水溶性高分子の物理化学的特性に基づくがんのセラノスティックス薬剤の創製

佐野 紘平

Development of Cancer-targeted Theranostics Probes Based on the Physicochemical Properties of Water-soluble Macromolecules

Kohei Sano

*Laboratory of Biophysical Chemistry, Kobe Pharmaceutical University;
4-19-1 Motoyama Kitamachi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan.*

(Received September 17, 2019)

Water-soluble macromolecules, such as polymers and monoclonal antibodies, have some advantages, including high water solubility, high biocompatibility, a wide range of molecular weights, and amenability to easy modification through the terminal attachment of functional groups. Although there are many instances in which water-soluble polymers are used as solubilizers and stabilizing agents in the medical sciences, the possibility of water-soluble polymers themselves serving as drug carriers in cancer-targeting theranostics (therapeutic + diagnostic) remains to be elucidated. We developed water-soluble polymers labeled with radioisotopes and fluorescence dyes, and elucidated their usefulness as cancer-targeting imaging probes by evaluating their biodistribution with *in vivo* molecular imaging techniques including nuclear medicine, fluorescence imaging, and photoacoustic imaging. Many water-soluble polymers have some physicochemical properties, such as lower critical solution temperature (LCST), which must be considered as well. We developed cancer-targeting therapeutic compounds by controlling the tumor accumulation of water-soluble polymers based on these physicochemical properties. In this paper, details of the development of cancer-targeting theranostics probes will be discussed.

Key words——water-soluble polymer; theranostics; cancer; drug delivery system

1. はじめに

まず、治療と診断の融合を意味するセラノスティックス (therapeutics + diagnostics) について簡単に説明する。一般に、効率よくがんの治療を実施するためには、術前の高精度な診断が必須となるが、単純にがんを発見し、手術により摘出することがベストな方法であるというわけではない。言わずもがな、良性悪性の鑑別結果など、状況次第で治療方針は大きく異なる。近年、生体内で起きている病態に係わる分子プロセスを画像として捉え、病態を生きたままの状態でも明らかとする技術である‘生体分子イメージング’の研究分野が大きな発展を遂げ、病変部位の画像化による病因の解明研究、創薬研究、臨床診断などの医学研究へ応用されるに至っ

ている。しかしながら、高精度ながんの診断技術 (診断法) が構築できたとしても、それが有効ながん治療に結びついているかという疑問が残る。

セラノスティックスは、診断から得られた情報をいかに治療に結びつけるかに重点をおいた学問領域として近年大きな注目を集めている。¹⁾ ここで、ポジトロン断層撮像 (positron emission tomography; PET) やシングルフォトン断層撮像 (single photon emission computed tomography; SPECT) を利用する核医学分野においては、はるか昔からセラノスティックスの概念が存在している。すなわち、核医学診断には放射性医薬品の投与が必要となるが、例えば、甲状腺がんのがん細胞がヨウ素を取り込む性質を利用し、 γ 線放出核種であるヨウ素-123を用いた SPECT 診断がなされる。この診断で、甲状腺がんへの一定の放射能集積が認められた場合、細胞傷害性を有する β^- 線放出核種であるヨウ素-131 (ヨウ化ナトリウムカプセル) を投与する治療が実施される。診断から治療へとシームレスかつ極めて効率

神戸薬科大学薬品物理化学研究室 (〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1)

e-mail: ksano@kobepharm-u.ac.jp

本総説は、2019年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

よく展開することのできるセラノスティックスの典型例と言える。この核医学の例のように、診断と（ほぼ）同一の薬剤を用いて治療を実施すれば、診断情報に基づく治療，すなわち，診断による治療効果予測だけでなく副作用評価も可能となり，効果的な個別化医療へと展開できるものと考えられる。また，セラノスティックスの形態は様々であり，例えば，高精度な外科的手術を行うために術者を視覚的にサポートし得るプローブ開発や抗がん剤の治療効果判定に資するプローブ開発などが実施されている。筆者は，がんのセラノスティックスに資する薬剤開発が臨床的に有効であると考え，これまで一貫した研究を実施しており，本稿ではそれらの成果について詳述する。

