

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	中辻 匡俊
学位授与の日付	平成30年3月31日	
論文名	Drug delivery system for poorly water-soluble anti-tumor drug by using intravital transporter protein (生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性抗癌剤に対するドラッグデリバリーシステム)	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	山地 亮一
	副査	杉本 憲治

論文要旨

序章

我が国において、癌疾患は昭和56年に死因の第1位となり、一貫して増加し、平成27年時点で総死亡数の約3割を占めている。癌に対する治療法として、外科的手術、放射線治療、および化学療法が存在するが、中でも抗癌剤を用いた化学療法は癌細胞の持つ転移性に対抗する唯一の治療法であり、多くの製薬企業や研究機関において新規抗癌剤開発が行われている。しかし、化合物スクリーニングにより発見された抗癌剤候補化合物は、薬効を重視することから多くが難水溶性であり、また癌組織特異性が低く、強い副作用を示す。難水溶性抗癌剤の可溶化には、化学修飾や界面活性剤などの添加剤の利用が検討されるが、抗癌活性の低下や添加剤の毒性などの問題が存在する。このような化合物の一例として、7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) が挙げられる。SN-38は、高い抗癌活性を有するにも関わらず難水溶性であるため、臨床では化学修飾によりプロドラック化された塩酸イリノテカン (CPT-11) が用いられている。しかし、CPT-11は投与後、肝臓や癌組織中のカルボキシエステラーゼにより加水分解され、活性型のSN-38へと変換され薬効を示すが、ヒト体内において、その転換効率は投与量の10%以下と低い。また、CPT-11はSN-38と比べ、抗癌活性が1%以下に低下していることからSN-38の直接利用が望まれている。

一方、現在このような難水溶性抗癌剤を臨床応用するための技術として、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が世界中で注目されている。DDS とは、ナノサイズ of 物質に薬剤を内包、または結合し、疾患部に輸送する技術である。しかし、薬剤キャリア自身の毒性や、抗原性、標的性といった課題が山積されており、安全かつ癌特異的な DDS の開発が強く望まれている。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、ヒト脳脊髄液中に豊富に存在する生体内輸送蛋白質である。これまでに L-PGDS の疎水性低分子結合能に着目し、L-PGDS が難水溶性薬剤に対する新規可溶化剤として、有用であることが報告されている。そこで本研究では、L-PGDS を難水溶性抗癌剤 SN-38 に対する新規薬剤キャリアとして応用し、SN-38 の可溶化を試み、癌疾患モデル動物を用いて SN-38/L-PGDS 複合体の薬効を評価した。さらに、高い抗腫瘍効果を有する新規の癌ターゲティング DDS の構築を目指し、癌細胞表面の受容体を標的とした癌標的ペプチドを付加した L-PGDS を設計し、癌細胞への内在化、および腫瘍集積性を評価した。

第 1 章 L-PGDS の SN-38 に対する新規薬剤キャリアとしての有用性評価

L-PGDS は、活性中心をアラニンに置換したヒト由来変異型を使用した。大腸菌発現系を用いて発現、および精製を行い、各実験に使用した。L-PGDS の SN-38 の溶液中濃度に対する効果を調べるために、2 mM L-PGDS (PBS 溶液 pH 7.4) 存在下における SN-38 濃度を分光学的に決定した (SN-38 in DMSO $\epsilon_{380} = 20,985 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。その結果、L-PGDS 非存在下における SN-38 濃度は $1.5 \mu\text{M}$ であったのに対し、2 mM L-PGDS 存在下では $1,700 \mu\text{M}$ となり、1,130 倍上昇した。L-PGDS と SN-38 との詳細な結合様式を調べるために、等温滴定型熱量測定を行った。L-PGDS の SN-38 に対する解離定数は、 $60 \pm 4.0 \mu\text{M}$ であり、3 分子の SN-38 を結合することが明らかとなった。また、その結合はエンタルピー駆動であった。

