

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32403
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K16421
研究課題名(和文) CD44陽性がん標的指向性を有するプロドラッグ型グルタチオン応答薬物放出システム

研究課題名(英文) Prodrug-type glutathione-responsive drug release system with CD44-positive cancer target nanocarrier

研究代表者
関 智宏 (Seki, Tomohiro)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：20848486
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：モデル薬物として用いたドキソルビシン(Dox)をプロドラッグ化したものは、がん細胞内相当のGSH濃度環境で活性化され、生細胞内でも活性化が確認された。このプロドラッグはDNAとの相互作用がDoxよりも低く、がん細胞内で細胞障害性を示すことも確認された。HAは細胞実験より、CD44を介して取り込まれることが確認され、一方で、HAの短い生体内半減基はHAへのポリエチレングリコール化により延長できた。これらの成果を統合して、完成されたシステムを現在構築段階だが、個々の実験結果は、システムを構築するための材料を作成していく上で極めて重要な知見であり、今後の研究においてその発展に寄与するものと確信する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の意義は、CD44に対する親和性をもつHAによりがん細胞に選択的に集積させ、細胞内の高濃度GSH環境において抗がん薬の活性化と放出によりがん細胞選択的な治療を狙ったものであり、合理的にデザインされたものであると同時に、個々の実験結果は、システムを構築するための材料を作成していく上で極めて重要な知見であった。他の癌種や疾患治療のデリバリーシステムへも広く応用可能な基礎技術として有用であり、本研究で学術的な理解を深め制御の方法論を確立したことは、社会への還元性の高い取り組みであり、今後の研究においてその発展に寄与するものと確信する。

研究成果の概要(英文)：A prodrug of doxorubicin (Dox) used as a model drug was found to be active at GSH concentrations equivalent to those in cancer cells and was also found to be active in living cells. The prodrug was also found to be cytotoxic in cancer cells with lower interaction with DNA than Dox. HA confirmed to be taken up via CD44 by cell experiments, while the short in vivo half-life of HA can be extended by PEGylation of HA. The results of the individual experiments are extremely important for the creation of materials for the construction of the system, and we are confident that they will contribute to the development of the system in future research.

研究分野：薬剤学

キーワード：刺激応答 グルタチオン がんターゲティング CD44 シスチントランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がん、乳がん、膵臓がんなどのある種のがんにおいて、表面抗原の CD44 は、過剰に発現していることが明らかとなっており、中でも CD44 のバリエーションアイソフォーム(CD44v)を発現するがんにおいては、抗がん剤治療や放射線治療抵抗性を示し、臨床的にもその評価の重要性が示唆されている。CD44v による抗がん剤治療や放射線治療抵抗性は、CD44v が細胞内グルタチオン(GSH)の生合成を促進し、形成される高濃度 GSH 環境により酸化ストレス耐性を生じることによって起因する。本研究では、標準型 CD44 および CD44v のリガンドであるヒアルロン酸(HA)をがんターゲティング素材および薬物担体とし、がん細胞内において HA に結合したプロドラッグが細胞内 GSH 濃度を感知することで抗がん剤を放出して殺細胞作用を発現するドラッグデリバリーシステム(DDS)を確立する。本システムにおいては、血中または細胞外では、薬物が GSH 応答開裂リンカーを介して薬物担体およびターゲティング素材である HA に結合していることで、細網内皮系を回避可能なプロドラッグとして振る舞い、一方で、EPR 効果と CD44 への結合を介して CD44 陽性のがん細胞内に送達された高濃度の GSH 環境下では、リンカーが切断されることで活性薬物が放出されることから、有効かつ副作用のより少ないがん治療が可能となる(図 1)。

