

分岐鎖オリゴグリセロールを用いた
新規水溶性カンプトテシン誘導体の
ヒト肺がんモデルマウスに対する効果の検討

2020

伊勢(土橋) 有希

目次

第1章 序論	3
第2章 新規水溶性カンプトテシン誘導体の肺がんに対する抗腫瘍効果の検討	6
第1節 背景	7
第2節 実験方法	14
2.2.1. 使用した試薬	14
2.2.2. 細胞培養	15
2.2.3. 細胞生存率の測定	15
2.2.4. 担癌ヌードマウスモデルの作成	16
2.2.5. 担癌ヌードマウスモデルにおける腫瘍径の測定	16
2.2.6. 糞便評価	17
2.2.7. 組織学的評価	17
2.2.8. Ex vivo における化合物の代謝分析	18
2.2.9. UPLC による各サンプルのピーク時間、ピーク面積の解析	19
2.2.10. HPLC による各サンプルの水溶性の検討	19
2.2.11. 1-オクタノール/水分配係数の値と水溶性の評価	20
2.2.12. 逆相 HPLC による早期代謝物の分離	21

2.2.13. 統計処理	22
第3節 結果	23
2.3.1. SN38-BGLの水溶性の検討	23
2.3.2. SN38-BGLの肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果	26
2.3.3. 担癌ヌードマウスモデルにおけるSN38-BGLの抗腫瘍効果	29
2.3.4. SN38-BGLの下痢の発症の評価	33
2.3.5. SN38-BGL投与時の小腸に関する組織学的評価	36
2.3.6. SN38-BGLの肝ミクロソームによる代謝に関する検討	38
第4節 考察	44
第3章 参考文献	53
謝辞	58

本論文では、以下の略語を用いた。

PTX	Paclitaxel (パクリタキセル)
CPT-11	Irinotecan hydrochloride hydrate (イリノテカン塩酸塩水和物)
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UDP グルクロン酸 転移酵素)
BGL	Branched oligoglycerols (分岐鎖オリゴグリセロール)
FBS	fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3- (4, 5-ジメチル-チアゾール-2-イル) -2, 5-ジフェニルテトラゾ リウムブロマイド)
s.c.	subcutaneous injection (皮下注射)
i.p.	intraperitoneal injection; (腹腔内注射)
HPLC	High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラ フ)
UPLC	Ultra performance liquid chromatography (超高速高分離液体クロ マトグラフ)
HE 染色	Hematoxilin-eosin 染色 (ヘマトキシリン-エオシン染色)

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスヒドロキシメチルアミノメタン) (緩衝剤)
TFA	Trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
PBS	Phosphate buffered salts (リン酸緩衝生理食塩水)
PEG	polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)

第 1 章

序論

<概要>

カンプトテシンはトポイソメラーゼ I を阻害し、DNA 合成を妨げることでアポトーシスを引き起こすことにより、さまざまな癌に対して幅広い抗腫瘍スペクトルを持つ強力な抗癌剤であるにもかかわらず、難水溶性のため現在臨床使用されていない。この点を改善したのがカンプトテシンの親水性誘導体の 1 つである CPT-11 (イリノテカン) であり、白血病や肺がんなどのがんの治療に広く使用されている。しかし、CPT-11 の水溶性は十分でなく、その活性代謝物である SN38 の腸管再吸収による遅発性下痢に加えて、コリンエステラーゼの非特異的阻害により早発性下痢を引き起こすことが言われている。そのため、CPT-11 の利点を最大限に引き出すために、疎水性分子に親水性を付与する独自の戦略として開発してきた分岐鎖オリゴグリセロールと SN38 を結合した新規の親水性カンプトテシン誘導体 (SN38-BGL) を設計し、合成した。SN38-BGL は CPT-11 と比較して、肺がん移植モデルマウスでは同等またはわずかに強い腫瘍抑制効果を示した。さらに、早期性または遅発性の下痢においては SN38-BGL を投与した際、CPT-11 投与群ほどは観察されなかった。空腸と回腸の絨毛の長さは、CPT-11 を投与した際の絨毛よりも長く、SN38-BGL は CPT-11 よりも副作用である腸管障害が軽減されることが示唆された。肝臓ミクロソームによる *ex vivo* では、SN38 の産物は確認できなかったが、予想に反して別の代謝産物が得られた。結論として、SN38-BGL は、重度の下痢を引

き起こすことなく、新規の水溶性カンプトテシン誘導体としての有用性が期待できる。

第 2 章

新規水溶性カンプトテシン誘導体の

ヒト肺がんモデルマウスに対する効果の検討

第1節 背景

生物学的利用率および組織分布を含む薬物動態は、in vivo における薬効の重要な決定要因のひとつである。また、医薬品開発において親水性と疎水性の適切なバランスを考慮することは適切な薬物動態を実現するために必要である。

カンプトテシン [図 1 A] は、カンレンボクから単離されたキノリンアルカロイドである。トポイソメラーゼ I と DNA の共有結合複合体との相互作用に平面的構造が必要であり、カンプトテシンは 5 つの環状構造が連なった平面構造をしていることからカンプトテシンの共存により共有結合複合体の複合体の安定化が必要以上に高まり、その結果、トポイソメラーゼ I の活性が阻害され、アポトーシス誘導により白血病や肺癌などに対して顕著な抗腫瘍活性を示すと考えられている。しかし、カンプトテシンは親水性部分のない平面構造のため水に対する溶解性が極めて低く、出血性膀胱炎などの強い消化管障害、強い骨髄抑制が見られたため臨床現場での使用はされていない。カンプトテシンの活性を保持し、かつ毒性を軽減した誘導体の合成研究が進められていく中で、SN-38 [図 1B] が顕著な活性を有することが見出された。しかしながら SN38 は難水溶性であるため、さらなる可溶化の研究が進められた。その結果、SN38 を化学的に可溶化したカンプトテシン水溶性誘導体としてイリノテカン (CPT-11) [図 1C] が開発された。現在は、カンプトテシン水溶性誘導体としてイリノテカン (CPT-11) とトポテカン (ノギテカン) の 2

つのみが承認され、臨床現場で使用されている。

CPT-11 は大腸がん、肺がんなどの治療に有効なカンプトテシン誘導体として臨床的に広く使われており、WHO 必須医薬品モデル・リストにも挙げられている。

CPT-11 はそれ自体でも効果はあるが、主に肝臓でカルボキシエステラーゼにより活性代謝産物 SN38 へと変換されるプロドラッグである。SN38 は CPT-11 の約 100 - 1000 倍の抗腫瘍効果をもつことが報告されている。¹ SN38 は肝臓の代謝酵素である UGT1A1 によりグルクロン酸抱合を受け、SN38 グルクロン酸抱合体 (SN38-G、SN38-グルクロニド) [図 1 D] となり、主に胆汁中に排泄される。しかし、SN38-G の一部は腸内細菌の持つ β -グルクロニダーゼにより脱抱合され、SN38 に変換されるとともに消化管で再吸収されることが分かっている。²⁻³

CPT-11 投与時の副作用として知られる下痢は臨床上で深刻な問題となっている。CPT-11 投与時に見られる下痢には 2 種類あり、早期性下痢と遅発性下痢がある。前述したように脱抱合を受けた SN38 が腸上皮細胞を障害することにより起こると言われている重篤な下痢は遅発性下痢として知られている。²⁻³ また、CPT-11 自体が早発性下痢を引き起こすと言われている。早期性下痢が起きる主な原因として CPT-11 自体がコリンエステラーゼの非特異的阻害することでコリン作動性を示すことが考えられている。

肺がんは世界中において癌関連疾患のうち最も罹患率が多く、死亡率も高い疾患

(~1.76 百万人/年) である。また、肺がんは罹患数、死亡数ともにそれほど差がみられないことから予後不良である。⁴⁻⁵ 肺がんは小細胞肺がんと非小細胞肺がんに分類される。非小細胞肺がんは腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんに分類される。非小細胞肺がんの発症率は約 85% で小細胞肺がんの発症率は約 15% である。⁶ 特に腺がんの発生率が高く、男性の 40%、女性の 70% を占める。化学療法は非小細胞肺がん、小細胞肺がんの両方に適用される。化学療法は一般的に白金製剤やタキソールやカンプトテシン誘導体のような抗ガン剤を組み合わせで行われる。⁷⁻⁸ また化学療法は放射線療法と併用されることも多い。⁹ 小細胞肺がんは非常に増殖が速く、様々な部位に転移しやすいため、化学療法が一般的な治療とされている。一方で、初期の非小細胞肺がんには外科的治療が適用される。したがって、カンプトテシンの利用効率の向上ならびに小細胞肺がんへの効能展開が囑望されている。

CPT-11 の水溶性は、カンプトテシンと比較すると相対的に向上した。それでもなお CPT-11 の水溶性は低いため、副作用の軽減、薬効の向上を目的とした PEG 修飾された SN38 製剤のようなカンプトテシン水溶性誘導体が開発されている。¹⁰⁻

19

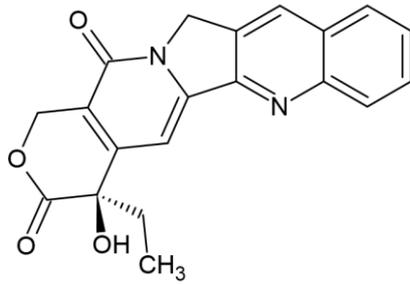
当研究室では分岐鎖グリセロール (BGL) を難溶性化合物に結合させることで水溶性の改善を図ることに成功している。²⁰⁻²¹ 臨床現場で使用されている難水溶性薬物として知られているフェノフィブラートは、この分岐鎖オリゴグリセロール

[BGL003, 図 1G] を修飾させることにより、水溶性が 2000 倍以上、脂質低下作用が 10 倍以上向上した。²² また、同様に難水溶性抗がん剤として知られる PTX (パクリタキセル) に対して同様に分岐鎖オリゴグリセロール (BGL003) を修飾させると、水溶性と抗腫瘍効果が向上した。²³ さらに、当研究室では BGL が細胞レベル、動物レベルにおいてが安全性に優れている化合物であることを報告している。

24-25

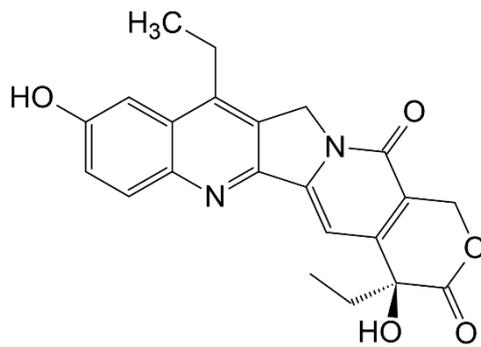
本研究では、SN38 の難水溶性について解決するために BGL003 を修飾した新規水溶性カンプトテシン誘導体として 2 種類の SN38-BGL A [図 1E]、SN38-BGL B [図 1F] を合成した。そして、SN38 の難水溶性を改善した化合物という点で SN38-BGL 体の類似体として考えられる CPT-11 と比較検討を行った。薬効の評価には、培養細胞のほか、ヒト肺がん細胞移植モデルとして、非小細胞肺がんおよび小細胞肺がんを代表的な固形腫瘍として使用した。その結果、SN38-BGL 誘導体は CPT-11 と比較すると水溶性が向上し、下痢や腸障害を軽減、そして抗腫瘍効果はほぼ同等という結果が得られたので報告する。

