

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25242046

研究課題名(和文) 癌指向性を有する難水溶性薬剤内包タンパク質ナノカプセルの開発とDDSへの応用

研究課題名(英文) Development of poorly water-soluble drug encapsulated protein nanocapsule possessing cancer directivity and application to DDS

研究代表者

乾 隆 (Inui, Takashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：80352912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素(L-PGDS)のC末端に腫瘍認識ペプチドCRGDKを付加したL-PGDS-CRGDKを作製した。また、L-PGDS-CRGDKを蛍光試薬Cyto 750でラベルし、前立腺癌細胞を移植した担癌ヌードマウス尾静脈に投与後、in vivoイメージングシステムを用いて体内代謝を調べたところ、投与後30分から5時間においてL-PGDS-CRGDKの癌組織への一過性集積が観測された。さらに、L-PGDSの薬剤結合キャビティー上部にジスルフィド結合を導入した酸化還元応答型カプセルを作製した。本カプセルの酸化・還元処理により、ジスルフィド結合の形成・開裂が確認された。

研究成果の概要(英文)：We introduced CRGDK peptide, a tumor recognition peptide, at a C-terminal region of lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS). L-PGDS-CRGDK labeled with a fluorescent reagent Cyto 750 was administered intravenously to human prostate cancer cells-bearing nude mice, and the metabolic disposition of L-PGDS-CRGDK was investigated using in vivo imaging system, resulting that a transient accumulation of L-PGDS-CRGDK to the cancer tissues was observed after 30 min to 5 h of the administration. Furthermore, we generated L-PGDS-based redox sensitive protein capsules by introducing a disulfide bond into the upper part of the drug-binding cavity of L-PGDS. The disulfide bond in capsules was opened and closed in an oxidation-reduction environment, suggesting that the capsules could be used as a drug delivery vehicle with drug controlled-release property.

研究分野：蛋白質科学、薬理学、構造生物学、生化学

キーワード：DDS 難水溶性薬剤 タンパク質ナノカプセル 癌指向性 生体内輸送蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 医薬品に対する安全性が厳しく求められているために、創薬現場では高度なバイオサイエンス技術が要求され、新薬開発コストの急騰を招いている。一方、薬剤が難水溶性であることや、薬剤溶解度向上を図るための化学修飾により活性が低下し開発中止になった医薬候補化合物を復活させる動きが世界的に始まっている。現在、これらのニーズを実現させるために、リポソーム(Pharm. Res., 27, 1171-1183, 2010)、高分子ミセル(Biomaterials, 32, 5505-5514, 2011)、抗体結合型医薬(J. Control. Release, 161, 422-428, 2012)などを利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が全世界で精力的に行われている。しかし、輸送体の大量調製、薬物選択性、および輸送体自身の毒性などの課題が山積され、我が国における DDS 医薬品の承認数は極めて少ない。

(2) そこで、本課題では、難水溶性抗癌剤の可溶化能、癌集積効果を有するペプチド導入による標的指向性、且つ癌細胞における薬剤放出機能を併せ持つ新規タンパク質ナノカプセルを作製し、副作用の少ない癌ターゲット DDS に応用する。カプセルの鋳型タンパク質として、遺伝子組換えにより酵素活性を失活させたりポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS, 図1)を用いる。

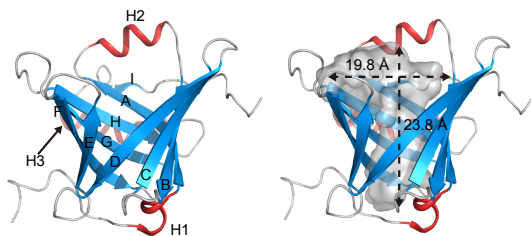


図1 L-PGDS の構造

研究代表者は、これまでに多次元 NMR 法、SPRING-8 放射光利用による X 線小角散乱法、および等温滴定熱量測定法(ITC)により、マウスやヒト型 L-PGDS を用いて、疎水性低分子との複合体の構造解析や相互作用解析を行い、L-PGDS がβ-バレル(樽型)構造を有し、バレル内部の疎水性ポケットが、他のリポカリンファミリータンパク質と比べて最も大きく(図1右 幅19.8 Å 深さ23.8 Å)、且つ分子量が200~800程度の疎水性低分子を非選択的に結合することを報告した(Biochem. J., 446, 279-289, 2012, J. Struct. Biol., 169, 209-218, 2010)。また、L-PGDS は非常に柔軟な構造を持ち、疎水性低分子の結合に伴い、その慣性半径が約10%減少しコンパクトになる性質を持つことを示した(J. Biochem., 145, 169-17, 2009)。さらに、L-PGDS は高温条件下でも、疎水性低分子に対して高い結合親和性を有し、熱安定性が高いことも示した(FEBS J., 275, 233-241, 2008)。以上の結果から、本研究代

