

カンナカ ケント

氏名(本籍)	甘中 健登 (兵庫県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第46号
学位授与年月日	令和4年3月3日
学位授与の条件	学位規程第4条第1項該当者
学位論文の題名	生体直交型反応を利用したリポソーム製剤からの薬物放出制御に関する研究
論文審査委員	主査 教授 坂根 稔康 副査 教授 大河原 賢一 副査 教授 田中 将史 副査 教授 向 高弘

論文内容の要旨

緒言

薬物の効果を最大限に発揮させることや、副作用を最小限に抑えることを目的に、その薬物の体内動態を制御する技術・システムをドラッグデリバリーシステム(DDS)という。必要最小限の薬物を、必要な場所に、必要な時(タイミング・期間)に供給することを目指し、DDSの研究開発が進められている。代表的なDDSキャリアであるリポソームは、薬物の体内動態を改善し、enhanced permeability and retention (EPR)効果に基づき、固形がんへ高く集積することや、抗がん剤を内膵することにより、全身性の副作用を軽減することを長所とする[1]。一方、内封薬物の放出制御が困難であることから、がん部位での薬効発現が乏しいことが短所として挙げられる[2,3]。リポソームを用いて効果的で安全ながん治療を行うには、非標的部位での薬物の安定保持と、標的部位における速やかな薬物放出という相反する機能が求められる。近年、この課題を解決するために、様々な刺激を利用した薬物放出制御法が開発され、リポソームを用いた薬物治療における効果の改善が報告されている[4]。しかし、pHや酵素などの内部刺激を利用する場合、がん微小環境は不均一であるために、治療効果に個人差が生じることが懸念される。また、熱などの外部刺激を利用する場合には、刺激自体による正常組織への物理的なダメージが懸念される。

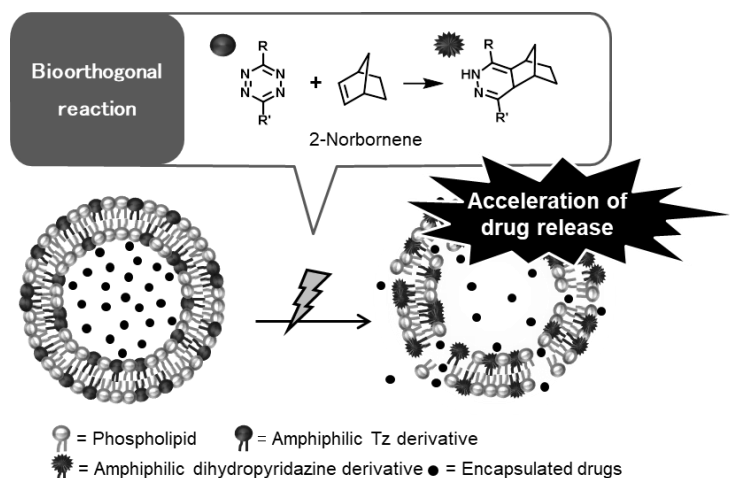


Fig. 1 A strategy for releasing drug from liposome where the membrane structure could be disrupted by reaction between NB and Tz derivative introduced into the liposome as a membrane component.

したがって、新たな機構に基づいた時空間的な薬物放出制御法の開発が求められている。

本研究では、化学反応を利用したリポソーム製剤からの薬物放出制御法の開発を着想した。化学反応としては、夾雑な生体内においても、特定の官能基の組み合わせでのみ選択的に進行する生体直交型反応 (bioorthogonal reaction) に着目し、中でも、テトラジン (Tz) とノルボルネン (NB) との逆電子要請型 Diels-Alder 反応 (inverse electron demand Diels-Alder reaction) を選択した[5]。すなわち、リポソーム膜表面で生体直交型反応を起こし、構成成分の分子構造を変化させることができれば、それに伴った膜特性の変化が誘導され、内封薬物の放出促進が達成されるのではないかと考えた (Fig. 1)。

第1章 両親媒性 Tz 誘導体の合成とリポソームへの応用

生体直交型反応を起こしうるリポソームを設計するにあたり、比較的水溶性の高い Tz 化合物を両親媒性化合物へと誘導体化し、リポソームに導入することとした。次に、Tz 誘導体を構成成分とするリポソームを作製し、NB との化学反応に基づく薬物放出挙動の変化について評価した。また、化学反応前後のリポソーム膜の特性変化について、Langmuir 単分子膜を用いた物理化学的なアプローチによって評価することで、リポソームからの薬物放出に関する制御機構の解明を試みた。

