

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) 癌細胞超選択的光線力学診断法・治療法の開発

(英語) Development of cancer super-selective photodynamic diagnosis and photodynamic therapy

研究開発実施期間：2018年9月11日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 片岡洋望

(英語) Hiromi KATAOKA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 名古屋市立大学
消化器・代謝内科学
教授

(英語) Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
Department of Gastroenterology and Metabolism
Professor

II 研究開発の概要

(1) SC-N003HP による PDT の詳細な薬効薬理試験

1) SC-N003HP の食道癌細胞株・胃癌細胞株・大腸癌細胞株における IC₅₀ の検討

食道癌細胞株 OE21、胃癌細胞株 MKN45、大腸癌細胞株 HCT116 に SC-N003HP をそれぞれ投与し、660nm の LED を 16 J/cm² 照射し、WST-8 細胞増殖アッセイにて殺細胞効果を検討した。SC-N003HP は 0.83~1.73 nM と非常に低い濃度の IC₅₀ を認めた。癌種により濃度に差はなかった。

2) SC-N003HP の食道癌細胞株・胃癌細胞株・大腸癌細胞株におけるアポトーシス誘導能の検討

食道癌細胞株 OE21、胃癌細胞株 MKN45、大腸癌細胞株 HCT116 に SC-N003HP をそれぞれ投与し、660nm の LED を 16 J/cm² 照射し、FACS/active caspase 3 にてアポトーシス誘導能を検討した。SC-N003HP による PDT にて時間経過とともに active caspase 3 の上昇を認めアポトーシスが関与していることを確認した。

3) SC-N003HP の食道癌細胞株・胃癌細胞株・大腸癌細胞株における細胞内局在の検討

食道癌細胞株 OE21、胃癌細胞株 MKN45、大腸癌細胞株 HCT116 に SC-N003HP (1 μM) をそれぞれ投与し、細胞内器官マーカーを用いて SC-N003HP の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。mito tracker と NBD tracker において SC-N003HP との一致を認めた。以上より SC-N003HP がミトコンドリア、ゴルジ体に局在することを確認した。

4) GLUT1、GLUT3、SGLT2 の SC-N003HP の取り込み関与の検討

siRNA による GLUT1、GLUT3、SGLT2 のノックダウンを行い SC-N003HP を投与し、細胞内への取り込みを flow cytometry を用いて評価した。GLUT1、GLUT3、SGLT2 のノックダウン細胞において SC-N003HP の取り込み抑制を確認した。SGLT2 が特に SC-N003HP の取り込みに関与していることが示唆された。

5) エンドサイトーシス拮抗薬投与による SC-N003HP 取り込み抑制の検討

NaN3、cytocharasinB 等のエンドサイトーシスの拮抗薬投与下で SC-N003HP の細胞内への取り込みを flow cytometry を用いて評価した。7 種類のエンドサイトーシスの拮抗薬のうち SC-N003HP の取り込み抑制したのは NaN3、cytocharasinB であった。これより、ATP-dependent endocytosis と macropinocytosis が SC-N003HP の取り込みに関与していることを確認した。

(2) イヌ自然発症腫瘍症例における SC-N003HP を用いた PDD、PDT 試験の実施

1) イヌを用いた簡易毒性試験、体内動態試験を施行した。イヌでの至適投与量の決定、薬剤の簡易体内動態の把握を行った。溶媒に溶解した各濃度の SC-N003HP を健常ビーグル犬に静脈内投与し、経時的に採血した。血中の SC-N003HP の蛍光強度を元に、SC-N003HP の体内薬物動態を評価した。健常ビーグル犬 6 匹に対して、SC-N003HP を 2、5 および 20 mg/kg 投与した。最大血液中濃度到達時間 (T_{max}) は投与直後であり、投与濃度に依存して高値を示した。すべての投与量において、排泄相での半減期 (T_{1/2}) は約 3 時間であった。SC-N003HP の薬物動態解析の結果において、投与数時間後で血中濃度が大幅に低下した。

2) イヌ自然発症腫瘍症例における PDD 試験を施行した。(マウス移植モデルとの相違など)。溶媒に溶解した至適投与量の SC-N003HP を各種イヌ自然発症腫瘍症例に静脈内投与し、一定時間後に腫瘍の蛍光画像を記録した。SC-N003HP 投与 4 時間後の腫瘍組織内に SC-N003HP の蓄積が認められた。

2) イヌ自然発症腫瘍症例における PDT 試験を施行した。溶媒に溶解した至適投与量の SC-N003HP を、各種イヌ自然発症腫瘍症例に静脈内投与し、腫瘍組織にレーザー光を照射し、抗腫瘍

効果を評価した。SC-N003HP 投与 0~60 分後に、腫瘍組織にレーザー光を照射する治療を繰り返すことにより、腫瘍が縮小した。

(3) SC-N003HP による PDD の *in vivo* での薬効薬理試験

1) 胃癌細胞株、大腸癌細胞株を用いてマウス腹膜播種モデルを作成し、各種薬剤を投与し、各種照射波長により腹膜播種病巣の蛍光を確認した。SC-N003HP は 5-Aminole Levulinic Acid とほぼ同等で Taraporfin sodium よりも高い蛍光性を認めた。

2) 胃癌細胞株、大腸癌細胞株を用いてマウス腹膜播種モデルを作成し、SC-N003HP を投与し、腹膜播種病巣に集積した薬剤をレーザー内視鏡を用いて検討した。レーザー内視鏡の光量、感度等、至適励起波長、カットフィルター等の調節は富士フイルム株式会社の技術者にて施行した。レーザー内視鏡にて病巣に集積した薬剤の確認は可能であったが、感度、カットフィルターを調節しても色差の強調はされなかった。

(4) SC-N003HP の安全性試験

1) ラット致死量の把握のため、ラット単回毒性試験を実施した (外注)。

第 2 世代の PDT 保険承認薬 Talaporfin の致死量ラット 120mg/kg と同等かこれ以上の薬剤量を、致死量を目安とした。SC-N003HP の単回静脈内投与における最小致死量は、雄では 300 mg/kg を上回り、雌では 300 mg/kg であると考えられた。

2) 実験犬に SC-N003HP を単回静脈内投与した際の副作用を、血液データ等を用いて検討した。溶媒に溶解した各濃度の SC-N003HP を実験犬に静脈内投与し、SC-N003HP 投与前後の血液検査および一般状態の評価を行った。血液生化学検査では、2 および 5 mg/kg 投与した際、投与後に血液検査上で異常値を呈した個体は認められなかった。一方、20 mg/kg 投与後では、ALT と AST が上昇し異常値を示した。

(5) SC-N003HP の合成

1) 中間体の反応と薬剤ミセル化の検討を行った。中間体反応の完了を目指した。本反応は市販クロリン e6 を、5 段階の反応を経て変換している。このうちアルキルスペーサーの導入部分が溶媒酢酸の留去を伴う過程であり、大スケールになると非常に困難な作業となる。そこで、現在 1~5 g 程度で行っている中間体製造を 10~20 g に引き上げるために必要な実験装置の確立と、大スケール化にともなう酢酸留去における問題点を抽出し、最適な反応系をセットアップした。

これに並行して、薬剤のミセル化を試みた。ミセル化剤としては生体に無害なアルキルカルボン酸、PEG 誘導体を 10 種程度試み、粒子径測定を行った。中間体合成において、10 g スケール 50% の収率を達成し、68% であった。酢酸の留去は小容器に分けて行う方が効果的であった。また HPLC 純度測定でも 90% 以上の純度であった。

2) 20g での合成系の開発を完了した。前年度の大スケール合成によって製造された中間体に対し、アセチル糖の導入反応、および脱保護による糖鎖の再生と高純度化を行った。最も問題となるのは、脱保護後における余剰アセチル糖との分離であり、カラムクロマトグラフィーによって、大スケール化にともない、HPLC 純度で 99% 以上の高純度を担保する製造方法を確立した。90% 以上の純度が確保され、中間体収率も向上し、20g スケールでの反応に成功した。

(6) クロリン e6 エステル体の高純度大量合成法の確立

出発原料のトリメチルエステル体は昨年度まで、奈良女子大矢野グループによって合成されていた

が、収率 70~80%で研究を進めていた。20g での合成系の開発のためには、高収率で反応を行うことで研究効率を大幅に上げた。大阪府立大学ではヨウ化メチルを用いて、定量的に出発物質を得ることに成功していることから、20g の原料取得を効率的に行うとともに、本薬剤 SC-N003HP の機能性、優位性を十分に確認可能な誘導体の合成を行った。反応時間 2 時間で原料 20.4 g から目的のトリメチルエステル体を 21.0 g 得た。また、メタノール中 10%硫酸触媒下、24 時間反応で目的のジメチルエステル体 5.5g を得た。