表者は L-PGDS が「難水溶性薬剤の輸送体」として利用できるのではないかとという発想に至り、「タンパク質を利用した DDS の可能性」についての概念検証を行った。その結果、抗不安薬であるジアゼパムや、虚血性神経細胞死抑制効果を有する NBQX 等の難水溶性薬剤が L-PGDS 存在下、3~7 倍程度可溶化され、且つ *in vivo* で有効な薬理効果を示すことが判明した(J. Control. Release, 159, 143-150, 2012, 特開 2008-120793 号)。さらに、難水溶性抗癌剤である SN-38 を L-PGDS に内包し、癌組織に対する薬剤送達の可能性を調べた。SN-38 は難水溶性のため臨床応用が難しく、誘導体である塩酸イリノテカン(CPT-11)が実臨床に展開され、大腸癌、胃癌、肺癌、卵巣癌、悪性リンパ腫等の治療に用いられている。CPT-11 は、体内で carboxyl esterase (CE) により、SN-38 に変換され抗腫瘍効果を発揮するが、その効果が SN-38 に比べて低いこと、CE 活性に個人差があること、且つ重篤な消化器毒性を引き起こすことから、より効率的で有効な抗腫瘍効果を得るためには、SN-38 の直接利用が望ましい。ITC による先行研究により、L-PGDS と SN-38 との結合親和性 (K_d)、および結合比を求めたところ、 $K_d = 60 \mu\text{M}$ 、および結合比 = 1 : 3 となり、1 分子の L-PGDS に 3 分子の SN-38 が結合することが判明した。

2. 研究の目的

標的受容体や酵素に作用する新規医薬候補化合物の多くは難水溶性であり、臨床応用が困難である。難水溶性ではあるが、優れた薬理効果を発揮する薬剤を標的部位へ適確に輸送することができれば、副作用の少ない治療が可能となり、また投薬に伴う苦痛や投薬回数を減らすことによる患者の QOL 改善が可能となる。本研究では、生体内輸送タンパク質を利用し、「難水溶性抗癌剤の可溶化」、「癌組織に対する標的指向性」、および「癌細胞内での薬剤放出機能」を併せ持つタンパク質ナノカプセルを作製し、*in vivo* における抗癌剤内包カプセルの抗腫瘍効果の評価、および陽電子放射断層画像撮影法(PET)分子イメージング技術を用いた、カプセルの生体内動態の測定を行い、本カプセルの DDS としての有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) L-PGDS を用いた DDS の癌疾患への応用

L-PGDS が難水溶性薬剤であるジアゼパムや NBQX を可溶化し、本薬剤内包 L-PGDS が経口投与および静脈内投与の両投与方法において、高い薬効を示したことから、L-PGDS を用いた難水溶性薬剤に対する DDS の有用性を証明してきた(J. Control. Release, 159, 143-150, 2012)。そこで、本 DDS を癌疾患に対して応用することを目指し、L-PGDS による難水溶性抗癌剤 SN-38 の可溶化効果お

よび癌疾患モデルマウスに対する SN-38 内包 L-PGDS の抗腫瘍効果を調べる。また、癌指向性として、癌細胞表面に高発現する neuropilin-1 受容体を介してキャリアの癌細胞への内在化を亢進する CRGDK ペプチド (Cancer Cell, 16, 510-520, 2009) を利用し、本ペプチドを C 末端に付加した L-PGDS-CRGDK の癌組織への集積性を *in vivo* イメージング法により確認する。さらに、輸送中は薬剤を内包し、標的癌細胞内において薬剤放出を可能にするために、L-PGDS の薬剤結合ポケット入口に酸化還元環境に応答して開閉するジスルフィド結合を導入したタンパク質カプセルを作製し、その機能と有効性について評価する。また、内包した薬剤の体内動態をリアルタイムで調べるために、SN-38 をリード化合物とした PET プローブ化合物の合成を行い、その有効性を評価する。

