

アルブミン結合型パクリタキセル製剤
Abraxane[®]の薬物輸送メカニズムの解明
と新規アルブミンキャリアの創製

2022

濱 真壱

要旨

【研究目的】

Abraxane[®]には、従来のパクリタキセル製剤にはない切除不能な膵臓がんへの効能が認められており、高い有効性を示している。これには、一般的には血管内皮細胞に存在する正常アルブミン受容体Gp60や腫瘍間質に存在するアルブミン結合タンパク質Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) による効率的な経内皮輸送やがん細胞送達が関与していると考えられている。しかしながら、循環血液中に存在する多量な内因性アルブミンの存在下におけるAbraxane[®]の体内分布機構の詳細については、不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、Abraxane[®]のパクリタキセル送達機構の解明を試みた。加えて、Abraxane[®]由来HSA (Human Serum Albumin)の構造特性や物性についての知見を基に、より腫瘍集積性の高いアルブミンキャリアの創製を試みた。

【方法】

Abraxane[®]由来HSAの高次構造や分子表面の疎水性評価は、CDスペクトル法や疎水性蛍光プローブ法を用いて、内因性アルブミンであるNormal HSAと比較検討した。また、アルブミンの変性については、酸処理や加熱処理により調製し、*in vitro*において膵臓がん細胞における細胞内移行性の評価、さらに担癌マウスを用いた体内動態および抗腫瘍効果の評価を行った。

【結果】

Normal HSAはGp60経路を介した輸送であった一方で、Abraxane[®]由来HSAは変性アルブミンによって細胞内取り込みが減少したことから、変性アルブミン受容体による全く別の輸送機序を介していることが明らかとなった。実際に、Abraxane[®]由来HSAはNormal HSAとは異なる膜タンパク質と相互作用していることが確認された。さらに、Abraxane[®]由来HSAの構造特性をNormal HSAと比較したところ、二次構造変化や分子表面の疎水性変化が惹起されていることが示唆された。以上のことから、細胞への取り込みに関して、Abraxane[®]由来HSAは、Normal HSAの取り込みに関与するGp60ではなく、変性アルブミン受容体等を介していることが明らかとなった。そこで、変性剤や加熱処理により調製した変性アルブミンの細胞取り込みを評価したところ、*in vitro*において酸処理HSAや熱処理HSAはAbraxane[®]由来HSAよりもさらに高い細胞内取り込みが観察された。また*in vivo*において、酸処理HSAではNormal HSAに比べ、有意に高い腫瘍組織への集積が認められた。

【考察】

本研究ではAbraxane[®]の腫瘍移行機構の解明を行い、Abraxane[®]由来HSAは、おそらく製造工程で暴露された有機溶媒などによってHSAが僅かに変性を受けたことで、Gp60ではない変性アルブミン受容体を介して腫瘍に移行するというユニークなメカニズムを有することを見出した。Abraxane[®]由来HSAの取り込みに寄与する変性アルブミン受容体の同定には至らなかったものの、がん細胞での発現が知られているGp18やGp30等の変性アルブミン受容体が関与している可能性を考えている。本検討から、変性アルブミン受容体の同定を行うことで、受容体との親和性をより高めた新規HSAキャリアの開発が可能であることが示唆された。

【結論】

本検討で、Abraxane[®]に含まれている HSA が単なる可溶化剤としての役割だけではなく、パクリタキセルの DDS キャリアとしても機能していることを初めて明らかにした。本知見は、変性アルブミン受容体を介した次世代アルブミンキャリアによる薬物輸送機構の新たな可能性を拓く有用な基礎資料となることが期待される。

本論文で使用した略語一覧

AcOEt	酢酸エチル	ethyl acetate
Alexa750-HSA	Alexa750 標識 HSA	Alexa750 labelled HSA
BD140		4,4-difluoro-1-methyl-3-(4-propoxystyryl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
C26	マウス大腸がん由来細胞株	Colon26
CD	円偏光二色性	circular dichroism
CHCl ₃	クロロホルム	chloroform
Cys	L-システイン	L-cysteine
DDS	ドラッグデリバリーシステム	drug delivery system
DNSA	ダンシルアミド	dansylamide
DTT	ジチオトレイトール	dithiothreitol
EAT	内因的アルブミン輸送	endogenous albumin transport
EPR		enhanced permeation and retention
F-Alb	ホルミル化アルブミン	formylated albumin
FcRn	胎児性 Fc 受容体	neonatal Fc receptor
FDA	アメリカ食品医薬品局	food and drug administration
FITC	フルオレセイン	fluoresceinisothiocyanate isomer-I
FITC-Abr	FITC 標識 Abraxane [®] HSA	FITC labelled Abraxane [®] HSA
FITC-Alb	FITC 標識 HSA	FITC labelled HSA
Gp18	グリコプロテイン	18-kDa glycoprotein
Gp30	グリコプロテイン	30-kDa glycoprotein
Gp60	グリコプロテイン	60-kDa glycoprotein
HSA	ヒト血清アルブミン	human serum albumin
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	human umbilical vein endothelial cells
<i>i.v.</i>	静脈内	intravenous
M-Alb	マレイル化アルブミン	maleylated albumin
MeOH	メタノール	methanol
MST	生存期間中央値	median survival time
nab		nanoparticle albumin bound
NaOCl	次亜塩素酸ナトリウム	sodium hypochlorite

PTX	パクリタキセル	paclitaxel
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS ポリアクリルアミドゲル 電気泳動	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SPARC		secreted protein acidic and rich in cysteine
WB	ウエスタンブロッティング	western blotting

目次

第1章 緒言.....	7
第2章 Abraxane [®] HSA の特性評価.....	13
第1節 序.....	13
第2節 実験方法.....	15
第3節 実験結果.....	24
第1項 Abraxane [®] HSA の物理化学的特性評価.....	24
第2項 数種がん細胞のエンドサイトーシス経路の探索.....	28
第3項 SUIT-2 ヒト膵臓がん細胞への取り込み評価.....	35
第4項 HUVEC ヒト臍帯静脈内皮細胞への取り込み評価.....	41
第5項 SPARC を介した取り込み評価.....	45
第6項 膜タンパク質の相互作用評価.....	48
第4節 考察.....	50
第5節 小括.....	55
第3章 変性アルブミンの有用性評価.....	56
第1節 序.....	56
第2節 実験方法.....	58
第3節 実験結果.....	61
第1項 変性アルブミンの調製.....	61
第2項 変性アルブミンの細胞取り込み評価.....	65
第3項 変性アルブミンの物理化学的特性評価.....	72
第4項 変性アルブミンの体内動態特性評価.....	76
第5項 変性アルブミン結合 PTX の抗腫瘍活性評価.....	83
第4節 考察.....	86
第5節 小括.....	88
第4章 総括.....	89
参考文献.....	93

第1章 緒言

日本人が一生のうちにがんと診断される割合は、男女ともに2人に1人とされている。本邦における死因の第1位であり、人口の高齢化と共に増加しており、2019年度においては、全死因のうち27.3%を占めている。現在の標準的ながんの治療法は手術療法、放射線療法、化学療法と大きく3つに分類されており、がんの治療は外科的手術や放射線療法が主流で、化学療法は補助療法として併用される場合が多い。その中でも、難治性がんである膵臓がんはがん死亡数の第4位であり、がん死亡全体の9.5%を占める予後不良のがんである。外科的手術による切除が可能で、治癒の可能性のある膵臓がん患者は少ない。その理由として、他の悪性腫瘍とは異なり膵臓がんでは通常、早期に特徴的な症状はなく、胃の裏側にあるため早期発見が難しく、診断時には切除不能な進行がんの状態で見つかるからである。遠隔転移を伴うがん進行の後期まで現れないことが多いため、化学療法が膵臓がん患者の唯一の治療選択肢となることが多い。その一方で、化学療法での治療効果はほとんどの場合低く、局所進行性の膵臓がんの生存期間中央値は6~10か月であり、転移性膵臓がん患者の生存期間中央値は3~6か月となっており、膵臓がん治療のための新しい戦略が必要とされている。

一方、治療効果のみならず抗がん剤には重篤な副作用が報告されており、化学療法の継続に大きな支障をきたす場合がある。事実、化学療法において副作用は問題視されており、臨床応用されている具体例として、Taxol[®]が挙げられる。Taxol[®]の有効成分であるパクリタキセル (PTX)は太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮より単離されたタキサン系微小管阻害薬に分類される抗がん剤であり、微小管の働きを阻害することで細胞分裂を停止させアポトーシスを引き起こす¹ (Fig. 1)。

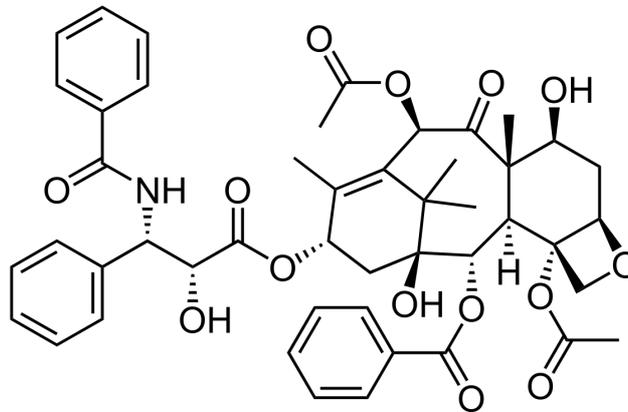


Fig. 1, Structure, molecular formula, and molecular weight of PTX.

Molecular formula of PTX $C_{47}H_{51}NO_{14}$. Molecular weight of PTX 853.

卵巣がん、非小細胞肺癌、乳がん、胃がんを含む多種多様な悪性腫瘍に対して抗腫瘍活性を示している²。しかし、PTXはその高い疎水性から、Taxol[®]では溶解補助剤としてポリオキシエチレンヒマシ油 (Cremophor[®]-EL) 及び無水エタノールが使用されている (Fig. 2)。

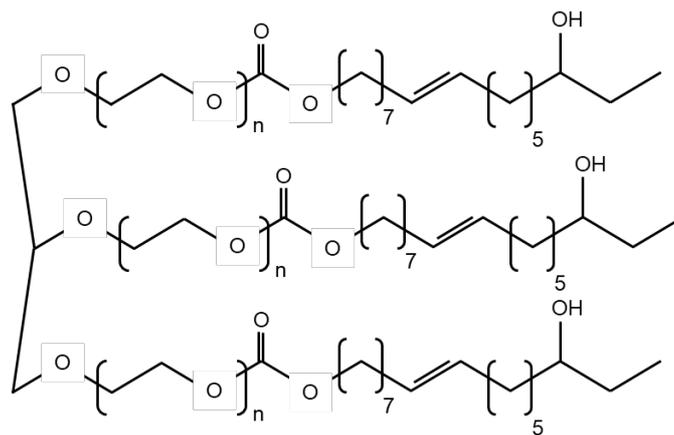


Fig. 2, Structure of Polyoxyethylene Castor Oil (Cremophor[®]-EL).

The average number of moles of ethylene oxide added is 3, 10, 20, 35, 40, 50 and 60.

これらの溶解補助剤に関連するアレルギー反応の問題から³⁻⁵、Taxol[®]では過敏症対策として、前処置としてステロイドや抗ヒスタミン薬を投与することが不可欠となっている⁶。こうした予防策を講じてもなお、Taxol[®]に対する過敏反応を完全に防ぐには至っていない。一方、治療効果の面でも、Cremophor[®]-EL は静脈投与された後に、血漿中で Cremophor[®]-EL ミセルを形成し PTX を捕捉し、分布容積の減少によるバイオアベイラビリティの低下をもたらすことが報告されており、その結果、抗腫瘍活性が失われることが報告されている^{7,8}。また、ドキシソルビシンとの間には薬物動態学的相互作用が認められるといった報告もあり、Cremophor[®]-EL ミセルが他薬剤との薬物動態学的相互作用に関与していると考えられている^{9,10}。

このような背景の中、Taxol[®]に含まれる Cremophor[®]-EL 誘発毒性を低減するために、ミセル、ポリマー、リポソームなど様々な新規製剤の開発が行われている。その中でも、FDA の承認と商業化に成功した唯一の医薬品が Abraxane[®]である^{11,12}。PTX の物理化学的性質及びヒト血清アルブミン (HSA) との結合親和性に着目し、Cremophor[®]-EL 及び無水エタノールに代わる溶解補助剤として、HSA を PTX 存在下でナノ粒子化した Abraxane[®]が開発された。HSA はヒトの血漿中に最も多く存在し、血漿膠質浸透圧の調節や内因性および外因性のリガンドの輸送担体として機能するタンパク質であり、近年 DDS キャリアとしても注目されている¹³⁻¹⁷。Abraxane[®]はナノ粒子として調製されており、平均粒子サイズが約 130 nm のアルブミン結合型 PTX 製剤で、希釈により投与後は速やかに崩壊し、HSA 単量体 (約 7 nm) としての動態を示す¹⁸。副作用や薬物動態に悪影響を与えていた Cremophor[®]-EL 及び無水エタノールを HSA へと変更することで、過敏症予防を目的としたステロイド前投与が不要になり、薬剤投与時間が 30 分と短縮され、患者負担の軽減につながっている (Table 1)。

Receptor	Abraxane [®]	Taxol [®]
Type of additive	HSA	Cremophor [®] -EL, Absolute ethanol
Premedication	Not need	Steroids, Antihistamine
Dosing time	30 min	1 ~ 3 hr
Dose	260 mg/m ²	175 mg/m ²

Table 1, Information on the administration of Abraxane[®] and Taxol[®].

興味深いことに、Abraxane[®]は従来の PTX 製剤と異なり、切除不能な膵がんでの承認も新たに追加されている¹⁹⁻²²。その理由として、HSA 介在性の動態特性の関与が示唆されている。Abraxane[®]は、薬物ターゲティングや放出制御などの機能を有する製剤として開発されたわけではないが、Taxol[®]と比較し、は血管内皮細胞との結合や微小管への結合度が有意に高いという幾つかの利点があることが報告されている²³。このことは、PTX の溶解補助剤としての HSA が、がん治療効果向上作用をもたらしている大変興味深い一例でもある。さらに、Abraxane[®]が、がん治療効果向上作用をもたらした理由の 1 つとして、HSA のターゲティング能力が関わっているとされている。

ターゲティングとは、抗がん剤を DDS キャリアに搭載することで体内動態を制御し、受動的な薬物移行により目的組織へ送達する「受動的ターゲティング」と標的部位に特異的に発現する受容体あるいは抗原と親和性を有するリガンドや抗体をキャリアに付与することで選択的に薬物を送達する「能動的ターゲティング」の 2 つに大別される。がん治療における、受動的ターゲティングの 1 つに、Maeda、Matsumura らによって提唱された、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果が挙げられる²⁴。これは、腫瘍組織の増殖に伴う血管新生により、血管内皮細胞間の比較的広い間隙を持つ脆弱な血管が存在することと、腫瘍内のリンパ組織が成熟していないことによる排泄機構の抑制といった腫瘍環境に起因して、ナノマテリアルが循環血液中から腫瘍血管を透過して、腫瘍組織中に滞留しやすくなる現象である。この理論は、エバンスブルーを担がんマウスに静脈内投与すると、腫瘍組織にエバンスブルーががん組織選択的に集積することから見出された。投与されたエバンスブルーのほとんどは血液中でアルブミンと強く結合した状態で存在していることを踏まえると、このエバンスブルーの腫瘍組織への集積はアルブミンが効率的に腫瘍に集積していることを意味している。

HSA の EPR 効果による受動的ターゲティングの他に、能動的に腫瘍細胞にターゲティングされるという知見が報告されている²⁵⁻²⁷。具体的には、血管内皮細胞の表面にあるアルブミン受容体である、Gp60 を介した受容体輸送によるアルブミンの送達や^{23,28}、腫瘍間質に存在するアルブミン結合タンパク質 Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) が HSA と相互作用を示すことで、効率的にがん細胞への到達が促されているというものである^{29,30}。また、がん細胞がマクロピノ介在性サイトーシスを介して取り込んだ HSA をアミノ酸源として利用しているといった報告もあり、Ishima らは、腫瘍細胞が積極的に HSA を取り込み、細胞増殖を続けようとするこの現象のことを「Endogenous Albumin Transport (EAT) System」と新たに提唱している³¹。さらに、血管新生が乏しく血管密度が

低いことで、腫瘍組織全体の透過性が乏しい膵臓がんのような難治性がんでは、Gp60 や SPARC の発現が多いことから、HSA はこのような難治性がんに対して、より高い運搬特性を発揮すると考えられる³²。PTX の HSA へのタンパク質結合率は 90%を超えていることから^{33,34}、Abraxane[®]の有効成分である PTX は添加剤の HSA または循環血液中の HSA と結合し、血管内皮細胞の表面にあるアルブミン受容体である Gp60 を介した受容体輸送とアルブミン関連タンパク質である SPARC との相互作用に起因し³⁵⁻³⁷、腫瘍に蓄積しているとこれまで考えられてきた (Fig. 3)。

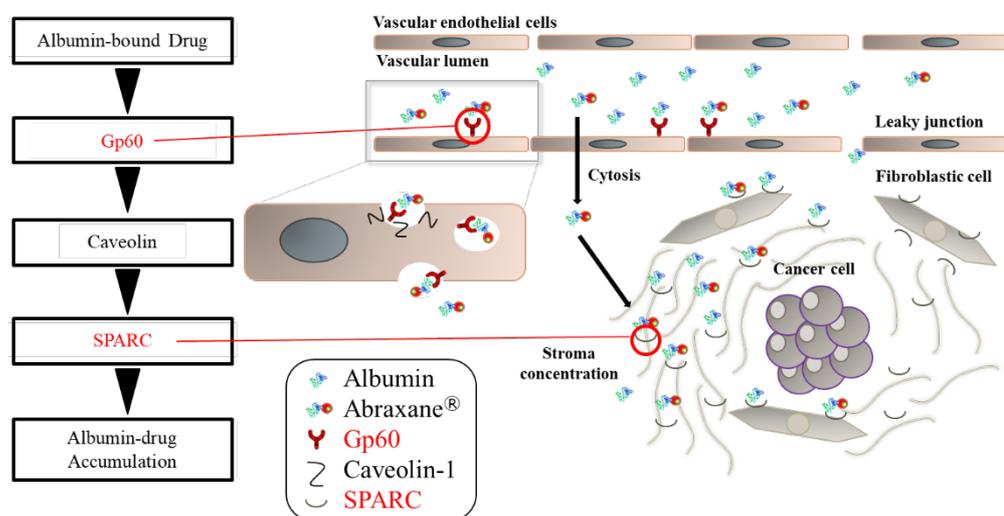


Fig. 3, Mechanisms for the transport and accumulation of albumin-bound paclitaxel (Abraxane[®]) in tumors.

一方で、循環血液中には大量の内因性アルブミン (約 40 mg/mL) が存在しており、静脈内投与された Abraxane[®] (PTX C_{max} : 約 20 μ g/mL、Abraxane[®] HSA : 約 0.2 mg/mL)³⁸が大過剰の内因性アルブミン存在下において、Gp60 や SPARC などを経た担体輸送で送達されるとは考えにくい。しかしながら、腫瘍部位に Abraxane[®]が送達し、確かに臨床では治療効果を示していることから、³⁹⁻⁴¹ ここに何らかのブラックボックスがあると考えた。興味深いことに、血管内皮細胞に発現するアルブミンレセプターは Gp60 以外にも、リサイクリングに関与している neonatal Fc receptor (FcRn)^{42,43}や化学修飾された HSA を認識するスカベンジャー様受容体 Gp18 と Gp30 など⁴⁴⁻⁴⁶多岐にわたるアルブミン受容体⁴⁷⁻⁵⁰が報告されている (Table 2)。

Receptor	Expression site	Target
Gp60	Endothelial cells	Normal albumin
Gp18	Endothelial cells, Macrophages, Fibroblast, Cancer cell	Modified albumin
Gp30	Endothelial cells, Macrophages, Fibroblast, Cancer cell	Modified albumin
SPARC	Endothelial cells, Fibroblast, Cancer cell, Smooth muscle cells	Normal albumin
FcRn	Endothelial cells, Intestines, Kidneys, Liver, Lungs	Normal albumin
CD36	Renal tubular cells, Adipocytes, Monocytes	Modified albumin
Megalin	Renal tubular cells, Intestine, Placenta	Normal and Modified albumin
Calreticulin	Cancer cell	Normal albumin
Cubilin	Renal tubular cells, Intestine, Placenta	Normal and Modified albumin

Table 2, Schematic summary of albumin receptor

以前の報告では、薬物を搭載したアルブミンは変性アルブミン受容体を介して取り込まれることが示唆するものもある^{51,52}。さらに、Abraxane[®]は Nanoparticle albumin bound (nab)-technology で調製されており⁵³、PTX を溶解するために有機溶媒が含まれている。HSA は有機溶媒によって変性することが知られていることから⁵⁴⁻⁵⁶、HSA は Abraxane[®]の調製中に変性したのではないかと考えた。そこで、筆者は、Abraxane[®]に由来する HSA が製造プロセス中に有機溶媒による変性を受け、内因性 HSA の経内皮輸送に関連する Gp60 ではなく、変性アルブミン受容体などの他の経路を介した経内皮輸送が行われているのではないかと仮説を立てた。変性アルブミン受容体などの内因性アルブミンと競合が起きにくい他の担体を介した輸送経路であれば、Abraxane[®]は豊富な内因性 HSA の存在下でも腫瘍に蓄積する可能性がある。これらの点を明らかにすることは、溶解補助剤として Abraxane[®]に添加されている HSA が PTX の DDS キャリアとして機能していることを示すだけでなく、変性アルブミンレセプターを介した薬物送達という次世代のアルブミン DDS の扉を開くことになると考えられる。

そこで本研究では、第 2 章で Abraxane[®]由来の HSA(Abraxane[®] HSA)と内因性 HSA (Normal HSA) の物理化学的特性を比較し、血管内皮から腫瘍組織、腫瘍間質から腫瘍細胞、腫瘍細胞での取り込みの 3 段階にわけ Abraxane[®] の薬物送達機構を解明することを目的とした。第 3 章では様々な変性アルブミンの開発を行い、膵臓がん同所移植モデルマウスにおける有効性評価を検証した。以下に本研究で得られた知見を示す。

第2章 Abraxane[®] HSA の特性評価

第1節 序

緒論でも述べたように、Abraxane[®]と従来の PTX 製剤では薬物送達メカニズムが異なり、Abraxane[®]の薬物送達は HSA 介在性という説が一般的に支持されている。現在報告されている Abraxane[®]の薬物送達メカニズムは、血管内皮細胞にあるアルブミン受容体である Gp60 を介したアルブミン独自の受容体介在性の輸送メカニズムが関与し、微小血管内皮細胞をトランスサイトーシスしていると考えられている。具体的には、血管内皮細胞上の Gp60 受容体へアルブミンが結合した後、カベオラに存在する Caveolin-1 を活性化し、細胞内を移動し、基底外側膜と融合し、カベオラから間質に物質を放出する。そのため、アルブミン-薬物複合体である Abraxane[®]もカベオラを介して内皮を通過し腫瘍間質に輸送されると考えられている⁵⁷。この輸送メカニズムの根拠として、Gp60 /カベオラ輸送の既知の阻害剤である Methyl- β -cyclodextrin によって Abraxane[®]の細胞内取り込みが阻害されることがデータとして示されているものの⁵⁸、変性アルブミンの輸送にもカベオラが関与することが知られているため⁵⁹、Gp60 を介しているとは断定できない。しかしながら、これまでに Abraxane[®]由来の HSA が取り込まれる際に Gp60 以外のアルブミン経路が関与することを調査した研究はない。

変性または修飾されたアルブミンと相互作用する受容体に関して、正常なアルブミンよりも高い親和性を示す受容体も報告されている。実際に、循環血液中のアルブミンは炎症や糖尿病、高脂血症などの疾患時には酸化反応を通じて、変性アルブミンになっている。これらの変性したアルブミンを認識するスカベンジャー様受容体として Gp18 や Gp30 が報告されており、血管内皮やマクロファージ、腫瘍に広く存在することが知られている⁴⁶。変性アルブミン受容体は生体内で変性を受けたアルブミンを分解する生理的役割を担っていると考えられている⁵⁹。正常なアルブミンは Gp18 や Gp30 とは強く結合せず、優先的に Gp60 に結合する一方、金修飾アルブミンやマレイル化アルブミン (M-Alb)、ホルミル化アルブミン (F-Alb) のような修飾アルブミンは Gp18 や Gp30 に強固に結合する。実際に、化学修飾ウシ血清アルブミンは正常なウシ血清アルブミンよりも、約 1000 倍高い親和性で Gp18 や Gp30 と相互作用することが報告されている^{44,45}。このことは、正常なアルブミンと変性アルブミンは異なる受容体により認識されていることを示し、互いに独立した輸送経路を介していることを示唆している。つまり、Abraxane[®]由来の HSA が正常なア

アルブミンとは異なる物性を持つ場合、内因性のアルブミンとは異なる輸送メカニズムが存在している可能性がある。

また、アルブミン関連タンパク質の1つに SPARC が挙げられる。膵臓がんにおいては、腫瘍体積の約 90%が腫瘍間質であることも知られており、予後不良に関連する複数のタンパク質および成長因子を発現している。SPARC は正常組織ではほとんど観察されず、腫瘍間質の線維芽細胞で高度に発現しており、SPARC の過剰発現は予後不良と関連している。興味深いことに、Abraxane[®]の治療効果と SPARC の過剰発現に相関があることが示されており、アルブミン結合とその後の腫瘍細胞による取り込みに関わっていることが、いくつかの前臨床試験で示唆されている^{30,32}。これは、腫瘍間質に存在する SPARC と Abraxane[®]由来の HSA が何らかの相互作用を示し、腫瘍微小環境への PTX の送達を促進することを示唆している。その一方で、マウスモデルでは Abraxane[®]の治療効果と SPARC 発現は関連しないという報告もあり⁶⁰、SPARC を介した Abraxane[®]の細胞内アルブミン取り込みには、未だ議論が絶えない状況である。

こうした、アルブミンとアルブミン関連タンパク質との相互作用に影響を及ぼす要因の1つに、アルブミンの物理化学的特性が関わっていると考えられている。アルブミンの構造変化がアルブミン受容体との相互作用に影響を与えることもわかっており⁶¹、陰イオン性のナノ粒子に吸着されたアルブミンはその本来の構造を保持し、正常なアルブミン受容体に結合することが分かっている。その一方で、陽イオン性のナノ粒子に吸着されたアルブミンは二次構造が変化し、スカベンジャー様受容体に優先的に認識されることが分かっている⁶²。また、化学修飾により、立体配座的に修飾されたアルブミンは Gp18 や Gp30 に優先的に相互作用することが知られており、これらの知見は、アルブミンの構造が受容体との相互作用に大きく関わっていることを示している。

そこで、本章ではまず Abraxane[®]由来の HSA (Abraxane[®] HSA) の物理化学的特徴に注目し、Normal HSA とを比較した。また、血管内皮細胞、がん細胞での取り込み経路の違いに着目し、詳しい取り込みメカニズムの解明を試みた。以下に得られた知見を示す。

第 2 節 実験方法

実験試料

ヒト血清アルブミンは、化学及び血清療法研究所またはニチャク、ベネシスから購入したものを Chen らの方法に従い脂肪酸を除去し、透析したのち凍結乾燥したものを実験に供した。平均分子量は 66,500 とした。Abraxane[®] は大鵬薬品工業株式会社のもを購入して使用した。透析膜は、REPLIGEN 社のスペクトラポア 7 透析膜 (分画分子量=3,500) のものを購入し、透析液にて直前で洗浄した後に使用した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (High Glucose) は gibco 社のもを購入した。Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地、塩酸 (HCl)、Bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt、Dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt、RIPA バッファー、Cell Counting Kit-8、FGF-Basic, Human, Recombinant、MCDB 131 Medium、ProteoGuard[™] EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail、ピロリン酸、無水マレイン酸、1,4-ジオキササン、Anti-SPARC、Amiloride (hydrochloride)は富士フィルム和光純薬より購入した。Amicon[®] Ultra-15、Fluoresceinisothiocyanate isomer-I (FITC)、Chlorpromazine、1,4-dithiothreitol (DTT) は Merck 社より購入した。Alexa Fluor[™] 750 NHS Ester (Succinimidyl Ester)、Pierce[™] Silver Stain、Pierce[™] BCA Protein Assay Kit、Lipofectamine[™] 3000 Transfection Reagent、Opti-MEM[™]は Thermo Fisher 社より購入した。Paclitaxel (PTX) は Med Chem Express 社より購入した。Protein A/G PLUS-Agarose は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。コラーゲンコート溶液は東洋紡株式会社より購入した。anti-Dibromotyrosine (DiBrY) は Bio connect 社より購入した。Anti-Albumin, Human, Goat-Poly はフナコシ株式会社より購入した。その他、試薬、溶媒類は全て市販特級品を使用した。水は Merck Millipore 社の超純水製造装置で超純水を用事調製して使用した。

