

氏 名（本 籍）	一 色 信 行	（東京都）
学 位 の 種 類	博士(薬学)	
学 位 記 番 号	乙 第144号	
学位授与年月日	平成17年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	新規マイトマイシンC-エストラジオール結合体の抗癌特性	
論 文 審 査 委 員	主 査	教 授 町 田 良 治
	副 査	教 授 高 山 幸 三
	副 査	教 授 杉 山 清

論文内容の要旨

能動的ターゲティングの方法のひとつとして薬物・ホルモン結合体を用いる方法が知られている。薬物・ホルモン結合体は癌に存在するホルモンレセプターへの能動的ターゲティングを目指したものである。代表的な例として、ホーミングリガンドとしてステロイドホルモンを用い、抗癌剤を選択的に作用させようとする試みがある。薬物・ステロイドホルモン結合体はステロイドホルモンレセプターを持たない多くの固形癌に対しても高い親和性を示すことが知られており、親化合物である抗癌剤と比較して副作用を低減する例も知られている。

本研究では親化合物の抗癌剤として、強力な抗癌作用を示すことで知られているマイトマイシンC（MMC）を用い、安息香酸エストラジオール（EB）及びエストラジオール（E₂）の誘導体である安息香酸エストラジオール・グルタル酸・マイトマイシンC結合体（EB-glu-MMC）及びエストラジオール・グルタル酸・マイトマイシンC結合体（E-glu-MMC）合成し、その新規抗癌薬としての薬物特性を評価した。

EB-glu-MMC及びE-glu-MMCは次のように合成した。EBと無水グルタル酸を反応させ、EBの17β位にグルタル酸をエステル結合させたEB-gluを合成した。次に得られたEB-gluにカルボニルジイミダゾール（CDI）を加えTHF中でEB-gluを活性化し、さらにMMCを添加することにより、EB-gluのカルボキシル基にMMCの1a-NH位を縮合したEB-glu-MMCを合成した。またE-glu-MMCについては、まずEB-gluの3位に結合したベンジル基を加水分解

することにより E-glu を合成し、次いで MMC を結合させ E-glu のカルボキシル基に MMC の 1a-NH 位を縮合することにより合成した。

合成した両結合体のプロドラッグとしての特性を評価する目的で、緩衝液中での分解及び MMC の生成速度を調べた。両結合体は難水溶性であるため、安定性試験は EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC を緩衝液とプロピレングリコール (PG) の混液 (1:1, v/v%) に溶解し、37℃にて行った。EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC は擬一次速度式にしたがって分解し、主生成物は MMC であった。強酸性域では両結合体及び MMC の分解が速やかに起こり、強塩基性域では両結合体からの MMC の放出及び EB-glu-MMC から E-glu-MMC への変換が速やかに起こった。両結合体ともに弱酸から中性付近では非常に安定であった。両結合体からの MMC の放出速度はほぼ同じであった。さらに生体成分を添加した緩衝液中での両結合体の安定性及び MMC の放出特性を評価した。10%(v/v) ラット血漿及び 5%(w/v) ラット肝ホモジネートを添加したリン酸緩衝液中、37℃で両結合体をインキュベートした。EB-glu-MMC は 10% 血漿添加液中で E-glu-MMC に徐々に変換され、血漿中のエステラーゼにより 3 位のベンジル基が酵素的に加水分解されたと考えられた。また、10% 血漿添加液中においても EB-glu-MMC 及び E-glu-MMC からの MMC の放出が確認された。この MMC の放出は非常に緩やかであり、緩衝液中での結果と比較すると、主に非酵素的な反応により MMC が放出されていると考えられた。EB-glu-MMC は 5% 肝ホモジネート添加液中で速やかに E-glu-MMC に変換された。5% 肝ホモジネート添加液中においても E-glu-MMC からの MMC の放出が確認されたが、その放出速度は非常に緩やかであり、非酵素的な反応によって MMC を放出していると考えられた。以上より、EB-glu-MMC から E-glu-MMC への変換速度は組織によって違うが、両結合体は生体内でも MMC を直接放出し、MMC のプロドラッグとして機能することが示された。

各結合体のレセプター指向性の基礎的検討を目的として、両結合体のエストロゲンレセプター (ER) への結合能を DCC 法によって求めた。各化合物の結合能は、E₂ の ER への結合を 50% 阻害する薬物濃度を求め、E₂ の阻害濃度に対する相対結合能として評価した。E-glu-MMC は E₂ に対して 0.81% の相対結合能を示したが、EB-glu-MMC、MMC は結合能を示さなかった。つまり E-glu-MMC はエストロゲンレセプターへある程度の親和性を有するホルモン・薬物結合体と考えられた。EB-glu-MMC も生体内では E-glu-MMC に変換され

