

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	伊藤 千尋
主 論 文 題 名： ヘモグロビン-アルブミンクラスターを基盤としたドキシソルビシンおよび一酸化炭素 ナノ共輸送体の創製と有用性評価				
(内容の要旨)				
1. 緒言 ドキシソルビシン (DOX) は、強力な抗腫瘍効果を有する一方で、重篤な副作用として用量依存 的かつ不可逆的な心毒性を惹起するため、副作用を最小限に抑えることが求められている。これ までに Doxil® (DOX のリポソーム製剤) をはじめ、高分子物質やナノ粒子が腫瘍部位に集積しや すい Enhanced permeability and retention (EPR) 効果の概念に基づき、副作用の軽減を図った DOX 製剤の創薬がなされてきた。しかしこのような製剤工夫をした製剤であっても、投与された DOX の全量を腫瘍部位に送達させることは不可能であり、少なからず心毒性を含む臓器傷害が引き起 こされる。そのため、近年では臓器保護剤を DOX と併用するアプローチに関する基礎研究が行 われ、DOX が惹起する細胞毒性を全身的に抑制できる可能性が示されている。 そこで抗酸化作用を含む多彩な生理活性を有する一酸化炭素 (CO) を細胞保護剤として着目 し、CO と DOX を共輸送できる新規 DOX 製剤を構想した。CO と DOX のデュアルデリバリー システムを確立するための基盤担体として、ヘモグロビンをアルブミンで被覆したヘモグロビン -アルブミンクラスター (HA) に着目した。HA はヘモグロビンとアルブミンの結合特性により CO と DOX を容易に担持可能であることに加え、腫瘍血管内皮細胞や腫瘍間質に高発現している アルブミンレセプター gp60 やアルブミン結合タンパク質 SPARC を介してがん微小環境を突破す ることが期待できる。本研究では、HA に CO と DOX を担持した DOX 担持ヘモグロビン-アル ブミンクラスターCO 体 (CO-HA-DOX) を2つのアプローチにより設計・作製し、有効性と忍容 性の高い新規 DOX 製剤としての有用性を評価した。以下に得られた知見を総括する。				
2. CO-HA-DOX の作製および有用性評価 【背景・目的】 CO-HA と DOX の結合アプローチとして、腫瘍部位特異的に抗腫瘍活性物質である DOX が HA から解離することが理想的である。近年、がん微小環境が低 pH であることを利用した酸応答性 抗がん剤は、腫瘍選択的な薬物放出により副作用を軽減させる創薬戦略として期待されている。 なかでも、Aldoxorubicin (ALDOX) は構造中にヒドラゾン結合と末端にマレイミド基を有し、生 体内アルブミンの遊離システインに共有結合するアルブミン-ヒッチハイク型酸応答性 DOX プ				

ロドラッグであり、非臨床および臨床試験において優れた有効性と安全性を示した製剤である。また、マレイミド化合物を含むアルブミン結合分子は *in vivo* において生体内アルブミンを利用するヒッチハイク型よりも、アルブミン複合体として投与することで腫瘍ターゲティング能の向上により高い抗腫瘍効果が得られることが実証されている。よって EPR 効果を受けやすい粒子特性 (高分子・ナノ粒子) をもつ HA に細胞保護効果を有する CO と酸応答性を示す ALDOX を結合させることで腫瘍送達性・選択性に富んだ安全性と有効性の高い DOX 製剤の創製が期待できる。本研究では、CO-HA の分子表面に ALDOX を共有結合した CO-HA-DOX を作製し、その製剤特性および有効性、安全性評価を行った。さらに CO-HA-DOX に担持した CO が DOX 誘発心毒性を抑制することを検証するため、CO-HA と DOX の併用時に心筋に及ぼす影響を評価した。

