

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15327

研究課題名（和文）高分子化抗がん剤のがん組織集積性を増強するがん指向性NO徐放剤の開発

研究課題名（英文）Development of tumor-targeting NO sustained release agent that enhances tumor accumulation of macromolecular antitumor drugs

研究代表者

月川 健士 (Tsukigawa, Kenji)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：60772027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者グループ開発の一酸化窒素（NO）徐放剤（NPB）と、がん指向性に優れたヒト血清アルブミン（HSA）を結合させた、がん指向性NO徐放剤（HSA-NPB）の開発に取り組んできた。がん組織にNOを特異的かつ持続的に作用させ、がん組織の血流の持続的な増大による薬物集積性と治療効果の増強を企図した薬剤である。まずHSA-NPBを作製し、NO徐放性を確認した。担がんマウスに、高分子化抗がん剤と同時投与すると、単独時より高い治療効果が得られた。本研究の成果は、高分子化抗がん剤と併用するだけで、そのがん組織集積性や治療効果を増強する、新規がん治療戦略の開発につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、NPBのNO徐放性とHSAのがん指向性を活用し、腫瘍組織の血流の持続的な増大と、それによる腫瘍集積性と治療効果の増強を企図した薬剤 HSA-NPBを開発した。高分子化抗がん剤の腫瘍集積性が低い場合、治療効果の減弱や副作用とともに、抗がん剤多量使用による医療費増大の要因となるため、腫瘍集積性の増強を志向した研究は極めて大きな意義がある。実際に高分子化抗がん剤と併用することで、単独時より高い治療効果が得られた。HSA-NPBは、種々の高分子化抗がん剤と併用できるため、がん治療戦略が広がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a tumor-targeting nitric oxide (NO) sustained-releasing agent (HSA-NPB) by combining NO sustained-release agent (NPB) developed by our laboratory with human serum albumin (HSA), which has excellent tumor-targeting properties. HSA-NPB is designed to specifically and continuously act on tumor tissue with NO, and to enhance drug accumulation through a sustained increase in blood flow in tumor tissue. At first, we prepared HSA-NPB, in which two molecules of NPB are bound to one molecule of HSA, and confirmed the sustained release of NO. Then, we showed that the simultaneous administration of a macromolecular antitumor drug and HSA-NPB to tumor-bearing mice resulted in higher therapeutic efficacy than when the macromolecular antitumor drug was administered alone. These results indicate that HSA-NPB is a promising agent to enhance the tumor accumulation and therapeutic activity of macromolecular antitumor drug.

研究分野：医療薬学

キーワード：一酸化窒素 アルブミン 高分子化抗がん剤 EPR効果 抗がん効果

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「がん」は死亡率の高い深刻な疾患であり、安全かつ効果的な治療法の開発が必要不可欠である。治療法の一つである抗がん剤治療は広く行われているが、投与された抗がん剤の血中滞留性やがん組織集積性が低く、がん組織に到達できる抗がん剤はごく一部でしかない。そこで、抗がん剤のがん組織集積性や治療成果の向上を目指して、数多くの高分子化抗がん剤が開発されており、現在リポソーム製剤などが上市されている。これらは、高分子ががん組織に集積する特性を利用したものであるが、この特性を駆使しても、そのがん組織集積性は、投与量の数%程度である。また、がん組織の血流量にも大きく左右されてしまう。

一酸化窒素 (NO) は、がん組織の血流を改善し、高分子化抗がん剤のがん組織集積性を増強できるが、生体内寿命が極めて短いため、効果は一時的である。また、体内分布の制御が困難であるため、低血圧などの副作用が懸念される。そこで、申請者グループ開発のユニークな NO 徐放剤 (NPB) と、がん指向性に優れたヒト血清アルブミン (HSA) を活用して、「がん指向性 NO 徐放剤 (HSA-NPB)」を作製し、がん組織に NO を選択的かつ持続的に作用させることを目指した。本研究では、この HSA-NPB が、がん組織の血流を改善し、高分子化抗がん剤のがん組織集積性や抗がん効果を増強できるか検証することとした。

