

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06704

研究課題名(和文)腫瘍血管を制御し薬物集積を増強させる腫瘍選択作動型ブラジキニンの創製

研究課題名(英文) Synthesis of tumor-selective bradykinin enhancing tumor accumulation of nanomedicine

研究代表者

中村 秀明 (Hideaki, Nakamura)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：30435151

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)：がん選択的に作動するブラジキニン(CS-BK)の創製を企図し、pH応答性が異なるHPMAポリマー結合型ブラジキニン(P-BK)を調整し、高分子抗がん剤の腫瘍集積性を検討した。pH応答性の要となるヒドラゾン結合の隣接基を変えることで、活性を損なわずにpH応答性の調節が可能であった。ポリマー結合体であるP-BKは血漿中安定性が高くBK様活性は低かったが、酸性環境に反応してBKを放出し、血管透過性亢進活性の回復がみられた。またP-BKの投与により腫瘍への流入血液量が増大し、高分子性薬剤の腫瘍集積性ならびに抗腫瘍効果の増大がみられ、これらの効果はpH応答性の高いP-BKにおいて顕著に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子性抗がん剤(抗体医薬品やリポソーム製剤)は腫瘍などの内皮細胞間隙が広い血管を有する臓器に選択的に分布する特徴を持ち、腫瘍を標的とした多くの高分子性抗がん剤が研究・開発されてきた。しかし難治性がんでは流入血液量が乏しく血管透過性が高くないため、抗がん剤が送達されにくく、がん治療を行う上での難点の一つとなっている。ブラジキニンなどの血管作動性因子を腫瘍選択的に作用させるP-BKを用いた、腫瘍への流入血液量ならびに腫瘍血管の血管透過性を制御し、高分子性抗がん剤の腫瘍集積性を増強しようとする研究は、高分子性抗がん剤を用いたがん治療を行う上で、重要な基礎研究になると思われる。

研究成果の概要(英文)：The pH-responsive HPMA-polymer conjugates of bradykinin (P-BK), which have different pH-responsiveness, were synthesized to investigate their effect on tumor accumulation of high molecular weight anticancer agents. The pH-responsiveness of the HPMA-polymer conjugate, P-BK, could be modulated by changing the substituent adjacent to the hydrazone linkage without loss of BK activity. Although P-BK had higher plasma stability and low BK-like activity, release of BK in response to an acidic environment resulted in restoration of its vascular permeability-increasing activity. Administration of P-BK increased blood flow to the tumor and enhanced tumor accumulation of anticancer drugs, leading to improved anti-tumor effects of the anticancer drugs. These effects were more pronounced with the more pH-sensitive P-BK.

研究分野：医療薬学

キーワード：ブラジキニン 腫瘍 pH応答性 ポリマー

1. 研究開始当初の背景

がん治療においては、腫瘍血管網を介して抗がん剤が腫瘍内に送達されるが、難治性がんでは流入血液量が乏しく抗がん剤が送達されにくいいため、がん治療を行う上での難点の一つとなっている。これまでにブラジキニンの血管透過性亢進活性を利用した脳腫瘍への薬物送達増強法が報告されているが、用いられているブラジキニンアナログはいずれも全身に作用しうる薬物設計であるため、脳腫瘍以外の固形腫瘍に対しては、血圧低下による腫瘍への血流減少のため腫瘍への薬物集積性を減弱させると考えられる。これまでに申請者グループは腫瘍選択的に作動するブラジキニン（CS-BK）のプロトタイプを作製し、マウス結腸がん皮下移植モデルに CS-BK を静脈内投与することで、正常皮下へは影響せずに、皮下腫瘍への流入血液量が3時間以上にわたり50%以上増加すること、高分子の腫瘍集積量が40 - 70%増強することを確認している。しかし、CS-BK が持つ pH 応答性の最適化や抗腫瘍効果に関する検討は行えておらず、本研究において明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、高分子性抗がん剤の腫瘍集積性・抗腫瘍効果を増強しうる、性質の異なる複数の腫瘍選択作動型ブラジキニン（CS-BK）を創製し、がんマウスモデルにおいて、その作用を明らかにする事を目的とする。本研究計画で着目するブラジキニンは一酸化窒素の放出に基づく血管拡張作用を持ち、さらにプラスミノゲン活性化因子の放出作用を併せ持つ。そのため、一酸化窒素による血管拡張作用に加え腫瘍血管内の血栓溶解作用による、協調的な腫瘍内血流の増加が期待される。本作用を実現するには、腫瘍組織選択的に作動するブラジキニンの作製が必須であり、本研究計画で取り組む課題の一つである。申請者グループは生体親和性ポリマーを用い、腫瘍の微酸性環境で活性薬物を放出させるユニークな技術を応用し、CS-BK の作製が達成できるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) P-BK の合成：ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド（HPMA）をベースとしたヒドラジド含有 HPMA コポリマー（HPMA-hyd ポリマー）を RAFT 重合法により合成した。N 末端にケト基を持つブラジキニン誘導体は、Fmoc 固相合成法により合成し HPLC により精製した。精製した各ブラジキニン誘導体は HPLC および MALDI TOF/MS により確認を行った。HPMA-hyd ポリマーへのブラジキニン誘導体の結合は酸触媒存在下のメタノール中で行い、未反応のブラジキニン誘導体はサイズ排除クロマトグラフィにより除き凍結乾燥を行うことで粉末の P-BK を得た。

