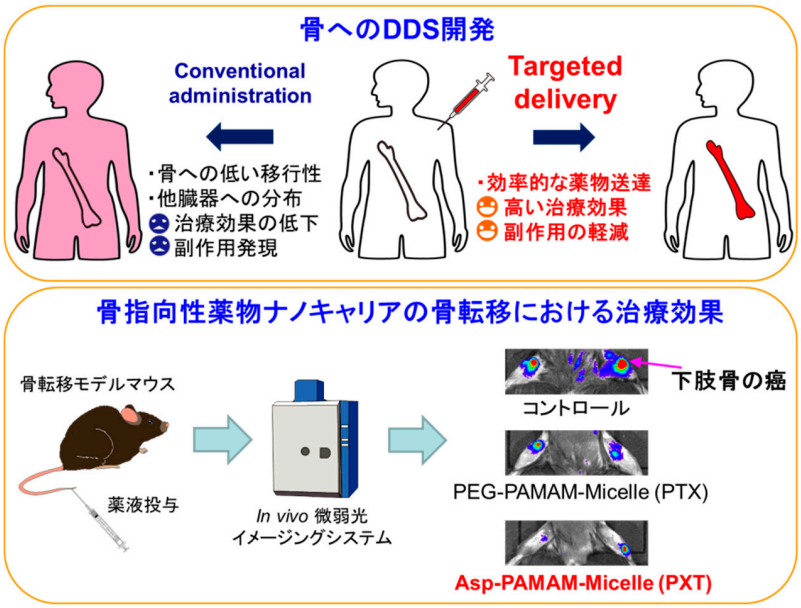
102　カルボン酸修飾を利用した骨指向性ナノキャリアの開発	勝見　英正

【目的】人口の高齢化に伴い、骨転移や骨粗鬆症などの骨疾患治療の重要性が高くなり、薬物を標的部位である骨に効率よく送達する DDS 開発が切望されている。最近、筆者らはアスパラギン酸（Asp）などのカルボン酸のポリマー配列が骨に対して高親和性を有すること及び、カルボン酸修飾が高分子の骨ターゲティングに有用であることを見出した。そこで本研究では、様々な薬物を封入可能なナノ粒子へのカルボン酸修飾化による汎用性の高い骨ターゲティングシステムの開発及びそれらを用いた新規骨転移治療法の構築を試みた。すなわち、体内動態と薬効を基盤とした合理的な粒子設計により、高い有効性と効率的な治療が得られる骨指向性薬物ナノキャリアの創製を試みた。

【方法】骨指向性薬物ナノキャリアの調製：Asp 修飾樹状高分子（Asp-PAMAM）に水溶性のポリエチレングリコール（PEG）と疎水基（L）を結合させた両親媒性分子を合成し、溶液中で自己集合させたナノ粒子（Asp-PAMAM-Micelle）を調製した。Asp-PAMAM-Micelle と抗がん剤であるパクリタキセル（PTX）を混合することで PTX を封入した Asp-PAMAM-Micelle（PEG-Asp- Micelle（PTX））を調製した。Asp-PAMAM-Micelle の粒子径及び表面電荷測定：動的光散乱法及び電気/レーザー・ドップラー法により測定した。マウスを用いた薬物及びキャリアの体内動態：^{3}H-PTX 封入 ^{111}In-Asp-PAMAM-Micelle を用いて評価した。骨転移治療効果：ルシフェラーゼ遺伝子を導入した癌細胞株 B16-BL6/Luc 細胞を用いて作製した骨転移モデルマウスに Asp-PAMAM-Micelle（PTX）を投与した後の癌増殖を評価した。

【結果】Asp-PAMAM-Micelle の粒子径は 約 50 nm を示し、またその表面電荷は負の値を示すことが確認された。Asp 未修飾の ^{111}In-PEG-PAMAM-Micelle（^{3}H-PTX）をマウスに静脈内投与したところ、投与後 3 時間でミセル及び PTX の骨移行率はそれぞれ、5.6%、7.7% を示した。一方、Asp 修飾を施した ^{111}In-Asp-PAMAM-Micelle（^{3}H-PTX）投与後のミセル及び PTX の骨移行率はそれぞれ、26%、22% となり、Asp 未修飾体に比べ高い値を示した。骨転移モデルマウスを用いた検討では、Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の投与により下肢骨における癌増殖が顕著に抑制され、骨転移治療における Asp-PAMAM-Micelle の有用性が示された。

