

## 論文の内容の要旨

論文題目 悪性胸膜中皮腫治療のためのヒアルロン酸を用いた  
抗がん剤送達キャリアの開発

氏 名 天野 由貴

### 第1章 序論

悪性胸膜中皮腫は主にアスベストの曝露により胸膜腫瘍が引き起こされる疾患である。アスベストの曝露から発症までに50年程の長い潜伏期間を有するため、今後更なる患者数の増加が予想され、日本における患者数のピークは2025年に訪れると言われている。化学療法の標準治療はシスプラチン(CDDP)とペメトレキセド(PMX)の2種類の抗がん剤の併用であるが、平均生存期間は極めて短く、僅か12か月に留まる。また、中皮腫患者の5年生存率は10%未満であり、極めて難治性の疾患である膵臓がんにも匹敵する。CDDPとPMXの併用は強い副作用も問題となっており、抗腫瘍効果が高く、副作用の少ない治療法の確立が熱望される。

ヒアルロン酸(HA)はヒトのがん組織の約25%に過剰発現しており、中皮腫においても約40%以上の割合で過剰な発現が見られる。HAは高い水和容量により間質腔を確保し、がん細胞の遊走や浸潤に貢献するとともに、高い粘性により薬剤の送達を妨害することで腫瘍の成長に適した空間を整備する。そのためがん組織ではHAの代謝回転が極めて重要となる。HAの代謝において重要な役割を担うのが細胞表面の受容体CD44である。CD44はがん細胞においてhigh-affinityな状態で存在しており、発現量も豊富なことからがん細胞への薬物送達のための標的として用いられてきた。悪性胸膜中皮腫においてもCD44の発現は豊富である。しかしながら、悪性胸膜中皮腫に対するHAを原料とした薬物キャリアの研究例は乏しい。

本論文では活発なHAの代謝を利用して、難治性の疾患である悪性胸膜中皮腫に対する効果的な抗がん剤送達キャリアを開発することを目的とした。HAに薬剤を担持することによるがん細胞の積極的な薬剤の取り込みを期待し、標準治療薬CDDPおよびPMXのHAベースの薬物キャリアを開発することで薬効の亢進および副作用の低減を目指した。薬物キャリアの設計を行うにあたり、合成の再現性が高く、高い薬物担持能・保持能の実現が期待される、ポリマー薬物コンジュゲートを選択した。そしてHAは分子量

ごとに生体内における役割や受容体との相互作用の強さが異なることに加え、薬物キャリアの分子量は血管透過性、腫瘍内浸透性および滞留性に影響するため、本研究では薬物キャリアの性能を決定するパラメータとして、特にHAの分子量に着目した。

## 第2章 ヒアルロン酸を用いたシスプラチン送達システムの検討

本章では悪性胸膜中皮腫へのHAベースのCDDP送達システムの構築を目指した。本研究室の先行研究である胃がん腹膜播種治療のために開発された、HAナノゲル/HAXハイブリッドを用いたアプローチを試みた。この材料はHAの2液性インジェクタブルゲルであるHAXの中に、CDDPを担持したHAナノゲルを封入したものである。HAナノゲルはCDDPの保持能の向上のために、キレート配位子であるイミノ二酢酸を修飾したHA(HA-IDA)へCDDPを配位している。この材料はナノゲル化によるターゲティング性とゲル封入による滞留性の向上を目指して作製された。悪性胸膜中皮腫においても、腹膜播種同様、CD44の発現が多く、腫瘍の存在する胸腔内への直接投与が可能であることから本材料で治療効果が得られると考えた。本研究では新たに、低分子量から高分子量まで3種類の分子量のナノゲルを作製し、悪性胸膜中皮腫における抗腫瘍効果を評価した。分子量の違いはナノゲルのサイズ、細胞内取り込み能、がん細胞増殖抑制能に影響することが明らかとされた。中分子量 (850 kDa)のナノゲルにおいて、エンドサイトーシス効率が高く、CDDPと匹敵する細胞毒性が達成された。高分子量ほど受容体との相互作用は強くなる一方で、分子サイズが増加するためにエンドサイトーシス効率が低下したと考えられる。また、分子量850 kDaのナノゲルを用いたマウス悪性胸膜中皮腫播種モデルへの胸腔内投与により、フリーのCDDP投与群と比較してHAナノゲル/HAXハイブリッド投与群では有意な生存日数の延長が確認された。

## 第3章 イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸の鉄イオンキレート能および

### 生体適合性の検証

本章では第2章においてCDDPの担持に用いたHA-IDAの生体適合性の評価を行うことを目的とした。分子量850 kDaのHA-IDAをFe<sup>3+</sup>により架橋し形成したハイドロゲル(FeHA-IDA)を癒着防止剤として腹腔内に投与し、その効果を評価した。1990年代後半にHAとFe<sup>3+</sup>から成るハイドロゲル(FeHA)の癒着防止剤 Intergel®が上市されたが、感染症や免疫反応の増加等の副作用を理由に2003年に使用が中止された。この原因として、腹腔内に長期に残存したFeHAによる炎症の惹起が推察された。そのため、生体内からのクリアランスの向上により、毒性の低下を実現できる可能性を考えた。

