120　難治癌に抗癌剤を高効率に送達可能な薬物送達システム	東　大志

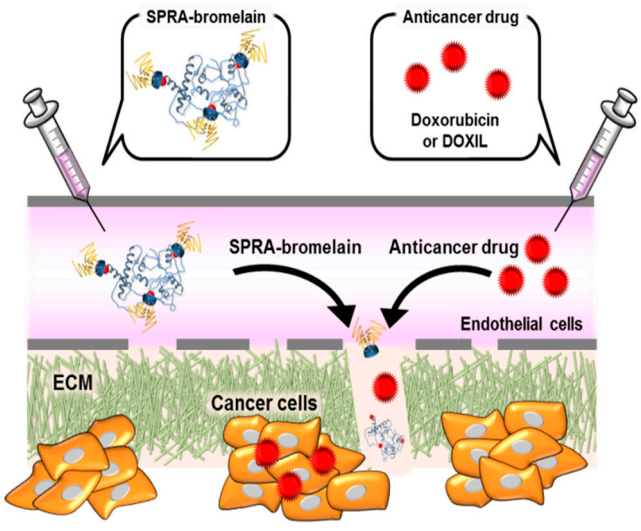
【目的】膵臓癌は、様々な癌種の中で生存率や薬物の治療貢献度が最も低い難治癌である。この理由の一つに、癌細胞周辺に密に存在する間質によって、抗癌剤が癌組織に拡散できないことが挙げられる。一方、タンパク質分解酵素であるブロメラインやヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼは、癌組織中の間質を分解可能なことが知られている。しかし、これら間質分解酵素は、静脈内投与後速やかに排泄されるため、癌組織まで到達することが困難である。ここで、タンパク質に共有結合を介してポリエチレングリコール（PEG）を化学修飾すると、血中滞留性が著しく改善されるものの、タンパク質本来の活性が劇的に低下するという致命的な欠点を有する。これに対して、最近我々は、β-シクロデキストリン（β-CyD）とアダマンタン（Ad）の可逆的な相互作用を介してタンパク質を PEG 化すると、活性を損なうことなく血中滞留性が増大することを明らかにし、self-assembly PEGylation retaining activity（SPRA）技術と命名した。そこで本研究では、SPRA 技術を駆使して、血中滞留性や癌集積性に優れる活性保持型 PEG 化ブロメライン（SPRA-ブロメライン）および SPRA-ヒアルロニダーゼを構築し、膵臓癌への高効率な抗癌剤デリバリーシステムとしての有用性を評価した。以下には、紙面の都合上、SPRA-ブロメラインの結果のみを紹介する。

【方法】β-CyD に分子量 20 kD の PEG 鎖を複数本修飾した PEG-β-CyD を調製した。また、ブロメラインに Ad を結合させた Ad-ブロメラインを合成し、PEG-β-CyD と水中で混合することにより、SPRA-ブロメラインを調製した。SPRA-ブロメラインの形成の確認は、等温滴定型熱量測定ならびに動的光散乱法による粒子径測定により行った。*In vitro* 間質分解能は、ゼラチンゲルに対するゲル分解能を指標に評価した。さらに、*in vivo* 抗腫瘍活性を評価するため、ヒト膵臓癌細胞由来の株化細胞である MIA PaCa-2 細胞を用いて膵臓癌モデルマウスを作製し、SPRA-ブロメラインとドキソルビシンの静脈内併用投与後の腫瘍サイズを測定した。

【結果】PEG-β-CyD は、Ad-ブロメラインと安定な超分子複合体（SPRA-ブロメライン）を形成した（$K_c > 10^4$ M^{-1}）。また、それらの粒子径は約 150 nm 程度で、enhanced permeability and retention effect（EPR 効果）により腫瘍に集積しやすい粒子径であることが示唆された。共有結合により PEG 鎖を導入した PEG-ブロメラインは、間質分解能を有していなかったのに対して、SPRA-ブロメラインは、ブロメライン単独と比較して同等以上の活性を保持した。ヒト膵臓癌モデルマウスに、SPRA-ブロメラインを静脈内投与し、さらに FITC-デキストラン（2 MD）を静脈内投与すると、腫瘍内に FITC-デキストラン由来の蛍光が観察された。また、SPRA-ブロメラインの静脈内投与は、ドキソルビシンの抗腫瘍活性を増強する傾向を示した。