2. 水溶性高分子

筆者は，がんのセラノスティックスに資する薬剤開発を行うにあたり，タンパク質や水溶性ポリマーなどの水溶性高分子を母体化合物として利用することとした。水溶性高分子は，高い水溶性や生体適合性，広範囲の分子量を利用できる利便性，官能基の導入を可能とする修飾簡便性などの利点を有している。また，ある程度の低分子診断薬あるいは治療薬を化学的に導入しても，その物性に大きな影響を与えないと考えられることから，ほぼ同等の物理化学的特性を持つ診断・治療薬を開発することが可能である。

特にポリエチレングリコール（polyethylene glycol; PEG）に代表される水溶性ポリマーについては，不溶性タンパク質の可溶化剤として機能すること，免疫細胞の貪食や生体内酵素の認識を回避できる特徴を有すること，などが明らかとされ，現在では低分子化抗体などの医薬品の可溶化剤や安定化剤として利用されている。また，ナノ粒子製剤の表面を水溶性ポリマーでコーティングすることで，肝臓や脾臓などの細網内皮系への取り込みが抑制され，血中滞留性を改善し得るため，薬物の体内動態制御の観点からも非常に重要な役割を果たすことが広く知られている。しかしながら，臨床でこれほどの使用実績があるにもかかわらず，それ自体が病変部位に集積性を示すドラッグデリバリーシステム（drug delivery system; DDS）キャリアとなり得るかどうかについては全く情報がなかった。筆者らは，PEG,²⁾ ポリオキサゾリン（polyoxazoline; POZ），³⁾

ポリサルコシン（polysarcosine; PSar），⁴⁾ ヒト血清アルブミン⁵⁾について放射性標識体あるいは蛍光標識体を合成し，がん組織の血管内皮細胞間の開口部からがん部位へと送達する enhanced permeability and retention (EPR) 効果に基づくがん集積の可能性について，核医学イメージング及び光音響イメージングの手法を用いて評価を行った。まずは，タンパク質及び水溶性ポリマーを用いた分子イメージングプローブについての研究成果を述べる。

3. プローブ開発

3-1. ヒト血清アルブミン及び水溶性ポリマーを母体とする分子イメージングプローブの開発 主に EPR 効果によるがん集積性を狙い，臨床応用も見据えて，生体適合性の高い水溶性高分子としてヒト血清アルブミンや PEG, PSar, POZ の放射性標識体及び近赤外蛍光色素であるインドシアニングリーン（indocyanine green; ICG）を結合させた蛍光標識体を合成し，SPECT 及び光音響イメージングによる評価を行った。²⁻⁵⁾ なお，光音響イメージング法は，生体組織透過性に優れる近赤外領域の光により励起された光吸収体から生じる音響波（超音波）を検出するもので，光を照射し，光を検出する蛍光イメージング法に比して，体深部の撮像を可能とする体外診断及び術中診断法としての展開が注目されている。^{6,7)} 結果として，Fig. 1 に示すように，いずれのプローブもがん部位のイメージングに成功した。しかしながら，いずれも血中滞留時間が長いことため血液からの信号がノイズとなり，診断までには投与後数日以上の上時間を要することを認めたことから，EPR 効果とは異なる機序で，プローブをがん組織へ集積させる手法の構築が希求された。

3-2. モノクローナル抗体を基盤とする分子プローブを利用する新たな分子イメージング法の構築 そこで筆者は，よりがん特異的な診断を達成する

佐野 紘平

京都府出身。2009 年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程を修了し，博士（薬学）取得。九州大学大学院薬学研究科助教，京都大学大学院薬学研究科特定助教，米国国立がん研究所/米国国立衛生研究所ポスドク，京都大学医学部附属病院助教を経て，2016 年より神戸薬科大学講師（現職）。専門は生体分子イメージング・がんのセラノスティックス。

