

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670085

研究課題名(和文) 悪性腫瘍の骨転移制御を目的とした抗がん剤の革新的骨髄デリバリーシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of an Innovative Bone Marrow Delivery System of Anticancer Drug for Control of Malignant Tumors' Bone Metastasis

研究代表者

小田切 優樹 (OTAGIRI, Masaki)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80120145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄指向性リポソームを担体とした抗がん剤のデリバリーシステムの構築と悪性腫瘍の骨転移治療への臨床応用を最終目標に、骨髄指向性リポソームへの薬剤の封入と、その物性および薬効評価、加えて動態特性を調べた。すなわち、エリスロポエチン(EPO)の作用部位である骨髄への効率的・選択的なデリバリーを可能とするため、リポソーム-EPO製剤を作製し、その製剤特性、骨髄移行性および造血効果について調べ、EPO単独では有効な効果は認められないものの、リポソーム製剤では著明な改善効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research aims to construct an anticancer drug delivery system using bone marrow-directed liposome as a carrier, and explore its clinical application in malignant tumors' bone metastasis treatment. The drug was incorporated in the bone marrow directed liposome for physicochemical, pharmacological efficacy and pharmacokinetic properties examinations. As such, erythropoietin (EPO) liposome was produced to effectively and selectively deliver EPO to its site of action in bone marrow. The formulation characteristics, transferability to bone marrow, and hematopoietic effect were being examined. In comparison to EPO alone which did not demonstrate any desirable effects, liposome formulation was found to have produced significant site directed delivery improvement effect.

研究分野：薬物動態学、DDS

キーワード：アルブミン リポソーム 骨髄指向性 デリバリーシステム 体内動態解析 薬力学的評価 抗がん剤 腫瘍治療効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、がん治療の新たな目標は骨などの遠隔臓器への転移をいかに制御するかにシフトしてきた。骨転移が生じると患者のQOLは著しく低下して死期が早まるため、骨をターゲットとしたがん治療法の開発は緊急かつ最重要課題の一つとして位置付けられている。しかし、現時点では骨転移に有効な治療法は確立されていない。そこで本研究では、画期的な抗がん剤のデリバリーシステムの確立と臨床応用に向けた基盤情報の構築を試みる。

(2) 脂質膜に負電荷りん脂質である L-glutamic acid, N-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester(DHSG) や 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG(5000)(PEG-DSPE)を導入することで高い骨髄への移行性を示す骨髄指向性リポソームに着目した。まず本リポソームの骨髄指向性を確認すべく、腎性貧血治療薬のエリスロポエチン(EPO)を内包させたりポソーム-EPOを作製し安定性や生物活性等を評価した。

2. 研究の目的

(1) 現在、臨床で使用されている抗がん薬の骨移行性が低いという欠点を克服するため、抗がん薬を骨髄指向性リポソームに封入して、画期的な抗がん剤の骨髄デリバリーシステムの確立を試みる。

(2) 骨髄指向性リポソームをキャリアとして用いて、腎性貧血治療薬 EPO の作用部位である骨髄へ効率良く送達するための骨髄標的化 EPO 製剤の設計と腎性貧血治療薬としての効果を評価して、本リポソームの骨髄移行性に関する基盤情報を構築する。この知見を基に、骨腫瘍治療薬のデリバリーシステムの応用展開を図る。

3. 研究の方法

(1) Liposome-EPO の 作 製 :

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, cholesterol, L-glutamic acid, N-(3-carboxy-1-oxopropyl)-,

1,5-dihexadecyl ester および 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG を EPO 溶液で穏やかにミキサーで攪拌し、分散液をエクストルーダーに導入し、メンブレンフィルターから加圧で押出して調製した。フリーの EPO を遠心分離によって除去した。調製したリポソームは粒子系やゼータ電位などの物性を評価し、また EPO 濃度は ELISA 法により確認した。

(2) EPO 生物活性は、コロニーアッセイ用培地にヒト骨髄由来 CD34 細胞に EPO あるいは Liposome-EPO 溶液を加え、後期赤芽球系前駆細胞あるいは後期赤芽球系前駆細胞のコロニー数を計測して評価した。赤球形造血作用は、赤球形数・ヘモグロビン値により評価した。

