

タナカ トシエ

氏名（本籍）	田中 寿枝（愛知県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 50 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 7 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	静電的相互作用による自己組織化に基づくがん標的ナノ粒子型セラノスティクス薬剤の開発研究
論文審査委員	主 査 教 授 大河原 賢一 副 査 教 授 向 高弘 副 査 教 授 坂根 稔康 副 査 教 授 田中 将史

## 論文内容の要旨

### 緒言

がんは日本人の死因の第 1 位であり、がんに対する施策である「がん対策推進基本計画」において、その早期発見や治療法の更なる充実等が求められている [1]。がん治療を効果的に推進するにあたり、正確ながんの局在・性状鑑別診断とその情報に基づく治療方針の決定ならびに治療の実施が極めて重要となる。それゆえ、がんの診断と治療をシームレスに実施しうるセラノスティクス（Theranostics = therapeutics（治療） + diagnostics（診断））の重要性が強く提唱されている [2]。がんのセラノスティクスに資する薬剤を開発するためには、診断薬と治療薬を一つの薬剤に搭載できることが好ましい。セラノスティクスの実現に向けて、がん標的性を示す低分子化合物に診断薬や治療薬を導入した場合、化学的な構造修飾により、化合物が本来示すがん細胞に対する結合親和性や生体内における薬物動態に大きな影響を及ぼすことが予想される。一方で、ナノ粒子を用いた場合、薬物の搭載がその物理化学的特性に与える影響は小さい場合が多い [3]。

リポソームをはじめとする数十 nm から数百 nm のサイズのナノ粒子は、enhanced permeability and retention（EPR）効果 [4] を介してがん組織へ集積して滞留することから、がんへの薬物送達キャリアとして有効である。しかしながら、これらのナノ粒子型薬剤の治療効果は十分であるとは言えず、その薬物送達量を改善するために、ナノ粒子表面にがん特異的抗原を認識しうる抗体やペプチドなどを化学的に修飾するケースが多い [5,6]。しかし、がん指向性分子をナノ粒子表面に共有結合させるのに一般的に半日から 1 日の時間を要する [7-9] など、合成および精製過程は煩雑であるため、臨床への展開を考えて、より簡便かつ安全な創薬基盤の構築が希求されている。

交互吸着法（Layer-by-Layer 法）は、積層型の薄膜作製方法の 1 つである。アニオン性あるいはカチオン性高分子を修飾した基板を、反対の電荷をもつ高分子の水溶液に浸漬すると、高分子間の

静電的相互作用に基づく吸着が起こるが、この吸着は電荷の中和点で止まらず過剰に進行して電荷の反転が生じる。この電荷の反転を繰り返しながらポリマーを交互に吸着させることで、煩雑な化学反応を介することなく高分子を多層化することができる[10]。この静電的相互作用を利用して自己組織化させたナノ粒子の例として、Kurosakiらは、アニオン性プラスミド DNA (pDNA) をカチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) とアニオン性ポリマーである $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) で順次被覆した pDNA/PEI/ $\gamma$ -PGA を開発し、本アニオン性ナノ粒子がメラノーマ細胞へと高く取り込まれて高い遺伝子発現効果を示すことを報告した[11]。また最近では、カチオン性リポソームの膜表面にがん標的ポリマーであるヒアルロン酸 (HA) を被覆させた薬剤について、その高いがん治療効果が報告されるなど[12]、静電的相互作用に基づくがん標的ナノ粒子の開発が盛んに行われつつある。

以上の背景により、著者は、静電的相互作用により自己組織化するがん標的ナノ粒子型セラノステイクス薬剤の開発を着想し、以下の検討を行った。

## 第 1 章 肺転移メラノーマの核医学診断を目的とする $\gamma$ -ポリグルタミン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

皮膚がんの一種であるメラノーマは、転移能が高く、肺や骨、脳などへ転移することが知られている[13]。そのため、転移病巣の生体内局在を正確に診断することができれば、適切な治療方針を決定することができると考えられる。