A



Camptothecin
MW 348.35

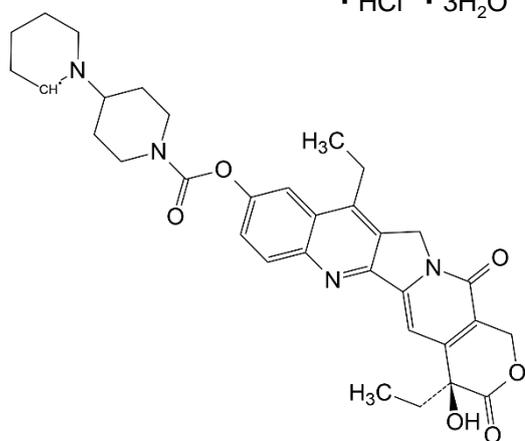
B



SN38
MW 392.41

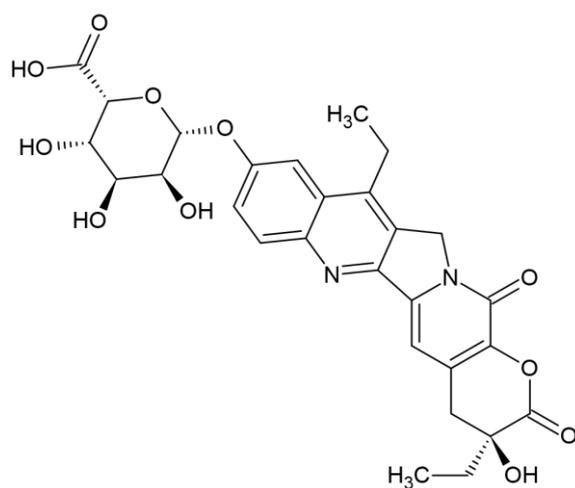
C

· HCl · 3H₂O



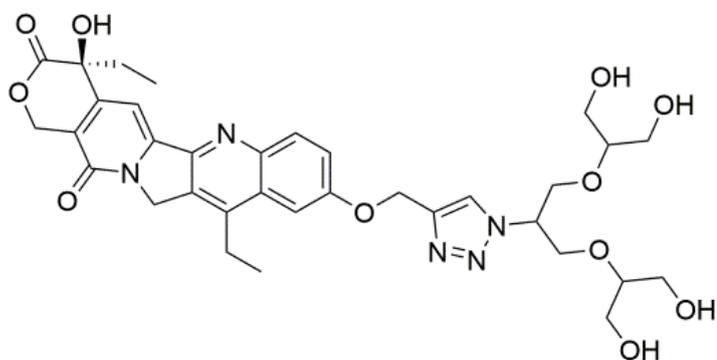
CPT-11
MW 677.18

D



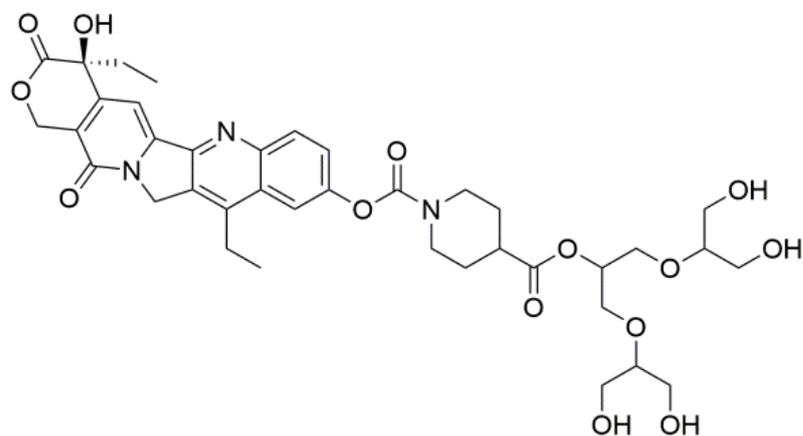
SN38-G
MW 586.53

E



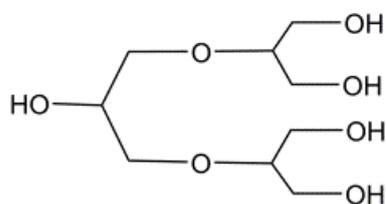
SN38-BGL A
MW 695.72

F



SN38-BGL B
MW 769.79

G



BGL003
MW 240.25

図1 各化合物の構造式および分子量

(A) Camptotecin (B) SN38 (C) CPT-11 (D) SN38-G (E) SN38-BGL A (F) SN38-BGL B (G) BGL003

第2節 実験方法

2.2.1. 使用した試薬

SN38-BGLA ((S)-4-(1,3-bis((1,3-dihydroxypropan-2-yl)oxy)propan-2-yl)1-(4,11-diethyl-4-hydroxy-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-1H-pyrano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-9-yl)piperidine-1,4-dicarboxylate) 、
SN38-BGL B ((S)-9-((1-(1,3-bis((1,3-dihydroxypropan-2-yl)oxy)propan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4,11-diethyl-4-hydroxy-1,12-dihydro-14H-pyrano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H)-dione) は徳島大学 機能分子合成薬学分野の根本尚夫准教授より供与された。CPT-11(7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin) は大鵬薬品工業株式会社から購入し、SN38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) は (株) ヤクルト本社 (東京、日本) から供与を受けた。[図1 B-F] アセトニトリル、ヘマトキシリン溶液、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。DMSO、MTT 試薬は、Sigma-Aldrich (ミズーリ州, 米国) から購入した。パラホルムアルデヒド (PFA) は東京化成株式会社 (東京、日本) から購入した。エオシンは、キシダ化学株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) の特級品を購入して用いた。

2.2.2 細胞培養

細胞に関しては、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549, ヒト肺扁平上皮癌細胞株 NCI-H520, ヒト肺大細胞癌細胞株 NCI-H1299、およびヒト小細胞肺癌細胞株 NCI-H196 細胞は ATCC (バージニア州, 米国) から購入し、ヒト小細胞肺癌細胞株 SBC5、および SBC3 細胞は、徳島大学大学院医歯薬研究部 呼吸器・膠原病内科学分野から供与を受けた。

細胞は 10 % fetal bovine serum (FBS) (ナカライテスク株式会社)、1 % penicillin/streptomycin を含んだ RPMI 1640 (ナカライテスク株式会社) を用いて、37 °C、95 % air - 5 % CO₂ の条件下でインキュベートし、70–80% コンフルエントになるまで培養を行った。

2.2.3. 細胞生存率の測定

96 well プレートに細胞 (2×10^3 個/well) を 100 μ L/well で播種し、37°C 95 % air - 5 % CO₂ で 24 時間インキュベートし、RPMI 1640 培地で希釈した試薬で処置し更に 48 時間インキュベートした。²⁶⁻²⁷ 上清除去後 MTT 試薬を加え、再び 2 時間インキュベート後、上清を除去し 100 μ L の DMSO を加えてホルマザンを溶解し、分光光度計 (kinetic microplate reader SOFTmax[®]PRO, Molecular Devices Japan K.K, 東京、日本) を用いて波長 600 nm で生成したホルマザン由来の吸光度を測定

した。Control には試薬と等量の培地を加え、細胞生存率は control (100 %) に対する cell viability (%) として求めた。さらにその cell viability を用いて、細胞障害に対する IC₅₀ を算出した。

2.2.4. 担癌ヌードマウスモデルの作成

実験には、6 週齢の雄性 BALB/cAJc1-nu/nu マウス（ヌードマウス）を日本クレア株式会社（大阪、日本）から購入し用いた。実験動物は、室温 22±2°C、12 時間の明暗サイクルで飼育し、飲水及び餌は自由摂取とした。ヒト肺癌細胞株のうちのヒト腺癌細胞株の A549、ヒト小細胞癌細胞株の SBC5 腫瘍細胞を PBS で懸濁し、2×10⁶ 個/100 μL/匹を皮下移植 (s.c.) し、肺癌移植モデルマウスとした。^{11, 13-14, 28-29} (承認番号：徳動物 12124)

2.2.5. 担癌ヌードマウスモデルにおける腫瘍径の測定

ヌードマウスを 8 群に分け、control 群として担癌ヌードマウス群とし、control (生食) 群、CPT-11 投与群、SN38-BGL A 投与群、SN38-BGL B 投与群に分け、それぞれ n=10 とした。試薬投与群に関しては、さらに低投与群、高投与群の 2 つに分けた。群は、低投与群 (0.03 μmol/kg) では CPT-11 の投与量 2 mg/kg に対して、SN38-BGL A は 2.27 mg/kg, SN38-BGL B は 2.05 mg/kg と mol 量が等しくなるよ

うに設定した。同様に高投与群 (0.3 $\mu\text{mol/kg}$) と設定した。腫瘍面積 (Tumor area) $> 20 \text{ mm}^2$ となったときを day 0 (播種 1 週間後) とし、調製した試薬を 100 μL ずつ 1 週間に 2 回、2 週間腹腔内投与 (i.p.) し、その都度、体重、tumor area (mm^2) を測定した。Tumor area (mm^2) は $\text{Tumor area (mm}^2\text{)} = \text{longest (mm)} \times \text{shortest (mm)}$ で算出し、投与終了後も 1 週間計測した。

2.2.6. 糞便評価

動物には 6 週齢の雄性 BALB/cCrSlc (日本 SLC 株式会社、静岡、日本) を用いた。評価対象化合物投与初日を day 0 とし、各化合物を一週間投与した翌日の day 8 まですべて毎日、下痢の重症度を観察した。下痢スコアは早期性下痢の評価として投与後 1 時間後、また遅発性下痢の評価として翌日の投与時に下痢評価を行った。下痢スコアは Kurita らの論文³⁰⁻³¹を参考にし、スコア 0 (通常便)、スコア 1 (軟様便)、スコア 2 (中等度の下痢)、スコア 3 (重度の下痢) とした。

2.2.7. 組織学的評価

投与最終日の翌日に解剖を行い、小腸組織 (空腸、回腸) を回収し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後、サンプルをパラフィン包埋し、全自動ロータリーマイクローム MICROM HM360 (ZEISS, 大阪, 日本) を用いて 5 μm で薄

切した。脱パラフィン処理後、HE 染色を行った。光学顕微鏡で観察し、image J を用いて各サンプルの絨毛の長さを測定した。^{26-27, 29-30, 32-35}

2.2.8. Ex vivo における化合物の代謝分析

肝ミクロソームは 8 週齢の雄性 SD ラット（日本チャールス・リバー株式会社、神奈川、日本）を解剖し、肝臓を摘出して調製した。実際にはポッター型ホモジナイザー攪拌機（アズワン株式会社、大阪、日本）を用いて、氷冷下で肝臓重量の 3 倍量の 1.15 % KCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) とともにラット肝臓をホモジナイズした。ホモジネートサンプルは遠心 (8,000×g, 60 min, 4°C) し、上清を回収後、液体窒素下で用時まで保存した。解凍後、超遠心 (10,5000×g, 1.05 hr, 4°C) を行い、上清を取り除いたのち、肝ミクロソーム画分であるペレットを回収し、氷冷 1.15 % KCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) でホモジナイズを再び行った。²² 代謝分析実験では肝ミクロソーム濃度を 65 mg protein /mL になるように調製し、更に酵素失活させるために 98 °C で 15 min, 加熱処理を行った。評価対象各化合物である CPT-11、SN38-BGL A、SN38-BGL B は最終濃度が 8.57 mM となるように調製し、肝ミクロソーム 300 μL (加熱処理有り、または無し) と NADPH (適量) を加えて 37°C、24 時間インキュベートを行った。それらのサンプルを cut off 分子量 3,000 の遠心フィルター (Amicon® Ultra cel-3K (アイルランド)) で限外濾過したのちに、次項

に記した UPLC を用いて解析を行った。

2.2.9. UPLC による各サンプルのピーク時間、ピーク面積の解析

測定する評価対象化合物は一定濃度になるように移動相で希釈し、メンブレンフィルター (GHP Acridisc® 13 mm Syringe Filter with 0.2 µm GHP Membrane) で前処理し、注入量を 10 µL として測定を行った。UPLC の測定は超高速液体クロマトグラフシステム (米国 Waters テクノロジーズ ACQUITY UPLC System)、吸光度検出器 (超高速クロマトグラフシステム ACQUITY UPLC TUV TK)、解析ドライバ (Empower™2) からなるシステムを用いて行った。分析用カラムとしては、ACQUITY UPLC® BEH Phenyl (1.7 µm, 2.1×50 mm column) を使い、ガードカラムには、ACQUITY UPLC® BEH Phenyl (1.7 µm, VanGuard™ Pre-Column 2.1×5 mm column) を使用した。移動相には、H₂O + 0.1 % TFA (以下、A 相), MeCN + 0.1 % TFA (以下、B 相) を使い、分析時間を 12 分とし、A 相を 88 % から 44 % に、B 相を 12 % から 56 % になるようにグラジュエントをかけ、流速は 0.3 mL/ min, 測定波長は 380 nm とした。サンプル温度は 20 °C、カラム温度は 50 °C に設定した。²²

2.2.10. HPLC による各サンプルの水溶性の検討

測定する評価対象化合物は一定濃度になるように移動相で希釈し、メンブレンフィルター (Millipore、Millex®-FG 0.2 μm) で前処理、注入量を 20 μL とし、測定した。HPLC の測定は JASCO 製 880-PU intelligent HPLC Pump、吸光度検出器 (HITACHI 製 L-7400 UV detector)、データ収集ドライバ (KEYENCE 社製 NR-2000) からなるシステムを用いて行った。分析用カラムには、ナカライテスク製 5C18-AR-II (4.6 mm×100 mm i.d.)を用いた。移動相には、5mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 3.6) (以下、I 相)、アセトニトリル/純水混液 (3:1) (以下、II 相) を用い、I 相 : II 相 = 65 % : 35% で混ぜた溶液を移動相として用いた。各サンプルの希釈溶液には、II 相を用いた。分析時間を 15 分とし、流速は 1.0 mL / min, 測定波長は 380 nm とした。¹¹

2.2.11. 1-オクタノール/水分配係数 (Po/w) の値と水溶性の評価

逆相 HPLC で 1-オクタノール/水分配係数 (Po/w) と水溶性の分析は、経済協力開発機構 (OECD) による「化学物質の試験のための公式ガイドライン」に従って行った。³⁶ 分析用カラムには、ナカライテスク製 5C18-AR-II (4.6 mm×100 mm i.d.)を用いた。75% (v/v) メタノール水溶液を移動相として、流速 1.0 mL / min、測定波長は 256 nm とした。アセトアニリド、フェニルアセトニトリル、p-クレゾール、2,3-ジクロロアニリン、チモールおよび安息香酸フェニル

を Po/w の参照化合物として使用し retention time を利用して、検量線を作成して、評価対象化合物の Po/w を求めた。なお、各評価対象化合物は 6 回ずつ測定を行った。

2.2.12. 逆相 HPLC による早期代謝物の分離

評価対象化合物の活性本体を推定するために、SN38 誘導体の代謝物をさらに分析した。HPLC の測定は JASCO 製 880-PU intelligent HPLC Pump、吸光度検出器 (HITACHI 製 L-7400 UV detector)、データ収集ドライバ (KEYENCE 社製 NR-2000) からなるシステムを用いて行った。分析用カラムには、ナカライテスク製 5C18-AR-II (4.6 mm×100 mm i.d.)を用いた。NADPH の存在下で、1 mM の CPT-11、SN38-BGL A、SN38-BGL B を新たに調製した肝臓ミクロソーム画分 (65 mg protein/mL) 1.5 mL とともに 37°C でインキュベート (10 min, 30 min, 60 min) した。反応終了後 1.5 倍量の冷メタノールを加えて、酵素反応を止め、cut off 分子量 3,000 のメンブレンフィルター (Millipore、Millex®-FG 0.2 μm) で遠心ろ過し除タンパクを行った。得られた試料を 2.2.10 の移動相とシステムを用い逆相 HPLC (流速 0.75 mL/min、注入量 100 μL) に流し 380 nm の吸光度を観察した。ピーク確認後、検出器からの流出液を分取し、ピークがベースラインに戻った後も 30 秒間分取し続け、これを 3 回繰り返して代謝物を回収した。移動相は酸性なので、分取した試料 1 mL に対し、中和 (pH 7.0~7.3) す