統計解析

実験データは平均値±標準誤差で示した。2 群間比較の有意差検定は Student の t-検定を用いて行った。多群間の有意差検定には、ANOVA 検定を用いた。危険値が 0.05 以下であるとき統計学的に有意差があると判断した。

各種細胞の培養・継代

培養に用いた器具類は全てオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作はクリーンベンチ内で、無菌的に行った。

1. SUIT-2 GLuc (SUIT-2) 細胞

ヒト膵臓がん由来細胞である SUIT-2 細胞は 10% FBS、100 U penicillin/mL、100 µg streptomycin /mL を含む DMEM 培地を用いて SUIT-2 細胞を懸濁し、プラスチック製培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達する前に CO₂ インキュベーターからディッシュを取り出し、培養上清を除去したのち、PBS で洗浄した。その後、トリプシン代替物である TrypLE にて回収し、培養液を加え、直ちに遠心分離 (室温、1000×g、5 分) した。上清を除去し、再度培養液を加えて懸濁したのち、培養ディッシュに播種することで継代を行った。

2. Panc-1 細胞

ヒト膵臓がん由来細胞である Panc-1 細胞は 10% FBS、100 U penicillin/mL、100 µg streptomycin /mL を含む DMEM 培地を用いて SUIT-2 細胞を懸濁し、プラスチック製培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達する前に CO₂ インキュベーターからディッシュを取り出し、培養上清を除去したのち、PBS で洗浄した。その後、トリプシン代替物である TrypLE にて回収し、培養液を加え、直ちに遠心分離 (室温、1000×g、5 分) した。上清を除去し、再度培養液を加えて懸濁したのち、培養ディッシュに播種することで継代を行った。

3. Colon26 細胞

マウス大腸がん由来細胞である Colon26 細胞は 10% FBS、100 U penicillin/mL、100 µg streptomycin /mL を含む RPMI 培地を用いて SUIT-2 細胞を懸濁し、プラスチック製培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達する前に CO₂ インキュベーターからディッシュを取り出し、培養上清を除去したのち、PBS で洗浄した。その後、トリプシン代替物である TrypLE にて回収し、培養液を加え、直ちに遠心分離 (室温、1000×g、5 分) した。上清を除去し、再度培養液を加えて懸濁したのち、培養ディッシュに播種することで継代を行った。

4. HUVEC

ヒト血管内皮細胞である HUVEC は 10% FBS、100 U penicillin/mL、100 µg streptomycin /mL、20 ng/mL FGF を含む MCDB 培地を用いて HUVEC を懸濁し、コラーゲンコートでコーティングしたプラスチック製培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達する前に CO₂ インキュベーターからディッシュを取り出し、培養上清を除去したのち、PBS で洗浄した。その後、トリプシン代替物である TrypLE

にて回収し、培養液を加え、直ちに遠心分離 (室温、1000×g、5分) した。上清を除去し、再度培養液を加えて懸濁したのち、培養ディッシュに播種することで継代を行った。

タンパク質定量

タンパク質の濃度は、Bradford 法または BCA 法により求めた。基本的には Bradford 法を使用し、細胞内アルブミンの定量には BCA 法を用いた。検量線には、ウシ血清アルブミンを使用した。

CD スペクトルの測定

JASCO J-820 型分光偏光計を用いた。タンパク質を PBS (pH 7.4) 中にて 10 μM の濃度になるよう調整した。近赤外領域の CD スペクトルは 10 mm セルを、遠赤外領域の CD は 1 mm セルを用いてそれぞれ測定を行った。

ヘリックス含量は Chen らの方法に従い、222 nm における $[\theta]$ を用いて、下記式により算出した。

$$\alpha\text{-helix contents (\%)} = -([\theta]_{222\text{ nm}} + 2340) / 30300 \times 100$$

トリプトファン由来の蛍光の測定

蛍光分光光度計 (日本分光、FP-8200)を用いた。タンパク質を PBS (pH 7.4) 中にて 10 μM の濃度になるよう調整した。10 mm セルを用いて測定を行った。励起波長 295 nm、蛍光波長 300-550 nm の蛍光強度を測定した。

疎水性領域の測定

蛍光分光光度計 (FP-8200、日本分光)を用いた。タンパク質を PBS (pH 7.4) 中にて 10 μM の濃度になるよう調整した。さらに疎水領域探索プローブである Sypro orange 溶液を 500 倍希釈になるように加えた。10 mm セルを用いて測定を行った。励起波長 470 nm、蛍光波長 520-620 nm の蛍光強度を測定した。

Native-PAGE

Native-PAGE は 30% アクリルアミド、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、10% AmperS、TEMED を含む自作ゲル (12.5%) を使用して行い、還元試薬を除いたサンプルバッファーに溶解しサンプルは 2.5 $\mu\text{g}/\text{レーン lane}$ でアプライ添加し、電気泳動後にた後 CBB 染色した。

Abraxane[®]から PTX の除去

Abraxane[®]を PTX 濃度で 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下に調整し、Amicon Ultra-4 (NMWL : 10 kDa) を用いて、限外ろ過により PTX を除去した。ろ液中の PTX 濃度が約 100 nM 以下になるまで繰り返し限外ろ過を行った。

HSA の FITC 標識

凍結乾燥処理後の HSA を 0.1 M 炭酸ナトリウム溶液 (pH 9.0) に溶解させ、4 mg/mL に調整した。FITC (5 mg/mL (in DMSO)) を、HSA 溶液 1 mL に対し、100 μL 添加後、遮光条件下 4°C で 3 hr 回転混和した。その後、Amicon Ultra-4 (NMWL : 10 kDa) を用いて、限外ろ過により未反応の FITC を除去した。FITC 標識効率についてはサンプルの FITC 濃度 (マイクロプレートリーダーにより測定した吸光度 (495 nm) / モル吸光係数 (68000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)) 及び、HSA 濃度 (Bradford 法) により算出した (標識効率 ; FITC/HSA = 1.04 ± 0.08)。

細胞障害性評価

96 well plate にそれぞれ SUIT-2 及び Panc-1、Colon26 細胞を播種 (1×10^4 cells/well) して、24 hr 反応後、Amiloride、Chlorpromazine、Methyl- β -cyclodextrin を添加した。これら試薬添加 24 hr 後に、MTT assay により細胞生存率を評価した。

• MTT assay

PBS で洗浄後、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を medium で 10 倍希釈した溶液を 100 mL を添加し、37°C で 2 hr 反応後に、マイクロプレートリーダーにより吸光度(450 nm)を測定し、細胞生存率(%)を以下の式に従い、算出した。

$$\text{Cell survival rate (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A : Absorbance of sample

B : Absorbance of background

C : Absorbance of control

Normal HSA のエンドサイトーシス経路競合阻害評価

12 well plate に SUIT-2 及び Panc-1、Colon26 細胞を播種 (1×10^5 cells/well) し、24 hr 反応後、無血清培地に置換し、その 2 hr 後に、細胞障害性評価より算出された IC₈₀ の濃度で Amiloride、Chlorpromazine、Methyl- β -cyclodextrin を加えた。その 0.5 hr 後に FITC-Alb を 200 μ g/mL 添加し、2 hr 後に PBS で洗浄し細胞を PIPA 溶液で溶解処理した。回収した細胞懸濁液を遠心処理し (16,000 rpm、15 min、4°C)、上清の蛍光強度 (Ex/Em : 485 nm / 535 nm) をプレートリーダー (Infinite F200 pro[®]: Tecan) を用いて測定した。

温度変化による細胞内移行性評価

12 well plate に SUIT-2 細胞を播種 (1×10^5 cells/well) し、24 hr 反応後、無血清培地に置換し、37、26、4°C で 2 hr 反応を行った。その後、FITC-Alb を 200 μ g/mL 添加し、3 hr 後に細胞を回収した。回収した細胞懸濁液を遠心処理し (16,000 rpm、15 min、4°C)、上清の蛍光強度 (Ex / Em : 485 nm / 535 nm) をプレートリーダー (Infinite F200 pro[®]: Tecan) を用いて測定した。

化学修飾された変性アルブミンの調製

ホルムアルデヒド処理アルブミン (F-Alb) とマレイル化アルブミン (M-Alb) の 2 種類の化学修飾アルブミンを調製した。

• F-Alb

凍結乾燥処理後の HSA を (4 mg/mL) を、ホルムアルデヒド溶液 (最終濃度 20% vol/ vol) に添加し 37°C で 1 hr 反応し、その反応液を PBS に対して透析し、F-Alb を得た。

• M-Alb

凍結乾燥処理後の HSA を (4 mg/mL) を、0.1 M ピロリン酸ナトリウム溶液 (pH 9.0) で溶解し、1,4-ジオキサン (pH 9.0) 中の 0.5 mL の 1 M 無水マレイン酸と氷上で 5 分間反応し、その反応液を PBS に対して透析し、M-Alb を得た。

F-Alb および M-Alb の α ヘリックス含有量は、それぞれ 36.8% および 32.3% であった。

修飾アルブミンを使用した競合阻害評価

SUIT-2 および HUVEC を無血清培地に置換し、2 hr 反応後、阻害剤として変性アルブミン受容体阻害剤 F-Alb (1.25 mg/mL) または M-Alb (1.25 mg/mL)、Normal HSA (1.25 mg/mL) を添加した。その 0.5 hr 後に、FITC-Alb または FITC-Abr (200 mg/mL) とともに、37°C で 2 hr 反応した。次に、細胞を PBS で 3 回洗浄し、RIPA 溶液で溶解し、蛍光定量を行った。

F-Alb、M-Alb 処理後の PTX 取り込み

12 well plate に SUIT-2 を播種 (1×10^5 cells/well) し 24 hr 反応後、無血清培地に置換し、2 hr 反応後、阻害剤として変性アルブミン受容体阻害剤 F-Alb (1.25 mg/mL) または M-Alb (1.25 mg/mL)、Normal HSA (1.25 mg/mL) を添加した。その 0.5 hr 後に、Abraxane[®] (2 nM PTX) とともに、37°C で 2 hr 反応し、細胞内 PTX を定量するために、アセトニトリルにて細胞を溶解し、遠心分離してすべてのタンパク質を除去した。PTX 濃度は、TSKgel[®] ODS-100V 3 m、4.6×15 cm (東ソー、東京、日本) を使用した HPLC で分析した。脱イオン水中のアセトニトリル (60 : 40、v/v) からなる移動相は、使用前に真空下で脱気した。UV 検出波長は 227 nm で測定した。流量は 0.8 mL/min に設定した。PTX 濃度は、標準に基づいて各サンプルのピーク面積から計算した。

リソソーム分解評価

12 well plate に SUIT-2 を播種 (1×10^5 cells/well) し、24 hr 反応後、無血清培地に置換し、2 hr 反応を行い、FITC-Alb または FITC-Abr (200 mg/mL) の分解を SDS-PAGE にて評価した。SDS-PAGE 後、フルオロイメーリアナライザー ImageQuant (GE Healthcare) を使用してゲルの蛍光強度を分析した。加えて、抗ヒトアルブミン抗体 (A80-229A、モンゴメリー、米国) により Normal HSA または Abraxane[®] HSA を視覚化した。

ウェスタンブロット(WB)

SDS-PAGE は e-PAGEL (10-20%) を使用して行い、細胞溶解サンプルは 2.5 µg/lane で添加した。泳動後、ゲルをニトロセルロースメンブレンに転写した。その後、メンブレンを 0.5% Tween20 を含む 7% スキムミルク PBS 溶液にて 1 hr 処理し、0.5% Tween20 を含む PBS で 15 分間の洗浄を 3 回繰り返した。続いて、メンブレンを抗ヒト SPARC (HPA003020、Proteintech、日本) または抗ヒトアルブミン抗体 (A80-229A、モンゴメリー、米国) と 4°C

で一晩反応した。0.5%Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄後、HRP 標識二次抗体 (マウス抗ヤギ IgG (SC-2354、サンタクルーズバイオテクノロジー、米国) またはヤギ抗ウサギ IgG (ab6721、アブカム、日本)) と 37°C で 2 hr 反応した。0.5%Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄後、ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare、ウイスコンシン、米国) にて検出した。

HSA の細胞内のリソソーム局在測定

リソソームの FITC-Normal HSA および FITC-Abraxane[®] HSA の細胞内局在は、LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen-Molecular Probes) (Ex/Em : 577/590 nm) を使用した。HUVEC を無血清培地で 2 hr 反応し、細胞を FITC-Normal HSA および FITC-Abraxane[®] HSA (200 mg/ mL) で 2 hr 処理した。処理後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、さらに 75 nM LysoTracker RedDND-99、Hoechst 33342 (×500) を含む培地で 1 hr 反応した。その後、細胞を再び PBS を使用して 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。固定した細胞は、蛍光イメージングシステムを使用して観察した。

SUIT-2 の HSA 取り込みに対する SPARC 発現の影響

12 well plate に SUIT-2 を播種 (1×10^5 cells/well) し 24 hr 反応後、50 nM Control siRNA、SPARC siRNA #1、または SPARC siRNA #2 を 37°C で 24 hr 反応させた。Lipofectamine3000 トランスフェクション試薬を常法に従って反応後、細胞を Normal HSA および Abraxane[®] HSA で 2 hr 処理した。

これらの siRNA 配列は以下の通りである。

SPARC siRNA #1: 5'-AUUUCUUUACAUCAGAAUGGGUCUG-3' (sense)

SPARC siRNA #1: 5'-CAGACCCAUUCUGAUGUAAAGAAAU3' (antisense)

SPARC siRNA #2: 5'-CCACAGUACCGGAUUCUCUCUUUAA3' (sense)

SPARC siRNA #2: 5'-UUAAAGAGAGAAUCCGGUACUGUGG3' (antisense)

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。次に、細胞を PBS 中の 1%Triton X-100 によって 37°C で 10 分間透過処理し、PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞を 1%ブロックエース (UK-B80、大日本製薬、大阪、日本) を含む PBS で 30 分間反応し、PBS で 3 回洗浄した。さらに、1%ブロックエースで希釈したヒト抗ウサギ SPARC 抗体 (HPA003020、Proteintech、日本) および Hoechst 33342 (DOJINDO 化学研究所、日本) を細胞に添加し 2 hr 反応した。洗浄後、蛍光イメージングシステムを使用して観察した。

siRNA 処理後の細胞生存率評価

96 well plate に SUIT-2 細胞を播種 (1×10^4 cells/well) して、24 hr 反応後、無血清培地に置換し、2 hr 反応後、50 nM Control siRNA、SPARC siRNA #1、または SPARC siRNA #2 を 37°C で 24 hr 反応させた。Lipofectamine3000 トランスフェクション試薬を常法に従って反応後、細胞に 1×10^{-13} - 1×10^{-2} M (PTX) の Abraxane[®] を添加した。添加 24 hr 後に、MTT assay により細胞生存率を評価した。

siRNA 処理後の PTX 取り込み

12 well plate に SUIT-2 を播種 (1×10^5 cells/well) し 24 hr 反応後、無血清培地に置換し、2 hr 反応後、50 nM Control siRNA、SPARC siRNA #1、または SPARC siRNA #2 を 37°C で 24 hr 反応させた。Lipofectamine3000 トランスフェクション試薬を常法に従って反応後、細胞を Abraxane[®] (2 nM PTX) とともに、37°C で 2 hr 反応し、細胞内 PTX を定量するために、アセトニトリルにて細胞を溶解し、遠心分離してすべてのタンパク質を除去した。PTX 濃度は、TSKgel[®] ODS-100V 3 m、4.6×15 cm (東ソー、東京、日本) を使用した HPLC で分析した。脱イオン水中のアセトニトリル (60 : 40、v/v) からなる移動相は、使用前に真空中で脱気した。UV 検出波長は 227 nm で測定した。流量は 0.8 mL/min に設定した。PTX 濃度は、標準に基づいて各サンプルのピーク面積から計算した。

クロスカップリングと免疫沈降

・クロスカップリング

SUIT-2 細胞を 150 mm 培養プレートに 1×10^6 cell で播種し、5% CO₂ を含む 37°C で 24 hr 反応した。培地を除去した後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、無血清培地で 2 hr 反応した。細胞を冷 PBS で 3 回洗浄して、残りの FBS および他のタンパク質を培地から除去し、2,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、 5×10^6 細胞の PBS に懸濁した。次に、500 μM の 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate) と 5 μM の Normal HSA または Abraxane[®] HSA を細胞とともに 25°C で 30 分間反応した。その後直ちにトリス緩衝液 (pH 7.4) を加え、架橋反応を停止した。細胞を冷 PBS で洗浄し、次に溶解緩衝液にて可溶化した。

・免疫沈降

共免疫沈降分析では、タンパク質量 2 mg の全細胞溶解物を 1 μg のヒトアルブミン特異

的抗体 (A80-229A、Montgomery、USA) と 4°C で一晩反応し、次にプロテイン A/G PLUS-アガロース (sc-2003、SCB、USA) 4°C で一晩振盪した後に、ビーズを遠心分離により回収した。0.05% Tween 20 を含む PBS でビーズを 5 回洗浄後、還元試薬を含む SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGE で泳動し、銀染色キット (24600、Thermo Scientific、日本) を使用して銀染色した。

第3節 実験結果

第1項 Abraxane[®] HSA の物理化学的特性評価

Normal HSA と Abraxane[®] HSA を比較することで、Abraxane[®] HSA の構造変化の解析を試みた。まず、円二色性 (CD) スペクトルを測定したところ、二次構造 (Fig. 4A) を反映する遠紫外領域及び三次構造 (Fig. 4B) を反映する近紫外領域スペクトルの変化を観察した。二次構造を反映する遠紫外領域では、タンパク質の α ヘリックス含有量を示す 210–230 nm 付近のスペクトル強度が Abraxane[®] HSA では減少した。Abraxane[®] HSA の α ヘリックス含有量が Normal HSA に比べ約 10%減少しており、PTX が結合した状態の Abraxane[®] では約 17%減少していた。近紫外領域では、250–350 nm の全波長で特徴的な変化が観察されたことから、Abraxane[®] HSA の三次構造に、Normal HSA とは異なる構造変化がもたらされた可能性が高いと考えられた。250–350 nm 付近のスペクトル強度は、アミノ酸残基の芳香族側鎖に起因するものであることから、芳香族基の周辺の微細な環境変化が Abraxane[®] HSA では起きていることを示唆している。また、HSA を含まない PTX 溶液のみでは CD スペクトルにほとんど影響はなかった。

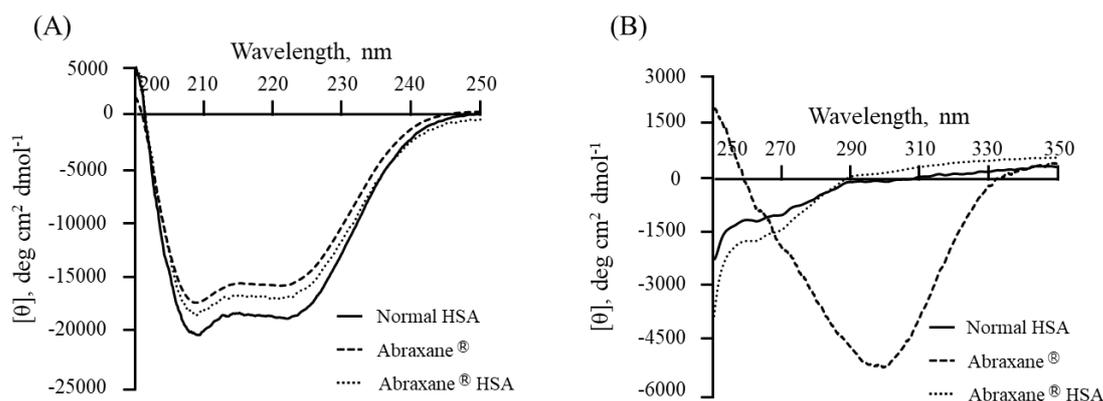


Fig. 4, CD spectra of Abraxane[®] HSA.

(A) Far-UV spectra and (B) near-UV spectra of Abraxane[®] HSA (10 μ M) were measured in PBS at room temperature.

次に、CD スペクトル以外の構造特性に関する情報を得るべく、HSA のトリプトファンに由来する蛍光を測定した。その結果、Abraxane[®] HSA は Normal HSA と比較してトリプトファンの蛍光が上昇していた (Fig. 5)。トリプトファンは、280 nm の励起光によって蛍光を示す芳香族アミノ酸であり、HSA には 214 番目に唯一存在する。このトリプトファンは HSA の内側に存在している。トリプトファンの蛍光エネルギーと運動エネルギーの総和は一定であると考えられている⁶³。Abraxane[®] HSA の蛍光エネルギーが高いことから、運動エネルギーが減少していることが示唆された。このことから、Abraxane[®] HSA は Normal HSA と比較して、214 番目に存在するトリプトファンが周囲の立体構造の変化により、トリプトファンが立体障害を受ける構造変化が引き起こされていることが示唆された。

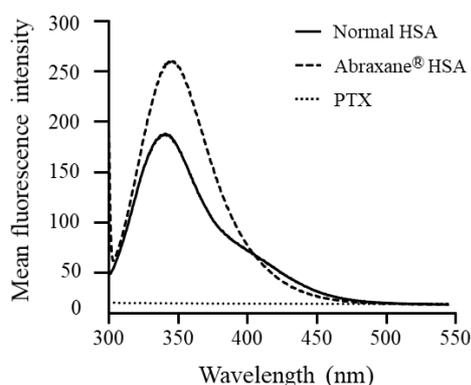


Fig. 5, Fluorescence of tryptophan in Abraxane[®] HSA.

Absorption spectra with 295 nm excitation of Abraxane[®] HSA and Normal HSA (10 μ M).

次に、タンパク質分子表面上の疎水面に結合することで蛍光を発する疎水領域探索プローブである Sypro orange を用いて構造特性を評価した。Sypro orange を HSA と反応させ、蛍光を測定したところ、Abraxane[®] HSA で蛍光の減少が観察され、タンパク質分子表面上の疎水面が減少していることが明らかとなった (Fig. 6)。

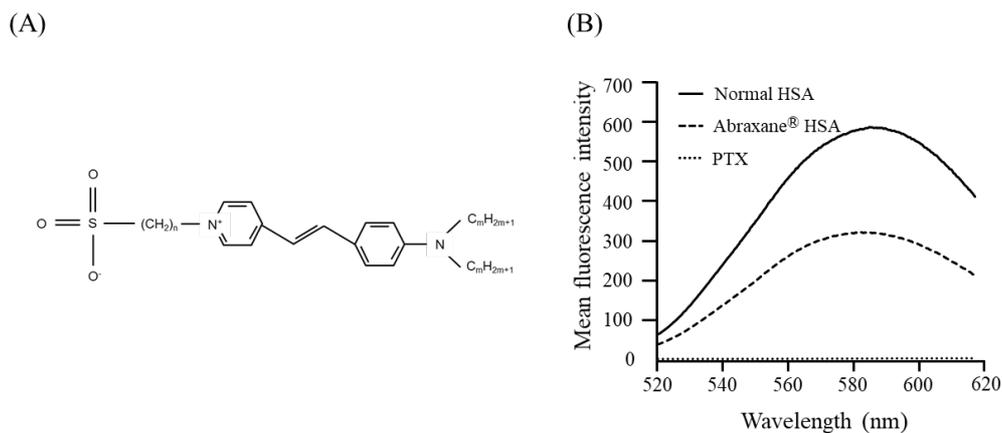


Fig. 6, Effect of Abraxane[®] on the fluorescence of sypro orange.

(A) Structure of Sypro orange, (B) Abraxane[®] HSA (10 μ M) was mixed with 500 time diluted sypro orange. The fluorescence was measured at ex. 470 nm, em. 520 – 620 nm.

次に、細胞への取り込み実験を行うため、fluorescein isothiocyanate (FITC) と HSA を反応させた。FITC は HSA のリジン残基と化学結合することが報告されている。まずは FITC 修飾による構造変化が起きていないかを確認した。CD スペクトルを測定したところ、二次構造を反映する遠紫外領域および三次構造を反映する近紫外領域スペクトルともに FITC 修飾による大きな変化は観察されなかった (Fig. 7)。このことから、FITC 修飾がもたらず構造変化は極めて小さいことが確認できた。このため、細胞への取り込み実験では FITC 修飾体を使用することとした。

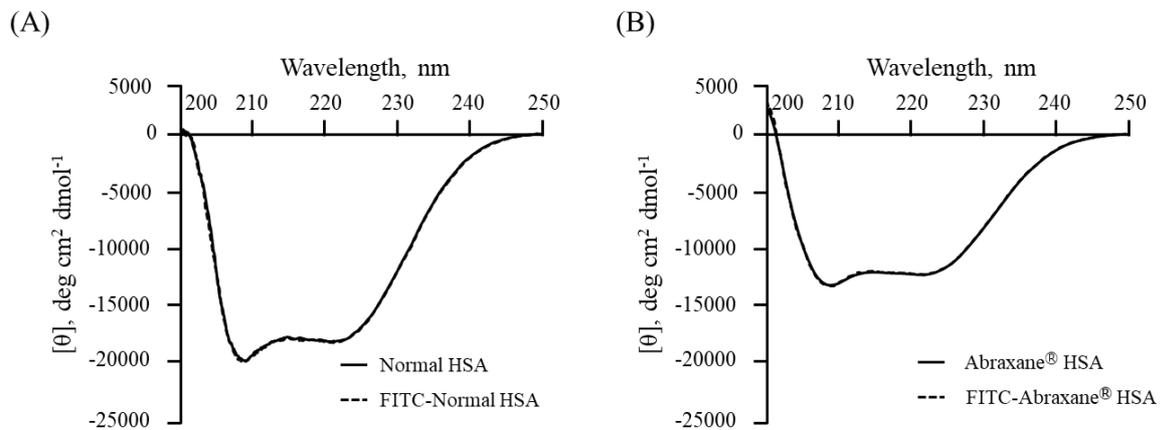


Fig. 7, CD spectra of FITC treatment HSA.

Far-UV spectra of (A) FITC- Abraxane[®] HSA and (B) FITC-Normal HSA(10 μ M) were measured in PBS at room temperature.

次に、電気泳動による分子量の違いと電荷について評価を行った (Fig. 8)。Native-PAGE では Abraxane[®]では Dimer および Trimer の存在が Normal HSA よりも多く観察された。また、SDS-PAGE では Normal HSA ではほとんど見られなかった polymer が Abraxane[®]では観察された。この現象の原理は明らかではないが、アルブミンナノ粒子の形成に起因したものと推察される。

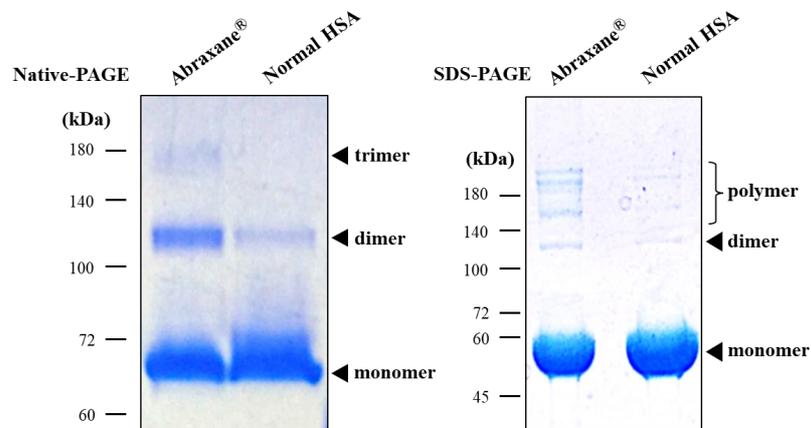


Fig. 8, Structural properties of Abraxane®.

Native PAGE (left) and SDS-PAGE analysis (right) of Abraxane® HSA and Normal HSA. Each arrow indicates an albumin monomer, dimer, trimer, and polymer.

