

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松村 保広

平成23（2012）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. 抗体 DDS 開発・抗体イメージング・毒性評価	----- 4
松村 保広 安永 正浩	
2. 抗腫瘍剤内包ミセル製材の開発	----- 8
西山 伸宏	
3. リンカーテクノロジー・有機化学合成	----- 12
眞鍋 史乃	
4. 抗腫瘍剤内包リポソーム製剤の開発	----- 15
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

国立がん研究センター東病院 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. 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* 104, 593-598, 2011
2. M Yasunaga, S Manabe, Y Matsumura. New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots. *Cancer Sci.*102, 1396-1402, 2011
3. M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin & Y. Matsumura. Cancer-stroma

targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem* 22, 1776-1783, 2011.

4. K Kato, K.Chin, K.Yoshikawa, T.Yamaguchi, K.Tsuji, Y.Esaki, T.Sakai, K.Kimura, M.Hamaguchi, T.Shimada, Y.Matsumura, Y.Ikeda, R. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs*, 2011 (published online.)
5. Y Matsumura. Cancer stromal trageting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 64,710-719, 2012 .
6. Y Saito, Y Hashimoto, J Kuroda, M Yasunaga, Y Koga, A Takahashi, Y Matsumura. The inhibition of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *Eur J Cancer.* 47, 2230-2239. 2011.
7. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex-in vitro and in vivo study. Hagiisawa K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M,

- Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. *Int. J. Cardiol.* 152, 202-206, 2011
8. Ultrasound-mediated Transfection with Liposomal Bubbles Delivers Plasmid DNA Directly into Nucleus. Takeshi Kawazu, Kazumi Hakamada, Yusuke Oda, Jun Miyake, Kazuo Maruyama and Takeshi Nagasaki. *Chemistry Letters.* 40 (3). 298-299. 2011
9. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. Yurika Ikeda-Dantsuji, Loreto B. Feril Jr., Katsuro Tachibana, Koichi Ogawa, Hitomi Endo, Yoshimi Harada, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama. *Ultrasonics Sonochem.* 18, 425-430, 2011
10. Md. Rafi, H. Cabral, M.R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J. Control. Release*, in press.
11. H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotech.* 6 (12) 815-823 (2011)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 発明の名称：Novel cancer targeting therapy using complex of substance capable of binding specifically to constituent factor of cancer stroma and anti-tumor compound.
 発明人：松村保広 安永正浩 眞鍋史乃
 出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 独立業際法人理化学研究所 特願 2010-9139572(平成 23 年 6 月 22 日)

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

抗体 DDS 製剤開発・抗体イメージング・毒性評価

研究代表者 松村 保広

分担研究者 安永 正浩

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター がん治療開発部

昨年度提唱したがん間質ターゲティング療法につきさらに理論的基盤を強固にするために間質をターゲットとする抗フィブリン抗体の化学的特性を調べた結果、我々の抗フィブリン抗体は不溶性フィブリンにのみ結合することが判明し、フィブリン上のエピトープもほぼ同定した。抗体・抗がん剤複合体(ADC)の薬理・薬効性は細胞内インタナリゼーション効率と腫瘍組織コンポーネントの違いに大きく影響を受けるため、がん種別に標的抗体と薬剤リリース用リンカーの組み合わせを最適化する必要がある。すなわち、ADCのリンカー部分に関して、がんを直接狙う場合と間質にターゲティング後に抗がん剤をリリースする場合の結合方法に関して前者はカルバメート結合で後者をエステル結合で抗がん剤をつけるべきとの結論を得た。

A. 研究目的

昨年度までにがん間質形成に血液凝固系の亢進が関係していることを明らかにしてきた。特に外因系凝固因子のトリガー蛋白である組織因子 Tissue factor (TF)は多くのヒト腫瘍で細胞膜上に抗発現しており、また腫瘍血管内皮やその周辺で抗発現していることも明らかにしている。本年度は凝固の最終産物である不溶性フィブリンに対する我々が樹立した抗フィブリン抗体（102-10）の化学的特性につき解析することである。不溶性フィブリンは、がんの周囲に恒常的に発現し、健常人では発現せず、がん以外の創傷、梗塞性疾患、関節リウマチでの発現は

一過性であることからがんの病態特異的タンパクといえる。102-10のエピトープの解明をはじめとする詳細な性質を解析し、がん周囲に存在する不溶性フィブリンへのドラッグデリバリーツールとしての有用性を示す。

