

《様式B》

研究テーマ	「 酸化還元活性リン脂質ポリマーによるがん治療法の開発 」
研究責任者	所属機関名 国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学 官職又は役職 助教 氏 名 金子真大 メールアドレス: kaneko.masahiro@material.nagoya-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名 官職又は役職 氏 名

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

がん細胞は一般的に酸化ストレスに対する脆弱性が高いことから、細胞内の酸化還元(レドックス)バランスを攪乱するレドックス活性化合物は有望ながん治療薬候補である。しかし、単一のレドックス分子では効果が限定的であり、複数の分子を組み合わせる場合も、水溶性の低さや合成の複雑さが課題であった。本研究ではこの課題を解決するため、優れた生体適合性と水溶性、細胞膜透過性を有するリン脂質ポリマー(MPCポリマー)を基盤とし、異なるレドックス電位を持つ二種類のレドックス活性ユニット、すなわち抗酸化物質を枯渇させるフェロセン(Fc)と活性酸素種(ROS)を生成するアントラキノン(Aq)を同一分子内に導入した、水溶性・細胞透過性のデュアルレドックス活性ポリマー(pMBFcAq)を設計・合成した。

電気化学測定により、合成したpMBFcAqが、FcユニットとAqユニット双方に由来するレドックス活性を維持していることが確認された。マウス大腸がんCT26細胞を用いたin vitro評価において、pMBFcAqが細胞内に侵入できることが明らかになった。また、FcまたはAq単独のポリマーと比較して、pMBFcAqはより強力に細胞内ROSレベルを上昇させ、より高い抗がん活性を示した。これは、Fcによる抗酸化物質の枯渇とAqによるROS生成という二つの作用機序が相乗的に働き、がん細胞内の酸化ストレスを効果的に増大させたことを示唆している。ポリマーの抗がん活性は、ポリマーのユニット組成比を最適することでさらに向上させることができた。さらに、CT26担がんマウスモデルを用いたin vivo評価では、pMBFcAqの腫瘍内投与により、対照群と比較して顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた。

本研究では、リン脂質ポリマーを応用することで、水溶性かつ細胞透過性を有するデュアルレドックスポリマーを開発した。本成果は、既存の低分子レドックス薬剤の課題(水溶性、単一作用)を克服しうる、新しいタイプのがん治療薬候補としての展開が期待される。特にin

vivo での有効性と低毒性が示されたことは、今後の前臨床試験への移行に向けた重要な知見である本研究は、レドックスポリマーのがん治療応用における有効な戦略を提供するものであり、将来的な創薬分野への貢献が期待される。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