まず、両親媒性 Tz 誘導体 (化合物 **1**, Fig. 2) の分子設計では、生体内での Tz 骨格の安定性を高め、NB 誘導体との反応性の向上が報告されている π 欠如系芳香族複素環化合物であるピリジン修飾を修飾し[6]、さらに、リポソームの疎水性領域との相互作用を高めるために、飽和アルキル鎖を導入した。化合物 **1** は 2 種類のシアノピリジン誘導体を出発物質として、3 段階の反応により合成した。得られた化合物 **1** は、NB 誘導体との高い反応性を示し、生体内における本化学反応の進行が期待された。

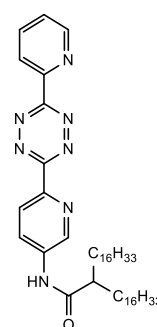


Fig. 2 Chemical structure of Tz derivative (**1**).

次に、リン脂質である 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) と化合物 **1** で構成されるリポソーム (POTz-liposome) を作製した。薬物放出の定量的な評価のために、モデル薬物として放射性インジウム錯体 (^{111}In -diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)) を配位子交換反応により内封した。得られた POTz-liposome の粒子径は約 85 nm で、ゼータ電位は約 2 mV であり、放射標識前後で大きく変化しなかった。リポソームからの薬物放出をセルロースアセテート膜電気泳動法あるいはサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した結果、2-norbornene (2-NB) を添加した場合の POTz-liposome からの薬物放出率は、非添加群と比べて有意に高い値を示した (Fig. 3A)。また、norbornane (NBane, 2-NB の二重結合を還元した Tz と反応しない化合物) を添加した場合、POTz-liposome からの薬物放出の増大は認められなかった。さらに、官能基の異なる NB 誘導体を用いて薬物放出性を比較すると、POTz-liposome に 5-norbornene-2-carboxylic acid (NBCOOH) や 5-norbornene-2,3-dicarboxylic acid (NB(COOH)₂) を添加した場合の放出率は、2-NB を添加した場合と比較して、有意に高い値を示した (Fig. 3B)。NBCOOH を添加した 24 時間後の放出率は 80% 以上であり、NBCOOH が最も高い放出促進効果を

示すことが明らかとなった。なお、POTz-liposome を構成する化合物 **1** の割合や、混合する NB 誘導体の濃度の増大に伴って、放出率が向上する傾向が観察された。以上の結果より、POTz-liposome からの薬物放出促進には、化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応は必須であり、特に NBCOOH との化学反応が最も迅速かつ顕著な薬物放出の促進を引き起こすことが明らかとなった。

NB 誘導体との化学反応前後で

POTz-liposome の膜特性の変化が惹起されると仮定し、Langmuir 単分子膜を用いた熱力学的な解析を実施し、リポソームからの薬物放出の促進機構の解明を試みた。本評価は、リポソームの表面構造を単分子膜として捉え、膜を構成する分子の占有面積 (A) や表面圧 (π) を測定することで、その分子自身の特性や混合膜中の分子間相互作用を理解するための一助となる[7]。本検討において、化合物 **1** と NB 誘導体との化学反応は単分子膜の親水基部分で起こるため、膜特性の相違が生じた場合は、親水基部分の変化に由来すると想定される。化合物 **1** と各 NB 誘導体 (2-NB、NBCOOH、NB(COOH)₂) との反応生成物をそれぞれ compd. 1-2-NB、compd. 1-NBCOOH、compd. 1-NB(COOH)₂ として表す。単分子膜は POTz-liposome と同様の脂質組成で作製した。検討の結果、POPC/compd. 1-2-NB や POPC/compd. 1-NBCOOH で作製された単分子膜の π - A 等温線は、POPC/compd. **1** の単分子膜と異なる等温線を示したことから、2-NB や NBCOOH との化学反応による生成物と化合物 **1** で、POPC との相互作用が異なると考えられた。また、単分子膜の流動性の指標となる圧縮率 (compressibility modulus, C_s) の逆数 (C_s^{-1}) 値を算出した。なお、 C_s^{-1} 値が小さい程、膜流動性が高いことを表す。その結果、POPC/compd. 1-2-NB や POPC/compd. 1-NBCOOH で作製された単分子膜では、POPC/compd. **1** の単分子膜と比較して、 C_s^{-1} は低値を示し、流動性の増大を認めた (Fig. 4)。本