骨への DDS 開発の概念と骨指向性薬物ナノキャリアの骨転移における治療効果



102. カルボン酸修飾を利用した骨指向性ナノキャリアの開発

勝見　英正

京都薬科大学 薬学部 薬剤学分野

Key words：ドラッグデリバリーシステム，骨ターゲティング，ナノキャリア，骨転移

緒　言

骨は肺・肝臓に匹敵するがん転移好発臓器であり、骨転移を有するがん患者数は増加の一途を辿っている。骨転移は対応困難な骨痛、病的骨折、脊髄麻痺などの日常生活動作障害の強い骨関連事象を併発することで、がん患者の QOL を著しく低下させ、死期を早めることから、その抑制法の開発が切望されている。

従来の骨転移療法では、骨に転移したがんの脊髄圧迫による痛み及び麻痺の緩和を目的とした放射線療法、外科的治療、鎮痛薬の投与などが行われてきた。しかしながら、骨は他臓器と比較して血流量が乏しく、血液–骨髄関門により血管腔側から骨基質側への物質の移動が制限されているなど、薬物が移行しにくい組織構造を有するため、抗がん剤などの薬物の骨移行性は不十分であり、骨転移の進行そのものを抑制する方法は皆無であった［1］。

近年、破骨細胞が産生する成長因子及び骨転移がん細胞が分泌する増殖因子の相互活性により骨転移が増悪することが明らかとなり、骨移行性に優れ、破骨細胞の機能を抑制するビスホスホネートなどの骨修飾薬が、骨転移に対する治療薬として利用されている［2］。しかしながら、骨修飾薬の単独投与により骨転移の根治に至ることは稀であり、骨へ抗がん剤などの薬物を効率的に送達可能なデリバリーシステムの構築による新規治療法の開発が切望される。筆者らはこれまでに、アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸、コハク酸、アコニット酸などのカルボン酸の骨標的化素子としての有用性について、物性と体内動態の観点から検討を行い、Asp が骨ターゲティング素子として最も優れていること、ポリマー化した Asp はカルシウムとのキレート形成を介して骨に吸着することを明らかにした［3，4］。

そこで本研究では、抗がん剤を骨に効率よく送達可能なドラッグデリバリーシステムの開発による骨転移治療法の構築を目指して、Asp 修飾を利用した抗がん剤の骨指向性ナノキャリアの設計・開発を行った。

方　法

1. 骨指向性ナノキャリア（Asp-PAMAM-Micelle（PTX））の調製

樹状高分子（PAMAM）にポリエチレングリコール（PEG）と Asp が結合した PEG-Asp-PAMAM の合成を既報に準じて行った［3］。次いで、DMF/pyridine 中で PEG-Asp-PAMAM に対して、疎水基（L）を反応させた。反応混合液の溶媒を留去し、透析膜で精製した。次いで、PEG-Asp-PAMAM-L と抗がん剤であるパクリタキセル（PTX）を超純水中で混合し、フィルターろ過することで PTX 封入高分子ミセル（Asp-PAMAM-Micelle（PTX））を得た。Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の粒子径及び表面電荷測定は、それぞれ動的光散乱法及び電気／レーザー・ドップラー法により測定した。

2. 動物実験

動物実験を行う際、所属機関である京都薬科大学で策定された動物実験実施規程に則ってプロトコールを作成し、動物実験委員会によって承認を受けると共に、実験遂行時にはプロトコールを遵守した。

3. Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の体内動態評価

Asp-PAMAM-Micelle の体内動態を評価するため、Asp-PAMAM-Micelle への ^{111}In 標識を Hnatowich らの方法に準じて行った［5］。PTX の体内動態の評価には ^{3}H 標識体を用いた。^{111}In -Asp-PAMAM-Micelle（^{3}H-PTX）を、ddY マウスの尾静脈を介して静脈内投与した。投与後 1、5、10、30、60、180 分の時点で、血漿及び各臓器中の放射

