

26. 細胞対話型キャリアーを用いる悪性がん治療法の開発

片山 佳樹

九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門 機能組織化学講座

Key words : 遺伝子送達, DDS, がん治療, プロテインキナーゼ, EPR 効果

緒言

がん化学療法は、効果に大きな問題があるのが現状である。その主要な原因は、正常臓器に分配した抗がん剤の重篤な副作用と、がん組織内の悪性細胞に対する効果の弱さにある。前者に関しては、最近特にナノ粒子を用いる DDS 技術が活発に検討されている。固形がんの新生血管での内皮細胞における漏出性とリンパ組織の未発達を利用したナノ粒子のがん近傍での特異的漏出と蓄積 (EPR 効果) を利用する戦略と、がん細胞表面マーカーを利用した薬剤キャリアーのがん細胞への蓄積を促進する戦略が主な方法論である。しかし、これらの方法をとっても、がん部に蓄積するのは投与量の数%であり、肝臓をはじめとする他の臓器には依然より多くの薬剤が分布してしまう。そこで本研究では、正常臓器に分布したナノキャリアーからの薬剤放出を抑えておき、患部に対する刺激によって初めて放出させるシステムを用いる新たな治療法の実現を目的とした。そのために、悪性がん細胞で特異的に亢進しているプロテインキナーゼ Ca (PKC α) を刺激として遺伝子医薬を開放するシステムを開発して、これを中心とした真にがん細胞特異的ながん化学療法を開発することを目的とした。

方法

1. PKC α 応答型キャリアーを用いる悪性がん治療効果の評価

図1に示した構造のキャリアー (基質ペプチド側鎖 5 mol%) とルシフェラーゼをコードした CMV プロモータを持つプラスミドと荷電比7で混合することによりナノ複合体を調製した。

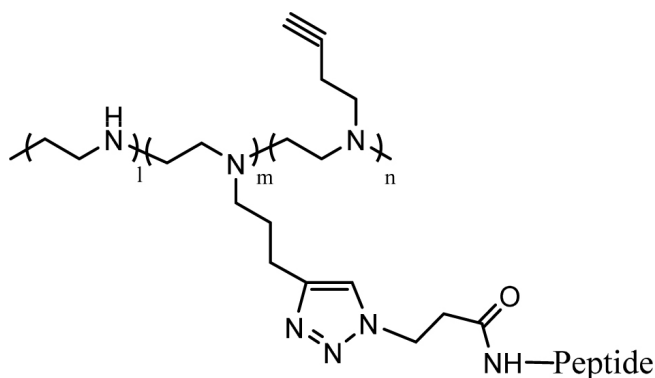


図1. PKC α 応答型キャリアーの構造
基質ペプチド側鎖 5 mol%。

マウスに U87MG グリオブラストーマを移植し、腫瘍径が 5 mm 程度になった後、+1 複合体を腫瘍内投与して、48 時間後にその発現を *in vivo* イメージングシステム IVIS により評価した。また、同じ条件で正常皮下組織にも投与して比較した。次に、DNA を、カスパーゼ-8 をコードした発現プラスミドに変更して、U87MG 担がんマウスを用い、

同様の腫瘍内投与を行い、治療を検討した。治療の場合には、がん細胞播種後、1日後から5日まで1日1回投与し、その後、7日、9日にも投与して、腫瘍の増殖とマウスの生存によりその効果を評価した。

2. 複合体の血中における安定化の検討

まず、血中对流性の短い葉酸誘導体にアルキル鎖（パルミトイル基）を導入し、可視化のために Cy7 を標識した化合物（図2）を合成して、A549 肺がん株を播種して作製した担がんマウスに尾静脈投与して、アルキル鎖を導入していない場合と比較することでその効果を検証した。