2. 研究の目的

本研究では、申請者グループ開発のユニークな NO 徐放剤 (NPB) と、がん指向性に優れたヒト血清アルブミン (HSA) を結合させ、「がん指向性 NO 徐放剤 (HSA-NPB)」を作製する。この HSA-NPB は、がん組織に NO を選択的かつ持続的に作用させることで、がん組織の血流の持続的な増大と、それによる薬物集積増強効果を企図した薬剤である。HSA-NPB の作製から NPB 結合数の定量や、HSA-NPB からの NO 徐放性を確認するとともに、マウス大腸がん (Colon 26) モデルマウスを用いて、高分子化抗がん剤のがん組織集積性や抗がん効果を増強できるか検証し、HSA-NPB の有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NPB 活性化エステル (NPB-NHS) の合成

HSA と NPB を結合させる前に、まずは N,N' -ジスクシンイミジルカルボネートを用いて、NPB の活性化エステル (NPB-NHS) を合成した。合成物は、HPLC、¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-Mass (ESI) を用いて確認した。

(2) HSA-NPB の作製

HSA-NPB は、HSA のリジン残基のアミノ基と NPB のカルボキシル基を結合させることで作製する。上述の NPB-NHS を HSA 溶液に加え、HSA 上のアミノ基と反応させ、限外濾過 (未反応の NPB-NHS や NPB を除去) 凍結乾燥を経て、HSA-NPB の粉末を得た。HSA1 分子あたりの NPB 結合数は、アミノ基の定量法の一つである TNBS 法を用いた。HSA 中のリジン残基類縁体として、アセチルリジンアミドを用いた検量線をもとに、HSA 中と HSA-NPB 中のリジン残基のアミノ基をそれぞれ定量し、消費されたアミノ基数を算出することで、HSA1 分子あたりの NPB 結合数を算出した。HSA-NPB からの NO 放出性は、NO 定量キットを用いて、経時的に水溶液中における NO 放出を測定した。

(3) HSA-NPB からの NO 放出性の確認

HSA-NPB から放出される NO は、NPB から放出される硝酸・亜硝酸イオン (NO_x) に由来する。HSA-NPB を PBS に溶解し、経時的に NO_x 放出を測定することで HSA-NPB からの NO 放出性を確認した。NO_x の測定は NO 定量キットを用いて測定した。

(4) がん組織への薬物集積性に関する検討

HSA-NPB 併用により、がん組織への薬物集積性が向上するか検証した。本研究では、薬物として、がん集積性を評価する色素エバンスブルー、蛍光標識 (Cy5) した HSA (高分子化抗がん剤のモデル) ドキソルピシン封入リポソーム (高分子化抗がん剤) を用いた。これらについて、Colon 26 担がんマウスに HSA-NPB (0.8 μg/kg as NPB) と同時投与した際のがん組織や正常組織への集積量の変化を評価し、様々な高分子化抗がん剤に有効であるかを検討した。エバンスブルーについては、投与から一定時間経過後、各組織を摘出し、各組織内のエバンスブルーをジメチルホルムアミドを用いて抽出し、定量した。また、蛍光標識した HSA やドキソルピシン封入リポソームについては、*in vivo* 蛍光イメージング装置 IVIS を用いて観察した。

(5) HSA-NPB と高分子化抗がん剤併用時の抗腫瘍効果の検討

HSA-NPB と併用し、高分子化抗がん剤単独投与時より、高い治療効果が得られるか検証した。がんサイズが 3~6 mm の Colon 26 担がんマウスに対して、ドキソルピシン封入リポソーム (2

mg/kg) と HSA-NPB (NPB として 0.8 μmol/kg) を同時に 1 回静脈投与し、経時的に、ノギスを用いてがん体積の測定や体重変化の測定を行った。

4. 研究成果

(1) HSA-NPB の合成

本研究では、HSA 1 mol 当たり 2 mol の NPB-NHS を反応させ、HSA-NPB を作製したが (図 1) TNBS 法により、HSA 1 mol 当たり約 2 mol の NPB が結合していると算出された (2.13 mol / mol HSA)。このことから、本研究での反応条件下では、おおよそ理論的当量比通りに結合することが示唆された。また、HPLC を用いて元の NPB や NPB-NHS などが含まれないことを確認した。DLS 測定の結果から、水溶液中でのサイズは、約 10 nm であった。HSA (約 10 nm) と変わらず、HSA-NPB 分子同士の凝集は見られないことが示唆された。

