

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860118

研究課題名(和文)腫瘍移行制御特性を有するSNO-アルブミン二量体による多角的な新規癌治療戦略

研究課題名(英文)S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes

研究代表者

異島 優 (Ishima, Yu)

熊本大学・薬学部・助教

研究者番号：00457590

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)：Enhanced permeability and retention (EPR) 効果を受けるサイズであるヒト血清アルブミン二量体を輸送担体とし、それにNOを付与したNO付加アルブミンダイマー(SNO-HSA Dimer)が、エバンスブルーの集積性の増大(EPR効果の増強)を引き起こすことに成功した。さらに、C26担癌マウスにて、アルブミン結合医薬であるAbraxaneまたはリポソーム製剤であるDoxilとSNO-HSA Dimer併用投与による腫瘍体積変動を評価したところ、いずれも単独投与の2倍以上の抗腫瘍活性の増強が認められ、生体分布の評価でも、腫瘍集積を増強した。

研究成果の概要(英文)：The enhanced permeability and retention (EPR) effect is a unique phenomenon of solid tumors, and it can serve as a basis for the development of macromolecular anticancer therapy. We have previously found that recombinant human serum albumin dimer, and especially its S-nitrosated form (SNO-HSA-Dimer), is an enhancer of the EPR effect. In this study, we investigated the influence of SNO-HSA-Dimer on the anti-tumor effect of two types of macromolecular anti-tumor drugs. In mice having C26 tumors with highly permeable vasculature, SNO-HSA-Dimer increases tumor accumulation of the drugs by a factor 3-4 and thereby their anti-tumor effects. Furthermore, SNO-HSA-Dimer improves the anti-metastatic effects of Doxil and reduces its minor uptake in non-tumorous organs such as liver and kidney. The present findings indicate that SNO-HSA-Dimer is promising for enhancing the EPR effect and consequently the specific, therapeutic effects of macromolecular anticancer drugs.

研究分野：薬剤学

キーワード：ヒト血清アルブミン 一酸化窒素 癌 EPR効果 ドキシル アブラキサン

1. 研究開始当初の背景

近年脚光を浴びているドラッグデリバリーシステム(DDS)は、特に癌治療の領域における新薬開発に必要な不可欠な技術である。例えば、リポソーム製剤やナノ粒子製剤といった高分子抗癌剤は、著しい血管透過性の亢進などが原因で、癌組織における高分子の滞留性が亢進する現象である「EPR効果」を利用した受動的なDDS製剤である。このようなDDS技術は、抗癌剤の腫瘍移行性の増大による「副作用の軽減」といった患者の心身の負担をはじめ、投与量減少による「医療費の削減」といった、患者の経済的な負担軽減にも繋がるため、極めて必要性が高いと考えられる。

実際に、「EPR効果」を利用したDDS製剤の開発は、目覚ましい速度で進んでおり、EPR関連論文数は、すでに8,000報以上にのぼっていることから、国内外含め多くの関心があることが伺える。興味深いことに、EPR効果が発見されるきっかけの1つは、内因的なアルブミン(HSA)の漏出であった。HSAは、血中に最も多量に存在し、66,500の分子量を有し、粒子径は約10nmである。我々は、このHSA分子が腫瘍内に効率的に漏れ出し長時間留まることから、このHSAこそ腫瘍へのDDS担体として最適であるとの着想に至った。さらに内因的なHSAとの差別化を図るため、更なる分子サイズの増大(2量体Dimer化)を行ったところ、HSA Dimerの分子サイズがEPR効果を示す範囲内に位置することから、抗癌剤としての担体として選択した。しかしながら、より優れた次世代型DDS担体の作製するためには、[1]EPR効果を示す分子サイズの担体を作製することだけでは、他の高分子抗癌剤と差別化できないこと、さらに、[2]これまでに蓄積されたデータから、内因的EPR効果を利用して、高分子抗癌剤の集積性は、高くても10%程度にしかすぎず、残りの90%は標的部以外に拡散あるいは代謝されており、内因的なEPR効果を活用した受動的ターゲティングだけで高分子抗癌剤を制御するには限界があることなどが問題点として残されていた。