る目的で 20 mM Ca(OH)₂ を 100 μL の割合で加え、その後凍結乾燥させた。得られた試料は少量のメタノールに溶解し、0.45 μm のナイロン製メンブレンフィルターでろ過しリン酸カルシウムを除いた。上清を再度集め、この試料 40 μL を採取し、逆相 HPLC で同様に分析を行った。

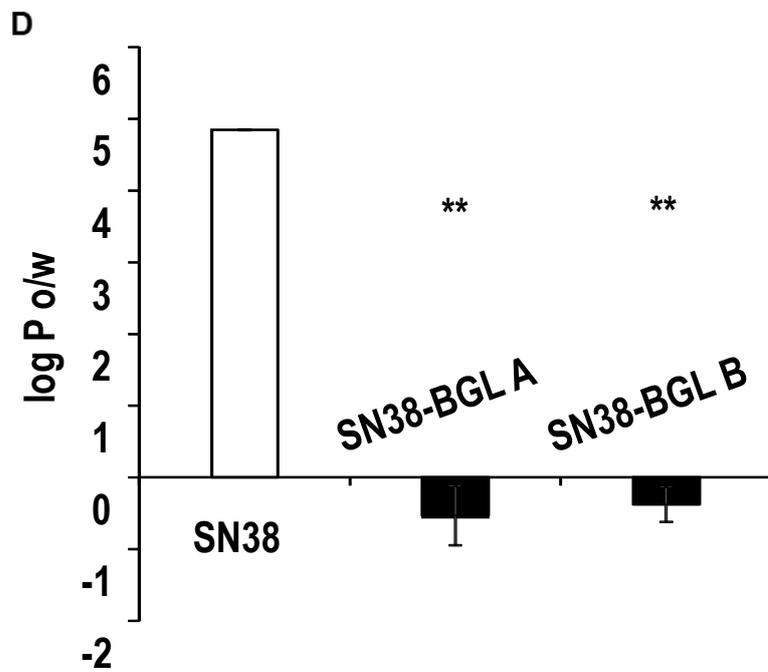
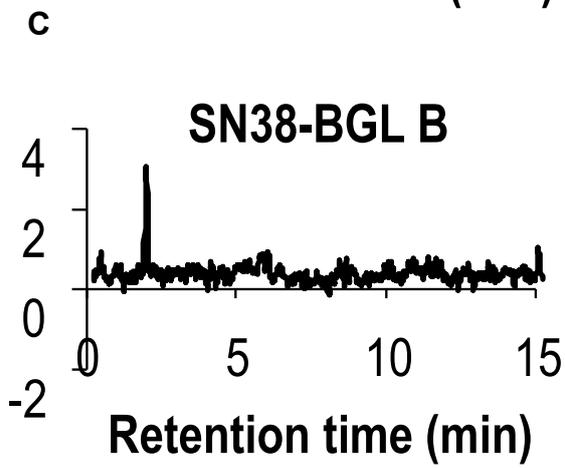
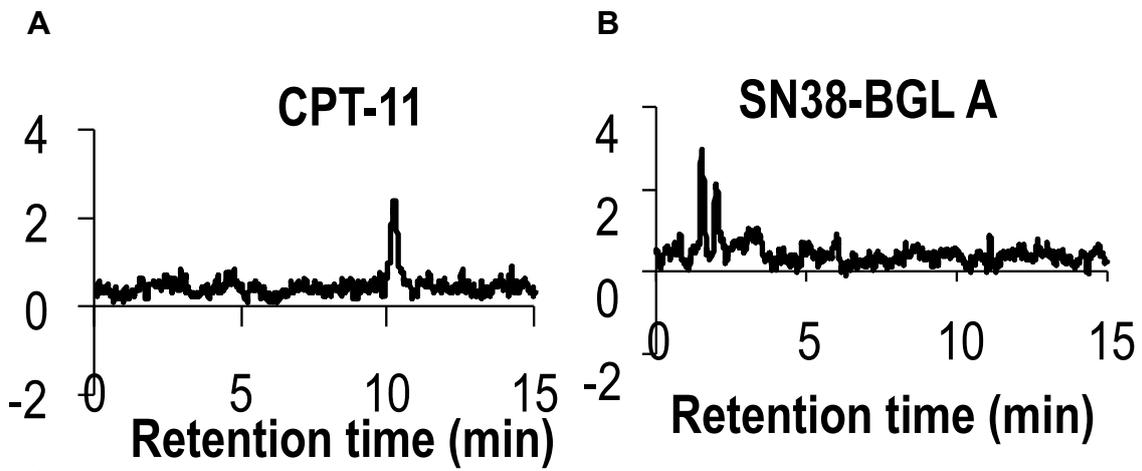
2.2.13. 統計処理

得られたデータから平均値±標準誤差 (S.E.) を求め、各群の有意差は等分散の評価により student t 検定または Welch 検定で行った。多群間の検定は、Turkey-Kramer 検定を用いて判定した。下痢評価に関しては、Steel-Dwass 法を用いて判定した。また、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第3節 実験結果

2.3.1. SN38-BGLの水溶性の検討

逆相カラムを用いて CPT-11, SN38-BGL A, SN38-BGL B の保持時間を HPLC により確認すると、それぞれ 10.3 min, 2.1 min, 1.8 min であった。SN38-BGL A および B の保持時間が CPT-11 よりも短いことから、SN38-BGL 体は BGL 基を修飾したことにより、CPT-11 よりも水溶性が向上したことが示唆される。[図 2 A-C] また、SN38-BGL A および B の Log Po/w 値は 0 未満 (-0.53 ± 0.4 および -0.38 ± 0.2) であり、SN38 の Log Po/w 値は約 5 (4.85 ± 0.0) であった。[図 2 D]、SN38-BGL A および B の水への溶解度は約 90 mg / mL とほぼ同じであった (90.2 mg / mL; A および 88.1 mg / ml; B) [図 2 E]。SN38-BGL A および B の水への溶解度が SN38 と比べて増加しており、SN38 の難水溶性は BGL による修飾にて改善された。



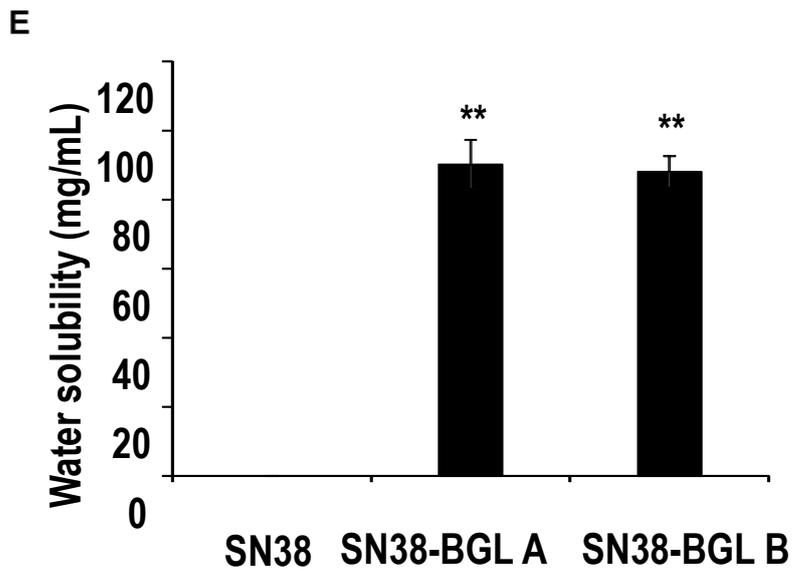


図 2

逆相 HPLC による (A) CPT-11, (B) SN38-BGL-A, (C) SN38-BGL B の保持時間、逆相 HPLC により算出した (D) 各化合物の 1-octanol/水分配係数 (log Po/w)、(E) 室温での各化合物の水への溶解度

データは Mean ± S.E. n=6 で示している。** p<0.01 vs SN38.

2.3.2. SN38-BGL の肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果

SN38、CPT-11、SN38-BGL A、SN38-BGL B のヒト非小細胞肺癌細胞株（ヒト腺癌細胞株 A549、ヒト扁平上皮癌細胞株 H520、ヒト大細胞癌細胞株 H1299）とヒト小細胞肺癌細胞株（SBC5、H196、SBC3）に対して、細胞生存率と IC_{50} を検討した。SN38 は今回使用した細胞株すべてにおいて他の化合物よりも強い細胞増殖抑制効果を示すことが分かった。SN38-BGL A は、CPT-11 と比較すると SBC5、SBC3 に対してそれぞれ IC_{50} が約 1.52 倍、約 16 倍高く、H1299 に対して IC_{50} が約 1/5 に低下していた。一方で、SN38-BGL B は、CPT-11 と比較すると A549、H520 に対して IC_{50} がそれぞれ約 1.39 倍、約 3.76 倍高く、H1299 に対して約 1/17 に低下していた。他の細胞株に関しては、SN38-BGL A、B ともに CPT-11 と同等の細胞増殖抑制効果を示した。[図 3、表 1]

ほとんどのヒト肺癌細胞株において、SN38-BGL A、B の IC_{50} と CPT-11 の IC_{50} の値にそれほど大きく差が見られないことから、CPT-11 とほぼ同等の細胞増殖抑制効果を持つといえる。

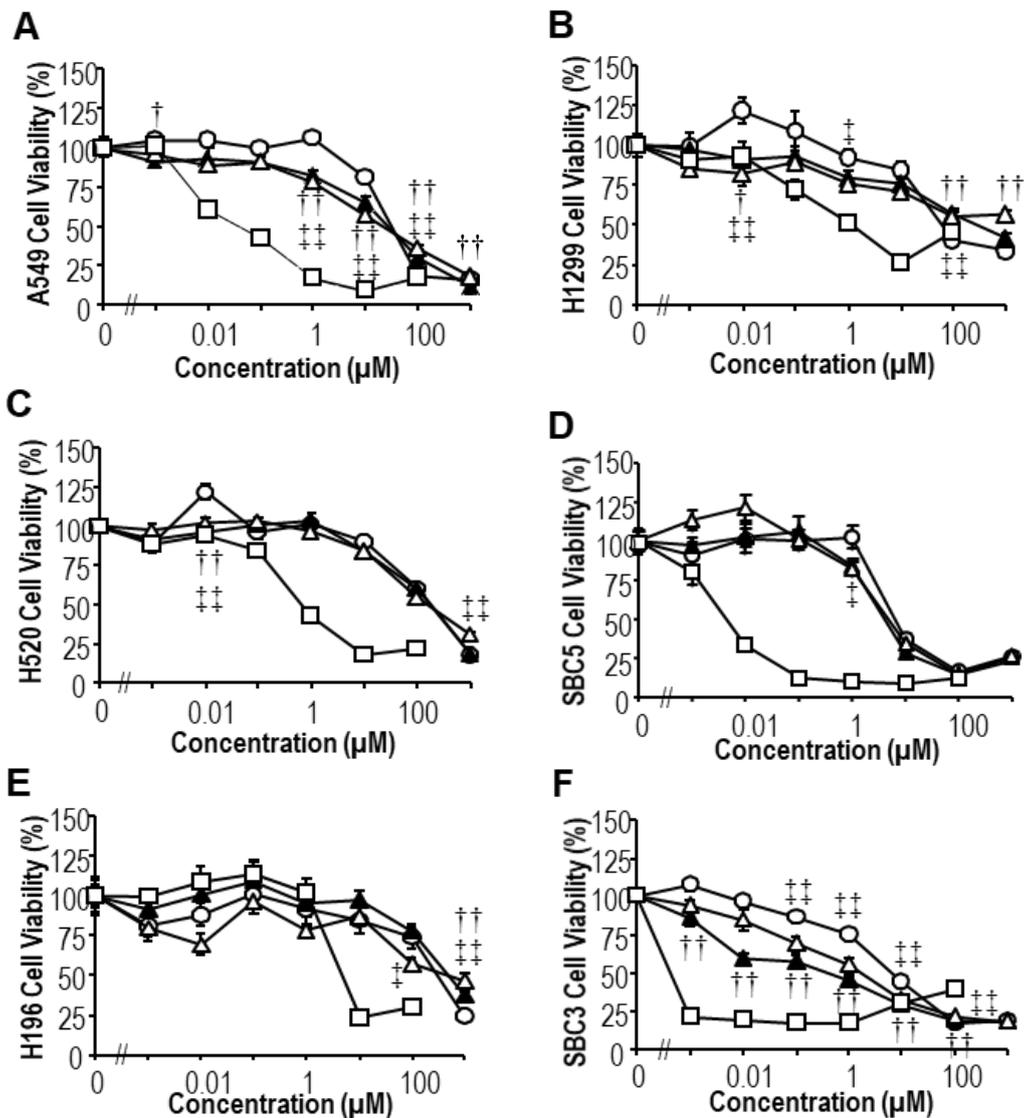


図 3

各化合物のヒト肺癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果

(A)ヒト腺癌細胞株 A549、(B)ヒト大細胞癌細胞株 H1299、(C)ヒト扁平上皮癌細胞株 H520、(D)ヒト小細胞肺癌細胞株 SBC5、(E)ヒト小細胞肺癌細胞株 H196、(F)ヒト小細胞肺癌細胞株 SBC3 において細胞生存率は各化合物を 48 時間処置後の control (試薬未処置; 0 μM) に対する割合を MTT assay により算出した。

データは Mean ± S.E. n=5-8 で示している。

○; CPT-11, ▲; SN38-BGL A, △; SN38-BGL B, □; SN38

† †; p<0.01 SN38-BGL A vs CPT-11,

‡ ‡; p<0.05, ‡ ‡ ‡; p<0.01, SN38-BGL B vs CPT-11.