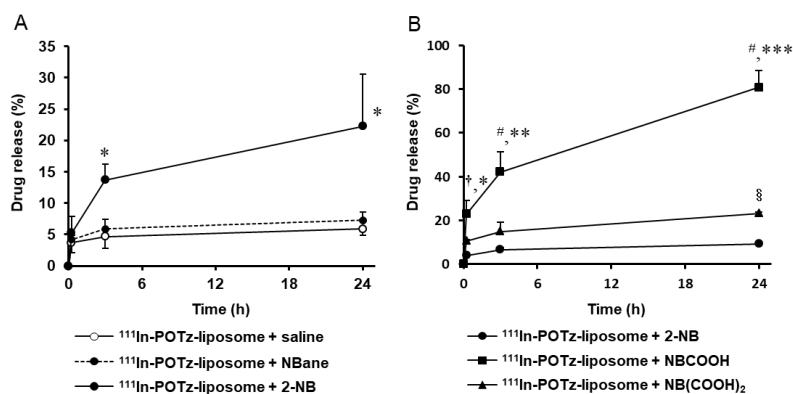


Fig. 3 (A) Release rate of ¹¹¹In-DTPA (%) from POTz-liposome in presence of 2-NB (40 mM) or NBane (40 mM). Results are expressed as mean ± SD (n = 3). **p* < 0.05 vs. POTz-liposome + saline. (B) Release rate of ¹¹¹In-DTPA (%) from POTz-liposome reacted with 2-NB (20 mM), NBCOOH (20 mM) or NB(COOH)₂ (20 mM). Results are expressed as mean ± SD (n = 3). #*p* < 0.001, †*p* < 0.01, §*p* < 0.05 vs. POTz-liposome + 2-NB, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 vs. POTz-liposome + NB(COOH)₂.

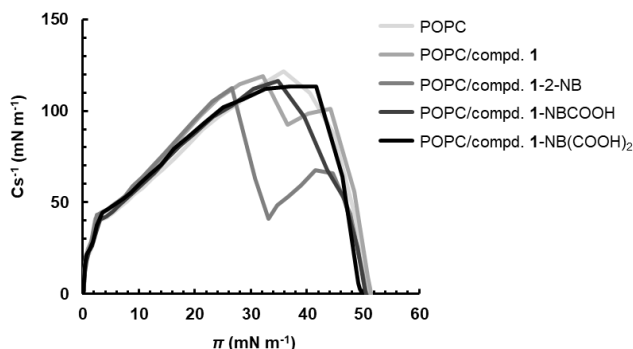


Fig. 4 The compressibility modulus (C_s^{-1}) of the two-component monolayers on 150 mM NaCl aq. at 25°C as a function of π .

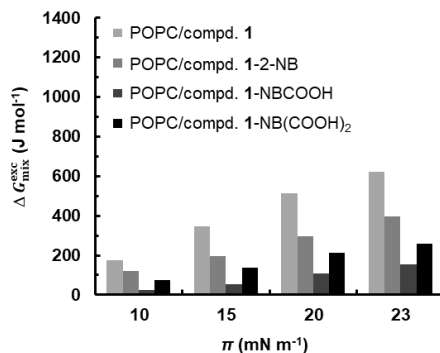


Fig. 5 Excess Gibbs free energy of mixing (ΔG_{mix}^{exc}) of two-component monolayers on 150 mM NaCl aq. at 25°C as a function of π .

