

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06773

研究課題名(和文) がん組織血管の透過性増強を基盤とした高分子性抗がん剤の集積増強法に関する研究

研究課題名(英文) Augmentation of tumor-target delivery of nanomedicine by an acid-responsive N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer-bradykinin conjugate.

研究代表者

中村 秀明 (Nakamura, Hideaki)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：30435151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規のpH応答性ポリマー結合型ブラジキニン(P-BK)を創製した。P-BKは、血漿ペプチド分解酵素に対して抵抗性を示し、腫瘍組織などの酸性環境においてBKと同等の活性を示すLev-BKを放出した。C26皮下移植がんモデルマウスにP-BKを投与したところ、腫瘍への流入血液量が約1.7倍上昇し、腫瘍への高分子性抗がん剤の蓄積量が約3倍増加した。P-BKと高分子性抗がん剤を併用投与することにより、顕著な副作用を起こすことなく、腫瘍の増殖を有意に抑制し、生存率の延長をもたらした。これらの結果は、P-BKが高分子性抗がん剤の腫瘍集積性を増強できる優れた併用薬であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我国においては、およそ年間40万人が「がん」を原因として亡くなっており、死因の第一位を占めている。また、抗体医薬品をはじめとする抗がん剤の高額化も医療財政上の大きな問題となってきている。本研究では、「がん病巣」への抗がん剤の集積性を増強する併用薬の創製に取り組むものである。本研究の結果より、本研究で創製したP-BKは、抗がん効果を維持したまま高分子性抗がん剤の投与量を減らす事が可能であることが示唆された。投与量の減少による副作用の減弱にもつながりうるものでもあり、高分子性抗がん剤を用いたがん治療をさらに発展しうる成果につながるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we designed and synthesized a novel N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA)-based copolymer conjugate of bradykinin (BK), which is an endogenous vasoactive peptide. Pretreatment with the polymer conjugate (P-BK) followed by administration of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in C26 tumor-bearing mice improved intratumoral blood flow (1.4-1.7 fold), increased tumor accumulation of PLD (approximately 3-fold), and demonstrated superior antitumor activity of PLD. Moreover, the combination significantly improved the survival rate of tumor-bearing mice. We believe that our study makes a significant contribution to the literature because the study findings suggest P-BK as a potential candidate to augment the enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumors, and its concomitant use is expected to improve tumor delivery of nanomedicines.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ブラジキニン HPMAポリマー 抗腫瘍効果 ナノメディシン

1. 研究開始当初の背景

これまでに種々のメカニズムに基づく優れた抗体医薬品やリポソームなどの高分子性抗がん剤が上市されている。高分子性抗がん剤は特徴的な体内分布を示し、肝臓、脾臓、骨髄、がん組織などの、内皮細胞間隙が広く血管透過性が高い血管を持つ臓器に分布しやすい。高分子性抗がん剤の多くは、がん組織に集積し薬効を発現するため、その作用メカニズムに加え、如何に多くの高分子性抗がん剤をがん組織に集積できるかが肝要となる。

しかし、高分子性抗がん剤が集積しにくいがんが多いことも事実であり、そのようながんに対しては治療効果が得られにくい。実際に臨床でも同様の報告がされており、臨床のがんでは高分子性抗がん剤のがん集積性が低く、効果的な薬物治療が妨げられる要因となっている。高分子性抗がん剤が集積しにくい要因として、血管密度、血管透過性、細胞外マトリックスなど複数の要因が関与していると考えられている。いずれにしても、本問題は治療効果の減弱とともに、高額な抗がん剤の多量使用による医療費の増大の要因にもなるため、高分子性抗がん剤のがん組織への集積性の向上を志向した研究は極めて重要である。

内因性の血管透過性亢進因子としてブラジキニン(BK)や一酸化窒素(NO)などがよく知られ、ブラジキニンは一酸化窒素、内皮由来過極因子やプロスタグランジンの放出を促し、血管拡張ならびに血管透過性を強力に亢進する。これまでに申請者グループは、一酸化窒素を発生する医薬品(ニトログリセリンなど)の投与により、高分子性抗がん剤のがん組織への集積性が向上することを明らかにしており、NOなどの血管作動性因子を作用させることで、高分子性抗がん剤の集積性が増強する事を明らかにしてきた。そこで、血管作動性因子を用いた薬物集積増強法に関する研究をさらに発展させようと、ブラジキニンに着目した。ブラジキニンは一酸化窒素よりもシグナル伝達の上流に位置し、僅かな量で強力に血管透過性の亢進および血管拡張を引き起こす。さらにペプチドであるために、様々な修飾がやすく、必要に応じて機能性・発展性を持たせる事が可能である点も優れる。