ることが予測されるため、両結合体は ER 陽性の癌細胞に対してレセプター介在性の標的指向性を有する可能性が示唆された。

次に *in vivo* 特性評価に重要な薬物動態特性を調べた。さらに、両結合体は難水溶性であるため、投与形態によって作用に違いが現れることが予想された。そこで両結合体を PG で溶解した溶液製剤及び10%PG含有生理食塩水溶液に懸濁した懸濁液製剤について *in vivo* での薬効、毒性について検討を行った。

薬物動態特性は、両結合体の溶液製剤を正常ラットに腹腔内投与した後の血漿中薬物濃度推移を調べることにより行った。EB-glu-MMC投与後、EB-glu-MMCは非常に小さなAUC，MRT，VRTを示したが、E-glu-MMC及びMMCのAUCはEB-glu-MMCのAUCと比較してそれぞれ10倍及び30倍以上大きかった。EB-glu-MMCは生体内で効率よくMMCに変換され、さらに長時間MMCを放出することが確認された。E-glu-MMC投与後、E-glu-MMCは高いCmaxと速いTmaxを示し、MMCは7時間後まで血漿中に確認された。E-glu-MMCもまた生体内で効率よくMMCに変換された。

両結合体の薬効は、一般的な腫瘍であるP388白血病細胞とSarcoma180固形肉腫細胞移植担癌マウスを用いて評価した。P388白血病細胞を腹腔内に移植し、24時間後にMMC，EB-glu-MMC及びE-glu-MMCを単回腹腔内投与した。両結合体は溶液製剤及び懸濁液製剤として投与した。

P388白血病細胞への効果は、腹腔内中の癌細胞に対する腹腔内薬物投与、つまり薬物投与部位と腫瘍部位が同じである投与形態として評価した。

MMCの5mg/kg投与群は最も高い延命率を示したが、10mg/kg投与群では致死的な副作用を示した。一方、E-glu-MMCは溶液製剤投与では10-20mg eq.

MMC/kg投与群においてコントロール群に対して有意な延命効果を示し、懸濁液製剤投与では50-75mg eq. MMC/kg投与群でコントロール群に対して有意な延命効果が認められた。また、EB-glu-MMCは溶液製剤投与では10mg eq.

MMC/kg投与群においてのみ有意な延命効果を示し、懸濁液製剤投与では10-75mg eq. MMC/kg投与群で著明な延命効果は認められなかった。両結合体ともにP388白血病細胞に対する抗癌効果はMMCの効果を上回らなかったが、副作用は低減した。

Sarcoma180固形肉腫細胞を皮下に移植4日後にMMC，EB-glu-MMC及びE-glu-MMCを単回腹腔内投与した。Sarcoma180固形肉腫細胞への効果は皮下移植した癌細胞に対する腹腔内投与、つまり薬物投与部位と腫瘍部位とが離

れている投与形態として評価した。MMC は5mg/kg 投与群において著しい腫瘍増殖抑制を示したが、10mg/kg 投与群では致死的な副作用を示した。

E-glu-MMC は溶液製剤投与では30mg eq. MMC/kg 投与群において MMC の5mg/kg 投与群と同等以上の抗腫瘍効果を示し、体重変化を指標とした副作用も観察されなかった。懸濁液製剤投与では50-75mg eq. MMC/kgで最も高い腫瘍増殖抑制作用を示したが、著しい体重減少を引き起こし75mg eq. MMC/kgでは致死的な副作用が観察された。EB-glu-MMCは溶液製剤投与で E-glu-MMC とほぼ同等の腫瘍増殖抑制効果を示し、投与10日後から腫瘍体積が減少した。懸濁液製剤投与では高投与量で MMC と同等以上の抗腫瘍効果を示し、観察後期において腫瘍増殖をより著しく抑制した。両結合体は MMC のプロドラッグとして機能し、投与部位から離れて存在する Sarcoma180 固形肉腫に対して MMC 以上の効果を示した。

さらに両結合体の副作用について、詳細な検討を行った。両結合体を正常マウス、Sarcoma180 担癌マウスに腹腔内投与し、抗腫瘍効果、体重減少に加え白血球数の推移を観察した。EB-glu-MMC及び E-glu-MMC の 30mg eq. MMC/kg 投与群（溶液製剤）と MMC の5mg/kgを比較した場合、体重変化を指標とした副作用には差が認められなかったが、白血球数を指標とした場合、両結合体の方が MMC より副作用が強いと考えられた。また、懸濁液製剤投与において全処置群を通じて体重の減少は白血球数の減少とほぼ一致した。しかしながら、E-glu-MMC の25mg eq. MMC/kg 投与群では有意な体重減少が観察されなかったが、移植18日後の白血球数は有意に減少していた。白血球数の変化が体重の変化と比較してより高感度な副作用の指標であることが示唆された。副作用を評価した際、腫瘍自体の存在が体重および白血球数の変化に影響することが認められた。しかしながら、体重変化と白血球数の変化から評価した副作用は、担癌マウス群と正常マウス群の間でほぼ同程度に評価することが可能であった。

