薬 剤 学, **68** (1), 27–31 (2008)

≪若手研究者紹介≫

癌転移抑制を目的とした活性酸素消去酵素デリバリーシステムの開発

兵 頭 健 治 Kenji Hyodo
エーザイ株式会社 製剤研究所

1. は じ め に

癌転移及びそれに伴う癌の再発は，癌患者の生命を脅かす最大の要因である．近年，多くの過程が複雑に絡み合った結果として生じる癌転移のメカニズムが徐々に明らかとされ，転移抑制を目的として各過程の抑制法の開発が進められている．しかしながら，癌細胞の多様性からその効果は癌細胞の性質に左右されることが多く，一般的に適用可能な抑制法はいまだに確立されていない．その一方で，活性酸素が種々の癌転移過程に複雑に関与し，多くの癌腫で癌転移を亢進させることが明らかとされつつある．そこで，活性酸素を効率よく消去する catalase や superoxide dismutase などの酵素の利用が検討されているものの，その効果は十分とは言い難い．その主な理由として，抑制メカニズムに関する情報が断片的であり，それぞれを生体内に適用した場合の詳細が明らかではないことが挙げられる．投与された酵素が十分な癌転移抑制効果を発揮するためには活性酸素発生部位に到達することが必須であり，ドラッグデリバリーシステム（DDS）の適用により活性酸素消去酵素の体内動態を時間的・空間的に制御することが必要不可欠である．本稿では筆者が大学院在学中に行った catalase デリバリーによる癌転移抑制研究について紹介させて頂く．

筆者紹介：平成 14 年京都大学薬学部総合薬学科卒業，平成 16 年京都大学大学院薬学研究科修士課程修了，平成 19 年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了．同年エーザイ株式会社入社，現在に至る．研究のモットー：患者にとって価値のある技術開発．趣味：F1 観戦，ゴルフ，美味しいビール．

2. レポーター遺伝子を利用した癌転移解析法の開発

癌転移は多くの過程を経ることにより成立する（図 1）[1]．効率的な DDS の開発には，癌細胞の毛細血管への塞栓・血管内皮細胞への接着，間質への浸潤，増殖等の転移の素過程を組織レベルで分離評価可能な解析法が必要である．そこで筆者は，まず癌転移の複雑な過程の中から，接着，浸潤及び増殖過程を分離し，各過程を定量的に解析することを可能とする実験評価系の確立を試みた．マウス由来メラノーマ細胞株 B16-BL6 および結腸癌細胞株 colon26 に firefly luciferase 遺伝子を導入することでレポーター遺伝子安定発現癌細胞株（B16-BL6/Luc および colon26/Luc）を樹立した．得られた安定発現株のうち，luciferase 遺伝子発現活性が高く，また形質および転移能が親細胞株と同等のものを選択し，以降の検討に用いた．樹立した癌細胞株の luciferase 活性は癌細胞数と広範囲において比例し，得られた関係式から換算すると，組織 1 g 中 400 個程度の癌細胞があれば検出が可能な評価系を創出することに成功した．そこで，B16-BL6/Luc 細胞を血管内に注入後，流域下の臓器中における luciferase 活性を経時的に測定することで，癌原発巣から血管内へ脱出後の癌細胞の体内動態を検討した．その結果，血管内に投与された癌細胞の 60 ～ 90% は肺に塞栓的に集積し，投与 24 時間以内に生き残った 3% 程度の癌細胞が内皮細胞へ接着すること，さらにはその後標的臓器への浸潤を完了し，指数関数的に増殖することが示唆された（図 2）[2]．また，臨床においては原発

