

201019045A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松村 保広

平成23（2011）年 3月

1/1 冊

目 次

I. 総括研究報告

- 新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究 1
松村 保広

II. 分担研究報告

1. 腫瘍脈管の特性に基づく DDS 製剤の開発とトランスレーショナル研究 5
松村 保広
2. 抗腫瘍剤内包ミセル製材の開発 9
西山 伸宏
3. 抗がん剤治療効果を規定する腫瘍微小環境の研究 13
土原 一哉
4. 微生物代謝産物からの抗がん剤の開発に関する研究 16
百瀬 功
5. オートファジー阻害物質の探索 19
上野 隆
6. 抗腫瘍剤内包リポソーム製剤の開発 22
丸山 一雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

研究代表者 松村 保広

国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部

低分子抗がん剤はがんと同等に正常組織へ分布し有害事象をもたらす。この不都合を解消するために DDS の概念が導入された。がん組織はしかしながら、せっかくながら集積した DDS 製剤の行く手をはばむ間質が存在するので、単に集めれば効果がでるわけではない。本研究ではがん組織の生理学、病理学に立脚し、工学系マテリアルサイエンスと生物学マテリアル抗体などとの融合でより有用ながん治療法の開発を行ってきた。

A. 研究目的

工学系マテリアルとしてはポリマーミセルによる抗がん剤デリバリー、リポソームによる遺伝子デリバリー、生物系マテリアルとしては抗体抗がん剤複合体の有用性を検討する。いずれは抗体と工学系マテリアルとのハイブリッド化を行う。がんと血液凝固といった病態生理学に立脚した新たな治療戦略を創生する。

B. 研究方法

- 1) 抗 Tissue Factor (TF) 抗体の開発と DDS への応用のための薬理評価
- 2) 環状 RGD ペプチド導入 DACHPt 内包ミセルの構築と細胞毒性評価
- 3) バブルリポソームと超音波によるインターロイキン 12 遺伝子治療
- 4) 新規プロテアソーム阻害剤の開発
- 5) オートファジー阻害剤のスクリーニング
- 6) BRCA2 遺伝子変異陽性膵癌

PARP1 阻害剤の感受性の検討。

C. 研究結果

- 1) 抗ヒト、抗マウス TF 抗体の作製に成功し、ヌードマウス移植ヒト腫瘍に両者とも選択的に集積した。悪性グリオーマで TF が高発現していることを確認した。
- 2) RGD 付加 DACHPt 内包ミセルは一部のがん細胞で毒性の増強が確認された。
- 3) バブルリポソーム・超音波によりインターロイキン 12 遺伝子導入に成功し、顕著な抗腫瘍効果を認めた。
- 4) 新規のプロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体を見いだした。
- 5) 新規のオートファジー阻害剤 CB112B03 と CB153C07 を見いだした。
- 6) 膵がん細胞 Capan-1 においても BRCA 変異陽性乳癌モデルで提唱されている Synthetic lethality が成立していることが示唆された。

D. 考察、

DDS 製剤は工学系のナノ粒子に抗体などのパイロット分子を搭載することにより有効なナノキャリアになることが証明された。分子標的剤も DDS との組み合わせが重要と考える。

E. 結論

第 2 世代の DDS は工学系マテリアルと生物系マテリアルのハイブリッドであり、さらなる効果および安全性の増強が認められ、臨床評価すべきと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. J Kuroda, Y Matsumura, et al. Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle on U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan in Combination with Bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 15;16(2):521-9, 2010.
2. H Kenmotsu, Y Matsumura et al. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer.* October 1, 4597-4604, 2010.
3. T Nagano, Y Matsumura et al. Synergistic Antitumor Activity of the SN-38-Incorporating Polymeric Micelles NK012 with S-1 in a Mouse Model of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer.* 127(11), 2699-2706, 2010.
4. A Takahashi, Y Matsumura et al.. Detailed distribution of NK012, an SN-38 incorporating micelle, in the liver and its potent antitumor effects in mice bearing liver metastases. *Clin Cancer res.* 16(19), 4822-4831,2010.
5. S Fujisawa, Y Matsumura et al.. Optimum conditions of ultrasound-mediated destruction of bubble liposome for siRNA transfer in bladder cancer. *Therapeutic Delivery.* 1(2), 247-255,2010.
6. Y Matsumura. Preclinical and clinical studies of NK012, an SN-38-incorporating polymeric micelles, which is designed based on EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev,* 63(3),184-192,2010.
7. T Hamaguchi, Y Matsumura et al.. Phase I Study of NK012, a Novel SN-38-Incorporating Micellar Nanoparticle, in Adult Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 16(20), 5058-5066, 2010.
8. R Plummer, R H Wilson, Y Matsumura, T Nishiya et al. A phase I clinical study of

- cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumors. *Brit J Cancer* . 15;104(4):593-8,2011.
9. A Ishii-Watabe, Y Matsumura et al.. Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab Pharmacokinet*.2010.
 10. Yasunaga, M. Manabe, S.Matsumura, Y. New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots. *Cancer Sci*. 2011(in press).
 11. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
 12. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)
 13. Onozuka H, Tsuchihara K, et al. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci.* 102; 975-82, 2011.
 14. Momose, I., Ohba, S., Tatsuda, D., Kawada, M., Masuda, T., Tsujiuchi. G., Yamori, T., Esumi, H., Ikeda, D. Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (3): 460-466 (2010).
 15. Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S., Masuda, T., Momose, I., Ikeda, D. Leucinstatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. M. Kawada, H. Inoue, S. Ohba, T. Masuda, I. Momose and D. Ikeda, **Int J. Cancer**, 126(4): 810-818 (2010).
 16. Iijima, M., Momose, I., Ikeda, D. Increased ABCB1 expression in TP-110-resistant RPMI-8226 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(9): 1913-1919 (2010).
 17. Watanabe, T., Abe . H., Momose, I., Takahashi, Y., Ikeda, D., Akamatsu,

- Y. Structure-activity relationship of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20(19): 5839-5842 (2010).
18. Katsuhiko Asanum, Miyuki Akiba, Takagi, Fumiko Kodama et al. Dendrin location in podocytes is associated with the disease progression in animal and human glomerulopathy. *Am. J. Nephrol.* in press
19. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. *J. Control. Release.* 149(1), 36-41, 2011
20. Circadian Rhythm of Transferrin Receptor 1 Gene Expression Controlled by c-Myc in Colon Cancer-Bearing Mice. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. *Cancer Res.* 70 (15), 6238-6246, 2010
21. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M, *Biomaterials.* 31(30), 7813-26, 2010
22. Effective in vitro and in vivo gene delivery by the combination of liposomal bubbles (bubble liposomes) and ultrasound exposure. Suzuki R, Maruyama K, *Methods Mol. Biol.* 605, 473-86, 2010
23. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro. Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K, *Ultrason. Sonochem.* 18(1), 425-30, 2010
24. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K, *J. control. Release,* 142, 245-50, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

研究代表者 松村 保広

国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部

低分子抗がん剤はがんと同等に正常組織へ分布し有害事象をもたらす。この不都合を解消するために DDS の概念が導入された。その中で抗がん剤をがん細胞特異的抗体に付加したミサイル療法が開発されたが、一般の固形がんは間質が存在し、腫瘍血管から漏れ出した抗がん剤抗体複合体が効率よくがん細胞にデリバリーできない。本研究ではこの点を解消するための間質ターゲティング療法の開発を行った。

A. 研究目的

がんと凝固の関係は古くから知られていたが、最近の臨床報告からがんが生体内に存在するだけで、静脈血栓症がおきやすいことが明らかになった。特に脳腫瘍、胃がん、膵がんなど侵襲性の強いがんで顕著である。そもそもがんは浸潤性であり血管を破壊すると出血がおき、またがん細胞表面には外因系凝固のトリガーである組織因子 Tissue Factor が強発現しており、癌組織においても凝固亢進状態にあり、凝固がおきると、1-2 週でコラーゲンに置き換わる。凝固のものは外傷や心筋梗塞などでもおきるが、がんの場合はがんが存在する限り凝固が起き続け、これが最終的にがんにおける間質となり免疫複合体の行く手を阻むと考えた。本研究では抗ヒトおよびマウス TF の抗体を作製し、抗体の SH 基にスパーサーを介してトポイン

メラゼ I 阻害剤 SN-38 を付加した抗がん剤抗体複合体を作製し、がん細胞だけでなくがん間質を狙うミサイル療法の開発を手がける。

B. 研究方法

- 1) フロイント完全アジュバントとの混合でヒト・レコンビナント TF (抗原) をラットに免疫した。リビアジュバントシステムと抗原ブースト後に、採取したラット脾臓細胞とミエローマ(P3X63Ag8.653)との細胞融合及び HAT 培地での選択を行った。最終的に抗原の ELISA 試験で陽性クローンを取得した。同様に抗マウス TF 抗体の作成も行った。選択した抗体でヒト脳腫瘍株およびマウス腫瘍株で FACS をおこなった。
- 2) 抗ヒトおよび抗マウス TF 抗体を蛍光標識して in vivo イメージングで実際の腫瘍内分布様式を確認した。
- 3) TF の血液凝固系を中心としたが

ん病態への関与に関して、臨床病理学意義の確認のために、脳腫瘍のヒト手術検体に対して抗ヒト TF 抗体と抗フィブリン抗体で免疫染色を行った。

C. 研究結果

1) 抗ヒトと抗マウスの2種類の抗TF抗体の作成に成功した(図1、図2)。

図1. ヒト芽生腫細胞株におけるTFの発現

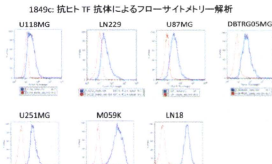


図2. 新規作成抗マウスTF mAbのaffinityの評価

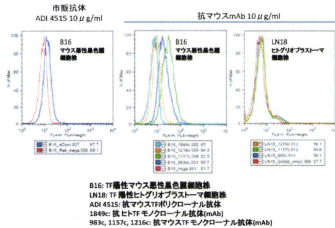


図3. 蛍光標識抗ヒトTF抗体の脳腫瘍組織への集積

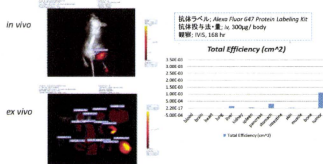


図4. 蛍光標識抗マウスTF抗体の脳腫瘍組織への集積

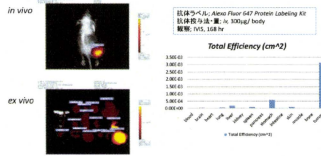
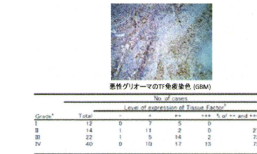


