

## 94. 抗 VEGF プラスチック人工抗体の開発とがん治療への応用

小出 裕之

静岡県立大学 薬学部 薬学科 医薬生命化学教室

Key words : がん, 高分子, 抗体, ヘパリン, VEGF

### 緒言

リガンドとレセプターなど生体高分子間の相互作用は、細胞増殖など生命活動の維持に必須の現象である。そのため、生体高分子間相互作用の人工的な調節は、様々な疾患の治療戦略として非常に重要な意味をもつ。そもそも生体高分子間の相互作用は、静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用など多くの弱い結合が合わさり強い結合を生み出している。そのため、これらの結合を生み出す複数の機能性グルーブを組み込んだ合成高分子は、“人工抗体”として標的タンパク質に対して高い結合能を示す。これまで、*N*-isopropylacrylamide (NIPAm) を基盤とし、シンプルな負電荷モノマーである Acrylic acid (AAc) と疎水性モノマーである *N*-tert-butylacrylamide (TBAm) を組み合わせることで、ハチ毒メリチンに対して強く結合するポリマーナノ粒子 (NPs) “プラスチック人工抗体”の合成開発に成功している<sup>1-4)</sup>。

がん細胞は正常細胞とは異なり無秩序に、そして無限に増殖するため既存の血管からでは十分な酸素や栄養素を得られない。そのため、がん細胞自身が vascular endothelial growth factor (VEGF) や fibroblast growth factor (FGF)、platelet-derived growth factor (PDGF) など多くの増殖因子を産生し、がんの周辺に新たな血管を誘導する (血管新生)<sup>5,6)</sup>。新生血管の構築はこれら増殖因子のなかでも 165 個のアミノ酸からなる VEGF<sub>165</sub> が中心的な役割を担っていることが知られている。そこで本研究では、がんの増殖に必要なタンパク質である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF<sub>165</sub>) に結合し、機能を阻害する抗 VEGF プラスチック人工抗体を合成開発し、がん治療への応用を目指した<sup>7)</sup>。

### 方法、結果および考察

#### 1. VEGF<sub>165</sub> に対して親和性の高いポリマーナノ粒子ライブラリーの合成とスクリーニング

VEGF<sub>165</sub> に親和性を示すナノ粒子の開発に向けて、VEGF<sub>165</sub> が有するヘパリンとの結合ドメインに着目した。ヘパリンは高度に硫酸化された *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) であり、負に帯電している。そこで、ナノ粒子の構成成分としてヘパリン構造に類似した 3,4,6 tri-sulfate GlcNAc (3,4,6S-GlcNAc) モノマーを合成した。ナノ粒子は、*N*-isopropylacrylamide (NIPAm) を主成分として、疎水性モノマーである *N*-tert-butylacrylamide (TBAm)、架橋剤である *N,N'*-methylenebisacrylamide (Bis)、そして 3,4,6 trisulfate-GlcNAc を用いラジカル重合反応により合成した (図 1)。ナノ粒子は、TBAm 40 mol%、Bis 2 mol% とし、3,4,6S-GlcNAc を 0、1.7、5、10 mol% となるように 4 種類、沈殿重合法により合成した (表 1)。合成したナノ粒子と VEGF<sub>165</sub> との結合親和性は quartz crystal microbalance (QCM) により測定した (図 2)。その結果、3,4,6S-GlcNAc を 1.7% 組み込んだナノ粒子 (NP2) が VEGF<sub>165</sub> に対して高い親和性を示し、3,4,6S-GlcNAc 含有量を 5% (NP3)、10% (NP4) と増加させることで親和性が減弱していくことが明らかになった。この結果から、ナノ粒子に組み込む 3,4,6S-GlcNAc には最適な添加量が存在することが示唆された。

