

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14628

研究課題名(和文)新規低酸素環境応答性プロドラッグの構造最適化

研究課題名(英文)Structure optimization of hypoxically activated prodrug

研究代表者

池田 豊 (IKEDA, Yutaka)

筑波大学・数理物質系・研究員

研究者番号：70425734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究機関ではこれまでに開発した低酸素環境応答性プロドラッグシステムのIC50値を下げる事を試みた。具体的には従来のプロドラッグは薬剤がアミド結合を介してプロドラッグ化されアミド結合の開裂により薬剤がリリースされていたが、新たに開発したシステムはアミド結合を介したプロドラッグ化であるが、エステル結合の開裂をトリガーとする分子システムである。新たに開発したシステムをin vitroで評価したところIC50値が一桁低下していた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to reduce IC50 value of previously developed hypoxically activated anti-cancer prodrug. In previous system, drug was modified via amide bond and released by the cleavage of amide bond. In contrast, newly developed method enabled drug release by cleavage of ester bond although drug was conjugated by amide bond. IC50 value reduced by one order in the case of developed method.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：低酸素 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

血管から離れた部位に存在する低酸素部位の腫瘍は浸潤及び転移の原因となっており、さらに問題なのが、低酸素であるため放射線治療の効果が低く、また耐薬剤性を有している事である。癌幹細胞が低酸素領域に存在することも明らかとなっており、これら低酸素環境下にある癌細胞を標的とした医薬品開発は癌の根治を達成するためにも切に望まれており、現在幾つかの化合物の臨床試験が行われているが、未だに認可されていない。我々はこれまでに低酸素環境の細胞が還元環境にある事を利用し、低酸素環境に应答する独自の分子システムを開発してきた。開発したシステムは低酸素環境下において特異的に生じる分子内環化反応である。この分子システムを用いると、通常の酸素濃度では抗がん剤が化学修飾されている為、活性を持たないが、低酸素環境になると抗がん剤が放出され活性が回復する。その為、抗がん剤の副作用が抑制された新規のプロドラッグとなる。これまでに抗がん剤として広く用いられているドキソルビシン及びゲムシタピンをプロドラッグ化した(図1)。

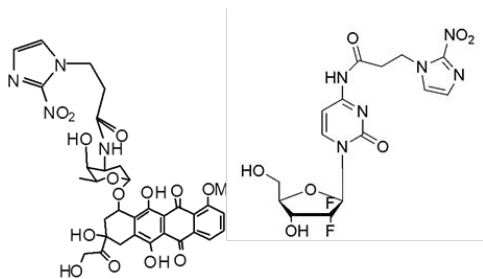


図1 開発した低酸素環境応答性ドキソルビシン(左)及び低酸素環境応答性ゲムシタピンプロドラッグ(右)

開発した低酸素環境応答性プロドラッグは *in vitro* 試験において狙い通り低酸素環境で薬剤がリリースされていると共に、低酸素環境下において抗がん活性が回復していた。さらに担癌マウスを用いた *in vivo* 試験において腫瘍成長抑制効果が従来のドキソルビシンと同等程度の条件下で評価したところ(図2-a) 注目すべき事として、開発したプロドラッグは従来の抗がん剤にみられるような顕著な体重減少が全くなく、抗がん剤の副作用を劇的に減少させている事が認められた(図2b)。さらに驚くべきことに生存率も無処置群及びドキソルビシン群と比較して大幅に改善した(図2c)。

現在の医薬品開発においては、高い安全性と既存医薬品と比較した際の高い有用性が求められている。近年ではナノ粒子を用いたドラッグデリバリーの研究が盛んにおこなわれており、優れた研究成果により臨床応用される段階にまで発展した。しかしながらほとんどの作用原理は腫瘍組織・細胞への高い取り込み能に起因する仕組みであり、近年のナノ粒子を用いたドラッグデリバリーのコン