これまでの創薬研究は、高分子性抗がん剤自体に手を加え、がん組織集積性の改善が図られてきた。一方、高分子性抗がん剤が血管間隙を通過して血中からがん組織へ分布する限り、がん組織の血管密度・間隙の広さなど、血管の性質に集積性が左右される。そのため申請者は、がん組織血管を制御することで、高分子性抗がん剤のがん組織への集積性を制御できるのではないかと考え本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究ではブラジキニンを用いたがん組織選択的な血管透過性亢進法が、高分子性抗がん剤のがん組織への集積増強に有効であるのかを明らかにする。申請者グループは、合成ポリマーを用い、がん組織の微酸性環境で遊離薬物を放出させるユニークな技術を持っており、本技術を応用しがんを選択的に作用するブラジキニンの作製を行う。がんは糖代謝の異常により、組織が微酸性であることが報告されており、本研究ではがんの酸性環境でブラジキニンを放出し作用するpH応答性ポリマー結合型ブラジキニンを創製し、がんモデルマウスでその機能を評価し、血管透過性亢進を基盤とした薬物集積増強法が可能であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) pH 応答性ポリマー結合型ブラジキニン(P-BK)の合成

Fmoc 固相合成法により、ブラジキニン(BK)を合成した。BKのN-末端にレブリン酸を結合させ、Lev-BKを合成した。トリフルオロ酢酸を用いて、Lev-BKをビーズから切り離した後に、HPLCを用いてLev-BKを精製した。ヒドラジド基を持つヒドロキシプロピルメタクリルアミドコポリマー(HPMA-co-maah-NHNH₂)はRAFT重合法により合成した。脱水メタノール中でヒドラゾン結合を介して、HPMA-co-maah-NHNH₂とLev-BKを結合させた(P-BK)。サイズ排除クロマトグラフィー(SB804HQ)で未反応のLev-BKを除去し、P-BKを得た。

(2) P-BKからのLev-BKの放出

各pH5~pH8の緩衝液中にP-BKを溶解し、37℃でインキュベーションした。経時的にサイズ排除クロマトグラフィー(monoselect nPEC)を用いて、P-BKから離脱したLev-BKを定量した。Lev-BKは210nmにおける吸光度を用いて検出・定量を行った。

(3) 血症ペプチダーゼに対するP-BKの安定性

20%マウス血漿中にP-BKを溶解し、37℃でインキュベーションした。0.5M HClで反応を停止し、40℃で1時間インキュベーションすることで、ポリマーからペプチドを遊離させた。固相抽出用カラム(Strata X)を用いてペプチドを精製し、逆相クロマトグラフィーを用いて未分解の

ブラジキニンを定量した。

(4) 血管透過性亢進活性の測定

6~7週齢の雄性SDラットに蛍光標識ウシ血清アルブミン(Cy5.5-BSA)を尾静脈より投与した。20分後にイソフルラン麻酔下で10 μ g当量のBKまたはP-BKをラット背部皮内に投与した。1時間後にCO₂吸入によりラットを安楽死させ、ラット背部皮膚を摘出した。蛍光イメージング装置(IVIS-Lumina XR)を用いて、皮内投与部に漏出したCy5.5-BSAを定量した。

(5) 腫瘍内血流量

イソフルラン麻酔下で、C26皮下担がんマウスに2mg/kg当量のBKまたはP-BKを投与し、皮下腫瘍に流入する血流量をレーザードップラー血流計(RBF-101)を用いて計測した。BKまたはP-BKは血流が安定した後に投与し、投与後4時間まで血流量の計測をおこなった。

