

201220027A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松村 保広

平成25（2013）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 松村 保広	----- 1
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 松村 保広 安永 正浩	----- 4
2. 抗腫瘍剤内包ミセル製材の開発 西山 伸宏	----- 8
3. リンカーテクノロジー・有機化学合成 眞鍋 史乃	----- 13
4. 抗腫瘍剤内包リポソーム製剤の開発 丸山 一雄	----- 17
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、リポソームと超音波併用による温熱療法の開発、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) 抗不溶性フィブリン 抗体の生化学的特性の解析と 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薬効評価
- 3) バブルリポソームと超音波による温熱療法の開発
- 4) 抗体抗がん剤複合体作製のためのリンカーテクノロジーの研究開発

C. 研究結果

- 1) 我々が樹立した抗フィブリン抗

体は不溶性フィブリンにのみ結合し、エピトープはフィブリノゲンの B β 鎖上にあることが分かった。この領域はフィブリノゲンやその他の可溶性フィブリン産物では γ 鎖の特定の領域で覆われており、不溶性フィブリンに変化した時にのみ露出することをつきとめた。

2) RGD 付加 DACHPt 内包ミセルは同所移植脳腫瘍に選択的に集積し、また DACHPt に比べて、高い抗腫瘍効果をしめした。

3) バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法後に樹状細胞を腫瘍内投与することで、超音波がん温熱療法または樹状細胞免疫療法単独より高い抗腫瘍効果が認められた。

4) 新規 Pro-Gly を設計、合成した。さらに、in vitro において、新規リンカーがこれまでに汎用されているスパーサーと同等の放出能を持つこと

が明らかになった。

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。新規不溶性フィブリン抗体の生化学的特性を明らかにし、かつ臨床的有用性を明らかにすることができた。抗体抗がん剤複合体においては抗体の特性によりリンカーを変えることが重要である CAST 治療・診断への応用が期待できる。

E. 結論

今後抗体をキーワードとしての DDS 製剤の開発が主流となると考える。本邦における regulation を含む整備が重要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. S Murata, Y Koga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, Y Kakugawa, Y Ohtake, N Saito, Y Matsumura. Application of miRNA expression analysis on exfoliated colonocytes for colorectal cancer diagnosis. *Gastrointestinal Cancer Targets and Therapy*. 2 11-18 2012
2. M Yasunaga, S Manabe, D Tarin, Y Matsumura. Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor

stroma. *Cancer Sci*. 104(2) 231-237, 2013

3. P. Mi, H. Cabrera, D. Kokuryo, M. Rafi, Y. Terada, I. Aoki, T. Saga, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials*, 34 (2) 492-500 (2013)
4. F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
5. R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)
6. “Development of Diketopiperazine-forming Dipeptidyl Pro-Gly Spacer for Preparation of Antibody-Drug Conjugate” Shino Manabe, Hikaru Machida, Yoshiyuki Aihara, Masahiro Yasunaga, Yukishige Ito, Yasuhiro Matsumura,

Med. Chem. Comm. **2013**, *4*,
792-796.

7. Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y. Involvement of Ca²⁺ and ATP in enhanced gene delivery by bubble liposomes and ultrasound exposure. *Mol. Pharm.* **9** 1017-1023 2012
8. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K. Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *J. Control. Release* **160** 362-366 2012

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）

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

昨年度に引き続き、我々が樹立した、がん間質をターゲットとする抗フィブリン抗体 102-10 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し、エピトープはフィブリノゲンの B β 鎖上にあることが分かった。この領域はフィブリノゲンやその他の可溶性フィブリン産物では γ 鎖の特定の領域で覆われており、不溶性フィブリンに変化した時にのみ露出することをつきとめた。抗間質抗体としては、抗フィブリン抗体と抗 Tissue factor を選択した。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。抗フィブリン抗体にはプラスミンでカットされるように、抗 TF はカテプシンでカットされるようにリンカーをデザインして抗がん剤 MMAE をつけた ADC を作製することに成功した。