図5. グリオーマ臨床サンプルにおけるTissue factor発現と腫瘍悪性度



*Histologic diagnosis based on the World Health Organization classification system.
 *Expression of tissue factor protein was classified as follows: (+) negative; (++) weakly positive (20% positive tumor cells); (+++) moderately positive (50% positive tumor cells with weak intensity); (++++) strongly positive (50% positive tumor cells with strong intensity).

2) ヒトがん細胞とマウス間質からなる脳腫瘍モデルにおいても、TF はがん細胞とがん間質の両方に発現しており、蛍光抗体を用いた in vivo イメージングにおいて、抗ヒト TF 抗体(図4)はがん組織に特異的に集積していることを確認した。

3) 88 症例のヒト脳腫瘍免疫染色の解析結果から TF は 98% が陽性で、予想通り腫瘍内のがん細胞と間質の両方に発現していた(図5)。

D. 考察、

今後、抗ヒトと抗マウスの2種類の抗TF抗体の抗腫瘍効果の違いを確認することで、がん細胞もしくは間質TF

のどちらを標的にした DDS 製剤が有効かを明らかにすることができる。また、脳腫瘍において TF とフィブリンが共に強く発現していることから、TF による外因系凝固カスケードの亢進が深部血栓症の頻度を増している可能性がさらに高まった。TF を介した脳腫瘍と血液凝固系との関連に関しても、さらに解析を進める。

E. 結論

作製した抗ヒト、抗マウス TF 抗体が機能していることが判明した、次年度以降は SN-38 をはじめとする抗がん剤付加体を作製し、脳腫瘍をはじめとするモデル系にて薬効評価を行うことが可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. J Kuroda, Y Matsumura. Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle on U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan in Combination with Bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 15;16(2):521-9, 2010.
2. H Kenmotsu, Y Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer.* October 1, 4597-4604, 2010.
3. T Nagano, Y Matsumura. Synergistic Antitumor Activity of the SN-38-Incorporating Polymeric Micelles NK012 with S-1 in a Mouse Model of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer.* 127(11), 2699-2706, 2010.
4. A Takahashi, Y Matsumura. Detailed distribution of NK012, an SN-38 incorporating micelle, in the liver and its potent antitumor effects in mice bearing liver metastases. *Clin Cancer res.* 16(19), 4822-4831, 2010.
5. S Fujisawa, Y Matsumura. Optimum conditions of ultrasound-mediated destruction of bubble liposome for siRNA transfer in bladder cancer. *Therapeutic Delivery.* 1(2), 247-255, 2010.
6. Y Matsumura. Preclinical and clinical studies of NK012, an SN-38-incorporating polymeric micelles, which is designed based on EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev,* 63(3), 184-192, 2010.
7. T Hamaguchi, T Doi, T Eguchi-Nakajima, K Kato, Y Yamada, Y Shimada, N Fuse, A Ohtsu, S Matsumoto, M Takanashi,

- Y Matsumura. Phase I Study of NK012, a Novel SN-38-Incorporating Micellar Nanoparticle, in Adult Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 16(20), 5058-5066, 2010.
8. R Plummer, R H Wilson, H Calvert, A V Boddy, M Griffin, J Sludden, M J Tilby, M Eatock, D G Pearson, C J Ottley, Y Matsumura, K Kataoka, and T Nishiya. A phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumors. *Brit J Cancer* . 15;104(4):593-8,2011.
9. A Ishii-Watabe, Y Matsumura. Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab Pharmacokinet.*2010.
10. Yasunaga, M. Manabe, S.Matsumura, Y. New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots. *Cancer Sci.* 2011(in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業「新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究」
分担研究報告書

抗腫瘍剤内包ミセル製剤の開発

分担研究者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科 准教授

本研究では、ペプチドや抗体などの標的リガンドを搭載した高分子ミセル型DDSを構築し、耐性がんなどの難治がんの革新的治療を実現することを目指している。本年度は、ダハプラチン内包ミセル (DACHPt/m) のオキサリプラチン耐性克服メカニズムに関して、metallothionein(MTIQ)およびmethionine synthase(MTR)の関与をsiRNAによる遺伝子ノックダウンを利用して解明した。さらにリガンド分子として腫瘍血管の内皮細胞やがん細胞表面に過剰発現が認められる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチドを導入したDACHPt/mを構築し、種々のがん細胞に対する細胞毒性を評価した。

