

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：24403

研究種目：新学術領域研究（課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200076

研究課題名（和文）輸送蛋白質によるインテリジェント型ドラッグデリバリーシステムの創製

研究課題名（英文）Development of intelligent-type drug delivery system by transporter protein.

研究代表者

乾 隆（INUI TAKASHI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80352912

研究成果の概要（和文）：新生血管の内皮細胞に発現する蛋白質 CD13 を認識する Asn-Gly-Arg（NGR）をリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素（L-PGDS）に導入した NGR-L-PGDS と難水溶性抗がん剤 SN-38 との複合体を作製した。SN-38 濃度は、2 mM NGR-L-PGDS 存在下で、PBS 存在下よりも 300 倍高かった。同複合体をヒト大腸がん細胞移植ヌードマウスの静脈内に投与したところ、対照群に比べて有意な抗腫瘍効果が観測された。

研究成果の概要（英文）：We generated NGR (Asn-Gly-Arg)-lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS), possessing tumor-targeting NGR-motif, which specifically binds to CD13 receptor expressing in the endothelium of angiogenic blood vessels. NGR-L-PGDS was complexed with SN-38 which is a poorly water-soluble antitumor drug. The solubility of SN-38 in the presence of 2 mM NGR-L-PGDS in PBS increased by 300-fold as compared with that in PBS. Intravenous administration of SN-38/NGR-L-PGDS complex dominantly inhibited tumor growth as compared with control in mouse xenograft tumor model using human colon cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	20,300,000	6,090,000	26,390,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム・がんターゲット・難水溶性抗がん剤・生体内輸送蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、医薬品に対する安全性が厳しく求められているために、創薬現場において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、あるいは薬剤溶解度の向上を図るための化学修飾による薬剤活性の低下により、開発中止になった薬剤候補を

復活させる動きが始まっている。このようなニーズを実現させるには大きなブレークスルーが必要であり、その本命として、ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）が画期的治療法の根源技術として近年著しい発展を遂げている。現在、リポソーム、エマルジョン、高分子ミセルやシリカナノ粒子等を用いた DDS の研究が精力的に行

われている。特に、リポソームを用いた DDS は、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention ; がん集積性効果) を利用した標的化機構がすでに実用化されている。しかし、比較的血管密度の低いがんにおいて EPR 効果は出にくく、さらにリポソーム自身の毒性、大量調製、薬物選択性等の課題が山積されている。本申請課題である生体内輸送蛋白質を利用した DDS は、毒性 (副作用) が少なく、大量調製が可能であり、薬物選択性を付与することも可能である。申請者が提案するインテリジェント型人工蛋白質による DDS は世界的にも稀有であり、日本がこの分野をリードするための大きなブレイクスルーとなり得る。

(2) 申請者は、以前製薬企業に在籍した折、薬剤の難水溶性に対する問題に直面した経験がある。新規薬剤の合成には、生体側受容体の立体構造に基づく設計や、これまでに開発されてきた化合物に他の官能基を付加するという手法が多用され、多くは分子量の大きい化合物になっている。また、高い薬剤活性を持つ化合物を設計するためには、極性の低い化合物が合成される場合が多く、難水溶性に拍車をかける。極性の高い官能基の導入により化合物の水溶性は高められるが、薬剤活性が減じられる場合が多い。しかし近年、このような薬剤活性の減衰の観点から開発中止になった薬剤を復活させる動きが世界的に始まっており、その動きの一つとして、新規 DDS の開発が挙げられる。申請者らはこれまでに、本 DDS の鋳型蛋白質として用いるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) の構造解析、及び機能解析を行ってきた。L-PGDS は、分子量が 2 万程度の小さな蛋白質であり、非常に柔軟な構造を持つ (*J. Biochem.*, 145, 169-175, 2009; *J. Biol. Chem.*, 282, 31373-31379, 2007)。また、L-PGDS の三次元構造は  $\beta$  バレル (樽型) 構造を有し、バレル内部の疎水性ポケットは、他のリポカリンファミリー蛋白質と比べて最も大きく、分子量が 200~600 程度の疎水性低分子を非選択的、且つ高親和性に結合できる (*J. Biochem.*, 141, 173-180, 2007; *Gene*, 375, 14-25, 2006; *J. Biol. Chem.* 278, 2845-2852, 2003)。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 (*FEBS J.*, 275, 233-241, 2008)。以上の研究成果をもとに、申請者は生体内輸送蛋白質である L-PGDS を鋳型として作製した人工蛋白質が、DDS として利用できるのではないかという着想に至った。