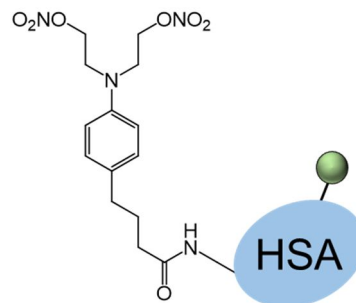


図 1 HSA-NPB の構造

(2) HSA-NPB からの NO 放出性の確認

NPB からの NO 放出については、48 時間以上継続することが報告されている。HSA-NPB においても、同程度の NO 徐放性を示すことを確認した。

(3) がん組織への薬物集積性に関する検討

本研究では、マウス大腸がん Colon 26 担がんマウスに、薬剤と HSA-NPB を同時投与し、各薬剤の腫瘍集積性が増強されるか検討した。図 2 に示すように、エバンスブルー単独時や NPB との併用時と比較すると、HSA-NPB との併用時は、エバンスブルーの腫瘍組織内濃度が有意に高かった。さらに、エバンスブルーの腫瘍組織内濃度 / 血中濃度比においても、HSA-NPB 併用によって、エバンスブルーの腫瘍集積性の有意な増加が見られた。これらのことから、HSA-NPB は NPB よりも、腫瘍組織へ特異的に NO を送達することが可能であり、その結果、薬物集積性が増強されたと考えられた。

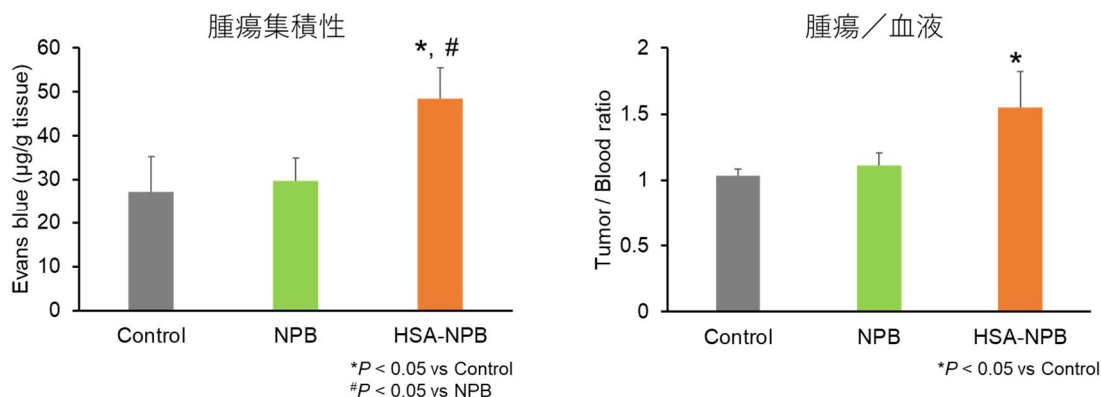


図 2 NPB あるいは HSA-NPB 併用時のエバンスブルーの腫瘍集積性

続いて、HSA 高分子化抗がん剤のモデル、蛍光色素 Cy5 を結合させた HSA (Cy5-HSA) を用いて、HSA-NPB の同時投与により、Cy5-HSA の腫瘍集積性が増強されるのか、蛍光イメージング法にて検討した。HSA-NPB と Cy5-HSA を同時投与すると、腫瘍への集積が有意に増加した (図 3)。また、ドキソルピシン封入りポソームについても同様の結果が得られた。