(2) L-PGDS を新規可溶化剤とした経口固形製剤の開発

L-PGDS による DDS の臨床応用に向け、L-PGDS を難水溶性薬剤に対する新規医療用可溶化剤とした可溶性経口固形製剤の製造法の確立と有用性の評価を行う。モデル薬剤として、降血圧作用を有する難水溶性薬剤 Telmisartan (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) を用いて、噴霧乾燥法により、複合体製剤の作製を行う。また、作製した複合体製剤の胃腸内環境下における薬剤溶出性、および *in vivo* における血清中薬物濃度プロファイルを調べる。

4. 研究成果

(1) 2 mM L-PGDS 存在下における SN-38 溶液中濃度を測定したところ、SN-38 濃度は 1.7 mM となり、PBS 溶液中 (1.5 μ M) と比較して、1,130 倍上昇し、L-PGDS による SN-38 の可溶化に成功した。次に、ヒト大腸癌細胞 Colo201 を右脇腹に皮下投与した大腸癌モデルマウスに対し、SN-38 内包 L-PGDS (1.0, 2.0, 2.8 mg/kg/d), CPT-11 (4.0, 20 mg/kg/d), および PBS を 1 日おきに計 8 回静脈内投与し、抗腫瘍効果を調べた (図 2)。その結果、低濃度の CPT-11 投与群 (4.0 mg/kg/d) では、抗腫瘍効果を示さなかったのに対して、SN-38 内包 L-PGDS 投与群では、PBS 投与群と比較して、有意に腫瘍成長を抑制し、かつ副作用の指標の一つである体重減少を示さなかった。一方、高濃度の CPT-11 (20 mg/kg/d) 投与群では、SN-38 内包 L-PGDS (2.8 mg/kg/d) と同程度の抗腫瘍効果を示したが、副作用の指標の一つである体重減少が観察された。以上より、L-PGDS を用いることにより、難水溶性であることから臨床応用が困難であった抗癌剤 SN-38 の直接利用を可能にした。また、SN-38 内包 L-PGDS は、実臨床で用いられている CPT-11 と比べて、低用量で高い抗腫瘍効果

を示した (PLOS ONE, 10, e0142206, 2015)。

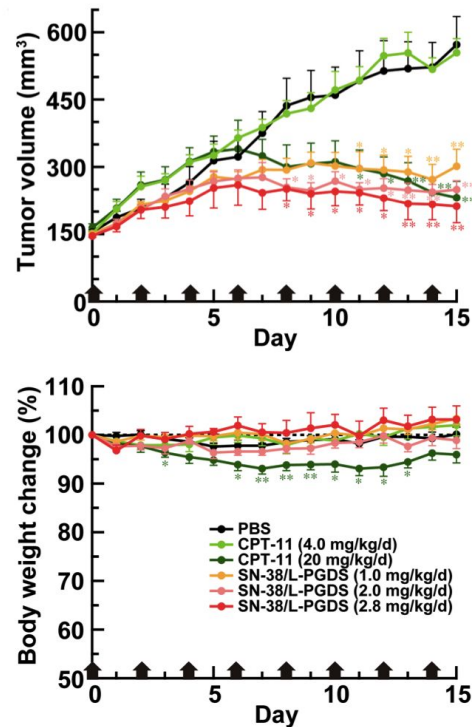


図 2 SN-38 内包 L-PGDS の抗腫瘍効果 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS)

(2) 次に、抗癌剤の癌特異的輸送を可能にするために、癌標的 CRGDK ペプチドを L-PGDS の C 末端に付加した L-PGDS-CRGDK を作製し、ヒト前立腺癌細胞 PC-3 への内在化を共焦点蛍光顕微鏡を用い、*in vitro* において確認した。その結果、PC-3 細胞内において enhanced GFP により標識した L-PGDS-CRGDK の存在が確認され、癌標的ペプチドを付加することにより、L-PGDS は細胞膜を透過することが明らかとなった。次に、*in vivo* において癌組織への集積性を確認するために、PC-3 を右脇腹に皮下投与した前立腺癌モデルマウスに対して、蛍光標識した L-PGDS、および L-PGDS-CRGDK を静脈内投与し、蛍光イメージング装置 IVIS® kinetic を用いて、マウス体内からの蛍光を経時的に測定し癌組織からの蛍光強度を比較したところ、L-PGDS-CRGDK 投与群では、L-PGDS 投与群と比較して、投与 30 分後から投与 5 時間後において、有意に強い蛍光強度が得られ、L-PGDS-CRGDK が癌組織に集積することを明らかにした。