第2項 数種がん細胞のエンドサイトーシス経路の探索

前述の通り HSA はエンドサイトーシス経路で取り込まれていることが知られている。そこで、*in vivo* 実験への応用のために同所移植モデルに用いられる SUIT-2 細胞を選択し、Normal HSA 及び Abraxane® HSA の取り込み時間や添加濃度の最適化を行った。まず、HSA の最適な取り込み時間や添加濃度条件の検討を行い、その後、最適化した条件下において、SUIT-2 への取り込み評価を行った (Fig. 9)。

まず、SUIT-2 を用いて反応温度および反応時間の最適化を試みた。その結果、HSA 取り込み量はどの時間軸においても、 $4^{\circ}\text{C} < 26^{\circ}\text{C} < 37^{\circ}\text{C}$ となった。このことから、Normal HSA 及び Abraxane® HSA において、SUIT-2 細胞によるエネルギー依存性の HSA 取り込みが認められた。そこで、「 37°C 、2 hr」を最適反応温度・時間として今後の実験を行った。

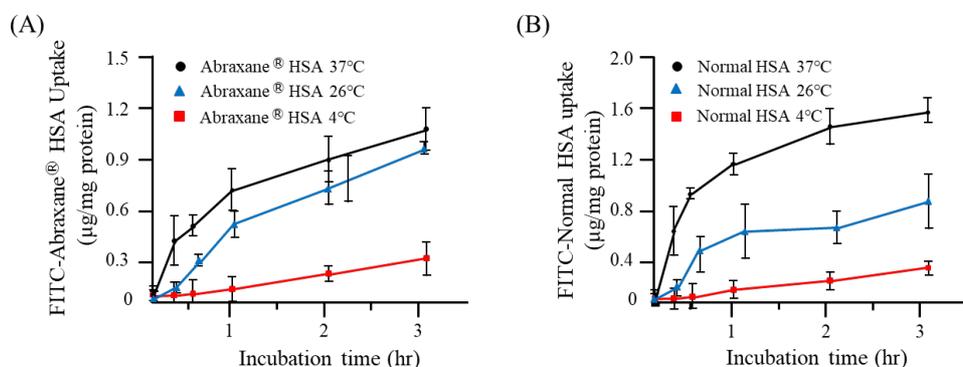


Fig. 9, Abraxane® HSA uptake by SUIT-2 cells.

Time course of cellular uptake of (A) FITC-Abraxane® HSA and (B) FITC-Normal HSA. SUIT-2 cells were treated with FITC-Abraxane® HSA or FITC-Normal HSA at 37 °C (black circle), 26 °C (blue triangle), or 4 °C (red square) in a serum-free medium. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、SUIT-2 を用いて、HSA の添加濃度の最適化を試みた。その結果、濃度依存的に取り込み量は増加し、やがて飽和する傾向が見られた。また、生体内に投与された Abraxane® に由来する PTX の C_{max} 時には Abraxane® HSA が約 0.2 mg/mL であることを考慮し、これらの知見から、Normal HSA 及び Abraxane® HSA の細胞取り込みを検出するのに必要な最適添加濃度を 0.2 mg/mL とした (Fig. 10)。

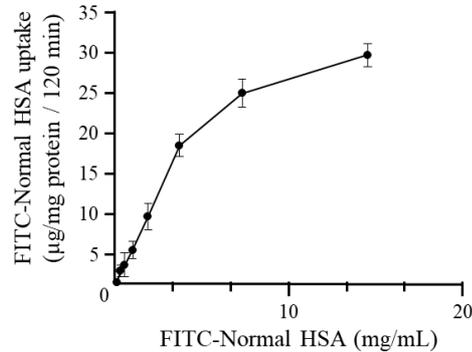


Fig. 10, Abraxane[®] uptake by SUIT-2 cells.

Concentration-dependent uptake. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、複数のがん細胞への HSA 取り込み経路に関する情報を得るべく、エンドサイトーシス阻害剤による細胞生存率の影響を調べた。エンドサイトーシス阻害剤として、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤であり、膜流動性および透過性の変化させる Chlorpromazine、マクロピノ介在性サイトーシス阻害剤であり、詳しい作用機序は不明である Amiloride、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤であり、コレステロールと強く結合しカベオリン形成を阻害する Methyl- β -cyclodextrin を使用した。その際に、エンドサイトーシス阻害剤が細胞毒性を示さない、適切な濃度を検討するため、ヒト膵管がん由来細胞株 SUIT-2 (Fig. 11) 及び Panc-1 (Fig. 12)、マウス大腸がん由来細胞株 Colon26 (Fig. 13) への細胞生存率測定を行った。毒性を示さない閾値として IC₈₀ を計算したところ、SUIT-2 では、Chlorpromazine は 82.3 μ M (Fig. 11A)、Amiloride は 2018.4 μ M (Fig. 11B)、Methyl- β -cyclodextrin は 3.2 mM (Fig. 11C)であった。Panc-1 では、Chlorpromazine は 17.2 μ M (Fig. 12A)、Amiloride は 163.8 μ M (Fig. 12B)、Methyl- β -cyclodextrin は 2.2 mM (Fig. 12C)であった。Colon26 では、Chlorpromazine は 30.6 μ M (Fig. 13A)、Amiloride は毒性を示さず (Fig. 13B)、Methyl- β -cyclodextrin は 2.4 mM (Fig. 13C)であった。

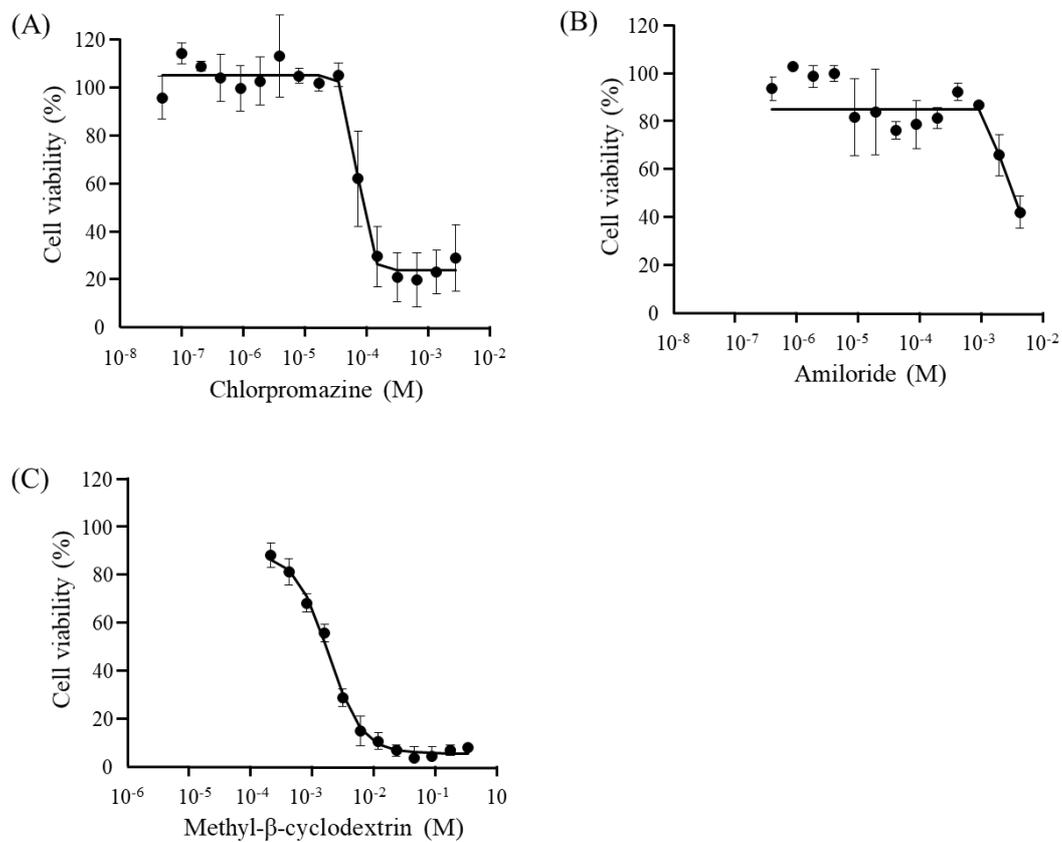


Fig. 11, Effect of the concentration of endocytosis inhibitor for the viability of SUIT-2 cells. SUIT-2 cells were treated with increasing concentration of (A) Chlorpromazine, (B) Amiloride, (C) Methyl-β-cyclodextrin for 30 min. Survival cells were quantified by MTT assay and expressed as percent survival to untreated control. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

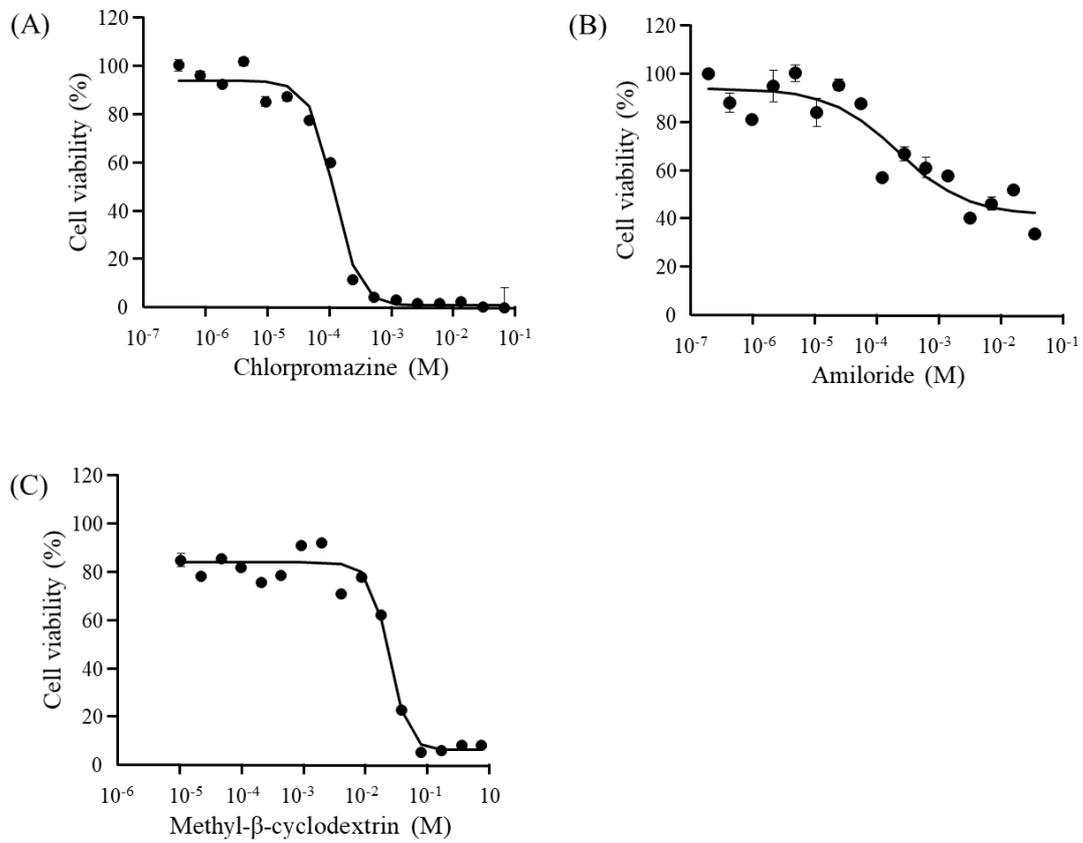


Fig. 12, Effect of the concentration of endocytosis inhibitor for the viability of Panc-1 cells. Panc-1 cells were treated with increasing concentration of (A) Chlorpromazine, (B) Amiloride, (C) Methyl-β-cyclodextrin for 30 min. Survival cells were quantified by MTT assay and expressed as percent survival to untreated control. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

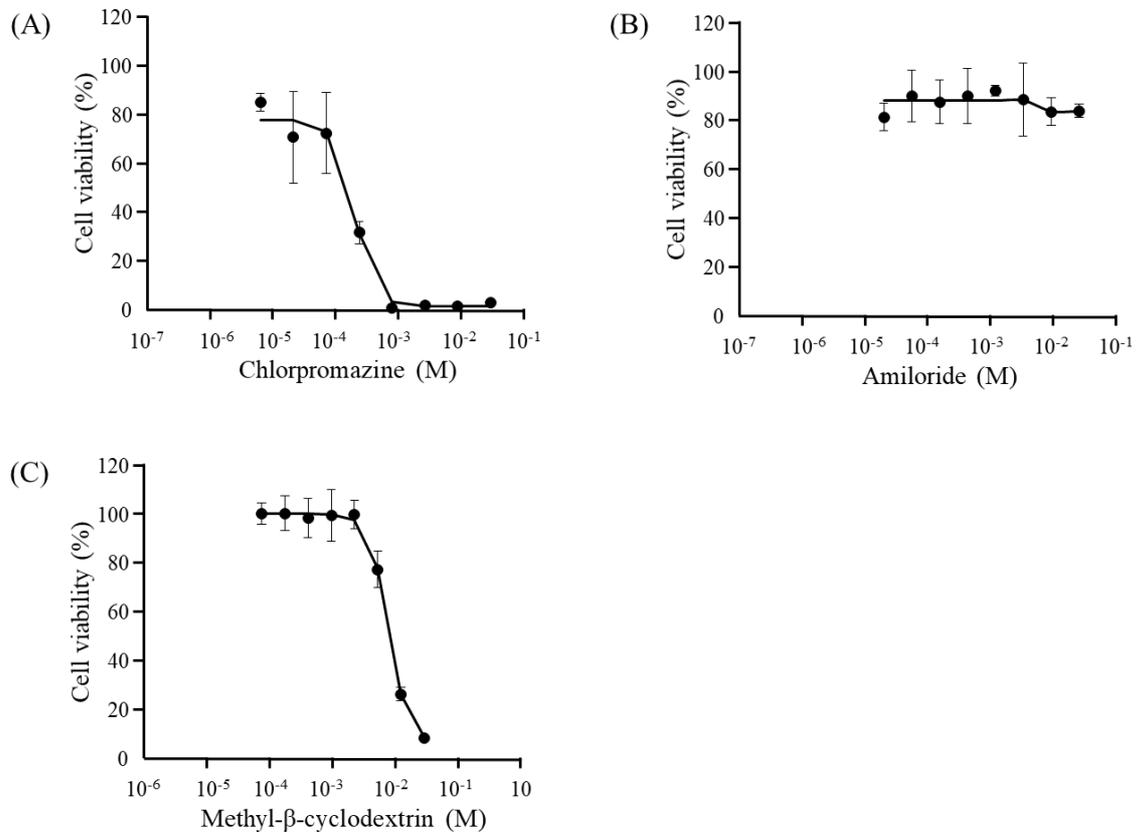


Fig. 13, Effect of the concentration of endocytosis inhibitor for the viability of Colon26 cells. Colon26 cells were treated with increasing concentration of (A) Chlorpromazine, (B) Amiloride, (C) Methyl- β -cyclodextrin for 30 min. Survival cells were quantified by MTT assay and expressed as percent survival to untreated control. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、エンドサイトーシス取り込み経路に関する情報を得るべく、エンドサイトーシス阻害剤による検討を行った。FITC 標識した Normal HSA を 3 種のがん細胞 (Colon26 : マウス大腸がん細胞、Panc-1 : ヒト膵臓がん細胞、SUIT-2 : ヒト膵臓がん細胞) に添加し、2 時間後に細胞を可溶化し、細胞に取り込まれた FITC を定量した。阻害剤は細胞生存率測定より算出した IC_{80} にあたる濃度で添加した (Table 3)。Colon26 は Amiloride では毒性を示さなかったため、最も高容量を示した SUIT-2 に合わせ 2000 μ M 添加した。その結果、SUIT-2 では Methyl- β -cyclodextrin 添加により、HSA の細胞取り込み量が低下したことから、カベオラ介在性エンドサイトーシス経路が関わっていることが示唆された (Fig. 14A)。Panc-1 では、Amiloride および Methyl- β -cyclodextrin 添加により、HSA の細胞取り込み量が

低下したことから、マクロピノ介在性サイトーシス経路およびカベオラ介在性エンドサイトーシス経路が関わっていることが示唆された (Fig. 14B)。Colon26 では、Amiloride 添加により、HSA の細胞取り込み量が低下したことから、マクロピノ介在性サイトーシス経路が関わっていることが示唆された (Fig. 14C)。これらの結果から、がん細胞における Normal HSA のエンドサイトーシスには、主に、マクロピノ介在性サイトーシス経路およびカベオラ介在性エンドサイトーシス経路が関わっていることが示唆された。

Compound	IC ₈₀ concentration		
	Cell Lines		
	SUIT-2	Panc-1	Colon26
Chlorpromazine	82.3 μ M	17.2 μ M	30.6 μ M
Amiloride	2018.4 μ M	163.8 μ M	–
Methyl- β -cyclodextrin	3.2 mM	2.2 mM	2.4 mM

Table 3, The IC₈₀ values of the chlorpromazine, amiloride and methyl- β -cyclodextrin compounds against the SUIT-2 cells, Panc-1 and Colon26.

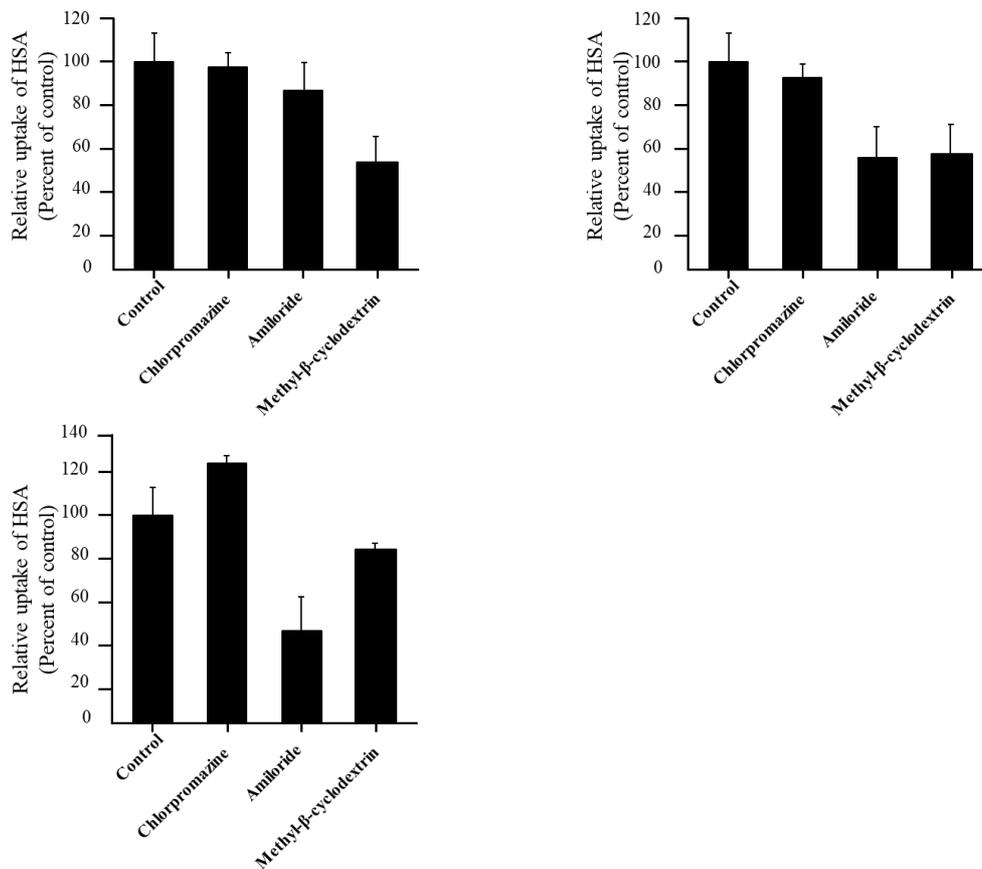


Fig. 14, The effects of various types of endocytosis inhibitors on the cellular uptake of Normal HSA

(A) SUIT-2 Cell, (B) Panc-1, (C) Colon26 was pretreated with various endocytosis-inhibitors for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC-Normal HSA was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

第3項 SUIT-2 ヒト膵臓がん細胞への取り込み評価

ここで、SUIT-2 での最適な条件が分かったため、次に Abraxane[®] HSA のエンドサイトーシス経路に関する情報を得るべく、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて取り込み阻害実験を行った。Normal HSA 及び Abraxane[®] HSA を比較した結果、Abraxane[®] HSA では、Normal HSA とは異なり、カベオラ介在性エンドサイトーシス経路での取り込み阻害

は観察されなかった。一方で Normal HSA では見られなかった、クラスリン介在性エンドサイトーシス経路での取り込み阻害が観察された (Fig. 15)。この結果から、Abraxane[®] HSA は Normal HSA とは取り込み経路が異なることが示唆された。

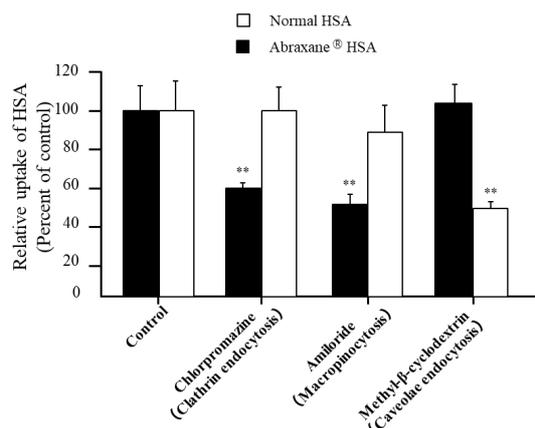
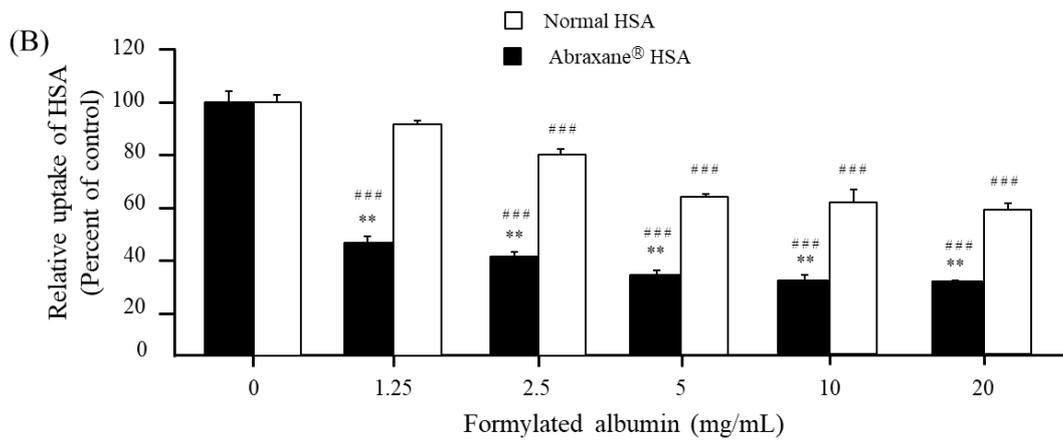
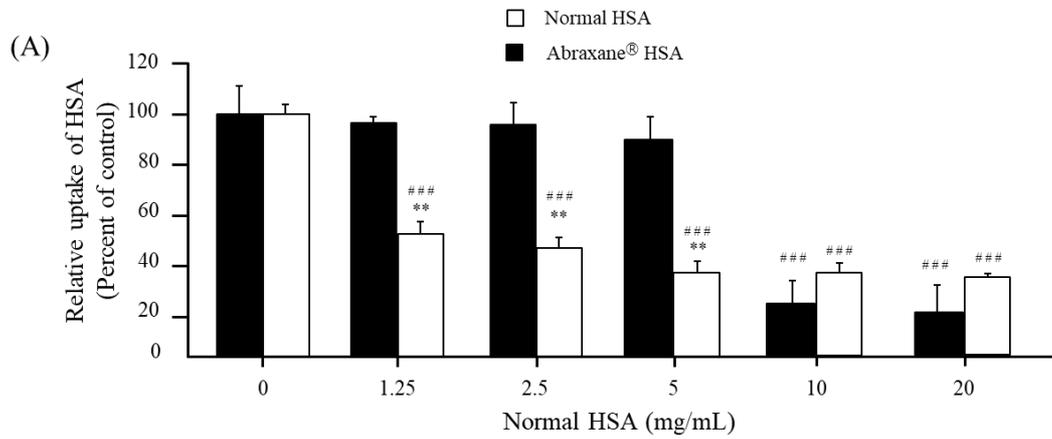


Fig. 15, Inhibition of cellular uptake of Abraxane[®] HSA or Normal HSA by endocytosis inhibitor.

SUIT-2 Cell was pretreated with various endocytosis-inhibitors for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA or Abraxane[®] HSA for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

以上より、Normal HSA と Abraxane[®] HSA では取り込み経路が異なることが判明した。そこで、同様の条件で Normal HSA を競合剤として加えた時の Normal HSA 及び Abraxane[®] HSA の取り込み量の評価を行った。その結果、Normal HSA は Normal HSA 存在下では 1.25 mg/mL から取り込み阻害が観察されたのに対し、Abraxane[®] HSA では Normal HSA 存在下では 10 mg/mL 以上で取り込み阻害が観察された (Fig. 16A)。高濃度の Normal HSA 存在下では Abraxane[®] HSA の細胞内取り込み量が減少していることから、Abraxane[®] HSA の変性アルブミン受容体への特異性が高くないことが示唆された。さらに、代表的な変性アルブミンである Formylated Albumin (F-Alb) と Maleylated Albumin (M-Alb) を競合剤として加えた時の取り込み実験を行った。その結果、変性アルブミン 1.25 mg/mL 存在下で Normal HSA はほとんど取り込み阻害を受けなかったのに対し、Abraxane[®] HSA の取り込

み阻害が観察された (Fig. 16B, C)。このことから、Abraxane[®] HSA は Normal HSA とは取り込み経路が異なることがさらに強く示唆された。



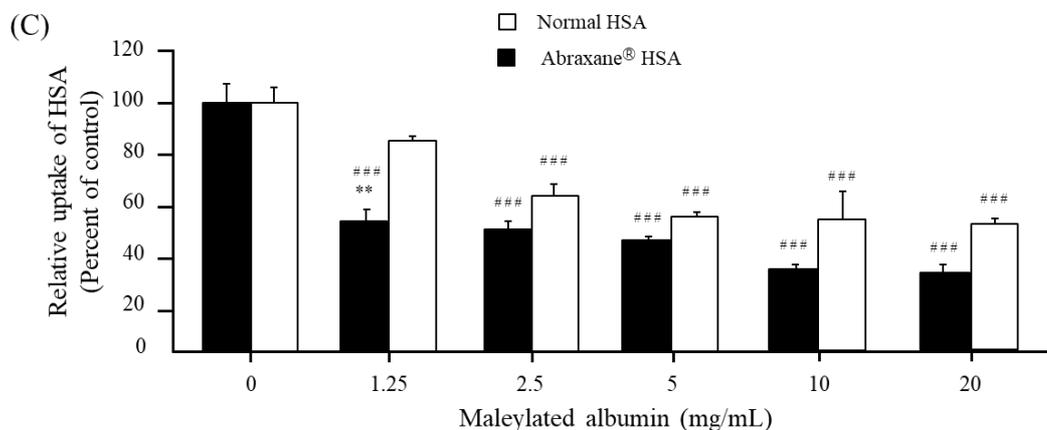


Fig. 16, Inhibition of cellular uptake of Abraxane® HSA (left) or Normal HSA (right) by denatured albumin receptor inhibitors (F-Alb and M-Alb).

SUIT-2 Cell was pretreated with (A) Normal HSA, (B) F-Alb, (C) M-Alb for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA or Abraxane® HSA for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3). (A) **p < 0.01 vs Abraxane® HSA. ###p < 0.001 vs corresponding 0 mg/mL. (B) **p < 0.01 vs Normal HSA. ###p < 0.001 vs corresponding 0 mg/mL. (C) **p < 0.01 vs Normal HSA. ###p < 0.001 vs corresponding 0 mg/mL. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、Abraxane®において Normal HSA または変性アルブミン共存下による細胞生存率変化と、Abraxane®に由来する PTX の取り込み量変化について評価した。

まず、SUIT-2 細胞における Abraxane®または PTX の細胞生存率測定を行った。Abraxane®と PTX 間において、細胞生存率に大きな変化は観察されなかった。また、Normal HSA 存在下では Abraxane®の生存率に変化は見られなかった (Fig. 17A)。(IC₅₀ : 7.0 \times 10⁻⁸ M (Abraxane®), 7.0 \times 10⁻⁸ M (+Normal HSA) vs 1.4 \times 10⁻⁵ M (+F-Alb) and 2.4 \times 10⁻⁶ M (+M-Alb)) その一方、変性アルブミン存在下では Abraxane®の細胞毒性が低減され、細胞生存率が高くなった。これに対し、HSA を含まない PTX 群においてはそのいずれの HSA 存在下においても細胞生存率に変化がなかった (Fig. 17 B)。その理由として、PTX は溶解補助剤であ

る Cremophor[®]-EL により、ミセルとして存在する。そのため、HSA とは結合せずミセルとして細胞内取り込みを受けるため、Normal HSA または変性アルブミン存在下でも、細胞生存率に影響がなかったと考えられる。一方で、Abraxane[®]由来の PTX は Abraxane[®] HSA に結合し、変性アルブミン受容体により認識されるため、変性アルブミン存在下で、細胞生存率が上昇したと考えられる。

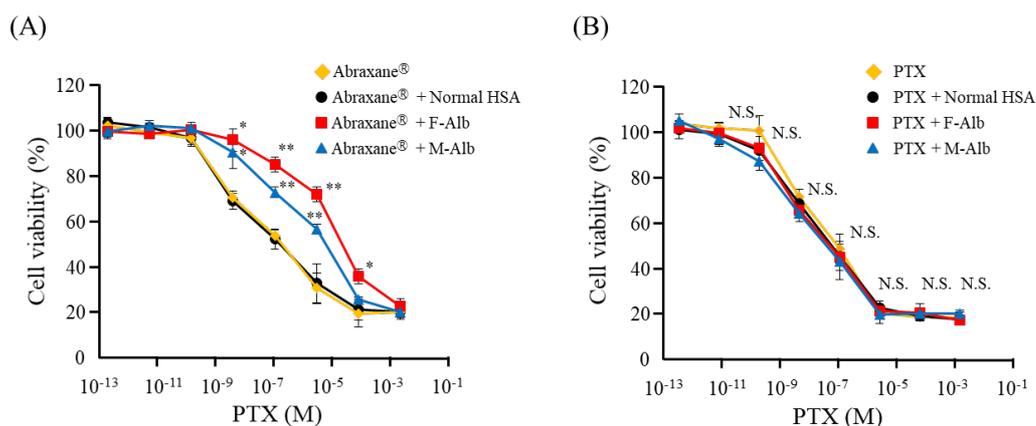


Fig. 17, Effect of denatured albumin receptor inhibitors on Abraxane[®] cytotoxicity in SUIT-2 cells.

