

DEAE-デキストラン-MMAグラフト共重合体をホストとして用い、ゲストのパクリタキセルと成る、超分子複合体(DDMC/P TX)の開発および抗癌メカニズムの研究

○大西 靖彦¹, 江下 優樹², 紀 瑞成³, 小林隆志², 大西 政康¹, 水野 正明⁴, 吉田 純⁵, 石川雄一⁶, 久保田 直治⁷

1 株式会社リ्यूージュサイエンス

2 大分大学医学部感染予防医学講座

3 大分大学医学部生体構造医学講座

4 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

5 独立行政法人労働者健康福祉機構中部労災病院

6 大分大学工学部応用化学科機能物質化学講座

7 大分大学医学部化学講座

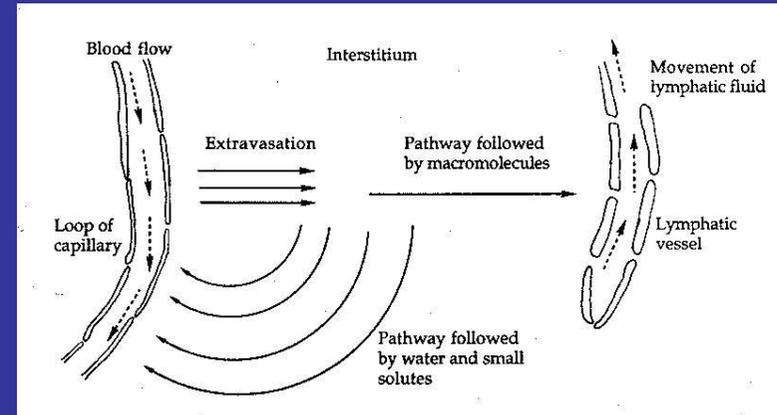
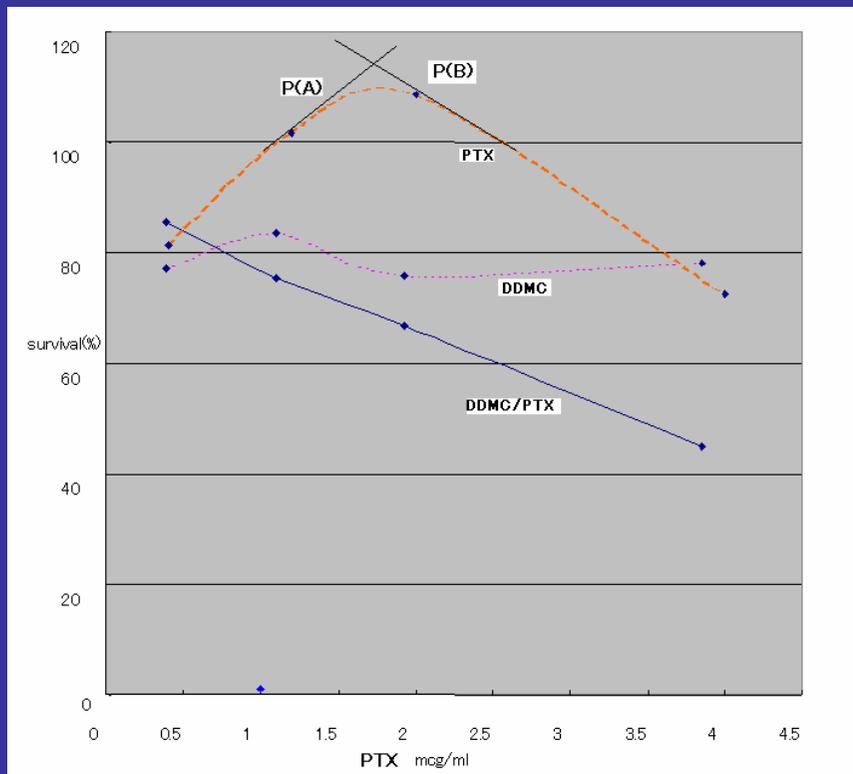
DEAE-デキストラン-MMAグラフト共重合体を宿主として用い、ゲストのパクリタキセルと成る、超分子複合体(DDMC/PTX)の開発および抗癌メカニズムの研究