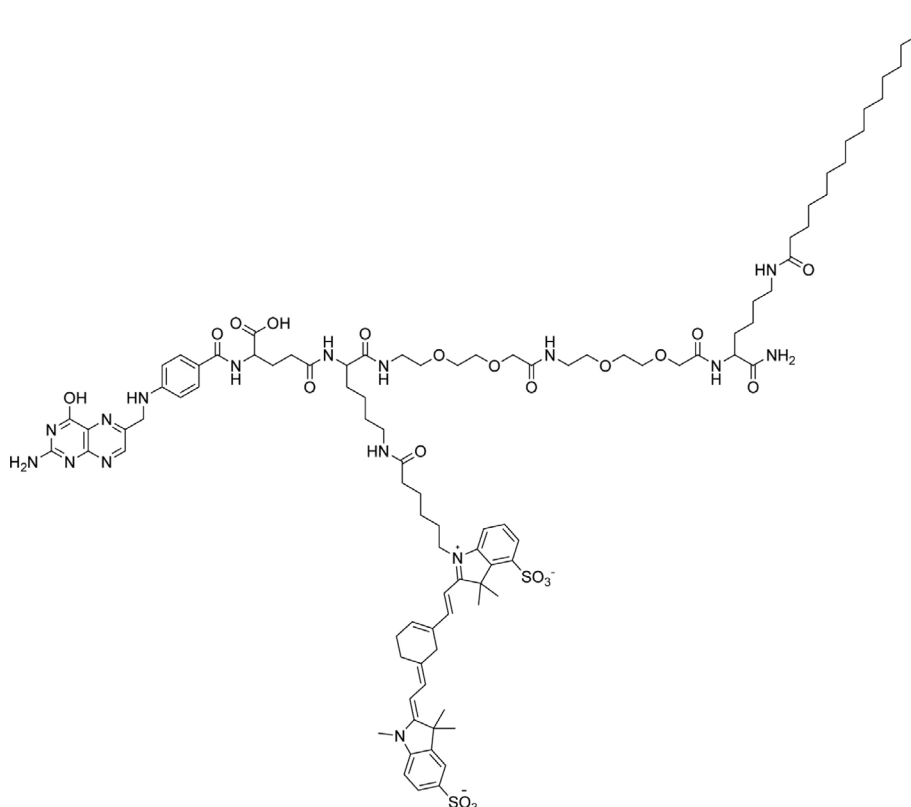


図2. 血清アルブミン結合型葉酸誘導体の構造
可視化のために Cy7 を導入。

その後、遺伝子キャリアーへの適用検討として、前述のキャリアーと同様の構造を有するポリエチレンイミンにステアロイル基を種々の導入率（0.4、3.7、7.8 mol%の3種）で導入して（図3）、プラスミドとナノ複合体を調製して、その安定性を評価した。

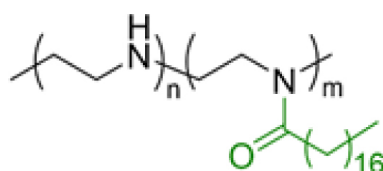


図3. 血清アルブミン被覆型キャリアの構造
血清アルブミン基質としてステアリン酸を 0.4、3.7、7.8 mol% 導入した 3 種類を合成。

3. 遺伝子/キャリアナノ複合体のがん送達率を高めるための EPR 増強システムの開発

リポソームの組成は、すでに認可されている Doxil と等しいものにし、自発的に NO を徐放できる NOC-18 を 1 nmol、エクストルージョン法により封入した。封入量に関しては、予め種々の封入量のことを調製し、マウスに尾静脈投与後、全身血圧に影響を及ぼさない上限の十分の一に設定した。さらに、これを担がんマウス (CT-26) に尾静脈投与してその蓄積量の増大を、NO 発生剤なし、および NO 放出剤をリポソームに封入せずに同時投与した場合と比較し、IVIS による *in vivo* 評価と、各臓器を摘出しての *ex vivo* 評価を行った。

