

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390010
 研究課題名（和文） レドックス制御型DDSを利用した癌化学・免疫治療システムの開発
 研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF CANCER CHEMO-IMMUNOTHERAPEUTIC SYSTEM USING REDOX CONTROLLABLE DDS
 研究代表者
 西川 元也 (NISHIKAWA MAKIYA)
 京都大学・薬学研究科・准教授
 研究者番号：40273437

研究成果の概要（和文）：癌や炎症、さらには動脈硬化や生活習慣病など広範な疾患における関与が注目される活性酸素を効率よく抑制することによる疾患治療法の開発を試みた。種々の動態制御機能を賦与したカタラーゼ誘導体を作製し、適宜ゼラチンハイドロゲルを組み合わせることで長期作動型システムを開発した。これにより、マウスモデルにおいて結腸癌細胞の腹膜播種性転移の抑制ならびにインスリン抵抗性の改善に成功した。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop therapeutic systems by efficiently inhibiting reactive oxygen species, which have attracted much attention on the involvement in a variety of diseases, including cancer, inflammation and life-related diseases. We synthesized catalase derivatives with diverse tissue distribution characteristics and, with or without gelatin hydrogels, developed long-lasting systems. The application of these systems to mouse disease models have proved that they are effective in inhibiting the peritoneal dissemination of colon carcinoma cells and in ameliorating the insulin resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生物薬剤学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、活性酸素、カタラーゼ、癌転移、高血糖

1. 研究開始当初の背景

過剰な活性酸素による酸化ストレスは、癌や炎症、さらには動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病など広範な疾患における関与が注目されている。酸化ストレスに対する防御には抗酸化化合物の利用が期待され、中でも活性酸素を特異的かつ効率的に消去可能であり、アスコルビン酸のように酸化剤として機能する危険性がないスーパーオキシドデ

ィスムターゼ (SOD) やカタラーゼなどの活性酸素消去酵素が注目されている。バイオテクノロジーの進展により生理活性タンパク質の大量精製が可能になると、活性酸素消去酵素、特にSODの臨床試験が実施されたが、SODをはじめとする活性酸素消去酵素の医薬品開発は順調には進んでいないのが現状である。

その最大の理由として、生体投与後の消失

が速く、標的部位での酵素濃度が低いなどの体内動態特性上の問題が挙げられる。申請者らのグループはこの問題に取り組み、SOD及びカタラーゼの体内動態を厳密に制御可能なDDS開発を行い、各種疾患モデルにおける有効性向上ならびに副作用軽減を実現した。しかしながら、持続的な血中動態を示すPEG修飾カタラーゼ(PEG-catalase)の場合でも消失半減期はマウスで数十時間程度であり、抑制効果の持続には分子構造修飾による動態制御に加えて投与経路の選択や製剤の利用も必要と考えられた。また、これまでは、ウシ肝臓から抽出されたカタラーゼを利用した検討が多いが、これは臨床応用の際に抗原性の問題が懸念される。従って、ウシカタラーゼで得られた知見を疾患治療に展開するためには、ヒトカタラーゼ(hCAT)誘導体の開発が重要である。

2. 研究の目的

本研究では、カタラーゼ誘導体を基盤とする疾患治療システムの開発を目的に、以下の項目について検討する。

- (1) PEG-catalaseの繰り返し投与によるインスリン抵抗性の改善
- (2) PEG-catalaseとゼラチンハイドロゲルの組み合わせによる癌自然転移の抑制
- (3) hCAT誘導体の開発と術時損傷により亢進する結腸癌腹膜播種の抑制

3. 研究の方法

- (1) PEG-catalaseの繰り返し投与によるインスリン抵抗性の改善
 - ① PEG-catalaseの投与: PEG-catalaseは既報に従い合成した。C57BL/6マウス及びob/obマウスをそれぞれ正常マウス、インスリン抵抗性マウスとして選択した。1週当たり合計17,500 unitsのPEG-catalaseを、3回に分けてob/obマウスに腹腔内注射した。別のob/obマウスとC57BL/6マウスには同一プロトコールで生理食塩水を注射した。この処置を16週間行った。
 - ② 血糖値の測定: 随時、尾静脈より採血し、摂食条件下の血糖値を測定した。
 - ③ ブドウ糖負荷試験: PEG-catalase投与開始12週後に行った。4時間の絶食後、ブドウ糖を1.5 g/kgの投与量で腹腔内注射し、0, 15, 30, 60, 90 and 120分後の血糖値を測定した。
 - ④ インスリン負荷試験: PEG-catalase投与開始16週後に行った。4時間の絶食後、インスリンを0.1 units/kgの投与量で皮下注射し、0, 15, 30, 60, 90 and 120分後の血糖値を測定した。
- (2) PEG-catalaseとゼラチンハイドロゲルの組み合わせによる癌自然転移の抑制
 - ① ゼラチンハイドロゲルを用いたPEG-catalaseの投与: 生分解性のゼラチン

