

201313018A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安永正浩

平成26(2014)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
安永 正浩	
II. 分担研究報告	
1. 抗体 DDS 開発・抗体イメージング・毒性評価	----- 5
安永 正浩	
2. 抗腫瘍剤内包ミセル製材の開発	----- 10
西山 伸宏	
3. リンカーテクノロジー・有機化学合成	----- 16
眞鍋 史乃	
4. 抗腫瘍剤内包リポソーム製剤の開発	----- 18
丸山 一雄	
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 安永 正浩

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 新薬開発分野

低分子抗がん剤はがんと同等に正常組織へ分布し有害事象をもたらす。この不都合を解消するために DDS の概念が導入された。しかしながら、従来の DDS が目指した選択的腫瘍部集積性のみでは効果が十分とはいえない。固形腫瘍、特に難治性がんには豊富な間質が存在して、DDS 製剤の腫瘍組織内部での浸透性を妨げている。本研究ではがん組織の生理学、病理学に立脚し、工学系マテリアルと生物学マテリアル抗体などとの融合による次世代 DDS の創生を目標にして、より有効・有用ながん治療法の開発を行ってきた。

#### A. 研究目的

工学系マテリアルとしてはポリマーミセルによる抗がん剤デリバリー、リポソームと超音波併用による温熱療法の開発、生物系マテリアルとしては ADC (Antibody drug conjugate) の有用性を検討する。抗体と工学系マテリアルとのハイブリッド化を行う。がんと間質或いは血液凝固といった病態生理学に立脚した新たな治療戦略を創生する。

#### B. 研究方法

- 1) 抗不溶性フィブリン抗体と抗 TF 抗体の特性解析と DDS 応用の非臨床 POC(Proof of concept)研究
- 2) 環状 RGD ペプチド導入 DACHPt 内包ミセルのサイズコントロールと薬効評価
- 3) バブルリポソーム (BL) と超音波による温熱療法の開発
- 4) ADC 作製のためのリンカーテクノ

#### ロジーの開発

#### C. 研究結果

- 1) 抗不溶性フィブリン抗体の解析から、フィブリンノゲンがフィブリンに変換した際に生じる B $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖から構成されるポケット状開裂部を発見した。グリオーマにおいて、不溶性フィブリン析出の多寡が悪性度の指標になることが判明した。抗 TF 抗体 ADC のがん細胞とがん間質へのダブルターゲティング作用を明らかにした。DDS イメージングにおける低分子化抗体の有用性を示した。
- 2) RGD 付加 DACHPt 内包ミセルを 30-100nm の範囲でサイズをコントロールして作製したところ、50nm 以下のペプチド搭載ミセルが、腫瘍に効果的に集積し、優れた薬効を示すことが明らかになった。
- 3) BL を利用した超音波がん温熱療法

と樹状細胞免疫療法を併用することで、細胞性免疫を中心とした抗腫瘍免疫が誘導され、抗腫瘍効果の増強が認められた。

4) カテプシンが認識する Val-Cit リンカーを設計合成した。さらに、PEG 鎖長を短くした化合物を合成した。細胞内ライゾゾームにおいて、良好な放出能を持つことが明らかになった。

#### D. 考察、

抗フィブリン抗体の認識部位としてフィリノゲンからフィブリン変換時に生じる不溶性フィブリン特異的なポケット状開裂部の証明は、フィブリンを標的にしたがん診断治療法の有力な POC となった。抗 TF 抗体のドラッグデリバリーツールとしての有用性も明らかになった。いずれもがん間質を標的にした CAST 治療・診断への応用が期待できる。各 DDS 製剤は抗体などのパイロット分子を搭載することで、より効果的なナノキャリアになることが示された。

#### E. 結論

抗体テクノロジーを活用した次世代 DDS 製剤の有用性が確かなものになった。早期臨床応用に向けた技術基盤や regulation の整備がますます重要となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. A Takahashi<sup>1</sup>, Y Yamamoto, M Yasunaga, Y Koga, J Kuroda, M Takigahira, M Harada, H Saito, T Hayashi, Y Kato, T Kinoshita, N Ohkohchi, I Hyodo, Y Matsumura. NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, exerts higher antitumor activity and the least cardiotoxicity as compared to conventional epirubicin. *Cancer Sci.* 104(7), 920-925, 2013.
2. Y Hisada, M Yasunaga, S Hanaoka, , Saijou. T Sugino A, Tsuji, T Saga, K Tsumoto, S Manabe., J Kuroda., J Kuratsu, Y Matsumura. Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Sci. Rep.* 3, 2604,2013.
3. Y Matsumura, M Yasunaga, S Manabe. Cancer stromal targeting (CAST) therapy and tailored antibody drug conjugate therapy depending on the nature of tumor stroma. *In Cancer Targeted Drug Delivery, An Elusive Dream* (eds. Bae YH, Mrsny RJ, and Park K) Springer New York Heidelberg