2点目としては、難治性固形腫瘍では豊富な間質が抗体の腫瘍内浸透性を障害している。この間質バリアを克服するために、従来型の抗細胞 ADCとは異なる CAST(cancer stromal targeting)療法剤として抗間質 ADCを新たに考案・開発した。本研究では、抗体とリンカーの組み合わせと共に、①細胞内インタナリゼーション効率と②腫瘍組織コンポーネントの違い

が ADC の薬理・薬効性へ与える影響を明らかにする。

B. 研究方法

1) 102-10 の反応性を調べるため、不溶性フィブリン、フィブリノゲン、可溶性フィブリン（不溶性フィブリン中間体）、D-ダイマー（不溶性フィブリン分解物）をプレートに固定して、ELISA を行った。102-10 のエピトープを明らかにするため、合成ペプチドを用いた競争阻害実験を行った。102-10 を用いて、各種がん組織、それに付随する正常組織、梗塞性疾患、炎症性疾患などの剖検検体につき染色した。

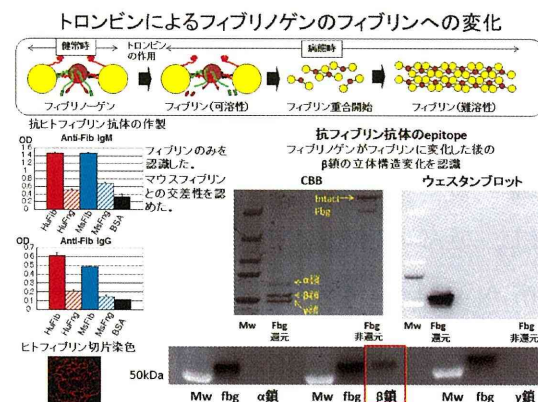
2) 抗 CD20 抗体、抗 EpCAM 抗体及び抗コラーゲン 4 抗体に、カルバメート結合（細胞内薬剤リリース型）或いはエステル結合（細胞外薬剤リリース型）を介して抗がん剤 SN-38 を結合させた ADC を作製した。腫瘍組織コンポーネントの異なる悪性リンパ種モデルと膵臓がんモデルを対象に、抗体による細胞内インタナリゼーション効率と各 ADC による *in vitro* 殺細胞効果及び *in vivo* 抗腫瘍効果の違いを比較検討した。

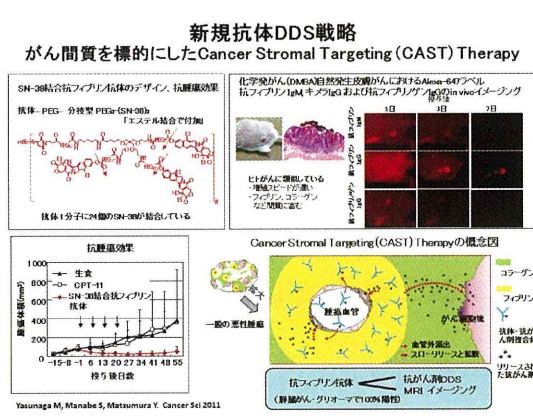
リンのみに反応することが明らかになった。合成ペプチドを用いた競争阻害実験により、102-10 のエピトープを 16 アミノ酸に同定した。102-10 を用いた免疫組織化学染色により、脳腫瘍、胃がん、膵がん、肺がん、大腸がんなどほとんどの固形腫瘍で陽性を示した。リンパ腫は陰性であった。主立った正常組織はすべて陰性であった。心筋梗塞、脳梗塞、急性炎症の発症時死亡された方の剖検例では陽性であったが、梗塞性疾患発症後 3 週目に死亡した患者の剖検例では陰性を示した。

2) 悪性リンパ種では、抗 CD20 抗体が効率よくインタナリゼーションされており、*in vitro* と *in vivo* 共に、細胞内リリース型の抗 CD20・ADC が最も優れていた。膵臓がんでは、*in vitro* では、抗 EpCAM・ADC が抗コラーゲン 4・ADC より優れていたが、細胞内リリース型の優位性は示されなかった。一方、*in vivo* では、細胞外リリース型の抗コラーゲン 4・ADC が最も優れていた。