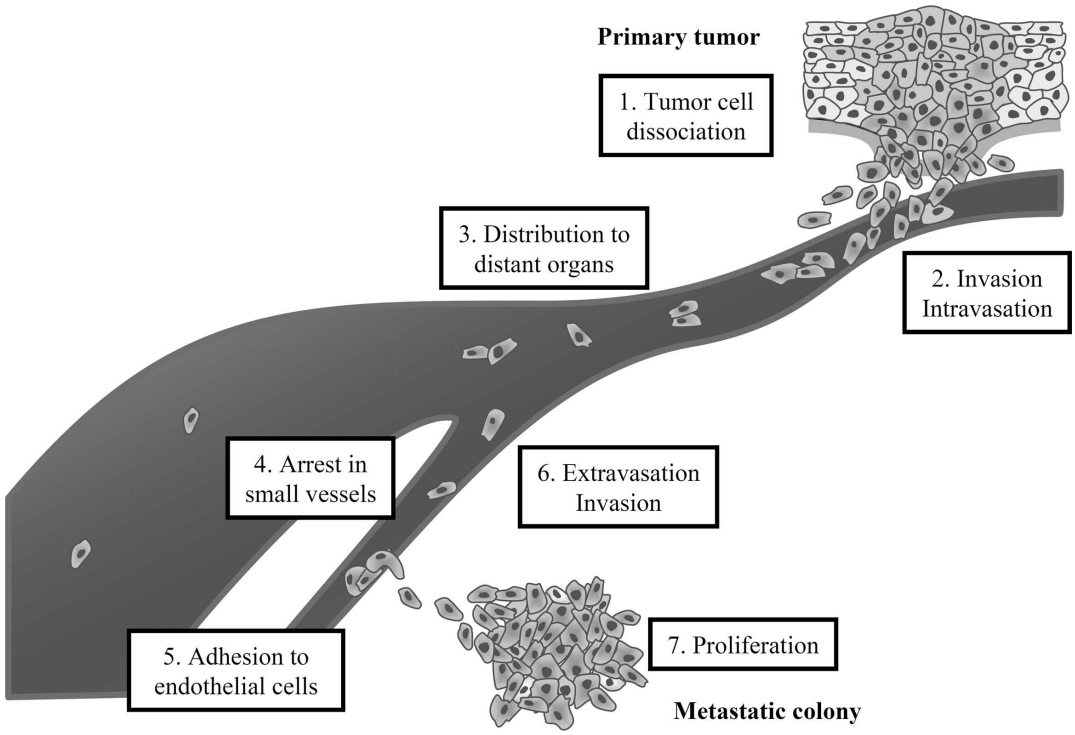

図 1　転移巣形成までのステップ

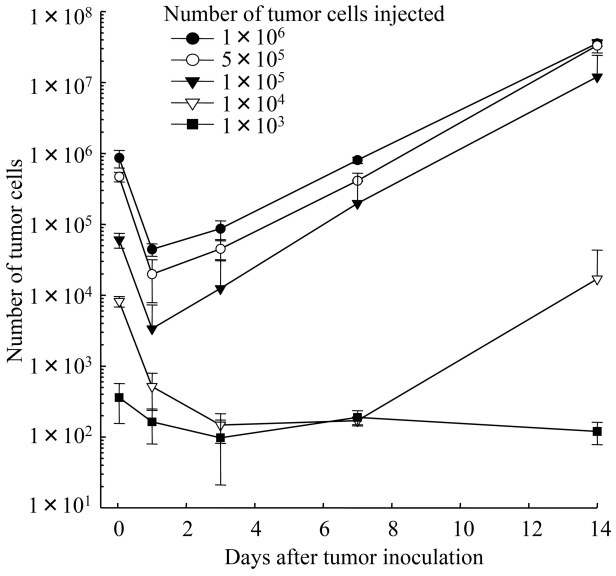

図 2　B16-BL6/Luc メラノーマ細胞を C57BL/6 マウス静脈内に投与後の肺における癌細胞数推移

腫瘍を外科切除後に，転移巣で再発が起こりやすいことがしばしば問題となっているが，こうした事象に関しても本評価系を用い，検討を行った．原発巣として皮下に B16-BL6/Luc 細胞を移植し，肺への自然転移モデルを作成することで，原発巣を切除後の転移巣における癌細胞増殖に対する速度論的解析を行った．その結果，原発巣の切除により肺において急激な癌細胞の増殖が観察され，切除後の 1 週間で癌細胞数は約 1000 倍となることが明らかとなった[3]．さらに，複雑な組織構造のためにこれまで定量的評価が困難であった腹膜播種性転移においても本評価系は適用可能であり，経時的に解析した結果，腹腔内に播種された癌細胞が選択的に大網（主に脂肪でできた膜で，胃の下から垂れ下がり，リンパ組織である乳斑が数多く存在）に集積すること，腹壁の創傷部位付近での癌細胞増殖が著しく速いことが明らかとなった[4]．以上のように，レポーター遺伝子導入癌細胞を用いることにより，従来困難であった癌転移過程の分離評価，増殖の速度論的解析，組織分布評価などが可能となった．