Normal HSA, F-Alb, and M-Alb were coincubated with various PTX concentrations (0.1 nM–0.001 M) of Abraxane[®] (A) or PTX (B) for 24 hr. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01 vs Normal HSA group.

次に、SUIT-2 を Normal HSA や変性アルブミンである F-Alb や M-Alb で前処理し、Abraxane[®]を IC₈₀ (2 nM PTX) の濃度で添加し HPLC により細胞内 PTX 量を定量した。結果、変性アルブミン前処理で、細胞内 PTX 量の低下が観察された。一方で、Normal HSA 前処理では細胞内 PTX 量に変化は認められなかった (Fig. 18)。

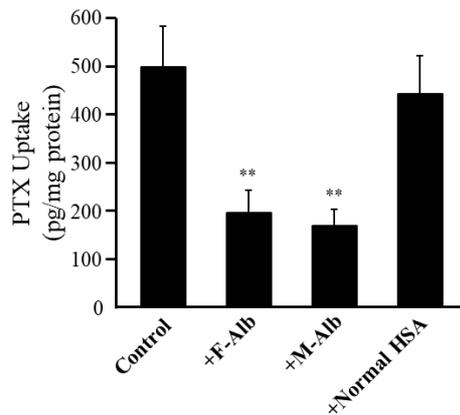


Fig. 18, Quantification of intracellular PTX.

The SUI2-2 cells were incubated with Abraxane[®] (2 nM PTX) for 2 hr at 37°C. To quantify intracellular PTX in SUI2-2 cells, the samples were deproteinized with acetonitrile and centrifuged to remove all proteins. The concentrations of PTX were analyzed by HPLC. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、SUI2-2におけるHSAの分解について評価した。HSAは生体内でストレスを受けると変性が起き、変性アルブミンになることが報告されている。変性アルブミンはスカベンジャー様受容体に認識され、細胞内に取り込まれ、リソソームで分解される。そこで、Normal HSA及びAbraxane[®] HSAの経時的な分解をFITC蛍光測定およびウェスタンブロットで評価した。Normal HSAまたはAbraxane[®] HSA添加後、経時的に細胞内のHSAのFITC蛍光またはアルブミン抗体によってバンドの変化を評価した。その結果、FITC蛍光測定 (Fig. 19A, B)とウェスタンブロット (Fig. 19C)の両方にて、Normal HSAとAbraxane[®] HSAの分解は観察されなかった。このことから、Abraxane[®] HSAは変性アルブミン受容体によってがん細胞内に取り込まれるものの、リソソームによる分解を回避していることが示唆された。

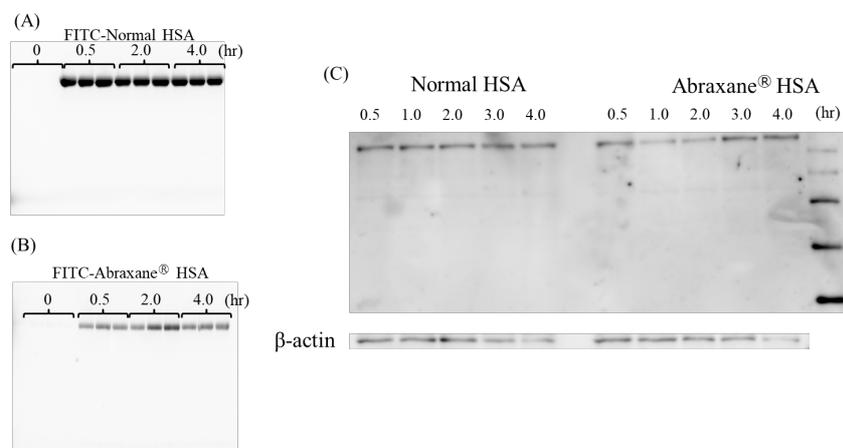


Fig. 19, Detection of intact Abraxane[®] HSA or Normal HSA in SUIT-2 Cell and Abraxane HSA by SDS-PAGE.

Time course of intact HSAs of FITC-Normal HSA (A) and FITC-Abraxane[®] HSA (B). The same amount of HSA was loaded in each lane to evaluate the intracellular degradation of HSA at each time point. (C) Intact HSAs was evaluated by western blot.

第4項 HUVEC ヒト臍帯静脈内皮細胞への取り込み評価

前述の通りがん細胞 SUIT-2 において、HSA は変性アルブミン受容体に認識されていることが示唆された。そこで、血流からがん細胞にたどり着くまでに存在する血管内皮での取り込みの有無および取り込み機構を明らかにすることを試みた。ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC において、その取り込み評価を行った。まず HSA の温度依存的な取り込みを評価した。その結果、取り込み量は温度依存性を示したことから、SUIT-2 同様に Normal HSA 及び Abraxane[®] HSA は、エネルギー依存的に取り込まれることが示唆された (Fig. 20)。

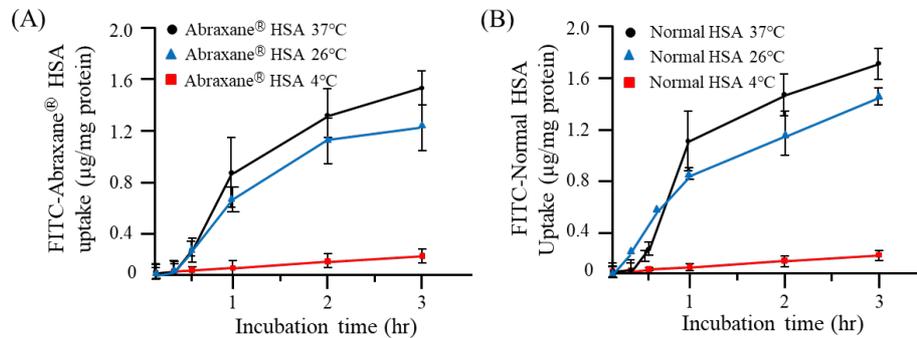


Fig. 20, Abraxane® HSA uptake by HUVEC.

Time course of cellular uptake of (A) FITC-Abraxane® HSA and (B) FITC-Normal HSA. (B) SUIT-2 cells were treated with FITC-Abraxane® HSA or FITC-Normal HSA at 37 °C (black circle), 26 °C (blue triangle), or 4 °C (red square) in a serum-free medium. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、Normal HSA または変性アルブミン共存下での Normal HSA および Abraxane® HSA の取り込み量の定量を行った。その結果、Normal HSA では Normal HSA 共存下では取り込み阻害が観察されたのに対し、変性アルブミン共存下では取り込みに有意な差は観察されなかった。その一方、Abraxane® HSA では Normal HSA 共存下では有意な差は観察されなかったが、変性アルブミン共存下では取り込み阻害が観察された (Fig. 21A)。従って、SUIT-2 と同様に HUVEC においても Abraxane® HSA は Normal HSA とは異なり、変性アルブミンと親和性が高い受容体によって認識されていることが示唆された。

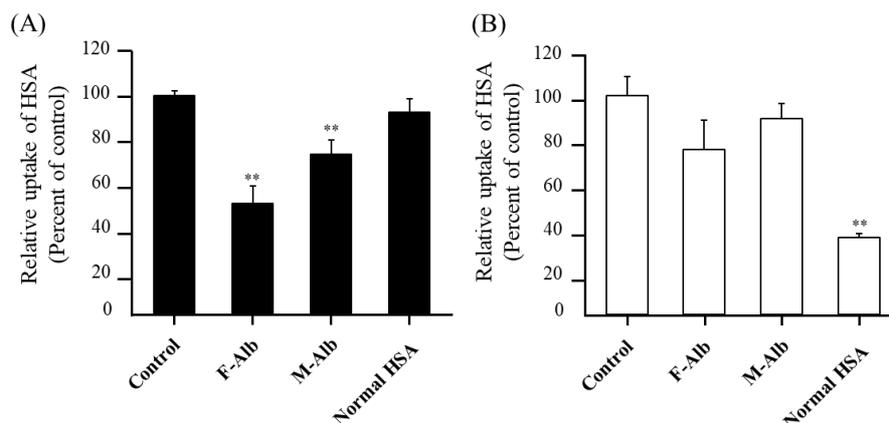


Fig. 21, Inhibition of cellular uptake of Abraxane[®] HSA or Normal HSA by denatured albumin receptor inhibitors (F-Alb and M-Alb).

HUVEC was pretreated with Normal HSA or F-Alb, M-Alb (1.25 mg/mL) for 30 min, after which, they were incubated with (A) Abraxane[®] HSA or (B) Normal HSA for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、HUVEC における HSA の分解について評価した。Normal HSA 及び Abraxane[®] HSA の経時的な分解を SDS-PAGE によって評価した。Normal HSA または Abraxane[®] HSA 添加後、経時的に細胞を SDS-PAGE で泳動し、HSA の変化を評価した。その結果、Normal HSA と Abraxane[®] HSA の分解は観察されなかった (Fig. 22)。このことから、Abraxane[®] HSA は変性アルブミン受容体によって血管内皮細胞に取り込まれるが、リソソームによる分解を回避していることが示唆された。

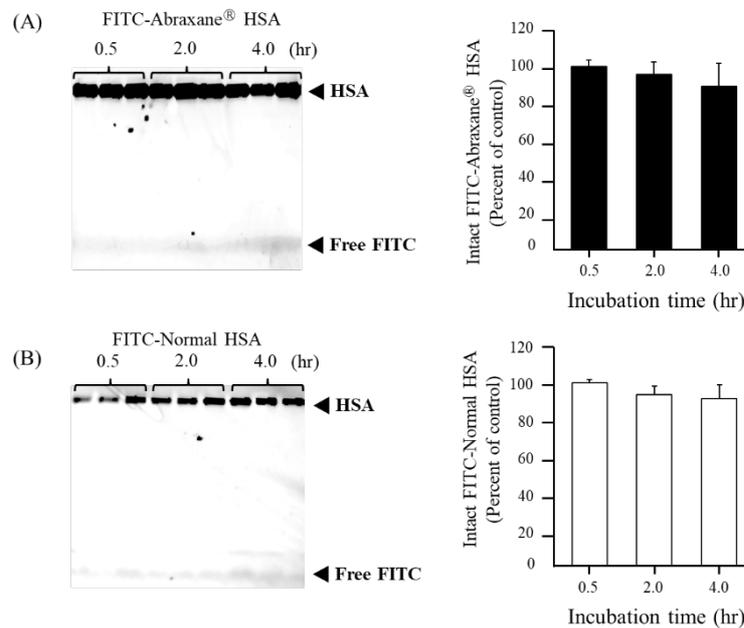


Fig. 22, Detection of intact Abraxane® HSA or Normal HSA in HUVEC and Abraxane® HSA by SDS-PAGE.

Time course of intact HSAs of (A) FITC-Abraxane® HSA and (B) FITC-Normal HSA. The same amount of HSA was loaded in each lane to evaluate the intracellular degradation of HSA at each time point. The quantitative analysis of each data was performed using ImageJ software (right).

Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

また、リソソームマーカである Lyso Tracker で HSA とリソソームの共局在を共焦点顕微鏡で観察した。結果、Normal HSA および Abraxane® HSA とリソソームの共局在が一部観察されたが、大部分は共局在はしておらず、リソソームによる分解を回避していることがさらに強く示唆された。以上の結果から、HUVEC においても Abraxane® HSA は変性アルブミン受容体に認識され取り込まれているが、リソソームによる分解は受けていないことがより強く示唆された (Fig. 23)。

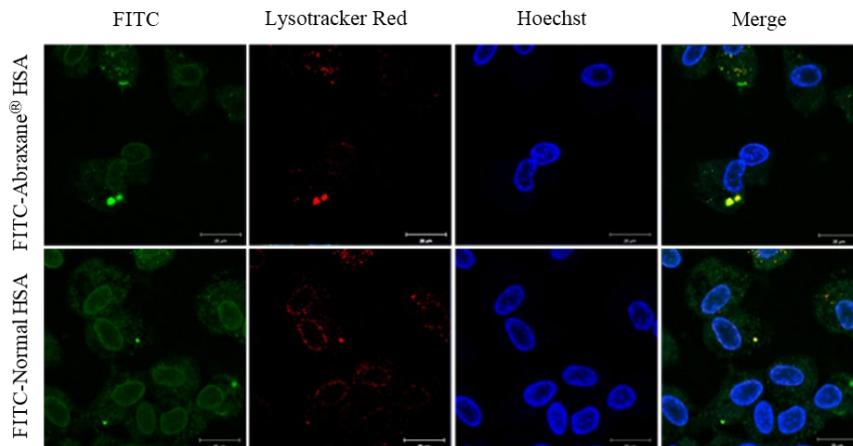


Fig. 23, Cellular localization of Abraxane® HSA and Normal HSA labeled with FITC (green).

The intracellular localization of the endolysosomal track was determined using LysoTracker Red DND-99 (Ex/Em: 577/590 nm). HUVEC were incubated with a serum-free medium for 2 hr. The cells were then treated with FITC-Normal HSA and FITC-Abraxane® HSA (200 µg/mL) for 2 hr. Following treatment, the cells were washed three times with PBS and further incubated with the media containing 75 nM LysoTracker Red DND-99 for 1 hr. Hoechst 33342 (blue) was used to visualize nuclei. Lysosomes were stained by LysoTracker (red). scale bar = 20 µm.

第5項 SPARC を介した取り込み評価

Abraxane®の腫瘍移行機序の一つとして、腫瘍間質に存在する糖タンパク質 Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) を介したがん細胞によるエンドサイトーシスを介した取り込みが関与している可能性があることが報告されている。そこで次に、SPARC siRNA による SUI-2 の knockdown 後、FITC 標識した Normal HSA または Abraxane® HSA を添加した。ウェスタンブロットによって、SPARC siRNA 処理によって SUI-2 では SPARC の発現量を評価したところ、SPARC の発現量は減少していた。さらに、細胞内取り込み量を評価したところ、Normal HSA および Abraxane® HSA の両方において取り込み量が減少した(Fig. 24A)。また、細胞内に取り込まれた Normal HSA または Abraxane® HSA の蛍光定量を行ったところ、SPARC siRNA による SUI-2 の knockdown を行うことで、Normal HSA および Abraxane® HSA の両方で細胞内取り込みが減少していた(Fig. 24B)。

HSA の取り込み量は SPARC の発現量の減少に伴い減少していることから、SPARC は Normal HSA および Abraxane[®] HSA の取り込みに関与していることが示唆された。一方で、約半分程度の HSA は SPARC の発現が減少しているにも関わらず細胞内に取り込まれていることから、HSA の細胞内への取り込み機構には SPARC だけではなく、アルブミン関連受容体が介在していると考えられる。

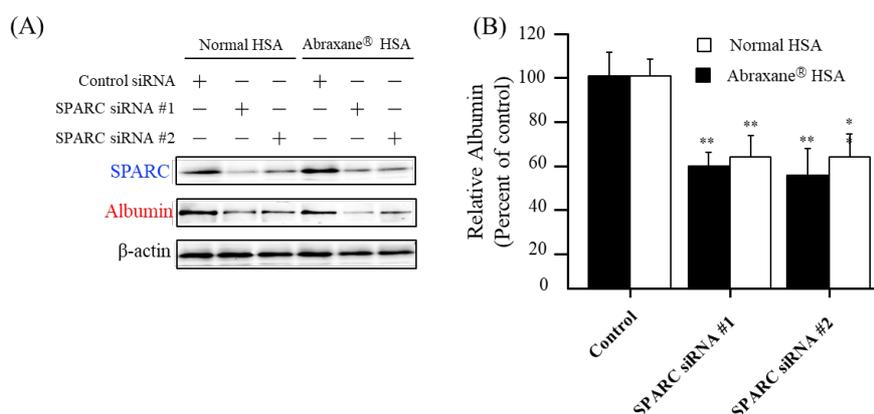


Fig. 24, Effect of SPARC on the cellular uptake of Abraxane[®] HSA.

(A) Cellular uptake of HSAs in SPARC siRNA-treated SUIT-2 cells. SPARC siRNA #1 or #2 was preincubated with SUIT-2 cells for 24 hr, and then Abraxane[®] HSA or Normal HSA was incubated with the cells for 2 hr. SPARC and albumin in SUIT-2 cells were detected by Western blotting. (B) Cellular uptake of FITC-Abraxane[®] HSA and FITC-Normal HSA in SPARC-knockdown cells. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、SPARC の発現量の変化による Abraxane[®]が誘導する細胞生存率の変化と、Abraxane[®]に由来する PTX の取り込み量変化について評価した。

まず、SPARC siRNA 処理 SUIT-2 における Abraxane[®]または PTX の細胞生存率測定を行った。SPARC siRNA 処理 SUIT-2 では Control siRNA 処理 SUIT-2 よりも Abraxane[®]の細胞毒性が低減され、細胞生存率が高くなった (Fig. 25A)。(IC_{50} : 6.0×10^{-8} M (control siRNA) vs 7.3×10^{-6} M (siRNA #1) and 3.4×10^{-6} M (siRNA #2)) これに対し、PTX 群においては SPARC siRNA 処理 SUIT-2 においても細胞生存率に変化がなかった (Fig. 25B)。これらのことから、Abraxane[®]は SPARC により認識されていることが示唆された。

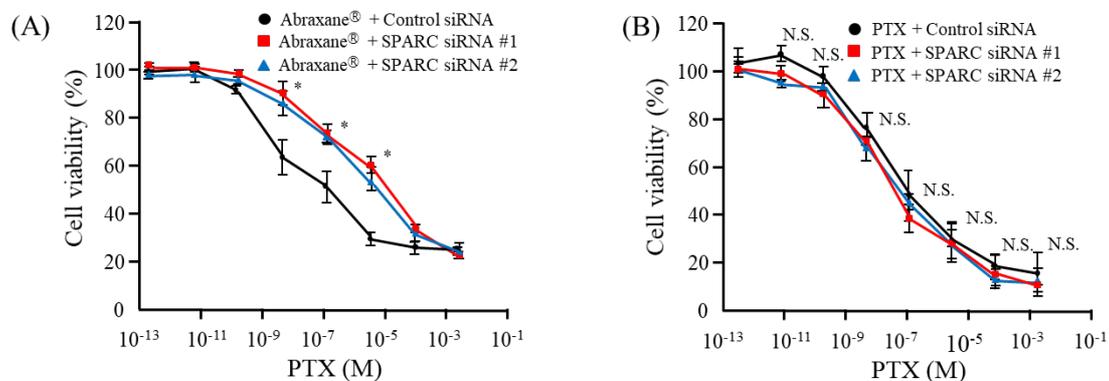


Fig. 25, Effect of SPARC on Abraxane® cytotoxicity in SUIT-2 cells.

SUIT-2 cells were precultured overnight at 37 °C then transfected with 50 nM control siRNA, SPARC siRNA #1, or SPARC siRNA #2 for 24 h at 37 °C using a Lipofectamine 3000 transfection reagent according to the manufacturer's instructions. After incubation, control or SPARC siRNA treated SUIT-2 cells were incubated with various PTX concentrations (0.1 nM–0.001 M) of (A) Abraxane® or (B) PTX for 24 hr. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3). *p < 0.05 vs control siRNA.

次に、SPARC siRNA 処理 SUIT-2 に IC₈₀ の濃度で Abraxane® を添加し HPLC により細胞内 PTX 量を定量した。結果、SPARC siRNA 処理 SUIT-2 では、細胞内 PTX 量の低下が観察された。これらの結果より、SPARC の発現量の減少により、Abraxane® HSA に結合した PTX の取り込み量の減少も起きていることが示唆された (Fig. 26)。

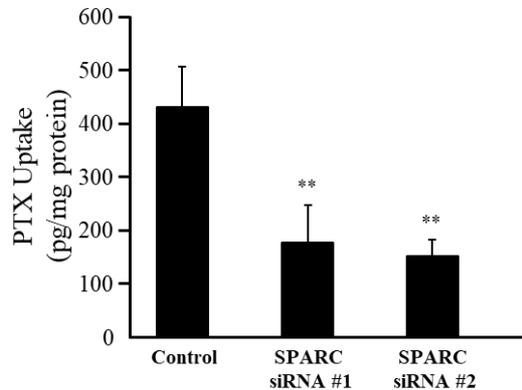


Fig. 26, Quantification of intracellular PTX.

The SUIT-2 cells were incubated with Abraxane[®] (2 nM PTX) for 2 hr at 37°C. To quantify intracellular PTX in SPARC siRNA treated SUIT-2 cells, the samples were deproteinized with acetonitrile and centrifuged to remove all proteins. The concentrations of PTX were analyzed by HPLC. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

第6項 膜タンパク質の相互作用評価

前述の通りがん細胞 SUIT-2 において、Abraxane[®] HSA は変性アルブミン受容体に一部認識されていることが示唆された。そこで、このことについてさらに詳細に解析すべく、SUIT-2 を用い、Normal HSA および Abraxane[®] HSA と相互作用する膜タンパク質の違いを評価した (Fig. 27)。まず、Normal HSA および Abraxane[®] HSA を SUIT-2 と相互作用させ、この状態を維持させるためにアルブミンを SUIT-2 の膜タンパク質と架橋剤でクロスカップリングし、アガロースビーズによる免疫沈降を行った。免疫沈降によって得たタンパク質を SDS-PAGE で泳動した後に、銀染色を行った。その結果、Normal HSA では検出されないものの、Abraxane[®] HSA のみと相互作用を示した膜タンパク質のバンドが複数観察された。以上の結果より、Abraxane[®] HSA は Normal HSA とは異なる膜タンパク質と相互作用を示していることが示唆された。これらのことから、Abraxane[®] が循環血液中に多量に存在する内因的な HSA と競合せず、アルブミン受容体介在性の取り込みが起きるのは、Abraxane[®] HSA の構造特性が変化し、Normal HSA とは異なる受容体によって認識されていることが示唆された。

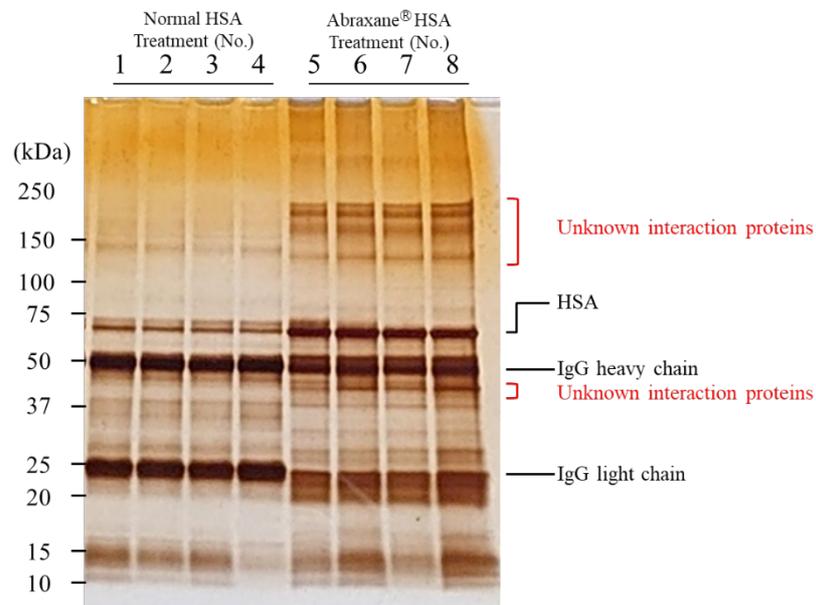


Fig. 27, Abraxane® HSA is interact with some membrane proteins on the surface of SUIT-2 cells.

SUIT-2 cells were washed three times with cold PBS to remove the remaining FBS and other proteins from the culture medium and were suspended in PBS. Then, 500 μ M 3,3'- dithiobis (sulfo succinimidyl propionate), a redactable crosslinker, and 5 μ M Normal HSA (N = 4, No.1,2,3,4) or Abraxane® HSA (N = 4, No.5,6,7,8) were incubated with the cells for 30 min at 25°C. The cross-linking reaction was quenched by adding Tris buffer (pH 7.4). The cells were washed with cold PBS and then solubilized in the lysis buffer. For coimmunoprecipitation analysis, 2 mg of total cell lysates were incubated with Human Albumin specific antibody and then incubated with rotation with Protein A/G PLUS Agarose for overnight at 4°C. The beads were collected by centrifugation. After washing the beads five times in PBS contained 0.05% Tween 20, they were dissolved in SDS-PAGE sample buffer contained reducing reagent and analyzed by SDS-PAGE followed by silver stain using silver staining kit.