- Dordrecht London, p.161-181, 2013
4. M Yasunaga, M Furuta, K Ogata, Y Koga, Y Yamamoto, M Takigahira, Y Matsumura. The significance of microscopic mass spectrometry with high resolution in the visualisation of drug distribution. *Sci. Rep.* 3, 3050, 2013.
  5. M Yasunaga, S Manabe, Y Matsumura. Tumor stromal barrier and cancer stromal targeting therapy. *Microvascular Reviews and Communications.* 6(1) 2-8 (2013)
  6. Y Yamamoto, I Hyodo, M Takigahira, Y Koga, M Yasunaga, M Harada, T Hayashi, Y Kato, Y Matsumura Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model. *Int J Cancer* 135(1) 214-23 (2014)
  7. Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7 (10) 8583-8592 (2013)
  8. S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka\*, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (41) 15501-15507 (2013)
  9. R Suzuki, Y Oda, D Omata, N Nishiie, R Koshima, Y Shiona, Y Sawaguchi, J Ung, T Naoi, Y Negishi, S Kawakami, M Hashida, K Maruyama Tumor growth suppression by mild hyperthermia using non-high intensity focused ultrasound in combination with nanobubbles. *Int. Hyperthermia* 2014 in press.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体 発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己、出願人：独立行政法人国立がん研究センター、国立大学法人東京大学、独立行政法人理化学研究所、ナノキャリア株式会社

特願 2014-18586 (平成 26 年 2 月  
3 日)

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

抗体 DDS 製剤開発・抗体イメージング・毒性評価

研究代表者 安永 正浩

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター がん治療開発部

我々が樹立した、がん間質をターゲットとする抗フィブリン抗体 102-10 のエピトープ解析から、フィブリノゲンから不溶性フィブリンへの変換時に生じるポケット状開裂部の存在を証明することができた。Tissue factor (TF) ががん細胞と腫瘍間質の両方に強く発現していることを利用して、抗 TF 抗体 Antibody drug conjugate (ADC) ががん細胞と腫瘍間質のダブルターゲティングができることを示した。抗体の低分子化により腫瘍内浸透性の向上と生体内半減期の短縮化が可能となった。以上より、デリバリーのツールとしての抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体の有用性が明らかとなった。

#### A. 研究目的

がん間質形成に血液凝固系の亢進が関係していることを明らかにしてきた。特に外因系凝固因子のトリガー蛋白である組織因子 Tissue factor (TF) は多くのヒト腫瘍で細胞膜上に抗発現しており、また腫瘍血管内皮やその周辺で高発現していることも明らかにしている。さらに、昨年度は凝固の最終産物である不溶性フィブリンに対する我々が樹立した抗フィブリン抗体 (102-10) のエピトープ解析からその化学的特性を明らかにした。本年度は、その構造学的特徴を明らかにする。不溶性フィブリンは、がんの周囲に恒常的に析出し、健常人では認められない。がん以外の炎症性・梗塞性疾患での出現は一過性であり症状を伴うこ

とから、無症候性の持続性不溶性フィブリン陽性はがんに特徴的所見である。102-10 の免疫染色を用いてがん病理組織学的検索から、その詳細な性質・特徴を解析し、がん周囲に存在する不溶性フィブリンへのドラッグデリバリーツールとしての有用性を示す。

難治性固形腫瘍では豊富な間質が抗体の腫瘍内浸透性を障害している。この間質バリアを克服するために、従来型の細胞を標的にした抗がん細胞 Antibody drug conjugate (ADC) とは異なる間質を標的にした CAST (cancer stromal targeting) 療法を考案して、抗間質 ADC を開発した。本年度は、抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体の ADC を作製してその有効性を検証する。以

上を目的とした。

## B. 研究方法

1) *in silico* 立体構造解析からフィブリノゲンのB $\beta$ 鎖上に存在する102-10のエピトープを覆う $\gamma$ 鎖の配列を同定した。同部の合成ペプチドを作製して抗フィブリン $\gamma$ 鎖抗体の作製及びその特性評価を試みた。組織学的悪性度(グレード分類)の異なる脳腫瘍グリオーマに関して、102-10で免疫染色を行い、臨床病理学的特徴を調べた。

2) カテプシンでカットされるリンカーを用いて抗ヒトTF抗体ADCと抗マウスTF抗体ADCを作製した。ヒト膵臓がん細胞Xenograftマウスモデル(がん細胞はヒト型TFを腫瘍間質はマウス型TFを発現)に各々投与して、その抗腫瘍効果を評価した。さらに、投与後の病理組織学的検索を行い、薬効の違いを比較検討した。

3) 抗TF抗体IgGに消化酵素パパインを処理して精製後、抗体断片(Fab)を作製した。また、抗TF抗体IgGから重鎖可変領域(VH)と短鎖可変領域(VL)の遺伝子をクローニングして専用のコンストラクトを用いて一本鎖可変領域断片(scFv)の作製を行った。2種類の低分子化抗体を蛍光標識後に担がんマウスに投与して、デリバリー効果を評価した。

