

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06627

研究課題名(和文)新発見の腫瘍血管動的透過経路の解明と制御によるがん治療への応用

研究課題名(英文) Manipulation of dynamic tumor blood vessel permeability: nano-eruption

研究代表者

井上 雄太 (Inoue, Yuta)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：10802358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が発見した腫瘍血管が一過性に破綻しドラッグデリバリーシステム(DDS)が腫瘍組織に噴出する動的な血管透過性亢進現象(nano-eruption: NE)の機序解明と制御による腫瘍組織深部へDDSを送達を目的に、TGF-阻害薬とクロロキンの併用でNEの変化を検討した。その結果、TGF-阻害薬投与群ではNEの発生回数が増加し持続時間が有意に亢進した。クロロキン群では発生回数に有意な変化は認めなかったが、増大速度と拡散面積の増加が認められ、TGF-阻害薬とは異なる機序でNEによる薬剤送達効果を増大させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nano eruptionは2016年に初めて報告された。この腫瘍血管が一過性に破綻し高分子ナノミセル薬剤が腫瘍組織へ噴出する動的透過経路を利用して新たなドラッグデリバリーシステムを構築できればこれまでにないがん治療の選択肢となりうる。そのためにはNano eruptionの機序解明と制御が必要だが、本研究でNano eruptionの発生変化を明らかにすることはその第一歩となる。また、これまで薬剤併用によるNano eruptionの変化は報告されていないので本研究の論文化は学術的分野からの関心も高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have recently discovered dynamic extravasation through transient tumor vascular bursts. This phenomenon, named as nano-eruption (NE), increases accumulation of larger nanomicelles in tumors. To unveil the mechanisms and ultimately control NE, conditions that either provoke or inhibit NE is under investigation. Tumor-bearing mice were treated with either TGF-inhibitor and chloroquine. The 30- or 70- nm fluorescent-labeled micelles were administered, and their tumor distribution was assessed over time with intravital microscopy. TGF-inhibitor increased the frequency, maximum area & velocity and duration time of NE. Chloroquine did not affect the frequency, but increased the maximum area & velocity and duration time of NE. Our result demonstrated that different modulator drugs enhanced the different aspect of the NE, and the consequences are also dependent on the micelle size.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究チームは高分子ナノミセルを用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発研究を行っている。これまでの概念では、腫瘍血管には細胞間隙やフェネストラなどの透過性の高い静的な孔(static pore)があり、これを介して徐々に高分子物質が血管外へ漏出するとされていた(Enhanced Permeability and Retention effect: EPR 効果)。DDSの生体内動態を詳細に評価するために生体リアルタイム共焦点・多光子レーザー走査型顕微鏡(以下、生体顕微鏡)を構築した。解析を行う中で、腫瘍血管が一過性に破綻しDDSが腫瘍組織に噴出する動的透過経路(dynamic vent)を発見しNano eruption (NE)と命名した(Matsumoto, et al. Nature Nanotech 2016)。NEについてのこれまでの解析では以下のことが判明している。

- (1) 観察期間を通じて時空間的に不規則に発生する。
- (2) 発生頻度は腫瘍細胞からの距離と相関する。
- (3) 蛍光標識した赤血球や血小板はNE発生部位でも血管外へ漏出しない。つまり微小出血では無く血漿成分の一過性の噴出である。
- (4) 腫瘍血管のstatic poreとdynamic ventの2種類の透過経路に大小の粒径(30 nm及び70 nm)の高分子ナノDDSを用いたところ、30nmミセルはstatic poreもdynamic ventも突破したが、70nmミセルはstatic poreを突破できずdynamic ventに依存して血管外へ漏出した。
- (5) 短時間で増大する噴出期(eruption phase)と、その後徐々に広がっていく拡散期(dispersal phase)に分けることができる。
- (6) Eruption phaseでは噴出速度などに有意差は無いため、eruption phaseは腫瘍血管内外の圧力差を駆動力とすることが示唆された。
- (7) Dispersal phaseでは30 nmの高分子ナノDDSは有意に拡散効率が高かった。つまりdispersal phaseは対流(convection)に依存し、腫瘍組織の密度に左右されることが示唆された。

