

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16415

研究課題名(和文)尿アルカリ化剤による抗がん剤治療効果の増強と効果予測

研究課題名(英文)Enhancement of conventional chemotherapy by treatment with an alkalinizing agent

研究代表者

安藤 英紀 (ANDO, Hidenori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・特任助教

研究者番号：00735524

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)：腫瘍内微小環境は酸性環境にあり、腫瘍の成長や血管新生、転移などを促進させることで悪性化し、薬物排出トランスポーターの発現亢進や免疫細胞の不活化により抗がん剤の薬効を減弱させる。本研究では、アルカリ化剤として重曹(NaHCO₃)あるいはクエン酸塩を用い、これを経口投与することで血清中および尿中の重炭酸イオン濃度を上昇させ、尿pHがアルカリ化することを明らかにし、また腫瘍酸性環境を中性化させることに成功した。さらに、アルカリ化剤の経口投与は既存の抗がん剤(ドキシソルビシン、Doxil、抗PD-1抗体)の抗腫瘍効果を顕著に増強させることを明らかにし、その効果は尿pHの変動と相関することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、アルカリ化剤を経口投与することで、抗がん剤の効きやすさを尿pHの変動から予測可能である可能性を示した。腫瘍内pHの測定は、これまで腫瘍摘出後のpHモニタリング、あるいは針状電極を侵襲的に刺突することで行っていたが、尿pHの変動から簡便に腫瘍内中性化をモニタリングし、既存の抗がん剤の治療効果を予測するといった概念はこれまでに存在せず、極めて学術的意義の高いものである。近年、コンパニオン診断薬による医薬品の有効性や安全性を事前に特定する治療概念が注目されている。本研究結果を活用することで、高活性の抗がん剤の薬効を事前に予測可能であることから、高い社会的意義を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Acidic extracellular pH is characteristic of the tumor microenvironment and could induce un controlled progression, angiogenesis, and metastasis of the tumors. In addition, it was reported that tumor acidic pH microenvironment is related to the chemoresistance by overexpression of drug-efflux transporters and inactivation of antitumor immune cells. In this study, we challenged to treat the tumor-bearing mice with an oral alkalinizing agent, such as NaHCO₃ or sodium potassium citrate, showed the increases of serum/urine bicarbonate concentrations and urine pHs, and consequently succeeded to neutralize the tumor acidic pH microenvironment. In addition, we demonstrated that the oral alkalinizing agent can enhance the therapeutic effects of the conventional anticancer agent, such as doxorubicin, Doxil, and anti-PD-1 antibody.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム(DDS)

キーワード：アルカリ化剤 腫瘍内中性化 尿pH 重曹(NaHCO₃) クエン酸塩 ドキシソルビシン Doxil 抗PD-1抗体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍内微小環境では、がん細胞膜上に発現している Na^+/H^+ 交換輸送体やモノカルボン酸輸送体などの幾つかのトランスポーターが過刺激されている状態にある (*Nat. Rev. Cancer*, **5**, 786-795, 2005)。これにより、 H^+ が積極的に細胞内から細胞外へと排出され、腫瘍内 pH は低下 (酸性化) する。この腫瘍内酸性化は腫瘍の悪性化に大きく寄与しており、腫瘍の成長や血管新生、転移などを促進させる (*Biochim. Biophys. Acta*, **1756**, 1-24, 2005)。ところで、がん化学療法において、低分子化合物の分子型分率は抗がん剤の薬理効果に大きく影響する。例えば、抗がん剤の doxorubicin (DXR) は pKa が 8.22 の塩基性化合物であり、酸性環境ではイオン型となるため細胞内に移行しにくいのに対し、中性～塩基性環境では分子型が多くなり、細胞膜透過性が向上することで薬効を発揮しやすくなる (図 1)。すなわち、腫瘍内環境の中性化はがん治療において極めて重要な要素であり、がんの悪性化を抑えるだけでなく、DXR やリポソーム化 DXR (Doxil[®]) のような塩基性抗がん剤による治療効果を飛躍的に高めることが期待できる。