## 2. 研究の目的

ゲノム創薬研究により発見された標的受容体へ作用する医薬候補化合物は、総じて分子量が大きく、水に対する溶解度が低い。化

学修飾法により水溶性は高められるが、薬剤活性が減じられる場合が多い。薬剤活性の高い難水溶性薬剤を効率的に疾患部に輸送できれば、難水溶性薬剤の臨床応用例を拡大し、今日まで製薬企業で困難を極めていた薬剤溶解度に対する問題を解決できる。本研究では、「難水溶性であるが故に開発から排除された薬剤を、薬剤運搬体によって利用可能にする」というコンセプトに基づき、生体内輸送蛋白質を用いたがん組織指向性を有する新規インテリジェント型人工蛋白質による DDS の創製を目的とした。これまでにリポソームや高分子ミセル等を用いた様々な DDS が構築されているが、蛋白質を用いた DDS は世界的にも稀有であり、副作用の少ない DDS として期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 受容体ターゲットの DDS として、これまでの薬理実験により DDS 効果を確認している難水溶性薬剤 (DZP, 及び NBQX) に対する結合親和性の異なる変異体 L-PGDS を作製し、薬剤複合体の薬剤活性を評価する。さらに、変異体 L-PGDS と薬剤との結合親和性 (解離定数) を求めるとともに、薬剤の標的受容体に対する解離定数との比を求め、最も効果的な DDS を可能にする結合親和性比を決定する。

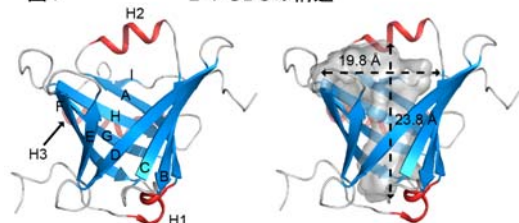
(2) 一方、がんターゲットの DDS においては、新生血管の内皮細胞特異的に発現する各種膜貫通蛋白質を認識し結合するペプチド配列を L-PGDS の N 末端、あるいは C 末端に導入し、インテリジェント型人工蛋白質 (iAP) を創製する。例として、がん組織を狙い撃つ DDS の積極的標的化 (active targeting) を行うために、新生血管の内皮細胞に発現する膜貫通蛋白質の CD13 を認識するペプチドである Asn-Gly-Arg (NGR) モチーフ、または  $\alpha\beta 3$  インテグリンを認識する isoAsp-Gly-Arg (isoDGR) モチーフを遺伝子組換えにより L-PGDS の N 末端、あるいは C 末端に導入し、iAP を作製する。上記モチーフの導入が成功すれば、さらに胃がんの腹膜腫瘍を認識する Lys-Leu-Pro (KLP)-モチーフ (*Cancer Res.*, 97, 1075-81, 2006)、転移性がん細胞を認識する Asn-Val-Val-Arg-Gln (NVVRQ)モチーフ (*Clin. Cancer Res.*, 14, 5494-502, 2008)、肝がん細胞を認識する Phe-Gln-His-Pro-Ser-Phe-Ile (FQHPSFI)モチーフ (*Mol. Med.*, 13, 246-54, 2007) 等の導入も検討し、様々なタイプのがんに対応できる iAP の作製を試みる。これまでの研究により、L-PGDS は、大腸菌発現系により大量 (30-50 mg/L) に発現できることを確認しており、上記ペプチドの導入による

人工蛋白質の精製も容易であると考えられる。また、作製された iAP と市販されている難水溶性抗がん剤（例：SN-38（大腸がん）、プロカルバジン（脳腫瘍）、ロムスチン（脳腫瘍）、イリノテカン（大腸がん）、クロラムブシル（卵巣がん）、パクリタキセル（乳がん）、タモキシフェン（乳がん））との結合の有無を確認し、結合親和性や結合様式を調べた後、複合体を作製し、上記標的がん細胞を皮下に移植したヌードマウスに対する抗がん効果を薬理的に評価する。