A. 研究目的

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) のエピトープ解析を含む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、抗フィブリン抗体と抗 TF 抗体につき ADC を作製することを目的とした。

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) 抗フィブリン抗体 102-10、抗 TF 抗体 1849 に強力な毒性をもつ MMAE というチューブリン阻害物質を付加する。102-10 に関してはがん組織中の析出フィブリンがターゲットであるために、ADC が癌組織中のフィブリンと結合した後にプラスミンで可溶性にする。1849 に関しては、間質細胞としての腫瘍血管内皮細胞やがん細胞直接ターゲットの両方あるために細胞内のカテプシンでカットされる剤型とする。

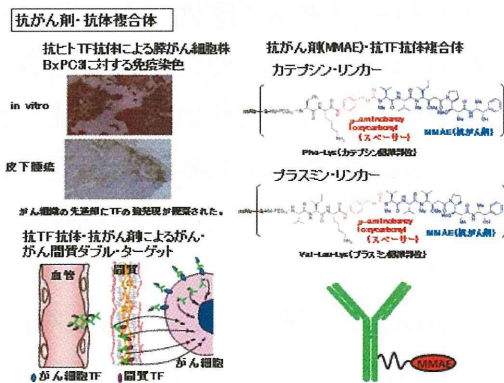
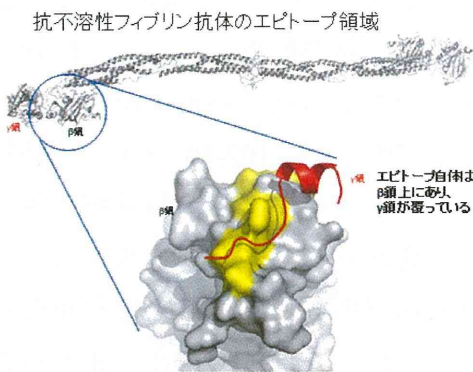
C. 研究結果

1) 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。この領域はフィブリノゲンの B β 鎖上に存在することを突き止めた。またこの領域はフィブリノゲンやその他のフィブリン可溶性産物においては γ 鎖により覆われていることが分かった。そして、これら可溶性フィブリノゲンあるいはフィブリンが不溶性フィブリンに変化した時にのみ同部の B β 鎖および γ 鎖が解離し、今までに知られていなかったホールを形成することを証明した。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) ADC の作製においては抗フィブリン、抗 TF とともにチューブリンの強力な阻害剤 MMAE を付加することに成功した。無水マレイミドにポリエチレングリコール (PEG) をつけ、その先に抗フィブリンの場合は valine-leucine-lysine というプラスミンでカットできるトリペプチドの C 末端に MMAE を付加することに成功した。一方、抗 TF の場合は

phenylalanine-lysine というカテプシンでカットできるようなペプチドをリンカーとして用いた。In vitro における実験により抗フィブリン-MMAE はプラスミン特異的に抗TF-MMAE はカテプシン特異的にMMAEをリリースすることを確認した。



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ン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が、不溶性ゆえ

に、エックス線解析あるいはNMR解析が不可能で、エピトープ同定は困難を極めたが、フィブリンノゲンの熱変性および還元により、エピトープ部位が暴露されることがわかり、エピトープの同定にこじつけた。この発見はいままで知られていなかった、Bβ鎖とγ鎖の結合が不溶性フィブリン形成という物理的力により解離し、特殊なホール形成に繋がったと結論づけた。フィブリン沈着は非悪性疾患でもおきるが、それらは怪我と同様に発生時にはフィブリン沈着は認められるものの2-3週以内にフィブリンはすべて消失し、コラーゲンで置き換わることも病理学的検討からあきらかにした。すなわち、無症候性の持続的フィブリン析出はがん特異的である。我々の抗フィブリン抗体は、したがって、血中のフィブリンノゲンや可溶性フィブリンでは中和されないことから、がんへの選択的ターゲットを可能とする。TFも腫瘍細胞表面だけでなく腫瘍血管内皮細胞においても強発現しており、CAST治療のツールとして有用である。