【方法】

クロスリンカーを介してヘモグロビン CO 体の表面に位置するリシン残基とアルブミンの 34 位-システイン残基を結合した CO-HA の分子表面にチオール基を導入し、ALDOX を結合させることで CO-HA-DOX を作製した。動的光散乱法 (DLS)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、円二色性 (CD) スペクトル、電気泳動、紫外可視吸収スペクトルにより、CO-HA-DOX の構造および粒子特性を評価した。2 次元および 3 次元培養したがん細胞に対する CO-HA-DOX の抗腫瘍効果を WST-8 法および酸性ホスファターゼ活性より評価した。CO-HA-DOX の細胞内取り込みを共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメトリーにより評価した。また、健常マウスを用いて CO-HA-DOX の血算、生化学パラメータ、組織形態、臓器中 DOX 由来蛍光強度を評価し、生体適合性および臓器分布を検討した。さらに Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスに CO-HA-DOX を投与し、腫瘍体積と腫瘍内 DOX 蛍光強度から有効性および腫瘍集積性を検討した。また、CO-HA の併用下で DOX を曝露した心筋細胞 (H9c2 細胞) の表面積を比較検討した。加えて、健常マウスに DOX と CO-HA を同時投与し、体重、心重量、生化学パラメータより心傷害性を評価した。なお、本研究における動物実験は「慶應義塾動物実験規定」を遵守し、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た実験計画に則って実施した (承認番号: A2022-192)。

【結果・考察】

CO-HA-DOX はヘモグロビン CO 体にアルブミンと DOX がそれぞれ平均 3 分子結合した約 12 nm の負に帯電した粒子であり、酸応答的な DOX/CO 放出性を示した。CO-HA-DOX は 2 次元培養した 8 種類のがん細胞に対し用量依存的な細胞増殖抑制効果を示したが、その効果は DOX の約 1/10 であった。一方で、生体内の腫瘍環境を模倣した 3 次元培養がん細胞スフェロイドに対して、CO-HA-DOX は濃度依存的にスフェロイドの増大および生細胞数を反映する酸性ホスファターゼの活性を抑制し、2 次元培養細胞毒性試験の結果と比較すると DOX との有効性の差は小さかった。さらに CO-HA-DOX を曝露したヒト乳がん細胞 (MCF-7 細胞) における DOX とアルブミンの細胞内局在観察と細胞内取り込み評価の結果から、CO-HA-DOX の DOX は大部分が細胞

外で解離して細胞内へ取り込まれ、一部の DOX は CO-HA-DOX として細胞内に取り込まれた後に放出され则认为された。また CO-HA-DOX は DOX が有効性を示さない DOX 等量で Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍体積の増加を抑制した。臓器分布評価の結果より、CO-HA-DOX は DOX の約 5.5 倍の DOX 由来蛍光が腫瘍部位に検出されたことから、CO-HA-DOX の優れた DOX 送達性が高い抗腫瘍効果に繋がったと认为された。加えて、CO-HA-DOX は DOX と比較して高い血中滞留性を示し、肝臓への高い分布がみられたが、生化学パラメータ (AST, ALT) および組織形態に異常は認められなかった。また DOX と CO-HA の併用により、DOX 投与に起因する H9c2 細胞の萎縮およびマウスの心筋傷害マーカー (CK-MB および LDH) の上昇を抑制したことから、CO-HA が供給する CO は心保護に寄与すると认为された。よって CO-HA-DOX は DOX 誘発心毒性を軽減した有効性の高い新規 DOX 製剤として利用できることを実証した。

3. ヒト血清アルブミンのリガンド結合能を利用した改良型 CO-HA-DOX の作製と有用性評価

【背景・目的】

「2. CO-HA-DOX の作製および有用性評価」の項では、HA を輸送担体として用いた CO と DOX の共輸送は抗腫瘍効果を損なうことなく DOX 誘発心毒性を抑制する概念実証を得た。しかし CO-HA への DOX の化学修飾は煩雑な調製 (結合) 過程やクラスターの疎水性の増大により DOX 結合数に限界があった。そのため、HA を基盤とした実用的な CO と DOX の共輸送体を実現するには、CO-HA に簡便に多量の DOX を担持できる手法の確立が望まれる。

本研究では、One-pot で調製かつ高率に薬物を搭載可能な CO-HA と DOX の新たな結合様式として、アルブミンのリガンド (脂肪酸) 結合能に着目した。アルブミンには脂肪酸結合サイトが 7-9 か所存在し、脂肪酸の炭素鎖長や不飽和度によりその結合数や結合親和性は異なることが知られている。近年ではアルブミンと脂肪酸の高親和性を利用し、薬物を脂肪酸に結合しプロドラッグ化することで体内動態の改善を図った製剤の開発が盛んに行われており、一部の製剤 (Levemir[®], Aristada[®]) は実用化されている。さらに、脂肪酸-薬物複合体をリポソームなどのナノ粒子に搭載させることで、薬物送達性を強化した創薬研究も数多く行われている。そこで、CO-HA に One-pot で高率に DOX を担持可能な調製を実現するため、5 種類の飽和脂肪酸-DOX 誘導体を合成し、CO-HA の脂肪酸結合サイトを介して担持させた改良型 CO-HA-DOX を調製した。粒子の安定性や結合数の観点から最適な飽和脂肪酸-DOX 誘導体を決定し、その有用性を評価した。

