

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：がん集積物質葉酸クラスター型キャリアによるがん治療戦略の構築

Design and Evaluation of Folate-clustered Anticancer Drug Carrier

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：本山 敬一

Keiichi Motoyama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授

Kumamoto University, Department of Physical Pharmaceutics, Graduate School of
Pharmaceutical Sciences, Associate Professor

II 研究開発の概要

(1) 研究の目的

わが国におけるがん患者数は毎年 100 万人であり、うち 30 万人が死亡している。死因の第一位であり、高齢者のみならず 40 歳代の働き盛りの患者も増加している。がんの効果的な治療および診断の研究開発は国民的課題であるのみならず、世界的にも毎年 700 万人の死亡に関して、人類の最大の課題である。外科的治療法ができない患者には放射線療法が行われ、さらには重篤な患者に限って副作用の大きい化学治療法が施されているが、われわれは、副作用の少ない、患者に優しい治療法、早期発見、早期治療につながる画像診断法の開発を目指している。我が国でもがん対策基本法を基盤として、オールジャパンでの抗がん剤開発の重要性は増している。これまで我々は、がん細胞に特異的に集積する物質（葉酸クラスター型シクロデキストリン、FA7- β -CyD、図 1）を見出し、特許を取得している。抗原抗体反応レベルの強いがん細胞認識能を有しており、このがん細胞への特異的な集積能を、がん治療およびがん診断に使えるものとの考えに立ち、その応用の展開を行っている。本研究では、抗がん剤ドキソルビシン、タキソール、シスプラチン、ダハプラチンなどを FA7- β -CyD と組み合わせて、大

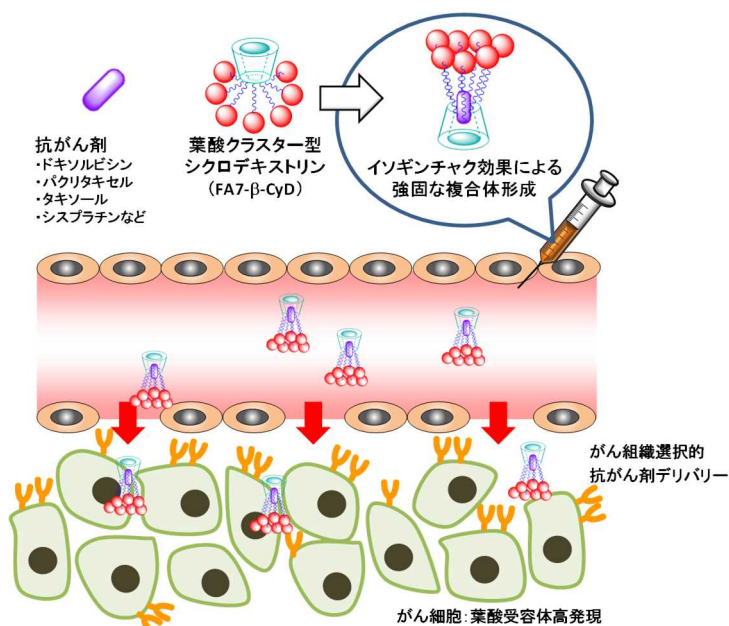


図1: 葉酸クラスター型シクロデキストリン (FA7- β -CyD)によるがん細胞選択的抗がん剤デリバリー

腸がんおよび脳腫瘍選択的に薬物をデリバリーすることにより、抗がん剤を単独で使用する場合に比して、生存日数の増加および腫瘍体積の縮小効果が明確な治療法を開発することを目的とする。

(2) 研究開発の成果

1) 化合物調製と物理化学的性質の解析

FA7- β -CyD の調製は、 β -CyD の水酸基をトシル化し、続いてアミノ化した後、縮合剤を用いて末端に葉酸を結合させた。FA7- β -CyD の確認および葉酸置換度の算出は、MALDI-TOF-Mass および $^1\text{H-NMR}$ を用いて行った。その結果、葉酸置換度が 5 付近の FA7- β -CyD の調整が確認された。抗がん剤と FA7- β -CyD の相互作用は、各種スペクトル法 (NMR、円二色性スペクトル、蛍光スペクトルなど) を用いて検討し、抗がん剤とキャリアの安定度定数を算出した。その結果、FA7- β -CyD とドキソルビシン (DOX)、イリノテカン (IRT)、パクリタキセル (PTX) の会合乗数は、10 の 5 乗オーダーの極めて強い相互作用を示した。さらに、FA7- β -CyD の構造最適化して、より溶解性に優れる化合物の探索を目指して、FA7- β -CyD にメチル基を導入した新規化合物の合成に着手している。

2) 細胞表面への会合および細胞内取込み

FA7- β -CyD の細胞表面への会合は、葉酸受容体 (FR) 高発現細胞および FR 低発現細胞を FA7- β -CyD 含有 PBS を 4°C で 1 時間処理後、フローサイトメトリーにより解析した結果、FR 高発現細胞への有意な取り込みが確認された。また、抗がん剤 (DOX、IRT) の細胞内移行性を蛍光顕微鏡で調べたところ、細胞内取り込みの増加が確認された。

3) *In vivo* における安全性および体内動態

抗がん剤 DOX と FA7- β -CyD との複合体を調製し、その *In vivo* における複合体の繰り返し投与系での安全性を確認するため、健常 BALB/c マウスの皮下および静脈内に複合体を投与後、血液生化学的検査値の測定を行ったところ、検査値に大きな変化はなく安全性上の懸念は現時点では確認されなかった。また、DOX/FA7- β -CyD 複合体を投与後、腫瘍中の濃度を調べたところ、DOX 単独と比して、有意な集積が認められた。また、昨年度解析が遅れていた DOX 血中薬物濃度および臓器内薬物濃度を測定し、DOX 単独と比較して、優れた血中滞留性の向上および DOX の心臓移行性を抑制することに成功した。これにより、DOX が惹起する重篤な心臓毒性を本複合体は抑制できる可能性が強く示唆された。担がんマウスの作成に時間を要したために、他の抗がん剤 (IRT もしくはビンブラスチン) について安全性および体内動態が進捗より遅れているが、年度内に完了すべく検討中である。一方で、中性子補足療法への FA7- β -CyD の応用を検討した。中性子補足療法を達成するには、ホウ素化合物を効率よく腫瘍部位へ送達する必要がある。そこで、ホウ素化合物である Sodium Borocaptate (BSH) と FA7- β -CyD との複合体を担がんマウスに投与し、腫瘍組織への送達を検討した。その結果、BSH/FA7- β -CyD 複合体は BSH 単独投与群に比較して、優位に腫瘍集積性を示すことが明らかとなった。これらの結果より、FA7- β -CyD は抗がん剤キャリア以外にも、中性子補足療法への応用が期待される。

4) 担がんマウスにおける抗腫瘍効果の検討

大腸がん細胞である Colon-26 細胞および HCT116 細胞をマウスに移植した担癌モデルに対して、それぞれ DOX/FA7- β -CyD 複合体および IRT/FA7- β -CyD 複合体を尾静脈より投与したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、卵巣がん腹膜播種モデルマウスに対して、パクリタキセル/FA7- β -CyD 複合体を尾静脈より投与し、体重、生存率、腹膜転移抑制効果を検討したところ、優れた延命効果、転移抑制効果を示す傾向が観察された。

5) 研究開発推進および技術導出

BioJapan などを通じて、アカデミアや国内製薬企業と面談を行い、本技術情報の提供および本申請課題に対するニーズを調査することができた。複数の製薬企業から興味関心を頂いたので、コンタクトを取っている段階である。その内、製薬企業 2 社については、実際に FA7- β -CyD を提供し、自社の開発化合物にて検討している。本研究の目標の一つである、企業への FA7- β -CyD の導出は達成されていると考える。