活性を測定した。骨への移行量は、脛骨および大腿骨の骨中の放射活性を全身の骨重量に換算することで算出した。

4. 骨転移における Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の治療効果

骨転移モデルマウスは Arguello らの方法に準じて作製した［6］。すなわち、C57BL/6 系雌性マウスの左心室内にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を導入したがん細胞株である B16B-L6/Luc 細胞を投与することで骨転移モデルマウスを作製した。癌細胞投与日を 0 日目として、7 日目及び 10 日目に Asp-PAMAM-Micelle（PTX）を投与した。癌細胞投与 14 日目に、*in vivo* 微弱光イメージングシステムで癌増殖を評価した。すなわち、イソフルラン麻酔下、C57BL/6 系雌性マウスに D-luciferin を腹腔内投与した後、*in vivo* 微弱光イメージングシステムを用いて下肢骨における癌細胞由来のルシフェリン-ルシフェラーゼ発光を観察した。別途、イメージング画像取得後に、C57BL/6 系雌性マウスを安楽死させた後、下肢骨を採取し lysis buffer 中で下肢骨をホモジネートした。ホモジネート液を 凍結融解し遠心処理を施した後、D-luciferin を添加し、ルミノメータを用いて下肢骨中の癌細胞由来のルシフェラーゼ活性を測定した。下肢骨中の癌細胞数はルシフェラーゼ活性に基づき算出した。

5. 統計処理

実験結果は一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較を行い、P 値が 0.05 未満を有意と判定した。

結　果

1. Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の調製及び物理化学的特性

Asp 修飾 PAMAM に水溶性の PEG 及び疎水基（L）を結合させた両親媒性分子を合成し、溶液中で自己集合させた Asp-PAMAM-Micelle を調製した。本ミセルは、疎水基（L）で形成される疎水性コアに疎水性薬物が封入可能であることから、筆者らは Asp-PAMAM-Micelle に疎水性の抗がん剤である PTX を封入させた Asp-PAMAM-Micelle（PTX）を作製し、PTX の骨移行性の改善及び骨転移抑制効果について評価した。

疎水基を結合させていないデンドリマー誘導体の粒子径は約 15 nm を示した。一方、疎水基（L）を結合した各種デンドリマー誘導体の粒子径は約 50 nm を示し、粒子径の増大が観察された。このことから、疎水基（L）の結合により、デンドリマー誘導体がミセルを形成したと考えられる。また、Asp-PAMAM-Micelle は負電荷を示すことを確認した。

2. マウスにおける Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の体内動態

図 1 にマウス尾静脈内投与後の Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の血漿中濃度及び臓器分布の時間的推移を示す。評価には ^{3}H-PTX を封入した ^{111}In 標識 Asp-PAMAM-Micelle の 2 重標識体を用い、薬物と薬物キャリアの動態を同時に評価した。Asp を未修飾の ^{111}In-PEG-PAMAM-Micelle（PTX）及び封入された ^{3}H-PTX は急速に肝臓中へ移行し、投与後 180 分におけるそれらの骨移行率は、それぞれ 5.6%、7.7%であった。一方、^{111}In-Asp-PAMAM-Micelle（PTX）及び封入された ^{3}H-PTX は骨選択的な体内動態を示し、それぞれの骨移行率は 22%、26%であった。

3. Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の骨転移抑制効果の評価

図 2 に Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の骨転移に対する治療効果を示す。本骨転移モデルでは、B16-BL6 /Luc 細胞を投与した日を 0 日目として、がん細胞投与 0 日目から 3 日目にかけて、がんの接着が起こり、その後の浸潤過程を経て、7 日目以降に増殖過程に入ることが明らかとなっている。そこで、増殖過程における Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の癌増殖抑制効果の評価を目的として、7 日目及び 10 日目に投与後の下肢骨中がん増殖について、下肢骨中ルシフェラーゼ活性を指標に評価した。下肢骨における癌増殖は、Asp 未修飾の PEG-PAMAM-Micelle（PTX）の投与により減少する傾向を示した。一方、Asp-PAMAM-Micelle（PTX）は、PEG-PAMAM-Micelle（PTX）と比較して有意に下肢骨における癌増殖を抑制した。