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、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。がん間質タ

ーゲティング Cancer Stromal Targeting (CAST)療法を具現化するためのツールも2種類出来上がった。非臨床 POC 研究を重ね、数年以内の治験実施を目標とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

S Murata, Y Koga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, Y Kakugawa, Y Ohtake, N Saito, Y Matsumura. Application of miRNA expression analysis on exfoliated colonocytes for colorectal cancer diagnosis. Gastrointestinal Cancer Targets and Therapy. 2 11-18 2012

2. M Yasunaga, S Manabe, D Tarin, Y Matsumura.

Tailored immunoconjugate therapy depending on a quantity of tumor stroma. Cancer Sci. 104(2) 231-237, 2013

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）

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

東京工業大学 資源化学研究所

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(環状 RGD 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おけるがん集積性の評価と U87MG 細胞の同所移植モデルに対する抗腫瘍効果を検証した。また、環状 RGD ペプチドの新たな機能として、抗がん剤内包ミセルの毒性が軽減される効果を見出した。

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、水中で自己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(図1)。高分子ミセルは、内核に抗がん剤などの生理活性物質を内包させることができ、表面が生体適合性のポリエチレングリコール(PEG)で覆われているため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)によって固形がんを選択的に集積し、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。

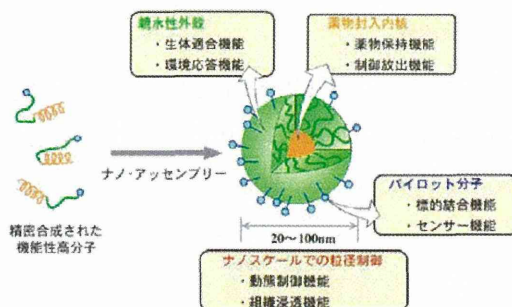


図1. 高分子ミセル型 DDS の模式図

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がん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（環状 RGD ペプチド）を導入した DACHPt 内包ミセルに関して、ヒト Glioblastoma U87MG 細胞の皮下移植モデルにおけるがん集積性の評価と U87MG 細胞の同所移植モデルに対する抗腫瘍効果を検証した。また、環状 RGD ペプチドの新たな機能として、抗がん剤内包ミセルの毒性が軽減される効果を見出した。

B. 研究方法

1) 環状 RGD ペプチド(cRGD)導入 DACHPt 内包ミセルの U87MG 腫瘍への集積性の評価

cRGD およびコントロールリガンドとして環状 RAD ペプチド(cRAD)を搭載した DACHPt 内包ミセル（それぞれ cRGD/m および cRAD/m と略。リガンド導入率は 20%）をそれぞれ Alexa647(赤)および Dy488(緑)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。

2) cRGD 導入 DACHPt 内包ミセルの Glioblastoma(GBM)同所移植モデルに対する抗がん活性評価

ルシフェラーゼ安定発現 GBM 細胞 (U87MG-luc 細胞) を BALB/c ノードマウス(♀、6 週齢、n=12)の脳室内に注入することによって GBM の同所移植

モデルを作製した。このマウスに対して、ペプチド導入 DACHPt 内包ミセル (cRGD/m および cRAD/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)、腫瘍の増殖をルシフェラーゼ発光量より評価した。ルシフェラーゼ発光量は、フットイメージャー(IVIS Spectrum)を用いて測定した。