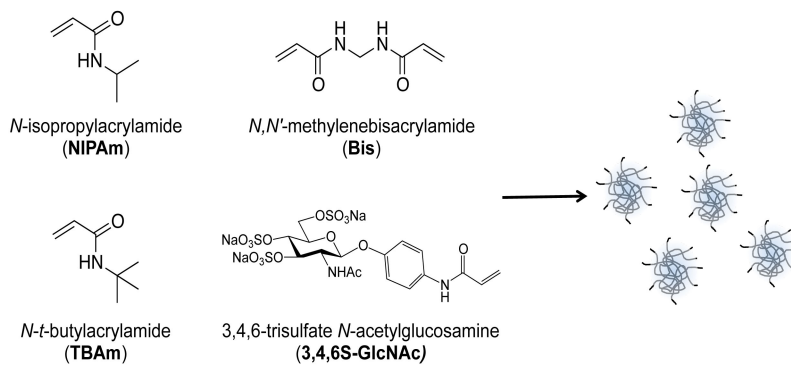


図1. 機能性モノマーの構造式とナノ粒子の合成

ナノ粒子は超純水に NIPAm、TBAm、Bis、3,4,6S-GlcNAc モノマーとドデシル硫酸ナトリウム (SDS、0.694 mM) を溶解し、過硫酸アンモニウム (2.63 mM) を加え 65℃ にて 3 時間反応させることで合成した。合成したナノ粒子は透析により精製した。

表1. ナノ粒子の組成、サイズ、PDI 及び表面電荷

	NIPAm	3,4,6S GlcNAc	TBAm	Bis	Size (nm)	PDI	$\zeta$ -potential (mV)
NP1	58	0	40	2	79.9	0.014	N.D.
NP2	56.3	1.7	40	2	85.9	0.017	-38.1
NP3	53	5	40	2	87.7	0.026	-31.1
NP4	48	10	40	2	74.8	0.044	-29.7

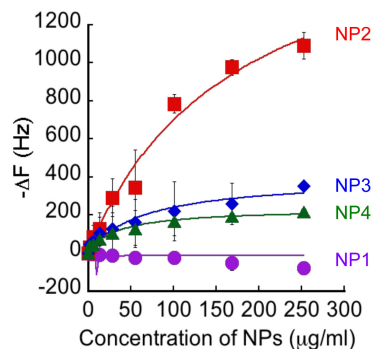


図2. QCM を用いたナノ粒子と VEGF<sub>165</sub> の相互作用解析

QCM セルの金基盤にアミノカップリングにて VEGF<sub>165</sub> を固定化し、ナノ粒子を添加。

## 2. 新生血管モデル細胞を用いたポリマーナノ粒子の *in vitro* 評価

合成した VEGF<sub>165</sub> に対して親和性のあるナノ粒子の *in vitro* 評価に向けて、ヒト新生血管モデル細胞である HUVEC を用いて検証した。一般的に VEGF<sub>165</sub> はレセプター結合ドメインを介して VEGF 受容体 (VEGFR-2) に結合することで受容体が自己リン酸化し、細胞の増殖を促進する。しかし、ナノ粒子はヘパリン結合ドメインに結合するように設計しているため、ナノ粒子と VEGF<sub>165</sub> の結合が VEGF<sub>165</sub> と VEGFR-2 の相互作用を阻害するとは限らない。そこでまず、

VEGF<sub>165</sub> 依存的な VEGFR-2 のリン酸化について検討を行った。VEGF (20 ng/ml) と様々な濃度のナノ粒子を添加し、リン酸化された VEGFR-2 をウエスタンブロット法により検出した。その結果、前述の QCM を用いた相互作用解析結果と相関するように、3,4,6S-GlcNAc モノマーの導入量が 0、5、10% のナノ粒子 (NP1、NP3、NP4) は VEGF<sub>165</sub> 依存的な VEGFR-2 のリン酸化を殆ど抑制しなかった。しかし、3,4,6S-GlcNAc を 1.7% 添加した NP2 に関しては、濃度依存的に VEGFR-2 のリン酸化を抑制した。次に、ナノ粒子による VEGF<sub>165</sub> 依存的な細胞増殖抑制効果を検証した。その結果、VEGFR-2 のリン酸化阻害検討の結果と相関し、NP1、NP3、NP4 は VEGF<sub>165</sub> 依存的な細胞増殖を殆ど抑制しなかったが、NP2 においてはコントロールであるナノ粒子未添加群と比較して有意な細胞増殖抑制能を示した (図 3)。また、4 種類全てのナノ粒子において、VEGF<sub>165</sub> 未添加の場合には生細胞数に影響を示さなかったことから、ナノ粒子自体の毒性は低いことが示された。以上より、1.7% 3,4,6S-GlcNAc NPs は VEGF<sub>165</sub> に結合し、VEGF<sub>165</sub> と VEGFR-2 の相互作用を阻害することで、VEGF<sub>165</sub> 依存的な細胞増殖を抑制することが示された。ナノ粒子の粒子径が 100 nm であり VEGF<sub>165</sub> タンパク質が数 nm 程度の大きさである点を考慮すると、ナノ粒子がヘパリン結合ドメインを介して VEGF<sub>165</sub> に結合することで、レセプター結合ドメイン付近に立体的な障害が生まれ、受容体との相互作用を阻害している可能性が考えられる。