第4節 考察

本章では、Abraxane[®] HSA の新たな腫瘍移行メカニズムの解明を目的として、Abraxane[®] と、Normal HSA と比較検討した。まず、Abraxane[®] 由来の HSA である Abraxane[®] HSA の物理化学的特性を評価した。具体的には、構造特性を評価した。二次構造を反映する遠紫外領域では、Abraxane[®] HSA の α ヘリックス含有量が Normal HSA に比べ約 10%減少しており、PTX が結合した状態の Abraxane[®] では約 17%減少していた。HSA の α ヘリックス含有量は、酸化または糖化修飾によって減少することが知られている。具体的には、生体内のアルブミンの酸化修飾に関わっている次亜塩素酸によるアルブミンの α ヘリックス含有量の低下は約 5%、グルコースによる糖化を受けたアルブミンでは約 10%低下していることが知られている⁶⁴。このことから、Abraxane[®] は一般的な生体内の酸化・糖化修飾アルブミンよりも α ヘリックス含有量が減少していることが示唆された。また、トリプトファンの蛍光測定では、Abraxane[®] の調製の過程で 214 位のトリプトファン残基の蛍光が増加していることを示した。一方で、糖化アルブミンでは、蛍光が減少していることが報告されている⁶⁵。Abraxane[®] HSA は、疎水性が低下していることも示された。Abraxane[®] HSA には Dimer および Trimer の存在が Normal HSA よりも多く存在していることも明らかとなった。これらの結果は、詳しい製造方法が明かされていないので不明な部分が多いが、Abraxane[®] の調製の過程での PTX 結合や PTX の溶解に用いている有機溶媒による処理が HSA の高次構造変化を誘発し、HSA の二次構造や立体構造を変化させたことを示唆している。この現象の詳細は不明であるが、アルブミンナノ粒子を形成する際の反応に起因したものと推察される。生体内に存在する変性アルブミンである酸化または糖化修飾されたアルブミンも α ヘリックス含有量の低下やトリプトファンの蛍光の変化などの物理化学的特性の変化が起きており、CD36 などのアルブミン受容体に強く結合することが分かっている⁶⁶。こうした背景から、Abraxane[®] HSA の物理化学的特性の変化は、正常アルブミン受容体の Gp60 や、変性アルブミン受容体の Gp18 および Gp30 以外にも、他のアルブミン受容体に認識されている可能性があると考えられた。

そこで、Abraxane[®] HSA の詳細な取り込み経路を検討した。Abraxane[®] HSA がエネルギー駆動型サイトーシスが関与しているかを調べるため、温度依存的な取り込み評価を行った。結果は、Normal HSA と同様に Abraxane[®] HSA の蛍光強度が時間およびの温度依存的に増加し、低温条件では蛍光強度は著しく低下した。このことは、Abraxane[®] HSA においても、Normal HSA と同様にエンドサイトーシスなどのエネルギー依存性経路が、細胞取り込みに重要な役割を果たすことを示唆している。さらに取り込み経路を調査するため、

エンドサイトーシス阻害剤による阻害実験により、Abraxane[®] HSA と Normal HSA は取り込み経路が異なる事が判明した。Normal HSA では、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である Methyl- β -cyclodextrin で最も取り込み阻害が見られた。対照的に、Abraxane[®] HSA では、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である Chlorpromazine とマクロピノ介在性サイトーシス阻害剤の Amiloride で最も取り込み阻害が見られた。過去の知見では、Abraxane[®]は Methyl- β -cyclodextrin によって、細胞内取り込みが阻害されたと報告されていた。しかし、化学修飾アルブミンはクラスリン介在性エンドサイトーシスやマクロピノ介在性サイトーシスによって取り込まれているという報告もある⁶⁷。また、HSA dimer では Chlorpromazine での阻害が最も高いことが分かっており、アルブミンの物性により取り込み経路が異なる事が示唆されている。今回、数種のがん細胞種で Normal HSA の取り込み経路の特定を行ったが、細胞種による取り込み経路の違いが観察された。

また、アルブミン受容体が Abraxane[®] HSA と Normal HSA の細胞取り込みに関与しているかを調査するため、さまざまなタイプのアルブミン受容体阻害剤の存在下で取り込み実験を行った。アルブミン受容体阻害剤として Normal HSA、変性アルブミン受容体阻害剤として F-Alb および M-Alb を用いた。Normal HSA は、正常アルブミンである Normal HSA 共存下で著しく細胞取り込みが低下した。その一方で、Abraxane[®] HSA は変性アルブミン受容体阻害剤である F-Alb および M-Alb により、細胞取り込みが著しく低下していることから、変性アルブミン受容体が Abraxane[®] HSA の取り込みに関与していることが示された。F-Alb および M-Alb によって取り込みが有意に減少することは、酸化修飾アルブミンでも知られており、酸化修飾により、Normal HSA の分子内に隠されている Gp18 および Gp30 に共通の結合部位が露出すると考えられている⁵⁹。したがって、Abraxane[®] HSA の構造変化に起因し、正常なアルブミンを輸送する Gp60 ではなく、主に、変性アルブミン受容体が Abraxane[®] HSA の取り込みに関与していることを示したと考えられる。

Normal HSA、F-Alb、N-Alb の存在下で Abraxane[®]によって誘発される細胞毒性が影響を与えるか SUIT-2 を用いて調査した。変性アルブミンである F-Alb、M-Alb 存在下では、Normal HSA 存在下よりも有意に Abraxane[®]によって誘発される細胞毒性を減少させることを示した (IC₅₀ : 7.0×10^{-8} M (+Normal HSA) vs 1.4×10^{-5} M (+F-Alb) and 2.4×10^{-6} M (+M-Alb))。対照的に、PTX 誘発性の細胞毒性では全てのアルブミン存在下でも細胞毒性に影響を与えなかった。これは、Abraxane[®]に含まれる PTX がアルブミン介在性の取り込み機構により、細胞内に送達されていることを示唆している。一般的に、リポソームやミセルなどのキャリアに薬物を封入すると、*in vitro* 実験では細胞毒性が低下する傾向にある。しかし、Abraxane[®]では高い細胞毒性を示し、Cremophor[®]-EL 及び無水エタノールが含まれている Taxol[®]と細胞毒性が大きく変わらないことが報告されている⁶⁸。このことは、PTX の細

胞毒性活性が、HSA と結合していても維持されていることを示している。さらに、変性アルブミン存在下で Abraxane[®] 誘発性の細胞毒性が減少していることから、Abraxane[®] は Normal HSA とは異なるアルブミン受容体に認識されていることを示唆している。この現象を支持するデータが、細胞内 PTX の定量値であり、この結果は F-Alb および M-Alb が PTX の細胞内蓄積を阻害したことを強く示唆している。

変性アルブミン受容体である Gp18 と Gp30 はスカベンジャー様受容体に分類され、変性アルブミンをリソソームでの分解へと誘導することが知られている。その際に、F-Alb や M-Alb といった過剰な化学修飾を受けた変性アルブミンは速やかにリソソームにより分解されるが、Normal HSA では近年新たに報告されている FcRn (neonatal Fc receptor) によるリサイクリング機構によりリソソーム分解を回避することが知られている^{42,69}。Abraxane[®] HSA の経時的な分解を蛍光撮影およびウェスタンブロットで評価したところ、Normal HSA と比較して分解に差は観察されなかった。これは、Abraxane[®] HSA は変性アルブミン受容体に認識され細胞内に取り込まれるが、Gp30 および Gp18 での報告があるようなリソソーム分解を受けていないことを示している⁵⁹。つまり、Abraxane[®] HSA は過剰な化学修飾を受けておらず、変性アルブミンとしての性質を持ちながら、一部正常なアルブミンとしての機能を維持しているといえる。

また、変性アルブミン受容体阻害剤の存在下で Abraxane[®] HSA の細胞内取り込みが低下したことから、HUVEC においてもアルブミン受容体 Gp60 ではなく、変性アルブミン受容体が Abraxane[®] HSA のトランスサイトosisに関与していることが示された。Gp18 および Gp30 によって認識された変性アルブミンは速やかに分解されることが分かっていることから、細胞内に取り込まれたアルブミンがリソソーム分解を受けているか調査した。SDS-PAGE による経時的な HSA の変化を調べた結果より、Normal HSA と同様に Abraxane[®] HSA はほとんど分解を受けず、HSA としての構造を保ったまま血管内皮で存在していることが示唆された。Abraxane[®] HSA は血管内皮では、変性アルブミン受容体に認識され通過しているが、リソソーム分解を受けることなく HSA の構造を保ったまま腫瘍間質へと運ばれると考えられる。過去にも、従来の PTX 製剤と比べ、Abraxane[®] の血管内皮細胞への結合は約 10 倍増加していること、エンドサイトosis阻害剤存在下ではほとんどの Abraxane[®] が内皮細胞を通過していないことが報告されている⁵⁸。こうした背景から、Abraxane[®] HSA は PTX を保持したまま腫瘍間質に送達されており、アルブミン受容体によって媒介され薬物送達を行っていることが示唆された。

細胞内の SPARC の発現量は Normal HSA と同様に Abraxane[®] HSA の取り込み量と相関していることが明らかとなった。SPARC の発現量が Abraxane[®] によって誘発される細胞毒性に影響を与えるかを調査した。結果は、SPARC の発現量の低下は Abraxane[®] の細胞毒性

を低下させた (IC_{50} : 6.0×10^{-8} M (control siRNA) vs 7.3×10^{-6} M (siRNA #1) and 3.4×10^{-6} M (siRNA #2))。また、SPARC の発現が Abraxane[®] によって誘発される細胞毒性に関わっていることを示唆した。これらのことは、SPARC が Abraxane[®] によって誘発される細胞毒性および Abraxane[®] の取り込みの過程において重要な役割を果たしていることを示唆しており、血管内皮を通過した Abraxane[®] HSA は SPARC と相互作用し、細胞内取り込みに関わっていると推察している。

免疫沈降により Abraxane[®] HSA と相互作用を示すタンパク質があることを明らかにした。Normal HSA と比較して、Abraxane[®] HSA で特有のタンパク質が示された。その一方で、従来報告されていた Gp18 や Gp30、Gp60 の存在ははっきりとは確認することはできなかった。しかし、Abraxane[®] HSA が Normal HSA 存在下でも細胞内取り込みが変化しなかったことや、変性アルブミン受容体を介していることが示唆されながらもリソソーム分解を回避していることを総合的に考慮すると、Abraxane[®] HSA については報告されているアルブミン受容体以外の取り込み経路が存在する可能性がある。近年の研究では CD36 や Cubilin を代表とする新たなアルブミン受容体が発見されている。残念ながら、今回 Abraxane[®] HSA と相互作用を示すタンパク質の詳細を明らかにすることはできなかったが、これらのタンパク質を解明することが出来れば、新たなアルブミンを用いたデリバリーシステムのターゲット分子となる可能性が高い。

マンノースやグリチルレチン酸を HSA に化学修飾することで、組織への選択性・移行性が上昇することが知られている。また、HSA 融合化技術では、ペプチド医薬品と HSA を遺伝子上で融合することにより、ペプチド医薬品の血中半減期を延長することが分かっており、FDA ではすでに遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子アルブミン融合製剤 IDELVION[®] や GLP-1 受容体作動薬 albiglutide のアルブミン融合製剤 Tanzeum[®] を承認している。こうした、新たな治療戦略として、HSA と治療薬を組み合わせた医薬品が提案されるようになってきた。今回明らかにした、Abraxane[®] HSA のアルブミン受容体を介した新たな腫瘍移行メカニズムは、従来考えられてきた HSA ターゲティングに新しい選択を提示するものであり、現状の HSA をキャリア基盤とする腫瘍 DDS 戦略において変性アルブミンを用いた新しい戦略の展開も期待できる。

ただし、本論文では Abraxane[®] HSA がどのような変性を受け、こういった構造変化が起きているのかを特定できておらず、さらには具体的なアルブミン受容体を同定出来ないため、最適な変性アルブミンの選択やターゲットとなる受容体の探索が今後の課題である。今回、変性アルブミン受容体と腫瘍組織移行の関係を明らかにできたことは、今後の HSA を用いた新しい腫瘍ターゲティング技術の開発に繋がるものと期待できる。次章では、これらの知見を駆使して、HSA に変性を加えた変性アルブミンを開発し、新たな腫

臓がん治療の為の DDS キャリアとしての利用を試みた。

第5節 小括

本章では、Abraxane[®] HSA と内因性アルブミンである Normal HSA との物理化学的特性の違いを比較検討し、Abraxane[®] HSA の腫瘍移行機序の解明を試みた。以下に、得られた知見をまとめる。

- 1) Abraxane[®] HSA の物理化学的特性を解析したところ、Normal HSA と比較した際に、 α ヘリックス含有量の減少、トリプトファンの蛍光増加、疎水性の低下、Dimer 及び Trimer など、立体構造変化が生じていることを明らかにした。
- 2) ヒト膵臓がん細胞 SUIT-2 を用いた Abraxane[®] HSA の細胞取り込み実験より、Abraxane[®] HSA の一部が変性アルブミン受容体を介して細胞に取り込まれることが示唆された。
- 3) ヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いた Abraxane[®] HSA の細胞取り込み実験より、Abraxane[®] HSA の一部が変性アルブミン受容体を介して、細胞に取り込まれることが示唆された。
- 4) アルブミン関連タンパク質 SPARC が Abraxane[®] HSA の細胞内取り込みに関与していることを明らかにした。SPARC の発現量の減少に伴い、Abraxane[®] HSA の細胞内取り込みは減少し、Abraxane[®]誘発性の細胞毒性は低下した。
- 5) 十分な評価には至っていないものの、Abraxane[®] HSA と相互作用を示す SUIT-2 細胞由来の膜タンパク質の存在が示唆された。

以上、Abraxane[®] HSA の物理化学的特性を明らかにし、さらに既知の報告以外の細胞内取り込み経路を有していることを見出した。これらの知見は、Abraxane[®] HSA の一部が変性アルブミンとして機能し、変性アルブミン受容体を介した薬物送達が行われていることを示すものである。

第3章 変性アルブミンの有用性評価

第1節 序

アルブミンを活用した DDS 技術として、化学修飾やナノ粒子化技術、遺伝子組換えタンパク質などが開発されている。HSA には反応性の高い遊離型 Cys³⁴ 残基やアミノ基などが豊富に存在していることから、高効率に化学修飾できることが知られている。これまでにマンノース (Man) 付加 HSA が開発され、この Man-HSA は、肝臓のクッパー細胞特異的に取り込まれることが分かっている⁷⁰。また、S-ニトロシル化 HSA (SNO-HSA) は Colon26 担癌マウスと LY-80 担癌ラットにおいて腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することなどが報告されている⁷¹。また、投与後に内因性の HSA と結合し、HSA の体内動態を模倣するアルブミンヒッチハイキング製剤の DOX-EMCH (INNO-206) も開発されている⁷²。さらに、肝臓がん細胞ではグリチルレチン酸 (GA) 受容体の過剰発現が知られており、この GA 受容体を標的とするためにグリチルレチン酸修飾を施し、ドキソルビシン (DOX) を搭載した DOX-GA-HSA ナノ粒子や⁷³、脳毛細血管の内皮細胞との相互作用を強化したカチオン修飾 HSA⁷⁴ が戦略的ナノ粒子として利用されている。遺伝子組換え HSA 融合化技術に関しては、FDA ではすでに HSA と成長ホルモンの融合タンパク質などを承認している。また、SNO-HSA-Dimer は、血管透過性の低い膵臓がんにおいて EPR 効果を増強し Abraxane[®] の治療効果を高めることが知られており¹⁷、HSA-d-DOX は SUIT2 ヒト膵臓腫瘍移植モデルにおいて高い治療効果を認めている¹⁴。

こうした、化学修飾や遺伝子組換えによる HSA 誘導体は、内因性の HSA とは異なる特性を有しているものの、Normal HSA を認識する Gp60 や SPARC 以外のアルブミン受容体の関与を示した報告は少ない。こうした中、筆者は前章において、HSA 結合型パクリタキセル製剤である Abraxane[®] が、Gp60 ではなく変性アルブミン受容体を介した細胞取り込みが引き起こされることを明らかにした。そこで、これまで DDS を目的に開発されてきたアルブミンにおいても、変性アルブミン受容体に認識され、生体内において内因性の HSA とは異なる体内動態挙動を示すものがあるのではないかと考えた。例えば、内因性の HSA を DDS キャリアとして利用するヒッチハイキング型ではなく、予め HSA に DOX を化学修飾した HSA-DOX は free DOX と比較して高い治療効果を示しており、ヒッチハイキング型よりも高い抗腫瘍活性を示すことが確認されている¹⁴。これは、HSA-DOX が有する内因性の HSA とは異なるアルブミン受容体を介したエンドサイトーシス機構の関与も十

分に起こり得る。そこで、Abraxane[®]では PTX と反応した際の有機溶媒による構造変化により変性アルブミン受容体に認識されたと考えられることから、複雑な化学修飾やナノ粒子化、遺伝子組換えを行わずとも、Normal HSA に変性剤や物理的的刺激を加えることで、アルブミン受容体による認識を変化させ、様々な組織移行させることができるのではないかと企図した。

そこで、本章では、変性を加えた新規アルブミンキャリアを作製し、膵臓がんに対する薬物デリバリーシステムの構築を試みた。

第2節 実験方法

変性アルブミンの調製

・変性剤による変性

凍結乾燥処理後の FITC-Normal HSA (4 mg/mL) を、変性剤 (メタノール (MeOH)、2-プロパノール、硫酸、塩酸、ギ酸、ジチオトレイトール (DTT)、アセトン、クロロホルム(CHCl₃)、酢酸エチル (AcOEt)、ホルムアミド、アセトニトリル、クロロホルムとメタノールの混合溶媒) を 1-50 v/v% の範囲で混合し、直ちに常温で 30 分間激しく攪拌した。その後、4°C 条件下で変性剤を取り除くため透析を行い、凍結乾燥した。

・熱による変性

凍結乾燥処理後の FITC-Normal HSA (4 mg/mL) を、65、70、75、80、85、90、95°C で 10、20、30、40、50、60 分間加熱した。その後、凍結乾燥した。

・塩素化

凍結乾燥処理後の Normal HSA (5 mg/mL) を、PBS 中の 2 mM NaOCl と 37°C で 15 または 30 hr 反応させた。等量の 10 mM l-Met を添加し反応を停止させた後、透析を行い凍結乾燥した。

蛍光プローブによる薬物結合サイトの解析

BD140 (3 μM)、DNSA (10 μM)、HSA (10 μM) および samples (100 μM) を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中で室温にて全量が 1 mL になるように反応させた。試料をガラスセルに移し、蛍光分光光度計 (FP-6600、日本分光) を用いて、365 nm で励起した際の蛍光をスキャンモードにて測定した。

変性による電荷および分子量への影響評価

FITC-Normal HSA と各変性アルブミンの電荷および分子量を SDS-PAGE または Native-PAGE にて評価した。FITC 修飾した各変性アルブミンを 2.5 μg/lane で添加した。泳動後、フルオロイメーリアナライザー ImageQuant (GE Healthcare) を使用してゲルの蛍光強度を分析した。

Alexa750-HSAs の調製

凍結乾燥処理後の HSA をイオン交換水に溶解させ、20 mg/mL に調整した。近赤外蛍光標識試薬である Alexa750 NHS Ester (10 mg/mL (in DMSO)) を、HSA 溶液 1 mL に対し、50 μ L 添加後、遮光条件室温で 1 hr 回転混和した。その後、Amicon Ultra-4 (NMWL : 10 kDa) を用いて、限外ろ過により未反応の Alexa750 を除去した。

SUIT-2 ヒト膵臓がん同所移植モデル

日本 SLC より購入した BALB/c-*nu/nu* マウス (male、5 week-old) を実験に供した。イソフルラン麻酔下、マウスを開腹し、SUIT-2 GLuc 細胞懸濁液 (1×10^5 cells/10 μ g FBS free DMSO) を膵体部に投与した後、開腹部を縫合することで SUIT-2 担がん (同所移植) マウスを作製した。

・腫瘍モニタリング

発光基質である coelenterazine (AVIDITY L.L.C.) 500 μ g を 118 μ L の acidified ethanol (10 μ L conc. HCl/10 mL エタノール) に溶解し、その溶液 (10 μ L) と PBS (150 μ L) を混合したもの (100 μ L) を SUIT-2 同所移植モデルに静脈内投与した。投与後、イソフルラン麻酔下、IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences) にて *in vivo* imaging を行い、腫瘍由来の生物発光を観察した。(測定条件; Ex/Em : block/open、exposure time : 2 min)

SUIT-2 ヒト膵臓がん同所移植モデルにおける HSAs の体内動態解析

SUIT-2 細胞移植 28 日後に *ex vivo* imaging により腫瘍体積を測定し、ランダム化を行った。モデル作製時点を Day 0 とし、Day 28 に Alexa750-Normal HSA (1 mg /mice) および Alexa750-Abraxane[®] HSA (1 mg /mice)、Alexa750-酸処理 HSA (1 mg /mice)、Alexa750-熱処理 HSA (1 mg /mice) を静脈内投与した。投与 24 hr 後に各臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓) および腫瘍を摘出し、IVIS Spectrum により *ex vivo* imaging を行い、各臓器および腫瘍の蛍光強度の測定を行った。(Ex/Em : 745 nm/800 nm)

SUIT-2 同所移植モデルにおける変性アルブミンの抗腫瘍活性評価

SUIT-2 細胞移植 28 日後に *ex vivo* imaging により腫瘍体積を測定し、ランダム化を行った。モデル作製時点を Day 0 とし、Day 28、35、42 に生理食塩水 (Control)、Abraxane[®] (20 mg (PTX)/kg)、酸処理 HSA (20 mg (PTX)/kg)、熱処理 HSA (20 mg (PTX)/kg) を静脈内投与し

た。治療の間、経日的に生存日数および体重を測定した。

第3節 実験結果

第1項 変性アルブミンの調製

Normal HSA に様々な変性剤や変性条件を検討することで、変性度の異なる HSA を作製すべく、化学極性の異なる有機溶媒や pH の変化、熱による処理を加えた変性アルブミンを調製した。

まず、攪拌などの物理的な刺激での HSA の構造変化ならびに細胞取り込み能への影響を調べた。Abraxane[®]の最新の製造方法の詳細は不明であるが、Abraxane[®]の製造において、HSA と PTX を反応させる過程で、室温で 30 分間激しく攪拌している⁷⁵。そこで定法に従い変性剤を加えず Normal HSA を室温で 30 分間激しく攪拌した後、限外ろ過後に凍結乾燥処理を行い、リン酸緩衝液 (PBS) で再溶解させた HSA (攪拌後 HSA) を用い、CD スペクトル測定や細胞取り込み実験を行った。

その結果、室温で 30 分間激しく攪拌した条件では、CD スペクトルでは α ヘリックス含有量の減少がわずかに観察されたが (Fig. 28 A)、化学修飾された変性アルブミンである F-Alb や M-Alb、Normal HSA 競合下での SUIT-2 への細胞取り込みは、攪拌前後では差を示さなかった (Fig. 28B)。以上の結果から、室温で 30 分間激しく攪拌するだけでは、変性アルブミンレセプターに認識されるほどの変性は生じないことが示唆された。

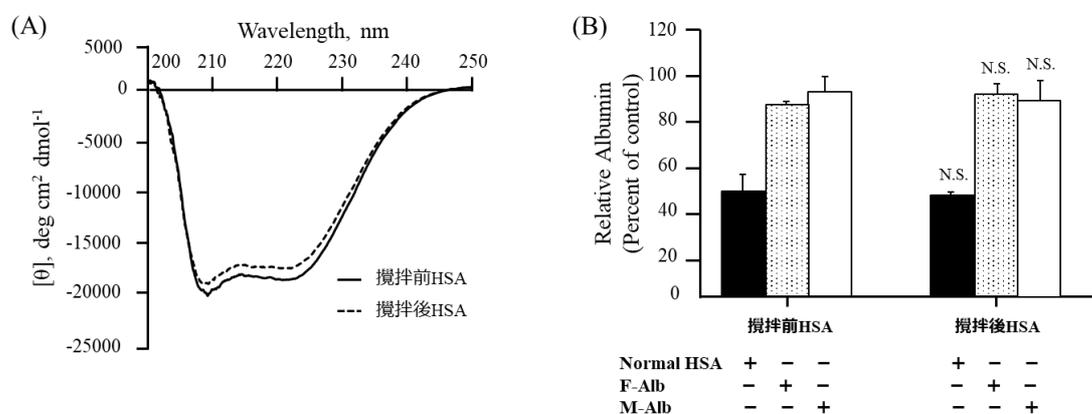


Fig. 28, CD spectra and cellular uptake of stir-treatment HSA.

(A) Far-UV spectra of stir-treatment HSA (10 μ M) were measured in PBS at room temperature. (B) SUIT-2 cell was pretreated with Normal HSA or F-Alb, M-Alb for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA or FITC-stir-treatment HSA (Abraxane[®] imitation HSA). for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

次に、変性剤による HSA の変性を検討するために、次に、HSA の変性剤による変化を検討した。過去の Abraxane[®] の製造において、PTX の溶解剤としてクロロホルムが使用されていたことから、まず HSA のクロロホルムによる影響を評価した。特許情報よりクロロホルム⁷⁵を用いて Abraxane[®] 模倣 HSA を調製し、同様に CD スペクトル測定及び細胞取り込み実験を行った。

CD スペクトルでは、209 nm と 222 nm 付近にピークを有する α ヘリックス構造に特有のスペクトルが減少した (Fig. 29A)。また SUIT-2 細胞を用いた細胞取り込み実験では、F-Alb、M-Alb による取り込み阻害が観察された (Fig. 29B)。これらの結果は、HSA の構造変化がクロロホルムによって惹起され、SUIT-2 細胞による取り込みが変性アルブミン受容体を介した経路へと変化したことを示唆している。

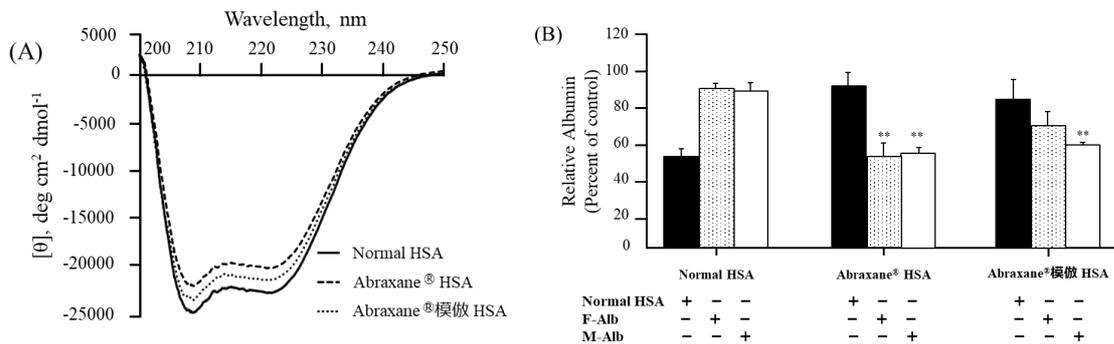


Fig. 29, CD spectra and cellular uptake of chloroform-treatment HSA.

(A) Far-UV spectra of chloroform-treatment HSA (10 μ M) were measured in PBS at room temperature. (B) SUIT-2 cell was pretreated with Normal HSA or F-Alb, M-Alb for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA or FITC-Abraxane[®] HSA, FITC-chloroform-treatment HSA (Abraxane[®] imitation HSA), for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

そこで、クロロホルムによる構造変化をより詳細に解析すべく、HSA のハロゲン化を行った。クロロホルムは酸素条件下で、光などによって分解し、塩素として反応することが知られている⁷⁶。また、内因性のアルブミンは酸化ストレスにより、塩素化などのハロゲン化を受け、酸化修飾アルブミンになることが知られており、好中球・好酸球由来の組織障害マーカーとなることが報告されている⁷⁷(Fig. 30)。

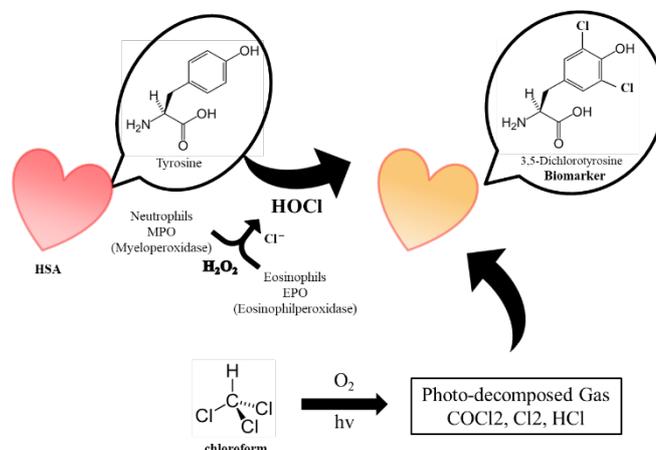


Fig. 30, Schematic summary of chlorinated HSA production by chloroform.

そこで、生体内でアルブミンの酸化修飾に関与している次亜塩素酸ナトリウムを用いてハロゲン化の一つである塩素化 HSA を調製した。次亜塩素酸ナトリウム 2 mM で 15 時間処理したものを塩素化 HSA、30 時間処理したものを過剰塩素化 HSA とし Normal HSA と比較検討した。

Normal HSA および、Abraxane[®] HSA、塩素化 HSA、過剰塩素化 HSA のハロゲン化の程度を調べるために、CD スペクトル測定及びジハロゲン化チロシンモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットを行った。その結果、塩素化 HSA および過剰塩素化 HSA では、次亜塩素酸ナトリウムとの反応時間依存的な α ヘリックス含有量の減少が観察され (Fig. 31A)、ジハロゲン化チロシンモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットの結果からもそれを裏付ける結果が得られた。しかしながら、Abraxane[®] 製剤中の HSA からは塩素化 HSA を検出することができなかった (Fig. 31B)。通常、生体内でも HSA は酸化修飾を受けていることから、Normal HSA においてもわずかに塩素化が起こっていると考えられるが、今回 Normal HSA では塩素化が観察されなかったことから、ジハロゲン化チロシンモノクローナル抗体の感度が低くウェスタンブロットでの今回の検討では Normal HSA における微量な塩素化は検出できないと推察された。以上のことから、Abraxane[®] HSA では Normal HSA と同等の塩素化が起きている可能性はあるが、Abraxane[®] 製造工程中での過剰な塩素化は起きていないことが示唆された。

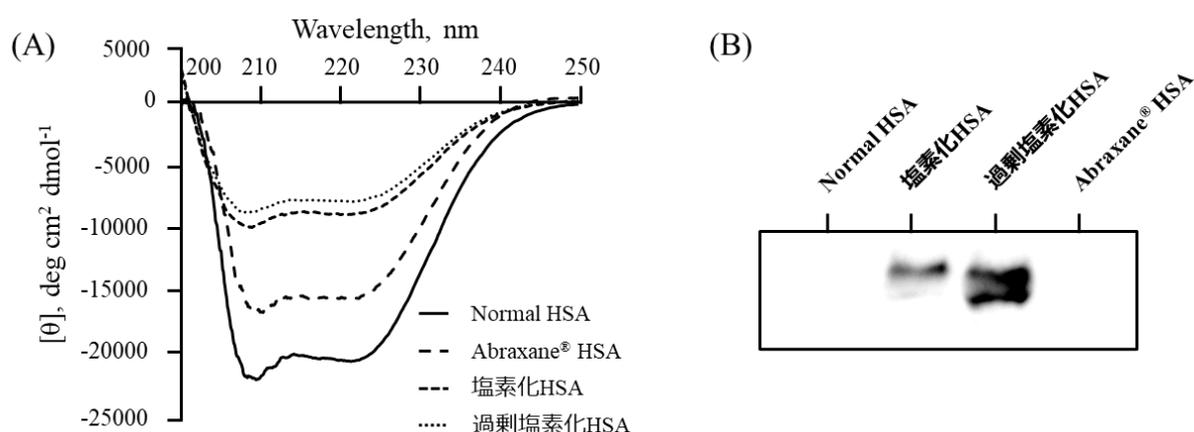


Fig. 31, CD spectra and WB of chlorinated HSA.