A. 研究目的

親水性高分子と疎水性高分子が連結されたブロック共重合体は、水中で自律的に会合し粒径数十ナノメートルの高分子ミセルを形成する。高分子ミセルは、内核に制癌剤などの疎水性薬剤を内包させることができ、表面が生体適合性のPEGで覆われているために生体内で異物として認識されず血中を長期滞留することができる。さらに、高分子ミセルは、Enhanced Permeability and Retention (EPR)効果(腫瘍では血管壁の透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築によって高分子物質が集積しやすい環境が形成されている効果)によって固形癌に選択的に集積し、優れた制癌活性を示すことが実証されている。このような高分子ミセル型DDSは、パクリタキセル、シスプラチン、SN-38、オキサリプラチンを内包したシステムの臨床治験が国内外で実施されており、

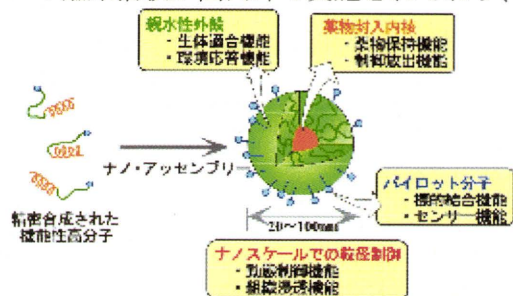


図1. 高分子ミセル型DDSの概念図

癌標的治療において有望なキャリアであると考えられている。

そこで本研究では、高分子ミセルを構成するブロック共重合体の最適化と機能の創り込みによって、従来型ミセルと比較して高機能化された高分子ミセルを構築し、耐性癌や転移癌などの難治性癌の治療を実現することを目指している。本年度は、これまでの研究で確認されてきたダハプラチン内包ミセル (DACHPt/m) のオキサリプラチン耐性克服メカニズムを検証し、さらにリガンド分子として環状RGDペプチドを導入したDACHPt/mを構築し、種々の癌細胞に対する細胞毒性を評価した。

B. 研究方法

1) DACHPt/m のオキサリプラチン耐性克服メカニズムの解析

オキサリプラチン存在下で培養することにより樹立したオキサリプラチン耐性ヒト大腸癌細胞 (HT29/ox) に対して、Lipofectamine RNAiMax を用いてmetallothionein (MTIQ)とmethionine synthase (MTR)をノックダウンした。その24時間後に、オキサリプラチンとHT29/oxを48時間接触させ、オキサリプラチンの細胞毒性をMTTアッセイによって評価した。

2) 環状 RGD ペプチド導入 DACHPt/m の構築と細胞毒性評価

末端にマレイミド(MAL)基を有する poly(ethylene glycol)-poly(glutamic acid) [PEG-P(Glu)]ブロック共重合体と DACHPt を 37°C の水中で 3 日間反応させることによって表面に MAL 基を有する DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)を構築した。このミセルと N 末端に Cys 残基を有する環状 RGD ペプチドを反応させることによって表面に環状 RGD が導入された DACHPt/m を構築した。

調製した環状 RGD 導入 DACHPt/m の機能評価は、種々のがん細胞(ヒト乳癌 MDA-MB-435S、ヒトグリオーマ U87MG、マウスメラノーマ B16-F10、ヒト子宮頸癌 HeLa、ヒト肝癌 Huh-7)に対する細胞毒性によって評価した。この評価では、薬剤と細胞を 3 時間接触させ、培地交換を行なった後に 48 時間培養した後の細胞生存率を MTT アッセイによって評価した。

C. 研究結果

1) DACHPt/m のオキサリプラチン耐性克服メカニズムの解析

ヒト大腸がん HT29 細胞と比較して 10 倍のオキサリプラチン耐性を示す HT29/ox 細胞における metallothionein (MT1Q) および methionine synthase (MTR) の発現量を real-time PCR により評価したところ、HT29/ox 細胞は HT29 細胞と比較して 3 倍の MT1Q および MTR の発現を示すことが明らかになった(図 2A, B)。次に、HT29/ox 細胞に対して siRNA を用いて MT1Q および MTR をノックダウンしたところ、HT29 細胞と同程度まで MT1Q と MTR の発現量がノックダウンされることが明らかになった(図 2A, B)。HT29 細胞、HT29/ox 細胞、control siRNA を導入した HT29/ox 細胞、ならびに MT1Q と MTR を同時にノックダウンした HT29/ox 細胞に対してオキサリプラチンの細胞毒性を評価したところ、HT29/ox 細胞と control siRNA を導入した HT29/ox 細胞は、HT29 細胞と比べて 10 倍の 50%細胞増殖阻止濃度(IC50)値を示したが、MT1Q と MTR を同時にノックダウンした HT29/ox 細胞の

IC50 値は、HT29 細胞のそれと同程度であった。これらの結果より、MT1Q と MTR が HT29/ox 細胞のオキサリプラチン耐性に大きく関与していることが示唆された。