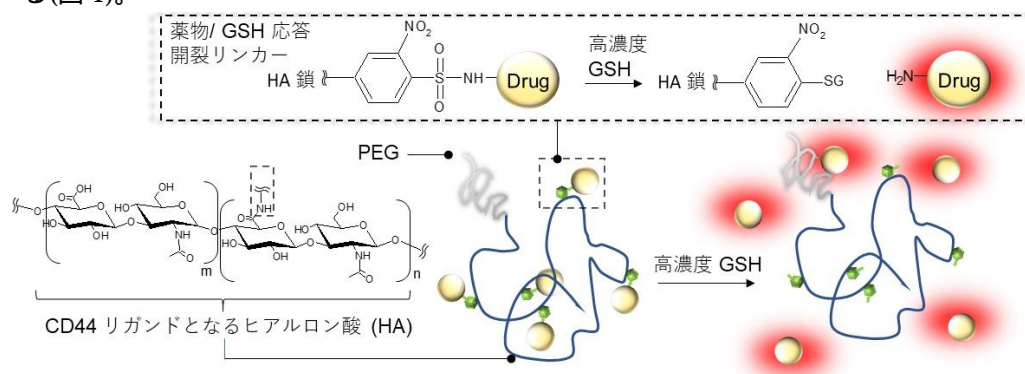


図 1. CD44 陽性がん標的指向性を持つプロドラッグ型グルタチオン応答薬物放出システムの概念図

2. 研究の目的

本申請の研究では、CD44v 陽性がん細胞への薬物送達と同時に、ターゲットとする細胞中で形成される高濃度 GSH 環境を化学刺激として薬物を放出する DDS を確立する。このシステムにおいて、HA を CD44v 陽性がんへのターゲティング素材として用い、また、GSH 応答開裂リンカーとして 2-nitrobenzenesulfonyl (Ns) 基を介して薬物を HA に結合させる(図 1)。血中または細胞外では Ns 基に結合した状態の薬物は担体である HA からの放出が制御されているだけでなく、細網内皮系を回避可能なプロドラッグとして振る舞い、一方で、EPR 効果と CD44v への結合を介して CD44v 陽性のがん細胞内に送達された後の高濃度の GSH 環境下では、Ns 基が切断されることでプロドラッグが再活性化されながら放出されることが期待できる。

還元環境に反応して切断される化学リンカーとして、最もよく用いられるのはジスルフィド結合であり、HA を用いたターゲティングの放出機構に用いられた例も少数ある。しかし、ジスルフィド結合は血中の微量な GSH 濃度(20 μ M 程度)においても一定程度切断されてしまうという問題がある。一方、本申請による研究では、新たな化学リンカーとして Ns 基に着目した。Ns 構造は有機合成の分野ではアミノ基の保護基として用いられる比較的安定な結合である。本申請の研究は、Ns 基に特有の細胞外での安定性、また HA との組み合わせにより、送達された CD44v 陽性がん細胞内での高濃度 GSH 環境でのプロドラッグ放出性が期待できる独自性の高いシステムである。さらに、ジスルフィド基と異なり、Ns 基中ベンゼン環への置換基導入による GSH への反応性を調節可能であることから、本システムの実現可能性は高く、有効かつ副作用のより少ないがん治療の研究として社会への貢献も大きい。

3. 研究の方法

本研究は、GSH 刺激に反応して放出されるプロドラッグの解離機能の設計、HA のターゲティング素材かつ薬物担体としての評価と化学修飾、及び HA へのプロドラッグ導入と in vitro がん細胞、in vivo 腫瘍モデル動物を用いた本システムの検証からなる。

まずは、GSH 濃度の化学刺激を感知して結合が切断される薬物-リンカーを合成し、その応答を確認することとした。その一つとして、モデルドラッグとして 7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)を用いて検討を行った。AMC の蛍光は構造中のアミノ基とカルボニル間での分子内電荷移動に基づくため、AMC のアミノ基に Ns 基を修飾することで蛍光が OFF の状態となる。Ns-AMC を得た後、上述の性質を利用し、緩衝液中各 GSH 濃度条件下での AMC の放出応答性を蛍光測定により評価

した。血中安定性の観点から、AMC へのカルバモイル基を介したジスルフィドの修飾も行い、GSH 20 μ M という血中での模倣環境での Ns 基とジスルフィド基の安定性を比較した。

また、GSH 生合成の亢進したがん選択的に細胞障害性を示すことを期待し、モデル薬物としてドキシソルピシン(Dox)を選択し、Dox 構造中のアミノ糖部分に GSH 応答開裂基として Ns 基を修飾することで、GSH 応答プロドラッグとなる Ns 修飾 Dox(Ns-Dox)を合成した。

この Ns-Dox は、本来 Dox が有する蛍光を OFF 状態にすることが蛍光スペクトルからわかり、蛍光追跡によりその活性化を評価した。すなわち、緩衝液中で GSH 1, 5 mM または GSH 1, 5 mM にグルタチオン-s-トランスフェラーゼ(GST) 0.4 nM 共存により Ns 基の脱保護と Dox の遊離について 557 nm の蛍光強度から評価した。