表 1

各化合物のヒト肺癌細胞株に対する IC₅₀ (μM)

図 3 のデータより IC₅₀ を算出した。

Cancer cell type	A549	H1299	H520	SBC5	H196	SBC3
CPT-11	3.2×10	6.0×10	1.7×10^2	6.4	3.1×10^2	6.4
SN38-BGLA	2.7×10	2.8×10^2	1.8×10^2	4.2	4.9×10^2	0.4
SN38-BGLB	2.3×10	$>10^3$	1.5×10^2	4.8	5.1×10^2	1.7
SN38	3.9×10^{-2}	1.2	6.7×10^{-1}	4.3×10^{-3}	4.6	4.3×10^{-4}

2.3.3. 担癌ヌードマウスモデルにおける SN38-BGL の抗腫瘍効果

A549, SBC5 を皮下移植した担癌ヌードマウスモデルを用いて、in vivo における非小細胞肺癌、小細胞肺癌においての CPT-11, SN38-BGL A, SN38-BGL B を 1 週間に 2 回、2 週間腹腔内投与 (i.p.) を行い、腫瘍面積を比較することで抗腫瘍効果の検討を行った。

ヒト非小細胞肺癌細胞株のうちのヒト腺がん細胞株 A549 を皮下移植した担癌ヌードマウスモデルでは、CPT-11 高投与群 (0.3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)、低投与群 (0.03 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) どちらも 4 回投与後、腫瘍面積が縮小した。[図 4 A,C] 腫瘍面積変化に関しては、SN38-BGL A 投与群では CPT-11 とほぼ同じタイミングで腫瘍面積の縮小が見られた。[図 4 A,C] SN38-BGL B 投与群では CPT-11、SN38-BGL A 投与群と比較して低投与では抗腫瘍効果は低下していたが、高投与では同等の抗腫瘍効果が見られた[図 4 A,C]。非投与群 (control) と、CPT-11 投与群、SN38-BGL A 投与群、SN38-BGL B 投与群で体重変化は見られなかった[図 4 B,D]。

小細胞肺癌細胞株 SBC5 を皮下移植した担癌ヌードマウスモデルでは、非投与群 (control) 、CPT-11 投与群、SN38-BGL A 投与群、SN38-BGL-B 投与群で体重変化に差は見られなかった。[図 5 B,D] 腫瘍面積変化に関しては、SN38-BGL A 投与群、SN38-BGL B 投与群ともに CPT-11 投与群と比べて抗腫瘍効果がやや強い傾向が見られた。[図 5 A,C]

また、担癌ヌードマウスモデルでの SN38-BGLA,B は高用量でも体重に影響を及ぼさないことから今回の投与量での毒性はほぼないと考えられる。

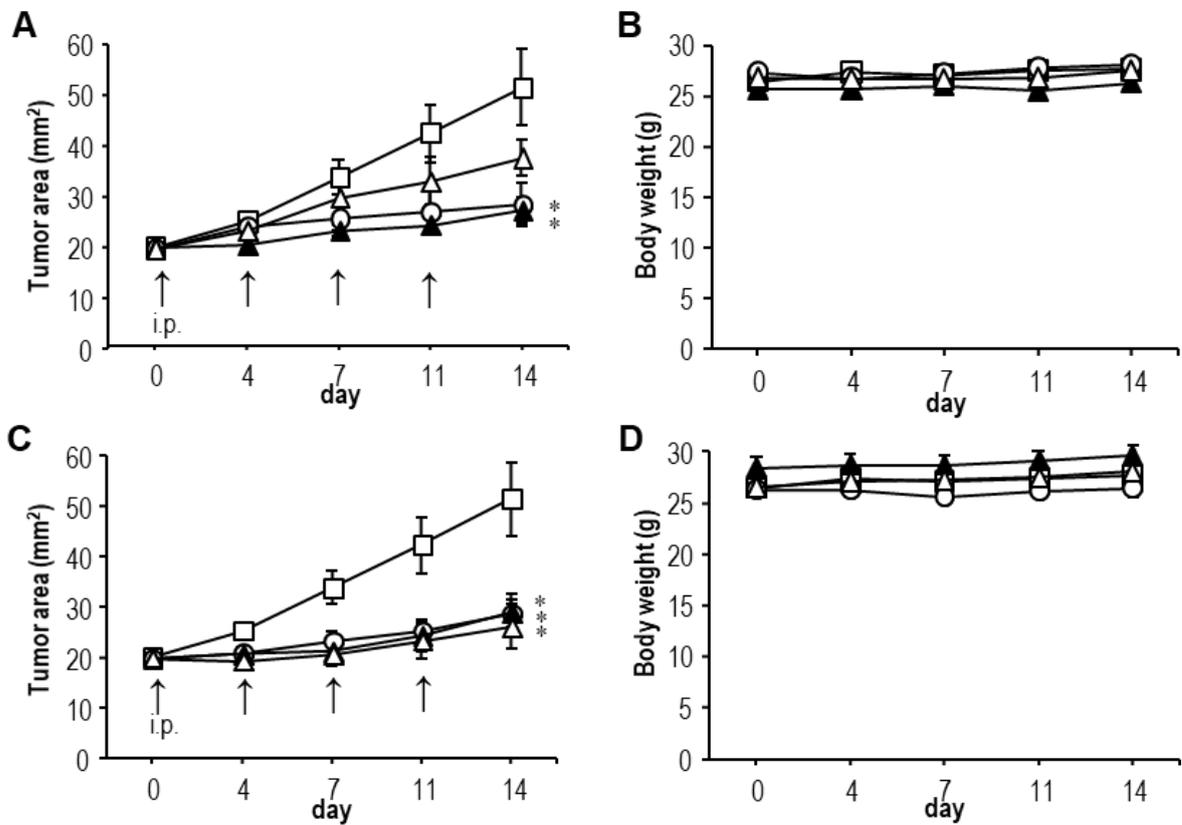


図 4 各化合物のヒト非小細胞肺癌細胞株 (A549) を皮下移植した担癌ヌードマウスモデルに対する抗腫瘍効果

(A) 低投与による腫瘍面積の変化 (B) 低投与時の体重変化

(C) 高投与による腫瘍面積の変化 (D) 高投与時の体重変化

低投与では $0.03 \mu\text{mol/kg}$ (CPT-11 2mg/kg に相当)、高投与では $0.3 \mu\text{mol/kg}$ (CPT-11 20mg/kg に相当) で各化合物を調製し、day 0, 4, 7, 11 に腹腔内投与を行った。

データは Mean \pm S.E. n=5 で示している。

○; CPT-11, ▲; SN38-BGL A, △; SN38-BGL B, □; control (生食)

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ (vs control)

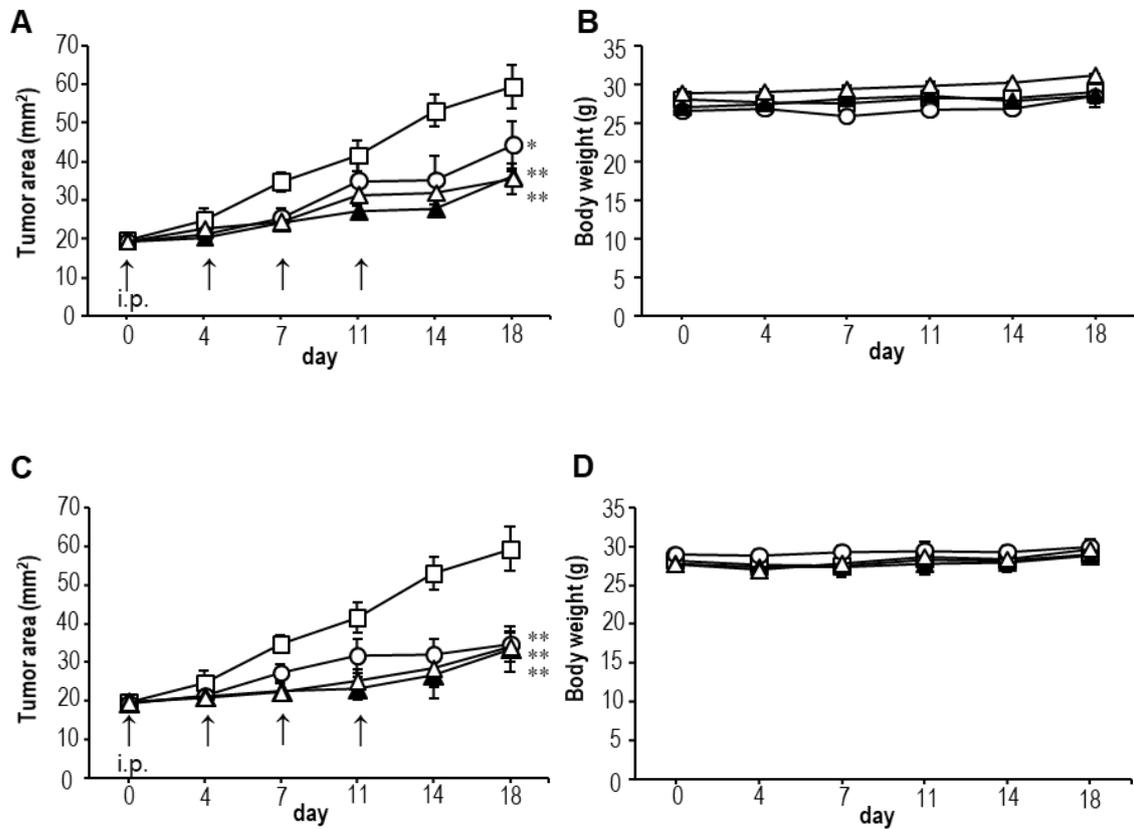


図 5 各化合物のヒト小細胞肺癌細胞株 (SBC5) を皮下移植した担癌ヌードマウスモデルに対する抗腫瘍効果

(A) 低投与による腫瘍面積の変化 (B) 低投与時の体重変化

(C) 高投与による腫瘍面積の変化 (D) 高投与時の体重変化

低投与では 0.03 $\mu\text{mol/kg}$ (CPT-11 2mg/kg に相当)、高投与では 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ (CPT-11 20mg/kg に相当) で各化合物を調製し、day 0, 4, 7, 11 に腹腔内投与を行った。

データは Mean \pm S.E. n=5 で示している。

○; CPT-11, ▲; SN38-BGL A, △; SN38-BGL B, □; control (生食)

*; p<0.05, **; p<0.01 (vs control)

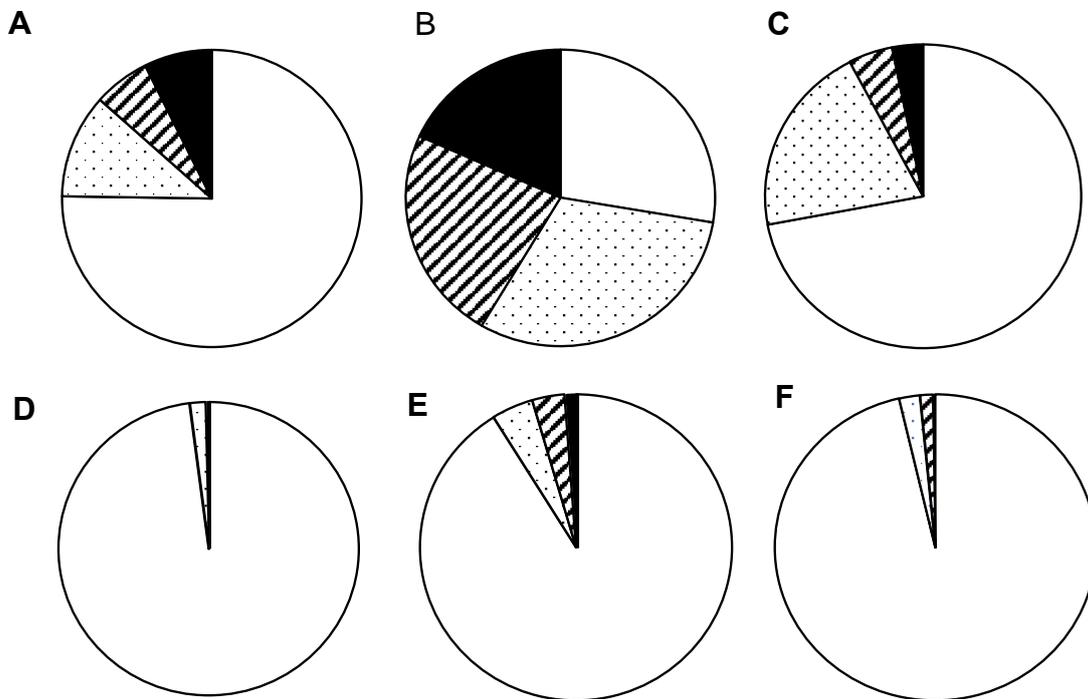
2.3.4. SN38-BGL の下痢の発症の評価

下痢はカンプトテシン誘導体である CPT-11 の臨床上最も大きな問題であり、投薬中止の最大の要因でもある。SN38-BGL A において CPT-11 と比較するため、CPT-11 投与時に見られる 2 種類の下痢（早期性下痢、遅発性下痢）の発症について評価した。各投与群において全糞便を 1 つずつスコア化することにより検討を行った。