(A) Far-UV spectra of chlorinated HSA (10 μ M) were measured in PBS at room temperature. (B) WB of chlorinated HSAs in hypochlorous acid-treated Normal HSA. hypochlorous acid 2 mM was incubated with Normal HSA for 15 or 30 hr. Chlorination in HSAs were detected by Western blotting.

次に、塩素化 HSA および過剰塩素化 HSA の細胞内取り込み実験を行った。その結果、Normal HSA 存在下でのみ、塩素化 HSA および過剰塩素化 HSA の細胞内取り込みの低下が観察された (Fig. 32)。このことから、塩素化によって変性アルブミン受容体への認識性が上昇する可能性は少ないと考えられた。

以上の結果より、HSA を変性させる条件として、化学修飾ではなく有機溶媒などを用いた変性を選択した。

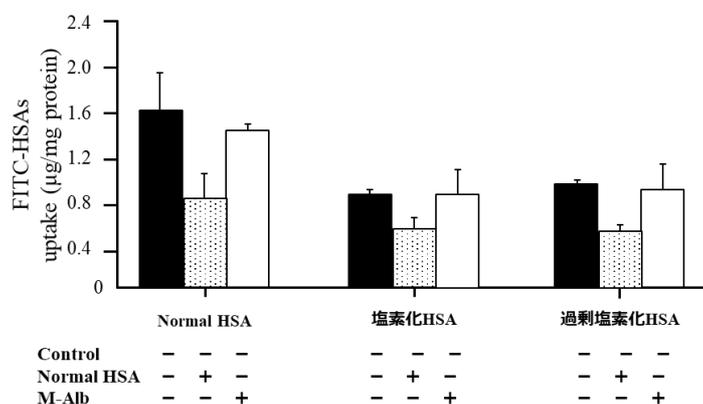


Fig. 32, Inhibition of cellular uptake of chlorinated HSA or Normal HSA by M-Alb or Normal HSA.

SUIT-2 cell was pretreated with Normal HSA or M-Alb for 30 min, after which, they were incubated with FITC-Normal HSA or FITC-chlorinated HSA for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

第2項 変性アルブミンの細胞取り込み評価

次に、様々な溶媒を用いて変性アルブミンを作製するべく、MeOH、2-プロパノール、硫酸、塩酸、ギ酸、DTT、アセトン、CHCl₃、AcOEt、ホルムアミド、アセトニトリルを用い

て変性アルブミンを調製し、SUIT-2 細胞による取り込み実験を行った。

細胞内に取り込まれた HSA を定量するため、Normal HSA に FITC 修飾した後に、変性剤により FITC-変性アルブミンを調製した (Fig. 33)。

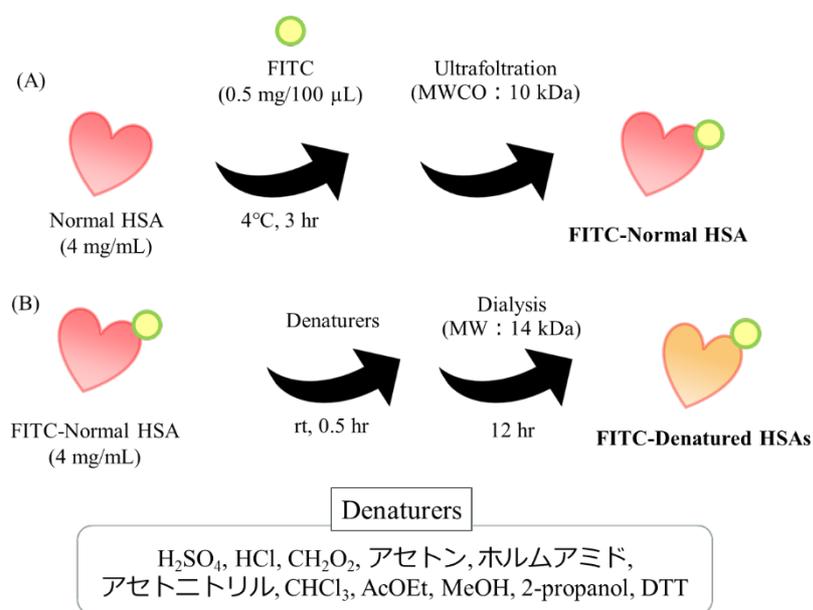


Fig. 33, Schematic summary of FITC-denatured HSAs production by denaturers.

その結果、塩酸において、Normal HSA よりも有意に高い細胞取り込み量を示した。このことから、様々な溶媒の中でも、特に酸溶媒による構造変化が細胞取り込みに大きく関与することが明らかとなった。HSA を酸性条件下で変性させた酸処理群においては、塩酸処理による変性が、最も SUIT-2 細胞への取り込みが高くなった (Fig. 34A)。一方で、極性溶媒、非極性溶媒による変性では取り込み量を増加させなかった (Fig. 34B, C)。

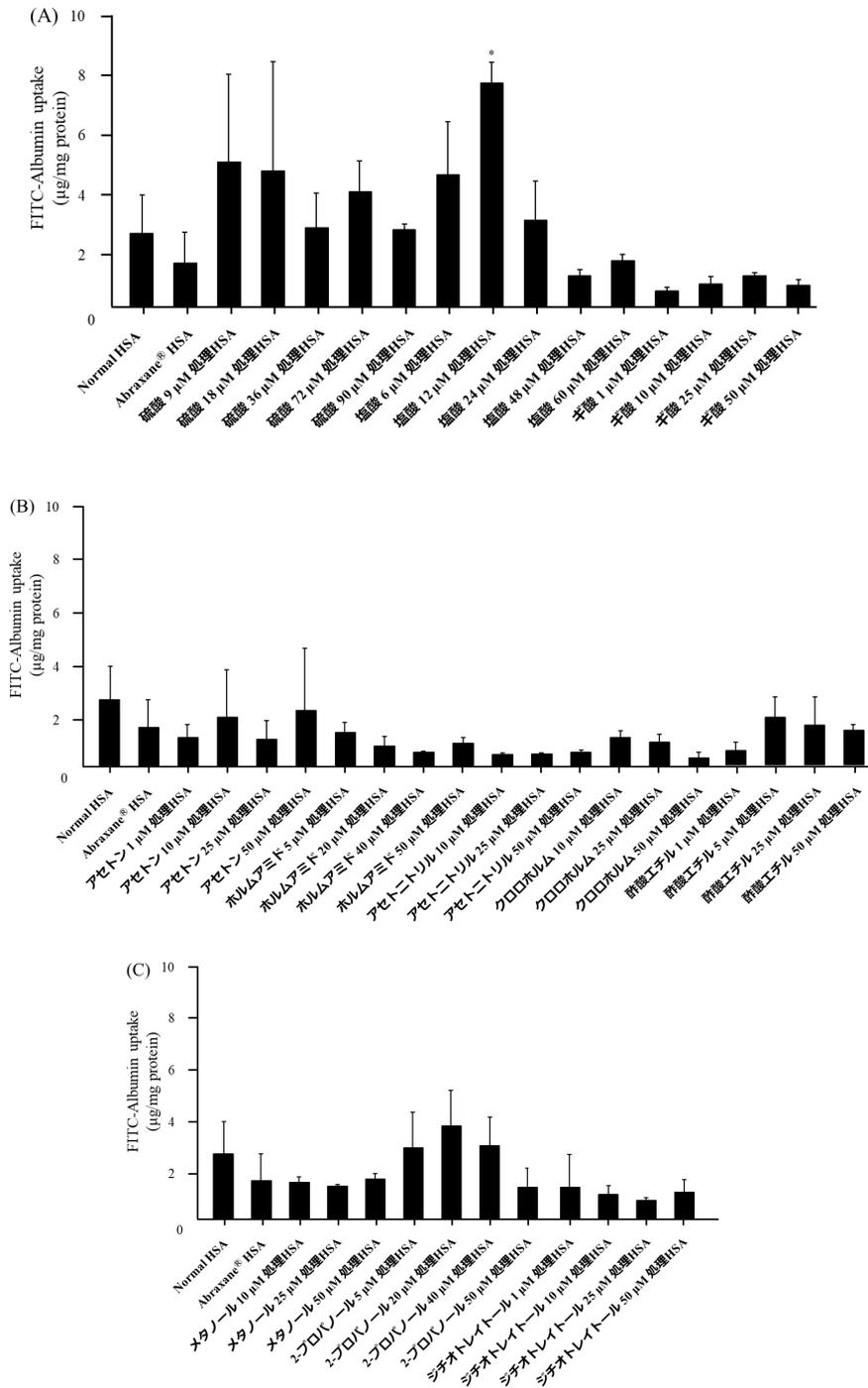
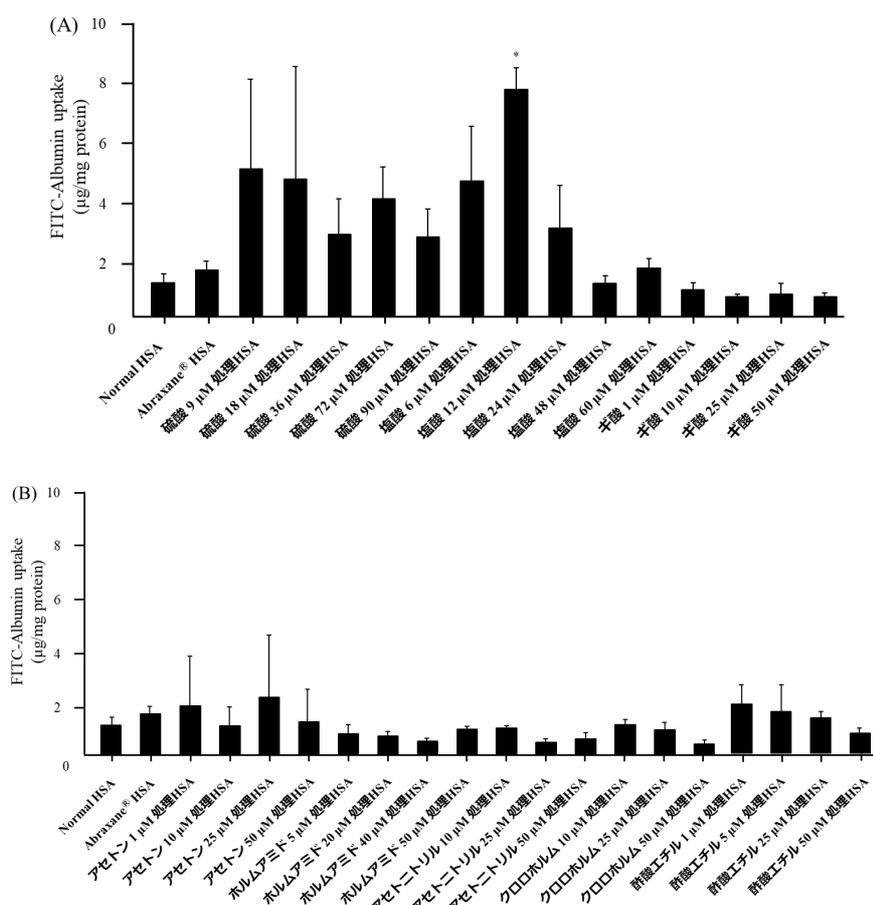


Fig. 34, Denatured HSAs uptake by SUIT-2 cells.

SUIT-2 cells were incubated with FITC-denatured HSAs (200 µg/mL) for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

次に、内因性の HSA による競合阻害の程度を検証すべく、各種溶媒によって作製された変性アルブミンを Normal HSA と競合させ、その時の細胞取り込み量を測定した。その結果、塩酸処理 HSA において、Normal HSA 競合下においても有意に高い取り込みを示した。興味深いことに、その細胞取り込み量は Abraxane® HSA も上回るものであった (Fig. 35A)。一方で、極性溶媒、非極性溶媒による変性では取り込み量を増加させなかった (Fig. 35B, C)。



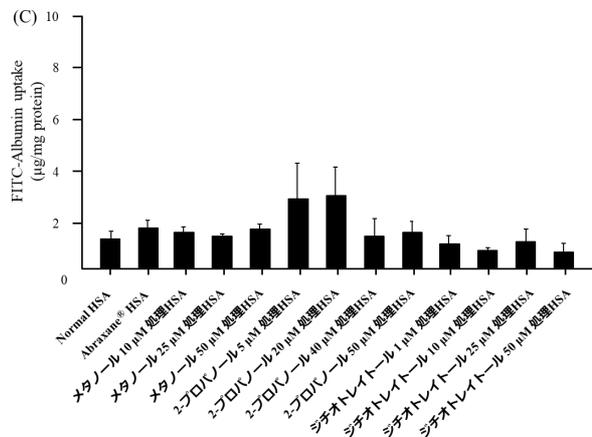


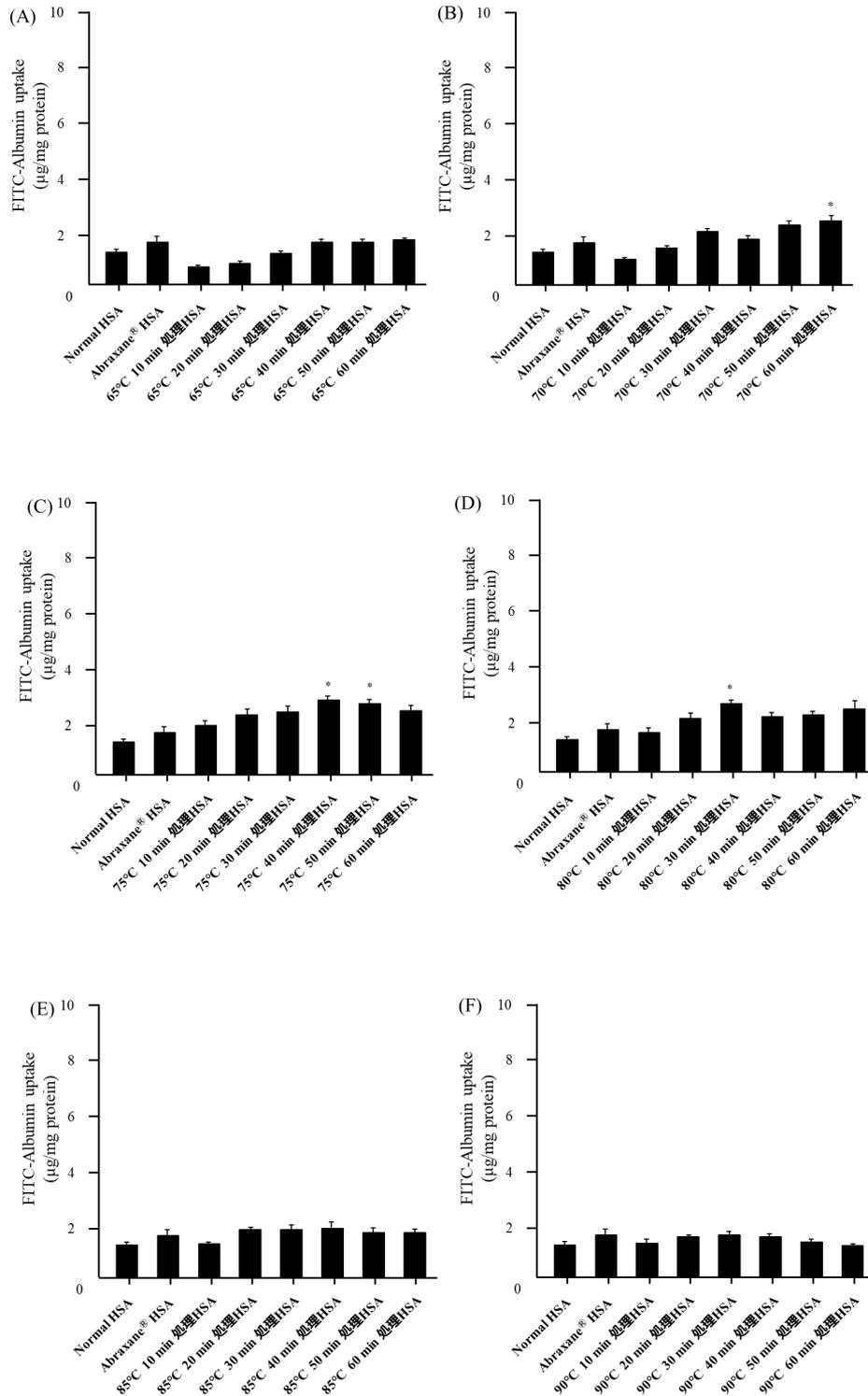
Fig. 35, Inhibition of cellular uptake of denatured HSAs by normal HSA.

SUIT-2 Cell was pretreated with Normal HSA for 30 min, after which, they were incubated with FITC-denatured HSAs for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

上記の結果から、塩酸、硫酸によって HSA に変性を加えた群において Abraxane® HSA よりも顕著に高い細胞への取り込みを示した (Fig. 34A)。また、Normal HSA との競合もほとんどないことから、内因性の HSA の存在下でも十分に細胞取り込みが引き起こされることが示唆された。特に塩酸 12 µM で処理した HSA は Normal HSA 存在下においても有意に高い取り込み量を示した (Fig. 35A)。以上の結果より、塩酸で HSA を処理した酸変性アルブミンが Abraxane® HSA よりも優れた変性アルブミン受容体を介するアルブミンキャリアになり得ることが示唆された。

次に、溶媒以外での変性方法として、熱を用いた検討も行った。熱変性では不可逆的な構造変化がおき、加熱による水素結合の消失などによる凝集を引き起こす⁷⁸。そこで、熱処理による構造変化が与える細胞による取り込みへの影響を調査した。作製された熱変性アルブミンを Normal HSA と競合させ、その時の取り込み量を測定した (Fig. 36)。その際の選定基準として、Normal HSA 存在下で、Abraxane® HSA よりも有意に高い細胞取り込み量である条件を候補として残すこととした。その結果、65°C においては細胞取り込み量の増加は観察されなかった (Fig. 36A)。70 – 80°C において、Abraxane® HSA よりも、有意に高い細胞取り込みを示した (Fig. 36B, C, D)。一方で、85°C を超えると細胞取り込み量の

増加は観察されなかった (Fig. 36E, F, G)。以上の結果から、加熱温度の変化と加熱時間により細胞取り込みに差異は認められるものの、一部の条件においては Abraxane[®] HSA よりも高い細胞取り込み能を獲得することが示唆された。



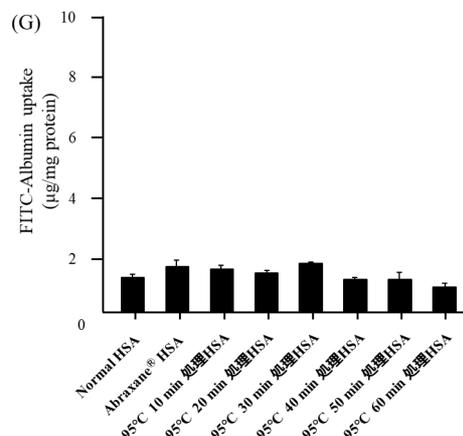


Fig. 36, Inhibition of cellular uptake of heat-treatment HSAs by normal HSA.

SUIT-2 Cell was pretreated with Normal HSA for 30 min, after which, they were incubated with (A) heat-treatment HSA 10-60 min at 65°C, (B) heat-treatment HSA 10-60 min at 70°C, (C) heat-treatment HSA 10-60 min at 75°C, (D) heat-treatment HSA 10-60 min at 80°C, (E) heat-treatment HSA 10-60 min at 85°C, (F) heat-treatment HSA 10-60 min at 90°C, (G) heat-treatment HSA 10-60 min at 95°C, (200 µg/mL) for 2hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean ± SEM (n = 3).

前述の通り、ヒト臍臓がん細胞株である SUIT-2 において、酸処理および 70 – 80°Cでの加熱による変性において、Abraxane® HSA よりも高い細胞内取り込みを示した。そこで、循環血中からがん細胞に到達する間のステップである経内皮輸送でも変性アルブミン受容体が寄与しているかを明らかにするため、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC を用いて、まずはその細胞取り込み評価を行った。その結果、SUIT-2 の結果とは異なり、各種酸処理 HSA では、Abraxane® HSA を上回る細胞取り込み量は観察されなかった。しかしながら、熱処理した HSA は Abraxane® HSA よりも、有意に高い細胞取り込み量を示した (Fig. 37)。以上の結果より、熱処理 HSA は循環血液中においても血管内皮を通過できる事が示唆された。

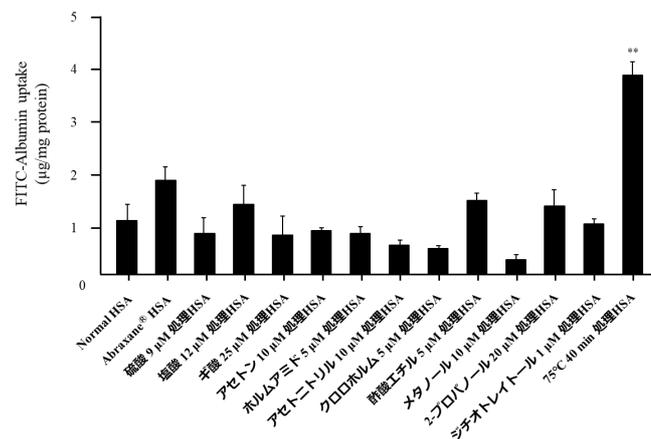


Fig. 37, Inhibition of cellular uptake of denatured-treatment HSAs or heat-treatment HSA by Normal HSA.

HUVEC was pretreated with Normal HSA for 30 min, after which, they were incubated with FITC-denatured-treatment HSAs or FITC-heat-treatment HSA. for 2 hr at 37°C in serum-free culture medium. Cellular uptake of FITC was analyzed by fluorescence quantification was performed. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

第 3 項 変性アルブミンの物理化学的特性評価

次に、*in vitro* 実験において、SUIT-2 細胞での細胞内取り込み量が Abraxane® HSA よりも優れていた塩酸 12 μ M 処理 HSA (酸処理 HSA) および、HUVEC での細胞内取り込み量が優れていた 75°C 条件下で 40 分間熱処理を加えた HSA (熱処理 HSA) を選択し、Normal HSA と Abraxane® HSA と比較することで、物理化学的特性変化の解析を試みた。

まず、CD スペクトルを測定し、二次構造を反映する遠紫外領域スペクトルの変化を観察した。210–230 nm 付近のスペクトル変化から、酸処理 HSA および熱処理 HSA では Normal HSA に比べ α ヘリックス含有量の減少が観察された (Fig. 38)。このことから、酸および熱処理により HSA の 2 次構造に変化が起きていることが示唆された。

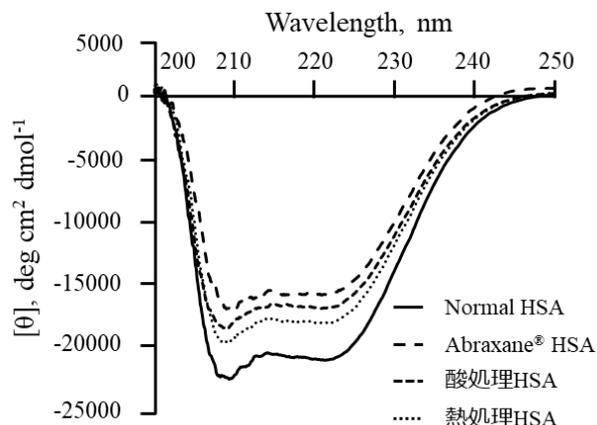


Fig. 38, CD spectra of acid-treatment HSA and heat-treatment HSA.

Far-UV spectra of HSAs (10 μ M) were measured in PBS at room temperature.

次に、構造の変化を調査すべく HSA 内部のトリプトファンの蛍光測定したところ、酸および熱処理により蛍光の消失が観察され、トリプトファンの露出が確認された。次に、疎水面に結合して蛍光を示すプローブである Sypro orange を用いて評価した。Normal HSA および酸処理 HSA、熱処理 HSA と Sypro orange を反応させたところ、Normal HSA と反応した際の蛍光に対し、酸処理 HSA および熱処理 HSA との反応により得られた蛍光が低かったことから、疎水面の減少が示唆された (Fig. 39)。

これらの結果から、HSA を酸処理または熱処理することで、Abraxane[®] HSA と同様な構造変化を引き起こされることが示唆された。

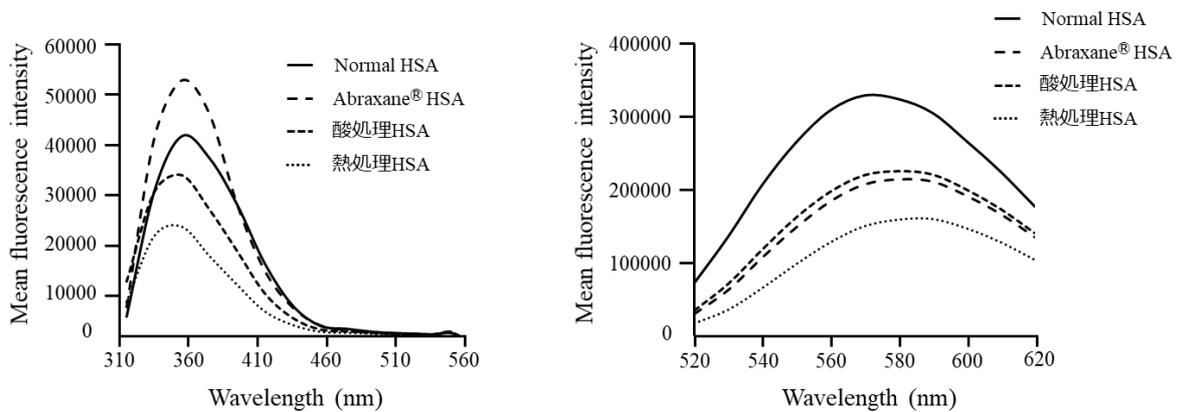


Fig. 39, Structural analysis of acid-treatment HSA and heat-treatment HSA.

(A) Fluorescence of tryptophane of HSA and Abraxane[®] HSA, acid-treatment HSA, heat-treatment HSA (10 μ M). (B) Fluorescence of HSA and Abraxane[®] HSA, acid-treatment HSA, heat-treatment HSA with Sypro orange.

HSA にはサイトIとサイトIIと呼ばれる薬物結合ポケットが存在する。HSA の変性に伴う立体構造変化により薬物結合ポケットが変化し、薬物との親和性が変化する可能性が考えられる。それぞれサイトI、サイトIIに特異的に結合して蛍光を示すプローブであるダンシルアミド (Fig. 40)および BD140 を用いて Normal HSA および Abraxane[®] HSA、酸処理 HSA、熱処理 HSA の薬物結合能を評価した。

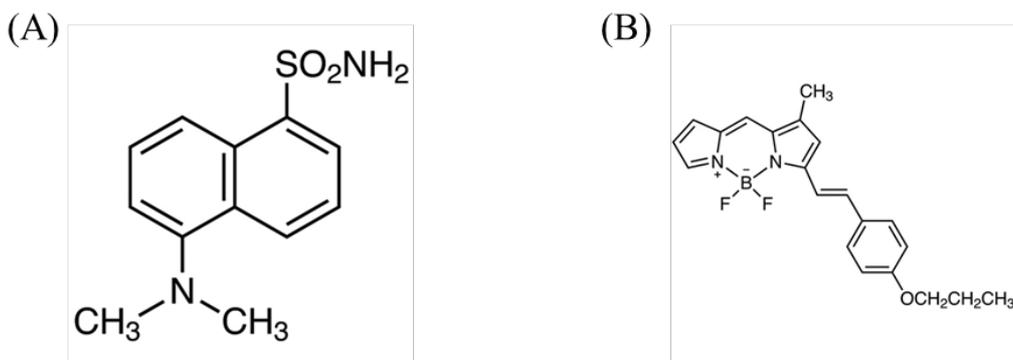


Fig. 40, Structure of dansylamide and BD140

(A) Dansylamide, (B) BD140

その結果、Abraxane[®] HSA および酸処理 HSA、熱処理 HSA では、485 nm の蛍光をピークとする dansyl アミドの蛍光は Normal HSA に比べ、結合活性が著しく減少していた。また、590 nm の蛍光をピークとする BD140 の結合能も減少しており、特に熱処理 HSA では著しく減少していた (Fig. 41)。従って Abraxane[®] HSA は Normal HSA と比較して、サイトを問わず薬物結合能が低下しており、酸処理または熱処理によっても HSA のサイト I およびサイト II 両方の結合能が低下することが分かった。

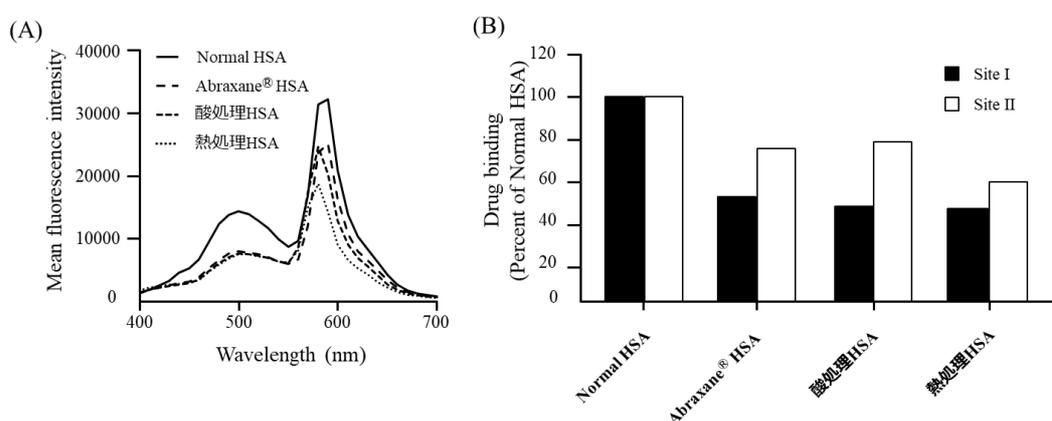


Fig. 41, Binding efficacy of dansylamide and BD140 to denatured albumin.