Kurosaki らが報告した $\gamma$ -PGA 被覆ナノ粒子は、血球細胞に対する毒性が低く、細胞接着に対する影響が少ないなど、良好な生体適合性を示している。一般的に、アニオン性ナノ粒子は負に帯電する細胞膜との静電的な反発により細胞内への取り込みは抑制されるが、 $\gamma$ -PGA 被覆ナノ粒子は、マウスメラノーマ細胞 B16-F10 に高く取り込まれることが報告された[11]。

そこで本研究では、pDNA の代わりに様々な化学的修飾が容易な第 4 世代ポリアミドアミン dendrimer (G4) をコアとして用いた。核医学診断や核医学治療だけでなく磁気共鳴画像や蛍光イメージングへの適用も考慮し、キレート剤として十分量の diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) 誘導体を G4 のアミノ基に導入し、DTPA-G4 を作製した。これにより、G4 の表面電荷は負に帯電するが、この誘導体に PEI、 $\gamma$ -PGA を順次被覆することでメラノーマを標的とする粒子を作製した。今回は、がんの非侵襲的スクリーニングに有効な単一光子放射断層撮影 (SPECT) への適用を考慮し、放射性インジウム (インジウム-111 ;  $^{111}\text{In}$ ) にて標識した DTPA-G4 を用いることとした。また、粒子の *in vitro* および *in vivo* 評価を実施するにあたり、粒子の安定性を評価する必要がある。そこで放射性ヨウ素 (ヨウ素-125 ;  $^{125}\text{I}$ ) で標識した PEI を併せて合成し、これらを静電的相互作用により自己組織化させたナノ粒子 ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA) (Figure 1) について、メラノーマ細胞に対する集積および健常マウス・肺転移メラノーマモデルマウスにおける体内動態評価を実施した。

まず、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4 のカルボキシ基、 $^{125}\text{I}$ -PEI のアミノ基、 $\gamma$ -PGA のカルボキシ基の電荷比が 1:8:16 となるように各成分を反応させることで  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA を高い放射化学的純度で作製することに成功した。得られたナノ粒子の粒子サイズは約 30 nm、ゼータ電位は約 -30 mV であり、非標識体と比べて大きな変化は見られなかった。

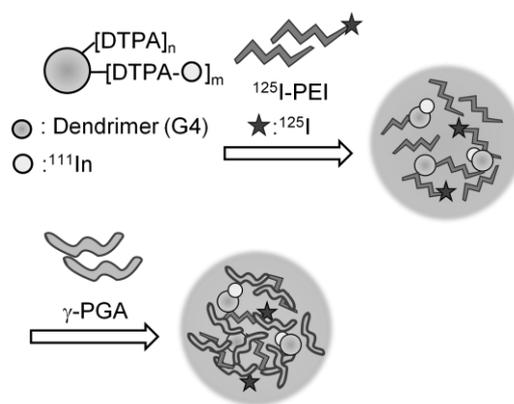


Figure 1. Preparation scheme of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA.

次に、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA の B16-F10 細胞への集積について、細胞内における  $^{111}\text{In}$  の放射能を経時的に測定することで評価した。 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA は、経時的に細胞に高く集積し、その集積率はカチオン性の  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI と同程度であり、また、アニオン性の  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4 と比べて有意に高かった。

続いて、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA の健常マウスにおける生体内分布について評価した結果、投与後早期にマクロファージが豊富に存在する脾臓や肝臓、肺へ高く集積した。また、これらの臓器における  $^{111}\text{In}$  と  $^{125}\text{I}$  の放射能集積が同程度であったことから、生体内においてナノ粒子が比較的安定に存在し、臓器へ分布した可能性が示された。また、比較対照として用いた  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI の生体内分布と大きく異なったことより、最外被覆成分である  $\gamma$ -PGA による影響が示唆された。

さらに、肺転移メラノーマモデルマウスにおける  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA の生体内分布評価では、血液中の放射能濃度に対するメラノーマが転移した肺における放射能濃度の比は、正常肺/血液比と比べ約 3 倍高い値を示したことから、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA が *in vivo* においても B16-F10 細胞に集積したものと考えられた。また、過剰量の  $\gamma$ -PGA を同時投与することで、メラノーマが転移した肺における  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/ $\gamma$ -PGA の集積が有意に抑制されたことから、本ナノ粒子が、一部  $\gamma$ -PGA 特異的な経路で B16-F10 細胞に集積した可能性が考えられた。

