

# 国立大学法人神戸大学

事業実施期間：開始 平成30年4月1日～終了 平成31年3月31日

申請者役職・氏名 助教 北山 雄己哉

研究・事業名

## 生体内で機能化するステルス癌治療薬の開発

### 交付申請内容

#### 研究・事業の目的及び意義

##### 【研究の目的】

ナノ材料は、難病治療薬をはじめとした革新的なナノメディシンに資する基盤材料として期待され近年急速に発展している。最近、生体内に投与されたナノ材料は、その表面に内在性タンパク質が吸着した新たな界面(プロテインコロナ)を形成することが報告された(PNAS 2007, 104, 2050)。さらに、プロテインコロナが細胞や組織に対するナノ材料の反応性を大きく左右することが報告された。本研究課題では、プロテインコロナ形成を制御する分子インプリントナノ粒子に放射線増感剤を内包した新規ステルス癌治療薬の創出を目的とした。

##### 【研究の意義】

本研究で目的とするプロテインコロナ制御は、未だに未確立な分野であるが、達成できれば新規ナノメディシン創製に直結するため、高い学術的意義があるだけでなく、医薬品開発における革新的技術となりうる。

#### 研究・事業の方法及び手段

1: 血漿タンパク質を認識する放射線増感剤内包分子インプリントポリマーナノゲルの合成

分子インプリンティング技術は、合成高分子内に標的分子認識能を付与できる高分子機能化技術である(図1)。これまでに種々の低分子化合物や生体高分子であるタンパク質を認識できる分子インプリントポリマーが合成できることが報告されている。本研究では、この分子インプリンティング技術を用いて、ステルス性癌治療薬を合成する。これまでに、生体に毒性を示す可能性がある界面活性剤は一切使用しない重合合法である沈殿重合を用いて、血清アルブミンを認識できる分子インプリントポリマーナノ粒子(MIP-NPs)合成に成功し、マウスを用い

たin vivo実験において患者の血清アルブミンを利用して免疫応答を回避できる「ステルス性」を獲得できることを明らかにした(Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 7088)。本申請では、この技術を応用し、放射線増感剤として用いられる金ナノ粒子(図2)を内包したステルスMIP-NP(Au-MIP-NPs)を合成する。はじめに、金ナノ粒子を担持させるためのチオール基を修飾した新規ステルスMIP-NPsを合成し、金ナノ粒子をMIP-NPs内部で還元析出させることで、Au-MIP-NPsを創製する。

##### 2: 分子認識能評価

合成したAu-MIP-NPsの血清アルブミンに対する分子認識能を、表面プラズモン共鳴を利用して評価する。

##### 3: Au-MIP-NPsを用いた放射線治療応用

本申請で開発したAu-MIP-NPsを用いた放射線治療を試みる。腫瘍担持 BalB/c nudeマウスを準備し、Au-MIP-NPsを尾静脈より投与し、様々な線量で放射線照射を行い、腫瘍サイズおよび体重を測定する。その結果として、Au-MIP-NPsの放射線増感効果を明らかにする。

#### 研究・事業の特徴(新規性、独自性 等)

生体に投与されたナノ材料の表面に形成されるプロテインコロナ層の組成は、細胞や組織に対するナノ材料の反応性を大きく左右することが報告されている(PNAS 2007, 104, 2050)。しかし、これまでの関連研究は、ナノ材料表面のプロテインコロナ解析に着目したものばかりで、プロテインコロナ組成を制御できるナノ材料の報告およびin vivoでのプロテインコロナの組成制御や動態解析に関する報告は申請者の知る限り皆無であった。そのような中、申請者らは、これまでに分子インプリンティング技術に関する一連の研究に携わり、低分子からタンパク質に対して様々な人工認識材料を創製してきた。最

近では、本手法を用いてヒト血清アルブミン(HSA)を認識するHSA-MIP-NPs(粒径約30nm)の合成に成功し、in vitro及びin vivoでの予備実験において、このHSA-MIP-NPsが① 高いアルブミン選択性、② 低い細胞毒性を持ち、③ in vivoでプロテインコロナ組成の制御により後天的にステルス性を獲得できることを明らかにした(Angew. Chem. Int. Ed. 2017, PCT/JP 2015/006041)。このようなプロテインコロナ制御をin vivoで達成した研究は過去に例がなく、申請者らが世界で初めて達成した。本研究における「分子インプリンティング技術」による高分子ナノ材料への分子認識能付与にもとづくプロテインコロナ制御は、生体内で自ら目的の分子を調達・表面に結合し、生体内後天的に機能を獲得するという新しい方法論である。本申請は、申請者らが独自に提案したプロテインコロナ制御によりステルス性を血中その場で獲得する薬物輸送キャリアに放射線増感剤を内包した新規ステルス放射線増感剤を開発することを目標としており、新規性と独自性を有する(図1)。

#### 研究・事業により期待される効果

我々独自のアプローチである「分子インプリンティング技術」による高分子ナノ材料への分子認識能付与に基づくプロテインコロナ制御は、生体内で自ら目的の分子を調達・表面に結合し、生体内後天的に機能を獲得するという新しい方法論である。これまでに、生体内の非免疫関連タンパク(HSA)を認識することでステルス性を獲得する点までを達成しており、ナノキャリアとしての重要な機能の獲得に成功した。しかし、実際に合成したナノキャリアを医療に応用できなければ意味がなく、本研究では、そのようなナノキャリアに癌治療に用いる放射線増感剤を内包した新たなステルス癌治療薬を開発することを目的とする。このような生体内機能獲得能を有する癌治療薬はこれまでに誰も達成したことが無いが、達成できれば、プロテインコロナ制御にもとづく新規ナノメディシンの機能性材料創製に直結する。このようなことから、本申請で遂行する生体内機能化にもとづく新規ナノメディシンは、神戸医療産業都市の発展へ大いに貢献できると考えている。

