

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25248044

研究課題名(和文) 難水溶化という従来の逆の分子設計に基づく新規薬剤ナノ粒子の創製とその薬効評価

研究課題名(英文) Creation of novel drug nanoparticles based on the conventional reverse molecular design using poor water-soluble compounds and the efficacy evaluation

研究代表者

笠井 均 (KASAI, HITOSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30312680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円

研究成果の概要(和文)：従来の薬設計の構想とは真逆ともいえる本プロジェクトでは、抗癌性薬効化合物に難水溶性置換基を導入し、新規合成を行った後、自前の技術である再沈法を駆使して、薬剤ナノ粒子を創製した。また、それらの薬剤ナノ粒子の上にポリマーやタンパク質を被覆することにより、薬剤の分散安定性が向上することが分かった。結果として、動物実験において、同ナノ粒子は、腫瘍組織の細胞内部まで効率的に抗癌性ナノ粒子を送達できるとともに、市販薬よりも良好な抗腫瘍性を示すことが明らかとなった。この技術は、点眼薬などにも応用可能であり、使用感が良い緑内障用点眼薬の作製に繋がることが想定される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we introduced a new concept of introducing a poorly water-soluble substituent into anticancer medicinal compounds. Next, we synthesized them and then created the drug nanoparticles by using our own technique of the reprecipitation method. And, it was found that, by covering polymers or proteins on these drug nanoparticles, dispersion stability of the nanodrug could be improved. In vivo experiment, it was revealed that the nanodrugs could be delivered into the inside of cells of the tumor tissue. And this technique could be applied as eye drops including the glaucoma and so on.

研究分野：有機材料化学

キーワード：ナノ薬剤 再沈法 抗癌薬 点眼薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の薬化合物の設計としては、生理活性部位を有する化合物に水溶性の置換基を付けたものが一般的であった。ところが、水溶性化合物は分子状態であり、血中に移行後、腎臓から濾過されやすいため、投与量のごく一部しか患部に届かず、結果的に投与量が増えるという不可避な課題を抱えていた。また、水溶性化合物の場合、正常組織にも拡散しやすい傾向にあり、副作用が出やすいという問題点もあった。これらの結果を鑑みると、果たして水溶性薬化合物が最適な設計であるとは言い切れず、薬剤ナノ粒子のドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究に大きな期待がかかる。その一方、DDS 研究としては、ポリエチレングリコール (PEG) などの高分子からなるキャリア内部に薬剤を内包し、体内でのデリバリーを行う手法がよく検討されているが、近年 PEG の抗原性や細胞膜透過阻害作用などのキャリア自身の問題点が指摘されている。

(2) このような状況下、代表者らは、対象化合物の溶液を貧溶媒中に注入し、溶質を再沈殿させるという簡単な操作「再沈法」(図1)により、有機ナノ結晶が水分散液の状態で見られることを約20年前に見出した(引用文献①)。その後、種々のπ共役系有機化合物において、再沈法の有効性を示し、化学特性や光学特性に有機ナノ結晶特有のサイズ依存性が発現することを世界で初めて観測した。また、有機ナノ結晶の生成過程も調査しており、貧溶媒である水に対する溶解度がより低い化合物を対象としたとき、ナノ結晶化が速くなり、微小化しやすくなることを既に報告している(引用文献②)。そこで、薬理活性部位を有する化合物を水に対する溶解度をより低くするために、二量体化(引用文献③)するか、または難水溶性置換基を化学的に付けた化合物へと合成した(これは、従来の製薬合成の発想とは真逆のものである。)後、その化合物を再沈法に適用すれば、薬剤ナノ粒子の分散液が得られるため、作製後のままの分散状態でナノ薬剤として用いることができるという特徴を有するDDS技術へと展開できると着想した。

