

114. がん特異的ラジカル療法用薬剤の開発研究

佐野 紘平

神戸薬科大学 薬学部 薬品物理化学研究室

Key words : ラジカル, 水溶性ポリマー, ドラッグデリバリーシステム

緒言

がんの化学療法において、抗がん剤の生体内分布を量的かつ時空間的に制御し、がん組織特異的な治療効果を達成することは、がんの根治に繋がるのみならず、正常組織における副作用を低減し、患者の苦痛の軽減と療養生活の質 (QOL) の維持向上に貢献するものと考えられる。

近年、ラジカルによる抗がん作用を期待したがん治療用薬剤の開発が高い注目を集めている。ラジカルはその反応性が高く、活性酸素種の産生や直接的な DNA アルキル化作用により抗がん作用を有するが [1]、高反応性ゆえに短寿命でもあることから、ヒトへの直接投与は不可能である。正常組織への副作用についても懸念されることから、厳密な生体内挙動の制御が求められるがゆえに、基礎研究においても高い治療効果を示した例はほとんどなく、培養細胞での治療効果が確認されたのみである [2]。ここで研究代表者は、がん組織選択的にラジカル発生剤 (非活性型) を送達した後に、がん組織特異的に治療用ラジカルを自在に発生させることができれば、がん部位超特異的な細胞障害を誘発し、正常組織への副作用なく高いがん治療効果が期待できるのではないかと考え、本研究では、ラジカル剤について、がん部位特異的に集積・活性化させる革新的ドラッグデリバリーシステム (DDS) 薬剤の開発を計画した (図 1)。

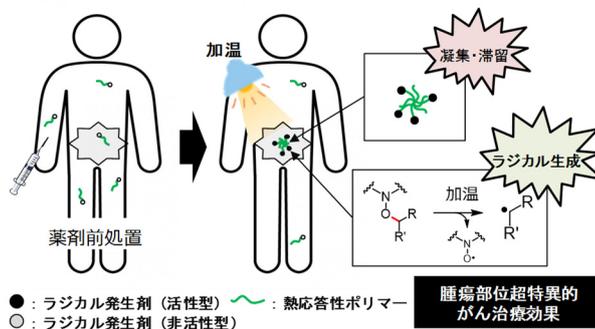


図 1. 熱応答性ラジカル発生剤と POZ との結合体を用いる腫瘍特異的ラジカル療法

まず、ラジカル発生剤を腫瘍特異的に集積させる手段として熱応答凝集性ポリマーの利用を考えた。すなわち、体内から比較的速やかにクリアランスされ、かつ、熱に応答して凝集する特長を有する生体適合性水溶性ポリマー (ポリオキサゾリン: POZ) を基盤とし、トリガー (熱) を利用して薬剤を腫瘍特異的に凝集・滞留させる手法を考案した。オキサゾリン誘導体の側鎖構造により下限臨界溶液温度 (凝集温度) が異なり、種々の構造のオキサゾリン誘導体を組み合わせることで、緻密な温度コントロールのもとで凝集化を引き起こすことが可能であるという知見 [3] をもとに、本研究では、約 37~38°C の凝集温度を示す POZ 誘導体の合成に成功した。また、がん部位の加温 (温熱療法を想定) により、本プローブのがん集積量が約 1.8 倍上昇することを見出すとともに、POZ ががん組織内の血管近傍で凝集・滞留していることを明らかとした [4]。一方、ラジカル発生剤については、共同研究者らが開発した、熱処理によりラジカルを生じるアルコキシアミン誘導体の利用を考え、温熱療法の条件下で利用可能な化合物の合成を行った。低分子ラジカル発生剤は生体からのクリアランスが早く、がん組織への集積が低下する可能性が考えられることから、それを POZ に結合させることにより、熱に応答した POZ の腫瘍集積性とその場所での特異的なラジカル発生を誘起できると考え、がん特異的な新たな治療法の確立を目指した。

方法および結果

1. POZ 誘導体の合成

過去の我々の報告 [5] に従って合成した。すなわち、2-ethyl-2-oxazoline および 2-isopropyl-2-oxazoline を用いて、マイクロ波照射により加温しながら攪拌することで合成した。得られた POZ 誘導体の分子量をゲル浸潤クロマトグラフィにて分析した結果、約 10、20、30 kDa であった。また、下限臨界溶液温度を測定した結果、いずれの POZ 誘導体においても約 38°C であった。さらに、がん組織への集積性を評価するために、POZ 誘導体の In-111 標識体および蛍光 (Fluorescein) 標識体を併せて合成した。