(6) Cy5.5-BSAおよびPLDの体内分布

C26皮下担がんマウスに0.2mg/kgまたは2.0mg/kg当量のBKまたはP-BKを投与し、一定時間後にCy5.5-BSAまたはドキソルピシン含有PEG化リポソーム(PLD)を投与した。24時間後にPBSを用いて還流後に各臓器を回収した。各臓器に集積したCy5.5-BSAは蛍光イメージング装置を用いて定量した。臓器に集積したPLDは、臓器をPBS中でホモジネート後にクロロホルム・イソプロパノール混液中にドキソルピシンを抽出し、逆相HPLCを用いて定量した。

(7) 抗腫瘍効果

C26皮下担がんマウスにPLD単独またはPLDとP-BKを併用投与した。P-BKはPLDの投与3時間前に行い、同投与スケジュールを72時間毎に2回行った。経時的にノギスを用いて腫瘍径を測定し、以下の式により腫瘍体積を算出した。(腫瘍体積=短径 \times 短径 \times 長径 \div 2)

4. 研究成果

(1) P-BKの合成

Lev-BKは固相合成法により合成し、分取逆相クロマトグラフィーで精製を行った。得られたLev-BKはMALDI-TOFMSにより分子量の決定をおこなった(m/z=1158.595, calcd. m/z=1157.608)。HPMA copolymerとの結合反応はサイズ排除クロマトグラフィーを用いて追跡し、精製後のP-BKには未反応のLev-BKはみられなかった(data not shown)。Lev-BKの結合は速やかに進行し、HPMA copolymerへのローディングは反応相中へのLev-BKの添加量により容易に調整できた。本研究においては、Lev-BKのローディングが5.9~19.4wt%のP-BKを調整した。以降の実験では、Lev-BKのローディングが10wt%のP-BKを用いた。重量平均分子量は28,700、水溶液中でのサイズは6.5nm、電位は-2.0であった。

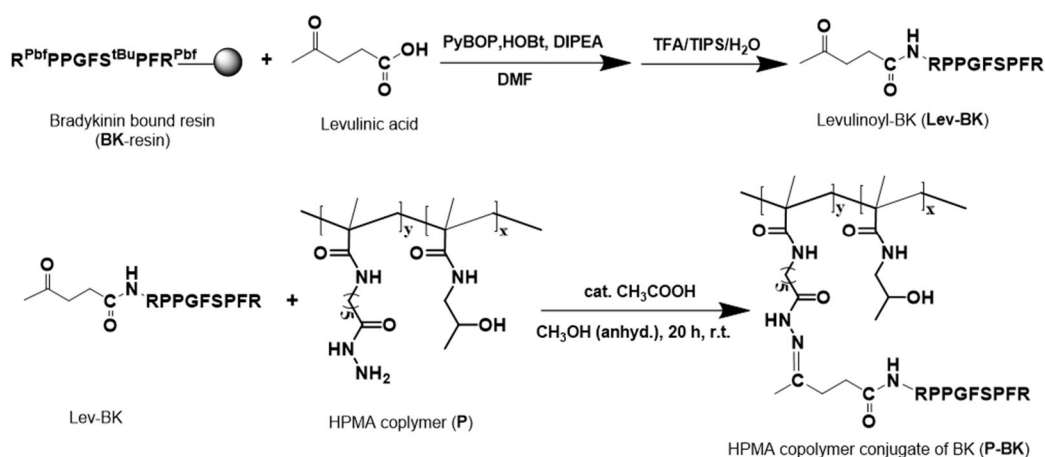


図1 P-BKの合成経路

(2) P-BKの安定性

本項では、P-BKの安定性として、ポリマーからのLev-BKの放出性と血漿ペプチド分解酵素に対するP-BKの安定性を検討した。P-BKは、ポリマーとLev-BKとの結合はヒドラゾン結合を介しており(図1)、酸性環境に応じたLev-BKの放出が期待される。図2に示すように、P-BKは中性~アルカリ性では比較的安定であり、Lev-BKの放出は緩やかであった。一方、酸性においてLev-BKの放出が促進され、インキュベーション1時間後においては、pH7.4に対し、pH6.8ではおよそ3倍速い放出が観察された。

ブラジキニンは血漿ペプチド分解酵素で速やかに分解され、活性が変化することが報告されているため、マウス血漿中におけるP-BKのペプチド分解酵素に対する安定性を検討した。BKは

