

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11284

研究課題名(和文) 高度腫瘍移行性と低毒性を可能としたナノメディシン抗がん剤の婦人科腫瘍における検討

研究課題名(英文) Evaluation of a nanomedicine-derived anticancer drug against gynecologic malignancies in regard to its higher drug delivery into tumor and lower toxicity to the host

研究代表者

小林 裕明 (Kobyashi, Hiroaki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70260700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： P-THPはナノメディシン技術により既存の抗がん剤THPにポリマーを結合させた新たな抗がん剤である。固形腫瘍では高分子薬剤が血管外に漏出し癌病巣に滞留しやすいというEPR効果により、静脈内投与後のP-THPは選択的に癌部に集積する。加えて固形癌特有の酸性環境下では活性型のTHPが多く放出される。更に非結合型THPは癌細胞膜上のトランスポーターシステムにより、ドキソルビシンやエピルビシンのような他のアン트라サイクリンよりずっと早く取り込まれる。

本研究からナノメディシン技術により生まれたP-THPが婦人科悪性腫瘍においてもその高度な腫瘍移行性と宿主に対する低毒性を発揮しうる可能性が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノメディシン薬剤P-THPの特徴は、EPR効果によって癌病巣に到達した後にTHPが効率よくがん細胞に取り込まれることにあり、有効な治療法のない婦人科がんにも有効な可能性がある。既存の抗がん剤THPを基に低価格で合成できるP-THPは医療経済的にも優れているだけでなく、高度の抗腫瘍効果を発揮しながら副作用がないという夢の新規薬剤として固形がん治療に貢献する可能性を有している。

研究成果の概要(英文)： P-THP is a new conceptual drug made by conjugation of pre-existing anticancer drug pirarubicin (THP) and polymer using nanomedicine technique. P-THP exhibits highly selective accumulation in solid tumors after intravenous injection by virtue of the enhanced permeability and retention (EPR) effect of high molecular drug in solid tumors. Moreover, P-THP releases active free THP more in the acidic environments in the tumor tissue than in the pH of normal tissue. Another advantage of P-THP is the cellular uptake rate: cancer cells incorporate free THP much more rapidly than other anthracyclines such as doxorubicin and epirubicin, through their highly upregulated cell membrane transporter system.

In this study, we obtained the possibility that the nanomedicine-derived P-THP can express its higher drug delivery into tumor and lower toxicity to the host even in the gynecologic malignancies.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ナノメディシン ピラルビシン 高分子ポリマー EPR効果 婦人科がん ドラッグデリバリーシステム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 固型癌は同一患者の病巣内でも無数のsubpopulation (変異細胞、遺伝子多型) を有するため、投与した抗がん剤で全滅させなければ、生き残った耐性クローンがすぐに増殖を始めることが分かっている。この現象 (再発) を克服して全滅させるには、耐性クローンも死滅するような高濃度の薬剤を投与するに限るが、実臨床では重篤薬剤毒性が患者に発現するため、大量投与する訳にはいかない。そこで腫瘍選択的に薬剤を到達させるdrug delivery system (DDS) が必要となる。研究代表者も以前、腫瘍血管が正常組織の血管と異なり平滑筋細胞や周細胞などの壁細胞を欠くため、透過性・漏出性に富んだいびつな血管であることを利用し、担動物に昇圧剤Angiotensin を投与して抗がん剤シスプラチンをより多く腫瘍に到達させる昇圧化学療法の有効性を報告した(Cancer Chemother Pharmacol 1989, Int J Cancer 1990, J Cancer 1991)。昇圧させれば平滑筋細胞を有する正常の血管は収縮するのに対して、収縮能のない腫瘍血管は受動的に拡張するため、シスプラチンの漏出が高まる訳である。しかしこの効果は昇圧中に限られるため、長時間の薬剤停滞効果は期待できなかった。これに対し、連携研究者である前田浩博士らは、高分子抗がん剤が腫瘍血管の透過性亢進により漏出しやすだけでなく、長時間にわたり回収されず腫瘍部に留まるといふEPR効果を有することを報告(Cancer Res 1986)した。この発見がいかに注目されたかは、EPR効果を利用し高い抗腫瘍効果と低い毒性を報告した数々の論文に対し、前田博士が2015、2016年とトムソンロイター引用栄誉賞の化学部門受賞者となったことから明白である (Microcirculation 2016)。