- ・ 従来の高分子DDSは、貧弱な血管をすり抜けがん細胞に集中的に集まるEPR効果や生体内の免疫システムから逃れるRES回避を可能とし、がん細胞に薬剤を放出するが、DDMC/PTX超分子複合体ではEPR効果やRES回避に加えてがん細胞に至ると一体的に人工酵素のように薬剤が働く事が解った。
- ・ 薬剤耐性を調べるためPTX薬剤耐性を示すメラノーマ細胞を使用して細胞実験を行った結果はPTXに対する薬剤耐性が明らかな凸生存率の曲線に成っているが、DDMC/PTXではメラノーマ細胞に対してほとんど耐薬剤性(MDR)を示さず、細胞死滅率とPTX濃度の関係が直線のMichaelis-Menten型を示し、PTX含量が低濃度でも有効であり、アロステリック促進酵素反応と同じ選択的触媒反応であることが観察された。
- ・ マウスを用いた動物実験では、生存率で見るとDDMC/PTXはゲスト役のパクリタキセル(PTX)の2倍もの大きな奏効性を示した。DDMC/PTXはマクロファージM1からM2の分化を抑制し新生リンパ管形成を抑制して、がん細胞の遠隔転移を抑えている事がわかった。これはDDMCの糖鎖であるデキストラン α -1,6グルコシド結合が寄与すると推測する。

従来の高分子DDS(貧弱な血管をすり抜けがん細胞に集中的に集まるEPR効果や生体内の免疫システムから逃れるRES回避)と異なるDDMC/PTX超分子複合体

EPR効果

Survival of B16F10 melanoma cells treated with paclitaxel or the DDMC-paclitaxel complex for 48 hours determined using the MTT (WST8) method



EPR効果では、薬剤の粒子径数10~200nmで腫瘍組織へ集積



The reticuloendothelial system (RES)

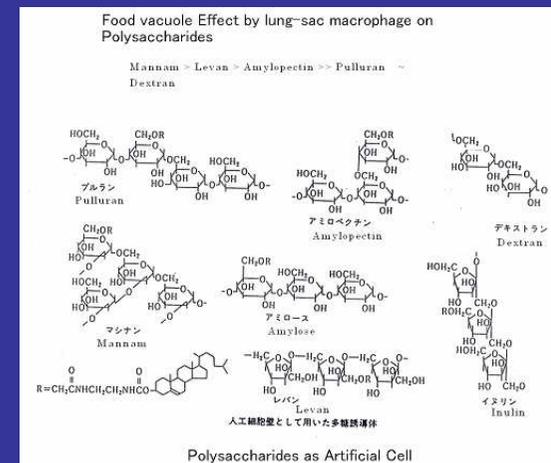
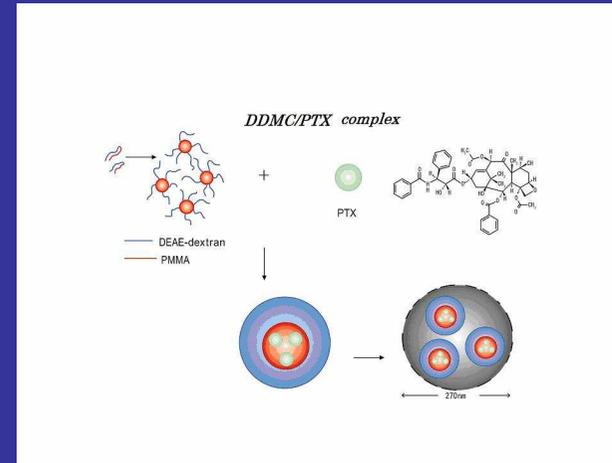
親水性: PEG 糖鎖