早期性下痢においては、control 群、SN38-BGL 投与群でスコア 0 の糞便の割合が約 75%を占めていたのに対し、CPT-11 投与群ではスコア 0 の糞便の割合が約 30%、スコア 1~スコア 3 の糞便の割合が約 70%を占める結果となった。

[図 6 A-C]

また、遅発性下痢については control 群、SN38-BGL 投与群はスコア 1~スコア 3 の糞便の割合がそれぞれ約 2%、約 3%であったが、CPT-11 投与群では約 10%を占める結果となった。[図 6 D-F] CPT-11 は早期性下痢、遅発性下痢ともに非投与群（control 群）と有意な差がみられたものの、SN38-BGL A では非投与群（control 群）との有意な差は見られなかった。特に早期性下痢においては SN38-BGL A は CPT-11 よりも下痢の発症頻度が有意に抑制された。[図 6 G, H] これらの結果より、SN38-BGL A は CPT-11 投与時に見られる 2 種類の下痢の発症を軽減する傾向がみられた。



G

Early onset diarrhea assesment

Group	Scores
Control	1 (0-2)
CPT-11	2 (1-3)*
SN38-BGLA	1 (0-2)†

H

Late onset diarrhea assesment

Group	Scores
Control	1 (0-2)
CPT-11	2 (2-3)**
SN38-BGLA	1.5 (1-3)

図 6 各化合物投与時のマウスの糞便の評価

8 日間、各化合物を低投与量 (0.03 $\mu\text{mol/kg}$) で腹腔内投与し糞便スコアを評価した。

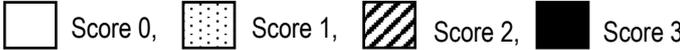
(A-C) 各化合物投与時の早期性下痢のスコア 0,1,2,3 の割合

(A) control 群, (B) CPT-11 投与群, (C) SN38-BGL A 投与群

(D-F) 各化合物投与時の遅発性下痢のスコア 0,1,2,3 の割合

(D) control 群, (E) CPT-11 投与群, (F) SN38-BGL A 投与群

(G,H) 各化合物投与時の早期性下痢のスコア化 (G), 遅発性下痢のスコア化 (H)し、Steel-Dwass test により検定を行った。値は中央値 (最小値 - 最大値)、n=3 で示している。

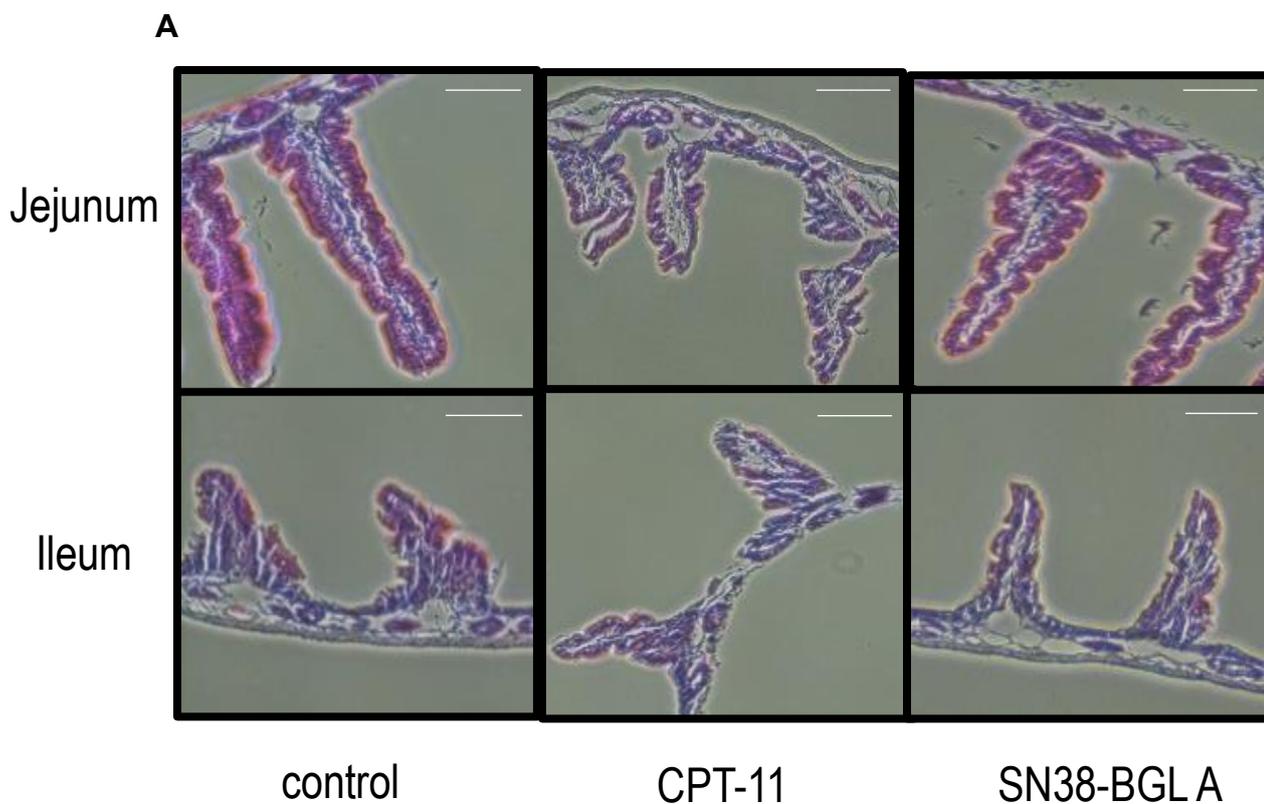
 Score 0,  Score 1,  Score 2,  Score 3

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ (vs control)

†; $p < 0.05$, SN38-BGL A vs CPT-11

2.3.5. SN38-BGL 投与時の小腸に関する組織学的評価

各投与群の最終投与後、空腸、回腸を回収し、HE 染色を行い、絨毛の長さを測定した。空腸において、control 群と比べて CPT-11 投与群では絨毛の長さが有意に短くなっていた。一方、SN38-BGL A 投与群では、絨毛が短くなることはなく、むしろ control 群よりも長い絨毛が観察された。[図 7 A,B] 回腸の絨毛の長さに関しては、CPT-11 投与群は、control 群と有意な差は見られなかった。一方、SN38-BGL A 投与群は CPT-11 投与群よりも長い絨毛が観察された。[図 7 A,C]



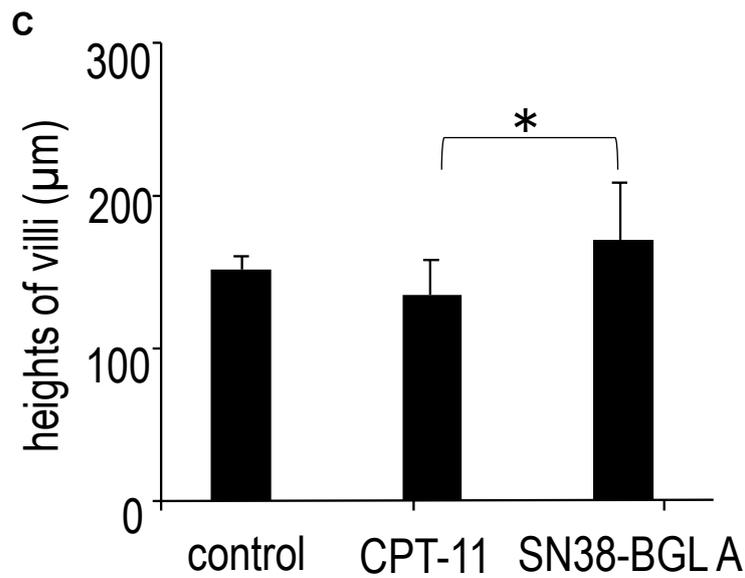
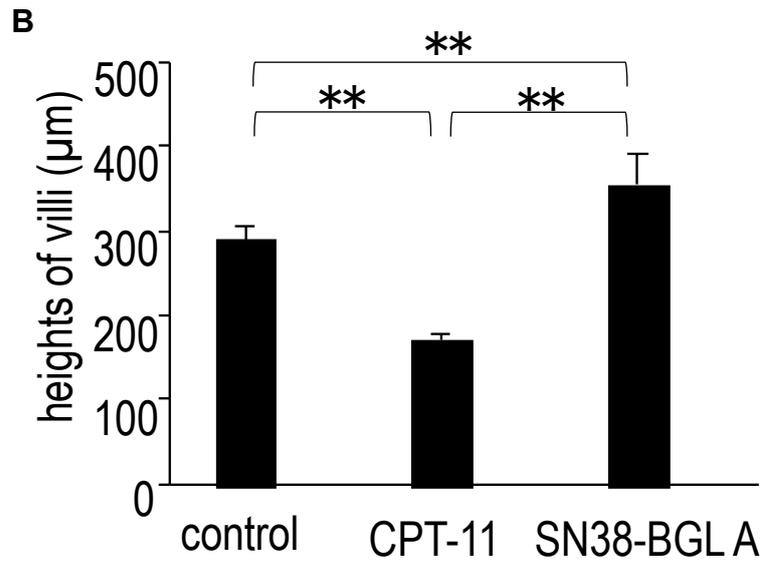


図7 各化合物投与時の小腸の組織学的評価

0.03 μmol/kg の投与量で CPT-11、SN38-BGLA を 8 日間投与したのち解剖し、小腸を回収した。さらに小腸を空腸と回腸に分け、HE 染色した。

(A) 空腸、回腸の絨毛の写真 (B) 空腸の絨毛の長さ (C) 回腸の絨毛の長さ

Scale bar は 100 μm を表す。

データは Mean ± S.E. n=3-10 で示している。

*; p<0.05, **; p<0.01

2.3.6. SN38-BGL の肝ミクロソームによる代謝に関する検討

CPT-11 は体内のカルボキシエステラーゼとブチリルコリンエステラーゼの 2 つのアイソフォームによって活性代謝物 SN-38 に加水分解されるプロドラッグである。カルボキシエステラーゼは肝臓、結腸、腎臓などに局在しているが、ブチリルコリンエステラーゼは主に血漿中に見られることがわかっている。また、これらのエステラーゼによる変換は主に肝臓内で起こることが報告されている。³⁷ SN38-BGL も SN38 を可溶化したという点で CPT-11 と同じであることから CPT-11 と同様にプロドラッグとして機能する可能性が考えられたため、カルボキシエステラーゼが多く分布している肝臓のミクロソームを用いて SN38-BGL A, B について評価した。

まず、各試薬と SN38 の保持時間を逆相 UPLC で比較したところ、それぞれ、SN38 (4.2 min) → CPT-11 (4.6 min)、SN38-BGL A (3.7 min) → SN38 (4.2 min)、SN38 (4.2 min) → SN38-BGL B (4.8 min) という順番で溶出が確認できた。 [図 8]

次に、ラット肝ミクロソーム を 98°C、15 分加熱処理することで酵素活性を失活させたもの（加熱処理有り）、と加熱処理をしないもの（加熱処理無し）を準備し、それらと各化合物のインキュベートを行うことで、肝代謝の関与の検討を行った。その結果、これまでの報告にもあるように、CPT-11 (4.5 min) は肝ミクロソーム

(加熱処理無し) によって SN38 (4.2 min) へ変換されることが確認できた [図 9 A, D]。一方で、SN38-BGL A、SN38-BGL B とともに肝ミクロソーム (加熱処理有・無) とインキュベートを行ったところ、SN38 の溶出時間である 4.2 min 付近でピークに変化が見られなかったことから SN38 は産出されず、異なるピークが確認されことから別の代謝産物に部分的に変換されることが分かった。[図 9 B,C,E,F]

次に活性化合物を決定するために、逆相 HPLC による代謝物の分析をさらに行った。CPT-11、SN38-BGL A および B を肝ミクロソームと共にインキュベートすることで各化合物の時間依存性の減少と代謝物のピークの増加が反応時間である 60 分にかけて観察された。[図 10 A-H] 保持時間が元の化合物よりも短いため、これらの代謝物はもとの化合物と比べ親水性が向上していると考えられた。CPT-11 の肝ミクロソームとの反応による代謝物は *in vivo* での CPT-11 の既知の代謝物の 1 つである SN38-グルクロン酸抱合体として報告されている。⁹ このことから、SN38-BGL A および B の早期代謝物はそれぞれのグルクロン酸抱合体である可能性が考えられた。そこで、各化合物のそれぞれの代謝物を含む画分を分取して再度 HPLC を用いて分析を試みた。代謝物の同定はできなかったが、代謝産物は元の化合物に部分的に分解されることが明らかになった。[図 10 I-K]