## C. 研究結果

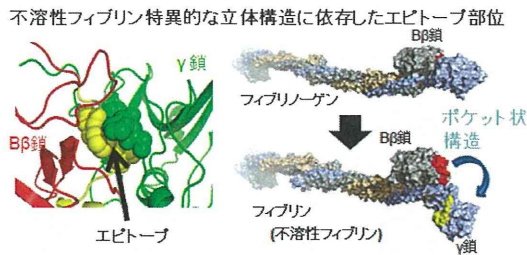
1) 新たに作製した抗フィブリン $\gamma$

鎖抗体は、102-10同様に不溶性フィブリンのみを認識することが判明した。これまでの解析結果と併せて、フィブリノゲンがフィブリンに変換される際に立体的構造の変化と共にB $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖から形成されるポケット状開裂部の存在が明らかにされた。102-10を用いた脳腫瘍の免疫組織化学染色により、不溶性フィブリンは正常神経組織では陰性であり、グレード1/2の神経膠腫では約半数が陽性で、そのうち強陽性は10%以下であるのに対して、グレード4の膠芽腫では100%が陽性で、そのうち60%以上が強陽性であることを明らかにした。

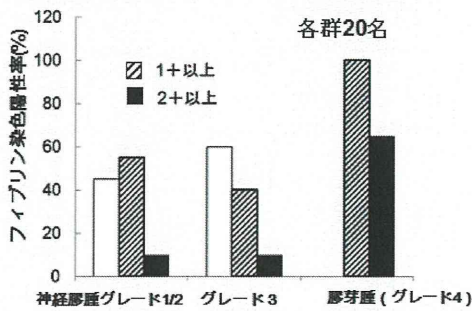
抗ヒトTF抗体ADCと抗マウスTF抗体ADCの治療実験で、共に対照群に比較して有意な抗腫瘍効果を認めた。病理組織学的検索で、抗ヒトTF抗体ADCはがん細胞の直接障害を示し、抗マウスTF抗体は腫瘍血管障害で抗腫瘍効果を示した。

(3) 低分子化抗体として、FabとscFvの作製を行った。抗体デリバリーの評価で、Fab・scFvといった低分子化抗体の方が、全長抗体IgGよりも腫瘍内浸透性が優れており中心部のがん細胞まで十分な量の抗体が到達していることが示された。さらに、生体半減期が短く体外への排出も容易であった。

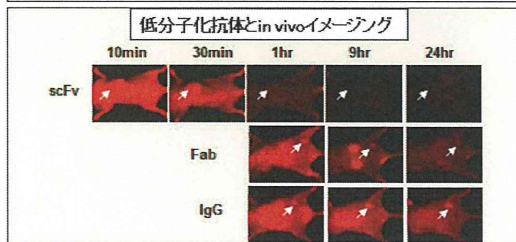
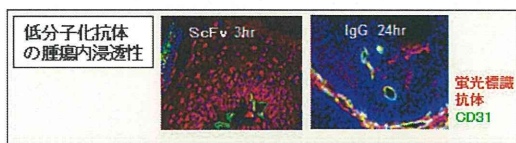
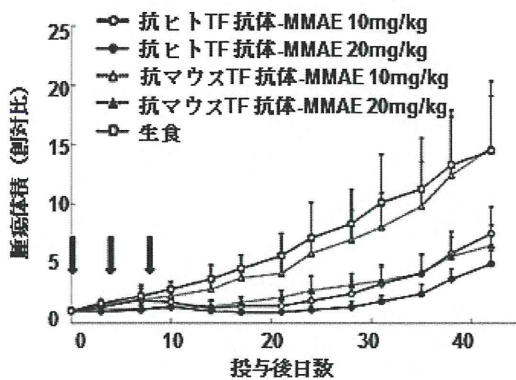




悪性度の違いによるフィブリン陽性率の違い



抗TF抗体ADCの抗腫瘍効果



抗フィブリン $\gamma$ 鎖抗体の取得とその解析結果から、フィブリンがフィブリンから不溶性フィブリンに変換した際に生じるB $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖からなるポケット状開裂部の存在を明らかにした。また同開裂部は可溶性フィブリンモノマーやFDPにも存在しない。炎症や出血・梗塞性疾患では急性期のみならず慢性期でも不溶性フィブリンを析出するので、不溶性フィブリンは2-3週間以内に全て可溶性フィブリンやFDPに代謝される。良性腫瘍や慢性炎症では不溶性フィブリンは析出しない。一方、がんでは無症候性に不溶性のフィブリン析出が早期から転移再発に至るまで持続的に起こる。したがって、無症候性の持続的フィブリン陽性のがんに特徴的な所見といえる。さらに、神経膠腫では、悪性度が高い程、フィブリン析出が多いということが判明した。他の浸潤性がんでも同様な現象が予想される。これまでの生体イメージングの結果からも、難治性がんを含む多くのがんのデリバリーツールとして有用と思われた。

今回の抗TF抗体ADCの実験結果から、ダブルターゲティングのコンセプト証明がなされた。間質の少ない腫瘍ではがん細胞と腫瘍血管の両方向への攻撃が可能で、間質の多い腫瘍でも間質バリアで中心部のがん細胞標的が困難でも腫瘍血管障害で一定の