【方法】

5 種類の飽和脂肪酸 [カプリン酸 (C10)、ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14)、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)] を用いて飽和脂肪酸-DOX 誘導体 (C10-DOX、C12-DOX、C14-DOX、C16-DOX、C18-DOX) を合成し、脱脂 CO-HA に添加することで改良型 CO-HA-DOX を調製した。改良型 CO-HA-DOX の DOX 結合数と粒子径を経日的に評価することにより、飽和

脂肪酸-DOX 誘導体をスクリーニングした。これらの検討結果から最適な調製方法で作製した改良型 CO-HA-DOX の構造および粒子特性 (粒子径、表面電荷、DOX 放出性) を DLS、CD スペクトル、電気泳動、蛍光スペクトルにより評価した。さらに2次元および3次元培養したがん細胞に対する改良型 CO-HA-DOX の抗腫瘍効果を WST-8 法および酸性ホスファターゼ活性より評価した。また改良型 CO-HA-DOX を投与した Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスの腫瘍体積、体重、生化学パラメータ、組織形態および臓器中 DOX 由来蛍光強度を評価し、抗腫瘍効果、安全性、臓器分布を比較検討した。なお、本研究における動物実験は「慶應義塾動物実験規定」を遵守し、慶應義塾動物実験委員会の承認を得た実験計画に則って実施した (承認番号: A2022-192)。

【結果・考察】

C18-DOX を用いて調製した改良型 CO-HA-DOX は、クラスター1 分子に対し DOX が平均 6 分子結合した約 10 nm の負に帯電したナノ粒子であり、作製後 1 週間において最も安定な構造を有していた。また改良型 CO-HA-DOX は脱脂 CO-HA と同等の製剤特性を有し、低 pH 応答的に緩徐な DOX 放出性を示した。さらに改良型 CO-HA-DOX は2次元および3次元培養したがん細胞に対し DOX を下回る抗腫瘍効果を示した一方で、Colon-26 細胞皮下移植モデルマウスにおける *in vivo* 有効性試験では DOX と同等の抗腫瘍効果を示した。これは改良型 CO-HA-DOX の高い血中滞留性と腫瘍集積性に起因すると考えられた。また改良型 CO-HA-DOX は DOX 投与に起因する CK-MB の上昇および体重減少を抑制し、組織形態の異常は認められなかった。加えて改良型 CO-HA-DOX は肝臓、腎臓、肺に高い分布がみられ、肝臓、腎臓、肺に高発現している脂肪酸輸送タンパク質による捕捉に起因すると考えられた。以上より、改良型 CO-HA-DOX は優れた抗腫瘍効果と心保護効果を両立した新規 DOX 製剤として期待できる。

4. 総括

本研究では、ヘモグロビンをアルブミンで被覆した HA に CO と DOX を担持させた新規 DOX 製剤の創製とその臨床応用に向けた基盤情報の構築を行った。まず、CO-HA の分子表面に DOX を共有結合した CO-HA-DOX を作製し、CO と DOX の共輸送の有用性の概念実証を得た。次に共有結合型 CO-HA-DOX の検討で明らかになった CO-HA-DOX のデメリットであるクラスターに対する DOX 担持数の制限および結合過程の煩雑さを克服すべく、アルブミンのリガンド結合能を利用した One-pot で調製可能な改良型 CO-HA-DOX の調製手法を確立し、CO-HA-DOX は有効性と安全性を兼ね備えた新規 DOX 製剤であることを示した。本結果は有効性と忍容性を有する新規 DOX 製剤を提示するだけでなく、CO と毒性の高い薬剤を共輸送することにより臓器保護効果を付与したドラッグデリバリー製剤開発の新たなアプローチも提示しており、今後、様々な疾患治療薬開発への応用が期待される。