



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of anticancer nanomedicine targeting Neuraminidase-1
Author(s)	村上, 賢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16598号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16598
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98208
Type	doctoral thesis
File Information	Ken_Murakami_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 村上 賢

学位論文題名

Development of anticancer nanomedicine targeting Neuraminidase-1
(ノイラミニダーゼ-1 をターゲットとした抗がんナノ医薬の開発)

腫瘍に対する標準的な治療法の一つとして、抗がん剤をはじめとする低分子医薬品の投与が広く実施されている。これらの薬剤は静脈内投与後、全身へと非選択的に分布し、疾患部位のみならず非疾患部位においても作用することから、標的腫瘍に対する集積性が低く、治療効果が限定的であると同時に、正常組織への影響による重篤な副作用の発現が大きな問題となっている。したがって、薬剤の標的化と副作用軽減を同時に実現可能な、新たな薬物送達技術の開発が強く求められている。

このような背景のもと、我々は薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) に着目し、その中でも特に、数ナノメートルから数百ナノメートルの粒径を有するナノ粒子を用いたナノ DDS の可能性に注目してきた。ナノ粒子はそのサイズ特性により、生体内での網内系 (RES) によるクリアランスからの回避が可能であり、がん組織に特異的に集積する “Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果” を活用することで、がん細胞への選択的薬物送達を実現し得る。本研究室では、独自に開発した抗接着性ナノ粒子「ナノソーム (Nanosome)」を基盤とし、がんに対する革新的治療技術の構築を試みてきた。ナノソームは、直径約数十ナノメートルの脂質被覆粒子であり、その表面はホスホリルコリンにより修飾されており、血中環境下における高い安定性を示す特徴を有している。さらに、ナノソーム表面に導入したアミノオキシ基を利用し、種々の薬剤や標的分子をオキシム結合によって簡便に担持・提示することが可能である。これにより、目的に応じた柔軟な機能化が可能となる。

これまで、我々の研究室ではリソソーム酵素阻害剤を担持したナノソームを用いた研究を報告している。がん細胞は急速な増殖に伴い、細胞内で大量の UDP-GlcNAc (ウリジン二リン酸 N-アセチルグルコサミン) を必要とし、リソソームにおける複合糖質分解産物を活用している。このリサイクル経路の要となるリソソーム酵素、特に β -ヘキソサミニダーゼや β -ガラクトシダーゼの阻害を狙った。これら阻害剤はジフルオロメチル基を持つことが特徴で、酵素と共有結合を形成することにより酵素活性を阻害することができる。その阻害機構は以下の通りである：(I) 自殺基質が酵素に認識され、糖鎖部分の加水分解が起こり、反応性メチドが生成する。(II) メチドはグリコシダーゼの求核剤 (すなわち Asp または Glu のカルボキシレート) と反応し、グリコシダーゼと遊離したアリール部分との間に共有結合を形成する。このメカニズムにより、不可逆的な酵素阻害が可能となった。HepG2 (肝がん細胞) や MDA-MB-231 (トリプルネガティブ乳がん細胞) への阻害剤担持ナノソームの投与により、リソソーム膜透過 (Lysosomal Membrane Permeabilization: LMP) の亢進が観察され、細胞死が誘導された。抗接着性ナノソームを用いてリソソーム酵素を阻害するという新たな治療法の可能性を示した。

本研究では、がん細胞の分子特異性を活用した標的化 DDS の実現を目的とし、標的分子としてノイラミニダーゼ-1 (Neuraminidase-1: NEU1) に着目した。NEU1 はもともとリソソーム内に存在する糖加水分解酵素として知られてきたが、近年の研究により細胞表面にも発現していることが明らかとなっている。細胞表面の NEU1 は、受容体チロシンキナーゼ (RTK) に結合したシアル酸残基を加水分解することで、RTK の立体障害を除去し、受容体のリガンド依存的な二量体化を促進する機能を有することが報告されている。この機構は、がん細胞における受容体活性化やシグナル伝達の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。NEU1 を標的とする阻害剤を担持したナノソームが、ヒト肝がん、肺がん、大腸がんの各細胞株に対して、細胞表面の NEU1 を介したエンドサイトーシスによって特異的に取り込まれ、さらにリソソーム内で内在性 NEU1 と凝集す

ることで、LMPを引き起こし、細胞死を誘導することが期待される。このように、NEU1は細胞表面とリソソーム内の双方に存在し、二重の治療標的としての特性を備えている。また、早期発見が困難かつ進行の早い膵臓がんを対象疾患とし、NEU1が膵がん細胞においても高発現していることを確認した上で、NEU1阻害剤と抗がん剤イリノテカンの活性代謝物であるSN-38をアミノオキシ基により同時提示したナノソームを開発した。これにより、NEU1標的化と細胞毒性の相乗効果を期待した戦略的薬剤送達が可能となる。

