

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300164

研究課題名（和文） 重金属含有精密設計高分子によるX線増感型がん治療法の創出

研究課題名（英文） Development of X-ray sensitizing therapy by precisely designed polymers bearing heavy metals

研究代表者

安藤 剛 (ANDO TSUYOSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：60324654

研究成果の概要（和文）：がんの放射線治療において、低線量の放射線照射によってがん細胞を殺傷する新たな治療法の開発を目指し、X線増感剤の開発を行った。リビングラジカル重合を用いて、中心に多数の金属を有する星型ポリマーを合成した。得られた金属含有星型ポリマーを子宮頸部ガン由来培養細胞株(HeLa)に加えて培養し、X線を照射したところ、金属含有星型ポリマーを加えていないHeLa細胞はほとんど殺傷されなかったのに対し、金属含有星型ポリマーを加えたHeLa細胞では多くの細胞が殺傷されており、X線増感効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this project, X-ray sensitizing material was developed for radiation therapy of cancer to reduce irradiation dose. Metal-bearing star polymer, which has many metals in its core, was prepared by living radical polymerization and was employed as an X-ray sensitizer. The obtained metal-bearing star polymer was added to HeLa cells and incubated. X-ray was then irradiated to the cells. More cells containing the star polymer were killed than that without the star polymer, which indicates that the metal-containing star polymer actually worked as an X-ray sensitizer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノバイオロジー、ナノメディスン、X線増感、スターポリマー

1. 研究開始当初の背景

がんは我国の死亡原因の1位(平成18年現在30.5%)であり、有効な治療法の開発が急務である。がん治療は主に外科手術、化学療法、放射線療法があり、中でも放射線療法は体透過性が非常に高く、外科的手術が困難な部位でも適用可能である。しかし現在の放射線治

療では、70Gy以上という致死線量をはるかに超える線量を1回2Gyで2ヶ月間の分割照射によって行っており、さらに抗がん剤との併用を行うことから患者への負担が非常に大きい。

レーザー療法の一つである光線力学療法(PDT)は、レーザー光と光増感剤を組み合わせがん細胞内で光化学反応を起こさせ、がん部

位のみを死滅させる。この治療法は通常のレーザー療法と比べて200倍以上の治療効果が高まる事が知られており、子宮がんなどで臨床試験が盛んに行われている。しかしながら、PDTで用いる光線は可視光からせいぜい赤外光のため光の透過性はそれほど高くなく、皮膚表面から数mm程度の深さまでしか光は到達せず、深部がんには適用できない。

そこで申請者らは、X線間接撮影に用いられている程度(約1mGy)の低線量でがん組織を死滅させることを目指し、がん組織内でX線を吸収し、細胞内で殺傷効果の高い活性酸素を発生させるX線増感剤を用いた新しい放射線治療法開発の発想に至った(図1)。

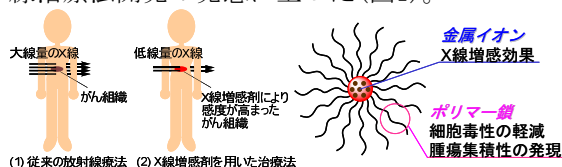


図1. X線増感剤によるがん治療

2. 研究の目的

本研究では特に重金属を分子内に含有する高分子をキャリアとして検討する。高分子は分子内に多数の機能性基、官能基を持たせることができ、また鎖の構造を適切に選択することにより溶解性を比較的容易にコントロールできる。特に、中心から多数のポリマー鎖が放射状に伸びた特殊な構造を持つポリマーを星型ポリマーと呼ぶ。申請者らが近年見出した金属錯体を用いたリビングラジカル重合法を用いることにより、金属含有星型ポリマーを合成することができる。星型ポリマーの中心部(核)は直径数ナノメートル程度のマイクロゲルを有しており、核内に数十から数百の金属原子を持つ星型ポリマーが合成できる。

本研究では、(1) X線増感効果が期待できる重金属原子をがん細胞へ取り込ませるために、EPR効果を持つと考えられている高分子薬剤を用いることで選択的に腫瘍部へ薬剤を集中させ、(2) 重金属原子の高いX線吸収効率によりがん細胞内で選択的に活性酸素種を発生させる二重の選択性を用いることにより、QOLの高いがん治療法を提供することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、精密に設計した重金属含有高分子(薬剤)をX線と組み合わせることにより、薬剤を含まない細胞には影響を及ぼさない程度の低線量のX線を増感し、がん細胞を死滅させるX線増感型がん治療薬の創成および治療法の創出を目指す。そのために「高分子X線増感薬剤の創成」と「細胞を用いたin vitro

評価」の両面から精査する。

申請者らが開発したリビングラジカル重合法を用い、種々の枝の種類、枝の長さを有する金属含有星型高分子を合成し(*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5288-5289 など)、以下の項目について評価を行う。

(1) 金属含有星型高分子の合成

リビングラジカル重合法により、種々のモノマーについて分子量の揃った高分子(枝ポリマー)を合成する。様々な長さの枝ポリマーをマクロ開始剤として用い、ジビニル化合物(リンキング剤)、配位子モノマー(金属結合剤)を重合させ種々のサイズ、溶解性、電荷を有する星型高分子を得る。