粒径: RES抑制では肝臓のクッパー細胞や副腎のマクロファージ系の細胞によって粒子径400nm以上のものを異物として食食作用により排除している。

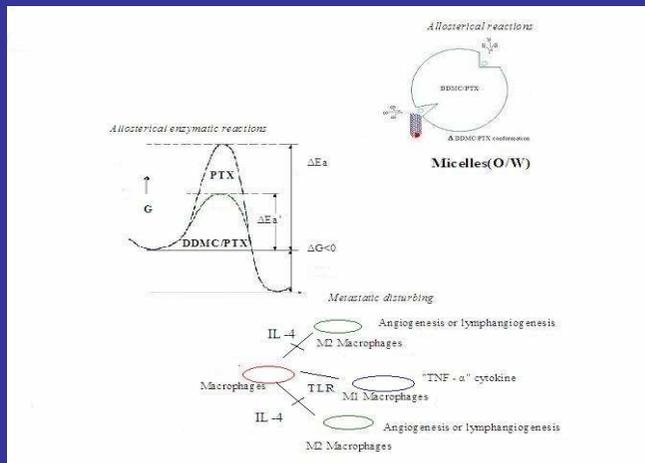
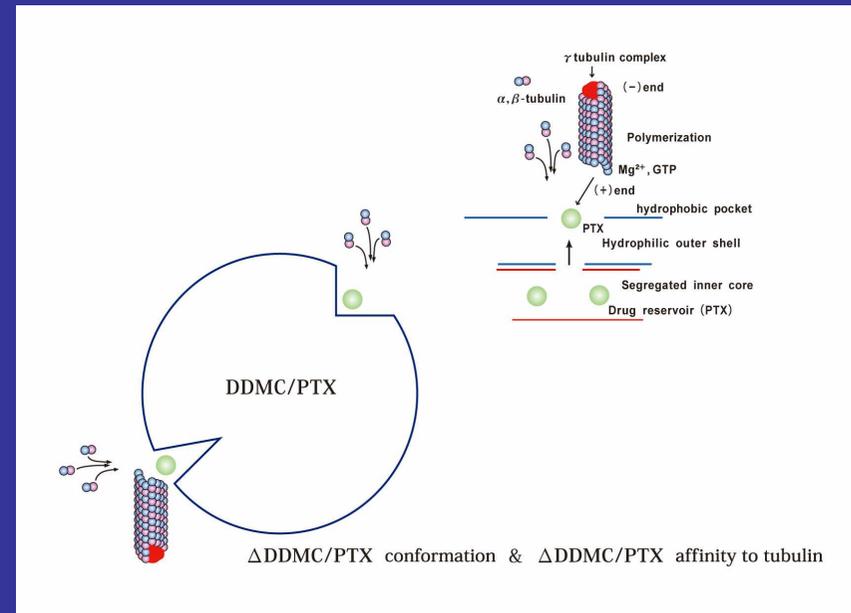
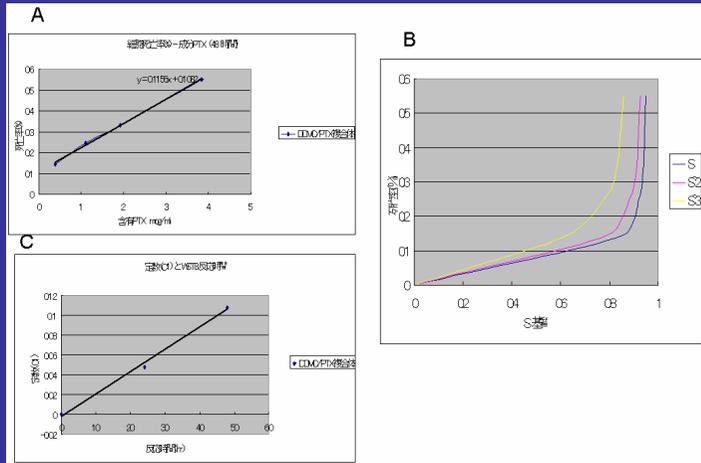
RES(細網内皮系)回避

DEAE-デキストラン-MMAグラフト共重合体をホストとして用い、ゲストのパクリタキセルと成る、超分子複合体(DDMC/PTX)

- DEAE-デキストランを幹ポリマーにPMMAを枝ポリマーとする共重合体とPTXの超分子である。
- DEAE-デキストラン部を親水ドメイン、枝ポリマーPMMA部を疎水ドメインとする親水-疎水マイクロ相分離構造を形成する高分子ミセル(DDMC)にPTXは包摂される。粒径は80nm
- DDMCは非常に安定で、オートクレーブ滅菌(121°C 15min)が可能。
- DDMC/PTXは既存のDDSなどとは異なり、DDMC/PTX複合体は細胞内で分解されず、そのまま超分子として薬効を表していると考えられる。
- デキストランは菌体細胞壁に存在しないので、DDMC/PTXのRES (reticuloendothelial system)など免疫回避に寄与している(既存の生分解ポリマーと大きく異なる)。

