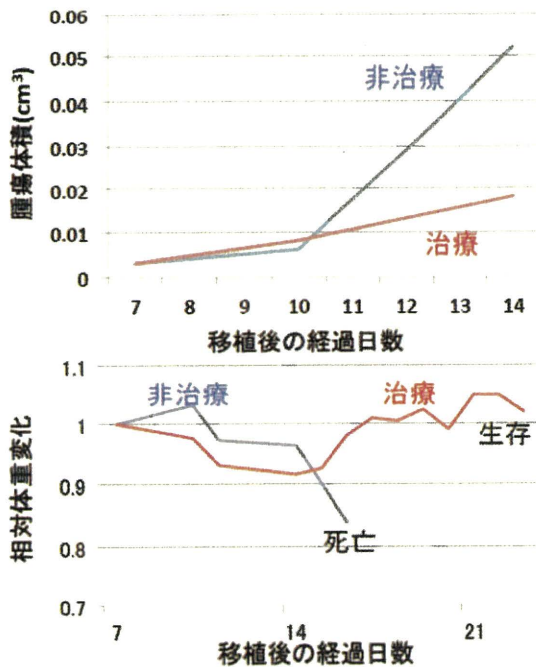


図14. TGF-β 阻害剤とDACHPt内包ミセルの併用治療後の腫瘍体積と体重変化

D. 考察

近年、がん治療におけるDDS製剤の有用性が明らかにされている。これらのDDSは、腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因するがん集積効果(EPR効果)を利用しているが、膠芽腫(glioblastoma, GBM)に代表される悪性脳腫瘍においては血液-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Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果を超越した新しいデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、我々が開発を進めている高分子ミセル型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、DDSのがん集積性を高めることのできるリガンド分子の導入や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に基づく新規治療戦略の開発を行い、悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法を確立することを目指して研究を展開してきた。

このような目標を達成するために、本研究では、研究代表者の片岡と分担者の西山が所属する東京大学大学院・医学系臨床医工学部門において、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の脳腫瘍モデルに対する治療効果を検証し、東大院・医学系分子病理学(狩野)で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)は、これらの研究成果を臨床へと繋げるために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証を行ってきた。

本研究では、オキサリプラチン活性体

(DACHPt)内包ミセルにリガンド分子を導入した高分子ミセルの開発を行ってきた。H21年度においては、腫瘍血管の内皮細胞ならびにがん細胞で過剰発現が認められる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築し、H22年度にヒトGBM由来のU87MG細胞に対してリガンド導入による細胞毒性の増強ならびに皮下移植がんに対するin vivo制がん活性の向上を確認することができた。さらに、U87MG細胞の同所移植モデルにおいても環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルは有効性を示すことが確認された。

一方、本研究では、臨床のGBMに近い血管構造(CD34陽性内皮細胞+ α -smooth muscle actin (SMA)陽性・Desmin陰性周皮細胞)を有するモデルとしてマウスGBM由来SR-B10.A細胞の同所移植モデルを用いた検討も行ってきた。このような血管構築の差の臨床的意義に関して、予後情報の判明しているヒトグリオーマ手術摘出病理標本を用いて検討を行った。悪性脳腫瘍のうち、Astrocytic tumorは予後不良で、Oligodendroglial tumorは比較的予後良好と言われているが、その理由は腫瘍細胞自体の特性によるのか、あるいはその背景組織にあるのかについては全く定説がない。H21年度の研究の結果から、両者間の背景には大きな血管構造の差異が認められ、周皮細胞の量や特性が抗癌剤の浸透性に影響していることが示唆された。さらにH22年度の研究の結果、これらの血管パターンに応じて、実際の脳腫瘍組織を分類し、その治療成績・予後との相関を検討したところ、Oligodendroglial tumorに多く見られるChichen wire vascular patternを有する症例は予後が良好であることが判明し、我々の仮説を証明することとなった。従って、脳腫瘍特異的血管と治療抵抗性のメカニズムを解明することの重要性を確認することが出来たと同時に、これらの血管壁を構成しているpericyteの機能を解明することで、新たな薬物治療戦略を築くことの必要性が示唆された。そこで、本研究では、SR-B10.A脳腫瘍モデルに対して、腫瘍血管のpericyteに特異的に作用し、内皮細胞のpericyteによる被覆を減少させることによって血管の物質透過性を高めることが確認されているTGF-β阻害剤(M. R. Kano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 3460-3465 (2007))の併用効果の検討を行った。この原理は、TGF-β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り、本研究では阻害剤としてTGF-β受容体(ALK5, TGF-β 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- β 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。本研究では、DACHPt内包ミセルにTGF- β 阻害剤を併用し、ミセルのがん組織への蓄積と治療効果を検討した。その結果、TGF- β 阻害剤の併用により、DACHPt内包ミセルのがん組織に集積することが確認された。そこで、DACHPt内包ミセルとTGF- β 阻害剤を2日おきに3回併用投与し、MRIによって治療効果を検証したところ、治療個体において腫瘍縮小効果が認められた。さらに、TGF- β 阻害剤の投与による血管構築への変化について解析したところ、これまで報告されている通り、内皮細胞は変化しないまま血管壁細胞の減少が認められ、この効果を介した蓄積効果の増強であることが示唆された。

