

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬 学)	氏名	塩 瀬 能 伸
論文題目	カテプシン感受性ペプチドスペーサーを有する抗癌剤- カルボキシメチルデキストランポリアルコール結合体の薬物遊離特性と抗腫瘍効果の関連に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>抗癌剤の高分子化プロドラッグ修飾は注目を集めているが、高い治療効果を得るためには体内分布制御のみならず抗癌剤の作用特性に合わせた遊離速度の制御が不可欠である。本研究では、carboxymethyl dextran polyalcohol (CM-Dex-PA) と抗癌剤との間にカテプシンに感受性を示すペプチドスペーサーを挿入した高分子化プロドラッグを合成し、体内および細胞内動態を評価するとともに、ペプチドスペーサーの網羅的解析を行い、抗癌剤の遊離特性と抗腫瘍効果の関係を詳細に解析した。</p> <p>I. 高分子化抗癌剤プロドラッグ DE-310 の体内・細胞内動態の解析</p> <p>DE-310は、CM-Dex-PAにペプチドスペーサー (Gly-Gly-Phe-Gly) を介して抗癌活性をもつカンプトテシン誘導体DX-8951を結合した化合物である。このスペーサーはバックボーンとなるCM-Dex-PAの2位あるいは4位のカルボキシメチル基に結合しており、両者の間で分解速度が異なる可能性があることから、基礎実験や臨床応用に際しては一定規格の化合物を使用することが必要である。そこで、本研究の遂行にあたり、まず、Smith分解に基づいた分離分析、およびデコンボリューション法による数値解析を組み合わせて、スペーサーの結合位置を定量的に評価できる分析方法を確立した。次に、マウス線維肉腫Meth Aの腹水腫瘍モデルを用いて、DE-310の抗腫瘍効果に深く関わる体内動態、さらに細胞内動態を評価した。DE-310は単回静脈内投与で用量依存的に延命効果を示した。DE-310投与後、腹水中への高分子結合型DX-8951の移行性、および腹水中でDX-8951とGly-DX-8951 (G-DX-8951) の遊離を確認し、その遊離には腹水中の腫瘍細胞とマクロファージが関与していることを明らかにした。さらに、DE-310の細胞内動態を共焦点蛍光顕微鏡により観察したところ、細胞内への移行が低温で抑制されるとともに、その細胞内での分布がライソゾームマーカの分布と一致することから、DE-310はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていると推察された。</p> <p>II. 腫瘍細胞モデルを用いたDE-310からの薬物遊離の評価および解析</p> <p>カテプシン類の発現は癌の発現や悪性化に伴い上昇することが知られており、腫瘍細胞におけるDE-310の薬物遊離に対するカテプシン類の寄与を明確にすることは重要な課題である。まずMeth A腫瘍ホモジネートを用いて検討したところ、非選択的なカテプシン阻害剤E-64により、DE-310からのDX-8951およびG-DX-8951の遊離が完全に抑制されることが示され、この薬物遊離には基本的にカテプシン類が関与していることが確認された。さらに、単離精製したカテプシン類による検討では、カテプシンBはDX-8951とG-DX-8951の両者を遊離させるのに対し、カテプシンLはDX-8951を選択的に遊離させることが示された。また、細胞系での各カテプシン分子種の寄与を分離評価するために、7種類の腫瘍細胞におけるDE-310からの薬物遊離速度およびカテプシン</p>			

発現量を測定した結果、腫瘍細胞における各カテプシンの活性は様々であったが、DE-310からのG-DX-8951の遊離量は腫瘍のカテプシンB活性と、DX-8951の遊離量はカテプシンB、L活性と高い相関性が示された。さらに、*in vivo*マウス固形腫瘍において薬物遊離を検討したところ、マウス組織球腫M5076の移植時のほうがMeth Aの場合に比べて腫瘍内での遊離薬物濃度が高く、*in vitro*の結果とよく対応した。

III. ペプチドスペーサーの探索的評価と高分子化プロドラッグの薬物遊離特性の最適化

以上のDE-310を対象とした研究から、高分子化プロドラッグによる治療効果発現において、腫瘍における薬物遊離が重要な因子の一つとなることが示された。したがって、望ましい薬物遊離性を示す高分子化プロドラッグを創製するためには、ペプチドスペーサーの酵素感受性に関する構造活性相関を体系的に理解することが必要と考えた。そこで、Dansyl誘導体 (DNS) をモデル薬物とし、225種のペプチドスペーサーの異なる高分子化プロドラッグ (CM-Dex-PA-Gly-Gly-P₂-P₁-DNS) を合成し、Meth Aホモジネートによる薬物遊離プロファイルを網羅的に解析した結果、P₂位が疎水性アミノ酸の場合に遊離速度が大きくなる傾向が認められた。この他、P₂あるいはP₁位がProの場合には遊離しにくく、Asnがある場合にはそのカルボキシル基側のペプチド結合が特異的に加水分解されることも明らかとなった。DNS複合体の結果に基づき、Meth Aホモジネート系で遊離速度の異なる3種のペプチドスペーサーを選抜し、ドキシソルビシン (DXR) を適用した高分子化プロドラッグを合成し、*in vitro*細胞系での薬物遊離および*in vivo*での薬物遊離と抗腫瘍効果の関係を精査した。Meth Aホモジネート系で遊離速度の最も小さかったCM-Dex-PA-Gly-Gly-Pro-Leu-DXRは、*in vitro*細胞系および*in vivo*腫瘍組織中でも遊離薬物量が少なく、抗腫瘍効果も弱かった。一方、CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXRは、Meth Aホモジネート系でCM-Dex-PA-Gly-Gly-Ile-Gly-DXRよりも有意に速い遊離速度を示したにもかかわらず、両者は同等に優れた抗腫瘍効果を示した。両者は*in vitro*細胞系や*in vivo*腫瘍組織中で同程度の遊離DXR量を示したことから、細胞内への取り込み過程が律速となっていることが示唆され、取り込みも含めたトータルプロセスとしての薬物遊離がDXRによる抗腫瘍効果の決定因子となることが示唆された。

以上、DE-310の腹水腫瘍モデルでの抗腫瘍効果発現機構について検討を行い、静脈内投与されたDE-310が腹水中に移行し、腫瘍細胞やマクロファージに高分子化プロドラッグの形でエンドサイトーシスにより取り込まれた後、ライソゾーム内のカテプシン類とりわけカテプシンB、Lにより加水分解を受けてDX-8951を遊離し、抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに、高分子化プロドラッグのペプチドスペーサーによる薬物遊離特性の違いを体系的に整理し、DXR複合体の抗腫瘍効果と薬物遊離性との間の関連を見出した。

本研究成果は、ペプチドスペーサーを用いたCM-Dex-PAの高分子キャリアシステムを抗癌剤DDSに応用する上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

抗癌剤の高分子化プロドラッグの開発において、優れた治療効果を得るためには体内分布と遊離速度の制御が重要である。申請者は、carboxymethyl dextran polyalcohol (CM-Dex-PA) と抗癌剤との間にペプチドスペーサーを挿入した高分子化プロドラッグを合成し、体内および細胞内動態を評価するとともに、スペーサーの構造に関して網羅的解析を行い、遊離特性と抗腫瘍効果の関係を詳細に解析した。

最初に、CM-Dex-PAにペプチドスペーサー (Gly-Gly-Phe-Gly) を介してカンプトテシン誘導体DX-8951を結合させた高分子化抗癌剤プロドラッグDE-310を合成し、Smith分解に基づいた分離分析およびデコンボリューション法による数値解析を組み合わせ、スペーサーの結合位置を定量的に評価した。次に、マウス線維肉腫Meth Aの腹水腫瘍モデルを用いて体内動態と細胞内動態を評価し、腹水中への高分子結合型DX-8951の移行と腹水中でのDX-8951とGly-DX-8951 (G-DX-8951) の遊離を確認した。また、遊離に腹水中の腫瘍細胞とマクロファージが関与していることを示し、DE-310の細胞内動態を共焦点蛍光顕微鏡により観察した結果、DE-310はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていると推察された。

次に、癌の発現や悪性化に伴い発現が上昇するカテプシン類について、腫瘍細胞における薬物遊離への寄与を検討し、Meth A腫瘍ホモジネートにおいて非選択的なカテプシン阻害剤E-64により遊離が完全に抑制されたことから、カテプシン類の関与を確認した。また、単離精製したカテプシンBはDX-8951とG-DX-8951の両者を遊離させ、カテプシンLはDX-8951を選択的に遊離させることを確認し、さらに、7種類の腫瘍細胞における薬物遊離速度とカテプシン発現量の関係を検討して、腫瘍の各カテプシン活性と遊離パターンとの間に同様の関係を見出した。in vivoマウス固形腫瘍においても、in vitroの結果とよく一致する結果が得られた。

以上より、望ましい薬物遊離特性を示す高分子化プロドラッグを創製するためには、ペプチドスペーサーの酵素感受性に関する構造活性相関を体系的に理解することが必要と考えられたことから、Dansyl誘導体 (DNS) をモデル薬物とし、225種のペプチドスペーサーの異なる高分子プロドラッグ (CM-Dex-PA-Gly-Gly-P₂-P₁-DNS) を合成し、Meth Aホモジネートによる薬物遊離プロファイルを網羅的に解析した結果、P₂位が疎水性アミノ酸の場合に遊離速度が大きくなり、P₂あるいはP₁位がProの場合には遊離しにくく、Asnがある場合にはそのカルボキシル基側のペプチド結合が特異的に加水分解されることを明らかにした。以上の結果に基づき、Meth Aホモジネート系で遊離速度の異なる3種のペプチドスペーサーを選択し、ドキシソルビシン (DXR) を適用した高分子化プロドラッグを合成してin vitro細胞系での薬物遊離およびin vivoでの薬物遊離と抗腫瘍効果の関係を精査した結果、細胞取り込みも含めた全過程における薬物遊離が、DXRの抗腫瘍効果の決定因子となることを確認した。

以上、本研究成果は、ペプチドスペーサーを用いたCM-Dex-PAの高分子キャリアシステムを抗癌剤DDSに応用する上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。
さらに、平成22年2月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降