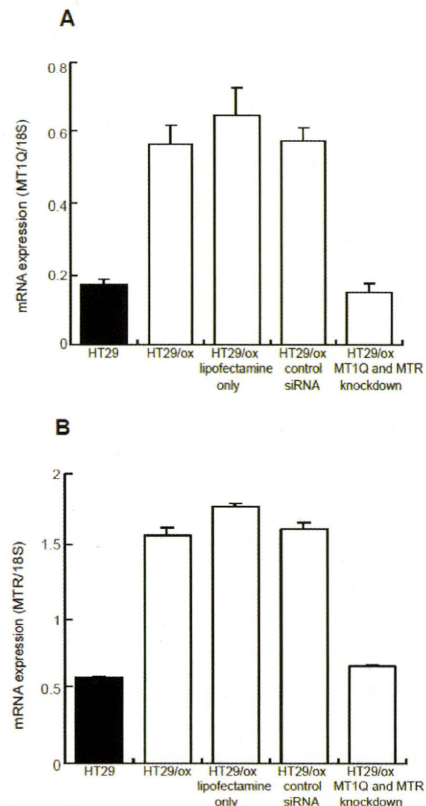


図 2. HT29/ox 細胞における MT1Q (A) および MTR (B) の siRNA によるノックダウン(Real-time PCR による評価)

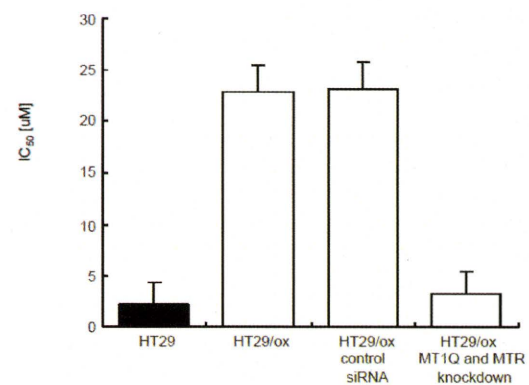


図 3. DACHPt 内包ミセルからの Pt のリリース評価

2) 環状 RGD ペプチド導入 DACHPt/m の構築と細胞毒性評価

マレイミド基を有する PEG-P(Glu)の合成

に関しては、¹H-NMRによる分析を行い、副反応なく合成が進行したことが確認された。マレイミド基の導入率は40%前後であった。このポリマーとDACHPtを水中で3日間反応させることによりDACHPt内包ミセル(DACHPt/m)が形成され、MAL基と環状RGDを反応させることによって、環状RGDが導入されたDACHPt/mを構築することができた。調製されたDACHPt/mの動的光散乱測定を行なったところ、ミセルの粒径は30nmであり、多分散度(PDI)は0.09であった。

次に、環状RGDペプチドを導入したDACHPt/mの種々の癌細胞に対する細胞毒性を評価した。表1のIC50値から分かるように、環状RGDの効果には細胞腫依存性が見られ、MDA-MB-435S、U87MG細胞では、環状RGDペプチドの導入によるIC50の低下(すなわち細胞毒性の増強)が見られたが、HeLa、Huh-7細胞では環状RGDペプチドの導入はほとんど効果がなく、B16F10ではむしろIC50の増加(すなわち細胞毒性の低下)が確認された。

表1. 環状RGD導入DACHPt/mの種々の癌細胞に対する50%細胞増殖阻止濃度(IC50)

	IC50 (μM)		
	oxaliplatin	DACHPt/m	cRGD -DACHPt/m
MDA-MB-435S	60	>373	102
U87MG	74	>1000	45
B16F10	31	25	51
HeLa	18	86	112
Huh-7	32	150	123

D. 考察

これまでの研究により、DACHPt内包ミセル(DACHPt/m)がオキサリプラチン耐性大腸がん (HT29/ox)細胞に対して優れた薬効を示した要因として、細胞質内の白金の解毒機構を担っているMT1Q、MTR遺伝子の関与が示唆されていた。そこで、本年度は、HT29/ox細胞のMT1QとMTRをsiRNAによりノックダウンし、オキサリプラチンの細胞毒性を評価したところ、MT1QとMTRのノックダウンによって、オキサリプラチンがHT29/ox細胞に対して高い細胞毒性を示す、すなわちHT29/ox細胞のオキサリプラチ

ン耐性がreverseすることが確認された。一方、これまでの研究により、DACHPt/mは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、初期エンドソームでは安定であるが、後期エンドソーム/リソソームで崩壊し、DACHPtをリリースすることが、細胞内環境を再現した条件でのミセルからのDACHPtのリリース実験、培養細胞ならびに固形がん組織の共焦点顕微鏡観察によって確認されており、これらの結果より、DACHPt内包ミセルは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、後期エンドソーム/リソソーム環境で選択的にDACHPtをリリースすることにより細胞質内の解毒機構を回避していることが示唆された。この結果は、DACHPt/mが癌細胞の細胞質内に存在する耐性機構を回避するナノスケールのトロイの木馬として機能することを示唆するものであり(図4)、DDSの新しい可能性を示している。