ハイドロゲルは既報に従い調製した。凍結乾燥したゲルに¹²⁵I標識catalaseまたはPEG-catalaseを滴下することで含浸した。マウス皮下に移植し、1日後に摘出したゲル中の放射活性を測定した。

- ② 自然癌転移モデル: ルシフェラーゼを発現するマウスメラノーマB16-BL6/Luc細胞をマウス足蹠に移植した。移植3週間後に肺を摘出し、臓器中ルシフェラーゼ活性を指標に肺に転移・増殖したB16-BL6/Luc細胞数を評価した。

- ③ PEG-catalaseの投与: PEG-catalase溶液は、1日当たり1,000 unitsの投与量で連日皮下注射した。一方、生理食塩水またはPEG-catalaseを含むハイドロゲルは、皮膚を切開後皮下に埋め込んだ。

- (3) hCAT誘導体の開発と術時損傷により亢進する結腸癌腹膜播種の抑制

- ① hCAT誘導体の作製: hCAT cDNAをコードするベクターを発現させた酵母*Pichia pastoris*のプロテアーゼ欠損株SMD1168をYPD培地中で培養後、可溶性画分を回収し、GSTセファロースカラムにてhCATを精製した。また、細胞への親和性増大を目的とした誘導体設計においては、アルギニン9残基(R9)から成るカチオン性ペプチドまたはインテグリンへの結合能を有するRGDペプチドを3回繰り返さず配列(RGDRGDRGD)を選択した。別途、アルブミンに高い親和性を有する24アミノ酸からなるペプチド(albumin binding peptide; ABP)を選択し、血清アルブミン結合型誘導体を設計した。hCATのC末端部に存在するペルオキシゾーム局在化配列を上記の各配列で置換したベクターを構築し、hCAT-R9、hCAT-(RGD)3、hCAT-ABPを得た。

- ② 細胞接着抑制効果: マウス血管内皮細胞株MAECに各種hCAT誘導体を添加し、低酸素(8% O₂)条件下で培養後、B16-BL6/Lucを添加した。3時間後、ルシフェラーゼ活性を指標にMAECに接着したB16-BL6/Luc細胞数を定量した。

- ③ ROS産生: 蛍光色素CM-H₂DCFDAを取り込ませたMAECに各hCAT誘導体を添加し、低酸素条件下で培養した。経時的に蛍光強度を測定することで細胞内ROS産生を評価した。

- ④ 転写因子活性の評価: HIF-1またはAP-1、NF-κBに依存してルシフェラーゼを発現するプラスミドを導入したMAECに各種hCAT誘導体を添加し、低酸素条件下で培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定することでHIF-1、AP-1、NF-κB活性を評価した。

- ⑤ mRNAの定量: MAECに各種誘導体を添加し、低酸素条件下で培養した後、細胞から抽出したtotal RNAを用いて、RT-PCR法によりICAM-1、VCAM-1、E-selectin、TGFβ、

PAI-1、TNF α の mRNA を定量した。

⑥ 腹腔内滞留性の評価：¹²⁵I で標識した hCAT 誘導体を ICR マウスに腹腔内投与し、経時的に摘出した腹腔内臓器中の放射活性を測定した。

⑦ 手術侵襲モデルの作製：麻酔下、BALB/c マウスの左側腹部を切開し、小型電気はんだごてを用いて盲腸を約 1 秒間焼灼した。焼灼後、盲腸を速やかに腹腔内に戻し、腹膜及び腹壁を縫合した。

⑧ 腹膜転移抑制効果の評価：施術したマウスに hCAT 誘導体を 500U/mouse の投与量で腹腔内投与し、その 5 分後にルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させたマウス結腸癌細胞 colon26/Luc 細胞を腹腔内に移植した。移植 3 日後に腹腔内臓器を摘出し、ルシフェラーゼ活性を指標に臓器中癌細胞数を評価した。

⑨ *In vivo* 酸化ストレスの評価：手術 1 日後に盲腸を回収し、脂質過酸化のマーカである MDA 量を TBARS 法により測定した。

4. 研究成果

(1) PEG-catalase の繰り返し投与によるインスリン抵抗性の改善

① 体重及び血糖値に及ぼす影響：*Ob/ob* マウスの体重は経目的に増加し、PEG-catalase の繰り返し投与による影響は認められなかった。生理食塩水投与 *ob/ob* マウスは、C57BL/6 マウスと比較して有意に高い血糖値を示したことから、インスリン抵抗性を発症していることが確認された。一方、PEG-catalase 投与 *ob/ob* マウスは、対照群よりも有意に低い血糖値を示した。

