

熊谷研究助成表彰報告書

(令和3年度 助成分)

令和 5年 4月 12日

公益財団法人 熊谷科学技術振興財団 御中

代表研究者・所属機関名

静岡県立大学

所属学部学科・所属部課室・役職

薬学部・医薬生命化学分野・准教授

氏名 小出裕之

貴財団より助成を受けました件につき下記の通り(中間・最終)報告致します。

1. 研究テーマ及び期間

温度に反応して標的分子を放出するプラスチック抗体開発とがん治療応用

研究期間：令和4年 4月～令和 5年 3月

2. 共同研究者名

氏名

所属機関・職名

3. 成果の概要

【目的】抗体-抗原間の結合に代表されるタンパク質間の特異的で強い結合は、水素結合や疎水性相互作用など複数の非共有結合の多点結合により成立している。我々はこのタンパク質間相互作用を模倣して、poly *N*-isopropylacrylamide (pNIPAm) を基盤とした合成高分子ナノ粒子に静電的相互作用や疎水性相互作用を生み出す機能性モノマーを組み込むことで、標的分子に強く結合してその機能を中和可能なナノ粒子開発を行ってきた。これまでに、ハチ毒に含まれる溶血性のメリチンやがんの増殖を促進する血管内皮細胞増殖因子に対するナノ粒子を開発し、マウス血液中での標的分子の吸着と中和に成功してきた。ところで、pNIPAmを基盤とした合成高分子には下限臨界溶液温度(LCST)が存在し、LCST以上では粒子が収縮し、LCST以下では粒子が膨潤する性質を有している。このLCSTは組み込む機能性モノマーの構造と配合比によって変化することが知られている。さらに我々はいくつかのナノ粒子は収縮時に標的分子に対して高い親和性を示し、膨潤時には相互作用しにくいことを明らかにしてきた(Fig. 1a)。そこで本研究では、血液中で細胞障害性分子であるメリチンペプチドを吸着・中和し、腫瘍冷却により腫瘍局所でのみ細胞障害性分子を放出可能な温度応答性ナノ粒子を開発することで、がん治療を試みた(Fig. 1b)。メリチンは、ハチ毒由来の細胞障害性ペプチドであり、高い抗腫瘍効果が報告されている。

【方法】メリチンは正電荷、疎水性、中性アミノ酸から構成されるペプチドであることから、ナノ粒子はNIPAm、Acrylic acid(負電荷モノマー)、*N*-*tert*-butylacrylamide(疎水性モノマー)を用いて合成した。合成したナノ粒子の温度に応答した粒子径変化はDynamic light scattering、メリチンの吸着能の変化は赤血球溶血試験により評価した。温度に応答したナノ粒子-メリチン複合体の殺細胞効果を検討するために、マウス結腸がん細胞(Colon 26 NL-17)に複合体を添加し、37℃あるいは25℃で4時間インキュベートした後の生細胞数をWST-8 assayにより測定した。次に、ナノ粒子の生体内での安定性と静脈内投与後の血中滞留性の向上を目的として、Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate(PEG; M.W. 4000)を総モノマー濃度に対して3 mol%組み込んだPEG含有ナノ粒子

(PEG-NPs)を合成した。*In vivo*におけるナノ粒子の体内動態および、PEG含有ナノ粒子-メリチン複合体の抗腫瘍効果は、Colon 26 NL-17細胞を皮下移植したマウスを用いて検討した。放射標識PEG含有ナノ粒子とメリチンの複合体を形成後、腫瘍移植マウスに静脈内投与し、その24時間後に各組織中の放射活性を測定した。治療実験では、腫瘍移植マウスにPEG含有ナノ粒子-メリチン複合体をメリチン量として1.2 mg/kgとなるように尾静脈内投与し、投与後は毎日30分間腫瘍を氷嚢で冷却した。