2. 研究の目的

そこで我々は、EPR効果を示す『HSA Dimer』とEPR効果増強作用を有する『NO』、これらの結合体である『SNO-HSA Dimer』を新たに開発した。これは、シンプルなDDS技術を用いた、極めて多面的な癌治療薬としての可能性を秘めている。そこで、本研究の目的をSNO-HSA Dimerを用いた高分子抗癌剤の腫瘍移行性増大と副作用軽減とし、モデル高分子抗癌剤としてリポソーム製剤であるドキシルとアルブミン製剤であるアブラキサンを選択し、これらの抗癌剤との併用治療を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)組換え型HSAsの作製とそのSNO化

HSA Dimerは、ポリペプチドリンカー(GGGGS)₂で融合したHSAダイマーのcDNAが組み込まれた発現ベクターを *Pichia pastoris*(GS115)に形質転換した。このGS115株をBMGY培地、BMMY培地で培養後、培地上清より60%硫酸分画で濃縮した培地上清を、群アフィニティカラム及び疎水性相互作用クロマトグラフィーによりHSA Dimerの精製を行った。

(2)SNO-HSA Dimerの作製

NO付加部位Cys-34(唯一の遊離型Cys残基)へのSNO化は、DTT処理にて完全にCys-34を還元後、有機ニトロソ化剤(イソamil亜硝酸)反応を緩和な条件下で行い、そのNO抱合率はHPLCで定量した。

(3)SNO-HSA Dimerの体内動態解析

担癌モデルマウスに放射ラベル化(¹¹¹In)したSNO-HSA Dimerを静脈内投与し、その体内動態及び腫瘍蓄積性を検討した。同時に、NOや内封・結合している抗癌剤の血中動態、腫瘍組織蓄積性を評価する。その際、NO濃度測定はNOの酸化物(NO₂⁻、NO₃⁻)を合計して見積もった。

(4)SNO-HSA DimerのEPR増強活性評価

In vivoでのEPR増強活性はエバンスブルー集積性評価、SNO-HSA Dimer併用による高分子抗癌剤の移行性評価により検討した。

エバンスブルー(EB)集積性評価

C26細胞を背部皮下に移植したC26移植担癌マウスに対して、SNO-HSA Dimerを単回投与0-4時間後に、エバンスブルーを投与し、腫瘍部位のエバンスブルー濃度をUV測定した。

SNO-HSA Dimer併用による高分子抗癌剤の移行性評価

C26細胞を背部皮下に移植したC26移植担癌マウスに対して、高分子抗癌剤(ドキシル、アブラキサン)の投与に加え、SNO-HSA Dimerを併用投与し、経時的に腫瘍体積の縮小効果を検討する。具体的には、C26細胞を背部皮下に移植した担癌マウスに対して、SNO-HSA Dimerと併用高分子抗癌剤を投与して、経時的に腫瘍体積の縮小効果を検討した。生存率に関しては、治療開始後30日目まで観察した。

4. 研究成果

(1)SNO-HSA Dimerの体内動態解析

担癌モデルマウスに放射ラベル化(¹¹¹In)したHSA Monomer、HSA DimerやSNO-HSA Monomer、SNO-HSA Dimerを静脈内投与し、その体内動態及び腫瘍蓄積性を検討した結果、

どの群も投与量の 10%以上は集積するものの、二量体化により単量体よりも高い集積性が認められること、さらに、SNO-HSA Dimer では、他の群と比較して有意に高い腫瘍蓄積性が観察され、その蓄積量は投与量の 40%程度にまで達することが観察された (図 1)。

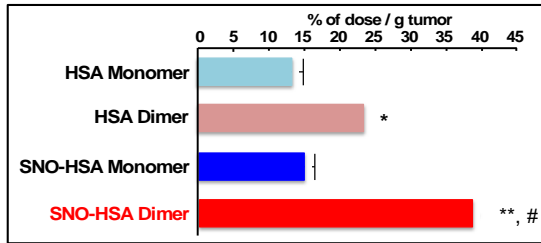


図 1. Tumor accumulation of ¹¹¹In-labeled HSAs with and without S-nitrosation after intravenous administration to C26 tumor-bearing mice at a dose of 1 mg/kg. Results are means \pm SD (n = 4). * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with HSA-Monomer or SNO-HSA Monomer, # P < 0.05 compared with HSA Dimer.