D. 考察、

抗腫瘍効果を得ることが可能という治療戦略が成り立つ。機能面で凝固・線溶系に作用しない出血傾向などの副作用の少ない抗体クローンの選別にも成功している。今後 TF を介した腫瘍と血液凝固系との関連についても、さらに解析を進める予定である。

今回抗体デリバリーの研究で、全長 IgG と比較して、scFv や Fab などの低分子化抗体では生体内半減期が短く腫瘍内浸透性も高くなることが明らかになった。さらに、Fc 部は、免疫アレルギー反応を惹起して生体に悪影響を及ぼすことがある。そのため、治療用抗体としては IgG の使用が一般的であるが、被験者に健常者が含まれ外来診療が対象になる PET や MRI などの診断への応用に関しては、低分子化抗体の方が優れている可能性が高い。抗体デリバリーに関しては、用途に合わせた剤型の最適化が必要と思われた。

#### E. 結論

フィブリン特異的な立体的構造変化と浸潤性の高い腫瘍部での不溶性フィブリンの持続陽性を明らかにできた。CAST 療法を具現化するためのデリバリーツールとしての抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体の有効性・有用性を示した。安全性試験を含む非臨床 POC 研究を重ね、早期臨床応用を目標とする。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

10. A Takahashi<sup>1</sup>, Y Yamamoto, M Yasunaga, Y Koga, J Kuroda, M Takigahira, M Harada, H Saito, T Hayashi, Y Kato, T Kinoshita, N Ohkohchi, I Hyodo, Y Matsumura. NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, exerts higher antitumor activity and the least cardiotoxicity as compared to conventional epirubicin. *Cancer Sci.* 104(7), 920-927, 2013.
11. Y Hisada, M Yasunaga, S Hanaoka, , Saijou. T Sugino A, Tsuji, T Saga, K Tsumoto, S Manabe, J Kuroda, J Kuratsu, Y Matsumura. Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Sci. Rep.* 3, 2604, 2013.
12. Y Matsumura, M Yasunaga, S Manabe. Cancer stromal targeting (CAST) therapy and tailored antibody drug conjugate therapy depending on the nature of tumor stroma. *In Cancer Targeted Drug Delivery, An Elusive Dream* (eds. Bae YH, Mrsny RJ, and Park K) Springer New York Heidelberg Dordrecht London, p.161-181, 2013
13. M Yasunaga, M Furuta, K Ogata, Y Koga, Y Yamamoto, M Takigahira, Y

Matsumura. The significance of microscopic mass spectrometry with high resolution in the visualisation of drug distribution. *Sci. Rep.* 3, 3050, 2013.

14. M Yasunaga, S Manabe, Y Matsumura. Tumor stromal barrier and cancer stromal targeting therapy. *Microvascular Reviews and Communications.* 6(1) 2-8 (2013)
15. Y Yamamoto, I Hyodo, M Takigahira, Y Koga, M Yasunaga, M Harada, T Hayashi, Y Kato, Y Matsumua Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model. *Int J Cancer* 135(1) 214-23 (2014)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 発明の名称：抗 Tissue Factor モノクローナル抗体 発明人：松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己、出願人：独立行政法人国立がん研究センター、国立大学法人東京大学、独立行政法人理化学研究所、ナノキャリア株式会社 特願 2014-18586 (平成 26 年 2 月 3 日)

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

研究分担者 西山 伸宏

東京工業大学 資源化学研究所

本研究では、リガンド付加型高分子ミセルを構築し、難治がん治療へと展開することを目指している。前年度までに、環状RGDペプチド付加ミセルが悪性脳腫瘍(Glioblastoma, GBM)モデルの血液-脳腫瘍関門(BBTB)を能動的に通過することが確認された為に、本年度は、サイズを30-100nmの範囲で精密に制御した環状RGD付加白金抗がん剤内包ミセルのGBMモデルに対する有効性を検討した。その結果、50nm以下のペプチド付加ミセルが、腫瘍に効果的に集積し、優れた薬効を示すことが明らかになった。

#### 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、水中で自己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、内核に抗がん剤などの生理活性物質を内包させることができ、表面が生体適合性のポリエチレングリコール (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)効果によって固形がんを選択的に集積し、優れた抗がん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、パクリタキセル、シスプラチン、SN-38、オキサリプラチン、エピルビシン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、がん標的治療において有望なキャリアとして実用化が期待されている。

本研究では、次世代のミセル型 DDS として、ペプチドリガンドを付加した高分子ミセルを構築し、従来の EPR 効果に基づくターゲティングでは効果が期待できない難治がんモデルに対する有効性を明らかにすることを目的としている。とりわけ、本研究では、難治がんとして、血液-脳腫瘍関門(BBTB)の存在によって DDS のがん集積性が著しく低下している Glioblastoma (GBM)(図 1)を治療標的と定め研究開発を行った。前年度までに、30nm のダハプラチン内包高分子ミセルの表層に腫瘍血管内皮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