結果より、化学反応による膜流動性の向上が POTz-liposome からの薬物放出促進の要因の1つとなることが示唆された。さらに、単分子膜を構成する二成分間の相互作用を熱力学的に解析するために、混合による過剰ギブズ自由エネルギーの変化量 (ΔG_{mix}^{exc}) について評価を行った (Fig. 5)。なお、 ΔG_{mix}^{exc} 値が正の値であれば、単分子膜を構成する両成分間に斥力が作用していることを意味する。解析の結果、全ての混合膜において正の ΔG_{mix}^{exc} 値が得られたことから、いずれの単分子膜においても、両成分間に斥力が作用していることが明らかとなった。各単分子膜の ΔG_{mix}^{exc} 値を比較すると、POPC/compd. 1-NBCOOH < POPC/compd. 1-NB(COOH)₂ < POPC/compd. 1-2-NB < POPC/compd. 1 の順であった。したがって、単分子膜の両成分間に作用する斥力は、化学反応後に低下することが明らかとなった。特に、POPC/compd. 1-NBCOOH の単分子膜において、 ΔG_{mix}^{exc} 値は最も小さな値を示し、斥力が顕著に減弱した。本知見は POTz-liposome からの薬物放出率が NBCOOH 添加時に最も高くなった結果と一致し、NB 誘導体との化学反応により生成した化合物と POPC の間に作用する斥力の低下も、リポソームからの薬物放出促進の要因の1つとなることが示唆された。以上の結果から、化学反応前後で膜の特性変化が生じ、これにより POTz-liposome からの薬物放出が促進される可能性が示された。

第2章 生体直交型反応を介した薬物放出制御型リポソーム製剤によるがん治療効果の増強

本薬物放出促進型リポソーム製剤をがん治療へと展開し、効果的な薬物治療が可能であるかを検証した。治療戦略としては、Fig. 6 に示すように、まず、ドキソルビシン (DOX) を内封した化合物 1 導入リポソームを前投与する。次に、EPR 効果によるがんへの集積と正常組織からのクリアランスが確認された時点で NB 誘導体を投与する。その後、リポソームが集積した部位でのみ生体直交型反応が進行し、それに伴った DOX の放出促進により、治療効果が増強されることを期待する薬剤投与計画である。本がん治療戦略の構築を目標に、化合物 1 導入リポソームの脂質組成を最適化した後、薬物放出性評価、体内動態評価、治療実験を実施した。

本リポソーム製剤を *in vivo* がん治療へと展開するためには、まず、リポソームの生体内での安定性が重要である。そのために、臨床で利用されている DOX 内封リポソーム (Doxil®) の脂質組成を参考に、水素添加大豆リン脂質 (hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC)、コレステロール、ポリエチレングリコール修飾脂質を用いて、新たに化合物 1 導入リポソーム (HSTz-liposome) を設計・作製した。また、コン

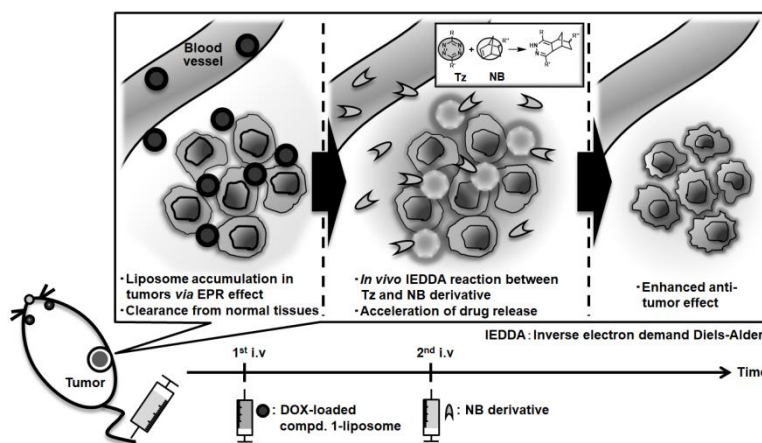


Fig. 6 A strategy for tumor chemotherapy using liposomal formulation which could accelerate drug release *via* IEDDA reactions.