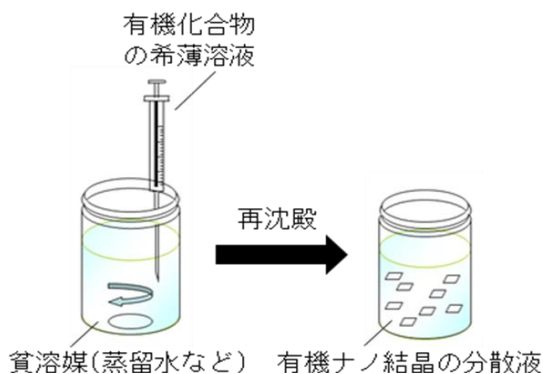


図1 再沈法の模式図

2. 研究の目的

(1) 本研究では、薬効を有する化合物に対して、従来の創薬とは逆の発想で難水溶性とするように分子構造を改変し、合成した後、代表者らが独自に開発した再沈法を駆使して、他の高分子等の添加することがないキャリアフリーで、薬効を有する化合物のみで構成されるナノ粒子(以下、薬剤ナノ粒子)の水系分散液を創製する。さらに、細胞培養系や生体内(血管内、眼組織)という各々の場における薬剤ナノ粒子の動態や薬効評価、及び化学的挙動のサイズ依存性を明らかにする。最終的には、従来の静脈注射薬や点眼薬では依然として困難とされる癌患部における細胞膜透過性や眼表面バリア透過性を有する次世代ドラッグデリバリーシステムを構築し得る薬剤ナノ粒子分散液の創出条件を見出し、応用展開を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 現在の市販薬としては、水溶性置換基を導入したイリノテカンが、加水分解後SN-38に変換されるプロドラッグとして使用されているが、本研究では、強い抗癌性を有するSN-38(図2)を対象化合物として取り上げている。SN-38に対して、通常の再沈法を適用すると、ナノファイバーが得られたため、生体内で加水分解されて、SN-38に変換され得るSN-38二量体を、難水溶性を高める目的で合成したところ、再沈法により50nm程度のナノ粒子水分散液が作製された。

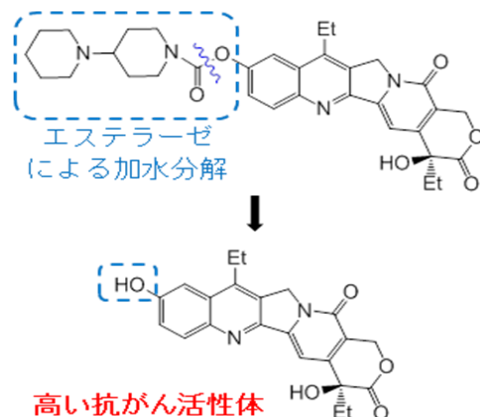


図2 イリノテカン(上)とSN-38(下)の構造式

(2) 以上のように、薬効を有する有望な分子を選出した後、難水溶性をより高める目的で、二量体化または難水溶性の置換基を導入することにより、新規合成を行う。さらに、合成された対象化合物の水への溶解度を測定し、再沈法による得られたナノ粒子のサイズとの関係を明らかにすることにより、サイズ制御された薬剤ナノ粒子水分散液の作製を行う。癌細胞培地の実験におい

ては、抗腫瘍特性における薬剤ナノ粒子のサイズ依存性を明らかにするとともに、細胞内への浸透メカニズムを明示し、*in vivo*の実験に移行する。

(3)小動物の血中動態に関しては、京大・村上助教との共同研究で、薬剤ナノ粒子の滞留時間や加水分解の挙動を解明した後、癌モデル動物の癌組織への取り込み効率や癌自体の大きさの変化を調査する。

(4)小動物に対する薬物の眼組織内移行性に関する実験に関しては、本学医学系研究科・中澤教授らとともに、薬剤ナノ粒子が眼表面バリアを透過して眼内に届く量と薬理効果のサイズ依存性を調査し、緑内障治療薬としての有用性を示す。最終的には、企業との共同研究に繋げて、実用化展開を図る。

4. 研究成果

(1)本研究で対象とした化合物としては、抗がん薬剤がSN-38とポドフィロトキシンの2種、緑内障用点眼薬剤がプリンゾラミドを選択した。これらの化合物を二量体化または様々な置換基を化学連絡させることにより、難水溶化が施された新規薬化合物の合成を施した後、独自に開発した再沈法により、3種の原薬化合物全てに対して、ナノプロドラッグ粒子を作成可能であることが判明した。このことは、従来の薬剤設計の基本指針である「水溶性化」の真逆の指針であり、本研究の薬剤設計の基本指針である「難水溶化」が、ナノプロドラッグ粒子の作製に理に合うことを証明できたと考えられる。