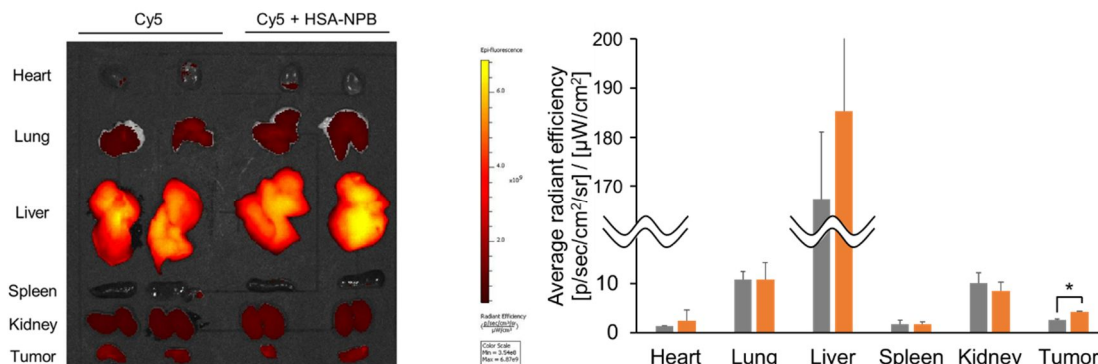


図 3 HSA-NPB 併用時の Cy5-HSA の腫瘍集積性

(4) HSA-NPB と高分子化抗がん剤併用時の抗腫瘍効果の検討

HSA-NPB 併用により高分子化抗がん剤ドキシソルビシン封入リポソームの抗腫瘍効果が増強されるか検討した。図4に示すように、Colon 26 担がんマウスに、ドキシソルビシン封入リポソームと HSA-NPB を同時投与することによって、ドキシソルビシン封入リポソーム単独時より高い治療効果が得られた。また、体重減少や毛並みの変化など明らかな毒性は確認されなかった。

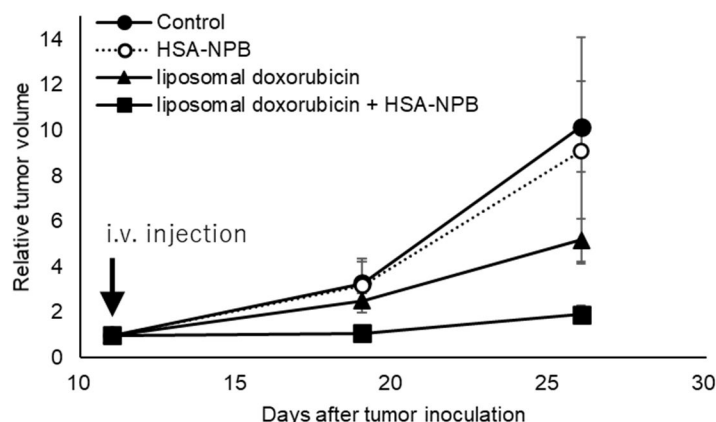


図4 HSA-NPB 併用時のドキシソルビシン封入リポソームの抗腫瘍効果

近年、がん組織への薬物集積増強に関しては、重要性が認識されており、種々の高分子化抗がん剤が開発されている。このような抗がん剤のがん集積性改善を図る研究は、高分子化抗がん剤自身のサイズや表面電荷などに注目するものが多いが、それらは高分子化抗がん剤の体内動態や毒性に大きく影響を与えてしまう。本研究では、高分子化抗がん剤自身の改良ではなく、高分子化抗がん剤と併用するだけで、そのがん組織集積性や治療効果を増強する、がん指向性 NO 徐放剤 HSA-NPB の開発を行った。実際に HSA-NPB は、高分子化抗がん剤の腫瘍集積性を高め、その結果、抗腫瘍効果を増強できることを示した。一方、本研究においては、HSA-NPB と高分子化抗がん剤を同時投与したが、HSA-NPB からの NO 徐放性を考慮すると、集積増強効果の持続性に関する検討が必要である。今後も、HSA-NPB と高分子化抗がん剤の投与間隔の最適化など種々の検討を進めていくことで、安全かつ効果的な新規がん治療戦略 (HSA-NPB 併用療法) の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 月川 健士
2. 発表標題 高分子特性と腫瘍特異的環境の理解に基づく腫瘍指向型DDSの開発研究
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 月川 健士、井本 修平、今村 思音、入江 直樹、安藤 綾乃、西 弘二、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 酸性環境応答性を有するアルブミン結合型抗がん剤の抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有村 吉史、西 弘二、別府 拓豪、森川 颯馬、松元 綾菜、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ニトロ化フェニル酪酸のヒト膵臓がん細胞死誘導におけるオートファジー阻害の関与
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 月川 健士、盛満 政也、和田 啓介、井本 修平、西 弘二、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 酸性環境応答性アルブミン結合型抗がん剤放出性と抗腫瘍効果
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 月川 健士、井本 修平、今村 思音、入江 直樹、西 弘二、堤 敏彦、横山 祥子、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 酸性環境応答性を発揮するアルブミン結合型抗がん剤の作製と抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膀胱がん細胞におけるニトロ化フェニル酪酸のオートファジー阻害効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膀胱がん細胞におけるニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導メカニズムの解明と抗腫瘍効果の評価
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 月川 健士、井本 修平、西 弘二、堤 敏彦、横山 祥子、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膀胱がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導メカニズムの解明
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