

がんの特異的代謝に着目したがん標的化システムの構築

東京工業大学 資源化学研究所 高分子材料部門
西山 伸宏

1. 目的

現在、抗がん剤の世界市場の上位3位が抗体医薬で占められているように、抗体、ペプチド等のリガンド分子を利用したがん標的治療は極めて有効なアプローチであるが、がん特異的かつ汎用性に優れたターゲティング技術は未だ確立されていないのが現状である。また、がん細胞は、多様性と不均一性 (heterogeneity) を有することから、従来のターゲティング技術では、治療できないがん細胞が生き残り、耐性を生じるという問題がある。そこで本研究では、がん細胞の表面に結合する物質Xを高分子に結合した新規がん細胞ターゲティング用合成リガンド(図1)を開発することを目的とした。

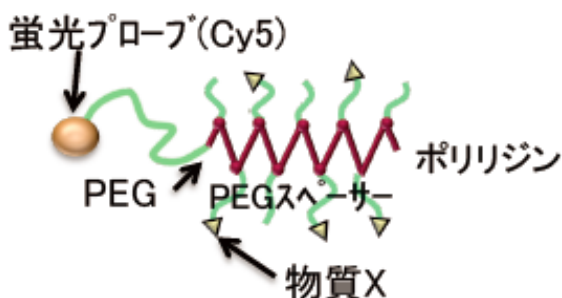


図1.
がん細胞
ターゲティング用
合成リガンド分子
の設計

2. 方法

1) がん細胞ターゲティング用合成リガンド分子の合成

ω末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール(PEG)を開始剤としてN ϵ -トリフルオロアセチル-L-リジンのN-カルボン酸無水物を開環重合し、TFA基を脱保護することによって、PEG-ポリ(L-リジン)ブロック共重合体を得た。その後、側鎖のアミノ基にPEGスパーサーを導入し、物質Xを結合することによって、目的とする合成リガンドを合成した。合成したポリマーは、¹H-NMRおよびゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)により評価した。

2) がん細胞ターゲティング用合成リガンド分子の機能評価

本研究では、がん細胞として、ヒト肝がんHepG2細胞、ヒト膵がんBxPC3細胞、ヒト肺がんA549細胞を使用した。まず、それぞれの細胞に関して、物質Xが結合するレセプターYの発現量をELISAアッセイにより評価した。次に、蛍光色素で標識した合成リガンド分子のがん細胞による取り込みをフローサイトメトリーにより評価した。本実験では、がん細胞の代謝の効果を評価するために、4°Cと37°Cで行い、物質X共存下での取り込み試験も実施した。合成リガンド分子のin vivo機能は、HepG2細胞の皮下腫瘍にリガンド分子を局所投与し、腫瘍での滞留性をホモジナイズした腫瘍組織中の蛍光強度を測定することにより検証した。

3. 結果

1) がん細胞ターゲティング用合成リガンド分子の合成

PEG-ポリ(N ϵ -トリフルオロアセチル-L-リジン)ブロック共重合体の¹H-NMRおよびGPCチャートを図2に示す。得られたポリマーの分子量分布が1.2以下であり、ポリ(L-リジン)の重合度は41であった。また、側鎖に導入した物質Xの数は34個であった。