C. 研究結果

1) cRGD 導入 DACHPt 内包ミセルの U87MG 腫瘍への集積性の評価

前年度は、cRGD/m および cRAD/m をそれぞれ Dy488(緑)および Alexa647(赤)で標識し、同時に静脈内の投与した時の U87MG 腫瘍（皮下腫瘍）への集積を in vivo 共焦点顕微鏡によって評価したところ、cRGD/m が血管からがん組織に速やかに移行することが確認された。そこで本年度は、この結果が蛍光色素の違いによるアーチファクトではないことを確認するために、蛍光色素による標識が逆の組み合わせとなるように cRGD/m および cRAD/m をそれぞれ Alexa647(赤)および Dy488(緑)により標識し、同時にマウスに投与した時の U87MG 腫瘍への集積を in vivo 共焦点顕微鏡によって評価した。その結果、cRAD/m(緑)は血管内に留まっていたが、cRGD/m(赤)は血管からがん組織に速やかに移行することが確認された (図

2)。このように、標識法によらず前年度と同様な結果を得ることができた。

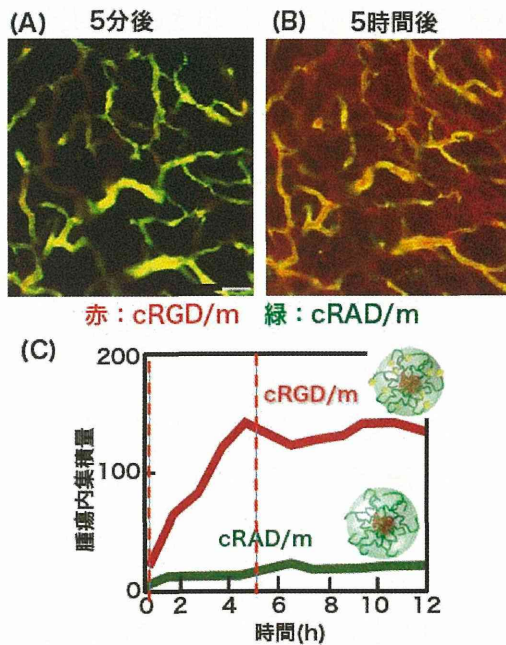


図 2. cRGD および cRAD ペプチド修飾高分子ミセルの U87MG 腫瘍 (皮下移植) への集積 [(A) 5 分後. (B) 5 時間後, (C) 腫瘍部位における蛍光の経時変化]

2) cRGD 導入 DACHPt 内包ミセルの GBM 同所移植モデルに対する抗がん活性評価

U87MG-luc 細胞の同所移植モデルに対して、オキサリプラチン、cRGD/m および cRAD/m を投与(0, 2, 4 日目)した時の腫瘍の増殖をフォトイメージャーにより評価した。治療 22 日後の発光イメージングの結果および発光量の経時変化を測定した結果をそれぞれ図 3(A)および(B)に示す。ここに示したように、オキサリプラチンおよび cRAD/m は有意な抗がん活性を

示さなかったが、cRGD/m は優れた治療効果を示すことが確認された。

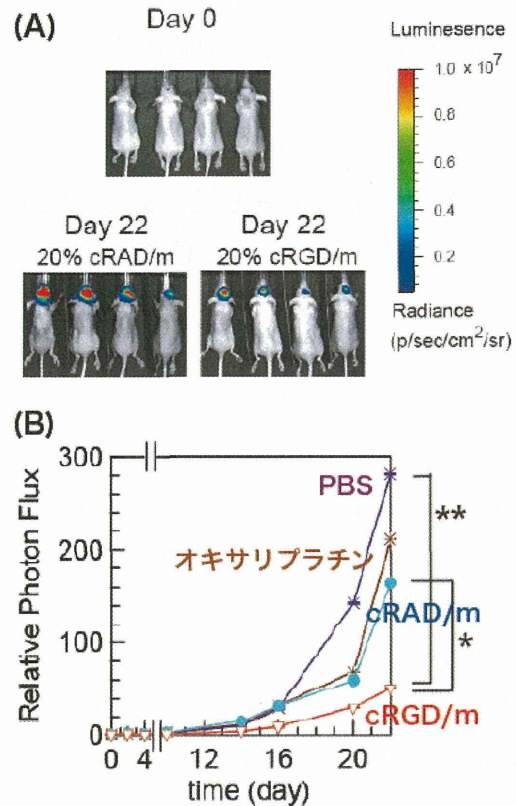


図 3. cRGD および cRAD ペプチド修飾高分子ミセルによる U87MG-Luc 腫瘍 (同所移植モデル) の治療 [(A) 22 日後の発光イメージング. (B) ルシフェラーゼ発光の経時変化]

