

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860113

研究課題名(和文) 生体吸収性高分子材料を用いたハイブリッドペプチドの徐放性注射剤の開発

研究課題名(英文) Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by complexation with high molecular weight biodegradable polymers

研究代表者

高娃 阿栄 (Gaowa, Arong)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50643805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR2R-lyticハイブリッドペプチドを全身投与後血中で長時間安定に存在させ抗腫瘍効果を増強させるために、生体吸収性高分子材料を用いハイブリッドペプチドの徐放性製剤を作製した。in vitro においてペプチドが時間経過とともに複合体から徐々に放出されることが確認され、in vivoにおいてペプチド単体と比べ、複合体ではペプチドの腫瘍組織への到達量増加並びに抗腫瘍効果増強が認められ、さらにペプチドの血中濃度-時間曲線下面積(AUC)の増大及び半減期(T1/2)の延長が確認された。

研究成果の概要(英文)：To improve the pharmacokinetics and anti-tumor activity of EGFR2R-lytic hybrid peptide after intravenous injection, we prepared a high molecular weight biodegradable polymer as delivery system for controlled release of the peptide. In vitro release studies confirmed that the hybrid peptide was released from the complex in a sustained manner. In vivo release studies indicated that the anti-tumor activity of the complex was more effective than that of peptide treatment alone, and high tumor accumulation of the peptide was observed in the mice treated with the complex. Furthermore, the plasma area under the concentration curve (AUC) and half-life (T1/2) values of the complex were higher than those of the peptide treatment alone, respectively.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 DDS ペプチド 動態

1. 研究開始当初の背景

上皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)はヒト種々の癌細胞において高発現が認められ、EGFR をターゲットした分子標的がん治療薬剤は近年注目を集めてきた。しかしながら、その多くはタンパク製剤であり高い製造コストと中和抗体産生、さらにEGFR 遺伝子及びその下流の蛋白に変異を起こした癌では治療抵抗性・薬剤耐性などが問題になっている。そこで、私の所属する研究グループにおいてこれらの問題を克服すべく、癌細胞を特異的に攻撃する革新的な分子標的化学合成ペプチドであるハイブリッドペプチドを設計することに成功し、すでに *in vitro* と *in vivo* レベルで癌細胞特異的に殺細胞効果と抗腫瘍効果が得られている。EGFR-lytic ハイブリッドペプチドは細胞の外側から膜を崩壊する溶解性配列 (lytic) とターゲット細胞への選択性を持つ EGFR 結合配列から構成される。さらに、EGFR 結合部位の 2 番目のヒスチジン (H) をアルギニン (R) に置換した EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドでは抗腫瘍効果が増強されることが示された。しかしながら、ペプチド性医薬品は体内動態が不安定であり、半減期が短いという問題がある。EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドも他のペプチドと同様に生体内で有効な血中濃度を長く維持できないため頻回投与が必要で改善しなければならない。

一方、近年進歩が著しいナノテクノロジーを利用した Drug Delivery System(DDS)製剤の開発が活発に行われており、薬物をハイドロゲルやマイクロカプセル中に封入することにより、薬の放出を制御し長期間治療域濃度に保持出来ることが知られている。特にがん治療分野において大きく注目されており、抗がん剤を DDS 製剤化できれば、より薬物量や投与回数を減らし副作用軽減が可能になり、理想的な癌治療法の確立が期待される。そこで、EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの臨床応用に向け、全身投与後血中で長時間安定に存在させ薬効を最大に発揮するために DDS 技術が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、生体適合性が確認されている天然高分子材料を用いハイブリッドペプチドを徐放性製剤化することにより、ペプチドの体内での安定性を向上させ抗腫瘍効果を増強することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放性ハイブリッドペプチド複合体の合成及び精製

EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの lytic 部分はカチオンリッチなため、アニオン化ゼラチン PI 5(等電点 5.0)を用い静電的相互作用を介したペプチド/ゼラチン複合体を

合成し、超遠心分離法により精製した。ゲル浸透クロマトグラフィー(Gel Permeation chromatography, GPC)法により複合体形成を確認し、物理化学の点から光散乱法によりペプチド複合体の粒径・分布と表面電位といった性質評価を行った。

(2) 複合体からのペプチド徐放試験

FITC 蛍光標識したペプチド複合体を用い生体内環境を考慮したウシ胎児血清(FBS)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)溶液中にインキュベートし、アミコンウルトラデバイスを用い複合体から徐放されたペプチドを経時的に回収し、蛍光光度計により得られた蛍光強度から計算することで放出されたペプチド量を評価した。

(3) EGFR 高発現癌細胞に対する殺細胞効果の評価

複合体の癌細胞に対する殺細胞効果は、EGFR 高発現ヒトすい臓がん細胞株 BxPC-3 を用いペプチドまたは複合体処置後 WST-8 アッセイにより生細胞数を測定し、細胞生存率を計算することで評価した。