既報と同様に血漿ペプチド分解酵素により速やかに分解され、Lev-BK も BK と同程度に分解された。一方 P-BK の分解は緩やかであり、P-BK は血中において BK と比較して安定に存在しうると考えられた (図 3)。

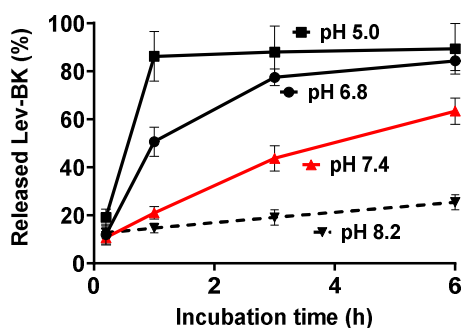


図 2 pH 依存的な Lev-BK の放出

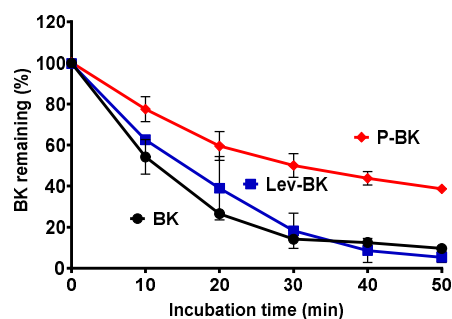


図 3 血漿ペプチダーゼに対する P-BK の安定性

(3) 血管透過性亢進活性

血管透過性亢進作用は BK の主要な作用の一つであり、本作用を指標として、P-BK および Lev-BK の BK 様活性を検討した。BK は投与量依存的に Cy5.5-BSA の血管外漏出を促進した (data not shown)。BK、Lev-BK および P-BK を、それぞれ 10 μ g BK 当量を投与したところ、BK による血管透過性亢進活性に対して Lev-BK はおよそ 70% の活性を示したが、P-BK は 10% 以下の活性しか示さなかった。本結果は P-BK が BK 様活性を示すには、ポリマーからの Lev-BK の放出が必要であることを示唆している。

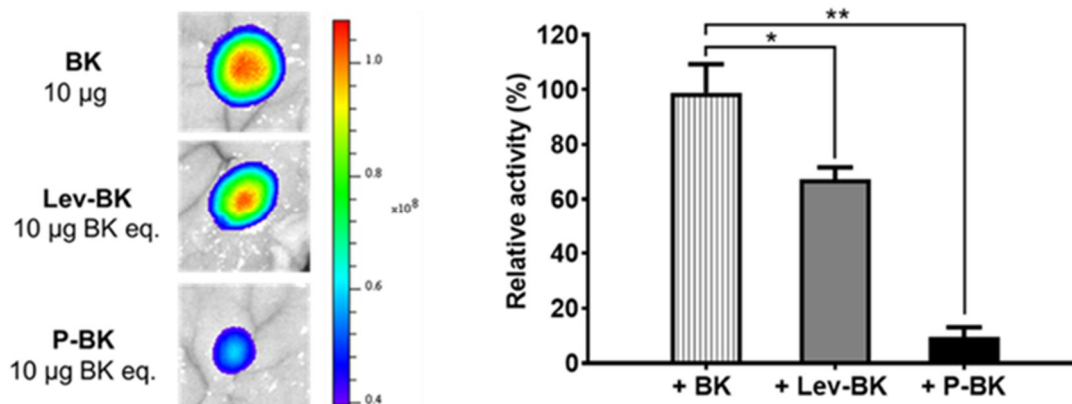


図 4 P-BK および Lev-BK の血管透過性亢進活性

(4) 腫瘍内血流量

BK は受容体に作用することで、血管拡張を引き起こす。そこで、BK または P-BK の投与により腫瘍内の血流量が経時的にどのように変化するかを、担がんマウスを用いて検討した。BK の投与により一時的な血圧の低下に伴い (data not shown) 腫瘍内血流量の減少がみられ、その後血流量は投与前と同等にまで回復した (図 5A)。一方、P-BK をすることで、投与後 30 分後から腫瘍内の血流量が増加し、1~4 時間に渡り、腫瘍内血流量は 1.5~1.7 倍に増加した (図 5A)。本作用は正常皮下では観察されず、腫瘍内のみで観られた (図 5B)。