一方、本実験では、投与量の検討も同時に行なっており、その結果、cRGD/m は、cRAD/m および PEG 末端がメトキシ基の DACHPt 内包ミセルより低い全身毒性を示す (すなわち、高投与量における体重減少が少ない) ことが分かった。これまでの検討では、cRGD/m は、cRAD/m と比較して 2-3 倍の最大耐用量(MTD)を有することが確認されており、cRGD/m は、GBM

に対して優れたがん集積性と治療効果を示すだけでなく、副作用も低いことが確認された。

D. 考察

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。本研究では、がんの血管内皮細胞に過剰発現している $\alpha V \beta 3$ 、 $\alpha V \beta 5$ インテグリンに特異的に結合する環状 RGD ペプチドをリガンドとして利用することにより DDS の BBTB を越えた脳腫瘍への薬剤デリバリーが可能になるものと考え、研究を行っている。前年度までは cRGD リガンドを搭載した DACHPt 内包ミセルのヒト GBM 細胞 (皮下移植モデル) への集積を評価したところ、ミセルが血管からがん組織に効率的に移行することが確認された。そこで本年度は、この結果が蛍光色素の違いによるアーチファクトではないことを確認するために、蛍光色素が逆の組み合わせの蛍光標識ミセルを用いて同様の実験を行った。その結果、cRGD/m が血管からがん組織に速やかに移行することが確認された。cRGD/m のがん組織への移行は 5 時間以内にプラトーに達し (図 2(c))、このような速やかな血流からがん組織への移行は EPR 効果によって説明することはできないために、この結果はリ

ガンドの導入によりミセルの Active Transport が誘起された為であると考えられる。

本結果に基づいて、U87MG-Luc 細胞の同所移植モデルに対する cRGD/m の薬効を検証した。その結果、cRGD/m による優れた治療効果が確認された。GBM 細胞は同所移植によって BBTB が形成され、DDS の集積性が著しく低下するが、cRGD/m は皮下移植モデルのみならず同所移植モデルにおいても Active Transport によってがん組織に移行し、優れた治療効果を示したものと考えられる。さらに本年度の新しい発見として、cRGD リガンドの導入によって抗がん剤内包ミセルの全身毒性が著しく低減されることが明らかになった。今後は、cRGD リガンドによる DDS の毒性低減効果のメカニズムについても検証していく予定である。

E. 結論

本年度は、cRGD リガンド導入ミセルの GBM 腫瘍への Active Transport を *in vivo* 共焦点顕微鏡観察により実証し、GBM の同所移植モデルの治療に成功した。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 GBM に対する画期的な治療法に繋がるものとして期待される。

F. 健康危険情報

なし

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文論文のみ)

- 1) P. Mi, H. Cabrala, D. Kokuryo, M. Rafi, Y. Terada, I. Aoki, T. Saga, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. *Biomaterials*, 34 (2) 492-500 (2013)
- 2) F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
- 3) R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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、血中では安定に存在する一方、目的部位においてのみ薬剤をいかに効率的に輸送担体から放出するかについての設計が鍵となる。これまで、抗間質抗体にリンカーを介して抗がん剤を結合させてきたが、リンカーについての改良を行うこととした。リンカーには、酵素による切断を容易にするために、酵素により特異的に認識切断される部位 (specifier) と抗がん剤との距離を離すスペーサーを導入されることが多い。これまでスペーサーとしては、*p*-アミノベンジルカーバメート基が多く使用されてきたが、切断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るため、生体内においてのシステイン SH 基などとの相互作用が懸念されてきた (図 1)。そこで、血中では安定に存在し、切断過