C. 研究結果

1) ELISA において、102-10 はフィブリノゲン、可溶性フィブリン、D-ダイマーといったフィブリン関連可溶性分子には反応せず、不溶性フィブ





D. 考察、

102-10 は不溶性フィブリンのみを認識し、同じアミノ酸配列をもつフィブリン関連可溶性分子を認識しないことから、102-10のエピトープはフィブリノゲンから不溶性フィブリンに変化する際の立体構造変化部位であることが強く示唆された。病変部で産生される不溶性フィブリンのみと反応し、血中を流れる他のフィブリン関連可溶性分子と反応しないことから102-10は優れたDDSのツールになり得ると考えられる。血管が豊富で間質の少ない悪性リンパ腫では、抗体のインターナリゼーション効率も高く、従来の細胞内リリース型抗細胞ADCが優れた抗腫瘍効果を示した。一方、血管が少なく間質の多い膵臓がんでは、CAST療法剤としての細胞外リリース型抗間質ADCが優れた抗腫瘍効果を示した。細胞内インターナリゼーション効率と腫瘍の組織コンポーネントの違いで標的抗体と薬剤リリース用リンカーの組み合わせを最適化する

必要がある。

E. 結論

我々の開発した抗フィブリン抗体が認識するエピトープがあきらかになりつつあり、がんにおける凝固系亢進の機構解明が進むものと考え、またさらに親和性の高い沈着フィブリンを認識する抗体作製も可能となる。本年度の知見を受けてがん間質ターゲティング Cancer Stromal Targeting (CAST)療法のアルゴリズムの基礎ができたと考える。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 104, 593-598, 2011
2. M Yasunaga, S Manabe, Y Matsumura. New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots. *Cancer Sci*.102, 1396-1402, 2011
3. M. Yasunaga, S. Manabe, D. Tarin &

- Y. Matsumura. Cancer-stroma targeting therapy by cytotoxic immunoconjugate bound to the collagen 4 network in the tumor tissue. *Bioconjug Chem* 22, 1776-1783, 2011.
4. K Kato, K.Chin, K.Yoshikawa, T.Yamaguchi, K.Tsuji, Y.Esaki, T.Sakai, K.Kimura, M.Hamaguchi, T.Shimada, Y.Matsumura, Y.Ikeda, R. Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs*, 2011 (published online.)
5. Y Matsumura. Cancer stromal targeting (CAST) therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 64,710-719, 2012 .
6. Y Saito, Y Hashimoto, J Kuroda, M Yasunaga, Y Koga, A Takahashi, Y Matsumura. The inhibition of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *Eur J Cancer.* 47, 2230-2239. 2011.
- constituent factor of cancer stroma and anti-tumor compound.
 発明人：松村保広 安永正浩 眞鍋史乃 出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 独立業際法人理化学研究所 特願 2010-9139572(平成 23 年 6 月 22 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：Novel cancer targeting therapy using complex of substance capable of binding specifically to

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

抗腫瘍剤内包ミセル製剤の開発

研究分担者 西山 伸宏

東京大学大学院医学系研究科 臨床医工学部門

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、種々の難治がんに対する革新的治療法を開発することを目指している。本年度は、腫瘍特異的ペプチドを導入した抗がん剤内包高分子ミセルに関して、ヒト Glioblastoma U87MG 細胞の皮下移植モデルに対するがん集積性ならびに抗腫瘍効果を評価した。

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、内核に制がん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、優れた抗がん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、がん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。

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、悪性脳腫瘍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、腫瘍特異的ペプチドを導入した DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)(図1)に関して、ヒト Glioblastoma U87MG 細胞の皮下移植モデルに対するがん集積性ならびに抗腫瘍効果を評価した。

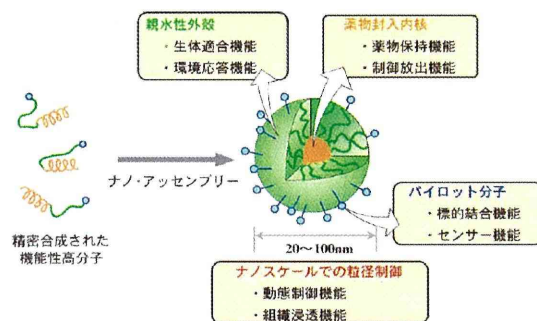


図1. 高分子ミセル型 DDS の模式図

B. 研究方法

1) 腫瘍特異的ペプチド導入 DACHPt/m の U87MG 腫瘍に対する制がん活性評価

ヒト glioblastoma U87MG 細胞を BALB/cヌードマウス(♀,6週齢)の皮下に注入することによって U87MG 細胞皮下移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、ペプチド導入量の異なる DACHPt/m (DACHPt 換算で 4mg/kg)を1日おきに3回投与し(0, 2, 4日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。