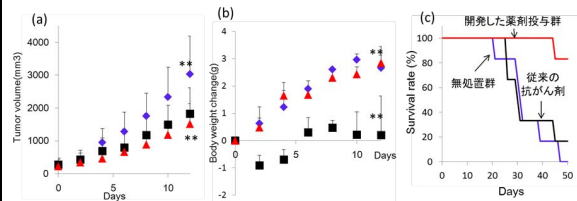


図2 開発したドキソルビシンプロドラッグのマウスを用いた活性評価。(a)腫瘍サイズの変化、(b)体重変化、無処置、従来の抗がん剤、開発化合物(c)生存率変化

セプトでは拡散性の高い低分子抗癌剤の副作用を限りなく下げる事は困難である。申請者らが開発した技術は既存の抗がん剤をプロドラッグ化し副作用を低減させ、尚且つ薬剤を低酸素部位に集積させる事で従来の抗がん剤の体内における局在を劇的に変化させる(図3)。

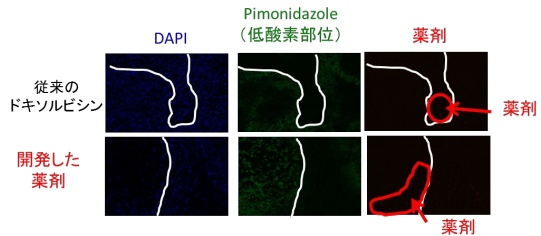


図3 開発したプロドラッグの腫瘍内分布。従来のドキソルビシンは低酸素部位には存在しないが、開発したプロドラッグは低酸素部位への局在が確認された。

2. 研究の目的

申請者らがこれまでに開発した低酸素環境に应答して分子構造が変化し薬剤を放出するシステムを図4に示す。

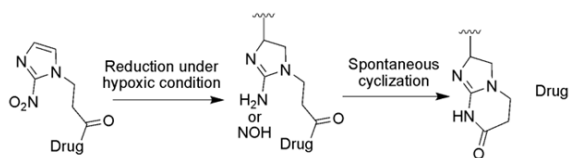


図4 開発した低酸素環境応答性の分子システム。低酸素環境下の細胞内において、ニトロイミダゾールが還元されると共に、細胞内のタンパク質に固定化される。その後分子内環化反応が自発的に生じ、抗がん剤等の分子を放出する。

開発した分子システムは2-ニトロイミダゾールが低酸素環境下において還元され、細胞内において特異的にタンパク質に固定化されると共に、ニトロ基がアミンへと変化する事を利用し、分子内で環化反応が進行し薬剤を放出するシステムである。これまでにヒト膀胱癌細胞を用いた実験により低酸素環境において薬剤の放出が増加し(図5) 抗がん活性が増加している事を確認している。分子設計通りに低酸素環境下において薬剤が

放出されたが、その効率は2時間後において添加した薬剤の数%であった。その為、in vitroにおけるIC50値が数十 μ Mと比較的高いものになっている。活性の高いプロドラッグを構築するためには低酸素環境においてより効率よく薬剤を放出する分子の設計が重要であると考えた。

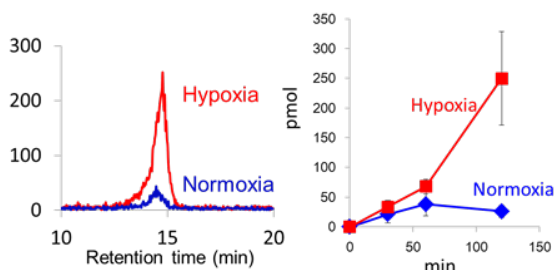


図5 低酸素環境下における抗がん剤(ゲムシタピン)の放出。LC-MSによる解析。チャート(左)及び放出量の経時変化(右)

