

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860031

研究課題名(和文) 癌組織選択的に抗癌剤を持続的に放出する、難治性膵臓癌治療薬の開発と有用性評価

研究課題名(英文) In vivo evaluation of macromolecular antitumor agent, P-THP, in pancreatic cancer

研究代表者

中村 秀明 (NAKAMURA, Hideaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：30435151

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)：ピラルビシン(THP)は他のアントラサイクリン系薬物と比較し高い細胞内取り込み、細胞傷害性を示した。さらにHPMAポリマーを用い高分子化し、P-THPを作成し検討したところ、他の高分子化アントラサイクリンと比較し、P-THPは細胞内取り込みおよび細胞傷害性とも優れていた。P-THPは高い腫瘍集積性、抗腫瘍効果を示し、重篤な副作用を起こさず、S-180腫瘍の完全消失、ヒトすい臓がんモデルの腫瘍縮小をもたらした。これらの結果より、P-THPは腫瘍への選択的集積性、高い細胞傷害性を示すことが示され、すい臓がんなどの固形癌に有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many conjugates of water-soluble polymers with biologically active molecules were developed. However, therapeutic effects of these conjugates do not depend only on the structures and properties of the polymer carriers; they are strongly influenced by properties and mechanisms of action of the attached drugs. Pirarubicin (THP), a tetrahydropyranyl derivative of doxorubicin (DOX), demonstrated more rapid cellular internalization and potent cytotoxicity than DOX. Here, we conjugated the THP or DOX to HPMA polymer via a hydrazone bond. The polymer prodrugs P-THP and P-DOX, respectively, had comparable hydrodynamic sizes and drug loading. Compared with P-DOX, P-THP showed approximately 10 times greater cellular uptake and a cytotoxicity. No significant difference occurred in the tumor drug concentration during 6-24 h after drug administration. Antitumor activity against xenograft human pancreatic tumor (SUIT2) in mice was greater for P-THP than for P-DOX.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：すい臓がん ピラルビシン 高分子ポリマー HPMA

1. 研究開始当初の背景

ナンドラッグは粒子サイズが数十ナノメートルの大きさの高分子薬物を指し、血中に投与後、癌組織へ選択的に集積する。そのため、抗癌剤をナンドラッグ化し、高分子化抗癌剤とすることで、抗癌剤を癌組織に選択的に集積させることが可能となる (Matsumura and Maeda, 1986)。高分子抗癌剤の代表としてドキシルが挙げられ、癌に選択的に集積する優れた高分子抗癌剤であるため、現在臨床においてカポジ肉腫や卵巣癌などに対して用いられている。

しかしながら、膵臓癌に対してドキシルが有効であるという結果は得られていない。その理由として、高分子抗癌剤の間質における拡散性の悪さが挙げられる。つまり、高分子抗癌剤は間質を通過しにくく、血管から遠く離れた癌細胞にまで到達することができない。特に膵臓癌は、血管密度が低く、間質が豊富であるため、高分子抗癌剤では膵臓癌の深部にまで到達することができず、十分な効果を発揮できないと考えられる。そこで、本研究では間質拡散性の克服を企図し、すい臓がんにも有効な高分子化抗癌剤の作成を目指した。

2. 研究の目的

本研究期間においては、高分子抗癌剤に内包された低分子抗癌剤を、癌組織で持続的に放出させることで、癌深部にまで抗癌剤を送達させ、膵臓癌に対しても有効な高分子抗癌剤を作成し、動物モデルで検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 粒子径測定 P-THP または P-DOX を 2 mg/mL となるように PBS に溶解し、フィルターを通した後に、動的光散乱法により粒子径を測定した。