NEはDDSにとっては好都合な薬剤侵入経路ではあるが、血漿成分や他の比較的大きな分子も大量に腫瘍組織に流入することになる。栄養や酸素が豊富に供給され、これが契機となって腫瘍細胞が増殖したり、脈管浸潤を起こしたりする可能性がある。つまりNEを人為的にコントロールすることが出来ればDDS投与中はNEを促進し、休薬期間中はNEを抑制するといった新しいDDS治療戦略の開発に貢献できる。

当研究では過去にTGF- β 阻害薬の併用が粒径の大きなミセルを腫瘍組織深部に到達させ、がんの増殖を抑制することを示している(Kano, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007) (Cabral, et al. Nature Nanotech 2011)。また、抗マラリア薬のクロロキン(CQ)はNotchシグナルを介し腫瘍血管のnormalizationによって腫瘍組織の低酸素状態改善や治療薬の効果を高めることで抗腫瘍効果を示す報告があるが(Maes, et al. Cancer cell 2014)、血管のnormalizationがNEにどのような影響を与えるかは興味深いところである。他にも、血管のnormalizationについては、サリドマイドが血管内皮細胞のPDGF-B発現を上昇させ壁細胞活性化を促進することで血管成熟が誘導されるという報告があり、臨床で遺伝性血管疾患患者の出血症状が減少することが示されている(Lebrin, et al. Nat Med 2010)が、同様の作用が腫瘍血管でも起こるのであればNE抑制に働くことが期待できる。COX-2阻害薬のセレコキシブはVEGF阻害を介して血管新生抑制と腫瘍増殖抑制を示すことは動物実験でも臨床試験でも証明されている(Xu, et al. Sci Transl Med 2014) (Wu, et al. J Control Release 2014)が、これもNEとの関連性が強く疑われる。

2. 研究の目的

本研究は新たに発見された NE という現象を詳細に調べ、そのメカニズムと制御の条件を明らかにし人為的に制御してがん治療に応用することを目的とする。まず高分子ナノ DDS の腫瘍内動態の観察を行い、NE の画像解析による数値化を行い「基礎データ」を蓄積する。その上で、TGF- 阻害剤、クロロキン、セレコキシブ、サリドマイドなどの薬剤を併用し、NE との関連性を評価する。NE 誘発する条件、抑制する条件について比較検討する。最終的に担癌マウスを誘発群と抑制群に分けて腫瘍の増大や転移について比較検討し、病態の進行との因果関係を証明する。