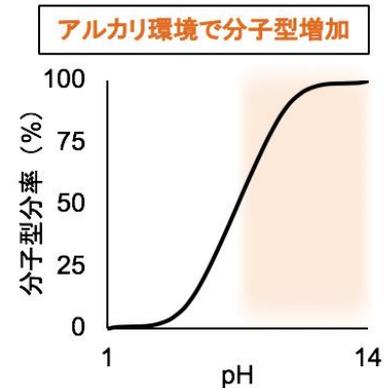


図 1. 塩基性抗がん剤の分子型分率

2. 研究の目的

アルカリ化剤として重曹 (NaHCO_3) あるいはクエン酸塩 (KNa-cit) を用い、これを経口投与することで腫瘍内中性化を図り、既存の抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させることを目的とする。また、この時の尿 pH をモニタリングすることで、抗がん剤治療効果と尿 pH 変動との相関性を示すデータを収集する。

3. 研究の方法

BALB/c マウスに NaHCO_3 (500 mg/kg) と酸化マグネシウム (MgO) (165 mg/kg)、あるいは KNa-cit (500 mg/kg) を経口投与し、その 1、2、4、6、24 時間後に血清および尿を回収し、重炭酸イオン濃度をダイヤカラー・ CO_2 (東洋紡) を用いて測定した。また、尿 pH を pH 試験紙 (pH 5.5-9.0, AS ONE) で観察した。Colon26 マウス結腸がん細胞を BALB/c マウスに皮下移植することで Colon26 担がんマウスモデルを作成した。腫瘍内 pH を計測するため、針状 pH 電極と比較電極を pH メーターに繋ぎ、針状 pH 電極を腫瘍内に、比較電極を皮下にそれぞれ挿入することで、腫瘍内 pH を計測した。治療評価のため、Colon26 担がんマウスに NaHCO_3 を投与し、抗がん剤として DXR あるいは Doxil[®] を併用投与した後の腫瘍体積を計測することで、抗腫瘍効果を評価した。また、 NaHCO_3 と Doxil[®] を併用投与した後の腫瘍体積 (抗腫瘍効果) と尿 pH 変動の相関を観察した。B16 マウスメラノーマを C57BL/6 マウスに皮下移植することで B16 担がんマウスモデルを作成し、 NaHCO_3 (500 mg/kg) と MgO (165 mg/kg)、あるいは KNa-cit (500 mg/kg) を経口投与し、抗がん剤として抗 PD-1 抗体を併用投与した後の腫瘍体積、生存期間、体重変化を観察し、尿 pH 変動との相関について評価した。また、KNa-cit と抗 PD-1 抗体を投与した後の腫瘍内免疫細胞 (CD8^+ T cell, tumor-associated macrophage ; TAM, natural killer cell ; NK cell, regulatory T cell ; Treg) の変動をそれぞれ評価した。

4. 研究成果

BALB/c マウスに $\text{NaHCO}_3+\text{MgO}$ を経口投与したところ、血清中重炭酸イオン濃度は投与後 1 時間から上昇が認められ、投与後 6 時間をピークとして徐々に減少し、投与後 24 時間では基底値まで戻った (図 2 左)。尿中重炭酸イオン濃度も一過性に上昇し (図 2 中央)、それに伴って尿 pH の一過性的上昇 (アルカリ化) が認められた (図 2 右)。KNa-cit を経口投与したところ、 $\text{NaHCO}_3+\text{MgO}$ と同じく、血清中重炭酸イオン濃度の上昇が認められ、尿中重炭酸イオン濃度および尿 pH も一過性に上昇した。 NaHCO_3 は消化管内あるいは血清中で直接重炭酸イオンを生成することで重炭酸イオン濃度を上昇させたと考えられ、また KNa-cit は血液中に入った後に電気平衡を変化させることで生体中での重炭酸イオンの産生を誘導したと考えられる (引用文献 1)。