(2)SN-38とポドフィロトキシンの両化合物の二量体ナノ粒子は、がん細胞培地において、50%阻害濃度(IC50)が0.5 μ M以下と非常に強い抗がん活性を示すことが観測されるとともに、アルキル基やコレステロール基をつけた抗がん性化合物のナノ粒子においても、強い抗がん活性を示した。ここで、アルキル基がより長鎖のナノ粒子になると、細胞毒性が弱まることや酵素存在下での加水分解速度が遅延化する傾向が認められた。以上のことを総合的に鑑みると、ナノ薬剤は細胞内に侵入した後、表面から加水分解が進行し、薬効化合物が遊離し、細胞増殖が阻害されると考えられる。ちなみに、コレステロール基の場合、細胞毒性も加水分解速度もC14とほぼ同等であったが、血中での分散安定性が良好であることが分かり、マウスにおける薬剤の血中滞留性を評価した。その結果、市販薬であるイリノテカンに比べて、数倍以上長く滞留することが明らかとなっており、担癌マウスを用いた抗腫瘍性の実験を遂行したところ、市販薬のイリノテカンに比べて、抗腫瘍性が約10倍向上することを実証した(図3)。現在、様々な置換基を用いて、ナノ薬剤の最適化を行い、臨床応用への展開を目指している。

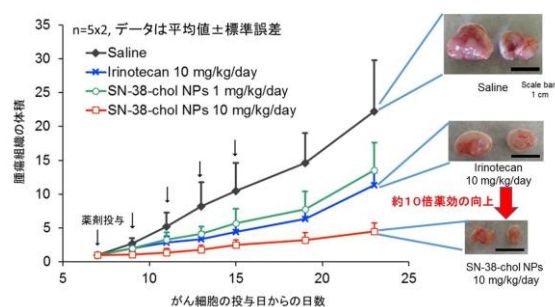


図3 マウスを用いた *In vivo* における各薬剤の抗腫瘍性評価

(3)その一方、緑内障用点眼薬剤に関しては、プリンゾラミドの二量体化合物のナノ粒子化は実現困難であったため、コレステロール基を修飾したが、眼内で加水分解が進行せずに、薬理効果が発現しないことが判明した。そこで、ラットから眼内の前房水を採取し、その条件下、ナノ粒子が加水分解を進行しうる置換基を模索した結果、トリメチルロック基を付けた化合物が有効であることが分かった。さらに、実際のラットを用いた実験においては、市販薬に比して、ナノ薬剤では5分の1の量で、同等の薬剤の眼内移行性や眼圧下降効果がみられることが明らかとなった。今後、眼表面バリア透過性を有する次世代ナノ点眼薬として、臨床応用への展開を模索する予定である。

<引用文献>

- ① H. Kasai et. al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **31**, L1132 (1992).
- ② J. Mori et. al., *J. Cryst. Growth*, **311**, 553 (2009).
- ③ H. Kasai et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 10315 (2012).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

- ① “Creation of nano eye-drops and effective drug delivery to the interior of the eye”, Y. Ikuta, S. Aoyagi, Y. Tanaka, K. Sato, S. Inada, Y. Koseki, T. Onodera, H. Oikawa, H. Kasai, 査読有, *Sci Reports*, **7**, 44229 (2017). DOI:10.1038/srep44229
- ② “Topical ocular dexamethasone decreases intraocular pressure and body weight in rats”, K. Sato, K.M. Nishiguchi, K. Maruyama, S. Moritoh, K. Fujita, Y. Ikuta, H. Kasai, T. Nakazawa, 査読有, *Journal of Negative Results in Biomedicine*, **15**, Article number 5, (2016). DOI:10.1186/s12952-016-0048-x
- ③ “Drug release is determined by the chain length of fatty acid-conjugated anticancer agent as one component of nano-prodrug”, Y. Koseki, Y. Ikuta, T. Kamishima, T. Onodera, H. Oikawa, H. Kasai, 査読有, *B*

Chem. Soc. Jpn., **89**, 540-545 (2016).
DOI:10.1246/bcsj.20150405

④ “Organic crystal-binding peptides: Morphology control and one-pot formation of protein-displaying organic crystals”, T. Niide, K. Ozawa, H. Nakazawa, D. Oliveira, H. Kasai, M. Onodera, R. Asano, I. Kumagai, M. Umetsu, 査読有, *Nanoscale*, **7**, 20155-20163 (2015).
DOI: 10.1039/c5nr06471f