Fig. 1. Multimodality Imaging of Tumors Using Water-soluble Macromolecules Labeled with Fluorescence Dyes and Radioisotopes

Fig. 2. *In Vivo* Molecular Imaging Based on Two-step Pre-targeting Strategy

ために、がん特異的抗体〔抗膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (membrane type 1 matrix metalloproteinase; MT1-MMP) 抗体〕を母体とする分子プローブの開発研究を進めた.⁸⁾ しかしながら、放射性標識 (^{99m}Tc 標識) 抗体を用いた検討では、上述のヒト血清アルブミンなどと同様に、至適な撮像までのタイミングに長時間を要したことから、ビオチンとストレプトアビジンの高い親和性及び特異性に着目し、プレターゲティング法に基づく撮像法を考案した.^{9,10)} すなわち、Fig. 2 に示すように、一段階目としてストレプトアビジンを結合させた抗体 (抗 MT1-MMP 抗体) を投与し、それが標的分子 (MT1-MMP) に特異的に結合した後に、二段階目として放射性ヨウ素標識ビオチンあるいは常磁性金属 (ガドリニウム) 結合ビオチンを投与した。第二

段階で投与するプローブは、ストレプトアビジンとビオチンの高い結合親和性によるインビボカップリング反応を起こして病変部位に集積する一方で、非標的部位からの速やかなクリアランスが期待されるため、投与後早期からのイメージングが可能になると考えた。なお、MR 造影剤としては、ガドリニウムを水溶性高分子であるデンドリマーに複数結合させることで、感度の指標となるプロトン緩和能の改善を図った。実際、プレターゲティング法を利用した場合、放射性標識抗体を用いた場合と比較して腫瘍対血液比は有意に改善されるとともに、イメージング実験を実施したところ、SPECT/CT イメージング及び MRI にてがんを明瞭に描出することに成功した。これより、生体イメージングへ抗体の利用を可能とする新しい分子プローブ設計法を構築でき

Fig. 3. Photoacoustic Tumor Imaging Using ICG-labeled Polyoxazoline

(A) Chemical structure of ICG-POZ. (B) Photoacoustic imaging of tumors and normal region (back) before and 24 h after injection of ICG-POZ. The graph shows ratio of photoacoustic signal intensity between normal regions and tumor regions.

たとえられた。

3-3. 水溶性ポリマーの物理化学的特性（化学的修飾）を駆使したセラノスティックス薬剤の創製

3-1. で紹介したように、PEG はがん組織へと高く集積した一方で、PEG は ICG を末端に 1 分子しか結合できないことから感度がまだ十分でないこと、また、血中滞留時間が長い血液からの信号がノイズとなり得るといった課題があることを見出した。²⁾ そこで、筆者は PEG と同程度の安全性を有し、1 分子あたりに ICG を多く導入することが可能な水溶性ポリマーである POZ に着目して、POZ を分子プローブの母体として選択し (Fig. 3), ICG との結合体 (POZ-ICG) を合成、その有効性を評価した。³⁾ まず、担がんマウスを用いて体内分布に対する POZ の分子量の影響を評価した結果、分子量の増大に伴う腫瘍集積性の増加及び血中滞留時間の延長を認めた。次に、POZ の側鎖を種々の割合で加水分解した POZ-ICG では、加水分解割合の増加に伴い腫瘍集積は低下することを認めた。また、POZ に複数の ICG を結合させた場合、一定数以上の ICG が結合すると腫瘍集積は低下することを認めた。その結果、分子量 50 kDa かつ加水分解割合 5% の POZ-ICG (ICG/POZ = 8) が、良好な腫瘍集積量及び腫瘍血液比を示すことを見出した。さらに、これを用いた光音響イメージングで、