3. 研究の方法

1. 試薬
ナノミセル投与時に併用した TGF- 阻害薬は CalbioChem (San Diego, CA) (LY364947; catalogue no. 616451) から、CQ は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO) から購入した。ナノミセルを標識する Alexa 555-, Alexa647-succinimide esters は Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR) より購入した。
2. 細胞及び動物
ヒト膀胱癌由来細胞である BxPC3 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) に安定的に green fluorescent protein が発現した BxPC3-GFP 細胞を Anticancer 社 (California, San Diego) より入手した。細胞は各細胞培養フラスコに 1.0×10^6 ずつ播き培養液には 10% fetal bovine serum (FBS) 及び RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., Inc.) を用い、37 の加湿された 5% CO₂ を含む大気圧のインキュベーターで培養した。Balb/c nu/nu マウス (female; age, 6-8 weeks) を Charles River Japan 社 (Kanagawa, Japan) より購入して使用した。
3. 腫瘍モデル (TGF- 阻害薬、CQ)
培養した BxPC3-GFP 細胞をマウス背部皮下に局注し、腫瘍サイズが 100 mm³ 以上に成長した後、Dorsal skinfold chamber (DSFC) 装着マウスのカバーガラス下に腫瘍を移植し、2-3 週間後生着したのを確認後顕微鏡下に観察した。
TGF- 阻害薬併用群はナノミセルを投与する 1 時間前に、1mg/kg になるよう希釈調製し腹腔内に投与した。コントロール群は同量の溶媒を同じくナノミセル投与 1 時間前に皮下投与した。CQ 併用群は、ナノミセルを投与する前日まで計 5 日間 100mg/kg/day に調製して 1 日 1 回腹腔内投与した。コントロール群は同量の溶媒のみを同じように投与した。
4. DACHPt/m の組成及び異なるサイズの調整
生体適合性ブロック共重合体であるポリエチレングリコール ポリグルタミン酸 [PEG-b-P(Glu)] と白金錯体制がん剤ダハプラチン (DACHPt) を反応させて白金錯体制がん剤内包ミセル (DACHPt/m) を調製した。このミセルを調製時にグルタミン酸ホモポリマーを添加することでミセルのサイズを制御できるが、今回 30nm と 70nm の DACHPt/m を調整した。調整した DACHPt/m は Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) で測定した。30nm DACHPt/m に Alexa 555- を、70nm DACHPt/m に Alexa647- を標識した。
5. 生体顕微鏡
Nikon A1R スキャンユニットと正立顕微鏡 ECLIPSE Ni-E を組み合わせたシステムを採用している (下図)。電動 XY ステージには小動物を固定する器具を装着し 37 を保持できるよう保温付きパッドを備えている。イソフルラン 1-1.5% を用いることで長時間安定した維持麻酔が可能となり、周辺機器に酸素飽和度と心拍数を測定可能なパルスオキシメーターを揃えている。ナノミセル投与 10 分前から 10 分ごとに観察した画像を記録した。
6. NE の同定及び解析
ImageJ ソフトウェア (NIH) を用い画像を二値化して差解析を行った。こうして半自動的に検出した NE を最後にオリジナルの画像と比較して偽陽性のものを除外した。同定された NE の一つ一つについて、NE の発生回数、最大面積、最大速度、最大 NE の発生時間、NE の持続時間、腫瘍細胞と各 NE の距離、NE 発生部の血管径の項目をそれぞれ測定した。
7. 統計解析法
統計解析は Stat Flex ソフトウェア (Version 6; Artech Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用し、NE の回数、最大噴出面積、最大噴出速度、最大噴出発生時間については F 検定の上 Student's t 検定もしくは Mann-Whitney U 検定で評価した。NE の持続時間、腫瘍細胞と各 NE の距離、NE 発生部の血管径はそれぞれ 2 検定を用いた。p 値が 0.05 未満の差を統計学的に有意なものとして扱った。

4. 研究成果

研究の成果をまとめると、

TGF- 阻害薬併用では 70nm ミセルでは NE の発生回数、最大速度、持続時間が増加したが、30nm ミセルでは発生回数の有意差を認めなかった。30nm と 70nm いずれのミセル投与でも NE の最大面積が亢進した。

CQ 併用は 30nm と 70nm いずれのミセル投与でも NE の総合的な発生回数に影響を与えなかった。CQ 併用で NE の最大面積、最大速度は 30nm と 70nm いずれのミセル投与でも亢進した。持続時間は 70nm ミセル投与で亢進したが、30nm ミセルでは有意差を認めなかった。TGF- 阻害薬併用の 30nm ミセルで NE は腫瘍細胞からより遠方の血管また太い血管での発生増加を認めたが、70 nm ミセルではこれらの有意差を認めなかった。TGF- 阻害薬併用と比較して CQ 併用群は 30nm と 70nm いずれのミセルも太い血管の NE 回数が増加した。同じ薬剤を併用してもナノミセルのサイズにより NE の反応は異なることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yuta Inoue, Elucidation and control of dynamic tumor vessel permeability: nano-eruption, 14th US-Japan Symposium on DDS, 2017 年

Yuta Inoue, Manipulation of dynamic tumor blood vessel permeability: nano-eruption, 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。