(3) さらに、L-PGDS の立体構造情報を基に、Cys 残基導入部位を決定し、癌細胞内においてのみ薬剤を放出するタンパク質ナノカプセルを 3 種類設計した (図 3)。各カプセルを酸化および還元処理した後、遊離チオール基の定量を行った結果、分子内のジスルフィド結合が形成および開裂することが確認され、酸化還元環境に応答して蓋の開閉が可能で

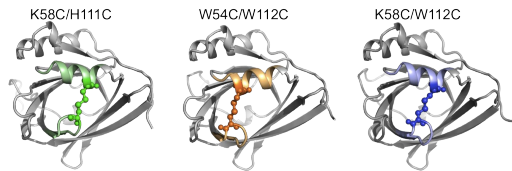


図3 タンパク質ナノカプセルのモデル構造

あることを示した。また, SN-38 の内包化を行った結果, 1 mM カプセル存在下において, PBS 溶液中と比較して, SN-38 濃度が 100-200 倍程度上昇することが明らかとなった。さらに非還元 SDS-PAGE 分析を行ったところ, SN-38 内包カプセルのジスルフィド架橋が形成していることが確認でき, カプセルへの SN-38 の内包化に成功した。

(4) 一方, SN-38 をリード化合物とした PET 化合物の合成を試みた結果, 計 13 種類の新規 SN-38 誘導体の合成に成功し, その中でも 1 種類の SN-38 誘導体については, 18F-標識にも成功した。本誘導体化合物を L-PGDS に内包し, 前立腺癌モデルマウスを用いて抗腫瘍効果を調べた結果, SN-38 内包 L-PGDS と比較して, より少ない投与回数で高い抗腫瘍効果を発揮し, 本誘導体化合物の有効性が示された。以上より, L-PGDS を癌疾患に対して応用することに成功し, 癌標的ペプチドを付加すれば, 癌組織特異的な薬剤輸送が可能であることが示唆された。また, 酸化還元環境に応答して開閉する蓋機能を有したタンパク質ナノカプセルの作製にも成功し, これらの技術と新たに合成に成功した SN-38 誘導体を組み合わせれば, より高い抗腫瘍効果を有する DDS の構築が可能になると考えられる。

(5) 次に, L-PGDS を利用した新規の可溶性経口固形製剤を開発するために, Telmisartan 内包 L-PGDS の噴霧乾燥を行った。得られた複合体製剤の薬剤溶出性を調べたところ, 生体内の pH 範囲 (pH 1.2~6.8) において, 100% の Telmisartan 溶出を示した。また, 生体内における Telmisartan 内包 L-PGDS からの薬物放出メカニズムについて検討するために, プロテアーゼを含む人工胃液, 腸液中での L-PGDS の消化実験を行った (図 4)。その結果, L-PGDS は, ペプシン存在下の胃内環境においてその構造を維持し, Telmisartan を内包したまま複合体として腸内環境に移行した後, パンクレアチンに含まれるプロテアーゼにより速やかに分解され, 薬物を放出することが示唆された。さらに, 本複合体製剤の生体内での挙動を評価するため, 自然発生型高血圧ラットを用いて, 複合体製剤投与後の血清中テルミサルタン濃度の経時的推移を評価したところ, 薬物のみの投与群と比較して, 血清中薬物濃度プロファイルを劇的に改善し, かつ溶解度改善技

術が施されている上市品と同様の結果を示した (図 5)。

以上より, L-PGDS を用いた可溶性経口固形製剤の噴霧乾燥法による製造法の確立に成功し, その有効性を実証した (Eur. J. Pharm. Sci., 74, 77-85, 2015)。