(2) P-BK からの pH 依存的なブラジキニンの放出：P-BK を pH7.4 および pH6.8 のリン酸緩衝液に溶解し 37 °C でインキュベーションし、経時的に P-BK から放出されたブラジキニンをサイズ排除クロマトグラフィにより定量した。

(3) 血管透過性亢進活性の測定：SD ラットに蛍光標識アルブミンを尾静脈より投与し、次いで P-BK またはブラジキニン誘導体をラット背部皮内に投与し、皮内投与部位への蛍光標識アルブ

ミンの滲出量を in vivo 光イメージング装置を用いて定量することで、血管透過性亢進作用の相対活性を測定した。

(4) 血漿安定性：ブラジキニン誘導体または P-BK をラット血漿中でインキュベーションした。経時的に回収し、0.25 M 塩酸を処理することで血漿中酵素の不活化ならびにポリマーからブラジキニンを完全に遊離させた。ブラジキニン誘導体を固相抽出後に逆相 HPLC を用いて未分解のブラジキニンを定量した。

(5) 高分子薬物の体内分布に与える -BK の影響：担がんモデルマウスは、Balb/c 雄性マウスの皮下にマウス結腸がん細胞 (C26) を接種することで作製した。C26 担がんマウスに各 P-BK を BK として 2 mg/kg を尾静脈より投与した。経時的に蛍光標識アルブミンを尾静脈より投与し、24 時間後に各臓器内に分布した蛍光標識アルブミンを定量した。

4. 研究成果

(1) P-BK の合成：図 1 に示す通り、カルボニルに隣接する R に異なる基を導入することで 3 種のブラジキニン誘導体を合成した。次いでヒドラジド基を有する HPMA ポリマーにブラジキニン誘導体を脱水縮合させ、3 種の pH 応答性ポリマー結合型ブラジキニン (P-BK) (P-MeBK、P-CPBK、P-PhBK) を調整した。P-BK は粉末として -80 に保存し、長期間 (~1 年間) にわたり安定であった。

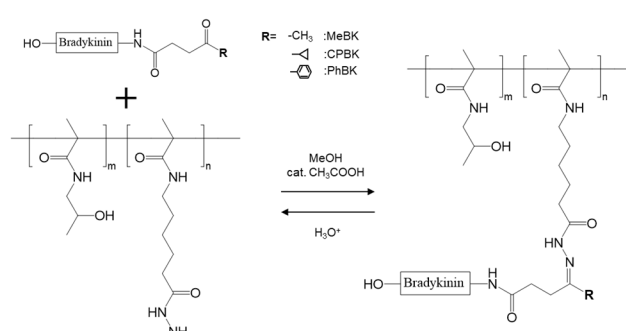


図 1. P-BK の構造と可逆反応

(2) pH 依存的なブラジキニンの放出と活性化：3 種の P-BK も酸性環境において BK の放出の促進がみられた (図 2)。さらに P-BK の pH 応答性は図 1 に示すヒドラゾン結合に隣接する R 基を変えることで大きく変化し、メチル > サイクロプロピル > フェニルの順に pH 応答性が変化した (図 2A, B)。pH 7.4 におけるそれぞれの速度定数は (メチル ; 0.18、シクロプロピル ; 0.047、フェニル ; 0.0024) であった。

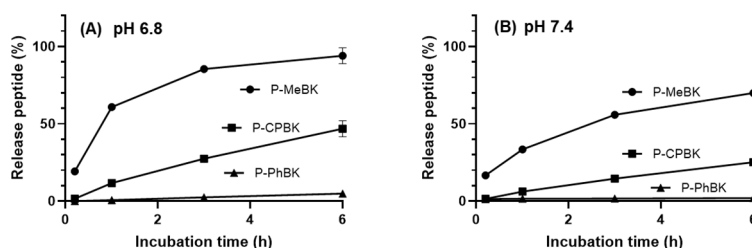


図 2. pH 依存的なブラジキニンの放出

ブラジキニン誘導体の血管透過性亢進活性を検討したところ、ブラジキニンの誘導体化によっては殆ど活性の変化はみられなかった。一方、ポリマー結合体では活性の著しい減弱がみられ、