程において環化反応により速やかに薬剤を放出し、反応性が高い中間体を生じないスペーサーを設計・合成し、薬剤放出能力の検証を行うこととした (図 2)。

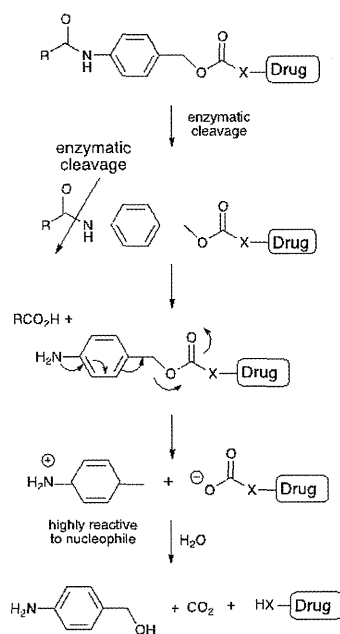


図1 汎用される *p*-アミノベンジルカーバメート基スペーサーと切断過程に生じる高反応性中間体

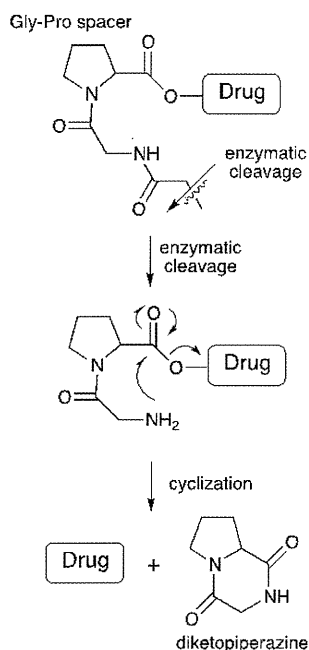


図2 新規設計した環化反応により薬剤放出するスペーサー

B. 研究方法

1) ジペプチドは環化反応により速やかにジケトピペラジンを生じることが知られているが、特に Gly-Pro は Pro の構造上、アミドのコンフォメーションが *cis* 型をとりやすいことからジケトピペラジンの生成速度が速い。このことに注目し、Gly-Pro をスペーサーとして使用することとした。抗がん剤としては、薬剤の汎用性が広いことと、修飾に必要である水酸基を持つことから、パクリタキセルを選択した。特定の酵素により切断可能である specifier としては、これまでのがんと血液凝固の関連に着目してきたしてきた経緯から、プラスミンにより切断

可能である Val-Leu-Lys トリペプチドを選択した。比較対象として、汎用されているスペーサーである *p*-アミノベンジルカーバメート基を介したパクリタキセル-リンカー複合体、および、スペーサーを介さずに specifier とパクリタキセルが結合した複合体も合成した。

2) *in vitro* においてプラスミンに対する切断活性を調べた。

C. 研究結果

1) 新規設計したリンカーとパクリタキセルを結合し、複合体を合成した (図 3)。化合物 1 は、Gly-Pro スペーサーを介して、specifier である Val-Leu-Lys をパクリタキセルに結合したものであり、化合物 2 は、非天然型の Pro を用いた Gly-(D)-Pro スペーサーを介して Val-Leu-Lys をパクリタキセルに結合したものである。化合物 3 は、これまで汎用されてきた *p*-アミノベンジルカーバメート基をスペーサーとして使用したものである。化合物 4 は、スペーサーを使用せずにパクリタキセルと Val-Leu-Lys を直接結合させたものである。

