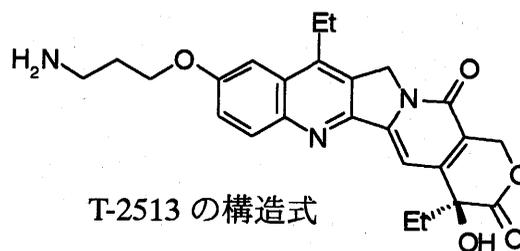


氏名	はら だ みつ のり 原 田 充 訓
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 651 号
学位授与の日付	平成 13 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Antitumor Activity, Pharmacokinetics, and Mechanisms of Action of T-0128, a Camptothecin Analogue-Carboxymethyl Dextran Conjugate (カンプトテシン誘導体—カルボキシメチルデキストラン複合体 T-0128 の抗腫瘍効果、体内動態、および作用機序に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 半 田 哲 郎 教 授 橋 田 充 教 授 富 岡 清

### 論 文 内 容 の 要 旨

イリノテカンをはじめとするカンプトテシン (CPT) 誘導体は、現在最も注目されている抗癌剤の一つである。しかし、その体内動態に起因する骨髄抑制や消化管毒性、特に下痢が問題となっており、腫瘍選択的に送達する手段が望まれている。そこで著者は、CPT の腫瘍ターゲティングシステムとして、T-0128 を合成した。T-0128 は新規 CPT 誘導体 T-2513 とカルボキシメチル (CM) デキストランとをトリグリシンを介して結合させた高分子プロドラッグで、その平均分子量は13万である。本研究では、T-0128 の抗腫瘍効果、体内動態、および活性薬物の遊離を評価し、加えて抗腫瘍効果発現のメカニズムを細胞レベルで検討し、以下に示す知見を得た。



#### 第一章 ヒト移植腫瘍に対する T-0128 の抗腫瘍効果

5 種類のヌードマウス移植ヒト腫瘍に対する T-0128 の抗腫瘍効果を、活性薬物 T-2513 と比較した。T-0128 はヒト乳癌 MX-1 を少量単回静脈内投与 (T-2513 換算で 6 mg/kg) で完治させたが、T-2513 は 60 mg/kg (最大耐量の 3/4)、週 1 回 3 週間の投与でも完治できなかった。また、T-0128 は T-2513 が無効であったヒト肺癌 LX-1 を最大耐量の 1/10 で完治させた。さらに T-0128 は難治性のヒト大腸癌 HT-29 に対しても強い抗腫瘍効果を示すなど、検討した全ての腫瘍で著効 (増殖抑制率96%以上) を示した。

次に、薬効と体内動態との関係を調べるため、T-0128 が効果を示すラット乳癌 Walker-256 担癌ラットにおいて、その体内動態を T-2513 と比較した。T-2513 が血中から速やかに消失したのに対し、T-0128 は長時間血中に滞留し、腫瘍と共に、肝臓、脾臓、リンパ節に高濃度に分布した。血漿中には検出されない遊離 T-2513 が各臓器中に検出され、腫瘍内では高濃度で持続した。以上の結果より、T-0128 は極めて高い治療効果を有する腫瘍ターゲティングプロドラッグであることが明らかとなった。

#### 第二章 健常および担癌ラットにおける T-0128 の体内動態

分子量 (4 万から 25 万) および CM 化度 (グルコース 1 残基当たり 0 から 1) の異なる、FITC ラベル化した CM デキストランを合成し、吉田肉腫担癌ラットにおける体内動態を検討した。分子量の増加に伴い、血中半減期が延長したが、11 万以上ではほぼ一定となった。また、CM 化度が 0 または 1 に近づくにつれ肝臓への移行が増大し、血中からの消失が速くなった。分子量 11 万のデキストランから製した CM 化度 0.4 の CM デキストラン (T-0128 のキャリア部分) が、最も長い血中滞留性を示し、腫瘍移行性も優れていた。

次に、健常および Walker-256 担癌ラットにおける T-0128 の体内動態を 1, 2, 5, 10, 25 mg/kg (T-2513 換算) の 5 段階で比較した。いずれのラットにおいても、T-0128 は非線形の動態を示したが、担癌ラットの方が血中からの消失は速かった。この差は臓器取り込みクリアランスの解析結果から、腫瘍に基づくクリアランスに起因すると考えられた。また、

投与24時間後、腫瘍をはじめとする各臓器は、投与量に比例して高分子体と遊離薬物濃度が増加したが、肝臓、脾臓、リンパ節では臓器中濃度の飽和が認められた。

### 第三章 カテプシン B を介した T-0128 からの薬物遊離

T-0128 はラット肝ホモジネイト中では薬物を遊離せず、それより精製したリソソーム酵素群で T-2513 を遊離した。pH 依存性や酵素阻害剤を用いた実験結果から、システインプロテアーゼ、特にカテプシン B が薬物遊離に強く関与することが分かった。また、Walker-256 肉腫や他の臓器から精製したリソソームを用いても同様に、薬物遊離の至適 pH が 4 であり、中性域ではほとんど遊離しないことから、リソソーム内で薬物遊離が起こると推察された。

次に、グリシン数の異なるスパーサーを持つ複合体を合成し、ラット肝リソソームによる薬物遊離を検討した。グリシン 2 つまでは薬物がほとんど遊離せず、3 つ (T-0128 に相当) 以上になるとグリシン数の増加に伴い遊離速度は増大した。また、ヌードマウス移植ヒト乳癌 MX-1 に対する抗腫瘍効果を比較したところ、T-0128 が最も高い抗腫瘍効果を示した。