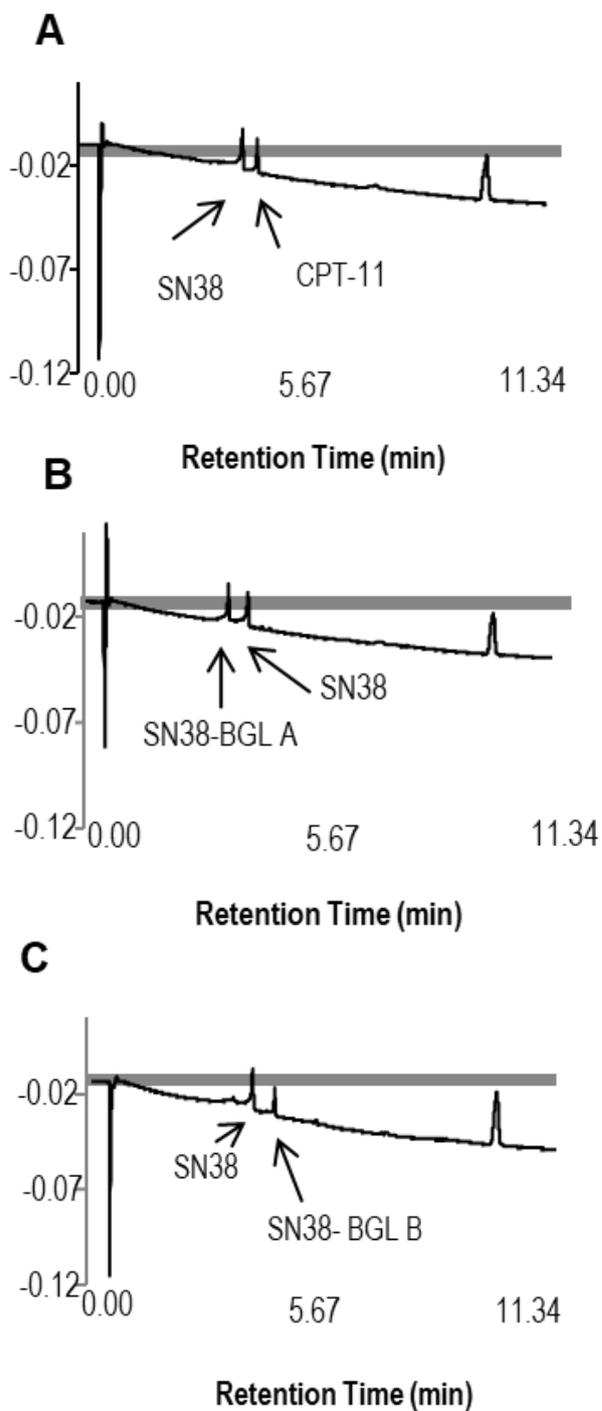


図8 各化合物のUPLCによる保持時間

各化合物とSN38をUPLCにて分析し保持時間を検討した。

SN38は4.2min、CPT-11は4.6min、SN38-BGL Aは3.7min、SN38-BGL Bは4.8minでピークを検出した。

(A) CPT-11とSN38の保持時間の関係 (B) SN38-BGL AとSN38の保持時間の関係
(C) SN38-BGL BとSN38の保持時間の関係

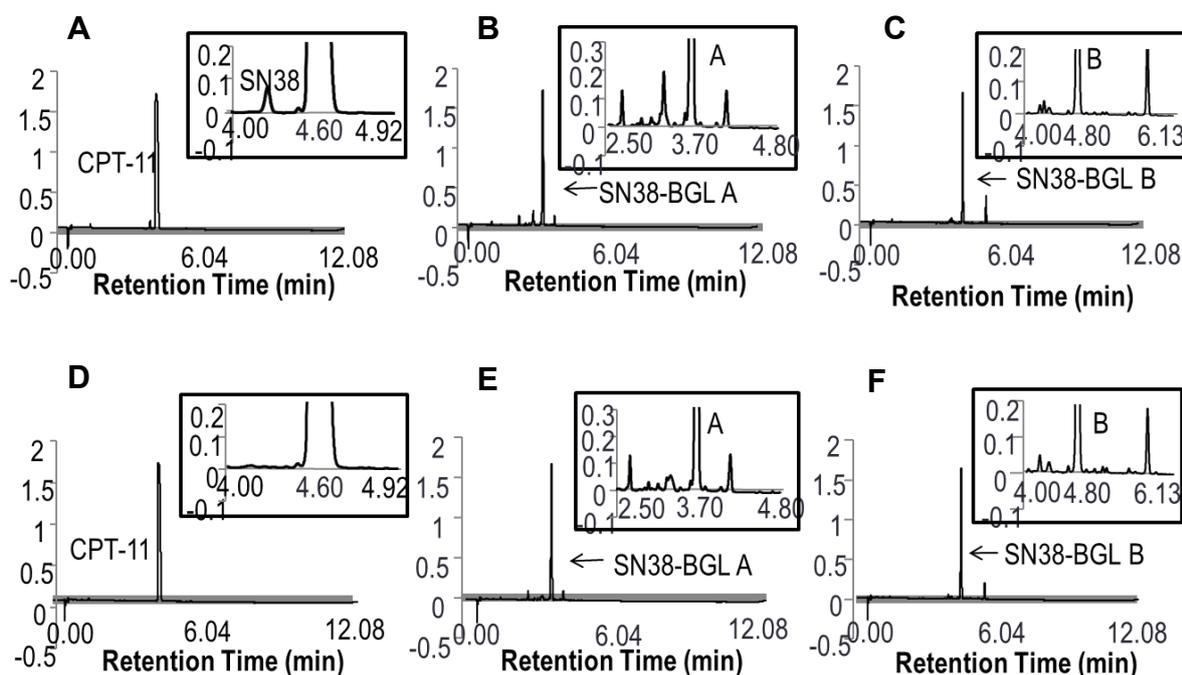


図9 各化合物の肝ミクロソームによる代謝の有無

酵素活性を失活させていない肝ミクロソームと各化合物 (A-C)、あるいは肝ミクロソームを 98°C、15 分で加熱処理し酵素活性を失活させたものと各化合物 (D-F) にそれぞれ適量の NADPH を加えて 24 時間 37°C でインキュベートしフェニルカラムを用いた UPLC でピークを確認した。(A)4.6min に CPT-11、4.2 min に SN38 のピーク、(D) 4.6min に CPT-11 のピークのみを検出した。(B,E) 3.7min に SN38-BGL A のピーク、(C,F) 4.8min に SN38-BGL B のピークを検出した。

(A,D) CPT-11 と (A) 加熱処理していない、(D) 加熱処理による酵素失活した肝ミクロソームをインキュベートしたもの

(B,E) SN38-BGL A と (B) 加熱処理していない、(E) 加熱処理による酵素失活した肝ミクロソームをインキュベートしたもの

(C,F) SN38-BGL B の (C) 加熱処理していない、(F) 加熱処理による酵素失活した肝ミクロソームをインキュベートしたもの

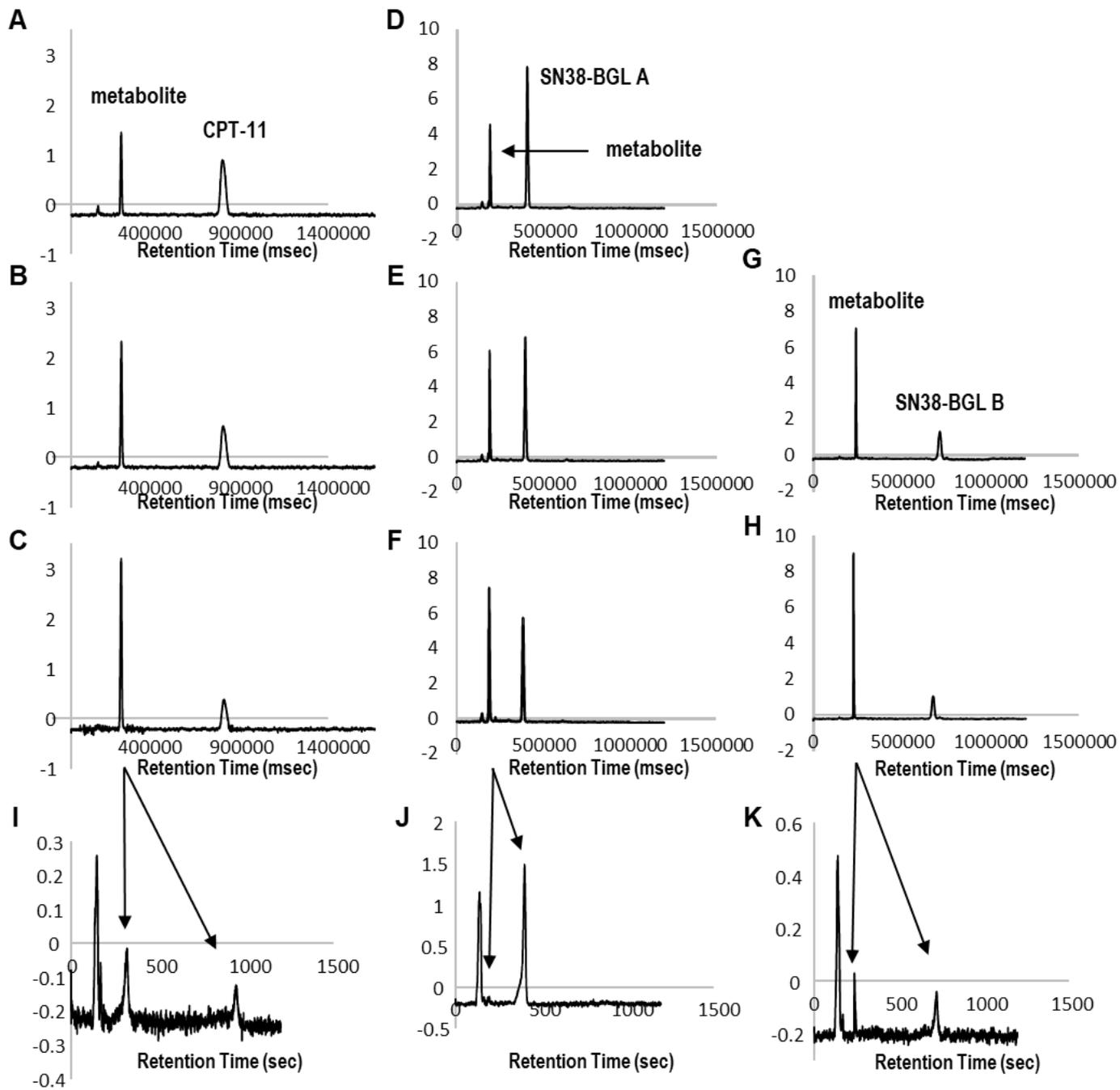


図 10 各化合物の肝ミクロソームによる早期代謝物の分析

肝ミクロソームと CPT-11 (A-C)、SN38-BGL A (D-F)、SN38-BGL B (G,H) を 37°C で 10 分間 (A,D)、30 分間 (D,E,G)、60 分間 (C,F,H) インキュベートし、逆相 HPLC で分析を行った。CPT-11 (I)、SN38-BGL A (J)、SN38-BGL B (K) の代謝物を含む画分をそれぞれ分取し再び逆相 HPLC で分析した。

(A,D) 10 分間、肝ミクロソームとインキュベート、

(B,E,G) 30 分間、肝ミクロソームとインキュベート

(C,F,H) 60 分間、肝ミクロソームとインキュベート

(I) CPT-11 と肝ミクロソームのインキュベート後、分取した代謝物を再び HPLC で測定したもの

(J) SN38-BGL A と肝ミクロソームのインキュベート後、分取した代謝物を再び HPLC で測定したもの

(K) SN38-BGL B と肝ミクロソームのインキュベート後、分取した代謝物を再び HPLC で測定したもの

第4節 考察

本研究では、分岐鎖オリゴグリセロールを修飾した新規親水性 SN38 が、CPT-11 とは対照的に、重度の下痢や腸への障害を引き起こすことなく SCLC（ヒト小細胞肺癌）および NSCLC（ヒト非小細胞肺癌）に対してほぼ同等の抗腫瘍効果を示し、ヒト小細胞肺癌細胞株およびヒト非小細胞肺癌細胞株に対する細胞毒性は CPT-11 とほぼ同じであることを明らかにした。CPT-11 の親水性はカンプトテシンに比べ改善されていることが医療者向けの情報としてインタビューフォームに記載されているが、CPT-11 の水溶性はまだ十分ではない（ $\sim 1 \text{ g} / 102.3 \text{ mL}$; 日本ヤクルト本社、CAMPTO[®]の薬物インタビューフォーム、ver.17)。本研究では、SN38-BGL A、B は CPT-11 の親水性に対する優位性が示されたことから、親水性の向上に BGL に付与は有効であることが明らかとなった。[図 1F-H]

次に、A549 および SBC5 細胞のマウス皮下移植モデルにおける NSCLC および SCLC に対する抗腫瘍効果を比較した。A549 皮下移植 NSCLC モデルマウスでは、低用量での SN38-BGL B は、腫瘍面積を縮小させる傾向があったものの、有意な減少は示さず [図 4A]、細胞毒性はほぼ同等であった。[図 3、表 1]。しかし図 4C に示すように、高用量で投与した際は十分な腫瘍抑制効果を示した。一方、SN38-BGL A は低用量・高用量ともに CPT-11 と同様に強い腫瘍抑制を示した。[図 4A,C] また、SN38-BGL A と B はともに、in vivo で CPT-11 よりも SCLC を引き起こす