2) 腫瘍特異的ペプチド導入 DACHPt/m の U87MG 腫瘍への集積性の評価

腫瘍特異的ペプチド搭載 DACHPt/m (ペプチド(+))ミセル およびコントロール DACHPt/m (ペプチド(-))ミセル)をそれぞれ Dy488(緑)および Alexa647(赤)により標識した。U87MG 腫瘍は dorsal skin fold chamber を用いて作成し、蛍光標識 DACHPt/m の固形がんへの集積を in vivo 共焦点顕微鏡によって評価した。

C. 研究結果

1) 腫瘍特異的ペプチド導入 DACHPt/m の U87MG 腫瘍に対する制がん活性評価

オキサリプラチン、リガンドなし DACHPt/m およびペプチド導入

DACHPt/m の U87MG 細胞皮下移植モデルに対する制がん活性を図2に示す。この結果より、オキサリプラチンとリガンドなし DACHPt 内包ミセルは有意な制がん活性を示さなかったが、ペプチド導入 DACHPt 内包ミセルは一定以上のリガンド導入量において有意な制がん活性を示すことが確認された($P<0.05$)。

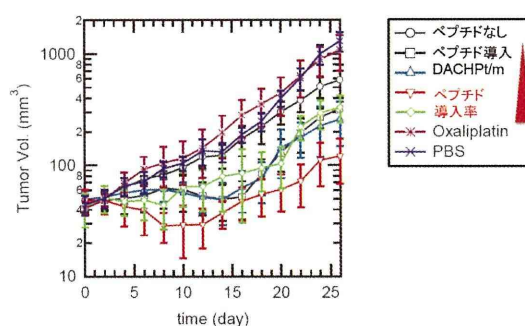


図 2. 腫瘍特異的ペプチド導入 DACHPt/m の U87MG 腫瘍に対する抗がん活性

2) 腫瘍特異的ペプチド導入 DACHPt/m の U87MG 腫瘍への集積性の評価

腫瘍特異的ペプチドおよびコントロールペプチドを搭載した DACHPt/m をそれぞれ Dy488(緑)および Alexa647(赤)により標識し、それらミセル溶液を混合した後に、dorsal skin fold chamber を利用して U87MG を皮下に移植したマウスに投与した。その後、腫瘍内の蛍光の変化を in vivo 共焦点顕微鏡によって評価した(図3)。

その結果、ペプチドを導入したミセルはコントロールペプチドを導入したミセルと比較してがん組織へと移行していることが確認された(図 3 において黄色の部分で腫瘍血管で、緑の蛍光のみががん組織へと移行している)。実際に、腫瘍特異的ペプチド導入ミセルの蛍光強度を測定した結果、腫瘍血管内のペプチド(+)ミセルの濃度の減少に伴い、間質中のペプチド(+)ミセルの濃度が増大することが確認された(図 3B)。

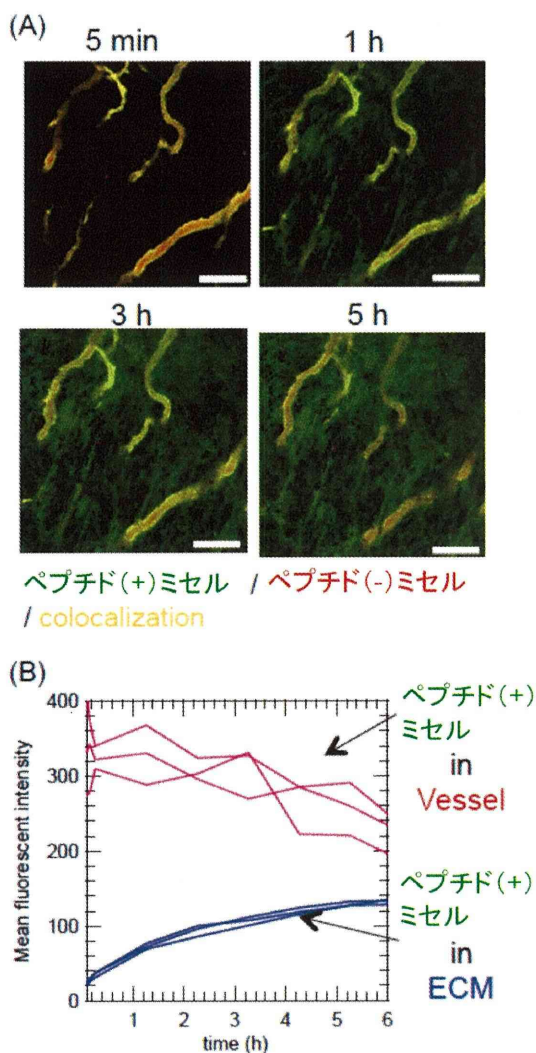


図 3. ペプチド(+)ミセルおよびペプチド(-)ミセルの U87MG 腫瘍への集積 (A) in vivo 共焦点による腫瘍内蛍光の直接観察 (B) ペプチド(+)ミセル投与後の血管および間質における蛍光の変化