2. POZ のがん集積性評価

担がんマウスは、Balb/c マウスの右腰皮下に Colon26 細胞 (1×10^6) を移植することにより作製した。なお、がん部位は、薬剤投与 15 分前から温水 (42°C) に浸漬して加温することで、がん組織内温度が 40°C 以上になるようにし、薬剤投与後も加温を継続した。担がんマウスの尾静脈より、In-111 標識体を投与し、投与 1 時間後の体内放射能分布を臓器摘出法により評価した。POZ 誘導体の分子量、投与量および加温時間が、がん部位への集積性に与える影響についても評価した。約 20 kDa の In-111 標識 POZ 誘導体を用いて検討した結果、投与 1 時間後において、非加温条件と比較して、加温条件下でがん部位への放射能集積は約 1.8 倍向上した (図 2A)。分子量が約 10 kDa の場合、非加温条件と比較して有意な集積量の改善が認められなかった一方で、20 kDa 以上の POZ 誘導体でがん集積性の改善を認めた (図 2A)。また、投与量については、4~40 nmol の範囲内において大きな変化は見られなかった (図 2B)。加温時間については、30 分以上の加温による集積性の改善を認めた (図 2C)。さらに、投与 3 時間後においてもがん集積量に大きな変化は認められなかったことから、高いがん集積性と滞留性が示唆された。

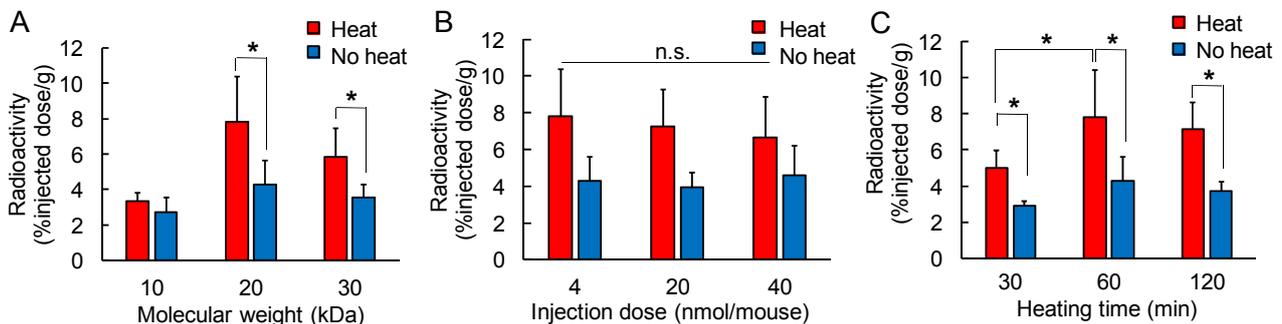


図 2. In-111 標識 POZ 誘導体のがん集積性評価

- A) POZ 分子量のがん集積性に与える影響、
- B) POZ 投与量のがん集積性に与える影響、
- C) がん部位の加温時間が腫瘍集積性に与える影響

データは平均±標準偏差、*P < 0.05 (Tukey-Kramer test)

3. POZ のがん組織内局在評価

2. と同様にごがん部位を加温した条件で、担がんマウスに Fluorescein 標識 POZ 誘導体を投与し、がん組織内における POZ の局在についてインビボ共焦点蛍光顕微鏡 (Cellvizio Endomicroscopy System) を用いて評価した。なお、観察の 10~30 分前にエバンスブルーを投与し、血管を描出した。その結果、非加温条件 においては大部分の POZ が血管内に滞留していた一方で、加温条件においては、血管近傍あるいは血管内に多数の蛍光スポットが認められた (図 3)。