(3) まとめ

本研究の結果より、FA7- β -CyD は抗がん剤キャリア以外にも、中性子補足療法への応用が期待される。本技術は、がんの化学治療が見直され、外科治療、放射線治療との集学的癌治療戦略の一助になるものである。また、本技術は様々な抗がん剤を腫瘍特異的に送達することが期待されるため、抗腫瘍効果の増強および副作用の軽減に大きく貢献し、製薬メーカーが有する医薬品シーズの開発成功率が上昇するものと考えられる。実際、製薬企業への FA7- β -CyD の導出が 2 件で進んでいることから、継続して状況把握に努め、医薬品開発を支援していく。また、他の製薬企業への導出も継続して進める予定である。一方、どのがん種に対して本キャリアが有効であるかについて、検証を続けていくことも重要と考える。昨今の非臨床試験が PDX でも展開されていることを考慮して、将来的には国立がん研究センターと連携して、PDX での評価を行い、本技術の精度についても検証を続けていきたい。

Chemotherapy is often used to treat cancer, and it is expected to destroy the tumor cells for maximum treatment efficacy, while minimizing side effects in other organs. To achieve optimum cancer treatment, drug delivery system (DDS), especially targeting techniques, is often utilized. Targeting techniques are classified into passive targeting and active targeting, and the former is based on the enhanced permeability and retention (EPR) effect. On the other hand, active targeting is based on the use of targeting ligands. FA has been widely utilized as a promising targeting ligand, because folate receptor (FR) is overexpressed in many human tumor cells, including malignancies of the ovary, brain, kidney, breast, myeloid cells and lung, and has little expression in normal tissues.

Cyclodextrins (CyDs) have been widely applied to DDS because of their good bioadaptability. CyDs can form inclusion complexes with various drugs. Recently, a number of FA-modified CyDs have been designed as tumor-targeting drug carriers. However, there are few reports in which targeting of antitumor drug *in vivo* were achieved using FA-conjugated CyDs. More recently, we prepared FA-clustered β -CyD, possessing caproic acid between FA and β -CyD molecules as a spacer (FA7- β -CyD), and demonstrated that this conjugate was useful as a tumor selective antitumor drug carrier *in vitro* and *in vivo*. In this project, to expand the application of FA7- β -CyD as an anticancer drug carrier for various anticancer drugs such as doxorubicin (DOX), paclitaxel (PTX), irinotecan (IRT), etc, we evaluated the pharmacokinetics of these anticancer drugs after intravenous administration in tumor bearing mice.

The intravenous administration of the complex of doxorubicin (DOX)/FA7- β -CyD to tumor-bearing BALB/c mice showed potent antitumor effect without any significant change in blood chemistry values. In addition, we determined the blood concentration and organ levels of DOX. As the result, FA7- β -CyD improved the blood retention of DOX and suppressed the migration of DOX to the heart, compared with DOX alone. These results strongly suggested that the complex could suppress the severe cardiotoxicity caused by DOX. Similar results were observed in IRT/FA7- β -CyD complex and PTX/FA7- β -CyD complex system in cancer models. In addition, FA7- β -CyD is expected to be applied to neutron capture therapy as well as anti-cancer drug carrier. The present technology will help chemotherapy for cancer and contribute to multidisciplinary cancer treatment strategies including surgery and radiation treatment. In addition, since this technology is expected to deliver various anti-cancer drugs to tumor tissues, it greatly contributes to the enhancement of anti-tumor effect and the reduction of side effects, and the development success rate of the drug seeds discovered by the pharmaceutical companies is improved. In fact, since FA7- β -CyD has been licensed to two pharmaceutical companies in two cases, we will continue to work to understand the situation and support drug development. It also plans to continue licensing out to other pharmaceutical companies. On the other hand, it is important to continue to verify for which cancer type this carrier is effective.

Collectively, this technique should be a promising approach to treat cancer by controlling pharmacokinetics of anticancer drugs.