(4) 皮下移植担がんモデルマウスに対する抗腫瘍効果の評価

本研究における動物実験は、事前に京都大学動物実験委員会による承認を得て行った。Balb/c 系ヌードマウスに BxPC3 細胞を皮下移植し、腫瘍移植日より 5 日後に 1 mg/kg のペプチドまたは複合体投与を開始し、週 3 回、3 週間連続静脈内投与を行った。腫瘍はノギスを用いて測定し、以下の数式を用いて腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times 0.5$$

(5) 静脈内投与後のペプチド体内動態の評価

Balb/c 正常マウスに対し、ATTO-740 蛍光標識したペプチドまたは複合体を 6 nmol 尾静脈内投与し、投与後経時的に採血を行い、IVIS 分子イメージングシステムにより得られた蛍光強度から計算することで血中ペプチド濃度を算出した。

(6) 静脈内投与後のペプチド腫瘍集積性の評価

(4)と同様に作製した BxPC-3 皮下移植担がんモデルマウスの腫瘍が 100-300 mm³ になった段階で ATTO-740 蛍光標識したペプチドまたは複合体を 6 nmol 尾静脈内投与し、IVIS 分子イメージングシステムを用い腫瘍部分の関心領域(ROI)での蛍光強度から計算することでペプチドの腫瘍組織への集積性を評価した。

(7) カルボキシメチルデキストラン(CMD)ポリマーを用いたペプチド封入チオールナノ粒子の調製及び徐放試験

予めシステイン残基(-SH)を導入したハイブリッドペプチドを用いチオール化したCMD (CMD-SH)とのS-S架橋を介したCMD-s-s-peptide複合体を作製し、超遠心分離法により精製した。CMD-s-s-peptide複合体をグルタチオン還元処理し、吸光度計により得られた280 nmの吸収測定値から計算することで放出されたペプチド量を評価した。CMD-s-s-peptide複合体の殺細胞効果、抗腫瘍効果並びに血中安定性、腫瘍内集積性評価は上の(3)~(6)と同様に行った。

4. 研究成果

(1) ゼラチンハイドロゲルを用いたペプチド/ゼラチン複合体の作製及び性質特性

GPCカラムを用い分子量分布を分析した結果、ペプチドの溶出時間がペプチド/ゼラチン複合体ではペプチド単体より早く、複合体が形成されていること確認された。また、光散乱法により複合体はマイナス電荷を持つ100 nm以下の小さい粒径の安定した注射可能な製剤であることが示された。

(2) 複合体からのペプチドの徐放及びEGFR高発現ヒトすい臓癌細胞株BxPC-3に対する殺細胞効果

ペプチドがペプチド/ゼラチン複合体からFBS濃度依存的、時間依存的に放出されることが確認された(図1A)。さらに、複合体のBxPC-3細胞に対する殺細胞効果は放出されるペプチド量に制御されていることが示された(図1B)。

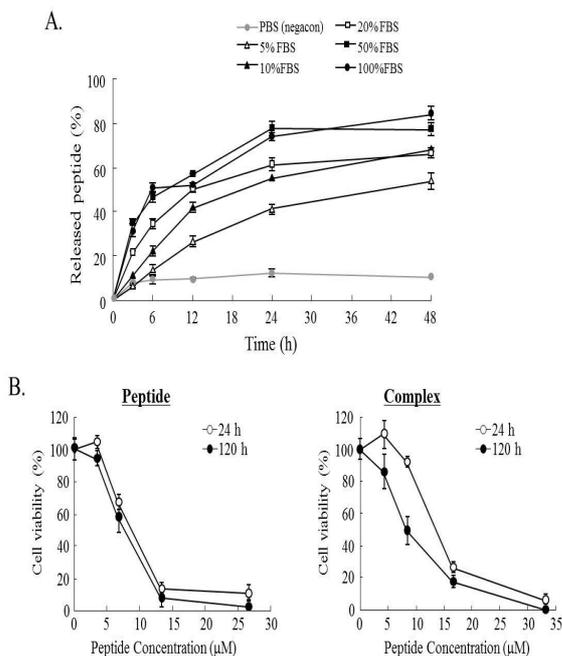


図1. In vitroにおけるペプチド/ゼラチン複合体からのペプチド徐放プロファイル(A)及びBxPC-3癌細胞に対する殺細胞効果(B)。

(3) 複合体のBxPC-3皮下移植担癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果増強

生理食塩水を投与したコントロール群と比べ、ペプチド単体及び複合体投与群では有意な腫瘍抑制効果が認められ、さらにペプチド単体投与群と比べ、複合体投与群では腫瘍体積が小さく、抗腫瘍効果が増強されていることが確認された(図2)。