以上の結果より、放射性標識  $\gamma$ -PGA 被覆自己組織化ナノ粒子が肺転移メラノーマの核医学診断に有効である可能性を示した。

## 第 2 章 CD44 高発現がんの核医学診断を目的とするヒアルロン酸被覆自己組織化ナノ粒子の開発

第 1 章で構築した三成分系ナノ粒子の作製手法を、他のがん種を標的とする核医学診断用薬剤へ適用することを考え、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI を母体として、最外構成成分をがんを高発現する分子に認識されるアニオン性ポリマーに置換した、新たな自己組織化ナノ粒子の開発を行った。アニオン性ポリマーとしては、HA を選択した。HA は、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンの繰り返しユニット構造を持つ、生体適合性の高いアニオン性ポリマーであり、がんの悪性度との密接な関連が報告されている CD44 に対して特異的に結合することが知られている[14,15]。そこで、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI を HA で被覆した自己組織化ナノ粒子  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA を作製し、がん細胞への取り込みや担がんマウスにおける体内分布を評価することにより、がんの CD44 を標的とした核医

学診断用薬剤としての有効性を評価した。

$^{111}\text{In}$ -DTPA-G4 のカルボキシ基、PEI のアミノ基、HA のカルボキシ基の電荷比が 1:8:32 となるように各成分を反応させることで、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/ $^{125}\text{I}$ -PEI/HA を高い放射化学的純度で作製した。得られたナノ粒子の粒子サイズは約 40 nm、ゼータ電位は約 -30 mV であった。

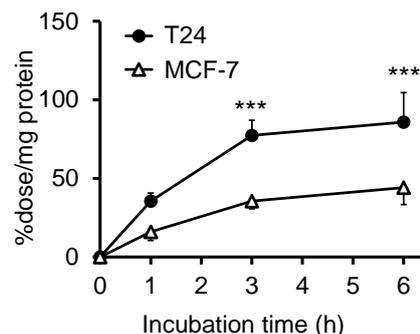
次に、CD44 の発現量が異なるがん細胞を用いて細胞取り込み評価を行った。 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA は、CD44 低発現細胞 MCF-7 に比べて高発現細胞 T24 に有意に高く取り込まれた (Figure 2)。また、過剰量の HA 共存下での細胞取り込み

を評価した結果、MCF-7 への取り込みは抑制されなかった一方で、T24 への取り込みは有意に抑制されたことから、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA は一部 CD44 特異的な経路を介して T24 へ取り込まれることが示唆された。

続いて、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA の生体内分布を評価した結果、脾臓や肝臓に高く集積し、滞留した。投与後早期には腎臓や肺にも比較的高く集積したが、経時的に減少した。また、担がんマウスにおける生体内分布評価では、MCF-7 と比較して CD44 高発現 T24 へ有意に高く集積した。さらに、T24 がん組織内の放射能局在をオートラジオグラフィにより解析した結果、不均一な放射能分布を認めたが、これは CD44 の組織内分布と概ね一致した。これらの結果より、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA が CD44 高発現がんの核医学診断に有効である可能性が示された。

### 第 3 章 CD44 高発現がんの光温熱治療を目的とするヒアルロン酸誘導体被覆自己組織化ナノ粒子の開発

第 2 章では、放射性標識 dendrimer をコアとする HA 被覆自己組織化ナノ粒子が、CD44 高発現がんの核医学診断に有効である可能性を示した。そこで、ナノ粒子のコアを治療薬およびイメージング素子としての活用が期待される金ナノロッド (Gold nanorod ; GNR) に変更することで、がんを発現する CD44 に認識される新たなナノ粒子型セラノスティクス薬剤を開発できるのではないかと考えた。GNR は桿状の金属ナノ粒子であり、生体透過性の高い近赤外光を吸収してプラズモン共鳴効果により発熱する性質を持つため、がんの光温熱治療への応用が期待されている。また、発熱効果に伴って光音響シグナルを発生することから、がん診断への適用も期待される [16]。そこで、GNR を基盤とする薬剤を効率良く創出するために静電的相互作用を利用することとし、カチオン性の GNR にアニオン性 HA を被覆させたナノ粒子 (GNR/HA) を作製し、CD44 を標的とするがんの光温熱治療用薬剤としての有効性について評価した。また一般に、金ナノ粒子は塩の影響により凝集が促進することが報告されている [17]。近年、静電的相互作用に基づき作製されたナノ粒子として、カルボキシ基を含有するポリマーよりも硫酸基を含有するポリマーを用いて形成させた粒子の方が、塩を含む溶液中において安定であるという結果が示された [18]。そこで本研究では、ナ



**Figure 2.** *In vitro* cellular uptake of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-G4/PEI/HA (charge ratio 1:8:32) by T24 and MCF-7 cells. \*\*\* $p < 0.001$  vs. MCF-7.

