

氏名 (生年月日) **山 下 修 吾** (1989年2月28日)

学位の種類 **博士 (薬学)**

学位記番号 **博 第173号**

学位授与の日付 **2018年3月17日**

学位授与の要件 **学位規則第4条第1項該当**

学位論文題目 **カルボン酸修飾に基づく骨ターゲティング型 DDS 開発とパクリタキセルによる骨転移治療への展開**

論文審査委員 (主査) **教授 山本 昌**

(副査) **教授 栄田 敏之**

(副査) **教授 西口 工司**

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

骨は肺・肝臓に匹敵するがん転移好発臓器であり、骨転移は対応困難な骨痛、病的骨折、脊髄麻痺など日常生活動作障害の強い骨関連事象を併発するため、がん患者の QOL を著しく低下させ、死期を早めることから、その抑制法の開発が切望されている。

従来の骨転移療法は、骨に転移したがんの脊髄圧迫による痛み及び麻痺の緩和を目的とした放射線療法、外科的治療、鎮痛薬の投与などが行われてきたが、骨は他臓器と比較して血流量が乏しく、血液-骨髄関門により血管腔側から骨基質側への物質の移動が制限されているなど、薬物が移行しにくい組織構造を有するため、抗がん剤の骨移行性は不十分であり、がん骨転移の進行そのものを抑制する方法は皆無であった。

近年、破骨細胞が産生する成長因子及び骨転移がん細胞が分泌する増殖因子の相互活性により骨転移が増悪することが明らかとなり、骨移行性に優れ、破骨細胞の機能を抑制するビスホスホネート (BP) などの骨修飾薬が、骨転移に対する治療薬として利用されている。しかしながら、骨修飾薬の単独投与により骨転移の根治に至ることは稀であり、骨へ抗がん剤などの薬物を効率的に送達可能なデリバリーシステムの構築による新規治療法の開発が切望される。

そこで本研究では、効率的に抗がん剤を骨に送達可能なドラッグデリバリーシステムの構築による骨転移治療法の開発を目指して、カルボン酸の骨ターゲティング素子としての有用性を物性と体内動態を基盤に系統的に評価するとともに、それらを利用した抗がん剤の骨ターゲティング型薬物キャリアの設計・開発を行った。

第1章 カルボン酸修飾を利用した骨標的化樹状高分子の開発

骨に効率よく薬物を送達するための骨ターゲティング素子として、骨に高い親和性を示す BP やテトラサイクリンなどがこれまでに報告されているが、これらは色素沈着や血中での凝集塊形成などの問題がある。また、BP 修飾は薬物やキャリアの骨取り込みクリアランスだけでなく、肝臓や腎臓などの標的部位以外の取り込みクリアランスも促進するなど骨選択性に課題がある。

一方、生体内には骨親和性の高い天然タンパク質がいくつか存在しており、カルボン酸の一種である酸性アミノ酸が骨基質であるヒドロキシアパタイト (HAP) への親和性に寄与することが報告され

ている (Hoang *et al.*, *Nature* 425:977-980, 2003)。そこで、申請者は生体由来成分であるカルボン酸修飾の利用により有効かつ安全性の高い骨ターゲティングキャリアが設計できる可能性があると考え、樹状高分子であるポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM) に様々なカルボン酸修飾を施し、骨親和性ならびに体内動態の観点から最適な骨ターゲティング素子を系統的に評価した。すなわち、各種カルボン酸修飾体はカルボン酸であるアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、コハク酸 (Suc) またはアコニット酸 (Aco) を PAMAM のアミノ基と縮合反応させるとともに、アミノ基反応型活性化ポリエチレングリコール (PEG-NHS) と反応させることで作製した。各種カルボン酸修飾体の HAP への親和性は、カルボン酸の負電荷の強度やカルシウムイオンとのキレート能と相関し、Aco>Suc>Asp>Glu 修飾の順に高かった。各種カルボン酸修飾体に ¹¹¹In 標識を施し、マウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、骨取り込みクリアランスは HAP への親和性が高いほど大きい値を示したが、全身クリアランスに占める骨取り込みクリアランスの割合は Asp 修飾体が最も高かった。骨への分布量についても、Asp 修飾体が最も高く、投与後 3 時間で投与量の 46% が骨に移行した。また、骨内分布を評価したところ、Asp 修飾体は骨転移や骨粗鬆症などの骨疾患の病巣部位である吸収面に選択的に集積することが示された。

以上のようにカルボン酸修飾 PAMAM の物性と体内動態を系統的に評価することで、カルボン酸の骨ターゲティング素子としての機能性及び有用性について明らかにした。

第 2 章 アスパラギン酸修飾に基づく骨標的化リポソームの開発

上述のように申請者は、骨ターゲティングにおける Asp 修飾の有用性を物性と体内動態の観点から明らかにした。次に申請者は、様々な薬物を封入可能な微粒子性ナノキャリアへの Asp 修飾化による汎用性の高い骨ターゲティングシステムの構築及びがん骨転移治療法への応用を試みた。リポソームは両親媒性分子であるリン脂質から構成され、二分子膜構造の脂質二重層を特徴とした微粒子であり、粒子内に疎水部と親水部を有することから、様々な物性の薬物が搭載可能である。申請者は N-(succinimidyl-oxo-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, dipalmitoyl (DPPE-NHS) と Asp を反応させた DPPE-Asp 及び PEG 修飾脂質を用いることで、リポソーム表面を Asp と PEG で修飾した骨標的化リポソーム (PEG-Asp-Lipo) に抗がん剤である PTX を封入した PEG-Asp-Lipo (PTX) の骨移行性及び治療効果について評価した。PEG-Asp-Lipo の骨親和性を、HAP に対する吸着を指標に評価したところ、HAP への親和性は、DPPE-Asp 含量依存的に増大することが示され、DPPE-Asp の利用により、リポソームに骨指向性を付与可能であることが示された。Asp 未修飾の PEG-Lipo (¹⁴C-PTX) をマウスに尾静脈内投与したところ、PTX の骨移行率は投与後 6 時間で 3.4% であった。一方、Asp 修飾を施した PEG-Asp-Lipo (¹⁴C-PTX) 投与後の PTX の骨移行率は 15% であり、PEG 修飾リポソームと比較して 4 倍高い骨移行性を示したことから PEG-Asp-Lipo は PTX を骨に効率的に送達可能な薬物キャリアであることが明らかとなった。また、蛍光標識を施した PEG-Asp-Lipo をマウス尾静脈内投与後、作製した骨切片を共焦点顕微鏡にて観察したところ、PEG-Asp-Lipo は破骨細胞が多く分布する吸収面に主に分布することが示された。さらに骨転移モデルマウスに対する PEG-Asp-Lipo (PTX) の治療効果を評価したところ、PEG-Asp-Lipo (PTX) の投与により骨転移が顕著に抑制されたことから、骨転移治療における PEG-Asp-Lipo (PTX) の有用性が示された。

総括 (結論)

本研究により、カルボン酸修飾を施した PAMAM 誘導体を作製し、それらの物性及び体内動態を系統的に評価することで、カルボン酸の骨ターゲティング素子としての機能性及び有用性について明らかにするとともに、骨ターゲティング型薬物キャリアの設計・開発に成功した。これらの薬物キャリ

アは抗がん剤の骨移行性を向上するとともに、骨転移治療に有利な骨内分布を示すことを明らかにした。さらに、骨転移モデルマウスを用いた検討において、これらの薬物キャリアを用いた抗がん剤の骨ターゲティングにより骨転移が顕著に抑制可能であることが示された。以上、本研究は骨への薬物送達及び骨転移治療に対して有用な方法論ひいては治療法が提唱できる可能性が高く、骨転移治療に大きく貢献できる研究と考えられる。

審査の結果の要旨

一般に、骨転移を治療するためには、骨に抗がん剤などの治療薬を効率よく移行させることが重要である。しかしながら、骨は他臓器と比較して血流量が乏しく、血液-骨髄関門により血管腔側から骨基質側への物質の移動が制限されているなど、薬物が移行しにくい組織構造を有するため、抗がん剤の骨移行性は不十分である。そこで本研究では、効率的に抗がん剤を骨に送達可能な新たなドラッグデリバリーシステムの構築による骨転移治療法の開発を目指して、カルボン酸修飾を用いた新規骨ターゲティング型薬物キャリアの設計・開発を行い、骨ターゲティング素子としての有用性を物性、体内動態ならびに治療効果の観点からを系統的に評価した。

生体内には骨親和性の高い天然タンパク質がいくつか存在しており、カルボン酸の一種である酸性アミノ酸が骨基質であるヒドロキシアパタイト (HAP) への親和性に寄与することが報告されている。そこで本研究では、樹状高分子であるポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM) に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、コハク酸 (Suc) またはアコニット酸 (Aco) 修飾を施し、骨親和性ならびに体内動態の観点から最適な骨ターゲティング素子を評価した。各種カルボン酸修飾体の HAP への親和性は、カルボン酸の負電荷の強度やカルシウムイオンとのキレート能と相関し、Aco>Suc>Asp>Glu 修飾の順に高かった。また、各種カルボン酸修飾体に ¹¹¹In 標識を施し、マウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、Asp 修飾体を投与した際に、全身クリアランスに占める骨クリアランスの割合及び骨への分布量が最も高くなり、投与後 3 時間で投与量の 46% が骨に移行することが明らかとなった。さらに、Asp 修飾体の骨内分布を評価したところ、Asp 修飾体は骨転移や骨粗鬆症などの骨疾患の病巣部位である骨破壊部位に選択的に集積することが示された。

次に、様々な薬物を封入可能なリポソームへの Asp 修飾化による汎用性の高い骨ターゲティングシステムの構築及び癌骨転移治療法への応用を試みた。本研究では N-(succinimidyl-oxo-glutaryl)-L- α -phosphatidylethanolamine, Dipalmitoyl (DPPE-NHS) と Asp を反応させた DPPE-Asp 及び PEG 修飾脂質を用いることで、リポソーム表面を Asp と PEG で修飾した骨標的化リポソーム (PEG-Asp-Lipo) に抗癌剤である PTX をリポソームに封入した PEG-Asp-Lipo (PTX) の骨移行性及び治療効果について評価した。PEG-Asp-Lipo の骨親和性は、DPPE-Asp 含量依存的に増大することが示され、DPPE-Asp の利用によりリポソームに骨指向性を付与できることが示された。また、Asp 修飾を施した PEG-Asp-Lipo (¹⁴C-PTX) 投与後の PTX の骨移行率は、PEG 修飾リポソームと比較して約 4 倍高い値となった。さらに、骨転移モデルマウスに対する PEG-Asp-Lipo (PTX) の治療効果を評価したところ、PEG-Asp-Lipo (PTX) の投与により骨転移が顕著に抑制されたことから、骨転移治療における PEG-Asp-Lipo (PTX) の有用性が示された。

以上のように、本研究で開発した薬物キャリアは、抗がん剤の骨移行性を向上するとともに、骨転移治療に有利な骨内分布を示すことを明らかにした。さらに、骨転移モデルマウスを用いた検討において、これらの薬物キャリアを用いた抗がん剤の骨ターゲティングにより骨転移が顕著に抑制可能で

あることが示された。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。