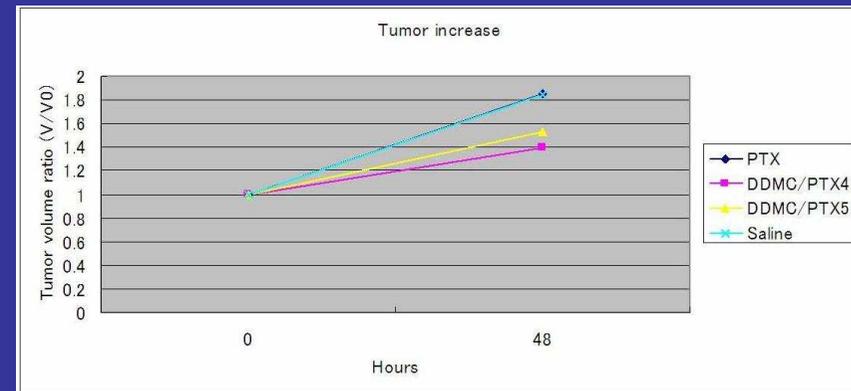


人工酵素、アロステリック環境での抗癌メカニズム

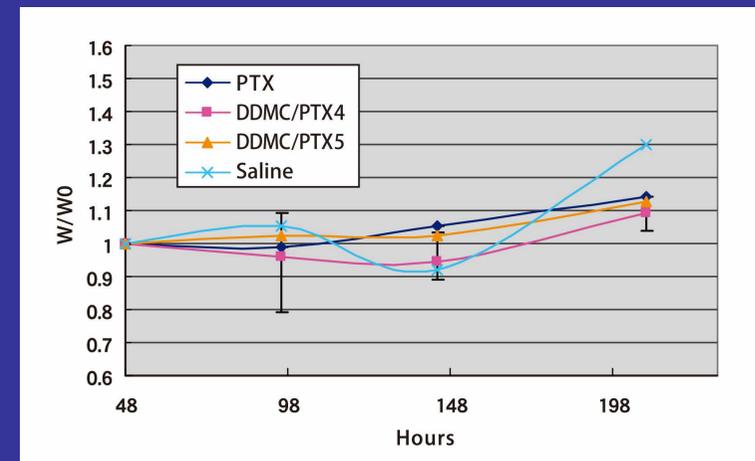


DDMC/PTXの薬理効果

- 投与後24時間くらいからPTX4あるいはPTX5のDDMC/PTX群のマウスでは腫瘍の形状が円から楕円へと変化した(細胞骨格変化)。
- 投与から48時間後の腫瘍増加率を示す。PTXは殆んど効果ないが、DDMC/PTX4は46%に、DDMC/PTX5は63%にそれぞれ低下させている(p<0.3)。
- DMC/PTX4群のマウスは生存して、腫瘍サイズも縮小して、皮膚出血、治癒しつつある状態も観察できた。これはマクロファージの腫瘍壊死因子「TNF- α 」サイトカインの放出と思われる腫瘍の出血性壊死の症状であった。
- DDMC/PTX複合体の薬理作用はM2マクロファージの腫瘍補助作用を抑えて、癌の増殖を抑制する。
- 超分子体DDMC/PTXを用いれば、大きなチューブリン基質選択性とアロステリック作用で反応性を高め、チューブリン変異の存在やグルタチオン仲介機構による癌細胞のMDRに十分対抗できる事を示唆している