ノ粒子の安定性の向上を期待して硫酸化 HA (sulfated HA ; sHA) (Figure 3) を用いて GNR/sHA を作製し、GNR/HA と併せて評価した。

まず、GNR のトリメチルアンモニウム基と HA のカルボキシ基の電荷比が 1:30 となるよう、超純水中で GNR と HA を混和することで、粒子サイズが約 10 nm、ゼータ電位が約 -30 mV の GNR/HA を作製した。また、HA と同じ物質量の sHA

を用いて GNR/sHA を作製し、GNR/HA と同等の粒子サイズおよびゼータ電位を示すことを確認した。塩を含む溶液

中でのナノ粒子の安定性については、GNR の吸収スペクトルが、凝集に伴って変化するため[19]、GNR/HA および GNR/sHA の吸収スペクトルおよび粒子サイズを測定することにより評価した。作製した各ナノ粒子を生理食塩水で希釈した結果、1 ユニットあたり約 1.2 の硫酸基が導入された sHA (sHAc) が最も安定に GNR を被覆できる可能性が示された。

次に、ナノ粒子の細胞に対する集積および体内動態を定量的に評価するために、放射性ヨウ素 ( $^{125}\text{I}$ ) で標識した GNR ( $^{125}\text{I}$ -GNR) を合成した。 $^{125}\text{I}$ -GNR を用いて作製した HA あるいは sHAc との自己組織化ナノ粒子について、細胞集積性評価を行った結果、 $^{125}\text{I}$ -GNR や  $^{125}\text{I}$ -GNR/HA 等とは異なり、 $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc は、CD44 低発現細胞 MCF-7 と比べて CD44 高発現細胞 T24 へ有意に高く集積した。また、過剰量の HA 共存下で、T24 に対する  $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc の集積は有意に抑制されたことから、一部 CD44 特異的な集積が示唆された。そこで、T24 に GNR/sHAc を集積させた後、近赤外レーザー光を照射した結果、非常に高い細胞傷害性が示された。

続いて、健常マウスを用いて  $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc の生体内分布評価を行った。 $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc は投与後早期から血液中より速やかに消失し、HA 受容体が豊富に存在するとされる肝臓へ選択的に集積した。比較対照として用いた  $^{125}\text{I}$ -GNR や  $^{125}\text{I}$ -GNR/HA は比較的長く血液中に滞留し、脾臓や肺に高く集積するなど、 $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc とは異なる体内挙動を示した。さらに、担がんモデルマウスに  $^{125}\text{I}$ -GNR/sHAc を投与し、がんへの集積性を調べた結果、MCF-7 と比較して CD44 高発現 T24 へ有意に高く集積した。これらの結果より、GNR/sHAc が光温熱治療用薬剤として有効である可能性が示された。

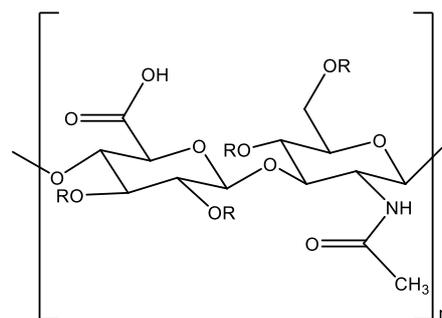


Figure 3. Chemical structure of sulfated hyaluronic acid. R=H or  $\text{SO}_3^-$ .