以上のことから、SPRA-ブロメラインは、抗癌剤を膵臓癌へ高効率にデリバリーする際に有用であることが示唆された。

SPRA-ブロメラインによる抗癌剤の抗腫瘍効果増強機構



120. 難治癌に抗癌剤を高効率に送達可能な薬物送達システム

東　大志

*熊本大学 大学院生命科学研究部 製剤設計学分野

Key words：膵臓癌，薬物送達，ブロメライン，ポリエチレングリコール，シクロデキストリン

緒　言

2014 年における癌の死亡者数は約 36 万 5 千人であり、1981 年以降、癌は我が国における死因第 1 位の疾患である。このうち、膵臓癌の 5 年生存率は約 7%と低く、難治癌と言われており、効果的で副作用が少ない抗癌剤の開発が必要とされている。効果的で副作用の少ない抗癌剤の開発を行うため、Enhanced Permeability and Retention effect（EPR 効果）の概念が広く受け入れられている。しかし、膵臓癌組織において、癌細胞周辺には種々の細胞外基質から成る間質が存在するため、抗癌剤が分布しにくくなる。加えて、腫瘍血管の高い透過性によって漏出・蓄積した高分子が原因となり、間質圧が亢進し、癌組織への薬物送達が妨げられる。

現在、間質圧の亢進した癌に対して、ヒアルロニダーゼを用いた治療戦略が精力的に研究されている。ヒアルロニダーゼは癌組織の間質に存在するヒアルロナンを分解し、間質圧を低下させる結果、癌組織深部にまで抗癌剤をデリバリーできることが期待できる。しかし、その血中消失半減期は静脈内投与において 3 分以下であり、ヒアルロニダーゼを効率よく癌組織へ移行させることは困難であった。そのため、ヒアルロニダーゼのポリエチレングリコール（PEG）化に関する研究が展開されてきた。例えば Curtis らは、ヒアルロニダーゼに分子量 30 kDa の PEG を化学修飾し、その血中半減期を 10 時間以上に延長させることに成功した。また、前立腺癌モデルマウスに PEG 化ヒアルロニダーゼを静脈内投与すると、癌組織の間質を分解し、間質圧の低下により、ドセタキセルやドキソルビシン封入リポソームの抗癌活性を上昇させた。同様に、Michael らは、PEG 化ヒアルロニダーゼを膵管腺癌モデルマウスに静脈内投与すると、分子量 2 MDa の FITC-デキストランの腫瘍への移行が増大すること、また、ゲムシタビンの抗癌活性が増強することを報告した。このように、PEG 化ヒアルロニダーゼを用いた癌組織深部への DDS は非常に有望な治療戦略であり、現在、ヒアルロン酸高発現進行性膵臓癌を対象として、アルブミン／パクリタキセル結合体（アブラキサン®）もしくはゲムシタビンとの併用投与の臨床試験第Ⅲ相が実施されている。しかし、ヒアルロニダーゼを PEG 化すると、本来の活性が 75%も低下することから、非 PEG 化体と比較して、投与量の増大を余儀なくされる。

一方、ブロメラインは、パイナップルから抽出されたパパインファミリーに属するタンパク質分解酵素で、システインプロテアーゼの一種である。ブロメラインは抗アレルギー作用、抗炎症作用および壊死組織除去作用などを有し、医薬品のみならずサプリメントにも有効利用されている。また、ブロメラインの毒性は非常に低く、マウスへの静脈内投与における LD_{50} は 30 mg/kg 以上であることが知られている。近年、ブロメラインが癌組織の間質を分解可能なことが報告された。したがって、ブロメラインと抗癌剤を併用投与すると、ヒアルロニダーゼと同様に、抗癌剤を癌組織深部にまで送達可能であると考えられる。しかし、ブロメラインの分子量は 40 kDa 以下であるため糸球体濾過を受けやすく、静脈内投与後の血中半減期が短いことや正常組織に分布する可能性があることから、癌組織へ集積することが困難であると予想される。