次に、SN-38/L-PGDS 複合体の抗癌活性を調べるために、ヒト大腸癌細胞 Colo201、ヒト前立腺癌細胞 PC-3、およびヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 に対する細胞毒性試験を行った。その結果、SN-38/L-PGDS 複合体の各細胞に対する半細胞増殖阻害濃度 IC_{50} 値は、 35 ± 6.5 、 10 ± 1.5 、および $900 \pm 190 \text{ nM}$ であった。一方、SN-38 のプロドラッグである CPT-11 の IC_{50} 値は、それぞれ 26 ± 4.1 、 9.8 ± 0.75 、および $35 \pm 5.2 \mu\text{M}$ であった。したがって、SN-38/L-PGDS 複合体は、CPT-11 の 39-980 倍高い抗癌活性を有していることが明らかとなった。さらに、SN-38 単剤の Colo201、および PC-3 に対する IC_{50} 値は、 15 ± 0.66 、および $18 \pm 2.4 \text{ nM}$ であったことから、SN-38/L-PGDS 複合体は、SN-38 単剤と同程度の薬効を有していることが明らかとなった。また、MDA-MB-231 については、SN-38 が溶解する最大濃度における細胞生存率が 80% 程度であったことから、 IC_{50} 値を算出することが出来なかった。

さらに、Colo201 担癌マウスを作成し、腫瘍体積が 150 mm^3 に達した日から、PBS、SN-38/L-PGDS 複合体 (1.0 mg/kg/d, 2.0 mg/kg/d, 2.8 mg/kg/d)、および CPT-11 (4.0 mg/kg/d, 20 mg/kg/d) を 1 日おきに計 8 回静脈内投与し、抗腫瘍効果を確認した。

低濃度の CPT-11 投与群 (4.0 mg/kg/d) では、PBS 投与群と同様に投与開始から腫瘍体積が増加し続けたのに対し、高濃度の CPT-11 投与群 (20 mg/kg/d) では抗腫瘍効果が確認され、投与開始 15 日目において、腫瘍体積は 231 mm³であった。一方、SN-38/L-PGDS 複合体投与群では、1.0 mg/kg/d の低濃度投与群においても腫瘍成長の抑制が確認され、2.8 mg/kg/d 投与群において、投与開始 15 日目において、腫瘍体積は 212 mm³であった。また、ddY マウスに対して、SN-38/L-PGDS 複合体 (2.8 mg/kg/d) を 1 日おきに計 8 回静脈内投与し、腸管の病理組織標本を作製したところ、炎症の指標とされる絨毛部の変性萎縮、および陰窩構造の消失といった形態的な変化を伴う炎症は確認されなかった。以上の結果から、L-PGDS を用いることにより、難水溶性であることから直接の臨床利用が断念された抗癌剤 SN-38 の可溶化に成功し、SN-38/L-PGDS 複合体が腸管組織に対して炎症を伴う副作用を示すことなく、上市品である CPT-11 よりも低用量で高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

第 2 章 癌標的ペプチド付加 L-PGDS による癌ターゲティング DDS

癌標的ペプチドとして、iRGD (CRGDKGPDC) を利用した。iRGD ペプチドは、癌細胞表面に高発現している $\alpha\beta3/\beta5$ integrin に RGD モチーフを介して結合する。その後、プロテアーゼによる分解を受け、露出した CRGDK ペプチドが neutrophilin-1 に結合し、細胞内へのキャリアの取り込みを亢進する。L-PGDS の C 末端に iRGD あるいは CRGDK 配列を付加した L-PGDS-iRGD、および L-PGDS-CRGDK 発現ベクターを作製し、大腸菌発現系により発現、および精製を行った。得られた L-PGDS-iRGD、および L-PGDS-CRGDK の MALDI-TOF MS 測定を行ったところ、推定分子量にピークが観察され、L-PGDS への各ペプチドの付加を確認した。次に、癌細胞への L-PGDS の取り込みを確認するために、N 末端に enhanced-GFP (EGFP) を融合させた EGFP-L-PGDS、EGFP-L-PGDS-iRGD、および EGFP-L-PGDS-CRGDK を作製した。これらの蛋白質をヒト前立腺癌細胞 PC-3 培養液中に添加し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、各蛋白質の細胞内への取り込みの有無を調べた。その結果、PC-3 細胞内において EGFP-L-PGDS-iRGD、および EGFP-L-PGDS-CRGDK の存在が確認され、癌標的ペプチドを付加することにより、L-PGDS は細胞膜を透過することが明らかとなった。