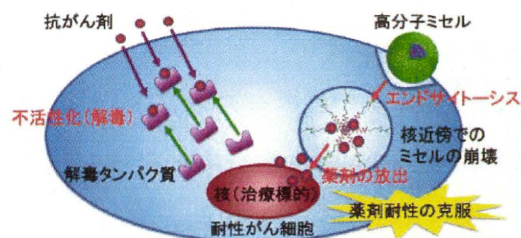


図4. DACHPt内包ミセルによるオキサリプラチン耐性克服のメカニズム

一方、癌細胞に対して特異的の高い標的治療を実現する上で、DDSキャリアへのリガンド分子の搭載は極めて有効なアプローチであると考えられる。そこで本研究では、腫瘍血管の内皮細胞やがん細胞表面に過剰発現が認められる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチドを導入したDACHPt/mを構築し、種々のがん細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、環状RGDリガンドの効果には細胞腫依存性が見られ、MDA-MB-435S、U87MG細胞では、DACHPt/mの細胞毒性が増強されたが、HeLa、Huh-7細胞ではDACHPt/mの細胞毒性が低下することが明らかになった。これは、環状RGDリガンドが単なる癌細胞による取り込みを向上させるだけでなく、細胞内

に取り込まれた後の細胞内動態を変化させることを示唆している。このような制癌剤内包高分子ミセルへのリガンド分子導入の効果に関しては、細胞内動態評価に加えて、担がんマウスを用いた動物実験を行うことにより、さらに検証していきたいと考えている。

E. 結論

本年度は、ダハプラチン内包ミセル (DACHPt/m) のオキサリプラチン耐性克服メカニズムに関して、metallothionein(MTIQ) およびmethionine synthase(MTR) の関与を siRNA による遺伝子ノックダウンを利用して解明した。これにより、DACHPt/m が癌細胞の細胞質内に存在する耐性機構を回避するナノスケールのトロイの木馬として機能することを示唆することができた。さらに、癌細胞に対してより特異的に優れた標的治療を実現するために、リガンド分子として環状 RGD ペプチドを導入した DACHPt/m を構築した。このミセルの種々のがん細胞に対する細胞毒性評価を行った結果、環状 RGD リガンドの効果には細胞腫依存性が存在することが明らかになった。このようなリガンド分子導入の効果に関しては、細胞内動態評価に加えて、担がんマウスを用いた動物実験により、さらに詳細に検証していく必要があるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
2. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)

2. 学会発表

(国内学会)

1. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カプラル, 呉寿榮, 松本有, 片岡一則, "オキサリプラチン耐性克服のための細胞内環境応答型高分子ミセルの開発", 第 32 回日本バイオマテリアル学会, グランドプリンスホテル広島, 広島 2010 年 11 月 30 日 (口頭)
2. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カプラル, 松本有, 片岡一則, "高分子ミセルを利用した細胞内薬物分布の時空間制御に基づく耐性がんの克服", 第 26 回日本 DDS 学会, 大阪国際交流センター, 大阪 2010 年 6 月 18 日 (口頭)
3. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カプラル, 松本有, 片岡一則, "細胞内環境に応答する白金錯体制がん剤内包高分子ミセルの創製", 第 59 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 横浜 2010 年 5 月 27 日 (口頭)

(国際学会)

1. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Nanocarrier-mediated photodynamic diagnosis and therapy of malignant tumors", 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology (October 5-7, 2010) "New Directions In Nanotheranostics: Imaging, Biosensors, Materials and DNA Technologies", Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany, October 6, 2010 (Invited Lecture)
2. N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, "Development of smart polymeric micelles for innovative cancer therapy", World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, September 1, 2010 (Invited Lecture)

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

抗がん剤治療効果を規定する腫瘍微小環境の研究

分担研究者 土原 一哉 国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部 室長

固形がん組織の微小環境を模倣する低栄養・低酸素環境により誘導される膵癌細胞のゲムシタビン耐性が2種のキナーゼ阻害剤 LY294002 と UCN-01 の併用により一部解除されることを明らかにした。また 2 本鎖切断修復異常を伴うがん細胞に特異的な効果を示す PARP 阻害剤が膵癌細胞株にも効果を示す可能性が示された。

A. 研究目的

膵癌、大腸癌など固形がん組織の一部は有効血流の低下に加え癌細胞における解糖系の亢進などが相まって絶対的、相対的な低栄養環境にあり、正常組織とは異なる代謝機構が利用されていることがメタボローム解析などにより示されている。こうした微小環境を模倣した低栄養・低酸素環境で膵癌細胞株に可逆的に誘導される抗がん剤耐性について、複数のキナーゼ阻害剤の併用が耐性解除に及ぼす影響、また膵癌を対象としたそのほかの分子標的療法の適応の可能性について、BRCA2 遺伝子変異陽性の膵癌細胞株における PARP1 阻害剤の感受性について検討した。

B. 研究方法

1) 低栄養・低酸素に誘導される

ゲムシタビン耐性がキナーゼ阻害剤 LY294002 および UCN-01 の併用により解除されるか WST-1 アッセイにより検証し、さらにこの現象に Chk1 キナーゼが直接関与するか Chk1 阻害剤 Go6976、RNA 干渉法による Chk1 遺伝子のノックダウンにより検討した。