3. 腹腔内滞留型 catalase 誘導体による腹膜播種性癌転移の抑制

胃癌は日本の癌腫の中では最も頻度の高いものであり，その死因のほとんどは腹膜播種性癌転移である．腹膜播種性癌転移は臓器の漿膜を突き破り腹腔内に浸潤した癌細胞や，手術の際に腹腔内にこぼれ落ちた癌細胞が標的組織で増殖することにより成立する．腹膜播種性癌転移治療においては，抗癌剤などの水溶性低分子は腹腔内から全身循環への吸収が速やかであるため奏功し難く，いまだ有効な治療法は開発されていない．catalase を利用した腹腔内癌

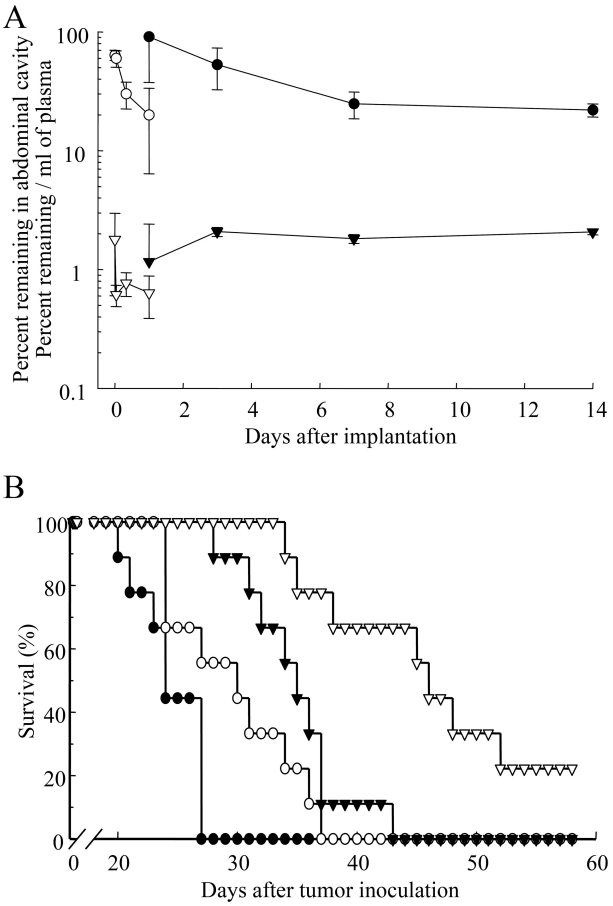

図 3　A）^{111}In 標識 ED-catalase を腹腔内に投与後の組織分布．○：ED-catalase 水溶液投与時の腹腔内残存率，●：ED-catalase/hydrogel 投与時の腹腔内残存率，▽ ED-catalase 水溶液投与時の血漿中残存率，▼：ED-catalase/hydrogel 投与時の血漿中残存率．B）colon 26 結腸癌細胞（5×10^4 個）を腹腔内投与後の生存日数．●：生理食塩水投与，○：生理食塩水 /hydrogel 投与，▼：ED-catalase 水溶液投与，▽ ED-catalase/hydrogel 投与．