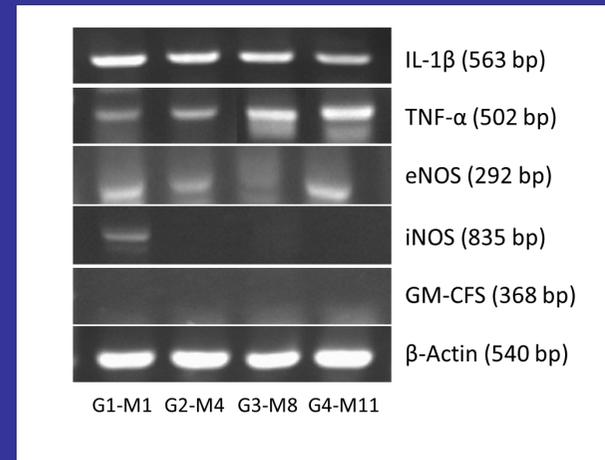
腫瘍の大きさ変化



体重変化

DDMC/PTXの炎症誘発性サイトカイン

- 炎症時におけるインターロイキンIL-1 β は全面的に発現。
- TNF- α はDDMC/PTX4のG3と生食G4で活発に発現。
- DDMC/PTX4群のマウスは生存して、腫瘍サイズも縮小して皮膚出血、治癒しつつある状態であったので、これはマクロファージの腫瘍壊死因子「TNF- α 」サイトカインの放出によるがんの出血性壊死の症状であった事と一致。
- パクリタキセルはM1マクロファージを誘導してIL1 β 、GM-CSF、TNF α のような炎症誘発性サイトカインおよび過酸化物質NO(NOS)を分泌させるというが、M2マクロファージ分化に関連しては、DDMC/PTXの炎症誘発性サイトカインは極めて少ないと考えられる。
- 常時細胞内に一定量存在する血管新生作用を有する血管内皮型のeNOSはDDMC/PTXのG2、G3で少なく、炎症やストレスにより誘導されるiNOSはPTXのG1でわずかに観察。
- 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子GM-CFSは全面的に発現せず(原因不明)。
- β -アクチンは全面的に活発に発現している(同じ量のタンパク質を担保)ので本実験の正当性を示す。これらの実験結果は概ねDDMC/PTX自身もともとステルス性を有し、分解されにくい事から異物認識化されにくく、脱メチル化酵素Jmjd3経路によるM1マクロファージのM2マクロファージ分化が起きにくいとする事を支持していると見る



DDMC-PTXの腫瘍の遠隔リンパ行性転移抑制

- 肺におけるリンパ管観察した結果からみると、DDMC-PTX4Gグループにはリンパ管の数と面積が減り、
- リンパ管の分数 (lymphatic fraction) にも反映してる。
- このグループが腫瘍のリンパ行性転移を抑制できることが強く示唆される。

Table 1

Lymphatic Fraction of a visual field

	Sample	SUM	Average	Variance
PTX	23	0.488574	0.021242	0.000179
DDMC/PTX4	15	0.264186	0.017612	2.99E-05
DDMC/PTX5	27	0.553068	0.020484	6.47E-05
Saline	25	0.597973	0.023919	7.98E-05

Table 2

Lympho vessel density:LVD (1/mm²)

Groups	Sample	SUM	Average	Variance
PTX	23	342.6187	14.89646	34.72552
DDMC/PTX4	15	157.3508	10.49005	11.83921
DDMC/PTX5	27	400.9908	14.85151	24.13089
Saline	25	342.6187	13.70475	18.78631

Table 3

Sectional area of a lymphatic vessel: SA

	Sample	SUM	Average	Variance
PTX	23	0.021302	0.000926(0.0926%)	8.11E-07
DDMC/PTX4	15	0.022444	0.001496(0.1496%)	2.02E-06
DDMC/PTX5	27	0.019463	0.000721(0.0721%)	1.67E-07
Saline	25	0.023821	0.000953(0.0953%)	2.2E-07

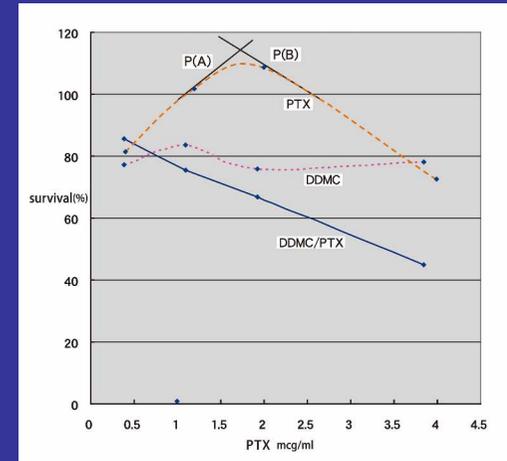
臨床試験への期待

- 図AはWST8テスト法による細胞生存率試験であり、パクリタキセル (PTX) 耐性のメラノーマB16F10細胞を用いた。PTX単体では薬効は低いが、超分子DDMC/PTX複合体では低濃度から高い薬効を示す (従来のDDSでは見られない)。
- 図BはメラノーマB16F10細胞を用いたDDMC/ PTX超分子複合体のマウス使用のin-vivo抗癌試験 (寿命) であり、DDMC/PTXはゲスト役のPTXの2倍もの大きな奏効性を示した ($p < 0.03$)

(出典はいずれもOnishi et al, The Beilstein Journal of Nanotechnology 2014;5:2293-307.)

パクリタキセルは21世紀最強の制癌剤と言われ、多くの癌の標準治療として幅広く使用されている。超分子DDMC/PTX複合体は人工酵素のごとくPTXの効能を飛躍的に増強している。ゆえに、臨床試験に於いては、安全性と飛躍的な薬剤効果が期待できることから、本提案は安価で飛躍的な薬剤開発につながり、社会的影響が大であると考えられる。

A



B