D. 考察

一般的に、悪性脳腫瘍は、血液-脳腫瘍関門(Blood-Brain Tumor Barrier, BBTB)の存在によって薬剤や DDS の集積性が著しく低下していると考えられているが、本研究では、U87MG 細胞の皮下移植モデルにおいて腫瘍特異的ペプチド搭載 DACHPt 内包ミセルががん組織に移行し、優れた抗腫瘍効果を示すことが確認された。腫瘍特異的ペプチド搭載 DACHPt 内包ミセルのがん集積メカニズムは未だ明らかになっていないが、腫瘍血管と腫瘍特異的ペプチドの相互作用がミセルのがん組織への移行に重要であると考えられる。この結果は、悪性脳腫瘍をはじめとする EPR 効果があり顕著ではない固形がんに対する薬剤デリバリーにおいて腫瘍特異的ペプチドを用いた Active Targeting が有効であることを示唆している。今後は、現在の皮下移植モデルよりもさらに薬剤や DDS の集積性が低下している Glioblastoma の同所移植モデルに対する腫瘍特異的ペプチド搭載 DACHPt

内包ミセルの有効性を検証し、リガンド分子によるミセルのがん組織移行性促進のメカニズムを明らかにしていく予定である。

E. 結論

本年度は、Glioblastoma 細胞の皮下モデルに対して腫瘍特異的ペプチドを搭載した DACHPt 内包ミセルが効果的に集積し、優れた抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。本成果は、BTB の存在によって薬剤や DDS の集積性が著しく低下していると考えられている悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法に繋がるものとして関連分野に大きなインパクトを与えることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文論文のみ)

- 1) Md. Rafi, H. Cabral, M.R. Kano, P. Mi, C. Iwata, M. Yashiro, K. Hirakawa, K. Miyazono, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J. Control. Release*, in press.

- 2) H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama*, K. Kataoka*, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotech.* 6 (12) 815-823 (2011)

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

リンカーテクノロジー・有機化学合成

研究分担者 眞鍋 史乃

独立行政法人理化学研究所 基幹研究所

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においての薬剤放出の鍵となるリンカーの設計、合成を行った。

A. 研究目的

効率的な DDS を実現するためには、薬剤をいかに効率的に輸送担体からリリースするかの設計が鍵となる。

がんと血液凝固の関係は古くから知られていた。プラスミンは、フィブリンやフィブリノーゲンを分解して血栓を分解する。通常はプラスミンは前駆体であるプラスミノゲンの形で存在しており、必要な時に活性化されるが、血中では速やかにプラスミンインヒビターにより不活性化される。以上のことより、プラスミンは、がん特異的酵素であると位置づけることができる。

前年度は、トポイソメラーゼの SN-38 を徐放性を持つようにエステル結合でスペーサーとなるポリエチレングリコールに結合させた。今年度は、よりがん組織特異的放出機能を持つリンカーを設計した。

B. 研究方法

1) プラスミンが切断するペプチドである Val-Leu-Lys シークエンスを合成し、ドキソルビシンを *p*-aminobenzyl カルバメートにより結合させた。ペプチド切断後、*p*-aminobenzyl カルバメートは分解し、ドキソルビシンを放出する。抗体 SH 基に結合できるように、スペーサーとして、マレイミド基を持つポリエチレングリコールを結合させた。

