

論文要旨

組織選択的な活性酸素生成メカニズムに基づく、新たな抗腫瘍薬および抗菌薬の開発に関する基礎的研究

崇城大学薬学部生命薬学講座 中村 秀明

活性酸素はその高い反応性のため、無秩序な産生により癌や動脈硬化など種々の疾患を引き起こすが、活性酸素の発生場所および量をコントロールすることにより、癌治療や感染菌の排除を行うことが可能である。そこで、本研究では、疾病組織特異的に活性酸素の生成を促し、がん治療または感染菌の排除を目的とした、新規抗腫瘍薬および抗菌薬の開発に関する基礎的研究を行った。

まず初めに、癌組織選択的に活性酸素を生成する抗腫瘍薬に関する検討を行った。亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) は、抗酸化酵素であるヘム酸化酵素 (HO-1) を阻害し、さらに光照射により一重項酸素を生成する性質を持つため、細胞に強い酸化ストレスを与える新たな抗がん剤として期待される。しかし、難水溶性かつ腫瘍集積性がないため、臨床への応用は困難であった。そこで我々は、種々の高分子 ZnPP ミセルを作製し、その性質を検討することで、高い腫瘍集積性と高い細胞内取り込み性を合わせ持つ、高分子 ZnPP ミセル薬剤の開発を目指した。これまでに我々はスチレンマレイン酸 (SMA) コポリマー、ポリエチレングリコール (PEG) を用い、高い水溶性を持つ SMA-ZnPP および PEG-ZnPP ミセルを作製してきた。PEG-ZnPP は高い腫瘍集積性を示すが、SMA-ZnPP は腫瘍集積性を示さないことを明らかにしてきている。そこで、SMA-ZnPP および PEG-ZnPP の性質をより詳細に検討するために、本論文では SMA-ZnPP と PEG-ZnPP の細胞内取り込み、および細胞内挙動に関する検討を行った。SMA-ZnPP では高い細胞内取り込みと、高い細胞障害性が見られたが、PEG-ZnPP の細胞内取り込みは低く、その細胞障害性も低かった。さらに、SMA-ZnPP は細胞内に取り込まれた後に、細胞膜成分によりミセル構造が壊され、薬効本体である ZnPP を放出していることが明らかとなり、SMA-ZnPP は細胞内で効率的に HO-1 を阻害していることが示唆された。次に、高分子ポリマーであるヒドロキシプロピルメタアクリルアミド (HPMA) ポリマーを用い、HPMA-ZnPP を作製し、腫瘍集積性および細胞内取り込みに関する検討を行った。HPMA-ZnPP の腫瘍集積性は非常に高く、正常組織に対して 10 倍ほどの集積が見られたが、細胞内取り込みが低く、HPMA-ZnPP 単独では全く抗腫瘍効果を示すことができなかった。しかし、HPMA-ZnPP は光線力学的療法に応用可能であり、光照射により有意に腫瘍の増殖を抑制することができた。面白いことに、HPMA-ZnPP の光照射による抗腫瘍効果は細胞内取り込みに依存しており、細胞内取り込みの改善を行うことで、より高い抗腫瘍効果が期待できると思われる。これらの結果より、SMA-ZnPP、PEG-ZnPP、HPMA-ZnPP とも、それぞれ利点と欠点があり、これらを解決することにより、高い抗腫瘍効果を持つ薬剤の開発に繋がると期待される。

ついで、感染症の治療を目的とし、D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) を用いた抗菌薬に関して検討を行った。DAO は D-アミノ酸を基質として、過酸化水素 (H_2O_2) を産生する酵素である。D-アミノ酸は菌体特有の成分であり、通常、生体内において積極的な合成はなされない。そのため、DAO による H_2O_2 の産生は、 H_2O_2 は抗菌作用が高い活性酸素種であるため、DAO は H_2O_2 を産生することで、抗菌作用を発揮することが期待される。黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を検討したところ、DAO および D-アミノ酸 (特に D-アラニン、D-プロリン) 処理により、黄色ブドウ球菌の増殖は著しく低下した (静菌作用)。さらに、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を加えることにより、DAO+D-アミノ酸による殺菌作用は顕著に増加した。D-アミノ酸の代わりに菌体抽出物を用いても、有意な殺菌作用が見られたことから、菌体自身が DAO の基質となり、殺菌成分を出しうる可能性が示唆された。In vivo の実験系において、DAO の活性が高い DAO(+ / +) マウスと、DAO 活性の低い DAO(- / -) マウスを用い、黄色ブドウ球菌に対する感染性を比較したところ、DAO(+ / +) マウスでは、有意に感染菌数の減少がみとめられ、生存率の延長が見られた。これらの結果より、DAO は生体内において、単独もしくは MPO と協奏的に働き、感染菌に対して静菌および殺菌作用を発揮している可能性が示唆された。

慢性肉芽腫は、NADPH 酸化酵素の機能欠損により、好中球内 H_2O_2 の産生不全が原因で、好中球の殺菌能が低下し、易感染性を示す遺伝性の疾患である。そこで、我々は DAO を用いて慢性肉芽腫好中球に H_2O_2 を供給し、好中球の殺菌能を回復させる戦略を思い立った。DAO 自身は病巣指向性がないため、本研究では enhanced permeability and retention (EPR) 効果による炎症組織指向性を持つ、ポリエチレングリコール結合型 DAO (PEG-DAO) を H_2O_2 供給酵素として用い、in vitro の評価を行った。PEG-DAO は DAO と同程度の酵素活性を持ち、黄色ブドウ球菌に対して静菌作用を示した。NADPH 酸化酵素阻害剤処理 (H_2O_2 の産生低下) により、黄色ブドウ球菌に対するマウス好中球の殺菌能は減弱したが、PEG-DAO+D-アラニンを処理することにより、 H_2O_2 が供給され、マウス好中球の殺菌能は正常レベルにまで回復した。さらに、PEG-DAO+D-アラニン処理による殺菌能の増強作用は、好中球内 MPO を介していることが確認された。慢性肉芽腫症患者由来の好中球を用いた実験系においても、PEG-DAO+D-アラニン処理により、好中球殺菌能の回復を認めた。以上のことから、感染部位に PEG-DAO を集積させることができれば、細菌感染部位に H_2O_2 を供給でき、好中球の殺菌能を回復させ、慢性肉芽腫症に対する治療ができることが示唆された。

以上、本研究において、ZnPP を適切な高分子ミセルとすることで、高い腫瘍集積性と高い細胞内取り込みを付与できる可能性が示され、腫瘍特異的な活性酸素生成を促す、がん治療薬の開発につながる可能性が示唆された。ついで、DAO は H_2O_2 を産生し、感染防御に関与すること、また、PEG-DAO が H_2O_2 を供給することで、慢性肉芽腫の治療に応用できる可能性が示唆された。これらの知見は、活性酸素の生成場所を適切にコントロールすることにより、がん治療および感染症の治療に有用であることを示唆している。