細胞膜透過性を考慮しない細胞模倣環境の系として、CD44v および xCT の高発現と高い細胞内 GSH 濃度が報告されているヒト結腸腺癌由来 HCT116 細胞の破碎液中での Dox 遊離率評価を前述と同様の定量方法で行った。

生細胞を用いた検討として、HCT116 に対して Ns-Dox 20 μ M 条件で 2, 4, 6 hr インキュベートした後に、共焦点レーザー顕微鏡でイメージング観察を行い、また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量で細胞内での Dox への変換を評価した。

Dox または Ns-Dox と DNA の相互作用について、等温滴定型熱量測定(ITC)を用いた結合定数解析から評価した。モデル二本鎖 DNA は、5' -CGTACGCGTACGCGTACGCG-3' とその相補オリゴヌクレオチドを用いてサーマルサイクラーで調製した。

Ns 部分の置換基効果を調査するため、Ns ベンゼン環中スルホニル基から o-位にあたる位置にメチル基を導入したメチル化 Ns-Dox を合成した。メチル化 Ns-Dox を緩衝液中、GSH 1, 5 mM または GSH 1, 5 mM にグルタチオン-s-トランスフェラーゼ(GST) 0.4 nM と共存し、経時的に HPLC による定量を行うことで、Ns 基の脱保護と Dox の遊離について評価した。

表面抗原 CD44 に対するリガンドであるヒアルロン酸(HA)の、ターゲティング素材および薬物担体としての有用性を検討するにあたり、in vitro 細胞内取り込みや in vivo 血中濃度推移、標的組織部位への集積を評価する目的で分子量 45kDa の HA 構造中のカルボキシ基へのアミノフルオレセイン(AF)の修飾を行い、次いで同反応点に片末端アミノ化 PEG(amino-PEG, 5 kDa)を修飾した。

HA への PEG 化率は、¹H NMR により算出した。D₂O 中、非修飾 HA 濃度を固定し、amino-PEG を各 mol 比で混合し、NMR 測定することで、1.9 ppm の HA 由来 N-アセチル基プロトン (CH₃-CO-N-) ピークと、3.5 ppm の PEG 由来プロトン (-CH₂-CH₂-O-) ピークの積分比を調製モル濃度比に対してプロットし、検量線を作成した。各 PEG 修飾 AF-HA サンプルを同様に測定し、解析した。各修飾 HA サンプルのゼータ電位をゼータサイザー Ultra で測定した。

AF-HA と PEG 修飾 AF-HA の HCT116 細胞への 0, 2, 4, 6 時間の取り込みを蛍光顕微鏡(Cytation 1)で評価した。4 での取り込みも行い、エネルギー依存性のエンドサイトーシスを阻害した条件でも測定を行った。

PEG 修飾 AF-HA の血中滞留性は、Wistar ラット(8 週齢)に PEG 修飾 AF-HA を 1.0 mg/kg で i.v. 投与し、経時的に採血することで、血中濃度推移から評価した。HPLC を用い、AF の蛍光強度から定量を行い、0-8 時間の血中濃度から算出した AUC と、対数血中濃度の後期の傾きを用いて 8 時間目以降の無限時間まで外挿した AUC を合計し、AUC₀₋ として評価した。また、投与初期の濃度を外挿し、初濃度 C₀ を求め、分布容積を求め、初期分布について考察した。動物実験は、城西大学動物実験規定に従い、全学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号:第 JU20025, 号第 JU21025 号, 第 JU22025 号)。

4. 研究成果

4-1. GSH 応答モデル蛍光分子の合成と応答評価

モデル蛍光物質 AMC を用いた、Ns 基とジスルフィド基の血中を想定した GSH 低濃度溶液中での安定性の比較

モデル蛍光物質とした AMC に対し、GSH 応答開裂基として 2-nitrobenzenesulfonyl (Ns)基またはジスルフィド基を有するリンカーを化学修飾した。フラッシュクロマトグラフィー(Isolera Prime)で分取した生成物を NMR 及び質量分析(FAB-MS)より構造解析し、Ns-AMC が得られたことを確認した。AMC が有する蛍光は Ns 基およびカルバモイル基を介したジスルフィドの修飾により OFF 状態となることが確認され、前述の AMC アミノ基の修飾が GSH 共存により外れることで再び ON 状態になることを利用して放出性の調査を行った。血液中を模倣した GSH 20 μ M の緩衝液中における AMC の放出はジスルフィド基修飾体では 48 時間目までに 30%程度生じた一方で、Ns 基修飾体では放出がほとんど見られず、血中環境での安定性が高いことが確認された(Not shown)。