⑤ “Cytotoxicity of pure nanodrugs of SN-38 and podophyllotoxin dimers in human cancer HepG2, KPL-4, and MCF-7 cells”, Y. Koseki, Y. Ikuta, T. Murakami, T. Onodera, H. Oikawa, L. Cong, H. Tada, K. Gonda, N. Ohuchi, H. Kasai, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 査読有, **622**, 1-5 (2015).
DOI:10.1080/15421406.2015.1096483

⑥ “The effect of molecular structure on the anticancer drug release rate from prodrug nanoparticles”, Y. Ikuta, Y. Koseki, T. Onodera, H. Oikawa, H. Kasai, 査読有, *Chem. Comm.*, **51** (64), 12835-12838 (2015). DOI: 10.1039/C5CC04164C

⑦ “Fabrication of Pure Nanodrugs of Podophyllotoxin Dimer and Their Anticancer Activity”, Y. Ikuta, Y. Koseki, T. Murakami, M. Ueda, H. Oikawa, H. Kasai, 査読有, *Chem. Lett.*, **42** (2013), 900-901.
DOI:10.1246/cl.130224

[学会発表] (計 65 件)

① Hitoshi KASAI, “Creation of Novel Designed Nano-Prodrugs Composed of Poorly Water-Soluble Compounds”, The 14th International Conferences on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (ICFPAM 2016), Soul, Korea, (2016. 10. 31) (Invited).

② Hitoshi KASAI, “The Novel Nano-Prodrugs Created by Reprecipitation Method and Their Efficacy Evaluation”, Fifth International Workshop on Advanced Nano - and Biomaterials and Their Device Applications (NABM2016), Constanta, Rumania, (2016. 9. 20) (Invited).

③ Hitoshi KASAI, “Creation of pure nano-drugs with anticancer properties by the reprecipitation”, Vietnam Malaysia International Chemical Congress (VMICC), Vietnam, Hanoi, (2014. 11. 7) (Invited).

④ Hitoshi KASAI, “Creation of Pure Nano Drugs by the Reprecipitation Method”, 13th International Symposium on Advanced Organic Photonics (ISAOP - 13), Kingston, Canada, (2013. 9. 9) (Invited).

⑤ Hitoshi KASAI, “Fabrication of Pure Nano-Drugs with Anticancer Properties”, KJF International Conference 2013 on Organic Materials for Electronics and Photonics (KJF 2013) Pusan, Korea (2013. 8. 29) (Invited).

⑥ Hitoshi KASAI, “Fabrication of organic nanocrystals for Pure Nano Drugs”, Collaborative Conference on Materials Research (CCMR) 2013, Jeju, Korea (2013. 6. 25) (Invited).

[図書] (計 1 件)

① “有機ナノ粒子・ナノ結晶”, 馬場耕一, 笠井均, 最新 マイクロ波エネルギーと応用技術, 産業技術サービスセンター, 第 5 章第 6 節 4, p. 567-p. 572 (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: シクロペンテノン誘導体およびその製造方法
発明者: 笠井均, 小関良卓, 神島堯明, 野中利之
権利者: 国立大学法人東北大学, フロムシート株式会社
種類: 特許
番号: 国際出願番号 PCT/JP2016/087257
出願年月日: 2016 年 12 月 14 日
国内外の別: 国外

名称: 癌疾患治療用ナノ粒子化製剤
発明者: 笠井均, 小関良卓
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-063031
出願年月日: 平成 28 年 3 月 28 日
国内外の別: 国内

名称: 眼疾患治療用ナノ粒子化製剤
発明者: 青柳重信, 稲田諭, 渋谷博, 笠井均, 中沢徹
権利者: 大内振興化学工業株式会社, 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-006212
出願年月日: 平成 27 年 1 月 15 日
国内外の別: 国内

[その他] ホームページアドレス:
<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/kasai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 均 (KASAI Hitoshi)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号: 30312680

(2) 研究分担者

中沢 徹 (NAKAZAWA Toru)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30361075

村上達也 (MURAKAMI Tatsuya)
富山県立大学・工学部・教授
研究者番号：90410737

(3) 連携研究者

及川英俊 (OIKAWA Hidetoshi)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号：60134061