3. 研究の方法

効率よく薬剤を放出する分子設計として、2-ニトロイミダゾールと薬剤の間のリンカー長を変化させた化合物を合成した(図6)。

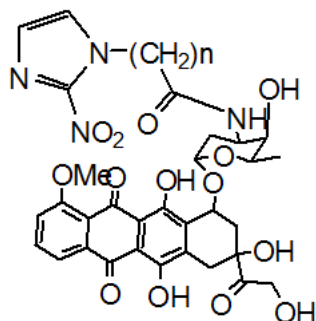


図6 合成した化合物。薬剤と2-ニトロイミダゾールの間のメチレン鎖長を変化させる。

また別の手法として薬剤の放出をエステル結合の開裂をトリガーとするシステムの構築を行う。これまでに開発したプロドラッグはニトロ基が還元されて生じたアミノ基が、薬剤が結合しているアミド結合に対して求核攻撃を行う事で薬剤を放出していた。しかしながら、この分子内環化反応は安定なアミド結合に対する求核攻撃であるために反応効率が低いことを確認している。その一方で、エステル結合を求核攻撃する効率は極めて高く、ほぼ100%の効率で分子内環化反応が生じる事も確認している。これらの知見を基に新たな分子システムを考案した。合成した化合物をヒト膀胱癌細胞(MiaPaCa-2)に添加し、低酸素インキュベーター及び通常酸素濃度のインキュベーターにおいて培養し、薬剤の放出をLC-MSを用いて解析する。抗がん剤活性に関してはWSTアッセイにより解析する。これまでに開発したプロドラッグと比較し、新しいシステムの有効性を解

析する。

4. 研究成果

2-ニトロイミダゾールとドキシソルピシンの距離をメチレン鎖長を変化させることで薬剤の放出を効率よくすることを試みた。従来の構造は図6においてn=2であるが、あらたにn=1及び3の化合物を合成した。合成した化合物は¹H NMR及びMSにより化合物の同定を行った。n=1の化合物に関しては薬剤の放出が確認されなかった。これは分子内環化反応が5員環生成により生じるが、この反応が立体的に生じにくいためであると考えている。

n=3の化合物に関してはin vitroにおける細胞障害性を評価した。結果を図7に示す。

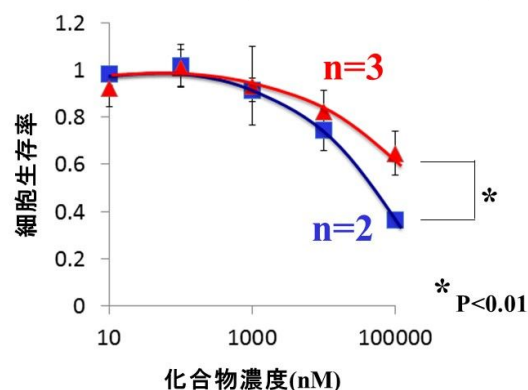


図7 メチレン鎖長を変化させた際の細胞障害性比較

低酸素環境下において細胞障害性の比較を行った。従来のn=2の化合物の方が、n=3の化合物よりも細胞障害性が高かった。この結果は薬剤を放出する際の分子内環化反応が、6員環生成のものが7員環生成よりも有利であることを示唆している。

薬剤と2-ニトロイミダゾール間の鎖長の最適化ができたため、エステル結合の開裂をトリガーとした薬剤の放出を試みた。従来のプロドラッグはIC50値が数十 μ Mであったが、新たに合成した化合物は数 μ Mとなり一桁下がっていた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

- (査読有) Yutaka Ikeda, Hikaru Hisano, Yuji Nishikawa, Yukio Nagasaki, Targeting and treatment of tumor hypoxia by newly designed prodrug possessing high permeability in solid tumors, Molecular Pharmaceutics, Volume13, No.7, pp 2283-2289(2016). DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00011
- (査読有) Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Design of antioxidative biointerface for separation of hematopoietic stem cells with high

maintenance of undifferentiated phenotype, Journal of Biomedical Materials Research: Part A, Volume 104A, Issue 8, 2080-2085(2016)
DOI: 10.1002/jbm.a.35740

