

博士論文（要約）

**A Study on the Characterization and
Biological Activity of Polymeric Micelles
Incorporating Platinum Antitumor
Agents**

（白金錯体制がん剤を内包する高分子ミセルの
特性解析と生物活性に関する研究）

持田 祐希

がん治療において患者のquality of life (QOL)を低下させる要因の一つに、制がん剤投与に起因する強い副作用が挙げられる。そのため、副作用を低減しつつ高い治療効果を得る方法として、薬物を体内の標的部位に選択的に集積させる薬物送達システム(DDS)が大きな注目を集めている。がん組織は血管壁の透過性が亢進し、リンパ系が未熟であるため、高分子ミセルなどのナノ粒子が集積し、滞留しやすい環境が形成されており[Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果]、制がん剤を高分子ミセルに内包して血中投与することで、がん組織選択的に集積させることができると考えられる。ところが、これまでに開発された多くの高分子ミセル型DDSは、他臓器への非特異的分布や血中滞留時間の短さが問題となり、制がん剤のがん組織に対する送達効率が悪く、十分な治療効果を挙げることができていない。それに対して、生体適合性ブロック共重合体であるポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸[PEG-*b*-P(Glu)]と白金錯体制がん剤シスプラチン(CDDP)またはダハプラチン(DACHPt)を反応させることで得られる白金錯体制がん剤内包ミセル(それぞれ、CDDP/mとDACHPt/m)は、非常に高い血中滞留性とがん組織に対する効率的集積性を示し、ヒトを対象とした臨床試験においても優れたがん治療効果を示している。そこで、本研究では、白金錯体制がん剤内包ミセルのコアを構成するポリグルタミン酸[P(Glu)]鎖と白金錯体の特性に着目して、その優れた薬剤機能に寄与する構造的要因を明らかにし、更なる機能向上を達成する方策を探った。

ポリペプチドは特徴的な二次構造を形成することができ、それらが集合した高次構造は、ポリペプチドの構造維持や機能発現に重要な役割を果たしていることが知られている。そのため、CDDP/mやDACHPt/mのコアを構成するP(Glu)鎖の二次構造が、ミセルの構造や薬剤機能に何らかの影響を与えている可能性がある。

そこで、構成グルタミン酸の光学活性が異なる3種類のPEG-*b*-P(Glu) [PEG-*b*-poly(L-glutamic acid) (L-Polymer)、PEG-*b*-poly(D-glutamic acid) (D-Polymer)及びPEG-*b*-poly(D,L-glutamic acid) (D,L-Polymer)]を合成し、各々からCDDP/mまたはDACHPt/mを調製することによりP(Glu)鎖の二次構造の影響を調べた。

まず、各ポリマーの二次構造形成能を酸性水溶液中で調べたところ、L-PolymerとD-PolymerはP(Glu)鎖にそれぞれ右巻きと左巻きの α ヘリックスが誘導されたのに対し、D,L-PolymerのP(Glu)鎖は二次構造を形成しなかった。続いて、各ポリマーとCDDPまたはDACHPtと反応させたところ、L-PolymerとD-PolymerはP(Glu)鎖に α ヘリックスが誘導されることにより会合体形成が促進され、D,L-Polymerを用いた場合より高収率で単分散のミセルを与えることが確認された。特に、疎水性が大きいDACHPtを内包する場合には、P(Glu)鎖に α ヘリックスを有することが単分散のミセルを得るために重要であることが明らかになった。また、L-Polymerから形成されるCDDP/mについて詳細な構造解析を行った結果、P(Glu)鎖の65%の領域が α ヘリックスを形成し、それらがミセルのコアの中でバンドル構造を形成していることが示唆された。

次に、P(Glu)鎖の高次構造が、生理条件下における白金錯体の放出とミセルの解離挙動に及ぼす影響を検証した。生理条件下では、コアに担持された白金錯体が塩化物イオンによる配位子交換を受けて徐放され、ミセル構造の解離が進行すると考えられる。コアのP(Glu)鎖が高次構造を形成しないD,L-Polymerから調製したミセルの場合は、白金錯体の放出に伴ってミセルの解離が加速的に進行したのに対し、L-PolymerまたはD-Polymerから調製したミセルの場合は、 α ヘリックスから成る高次構造によりコア構造が安定化され、より緩やかに、一定速度で白金錯体の放出とミセルの解離が進行した。特に、疎水性の大きいコアを有するDACHPt/mの場合は、コアの α ヘリックス構造がミセルの解離に伴う粒径の増大を防ぎ、解離過程において密なコア構造を維持できることが明らかになった。