トロールとして、化合物 **1** を導入していないリポソーム (HSPC-liposome) を作製した。作製したリポソームの粒子径は約 85 nm、ゼータ電位は約 -3 mV であった。HSTz-liposome はマウス血漿中においても高い薬物保持率を示したことから、静脈内投与された後も血液中を循環している間に内封薬物を漏出することなく、がん組織に送達されることが予想された。また、DOX を内封した HSTz-liposome に NBCOOH を添加した場合の薬物保持率は、PBS を添加した場合や HSPC-liposome に NBCOOH を添加した場合と比較して、有意に低い値を示した (Fig. 7)。したがって、HSTz-liposome においても POTz-liposome と同様に、化合物 **1** と NBCOOH との化学反応を介した薬物放出促進が可能であることが示された。

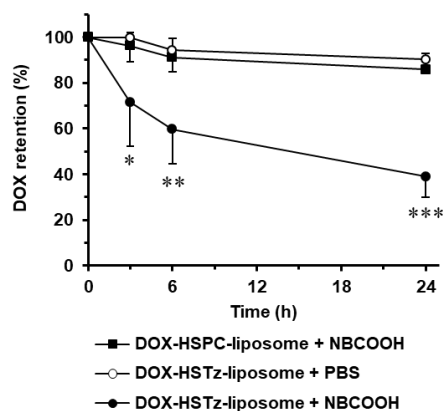


Fig. 7 Retention rate of DOX (%) in HSTz-liposome and HSPC-liposome via reactions with NBCOOH. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. HSPC-liposome + NBCOOH and HSTz-liposome + PBS.

HSTz-liposome と NB 誘導体を組み合わせたがん治療においては、リポソームを投与した後に NB 誘導体を投与するタイミングが重要である。そこで、担がんモデルマウスを用いて、リポソームの体内動態評価を行い、投与するタイミングを決定した。¹¹¹In-DTPA を内封した HSTz-liposome をマウスに静脈内投与し、体内放射能分布を評価した。その結果、HSTz-liposome は細網内皮系である脾臓と肝臓に高く集積した。また、リポソームを投与した 6~48 時間後に、がんへの比較的高い集積が観察された一方で、48 時間後には血液からほぼ消失した。これらの結果から、血液中での HSTz-liposome と NB 誘導体との化学反応を避けるために、NB 誘導体の投与はリポソームの投与 48 時間後とした。

続いて、本法が *in vivo* において機能するかどうかを検証した。生体直交型反応による薬物放出促進効果について評価するために、DOX 由来の蛍光とリポソーム膜を標識した蛍光脂質由来の蛍光が、がん組織内においてどのように分布するかを蛍光顕微鏡により観察した。その結果、HSTz-liposome と vehicle を組み合わせた群では、DOX と蛍光脂質の共局在が観察された。対照的に、NBCOOH と組み合わせた群では、DOX が蛍光脂質の周辺に広く分布している様子が観察された。したがって、がん組織において、化合物 **1** と NBCOOH との生体直交型反応により、HSTz-liposome からの DOX の放出が促進されることが示唆された。

本薬物放出促進法ががん治療に有効であるかどうかを検証するために、治療実験を実施した (Fig. 8)。DOX を内封した HSTz-liposome と NBCOOH を組み合わせた治療群では、がんの成長が有意に抑制された。一方、HSTz-liposome 投与後に、vehicle や Tz と反応しない norbornane-2,3-dicarboxylic acid (NBancOOH) を投与した場合、顕著な抗がん効果は認められなかった。本結果から、生体直交型反応を介した HSTz-liposome からの DOX の放出促進が治療効果の発現に重要な因子であることが示唆された。さらに、内封する DOX を半量に減量した HSTz-liposome と NBCOOH を組み合わせて治療を行った場合でも、HSPC-liposome と比較して、がんの成長が有意に抑制され

た。したがって、本治療戦略により、副作用の低減が実現できる可能性が示唆された。なお、いずれの治療群においても顕著な体重減少は見られなかった。以上の知見から、HSTz-liposome と NBCOOH による生体直交型反応を利用した薬物放出制御法が、がん治療戦略に対して、きわめて