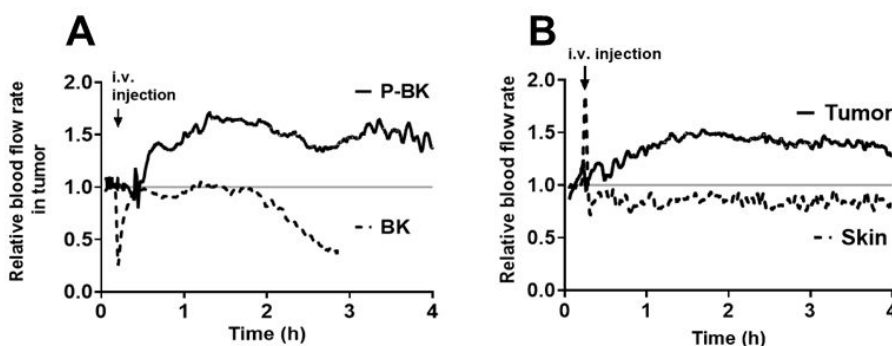


図 5 P-BK による腫瘍内血流量の変化

(5) P-BK 投与による高分子薬剤の体内分布の変化

C26 皮下担がんマウスに BK-または P-BK を投与、次いで一定時間後に Cy5.5-BSA を投与し、24 時間後に腫瘍に集積した Cy5.5-BSA を定量した (図 6A,B)。BK の事前投与では Cy5.5-BSA の腫瘍集積性に有意な変化はみられなかったが (図 6A) P-BK の 1~4 時間の事前投与では Cy5.5-BSA の腫瘍集積量が 1.5~2 倍程度増加した (図 6B)。また、リポソーム製剤 (PLD) の体内分布に対する P-BK の影響を検討したところ、P-BK を併用投与することにより、肝臓を除く正常臓器への集積量には変化なく、腫瘍への PLD の集積量は 2~3 倍増加した (図 6C)。

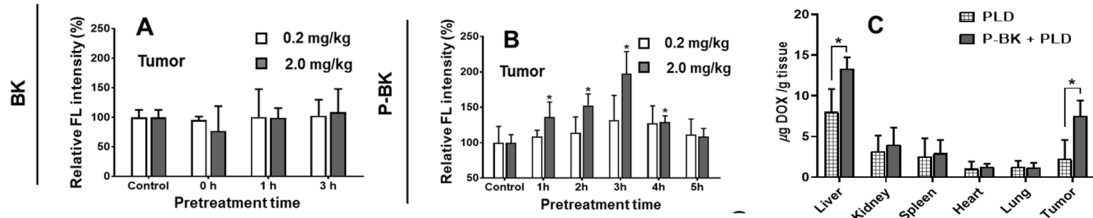


図 6 P-BK 投与による Cy5.5-BSA の体内分布の変化

(5) P-BK 併用投与による PLD の抗腫瘍効果

C26 皮下担がんマウスに対する PLD の抗腫瘍効果が、P-BK の併用投与により変化するのかを検討した。P-BK 単独投与では control 群と比較して、腫瘍体積に変化はみられなかった。P-BK と PLD の併用投与群では、PLD 単独投与群よりも有意に腫瘍体積の増加を抑制した (図 7A)。また、P-BK の投与により体重減少などの明確な毒性はみられなかった (図 7B)。