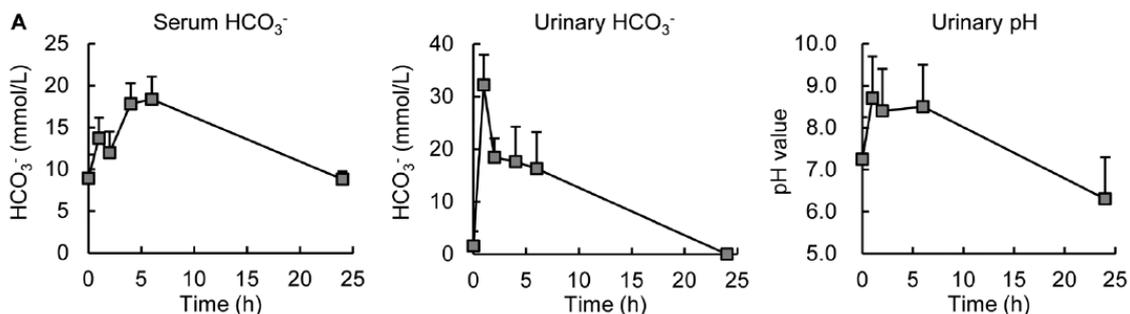


図 2. NaHCO_3 経口投与後の血清中/尿中重炭酸イオン濃度と尿 pH の変化 (Ando H, et al. *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 844-852 (2021), Fig. 1)

Colon26 担がんマウスを作成し、針状電極を腫瘍に直接刺すことで腫瘍内 pH を測定したところ、無処置群では pH 6.67 付近の弱酸性であったのに対し、NaHCO₃ を 14 日間経口投与した群では pH 6.90 付近まで中性化することを明らかにした。Colon26 担がんマウスに NaHCO₃ および DXR あるいは Doxil[®] を併用投与した際の抗腫瘍効果を評価したところ、NaHCO₃ の併用で DXR および Doxil[®] の治療効果が顕著に上昇することを明らかにした。また、投与期間中における体重減少は見られなかったことから、全身毒性は低いことが示された。さらに、NaHCO₃ と Doxil[®] を併用投与し、Doxil[®] 濃度依存的な抗腫瘍効果と尿アルカリ化との相関を観察したところ、投与量の多い Doxil[®] では腫瘍増殖抑制効果が高く、NaHCO₃ の投与による尿 pH 上昇（アルカリ化）も顕著に見られたのに対し、投与量の少ない Doxil[®] では腫瘍増殖抑制効果が低いのに相関して、尿 pH の上昇も低い（酸性化する）ことが明らかとなった。

B16 担がんマウスに抗 PD-1 抗体と NaHCO₃+MgO を併用投与した時の抗腫瘍効果を評価したところ、NaHCO₃+MgO 群では抗腫瘍効果が見られず、抗 PD-1 抗体単独群では無処置群と比較して 42.1%の腫瘍増殖抑制効果を示したのに対し、抗 PD-1 抗体と NaHCO₃+MgO の併用群では 80.1%と高い腫瘍増殖抑制効果を示した（図 3A）。マウス生存期間も同様に評価したところ、抗 PD-1 抗体単独群では 33.7%の延命効果を示したのに対し、抗 PD-1 抗体と NaHCO₃+MgO の併用群では 52.6%の高い延命効果を示した（図 3B）。この時の体重減少は認められなかった（図 3C）。また、NaHCO₃+MgO 群あるいは抗 PD-1 抗体との併用群の、腫瘍体積と尿 pH の相関を観察したところ、抗 PD-1 抗体との併用で腫瘍体積が小さい（抗腫瘍効果が高い）個体において、尿 pH は上昇（アルカリ化）する傾向を示した（図 3D）。さらに、マウスの生存曲線と尿 pH 変動に関して相関性を見たところ、NaHCO₃+MgO 群あるいは抗 PD-1 抗体との併用投与群の両方において、尿 pH の上昇（アルカリ化）が解除され始めるタイミングと死亡発現するタイミングに相関性が認められた（図 3E）。KNa-cit と抗 PD-1 抗体を併用投与した検討においても、NaHCO₃+MgO と同様に、併用投与することで抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果が増強することを示した。さらに、抗 PD-1 抗体と KNa-cit を併用した時の腫瘍内免疫細胞の割合をフローサイトメーターで解析したところ、抗 PD-1 抗体単独および KNa-cit との併用で、細胞障害性免疫細胞である CD8⁺ T 細胞の割合が増加すること、また pH を中性化することで細胞障害性サイトカインである IFN-gamma の産生が増強することを明らかにした。これより、アルカリ化剤による腫瘍中性化は、抗 PD-1 抗体をはじめとした免疫療法の治療効果を高めることを明らかにした（引用文献 2）。