腫瘍部位選択的な信号の増加を認め、またその増加は投与量並びに腫瘍集積量依存的であった。これにより、開発した POZ-ICG は、先に検討していた PEG を母体とするプローブと比較して、画像コントラストを大きく改善することを見出した。さらに興味深いことに、ポリマーに複数の ICG を導入することで、ICG 濃度あたりの光音響シグナルが増強する現象を見出し、これは励起エネルギーを高効率で光音響シグナルに変換し得るメカニズムとして、今後の光音響プローブ開発に有用な知見となることを明らかとした（メカニズムの詳細については現在検討を進めている）。以上より、POZ に対して複数の ICG 分子を導入した POZ-ICG が、がんの高感度光音響イメージングプローブとして有効である可能性を初めて見出した。

3-4. 水溶性ポリマーの物理化学的特性（下限臨界溶液温度）を駆使したセラノスティックス薬剤の創製 さらに筆者は、水溶性ポリマーの下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature; LCST) をがん組織への薬物送達に活かすことを考えた。水溶性ポリマーである POZ は、先に述べた PEG とは異なり、その組成や分子量に応じて緻密に LCST をコントロールできることが報告されている。¹¹⁾ そこで、POZ の放射性標識体を用いる内用放射線療法への展開を着想し、放射性標識 POZ と温熱療法

Fig. 4. Cancer Theranostics Using Radiolabeled Thermo-responsive Polyoxazoline (LCST: 38°C) Combined with Hyperthermia of Tumors

(A) Concept of cancer theranostics. Under hyperthermia, the radiolabeled POZ can be self-aggregated in the tumors nearby blood vessels. (B) Chemical structure of radiolabeled POZ. (C) Biodistribution of radiolabeled POZ under hyperthermia of tumors. The tumor-specific accumulation of radiolabeled POZ (except kidney) was demonstrated.

の組合せにより、薬剤をがんへ効率的に送達し得る新たな DDS の構築を目指した [Fig. 4(A)].¹²⁾ すなわち、体温 (約 36.5°C) 以上かつ温熱療法適用温度 (42–43°C) 以下の LCST を持つ POZ 誘導体及びその放射性標識体 [Fig. 4(B)] を合成し、がん集積性を評価した。その結果、至適な条件において、非加温時と比較してがん集積性が約 2 倍向上し、正常組織と比較しても 2–3 倍の高いがん特異的な集積を認めた [Fig. 4(C)]。また、その集積には POZ の凝集効果が関与していることを、インビボ共焦点蛍光顕微鏡を用いて明らかにした [Fig. 4(A)]。これにより、薬剤のがんへの集積性を“診る”ことに成功した。さらに、最近の研究において、β⁻線放出核種で標識したプローブの投与とがん部位の加温処置を組み合わせることにより、高いがん治療効果が得られている。この手法は副作用を低減し、治療効果を高め得る新たながん治療ストラテジとなるものと期待される。さらに別研究において、POZ の分子内に様々な機能性分子を化学的に修飾する方法を構築していることから、^{3,13)} 今後 POZ がん標的認識ユニットを導入するなど、がんへの薬物送達量をより向上させる手法を構築できるものと

考えている。

4. おわりに

本研究では、水溶性ポリマーやタンパク質 (抗体、血清アルブミン) などの水溶性高分子をキャリアとするがんのセラノスティックス薬剤の開発についての研究成果を述べた。筆者は、まず、これまでにほとんど評価されてこなかった水溶性ポリマーの薬物キャリアとしての可能性を見出すとともに、物理化学的な手法を駆使して、それらのがん集積性を制御 (増強) することで、それを高精度ながん診断 (Diagnostics) に適用し、さらにはその成果を基盤としたがん治療 (Therapeutics) [セラノスティックス (Theranostics) 研究] へと展開してきた。これまで分断されることの多かった“診断”と“治療”の領域をうまく融合し、より効果的な治療へつなげていくことが期待される。また、水溶性ポリマーの物理化学的特性に基づくがんのセラノスティックス薬剤の開発を進める中で、近年、がん組織へ能動的に集積し得るポリマー (PSar) の存在を見出すなど、水溶性ポリマーは次世代型 DDS キャリアとして幅広く展開できるものと期待している。今後、水溶性ポリマーを基盤とするポリマー薬