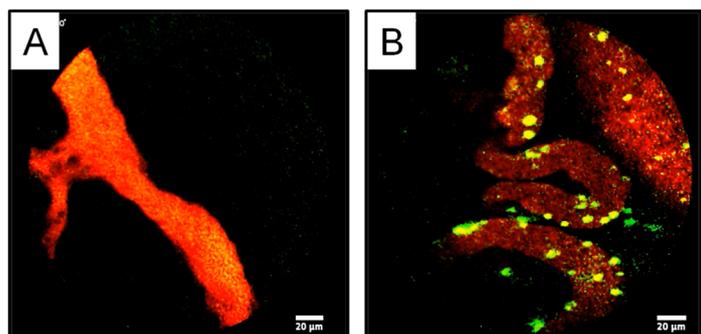


図 3. POZ 誘導体のがん組織内分布評価

A) 非加温条件における POZ の組織内分布、

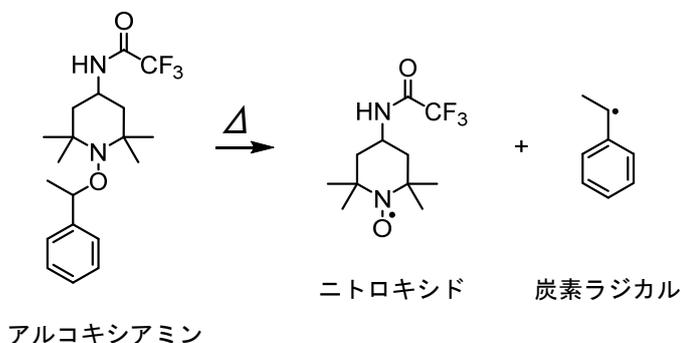
B) 加温条件における POZ の組織内分布、

赤：血管、緑：Fluorescein 標識 POZ 誘導体。Scale bar : 20 μ m

4. アルコキシアミンの合成

アルコキシアミンは加熱により、炭素-酸素結合が開裂し、 $>N\cdot O\cdot$ 部分構造を有するニトロキシドと炭素ラジカルを生成する。生成した炭素ラジカルは、脂質過酸化を誘導し、酸化還元バランスを崩壊させることにより細胞死を引き起こす可能性が期待されている [1]。これまでの研究により、ニトロキシド側あるいは炭素ラジカル側の置換基を修飾することで、電子的効果の影響を受け、開裂速度が変化することが知られている [6]。特に、炭素ラジカル側の結合開裂部位近傍の立体的嵩高さの増大は、ニトロキシド部位との立体反発の増大を引き起こし、開裂速度が向上する。本研究では、さらなる開裂速度の向上を目指し、ニトロキシド側の構造修飾による開裂速度の向上を検討した。

同様に開裂部位近傍の立体的嵩高さを増大させるため、ニトロキシド側に立体的に嵩高いアダマンチル基の導入を検討した。合成は、既報を参考に、4-ピペリドンの2位にアダマンタン骨格がスピロ結合したピペリドン誘導体の合成に成功した。これを酸化することでニトロキシドを得た後、4位の置換基変換を行い目的とする新規化合物を得た。



Scheme 1. 加温によるアルコキシアミンの開裂反応

次に、アルコキシアミンの炭素-酸素結合の開裂速度を求めた。方法は、80°Cの加温条件下、開裂反応により生成するニトロキシドのラジカル量を電子スピン共鳴装置を用いて定量した。アダマンタン骨格の効果を検証する対照化合物としては、汎用のメチル基のものと比較をした。その結果、既知化合物は $1.13 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であったのに対し、アダマンタン骨格を導入したものは、 $3.05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ と約3倍反応速度が向上した (図4)。今後は、炭素ラジカル側の構造修飾を組み合わせ、さらなる炭素ラジカル生成効率の向上を図る。