図1. 合成ドキソルビシンリンカー-PEGと薬剤放出機構

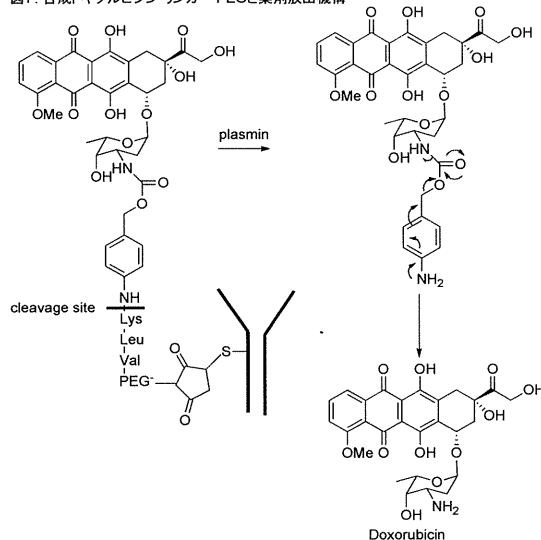
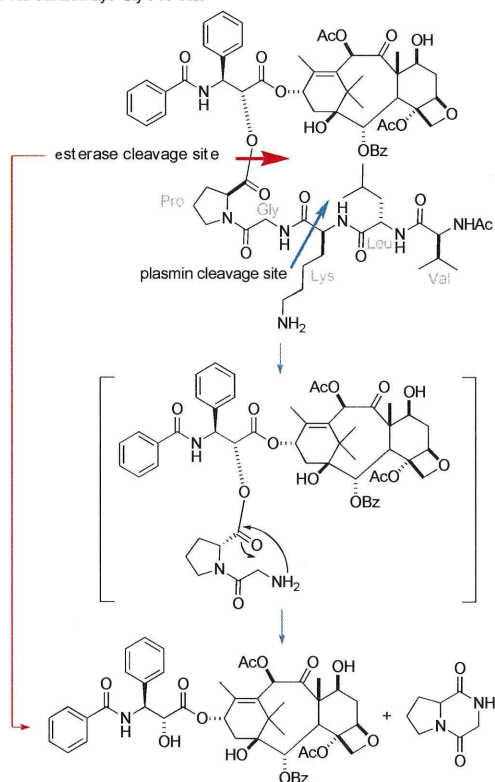
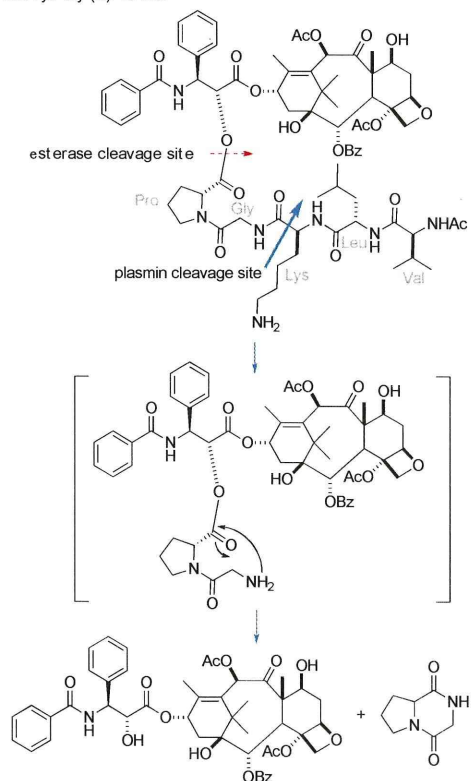


図2. 環化反応による薬剤放出リンカーを持つ合成化合物
I. Ac-Val-Leu-Lys-Gly-Pro-Tax



II. Ac-Val-Leu-Lys-Gly-(D)Pro-Tax



2) 上記の *p*-aminobenzyl カーバメート型リンカーは多く汎用されているものの、分解過程で生じる化合物が非常に強力なマイケルアクセプターになりうるため、生体内においてのシステイン SH 基と反応することが懸念される。プラスミンによる Val-Leu-Lys シークエンス切断後、環化反応により速やかに薬剤が放出されるリンカーを設計した。抗がん剤としてパクリタキセルを選択した。環化反応をおこすリンカーとしては、極めて容易に環化反応をおこし、合成も容易であり、環化後人体に無害であるジケトピペラジンを生じるジペプチドの Gly-Pro を選択した。図2の化合物I はプラスミンによる切断 (図2 青矢印) による放出の他に、体内のエステラーゼによりがん組織以外においても薬剤が放出される懸念がある (図2 赤矢印)。そこで、体内のエステラーゼによる薬剤—Gly-Pro リンカーの切断を防ぐため、非天然アミノ酸である(L)-Pro を導入した Gly-(L)-Pro リンカーを含む化合物 II も合成した。

C. 研究結果

上記化合物の合成を行った。リジンの側鎖アミノ基の保護基として、非常に弱い酸性条件において除去可能な4-メトキシトリチル基を用いることにより、塩基性、酸性条件において不

安定な薬剤を損なうことなく、合成を達成できた。

Bioconjugate Chem. **2011**, *22*, 1776-1783.