以上のように、本研究課題では、GBMをはじめとする実際のヒトの悪性脳腫瘍の組織構築を再現した正所性脳腫瘍モデルを構築し、そのモデルを用いて高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めるための新規治療戦略の開発を行ってきた。これらの研究成果は悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法の確立に繋がるものと考えられる。

E. 結論

本研究課題では、膠芽腫(glioblastoma, GBM)に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を目的として、3年間の研究を通じて、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有効性を検証し、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研究を行ってきた。特に、本研究では、この目的を達成するために、(i)高分子ミセル表面への腫瘍血管からがん組織への移行性を高めるリガンド分子の導入と(ii)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の二つの戦略に関して検討を行い、それらの有効性を明らかにすることができた。これらの研究成果は悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法の確立に繋がるものと考えられ、国民医療水準の向上に大きく貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

本研究課題は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. 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)

2. 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)
3. 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)
4. M. R. Kano, Y. Komuta, C. Iwata, M. Oka, Y. Shirai, Y. Morishita, Y. Ouchi, K. Kataoka, K. Miyazono, Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor- β receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci.* 100 (1) 173-180 (2009)
5. H. Ikushima, T. Todo, Y. Ino, M. Takahashi, K. Miyazawa, K. Miyazono, Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5(5) 504-514 (2009)
6. H. Nishihara, M. Nakasato, H. Sawa, H. Murakami, D. Yamamoto, K. Moriyama, N. Kato, I. Hashimoto, H. Kamada, S. Tanaka, A case of central nervous system lymphomatoid granulomatosis; characteristics of PET imaging and pathological findings. *J. Neurooncol.* 93(2) 275-278 (2009)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
 10. 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)
 11. Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)
 12. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)
 13. M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)
 14. 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)
 15. 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)
 16. K. Takahashi, H. Nishihara, M. Katoh, T. Yoshinaga, R. Mahabir, H. Kanno, T. Kimura, M. Tanino, J. Ikeda, Y. Sawamura, K. Nagashima, S. Tanaka, A case of atypical teratoid/rhabdoid tumor in an adult, with long survival. *Brain Tumor Pathol.* 28(1) 71-6 (2011)
 17. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
 18. 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* 149 (1) 51-57 (2011)
 19. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
 20. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
2. 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, 大阪, 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, 北海道, 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, 北海道, 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 回国際バイオフィォーラム, 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 回国際バイオフィォーラム, 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, 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, 愛知, 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, 愛知, 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, 長野, 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
 19. 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, 2009.7.4, 東京ドームホテル, 東京, 招待講演
 20. 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, 熊本大学工学部黒髪地区, 熊本県, 招待講演
 21. 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
 22. 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, タワーホール船堀, 東京, 招待講演
 23. 片岡一則, RNA 創薬のためのドラッグデリバリーシステム, CBI 学会第 307 回研究講演会, 2010.4.12, 東京大学山上会館, 東京, 招待講演
 24. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療, 第 39 回日本脳卒中の外科学会, 2010.4.16, 岩手県民会館, 岩手, 招待講演
 25. 片岡一則, 遺伝子治療実用化に向けた超分子ナノデバイスの創製, 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム, 2010.6.2, 北海道大学学術交流会館, 北海道, 招待講演
 26. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション, 第 2 回東京大学メディカルキューブシンポジウム, 2010.7.5, 東京大学鉄門記念講堂, 東京, 招待講演
 27. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション, 第 2 回東京大学メディカルキューブシンポジウム, 2010.11.29, グランドプリン