② 負荷試験：全ての群において、ブドウ糖注射により血糖値は急激に上昇した。しかしながら、正常マウスでは上昇の程度は小さく、120 分以内に正常値に復帰した。*Ob/ob* マウスでは、PEG-catalase 投与群でより速やかな血糖値の低下が観察され、インスリン感受性の回復が示唆された。

同様の結果は、C57BL/6 マウスに高脂肪食を投与することで作成した肥満マウスでも認められた。また、脂肪細胞での検討からは、インスリンのシグナル伝達に必須である Akt リン酸化が PEG-catalase により回復することも示されており、こうした作用がインスリン抵抗性の改善に関与することが示唆された。

以上より、PEG-catalase の投与により過酸化水素を消去することが、耐糖能及びインスリン感受性の改善、引いてはインスリン抵抗性の改善に繋がることが示された。

(2) PEG-catalase とゼラチンハイドロゲルの組み合わせによる癌自然転移の抑制

① ゲルからの catalase 誘導体の放出：埋め込み 1 日後にゲル中に残存した ¹²⁵I-catalase 及び ¹²⁵I-PEG-catalase の放射活性は、それ

ぞれ約 10 及び約 25% となり、PEG-catalase がゼラチンハイドロゲルからゆっくりと放出されることが示された。

② 自然転移の抑制：PEG-catalase 溶液の皮下注射により肺中の癌細胞数は有意に減少した。一方、PEG-catalase をゲルに含浸して投与した場合には、より高い抑制効果が認められ、生理食塩水投与群のわずか 2% 程度の癌細胞しか検出されなかった。生理食塩水を含浸したハイドロゲルの投与では抑制効果は認められず、PEG-catalase の徐放転移抑制に有効であることが示された。

ゲルから放出された PEG-catalase は、高い血中滞留性を示すことから、ハイドロゲル製剤の利用による癌転移抑制効果には、ゲルからの徐放化に加えて、PEG-catalase の高い血中滞留性が関与するものと考えられる。

(3) hCAT 誘導体の開発と術時損傷により亢進する結腸癌腹膜播種の抑制

① 低酸素ストレスによる細胞接着の変化と hCAT 誘導体の接着抑制効果：MAEC への B16-BL6/Luc 細胞の接着は、MAEC を低酸素状態にすることで約 2 倍亢進した。hCAT の添加により B16-BL6 細胞の接着亢進が抑制されたが、今回開発した hCAT-(RGD)₃ または hCAT-R9 は、100 倍以上高い細胞接着抑制効果を示した。

② 接着抑制効果のメカニズムの解明：B16-BL6/Luc の MAEC への接着は、過酸化水素の添加により濃度依存的に亢進した。低酸素条件下で培養した MAEC の細胞内では、培養開始 1 時間から ROS 産生が亢進することが示され、この ROS は hCAT 誘導体により消去可能であった。低酸素培養により認められた HIF-1 及び NF- κ B の活性化ならびに接着分子の発現亢進は、hCAT-(RGD)₃ または hCAT-R9 により抑制された。

③ 手術侵襲が腹腔内環境に及ぼす影響：盲腸における過酸化脂質量は、施術により約 2.6 倍に増加した。また、炎症反応の指標である TNF α 、癌細胞の接着に関わる ICAM-1、癌の悪性化及び組織間の異常な接着に関わる TGF β 及び PAI-1 の mRNA 発現はいずれも有意に増加した。この腹腔内環境の変化に伴い、盲腸をはじめ腹膜、消化管、脂肪組織などの間に数多くの癒着が認められた。手術侵襲により、腹腔内での colon26/Luc の転移巣形成は著明に亢進し、手術 3 日後における腹腔内臓器中癌細胞数は約 8 倍にまで増加することが確認された。

④ hCAT 誘導体による手術後の腹膜転移抑制効果：¹²⁵I 標識した hCAT 誘導体を腹腔内投与したところ、hCAT-R9 及び hCAT-ABP は hCAT と比較して腹腔内臓器に滞留する傾向を示した。そこで、手術時に hCAT 誘導体を腹腔内投与し、腹膜における mRNA の発現を評価したところ、盲腸焼灼および癌播種

による炎症性サイトカインや癌関連因子の有意な発現増加は、hCAT 誘導体の投与により抑制された。従って、手術侵襲により産生される過酸化水素を hCAT 誘導体が速やかに分解することで、これら因子の発現亢進を抑制可能であることが示唆された。また、癌移植 3 日後の腹腔内癌細胞数は、hCAT 投与群では有意な減少は認められなかったのに対し、hCAT-R9 または hCAT-ABP 投与群では有意に減少した。