(2) 星型高分子への種々の重金属の導入(金属の種類、濃度)

合成した星型高分子と種々の金属化合物を反応させ、星型高分子の核に導入できる金属の範囲を明らかにすると同時にその導入量をMIP-MS(現有設備)により定量する。さらに、星型高分子を合成する際に組み込む配位子モノマー(金属結合点)の量を変化させることにより導入できる金属量の範囲を明らかにする。高効率でX線を増感するには原子番号の大きな元素を用いる他に、細胞内に多数の金属を導入することも重要である。

(3) マーカー含有星型高分子の合成

X線増感剤の細胞内の局在化の様子を調べるため、星型高分子の核あるいは枝部に蛍光色素を導入し、マーカー含有星型高分子を合成する。

(4) 金属含有星型高分子の毒性試験

合成した種々の金属含有星型高分子のHeLa細胞に対する細胞毒性を調べる。高分子薬剤をHeLa細胞に接触させ、細胞へ取り込ませ、24時間後にWST-8アッセイにより細胞生存率を求める。この試験で細胞毒性を示さなかった金属含有星型高分子薬剤について、以下の評価を行う。

(5) X線照射試験

X線装置(Wターゲット50-100 keV)のX線を用い、合成した金属含有星型高分子のHeLa細胞に対するX線照射による殺細胞効果(X線増感効果)を評価する。特に照射線量、薬剤濃度、金属量依存性に着目して試験を行う。

4. 研究成果

(1) 水溶性重金属含有星型ポリマーの合成

申請者らが開発したリビングラジカル重合法を用い、種々の枝の種類、枝の長さを有する金属含有星型高分子の合成を検討した。特に、高分子薬剤に水溶性を付与するため、親水性モノマーであるメタクリル酸ポリエチレングリコール(PEGMA)を重合し、引き続

いて星型高分子へ変換した。この星型化の際に、単純にカップリング試薬を反応させるのではなく、一度嵩高さの小さいメタクリル酸メチルをポリ(PEGMA)に少量ブロック共重合し、それからカップリング試薬、配位子モノマーを加えることで、星型ポリマーを高収率で得ることに成功した(図2)。このポリマーにはRuが $39 \cdot \text{mol/g-polymer}$ の濃度で取り込まれていた。

さらに、重合の際に星型ポリマーの核に取り込ませた金属錯体触媒(ルテニウム)を抜き取り、より高い増感効果の期待できるRe、Pt等の重金属原子を星型ポリマーの核に導入することにも成功した。

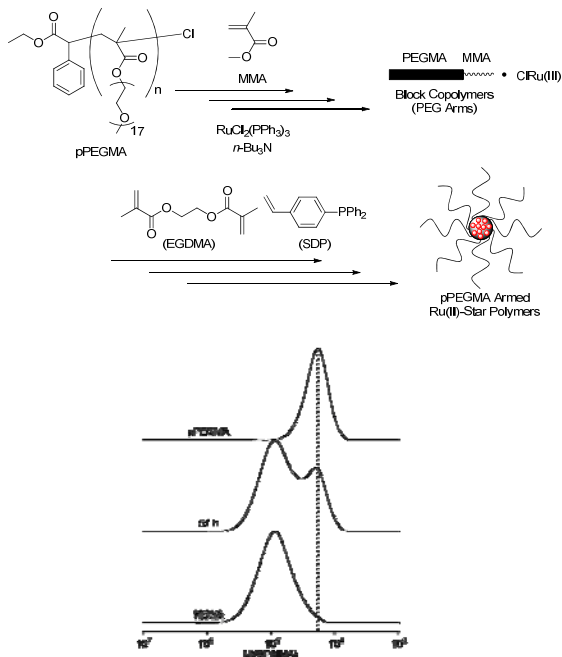


図2. Ru含有水溶性星型ポリマーの合成

(2) 重金属含有星型ポリマーを用いた *in vitro* X線増感試験

合成した核にルテニウムを含有する水溶性星型高分子薬剤を用い、そのX線増感効果について子宮頸部がん由来培養細胞株(HeLa)を用いて評価した。細胞にX線増感剤を添加し、24時間接触させて薬剤を取り込ませた後、X線照射装置によりX線を照射し、細胞の増殖能、生存率を顕微鏡により観察した。その結果、予備的な結果ではあるが、X線増感剤を添加し、X線照射した場合は、X線照射のみの場合に比べて細胞の生存率は低く(図3)、X線増感剤が有効に働いていることを示唆している。

また、前年度までのX線増感剤の合成方法では、合成後の安定性に問題があることがわかったが、合成法を改良することにより、より安定性の高いX線増感剤の合成に成功した。本