### 第四章 マクロファージを介した T-0128 の活性化

薬物遊離に必要な T-0128 の細胞内取り込みを、様々な細胞で比較した。その結果、腫瘍細胞の取り込み能は極めて小さく、マクロファージが効率的に T-0128 を細胞内に取り込み、培地中に遊離 T-2513 を放出することが分かった。次に、T-0128 の抗腫瘍効果に対するマクロファージの関与を調べるため、T-0128 を含む培地中、非接触下、マクロファージ様細胞 J774.1 と腫瘍細胞を共培養した。腫瘍細胞だけの単培養系と比較して、マクロファージ共培養系では培地中に遊離 T-2513 が検出され、腫瘍細胞の増殖が阻害された。以上の結果は、腫瘍周辺のマクロファージが T-0128 を取り込み、遊離した T-2513 が腫瘍細胞を致死させるという作用機構を示唆している。

以上、著者は T-0128 が固形腫瘍に対する極めて強い抗腫瘍効果と広い有効投与量域を併せ持つ、腫瘍ターゲティング抗癌剤であることを示した。高分子キャリアおよびペプチドスパーサーの選択に関して得られた知見および推測される T-0128 の作用機構は、今後の高分子プロドラッグの合理的な設計および臨床開発に有用な指針を与えるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

イリノテカンをはじめとするカンプトテシン (CPT) 誘導体は、体内動態に起因する副作用があり、その腫瘍選択的送達が望まれている。そこで著者は、CPT の腫瘍ターゲティングシステムとして、新規 CPT 誘導体 T-2513 とカルボキシメチル (CM) デキストランとをトリグリシンを介して結合させた高分子プロドラッグ T-0128 を合成した。本研究では、T-0128 の抗腫瘍効果、体内動態、および活性薬物の遊離を評価し、加えて抗腫瘍効果発現のメカニズムを細胞レベルで検討して以下の新知見を得た。

### 第一章 ヒト移植腫瘍に対する T-0128 の抗腫瘍効果

ヌードマウス移植ヒト腫瘍に対する T-0128 の抗腫瘍効果を活性薬物 T-2513 と比較した。T-0128 はヒト乳癌 MX-1、ヒト肺癌 A-1 また難治性のヒト大腸癌 HT-29 に対し少量投与で完治させたが、T-2513 は最大耐量に近い投与でも腫瘍増殖速度を僅かに抑えるにすぎなかった。このように、T-0128 は T-2513 が無効であった腫瘍に対し著効 (増殖抑制率 96% 以上) を示した。また、ラット乳癌 Walker-256 担癌ラットでは、T-2513 が血中から速やかに消失したのに対し T-0128 は長時間血中に滞留し、血漿中には検出されない遊離 T-2513 が腫瘍内で高濃度で持続した。以上より、T-0128 は高い治療効果を有する腫瘍ターゲティングプロドラッグであることが示唆された。

### 二章 健常および担癌ラットにおける T-0128 の体内動態

CM デキストランは吉田肉腫担癌ラットでは、分子量の増加に伴い血中半減期が延長したが、11 万以上ではほぼ一定となった。また、CM 化度 (グルコース 1 残基当たり) が 0 または 1 に近づくにつれ血中からの消失が速くなった。このように、分子量 11 万、CM 化度 0.4 の CM デキストラン (T-0128 のキャリア部分) が、最も長い血中滞留性を示し、腫瘍移行性も優れていた。次に、健常および Walker-256 担癌ラットにおける T-0128 の体内動態を比較したところ、後者の方が血中からの消失は速かった。この差は、臓器取り込みクリアランスの解析結果から腫瘍に基づくクリアランスに起因すると考えられた。

### 三章 カテプシン B を介した T-0128 からの薬物遊離

T-0128 はラット肝ホジネイト中では薬物を遊離せず、それより精製したリソソーム酵素群で T-2513 を遊離した。詳細な実験結果から、カテプシン B が薬物遊離に強く関与することが分かった。また、Walker-256 肉腫や他の臓器から精製したリソソームを用いても、同様にリソソーム内で薬物遊離が起こることが示された。次に、スパーサー中のグリシン数の効果をラット肝リソソームで検討した。グリシン 2 つまでは薬物がほとんど遊離せず、3 つ (T-0128 に相当) 以上になるとグリシン数の増加に伴い遊離速度は増大した。一方、ヌードマウス移植ヒト乳癌 MX-1 に対する抗腫瘍効果を比較したところ、T-6128 が最も高い抗腫瘍効果を示した。

#### 第四章 マクロファージを介した T-0128 の活性化

T-0128 の腫瘍細胞による取り込み能は極めて小さいが、マクロファージが効率的にこれを細胞内に取り込み、培地中に遊離 T-2513 を放出することが分かった。マクロファージの関与を調べるため、T-0128 を含む培地中、非接触下、マクロファージ様細胞 J774.1 と腫瘍細胞を共培養した。腫瘍細胞だけの単培養系と比較して、マクロファージ共培養系では培地中に遊離 T-2513 が検出され、腫瘍細胞の増殖が阻害された。以上の結果は、腫瘍周辺のマクロファージが T-0128 を取り込み、遊離した T-2513 が腫瘍細胞を致死させるという作用機構を示唆している。

以上、本論文は、T-0128 が固形腫瘍に対する強い抗腫瘍効果と広い有効投与量域を併せ持つ腫瘍ターゲティング抗癌剤であることを明らかにした。また、高分子キャリアおよびペプチドスパーサーの選択に関して得られた知見、および推測される T-0128 の作用機構は、今後の高分子プロドラッグの合理的な設計および臨床開発に有用な指針を与えるものと考えられる。

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。更に平成13年 6 月29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。