学の研究領域を新たに開拓していきたいと考えている。

謝辞 本研究の大部分は、京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野にて行われた研究の成果であり、終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野 佐治英郎特任教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、懇切なるご指導とご教示を頂きました、京都大学大学院薬学研究科 小野正博教授、北海道大学アイソトープ総合センター 久下裕司教授、大阪薬科大学 天満 敬教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田真史教授、京都薬科大学 木村寛之准教授、京都大学再生医科学研究所 東 高志博士、中井隆介博士、京都大学大学院情報学研究科 植崎美智子博士に深く感謝申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたり多大なる貢献を頂きました金崎健吾博士、工藤 喬博士、丁 寧博士、上端純子修士、金田侑子学士を始めとする京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野の教室員一同、キヤノン株式会社の共同研究者の皆様に感謝申し上げます。また、本稿の一部は、神戸薬科大学にて行われた研究成果であり、神戸薬科大学 向 高弘教授、高橋勝史学士並びに教室員一同に心より感謝申し上げます。なお、これらの研究は、文部科学省科学研究費補助金、文部科学省特別経費(プロジェクト分)事業、新エネルギー・産業技術総合開発機構研究開発事業、島津科学技術振興財団、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団の援助の下に実施されたものであり、併せて感謝致します。最後に、私の研究活動を常に支え続けてくれている家族に感謝致します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Ding H., Wu F., *Theranostics*, **2**, 1040–1053 (2012).
- 2) Kanazaki K., Sano K., Makino A., Yamauchi F., Takahashi A., Homma T., Ono M., Saji H., *J. Control. Release*, **226**, 115–123 (2016).
- 3) Kanazaki K., Sano K., Makino A., Homma T., Ono M., Saji H., *Sci. Rep.*, **6**, 33798 (2016).
- 4) Sano K., Ohashi M., Kanazaki K., Makino A., Ding N., Deguchi J., Kanada Y., Ono M., Saji H., *Bioconjug. Chem.*, **28**, 1024–1030 (2017).
- 5) Kanazaki K., Sano K., Makino A., Takahashi A., Deguchi J., Ohashi M., Temma T., Ono M., Saji H., *J. Biomed. Opt.*, **19**, 96002 (2014).
- 6) Ku G., Wang L. V., *Opt. Lett.*, **30**, 507–509 (2005).
- 7) Ntziachristos V., *Nat. Methods*, **7**, 603–614 (2010).
- 8) Temma T., Sano K., Kuge Y., Kamihashi J., Takai N., Ogawa Y., Saji H., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1272–1277 (2009).
- 9) Sano K., Temma T., Kuge Y., Kudo T., Kamihashi J., Zhao S., Saji H., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1589–1595 (2010).
- 10) Sano K., Temma T., Azuma T., Nakai R., Narazaki M., Kuge Y., Saji H., *Mol. Imaging Biol.*, **13**, 1196–1203 (2011).
- 11) Hruby M., Filippov S. K., Panek J., Novakova M., Mackova H., Kucka J., Vetvicka D., Ulbrich K., *Macromol. Biosci.*, **10**, 916–924 (2010).
- 12) Sano K., Kanada Y., Takahashi K., Ding N., Kanazaki K., Mukai T., Ono M., Saji H., *Mol. Pharm.*, **15**, 3997–4003 (2018).
- 13) Sano K., Bao L., Suzuno N., Kannaka K., Yamasaki T., Mune Kane M., Mukai T., *ACS Appl. Polym. Mater.*, **1**, 953–958 (2019).