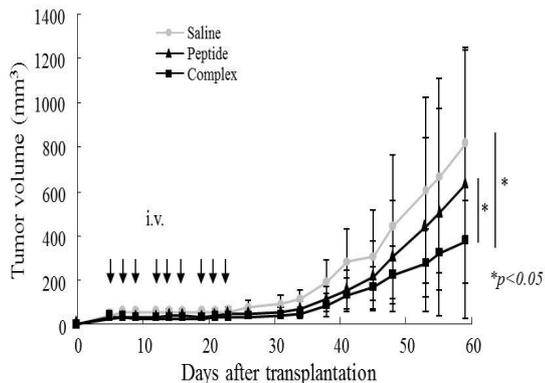


図2. In vivoにおけるペプチド/ゼラチン複合体のBxPC-3皮下移植担癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果。i.v.は静脈内投与を示す。

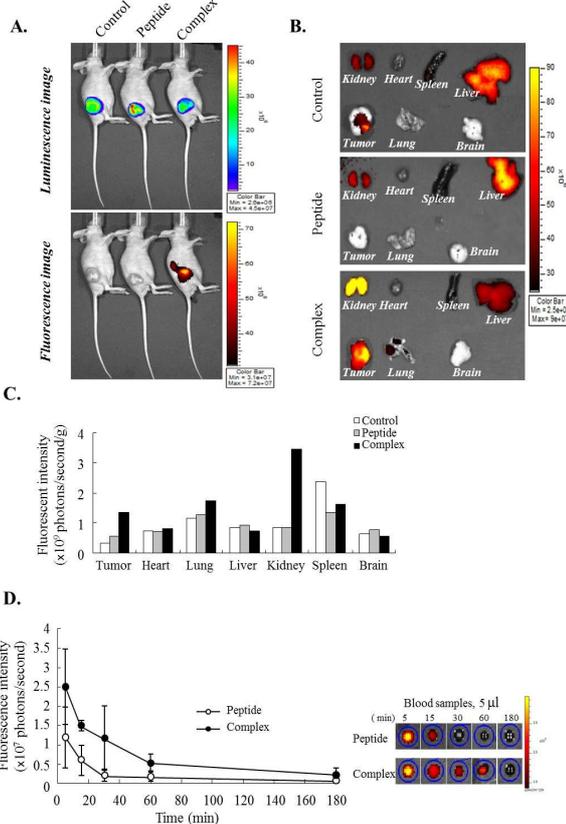


図3. In vivoにおけるIVIS分子イメージング法によるペプチド/ゼラチン複合体の臓器分布評価(A-C)及び血中動態評価(D)。Aの上段グラフはルシフェラーゼ(Luc)を安定発現させた細胞株BxPC-3-Lucを皮下移植した担癌モデルマウスにD-ルシフェリン基質を腹腔内投与後、IVIS発光イメージングによる腫瘍組織を示し、下段グラフは蛍光イメージングによる蛍光標識したペプチド及び複合体の腫瘍組織への集積を示す。ControlはATTO-740蛍光色素投与のみを示す。

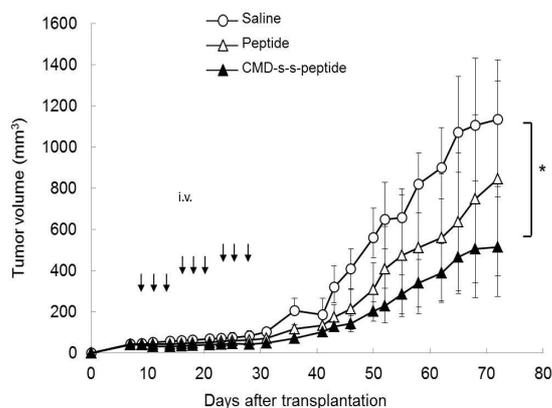
(4) 複合体投与による腫瘍組織へのペプチド到達量増加

IVIS を用いた生体イメージング法により ATTO-740 蛍光色素投与のみ (Control) 及び ATTO-740 蛍光標識したペプチド投与マウスと比べ、ATTO-740 蛍光標識したペプチド複合体投与マウスの腫瘍組織に強い蛍光シグナルが観察された (図 3A の下グラフ)。さらに、生体外イメージングの結果、複合体投与したマウスの肝臓組織では蛍光強度が低く、腫瘍組織では高い蛍光シグナルが観察され、複合体投与によりペプチドの組織分布が肝臓で減少するに對し腫瘍部位への移行性が上昇することが確認された (図 3B 及び C)。

(5) 複合体投与によるペプチド血中動態改善

ATTO-740 蛍光標識したペプチド単体投与では血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) が $62.8 \pm 8.3 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ 、半減期 ($t_{1/2}$) が約 $9.4 \pm 1.5 \text{ min}$ に対し、複合体では AUC が $232.3 \pm 75.7 \mu\text{M} \cdot \text{min}$ 、 $t_{1/2}$ が約 $19.3 \pm 2.9 \text{ min}$ を示し、複合体ではペプチドの血中滞留性が改善されていることが確認された (図 3D)。

A.