ペプチドを導入したリガンド導入ミセル(図2)を構築し、ヒト GBM モデルマウスに投与したところ、ミセルの腫瘍への効果的な集積と優れた治療効果が確認された。特に、生体リアルタイム共焦点顕微鏡による観察では、リガンド導入ミセルの血管内腔からがん組織への能動輸送が示唆された。そこで本年度は、サイズを 30-100nm の範囲で精密に制御したペプチド導入ダハプラチン内包ミセルを構築し、GBM モデルの標的治療における有効性を検討した。

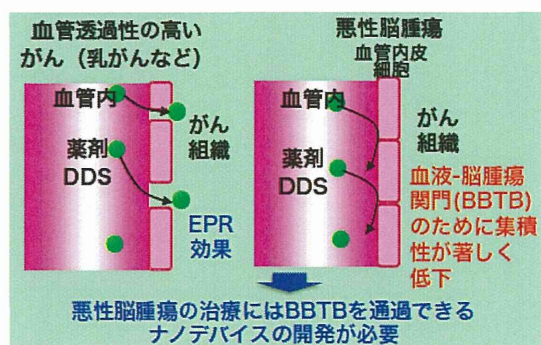


図 1. 悪性脳腫瘍における BBTB



図 2. 環状 RGD ペプチド導入ミセル

## B. 研究方法

### 1) サイズの異なる環状 RGD ペプチド導入ミセルの調製

ポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体

(PEG-PGlu) (PEG 分子量 12,000、PGlu 重合度 40)とポリグルタミン酸ホポリマー(PGlu) (重合度 40)を任意の比率で DACHPt と混合し、水中で反応させることによって、サイズの異なるダハプラチン(DACHPt)内包ミセルを調製した。環状 RGD ペプチドの導入は、末端にマレイミド基を有する PEG-Glu を任意の比率で混合することによって、表面に異なる密度のマレイミド基を有するミセルを調製し、N 末端に Cys を有する環状 RGD ペプチドをマイケル付加反応によりミセル表面に導入した。以上のようにして、サイズと環状 RGD の密度が異なる DACHPt 内包ミセルを調製した。

### 2) 環状 RGD 導入ミセルの Glioblastoma(GBM)に対する in vitro および in vivo 評価

ヒト GBM の U87MG 細胞に対するサイズ及びリガンド密度が異なるダハプラチン内包ミセルの細胞毒性を MTT アッセイにより評価した。また、U87MG 細胞のマウスの皮下移植モデルに対して、ミセルを 0, 2, 4 日目に投与した時の腫瘍増殖抑制効果を評価した。

### 3) サイズの異なる環状 RGD 導入ミセルの血中滞留性およびがん集積性の評価

実験 2)において最適化されたりガンド密度においてサイズの異なるミ

セルの血中滞留性と固形がん(U87MG)への集積を評価した。ここでは、オキサリプラチンおよびミセルを担がんマウスに投与し、所定時間後に採取した血漿および腫瘍組織中の Pt 量を ICP-MS により定量した。

### C. 研究結果

#### 1) サイズの異なる環状 RGD ペプチド導入ミセルの調製

PEG-PGlu と PGlu ホモポリマーを任意の比率で混合し、DACHPt と反応させることによって 30、50、70、100nm の DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)を調製した(多分散度 PDI=0.06-0.12)。また、マレイミド-PEG-Glu をミセル調製時に混合し、環状 RGD を反応させることによって、PEG 末端への環状 RGD の導入率が 0、20、40%のサイズの異なる DACHPt/m を調製した。

#### 2) 環状 RGD 導入ミセルの Glioblastoma(GBM)に対する in vitro および in vivo 評価

ヒト GBM の U87MG 細胞に対するサイズ及びリガンド密度が異なる DACHPt/m の細胞毒性を MTT アッセイにより評価した(表 1)。その結果、環状 RGD の導入率の増加に伴い、50%細胞増殖阻止濃度(IC50)値の減少が確認された。これは環状 RGD リガンドの導入による DACHPt/m の細胞内取り込み量の増大に起因するものと考え

えられる。一方、サイズの効果に関しては IC50 値に差異は認められなかった。

表 1. U87MG 細胞に対する IC50 ( $\mu$ M)

cRGD 導入率	diameter (nm)			
	30	50	70	100
0 %	120	130	130	150
20 %	61	55	81	71
40 %	33	48	33	46

次に、U87MG 細胞の皮下移植モデルに対するサイズ及びリガンド密度が異なる DACHPt/m の抗腫瘍効果を評価した結果を図3に示す。この結果、リガンド密度と粒径の両方に依存した抗腫瘍効果が見られ、環状 RGD リガンドの密度が 20%で、粒径が 50nm 以下の場合に非常に高い抗腫瘍効果が得られることが確認された。