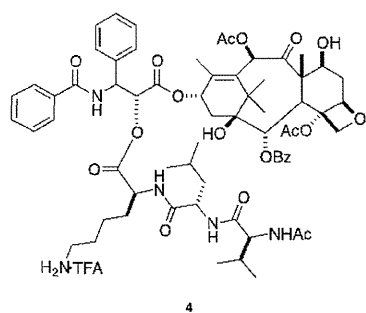
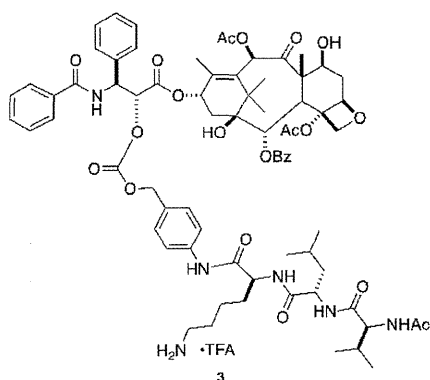
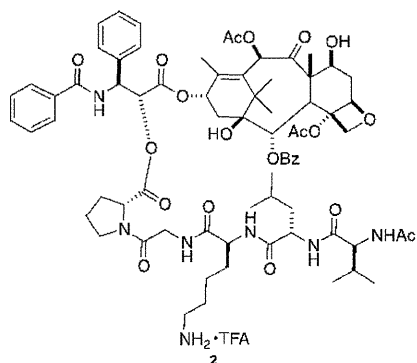
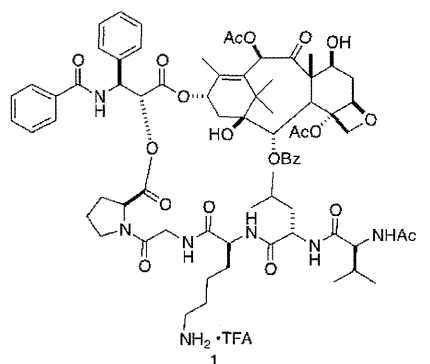


図3 合成したパクリタキセルースペーサー-specifier 複合体

2) 合成した4つのパクリタキセルースペーサー複合体について *in vitro* において、プラスミンを作用させ、経時変化を追跡することにより、パクリタキセルの放出能力について検討を行った。

D. 考察

化合物 **1, 2** は **3** と同程度、ほぼ同じ速度により、パクリタキセルを放出した。化合物 **4** は、パクリタキセルの立体障害のため、specifier 切断速度が遅かった。また、ジケトピペラジンの生成も確認され、期待どおりの放出機構により進行していることが明らかとされた。

E. 結論

新規スペーサーを用いるリンカーは、これまで汎用されてきたリンカーと同等な薬剤放出能力を有していることが明らかになった。合成も通常のペプチド合成の手法により簡便に行うことが可能である。高反応性を持ち、生体内の様々な相互作用が懸念される中間体を生じることがない、理想的なスペーサーである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

“Tailored Immunoconjugate Therapy Depending on a Quantity of Tumor Stroma” Masahiro Yasunaga, Shino Manabe, David Tarin, Yasuhiro Matsumura, *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 231-237.

“Development of Diketopiperazine-forming Dipeptidyl Pro-Gly Spacer for Preparation of Antibody-Drug Conjugate” Shino Manabe, Hikaru Machida, Yoshiyuki Aihara, Masahiro Yasunaga, Yukishige Ito, Yasuhiro Matsumura, *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 792-796.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

バブルリポソームへの超音波照射におけるキャビテーションにより生じる発熱とジェット流を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法を併用することで、細胞性免疫を中心とした抗腫瘍免疫が誘導され、抗腫瘍効果の増強が認められた。このことより、本併用療法が新たながん治療戦略として期待される。