B.

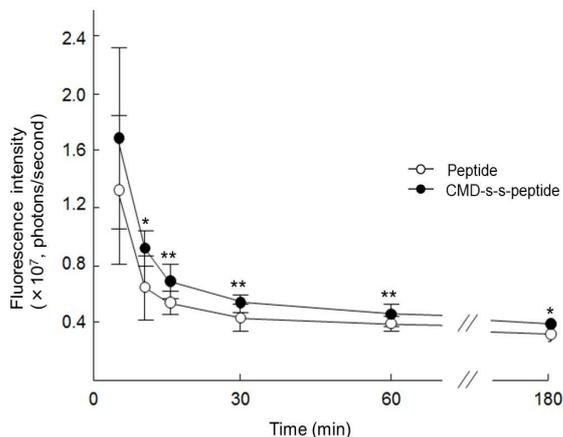


図 4. In vivo における CMD-s-s-peptide 複合体の BxPC-3 皮下移植担癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果(A)及び血中動態(B)。i.v.は静脈内投与を示す。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

(6) カルボキシメチルデキストランポリマーを用いたハイブリッドペプチドの徐放性製剤の検討

チオール化カルボキシメチルデキストランとシステイン残基導入した EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドのシステイン同士の S-S 架橋を介した CMD-s-s-peptide 複合体は in vitro において、生体内を考慮した細胞内レベルのグルタチオンに還元され、ペプチドが放出されることが確認された。In vivo において、ペプチド単体と比べ、CMD-s-s-peptide 複合体ではペプチドの血中半減期の延長、腫瘍集積性の改善並びに抗腫瘍効果の増強が確認され (図 4)。チオールナノ粒子はゼラチンハイドロゲルと同様にペプチドの抗腫瘍効果を向上させるためのキャリアーとして有用であることが示唆された。

以上の結果から、ハイブリッドペプチドを高分子材料ゼラチンハイドロゲルまたはカルボキシメチルデキストランポリマーと組み合わせ徐放性製剤化することにより、ペプチドの血中での安定性を向上させ、抗腫瘍効果を増強することが出来た。これらの知見は、ハイブリッドペプチドの臨床応用に向けて、最適な治療方針に資する情報を提供するものと考えられる。

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 2 件)

1. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Sato, K., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., Kawakami, K.

Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity in vivo.

J Control Release 176, 1-7, 2014.

DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.12.021.

2. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., Kawakami, K.

Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide in conjugation with carboxymethyl dextran via disulfide linkers.

Eur J Pharm Biopharm. 92, 228-236, 2015.

DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.015

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 阿榮 高娃、堀部 智久、川上 浩司
生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた EGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの徐放化による体内動態の改善

第 17 回日本がん分子標的治療学会 (2013 年 6 月 12 日 - 2013 年 6 月 14 日 国立京都国際

会館)

2. 阿栄 高娃、堀部 智久、河野 雅之、佐藤 圭祐、田畑 泰彦、原田 浩、川上 浩司

ゼラチンハイドロゲルを用いたEGFR2R-lytic ハイブリッドペプチドの徐放性注射剤の開発

第 29 回日本 DDS 学会(2013 年 7 月 4 日 - 2013 年 7 月 5 日京都テルサ)

3. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Sato, K., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., and Kawakami, K.

Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by complexation with biodegradable gelatin hydrogel.

12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2013年12月16日 - 2013年12月20日 Westin Maui Resort& Spa, Lahaina, Maui, Hawaii)

4. Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., and Kawakami, K.

Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by conjugation with thiolated carboxymethyl dextran via disulfide linkers.

41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2014年7月13日 - 2014年7月16日 The Hilton Chicago, Chicago, Illinois, U.S.A)

5. 阿栄 高娃、堀部 智久、河野 雅之、田畑 泰彦、原田 浩、平岡 眞寛、川上 浩司

チオール化カルボキシメチルデキストランとのS-S結合によるEGFR2R-lyticハイブリッドペプチドの抗腫瘍効果の増強

第 30 回日本 DDS 学会学術集会 (2014 年 7 月 30 日 - 2014 年 7 月 31 日慶應義塾大学 薬学部 芝共立キャンパス)

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿栄 高娃 (ARONG GAOWA)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50643805

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

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

原田 浩 (HARADA HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号：80362531