結果および考察

1. PKC α 応答型キャリアを用いる悪性がん治療効果の評価

図 4 に PKC α 応答型キャリアを用いてルシフェラーゼ遺伝子を投与した場合の結果を示す。

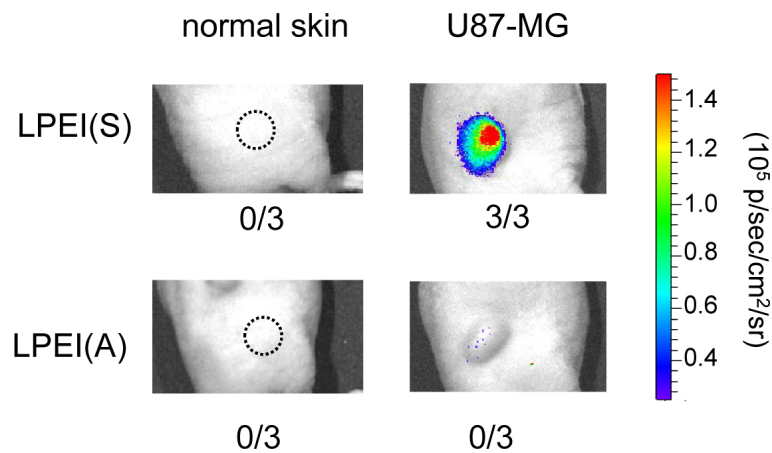


図 4. PKC α 応答型キャリアによるルシフェラーゼ遺伝子投与における腫瘍と正常組織での発現比較

マウスはそれぞれ 3 匹ずつ使用。キャリア-遺伝子複合体を荷電比 7 で局注した。

腫瘍への投与では明確な発現が認められた一方、正常皮下組織への投与では全く発現は認められず、明確ながん特異性を示した。次に、遺伝子を細胞自殺遺伝子であるカスパーゼ-8 に変更して同様の実験を行った。図 5 にその腫瘍抑制効果を示した。

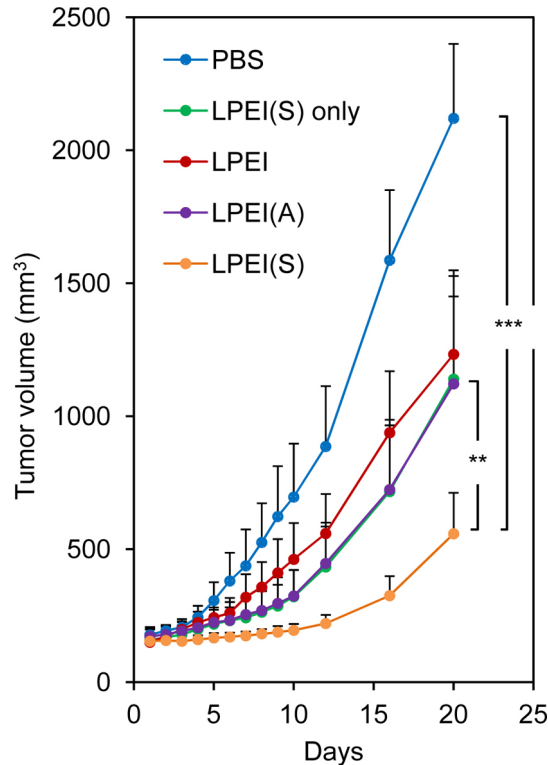


図5. PKC α 応答型キャリアーを用いてカスパーゼ-8 遺伝子を U87 担がんマウスに投与した際のがん増殖抑制効果
 値は、平均値 \pm SD (n = 5, **, P < 0.01) で表示。(T 検定によった。)

汎用されるポリエチレンイミンを用いた場合に比べ、PKC α 応答型キャリアーでは顕著な腫瘍抑制効果が得られた。また、キャリアー単独でもポリエチレンイミンと同程度の効果が得られ、これは PKC α 非応答型キャリアーであるリン酸化部位のセリンをアラニン残基に置換したキャリアー (LPEI (A)) でカスパーゼ-8 遺伝子を導入した場合と同程度であることから、用いたキャリアーに複数個導入した基質ペプチドあるいは、そのアラニン置換体が PKC α の競合阻害剤として働いた可能性が考えられた。また、マウスの生存率での評価においては、ポリエチレンイミン、および PKC α 非応答型キャリアーでの場合は、腫瘍播種後 30 日以内に全例が死亡したが、PKC α 応答型キャリアーでは 40% が 60 日に時点でも生存しており、腫瘍は実質的に消失していた。以上より、PKC α 応答型キャリアーは顕著な悪性細胞に対する治療効果を発揮できることが分かった。この結果は現在論文作成中である。