(3) ウサギにおける骨髄分布：ウサギにリポソームあるいは EPO 単独を静注後、ウサギの大腿骨を摘出して大腿骨の骨髄を単離した。固定した骨髄は組織標本システムにより蛍光免疫染色により評価した。

(4) Octadecyl RhodamineB で標識したリポソーム-EPO を作製して、ウサギ骨髄由来マクロファージ細胞への取り込みを評価した。加えて、フローサイトメトリーによる評価も行った。

4. 研究成果

本研究で得られた知見を要約する。

(1) エクストルージョン法により調製した Liposome-EPO に内包された rHuEPO の生物活性をコロニーアッセイ法により解析した結果、リポソーム化による rHuEPO の生物活性の変化は認められず、EPO は生物活性を保持していることが明らかになった。

(2) 健常ウサギに Liposome-EPO を単回投与し、造血効果を rHuEPO 単独投与と比較検討したところ、Liposome-EPO は

rHuEPO 単独投与では薬理効果を示さない rHuEPO 量 (69IU/kg) でも造血作用を發揮すること、また EPO による造血活性は少なくとも投与後 7 日目まで持続することが明らかになった。さらに、Liposome-EPO 投与後 6 時間後の rHuEPO 骨髄分布量は、rHuEPO 単独投与群と比較して、明らかに増大した。

(3) ウサギに Cisplatin (0.5mg/kg/day) を 9 日間静脈内投与することで、腎障害の誘発及び赤血球数とヘモグロビン値の低下が観察された。また、本モデルにおける貧血は赤血球指数により正球性正色素性貧血であることが確認され、慢性貧血病態モデルの作成に成功した。作成した腎性貧血モデルウサギに対する貧血改善効果を Liposome-EPO と rHuEPO 投与群で比較検討したところ、Liposome-EPO は rHuEPO 単独投与では貧血改善効果を示さない rHuEPO 量 (69IU/kg) で貧血を改善することが明らかになった。

(4) R18-Liposome-EPO のウサギ骨髄由来マクロファージ (BMDM ϕ) 細胞への取り込み実験を行ったところ、R18-Liposome-EPO は骨髄細胞と比較し BMDM 細胞により選択的かつ能動的に取り込まれていることが明らかとなった。このことから、Liposome-EPO の骨髄指向性に対する骨髄マクロファージの寄与が示唆された。

得られた結果から、本研究で作製した Liposome-EPO は骨髄マクロファージへの取り組み過程を介した優れた骨髄移行性により、従来の rHuEPO 単独投与では薬理効果を示さない低用量で貧血改善効果を發揮することが明らかとなった。この 2 年間は、EPO の作用部位として骨髄への薬物送達を試みてきたが、そもそも骨髄は赤球形新生の場としての以外にも、白血形、血小板等の産生を含む様々機能を担っている。したがって、本リポソームに抗がん剤を内包させること

ができれば、未だ有効な治療法が存在しない悪性腫瘍の骨転移や骨髄関連がんに対する治療への応用も期待できる。

しかし、当初の目標である薬物結合能に優れた血清アルブミンとリポソームを融合する DDS 製剤については、残念ながら期間中には成果を生み出すことはできなかったが、目下、この DDS 製剤についても鋭意努力中であり、来春、横浜で開催される日本薬学会 136 年会において口頭発表する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 39 件)

Taguchi K, Chuang VTG, Yamasaki K, Urata Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, Otagiri M. Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma retaining-agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *J Pharm Pharmacol*. 67:255-63. (2015), 査読有, doi: 10.1111/jphp.12338

Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Therapeutic Impact of Human Serum Albumin-Thioredoxin Fusion Protein on Influenza Virus-Induced Lung Injury Mice. *Front Immunol*. 5:561. (2014), 査読有, doi: 10.3389/fimmu.2014.00561.