D. 考察

今後、上記化合物を用いて薬剤放出過程、抗ガン活性を検証予定である。エステラーゼ、プラスミンの酵素の違いによる切断の相違を検討する。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. “Novel Cancer Targeting Therapy Using Complex of Substrate Capable of Binding Specifically to Constituent Factor of Cancer Stroma and Anti-Tumor Compound” Yasuhiro Matsumura, Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, PCT 2011. Jun. 17

E. 結論

がん組織特異的に放出されるリンカーを設計し、薬剤複合体を合成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文論文のみ)

1. “New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots” Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, Yasuhiro Matsumura, *Cancer Science* **2011**, *102*, 1396-1402.
2. “Cancer-stroma Targeting Therapy by Cytotoxic Immunoconjugate Bound to the Collagen 4 Network in the Tumor Tissue” Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, David Tarin, Yasuhiro Matsumura,

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

抗腫瘍剤内包リポソーム製剤の開発

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨：昨年度に続き、バブルリポソームと超音波照射の併用によるがん遺伝子治療への応用とシステム構築に関する検討を行った。担がんマウスに対して、プラスミド遺伝子とバブルリポソームを尾静脈内から全身投与しながら、体外から固形がん組織に超音波照射を行ったときの遺伝子発現や抗腫瘍効果について検討し、本方法の腫瘍局所遺伝子導入システムの有用性を検討した。膀胱内の浸潤性膀胱癌の遺伝子治療を目指して、経尿道的に遺伝子とバブルリポソームを投与し、体外から超音波照射し、その発現を検討した。その結果、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入法は、がん遺伝子治療において、低侵襲性で有用な非ウイルスベクターになることが示された。

A. 研究目的

がん遺伝子治療は、新たながん治療戦略の1つとして期待されている。しかし、安全性が高いとされている非ウイルスベクターの開発が遅れており、安全で有効ながん遺伝子治療の確立には至っていない。これまでに我々は、超音波照射によるリポソーム型ナノバブル（バブルリポソーム）のキャビテーションを利用した新規遺伝子導入法を開発した。そこで本研究では、バブルリポソームと超音波照射の併用によるがん遺伝子治療への応用に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) IL-12 コード遺伝子の代わりにルシフェラーゼコード遺伝子を用いた。マウスの足部に固形がんを移植し、ルシフェラーゼコード遺伝子とバブル

リポソームを支配動脈から投与しながら、体外から固形がん組織に超音波照射を行った。その後ルシフェラーゼ活性測定とバイオイメージングした。

2) マウスの膀胱内に、尿道からカテーテルでルシフェラーゼプラスミド遺伝子とバブルリポソームを導入し、体外から超音波照射し、ルシフェラーゼ活性測定とバイオイメージングした。

C. 研究結果

1) ルシフェラーゼコード遺伝子とバブルリポソームを同時投与して、固形腫瘍部位に体外から超音波照射した。ルシフェラーゼの発現が癌部位で認められ、本法の有用性を確認した (Fig. 1, Fig. 2)。

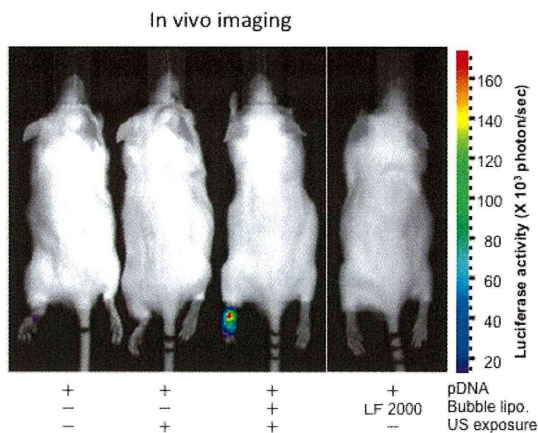


Fig. 1 In vivo imaging of In vivo gene delivery into mouse solid tumor cells with Bubble liposomes

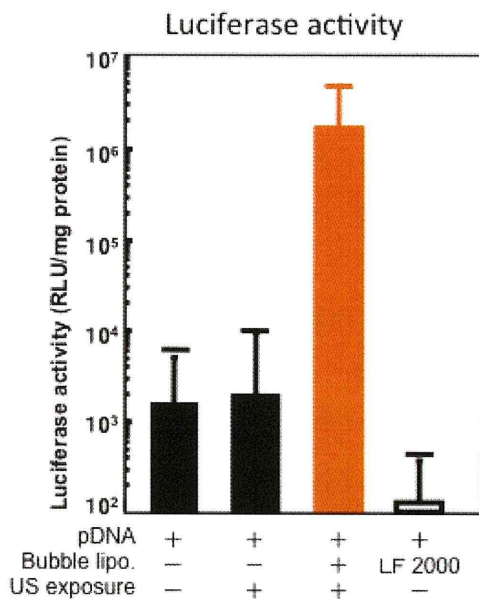


Fig. 2 Luciferase activity of In vivo gene delivery into mouse solid tumor cells with Bubble liposomes