4-2. GSH 応答モデル薬物の合成

合成後フラッシュクロマトグラフィーで精製したフラクションを NMR と FAB-MS により構造解析したところ、Dox のアミノ糖部分に Ns が結合した Ns-Dox が得られたことを確認した。

4-3. 各 GSH 濃度の緩衝液中での Dox への活性化評価

GSH 5 mM+GST, GSH 1 mM+GST, GSH 5 mMまたはGSH 1 mMを含む緩衝液中での反応 8 hrにおいて、Dox 遊離率は GSH 5 mM+GST>GSH 1 mM+GST>GSH 5 mM>GSH 1 mMの順であり、GSH 濃度依存性に加え GST の触媒機能が活性化に関与することがわかった(図 2)。

4-4. 細胞破碎液中での Dox への活性化評価
化学修飾による膜透過性変化に影響されない細胞模倣環境の系として、HCT116 細胞の破碎液中での Dox 遊離率評価を行った。結果は、8 hr 目で Dox 遊離率 50%を越え、一方 GSH 阻害剤(N-Ethylmaleimide, NEM)添加では 5%、GST 阻害剤(2-Chloro-5-NitrobenzenSulfonyl Fluoride, CNBSF)の添加では 20%にまで活性化が抑制された。

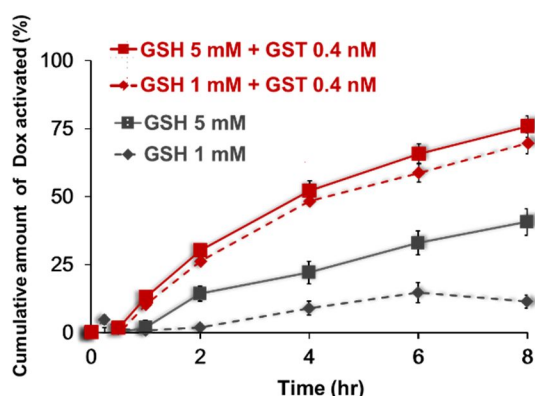


図 2. GSH 各条件における Dox への累積活性化率 Ns-Dox 20 μM 共存下, pH 7.4, 37°C, PBS / DMSO (99 / 1)

4-5. 生細胞中での Dox への活性化評価

生細胞内での Dox への変換の評価として、HCT116 細胞に Ns-Dox 添加後の蛍光顕微鏡観察と HPLC による定量を行ったところ、どちらの結果も、2-6 時間目にかけて Ns-Dox の活性化による Dox の蛍光が上昇することがわかった。また、HPLC での定量評価では Dox と Ns-Dox の物質量を定量し、細胞内に取り込まれた Ns-Dox と、取り込まれ活性化された Dox の割合を算出したところ、阻害剤未処理条件において活性化された Dox の割合に時間依存的増加が確認された。一方で、NEM 処理や CNBSF 処理条件では活性化の割合が増加しなかったことから、がん細胞内 GSH 刺激により活性化されるプロドラッグのコンセプトが証明された(Not shown)。

4-6. ITC を用いた Dox および Ns-Dox のモデル DNA との相互作用の解析

ITC の結果から、合成により得られた Ns-Dox の DNA との結合定数は Dox と比較して 1/50 と結合親和性が低く、Ns-Dox は活性化前の毒性が低いプロドラッグとして機能することが期待された。Ns-Dox の親和性低下の原因として、Ns 保護により、Dox アミノ基と DNA 構造中リン酸基との静電相互作用の減弱と立体障害によるインターカレーションの阻害が考えられる。