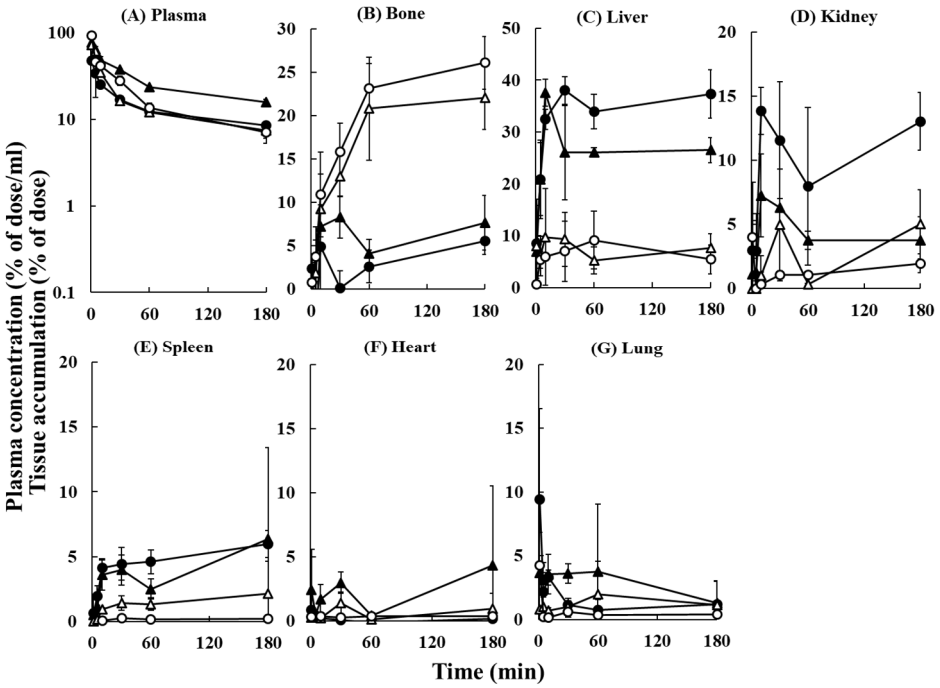


図 1. Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の体内動態

^{3}H-PTX を封入した ^{111}In 標識 Asp-PAMAM-Micelle の 2 重標識体を用い、マウス静脈内投与後の薬物と薬物キャリアの動態を同時に評価した。骨への移行量は、脛骨および大腿骨の骨中の放射活性を全身の骨重量に換算することで算出した。○：[^{111}In]Asp-PAMAM-Micelle（PTX）、△：Asp-PAMAM-Micelle（[^{3}H]PTX）、●：[^{111}In]PEG-PAMAM-Micelle（PTX）、▲：PEG-PAMAM-Micelle（[^{3}H]PTX）。

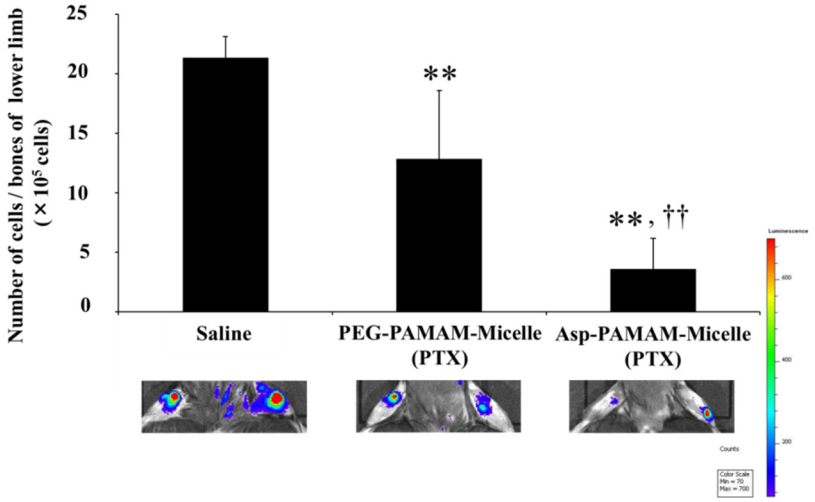


図 2. 骨転移モデルマウスにおける Asp-PAMAM-Micelle（PTX）の治療効果

PEG-PAMAM-Micelle（PTX）または Asp-PAMAM-Micelle（PTX）静脈内投与後の下肢骨中の癌増殖について、ルシフェラーゼ活性を指標に評価した。上図は下肢骨中の癌細胞数、下図はマウス下肢における癌細胞のイメージング画像を示す。**$P < 0.01$（saline 投与群との比較）、††$P < 0.01$（PEG-PAMAM-Micelle（PTX）投与群との比較）。