研究結果は、日本化学会第91春季年会(平成23年3月、横浜)にて発表した。

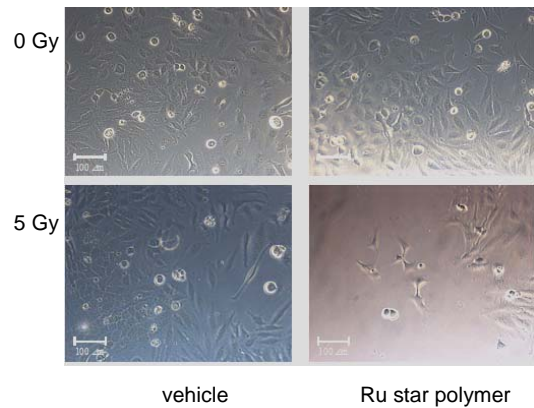


図3. Ru含有星型ポリマーを用いた *in vitro* X線増感試験

(3) ユーロピウム含有水溶性星型ポリマーの合成

ルテニウム含有星型ポリマーは長期保存の間に金属が酸化を受けることが分かった。これに代わり、ホスフィンオキシド配位子を有するユーロピウム錯体の導入を検討した。ユーロピウムの原子番号は63であり、原子番号44のルテニウムと比較して高いX線九州効率が期待される。導入方法を検討した結果、 $26 \mu \text{mol/g-polymer}$ の濃度でユーロピウムを導入することができた(図4)。

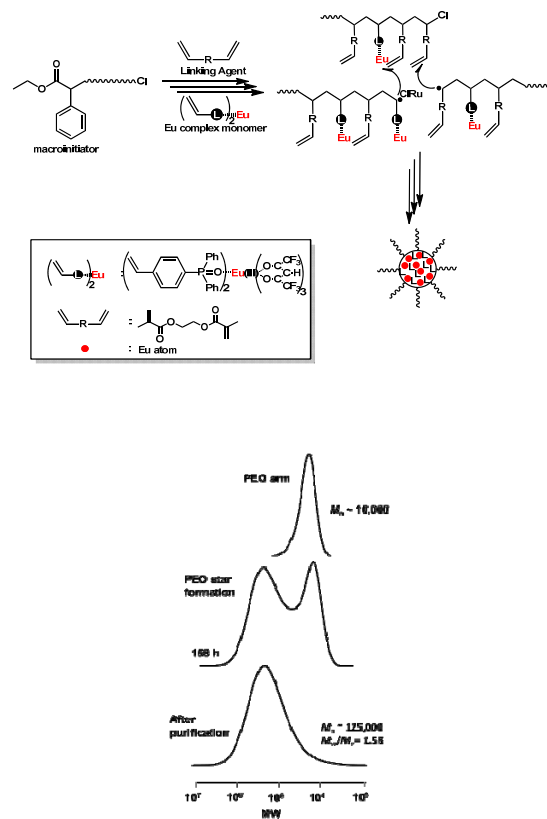


図4. Eu含有水溶性星型ポリマーの合成

このユーロピウム含有星型ポリマーはルテニウム含有星型ポリマーと異なり、酸素に対して安定であった。また、金属の原子番号が大きいため、高いX線増感効果が期待できる。さらに、得られたユーロピウム含有星型ポリマーは強い蛍光を発生し、その蛍光強度は対応するユーロピウム錯体よりも大きいものであった(図5)。

このように、ユーロピウム含有星型ポリマーは蛍光による診断、X線増感による治療の二種類の役割を一種類の分子で果たすことができると期待される。本成果は平成24年5月の第61回高分子学会年次大会において発表した。

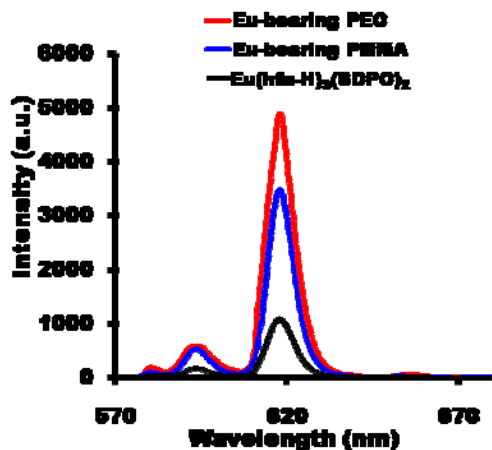


図 5. Eu 含有星型ポリマーの蛍光スペクトル

(4) 今後はこのユーロピウム含有星型ポリマーについて、X線照射によるDNAの切断能の調査およびがん細胞を用いた星型ポリマーの細胞内局在化、X線照射化における殺細胞能力の評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Ahmad Kusumaatmaja, Kayo Terada, Shiho Hirohara, Tsuyoshi Ando, Masao Tanihara, 「Eu-bearing Star Polymers: Syntheses by Living Radical Polymerization and Their Photoproperties」、第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 31 日、横浜
- (2) 増岡志寿香、安藤剛、寺田佳世、廣原志保、谷原正夫、「核に多数のルテニウムを有する星型ポリマーの合成と X 線増感作用の評価」、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 27 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 剛 (ANDO TSUYOSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：60324654

(2) 研究分担者

谷原 正夫 (TANIHARA MASAO)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：50294286

廣原 志保 (HIROHARA SHIHO)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：70413804