SBC5 細胞由来の腫瘍面積を抑制する傾向が見られた。[図 5 A、C] これらの違いは、後で説明する活性代謝物の違いが関与している可能性があると考えている。

SBC5 および A549 細胞に対する細胞毒性の IC₅₀ 値は、SN38-BGL A および B は CPT-11 よりもわずかに小さいにもかかわらず、動物実験で同等以上の効果が出たことから活性代謝物の違いが寄与している可能性が考えられた。[図 3] 今回はヌードマウスモデルにおいて手技上簡便である点から腹腔内投与による全身作用を検討したが、臨床では CPT-11 は静注で使用されているため、SN38-BGL A および B についても静注による抗腫瘍効果を検討する必要があると考えている。また、SN38-BGL が log Po/w が約 -0.5 と十分に水溶性を持つ化合物であるため、細胞への単純拡散による透過しにくいと考えられる。しかし、細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果において CPT-11 とほぼ同等の効果を示していたことから、少なくとも抗がん剤としての効果は発揮していると言える。このことから、SN38-BGL は SN38-BGL 体そのままの形ではなく、一部切れた形になって細胞内へ取り込まれている可能性、脂溶性部分のみが膜内にささっている可能性あるいはミセル等を形成し膜内に取り込まれる可能性などが考えられる。しかし、この点については十分に解明できていないため化合物処置した細胞を収集し、細胞内の代謝産物を測定などの更なる検討が必要である。

下痢は CPT-11 の深刻な副作用の 1 つである。興味深いことに、SN38-BGL A

では重篤な下痢の発症頻度の増加は CPT-11 に比べ低かった。[図 6 C,F] CPT-11 誘発性下痢は早発性および遅発性に分類され、前者は主にコリンエステラーゼの非特異的阻害によって引き起こされるコリン作動性刺激によるものであり、その機序として阻害剤が有する 1-カルボニル-4-ピペリジノピペリジン部分に関連することが示されており³⁸⁻⁴¹、CPT-11 のカルバモイル基が、コリンエステラーゼと相互作用するためと考えられている。一方 SN38-BGL A は CPT-11 とは異なりカルバモイル基を持たないため、早期性下痢の発症抑制につながったと考えられた。SN38-BGL B は動物実験を行うために必要な化合物が準備できなかったため副作用評価を行っていないために推定にはなるが、分子内にカルバモイル基を持っているが 4'位置にピペリジンを欠いているため、コリンエステラーゼを阻害することによる早期性下痢を引き起こす可能性は低いと思われる。この点については本研究と同様の実験を SN38-BGL B でも行い、実際に検討する必要がある。

一方、遅発性下痢は、CPT-11 の活性代謝物である SN38 による胃腸障害の結果と考えられている。今回の検討で SN38-BGL A は、重度の遅発性下痢を引き起こさなかった [図 6 F、H]。HE 染色による組織学的分析からも、SN38-BGL A による投与は CPT-11 投与時よりも腸粘膜障害が抑えられていた。SN38-BGL A が遅発性下痢を引き起こさない理由の一つとして、SN38-BGL A では肝臓ミクロソームとのインキュベート後の代謝物として SN38 が生成しないためと推定された。[図 6

F、H、図7、図9 B] 実際、SN38-BGL A は CPT-11 と異なり SN38 と BGL 基がエーテル結合しているため代謝されにくい分子構造である。SN38-BGL B は CPT-11 と同様で SN38 と BGL 基がカーバメートで結合しているため SN38 を生成する加水分解を受けやすいことを予想していた。しかし、SN38-BGL B のカルバモイルリンカーは同じ実験条件下では加水分解されず SN38 を生成しないことから、遅発性下痢は SN38-BGL B によっても引き起こされないことが推定される。[図9 C、F]。この点についても早期性下痢と同様、実際に投与実験を行い検討する必要がある。早期性下痢、遅発性下痢の実験において、control (PBS) 群で若干ではあるが下痢が見られた。これは、遅発性下痢評価よりも早期性下痢評価で特にみられていること、実際、スコア 0 以外の糞便割合は全糞便に対して少ないことから、腹腔内投与時の刺激によるものではないかと考えており、3 群とも同じ条件で行っているため実験条件にはそれほど影響はないと考えている。また HE 染色において SN38-BGL A 群は control 群よりも長い絨毛が見られた。これは前述した control 群で若干見られた下痢や、n=3 であるため結果として差がでていと推測している。これらの点については n 数を増やして行う必要があると考えている。

一方、CPT-11 は、以前の実験同様に、肝ミクロソームと 24 時間インキュベートすると、SN38 に切断されたことから、遅発性下痢の原因となり得ることが示唆された。[図9 A、D] SN38-BGL A および SN38-BGL B は肝酵素によって遊離した

SN38 が得られなかったが、代わりに UPLC 分析によって別の熱感受性ピークが検出された。[図 9 B,C] SN38-BGL A の細胞毒性は CPT-11 の細胞毒性と大差なく、SN38 の細胞毒性の 1 %であった [表 1] ことから、SN38-BGL A の未特定の代謝産物は、in vivo での腫瘍抑制効果を示す活性分子の 1 つである可能性も考えられる。しかし、SN38-BGL A および B の未特定の代謝産物については十分に解明ができておらず、この点については検討する必要がある。また、今回の研究ではげっ歯類モデルで実験を行っており、薬物代謝に大きな違いがあるため、これらの結果はげっ歯類に特有である可能性も考えられる。ヒトへの臨床応用するためには薬物動態および薬力学に関するさらなる研究、ならびに患者由来の異種移植モデルでの評価が必要と考えている。

図 10 の結果より肝ミクロソームと 60 分インキュベートした際に生じる SN38-BGL A および B の代謝物の保持時間は、CPT-11 の代謝物の保持時間よりも短く、これらの代謝物は CPT-11 の代謝物よりも親水性が高いことを示唆している。さらに、代謝物の一部は急速に元の化合物に分解された。これは、代謝が可逆的であり、分子を切断する反応が含まれないことを強く示唆している。[図 10 I-J] 今回見られた各化合物の代謝物がグルクロン酸抱合体であると仮定すると、SN38-BGL A および B はグルクロン酸が結合する SN38 のフェノール性ヒドロキシ基が BGL に結合しているため、グルクロン酸抱合体となる場合には SN38 の 4 位のヒドロキシ基

がグルクロン酸化されていると考えられる。一方、肝ミクロソームと 24 時間インキュベートした図 9 の結果から、各化合物の代謝物として考えられるグルクロン酸抱合分子は 24 時間のインキュベーション中に更に代謝をうけ、CPT-11 は SN38 を、SN38-BGL A および B は未知の分子が生じる可能性が考えられる。CPT-11 と SN38-BGL A および B において活性代謝物が異なるにもかかわらず、ヒト肺癌細胞株において細胞増殖抑制効果が同等であったのは、肝細胞にはミクロソームがあるのに対し、肺癌細胞にはミクロソームがほぼないと考えられ、SN38 というカンプトテシンの類似体を可溶化したという点でヒト肺癌細胞株においては同じプロフィールを示したためではないかと考えている。本研究では、各化合物の早期代謝物が可逆的に元の化合物に戻ることから、代謝物を再度 HPLC で分析を試みたが同定には至らず、腫瘍組織内、体内での活性本体が元の化合物、未知の代謝物かは明確にできていない。この点においては、投与実験を行い、血中濃度測定などを HPLC により測定するといった検討が必要である。

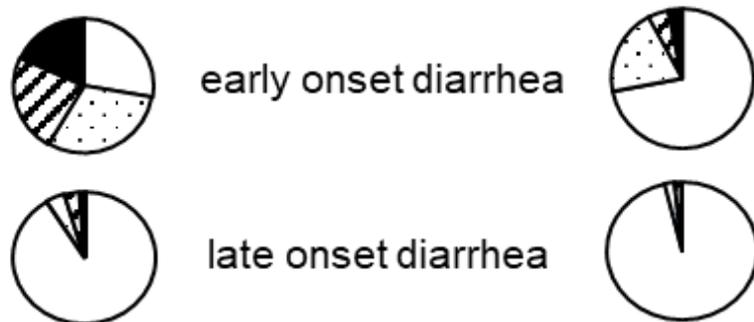
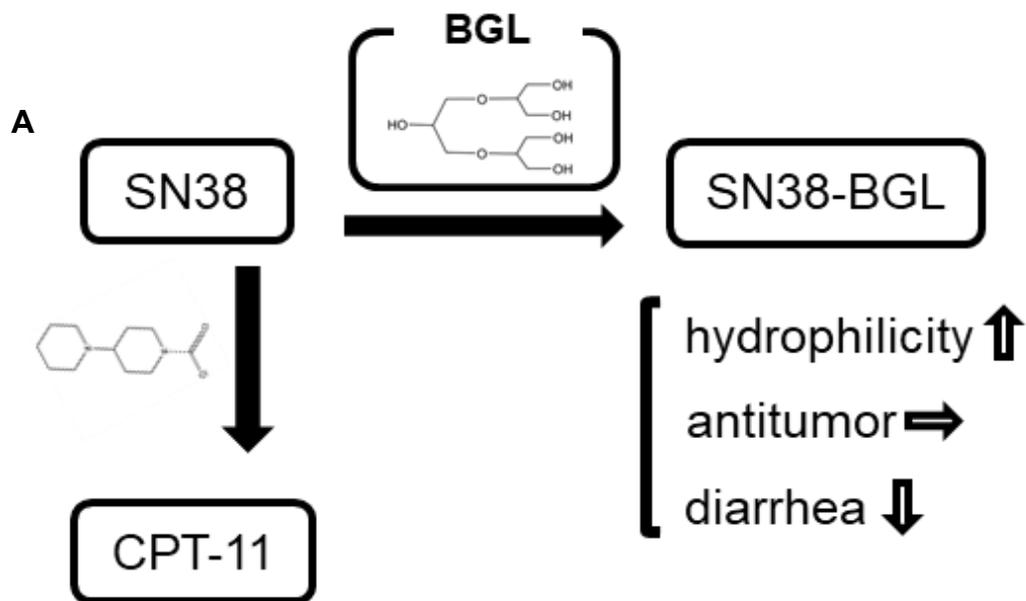
これまでのカンプトテシン誘導体は一般的に水溶性に問題がある。したがって、その親水性を向上するためにこれまで数々の戦略が試みられてきた。ポリエチレングリコール (PEG) を用いた戦略は、薬物送達の観点から、不安定な分子である疎水性分子を安定化する一般的な方法である。近年、Onivyde (MM-398) は CPT-11 のナノリポソーム製剤であり、米国食品医薬品局 (FDA) によって承認された。

⁴² SN38 に対する PEG 修飾に関する報告もされている。^{10, 19} EZN-2208 は PEG 結合 SN38 であり、現在、臨床試験されている。⁴³ PEG 化された SN38 製剤である NK012 は、最近 FDA によってオーファンドラッグとして承認された。SN38 のこれらの製剤は CPT-11 よりも高い有効性を示した。これは、保持効果の強化による可能性が考えられる。しかし、これらのポリマー薬物は分子のすべてが同一とは限らないため、安全性としては問題ないと報告されているが、各分子の薬理学的および薬物動態学的特性は少なからず影響をうける可能性が考えられる。対照的に、分岐鎖オリゴグリセロールは分子が同一であり、分子量のばらつきによる影響は受けにくいと考えられる。今回の検討で肝代謝酵素により BGL003 が遊離する可能性は低いと考えられるが、仮に代謝酵素により分子が切断され BGL003 が体内に放出されたとしても、BGL003 はマウスでの急性経口毒性と細胞毒性の点において生物学的安全性を確認している。²⁴⁻²⁵ [図 9、 10] 临床上では一般に抗がん剤は長期的に繰り返し投与されるが、BGL が生物学的に安全であること、CPT-11 と細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果に差が見られないことから、長期使用の安全性という点では CPT-11 とさほど変わらない可能性が考えられる。しかし、SN38-BGL は CPT-11 と異なり、微量ではあるが未知の代謝物が産出しているためそれらによる毒性がある可能性は少なからずあるかもしれない。その点については未知な代謝物を解明することで明らかにできると考えている。また SN38-BGL は抗がん剤であるため、投

与時の血中の AST、ALT 値の測定、白血球数、好中球数など血中指標の変化をモニターすることで肝機能障害や骨髄抑制といった抗がん剤でよくみられる副作用においてもさらなる検討が必要であると考えている。

結論として、今回私は、分岐鎖オリゴグリセロールを修飾した新規水溶性キャンプトテシン誘導体である SN38-BGL A および B を合成することに成功した。SN38-BGL A は、下痢の発症が軽減され、NSCLC と SCLC に対して CPT-11 とほぼ同等の抗腫瘍効果を示すといえる。このことから、SN38-BGL A は CPT-11 のようなキャンプトテシン誘導体が適用できる癌に対する薬物療法として有益である可能性が示唆される。しかし、本研究では SN38-BGL がどのように腫瘍組織内に到達しどのように抗腫瘍効果を発揮しているのかといった作用機序に関してや、水溶性向上したことによる SN38-BGL の ADME への影響に関しては十分に解明ができておらず、それらについて明らかにするためにも更なる検討が必要である。

分岐鎖オリゴグリセロールによる修飾は、抗がん剤などの難水溶性薬剤の親水性を改善するための単純かつ汎用性のある戦略であると考えられる。また、このような物性改善がもたらす効果として、副作用軽減、薬効改善などの患者の QOL 向上はもちろん、注射剤混合時の処方設計や、点滴投与時のルート確保において薬剤の溶解性に左右されることが少なくなる可能性が示唆され、医師などの医療従事者にも貢献できると考えている。