(1) Pharmacological study of PDT with SC-N003HP

SC-N003HP was administered to esophageal cancer cell line OE21, gastric cancer cell line MKN45, and colorectal cancer cell line HCT116, and irradiated with 660 nm LED at 16 J/cm². The effect was examined by WST-8 cell proliferation assay. IC₅₀ of PDT with SC-N003HP were 0.83 to 1.73 nM. There was no difference among the types of carcinoma. The ability to induce apoptosis was examined with FACS/active caspase 3. It was confirmed that apoptosis was involved in the efficacy of PDT with SC-N003HP. Subcellular localization of SC-N003HP was examined by confocal laser scanning microscopy and intracellular organ markers. It was confirmed that SC-N003HP was localized in mitochondria and Golgi body.

(2) The efficacy of SC-N003HP PDD or PDT in spontaneous neoplasm of dog

The dogs with spontaneous neoplasm are given intravenous injection of SC-N003HP. The emission of red fluorescence from neoplasm under blue light will be detected. SC-N003HP accumulation was observed in the tumor 4 hours after the administration in PDD. The neoplasm will be irradiated with the Laser system. PDT with SC-N003HP showed a significant decrease in the tumor volumes.

(3) In vivo pharmacological study of PDD with SC-N003HP

The mice with xenograft tumor are given intravenous injection of PS, the emission of red fluorescence from tumor will be detected by a endoscope. The data of SC-N003HP will be compared to that of first or second-generation photosensitizer. SC N003HP showed almost the same fluorescence as 5-ALA and higher fluorescence than TS. Next, the drug accumulated in the peritoneal dissemination lesion was examined using a laser endoscope. Fujifilm technicians performed adjustments the light and sensitivity of the laser endoscope, optimal excitation wavelength and cut filter. The color difference was not emphasized even if the sensitivity and the cut filter were adjusted.

(4) Safety test of SC-N003HP

A toxicity test was conducted in rats (the lethal dose of rats). The minimum lethal dose of SC N003HP after single intravenous administration was considered to be above 300 mg/kg in males and 300 mg/kg in females. (The minimum lethal dose of TS is 120 mg/kg.) The side effects of a single intravenous administration of SC-N003HP were examined using blood data in dogs. In the blood data, no individual showed an abnormal data after administration of 2 and 5 mg/kg. On the other hand, after administration of 20 mg/kg, some had increased ALT and AST.

(5) Synthesis of SC-N003HP

The reaction of intermediates and drug micelle formation were investigated. The experimental apparatus for the production of intermediates to 10 to 20 g was established. As the micellizing agent, about 10 kinds of alkylcarboxylic acid and PEG derivative, which are harmless to the living body, were tried and the particle size was measured. The development of the synthetic system with 20 g was completed. A purity of 90 % or more was secured, the intermediate yield was also improved, and the reaction on the 20 g scale was successful.

(6) Establishment of high-purity large-scale synthetic method for chlorin e6 ester

A fully identifiable derivative was synthesized. For the development of the synthetic system with 20 g, the research

efficiency was greatly improved by carrying out the reaction at a high yield. In addition, the reaction was carried out for 24 hours under a 10 % sulfuric acid catalyst in methanol to obtain 5.5 g of the target dimethyl ester compound.

III 事後評価総合所見

候補薬剤 SC-N003HP の光線力学療法 (PDT) 開発のための薬理的試験を行い、アポトーシスの観察等の評価からその殺細胞機序を明らかにしました。また、毒性評価のためラットにおける致死量とイヌでの薬物動態を解析し、イヌ自然発症腫瘍における腫瘍部位への集積を認めています。また、当該薬剤の高純度大量合成法も確立されており、一部に達成度が低い項目があるものの全体としてはほぼ予定通りに研究開発が進んでいると評価されました。

一方、既存薬剤の Talaporfin sodium 等と比較して、*in vitro* や *in vivo* 試験において、安全かつ強い抗腫瘍効果を示すデータも得られてはいますが、実用化に向け腫瘍選択性などに関し、競合技術に対する優位性を更に明確にする必要があります。

今後はターゲットを PDT から PDD に変更することですが、既存薬剤 5-ALA に対する明確な優位性が示されていないため、今後は優位性の確立と、臨床使用での位置づけの確立を目指して客観的な評価のもとに示し、事業化にむけた研究開発を進めて行くことを期待します。