さらに、PC-3 担癌マウスを用いて、癌標的ペプチド付加 L-PGDS の腫瘍組織への集積性を評価した。腫瘍体積が 400 mm³ に達した時点で蛍光色素 Cyto750 により標識した L-PGDS、L-PGDS-iRGD、および L-PGDS-CRGDK を静脈内投与した。蛍光イメージング装置 IVIS[®] kinetic を用いて、マウス体内からの蛍光を投与直後から 5 時間後まで経時的に測定した。その結果、いずれの投与群においても、投与直後から腎臓付近から強い蛍光が観察され、L-PGDS は静脈内投与後、腎臓より速やかに排泄されることが示唆された。一方、腫瘍組織からの蛍光強度を測定したところ、L-PGDS-iRGD、および L-PGDS-CRGDK 投与群では、L-PGDS 投与群と比較して、それぞれ投与 2 時間後から 4 時間後、および投与 30 分後から 5 時間後において有意

に強い蛍光が得られた。また、投与後 5 時間における蛍光強度は、L-PGDS-iRGD、および L-PGDS-CRGDK 投与群において、L-PGDS 投与群と比較して、それぞれ 1.75 倍、および 2.26 倍であった。以上の結果から、癌標的ペプチドを L-PGDS へ付加することにより、効果的に L-PGDS を腫瘍組織へ集積できることが示された。

結論

L-PGDS を用いることにより、難水溶性であることから臨床応用を断念された抗癌剤 SN-38 の溶液中濃度を著しく改善し、静脈内投与を可能にした。また、SN-38/L-PGDS 複合体の静脈内投与は、臨床で用いられている SN-38 のプロドラッグ CPT-11 と比較して、低用量で高い抗腫瘍効果を示し、かつ、SN-38 の副作用として知られる腸管炎症を示さないことが明らかとなった。さらに、癌標的ペプチド iRGD を L-PGDS に付加することにより、*in vitro*、および *in vivo* において、L-PGDS と比較して、薬剤キャリアが効率的に腫瘍組織へ集積し、細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。

以上より、L-PGDS が難水溶性抗癌剤 SN-38 に対する新規薬剤キャリアとして有用であることが明らかとなり、さらに癌標的ペプチドを利用することにより SN-38 に対する癌ターゲティング DDS の臨床応用への可能性が示された。

審査結果の要旨

癌治療において、抗癌剤は癌細胞の持つ転移性に対抗する唯一の治療法であり、製薬企業や研究機関において新規抗癌剤開発が活発に行われている。しかし、化合物スクリーニングにより発見された抗癌剤候補化合物は、その多くが難水溶性であり、また薬効を重視することから、癌組織特異性が低く強い副作用を示す。現在、このような難水溶性抗癌剤を臨床応用するための技術として、ドラッグデリバリーシステム (DDS) が世界中で注目されている。DDS とは、ナノサイズの物質に薬剤を内包、あるいは結合し、疾患部に輸送する技術である。しかし、キャリア自身の毒性や、抗原性、及び標的性などの課題が山積されていることから、安全、且つ癌特異的 DDS の開発が強く望まれている。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、ヒト脳脊髄液中に豊富に存在する酵素であり、且つ生体内輸送蛋白質である。これまでに、L-PGDS の疎水性低分子結合能に着目し、L-PGDS が難水溶性薬剤に対する新規可溶化剤として有用であることが報告されている。そこで本研究では、L-PGDS を難水溶性抗癌剤に対する新規薬剤キャリアとして応用し、癌細胞表面に高発現する受容体を標的とする癌標的ペプチドに着目した新規癌指向性 DDS の開発を目指した。