本結果は P-BK が血管透過性亢進活性を示すには、ポリマーからの放出が必要であることを示唆している。また、血中ではポリマー体として主に存在していると予想され、ブラジキニンを投与したラットではその作用により顕著な血圧の低下がみられたが、P-BK の投与によっては血圧の低下はみられなかったことから、血中では非活性の状態が存在していると考えられた。

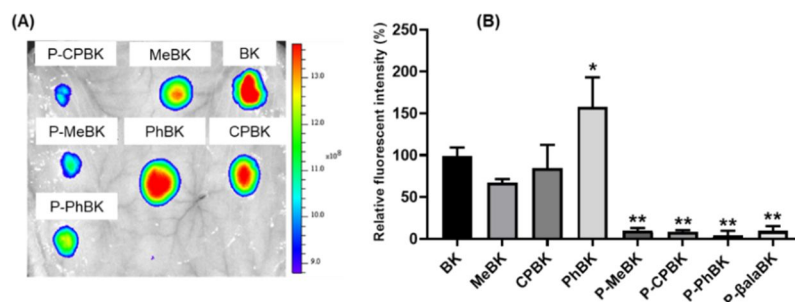


図 3 . ブラジキニン誘導体の血管透過性亢進活性

(3) 血中安定性：既報の通りブラジキニンは血漿安定性が低く、速やかに未分解のペプチドは消失していた。フェニル置換体を除き、ブラジキニン誘導体では血漿中安定性の変化はみられなかった。一方、ポリマー結合体はその遊離体と比較して血漿安定性の向上がみられた。

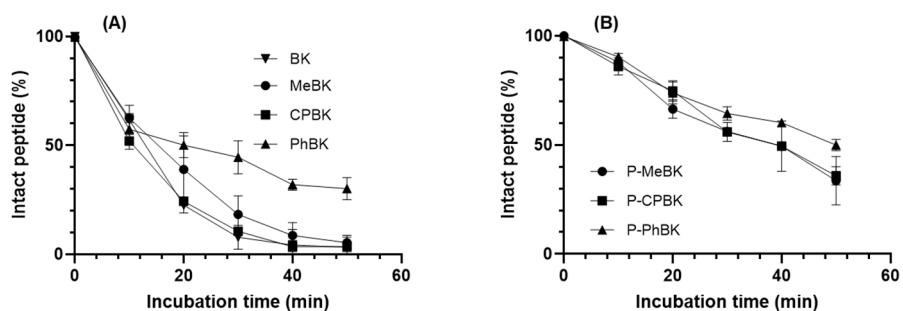


図 4 . ブラジキニン誘導体の血漿中安定性

(4) 高分子薬物の腫瘍集積性への影響：C26 担がんマウスを用いて蛍光標識アルブミンの腫瘍への集積に P-BK が影響するかを検討した。P-MeBK の前投与により蛍光標識アルブミンの腫瘍集積性が約 2 倍程度に増加し、同現象はドキソルビシン含有リポソームに対してもみられた。いっぽう、P-PhBK の前投与でわずかに腫瘍集積性の向上がみられたものの、P-CPBK の前投与によっては腫瘍集積性の向上はみられなかった。本作用はブラジキニンの持つ血管拡張作用に付随して起こると考えられ、実際に P-MeBK の投与により皮下腫瘍内への血流量の増加がみられた。また、ドキソルビシン含有リポソームによる抗腫瘍効果の増大がみられ、高分子性抗がん剤の併用薬として有効である可能性が示された。