#### 4. 研究成果

【構造解析と相互作用解析】多次元 NMR 法、及び SPring-8 放射光を利用した X 線小角散乱法を用いて、マウス L-PGDS、及び疎水性低分子との複合体の構造解析を行った。その結果、L-PGDS は  $\beta$ -バレル（樽型）構造を有し、バレル内部にある疎水性ポケットは、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、幅 19.8 Å、深さ 23.8 Å）、分

図 1 L-PGDS の構造

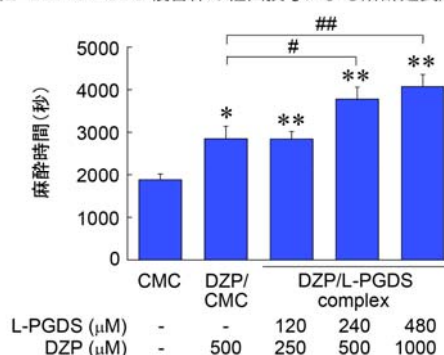


子量が 200-600 程度の疎水性低分子を非選択的に結合できることが分かった（*J. Struct. Biol.*, 169 巻, 209 頁-218 頁, 2010 年, *J. Biochem.*, 145 巻, 169 頁-175 頁, 2009 年）。また、L-PGDS は非常に柔軟な構造を持ち、疎水性低分子の結合に伴い、その慣性半径が 10% 程度減少し、コンパクトになる性質を持つことも判明した。

【*In vivo* 薬理試験】L-PGDS によって可溶化した薬物が、生体内で有効な効果を示すか否かを確認するために、難水溶性抗不安剤ジアゼパム（DZP, GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬）と L-PGDS 複合体のペントバルビタール麻酔時間延長作用を調べた。DZP は疎水性化合物であり、水系溶媒には極めて溶けにくく、動物へ適用する際にはセルロース溶媒などに懸濁させて使用されている。DZP の薬理活性を検出できる指標として、ペントバルビタール麻酔時間延長作用がある。DZP が効果を示すと麻酔時間が延長されるので、L-PGDS を用いた場合とそうでない場合において、麻酔時間を比較することにより、薬理活性の有無を判断できる。具体的には、カルボキシメチルセルロース（CMC）溶媒中に懸濁した DZP、または DZP/L-PGDS 複合体溶液（解離定数  $K_d = 90 \mu\text{M}$ ）をマウスに経口投与し、ペントバルビタール麻酔時間に及ぼす影響を調べ

た。その結果、CMC 溶液投与群（1）と比較して、DZP/CMC 投与群（2）、及び DZP/L-PGDS 複合体溶液投与群（3, 4, 5）は、ペントバルビタール麻酔時間が有意に

図 2 DZP/L-PGDS 複合体の経口投与による麻酔延長効果

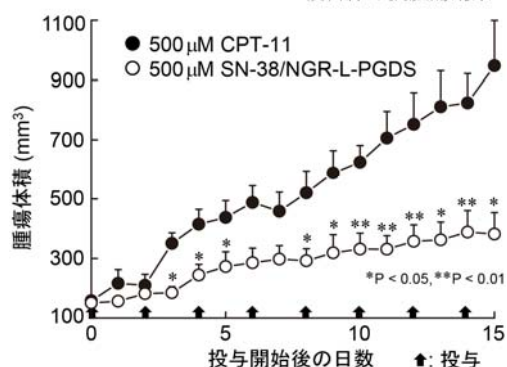


延長された（図 2、<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs DZP/CMC, <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs DZP/CMC, and  $P < 0.05$  vs CMC,  $P < 0.01$  vs CMC）。また、DZP/L-PGDS 複合体溶液投与群（3, 4, 5）は複合体の濃度依存的に麻酔時間の延長が認められた。さらに、DZP/CMC 投与群（2）と比較して、DZP/L-PGDS 複合体溶液投与群（4）は DZP 濃度が等しいにも関わらず、有意に麻酔時間の延長が認められた。以上の結果から、L-PGDS は疎水性化合物の溶解性を改善すること、またその複合体は、CMC に疎水性薬剤を懸濁させた場合に比べて、高い薬理効果を有することが判明した。L-PGDS は、CMC に比べて疎水性薬剤のバイオアベイラビリティ（生体利用率）を高めることが示唆された。