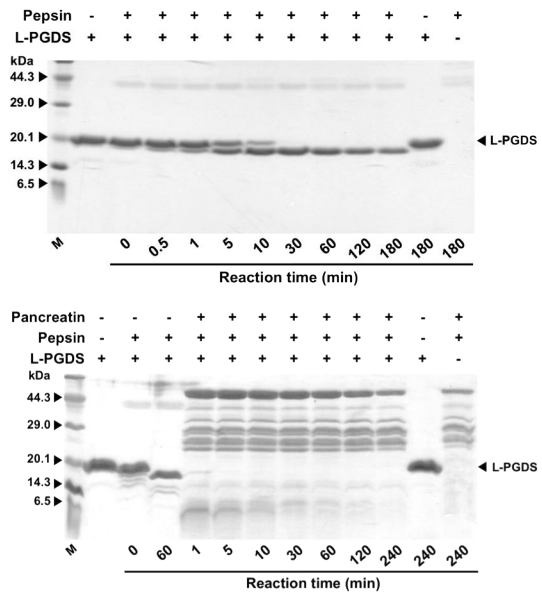


図4 L-PGDS 消化実験

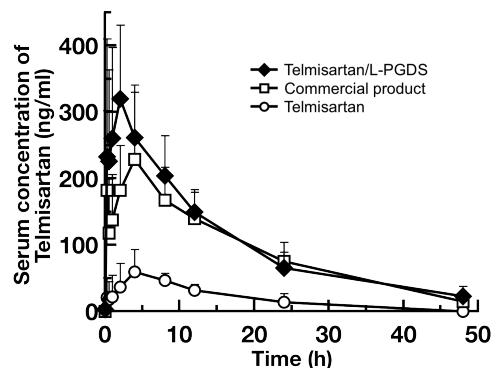


図5 Telmisartan の血清中濃度推移

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

- Mizoguchi, M., Nakatsuji, M., Takano, J., Ishibashi, O., Wada, K., Inui, T. (correspondence author) Development of pH-independent drug release formulation using lipocalin-type prostaglandin D synthase. J. Pharm. Sci., 印刷中, 2016 年. 査読有
- Nakatsuji, M., Inoue, H., Kohno, M., Saito, M., Tsuge, S., Shimizu, S., Ishida, A., Ishibashi, O., Inui, T. (correspondence author) Human Lipocalin-type Prostaglandin D

Synthase-Based Drug Delivery System for Poorly Water-Soluble Anti-Cancer Drug SN-38. PLOS ONE, 10, e0142206, 2015 年. 査読有
Mizoguchi, M., Nakatsuji, M., Inoue, H., Yamaguchi, K., Sakamoto, A., Wada, K., Inui, T. (correspondence author) Novel oral formulation approach for poorly water-soluble drug using lipocalin-type prostaglandin D synthase. Eur. J. Pharm. Sci., 74 巻, 77 頁-85 頁, 2015 年. 査読有
Inui, T., Mase, M., Shirota, R., Nagashima, M., Okada, T., Urade, Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase scavenges biliverdin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J. Cereb. Blood. Flow. Metab., 34 巻, 1558 頁-1567 頁, 2014 年. 査読有
Kume, S., Lee, Y. H., Nakatsuji, M., Teraoka, Y., Yamaguchi, K., Goto, Y., Inui, T. (correspondence author) Fine-tuned broad binding capability of human lipocalin-type prostaglandin D synthase for various small lipophilic ligands. FEBS Lett., 588 巻, 962 頁-969 頁, 2014 年. 査読有
乾 隆, 生体内輸送タンパク質を利用したドラッグデリバリーシステムの開発, 化学と生物, 51 巻, 234 頁-240 頁, 2013 年. 査読有

〔学会発表〕(計 67 件)

乾 隆 「難水溶性薬剤のドラッグレスキューを目指した新規 DDS の開発」, メディカル ジャパン 2016 第 2 回日本医療総合展, 2016 年 2 月 26 日, インテックス大阪 (大阪)
乾 隆 「ドラッグレスキューを目指した新規 DDS の開発」, 日本学術振興会 産学協力研究委員会 回折構造生物 第 169 委員会 第 48 回研究会, 2015 年 11 月 18 日, 関西学院大学 大阪梅田キャンパス (大阪)
Nakatsuji M., Inoue H., Kohno M., Saito M., Tsuge S., Shimizu S., Ishibashi O., Inui T. A novel drug delivery system for poorly water-soluble anti-tumor drug SN-38 utilizing intravital transporter protein. THE 29TH ANNUAL SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY, 2015 年 7 月 22 日, Firade Barcelona (Barcelona, Spain)
Shimizu S., Nakatsuji M., Yamaguchi K., Sano Y., Miyamoto Y., Inui T. Construction of protein capsule