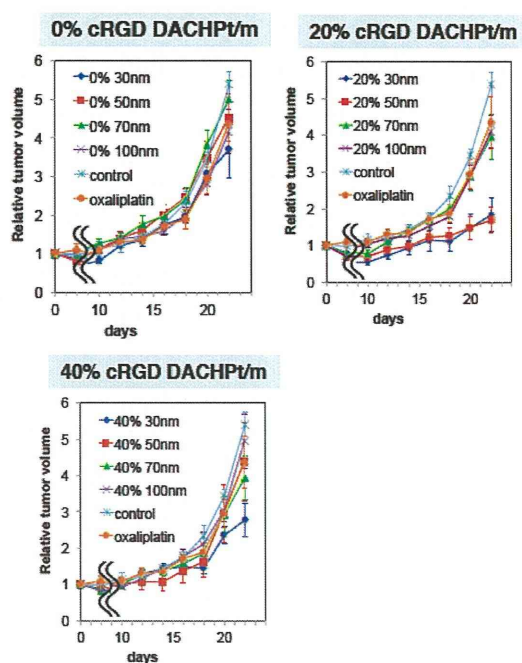


図 3. サイズ及びリガンド密度が異なる DACHPt/m の U87MG 腫瘍に対する制

## がん活性

### 3) サイズの異なる環状 RGD 導入ミセルの血中滞留性およびがん集積性の評価

実験 2)において優れた抗腫瘍効果が確認されたリガンド密度が 20%の DACHPt/m に関して、血中滞留性とがん集積性へのサイズの効果を検討した(図 4)。その結果、ミセルのサイズの増加に伴って血中滞留性が低下し、がん集積性が增大することが確認された。特に、がん集積性に関しては、50-70nm 以上において顕著にミセルの集積が低下することが確認された。

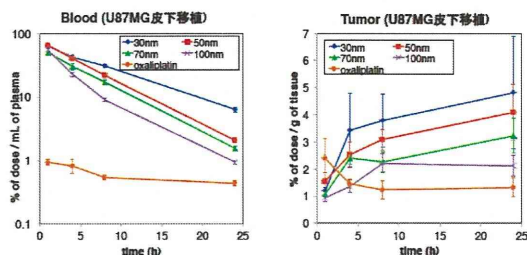


図 4. サイズ及びリガンド密度が異なる DACHPt/m の U87MG 腫瘍に対する制がん活性

### D. 考察

前年度までに、環状 RGD ペプチド搭載ミセルが悪性脳腫瘍モデルの血液-脳腫瘍関門を能動的に通過することが示唆された為に、本年度は、サイズを 30-100nm の範囲で精密に制御したペプチド搭載抗がん剤内包ミセル

の GBM モデルに対する有効性を検討した。その結果、リガンド密度が 20% でサイズが 50nm 以下の DACHPt/m が優れたがん集積性と治療効果を示すことが明らかになった。細胞毒性試験(表 1)では、ミセルのサイズによる差異が認められなかったことから、in vivo における治療効果はミセルのがん組織への移行性が関与しているものと考えられる。すなわち、ミセルの BBTB の能動輸送には、リガンドによるミセルの血管内皮細胞表面への結合に加えて、ミセルのサイズを 50nm 以下にすることによるベシクル輸送の誘起が必要であると我々は考えている。以上の研究により、我々は悪性脳腫瘍への効率的な移行を実現するためのナノ DDS の設計理論を明らかにすることができた。

### E. 結論

高分子ミセルにより悪性脳腫瘍への効率的な薬剤デリバリーを実現するためには、ミセル表面への環状 RGD ペプチドの導入が有効である。この時、リガンド密度に加えて、ミセルのサイズが重要であり、50nm 以下が望ましいということが明らかになった。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(英文論文のみ)

- 1) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka\*, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
- 2) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka\*, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
- 3) H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata\*, K. Kataoka\*, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* 4 (1) 50-60 (2014)
- 4) P. Mi, D. Kokuryo, H. Cabral, M. Kumagai, T. Nomoto, I. Aoki, Y. Terada, A. Kishimura, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Hydrothermally synthesized PEGylated calcium phosphate nanoparticles incorporating Gd-DTPA for contrast enhanced MRI diagnosis of solid tumors. *J. Control. Release* 174 63-71 (2014)
- 5) H. Chen, L. Xiao, Y. Anraku, P. Mi, X. Liu, H. Cabral, A. Inoue, T. Nomoto, A. Kishimura\*, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Polyion complex vesicles for photo-induced intracellular delivery of amphiphilic photosensitizer. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (1) 157-163 (2014)
- 6) Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7 (10) 8583-8592 (2013)
- 7) S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka\*, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (41) 15501-15507 (2013)
- 8) H. Cabral, M. Murakami, H. Hojo, Y. Terada, M. R. Kano, U. -I. Chung, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 (28) 11397-11402 (2013)
- 9) H. Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka\*, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN $\alpha$ -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (24) 6218-6221 (2013)
- 10) S. Wu\*, V. Kasim, M. R. Kano, S. Tanaka, S. Ohba, Y. Miura, K. Miyata, X. Liu, A. Matsushashi, U.-I. Chung, K. Kataoka, N. Nishiyama\*, M. Miyagishi\*, Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 $\alpha$  in a p53-independent manner. *Cancer Res.* 73 (6) 1787-1799 (2013)
- 11) P. Mi, H. Cabral, D. Kokuryo, M. Rafi, Y. Terada, I. Aoki, T. Saga, T. Ishii, N. Nishiyama\*, K. Kataoka\*, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials* 34 (2) 492-500 (2013)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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