次に、がん組織に対するターゲット DDS を確立するために、まず難水溶性抗がん剤の可溶化による薬理効果を調べた。L-PGDS に内包する難水溶性抗がん剤として SN-38 を用いた。SN-38 は難水溶性のためそのままでの投与が難しく、その誘導体であるイリノテカン（CPT-11）が実臨床に展開され、大腸がん、肺がん、卵巣がんなどに用いられている。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、その効果は SN-38 に比べて低いこと、CE 活性に個人差があること、そして重篤な下痢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 の直接利用が望まれている。等温滴定熱量測定法により、L-PGDS と SN-38 との結合親和性 ( $K_d$  値)、及び結合比を求めたところ、 $K_d = 60 \mu\text{M}$ 、及び結合比 = 1:2 となり、1 分子の L-PGDS に 2 分子の SN-38 が結合することが判明した。さらに、SN-38 の溶液中濃度は、2 mM L-PGDS 存在下では、PBS 存在下と比較して 300 倍も高いことが判明した。次に、500  $\mu\text{M}$  SN-38/L-PGDS 複合体をヒト大腸がん細胞株 Colo201 細胞移植ヌードマウスの静

脈内に投与したところ、同濃度の CPT-11 投与群に比べて有意な抗腫瘍効果が観測され

図3 SN-38/NGR-L-PGDS 複合体の抗腫瘍効果



た (図 3, 特願 2010-078300)。

以上より、本 DDS は、(1) ヒト生体内タンパク質を利用しており、キャリア自身が低抗原性であり安全性が高い、(2) キャリアーと薬剤の結合比が明らかとなるので、薬剤投与量を正確に把握できる、(3) がん組織への標的指向性を有するので、薬剤自身の副作用を軽減できる、(4) 内包薬剤に適したキャリアーのテーラード設計が可能である。以上の点において、リポソーム、高分子ミセル、シクロデキストリンなどを用いた競合技術に対する優位性が高いと考えられる。蛋白質によるがんターゲットング DDS は、世界的にも稀有であり、学術的新規性、及び独創性が高く、我が国が世界の DDS 分野をリードするための大きなブレークスルーとなり得る。

#### 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 10 件)

- ① Fukuhara, A., Nakajima, H., Miyamoto, Y., Inoue, K., Kume, S., Lee, YH., Noda, M., Uchiyama, S., Shimamoto, S., Nishimura, S., Ohkubo, T., Goto, Y., Takeuchi, T., and Inui, T. (correspondence author) Drug delivery system for poorly water-soluble compounds using lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Control. Release*, 159 巻, 143 頁-150 頁, 2012 年. 査読有
- ② Fukuhara, A., Yamada, M., Fujimori, K., Kusumoto, T., Nakajima, H., and Inui, T. (correspondence author) Lipocalin-type prostaglandin D synthase protects against oxidative stress-induced neuronal cell death. *Biochem. J.*, 443 巻, 75 頁-84 頁, 2012 年. 査読有
- ③ Miyamoto, Y., Noda, Y., Iida, T., Yamaguchi, K., Nishimura, S., Tanaka, A., Segawa, S., and Inui, T. (correspondence author) NMR and CD analysis of an intermediate state in the thermal unfolding process of mouse

lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Biochem.*, 151 巻, 335 頁-342 頁, 2012 年. 査読有

- ④ Fujimori, K., Fukuhara, A., Inui, T., and Allhorn, M. Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Neurochem.*, 120 巻, 279 頁-291 頁, 2012 年. 査読有
- ⑤ Miyamoto, Y., Nishimura, S., Inoue, K., Shimamoto, S., Yoshida, T., Fukuhara, A., Yamada, M., Urade, Y., Yagi, N., Ohkubo, T., and Inui, T. (correspondence author) Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR. *J. Struct. Biol.*, 169 巻, 209 頁-218 頁, 2010 年. 査読有
- ⑥ Nakajima, H., Amano, W., Kubo, T., Fukuhara, A., Ihara, H., Azuma, Y., Tajima, H., Inui, T., Sawa, A., and Takeuchi, T. GAPDH aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 284 巻, 34331 頁-34341 頁, 2009 年. 査読有

[学会発表] (計 45 件)