以上の結果から、SNO-HSA Dimer の腫瘍移行性の高さに加え、EPR 増強作用を有することが示唆された。

(2) SNO-HSA Dimer 投与による腫瘍内 EPR 増強時間および部位の解析

まず、腫瘍内の EPR 増強時間および EPR 増強部位の範囲を評価すべく、エバンスブルー (EB) の集積性評価を行った。マウスの背中側に C26 大腸癌細胞を皮下投与した担癌モデルを作成し、EB 色素単独投与および、SNO-HSA Dimer 併用投与時における EB の腫瘍集積性および腫瘍内局在量を測定した。併用投与群に関して、SNO-HSA Dimer 投与後 0.5、1、2、3、4 時間後に EB を投与した (図 2)。

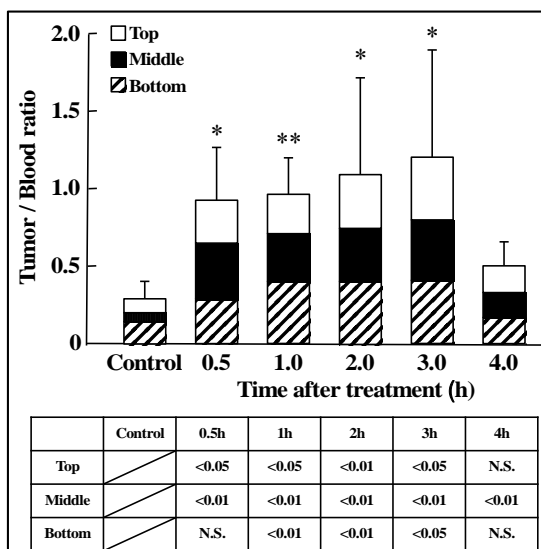


図 2. Extravasation of Evans blue induced by SNO-HSA Dimer in various section of solid tumor. SNO-HSA-Dimer (1.3 μ mol NO/kg) was injected intravenously into C26-bearing mice. Evans blue dye was injected i.v. at a dose of 10

mg/kg into three of the six groups of the tumor-bearing mice at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h after administration of SNO-HSA-Dimer. Twenty-four hours later, the top (nearest from blood vessel), middle, and bottom (furthest from blood vessel) sections of tumor tissues were assessed. Blood concentrations of Evans blue in the mice were also assessed as reference. Results are means \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control.

腫瘍集積性に関しては、EB の組織/血漿濃度比により評価し、腫瘍内局在量に関しては、腫瘍組織を血管側から上部 (Top)、中部 (Middle)、下部 (Bottom) に 3 等分し、それぞれの部位の EB 濃度を算出し評価した。その結果、EB 単独投与と比較して、SNO-HSA Dimer との併用投与は、EB の腫瘍集積性を向上させ、その効果は SNO-HSA Dimer 投与後 0.5 時間から増強が観察され、投与後 2 時間においてピークに達し、その後 EPR 効果は、コントロールレベルへ戻ることが判明した。この結果から、SNO-HSA Dimer による EPR 増強作用は SNO-HSA Dimer 投与後 1-3 時間に強く観察され、その効果は一過性であることが示唆された。

(3) SNO-HSA Dimer 併用による高分子抗癌剤の移行性評価

まず、リポソーム製剤であるドキシルの治療効果における SNO-HSA Dimer の影響を評価すべく、C26 担癌マウスにおいて、SNO-HSA Dimer 及びドキシルの投与後における腫瘍体積を経日的に測定した。C26 担癌マウスにて、Control 群、ドキシル単独投与群 (2.0 or 4.5 (ドキソルピシン) mg/kg) および SNO-HSA Dimer+ドキシル併用投与群の 5 群に分けて、ドキシルや SNO-HSA Dimer の投与は、週に 1 回の計 3 回行った。その結果、低投与量のドキシル (2.0 (ドキソルピシン) mg/kg) を用いた治療において、ドキシル単独投与群と比べ、SNO-HSA Dimer との併用投与群において有意な腫瘍体積増加の抑制効果が確認された (図 3)。

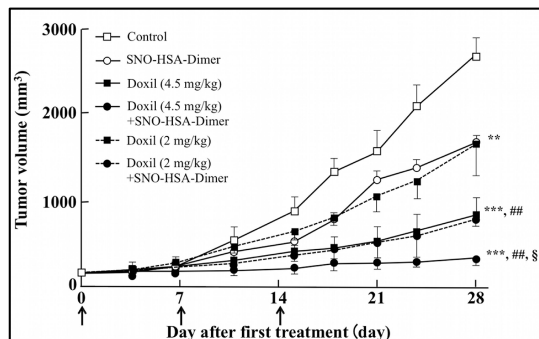


図 3. Antitumor activity of Doxil, without or with SNO-HSA-Dimer, in C26 tumor-bearing mice. Changes in tumor growth were measured in C26 tumor-bearing mice as a function of time