最近我々は、β-シクロデキストリン（β-CyD）とアダマンタン（Ad）の可逆的な相互作用を介してインスリンやリゾチームを PEG 化する技術を構築し、self-assembly PEGylation retaining activity（SPRA）技術と命名した［1～5］。すなわち、タンパク質に Ad を、β-CyD に PEG を修飾し、Ad とβ-CyD の可逆的な相互作用により、タンパク質に PEG を間接的に結合させた。驚くべきことに、SPRA 技術を用いてタンパク質を PEG 化すると、活性を損なうことなくタンパク質の血中滞留性が増大した。

*現在の所属：熊本大学 大学院先導機構 大学院薬学研究部

上記背景の下、本研究では、モデルタンパク質にヒアルロニダーゼおよびブロメラインを用いて、SPRA-ブロメラインおよび SPRA-ヒアルロニダーゼを調製し、腫瘍深部にまで抗癌剤をデリバリー可能なドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築を行った。両 SPRA-タンパク質は、高い細胞外基質分解能および優れた血中滞留性を有するため、抗癌剤との併用投与により、腫瘍深部にまで抗癌剤をデリバリー可能なことが期待できる（図 1）。以下に得られた知見を詳述するが、紙面の都合上、SPRA-ブロメラインの結果のみ紹介する。

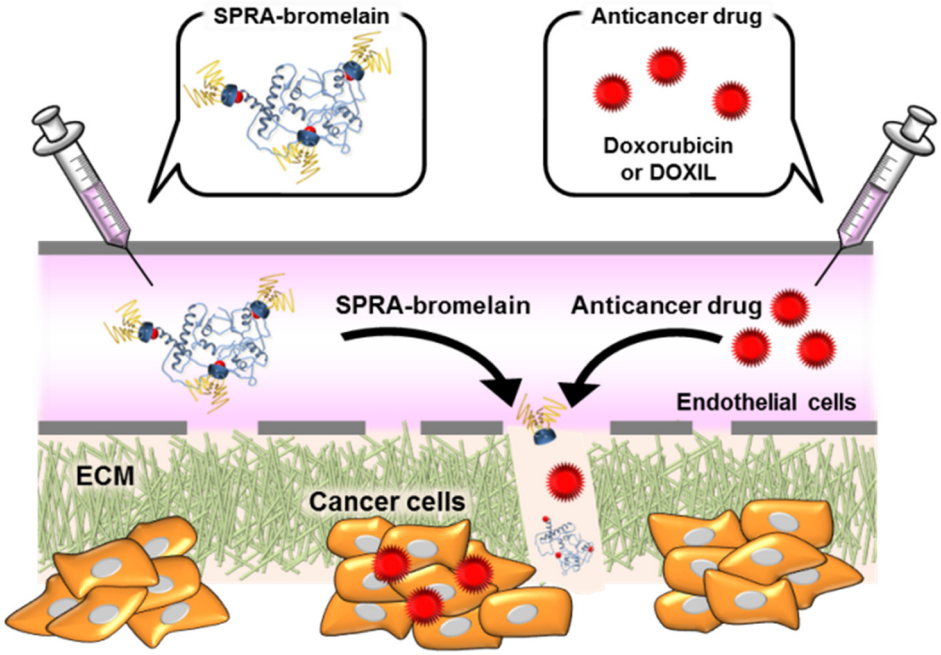


図 1. SPRA-ブロメラインによる抗癌剤の抗腫瘍効果増強機構

方　法

β-CyD に分子量 20 kD の PEG を複数本修飾した PEG-β-CyD を調製した。また、ブロメラインに Ad を結合させた Ad-ブロメラインを合成し、PEG-β-CyD と水中で混合することにより、SPRA-ブロメラインを調製した。SPRA-ブロメラインの形成の確認は、等温滴定型熱量測定（ITC）ならびに動的光散乱法による粒子径測定により行った。*In vitro* 間質分解能は、ゼラチンゲルに対するゲル分解能を指標に評価した。さらに、*in vivo* 抗腫瘍活性を評価するため、ヒト膵臓癌細胞由来の株化細胞である MIA PaCa-2 細胞を用いて膵臓癌モデルマウスを作製し、SPRA-ブロメラインとドキソルビシンの静脈内併用投与後の腫瘍サイズを測定した。