(2) pH 依存的な薬物の放出 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) または 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.5 または 7.4) に P-DOX または P-THP を溶解し、37 °C でインキュベーションを行った。ポリマー結合体と遊離体はサイズ排除クロマトグラフィーにより分離し、488 nm の吸光度測定より、ポリマー結合体と遊離体の存在量を測定した。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた、アントラサイクリン系薬物の細胞内取り込みの検討 9.6 cm² ガラスボトムディッシュに SUIT2 細胞を 2×10⁵ cells/2ml になるように播種し 37 °C、5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した。ピラルピシン、ドキソルピシンおよびエピルピシンを 5 μg/mL となるように、または P-DOX、P-THP を 30 μg/mL となるように処理し、細胞内の薬物を共焦点顕微鏡を用い経時的に観察した。

(4) 細胞内薬物の定量 9.2 cm² ディッシュに細胞密度が 2×10⁵ cells/2 mL となるように播種し、24 時間後にピラルピシン、ドキソルピシンおよびエピルピシンを 5 μg/mL となるように、または P-DOX、P-THP を 30 μg/mL となるように処理した。1% SDS を用いて細胞を溶解、細胞内薬物を抽出し、HPLC により細胞内薬物量を定量した。

(5) 細胞傷害性 96 穴プレートに、培養細胞を 1 穴当りに 2,000~3,000 細胞になるように播種した。24 時間後に THP、DOX、P-THP または P-DOX を 0.0003 μg/mL ~ 30 μg/mL となるように処理した。72 時間後に WST-1 法により生存細胞数を測定し、生存率を算出した。

(6) 薬物動態 SUIT2 担がんマウスに、15 mg/kg となるように P-DOX または P-THP を尾静脈より投与した。6 時間または 24 - 72 時間後に麻酔下でマウスを安楽死させ、各臓器を摘出し、クロロホルムを用いて組織中の薬物を抽出した。逆相クロマトグラフィーを用いて単位臓器重量当りの薬物濃度を測定した。

(7) 抗腫瘍効果の検討 腫瘍径が 5~8 mm になった SUIT2 担がんマウスに対し、P-DOX または P-THP を、5 mg/kg または 15 mg/kg の投与量を 2 回または 1 回投与した。経時的にノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は以下の式を用いて算出した。腫瘍体積 (mm³) = (短径 mm) × (短径 mm) × (長径 mm) / 2。

4. 研究成果

(1) P-DOX または P-THP の合成

ヒドラゾン結合を介し、HPMA ポリマーにピラルピシンまたはドキソルピシンを結合し、それぞれ P-DOX、P-THP とした。平均分子量はそれぞれ 39,000、37,800 であり、粒子径も 8.2 nm、8.1 nm、薬物含量は 9.8%、9.6% とほぼ同等の性質を持つものを作成した。

図 1

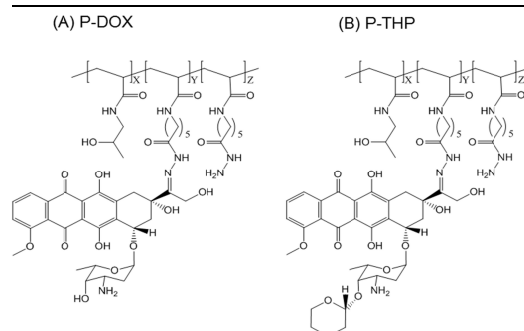


Fig. 1. Chemical structures of (A) P-DOX and (B) P-THP.

(2) pH 依存的な薬物の放出

P-DOX および P-THP はその構造中にヒド

ラズン結合を持つため、薬物の放出には水溶液中の pH が関与する。そこで、pH 7.4、6.5、5.5 における薬物の放出率を検討した。P-DOX および P-THP とともに時間依存的に薬物の放出が見られ、かつ pH が低いほど薬物の速やかな薬物の放出が確認された。P-DOX と P-THP 間に放出率の差は見られなかった。