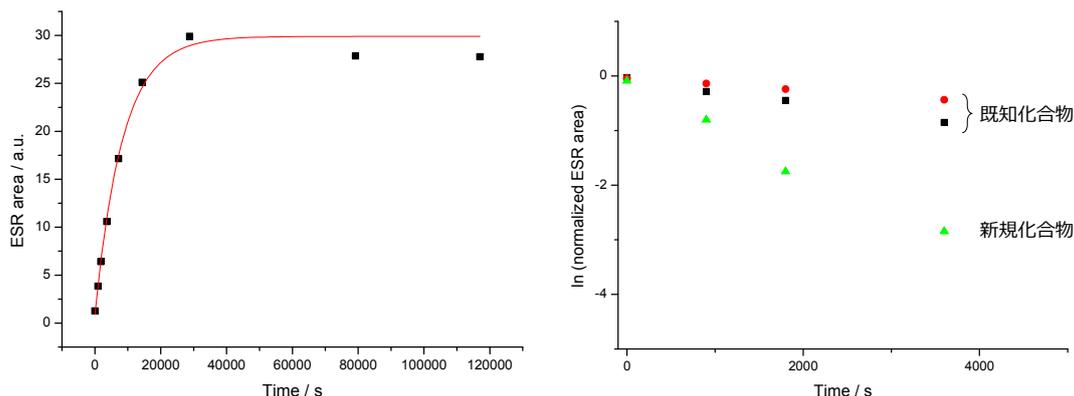


図 4. ESR による開裂反応速度定数

考 察

本研究では、がん特異的ラジカル療法用薬剤の開発を目的に、そのキャリアとして熱応答凝集性ポリマーである POZ 誘導体の利用を考え、検討を行った。2-Ethyl-2-oxazoline および 2-isopropyl-2-oxazoline を組み合わせて POZ 誘導体を合成し、その下限臨界溶液温度は約 38°C であったことから、体温条件下では溶解状態を取るが、がんの温熱療法の適用下 (約 43°C) において凝集する可能性を示した。この POZ 誘導体の In-111 標識体について、がん組織への集積性を評価した結果、分子量 20 kDa、投与量 4 nmol、加温時間 60 分の条件が最適であると考えられた。POZ 誘導体の分子量が 20 kDa 以上の場合、加温されたがん組織への高い集積を認めたが、分子量の増加に伴って血液からのクリアランスが遅延した。正常組織における不必要な毒性を極力低減させるために 30 kDa ではなく、20 kDa の POZ 誘導体を選択した。また、POZ 誘導体の投与量について、4~40 nmol の範囲内で結果に大きな違いは認められず、ポリマー自体の毒性は低いものの安全性を考慮して 4 nmol を選択した。加温時間については 60 分間を選択した。通常、温熱療法における処置時間は 30~60 分間であることから、温熱療法と組合せて臨床で利用可能であると考えられた。我々は最近、POZ 誘導体の側鎖に蛍光色素および放射性同位元素を化学的に修飾し、それをがんの診断薬として利用した研究成果を報告した [8]。今後、POZ 誘導体にかん標的性を有する分子 (抗体、ペプチド等) を化学的に導入することで、がん組織への能動的な標的化と熱による凝集効果を介して、集積性の更なる改善を目指す。

一方、ラジカル薬剤については、加熱により、アルコキシアミンの炭素-酸素結合の開裂により生じた炭素ラジカルを利用して脂質過酸化を誘導することを考えた。先に述べた通り、炭素ラジカル側の結合開裂部位近傍の立体的嵩高さの増大は、ニトロキシド部位との立体反発の増大を引き起こし、開裂速度が向上すると考えられる。本研究ではアダマンタン骨格を導入した化合物を新たに合成し、開裂速度の改善に成功した。しかし、現状では、温熱療法との併用によりラジカルを発生させるには効率が十分ではないと考えられるため、引き続き炭素ラジカル側の構造修飾等を行っていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、神戸薬科大学薬品物理化学研究室向高弘教授のご指導のもと、山崎俊栄助教のご協力を賜りながら進めて参りました。また、上原記念生命科学財団には多大なご支援を賜り、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Jin J, MacMillan DW. Alcohols as alkylating agents in heteroarene C–H functionalization. *Nature*. 2015 Sep 3;525(7567):87-90. doi: 10.1038/nature14885. Epub 2015 Aug 26.
- 2) Moncelet D, Voisin P, Koonjoo N, Bouchaud V, Massot P, Parzy E, Audran G, Franconi JM, Thiaudière E, Marque SR, Brémond P, Mellet P. Alkoxyamines: toward a new family of theranostic agents against cancer. *Mol Pharm*. 2014 Jul 7;11(7):2412-9. doi: 10.1021/mp5001394. Epub 2014 Jun 17.
- 3) Hruby M, Filippov SK, Panek J, Novakova M, Mackova H, Kucka J, Vetricka D, Ulbrich K. Polyoxazoline thermoresponsive micelles as radionuclide delivery systems. *Macromol Biosci*. 2010 Aug 11;10(8):916-24. doi: 10.1002/mabi.201000034.
- 4) Sano K, Kanada Y, Takahashi K, Ding N, Kanazaki K, Mukai T, Ono M, Saji H. Enhanced Delivery of Radiolabeled Polyoxazoline into Tumors via Self-Aggregation under Hyperthermic Conditions. *Mol Pharm*. 2018 Sep 4;15(9):3997-4003. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00441. Epub 2018 Aug 13.
- 5) Sano K, Kanada Y, Kanazaki K, Ding N, Ono M, Saji H. Brachytherapy with Intratumoral Injections of Radiometal-Labeled Polymers That Thermoresponsively Self-Aggregate in Tumor Tissues. *J Nucl Med*. 2017 Sep;58(9):1380-1385. doi: 10.2967/jnumed.117.189993. Epub 2017 Apr 13.
- 6) Miura Y, Nakamura N, Taniguchi I, Ichikawa A. Radical polymerization of butyl acrylate and random copolymerization of styrene and butyl acrylate and styrene and methyl methacrylate mediated by monospiro- and dispiropiperidinyl-N-oxyl radicals. *Polymer*. 2003 44:3461-7. doi: 10.1016/S0032-3861(03)00275-1.
- 7) Sano K, Bao L, Suzuno N, Kannaka K, Yamasaki T, Munekane M, Mukai T. Development of Cancer-Targeted Single Photon Emission Computed Tomography/Fluorescence Dual Imaging Probe Based on Polyoxazoline. *ACS Appl. Polym. Mater*. 2019; 1(5):953-958. doi.org/10.1021/acsapm.8b00238