

|          |                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------|
| 氏名       | のぐさ ひで お<br>野 草 秀 夫                                     |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (薬 学)                                               |
| 学位記番号    | 論 薬 博 第 655 号                                           |
| 学位授与の日付  | 平 成 13 年 9 月 25 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   | ターゲティング型高分子プロドラッグ CM プルラン—ペプチド—ドキシソルビシン<br>結合体の開発に関する研究 |

論文調査委員 (主 査)  
教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 半田 哲郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

抗癌剤を癌細胞へ選択的に送達させ、正常細胞への移行を減少させることにより、有効かつ安全な薬物治療が可能となる。このような薬物ターゲティングに用いられる方法論の中で、高分子を修飾素材として用い薬物を結合させた高分子プロドラッグについても研究が盛んに行われている。しかしながら、高分子プロドラッグの物理化学的性質と全身投与後の抗腫瘍効果や毒性あるいは体内動態との関連に関する情報は乏しく、合理的な分子設計はなされていないのが現状である。著者は、生体適合性が高く化学的に安定な水溶性多糖類のプルランをカルボキシメチル (CM) 化したキャリアーに、モデル抗癌剤ドキシソルビシン (DXR) をペプチドスペーサーを介して結合させた高分子プロドラッグを構築した。得られた CM プルラン (CMPul) —ペプチド—DXR 結合体を用いて、固形腫瘍に対する抗腫瘍効果増強と全身毒性軽減効果を評価し、体内動態と関連づけた。また、結合体の物理化学的性質の違いが抗腫瘍効果や体内動態に及ぼす影響について系統的に検討して、高分子プロドラッグの分子設計に関する指針を得た。さらに、検討結果に基づき最適化された結合体を構築して、固形腫瘍に対する DDS 抗癌剤の可能性について検討した。

#### 第 I 章 結合体の合成と物理化学的性質

DXR のアミノ基と、プルランをアルカリ条件下にクロロ酢酸で処理して得られる CMPul のカルボキシル基を、直接、あるいはテトラペプチドスペーサーを介して結合した結合体を合成した。いずれの結合体も pH 7.4 のリン酸緩衝溶液中で薬物の遊離は認めなかった。また、水溶液中の安定性や蛍光度の測定結果から、結合体の DXR が高い疎水性環境に存在することが示唆された。DXR の放出特性をラット肝リソゾーム酵素存在下で検討した結果、直接結合体では薬物の遊離を認めなかった。これに対して、テトラペプチドスペーサーを介した結合体ではいずれも薬物が遊離されたが、アミノ酸配列の違いにより遊離速度は異なった。

#### 第 II 章 結合体の抗腫瘍効果、全身毒性と体内動態

Walker 256 細胞を用いて結合体の *in vitro* 細胞増殖抑制作用および放射標識体の蓄積量を DXR と比較した結果、結合体は癌細胞にほとんど取り込まれないことが示された。Walker 256 担癌ラットを用いて *in vivo* 抗腫瘍効果を調べた結果、ペプチドスペーサーの有無やアミノ酸配列の違いにより抗腫瘍効果が異なり、Gly-Gly-Phe-Gly や Gly-Phe-Gly-Gly をスペーサーに持つ結合体の抗腫瘍効果は DXR を上回った。また、正常マウスに対する致死毒性を検討した結果、ペプチドスペーサーを介したいずれの結合体も DXR より約 3 倍軽減されていた。次に、Walker 256 担癌ラットを用いて静脈内投与後の体内動態を検討した結果、DXR は血中より速やかに消失したのに対して、結合体を投与した場合には、DXR が結合体の形で長時間血液中に存在し徐々に各組織に移行することが示された。結合体は腫瘍と共に、肝臓、脾臓や骨髄に DXR よりも高濃度に分布するのに対して、心臓、肺、筋肉などは低濃度であった。また、遊離 DXR の組織内濃度を経時的に評価した結果、結合体の腫瘍内遊離 DXR の AUC はペプチドスペーサーのアミノ酸配列により異なり、*in vivo* 抗腫瘍効果と相関することが示された。

#### 第 III 章 抗腫瘍効果・体内動態に及ぼす結合体の物理化学的性質の影響

結合体のペプチドスペーサーの長さやアミノ酸配列の違いが抗腫瘍効果に及ぼす影響について Walker 256 担癌ラットを用いて検討した結果、Phe-Gly, Leu-Gly や Tyr-Gly のジペプチドをスペーサーに持つ結合体は DXR よりも抗腫瘍効果が高く、トリペプチド以上のスペーサーを持つ結合体とほぼ同等の活性を持つことが明らかとなった。また、体内挙動を検討した結果、各結合体の抗腫瘍効果の違いが組織内の遊離 DXR 量に基づくことが示された。一方、結合体からの DXR の放出特性をラット肝リゾソーム酵素およびカテプシン B 存在下で検討した結果、抗腫瘍効果が増強している各結合体間でも遊離量が異なることが示された。次に、結合体の薬物含量の違いが抗腫瘍効果に及ぼす影響について Walker 256 担癌ラットを用いて検討した。その結果、薬物含量が増加するに伴い、抗腫瘍効果が低下する一方、正常マウスにおける致死毒性が増大し、治療係数が小さくなることが明らかになった。体内挙動を検討した結果、薬物含量が増加するに伴い血中半減期が減少し、肝臓、脾臓等の細網内皮組織へ高濃度に分布するのに対し、腫瘍内濃度は減少することが示された。