図 2

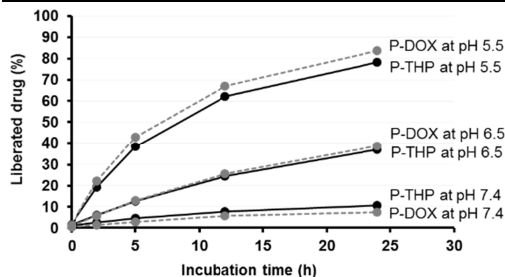


Fig. 2. Liberation of free drugs from polymer-drug conjugates. P-THP and P-DOX were incubated at pH 5.5, 6.5, and 7.4. Liberated free drug and polymer-bound drug were separated by using size exclusion chromatography and were detected by absorbance at 488 nm

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた、アントラサイクリン系薬物の細胞内取り込みの検討

ヒトすい臓がん細胞 (SUIT2) にピラルピシン、ドキソルピシンまたはエピルピシンを処理し、共焦点レーザー顕微鏡により経時的に蛍光観察を行った。ピラルピシンは投与直後より、急速に細胞内に取り込まれていた。本実験条件では、30 分以降では蛍光の飽和が見られている。一方、ドキソルピシンやエピルピシンの細胞内への移行は、ピラルピシンと比較し、非常に遅かった。

図 3

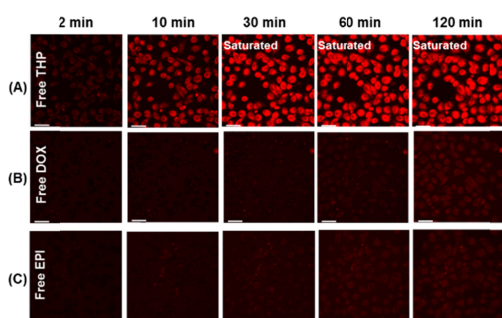


Fig. 3. Microscopy of cellular internalization of anthracycline drugs. SUIT2 cells were treated with (A) free THP, (B) free DOX, or (C) free EPI, each at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, after which cells were visualized by using confocal laser scanning microscopy. Scale bars = 50 μm .

次に、P-THP や P-DOX の細胞内取り込みに関して検討した。図 3 と比較して、P-THP や P-DOX の細胞内取り込みは、その遊離体

である THP または DOX に比べて非常に遅いことが分かる。P-DOX の細胞内取り込みは非常に遅く、360 min のインキュベーション時間でも細胞内の蛍光はほとんど見られなかった。また P-THP の細胞内取り込みは、P-DOX よりも速く、細胞内薬物の多くが核へ局在していた。

図 4

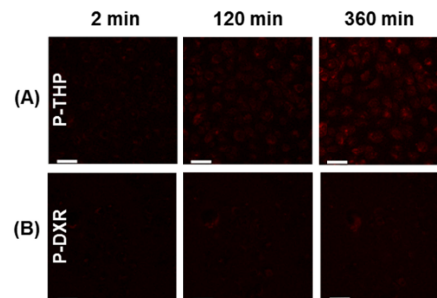


Fig. 4. Fluorescence microscopic images of uptake of P-THP and P-DOX by SUIT2 cells. SUIT2 cells were treated with (A) P-THP or (B) P-DOX with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the indicated time periods, after which cells were visualized by using confocal laser scanning microscopy. Scale bars = 50 μm .

(4) アントラサイクリン系薬物の細胞内取り込み

図 3 の結果と同様に、THP の細胞内取り込みは非常に速く、処理後 60 分には処理した THP のほぼ 100% が細胞内に取り込まれていた。対して、DOX や EPI の細胞内取り込みは THP と比較して非常に遅く、DOX 処理 240 min 後においても、THP の処理 30 min 後の 30% 程度しか細胞内取り込みは見られなかった。

図 5

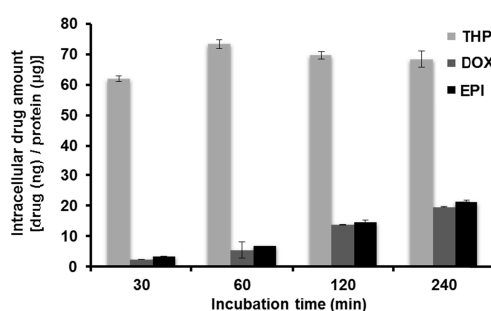


Fig. 5. Cellular uptake of different anthracyclines. SUIT2 cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ THP (gray), DOX (dark gray), or EPI (black) for the indicated time periods. Intracellular drug amounts were determined by using HPLC.

次に P-THP および P-DOX の細胞内取り込みを検討した。SUIT-2 細胞に P-THP または P-DOX を処理し、(A) 細胞内の遊離薬物を、

(B) 細胞内のポリマー結合薬物を定量した。P-THP および P-DOX とともに経時的に細胞内遊離薬物量の上昇がみられ。P-THP 処理群の細胞内遊離薬物濃度は高く、処理後 240 min では P-DOX の 10 倍以上の薬物濃度が観察された。(B) 一方、ポリマー結合体の細胞内薬物量は、経時的に増加していったが、P-DOX と P-THP に大きな差は見られなかった。(C) P-THP および P-DOX 投与群のどちらにおいても時間の経過と共に細胞内総薬物量に対する遊離体の比率が増加していた。また、細胞内の総薬物量に対する遊離薬物量の比率は、P-THP 投与群で高く、P-DOX 投与群では低かった。しかし、P-THP、P-DOX とともに処理時間の経過と共に遊離体の比率は増加していた。(D) 薬物の遊離に関してリソソームの関与を検討するために、プロトンポンプ阻害剤である Bafilomycin A1 を前処理し、P-THP および P-DOX の、細胞内における総薬物に対する遊離薬物の比率を検討した。Bafilomycin A1 の処理によって遊離薬物の量に変化は見られなかった。

これらの結果より、P-THP は P-DOX に比べ速やかに細胞内へと取り込まれること、リソソーム内の低 pH 環境で薬物が放出されているのではなく、細胞外で遊離した薬物が細胞内に取り込まれる経路が、主に寄与していることが明らかとなった。

図 6

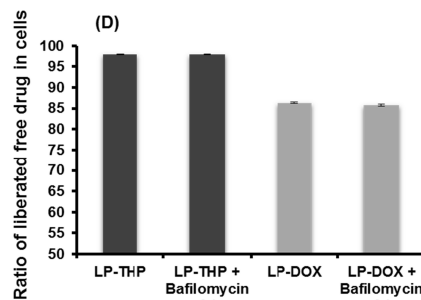
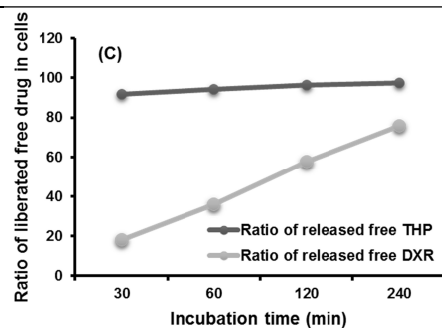
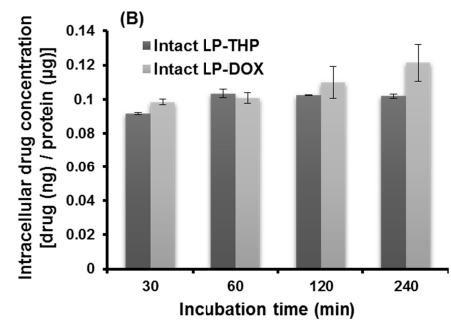
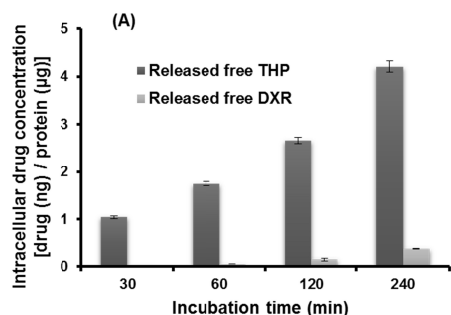


Fig. 6. Uptake of P-THP and P-DOX by SUI2 cells. Cells were treated with 30 µg/mL P-THP or P-DOX for the indicated time periods. (A) Intracellular concentration of liberated free drug. (B) Intracellular concentration of polymer-conjugated drug as quantified via HPLC with fluorescence detection (at 488 nm). (C) Ratio of intracellular liberated free drug to intracellular total drug. (D) SUI2 cells were pretreated with bafilomycin A1 for 1 h or were untreated, followed by P-THP or P-DOX treatment for 4 h, after which the amount of intracellular liberated free drug was quantified via HPLC.

(5) 細胞傷害性

THP、DOX、EPI、P-THP および P-DOX の細胞傷害性を検討した。

DOX や EPI と比較して、試験した処理時間の全てにおいて THP は高い細胞傷害性を示した。インキュベーション時間が短いほどその差は顕著であり、THP は短い作用時間で高い細胞傷害性を示す事がわかる。

図 7

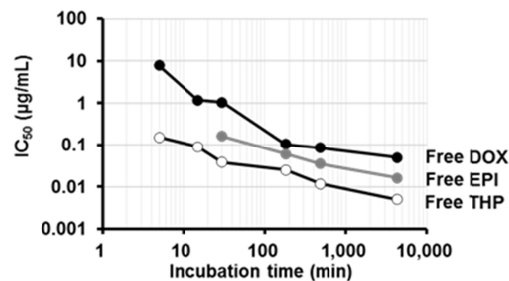


Fig. 7. Cytotoxicity of anthracyclines. SUI2 cells were treated with increasing concentrations of DOX, EPI, and THP for the indicated time periods followed by additional incubation in

drug-free medium for up to 72 h. Viable cell numbers were determined by means of the WST-1 assay

次に P-DOX および P-THP の細胞傷害性に関して検討を行った。遊離体と比較すると、P-THP および P-DOX とともに、その細胞傷害性は 10 倍ほど低かった。遊離体の細胞傷害性と同様に、P-THP は P-DOX よりも 10 倍ほど高い細胞傷害性を示し、短いインキュベーション時間において、より P-THP の優位性が高かった。

図 8

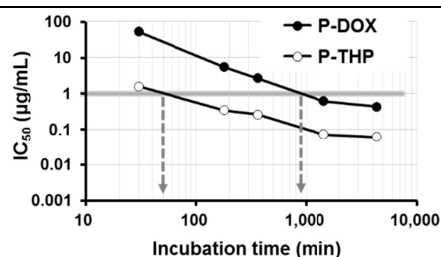


Fig. 8. Cytotoxicity of P-DOX and P-THP. SUIT2 cells were treated with increasing concentrations of P-THP or P-DOX for the indicated time periods followed by additional incubation in drug-free medium for up to 72 h. The number of viable cells was determined by means of the WST-1 assay. IC₅₀ values for each drug were calculated from the dose-response curves.

(6) SUIT-2 担がんマウスにおける薬物動態

腫瘍径が 5 ~ 8 mm 程度になった SUIT2 担がんマウスに、P-THP または P-DOX を 15 mg/kg の投与量で投与し、6 時間または 24 時間後における薬物の臓器分布を検討した。P-THP と P-DOX 間では、腫瘍内薬物量に大きな差は見られなかった。肝臓や腎臓では、P-THP と比較して P-DOX の分布が多く見られた。