## 総括

第1章および第2章では、放射性標識デンドリマーをコアとして PEI および $\gamma$ -PGA あるいは HA で被覆した自己組織化ナノ粒子が、がんの核医学診断に有効である可能性を示した。今後、治療用放射性同位元素を用いることにより、内用放射線治療に適用できる可能性が期待される。さらに、硫酸化ヒアルロン酸にて被覆した GNR については、がんの光温熱治療用薬剤としての可能性を示したが、GNR より生じる光音響シグナルを利用した光音響イメージングへの適用も期待される。以上、本研究では、静電的相互作用による自己組織化に基づくがん標的ナノ粒子型セラノステイクス薬剤の開発を行った。本研究で得られた知見は、有効性の高いナノ粒子型セラノステイクス薬剤の簡便な作製方法として、新たな医薬品開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

## 参考文献

- [1] 厚生労働省, がん対策推進基本計画, 1-77 (2018).
- [2] Janib S.M., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 1052-63 (2010).
- [3] Azevedo A., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **606**, 120905 (2021).
- [4] Matsumura Y., *et al.*, *Cancer Res.*, **46**, 6387-92 (1986).
- [5] Byrne J.D., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1615-26 (2008).
- [6] Chamundeeswari M., *et al.*, *Environ. Chem. Lett.*, **17**, 849-65 (2019).
- [7] Lin X., *et al.*, *AAPS J.*, **23**, 43 (2021).
- [8] van der Heide S., *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, **471**, 127-35 (2016).
- [9] Xu W., *et al.*, *Acta Biomater.*, **83**, 400-13 (2019).
- [10] Ariga K., *et al.*, *Chem. Asian J.*, **14**, 2553-66 (2019).
- [11] Kurosaki T., *et al.*, *Biomaterials*, **30**, 2846-53 (2009).
- [12] Qian Y., *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10**, 32006-16 (2018).
- [13] Xiong K., *et al.*, *Front. Immunol.*, **13**, 1000927 (2022).
- [14] Kim J.H., *et al.*, *Polymers*, **10**, 1133 (2018).
- [15] Mesrati M.H., *et al.*, *Biomolecules*, **11**, 1850 (2021).
- [16] Khan N.U., *et al.*, *Cancer Nano.*, **12**, 20 (2021).
- [17] Sun M., *et al.*, *Nanoscale*, **8**, 4452-7 (2016).
- [18] Boehnke N., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **31**, 2211-9 (2020).
- [19] Gole A., *et al.*, *Langmuir*, **20**, 7117-22 (2004).

## 論文審査の結果の要旨

がん治療を効果的に推進するにあたり、正確ながんの局在・性状鑑別診断とその情報に基づく治療方針の決定ならびに治療の実施が極めて重要となる。それゆえ、がんの診断と治療をシームレスに実施しうるセラノスティクス（Theranostics=Therapeutics + Diagnostics）の重要性が強く提唱されている。本学位論文では、静電的相互作用を利用する Layer-by-Layer 法に基づき、がん標的ナノ粒子型セラノスティクス薬剤の開発を目指した。まず、アニオン性の放射性標識 dendrimer に、カチオン性のポリエチレンジアミンおよびアニオン性の  $\gamma$ -ポリグルタミン酸を順次被覆した自己組織化ナノ粒子を合成した。本ナノ粒子は、生体内で比較的安定に存在し、肺に転移したメラノーマの核医学診断に有効である可能性を示した。次に、上述の三成分系ナノ粒子の開発手法を応用し、最外被覆成分をアニオン性のヒアルロン酸に置換したナノ粒子を作製した。本粒子は、CD44 を高発現するがんへ高く集積したことから、CD44 高発現がんの核医学診断に有効である可能性を示した。最後に、カチオン性の金ナノロッドをアニオン性の硫酸化ヒアルロン酸で被覆したナノ粒子を作製した。本ナノ粒子は CD44 高発現がん細胞へ高く集積し、また、近赤外光照射との併用により高いがん細胞傷害効果を認めた。さらに、CD44 高発現がんへの集積を認めたことから、CD44 高発現がんの光温熱治療に有効である可能性を示した。

以上、本研究は、静電的相互作用を利用する Layer-by-Layer 法に基づき、がん標的ナノ粒子型セラノスティクス薬剤の簡便な作製方法の構築に成功した。これらの知見は、今後のがん標的セラノスティクス医薬品の開発において、有益な情報を提供するものと考えられる。

上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。