Emission spectra of dansylamide ($\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$) and BD140 ($\lambda_{\max} = 585 \text{ nm}$) with Normal HSA (straight) and Abraxane[®] HSA (dash), acid-treated HSA (dash-dash), heat-treated HSA (broken) was measured by a microplate reader. $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$.

次に、変性による HSA の構造の変化を調査すべく電気泳動による分子量の違いについて評価を行った。2 章では Normal HSA ではほとんど見られなかった polymer が Abraxane[®] では観察されたが、熱処理 HSA では Abraxane[®] HSA よりも多くの polymer が観察された。

一方で、酸処理 HSA では Normal HSA との違いはほとんど観察されなかった (Fig. 42)。以上の結果より、酸処理 HSA においては、HSA の立体構造は変化しているが、タンパク質のポリマー化は観察されなかった。熱処理 HSA ではポリマーが観察されたことから、HSA の粒子径が大きくなった結果、吸作用などによって取り込みが増加したことが示唆さ

れた。酸処理 HSA は凝集体が観察されず、SUIT-2 細胞において高い細胞内取り込みを示したことから、HSA の立体構造の変化が細胞内取り込みに変化を与えたことが示唆された。

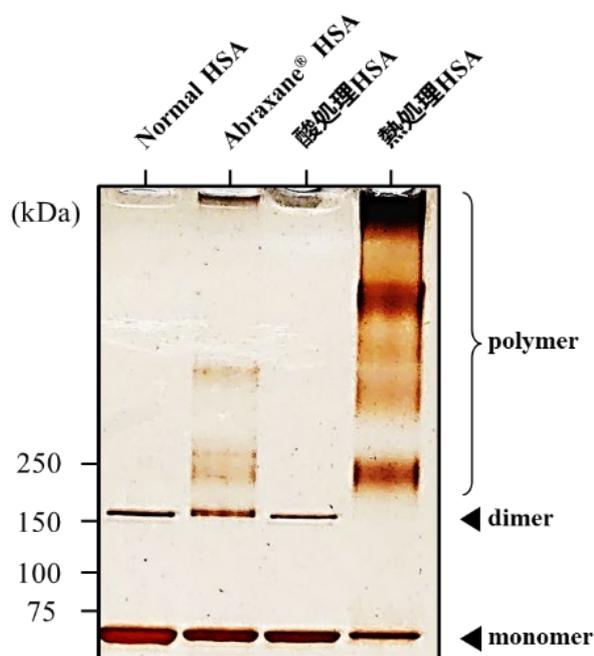


Fig. 42, Structural properties of acid-treatment HSA and heat-treatment HSA.

SDS-PAGE analysis of Normal HSA and Abraxane® HSA, acid-treatment HSA, heat-treatment HSA. Each arrow indicates an albumin monomer, dimer, and polymer.

第4項 変性アルブミンの体内動態特性評価

次に、*in vitro* で高い細胞内取り込みを示した 75°C で 40 分間加熱した熱処理 HSA と塩酸で処理した酸処理 HSA の *in vivo* における体内動態について評価した。体内における HSA の動態特性を IVIS イメージング法により検討すべく、近赤外蛍光試薬である Alexa750 による HSA の標識を試みた。まず、Alexa750 により標識した Alexa750-HSA を調製し、その後熱処理または酸処理を行うことで Alexa750-熱処理 HSA と Alexa750-酸処理 HSA を調製した (Fig. 43)。なお、Alexa750-熱処理 HSA と Alexa750-酸処理 HSA に関しては、変

性により蛍光強度の変動が起こるため、それぞれの検量線から蛍光強度補正を行った (Fig. 44)。

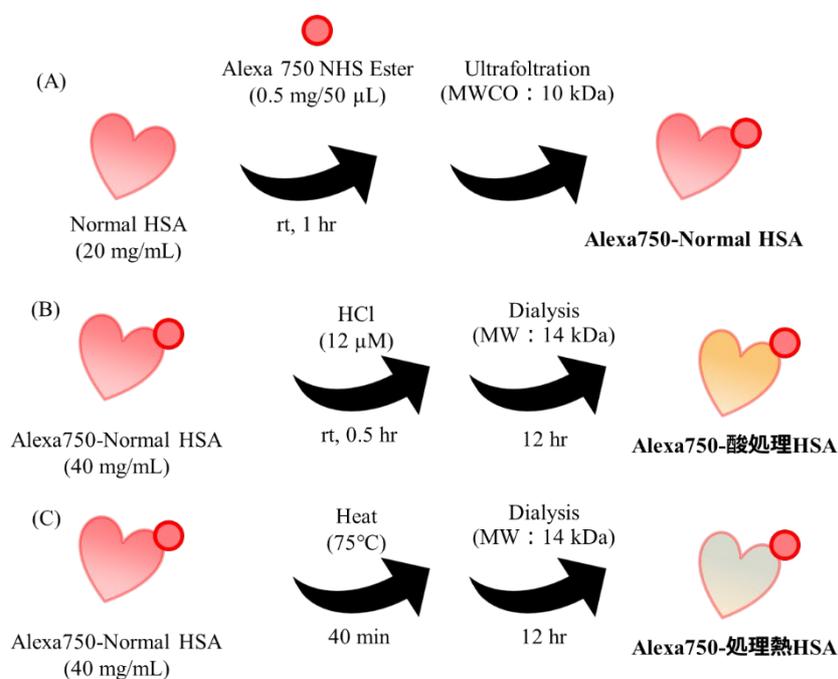
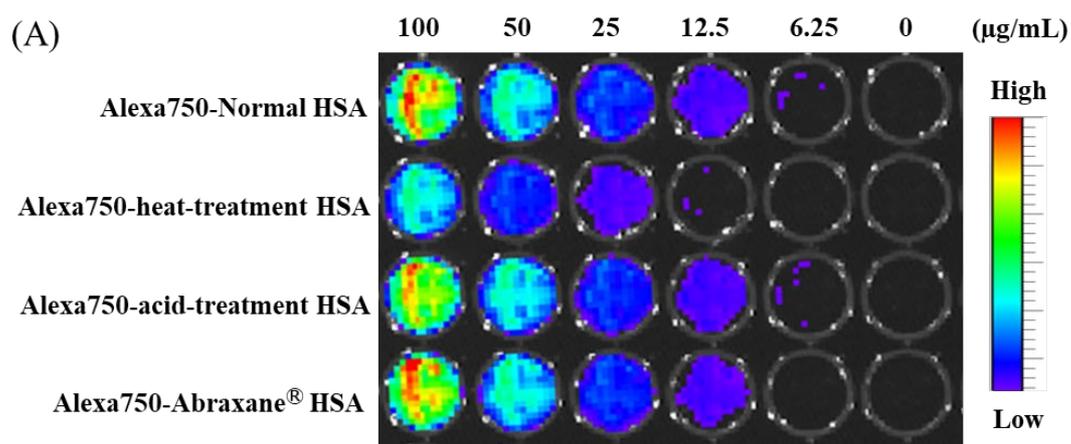


Fig. 43, Labeling of Alexa750 to HSA

(A) Preparation scheme of Alexa750-Normal HSA. (B) Acid treatment, (C) Heat treatment.



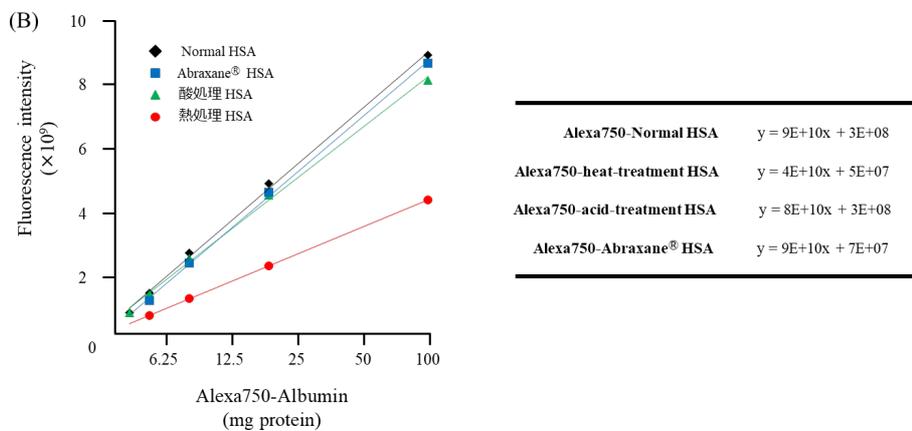


Fig. 44, Fluorescence of Alexa750-HSAs.

(A) Fluorescence images of Alexa750-HSAs at different concentrations and (B) calibration curve.

前臨床試験におけるナノ DDS 抗がん剤の評価では、マウスの皮下にがん細胞を移植した皮下移植モデルが汎用されている。しかし、皮下移植モデルと実際の臨床におけるがんの病態では乖離がみられることが指摘されている。近年では、ヒト由来のがん細胞を同所に移植したモデルが、皮下移植モデルと比較し、臨床像の再現度が高いとされている。事実、同系統のヒト由来膵臓がん細胞である SUIT-2 を用いて皮下移植モデル及び同所移植モデルを作製した場合、皮下移植モデルに比べ、同所移植モデルにおける腫瘍では膵臓がんの臨床像と同様に血管の密度が低くなっており、抗腫瘍効果を評価する上では臨床に近いモデルとなっている。そこで、SUIT-2 をマウスの膵体部に移植することで作製した SUIT-2 同所移植モデルにおける変性アルブミン結合 PTX の治療効果を評価した。

まず、SUIT-2 同所移植モデルと皮下移植モデルを比較し、腫瘍内微小環境の違いを評価した。各マウスの腫瘍を摘出し、血管内皮細胞を CD31 抗体で染色した。また、膵臓がんの悪性度および進行度の指標となる SPARC を免疫染色した。循環血液中の HSA を血管内に輸送する Caveolin-1 の免疫染色を行った。その結果、同所移植モデルにおいて皮下移植モデルに比べ血管数が少ないことが明らかとなった (Fig. 45)。このことから、同所移植モデルの腫瘍は虚血状態であり、低栄養状態であると考えられる。血液から十分な栄養の補給が行われていない腫瘍では、EAT system により HSA の取り込みが促進されていると考えられる。アルブミン関連タンパク質である SPARC も同所移植モデルの腫瘍では多く発現しており (Fig. 46)、アルブミンのカベオラ介在性のエンドサイトーシスに参与する

Caveolin-1 の発現も多かった (Fig. 47)。以上の結果から、同所移植モデルでは臨床像と同様に血管の密度が低くなっており、腫瘍の悪性度の指標となる SPARC の発現も増加していることから、アルブミンをキャリアとした抗腫瘍効果を評価する上では臨床に近い結果が得られることが示唆された。

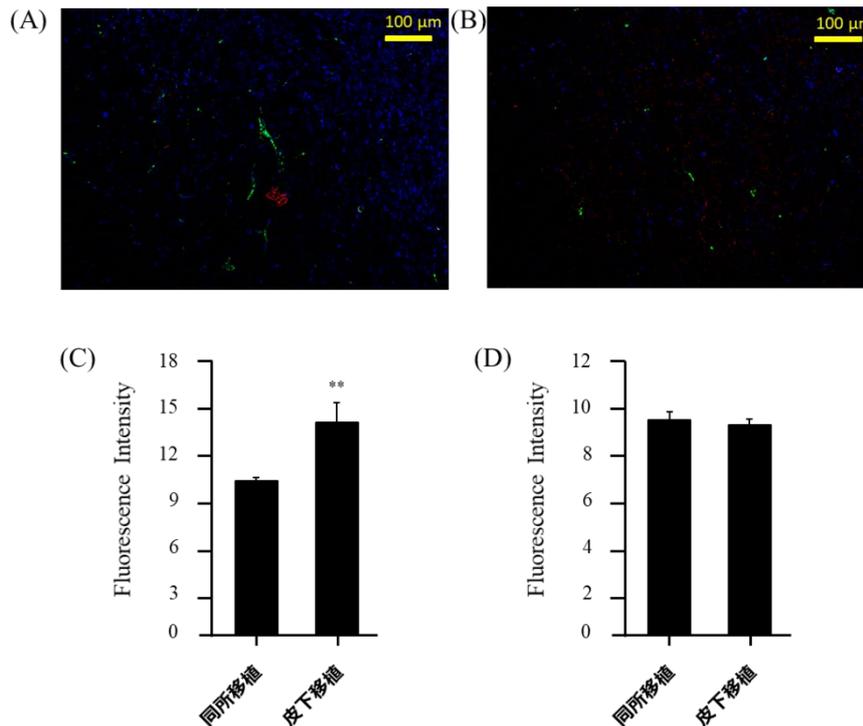


Fig. 45, The comparison between pancreatic cancer orthotopic model and ectopic model of CD31 and α -SMA.

(A) orthotopic tumour xenografts and (B) subcutaneous, in (C) Number of blood vessels, (D) α -SMA (S.C.) tumour xenografts. After immunostaining with Anti-CD31 antibody (red) and Anti-alpha Smooth Muscle Actin antibody (green), Hoechst 33342 (blue), the quantitative analysis of each data was performed using ImageJ software. Data are averages \pm standard deviation. scale bar = 100 μ m. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

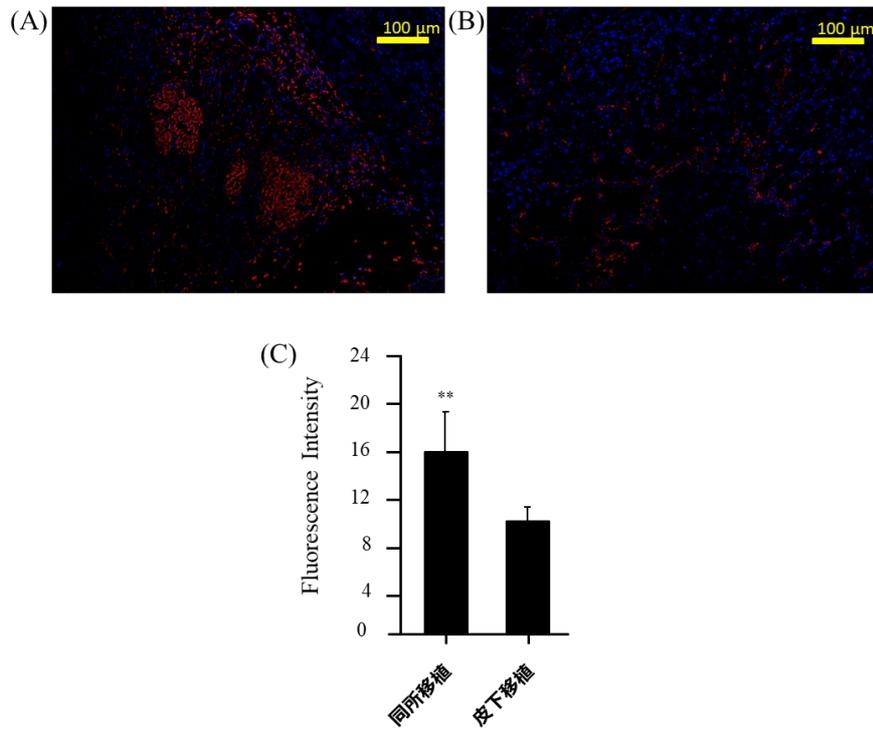


Fig. 46, The comparison between pancreatic cancer orthotopic model and ectopic model of SPARC.

(A) orthotopic tumour xenografts and (B) subcutaneous, (C) SPARC (S.C.) tumour xenografts. After immunostaining with Anti-SPARC antibody (red) and Hoechst 33342 (blue), the quantitative analysis of each data was performed using ImageJ software. Data are averages \pm standard deviation. scale bar = 100 μ m. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

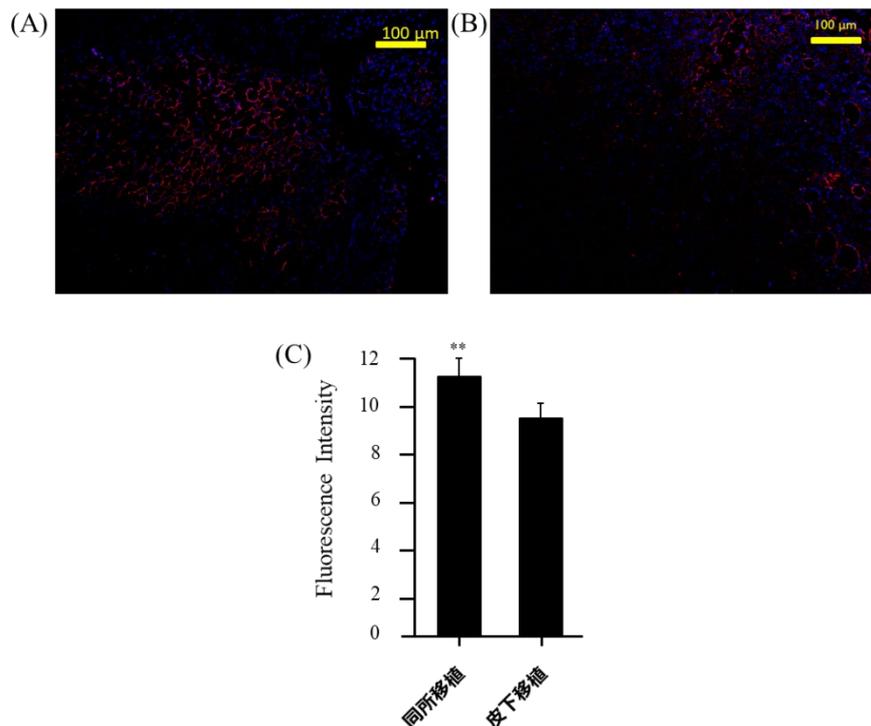


Fig. 47, The comparison between pancreatic cancer orthotopic model and ectopic model of Caveolin-1.

(A) orthotopic tumour xenografts and (B) subcutaneous, (C) Caveolin-1 (S.C.) tumour xenografts. After immunostaining with Anti- Caveolin-1 antibody (red) and Hoechst 33342 (blue), the quantitative analysis of each data was performed using ImageJ software. Data are averages \pm standard deviation. scale bar = 100 μ m. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

変性アルブミンの腫瘍集積性を評価すべく、マウスの膵臓に SUIT-2 を同所移植した同所移植膵臓がんマウスに対して、Alexa750-Normal HSA、Alexa750-Abraxane[®] HSA、Alexa750-熱処理 HSA と Alexa750-酸処理 HSA (1 mg/kg) を静脈内投与した (Fig. 48)。その後、IVIS を用いた *ex vivo* imaging により腫瘍集積性及び臓器移行性を評価した (Fig. 49)。その結果、Alexa750-Normal HSA に比べ、Alexa750-Abraxane[®] HSA と Alexa750-酸処理 HSA は腫瘍部位で高い蛍光が確認されたのに対し、Alexa750-熱処理 HSA では Alexa750-Normal HSA と同等であった (Fig. 50)。以上の結果より、酸処理 HSA は Normal HSA よりも有意に腫瘍への集積が認められた。その一方で、Abraxane[®] HSA との有差は認められなかった。

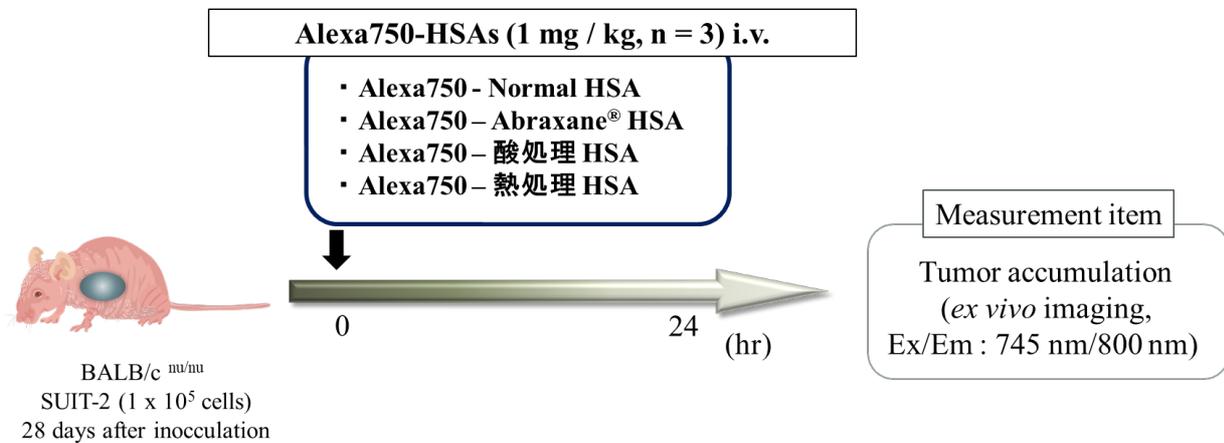


Fig. 48, Schematic summary of experimental protocol for Tumor accumulation analysis of HSAs in SUIT-2 ectopic tumor bearing mice.

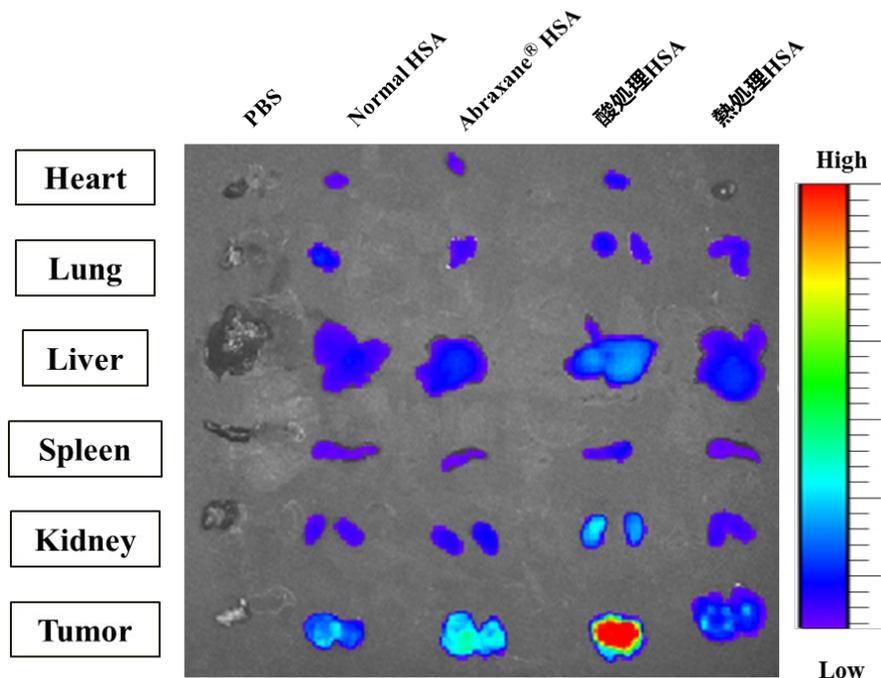


Fig. 49, Organ distribution of Alexa750-HSAs.

Ex vivo radiant of the major organs dissected from SUIT-2 orthotopic tumor bearing mice at 24 hr after 1 mg (HSA)/kg Alexa750-HSAs were *i.v.* injected.

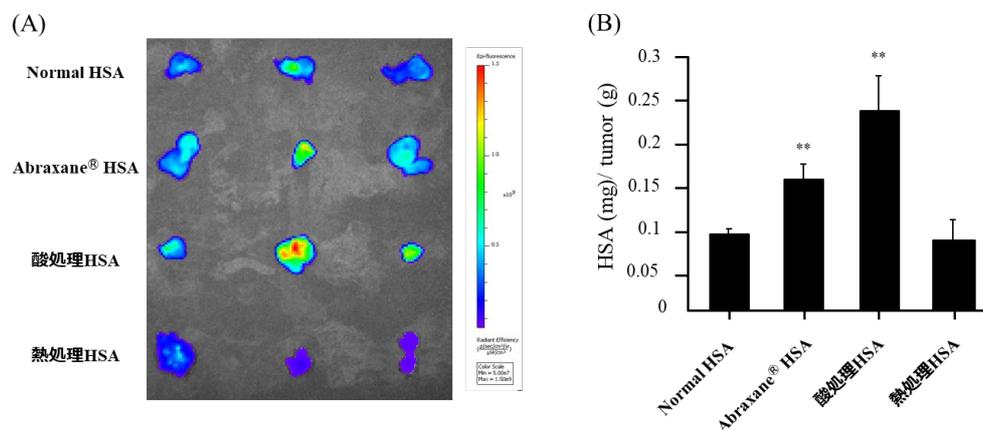


Fig. 50, Tumor distribution of Alexa750-HSAs.

(A) *ex vivo* imaging and (B) *ex vivo* radiant efficiency of the tumors dissected from SUIT-2 orthotopic tumor bearing mice at 24 hr after 1 mg /kg Alexa750-HSAs were *i.v.* injected. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 3).

第5項 変性アルブミン結合 PTX の抗腫瘍活性評価

膵臓がんへの適応が認められている Abraxane® と比較し、PTX 結合型変性アルブミンが及ぼす抗腫瘍効果を評価すべく、SUIT-2 同所移植モデルにおいて、Abraxane® および PTX 結合型熱処理 HSA、PTX 結合型酸処理 HSA による治療を実地した。使用した動物モデルとして、ルシフェラーゼ発現遺伝子を導入したヒト膵臓がん細胞である SUIT-2-GLuc (1×10^5 cell) をマウスの膵臓に直接投与し、ヒト膵臓がん同所移植モデルを作製した。また、モデルの腫瘍生着および、腫瘍成長は、発色基質である Coelenterazin を静脈内投与し、その際の生物発光を IVIS により確認した。治療スケジュールに関しては、ヒトの膵臓がんにおいて、早期発見が困難という背景から、ある程度病態の進行した移植 28 日目から治療開始とし、Control 群、Abraxane® 群、酸処理 HSA 群、熱処理 HSA 群 (20 mg (PTX)/kg) にわけ週 1 回、計 3 回の治療を行い、体重変動と生存日数を測定した(Fig. 51)。

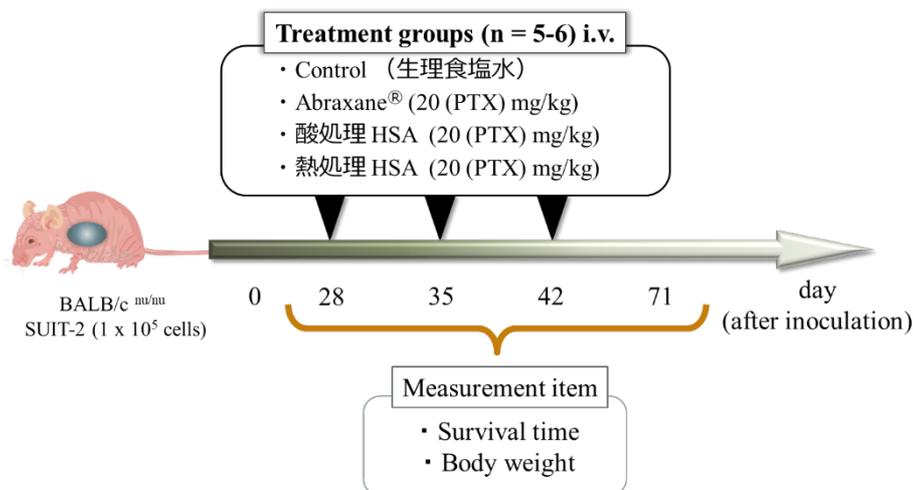


Fig. 51, Schematic summary of experimental protocol for the antitumor activity of Abraxane[®] or acid-treatment HSA, heat-treatment HSA in SUIT-2 orthotopic tumor bearing mice.