- スホテル広島, 広島, 招待講演
28. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション、東京大学医学部産婦人科研究会, 2010.12.11, 東天紅, 東京, 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, Alfandega 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
 14. K. Kataoka, Supramolecular Structures as Carriers in Gene and Drug Delivery ~Challenge to Smart Molecular Therapy~, Biomaterials Asia 2009, Regal Airport Hotel, Hong Kong, China, 2009.4.5, 招待講演
 15. K. Kataoka, Smart Nanocarrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery ~A Future for the Pharmaceutical Industry~, 2nd European Conference for Clinical Nanomedicine, Messe Schweiz, Hall l'Entree, Basel, Switzerland, 2009.4.27, 基調講演
 16. 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", The Congress Centrum Mainz, Mainz, Germany, 2009.6.7, 基調講演
 17. 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, Quinta da Marinha, Cascais, Lisbon, Portugal, 2009.6.12, 基調講演
 18. K. Kataoka, Supra-macromoleuclar Nanodevices for Smart Molecular Therapy, 73rd Prague Meeting on Macromolecules, PMM 2009, Prague, Czech Republic, 2009.7.5, 招待講演
 19. K. Kataoka, Nanotherapeutics through Polymer Chemistry ~Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery~, 2nd TERMIS World Congress, Lotte Hotel World, Seoul, Korea, 2009.8.31, 基調講演
 20. K. Kataoka, Supramoleuclar Nanocarriers for Gene and Drug Delivery ~Challenges to Intracellular Nanomedicine~, 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne,

- Switzerland, 2009.9.7, 基調講演
21. K. Kataoka, Interface Aspects of Polymeric Drug Delivery Systems~Challenges in Gene Delivery~, 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland, 2009.9.7, 招待講演
 22. K. Kataoka, Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (2nd Swiss-Japanese Symposium on Bionanotechnology, Aigle Castle, Switzerland, 2009.9.10, 招待講演
 23. K. Kataoka, Supra-molecular 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, Changchun, China, 2009.9.23, 招待講演
 24. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Block Copolymers for Smart Molecular Therapy, 2nd Aquitaine Conference on Polymers, Palais des Congres, Arcachon, France, 2009.10.13, 招待講演
 25. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 1st Annual Conference of the American Society for Nanomedicine, Bolger Center, Potomac, Maryland, USA, 2009.10.22, 基調講演
 26. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices for Nucleic Acid Delivery, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, Centennial Hall, Kyushu University Hospital Campus, Fukuoka, Japan, 2009.11.3, 招待講演
 27. K. Kataoka, Block copolymer micelles and vesicles as nanocarriers for gene and drug delivery, The 10th US-Japan symposium on Drug Delivery System, Lahaina, Maui, Hawaii, USA, 2009.12.16, 基調講演
 28. K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery. 3rd European Conference for Clinical Nanomedicine, Messe Schweiz, Hall L'Entree, Switzerland, 2010.5.10, 招待講演
 29. K. Kataoka, Smart micelles and vesicles from PEG-polypeptide block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery. 43rd IUPAC World Polymer Congress, Glasgow Science Centre, UK, 2010.7.15, 招待講演
 30. K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery. Gordon Research Conference on Drug Carriers in Medicine & Biology,