2. 複合体の血中における安定化の検討

以前の研究より、本研究で開発するようなプロテインキナーゼに反応するペプチドグラフト型キャリアーでは PEG 鎖を利用することができないことがわかっているため¹⁾、遺伝子との複合体の安定化に、血清アルブミンの可逆的被覆を考案した。まず、本システムが血中安定性を高めるかを評価するため、単独では血中循環の困難な葉酸誘導体を用い、これにパルミトイル基を導入した化合物と、パルミトイル基を欠損させた化合物を葉酸受容体過剰発現が知られている KB 細胞を播種した担がんマウスに尾静脈投与してその血中対流性を評価した²⁾。結果を図 6 に示す。

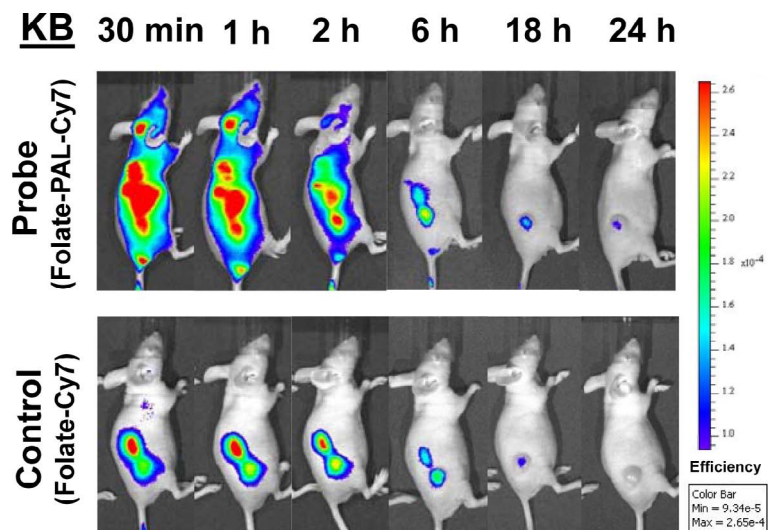


図6. パルミトイル基導入プローブ（上段）と非導入プローブ（下段）における血中対流性の評価
IVISにより Cy7 の傾向強度で評価。

パルミトイル基の導入により血中滞留性が顕著に向上した。そこで、次に本キャリアの基本形である高分子型キャリアであるポリエチレンイミンにステアロイル基を導入した化合物で、遺伝子とのナノ複合体を調製して、その安定性を評価した。複合体のゼータ電位が血清アルブミン添加により正から負に反転することで被覆を確認後、血清条件下で複合体の凝集を評価した。その結果、いずれのステアロイル基導入率においても凝集は顕著に抑制され、さらに赤血球の凝集評価においても顕著な抑制効果が示された（図7）。本結果は現在論文投稿中である。