4-7. Ns 基置換基効果の検討

Ns 部分の置換基効果を調査するため、Ns ベンゼン環中スルホニル基から o-位にあたる位置にメチル基を導入したメチル化 Ns-Dox を 4 ステップの反応により得た。この mNs-Dox はメチル基のない Ns-Dox に比べ、いずれの GSH 濃度共存条件、また GST 添加条件においても Dox の遊離が抑制されたものであった(Not shown)。GSH に対する応答性低下には、o-位メチル基の電子供与性と立体障害の 2 つの要因が考えられる。また、置換基効果により反応性を制御可能なことが確認された。システム全体を統合し、in vitro や in vivo での評価結果において、Ns 部分の血中安定性に問題がある場合などに、より反応性の低い mNs-Dox の利用を検討する。

4-8. HA への PEG 修飾と細胞取り込み能の評価

蛍光修飾の結果 HA1 分子あたり平均 0.60 の AF 修飾数のものが得られた。さらに AF-HA へ同反応点に対し PEG 化を行った。調製の検討から PEG/AF-HA 仕込み mol 比依存的 PEG 化率が直線的に上昇することがわかり、HA1 分子あたり PEG 5kDa が 3, 5, 9 分子修飾された PEG-AF-HA(PEG3-AF-HA, PEG5-AF-HA, PEG9-AF-HA)を得た。PBS 中で、各 HA のゼータ電位を測定したところ、PEG 修飾で HA のカルボキシ基が消費されることによってゼータ電位の絶対値が低下した(表 1)。AF-HA と PEG3-AF-HA の HCT116 細胞への取り込みを蛍光顕微鏡(Cytation 1)で評価したところ、どちらも 6 時間目までにかけて時間依存的な取り込みが確認され、PEG 修飾により取り込みが一定程度減少することがわかった(Not shown)。一方で、AF-HA と PEG3-AF-HA 共に、6 時間目までにかけて AF の蛍光が点在した偏った分布であったこと、4 の条件で評価すると取り込みが著しく低下したことからエンドサイトーシスをメインとして取り込まれた後、エンドソームから細胞質への移行が制限されていることが示唆された。エンドソームを脱出できなければ薬効発現は期待できないため、エンドソーム内の弱酸性環境を利用したエンドソーム脱出機構を今後システムに取り入れる必要がある。

表 1. HA への AF および PEG 修飾数とゼータ電位。

サンプル名	AF 修飾数 /HA 1 分子	PEG 修飾数 /HA 1 分子	消費カルボキシ基 (%)	ゼータ電位 (mV) *
AF-HA	0.60		0.53	-18 ± 0.2
PEG ₃ -AF-HA	0.60	2.8	3.0	-11 ± 0.7
PEG ₅ -AF-HA	0.60	5.1	5.0	-8.7 ± 0.1
PEG ₉ -AF-HA	0.60	8.7	8.3	-7.0 ± 0.0

4-9. HA への PEG 修飾による血中滞留性の評価

PEG-AF-HA の in vivo ラット静脈内投与後の血中滞留性について評価した結果、HA に PEG を修飾することでその血中滞留性が向上し、PEG 修飾率の増加に伴って血中滞留性も増加することが示された。分布容積を求めたところ、いずれの PEG 化 HA および HA も Wistar ラットの血漿量

0.028 (L/kg)に近い値が得られ、投与初期においては主に血液中に分布することが推察された。PEG 修飾による血中滞留性変化の要因として、分子量の増加、分子表面特性(水和層の形成や表面電位など)の変化が考えられる。

4-10 総括

これらの成果を統合して、完成されたシステムの実現までには至らなかったが、個々の実験結果は、システムを構築するための材料を作成していく上で極めて重要な知見であり、今後の研究において、その発展に寄与するものと確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幸村 友菜、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 ノシル化プロドラッグの調製とそのグルタチオンによる活性化の評価
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 湧真、望月 遥香、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 ポリエチレングリコール修飾ヒアルロン酸の調製と血中滞留性の評価
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸村 友菜、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 グルタチオン応答開裂性ノシル化ドキソルピシンの活性化とDNAとの相互作用の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 智宏、幸村 友菜、関 俊暢
2. 発表標題 ノシル化ドキソルピシンのグルタチオン応答活性化とDNAとの相互作用の評価
3. 学会等名 遺伝子デリバリー研究会 第21回シンポジウム、第20回夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幸村 友菜、関 智宏、関 俊暢
2. 発表標題 ヒアルロン酸をナノキャリアとするグルタチオン応答ノシル化ドキソルピシンの活性化評価
3. 学会等名 第27回創剤フォーラム若手研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------