Waterville Valley Resort, Waterville Valley, USA, 2010. 8.17, 招待講演

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 片岡一則、他3名, Size Controlled Micelle of Plutonium Coordination Complex, 東京大学, 米国仮出願 1/225716, 出願日2009年7月16日

研究成果の刊行に関する一覧表

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
M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking.	Mol. Pharm.	5	1080-1092	2008
K. Miyata, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	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	2924-2936	2008
S. Takae, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors.	J. Am. Chem. Soc.	130	6001-6009	2008
M.R. Kano, K. Kataoka, et al.	Comparison of the effects of the kinase inhibitors, Imatinib, Sorafenib, and TGF- β receptor inhibitor, on extravasation of nanoparticles from neovasculature.	Cancer Sci.	100	173-180	2009
H. Ikushima, Y. Ino, et al.	TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors.	Cell Stem Cell	5	504-514	2009
H. Nishihara et al.	A case of central nervous system lymphomatoid granulomatosis; characteristics of PET imaging and pathological findings.	J. Neurooncol.	93	275-278	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Kumagai, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF-beta inhibitor.	J. Control. Release	140	306-311	2009
M. Han, N. Nishiyama, M. R. Kano, K. Kataoka, et al.	Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles.	Mol. Ther.	17	1404-1410	2009
Y. Lee, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm.	Angew. Chem. Int. Ed.	48	5309-5312	2009
S. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery.	Biomacromolecules	10	119-127	2009
Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography.	Biomed. Opt. Express	1	1209-1216	2010
S. Kaida, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model.	Cancer Res.	70	7031-7041	2010
M. Kumagai, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties.	Macromol. Rapid Commun.	31	1521-1528	2010
M. Oba, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1.	Mol. Pharm.	7	501-509	2010

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, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles.	Angew. Chem. Int. Ed.	49	2552-2555	2010
K. Takahashi, H. Nishihara, et al.	A case of atypical teratoid/rhabdoid tumor in an adult, with long survival.	Brain Tumor Pathol.	28	71-76	2011
F. Pittella, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity.	Biomaterials	32	3106-3114	2011
Y. Vachutinsky, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles.	J. Control. Release	149	51-57	2011
M. Murakami, N. Nishiyama, K. Kataoka, et al.	Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting.	Science Transl. Med.	3	64ra2	2011
M. Oba, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka et al.	Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery.	Biomaterials	32	652-663	2011

Polyplex Micelles with Cyclic RGD Peptide Ligands and Disulfide Cross-Links Directing to the Enhanced Transfection via Controlled Intracellular Trafficking

Makoto Oba,[†] Kazuhiro Aoyagi,[‡] Kanjiro Miyata,^{§,||} Yu Matsumoto,[⊥]
Keiji Itaka,[⊥] Nobuhiro Nishiyama,^{||,⊥} Yuichi Yamasaki,^{‡,||} Hiroyuki Koyama,[†] and
Kazunori Kataoka^{*,†,||,⊥}

Department of Clinical Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8655, Japan, Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan, Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan, Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan, and Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

Received June 24, 2008; Revised Manuscript Received September 16, 2008; Accepted September 23, 2008

Abstract: Thiolated c(RGDfK)-poly(ethylene glycol)-*block*-poly(lysine) (PEG-PLys), a novel block polymer that has a cyclic RGD peptide in the PEG terminus and thiol groups in the PLys side chain, was prepared and applied to the preparation of targetable disulfide cross-linked polyplex micelles through ion complexation with plasmid DNA (pDNA). The obtained polyplex micelles achieved remarkably enhanced transfection efficiency against cultured HeLa cells possessing $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors, which are selectively recognized by cyclic RGD peptides, demonstrating the synergistic effect of cyclic RGD peptide ligands on the micelle surface and disulfide cross-links in the core to exert the smooth release of pDNA in the intracellular environment via reductive cleavage. This enhancement was not due to an increase in the uptake amount of polyplex micelles but to a change in their intracellular trafficking route. Detailed confocal laser scanning microscopic observation revealed that polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands were distributed in the perinuclear region in the early stages preferentially through caveolae-mediated endocytosis, which may be a desirable pathway for avoiding the lysosomal degradation of delivered genes. Hence, this approach to introducing ligands and cross-links into the polyplex micelles is promising for the construction of nonviral gene vectors that enhance transfection by controlling intracellular distribution.