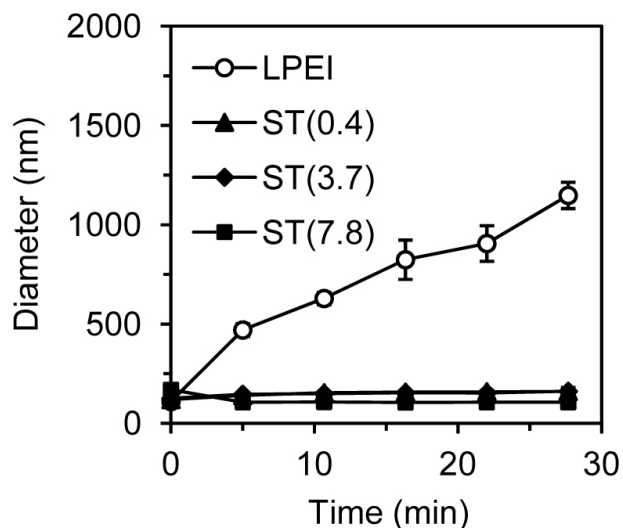


図7. 血清条件下での複合体凝集
データは3回の平均値 ± SEMs で表示。

3. 遺伝子/キャリアナノ複合体のがん送達率を高めるための EPR 増強システムの開発

NO 放出剤として NOC18 を封入したところ、NO の放出半減期は 35 時間であった。血圧に影響の出ない 1 nM 封入条件で尾静脈投与したところ、封入しない場合や 10 nM の放出剤を共投与した場合に比べ蓄積量は 2 倍に向上し、しかも、臓器ごとに評価した場合でも腫瘍での蓄積のみ向上し、他の臓器への蓄積には全く影響はなかった³⁾ (図 8)。

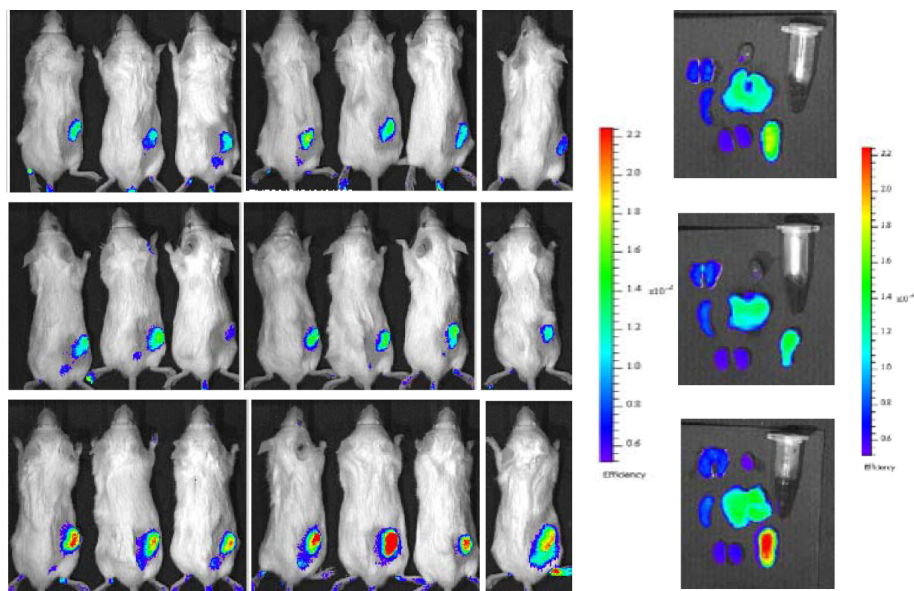


図 8. NO 放出型リポソームによる EPR 効果の増強

左は担がんマウスによる蓄積評価。右は各臓器の評価。いずれも、上段は、空のリポソーム、中段は、空のリポソームと NO 放出剤 10 nM 共投与。下段は、1 nM の NO 放出剤内包リポソーム。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学工学研究院の森健准教授である。

文 献

- 1) Y. Katayama, Peptide-grafted polymers as artificial converter of cellular signals, Bull. Chem. Soc. Jpn, 90, 12-21 (2017) DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.20160307>
- 2) Elnaz Nakhaeia, Chan Woo Kima, Daiki Funamotoa, Akihiro Kishimuraabc, Takeshi Moriab, Yoshiki Katayama, Ligand design for cancer imaging with long blood circulation and enhanced accumulation ability against tumor, MedChemComm, in press, DOI: 10.1039/x0xx00000x
- 3) Y. Tahara, T. Yoshikawa, H. Sato, Y. Mori, Md.Z. Hosain, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, Encapsulation of nitric oxide donor into a liposome to boost the enhanced permeability and retention effect, MedChemComm, 8, 415-421 (2017) DOI:10.1039/C6MD00614K