さらに、P(Glu)鎖の高次構造がミセルの薬剤機能に及ぼす影響を調べた。ヒト膵臓がん(BxPC3)細胞に対する細胞毒性は、コアを形成する P(Glu)鎖の高次構造の違いに因らず同様であったのに対し、BxPC3 腫瘍を担持したマウスに各ミセルを静脈投与すると、コアに α ヘリックスを有するミセルの方が、高次構造を有しないミセルより効果的な制がん効果を示すことが確認された。この結果は、コアの高次構造によって、がん組織に対する白金錯体の送達効率が制御されたことを示唆する。そこで、各ミセルの血中濃度と臓器に対する分布を経時的に追ったところ、コアに α ヘリックスを有するミセルは、肝臓と脾臓に対する集積が抑制され、血中滞留性が向上することで、EPR 効果により、がん組織に対する白金錯体の集積量が増大することが確認された。これは、 α ヘリックス構造によってコアが安定化されることにより、血中におけるミセル構造の急激な解離が抑制され、PEG によるコアの保護が維持された結果、肝臓や脾臓による捕捉が回避されたためであると考えられる。以上の結果は、高分子ミセルの構造安定性や解離挙動を制御する方法として、高分子鎖の高次構造を制御することが有効な手段であることを示す。

続いて、P(Glu)鎖の二次構造の構造特性を利用することで、DACHPt/m と類似した組成を有する中空粒子型 DDS を開発した。中空粒子は膜構造を有するため、側面方向に整列しやすい構造的性質を有する α ヘリックスが、膜の構成単位として利用できると考えられる。そこで、PEG と P(Glu)間の界面に働く力を調整し、膜構造を誘導する試みとして、二本鎖 PEG (PEGasus)を有し、疎水性の cholesterol を P(Glu)の ω 末端に導入した PEGasus-P(Glu)-cholesterol を合成し、DACHPt と反応させることで、中空粒子(Pt-some)を得ることに成功した。Pt-some の膜は、cholesterol を挟んだ P(Glu)鎖の α ヘリックスの二重層から成ることが示唆され、内水層に親水性高分子を内包できることが確認された。また、生理条件下では、塩化物イオンによる配位子交換反応により DACHPt が徐放され、それに伴い内包された親水

性高分子の徐放が進行することが確認された。マウス大腸がん(C26)を担持するマウスに対して、Pt-some を静脈投与したところ、臨床で使用される白金錯体制がん剤 oxaliplatin と比べて非常に高い血中滞留性と EPR 効果による腫瘍への選択的集積性を示した。そのため、Pt-some の内水層に蛍光プローブとして Alexa 680-dextran を内包してマウスに静脈投与すると、腫瘍のイメージングが可能となり、同時に高い制がん効果を示すことが確認された。

白金錯体制がん剤内包ミセルのコアのもう一つの構成要素は白金錯体である。白金錯体は、配位子の種類や白金原子の酸化数の大きさといった配位状態の変化により、配位子交換反応の速度が著しく変化することが知られている。そのため、P(Glu)鎖に担持された白金錯体の配位状態もミセルの安定性や機能に影響を与える可能性がある。これまでに、DACHPt/m は CDDP/m より構造の解離が速く、肝臓への集積が大きいことが明らかになっている。そこで、DACHPt の配位状態を制御することにより、DACHPt/m の機能改善を試みた。DACHPt/m の形成過程は速度論的過程であると考えられるため、得られたミセルが最安定構造であるとは限らない。そのため、DACHPt/m に対して、24 時間 70 °C で熱処理を行い、ミセル構造の再構築を促したところ、生理条件下におけるミセルの解離の速度が劇的に遅くなることが明らかになった。また、ミセル調製時の温度を変えることにより、P(Glu)鎖の側鎖カルボキシラートの白金原子に対する配位数を調整することで、ミセルの解離過程を幅広い時間範囲で制御できることが示された。さらに、過酸化水素を用いてコアに担持された白金原子を酸化し、配位子交換反応を不活性化したところ、生理条件下におけるミセルの解離が完全に抑制されたのに対し、還元剤のグルタチオンに応答して DACHPt の放出とミセル構造の解離を誘起させることに成功した。細胞外のグルタチオン濃度が数 μM であるのに対し、がん細胞内のグルタチオン濃度は数 mM にも及ぶため、酸化処理を施されたミセルはがん

細胞内において選択的に DACHPt を放出することが期待され、副作用の更なる低減が見込まれる。

本研究では、白金錯体制がん剤内包ミセルのコアを構成する P(Glu)鎖と白金錯体の特性、すなわち、P(Glu)鎖の高次構造と白金原子の配位状態が、本ミセルの優れた薬剤機能の決定的要因であることを示した。P(Glu)鎖に α ヘリックスが誘導されることにより、高収率で単分散のミセルが得られる一方、機能面では、ミセルの解離速度を抑制し、腫瘍選択的な白金錯体制がん剤の送達を可能にすることが明らかになった。また、 α ヘリックスの構造特性を利用して、がんの治療と診断を同時に行える中空粒子型 DDS の構築に成功した。さらに、DACHPt/m に熱処理や酸化処理を施すことで白金原子の配位状態を制御し、ミセルの解離速度の広範囲に渡る制御や白金錯体放出の還元環境応答性の付加が行えることを明らかにした。本研究の成果は、ポリペプチドや金属元素を含む超分子材料の新たな構造設計指針を提供し、臨床応用可能な高分子ミセル型 DDS の構築に大きく貢献するものと考えられる。