- ① 河野正樹, 福原彩乃, 山田晃平, 井上遥, 久米慧嗣, 城田涼子, 李映昊, 後藤祐児, 乾 隆, 「がんターゲットング機能を有するインテリジェント型薬剤輸送蛋白質を用いた SN-38 のドラッグデリバリーシステム」第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 & 23 日, 国立京都国際会館 (京都)
- ② Fukuhara, A., Nakajima, H., Miyamoto, Y., Kume, S., Lee, YH., Noda, M., Uchiyama, S., Ohkubo, T., Goto, Y. and Inui, T. Drug Delivery System for Poorly Water-soluble Compounds Using Lipocalin Protein. The 25th Annual Symposium of The Protein Society, 2011 年 7 月 25 日, Boston Marriott Copley Place (Boston, USA)
- ③ 福原彩乃, 久米慧嗣, 河野正樹, 人見麻衣, 李映昊, 後藤祐児, 中嶋秀満, 乾 隆, 「難水溶性薬物の経口投与におけるリポカリン蛋白質の効果」第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学本郷キャンパス (東京)
- ④ 福原彩乃, 中嶋秀満, 宮本優也, 久米慧嗣, 李映昊, 野田勝紀, 内山進, 西村重徳, 大久保忠恭, 後藤祐児, 乾 隆,

- 「リポカリン蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対するドラッグ・デリバリー・システムの開発」第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪)
- ⑤ 乾 隆「リポカリン蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規 DDS」, 近畿バイオインダストリー振興会議, 第 25 回 技術シーズ公開会, 2010 年 12 月 6 日, 大阪科学技術センター (大阪)
- ⑥ 乾 隆「輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する DDS の開発-X 線小角散乱による蛋白質・薬剤複合体の構造解析」, SPring-8 利用推進協議会 第 11 回蛋白質企業研究会, 2010 年 11 月 16 日, 大型放射光施設 (SPring-8) 普及棟 (兵庫)
- ⑦ 乾 隆「生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規ドラッグデリバリーシステムの開発」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2010 年 10 月 21 日, 大阪大学 (大阪)
- ⑧ 乾 隆「生体内輸送蛋白質のドラッグデリバリーシステムへの応用」, 第 46 回熱測定討論会, 2010 年 9 月 27-29 日, 三重大学 (三重)
- ⑨ Fukuhara, A., Nakajima, H., Inoue, K., Miyamoto, Y., Shimamoto, S., Nishimura, S., Ohkubo, T., Takeuchi, T., Inui, T. Drug Delivery System for Poorly Water-soluble Drugs by Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase. The 24<sup>th</sup> Annual Symposium of The Protein Society, 2010 年 8 月 1-5 日, California, USA
- ⑩ Fukuhara, A., Nakajima, H., Inoue, K., Miyamoto, Y., Nishimura, S., Yagi, N., Takeuchi, T., Inui, T. Protective effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase/NBQX complex on neuronal cell death induced by cerebral ischemia, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)
- ⑪ 乾 隆, 「生体内輸送蛋白質を用いた難水溶性薬剤に対する新規 DDS の開発」, 第 8 回国際バイオフォーラム, 2009 年 7 月 1-3 日, 東京ビックサイト (東京)
- ⑫ Fukuhara, A., Yamada, M., Kusumoto, T., Nakajima, H., Nishimura, S., and Inui, T. Protective effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase on oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. VIII European Symposium of The Protein Society, 2009 年 6 月 14-18 日, Zurich, Switzerland
- ⑬ 飯田津喜美, 宮本優也, 深田はるみ, 田中晶善, 裏出良博, 乾 隆, 「ヒトリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の熱変性過程の解析」, 第 9 回日本蛋

白質科学会, 2009 年 5 月 20-22 日, 熊本

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: DDS カプセル用蛋白質およびそれを用いた薬剤とその調整方法

発明者: 乾 隆

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-027389 号

出願年月日: 2012 年 2 月 10 日

国内外の別: 国内

名称: 標的結合部を有する薬剤運搬体

発明者: 乾 隆

権利者: 大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-078300 号

出願年月日: 2010 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ情報

<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・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 80352912

### (2) 研究分担者

中嶋 秀満 (NAKAJIMA HIDEMITSU)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 30405360