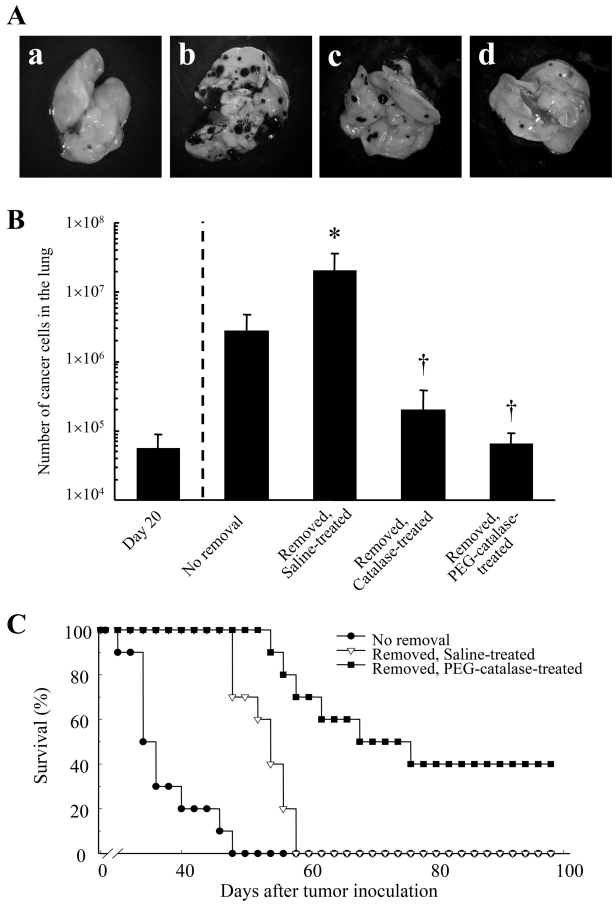

図 4　原発巣切除後の転移巣での急激な癌細胞増殖に対する catalase 誘導体の効果

原発巣として B16-BL6/Luc 細胞（2×10^5 個）を foot-pad に移植し，20 日後に原発巣を切除した．切除 1 週間後の肺表面結節，肺中癌細胞数および生存日数を評価した．A，a）原発巣非切除，b）原発巣切除・生理食塩水投与，c）原発巣切除・catalase 投与，d）原発巣切除・PEG-catalase 投与．B，原発巣切除 1 週間後の肺中癌細胞数．C，生存日数．

細胞の接着抑制の報告もあるが，腹腔内での滞留時間が短いこともあり十分な治療効果は得られていない．そこで筆者らは，catalase に対しポリエチレングリコール（PEG）修飾を施すことで分子量を増大させること，あるいは正電荷を持つエチレンジアミン（ED）を結合させ負電荷を有する細胞膜との静電的相互作用により腹腔内滞留性を向上させることによる効果増強を試みた．PEG-catalase および ED-catalase は未修飾の catalase と比較して腹腔内滞留時間が大幅に上昇し，腹膜播種性癌転移を効率的に抑制した[4,5]．また，さらなる徐放化を実現するために，ゼラチンハイドロゲルを用いたところ腹腔内滞留性が約 40 倍増大し，癌細胞増殖を 10 分の 1 以下にまで低下させるとともに顕著な延命効果が得られた（図 3）[6]．こうした catalase 誘導体による腹膜播種性癌転移に対する効果は，ICAM-1 の発現および matrix metalloproteinases の活性化を抑制することによるものであることが示唆された．

4．血中滞留型 catalase 誘導体による血行性転移抑制および原発巣切除後の微小転移巣での癌細胞増殖抑制

原発腫瘍から血管内へ侵入後の癌細胞が，転移巣を形成する各過程に対する catalase 誘導体の効果について検討を行った．癌細胞を静脈内に投与する直前に血中滞留型 PEG-catalase を静脈内投与することにより，24 時間後の肺における癌細胞数は PEG-catalase の投与量依存的に減少した．また，

癌細胞が浸潤過程にある投与1日後または増殖過程にある3日後にPEG-catalaseを投与した場合にも癌細胞数は生理食塩水投与群と比較して有意に少なく，catalase誘導体は癌細胞の接着だけではなく浸潤や増殖過程にも影響することが示唆された．そこで，肺転移の完全抑制を目的にPEG-catalaseを静脈内に連日投与した結果，癌細胞投与2週間後においても肺表面に転移性の結節は認められず，catalaseデリバリーによるtumor dormancy誘導の可能性が示された[2]．また，癌細胞を皮下に移植し，肺転移を生じさせる自然転移モデルにおいては，原発巣を切除することにより血中脂質過酸化物濃度が有意に上昇し，切除により活性酸素が産生されることが示された．さらに，原発巣の切除により肺転移巣で癌細胞が急激に増殖したが，原発巣切除直前にPEG-catalaseを単回投与することにより血中脂質過酸化物濃度の上昇は抑制され，切除1週間後での肺転移巣中癌細胞数は生理食塩水処理時の約300分の1にまで減少し，その後の生存日数も有意に延長された（図4）[3]．これらのことから，catalase誘導体は原発巣切除後の微小転移巣での癌細胞増殖を効率的に抑制することが示された．