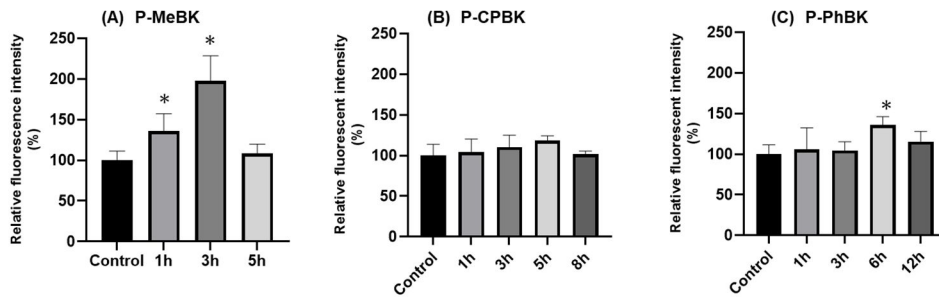


図 5 . P-BK 投与による蛍光標識アルブミンの腫瘍集積性への影響

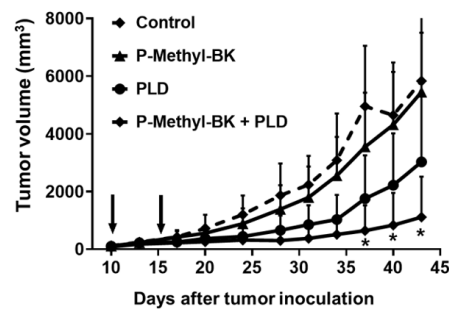


図 6 . P-BK 投与による抗がん剤の抗腫瘍効果に対する影響

本研究では HPMA ポリマーにヒドラゾン結合を介してブラジキニンを結合することにより、腫瘍環境が示す微酸性環境に反応してブラジキニンを放出し、血管透過性亢進活性を示すことを明らかにした。また、その放出速度はヒドラゾン結合に近接する基に電子供与性基を導入することで、pH 応答性を調節できることを明らかにした。しかし、ブラジキニンの血漿安定性は低いため、放出が遅い P-BK はブラジキニン様活性を示す前に分解していると考えられ、放出が速い P-BK において、抗がん剤の腫瘍集積増強作用や抗腫瘍作用の増強がみられた。今後はブラジキニンの安定化を検討し、より有効な P-BK の作製に取り組む必要がある。

< 引用文献 >

(1) Appiah E, Nakamura H, Assumang A, Etrych T, Haratake M. Chemical modification of bradykinin-polymer conjugates for optimum delivery of nanomedicines to tumors. *Nanomedicine*. 2024 Apr;57:102744. doi: 10.1016/j.nano.2024.102744. Epub 2024 Mar 8. PMID: 38460653.

(2) Appiah E, Nakamura H, Pola R, Grossmanová E, Lidický O, Kuniyasu A, Etrych T, Haratake M. Acid-responsive HPMA copolymer-bradykinin conjugate enhances tumor-targeted delivery of nanomedicine. *J Control Release*. 2021 Sep 10;337:546-556. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.009. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34375687.

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Appiah Enoch, Nakamura Hideaki, Pola Robert, Grossmanova Eliska, Lidicky Ondrej, Kuniyasu Akihiko, Etrych Tomas, Haratake Mamoru	4. 巻 337
2. 論文標題 Acid-responsive HPMA copolymer-bradykinin conjugate enhances tumor-targeted delivery of nanomedicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 546-556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2021.08.009	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 Appiah Enoch, Nakamura Hideaki, Assumang Anthony, Etrych Tomas, Haratake Mamoru	4. 巻 57
2. 論文標題 Chemical modification of bradykinin-polymer conjugates for optimum delivery of nanomedicines to tumors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 102744 - 102744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nano.2024.102744	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 Assumang Anthony, Hideaki Nakamura, Appiah Enoch, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 Synthesis and Evaluation of Biological Properties of Retro-inverso Bradykinin
3. 学会等名 第40回薬学会九州山口支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Assumang Anthony, Hideaki Nakamura, Appiah Enoch, Mamoru Haratake
2. 発表標題 腫瘍への薬物送達経路を整備するポリマー結合型レトロインバージョンブラジキニンの合成
3. 学会等名 第144回日本薬学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Assumang Anthony, Hideaki Nakamura, Appiah Enoch, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 血中安定性を高めたポリマー結合型レトロインパーソブラジキニンの合成
3. 学会等名 第39回日本DDS学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堂園健太郎、Appiah Enoch、中村秀明、高橋舎那、中尾恵、仲谷唯、原武衛
2. 発表標題 抗がん剤の腫瘍集積を増強するポリマー結合型レトロインパーソブラジキニンの創製
3. 学会等名 第39回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Enoch Appiah, Hideaki Nakamura, Robert Pola, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 pH応答性ポリマー結合型ブラジキニンによる 高分子性抗がん剤の腫瘍集積増強作用
3. 学会等名 第38回日本DDS学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村秀明、Appiah Enoch、Asman Anthony、原武衛
2. 発表標題 抗がん剤の腫瘍集積増強を企図したポリマー結合型レトロインパーソブラジキニンの合成
3. 学会等名 第143回日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Enoch Appiah, Hideaki Nakamura, Robert Pola, Kuniyasu Akihiko, Tomas Etrych, Mamoru Haratake
2. 発表標題 腫瘍指向性高分子化ブラジキニンによる抗がん剤の腫瘍集積増強法
3. 学会等名 第142回日本薬学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Appiah Enoch, Nakamura Hideaki, Pola Robert, Grossmanova Eliska, Lidicky Ondrej, Kuniyasu Akihiko, Etrych Tomas, Haratake Mamoru
2. 発表標題 腫瘍指向性高分子化ブラジキニンによる血流改善に基づく抗がん剤の腫瘍集積増強法
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Appiah Enoch, Nakamura Hideaki, Pola Robert, Grossmanova Eliska, Lidicky Ondrej, Kuniyasu Akihiko, Etrych Tomas, Haratake Mamoru
2. 発表標題 pH応答性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37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021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			
チェコ	チェコ高分子科学研究所			