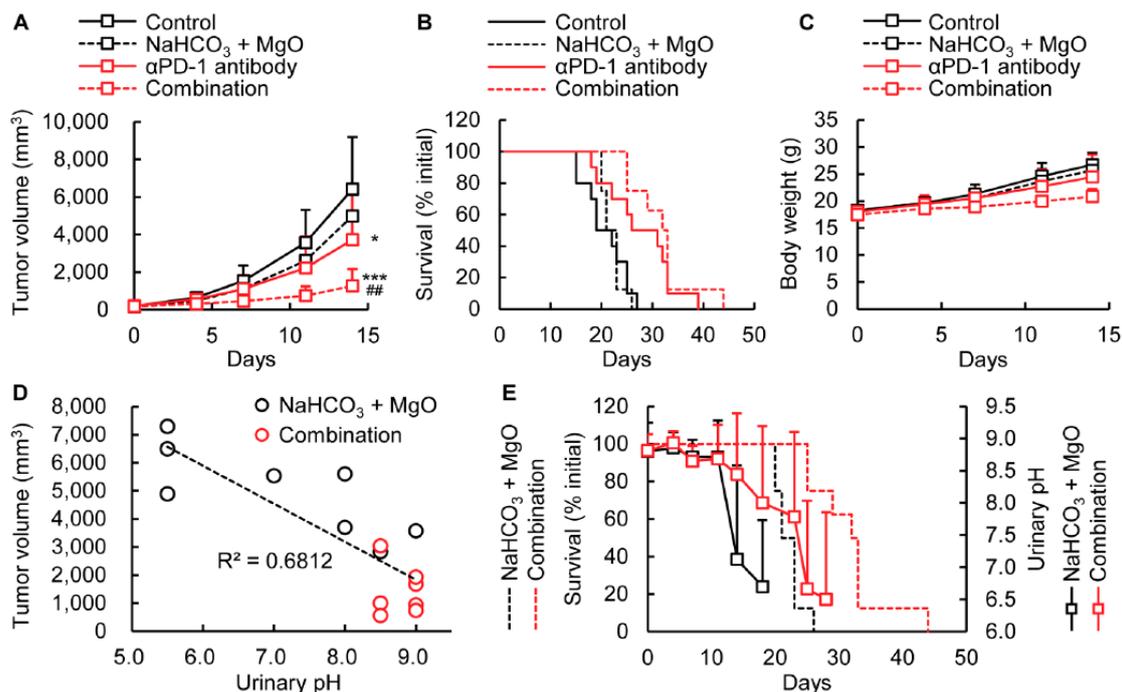


図 3. NaHCO₃+MgO と抗 PD-1 抗体を併用投与した時の抗腫瘍効果と尿 pH との相関 (Ando H, et al. Biol. Pharm. Bull., 44, 844-852 (2021), Fig. 3)

以上より、NaHCO₃ や KNa-cit などのアルカリ化剤は、経口投与で腫瘍内酸性環境を中性化することが可能であり、既存の抗がん剤の治療効果を増強させると共に、尿 pH をモニタリングすることで抗腫瘍効果を簡便に予測可能であることを示した（引用文献 2-3）。

<引用文献>

1. Parry-Billings M., et al., *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, **55**, 524-529 (1986)
2. Ando H., et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 844-852 (2021)
3. Ando H., et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 266-270 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ando H, Emam SE, Kawaguchi Y, Shimizu T, Ishima Y, Eshima K, Ishida T	4. 巻 44
2. 論文標題 Increasing Tumor Extracellular pH by an Oral Alkalinizing Agent Improves Antitumor Responses of Anti-PD-1 Antibody: Implication of Relationships between Serum Bicarbonate Concentrations, Urinary pH, and Therapeutic Outcomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 844 ~ 852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00076	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

1. 著者名 Ando H, Eshima K, Ishida T	4. 巻 44
2. 論文標題 Neutralization of Acidic Tumor Microenvironment (TME) with Daily Oral Dosing of Sodium Potassium Citrate (K/Na Citrate) Increases Therapeutic Effect of Anti-cancer Agent in Pancreatic Cancer Xenograft Mice Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 266 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00825	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tagami M, Ando H, Ikeda A, Eshima K, Huang CL, Wada H, Ishida T
2. 発表標題 Enhanced therapeutic efficacy of liposomal weak-base anticancer drugs by daily oral administration of sodium bicarbonate.
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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		
エジプト	Zagazig University		