(days). The mice were divided into cohorts (n = 4-5) and treated i.v. with saline (control), Doxil (2.0 or 4.5 mg (DOX)/kg), SNO-HSA-Dimer (1.3 μ mol NO/kg) or Doxil combined with SNO-HSA-Dimer on day 0, 7 and 14 and then followed for 14 days. The arrows indicate days of treatment. Results are means \pm SD. **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with control, ##P < 0.01, as compared with Doxil (2 mg/kg), §P < 0.01, as compared with Doxil (4.5 mg/kg).

EPR 効果の指標として使用した EB 法は、色素である EB が、血中のアルブミンと強力に結合し、見かけ上分子量約 7 万という高分子として挙動することで、EPR 効果や炎症などにより透過性が亢進した血管のみから漏出するという原理を利用している。すなわち、内因的な HSA の腫瘍への集積性が SNO-HSA Dimer により向上していることを示すものである。このことから我々は、HSA を DDS 担体として用いている抗癌剤においても同等の効果が得られるのではないかと仮説立てた。このことを実証すべく、すでに上市されているアルブミン結合型抗癌剤であるアブラキサンを用い、その抗腫瘍活性へ及ぼす SNO-HSA Dimer の併用効果の影響を検討した。このアブラキサンは、HSA にパクリタキセルを結合させナノ粒子化したパクリタキセル製剤である。ナノ粒子化されているものの、EPR 効果を企図した設計ではなく、水に極めて難溶性のパクリタキセルを HSA に結合させ、凍結乾燥製剤化したことにより、従来のパクリタキセル製剤の溶媒であるポリオキシエチレンヒマシ油やエタノールを使わず、生理食塩液で懸濁し投与することが可能となった製剤である。このアブラキサンを用いて、C26 担癌モデルにて、Control 群、アブラキサン単独投与群および SNO-HSA Dimer+アブラキサン併用投与群の 3 群に分けて治療を行い、腫瘍体積を経日的に測定した。その結果、腫瘍体積の変動については、アブラキサン単独投与群と比較して、SNO-HSA Dimer との併用投与群において腫瘍増殖を有意に抑制していた。

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 19 件)

1. Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy through the generation of nitric oxide. *Cancer Sci.* (査読有) 2015 106:194-200, doi: 10.1111/cas.12577.
2. 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.* (査読有) 2014 103:2184-8, doi: 10.1002/jps.24020.

3. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* (査読有) 2014 9:e85216, doi: 10.1371/journal.pone.0085216.
4. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide.* (査読有) 2013 30:36-42, doi: 10.1016/j.niox.2013.01.004.
5. Ishima Y, Minomo A, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, 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.* (査読有) 2013 1830:2917-23, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.006.

[学会発表](計 15 件)

1. 異島 優, ドラッグデリバリーシステム担体としてのヒト血清アルブミン, 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28「神戸学院大学(兵庫県, 神戸)」
2. 異島 優, ペバシズマブの抗腫瘍活性に及ぼす Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの併用効果, 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28「神戸学院大学(兵庫県, 神戸)」
3. 異島 優, 血清アルブミンを基盤とした一酸化窒素デリバリーシステムの創製と癌治療や虚血性疾患への応用 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(東京都, 港区)」
4. 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(東京都, 港区)」
5. 異島 優, NO 付加型ヒト血清アルブミンの臨床応用へのアプローチ, 第 14 回 日本 NO 学会学術集会 2014/5/16-17「ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県, 佐賀市)」

[図書](計 2 件)

1. 異島 優(分担): 赤池 孝章, 末松 誠(編) 医学のあゆみ 活性酸素-基礎から病態解明・制御まで vol. 247, No7, 医歯薬出版(2013): pp907-913.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：抗癌剤

発明者：小田切 優樹、異島 優、渡邊 博志、丸山 徹

権利者：ニプロ株式会社

種類：実用新案権

番号：特願 2011-208085

出願年月日：平成 23 年 9 月 22 日

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

6．研究組織

(1)研究代表者

異島 優 (Ishima Yu)

熊本大学・薬学部・助教

研究者番号：00457590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし