

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | ナリン チャンスリ<br>Narin Chansri   |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学)   |
| 学位記番号    | 薬博第601号  |
| 学位授与の日付  | 平成18年9月25日   |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当   |
| 研究科・専攻   | 薬学研究科医療薬科学専攻   |
| 学位論文題目   | Development of Targeting Formulations of All- <i>trans</i> Retinoic Acid for Cancer Therapy<br>(癌治療を目的とした全トランスレチノイン酸のターゲティング製剤の開発) |
| 論文調査委員   | (主査)<br>教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 半田 哲郎  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞分化・アポトーシス誘導作用を有する分化誘導剤、全トランスレチノイン酸(ATRA)は、臨床で経口製剤として急性前骨髄球性白血病治療に使用されている。近年、分化誘導剤は神経芽種、子宮頸癌、頭頸部癌などの固形癌などにも臨床応用が試みられており、治療効果が認められている。このように分化誘導剤は、臨床面においても治療効果が確認されるに至ったが、現在、有効な癌の種類はまだ一部であり、その治療効果にも改善の余地がある。したがって、ATRAを広範囲の癌に適用し、臨床における新しい治療法として確立していくためには、ドラッグデリバリーシステムの概念に基づいた製剤設計が必要であると考えられる。ATRAは、難水溶性薬物であるため、効果的な癌治療をおこなうためには、可溶化と標的指向性を付与し得る製剤設計が必要である。そこで本研究では、高分子ミセル、カチオン性リポソーム、O/WエマルジョンをATRAのプロトタイプ製剤として選択し、処方計画を通じて固形癌、肺、肝臓に対するATRAの部位選択的ターゲティングを試みた。また、ATRAの部位選択的ターゲティングに基づく転移癌抑制効果についても評価した。

#### I. 高分子ミセルおよびカチオン性リポソームを用いたATRAの固形癌および肺選択的ターゲティング法の開発

高分子ミセルは、合成高分子が数百分子会合し直径10-100 nmのナノサイズの粒子で、その内核に疎水性薬物を保持することができる。疎水性薬物の安定封入には、内核の環境が非常に重要であると考えられることから、高分子ミセルへのATRAの安定封入を目指して、ブロック共重合体の疎水性ポリマーに対してベンジル基を75%導入したpoly(ethylene glycol)-*b*-poly-(aspartic acid) derivativeを合成した。本ブロック共重合体を用いて調製したATRA封入高分子ミセルの平均粒子径は約20 nmで、固形癌移植マウスへ静脈内投与後、ATRA単独投与群と比較して高い血中濃度ならびに固形癌中濃度を示し、enhanced permeability and retention (EPR)効果に基づく固形癌選択的ターゲティングの可能性が示された。

カチオン性リポソームは、遺伝子導入における非ウイルスキャリアとして注目され、静脈内投与後、肺へ選択的に集積することが知られている。ATRAは、難水溶性に加えカルボキシル基を有しているため、カチオン性リポソームに安定に封入できると考えられることから、カチオン性リポソーム製剤として*in vivo*遺伝子導入で汎用されている1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP)/cholesterolリポソームを選択し、ATRAの肺選択的ターゲティングの可能性を評価した。ATRA封入カチオン性リポソームの平均粒子径およびゼータ電位は、約125 nmおよび50 mVで、マウスへ静脈内投与後、ATRA封入カチオン性リポソームは、ATRAの肺選択的な集積を示すことが明らかとなった。そこで、大腸癌由来細胞株CT26を用いて肺癌転移モデルマウスを作成し、肺癌転移に対する抑制効果を評価した結果、ATRA封入カチオン性リポソームでは、ATRA単独、あるいはATRA封入リポソームと比較して、転移癌結節数の有意な減少が認められた。

#### II. O/Wエマルジョンを用いたATRAの肝臓選択的ターゲティング法の開発

これまでの検討により、高分子ミセルおよびカチオン性リポソームを用いたATRAの固形癌および肺選択的ターゲティ

ングの結果、*in vivo*において癌治療が可能になることが示された。しかしながら、臨床応用を目指す立場から、ATRA 封入量の改善ならびに製剤自身の安全性などの詳細な確認も必要である。微粒子製剤の中でも、O/W エマルションは、内相に大量の疎水性薬物を溶解することが可能であり、また、静脈内投与による臨床使用に関しても長年の実績を有している。そこで、ATRA の臨床応用に向け、O/W エマルション製剤を開発し評価をおこなった。卵黄ホスファチジルコリン：コレステロール：大豆油から構成される平均粒子径約 130 nm の ATRA 封入 O/W エマルションを調製し、マウスに静脈内投与した結果、ATRA 単独投与に比べ、肝臓選択的な ATRA の集積が確認された。また、この高い肝臓への集積は、O/W エマルション自身の体内動態とほぼ対応する結果であった。そこで、CT26 細胞を用いて肝癌転移モデルマウスを作成し、肝癌転移に対する抑制効果を評価したところ、ATRA 封入 O/W エマルションでは、ATRA 単独と比較して、転移癌結節数の有意な減少効果ならびに生存日数の延長が確認された。