2) BRCA2 遺伝子変異陽性膵癌 Capan-1 細胞に対する PARP1 阻害剤の感受性についてコロニーフォーメーションアッセイ、細胞増殖アッセイにより検討した。

C. 研究結果

1) 通常条件での膵癌細胞株 PANC-1 に対するゲムシタビンの IC₅₀は 300 nMであったが、無グルコースあるいは通常の 1/10 のグルコース濃度かつ低酸素(1%)条件で

は 1000 倍以上の濃度でも細胞毒性が認められなかった。低酸素・低栄養に誘導される耐性は他 2 種の膵癌細胞株および肝癌細胞株 HepG2、また他の抗がん剤 5-FU、シスプラチンに対しても認められた。この耐性には DNA 損傷後のアポトーシス経路の阻害がかかわることが示唆されたが、低酸素下での細胞生存に重要な転写因子 HIF はこの耐性には関与しなかった。一方 PI3K の特異的阻害剤 LY294002 および PKC, Chk1 等を阻害する UCN-01 はそれぞれ単独でゲムシタビンと併用しても耐性は解除しなかったが LY294002 と UCN-01 を同時に添加すると、低栄養・低酸素条件におけるゲムシタビン耐性が一部解除された。しかし UCN-01 同様 Chk 1 を標的とする Go6976、また Chk 1 のノックダウンは耐性を解除することはできず、UCN-01 が Chk1 以外の分子を標的として作用を発揮している可能性が示された。

- 2) 臨床 I, II 相試験において単剤で BRCA 変異陽性乳癌・卵巣癌に特異的な治療効果が示されている PARP-1 阻害剤 Orapalib が、抗がん剤耐性症例で BRCA2 変異が誘発されることが報告されている膵癌でも効果を示すか、BRCA2 変異陽

性株 Capan-1 を用いて検討した。コロニーフォーメーションアッセイにおいて Capan-1 に対する Orapalib の IC₅₀ は 1 μ M であり BRCA1 変異陽性乳癌細胞株 HCC1395 とほぼ同様の感受性を示した。Orapalib の効果は細胞増殖アッセイ (細胞数カウント、CSFE アッセイ) でも示され、また染色体不安定性を示す小核形成率も Orapalib 添加により増加することなどから、Capan-1 においても BRCA 変異陽性乳癌モデルで提唱されている Synthetic lethality が成立していることが示唆された。

D. 考察

膵癌の標準治療薬である代謝拮抗薬ゲムシタビンについて、臨床上有効な併用療法の報告は乏しいが、今回、間質が多く、有効血流量の減少も知られている膵癌の微小環境に注目し、低酸素・低栄養環境特異的な耐性の解除を指標にして LY294002, UCN-01 の併用効果を細胞レベルで明らかにした。これら 2 剤は通常の培養条件では単剤でも細胞死誘導や増殖抑制を発揮することも知られているが、3 剤併用が安全に施行できる条件が見つかれば新たな治療法の可能性が期待できる。結果にも示した通り耐性解除における UCN-01 の標的分子はまだ明らか

ではない。治療の安全性を担保する上でも標的分子の同定は必須であり、今後検討を進める必要がある。

膵癌における有効な分子標的治療薬の候補はまだ限られているが、一部の症例で2本鎖切断修復を司るBRCA2に変異を伴うことが報告されている。今回Capan-1細胞がPARP阻害剤に感受性を示したことは、膵癌での2本鎖切断修復異常を標的とした選択的な分子標的治療の可能性を示すものだと考える。本剤について、ゲムシタビンで見られたような微小環境に依存した耐性が生じないかどうか、検討の予定である。

E. 結論

腫瘍微小環境を模倣した低栄養・低酸素環境に誘導される代謝拮抗薬に対する耐性が複数の分子標的薬の併用で解除される可能性が示された。本研究で想定している腫瘍微小環境は上記の通り有効血流に乏しい膵癌の組織学的特性に依存しており、従来剤型ではこうした組織に薬剤を送達することが困難である。一方でこうした環境に特異的な薬剤送達が可能となれば、正常組織に対する毒性が懸念される併用薬剤の利用も可能になると考えられる。

G. 研究発表

論文発表

1. Onozuka H, Tsuchihara K, et al. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci.* 102; 975-82, 2011.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

微生物代謝産物からの抗がん剤の開発に関する研究

分担研究者 百瀬 功

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 沼津支所

主席研究員

研究要旨 がん治療薬の開発を目的として、新しいプロテアソーム阻害剤を開発した。放線菌由来のプロテアソーム阻害剤チロペプチンの誘導体を合成したところ、多発性骨髄腫治療薬であるプロテアソーム阻害剤Bortezomibよりも優れた阻害活性を有するチロペプチン誘導体を見出すことができた。この誘導体は*in vitro*および*in vivo*でプロテアソーム阻害活性を示し、マウスを用いた腫瘍モデルで抗腫瘍活性を示したことから、がん治療への応用が期待できる結果を得た。