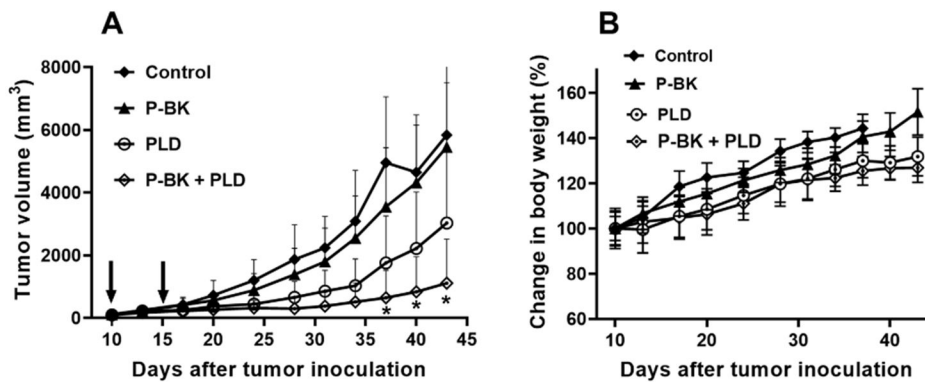


図 7 P-BK の併用投与による高分子性抗がん剤の抗腫瘍効果

本研究では、新規の pH 応答性ポリマー結合型ブラジキニン (P-BK) を創製した。P-BK は、pH 応答性を示し、中性~アルカリ性では比較的安定にポリマー結合体 (P-BK) として存在するが、酸性環境において Lev-BK の放出が促進された。P-BK の血管透過性亢進作用は極めて弱かったが、P-BK から放出される Lev-BK は BK と同等の活性を示した。さらに P-BK は血漿ペプチド分解酵素に対して抵抗性を示した。そのため、血中では不活性体の P-BK として存在し、腫瘍組織の酸性領域において BK 様活性を示す Lev-BK を放出し、腫瘍選択的に BK を作用させることができると考えられる。実際に、BK の投与では投与直後に急激な血圧低下が認められたが、P-BK を投与しても血圧低下はみられなかった。C26 皮下移植がんモデルマウスに P-BK を投与したところ、腫瘍への流入血液量が約 1.7 倍上昇し、少なくとも 3 時間維持された。さらに P-BK の投与により、腫瘍への PLD の蓄積量が約 3 倍増加した。本作用はリポソーム製剤のみならず、蛍光標識アルブミンでも同様の集積増強作用がみられた。PEG-BK と PLD の併用投与は、さらに顕著な副作用を起こすことなく、腫瘍の増殖を有意に抑制し、生存率の延長をもたらした。これらの結果は、P-BK が高分子性抗がん剤の腫瘍集積性を増強できる優れた併用薬であることを示唆していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideaki Nakamura, Eva Koziolova, Petr Chytil, Tomas Etrych, Mamoru Haratake, Hiroshi Maeda	4. 巻 16
2. 論文標題 Superior Penetration and Cytotoxicity of HPMA Copolymer Conjugates of Pirarubicin in Tumor Cell Spheroid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecuar Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 3452-3459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Appiah Enoch, Nakamura Hideaki, Pola Robert, Etrych Tomas, Haratake Mamoru
2. 発表標題 ポリマー結合型ブラジキニンを用いた高分子性抗がん剤の腫瘍集積増強法
3. 学会等名 第141回日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Appiah Enoch, 中村 秀明, Pola Robert, Etrych Tomas, 原武 衛
2. 発表標題 Bradykinin conjugates of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide based polymer for enhancing tumor delivery of nanomedicines
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Enoch Appiah, Hideaki Nakamura, Robert Pola, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 血管透過性亢進ペプチドによる高分子抗がん剤のがん組織デリバリー増強法の検討
3. 学会等名 日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Nakamura, Enoch Appiah, Robert Pola, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 An improvement of tumor drug delivery by HPMA based polymer conjugates of vascular permeability enhancing peptide
3. 学会等名 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Appiah Enoch、中村 秀明、Robert Pola、Tomas Etrych、原武 衛
2. 発表標題 An improvement of tumor drug delivery by conjugation of vasopressin with HPMA polymer
3. 学会等名 日本薬学会九州支部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 秀明、Enoch Appiah、Pola Robert、Etrych Tomas、原武 衛
2. 発表標題 ポリマー結合型ブラジキニンを用いた腫瘍への薬物送達増強法の検討
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 秀明
2. 発表標題 血管透過性増強に基づく 高分子性抗癌剤のがん組織集積増強法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アツビア イーノック
2. 発表標題 血管透過性亢進ペプチドを用いた高分子性抗がん剤のがん組織集積増強法の検討
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 秀明
2. 発表標題 An improvement of tumor drug delivery by HPMA based polymer conjugates of vascular permeability enhancing peptide
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原武 衛 (Haratake Mamoru)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	
研究協力者	國安 明彦 (Kuniyasu Akihiko)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
チェコ	Institute of Macromolecular Chemistry			