以上、著者は ATRA の治療目的・効果の改善、拡大を目指して高分子ミセル、カチオン性リポソーム、および O/W エマルション製剤の最適化処方設計を行い、固形癌、肺、肝臓への選択的ターゲティング製剤の開発に成功した。また、ATRA の肺および肝臓ターゲティングにより、癌転移における治療効果の改善が可能であることを明らかにした。これらの知見は、ATRA による癌治療の臨床応用に向けた製剤設計において、有益な設計指針を提供するものと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、全トランスレチノイン酸 (ATRA) を利用した癌化学療法 of 改善を目的として、新しいターゲティング製剤に関する基礎的検討を行ったものである。全トランスレチノイン酸は、細胞分化・アポトーシス誘導作用を有する分化誘導剤であり、急性前骨髄球性白血病治療に対する経口製剤が既に臨床使用されている。現在、神経芽種、子宮頸癌、頭頸部癌などの固形癌への適用拡大も期待されているが十分な治療効果を得るためには更なる改善が求められている。そこで申請者は、ドラッグデリバリーシステム of 概念に基づいた製剤設計が必要と考え、高分子ミセル、カチオン性リポソーム、O/W エマルションを ATRA のプロトタイプ製剤として処方検討を行い、実験動物において体内動態および治療効果 of 観点からそれらの有効性を示した。具体的な内容は以下の通りである。

#### I. 高分子ミセルおよびカチオン性リポソームを用いた ATRA の固形癌および肺選択的ターゲティング法 of 開発

高分子ミセルは、合成高分子が数百分子会合し直径 10-100 nm のナノサイズの粒子で、その内核に疎水性薬物を保持できるものの、ATRA のような疎水性薬物の安定封入には内核の環境が重要と考えられている。申請者は、ブロック共重合体の疎水性ポリマーに対してベンジル基を 75% 導入した poly(ethylene glycol)-b-poly-(aspartic acid) derivative の合成を行った。さらに、この ATRA 封入高分子ミセルは、静脈内投与後、ATRA 単独投与群と比較して高い血中濃度ならびに移植固形癌中濃度を示し、ATRA が enhanced permeability and retention (EPR) 効果で固形癌にターゲティングできることを見出した。

一方、肺転移癌への ATRA のターゲティングに対して、*in vivo* 遺伝子導入に利用され静脈内投与後肺選択的に集積する 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP)/cholesterol リポソームの利用を検討した。これは、ATRA がカルボキシル基を有するため、カチオン性リポソームに安定に封入できると仮定したものである。ATRA 封入カチオン性リポソームの平均粒子径およびゼータ電位は、約 100 nm および 60 mV で、ATRA 封入カチオン性リポソームをマウスへ静脈内投与後、ATRA の肺選択的な集積を認めた。さらに、大腸癌由来細胞株 CT26 の肝癌転移モデルマウスにおいて、ATRA 封入カチオン性リポソームが、ATRA 単独あるいは ATRA 封入リポソームと比較して、転移癌結節数が有意に減少することを見出し、本処方 that 転移性肺癌に有効であることを明らかにした。

#### II. O/W エマルションを用いた ATRA の肝臓選択的ターゲティング法 of 開発

さらに、臨床応用を目指す立場からは ATRA 封入量の改善ならびに製剤自身の安全性に配慮することも不可欠と考え、微粒子性製剤 of O/W エマルションの利用についてその可能性を検討した。卵黄ホスファチジルコリン：コレステロール：大豆油から構成される平均粒子径約 100 nm の ATRA 封入 O/W エマルションを調製した際、ATRA 単独投与に比べ、マウスに静脈内投与後肝臓選択的に ATRA が集積することを明らかにした。また、これは O/W エマルション自身の体内動態とほぼ対応したパターンであることを確認した。CT26 細胞 of 肝癌転移モデルマウスにおいて癌転移抑制効果を評価した

ところ、ATRA 封入 O/W エマルションでは、ATRA 単独と比較して、転移癌結節数が有意に減少することならびに生存日数が延長することを見出した。

以上、申請者は、固形癌、肺、肝臓に対する ATRA の組織選択的ターゲティングに成功するとともに、癌転移に対する抑制効果の増強に成功した。これらの研究成果は ATRA による癌治療の臨床応用に向けた製剤設計に有益な指針を示すとともに、広く薬剤学、製剤学分野に新規な知見と新しい方法論を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成18年8月21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。