結果および考察

1. Ad-ブロメライン結合体と PEG-β-CyD の相互作用

SPRA-ブロメラインの形成を ITC にて検討した結果、PEG-β-CyD と Ad-ブロメライン結合体との安定度定数は、1.14×10^{4} M^{-1} であり、*in vivo* においても複合体として安定に存在できる安定度定数であった。このことから、SPRA-ブロメラインは、安定な複合体であることが確認された。

また、SPRA-ブロメラインの粒子径を測定したところ、Ad-ブロメライン結合体の粒子径は 2.35 nm、PEG-β-CyD の粒子径は 10.9 nm であったのに対して、SPRA-ブロメラインの粒子径は、152 nm であった。このように、SPRA-ブロメラインは、EPR 効果に適した粒子径を有することが示唆された。

2. SPRA-ブロメラインのゼラチン分解能

細胞間質にはコラーゲン、エラスチン、フィブリン、フィブロネクチンなどの線維タンパク質や、ヒアルロナン、アグレカンなどのグリコサミノグリカンが存在する。中でも、コラーゲンは間質の主成分であると言われており、間質圧の高い癌組織に多く存在する。そこで、コラーゲンの変性体であるゼラチンを用いて、SPRA-ブロメラインの細胞外基質分解能について検討した。Ad-ブロメライン結合体は、ブロメライン単独と比較して同等以上のゼラチン分解能を示した。一方、共有結合型の PEG 化ブロメラインのゼラチン分解能はブロメライン単独と比較して、24%であった。重要なことに、SPRA-ブロメラインは、ブロメライン単独と比較して同等の活性を保持していた。以上の結果より、SPRA-ブロメラインはブロメライン本来の活性を保持していることが示唆された。

3. FITC-デキストランのゼラチンゲル透過能に及ぼす SPRA-ブロメラインの影響

本項では、高分子製剤のモデルとして FITC-デキストラン（分子量 2 MDa）を用いて、それらのゼラチンゲル透過性に及ぼす SPRA-ブロメラインの影響を検討した。PBS のみを添加した場合（ブロメライン非添加）、ほとんどゼラチンゲルを透過しなかったのに対して、SPRA-ブロメラインは、FITC-デキストランの透過性を向上させた。また、共有結合型の PEG 化ブロメラインの場合、FITC-デキストランの透過性を向上させなかった。これらの結果より、SPRA-ブロメラインは、ゼラチンゲルに対する FITC-デキストランの透過性を向上させることが示唆された。

4. SPRA-ブロメライン投与後の FITC-デキストランの癌組織集積性

本項では、間質圧が高く、難治性癌の一種であるヒト膵臓癌由来 MIA PaCa-2 細胞を異種移植した担癌マウスを作製し、FITC-デキストランの癌組織集積性に及ぼす SPRA-ブロメラインの静脈内投与の影響を検討した。実験は、まず SPRA-ブロメラインを静脈内投与 24 時間後、FITC-デキストラン（2 MDa）を静脈内投与し、12 時間後における腫瘍の蛍光強度を IVIS を用いて測定した。さらに、腫瘍を透明化し、蛍光顕微鏡を用いて観察した（図 2）。なお、腫瘍の透明化は Tainaka らの方法（CUBIC 法）に従い、アミノアルコールを処理し、腫瘍中のヘムを溶出させることにより行った。SPRA-ブロメライン静脈内併用投与後の各組織における FITC-デキストランの蛍光強度を IVIS により観察したところ、SPRA-ブロメライン投与群では、5%マンニトールおよびブロメライン投与群よりも、腫瘍において高い蛍光強度が認められた。また、透明化した腫瘍を蛍光顕微鏡にて観察した結果、IVIS の結果と同様、SPRA-ブロメライン投与群は、他の投与群と比較して、高い蛍光強度を示した。以上の結果より、SPRA-ブロメラインの静脈内併用投与、FITC-デキストランの癌組織集積性を増大させることが示唆された。