A. 研究目的

プロテアソームは細胞内の主要なタンパク質分解酵素である。この酵素は細胞内で不要なタンパク質やダメージを受けたタンパク質を分解するのみでなく、細胞周期やシグナル伝達に関与する種々の機能性タンパク質の分解に関与しており、細胞機能の制御に重要な役割を担っている。プロテアソーム阻害剤はこれらのタンパク質の分解を抑制することにより、それらが規則正しく機能できなくなり、アポトーシスを引き起こすと考えられている。特にがん細胞では、増殖が盛んであり且つタンパク質分解も活発であることからプロテアソーム阻害剤の効果は高くなる。従ってプロテアソームはがん治療の魅力的な標的分子として考えられるようになった。そ

こで我々はプロテアソームをがん治療の分子標的として定め、その阻害剤を探索した結果、これまでに放線菌の生産する新規阻害剤チロペプチンを発見した。今回チロペプチンの誘導体を合成し、その生物活性を調べたので報告する。

B. 研究方法

プロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体は、当研究所の有機合成研究部で合成された。プロテアソームの活性は、ヒト赤血球由来の20Sプロテアソームおよびプロテアソーム分解性蛍光タンパク質の蓄積により測定した。ポリユビキチン化タンパク質はウェスタンブロット法、NF- κ Bの活性はDNA結合活性を測定することにより行った。またプロテアソーム分解性蛍光

タンパク質発現 HEK293 細胞を免疫不全マウスに移植し、その腫瘍内プロテアソーム阻害活性を *in vivo* イメージングにより測定した。*In vivo* での抗腫瘍活性は、免疫不全マウスにヒト多発性骨髄腫 RPMI8226 細胞を鼠径部皮下に移植したヒトがんモデルマウスを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

当研究所内の動物実験指針および環境安全委員会規定に従い実験を行った。

C. 研究結果

プロテアソーム阻害剤チロペプチンの新規誘導体を50数種類合成した。それらの中から多発性骨髄腫の治療薬であるプロテアソーム阻害剤 Bortezomib よりも強いプロテアソーム阻害活性を示す誘導体を見出すことが出来た。この誘導体をプロテアソーム分解性蛍光タンパク質発現 HEK293細胞に作用させると細胞内に蛍光タンパク質が蓄積した。そこで内在性のプロテアソームの基質であるポリユビキチン化タンパク質を調べたところ、濃度依存的に細胞内に蓄積が増大した。プロテアソーム阻害剤による抗がん作用の1つの機序としては NF- κ B の活性化の抑制が考えられている。チロペプチン誘導体は、TNF- α による NF- κ B の阻害タンパク質 I κ B の分

解を抑制し、NF- κ B の核内移行を抑えることにより転写活性を阻害した。

次に *In vivo* でのプロテアソーム阻害活性について調べた。プロテアソーム分解性蛍光タンパク質発現 HEK293 細胞を免疫不全マウスの鼠径部皮下に移植し、チロペプチン誘導体を静脈内に投与したところ、24時間後に腫瘍内に蛍光が認められ、腫瘍内のプロテアソームが阻害されていることが判った。また Scid マウスの鼠径部皮下にヒト多発性骨髄腫 RPMI8226 細胞を移植したヒトがんモデルマウスを用いてがんの治療実験を行ったところ、4 mg/kg を週に2回静脈内投与したマウスに対して明らかな腫瘍増殖抑制効果を示した。

D. 考察

今回合成したプロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体が、Bortezomib よりも低濃度でプロテアソーム阻害活性を示し、また細胞内でプロテアソームを阻害することにより細胞死へと導く事がわかった。更に *in vivo* で抗腫瘍活性を示したことは、チロペプチン誘導体が抗がん剤のリード化合物になりうる可能性が示唆された。またがん治療の標的分子としてプロテアソームが有望であることが確認できた。

E. 結論

本研究において、多発性骨髄腫治療薬であるプロテアソーム阻害剤 Bortezomib よりも優れたプロテアソーム阻害活性を有するチロペプチン誘導体を見出すことができた。チロペプチン誘導体は *in vivo* で抗腫瘍活性を示し、がん治療への応用が期待出来る。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Momose, I., Ohba, S., Tatsuda, D., Kawada, M., Masuda, T., Tsujiuchi, G., Yamori, T., Esumi, H., Ikeda, D. Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (3): 460-466 (2010).
- 2) Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S., Masuda, T., Momose, I., Ikeda, D. Leucicostatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. M. Kawada, H. Inoue, S. Ohba, T. Masuda, I. Momose and D. Ikeda,

Int. J. Cancer, 126(4): 810-818 (2010).

- 3) Iijima, M., Momose, I., Ikeda, D. Increased ABCB1 expression in TP-110-resistant RPMI-8226 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(9): 1913-1919 (2010).
- 4) Watanabe, T., Abe, H., Momose, I., Takahashi, Y., Ikeda, D., Akamatsu, Y. Structure-activity relationship of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20(19): 5839-5842 (2010).

2. 学会発表

- 1) 第14回がん分子標的治療研究会総会
プロテアソーム阻害剤チロペプチンのボロン酸誘導体の生物活性
: 百瀬 功、飯島正富、大庭俊一、増田 徹、池田大四郎

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし