ドラッグデリバリーシステム担体としてのヒト血清アルブミン

異島 優,* 丸山 徹

Human Serum Albumin as Carrier in Drug Delivery Systems

Yu Ishima* and Toru Maruyama

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan.

(Received August 5, 2015)

Recently, human serum albumin (HSA) has emerged as a versatile carrier for therapeutic agents against diabetes, cancer, and infectious diseases. Market-approved products include fatty acid derivatives of human insulin for diabetes and the paclitaxel-HSA nanoparticle for various cancers such as metastatic breast cancer and advanced pancreatic cancer. In this review, we focus on the next-generation approach including HSA-binding bioactive gas such as nitric oxide (NO) for treating ischemic/reperfusion injury, cancer, and bacterial infection. To date, pharmacologically active compounds that release NO within the body, such as organic nitrates, have been used as therapeutic agents, but their efficacy is significantly limited by unwanted side effects. Therefore, novel NO donors with better pharmacological and pharmacokinetic properties are highly desirable. The S-nitrosothiol fraction in plasma is largely composed of endogenous S-nitrosated HSA (SNO-HSA), which is why we are investigating whether this albumin form can be therapeutically useful. Recently, we have developed SNO-HSA analogues such as SNO-HSA with many conjugated SNO groups (poly-SNO-HSA) prepared using chemical modification. Unexpectedly, we found striking inverse effects between poly-SNO-HSA and SNO-HSA. Despite the fact that SNO-HSA inhibits apoptosis, poly-SNO-HSA possesses very strong pro-apoptotic effects against tumor cells. Furthermore, poly-SNO-HSA can reduce or even completely eliminate the multidrug resistance often developed by cancer cells. In this review, we put forward the possibility that poly-SNO-HSA can be used as a safe, effective multifunctional antitumor agent.

Key words—human serum albumin; nitric oxide; drug delivery system; anticancer agent

1. はじめに

血清中に最も多く含まれる単純タンパク質であるヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) は、血中や組織間質において血漿膠質浸透圧の維持・調節、脂肪酸やビリルビンを始めとする内因性リガンド及び薬物などの外因性リガンドの輸送担体、抗酸化作用及び酵素的作用 (エステラーゼ様作用) など数多くの機能を有しているマルチ機能タンパク質である。^{1,2)} 特に、HSA の血中滞留性に優れている点を利用した融合タンパク質は、数多く報告されており、血中半減期の短いタンパク質の滞留性の向上にたびたび応用されている (Table 1)。^{3–11)}

がん治療における drug delivery system (DDS) に関しては、1986 年に前田らによって報告された enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)¹²⁾ の発見の手がかりとなった腫瘍部位への HSA の高い漏出性と滞留性からも分かるように、腫瘍部位への DDS 担体として使用する利点があることは言うまでもない。腫瘍組織での血管透過性が著しく亢進していることと、リンパ系が発達していないことによる高分子や微粒子が血管より流出し易く、蓄積し易い現象である EPR 効果は、「受動的ターゲティング」の 1 つであり、この理論を基盤に多くの高分子抗がん剤が承認されていることは周知の事実である。さらに興味深いことに、HSA を担体として使用する利点はこの EPR 効果による「受動的ターゲティング」だけに留まらない。それは、アルブミンレセプターと呼ばれる内皮細胞に存在する gp60 や多くの種類のがん組織 (主に間質) に存在

熊本大学薬学部薬剤学分野 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

*e-mail: y-ishima@kumamoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 135 年会シンポジウム S08 で発表した内容を中心に記述したものである。

Table 1. Typical Albumin Fusion Partners and Its Potential Therapeutic Applications

Albumin-fusion products	Potential application	Features
Albumin-growth hormone (Albutropin™)	Growth hormone deficiency	Clinical trial
Albumin-granulocyte colony-stimulating factor (GCSF)	Neutropenia	Clinical trial
Albumin-interferon (IFN)- α 2b (Albinterferon α -2b)	Chronic hepatitis C	Clinical trial Animal model study
Albumin-interleukin (IL)-2 (albuleukin)	Malignancy	Clinical trial
Albumin-IL-1 receptor antagonist	Rheumatoid arthritis	Animal model study
Albumin-glucagon-like peptide (GLP) 1 (albuglutide)	Diabetes mellitus	Clinical trial
Albumin-atrial natriuretic peptide (ANP) Albumin-B-type natriuretic peptide (BNP)	Hypertension, Congestive heart failure, Acute myocardial infarction	Animal model study
Albumin-tumor necrosis factor (TNF) ligands Animal model study (TNF- α , TWEAK, TRAIL)	Malignancy	Animal model study
Albumin-thymosin- α_1	Hepatitis B and C, Malignancy	Animal model study
Albumin-vascular endothelial growth factor (VEGF) 165b	Malignancy	Animal model study
Albumin-onconase	Malignancy	Animal model study
Albumin-tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 ¹²³ I- and ⁶⁸ Ga-labeled cRGD-Alb-TIMP-2 Tumor imaging probe for SPECT and PET	Malignancy	Animal model study
Albumin-factor VIIa	Haematophilia A	Animal model study
Albumin-coagulation factor IX	Haemophilia B	Animal model study Clinical trial
Albumin domain III-retinol binding protein	Liver fibrosis	Animal model study

We used a slightly modified scheme to that proposed in Ref. 2).

する secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) による「能動的ターゲティング」が機能することである。¹³⁻¹⁵⁾ このことは、HSA そのものが、「受動的」だけでなく「能動的」にもがん組織にターゲティングされていること、その結果、EPR 効果でがん組織まで送達していたものを『腫瘍間質』へさらには『腫瘍細胞内』にまで能動的に送達させることが可能であることを示している (Fig. 1)。これらの特性から、アメリカ食品医薬品局 U.S. Food and Drug Administration (FDA) が 2008 年に『Albumin-based nanoparticles Technology』が DDS 化技術における非常に有用な新しいプラットフォームなることを報告しており、¹⁶⁾ この技術を使用したアブラキサン®は、米国において 2005 年に乳がん、2012 年 10 月には肺がん、2013 年 9 月には切除不能な膵臓がんでの承認がなされており、今後更なる適応拡大が期待されている。Evaluate Pharma の推定では、2018 年には 17.8 億ドルの売

り上げが予想されていることから、単にバクリタキセルの溶解補助剤としての役割だけに留まらない Albumin-based nanoparticles Technology が今後さらに発展していくだろう。このような背景からも分かるように、アブラキサン®の開発以降、体内に最もありふれていた単純タンパク質である HSA は、新たな DDS キャリアとして世界的に再認識されるようになってきている。一方、われわれは 40 年以上前から HSA の研究を行い、いち早く DDS

異島 優

熊本大学薬学部薬剤学分野助教。2007 年熊本大学大学院薬学教育部博士後期課程修了、博士 (薬学)。同年、同大学薬学部の医薬高分子学の特任助教、米国ピッツバーグ大学医学部・博士研究員を経て、2011 年より現職。2015 年より、次世代創薬研究者養成塾顧問を兼任。研究キーワード：ドラッグデリバリーシステム、アルブミン、一酸化窒素。

Fig. 1. EPR Effect and Albumin-based Nanoparticles Technology

Uptake of HSA into the tumor interstitium is mediated by the gp60 transcytosis pathway and subsequent binding to secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) in the tumor extracellular matrix.

キャリアとして検討を重ねてきた。その中でも、極めてユニークかつ制御困難な一酸化窒素 (nitric oxide; NO) に着目し、そのデリバリーシステムの構築と臨床応用への基礎的知見を積み上げてきた。¹⁷⁻²²⁾ HSA での NO デリバリーシステムによって改善する疾患は多岐に及ぶが、ここではがん治療への NO の臨床応用に関して、われわれの知見を概説する。

2. NO 付加ヒト血清アルブミンのがん治療への応用

2-1. EPR 効果増強剤としての S-ニトロソ化 HSA Dimer 上述したように、がん治療における近年のナノ製剤の開発の礎に、『EPR 効果』は欠かせない理論となっており、ドキシル®を始め、いくつかのナノ製剤が世界中で承認されている。こうした状況の中、ナノ化による生存率の改善や副作用の軽減は確かに認められているものの、その反面、一部のがん種やその腫瘍のサイズ等の違いによっては、無効若しくは効果が乏しいことが少しずつであるものの、明らかになりつつある。²³⁾ これは、今まさに、高分子抗がん剤のリバーストランスレショナル・リサーチが待ち望まれている。この原因として、動物実験によって確立されている画一的な担がんモデルでは評価し難いといった EPR 効果の不均一性の関与が挙げられる。事実、マウス結腸がん由来の Colon26 細胞とマウスメラノーマ細胞 B16 細

胞では、内因的な EPR 効果の差が極めて大きいこと、加えて、同一のがん細胞であっても、その腫瘍の大きさによっても大きく異なることから、腫瘍の種類や大きさに十分配慮した実験系でのデータの構築が必要不可欠である。そこでわれわれは、EPR 制御剤を併用することにより、これまでの『内因的な EPR 効果を単純利用する戦略』から『EPR 効果を増強・制御する戦略』が可能になるものと考えている。このアプローチのメリットは、高分子抗がん剤に EPR 増強剤を併用投与するだけで、その高分子抗がん剤の腫瘍内集積性を増大させ、それ以外の臓器への分布を抑制する結果、比較的簡便に臨床有用性を向上させることが期待できる上、汎用性も高い。この EPR 制御剤として開発したものが、NO を HSA 二量体に存在する 2 ヲ所の Cys-34 位のチオール基に結合させた S-ニトロソ化 HSA Dimer [S-nitrosated-HSA (SNO-HSA) Dimer] である^{20,24)} HSA は二量体化によって、単量体と比較し、血中の半減期が延長し、腫瘍組織移行性が増大する体内動態特性を持つ。加えて、遺伝子組換え技術を用いた HSA Dimer の作製法により、ミセルやリポソームなどにみられる分子サイズの不均一性がなく、高純度のタンパク質が得られる。この腫瘍選択的な担体である HSA Dimer に EPR 増強作用を有する NO を付与した SNO-HSA Dimer は、『Albumin-based nanoparticles Technology』を搭載した魅力的

な EPR 制御剤になり得る可能性が高い。そこで、この SNO-HSA Dimer の EPR 増強剤としての有用性に関して、*in vivo* にて検証した。

2-2. *in vivo* による SNO-HSA Dimer の EPR 増強効果の検討 はじめに、SNO-HSA Dimer の腫瘍選択的な NO 輸送活性を検証した。担がんモデルとして、まずは、血管透過性が高い（内因的 EPR 効果が高い）C26 担がんモデルを作製し、SNO-HSA Dimer を投与したところ、腫瘍でのみ有意な NO の濃度上昇が確認された。²⁰⁾ このとき、腎臓や肝臓といった他の臓器には、NO の濃度変動は確認されず、低分子の NO ドナーである S-ニトロソグルタチオン（GSNO）の投与では、腫瘍内の NO 濃度変動も認められなかった。²⁰⁾ 次に、その腫瘍に運搬された NO によって EPR 増強作用が誘導されるかを、同様の C26 担がんモデルに EPR 効果の指標であるエバンスブルー法を用いて検討を行った。その結果、約 3 倍の EPR 効果の増強が SNO-HSA Dimer 投与群で観察された。²⁰⁾ この EPR 効果の増強は、SNO-HSA Monomer では比較的小さかったことから、二量体化による優位性も確認された。さらに、この SNO-HSA Dimer による EPR 増強効果を詳細に捉えるべく、EPR 増強時間とその際の腫瘍内エバンスブルー分布を解析したところ、EPR 増強効果は SNO-HSA Dimer 投与後 30 以内にほぼ最大値に達し、その増強作用は 3 時間後まで持続し、4 時間後には消失した。また、その際のエバンスブルー分布は、血管周囲への分布はもちろん、血管から遠く離れている腫瘍深部にまで送達していることから、SNO-HSA Dimer による EPR 増強効果は、腫瘍内全体へ波及していることが明らかとなった。²⁵⁾ そこで実際に、SNO-HSA Dimer と併用投与した高分子抗がん剤の移行性への影響を評価すべく、モデル高分子抗がん剤としてドキソルビシン内包 PEG リポソームであるドキシル®を用いて検討した。このとき使用した SNO-HSA Dimer の投与量は、単独では抗腫瘍効果を認めない量に設定した。その結果、ドキシル®は、EPR 効果を利用した受動的ターゲティング作用を有するため、ドキシル®単独でもある程度の抗腫瘍効果が確認されたが、そのドキシル®単独と比較しても SNO-HSA Dimer 併用群は有意に強力な抗腫瘍効果を示した。さらに、2 つの異なる投与量による検討から、ドキ

シル®の抗腫瘍効果を少なくとも 2、3 倍向上させることが示唆された。²⁵⁾ そこで、そのことを裏付けるべく、腫瘍内のドキソルビシン自身の蛍光を定量解析したところ、ドキソルビシンの腫瘍移行性が 3 倍程度上昇していた。その際、肝臓や腎臓などの他臓器へのドキソルビシンの分布は有意に減少し、血中のドキソルビシン量は減少傾向であった。これらのことから、SNO-HSA Dimer を投与したことによる腫瘍部位への移行性増大に起因する抗腫瘍効果であることが明らかとなった。さらに興味深いことに、がん転移に対しても有意に抑制した。これは、転移病巣部にも引き起こされていることが知られている EPR 効果に対しても、その増強を引き起こしていることに起因している可能性が考えられる。加えてわれわれは、血管透過性が低い（内因的 EPR 効果が低い）B16 担がんモデルでも同様の検討を行い、SNO-HSA Dimer 併用により EPR 増強効果を確認しており、その移行性増大率は非併用時と比較して約 6 倍まで上昇したことから、血管透過性が低いがん種の方がより SNO-HSA Dimer 併用効果が顕著であった。²⁵⁾ また、SNO-HSA Dimer 併用投与による血圧低下や肝毒性、心毒性などの副作用もなく、非常に安全性が高いことも確認しているが、ドキシル®の手足症候群などの副作用に及ぼす影響は現在検討中である。以上より、『EPR 効果を増強させた次世代型 EPR 治療戦略』が SNO-HSA Dimer 併用により可能になることが示唆された。高分子抗がん剤の腫瘍移行性を増大することは、他臓器への分布量減少（副作用の軽減）や、投与量・回数の減少（治療費削減ひいては医療経済にも貢献）をもたらすことが予想される。また、SNO-HSA Dimer の作用は、EPR 増強に基づく高分子抗がん剤の腫瘍移行性の増大作用であり、このメカニズムは腫瘍周辺部の血管拡張作用や、腫瘍間質内圧の低下であろう。²⁵⁾ しかしながら、腫瘍周辺部の血管拡張は、酸素や栄養の供給²⁶⁾にもつながりかねず、EPR 増強作用は『諸刃の剣』になり兼ねないため、一過的な作用であるべきであろう。実際、SNO-HSA Dimer 投与 4 時間後には EPR 増強作用は認められなかった。このことは、SNO-HSA Dimer が不可逆的ではなく、可逆的な EPR 増強をもたらす EPR『制御』剤であることを示唆している。これらの知見は、既に上市されているものや現在開発中の高分

Fig. 2. Novel Nano EPR Enhancer: S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer (SNO-HSA Dimer)

子抗がん剤への適応も可能であり、幅広い様々な高分子抗がん剤の前投与剤としての可能性が十分期待される (Fig. 2).^{20,25)}

3. がん治療に対する Poly-SNO-HSA の多面的効果

3-1. 内因的な SNO-HSA と Poly-SNO-HSA の NO 輸送能 近年, NO はアポトーシス誘導やがん化学療法, 免疫療法, 放射線療法の感受性増強に関与するなど, 多様な抗がん効果を併せ持つことが明らかとなってきた。^{22,27,28)} そこで新たながん治療薬として, NO の抗がん剤としての開発が積極的に展開されている。われわれもまた, NO をがん細胞へ効率的に輸送できるよう設計された Poly-SNO-HSA (1 分子の HSA に対し多分子の NO を HSA 表面に化学的に結合させたもの) を作製し, *in vitro* と *in vivo* の両面からアポトーシス誘導効果及び腫瘍増殖抑制作用を持つことを明らかにしてきた。^{22,29,30)} Poly-SNO-HSA は, 主に腫瘍細胞表面に高発現しているプロテインジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase; PDI) を介し, 効率よく細胞内へ NO を供給する。²¹⁾ その結果, マウス結腸がん由来細胞 C26 やラット腹水がん由来細胞 LY-80, ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞 K562 など種差やがん種を問わず, アポトーシスを効率的に引き起こす。^{19,22,29,30)} ここで特筆すべきは, Poly-SNO-HSA が従来の Cys-34 位に SNO 化した SNO-HSA とは, 相反する生理活性を有する点である

Fig. 3. Differences in the Mechanisms and Consequences of NO Traffic from SNO-HSA and Poly-SNO-HSA to Cells

NO transfer from the SNO group of Cys-34 on SNO-HSA to the cell is partly mediated by the L-amino acid transporter (L-AT) *via* S-transnitrosation to free low molecular weight thiol. By contrast, NO transfer from Poly-SNO-HSA is mainly mediated by PDI without S-transnitrosation to free low molecular weight thiol. The relatively slow transfer of NO from SNO-HSA avoids the presence of high intracellular NO concentrations and leads to cytoprotective activity through HO-1 induction. On the other hand, the NO influx from Poly-SNO-HSA is very fast and pronounced and leads to cell death caused by apoptosis. We used a slightly modified figure to that proposed in Ref. 21).

(Fig. 3).²¹⁾ 従来の SNO-HSA では, アポトーシスを引き起こすような細胞毒性は, ほとんどみられない。この生理活性の違いは, NO が効率的に細胞内に導入できるか否かで制限されており, すなわち, 先述した細胞膜表面の PDI の基質になるか否かである。結論から言えば, Poly-SNO-HSA は, 細胞膜表面の PDI の基質になるのに対し, SNO-HSA は, 細胞膜表面の PDI の基質にならない。おそらく, SNO-HSA の SNO 化部位である Cys-34 は, HSA 分子表面から奥まった凹みの部分に位置している一方, Poly-SNO-HSA の SNO 化部位は, 表面に露出していることがこの選択性を見出していると思われる。この偶然の発見とも言える Poly-SNO-HSA の PDI リガンド能の特性は, NO 供給のターゲティングにも寄与することが分かってきた。それは, 多くのがん細胞表面の PDI が, 正常細胞の細胞膜表面よりも高発現しているためである。さらに興味深いことに, 腫瘍細胞が免疫回避の手段の 1 つとして獲得している MHC class I chain-related gene A (MICA) の分泌に重要なタンパク質として細胞膜上の PDI が着目されている。³¹⁾

本来は多くの細胞の小胞体に多く分布しているはずの PDI が、がん細胞の膜表面に存在するメカニズムなど、まだまだ不明な部分が多く残されており、今後の研究課題の 1 つであると考えている。

3-2. P-糖タンパク質を介した耐性化における Poly-SNO-HSA の影響 このような細胞内への高い NO 供給能を有する Poly-SNO-HSA の活性に関しては、これまでに興味深い知見がいくつか得られた。¹⁹⁾ まず、臨床でも深刻な問題である抗がん剤多剤耐性の克服に着目した。われわれは、Poly-SNO-HSA の耐性克服剤としての有用性評価を、ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞 K562 のドキソルビシン (doxorubicin; dx) 耐性 (K562/dx) 細胞を用いて *in vivo* と *in vitro* の実験を行ったところ、Poly-SNO-HSA と dx を併用処置することで、dx の抗がん効果の増強が認められた。¹⁹⁾ (Poly-SNO-HSA は、*in vivo* 実験において腫瘍増殖を抑制させることが過去の報告で明らかにされているが、この検討では、Poly-SNO-HSA の耐性克服効果に焦点を当てるため、Poly-SNO-HSA の投与量をあえて減少させ、Poly-SNO-HSA 自身の腫瘍増殖抑制作用が十分に発揮されない条件にて検討した) また、低酸素誘導性の hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) を介したがん細胞の耐性化も報告されているため、低酸素条件下にて Poly-SNO-HSA を添加したところ、Poly-SNO-HSA は低酸素による K562 細胞の耐性化も抑制することが明らかとなった。¹⁹⁾ つまり、Poly-SNO-HSA は耐性を獲得したがん細胞に対する感受性増強効果のみならず、がん細胞が耐性化し始める初期段階でも耐性化を予防し、その有用性を発揮し得ると推察される。

そこで次に、Poly-SNO-HSA による耐性克服メカニズムの解明を試みた。NO の作用機序としては、cGMP 経路を介した間接的作用、及び細胞内タンパク質のニトロ化やニトロソ化などの修飾を介した非酵素的作用が広く知られており、主にこの 2 つの経路で種々の生理作用を示すと考えられている。²⁷⁾ そこで、Poly-SNO-HSA の耐性克服作用メカニズムとして、これらの経路の寄与を検討した結果、Poly-SNO-HSA は cGMP 経路を介し、耐性克服作用を示すことが示唆されたものの、阻害剤や促進剤の効果は限定的であり、あくまでもメカニズムの一部として関与しているものと考えられる。次に、

Poly-SNO-HSA の耐性克服作用に寄与する他の要因を精査すべく、耐性獲得の最も代表的な機序である抗がん剤の細胞外排出機構に着目した。担がんマウスのがん組織並びに細胞を用いて dx 蓄積量を評価したところ、Poly-SNO-HSA は、併用投与した dx の細胞内蓄積量を増加させることが判明した。すなわち、Poly-SNO-HSA はがん細胞への dx 蓄積量を増加させ、抗がん作用を増強させることが示唆された。そこで、抗がん剤の細胞外排出トランスポーターとして最も代表的な P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) の発現量の変動を解析した。Western blotting の結果、K562/dx 細胞では P-gp の発現量が顕著に上昇していたが、Poly-SNO-HSA 処理で発現量の低下が認められた。また、P-gp の発現誘発因子の 1 つに、HIF-1 α の活性化による P-gp 遺伝子の転写活性化が挙げられる。そこで、Poly-SNO-HSA による HIF-1 α の発現変動を Western blotting にて評価した。K562 細胞を低酸素環境で 24 時間反応することで HIF-1 α の発現量は顕著に上昇し、Poly-SNO-HSA 処理で HIF-1 α 発現量の低下が認められた。¹⁹⁾ HIF-1 α 発現量の変動は上述の P-gp の発現量を反映しており、その関連が強く示唆された。おそらく Poly-SNO-HSA から放出した NO が HIF-1 α の水酸化酵素を活性化し、HIF-1 α の分解が促進したものと考えられる。このように Poly-SNO-HSA は HIF-1 α の発現量を低下させることが判明したことから、P-gp のみならず、低酸素微小環境の変化に伴うがんの転移促進、細胞増殖等、多様ながんの増悪因子を抑制する可能性が示唆された。^{19,24)}

3-3. オートファジーを介した耐性化における Poly-SNO-HSA の影響 近年では、がん細胞耐性化におけるオートファジーの関与が多数報告されており、³²⁻³⁸⁾ 既に抗がん剤とオートファジー阻害剤併用の臨床試験が行われていることから臨床におけるオートファジー抑制の重要性が窺い知れる。³⁹⁻⁴²⁾ 中でも血管新生阻害剤であるベバシズマブ (bevacizumab; Bev) は、低酸素誘導性のオートファジーを引き起こし、治療効果が短期かつ限定的となることや長期の延命効果につながらないことがこれまでに報告されている。³³⁻³⁸⁾ しかしながら現在までに耐性化克服の有効な治療法はなく、新規治療薬の開発が切望されている。過去に NO がオート

Fig. 4. Mechanisms of Poly-SNO-HSA as a Safe and Strong Multiple Antitumor Agent

Fast and pronounced transfer of NO from Poly-SNO-HSA into the cell mainly takes place *via* PDI. Within the cell, a high concentration of NO induces apoptosis and reverts dx resistance or hypoxia-induced autophagy by activating a cGMP dependent pathway and HIF-1 α . We used a modified figure to that proposed in Ref. 19).

ファジー制御因子であることが *in vitro* の実験系にて報告されていることから、腫瘍組織への NO デリバリーシステムさえ構築できれば、がん細胞のオートファジー抑制を介して耐性化克服が期待される。そこで、腫瘍集積性を持つ HSA に多分子の NO を搭載した Poly-SNO-HSA を用いて、まず、Poly-SNO-HSA にオートファジー抑制効果があるか否かを、*in vitro* 実験系にてヒト慢性骨髄性白血病由来細胞 K562 及びマウス大腸がん細胞 C26 を用いた低酸素誘導性のオートファジーに対して検討した。その結果、Poly-SNO-HSA は活性型のリン酸化 JNK 及びその下流の Beclin1 の発現抑制を介して、オートファジーを抑制することが明らかとなった。⁴³⁾ その際の Poly-SNO-HSA の濃度は、アポトーシスを引き起こす濃度 (100 μ M 以上) よりも遥かに低い 1 μ M 以下であったことから、アポトーシスとは別な機序に基づくものであると推察された。そこで次に、*in vivo* 実験系にて C26 担がんマウスを用いて Bev の抗腫瘍活性に及ぼす Poly-SNO-HSA の併用効果を評価した。モデルとして、Bev 繰り返し投与により、オートファジーを引き起こした C26 細胞担がんマウスモデルを使用した。その結果、Bev と Poly-SNO-HSA の併用投与は、

Bev 単独投与群と比較し、腫瘍増殖及び肺への転移を有意に抑制した。このときの腫瘍切片を用いた免疫染色を行った結果、Poly-SNO-HSA 併用投与が Bev により促進されたオートファジーを顕著に抑制することが観察された。⁴³⁾ これらのことから、低酸素誘導オートファジーに対しても、Poly-SNO-HSA は、効果的にオートファジーを抑制し、低酸素誘導オートファジーによる耐性化を克服する可能性が示唆された。

以上の結果を踏まえ、がん治療に対する Poly-SNO-HSA の多面的効果を要約したものを示す (Fig. 4)。^{19,43)} このように、Poly-SNO-HSA は、アポトーシス誘導による自身の抗腫瘍効果に加え、多剤排出ポンプ阻害作用やオートファジー抑制作用も併せ持つことから、本知見により多面的な抗腫瘍効果を有する Poly-SNO-HSA の有効性や有用性がさらに高まり、安全かつ効果的な化学療法への応用が益々期待される。

4. おわりに

このように、HSA は、NO といった大変重要な生理活性シグナル分子のキャリアとして、非常に有用であることを見い出してきた。現在、われわれは硫化水素を始め、更なる生理活性ガスのキャリアと

しての応用に着手しており、HSA リガンドの選択肢は非常に多岐に渡るものと考えている。そして何より HSA は、①血中での安定な輸送能や②腫瘍へのターゲティング能、③細胞内取り込み能、④リガンドのコントロールドリリリース能に至るまで、HSA 本来の性質をそのまま利用することができる極めて優れた DDS プラットフォームであり、『Albumin-based nanoparticles Technology』は、DDS の領域で今後益々発展していく分野・技術として、多いに期待できると確信している。

謝辞 共同研究者である前田 浩教授、赤池孝章教授のご助言、ご協力に深謝する。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Peters T. Jr., "All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications," Academic Press, San Diego, 1996.
- 2) "Human Serum Albumin," ed. by Otagiri M., Chuang V. T., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Sojo University Publishing Center, Kumamoto, 2013.
- 3) Ikuta S., Chuang V. T. G., Ishima Y., Nakajou K., Furukawa M., Watanabe H., Maruyama T., Otagiri M., *J. Control. Release*, **147**, 17–23 (2010).
- 4) Tomkin G. H., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **11**, 579–588 (2009).
- 5) Huang Y. S., Chen Z., Chen Y. Q., Ma G. C., Shan J. F., Liu W., Zhou L. F., *J. Pept. Sci.*, **14**, 588–595 (2008).
- 6) Subramanian G. M., Fiscella M., Lamoué-Smith A., Zeuzem S., McHutchison J. G., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1411–1419 (2007).
- 7) Osborn B. L., Sekut L., Corcoran M., Poortman C., Sturm B., Chen G., Mather D., Lin H. L., Parry T. J., *Eur. J. Pharmacol.*, **456**, 149–158 (2002).
- 8) Duttaroy A., Kanakaraj P., Osborn B. L., Schneider H., Pickeral O. K., Chen C., Zhang G., Kaithamana S., Singh M., Schulingkamp R., Crossan D., Bock J., Kaufman T. E., Reavey P., Carey-Barber M., Krishnan S. R., Garcia A., Murphy K., Siskind J. K., McLean M. A., Cheng S., Ruben S., Birse C. E., Blondel O., *Diabetes*, **54**, 251–258 (2005).
- 9) Melder R. J., Osborn B. L., Riccobene T., Kanakaraj P., Wei P., Chen G., Stolow D., Halpern W. G., Migone T. S., Wang Q., Grzegorzewski K. J., Gallant G., *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 535–547 (2005).
- 10) Sheffield W. P., Mamdani A., Hortelano G., Gataiense S., Eltringham-Smith L., Begbie M. E., Leyva R. A., Liaw P. S., Ofosu F. A., *Br. J. Haematol.*, **126**, 565–573 (2004).
- 11) Wang W., Ou Y., Shi Y., *Pharm. Res.*, **21**, 2105–2111 (2004).
- 12) Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- 13) Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A., *J. Control. Release*, **157**, 168–182 (2012).
- 14) Schnitzer J. E., Oh P., *Am. J. Physiol.*, **263**, H1872–H1879 (1992).
- 15) Li C., Li Y., Gao Y., Wei N., Zhao X., Wang C., Li Y., Xiu X., Cui J., *Int. J. Pharm.*, **468**, 15–25 (2014).
- 16) Hawkins M. J., Soon-Shiong P., Desai N., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 876–885 (2008).
- 17) Ishima Y., Fang J., Kragh-Hansen U., Yin H., Liao L., Katayama N., Watanabe H., Kai T., Suenaga A., Maeda H., Otagiri M., Maruyama T., *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2184–2188 (2014).
- 18) Ishima Y., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M., *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 353892 (2013).
- 19) Ishima Y., Hara M., Kragh-Hansen U., Inoue A., Suenaga A., Kai T., Watanabe H., Otagiri M., Maruyama T., *J. Control. Release*, **164**, 1–7 (2012).
- 20) Ishima Y., Chen D., Fang J., Maeda H., Minomo A., Kragh-Hansen U., Kai T., Maruyama T., Otagiri M., *Bioconjug. Chem.*, **23**, 264–271 (2012).
- 21) Ishima Y., Yoshida F., Kragh-Hansen U., Watanabe K., Katayama N., Nakajou K., Akaike T., Kai T., Maruyama T., Otagiri M., *Free Radic. Res.*, **45**, 1196–1206 (2011).
- 22) Katayama N., Nakajou K., Ishima Y., Ikuta S., Yokoe J., Yoshida F., Suenaga A., Maruyama T., Kai T., Otagiri M., *Nitric Oxide*, **22**, 259–265 (2010).
- 23) Prabhakar U., Maeda H., Jain R. K., Sevic-Muraca E. M., Zamboni W., Farokhzad O.

- C., Barry S. T., Gabizon A., Grodzinski P., Blakey D. C., *Cancer Res.*, **73**, 2412–2417 (2013).
- 24) Ishima Y., Fang J., Kragh-Hansen U., Yin H., Liao L., Katayama N., Watanabe H., Kai T., Suenaga A., Maeda H., Otagiri M., Maruyama T., *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2184–2188 (2014).
- 25) Kinoshita R., Ishima Y., Ikeda M., Kragh-Hansen U., Fang J., Nakamura H., Chuang V. T. G., Tanaka R., Maeda H., Kodama A., Watanabe H., Maeda H., Otagiri M., Maruyama T., *J. Control. Release*, **217**, 1–9 (2015).
- 26) Kamphorst J. J., Nofal M., Comisso C., Hackett S. R., Lu W., Grabocka E., Vander Heiden M. G., Miller G., Drebin J. A., Barsagi D., Thompson C. B., Rabinowitz J. D., *Cancer Res.*, **75**, 544–553 (2015).
- 27) Stuehr D. J., Gross S. S., Sakuma I., Levi R., Nathan C. F., *J. Exp. Med.*, **169**, 1011–1020 (1989).
- 28) Laval F., Wink D., *Carcinogenesis*, **15**, 443–447 (1994).
- 29) Katayama N., Nakajou K., Ishima Y., Ikuta S., Yokoe J., Yoshida F., Suenaga A., Maruyama T., Kai T., Otagiri M., *Nitric Oxide*, **22**, 259–265 (2010).
- 30) Katayama N., Nakajou K., Komori H., Uchida K., Yokoe J., Yasui N., Yamamoto H., Kai T., Sato M., Nakagawa T., Takeya M., Maruyama T., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 69–76 (2008).
- 31) Kaiser B. K., Yim D., Chow I. T., Gonzalez S., Dai Z., Mann H. H., Strong R. K., Groh V., Spies T., *Nature*, **447**, 482–486 (2007).
- 32) Sarkar S., Korolchuk V. I., Renna M., Imarisio S., Fleming A., Williams A., Garcia-Arencibia M., Rose C., Luo S., Underwood B. R., Kroemer G., O’Kane C. J., Rubinsztein D. C., *Mol. Cell*, **43**, 19–32 (2011).
- 33) Vredenburg J. J., Desjardins A., Herndon J. E. 2nd, Dowell J. M., Reardon D. A., Quinn J. A., Rich J. N., Sathornsumetee S., Gururangan S., Wagner M., Bigner D. D., Friedman A. H., Friedman H. S., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 1253–1259 (2007).
- 34) Bergers G., Hanahan D., *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 592–603 (2008).
- 35) Jain R. K., *Oncology* (Williston Park), **19**, 7–16 (2005).
- 36) Saltz L. B., Lenz H. J., Kindler H. L., Hochster H. S., Wadler S., Hoff P. M., Kemeny N. E., Hollywood E. M., Gonen M., Quinones M., Morse M., Chen H. X., *J. Clin. Oncol.*, **25**, 4557–4561 (2007).
- 37) Shojaei F., Ferrara N., *Cancer J.*, **13**, 345–348 (2007).
- 38) Kindler H. L., Niedzwiecki D., Hollis D., Sutherland S., Schrag D., Hurwitz H., Innocenti F., Mulcahy M. F., O’Reilly E., Wozniak T. F., Picus J., Bhargava P., Mayer R. J., Schilsky R. L., Goldberg R. M., *J. Clin. Oncol.*, **28**, 3617–3622 (2010).
- 39) Selvakumaran M., Amaravadi R. K., Vasilevskaya I. A., O’Dwyer P. J., *Clin. Cancer Res.*, **19**, 2995–3007 (2013).
- 40) Augustine M. K., Choi M. D., Stefan W., Beth Levine M. D., *N. Engl. J. Med.*, **368**, 651–662 (2013).
- 41) Hu Y. L., DeLay M., Jahangiri A., Molinaro A. M., Rose S. D., Carbonell W. S., Aghi M. K., *Cancer Res.*, **72**, 1773–1783 (2012).
- 42) Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E., *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 961–967 (2007).
- 43) Ishima Y., Inoue A., Fang J., Kinoshita R., Ikeda M., Watanabe H., Maeda H., Otagiri M., Maruyama T., *Cancer Sci.*, **106**, 194–200 (2015).