5. catalase誘導体による転移抑制機構の解明

catalase誘導体による転移抑制機構の解明を目的に，転写因子NF-κBの活性を定量的に評価可能な解析法の開発を試みた[7]．NF-κBは活性酸素をはじめとする種々の刺激により活性化され，癌転移を促進する様々な分子の発現を亢進することが知られている．NF-κBの活性化によりfirefly luciferaseを発現するpNF-κB-LucとNF-κB活性非依存的にrenilla luciferaseを発現するpRL-SV40を選択し，両プラスミドDNAをB16-BL6細胞に導入することで安定発現株を作成した．firefly luciferaseとrenilla luciferaseの発現量の比を指標にNF-κB活性を評価したところ，静脈内投与8時間後における肺での癌細胞中NF-κB活性はPEG-catalaseの投与量依存的に減少した．また，原発巣切除により肺転移巣中の癌細胞NF-κB活性は増加したが，PEG-catalaseの投与によりその活性化は有意に抑制された．そこでこのNF-κB活性化により発現が亢進し，癌転移を促進する因子の変動をreal-time PCRおよびWestern blottingにより評価したところ，癌細胞の接着・増殖に関与するICAM-1，EGFRの発現変動が認められた．以上の結果より，癌転移過程において活性酸素が産生され，それによってNF-κBが活性化すること，さらにはNF-κBの活性化により癌転移を促進する接着分子や増殖因子の発現が亢進することが示された．また，これらの発現亢進を抑制することがcatalase誘導体の転移抑制機構に深く関与することが示された．

6. おわりに

以上，癌転移抑制法の開発に不可欠な癌細胞の体内分布および増殖，さらには癌細胞内のNF-κB活性を定量的に解析可能な評価系を開発し，癌転移過程を分離評価することに成功した．また本評価系を用いた癌転移抑制に関する検討から，catalase誘導体の体内動態を最適化することで癌転移を効率的に抑制することに成功した．以上のように，catalase誘導体は単独で用いた際にも十分な癌転移抑制効果を発揮するが，抗癌剤と併用した際にも抗癌剤の作用を減弱することなく副作用を低減することが可能であり[8]，臨床使用においても有用性の高いものであると考えられる．筆者は現在，エーザイ株式会社製剤研究所において，これまでの経験を生かしながら，抗癌剤のDDS研究を行っている．

本研究を遂行するにあたり，御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科・橋田 充教授，西川元也准教授，山下富義准教授，川上茂助教，京都大学再生医科学研究所・田畑泰彦教授に深謝するとともに，研究に御協力頂きました大学院生の方々に感謝致します．

引用文献

1) M. Nishikawa, K. Hyoudou, Y. Kobayashi, Y. Umeyama, Y. Takakura, M. Hashida, Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes, *J. Control. Release*, **109**, 101–107 (2005).
2) K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Umeyama, Y. Kobayashi, F. Yamashita, M. Hashida, Inhibition of metastatic tumor growth in mouse lung by repeated administration of polyethylene glycol-conjugated catalase: Quantitative analysis with firefly luciferase-expressing melanoma cells, *Clin. Cancer Res.*, **10**, 7685–7691 (2004).
3) K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Umeyama, F. Yamashita, M. Hashida, PEGylated

catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal, *Free Radic. Biol. Med*., **41**, 1449–1458 (2006).
4) K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Kuramoto, F. Yamashita, M. Hashida, Inhibition of adhesion and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells by pegylated catalase, *Clin. Exp. Metastasis*, **23**, 269–278 (2006).
5) K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, S. Mukai, M. Ikemura, Y. Kuramoto, F. Yamashita, M. Hashida, Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by cationized catalase in mice, *J. Control. Release*, **119**, 121–127 (2007).
6) K. Hyoudou, M. Nishikawa, M. Ikemura, Y. Kobayashi, A. Mendelsohn, N. Miyazaki, Y. Tabata, F. Yamashita, M. Hashida, Cationized catalase-loaded hydrogel for growth inhibition of peritoneally disseminated tumor cells, *J. Control. Release*, **122**, 151–158 (2007).
7) K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Kuramoto, F. Yamashita, M. Hashida, Analysis of *in vivo* nuclear factor-kappaB activation during liver inflammation in mice: Prevention by catalase delivery, *Mol. Pharmacol*., **71**, 446–453 (2007).
8) S.F. Ma, M. Nishikawa, K. Hyoudou, R. Takahashi, M. Ikemura, Y. Kobayashi, F. Yamashita, M. Hashida, Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity, *Kidney Int*. (in press).