#### 第IV章 最適化結合体の抗腫瘍効果

第III章までに明らかにした物理化学的性質の検討結果から、最適化された結合体である CMPul-Phe-Gly-DXR の抗腫瘍効果を腫瘍移植マウスの系を用いて検討した。Lewis 肺癌に対して、結合体投与群では DXR よりも強い抗腫瘍効果が認められ、全例腫瘍が退縮して長期生存した投与群も観察された。体重減少においては DXR 投与群より軽微であった。また、M5076 細網肉腫を用いた肝転移モデルの系でも結合体は顕著に転移抑制効果を示し、延命効果においても、DXR 投与群よりも優れていた。以上の結果より CMPul-Phe-Gly-DXR の各種固形腫瘍モデルに対する有効性が明らかになった。

以上、著者はモデル抗癌剤 DXR を CMPul にペプチドスペーサーを介して結合させた高分子プロドラッグが、固形腫瘍に対する有用な DDS 抗癌剤となる可能性を示した。本研究で得られた高分子プロドラッグの物理化学的性質と全身投与後の抗腫瘍作用や毒性、あるいは体内動態との関連に関する情報は、高分子プロドラッグの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

癌細胞への選択的送達を目的として、抗癌剤の高分子プロドラッグの開発が活発に進められているが、その物理化学的性質と全身投与後の抗腫瘍効果や毒性あるいは体内動態との関連に関する情報は乏しく、合理的な分子設計指針は確立されていない。著者は、生体適合性が高く化学的に安定な水溶性多糖類のプルラン (Pul) をカルボキシメチル (CM) 化したキャリアー (CMPul) に、抗癌剤ドキシソルピシン (DXR) をペプチドスペーサーを介して結合させた高分子プロドラッグを合成し、固形腫瘍に対する増殖抑制効果と全身毒性を評価して、結合体の体内動態と関連づけた。また、結合体の物理化学的性質の影響を系統的に検討し、高分子プロドラッグの設計指針を得るとともに、最適化された結合体を構築して固形腫瘍に対する高分子化抗癌剤の可能性を検証した。最初に、DXR のアミノ基とプルランをアルカリ条件下にクロロ酢酸で処理して得られる CMPul のカルボキシル基を、直接、あるいはテトラペプチドスペーサーを介して結合した結合体を合成し、安定性や蛍光強度の測定結果から、結合体中の DXR が高い疎水性環境に存在することを示した。また、ラット肝リゾソーム酵素存在下、直接結合体では DXR は遊離せず、一方、テトラペプチドスペーサーを介した結合体ではアミノ酸配列の違いにより異なった速度で DXR が遊離されることが明らかになった。Walker 256 細胞を用いた *in vitro* 実験の結果、結合体はそれ自体癌細胞にほとんど取り込まれないことが示され、一方、Walker 256 担癌ラットを用いた *in vivo* 実験では、ペプチドスペーサーの有無やアミノ酸配列の違いに依存し抗腫瘍効果が認められ、Gly-Gly-Phe-Gly や Gly-Phe-Gly-Gly をスペーサーとする結合体は DXR を上回る効果を示すことが確かめられた。次に、静脈内投与後の体内動態を検討した結果、DXR は血中より速やかに消失するのに対して、結合体では DXR が結合状態で長時間血液中に存在し徐々に各組織に移行することが示され、分布は腫瘍と共に肝臓、脾臓、骨髄で高く、心臓、肺、筋肉などで低かった。また、遊離 DXR の組織内濃度を解析した結果、結合体投与後の腫瘍内遊離 DXR の AUC はペプチドスペーサーのアミノ酸配列により異なり、*in vivo* 抗腫瘍効果と相関することが示された。さらに、スペーサーの長さやアミノ酸配列の影響について検討した結果、Phe-Gly, Leu-Gly や Tyr-Gly などのジペプチドをスペーサーとする結合体がトリペプチド以上のスペーサーを持つ結合体と同等の活性を持つことが明らかとなった。また、結合体の結合薬物量の影響については、結合量の増加に伴い腫瘍内濃度および治療係数が減少することが示された。以上の検討を通じて得られた最適化結合体である CMPul-Phe-Gly-DXR は、

マウス Lewis 肺癌に対して DXR を上回る抗腫瘍効果を示し、また、M5076 細網肉腫を用いた肝転移モデルの系でも顕著な転移抑制効果を示すなど、各種固形腫瘍モデルに対し有効性を示した。

以上、著者は抗癌剤 DXR を CMPul にペプチドスパーサーを介して結合させた高分子プロドラッグを開発し、固形腫瘍に対する優れた効果を証明した。本研究で得られた情報は、今後の高分子プロドラッグの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8月20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。