HA分解酵素によって生じる分子量の変化はIDAの修飾の有無によらず、HA-IDAポリマーのスムーズな分解が確認された。ゲルの貯蔵剛性率はIDA修飾により、未修飾のゲルと比較して10倍高い値となった。また、FeHA-IDAはFeHAと比較して素早い分解および分解後の凝集体形成が生じないことが確認され、FeHA-IDAではポリマー、ゲルとも

にスムーズな排泄が期待された。これらの物性の違いは架橋点構造の違いによると推測した。ヒト中皮細胞株を用いた細胞毒性試験では2日間のインキュベーションによる毒性は見られなかった。ラット盲腸擦過モデルへの投与により、全てのFeHA-IDA投与群において7日後に材料の残存は見られず、コントロール群と有意差はないものの、癒着スコアの低減が確認された。これらの結果から、FeHA-IDAは癒着防止剤として有用な材料になり得ることおよび、HA-IDAポリマーの生体適合性の高さが示唆された。

#### 第4章 ヒアルロン酸を用いたペメトレキセド送達システムの検討

本章ではPMXのHAを用いた悪性胸膜中皮腫への送達システムの構築を目指した。PMXは葉酸代謝拮抗薬の一種であり、還元型葉酸キャリア(RFC)などの葉酸の輸送に関わる、細胞表面のトランスポーターを介して細胞内に取り込まれるため、薬剤自身がターゲティング性を有している。ターゲティングを目的としてHAとPMXを組み合わせた薬物キャリアを開発した初めての報告例である。

HAにアジポジヒドラジドを修飾し、末端のヒドラジド基にNHSエステル化したPMXを反応させることでアミド結合によりPMXを修飾した(HA-ADH-PMX)。76 kDa、130 kDa、850 kDaの3種類の分子量のポリマーを合成したが、850 kDaのHA-ADH-PMXは溶解性が乏しく、本研究の用途では使用が難しかったため、他の2種類のみ評価を行った。PMXはHAへの修飾後においても、葉酸代謝酵素阻害能および細胞増殖抑制能を有することが確認された一方、その効果はフリーのPMXと比較して低下していた。PMXは主に葉酸のトランスポーターを介して細胞に取り込まれるが、HA-ADH-PMXはエンドサイトーシスへと取り込み経路が変化したことで、薬理効果の低下を招いたと考えられる。葉酸代謝酵素阻害能は130 kDa、細胞内取り込み能は76 kDa、細胞毒性は130 kDaの方が高くなっており、PMXは酵素反応阻害剤であるとともに、葉酸レセプターのリガンドとなり得るため、薬理効果はHAの分子量に加えてPMXの担持量に依存している可能性が考えられる。HA-ADH-PMXは*in vitro*ではフリーのPMXと比較して毒性が低かったものの、マウス悪性胸膜中皮腫播種モデルを用いて胸腔内にPMXおよびHA-ADH-PMXを投与したところ、全ての投与群において生存日数に統計的な有意差は見られず、コンジュゲートによる胸腔内滞留性の向上が推察された。PMXのHAへのコンジュゲートによる薬理効果の亢進は確認されなかったが、将来的には、葉酸の発現量が少なく、HAの発現量の多いがん種では効果を示す可能性が考えられる。

#### 第5章 総括と今後の展望

本研究では悪性胸膜中皮腫において代謝が活発なHAを用いて標準治療薬の送達キャリアの開発を行った。本研究は悪性胸膜中皮腫治療のためのHAを用いた薬物キャリア開発の先駆的な例である。HAは中皮腫細胞自身が活発に産生しており、腫瘍組織への薬剤送達のバリアの役割を果たしているが、この腫瘍の性質を利用した薬剤の送達は効

果的なアプローチとなり得ることが示唆された。

今回用いた2種類の薬剤を比較すると、ターゲティング能を有さないCDDPはHAを用いることで送達効率の上昇が見られたが、ターゲティング能を有するPMXは、取り込み経路の変更に伴い、送達効率の減少が示唆された。一方で2種類の薬剤の共通点としては、いずれも治療効果とHAの分子量が密接に関わっており、HAの分子量はHAベースの薬物キャリアを開発する上で重要なパラメータとなることが明らかとなった。

本研究より、HAベースの効果的な薬物キャリアの実現は、HAによる生体適合性の高さおよびターゲティング性から、悪性胸膜中皮腫治療への有望なアプローチとなり得ることが期待される。本研究で扱った腫瘍モデルは腫瘍形成初期に薬剤の投与を行っており、実際の患者では病態が進行した後に発見されることが多いため、腫瘍の進行度に応じた抗腫瘍効果の検討も必要と考えられ、病態と薬剤の治療効果の関係を明らかとすることが今後の課題として挙げられる。