研究分担者 眞鍋史乃

独立行政法人 理化学研究所

低分子抗がん剤はがんと同等に正常組織へ分布し有害事象をもたらす。この不都合を解消するために DDS の概念が導入された。その中で抗がん剤をがん細胞特異的抗体に付加したミサイル療法が開発されたが、一般の固形がんは間質が存在し、腫瘍血管から漏れ出た抗がん剤抗体複合体が効率よくがん細胞にデリバリーできない。本研究ではこの点を解消するための間質ターゲティング療法の開発においての薬剤放出の鍵となるリンカーの設計・合成を行った。

A. 研究目的

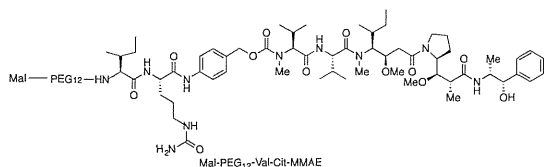
効率的な DDS を実現するためには、血中では安定に存在する一方、目的部位においてのみ薬剤をいかに効率的に輸送担体から放出するかについての設計が鍵となる。これまで、細胞外で薬剤を放出するために、エステル加水分解による薬剤放出メカニズムの他、がんと血液凝固の関連に着目して、プラスミンにより切断可能であるリンカーを合成してきた。本年度は、リンカーの選択により、薬剤放出位置を変化させることが可能であることを示すために、がん細胞の中で発現が上昇しているシステインプロテアーゼであるカテプシンで切断可能であるリンカーを設計合成することにした。

また、抗体-抗がん剤複合体は、溶解性の向上やステルス化を目的とし

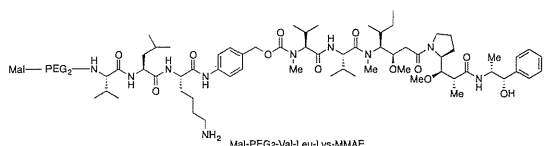
てポリエチレングリコール(PEG) が使用されるが、その鎖長と薬剤放出能力の相関について検討した。

B. 研究方法

カテプシンが認識切断する部位として、バリニンシトルリン (Val-Cit) 配列を選択した。カテプシンは、リジンの側鎖アミノ基を認識するが、リジンの側鎖アミノ基をウレアに変換すると薬剤放出速度を低下させることが可能であることが報告されていた。抗体の量を減らすために、抗がん剤として、活性が非常に強い monomethyl auristatin (MMAE) を選択し、Val-Cit-MMAE 複合体を合成した。さらに、一端がマレイミドの PEG と Val-Cit-MMAE を結合させた。



PEG 鎖長については、すでに合成した繰り返し度数 1 2 の PEG を持つプラスミン切断型リンカー Val-Leu-Lys と MMAE 複合体に加え、PEG 繰り返し度数が 2、8 の化合物を合成した。



#### C. 研究結果

設計に従って、問題なく、合成が可能であった。

#### D. 考察

抗体結合後、抗がん活性、副作用についての検討を行う。PEG の鎖長の効果を調べるために、より長い PEG 鎖を持つリンカー抗がん剤複合体を合成する。

#### E. 結論

抗がん剤-リンカー複合体を目的によって適宜設計し、合成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文論文のみ)

“Discovery of an Unexplored Space in Fibrin Clots and Its Clinical Significance” Yohei Hisada, Masahiro Yasunaga, Shingo Hanaoka, Shinji Saijou, Takashi Sugino, Atsushi Tsuji, Tsuneo Saga, Kohei Tsumoto, Shino Manabe, Jun-ichiro Kuroda, Jun-ichi Kuratsu, Yasuhiro Matsumura, *Sci. Rep.* **2013**, 3, 2604–2610

##### H. 知的財産権の出願・登録状況

「抗 Tissue Factor モノクローナル抗体」松村保広、安永正浩、古賀宣勝、山本祥之、佐藤隆太、津村遼、片岡一則、西山伸宏、三浦裕、眞鍋史乃、加藤泰己、特願 2013-138796, 出願日 2013 年 7 月 2 日

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

研究分担者 丸山一雄

帝京大学 薬学部

バブルリポソームへの超音波照射におけるキャビテーションにより生じる発熱とジェット流を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法を併用することで、細胞性免疫を中心とした抗腫瘍免疫が誘導され、抗腫瘍効果の増強が認められた。本研究では、そのメカニズムについて検討した。その結果、本併用療法の抗腫瘍効果に CD8<sup>+</sup> T 細胞が関与していることが明示された。