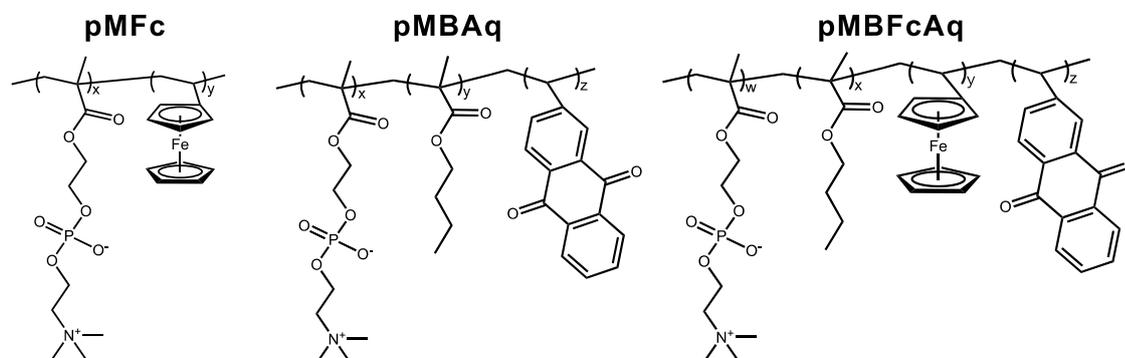


Figure 1. レドックスポリマーの構造式。

VFc と VAq を異なる比率で含む pMBFcAq 群を合成した (Figure 1, Table 1)。DLS 測定から、VAq ユニットを含む pMBAq および pMBFcAq は、pMFC よりも大きな流体力学サイズを示し、VAq ユニット間の π - π 相互作用が示唆された。また、pMBFcAq では、疎水性 BMA ユニットの割合が増加するとサイズが増大する傾向が見られた。pMBFcAq5212 を除き、いずれのポリマーも MPC ユニットの高い可溶化能力により、10 mg/mL の濃度で水に溶解した CV 測定の結果、pMFC は +0.47 V vs. SHE、pMBAq は -0.46 V にそれぞれ単一のレドックスピーク対を示したのに対し、pMBFcAq は VFc ユニット由来 (+0.48~+0.53 V) と VAq ユニット由来 (-0.42~-0.49 V) の二組のレドックスピークを示し、両ユニットのレドックス活性がポリマー中でも維持されていることが確認された。

レドックスポリマーをマウス結腸がん CT26 細胞に対して添加し、24 時間後の生存率を測定することで、抗がん活性を評価した。CT26 細胞に対するレドックスポリマーの IC₅₀ 値 (細胞が 50% 死滅する濃度) を比較した結果、pMFC (0.57 mg/mL) および pMBAq (13.4 mg/mL) と比較して、デュアルレドックスポリマー pMBFcAq はいずれの組成においてもこれらより低い IC₅₀ 値を示し、VFc と VAq の組み合わせが単独の場合よりも高い抗がん活性を有することが明らかとなった。pMBFcAq 内での親水性/疎水性バランス (MPC/BMA 比) を変化させた場合、pMBFcAq5311 が最も低い値 (0.26 mg/mL) を示した。次に、合成時の MPC/BMA 比を 50/20 に固定し、レドックスユニット比 (VFc/VAq 比) を変化させたポリマーを評価したところ、

VFc/VAq=2/1 の組成を持つ pMBFcAq5221 が最も低い IC₅₀ 値 (0.19 mg/mL) を示した。これは、レドックスユニットのモル濃度で換算すると、pMFC (VFc ユニット; 1.0 mM) や pMBAq (VAq ユニット; 3.8 mM) よりも大幅に低い濃度 (VFc ユニット; 0.18 mM, VAq ユニット; 0.094 mM) で同等の細胞死滅効果を示すことを意味し、デュアルレドックス化による相乗効果が強く示唆された。

Table 1. Properties of the redox polymers synthesized in this study.

Polymers	Monomer unit composition (mol %)		M_w ($\times 10^3$) ^c	M_w/M_n ^c	Hydro dynamic size (nm) ^d	Water solubility ^e
	In feed MPC/BMA/VFc/VAq ^a	In copolymer MPC/BMA/VFc/VAq ^b				
pMFC	60/0/40/0	53/0/47/0	3.7	1.9	7.1	++
pMBAq	60/30/0/10	59/34/0/7	7.3	2.1	36.7	++
pMBFcAq6211	60/20/10/10	68/10/17/5	1.9	1.6	14.7	++
pMBFcAq5311	50/30/10/10	44/38/9/9	2.1	1.5	29.3	++
pMBFcAq4411	40/40/10/10	35/47/9/10	0.97	1.9	37.8	++
pMBFcAq3511	30/50/10/10	30/53/9/8	0.97	1.9	99.3	++
pMBFcAq5212	50/20/10/20	43/30/9/18	0.99	1.8	176	+
pMBFcAq5221	50/20/20/10	40/26/22/12	1.0	1.9	13.1	++

^aMPC, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; BMA, n-butyl methacrylate; VFc, vinyl ferrocene; VAq, 2-vinyl anthraquinone.

^bCalculated using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopies and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).

^cWeight-average (M_w) and number-average (M_n) weights were measured by gel permeation chromatography (GPC) using poly (polyethylene glycol) standards.

^dDetermined by dynamic light scattering (DLS).