〔学会発表〕(計15件)

1. 池田 豊、長崎幸夫、新規ポリエチレングリコールにより修飾されたキラル反応場の創出とバイオ素子への展開、物質・デバイス領域共同研究拠点共同研究、分野融合を目指した次世代メディカル・バイオ機能材料開発シンポジウム2017.2.24、「東北大、(仙台)」
2. Yutaka Ikeda, Hikaru Hisano, Yuji Nishikawa, Yukio Nagasaki, Site-specific delivery and release of active drug at tumor hypoxia, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History (ISDPS) 2017.3.9 (Kyoto Research Park, Kyoto)
3. Yutaka Ikeda, Katsuhisa Kitano, Yukio Nagasaki, Facile construction of anti-oxidative cell culture dish by atmospheric plasma, MANA International Symposium 2017, 2017.3.1 (Epcocal Tsukuba, Tsukuba)
4. Yutaka Ikeda, Katsuhisa Kitano, Yukio Nagasaki, Surface construction of anti-oxidative cell culture dish preventing cell dysfunction -Application for various substrates by using atmospheric plasma, 第66回高分子学会春季年会, 2017.5.30 (幕張メッセ、千葉)
5. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Design and construction of oxidative stress-free cell culture system, 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, 2016.11.9 (Hanoi, Vietnam)
6. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Impact of scavenging oxidative stress during cell culture on the maintenance of cellular properties, The 2nd International Conference on NanoMaterials for health energy and the environment., 2016.9.5, (Flic en Flac, Mauritius)
7. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Impact of scavenging oxidative stress during cell culture on the maintenance of cellular properties, APA International Conference on Advanced Polymers, Biomaterials, Bioengineering and Nano Drug Delivery, 2016.9.5, (Flic en Flac, Mauritius)
8. Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Kouya Akasaka, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, A novel design of biointerface suppressing immune response on the substrate surface, 11th International Polymer Conference (IPC2016), 2016.12.15, (Fukuoka, Japan)
9. Yutaka Ikeda, Jinya Katamachi, Yukio Nagasaki, Development of the novel protein PEGylation reagent with high protein activity, 10th World Biomaterials Congress, WBC, 2016.5.18, (Montreal, Canada)
10. Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Construction of oxidative stress-free cell culture system to maintain cellular morphology, 10th World Biomaterials Congress, WBC 2016.5.17, (Montreal, Canada)
11. Yutaka Ikeda, Tomoki Yoshinari, Hirotohi Miyoshi, Yukio Nagasaki, Control of Undesired Cell Dysfunctions by ROS-scavenging Biointerfaces, 3rd International Symposium on Biomaterials Science (ICBS2016) 2016.11.28-30, (University of Tokyo, Tokyo)
12. Yutaka Ikeda, Hikaru Hisano, Yuji Nishikawa, Yukio Nagasaki, Treatment of tumor hypoxia by anticancer prodrug possessing high permeability in solid tumor, Society for Redox Biology and Medicine (SFRBM2016), 2016.11.18, (Hyatt Regency, San Francisco, USA)
13. 池田 豊、久野 光、西川祐司、長崎幸夫、腫瘍の低酸素部位を標的とした抗がん剤、第31回日本酸化ストレス学会関東支部会, 2016.12.17 (芝浦工業大学豊洲キャンパス、江東区、東京)
14. 池田 豊、久野 光、西川祐司、長崎幸夫、Delivery of anticancer drug into tumor hypoxia, 第75回日本癌学会学術総会 2016.10.8, (パシフィコ横浜、神奈川県)
15. 池田 豊、西川 祐司、長崎 幸夫、固形腫瘍深部の低酸素領域への DDS 開発、第32回日本 DDS 学会学術集会、2016.7.1、(静岡コンベンションアーツセンター、静岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 豊 (IKEDA, Yutaka)
筑波大学 数理物質系・研究員
研究者番号：70425734