その結果、Control 群と比較して、Abraxane[®]群および酸処理 HSA 群では生存期間の延長が観察された (Fig. 52)。生存期間中央値 (MST) での比較では、Abraxane[®]群および酸処理 HSA 群で有意な上昇が認められ、酸処理 HSA 群は Abraxane[®]群と同等の治療効果を示した。一方で、熱処理 HSA 群は Control 群と比較して生存率の延長は観察されなかった。また、この治療期間において、各群とも顕著な体重変動は見られなかった。

以上の結果より、酸処理により HSA を変性させることで Abraxane[®] HSA よりも高いがん細胞への取り込みが観察されたが、同所移植モデルにおいては Abraxane[®]と変わらない治療効果を示した。また、熱処理により HSA を変性させることで Abraxane[®] HSA よりも高い血管内皮細胞への取り込みが観察されたが、同所移植モデルにおいては治療効果を示さなかった。これは、変性アルブミンが PTX を効率的に腫瘍へ到達できていないことが示唆され、変性アルブミンは PTX の保持率が低い可能性があり、薬物との相互作用が課題となる。

これらのことから、HSA は変性することで変性アルブミン受容体に認識され、内因性のアルブミンと競合をうけにくくなり、アルブミン受容体が過剰発現している腫瘍において高い集積性を示した。一方で、熱処理などの凝集体などが形成される過剰な変性においては腫瘍への集積性は低下した。治療効果においては Abraxane[®]と同等であったため、更なる変性アルブミンの改良が望まれる。

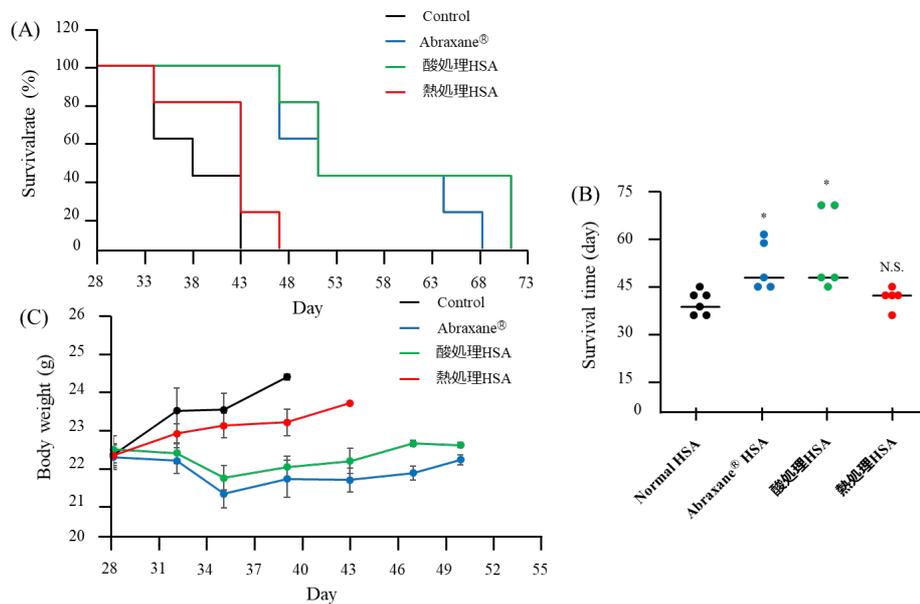


Fig. 52, The effect of the antitumor activity of Abraxane® or acid-treatment HSA, heat-treatment HSA in SUIT-2 human pancreatic cancer orthotopic mice.

(A) survival rate, (B) Median survival time (MST) and (C) body weight were measured in SUIT-2 orthotopic tumor bearing mice at each of the selected time points. The mice were i.v. injected with saline, Abraxane® or acid-treatment HSA, heat-treatment HSA (20 mg(PTX)/kg) at each of the selected time points. The arrows indicate days of treatment. Data are averages \pm standard deviation (n = 5-6).

第4節 考察

前章より、Abraxane[®] HSA の細胞取り込みにおいて、変性アルブミン受容体の関与が示された。そこで3章で得られた知見を基に変性アルブミン受容体を標的とした HSA キャリアの創製を目的に本章では、変性剤または熱による変性アルブミンの調製を試み、*in vitro* 及び *in vivo* において腫瘍がん細胞取り込み、さらに担癌マウスを用いた体内動態および抗腫瘍効果の評価を行った。

まず、変性アルブミン受容体に対する基質特異性を向上させ、Abraxane[®]よりも取り込み量が高い変性アルブミンを作製し薬物のキャリアとするため、変性アルブミンの調製法を検討した。Abraxane[®]の最新の製造方法の詳細は不明であるが、Abraxane[®]の製造において、HSA と PTX を反応させる過程で、室温で30分間激しく攪拌している⁷⁵。そこで、Normal HSA を室温で30分間激しく攪拌したところ、 α ヘリックス含有量の減少が観察されたが、細胞取り込み実験では変性アルブミン受容体阻害剤による取り込み阻害は観察されなかった。 α ヘリックス含有量の減少の原因として、HSA に泡立ちが観察されたことから、攪拌による酸化や物理的的刺激によりタンパク質の構造が変化したと考えられる。HSA は、水分と混ざることによって表面張力が弱くなり、タンパク質由来の泡立ちが引き起こされる。細胞取り込み実験において、攪拌前後において差がみられなかったことから、今回の検討では室温で30分間激しく攪拌した。

次に、HSA の変性剤による変化を検討した。過去の Abraxane[®]の製造において、PTX の溶解剤としてクロロホルムが使用されていたことから、まず HSA のクロロホルムによる影響を評価した。その結果、 α ヘリックス含有量の減少および、変性アルブミン阻害剤による細胞内取り込みが低下した。このことから、クロロホルムのような溶媒による構造変化が変性アルブミン受容体による認識に関わっていることが示唆された。そこで、さらなる溶媒の検討を行った結果、硫酸や塩酸などの酸処理において細胞内取り込み量が増加した。HSA は、pH に応じてさまざまな構造変化を取ることが知られている。酸性条件下では HSA は可逆的に正に帯電し、ドメイン III の構造変化を誘発するが、ドメイン I と II には大きな影響を与えないと報告されている⁷⁹。したがって、ドメイン III の構造変化が細胞内取り込みに影響を与えたと推察された。

また、タンパク質の代表的な変性方法に熱変性がある。熱変性では不可逆的な構造変化がおき、加熱による水素結合の消失などによる凝集を引き起こす⁷⁸。そこで、熱処理による構造変化が与える細胞による取り込みへの影響を調査した。その結果、温度の上昇、加熱時間の増加に伴い緩やかに細胞取り込み量の増加が観察され、70-80°C タンパク質処理

においては有意に高い細胞取り込み量を示した。HSA の場合、タンパク質の凝集は 56°C で始まり、不可逆的な構造変化は約 70°C で始まることが報告されている⁷⁹。また、 α ヘリックス含量の損失とそれともなう β シートの増加が報告されており、これらの不可逆的な構造変化や構造変化に伴う多量体が形成され、細胞による取り込みに影響を与えたと推察される。

次に、SUIT-2 細胞において最も高い細胞移行を示した、酸処理と熱処理の変性アルブミンを用いて、HUVEC において細胞内取り込み実験を行った。結果は SUIT-2 細胞とは異なり、熱処理アルブミンの細胞取り込みが高くなった。このことは、SUIT-2 や HUVEC といったそれぞれの細胞種において、各種アルブミン受容体の発現パターンおよび発現量に差異があることを示していると考えている。今後、これらの細胞種での各種アルブミン受容体の発現パターンを詳細に解析していくことがアルブミン受容体を介した DDS キャリアの開発において極めて重要であろう。実際に、SUIT-2 同所移植モデルにおける腫瘍集積性評価を行ったところ、Normal HSA に比べ、Abraxane[®] HSA および酸処理 HSA では有意に腫瘍組織への集積が認められた。この一方で、熱処理 HSA では有意な差は認められなかった。つまり、*in vitro* において Abraxane[®] HSA よりも高い細胞内取り込みを示した酸処理 HSA および熱処理 HSA は、*in vivo* での腫瘍集積性の結果からは有意な差は認められなかった。この研究結果は、まさに *in vivo* 実験の複雑性を示すものであり、様々な細胞の集団である *in vivo* での体内分布制御の難しさを痛感した。それと同時に、*in vivo* での理想的な体内分布制御を行う上で、各臓器や各細胞のアルブミン受容体の発現パターンおよび発現量の詳細な検討が急務であると考えている。

以上の結果より、Normal HSA に変性剤を加えることで、膵臓がん同所移植モデルにおいて腫瘍への集積性が増加する傾向が観察された。変性アルブミン結合型 PTX においては、Abraxane[®]よりも有意な抗腫瘍効果は見られなかったが、変性剤により Normal HSA の立体構造が変化し、腫瘍への集積性が増加する本知見は、変性アルブミン受容体を介した新規アルブミンキャリアによる薬物輸送機構の有益な基礎資料となる。一方で生体内での変性アルブミンを認識する受容体は明らかにすることは出来ておらず、変性アルブミン受容体の同定が重要な課題にとらう。

第5節 小括

本章では、各種変性条件を用いて変性アルブミンを作製し、物理学化的特性評価および膵臓がん治療における有用性の評価を行った。以下に得られた知見をまとめる。

- 1) 変性剤と Normal HSA を反応させることで、Normal HSA と競合しないアルブミン受容体に認識される HSA の調製に成功した。
- 2) 調製した変性アルブミンの細胞内取り込みのスクリーニングをした結果、SUIT-2 細胞においては酸処理 HSA、HUVEC においては熱処理 HSA が、Abraxane[®] HSA よりも有意に高く細胞に取り込まれることが明らかとなった。
- 3) 調製した酸処理 HSA および熱処理 HSA の物理化学的性質を解析したところ、 α ヘリックス含量の減少、トリプトファン蛍光の減少、疎水領域の減少が明らかになった。酸処理 HSA および熱処理 HSA の Site I または Site II の薬物結合能は、Abraxane[®] HSA と同様に減弱していた
- 4) SUIT-2 ヒト膵臓がん同所移植モデルに対して、Alexa750 標識 HSAs の体内動態解析を行った結果、Normal HSA と比較して、Abraxane[®] HSA と酸処理 HSA では有意に高い腫瘍移行性を示したものの、Abraxane[®] HSA と酸処理 HSA 間での有意な差は認められなかった。
- 5) SUIT-2 ヒト膵臓がん同所移植モデルに対する抗腫瘍効果において、Abraxane[®] HSA と酸処理 HSA 間での有意な差は認められなかった。

以上の結果から、Abraxane[®] HSA の体内分布特性をもとに新たに開発した変性アルブミンは、Normal HSA とは異なる細胞取り込み機構により、Abraxane[®] HSA よりも高い細胞内取り込みを示したものの、残念ながら動物モデルでは Abraxane[®] を上回る治療効果は示さなかった。が考えられる。今回の *in vivo* と *in vitro* におけるデータの解離については、変性アルブミンの結合サイトが変化していることから、HSA 分子に結合する PTX の量に変化しており、生体内での薬物動態が変化している可能性などの原因究明を詳細に行うことで、*in vivo* での有用性を高めた変性アルブミンの開発に繋げていきたいと考えている。

第4章 総括

近年、薬物の体内動態の改善と治療効果を高め、副作用を最小限にする DDS 戦略に注目が集まっている。化学療法においても、腫瘍選択的に薬物を送達することを企図した様々なナノ DDS 抗がん剤の開発が進んでいる。HSA は受動的ターゲティングである EPR 効果に加え、Gp60 などのアルブミン受容体を介した能動的ターゲティングも期待できる極めて有望なナノ腫瘍 DDS キャリアである。Abraxane[®]に代表される HSA 結合型薬物は、Gp60 を介した受容体輸送と SPARC との相互作用が腫瘍部位でのアルブミン蓄積に関与しているとこれまで考えられてきたものの、物理化学的特性に基づく取り込み経路の Normal HSA との比較評価はほとんど無かった。そこで本研究では、ヒト膵臓がん細胞 SUIT-2 とヒト血管内皮細胞 HUVEC を用い、臨床で使用されているアルブミン結合型製剤である Abraxane[®]の細胞取り込み機構および腫瘍移行メカニズムの解明と、変性アルブミンを基盤とするナノ DDS 抗がん剤の開発およびその有用性評価の検討を行い、次世代のアルブミン DDS 戦略の構築を試みた。具体的には、第2章で Abraxane[®] HSA の物理化学的特性および細胞内取り込み経路を Normal HSA と比較評価することで、変性アルブミン受容体の関与を明らかにした。次いで、第3章では化学変性や熱変性による変性アルブミンを調製し、ナノ DDS 抗がん剤のキャリアとしての有用性を検討した。以下に得られた知見を総括する。

第2章 Abraxane[®] HSA の特性評価

Abraxane[®]の詳しい腫瘍移行メカニズムの解明を行うために、Abraxane[®]から PTX を取り除いた Abraxane[®] HSA を調製し、Normal HSA との比較検討を行った。CD スペクトル解析などの物理化学的特性を評価したところ、2次構造および3次構造が変化していることが明らかとなった。また、Abraxane[®] HSA は従来報告されていた Gp60 などの取り込み機構以外にも、変性アルブミン受容体を介した経内皮細胞輸送および腫瘍移行メカニズムが存在することが明らかとなった。この Abraxane[®] HSA が変性アルブミン受容体によって認識されるようになった原因として、Abraxane[®]の製造過程における PTX 添加時の溶媒処理によって偶発的に引き起こされた HSA の構造変化によるものと推察された。

第3章 変性アルブミンを基盤とする新規アルブミンキャリアの有用性評価

第2章で明らかとなった Abraxane[®] HSA の新規取り込み機構や構造変化の知見から、変性アルブミンを基盤とする新規アルブミンキャリアの作製を行った。予備検討の結果から、PTX の溶解に用いられる有機溶媒がタンパク質の立体構造を変性させる因子の一つであったことから、有機溶媒等による構造変化の影響について検討した。その結果、変性剤による2次構造および3次構造の変化が変性アルブミン受容体への認識性を高める可能性が示唆された。また、代表的なタンパク質変性法である加熱によっても HSA の立体構造が変化し、細胞内取り込み経路に影響を与えることも示唆された。SUIT-2 ヒト膵臓がん細胞および HUVEC を用いた検討において、Abraxane[®] HSA と比較して酸処理 HSA および熱処理 HSA は高い細胞取り込み能を有していた。加えて、酸処理 HSA においては SUIT-2 同所移植モデルマウスを用いた体内動態解析の結果、Normal HSA よりも高い腫瘍移行性を示した。一方で、薬理効果の検討から、PTX 結合型酸処理 HSA は Abraxane[®]と同等の抗腫瘍効果を有していた。以上の結果から、変性アルブミンは新しいアルブミンキャリアとして機能する可能性が示唆された。

以上のように、本研究では Abraxane[®]の腫瘍移行メカニズムの解明を行い、Abraxane[®]は変性アルブミン受容体を介した腫瘍移行メカニズムが存在することや、これは HSA の構造特性の変化に起因していることを突き止めた。また、Abraxane[®]の腫瘍移行メカニズムの知見を踏まえ、変性アルブミンを利用した DDS 戦略の可能性を見出した。今回得られた知見は、変性アルブミンを物理化学的特性および動態学的特性の観点から腫瘍特異的 DDS キャリアとして最適化を行い、それらに基づいた難治性がんである膵臓がんに対する治療戦略を展開した初めての成果であり、これらの知見は今後のアルブミン受容体を介した HSA キャリアを開発する上で有用な基礎資料になるものと思われる。

謝辞

本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学系)薬物動態制御学分野 石田竜弘 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに際し、終始有益なる御指導と御便宜を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学系)薬物動態制御学分野 異島優 准教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査に際し、有益なる御助言と御校閲を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学系)衛生薬学分野 小暮健太郎 教授並びに同学部創薬理論化学分野 立川 正憲 教授に心から感謝致します。

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学系)薬物動態制御学分野で行われたものであり、御協力、そして数々の有益なる御助言、御指導を頂きました清水太郎 特任助教、安藤英紀 特任助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに際し、終始御指導、御助言頂きました、今福(池田)真由美 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに際し、多大なる御協力を頂きました、木下遼 博士、田坂菜々美 修士、島崎優奈 学士、高田春風 学士、田神舞帆 学士、松尾菜々 学士、長船裕輝 学士、金山忠史 学士、川口桂乃 学士、酒井真紀 学士、佐々井雅樹 学士、平川尚樹 学士、宮原康嘉 学士、井上改 学士、上田大 学士、小川真依 学士、福田悠花 学士、丸山敦也 学士、赤木俊介 氏、坂元智香 氏に深く心より御礼申し上げます。

実験に伴う諸々の些事に及んで御協力して頂きました、倉本伶音 氏、角南尚哉 氏、中野琉人 氏、橋本怜奈 氏、松木佑樹 氏、向井愛菜 氏、山口雪洲 氏、上原陸 氏、高田正希 氏、橋本愛子 氏、松崎隆朗 氏、山出莉奈 氏、山本舜人 氏、阿部舜史 氏、十鳥有希菜 氏、平井傑琉 氏、水町健太 氏、山本遥香 氏に心より御礼申し上げます。

最後に、これまで私を支えてくれた母と祖母、ともに励まし合った友人たちに心から感謝いたします。

令和4年3月

濱 真壱

参考文献

1. Weaver, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **25**, 2677–2681 (2014).
2. Zhu, L. & Chen, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **24**, 1–11 (2019).
3. Szebeni, J., Muggia, F. M. & Alving, C. R. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: An in vitro study. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 300–306 (1998).
4. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. & Sparreboom, A. Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* **37**, 1590–1598 (2001).
5. Szebeni, J. *et al.* Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: Possible role in hypersensitivity reactions. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 721–735 (2001).
6. Gradishar, W. J. *et al.* Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7794–7803 (2005).
7. Sparreboom, A. *et al.* Cremophor EL-mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications. *Cancer Res.* **59**, 1454–1457 (1999).
8. Sparreboom, A., Van Teelingen, O., Nooijen, W. J. & Beijnen, J. H. Nonlinear pharmacokinetics of paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle cremophor EL. *Cancer Res.* **56**, 2112–2115 (1996).
9. Hahn, S. M. *et al.* Taxol in combination with doxorubicin or etoposide possible antagonism in vitro. *Cancer* **72**, 2705–2711 (1993).
10. Gianni, L. *et al.* Human pharmacokinetic characterization and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1906–1915 (1997).
11. Huang, S. T. *et al.* Liposomal paclitaxel induces fewer hematopoietic and cardiovascular complications than bioequivalent doses of Taxol. *Int. J. Oncol.* **53**, 1105–1117 (2018).
12. Meng, Z. *et al.* Prodrug strategies for paclitaxel. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
13. Ishima, Y. *et al.* One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **23**, 121–127 (2010).

14. Kinoshita, R. *et al.* The therapeutic effect of human serum albumin dimer-doxorubicin complex against human pancreatic tumors. *Pharmaceutics* **13**, 1–12 (2021).
15. Ishima, Y. *et al.* Effects of endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 790–795 (2007).
16. Ishima, Y. *et al.* S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 34966–34975 (2008).
17. Kinoshita, R. *et al.* Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer. *Biomaterials* **140**, 162–169 (2017).
18. Kobayashi, K. & Nakamura, N. the Development. *Hybridoma* **5**, 57–90 (1986).
19. Fanciullino, R., Ciccolini, J. & Milano, G. Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: A focus on nano-albumin-bound drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 504–513 (2013).
20. Ma, P. & Mumper, R. J. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. *J. Nanomedicine Nanotechnol.* **4**, 6 (2013).
21. Yardley, D. A. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J. Control. Release* **170**, 365–372 (2013).
22. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Release* **132**, 171–183 (2008).
23. Elsadek, B. & Kratz, F. Impact of albumin on drug delivery - New applications on the horizon. *J. Control. Release* **157**, 4–28 (2012).
24. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
25. Kratz, F. & Beyer, U. Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: A review. *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents* **5**, 281–299 (1998).
26. Neumann, E. *et al.* Native albumin for targeted drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 915–925 (2010).
27. Stehle, G. *et al.* Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself - Implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **26**, 77–100 (1997).
28. Zhao, P., Wang, Y., Wu, A., Rao, Y. & Huang, Y. Roles of Albumin-Binding Proteins in Cancer Progression and Biomimetic Targeted Drug Delivery. *ChemBioChem* **19**, 1796–

- 1805 (2018).
29. Vaz, J., Ansari, D., Sasor, A. & Andersson, R. SPARC: A potential prognostic and therapeutic target in pancreatic cancer. *Pancreas* **44**, 1024–1035 (2015).
 30. Komiya, K. *et al.* SPARC is a possible predictive marker for albumin-bound paclitaxel in non-small-cell lung cancer. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 6663–6668 (2016).
 31. Ishima, Y., Maruyama, T., Otagiri, M. & Ishida, T. Drug delivery system for refractory cancer therapy via an endogenous albumin transport system. *Chem. Pharm. Bull.* **68**, 583–588 (2020).
 32. Desai, N., Trieu, V., Damascelli, B. & Soon-Shiong, P. SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Transl. Oncol.* **2**, 59–64 (2009).
 33. Trynda-Lemiesz, L. Paclitaxel-HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. *Bioorganic Med. Chem.* **12**, 3269–3275 (2004).
 34. Trynda-Lemiesz, L. & Łuczowski, M. Human serum albumin: Spectroscopic studies of the paclitaxel binding and proximity relationships with cisplatin and adriamycin. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1851–1856 (2004).
 35. Bellahcene, A. & Castronovo, V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* **146**, 95–100 (1995).
 36. Zhang, Y. *et al.* Endogenous albumin-mediated delivery of redox-responsive paclitaxel-loaded micelles for targeted cancer therapy. *Biomaterials* **183**, 243–257 (2018).
 37. Merlot, A. M., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Front. Physiol.* **5** AUG, 1–7 (2014).
 38. Baba, K. Pharmaceutical properties of Abraxane and highlight of its clinical study. *Drug Deliv. Syst.* **28**, 180–188 (2013).
 39. Saif, M. W. U.S. food and drug administration approves paclitaxel protein-bound particles (Abraxane®) in combination with gemcitabine as first-line treatment of patients with metastatic pancreatic cancer. *J. Pancreas* **14**, 686–688 (2013).
 40. Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* **4**, 99–105 (2009).
 41. Micha, J. P., Goldstein, B. H., Birk, C. L., Rettenmaier, M. A. & Brown, J. V. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: The absence of hypersensitivity reactions. *Gynecol. Oncol.* **100**, 437–438 (2006).

42. Rudnik-Jansen, I. & Howard, K. A. FcRn expression in cancer: Mechanistic basis and therapeutic opportunities. *J. Control. Release* **337**, 248–257 (2021).
43. Chaudhury, C., Brooks, C. L., Carter, D. C., Robinson, J. M. & Anderson, C. L. Albumin binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* **45**, 4983–4990 (2006).
44. Schnitzer, J. E., Sung, A., Horvat, R. & Bravo, J. Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. *J. Biol. Chem.* **267**, 24544–24553 (1992).
45. Schnitzer, J. E. & Oh, P. Albondin-mediated Capillary Permeability to Albumin. *J. Biol. Chem.* **269**, 6072–6082 (1994).
46. Schnitzer, J. E. & Bravo, J. High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 7562–7570 (1993).
47. Gui, S., Verrohst, P. J., Moestrup, S. K. & Christensen, E. I. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.* **271**, (1996).
48. Fritzsche, T. *et al.* Isolation and identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) from purified plasma membranes of human tumour cell lines as albumin-binding proteins. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 655–665 (2004).
49. Amsellem, S. *et al.* Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1859–1867 (2010).
50. Baines, R. J. *et al.* CD36 mediates proximal tubular binding and uptake of albumin and is upregulated in proteinuric nephropathies. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **303**, 1006–1014 (2012).
51. Jin, C. *et al.* Floxuridine Homomeric Oligonucleotides “Hitchhike” with Albumin In Situ for Cancer Chemotherapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 8994–8997 (2018).
52. Mayr, J. *et al.* An albumin-based tumor-targeted oxaliplatin prodrug with distinctly improved anticancer activity in vivo. *Chem. Sci.* **8**, 2241–2250 (2017).
53. Li, C. *et al.* Direct comparison of two albumin-based paclitaxel-loaded nanoparticle formulations: Is the crosslinked version more advantageous? *Int. J. Pharm.* **468**, 15–25 (2014).
54. Naeem, A. & Amani, S. Deciphering Structural Intermediates and Genotoxic Fibrillar Aggregates of Albumins: A Molecular Mechanism Underlying for Degenerative Diseases.

- PLoS One* **8**, (2013).
55. Kato, Y. *et al.* Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 24–31 (2005).
 56. Barreca, D., Laganà, G., Bruno, G., Magazù, S. & Bellocco, E. Diosmin binding to human serum albumin and its preventive action against degradation due to oxidative injuries. *Biochimie* **95**, 2042–2049 (2013).
 57. John, T. A., Vogel, S. M., Tirupathi, C., Malik, A. B. & Minshall, R. D. Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, 187–196 (2003).
 58. Desai, N. *et al.* Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1317–1324 (2006).
 59. Bito, R. *et al.* Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **289**, 531–542 (2005).
 60. Kim, H. *et al.* SPARC-independent delivery of nab-paclitaxel without depleting tumor stroma in patient-derived pancreatic Cancer xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 680–688 (2016).
 61. Bito, R., Shikano, T. & Kawabata, H. Isolation and characterization of denatured serum albumin from rats with endotoxemia. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1646**, 100–111 (2003).
 62. Fleischer, C. C. & Payne, C. K. Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2651–2659 (2014).
 63. Vivian, J. T. & Callis, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109 (2001).
 64. Petrônio, M. Oxidation of Bovine Albumin by Hypochlorous and Hypobromous Acids: Structural and Functional Alterations. *Br. J. Pharm. Res.* **3**, 147–160 (2013).
 65. Khan, M. W. A., Rasheed, Z., Khan, W. A. & Ali, R. Biochemical, biophysical, and thermodynamic analysis of in vitro glycated human serum albumin. *Biochem.* **72**, 146–152 (2007).
 66. Iwao, Y. *et al.* CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, (2008).
 67. Yumoto, R. *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, 946–955

- (2006).
68. Lee, J. E. *et al.* Self-assembled pegylated albumin nanoparticles (Span) as a platform for cancer chemotherapy and imaging. *Drug Deliv.* **25**, 1570–1578 (2018).
 69. Sleep, D., Cameron, J. & Evans, L. R. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5526–5534 (2013).
 70. Beljaars, L. *et al.* Characteristics of the hepatic stellate cell-selective carrier mannose 6-phosphate modified albumin (M6P28-HSA). *Liver* **21**, 320–328 (2001).
 71. Katayama, N. *et al.* Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **22**, 259–265 (2010).
 72. Cranmer, L. D. Spotlight on doxorubicin (INNO-206) and its potential in the treatment of soft tissue sarcomas: Evidence to date. *Onco. Targets. Ther.* **12**, 2047–2062 (2019).
 73. Qi, W. W. *et al.* Doxorubicin-Loaded Glycyrrhetic Acid Modified Recombinant Human Serum Albumin Nanoparticles for Targeting Liver Tumor Chemotherapy. *Mol. Pharm.* **12**, 675–683 (2015).
 74. Byeon, H. J. *et al.* Doxorubicin-loaded nanoparticles consisted of cationic- and mannose-modified-albumins for dual-targeting in brain tumors. *J. Control. Release* **225**, 301–313 (2016).
 75. Neil P. D. Nanoparticle Compositions of Albumin and Paclitaxel US 2014/0186447 A1 Patent Application Publication. 2014-07-03
 76. Kuwahara, Y., Zhang, A., Soma, H. & Tsuda, A. Photochemical molecular storage of Cl₂, HCl, and COCl₂: Synthesis of organochlorine compounds, salts, ureas, and polycarbonate with photodecomposed chloroform. *Org. Lett.* **14**, 3376–3379 (2012).
 77. Rieko Yachi, 1, 5 *et al.* Effects of tocotrienol on tumor necrosis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **52**, 146–153 (2013).
 78. Moriyama, Y. & Takeda, K. Secondary structural changes of intact and disulfide bridges-cleaved human serum albumins in thermal denaturation up to 130°C – Additive effects of sodium dodecyl sulfate on the changes. *J. Oleo Sci.* **66**, 521–529 (2017).
 79. Usoltsev, D., Sitnikova, V., Kajava, A. & Uspenskaya, M. Systematic FTIR spectroscopy study of the secondary structure changes in human serum albumin under various denaturation conditions. *Biomolecules* **9**, 1–17 (2019).