Miyazaki Y, Taguchi K, Sou K, Watanabe H, Ishima Y, Miyakawa T, Mitsuya H, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Therapeutic impact of erythropoietin-encapsulated liposomes targeted to bone marrow on renal anemia. *Mol Pharm*. 11:4238-48. (2014), 査読有, doi:

10.1021/mp500453a

Ishima Y, Fang J, Kragh-Hansen U, Yin H, Liao L, Katayama N, Watanabe H, Kai T, Suenaga A, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Tuning of poly-S-nitrosated human serum albumin as superior antitumor nanomedicine. *J Pharm Sci*. 103:2184-2188. (2014), 査読有, doi: 10.1002/jps.24020.

Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 35:6553-6562. (2014), 査読有, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.049

Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, Chuang VT, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm*. 11:1228-1238. (2014), 査読有, doi: 10.1021/mp400690v

Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1840:1152-1162. (2014), 査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.007

Ishima Y, Kragh-Hansen U,

Maruyama T, Otagiri M. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int*. 2013:353892. (2013), 査読有, doi: 10.1155/2013/353892

Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, and Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1830:5465-5472. (2013), 査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.036

Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, and Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*. 1830:5435-5443.(2013), 査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005.

Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, and Otagiri M. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1830:2917-23. (2013), 査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.006.

〔学会発表〕(計 61 件)

田口 和明、腎疾患時におけるアルブミンダイマーの体内動態評価、日本薬学会第 135 年会、2015/3/25-28、神戸学院大学・兵庫医療大学ほか(兵庫県神戸市)
小田切優樹、ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性・有用性評価と DDS への応用、第 52 回日本人工臓器学会大会、2014/10/17-19、京王プラザホテル札幌(北海道札幌市)

Masaki Otagiri, Therapeutic Applications of Albumin-Thioredoxin Fusion Protein, 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses in collaboration with ACS Lille, 2014/9/7-10, Lille(France)

木下 遼、新規 EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーは Doxil の抗腫瘍効果を向上する、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014/7/30-31、慶應義塾大学薬学部共立キャンパス (東京都港区)

異島 優、PEG 化や 2 量体化により増強する S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの抗腫瘍活性、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014/7/30-31、慶應義塾大学薬学部共立キャンパス (東京都港区)

M.Otagiri, Pharmacokinetics of serum albumin variants, Innovation workshop on Albumin: The next generation protein therapeutics 2014, 2014/7/12, Chicago(USA)

田中 遼大、インフルエンザ肺炎に対するヒト血清アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有効性評価、日本薬剤学会第 29 年会、2014/5/20-22、大宮ソニックシティビル (埼玉県大宮市)

異島優、インフルエンザ肺炎モデルマウスに対するヒト血清アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価、日本薬学会第 134 年会、2014/3/27-30、熊本大学 (熊本県熊本市)

Taguchi K, Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate, The XIVth International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics, 2013/10/20-21,

Chengdu(China)

Ryota Tanaka, THERAPEUTIC IMPACT OF HUMAN SERUM ALBUMIN-THIOREDOXIN FUSION PROTEIN, LONG-ACTING ANTI-OXIDATIVE AND ANTI-INFLAMMATORY

MODULATOR, AGAINST ACETAMINOPHEN-INDUCED ACUTE LIVER FAILURE, 日本薬物動態学会 第 28 回年会, 2013/10/9-11, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

Yu Ishima, Poly-S-nitrosated Human Serum Albumin inhibits the Expression of P-glycoprotein Transporter in Human Multidrug-resistant Tumor, the 5th Asian Arden conference, 2013/8/6-7, Aichi Gakuin University(愛知県日進市)

Masaki Otagiri, Albumin-Thioredoxin Fusion Protein is Effective in Suppressing Lung Injury, 9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2013/5/11-14, Orlando (USA)

Masaki Otagiri, Development of recombinant serum albumin, The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European association for the study of the liver, 2013/4/24-28, Amsterdam (Holland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田切 優樹 (OTAGIRI Masaki)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号：80120145

(2) 研究分担者

丸山 徹 (MARUYAMA Toru)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：90423657

渡邊 博志 (WATANABE Hiroshi)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：70398220