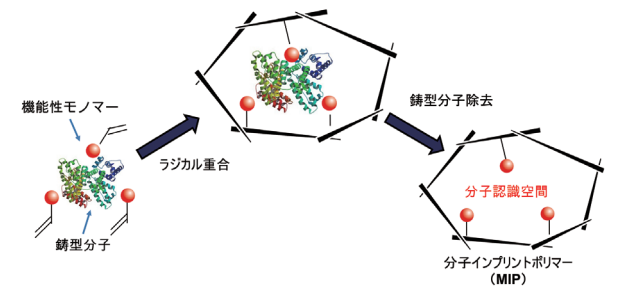


図1 分子インプリンティング技術によるタンパク質認識空間をもつ高分子の合成

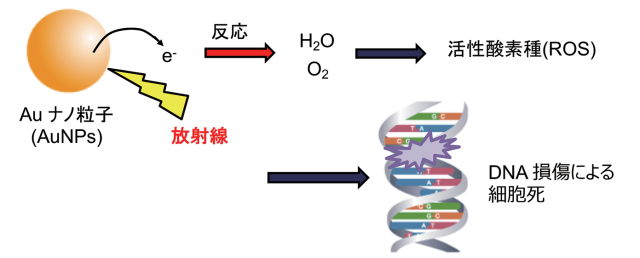


図2 金ナノ粒子の放射線増感剤としての効果

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

本研究では、プロテインコロナ形成を制御する分子インプリントナノ粒子(MIP-NPs)内に、放射線増感剤として利用される金ナノ粒子を内包することで新規ステルス癌治療薬を創出する(図3)。本ステルス癌治療薬では、血中においてプロテインコロナを制御する。そのために、免疫応答に関与しないタンパク質(非オプソニンタンパク質)として血中の血清アルブミンを利用する。本ナノ粒子の合成のため、ヒト血清アルブミン(HSA)を鋳型分子とし、HSAに相互作用する機能性モノマーであるpyrrolidyl acrylate(PyA)とHSAをリン酸緩衝液中で混合させることで複合体を形成させる。その後、N-isopropyl acrylamide(NIPAm)およびN,N'methylenebisacrylamide(MBAA)を主たるモノマーとし、さらにジスルフィド結合を含有する機能性モノマーを添加し無乳化剤沈殿重合を行った(70°C, 12h, N<sub>2</sub> 雰囲気下)。この重合により、ジスルフィド結合を導入したナノ粒子を合成した。

重合後、各種クロマトグラフィによる精製を行い、未反応モノマー、開始剤および鋳型分子であるHSAを除去することでMIP-NGsを得た。さらに、MIP-NGs内に含まれるジスルフィド結合を還元反応により切断しチオール化した後、金イオンの内部還元により金ナノ粒子内包MIP-NGs(Au MIP-NGs)をステルス癌治療薬として合成した。動的光散乱法による平均粒径は約50nmであり、ナノメートルサイズのAu MIP-NGsの作製が確認された。内包された金ナノ粒子量を誘導結合プラズマ発光分析によって測定したところ、粒子全重量に対して約15wt%であった。また、Au MIP-NGsのHSA認識能を、Au MIP-NGs固定化センサチップを用いた表面プラズモン共鳴装置を用いてHSA認識能を確認した。膵臓癌担持マウスを作製しAu MIP-NGsを投与して放射線治療を行い、放射線増感剤としての応用可能性について評価したところ、コントロールであるPBSを投与した群と比べて、Au MIP-NGsを尾静脈より投与した群では、腫瘍サイズが減少していたことから、Au MIP-NGsの放射線治療への応用可能性を示すことができた。

今後の展開

今後は、Au-MIP-NPsに内包する放射線増感剤である金ナノ粒子の濃度を増大することで、放射線増感効果の増幅を試みる。放射線増感効果を向上させることが低減できれば、低放射線量での治療が可能となり、効果的な放射線治療を実現できる。また、本研究で開発したステルスナノキャリアは、放射線増感剤に限らず様々な抗がん剤を内包して腫瘍に届けることができると考えられる。今後は、シスプラチンなどの抗がん剤やsiRNAなどのRNA干渉薬のデリバリーに取り組み、癌治療効果を確認する。

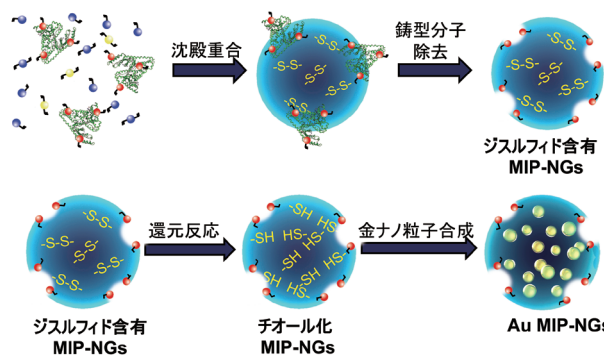


図3 本研究で開発する放射線増感剤を内包したステルス癌治療薬の合成