本研究で検討したマイトマイシンC・エストラジオール結合体は MMC のプロドラッグとして機能し、腹水腫には溶液製剤投与で比較的高い効果を示したが、MMC ほどには効果を示さなかった。一方、固形腫瘍には、腹腔内懸濁液製剤投与において高い効果を示したが、体重減少や白血球減少の副作用が見られた。E-glu-MMC に関しては、in vitro で ER 陽性癌に対して標的指向性を有する可能性が見出された。これらの検討により、マイトマイシンC・エストラジオール結合体の薬物特性が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

癌化学療法において、能動的ターゲティング能を有する薬物や製剤は、副作用の軽減と治療効果の改善上非常に有益である。本論文は、腫瘍選択的ホーミングリガンドとしてエストラジオールを選択し、抗癌剤マイトマイシンC (MMC)を用いて、安息香酸エストラジオール及びエストラジオールとの結合体である安息香酸エストラジオール-グルタル酸-マイトマイシンC (EB-glu-MMC) とエストラジオール-グルタル酸-マイトマイシンC (E-glu-MMC) を新規に合成して、それらの安定性、生体内でのMMC生成特性、ホルモンレセプターへの結合能、in vivo 抗癌活性について検討したものである。

まず各種pHの緩衝液中においてこれらの新規薬物-ホルモン結合体の分解とMMC生成速度を調べた。その結果、両結合体は中性付近の条件では非常に安定であることを確認した。また、血漿および肝ホモジネート添加液中での安定性を検討したが、EB-glu-MMCは比較的速やかにE-glu-MMCへと変換されるが、E-glu-MMCは生体成分中での酵素的加水分解に対し比較的安定で、体内で徐々にMMCを生成することが示唆され、結果として両結合体がプロドラッグとして機能しうることを確認した。

幼若ラットの子宮から得たサイトゾール画分中のエストロゲンレセプターに対する両結合体の結合能を測定したところ、EB-glu-MMCはエストラジオールの3位および17,位が置換されているため、レセプターへの親和性が失われているが、E-glu-MMCはエストラジオールの0.81%に相当する親和性を有することを認め、エストロゲンレセプターに対する特異的な結合能を有する化合物であることを解明した。

EB-glu-MMCをプロピレングリコール (PG) に溶解してラットに腹腔内投与したところ、EB-glu-MMCは初期において血漿中にわずかに検出されたが、E-glu-MMCは長時間にわたって血漿中に観察された。E-glu-MMCを投与した際にも同様の現象が確認されたが、血中滞留性はEB-glu-MMC投与時に比較して低いことが確認された。マウスに移植したP388白血病細胞に対する抗癌効果を検討したところ、E-glu-MMCはEB-glu-MMCより高い延命効果を示したもののMMCを上回る効果は得られなかった。一方、Sarcoma180に対しては両結合体ともに良好な効果と、体重減少を指標とする副作用の軽減を示した。また、結合体を10%PG含有生理食塩液に懸濁して腹腔内投与して検討したところ、P388白血病細胞に対してはMMCとE-glu-MMCのみが延命効果を示したが、Sarcoma180

に対しては高投与量で両結合体ともにMMCと同等以上の腫瘍増殖抑制効果を示した。

この結果を受けて、両結合体の副作用をさらに詳細に検討した。両結合体の30mg eq.MMC/kgを溶液製剤としてSarcoma180担癌マウスに腹腔内投与した場合、MMCの5mg/kgと比較して、体重減少では同等だったが、白血球数の変化では両結合体の方が強い副作用を示すことが示唆され、白血球数の変化が体重減少よりも鋭敏な副作用の指標であることを明らかにした。全体としては、正常マウス、担癌マウスのいずれも、体重減少、白血球減少では、類似した結果を示した。また、EB-glu-MMCやE-glu-MMCは、リンパ系組織への移行性が高いことを見出し、このことが両結合体の白血球減少作用に関与している可能性を推察している。

これらの研究から、両結合体がMMCのプロドラッグとして十分に機能し、E-glu-MMCはin vitroでエストロゲンレセプター陽性癌への指向性を有することが確認され、癌化学療法の最適化につながる有意義な知見を与えることとなった。

以上より、本論文は博士（薬学）の学位を授与するに十分値するものと判断した。