【結果・考察】ナノ粒子のLCSTは、それぞれの機能性モノマーの配合比を変えることで大きく変化した。本研究では、体温に近い37℃付近で粒子が収縮し、冷却時を想定した25℃付近で膨潤するよう機能性モノマーの配合比を最適化した。最適化したナノ粒子とメリチンの複合体と赤血球を37℃もしくは25℃でインキュベートしたところ、37℃では溶血作用を示さなかったが、25℃では高い溶血作用を示した。また、ナノ粒子とメリチンの複合体はColon 26 NL-17細胞に対しても温度応答性を示し、25℃でのみ高い殺細胞効果を示した。以上より、それぞれの機能性モノマーの最適化により、温度に応答したメリチンの吸着と放出が示唆されたことから、がん治療に向けてPEG含有ナノ粒子を合成した。ナノ粒子へのPEGの組み込みによる温度応答性を評価したところ、温度低下に伴う粒子の膨潤とメリチンの放出が確認された。次に、温度応答性PEG含有ナノ粒子のがん治療応用に向けて、放射標識PEG含有ナノ粒子とメリチンの複合体を担がんマウスに静脈内投与し、その24時間後の体内動態を解析したところ、PEG修飾によってNPsの血中滞留性と腫瘍集積性が有意に向上した。これは、粒子の血中滞留性向上によるEnhanced permeability and retention効果の増強に起因すると考えられる。最後に、温度応答性PEG含有ナノ粒子とメリチン複合体の抗腫瘍効果を検討したところ、温度応答性PEG含有ナノ粒子を投与して腫瘍を冷却した群では、対照群として用いた腫瘍の冷却を行わなかった群や温度非応答性のPEG含有ナノ粒子を投与して冷却した群と比較して有意に腫瘍の増大を抑制した。以上の結果より、温度応答性ナノ粒子は、冷却した腫瘍局所でのみメリチンを放出することで高い抗腫瘍効果が得られたことから、温度感受性の放出制御製材料としての有用性が示された。

4. 研究成果の発表状況(予定を含む)

- 小出裕之：生体内で標的分子を吸着する多官能性ナノ粒子製剤の開発と疾患治療への応用 日本薬学会第37年会(京都、オンライン開催)、講演要旨集 p.8、2022年5月26日～28日
- 小出裕之：2022年度日本薬学会奨励賞 生体内で標的分子を吸着する多官能性ナノ粒子製剤の開発と疾患治療への応用
- 小出裕之：令和5年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞 革新的な標的分子吸着モダリティ開発による疾患治療研究
- Hiroyuki Koide, Kazuhiro Saito, Keiichi Yoshimatsu, Beverly Chou, Yu Hoshino, Sei Yonezawa, Naoto Oku, Tomohiro Asai, Kenneth J Shea, Cooling-induced, localized release of cytotoxic peptides from engineered polymer nanoparticles in living mice for cancer therapy. *J Control Release*, 2023,355:745-759.

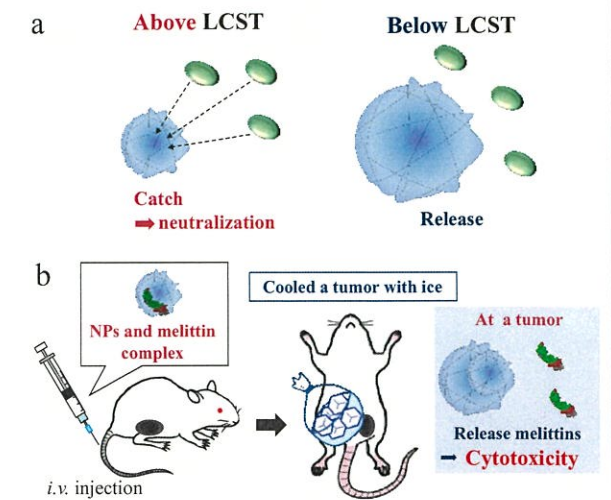


Figure 1. Schematic image of this study. (a) pNIPAm-based NPs have high affinity for the target above the LCST, but little affinity below the LCST. (b) In this study, we injected NPs and melittin complexes into the tumor-bearing mice. Then, the tumor was cooled with ice for the melittin release from NPs to induce tumor-specific cytotoxicity.