2) 雌性マウスについて、カテーテルを用いて経尿道的にルシフェラーゼコード遺伝子とバブルリポソームを同時投与して、体外から膀胱部位に向

けて超音波照射した。膀胱内膜にルシフェラーゼの発現が確認された (Fig. 3)

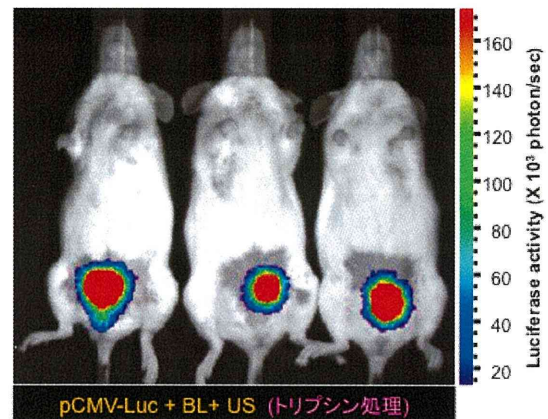


Fig. 3 Luciferase expression in bladder transfected with US and Bubble liposomes

D. 考察、

プラスミド遺伝子とバブルリポソームが共存して、超音波照射場に存在すれば、キャビテーションによってその近傍の細胞に遺伝子導入できることがレポーター遺伝子によって確認できたが、細胞に対する傷害や修復の程度など、本方法を実用化するには解決しなければならない問題点が指摘される。超音波強度によっては、キャビテーションの発熱を利用したがんの温熱療法が可能であり、遺伝子導入用の超音波強度と発熱強度の厳密なコントロールが必要になってくる。今後の重要な課題である。

E. 結論

昨年度に続き、バブルリポソームと超音波照射の併用によるがん遺伝子治療へ

の応用とシステム構築に関する検討を行った。担がんマウスに対して、プラスミド遺伝子とバブルリポソームを尾静脈内から全身投与しながら、体外から固形がん組織に超音波照射を行ったときの遺伝子発現や抗腫瘍効果について検討し、本方法の腫瘍局所遺伝子導入システムの有用性を検討した。膀胱内の浸潤性膀胱癌の遺伝子治療を目指して、経尿道的に遺伝子とバブルリポソームを投与し、体外から超音波照射し、その発現を検討した。その結果、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入法は、がん遺伝子治療において、低侵襲性で有用な非ウイルスベクターになることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex-in vitro and in vivo study. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. *Int. J. Cardiol.* 152, 202-206, 2011

2) Ultrasound-mediated Transfection with Liposomal Bubbles Delivers Plasmid DNA Directly into Nucleus.

Takeshi Kawazu, Kazumi Hakamada, Yusuke Oda, Jun Miyake, Kazuo Maruyama and Takeshi Nagasaki. *Chemistry Letters.* 40 (3). 298-299. 2011

3) Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. Yurika Ikeda-Dantsuji, Loreto B. Feril Jr., Katsuro Tachibana, Koichi Ogawa, Hitomi Endo, Yoshimi Harada, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama. *Ultrasonics Sonochem.* 18, 425-430, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Yasunaga, S. Manabe, Y. Matsumura	New Concept of Cytotoxic Immunoconjugate Therapy Targeting Cancer-Induced Fibrin Clots	<i>Cancer Science</i>	102 (7)	1396-1402	2011
M. Yasunaga, S. Manabe, Y. Matsumura	Cancer-stroma Targeting Therapy by Cytotoxic Immunoconjugate Bound to the Collagen 4 Network in the Tumor Tissue	<i>Bioconjugate Chem</i>	22(9)	1776-1783.	2011
M Rafi, N Nishiyama, et al.	Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane) platinum (II) suppress the	J. Controlled Release		印刷中	2012
H Cabral, N Nishiyama, et al.	Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size.	Nature Nanotech.	6(12)	815-823	2011
Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama	Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles	J. Controlled Release	149	36-41	2011
T. Kawazu, Y. Oda, K. Maruyama, et al.	Ultrasound-mediated Transfection with Liposomal Bubbles Delivers Plasmid DNA Directly into Nucleus.	Chemistry Letters	40	298-299	2011
Y. Ikeda-Dantsuji, R. Suzuki, K. Maruyama, et al.	Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro.	Ultrasonics Sonochem	18	425-430	2011