

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16467

研究課題名(和文) 血清アルブミンを活用したシンプルながん指向性高分子化抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Synthesis and therapeutic effect of macromolecular antitumor drug, pH-sensitive human serum albumin conjugates of pirarubicin

研究代表者

月川 健士 (TSUKIGAWA, Kenji)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：60772027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血清アルブミン(HSA)一分子あたり、ピラルビシン(THP)が約2分子結合したHSA-THP2、約4分子結合したHSA-THP4を作製した。両HSA-THPともに、酸性環境下で多くのfree THPを放出し、高い殺細胞効果を示した。両HSA-THPともに酸性環境応答性を示すことが確認できた。続いて、in vivo抗がん効果を検討した結果、体重減少などの目立った副作用は見られず、元のfree THPより高い抗がん効果を発揮した。また、両HSA-THP間では有意な差は見られなかった。以上の結果から、両HSA-THPは、酸性環境応答性を有する、効果的な抗がん剤になると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト血清アルブミン(HSA)とアントラサイクリン系抗がん剤ピラルビシン(THP)を用いた酸性環境応答性高分子化抗がん剤(HSA-THP)を開発した。酸性環境(がん組織環境)応答性や元のTHPより高い抗がん効果を示したことから、がん組織選択的に機能する、安全かつ効果的な高分子化抗がん剤治療が期待できる。また、シンプルな薬物送達システムであり、他の抗がん剤や抗がん剤の効果増強剤などへの応用も可能であり、高分子化抗がん剤治療の戦略が広がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human serum albumin (HSA), which has a high biocompatibility and good biodegradability, is a potent carrier for delivering antitumor drugs. The objective of this study was to develop pH-sensitive HSA conjugates of pirarubicin (THP) (HSA-THP) via a hydrazine bond between HSA and THP. In this study, we synthesized two types of HSA-THP with different amounts of THP (HSA-THP2 and HSA-THP4). Free THP was released from both of the HSA conjugates more rapidly at an acidic pH. And, both HSA-THPs showed a higher cytotoxicity at acidic pH than at neutral pH, which is consistent with the rapid liberation of free THP under acidic conditions. Moreover, both HSA-THPs exhibited antitumor effect without apparent adverse effects, and the antitumor effects were higher than free THP. These findings suggest that these types of HSA-THPs are promising candidates for further development.

研究分野：医療薬学

キーワード：アルブミン ドラッグデリバリーシステム がん ピラルビシン 酸性環境応答性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

効果的な抗がん剤治療を目指し、リポソームや合成高分子などを用いた高分子化抗がん剤の開発が近年盛んである。高分子化による利点は、がん組織選択的集積性 (EPR 効果) である。

抗がん剤ピラルピシン (THP) は、ドキソルピシン (DOX) と同じアントラサイクリン系抗がん剤であるが、DOX よりも素早くがん細胞へ取り込まれ、DOX 耐性がんにも有効である。我々は、がん組織内 (酸性環境) で切断されるヒドラゾン結合を介して、THP と合成高分子を結合させ、酸性環境応答性高分子化 THP の開発に取り組んできた。しかし、その合成高分子には、非分解性の問題や製造コストなどの課題があった。

そこで、安全性 (生体適合性、生分解性)、血中滞留性、がん指向性に優れる生体高分子「ヒト血清アルブミン (HSA)」に着目した。本研究では、この HSA を抗がん剤運搬体として活用し、シンプルながら安全かつ効果的な高分子化抗がん剤 (HSA-THP) の開発を目指した。

2. 研究の目的

HSA と THP を、ヒドラゾン結合を介して結合させ、酸性環境応答性を有する高分子化抗がん剤 HSA-THP の開発を最終目標とする。本研究期間内で、HSA1 分子当たりの THP 数が異なる HSA-THP を作製するとともに、各 HSA-THP の酸性環境応答性や抗がん効果などについて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ポリチオール化 HSA の作製

HSA に、イミノチオランを用いてチオール基を導入し、限外ろ過にて精製してポリチオール化 HSA を作製した。

(2) THP のマレイミド-ヒドラゾン誘導体 (THP-EMCH) の合成

THP と 6-maleimidohexane hydrazide (EMCH) を用いて、THP-EMCH を合成した。合成物は、¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-Mass を用いて確認した。

(3) HSA 1 分子当たりの THP 数が異なる HSA-THP の作製

(1) ポリチオール化 HSA のチオール基と (2) THP-EMCH のマレイミド基の特異的反応により、HSA-THP を作製した。HSA-THP の精製は限外ろ過で行い、THP 定量は THP の吸光度を利用して行った。

(4) 粒子径測定

各 HSA-THP を 2 mg/mL となるように PBS に溶解し、0.2 μm フィルターを過後、動的光散乱法により粒子径を測定した。

(5) 酸性環境下での THP 遊離性の検討

酢酸緩衝液 (pH 5.0)、リン酸緩衝液 (pH 6.0、pH 6.9、pH 7.4) に、各 HSA-THP を溶解し、37 °C でインキュベーションを行った。一定時間後、遊離した THP をクロロホルムで抽出し、HPLC を用いて定量を行った。

(6) 酸性環境下での殺細胞効果の検討

96 ウェルプレートに、酸性環境 (pH 6.5、pH 6.9) に順応させた子宮頸がん HeLa 細胞を 3000 細胞/ウェルとなるように播種した。24 時間後、free THP および各 HSA-THP で処理し、48 時間後に MTS アッセイを用いて殺細胞効果を評価した。

また、マウス大腸がん Colon 26 細胞については、中性 pH 7.4 でのみ殺細胞効果を測定した。

(7) 担がんマウスを用いた抗がん効果の検討

がんサイズが 3~6 mm の Colon 26 担がんマウスに対して、free THP および各 HSA-THP を THP として 5 mg/kg となるように 1 回静脈投与した。経時的に、ノギスを用いてがん体積の測定や体重変化の測定を行った。

4. 研究成果

(1) THP-EMCH の合成

THP のマレイミド-ヒドラゾン誘導体 (THP-EMCH) は、メタノール中で THP と EMCH を反応させることで合成し、¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-Mass を用いて確認した。また、高純度の THP-EMCH を合成することができた (HPLC 解析、Fig 1)。

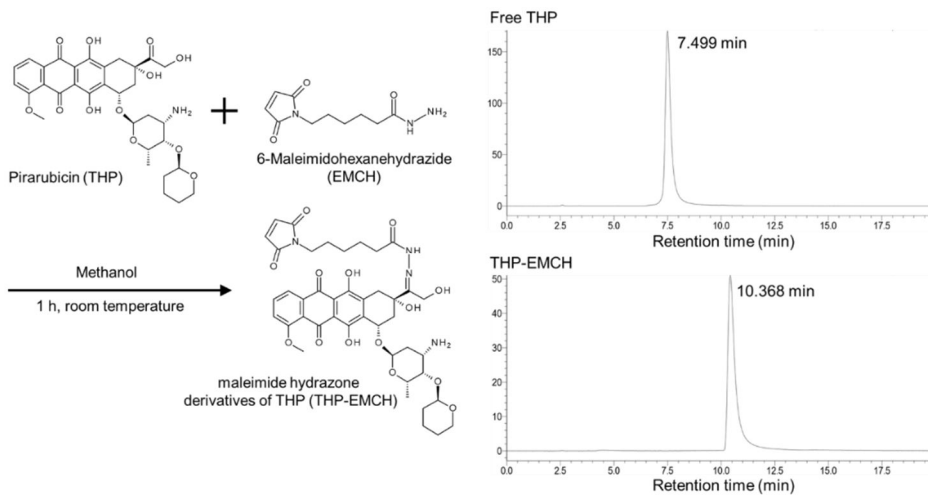


Figure 1. Synthesis and HPLC analyses of maleimide hydrazone derivatives of thapsigargin (THP-EMCH).

(1) HSA 1 分子当たりの THP 数が異なる HSA-THP の作製

本研究では、HSA1 分子当たり、THP が約 2 分子結合した HSA-THP2 (2.03 ± 0.12 分子) 約 4 分子結合した HSA-THP4 (4.12 ± 0.14 分子) を作製し、HPLC を用いて元の free THP や THP-EMCH などが含まれないことを確認した (Fig 2)。また水溶液中でのサイズは、いずれも 7.0 ~ 8.0 nm であった。元の HSA (7.7 nm) と大きな変化はなく、両 HSA-THP ともに凝集は見られないことが示唆された。

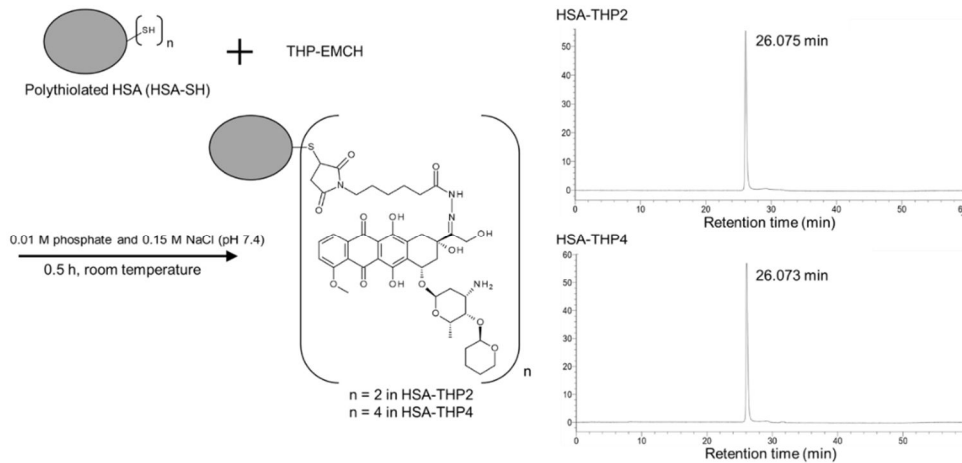


Figure 2. Synthesis and HPLC analyses of HSA-THP2 and HSA-THP4.