考　察

本研究では、効率的に抗がん剤を骨に送達可能なドラッグデリバリーシステムの開発による骨転移治療法の構築を目指して、Asp 修飾高分子ミセルを開発した。すなわち、Asp 修飾 PAMAM に水溶性の PEG と疎水基（L）を結合させた両親媒性分子を合成し、溶液中で自己集合させたナノ粒子（Asp-PAMAM-Micelle）を開発した。この Asp-PAMAM-Micelle は、疎水基（L）で構成される疎水性コアに疎水性薬物が封入可能であることから、疎水性コアにタキサン誘導体抗がん剤である PTX を封入させた Asp-PAMAM-Micelle（PTX）を作製し、PTX の骨移行性の改善を試みた。一般に、体内動態制御を目的とした化学修飾などが施されていない高分子ミセルなどの微粒子製剤は肝臓や脾臓などの細網内皮系へ集積することが報告されている［7］。Asp 未修飾の PAMAM-Micelle（PTX）は、予想通り肝臓への集積が顕著であったが、Asp-PAMAM-Micelle（PTX）は、肝臓や腎臓などの他臓器へほとんど集積せず、選択的に骨へ移行した。また、Asp-PAMAM-Micelle 及び PTX はほぼ同様の体内動態を示したことから、PTX は Asp-PAMAM-Micelle に封入されたまま骨へ効率よく分布したと考えられる。さらに、Asp-PAMAM-Micelle（PTX）による効率的な骨転移抑制は体内動態の結果と相関した。

以上のように本研究では、Asp-PAMAM-Micelle の物性、体内動態及び骨転移治療の評価により、Asp 修飾に基づく骨指向性薬物ナノキャリアの設計・開発に成功した。すなわち、Asp-PAMAM-Micelle は選択的に骨へ移行すること、Asp-PAMAM-Micelle の利用により PTX を骨へ効率よく送達可能であること、Asp-PAMAM-Micelle（PTX）は効率的に骨転移を抑制可能であることを明らかにした。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都薬科大学薬剤学分野の山本昌及び山下修吾である。

文　献

1） Hirabayashi H, Fujisaki J. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. Clin Pharmacokinet. 2003;42(15):1319-30. PMID: 14674786 DOI: 10.2165/00003088-200342150-00002

2） Van Poznak CH1, Temin S, Yee GC, Janjan NA, Barlow WE, Biermann JS, Bosserman LD, Geoghegan C, Hillner BE, Theriault RL, Zuckerman DS, Von Roenn JH; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2011 Mar 20;29(9):1221-7. PMID: 21343561 doi: 10.1200/JCO.2010.32.5209.

3） Yamashita S, Katsumi H, Hibino N, Isobe Y, Yagi Y, Kusamori K, Sakane T, Yamamoto A. Development of PEGylated carboxylic acid-modified polyamidoamine dendrimers as bone-targeting carriers for the treatment of bone diseases. J Control Release. 2017 Sep 28;262:10-17. PMID: 28710004 doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.018.

4） Yamashita S, Katsumi H, Hibino N, Isobe Y, Yagi Y, Tanaka Y, Yamada S, Naito C, Yamamoto A. Development of PEGylated aspartic acid-modified liposome as a bone-targeting carrier for the delivery of paclitaxel and treatment of bone metastasis. Biomaterials. 2018 Feb;154:74-85. PMID: 29120820 doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.053.

5） Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL. The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. Int J Appl Radiat Isot. 1982 May;33(5):327-32. PMID: 7095875

6） Arguello F, Baggs RB, Frantz CN. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow.Cancer Res. 1988 Dec 1;48(23):6876-81. PMID: 3180096

7） Allen TM, Chonn A.Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. FEBS

Lett. 1987 Oct 19;223(1):42-6. PMID: 3666140