図 9

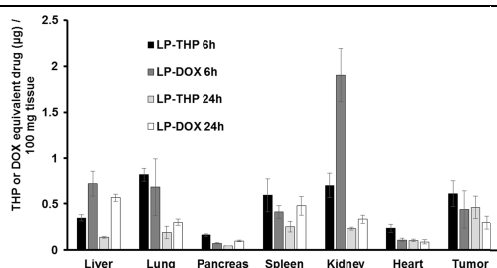


Fig. 9. Body distribution of P-THP and P-DOX. Mice with implanted SUIT2 cells were injected with 15 mg/kg P-THP or P-DOX. At the indicated time periods, mice were killed and were perfused transcardially with saline. Each tissue was collected, and the amounts of the drugs after extraction were measured by using HPLC. Values

are means \pm SD; n = 3.

(7) SUIT-2 担がんマウスにおける抗がん効果

腫瘍径が 5 ~ 8 mm になった SUIT-2 担がんマウスに、P-DOX または P-THP を尾静脈より投与した。経時的にノギスで腫瘍径を測定したところ、未治療群に比べ、P-THP および P-DOX 投与群では腫瘍の増殖が抑制された。さらに、P-DOX よりも P-THP において強い腫瘍増殖抑制作用が見られた。

図 10

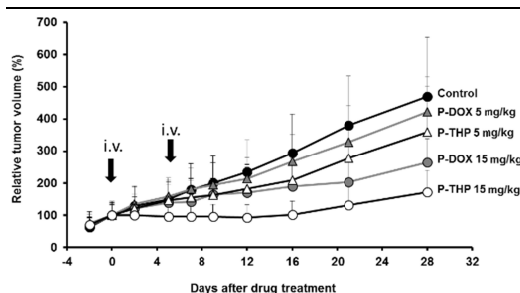


Fig. 10. Antitumor activity in SUIT2 tumor-bearing mice. Mice were treated with 5 or 15 mg/kg P-THP or P-DOX twice at the indicated times (arrows). Tumor volumes were measured as described in Materials and Methods. Values are means + SD. n = 11–12.

本研究期間内には異なるアントラサイクリン系抗がん剤を結合させた高分子化抗がん剤 P-THP と P-DOX を作成し、すい臓がんモデルマウスおよび肉腫モデルマウスにおいて、体内動態、毒性、抗腫瘍効果に関して検討を行った。

アントラサイクリン系薬剤の選定においては、ドキソルピシンやエピルピシンと比較して、ピラルピシンの高い細胞内取り込み、細胞傷害性を明らかにした。さらに HPMA ポリマーを用い高分子化し、P-THP、P-DOX を作成し検討したところ、P-DOX と比較して P-THP は細胞内取り込みおよび細胞傷害性とも優れていることが明らかとなった。

P-THP は酸性環境で効率よく THP を放出し、腫瘍組織環境である pH 6.5 ~ 6.9 付近で強い細胞傷害性を示した。

P-THP の腫瘍集積性は高く、投与 6 時間後においては、THP と比較して 6 倍ほど、24 時間では 10 倍以上も腫瘍に集積していた。P-THP は THP よりも高い抗腫瘍効果を示し、重篤な副作用が見られず、S-180 腫瘍の完全消失が見られた。さらに、皮下ヒトすい臓がん移植モデルにおいても抗腫瘍効果が見られ、P-THP は P-DOX と比較して高い抗腫瘍効果が見られた。

(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 11 件)

N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against post-translational oxidation as compared to N-acetyl-L-tryptophan. Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Nakamura H, Maruyama T, Hirayama F, Kragh-Hansene U, Otagiri M., *Biochem Biophys Res.* 2016, 6, 266-274, 査読あり, doi:10.1016/j.bbrep.2016.04.011

Missile-Type Tumor-Targeting Polymer Drug, P-THP, Seeks Tumors via Three Different Steps Based on the EPR Effect., Maeda H, Fang J, Ulbrich K, Etrych T, Nakamura H. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2016 May;43(5):549-557, 査読あり, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27210083>

pH-sensitive polymeric cisplatin-ion complex with styrene-maleic acid copolymer exhibits tumor-selective drug delivery and antitumor activity as a result of the enhanced permeability and retention effect., Saisyo A, Nakamura H, Fang J, Tsukigawa K, Greish K, Furukawa H, Maeda H., *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016 Feb 1;138:128-137, 査読あり, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.032.