5. SPRA-ブロメライン併用投与時の抗癌剤の抗腫瘍活性

SPRA-ブロメラインと抗癌剤ドキソルビシンとの併用投与による抗腫瘍活性について検討した。実験は、まず SPRA-ブロメラインを週 1 回静脈内投与し、24 時間後、ドキソルビシンを週 1 回静脈内投与した。その後、腫瘍体積および体重を経時的に測定した。SPRA-ブロメライン併用投与群は、ドキソルビシン単独投与群に比べて、有意に高い抗腫瘍効果を示した。また、SPRA-ブロメライン併用投与群の体重変化は、5%マンニトール群と比較して、差異は認められなかった。以上の結果から、SPRA-ブロメライン併用投与により、抗癌剤の抗腫瘍活性が増大することが示唆された。

6. SPRA-ブロメライン静脈内投与後の安全性評価

SPRA-ブロメラインの安全性を評価するため、マウスへ静脈内投与 24 時間後の血液生化学検査値を測定した。なお、血液生化学検査値は、腎障害性の指標として CRE および BUN、肝障害性の指標として AST および ALT、全身的な細胞障害性の指標として LDH を測定した。その結果、全ての検査項目において、SPRA-ブロメライン投与群は、コントロールである 5%マンニトール投与群と同等の値を示した。このことから、SPRA-ブロメラインの *in vivo* における安全性は高い可能性が示唆された。

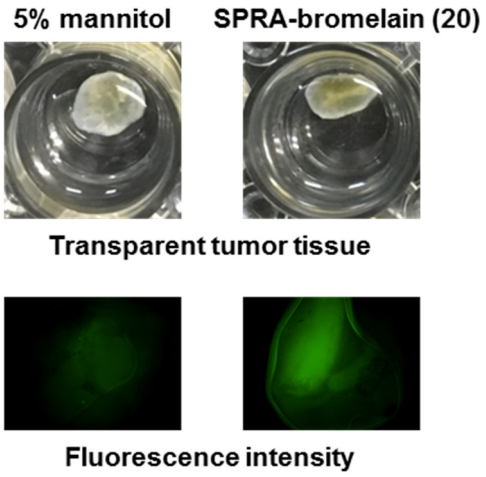


図 2. 透明化した腫瘍組織中の FITC-デキストランの蛍光

文 献

1) Higashi T. Cyclodextrin-Based Molecular Accessories for Drug Discovery and Drug Delivery. Chem Pharm Bull. 2019;67:289-298. doi.org/10.1248/cpb.c18-00735
2) Higashi T, Motoyama K, Arima H. Supramolecular Pharmaceutical Sciences: A Novel Concept for Future Pharmaceutical Sciences. Yakugaku Zasshi. 2019;139:175-183. doi.org/10.1248/cpb.c17-00765
3) Higashi T, Iohara D, Motoyama K, Arima H. Supramolecular Pharmaceutical Sciences: A Novel Concept Combining Pharmaceutical Sciences and Supramolecular Chemistry with a Focus on Cyclodextrin-Based Supermolecules. Chem Pharm Bull. 2018;66:207-216. doi.org/10.1248/cpb.c17-00765
4) Hirotsu T, Higashi T, Motoyama K, Arima H. Cyclodextrin-based Sustained and Controllable Release System of Insulin Utilizing the Combination System of Self-assembly PEGylation and Polypseudorotaxane Formation. Carbohydr Polym. 2017;164:42-48. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.074
5) Hirotsu T, Higashi T, Abu Hashim II, Misumi S, Wada K, Motoyama K, Arima H. Self-Assembly PEGylation Retaining Activity (SPRA) Technology via a Host-Guest Interaction Surpassing Conventional PEGylation Methods of Proteins. Mol Pharm. 2017;14:368-376. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00678