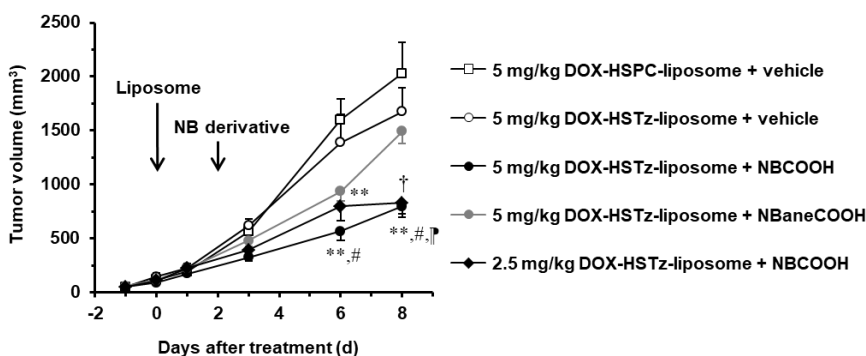


Fig. 8 Tumor growth suppression by a combination therapy of DOX-encapsulating HSTz-liposome and NBCOOH. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8 mice in each group). ** p < 0.01, † p < 0.05 vs. 5 mg/kg DOX-HSPC-liposome + vehicle, # p < 0.05 vs. 5 mg/kg DOX-HSTz-liposome + vehicle, ‡ p < 0.01 vs. 5 mg/kg DOX-HSPC-liposome + NBaneCOOH.

有用であることが明らかとなった。本手法は、これまでに報告されている熱応答性リポソームや光応答性リポソームと同等のがん治療効果を示すと考えられる[8,9]。今後、様々ながん種に対する検討や治療スケジュールの最適化を行うことで、より効果的ながん治療戦略となる可能性が考えられる。

結論

本研究では、両親媒性 Tz 誘導体 **1** を新規に合成し、本化合物を組み込んだリポソームの作製に成功した。作製したリポソームは、NB 誘導体との化学反応により、内封薬物の放出促進が可能であった。また、リポソーム膜の特性が化学反応前後で変化することを明らかとし、この膜特性の変化が薬物放出促進の要因となることを示した。さらに、本薬物放出制御法が *in vivo* においても機能し、HSTz-liposome と NBCOOH を組み合わせた薬物治療により、がんの成長が有意に抑制されたことから、有効ながん治療戦略であることが示された。本研究で得られた知見は、高い治療効果と安全性の両立を目指したがんの化学療法の実用化や新たな医薬品開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

参考文献

- [1] H. Maeda, *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 71–79 (2013).
- [2] K.M. Laginha, *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6944–6949 (2005).
- [3] G.J.R. Charrois, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1663**, 167–177 (2004).
- [4] B.S. Pattni, *et al.*, *Chem. Rev.*, **115**, 10938–10966 (2015).
- [5] B.L. Oliveira, *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4895–4950 (2017).
- [6] R. Rossin, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 3375–3378 (2010).
- [7] B. Moghaddam, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **417**, 235–244 (2011).
- [8] K. Kono, *et al.*, *Biomaterials.*, **31**, 7096–7105 (2010).
- [9] P.C. Peng, *et al.*, *Lasers Surg. Med.*, **47**, 77–87 (2015).

論文審査の結果の要旨

リポソーム製剤を用いて効果的で安全な薬物治療を行うには、非標的部位での薬物の安定保持と標的部位での速やかな薬物放出という相反する機能が求められる。本学位論文では、テトラジン (Tz) とノルボルネン (NB) の生体直交型反応を利用したリポソーム製剤からの薬物放出制御法の開発を目指した。

まず、新規に合成した両親媒性 Tz 誘導体を導入したリポソームを作製し、種々の NB 誘導体と化学反応させた結果、内封薬物の放出が顕著に促進された。そこで、Langmuir 単分子膜を用いた物理化学的評価を実施したところ、化学反応に基づくリポソーム膜の流動性や分子間相互作用の変化が薬物放出促進の要因となる可能性が明らかとなった。さらに、本薬物放出制御法をがん治療へ応用するために、リポソームの脂質組成を最適化し、生理的条件下において高い安定性を示す Tz 誘導体導入リポソームを作製した。作製したリポソームは、生体内で NB 誘導体との化学反応を介して、内封薬物 (ドキシソルビシン) の放出を促進し、顕著な副作用を示すことなく、がんの成長を有意に抑制することを明らかにした。

以上、本研究は、リポソーム膜での生体直交型反応を利用する新たな薬物放出制御を構築し、抗がん剤内封リポソームによるがんの治療効果を顕著に増大できる可能性を示した。これらの知見は、高い治療効果と安全性の両立を目指したがんの化学療法の実用化や新たなリポソーム製剤の開発に有益な情報を提供するものと評価される。

本論文は博士 (薬学) 論文として、適当と判定する。