Keywords: Polymeric micelle; cyclic RGD peptide; disulfide cross-links; caveolae-mediated endocytosis

Introduction

As an alternative to viral gene vectors with intrinsic safety issues, there is a growing demand for nonviral gene

vectors.^{1,2} Despite this demand, nonviral gene vectors based on cationic lipids (lipoplexes) and cationic polymers (polyplexes) are still insufficiently for *in vivo* applications, particularly those administered systemically. To achieve

* To whom correspondence should be addressed. Mailing address: The University of Tokyo, Department of Materials Engineering, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656, Japan. Tel: +81-3-5841-7138. Fax: +81-3-5841-7139. E-mail: kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp.

[†] Department of Clinical Vascular Regeneration, Graduate School of Medicine.

[‡] Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering.

[§] Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering.

^{||} Center for NanoBio Integration.

[⊥] Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine.

sufficient *in vivo* systemic transfection, nonviral vectors need to satisfy several properties, such as high stability in the bloodstream, accumulation in target tissues, and controlled intracellular trafficking directing to the nucleus.

Polyplex micelles, composed of poly(ethylene glycol) (PEG)-polycation block copolymers and plasmid DNA (pDNA), are nonviral gene vectors with the potential for systemic application,^{3–5} because of the suitable size of approximately 100 nm for systemic administration, and the formation of the biocompatible PEG shell layer to avoid the nonspecific interaction with blood components.^{6–8} To further improve the stability and transfection efficiency of polyplex micelles, disulfide cross-links were introduced into the micelle core, revealing the improved transfection to cultured cells as well as the successful reporter gene expression in mouse liver by systemic administration.^{9,10} Furthermore, we recently established a procedure to install cyclic RGD peptide ligands (c(RGDfK)), which can selectively recognize $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptors, on the surface of a polyplex micelle. Eventually, c(RGDfK) installed polyplex micelles

exhibited enhanced transfection efficiency against specific cells possessing $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptors, such as HeLa cells.¹¹ $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors are known to be overexpressed in endothelial cells of tumor capillaries and neointimal tissues. It should be noted that the use of vectors with cyclic RGD peptide ligands has been investigated as an active targeting strategy in antiangiogenic gene therapy for cancer.^{12–14} Nevertheless, those studies focused primarily on therapeutic through the facilitation of cellular uptake of the vectors through receptor-mediated routes, and less attention has been paid to the intracellular trafficking of the vectors possibly modulated by the installed ligands. Worth mentioning in this regard is our previous finding that installation of cyclic RGD ligands on the polyplex micelle surface facilitated their localization in the perinuclear region, suggesting the modulated trafficking induced by cyclic RGD ligands.¹¹

The study reported here is devoted to get further insights into the modulated cellular uptake and subsequent trafficking of c(RGDfK) installed polyplex micelles in order to enhance transfection efficiency. For this purpose, new polyplex micelles with integrated functions were developed by installing cyclic RGD ligands on the surface and disulfide cross-links in the core. Indeed, the PEG-*block*-poly(lysine) (PEG-PLys) block copolymer as a platform polymer was modified by introducing a cyclic RGD peptide into the PEG terminus as well as thiol groups into the side chain of the PLys segment. The functions of prepared polyplex micelles were tested against HeLa cells possessing $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin receptors; the transfection efficiency, the amount of cellular uptake, and the intracellular distribution were thus determined. In particular, the intracellular trafficking of the polyplex micelles loaded with Cy3- or Cy5-labeled pDNA was evaluated thoroughly by confocal laser scanning microscope (CLSM) observation, which clarified the uptake route and the final intracellular localization. The results demonstrated that cyclic RGD ligands facilitated the caveolae-mediated endocytosis of the polyplex micelles and thus improved transfection efficiency, which is apparently important for the design of nonviral gene vectors that can avoid lysosomal degradation. Moreover, cyclic RGD ligands should