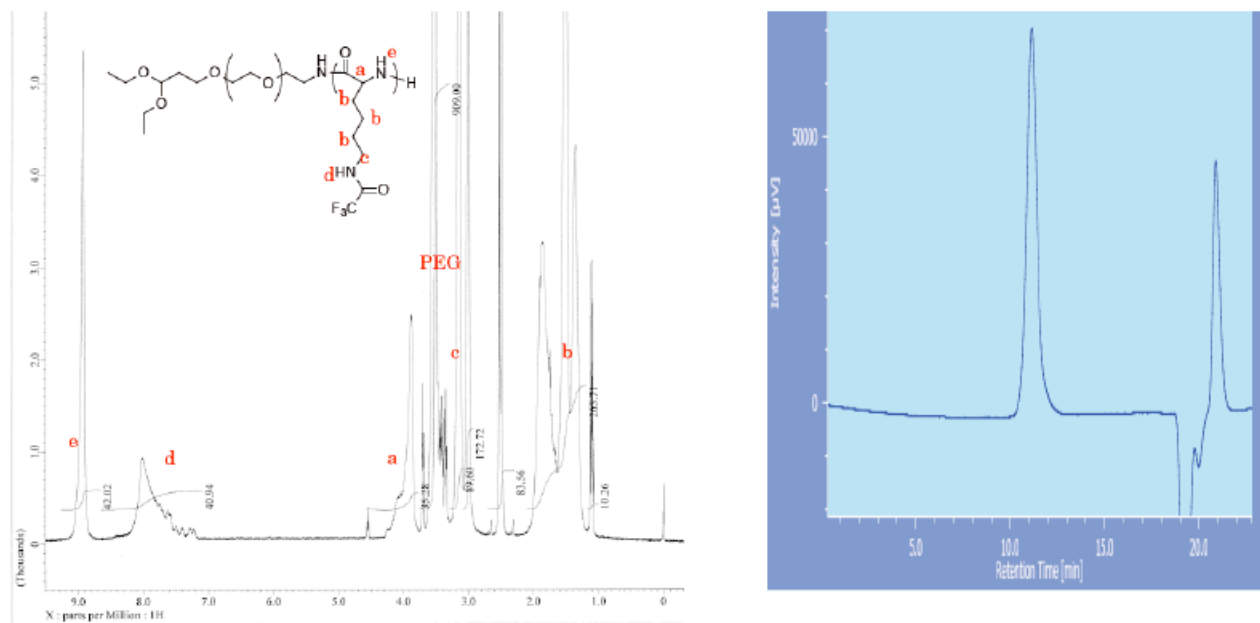


図2. ブロック共重合体の¹H-NMR(左)とGPCチャート(右)

2) がん細胞ターゲティング用合成リガンド分子の機能評価

まず、物質Xが結合するレセプターYの発現量をELISAアッセイにより評価したところ、HepG2細胞、BxPC3細胞、A549細胞のすべてのがん細胞がヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と比較して6-8倍のレセプターYを発現していることが明らかになった。

次に、合成リガンドのがん細胞による取り込み量をフローサイトメトリーにより評価したところ、コントロールリガンドと比較して、合成リガンドは8-10倍の取り込み量を示した。合成リガンドの細胞内取り込みには温度依存性が見られ、4℃と比較して37℃において取り込み量が增大することが確認された。さらにフリーの物質X共存下における合成リガンドの細胞内取り込み量を評価したところ、合成リガンドとフリーの物質Xが競合することにより取り込み量が減少することが予想されたが、予想に反して合成リガンドの取り込み量が20-30倍に増大することが確認された。4℃では、そのような取り込みの増大が確認されなかったことから、リガンド分子の内在化が寄与していることが示唆された。

合成リガンドのin vivo機能を評価するために、HepG2細胞の皮下腫瘍にリガンド分子を局所投与し、腫瘍での滞留性を評価した。その結果、コントロールリガンドは48時間以内にそのほとんどが腫瘍から消失したが、合成リガンドは腫瘍内に滞留することが明らかになった。

4. 考察

本研究では、合成高分子を基盤としてがん細胞に結合する物質Xを結合することにより新規がん細胞ターゲティング用リガンド分子を構築した。このリガンド分子は、生物合成が必要な抗体等と比較して、安価かつ簡便に合成することが可能であり、品質管理も容易であることから高い有用性が期待できる。本研究では、合成リガンド分子の由来の異なる種々のがん細胞による取り込みを評価したところ、すべてのがん細胞において物質XのレセプターYが過剰発現しており、合成リガンド分子はコントロールリガンドと比較してすべてのがん細胞に効率的に取り込まれることが確認された。さらに、フリーの物質X共存下における合成リガンドの細胞内取り

込み量を評価したところ、合成リガンド分子の取り込みが増大するという予想に反した結果が得られた。この取り込み増大のメカニズムに関しては、現在、検討中であるが、物質XおよびレセプターYに関連するこれまでに知られていない機序の関与が考えられ、取り込み量が20-30倍に増大したことはリガンド分子として高い有用性が期待できる。そこで、合成リガンド分子を腫瘍内に局所投与し、腫瘍内における滞留性を評価したところ、コントロールリガンドと比較して長期に滞留することが確認され、予備検討ではあるものの、新規リガンド分子としての有用性が示唆された。

今後の計画に関しては、合成リガンド分子の細胞内取り込みのメカニズムを明らかにする一方で、全身投与における腫瘍集積性の評価を行い、高分子の組成や分子量、さらには物質Xの結合量の最適化を行う。優れたがん特異的集積が確認されたリガンド分子に関しては、ガドリニウム錯体および光増感剤(クロリンe6)を結合し、それぞれ固形がんのMRIおよびがんの光線力学治療(PDT)へと応用することを考えている。

5. 参考文献

なし