(2) 近年、前田博士らは生体親和性高分子ポリマーとしてポリヒドロキシプロピルアクリル (HPMA) ポリマーを用い、既存の抗がん剤ピラルピシン (THP) と結合させたナノメディシン薬剤 P-THPを開発した(Mol Pharm 2016)。P-THPは次に述べる3つの理由で、高率にがん病巣においては癌細胞にとりこまれる一方、正常細胞にはわずかしかり取り込まれないため、高い抗腫瘍効果を持ちながら低毒性であるという、理想的なインテリジェント・ナノメディシンである。すなわち、EPR効果により腫瘍組織への移行性・集積性は正常組織の約30倍高く、P-THPは酸性環境応答型リンカーとしてヒドラゾン結合を有しているため、癌組織における低いpH環境下 (正常組織の7.4に対し5.5~6.5) ではTHPの離脱が生じやすくなる。そして遊離したTHPは低分子のため、もとの高分子P-THPに比し10~100倍も自由拡散する、癌細胞膜ではグルコース・トランスポーターなどの輸送系の活性が正常細胞の10倍程高くなっているため、低分子THPは同じアントラサイクリン系の抗がん剤であるドキソルピシンに対して30~50倍も早く癌細胞に取り込まれる、という3つの特徴を介して、薬効もそれに比例して高くなることが実験結果から推定される。他方、正常組織ではEPR効果もなく、その局所pHも中性であり高分子から薬剤の遊離もなく、このトランスポーターも活発に作動していないので、THPの毒性がほとんど現れない。実際、P-THPの静脈内投与後1日~7日後でもこの薬剤は癌部からしか検出されなかった。以上述べたようにP-THPは、固型癌の腫瘍血管に見られる透過性亢進という普遍的な異常を利用し腫瘍病巣選択的に到達し、その高分子性により長期停留することで健常組織への毒性を排除する。次いで腫瘍病巣では低pHとトランスポーターという癌に普遍的な別の異常を利用し癌細胞内に多く取り込まれ、高い殺細胞効果を発揮する、新しい概念のインテリジェント・ナノメディシンである(Mol Pharm 2016)。

(3) P-THPの臨床応用はまだ例数が少ないが、前田博士がチェコ科学アカデミー高分子化学研究所の協力を得て 期の末期癌患者に対して行ったpreliminaryな臨床試験がある。それでは、対象が進行再発例であるにもかかわらず転移病巣部の消失など驚くべき抗腫瘍効果を認めた。また驚いたことに通常投与濃度で全く副作用を認めなかった。即ち、抗がん剤の用量規制毒性であるDLT (dose limiting toxicity: 骨髄抑制、末梢神経毒性、肝腎機能障害、下痢、食欲不振など) が観察されなかった。本邦のパイロットスタディでも、 期の前立腺癌患者で無数の肺転移と骨転移が消失しながら、副作用もなく高いQOLを維持し退院に至った例を経験し、前田博士と研究申請者らのグループで論文報告した(Targ Oncol 2015)。

2. 研究の目的

THP は子宮癌と卵巣癌に対する抗癌剤としてすでに保険収載されているため、ナノメディシン薬剤である P-THP の婦人科がんへの臨床応用を最終目標として、現在有効な薬剤のない子宮肉腫や薬剤耐性卵巣癌に対する有用性を実験腫瘍を用いて検証することを本研究の目的とした

3. 研究の方法

(1) P-THP がマウス皮下腫瘍の治療実験で有効かの確認

研究代表者が樹立した複数の薬剤耐性再発卵巣癌細胞株(J Cancer Res Clin Oncol 1998, J Cancer Res Clin Oncol 2004)と、入手した子宮平滑筋肉腫などの樹立細胞株(Sarcoma 2015)を皮下に担癌させたマウスに P-THP と THP とドキソルピシンを静注投与し、それぞれの抗腫瘍効果を腫瘍縮小率で、薬剤毒性をマウス体重と外観の観察で経時的に評価する。