- (1) Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 581–593.
- (2) Mastrobattista, E.; van der Aa, M. A.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. Artificial Viruses: a Nanotechnological Approach to Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 115–121.
- (3) Katayose, S.; Kataoka, K. Water-Soluble Polyion Complex Associates of DNA and Poly(ethylene glycol)-Poly(L-lysine) Block Copolymer. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 702–707.
- (4) Kakizawa, Y.; Kataoka, K. Block Copolymer Micelles for Delivery of Gene and Related Compounds. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 203–222.
- (5) Osada, K.; Kataoka, K. Drug and Gene Delivery Based on Supramolecular Assembly of PEG-Polypeptide Hybrid Block Copolymers. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 113–153.
- (6) Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. Polyion Complex Micelles from Plasmid DNA and Poly(ethylene glycol)-Poly(L-lysine) Block Copolymer as Serum-Tolerable Polyplex System: Physicochemical Properties of Micelles Relevant to Gene Transfection Efficiency. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4495–4506.
- (7) Han, M.; Bae, Y.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Oba, M.; Kataoka, K. Transfection Study Using Multicellular Tumor Spheroids for Screening Non-Viral Polymeric Gene Vectors with Low Cytotoxicity and High Transfection Efficiencies. *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 38–48.
- (8) Akagi, D.; Oba, M.; Koyama, H.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Miyata, T.; Nagawa, H.; Kataoka, K. Biocompatible Micellar Nanovectors Achieve Efficient Gene Transfer to Vascular Lesions without Cytotoxicity and Thrombus Formation. *Gene Ther.* **2007**, *14*, 1029–1038.
- (9) Miyata, K.; Kakizawa, Y.; Nishiyama, N.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Koyama, H.; Kataoka, K. Block Cationic Polyplexes with Regulated Densities of Charge and Disulfide Cross-Linking Directed to Enhanced Gene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2355–2361.
- (10) Miyata, K.; Kakizawa, Y.; Nishiyama, N.; Yamasaki, Y.; Watanabe, T.; Kohara, M.; Kataoka, K. Freeze-Dried Formulations for In Vivo Gene Delivery of PEGylated Polyplex Micelles with Disulfide Crosslinked Cores to the Liver. *J. Controlled Release* **2005**, *109*, 15–23.
- (11) Oba, M.; Fukushima, S.; Kanayama, N.; Aoyagi, K.; Nishiyama, N.; Koyama, H.; Kataoka, K. Cyclic RGD Peptide-Conjugated Polyplex Micelles as a Targetable Gene Delivery System Directed to Cells Possessing $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ Integrins. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1415–1423.
- (12) Kim, W. J.; Yockman, J. W.; Lee, M.; Jeong, J. H.; Kim, Y. H.; Kim, S. W. Soluble *Flt-1* Gene Delivery Using PEI-g-PEG-RGD Conjugate for Anti-Angiogenesis. *J. Controlled Release* **2005**, *106*, 224–234.
- (13) Kim, W. J.; Yockman, J. W.; Jeong, J. H.; Christensen, L. V.; Lee, M.; Kim, Y. H.; Kim, S. W. Anti-Angiogenic Inhibition of Tumor Growth by Systemic Delivery of PEI-g-PEG-RGD/pCMV-sFlt-1 Complexes in Tumor-Bearing Mice. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 381–388.
- (14) Schiffelers, R. M.; Ansari, A.; Xu, J.; Zhou, Q.; Tang, Q.; Storm, G.; Molema, G.; Lu, P. Y.; Scaria, P. V.; Woodle, M. C. Cancer siRNA Therapy by Tumor Selective Delivery with Ligand-Targeted Sterically Stabilized Nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e149.