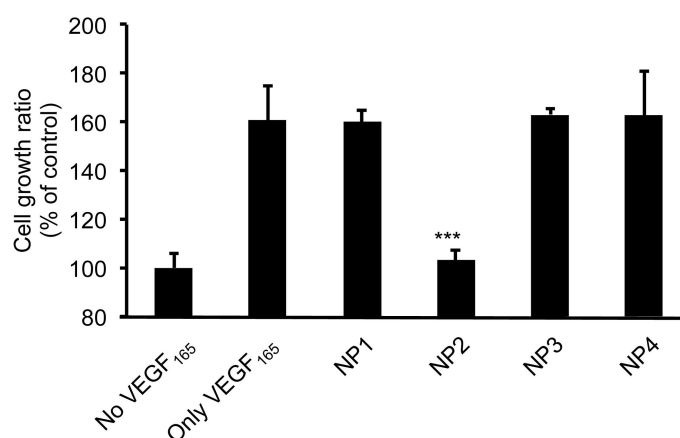


図 3. ナノ粒子による VEGF<sub>165</sub> 依存的な細胞増殖抑制

HUVEC 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well となるように 24 well plate に播種し 24 時間培養。増殖因子及び血清未含有の培地にて 12 時間培養後、VEGF<sub>165</sub> (20 ng/ml) とナノ粒子 (30  $\mu$ g/ml) を添加し、48 時間後の生細胞数を MTT アッセイにより検出。\*\*\*p < 0.001 vs. No VEGF<sub>165</sub>. 統計処理；Analysis of variance (ANOVA) with the Tukey post hoc test.

### 3. 担がんマウスを用いたがん治療への応用

ナノ粒子を用いた *in vivo* 抗がん効果の検討には、マウス結腸がん細胞である colon 26 NL17 細胞をマウス左腹側部に皮下移植することで作製した担がんマウスを用いた。がん細胞移植から 5、7、9、11 日目に *in vitro* で VEGF<sub>165</sub> の活性を阻害した NP2 を 5、10、20、40 mg/kg となるように尾静脈内投与し、腫瘍径と体重を測定した。がん移植から 20 日目の腫瘍の大きさを比較すると、NP2 の投与量依存的に腫瘍の増殖が抑制されていた (図 4a)。さらに、NP2 を 10 mg/kg 以上で投与することでコントロールである PBS 投与群と比較して、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。また、NP2 投与による体重減少は観察されなかった。この結果より、ナノ粒子は血液中、もしくは腫瘍組織の周辺で VEGF<sub>165</sub> を吸着し、活性を中和することで腫瘍増殖を抑制することが示唆された。しかし、VEGF<sub>165</sub> を吸着するナノ粒子単剤投与によって得られる抗腫瘍効果には限界がある。事実、現在市販されている抗 VEGF 抗体 (Avastin®) は、抗がん剤との併用が原則となっている。そこで、さらなる治療効果増大を目指し、抗がん剤であるドキソルビシンと併用投与することで抗腫瘍効果の検討を行った。がん細胞移植から 5、7、9、11 日目に NP2 を 20、40 mg/kg となるように尾静脈内投与し、ドキソルビシンは 6、8、10、12 日目に 5 mg/kg となるように尾静脈内投与した。その結果、ナノ粒子とドキソルビシンを併用することで、ドキソルビシン単剤と比較して顕著に腫瘍の増殖を抑制した (図 4b)。以上より、VEGF<sub>165</sub> を吸着するナノ粒子は、がん治療に有用であることが示唆された。