possessing drugs controlled release ability. THE 29TH ANNUAL SYMPOSIUM OF THE PROTEIN SOCIETY, 2015 年 7 月 22 日, Firade Barcelona (Barcelona, Spain)
乾 隆 「癌指向性を有する難水溶性薬剤内包タンパク質ナノカプセルの開発と DDS への応用」, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 2 日, 京王プラザホテル (東京)
清水翔太, 中辻匡俊, 山口桂右, 佐野裕也, 宮本優也, 乾 隆 「薬剤放出制御機能を有するタンパク質ナノカプセルの作製」, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 2 日, 京王プラザホテル (東京)
中辻匡俊, 井上 遥, 河野正樹, 齋藤茉有, 柘植祥吾, 清水翔太, 佐野裕也, 石田敦子, 石橋 宰, 乾 隆 「生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性抗癌剤 SN-38 に対するドラッグデリバリーシステム」, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 2 日, 京王プラザホテル (東京)
寺岡佳晃, 久米慧嗣, 乾 隆 「リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素により溶解可能な難水溶性薬剤の網羅的探索」, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 3 日, 京王プラザホテル (東京)
石田敦子, 中辻匡俊, 福原彩乃, 乾 隆 「難水溶性薬剤に対して結合親和性の異なるキャリア蛋白質の作製」, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 2015 年 7 月 2 日, 京王プラザホテル (東京)
乾 隆 「生体内輸送タンパク質による新規ドラッグデリバリーシステムの開発」, 酵素工学会 第 73 回講演会, 2015 年 4 月 24 日, I-site なんば (大阪)
Nakatsuji M., Inoue H., Kohno M., Saito M., Tsuge S., Shimizu S., Ishibashi O., Inui T. Drug delivery system for poorly water-soluble anti-tumor drug SN-38 utilizing L-PGDS. The 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications, 2014 年 8 月 12 日, Clarion Congress Hotel Prague (Prague, Czech Republic)
Teraoka Y., Kume S., Nakatsuji M., Yamaguchi K., Inui T. Improvement of solubility of poorly water-soluble drugs using lipocalin-type prostaglandin D synthase. The 5th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications, 2014 年 8 月 12 日, Clarion Congress Hotel Prague (Prague, Czech Republic)
中辻匡俊, 井上 遥, 河野正樹, 齋藤茉有, 柘植祥吾, 佐野裕也, 石橋 宰, 乾 隆,

「リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素を用いた難水溶性抗癌剤 SN-38 に対するドラッグデリバリーシステム」, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014 年 7 月 30 日, 慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパス(東京)
中辻匡俊, 河野正樹, 井上 遥, 清水翔太, 石橋 宰, 乾 隆, 「腫瘍標的ペプチド付加リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素を用いた難水溶性抗癌剤 SN-38 に対するドラッグデリバリーシステム」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 26 日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県)
乾 隆, 「生体内輸送タンパク質を利用したドラッグデリバリーシステムの創成」, 生物医工学サロン 2014 年 1 月 22 日, 大阪府立大学(大阪)
Inui T. Development of Drug Delivery System for Poorly Water-soluble Drugs Using Intravital Transporter protein. Synchrotron Radiation in Nanomedicine and Advanced Health Care (SRNAHC), 2014 年 1 月 10 日, 甲南大学 ポートアイランドキャンパス(兵庫)
乾 隆, 「生体内輸送蛋白質による難水溶性薬剤の可溶化と DDS への応用」, BioJapan 2013 World Business Forum, 2013 年 10 月 9-11 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
中辻匡俊, 宮本優也, 福原彩乃, 久米慧嗣, 西村重徳, 吉田卓也, 大久保忠恭, 李 映昊, 後藤祐児, 石橋 宰, 乾 隆, 「変異型リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素とジアゼパムの結合親和性と薬効の関係」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 13 日, とりぎん文化会館(鳥取)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 隆 (INUI Takashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 80352912

(2) 研究分担者

石橋 宰 (ISHIBASHI Osamu)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 70293214

研究分担者

片岡 洋祐 (KATAOKA Yosuke)
理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤
研究センター・チームリーダー
研究者番号: 40291033

研究分担者

土居 久志 (DOI Hisashi)
理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤
研究センター・チームリーダー
研究者番号: 00421818

(3) 連携研究者

中嶋 秀満 (NAKAJIMA Hidemitsu)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 30405360

(4) 研究協力者

和田 耕一 (WADA Koichi)

研究協力者

八木 直人 (YAGI Naoto)

研究協力者

喜田 達也 (KIDA Tatsuya)