(2) HSA-THP からの THP 遊離性

HSA と THP 間の結合には、酸性環境で加水分解されるヒドラゾン結合を用いている。そこで、pH 7.4、pH 6.9、pH 6.0、pH 5.0 において、各 HSA-THP からの THP 遊離性について検討した。両 HSA-THP ともに、時間依存的に THP を放出し、低 pH 下で速やかな THP 遊離が確認された (Fig 3)。両 HSA-THP 間で有意な差は見られなかった。

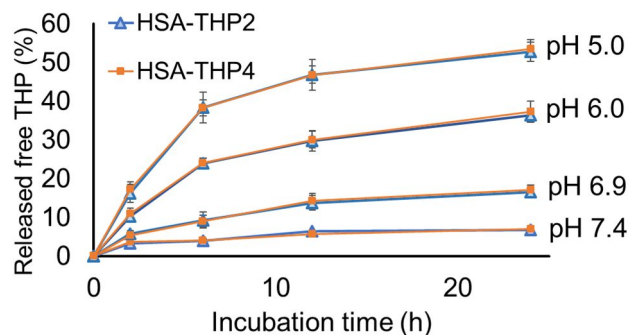


Figure 3. Release of free THP from HSA-THP at different pH values.

(3) HSA-THP の殺細胞効果

Free THP や各 HSA-THP の殺細胞効果について検討した。酸性環境 (pH 6.9 や pH 6.5) に順応させた子宮頸がん由来 HeLa 細胞に対して、両 HSA-THP ともに、濃度依存的な効果を発揮し、より酸性環境になるほど、高い殺細胞効果を示した (Fig 4, Table 1)。さらに、両 HSA-THP を pH 6.0 でプレインキュベーションすることにより、殺細胞効果が増強されることが分かった (Fig 5)。これらは、酸性環境下での THP 遊離性と一致する。また、マウス大腸がん Colon 26 細胞に対しても、両 HSA-THP ともに濃度依存的な殺細胞効果を示した (Fig 6)。

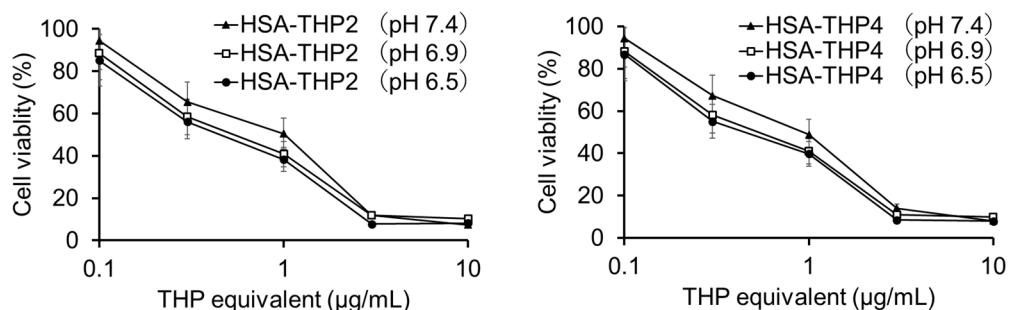


Figure 4. In vitro cytotoxicity of HSA-THP2 and HSA-THP4 against HeLa cells at different pH values (pH 7.4, pH 6.9, pH 6.5).

Table 1. Half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀, µg/mL THP equivalent) values of free THP, HSA-THP2, and HSA-THP4 against HeLa cells after a 48 h drug exposure.

	Free THP	HSA-THP2	HSA-THP4
pH 7.4	0.11 ± 0.01	1.01 ± 0.09	1.01 ± 0.12
pH 6.9	0.15 ± 0.01	0.65 ± 0.06 *	0.63 ± 0.06 *
pH 6.5	0.22 ± 0.02	0.55 ± 0.04 *	0.54 ± 0.07 *

Values are the means ± S.E. (n = 6). * p < 0.05, significant differences from IC₅₀ value at pH 7.4 for each drug.