以上のことから、手術侵襲に伴う腹腔内の炎症反応、それに伴う癌転移を惹起する遺伝子の発現亢進を hCAT の投与により抑制できること、さらに hCAT に機能性ペプチドを融合することで腹腔内滞留性を増大することが、手術侵襲亢進する癌細胞の腹膜転移を抑制する有効な方法論になりうることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Nishizaki C, Nishikawa M, Yata T, Yamada T, Takahashi Y, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y, Nakanishi K, Takakura Y. Inhibition of surgical trauma-enhanced peritoneal dissemination of tumor cells by human catalase derivatives in mice. *Free Radic Biol Med*, 査読有, 2011, 印刷中.
- ② Ikemura M, Nishikawa M, Hyoudou K, Kobayashi Y, Yamashita F, Hashida M. Improvement of insulin resistance by removal of systemic hydrogen peroxide by PEGylated catalase in obese mice. *Mol Pharm*, 査読有, 7(6), 2010, pp. 2069-2076.
- ③ Yata T, Nishikawa M, Nishizaki C, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y, Takakura Y. Control of hypoxia-induced tumor cell adhesion by cytophilic human catalase. *Free Radic Biol Med*, 査読有, 47(12), 2009, pp. 1772-1778.
- ④ Katsumi H, Nishikawa M, Yasui H, Yamashita F, Hashida M. Prevention of ischemia/reperfusion injury by hepatic targeting of nitric oxide in mice. *J Control Release*, 査読有, 140(1), 2009, pp. 12-17.
- ⑤ Hyoudou K, Nishikawa M, Ikemura M, Kobayashi Y, Mendelsohn A, Miyazaki N, Tabata Y, Yamashita F, Hashida M. Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sustained delivery of catalase. *J Control Release*, 査読有, 137(2), 2009, pp. 110-115.
- ⑥ Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Delivery Rev*, 査読有, 61(4), 2009, pp. 319-326.
- ⑦ Kobayashi Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M. Hydrogen peroxide-mediated nuclear factor κ B activation in both liver and tumor cells during initial stages of hepatic metastasis. *Cancer Sci*, 査読有, 99(8), 2008, pp. 1546-1552.
- ⑧ Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*, 査読有, 266(1), 2008, pp. 53-59.
- ⑨ Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Ikemura M, Yamashita F, Hashida M. SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Clin Exp Metastasis*, 査読有, 25(5), 2008, pp. 531-536.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Ikemura M, Nishikawa M, et al. Acceleration of tumor metastasis in obese or diabetic mice and its inhibition by PEGylated catalase. 4th Pharmaceutical Sciences World Congress, 2010/11/14-18, New Orleans, LA, USA
- ② 池村 舞、西川元也、他. 持続的活性酸素消去による糖尿病状態における癌細胞接着亢進の抑制. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 2010/6/17-18, 大阪
- ③ 西崎智香、西川元也、他. 細胞親和性ペプチド融合による動態制御型ヒトカタラーゼの開発とその癌転移抑制効果. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会, 2010/6/17-18, 大阪
- ④ 池村 舞、西川元也、他. 肥満・糖尿病における癌転移の亢進と活性酸素消去による転移抑制. 日本薬学会第 130 年会, 2010/3/28-30, 岡山
- ⑤ Yunlong Z, Nishikawa M, et al. Improved delivery of catalase to bone by conjugation of bisphosphonate and polyethylene glycol. 日本薬物動態学会第 24 回年会, 2009/11/27-29, 京都
- ⑥ Nishizaki C, Nishikawa M, et al. Effective inhibition of hypoxia-induced tumor cell adhesion by cytophilic human catalase. 日本薬物動態学会第 24 回年会, 2009/11/27-29, 京都
- ⑦ Ikemura M, Nishikawa M, et al. Inhibition of insulin resistance by continuous removal of hydrogen peroxide using catalase derivatives. The Fifth iCeMS International Symposium, 2009/7/27-28, 京都

- ⑧Ikemura M, Nishikawa M, et al. Continuous removal of hydrogen peroxide by polyethylene glycol-conjugated catalase for the inhibition of insulin resistance. AAPS Annual Meeting and Exposition 2008, 2008/11/16-20, Atlanta, GA, USA
- ⑨古林裕貴、西川元也、他. Differentiation of immature myeloid cells by PEGylated catalase for cancer immunotherapy. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008/10/28-30, 名古屋
- ⑩Kobayashi Y, Nishikawa M, et al. Targeted delivery of catalase to liver cells for inhibition of NF- κ B activation in tumor and liver cells during hepatic tumor metastasis. GPEN2008, 2008/9/9-12, Leuven, Belgium
- ⑪Nishikawa M. Receptor-mediated delivery of drugs, proteins and genes. 2nd Asian Pacific Regional Meeting of International Society of Xenobiotics, 2008/5/11-13, Shanghai, China

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 元也 (NISHIKAWA MAKIYA)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40273437

(2)研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

由里本 博也 (YURIMOTO HIROYA)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：00283648

高倉 喜信 (TAKAKURA YOSHINOBU)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30171432