HPMA Copolymer-Conjugated Pirarubicin in Multimodal Treatment of a Patient with Stage IV Prostate Cancer and Extensive Lung and Bone Metastases., Dozono H, Yanazume S, Nakamura H, Etrych T, Chytil P, Ulbrich K, Fang J, Arimura T, Douchi T, Kobayashi H, Ikoma M, Maeda H., *Target Oncol.* 2016 Feb;11(1):101-106, 査読あり, doi: 10.1007/s11523-015-0379-4.

S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes., Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VT, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T., *J Control Release.* 2015 Nov 10;217:1-9, 査読あり, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.036.

Synthesis and therapeutic effect of styrene-maleic acid copolymer-conjugated pirarubicin., Tsukigawa K, Liao L, Nakamura H, Fang J, Greish K, Otagiri M, Maeda H., *Cancer Sci.* 2015 Mar;106(3):270-278, 査読あり, doi: 10.1111/cas.12592.

Effect of different chemical bonds in pegylation of zinc protoporphyrin that affects drug release, intracellular uptake, and therapeutic effect in the tumor., Tsukigawa K, Nakamura H, Fang J, Otagiri M, Maeda H., *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Jan;89:259-270, 査読あり, doi: 10.1016/j.ejpb.2014.12.016.

Comparison between linear and star-like HPMA conjugated pirarubicin (THP) in pharmacokinetics and antitumor activity in tumor bearing mice., Nakamura H, Koziolová E, Etrych T, Chytil P, Fang J, Ulbrich K, Maeda H., *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Feb;90:90-96, 査読あり, doi: 10.1016/j.ejpb.2014.10.007.

Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls., Nakamura H, Jun F, Maeda H., *Expert Opin Drug Deliv.* 2015 Jan;12(1):53-64, 査読あり, doi: 10.1517/17425247.2014.955011.

Enhanced bacterial tumor delivery by modulating the EPR effect and therapeutic potential of Lactobacillus casei., Fang J, Liao L, Yin H, Nakamura H, Shin T, Maeda H., *J Pharm Sci.* 2014 Oct;103(10):3235-3243, 査読あり, doi: 10.1002/jps.24083.

Styrene-maleic acid copolymer-encapsulated CORM2, a water-soluble carbon monoxide (CO) donor with a constant CO-releasing property, exhibits therapeutic potential for inflammatory bowel disease., Yin H, Fang J, Liao L, Nakamura H, Maeda H., *J Control Release.* 2014 Aug 10;187:14-21, 査読あり, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.018.

〔学会発表〕(計 4 件)

中村 秀明, 環境応答性高分子型抗癌剤 (P-THP) の作製と抗癌効果の基礎的検討, 2016 年臨床腫瘍薬学会, 2016/3/12-13, 鹿児島市民文化ホール (鹿児島県, 鹿児島市)

中村 秀明, 高分子結合型アントラサイクリン系抗がん剤の比較, 第 31 回日本 DDS 学会, 2015/7/2-3, 京王プラザホテル (東京都, 新宿区)

原武 衛, 川島 愛, ..., 中村 秀明 両親媒性バナジウム-ヒドロキサム酸錯体の合成とその自己凝集特性, 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2015/5/30-31, 長崎大学 (長崎県, 長崎市)

中村 秀明, がん組織集積性と酸性環境応答性を併せ持つ高分子型抗がん剤の有用性評価, 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2014/11/15-16, 熊本大学 (熊本県, 熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 秀明 (NAKAMURA, Hideaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号: 30435151