#### A. 研究目的

これまでに我々は、超音波造影ガス (perfluoropropane) を封入した超音波応答性リポソーム (バブルリポソーム)を開発した。このバブルリポソームに高強度の超音波を照射するとバブルリポソームの圧壊に伴い、発熱やジェット流が生じる。この現象はキャビテーションと呼ばれており、このキャビテーションによりがん細胞を直接傷害できることを見出している。実際に担がんマウスのがん組織にバブルリポソームを投与し超音波照射することで腫瘍増殖抑制効果が得られ、バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法の有用性が示された。この療法ではがん組織内においてがん細胞の死滅に伴うがん関連抗原が放出されていると考えられ、実際、超音波がん温熱療法後のがん組織に抗原提示細胞である樹状細胞を投与する

と、強力な抗腫瘍免疫が誘導された。そこで本研究では、バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果について、そのメカニズムについて検討した。

#### B. 研究方法

マウス結腸がん Colon 26 細胞を BALB/c マウス後背部皮下に移植 8 日後、BL を腫瘍内投与し、体外から腫瘍組織に向け超音波 (1 MHz、4 W/cm<sup>2</sup>、2 分間) を照射した。その 1、2、3、5 日後、マウス骨髄由来樹状細胞を腫瘍内投与し、腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した。さらに、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞を枯渇したマウスに同様の治療を行い、抗腫瘍メカニズムの解析をした。PKH-67 により樹状細胞を蛍光標識し、フローサイトメトリーによりリンパ

節への移行率を評価した。また、ターゲット細胞特異的な免疫活性化を ELISpot Assay により評価した。

### C. 研究結果

バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法後に樹状細胞を腫瘍内投与することで、超音波がん温熱療法または樹状細胞免疫療法単独より高い抗腫瘍効果が認められた。この抗腫瘍メカニズムを解析するため、各種免疫担当細胞を枯渇したマウスを用い抗腫瘍効果を検討したところ、CD8<sup>+</sup>T 細胞枯渇マウスで抗腫瘍効果が完全に消失した (図 1)。このことから、本併用療法の抗腫瘍効果に CD8<sup>+</sup>T 細胞が関与していることが示唆された。また、脾細胞を回収しエフェクター細胞とし、ターゲット細胞である Colon-26 と共培養して、INF- $\gamma$  の産生細胞数を ELISpot Assay によって評価したところ、図 2 に示すように有意に高い Spot-forming が示され、Colon-26 細胞特異的な免疫が活性化されていることが示された。

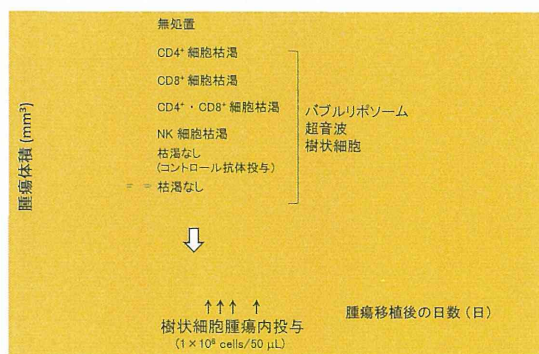


図 1 バブルリポソームを利用した超音波温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用における抗腫瘍メカニズム解析

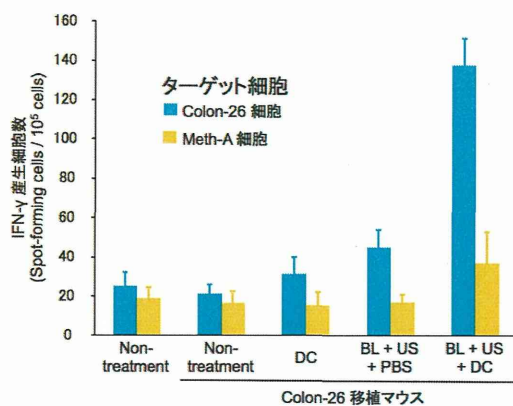


図 2 Colon-26 細胞特異的な免疫系の活性化 (ELISpot Assay)

また、同様に PKH-67 蛍光ラベル化樹状細胞を腫瘍内投与し、リンパ節回収によって移行率を評価したところ図 3 に示すように高い移行が認められた。

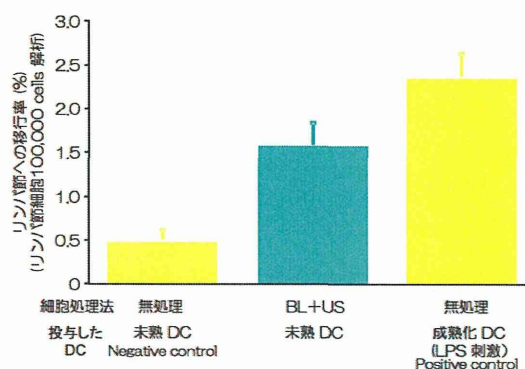


図 3 投与した樹状細胞のリンパ節への移行率の評価

以上の結果より、バブルリポソームと超音波による温熱によって傷害さ