^eSolubility was tested for the polymer solution in Dulbecco's phosphate-buffered saline: soluble at 1.0 mg/mL is denoted as (+) and 10 mg/mL is denoted as (++) .

pMBFcAq の高い抗がん活性のメカニズムを探るため、pMBFcAq の機能を評価した。ローダミン B により蛍光標識したポリマーを CT26 細胞に添加したところ、pMBFcAq5221 は pMFC や pMBAq と同様に CT26 細胞内へ効率的に移行することが明らかになった。次に、ポリマー添加 1 時間後の細胞内 ROS レベルを測定したところ、pMBFcAq5221 を添加した細胞は、pMFC または pMBAq を添加した細胞よりも高い ROS レベルを示した。これらの結果から、pMBFcAq の高い抗がん活性は、細胞内へ効率的に取り込まれた後、VFc ユニットによる抗酸化物質の枯渇作用と、VAq ユニットによる ROS 生成作用が相乗的に働き、細胞内の酸化ストレスを効果的に増大させることに起因したと考えられる。

最も高い *in vitro* 抗がん活性を示した pMBFcAq5221 を用いて、CT26 担がんマウスモデルに

における *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。治療は、pMBFcAq5221 を腫瘍内へ 10 日間連日投与することで行った。治療群では、対照群 (PBS を投与) と比較して、腫瘍増殖が抑制された対照群では全個体で腫瘍が増殖し続けたのに対し、pMBFcAq5221 投与群では全個体で増殖抑制が見られ、6 匹中 1 匹では腫瘍の完全退縮が観察された。また、投与期間中、pMBFcAq5221 投与群において顕著な体重減少は観察されず、全身的な毒性は低いことが示唆された。以上の結果は、開発したデュアルレドックス活性ポリマー pMBFcAq が *in vivo* においても強力な抗腫瘍効果を発揮したことを示している。

本研究では、VFc と VAq を同一ポリマー中に導入した、水溶性・細胞透過性のデュアルレドックス活性リン脂質ポリマー pMBFcAq の開発に成功した。pMBFcAq は、単一のレドックスユニットを持つポリマーと比較して、*in vitro* で著しく高い抗がん活性を示し、その活性はユニット組成の最適化によりさらに向上した。さらに、担がんマウスモデルを用いた *in vivo* 試験においても、pMBFcAq5221 の腫瘍内投与により顕著な腫瘍増殖抑制効果と低い毒性が確認された。本研究成果は、デュアルレドックスポリマーという分子設計が、高活性ながん治療用高分子材料を開発するための有効な戦略であることを実証したものである

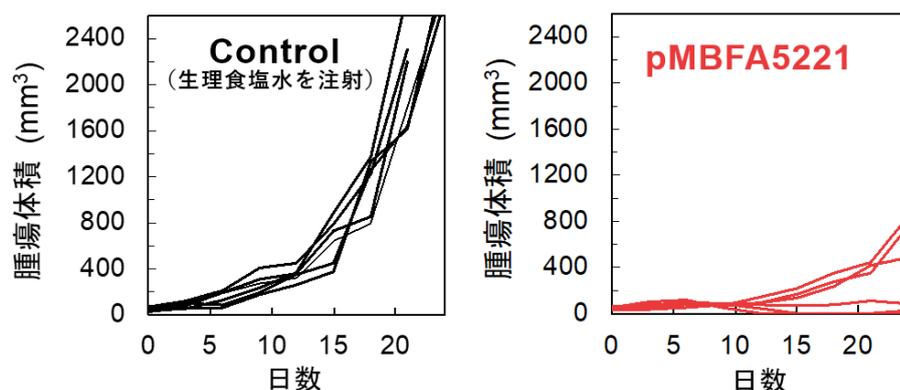


Figure 2. CT26 担癌マウスに対する pMBFA5221 の腫瘍内投与による治療効果。コントロール (左) および pMBFcAq5221 群 (右) の腫瘍成長曲線。各線は 1 匹のマウスの腫瘍成長を表す (n = 6)。

発表論文

Yuki Ogawa, Masahiro Kaneko, Akira Ito, Molecular Design of Dual Redox-Active Phospholipid Polymers with a Potent Anticancer Activity, *ACS Appl. Polym. Mater.* in press.