本研究の目的は、NEU1を分子標的としたナノソーム型DDSの開発を通じて、膵臓がんをはじめとする難治性がんに対する新たな治療アプローチの可能性を提示するものであり、分子標的治療とナノテクノロジーを融合した次世代抗がん治療の基盤となると期待される。膵臓がんは主として膵管腺がん（PDAC）であり、現在、発症率が急速に上昇している悪性腫瘍かつ、極めて高い致死率を有する。将来的には、がん関連死亡原因として肺がんに次ぐ主要疾患となることが予測されている。PDACの高い致死性は、診断時にすでに遠隔転移を伴う進行期であることが多く、手術による根治が困難である点に起因する。仮に手術が実施されたとしても、術後2年以内に再発するリスクが高く、また原発巣の局所浸潤が明確になる以前から、血中にPDAC細胞やその由来エクソソームが検出されることが報告されており、腫瘍細胞の早期逃避が示唆される。

2章では、まずリソソーム阻害剤5種類を合成した。得られた阻害剤は、ナノソームの表面にアミノオキシ基を介してオキシム結合により提示した。その後、このナノ粒子の抗腫瘍効果を評価すべく、ヒト肝がん細胞（HepG2）、ヒト肺がん細胞（A549）、およびヒト結腸がん細胞（HT-29）を対象に細胞生存率試験を行った。結果として、それぞれのリソソーム阻害剤担持ナノソームはがん細胞に対する抗がん活性が確認できたが、特にシアリダーゼ阻害剤を担持したナノソームは、いずれの細胞株に対しても普遍的で、顕著な増殖抑制効果を示した。さらに蛍光色素を使用した蛍光顕微鏡観察では、ナノソームががん細胞に効率的に取り込まれることが明らかになり、リソソームとの共局在することから、LMPの亢進が示唆された。

3章では、シアリダーゼ阻害剤に加えて難水溶性であり、すでに認可されている抗がん剤、マルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブとSN-38（トポイソメラーゼ阻害剤イリノテカンの活性代謝物）の誘導体をシアリダーゼ阻害剤担持ナノソームに同時に担持させた。ソラフェニブとの複合担持体は、HepG2に対してIC₅₀=8.57 nMという強力な抗腫瘍効果を示した。加えてSN-38誘導体担持ナノソームにおける、PANC-1（ヒト膵臓がん細胞）およびOUS-11（正常肺細胞）を用いて同様の細胞毒性試験を行った。PANC-1におけるIC₅₀値は8.07 nMと極めて高い抗がん活性を示し、正常細胞に対する毒性は抑制されていた。これらの結果は、NEU1シアリダーゼを標的としたナノソームが、がん細胞における細胞表面およびリソソーム内のNEU1を不可逆的に阻害し、リソソーム膜透過（Lysosomal Membrane Permeabilization: LMP）を誘導することにより細胞死を効果的に引き起こすことを示唆する。また、ソラフェニブやSN-38誘導体との同時搭載により、標的治療薬と細胞毒性薬の二重攻撃が実現し、治療効果の増強が期待される。

4章では、PANC-1細胞を皮下に移植したヌードマウスを用いて、ナノソームの抗腫瘍効果を実証する動物実験を行った。皮下における腫瘍体積が100mm³に到達した段階で、生理食塩水、薬剤を担持していないナノソーム、シアリダーゼ阻害剤担持ナノソーム、イリノテカン担持ナノソーム、シアリダーゼ阻害剤とイリノテカン同時担持ナノソームの全5群を尾静脈から投与し比較した。結果としてシアリダーゼ阻害剤担持ナノソームとイリノテカン同時担持ナノソームの2群において、腫瘍の成長は抑制されていた。さらに、ナノソーム投与群において、顕著な体重減少は認められず、明らかな全身毒性は示されなかった。

本研究における一連の知見は、NEU1ががん細胞表面においてRTKやTLRの活性制御に関与していること、さらにリソソーム内では栄養供給酵素として代謝的に重要であることから、NEU1が細胞内外の両面で治療標的として極めて有望であることを裏付ける。総じて、NEU1阻害剤を担持したナノソームは、NEU1を介したエンドサイトーシスによるがん細胞内への選択的取り込みと、その後のLMPによる細胞死誘導により、従来の抗がん剤に比して高い選択性と強力な治療効果を両立させる可能性を有する。NEU1阻害剤と他の抗がん薬との併用は、さらなる抗腫瘍効果の向上に寄与する戦略として期待される。