B

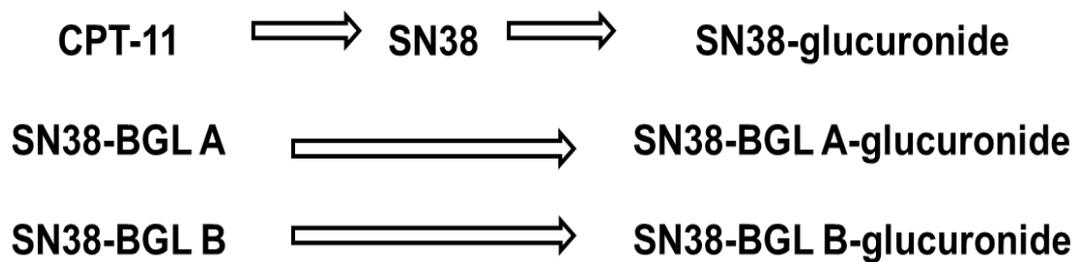


図 11 本研究のまとめ

(A) 本研究での結果を上図に示している。

(B) SN38-BGL A、SN38-BGL B は肝臓での代謝を受けて CPT-11 同様、それぞれグルクロン酸抱合体に変換される可能性が考えられると考察した。

第 3 章

参考文献

1. Chabot, G. G., Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet* **1997**, *33* (4), 245-59.
2. Alimonti, A.; Gelibter, A.; Pavese, I.; Satta, F.; Cognetti, F.; Ferretti, G.; Rasio, D.; Vecchione, A.; Di Palma, M., New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. *Cancer Treat Rev* **2004**, *30* (6), 555-62.
3. Takasuna, K.; Hagiwara, T.; Hirohashi, M.; Kato, M.; Nomura, M.; Nagai, E.; Yokoi, T.; Kamataki, T., Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res* **1996**, *56* (16), 3752-7.
4. Ferlay, J.; Parkin, D. M.; Steliarova-Foucher, E., Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* **2010**, *46* (4), 765-81.
5. Kamangar, F.; Dores, G. M.; Anderson, W. F., Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* **2006**, *24* (14), 2137-50.
6. Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; Lippman, S. M., Lung cancer. *N Engl J Med* **2008**, *359* (13), 1367-80.
7. Guidelines[®]), N. C. P. G. i. O. N., 小細胞肺癌ガイドライン 2017. **2017**.
8. Guidelines[®]), N. C. P. G. i. O. N., 非小細胞肺癌ガイドライン 2015. **2015**.
9. ヤクルト, <CPT-11 IF 2014 第 8 版.pdf>. **2014**.
10. Koizumi, F.; Kitagawa, M.; Negishi, T.; Onda, T.; Matsumoto, S.; Hamaguchi, T.; Matsumura, Y., Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Res* **2006**, *66* (20), 10048-56.
11. Matsuzaki, T.; Takagi, A.; Furuta, T.; Ueno, S.; Kurita, A.; Nohara, G.; Kodaira, H.; Sawada, S.; Hashimoto, S., Antitumor activity of IHL-305, a novel pegylated liposome containing irinotecan, in human xenograft models. *Oncol Rep* **2012**, *27* (1), 189-97.
12. Pastorino, F.; Loi, M.; Sapra, P.; Becherini, P.; Cilli, M.; Emionite, L.; Ribatti, D.; Greenberger, L. M.; Horak, I. D.; Ponzoni, M., Tumor regression and curability of preclinical neuroblastoma models by PEGylated SN38 (EZN-2208), a novel topoisomerase I inhibitor. *Clin Cancer Res* **2010**, *16* (19), 4809-21.
13. Sumitomo, M.; Koizumi, F.; Asano, T.; Horiguchi, A.; Ito, K.; Asano, T.; Kakizoe, T.; Hayakawa, M.; Matsumura, Y., Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* **2008**, *68* (6), 1631-5.
14. Tardi, P. G.; Dos Santos, N.; Harasym, T. O.; Johnstone, S. A.; Zisman, N.; Tsang, A. W.; Bermudes, D. G.; Mayer, L. D., Drug ratio-dependent antitumor activity of irinotecan and cisplatin combinations in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8* (8), 2266-75.
15. Zhang, H.; Wang, J.; Mao, W.; Huang, J.; Wu, X.; Shen, Y.; Sui, M., Novel SN38

conjugate-forming nanoparticles as anticancer prodrug: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* **2013**, *166* (2), 147-58.

16. Arpicco, S.; Stella, B.; Schiavon, O.; Milla, P.; Zonari, D.; Cattel, L., Preparation and characterization of novel poly(ethylene glycol) paclitaxel derivatives. *Int J Pharm* **2013**, *454* (2), 653-9.

17. Negishi, T.; Koizumi, F.; Uchino, H.; Kuroda, J.; Kawaguchi, T.; Naito, S.; Matsumura, Y., NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel. *Br J Cancer* **2006**, *95* (5), 601-6.

18. Matsumura, Y., Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* **2008**, *38* (12), 793-802.

19. Al-Kasspoles, M. F.; Williamson, S. K.; Henry, D.; Howell, J.; Niu, F.; Decedue, C. J.; Roby, K. F., Preclinical antitumor activity of a nanoparticulate SN38. *Invest New Drugs* **2013**, *31* (4), 871-80.

20. Ishihara, A.; Yamauchi, M.; Kusano, H.; Mimura, Y.; Nakakura, M.; Kamiya, M.; Katagiri, A.; Kawano, M.; Nemoto, H.; Suzawa, T.; Yamasaki, M., Preparation and properties of branched oligoglycerol modifiers for stabilization of liposomes. *Int J Pharm* **2010**, *391* (1-2), 237-43.

21. Nemoto H, A. T., Kamiya M. Kawamura T, Hino T, A quantitative investigation of the water-solubilizing properties of branched oligoglycerols. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *3003-3011* **2007**.

22. Miyamoto, L.; Watanabe, M.; Taoka, C.; Kono, M.; Tomida, Y.; Matsushita, T.; Kamiya, M.; Hattori, H.; Ishizawa, K.; Abe, S.; Nemoto, H.; Tsuchiya, K., A novel prodrug strategy for extremely hydrophobic agents: conjugation to symmetrically branched glycerol trimer improves pharmacological and pharmacokinetic properties of fenofibrate. *Mol Pharm* **2013**, *10* (7), 2723-9.

23. Nemoto, H.; Katagiri, A.; Kamiya, M.; Kawamura, T.; Matsushita, T.; Matsumura, K.; Itou, T.; Hattori, H.; Tamaki, M.; Ishizawa, K.; Miyamoto, L.; Abe, S.; Tsuchiya, K., Synthesis of paclitaxel-BGL conjugates. *Bioorg Med Chem* **2012**, *20* (18), 5559-67.

24. Miyamoto, L.; Watanabe, M.; Kono, M.; Matsushita, T.; Hattori, H.; Ishizawa, K.; Nemoto, H.; Tsuchiya, K., Cytotoxicity evaluation of symmetrically branched glycerol trimer in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J Toxicol Sci* **2012**, *37* (5), 1059-63.

25. Miyamoto, L.; Watanabe, M.; Tomida, Y.; Kono, M.; Fujii, S.; Matsushita, T.; Hattori, H.; Ishizawa, K.; Nemoto, H.; Tsuchiya, K., Acute oral toxicity evaluation of symmetrically branched glycerol trimer in ddY mice. *J Toxicol Sci* **2012**, *37* (6), 1253-9.

26. Chen, S.; Yueh, M. F.; Bigo, C.; Barbier, O.; Wang, K.; Karin, M.; Nguyen, N.; Tukey, R. H., Intestinal glucuronidation protects against chemotherapy-induced toxicity by irinotecan (CPT-11). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (47), 19143-8.

27. Lima-Junior, R. C.; Figueiredo, A. A.; Freitas, H. C.; Melo, M. L.; Wong, D. V.; Leite, C. A.; Medeiros, R. P.; Marques-Neto, R. D.; Vale, M. L.; Brito, G. A.; Oria, R. B.; Souza, M. H.;

Cunha, F. Q.; Ribeiro, R. A., Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. *Cancer Chemother Pharmacol* **2012**, *69* (4), 931-42.

28. Kenmotsu, H.; Yasunaga, M.; Goto, K.; Nagano, T.; Kuroda, J.; Koga, Y.; Takahashi, A.; Nishiwaki, Y.; Matsumura, Y., The antitumor activity of NK012, an SN-38-incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer* **2010**, *116* (19), 4597-604.

29. Nagano, T.; Yasunaga, M.; Goto, K.; Kenmotsu, H.; Koga, Y.; Kuroda, J.; Nishimura, Y.; Sugino, T.; Nishiwaki, Y.; Matsumura, Y., Antitumor activity of NK012 combined with cisplatin against small cell lung cancer and intestinal mucosal changes in tumor-bearing mouse after treatment. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (13), 4348-55.

30. Kurita, A.; Kado, S.; Kaneda, N.; Onoue, M.; Hashimoto, S.; Yokokura, T., Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **2000**, *46* (3), 211-20.

31. Kurita, A.; Kado, S.; Kaneda, N.; Onoue, M.; Hashimoto, S.; Yokokura, T., Alleviation of side effects induced by irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats by intravenous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* **2003**, *52* (5), 349-60.

32. Kon, R.; Tsubota, Y.; Minami, M.; Kato, S.; Matsunaga, Y.; Kimura, H.; Murakami, Y.; Fujikawa, T.; Sakurai, R.; Tomimoto, R.; Machida, Y.; Ikarashi, N.; Sugiyama, K., CPT-11-Induced Delayed Diarrhea Develops via Reduced Aquaporin-3 Expression in the Colon. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (1).

33. Lima-Junior, R. C.; Freitas, H. C.; Wong, D. V.; Wanderley, C. W.; Nunes, L. G.; Leite, L. L.; Miranda, S. P.; Souza, M. H.; Brito, G. A.; Magalhaes, P. J.; Teixeira, M. M.; Cunha, F. Q.; Ribeiro, R. A., Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. *Br J Pharmacol* **2014**, *171* (9), 2335-50.

34. Wardill, H. R.; Bowen, J. M.; Al-Dasooqi, N.; Sultani, M.; Bateman, E.; Stansborough, R.; Shirren, J.; Gibson, R. J., Irinotecan disrupts tight junction proteins within the gut : implications for chemotherapy-induced gut toxicity. *Cancer Biol Ther* **2014**, *15* (2), 236-44.

35. Yeung, C. Y.; Chan, W. T.; Jiang, C. B.; Cheng, M. L.; Liu, C. Y.; Chang, S. W.; Chiang Chiau, J. S.; Lee, H. C., Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. *PLoS One* **2015**, *10* (9), e0138746.

36. <OECD Guide line.pdf>.

37. de Man, F. M.; Goey, A. K. L.; van Schaik, R. H. N.; Mathijssen, R. H. J.; Bins, S., Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clin Pharmacokinet* **2018**, *57* (10), 1229-1254.

38. Dodds, H. M.; Hanrahan, J.; Rivory, L. R., The inhibition of acetylcholinesterase by

irinotecan and related camptothecins: key structural properties and experimental variables. *Anticancer Drug Des* **2001**, *16* (4-5), 239-46.

39. Gandia, D.; Abigeres, D.; Armand, J. P.; Chabot, G.; Da Costa, L.; De Forni, M.; Mathieu-Boue, A.; Herait, P., CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients. *J Clin Oncol* **1993**, *11* (1), 196-7.

40. Hyatt, J. L.; Tsurkan, L.; Morton, C. L.; Yoon, K. J.; Harel, M.; Brumshtein, B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Wadkins, R. M.; Potter, P. M., Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11. *Chem Biol Interact* **2005**, *157-158*, 247-52.

41. Kawato, Y.; Sekiguchi, M.; Akahane, K.; Tsutomi, Y.; Hirota, Y.; Kuga, H.; Suzuki, W.; Hakusui, H.; Sato, K., Inhibitory activity of camptothecin derivatives against acetylcholinesterase in dogs and their binding activity to acetylcholine receptors in rats. *J Pharm Pharmacol* **1993**, *45* (5), 444-8.

42. Drummond, D. C.; Noble, C. O.; Guo, Z.; Hong, K.; Park, J. W.; Kirpotin, D. B., Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy. *Cancer Res* **2006**, *66* (6), 3271-7.

43. Sapra, P.; Zhao, H.; Mehlig, M.; Malaby, J.; Kraft, P.; Longley, C.; Greenberger, L. M.; Horak, I. D., Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (6), 1888-96.

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し研究発案から遂行、結果解析に渡り、終始懇切なる御指導、御鞭撻、種々の有益な御助言を賜りました徳島大学大学院 医歯薬学研究部 医薬品機能生化学分野 土屋 浩一郎 教授、宮本 理人 助教、徳島大学薬学部 臨床薬学実務教育学分野 阿部 真治 教授に謹んで心より感謝に意を表します。

さらに、本研究を行うにあたり化合物の提供、実験操作に加え、御指導、御協力を頂きました徳島大学大学院 医歯薬学研究部 機能分子合成薬学分野 根本 尚夫 准教授に心から御礼申し上げます。

また、本研究における HE 染色に関して一から懇切丁寧に教えてくださった滋賀県立大学 人間文化学部 生活栄養学科 辰巳 佐和子 教授に心から感謝いたします。

最後に本研究に際し、御協力頂きました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 医薬品機能生化学分野 常松 保乃加 学士をはじめ、卒業生、在校生の皆様、並びに徳島大学大学院 医歯薬研究部 呼吸器・膠原病内科学分野の皆様、並びに徳島大学大学院 医歯薬研究部 機能分子合成薬学分野の皆様、徳島大学薬学部 臨床薬学実務教育学分野の皆様、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 医学域生理系 薬理学分野の皆様、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 分子栄養学分野の皆様心か

ら感謝いたします。