A. 研究目的

これまでに我々は、超音波造影ガス (perfluoropropane) を封入した超音波応答性リポソーム (バブルリポソーム)を開発した。このバブルリポソームに高強度の超音波を照射するとバブルリポソームの圧壊に伴い、発熱やジェット流が生じる。この現象はキャビテーションと呼ばれており、このキャビテーションによりがん細胞を直接傷害できることを見出している。実際に担がんマウスのがん組織にバブルリポソームを投与し超音波照射することで腫瘍増殖抑制効果が得られ、バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法の有用性が示された。この療法ではがん組織内においてがん細胞の死滅に伴うがん関連抗原が放出されていると考えられる。そのため、超音波がん温熱療法後のがん組織に抗原提示細胞である樹状細胞を投与することで、強力な抗腫瘍免疫が誘導されるものと期待される (図1)。そ

こで本研究では、バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果について検討した。

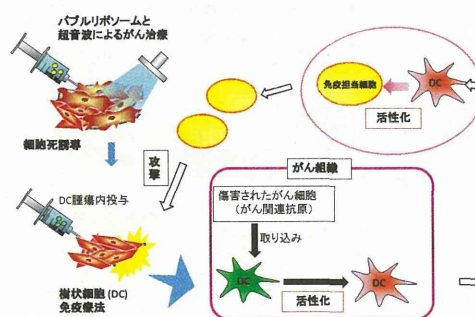


図1 バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療戦略

B. 研究方法

マウス結腸がん Colon 26 細胞を BALB/c マウス後背部皮下に移植 8 日後、BLを腫瘍内投与し、体外から腫瘍組織に向け超音波 (1 MHz、4 W/cm²、2 分間) を照射した。その 1、2、3、5 日後、マウス骨髄由来樹状細胞を腫瘍内投与し、腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した。さらに、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞

を枯渇したマウスに同様の治療を行い、抗腫瘍メカニズムの解析をした。

C. 研究結果

バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法後に樹状細胞を腫瘍内投与することで、超音波がん温熱療法または樹状細胞免疫療法単独より高い抗腫瘍効果が認められた(図2)。この抗腫瘍メカニズムを解析するため、各種免疫担当細胞を枯渇したマウ

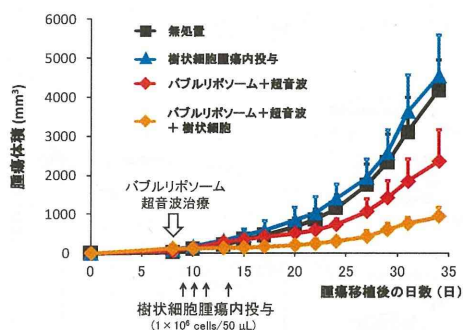


図2 バブルリポソームを利用した超音波温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用による抗腫瘍効果

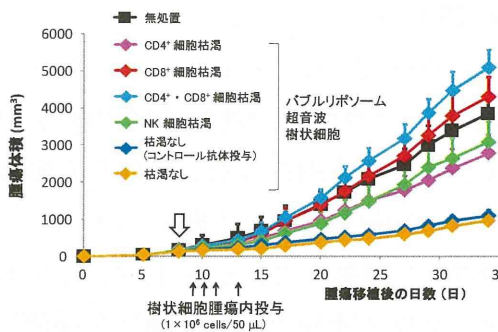


図3 バブルリポソームを利用した超音波温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用における抗腫瘍メカニズム解析

スを用い抗腫瘍効果を検討したところ、CD8⁺ T細胞枯渇マウスで抗腫瘍効果が完全に消失した(図3)。このことから、本併用療法の抗腫瘍効果にCD8⁺ T細胞が関与していることが示唆された。

D. 考察、

バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法を施したがん組織内に樹状細胞を投与することで、細胞性免疫を中心とした抗腫瘍免疫を効率よく誘導できることが明らかとなった。

E. 結論

バブルリポソームを利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用は有効な抗腫瘍免疫を誘導可能であるため、新たながん治療戦略として利用可能になるものと期待される。

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)

別紙4参照

H. 知的財産権の出願・登録状況