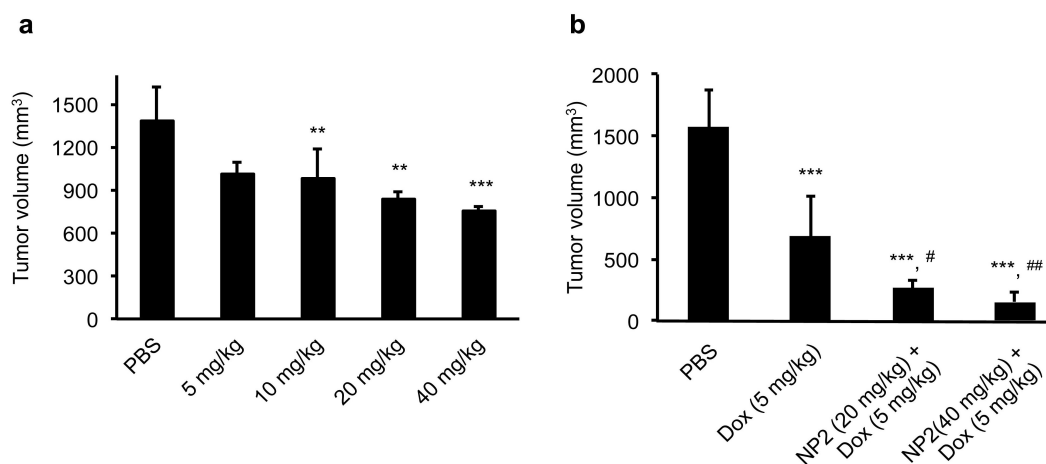


図4. ナノ粒子によるがん治療効果

a) がん移植から5、7、9、11日目にNP2を5、10、20、40 mg/kgにて尾静脈内投与。移植から20日後のがんの大きさ。\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. PBS

b) がん移植から5、7、9、11日目にNP2を20、40 mg/kg、6、8、10、12日目にドキシロビシンを2.5、5 mg/kgとなるように尾静脈内投与。移植から20日後のがんの大きさ。\*\*\*p < 0.001 vs. PBS、#p < 0.05、##p < 0.01 vs. Dox 統計処理；Analysis of variance (ANOVA) with the Tukey post hoc test.

## 共同研究者

本研究の共同研究者は静岡県立大学薬学部の奥直人教授、九州大学大学院工学研究院化学工学部門の三浦佳子教授、星野友准教授である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Hoshino Y, Urakami T, Kodama T, Koide H, Oku N, Okahata Y, Shea KJ., Design of synthetic polymer nanoparticles that capture and neutralize a toxic peptide. *small* 2009, 5(13), p.1562-1568. doi: 10.1002/sml.200900186.
- 2) Hoshino Y, Koide H, Urakami T, Kanazawa H, Kodama T, Oku N, Shea KJ., Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. *J Am Chem Soc.* 2010, 132(19), p.6644-6645. doi: 10.1021/ja102148f.
- 3) Hoshino Y, Koide H, Furuya K, Haberaecker WW 3rd, Lee SH, Kodama T, Kanazawa H, Oku N, Shea KJ., The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010,109(1), p.33-38. doi: 10.1073/pnas.1112828109
- 4) Yoshimatsu K, Koide H, Hoshino Y, Shea KJ., Preparation of abiotic polymer nanoparticles for sequestration and neutralization of a target peptide toxin., *Nat Protoc.* 2015, 10(4), p.595-604. doi: 10.1038/nprot.2015.032.
- 5) Folkman, J., Shing, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992, 267(16), p.10931-10934.
- 6) Karamysheva, A. F. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 2008, 73(7), p.751-762. doi:10.1134/S000629790870031
- 7) Koide H, Yoshimatsu K, Hoshino Yu, Lee S, Okajima A, Ariizumi S, Narita Y, Yonamine Y, Weisman A C, Nishimura Y, Oku N, Miura Y, and Shea KJ, A Polymer Nano particle with Engineered Affinity for a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165). *Nature Chemistry*, 2017 In press