第1章では、難水溶性抗癌剤である 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) を用いて、SN-38 に対する L-PGDS の新規薬剤キャリアとしての有用性を評価した。SN-38 は、高い抗癌活性を有するにも関わらず難水溶性であるため、臨床では化学修飾によりプロドラック化された塩酸イリノテカン (CPT-11) が用いられている。しかし、CPT-11 は投与後、肝臓や癌組織中のカルボキシエステラーゼにより加水分解され、活性型の SN-38 へと変換され薬効を示すが、ヒト体内においてその変換効率は投与量の 10%以下と極めて低い。また、CPT-11 は下痢等の重篤な副作用を引き起こすことから、SN-38 の直接利用が望まれている。溶解度測定実験の結果、L-PGDS 非存在下における SN-38 濃度が 1.5 μM であったのに対し、2 mM L-PGDS 存在下では 1,700 μM となり、1,130 倍上昇した。また、作製した SN-38/L-PGDS 複合体の抗癌活性を細胞毒性試験により調べたところ、SN-38/L-PGDS 複合体は、SN-38 単剤と同程度の抗癌活性を示した。次に、大腸癌細胞 Colo201 担癌マウスを作製し、*in vivo* における SN-38/L-PGDS 複合体の薬効を評価した。腫瘍体積が 150 mm^3 に達した日から、PBS, SN-38/L-PGDS 複合体, 及び CPT-11 を 1 日おきに計 8 回静脈内投与し、抗腫瘍効果を確認した。その結果、CPT-11 投与群 (4.0 mg/kg/d) では、PBS 投与群と同様に、投与開始から腫瘍体積が増加し続け、投与開始 15 日目において腫瘍体積は、555 mm^3 に達した。一方、CPT-11 投与群と同モル濃度の SN-38/L-PGDS 複合体 (2.0 mg/kg/d) 投与群では、腫瘍成長が有意に抑制され、15 日目の腫瘍体積は 249 mm^3 であった。また、ddY マウスに対して、SN-38/L-PGDS 複合体を同様のスケジュールで投与し、腸管の病理組織標本を作製したところ、絨毛部の変性萎縮、及び陰窩構造の消失といった形態的な変化を伴う炎症は確認されなかった。以上の結果から、L-PGDS は難水溶性抗癌剤 SN-38 に対する DDS の新規薬剤キャリアとして有用であることが示された。

第2章では、新規癌指向性 DDS の構築を目指し、癌細胞表面の受容体を標的とする癌標的ペプチドを付加した L-PGDS を設計した。癌標的ペプチドとして、iRGD (CRGDKGPDC) を利用した。iRGD は、癌細胞表面に高発現している $\alpha\text{v}\beta3/\beta5$ integrin に RGD モチーフを介して結合する。その後、プロテアーゼによる分解を受け、露出した CRGDK ペプチドが癌細胞上の neurophilin-1 に結合し、細胞内へのキャリアの取り込みを亢進する。そこで、enhanced-GFP (EGFP) を融合した L-PGDS-iRGD, 及び -CRGDK を作製し、ヒト前立腺癌細胞 PC-3 への取り込みを共焦点蛍光顕微鏡により調べた。その結果、PC-3 細胞内における GFP の蛍光が観測され、EGFP-L-PGDS-iRGD, 及び -CRGDK の PC-3 細胞内への取り込みが確認された。さらに、PC-3 担癌マウスを用いて、癌標的ペプチド付加 L-PGDS の腫瘍組織への集積性を評価した。蛍光色素 Cyto750 により標識した L-PGDS-iRGD, 及び -CRGDK を静脈内投与し、蛍光イメージング装置 IVIS[®] kinetic を用いて、マウス体内からの蛍光を経時的に測定した。その結果、L-PGDS-iRGD, 及び -CRGDK 投与群では、L-PGDS 投与群と比較して、それぞれ投与後 2 時間から 4 時間、及び投与後 30 分から 5 時間において有意に強い蛍光が得られた。以上の結果は、L-PGDS への癌標的ペプチド付加により、L-PGDS を腫瘍組織へ効果的に集積できることが示された。

本申請論文は、難水溶性抗癌剤に対する新規 DDS キャリアとして、生体内輸送蛋白質である L-PGDS を利用し、さらに癌標的ペプチドによる癌指向性 DDS の可能性を見出した。これらの知見は、難水溶性であることや、強い副作用のために臨床応用が中止になった医薬候補化合物を再開発できる可能性を示すものであり、創薬研究、特に薬理学、及び製剤学に大きく貢献するものである。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。