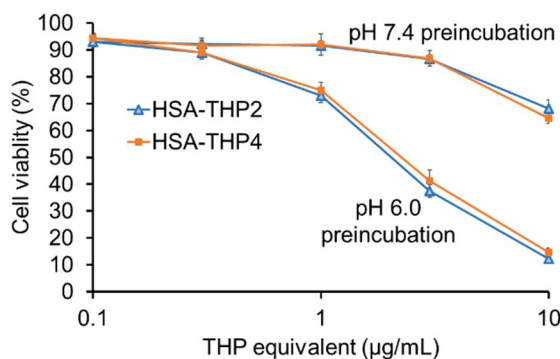


Figure 5. In vitro cytotoxicity of HSA-THP2 and HSA-THP4 against HeLa cells after preincubation in buffers at different pH values. HSA-THP2 or HSA-THP4 was incubated in different buffers pH 7.4 or pH 6.0 for 18 h before being exposed to HeLa cells for 3 h, followed by 48 h of culture.

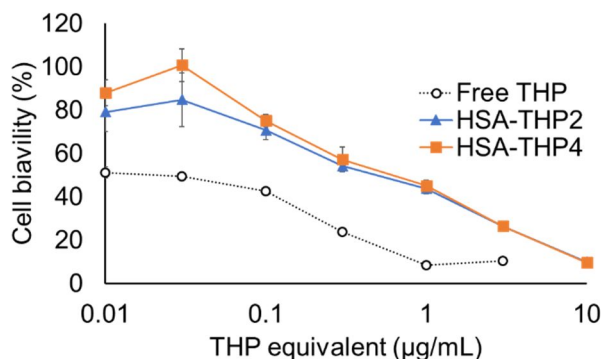


Figure 6. In vitro cytotoxicity of HSA-THP2 and HSA-THP4 against Colon 26 cells at pH 7.4.

(4) In vivo 抗がん効果の検討

マウス大腸がん Colon 26 モデルマウスに、free THP および各 HSA-THP を尾静脈投与し、抗がん効果を評価した。両 HSA-THP とともに、free THP に比べ、高い治療効果を示した (Fig 7)。両 HSA-THP 間では有意な差はなかった。また、静脈投与後の体重減少はなく、目立った副作用は見られなかった (Fig 7)。

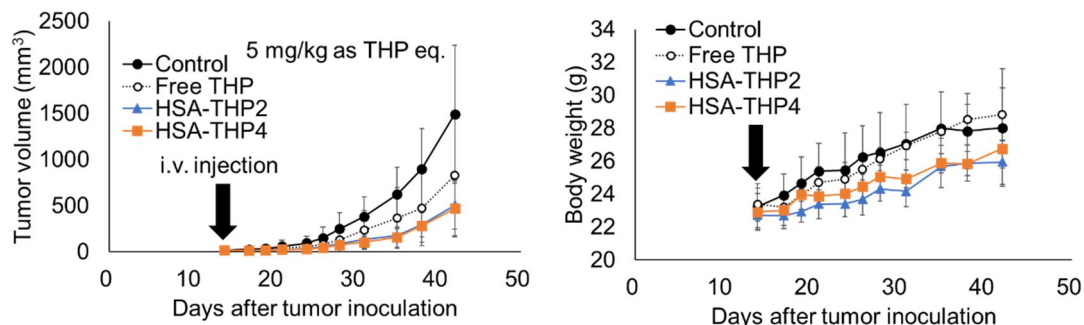


Figure 7. Antitumor effect and body weight change in colon 26 tumor bearing mice after treatment.

本研究では、シンプルながら安全かつ効果的な、酸性環境応答性高分子化抗がん剤(HSA-THP)の開発を目指し、HSA-THPの作製から、THP遊離性、殺細胞効果、in vivo 抗がん効果などの検討を行った。

HSA-THP2、HSA-THP4ともに、酸性環境下で多くのTHPを放出し、高い殺細胞効果を示した。また、colon 26がんモデルマウスにおいても、元のfree THPより高い抗がん効果が見られた。両HSA-THPは、酸性環境応答性を有し、高い抗がん効果を発揮することが示された。さらに、体内分布や詳細な副作用などの検討を進めることで、安全かつ効果的な抗がん剤開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukigawa Kenji, Imoto Shuhei, Yamasaki Keishi, Nishi Koji, Tsutsumi Toshihiko, Yokoyama Shoko, Ishima Yu, Otagiri Masaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Synthesis and In Vitro Assessment of pH-Sensitive Human Serum Albumin Conjugates of Pirarubicin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 22 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph14010022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 月川 健士
2. 発表標題 副作用のないがん治療を目指した高分子型抗がん剤の研究開発
3. 学会等名 第一回宮崎県北サイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 月川 健士、井本 修平、山崎 啓之、堤 敏彦、横山 祥子、小田切 優樹
2. 発表標題 酸性環境応答性を有するアルブミン結合型高分子化抗がん剤の設計と評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 月川 健士、井本 修平、西 弘二、堤 敏彦、横山 祥子、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 酸性環境応答性を有するアルブミン結合型抗がん剤の作製と評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------