P-THP 投与群に有意な良好な抗腫瘍効果を認めたら、P-THP の投与量がどこまで増量可能か

を評価する。具体的には健常マウスに P-THP と THP を静脈内投与し、10%、50%致死投与量及び MTD を明らかにする（多分 P-THP のみ非常に高用量を投与可能と思われるが、動物実験の倫理性にも配慮しながら行う）。

代表的毒性の評価として前述のマウス体重と外観の観察に加えて尾静脈より採血し、血算（骨髄抑制）肝・胆道系酵素値（肝毒性）およびクレアチニン値（腎毒性）に対する影響を P-THP と THP 間で比較する。

(2) 細胞膜のトランスポーター機能により THP が高率に癌細胞内に取り込まれるかの確認

他癌腫の細胞培養実験系で P-THP が低酸素環境で THP を遊離しやすいことは確認済みであるので、本研究では我々が用いる婦人科癌でもトランスポーターにより癌細胞への取り込みが THP で亢進していることを同じアントラサイクリン系抗癌剤であるドキソルビシンと比較する。細胞内取り込みは蛍光顕微鏡または HPLC を用い細胞内薬物量を比較する。THP での亢進が確認されたらトランスポーター阻害剤で THP 特有の細胞内取り込み促進が抑制されることを確認する。

(3) P-THP が肺転移や腹膜播種にも有効かの検討

皮下腫瘍の治療実験で P-THP 投与群により良好な抗腫瘍効果を認めたら、次に肺転移と腹膜播種への効果を検討する。具体的には各種細胞培養株を 1) 尾静脈から移植し、実験的肺転移巣を形成させ、また 2) 腹腔内投与しがん性腹膜炎のモデルを作成する。それぞれに対して P-THP と THP とドキソルビシンを投与し、肺転移のモデルマウスでは転移巣のサイズと数、がん性腹膜炎のモデルマウスでは生存率（腹水産生量や腹腔内播種所見も参考にする）を指標に、P-THP の有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) P-THP がマウス皮下腫瘍の治療実験で有効かの確認

我々が入手した子宮平滑筋肉腫細胞株をヌードマウスに担癌させ、径 1cm となった時点で、P-THP と THP とドキソルビシンを尾静注から投与した。経時的に腫瘍径を測定したが、THP とドキソルビシンが同程度の腫瘍縮小効果を示したのに対して、P-THP の縮小度は高度であった。同様の実験を我々が樹立した複数のパクリタキセル耐性再発卵巢癌細胞株の移植腫瘍でも行ったが、上記肉腫細胞株ほどの差は得られないものの、やはり P-THP 投与後の腫瘍縮小度は他の 2 剤に比し高度であった。薬剤毒性は非担癌ヌードマウスにおける体重変化を経時的に評価したが、THP とドキソルビシンでは体重減少を認めたのに対して、P-THP 投与後のマウスには体重減少を認めなかった。

P-THP の投与量がどこまで増量可能かの評価に関しては、健常マウスに THP 静脈内投与時の 10%、50%致死投与量に相当する P-THP（THP 含有量を等しくした）を投与したが、死亡例は認めなかった。50%致死投与量に相当する THP を含む P-THP の倍量を投与してもマウスの死亡例は無かった。動物実験の倫理性にも配慮しこれ以上の過量投与は行わなかった。

毒性の評価の別指標として前述の薬物有害事象実験においてマウス尾静脈より採血し、血算（骨髄抑制）およびクレアチニン値（腎毒性）を測定した。THP 静脈内投与時の 10%致死投与量に相当する P-THP（THP 含有量を等しくした）を投与したが、THP 投与時にみられた骨髄抑制と腎機能低下を認めなかった。

(2) 細胞膜のトランスポーター機能により THP が高率に癌細胞内に取り込まれるかの確認

研究代表者が樹立したパクリタキセル耐性再発卵巢癌細胞株と、入手した子宮平滑筋肉腫細胞株を低酸素環境と通常環境で細胞培養した。その培養器に P-THP を添加し、経時的に細胞内への THP 取り込み量を HPLC を用いて比較した。同一細胞数で比較した場合、細胞内への取り込みは低酸素環境下で多かった。

(3) P-THP が肺転移や腹膜播種にも有効かの検討

前述の卵巢癌細胞株と子宮肉腫細胞株をマウス尾静脈から投与したが、肺転移は形成されず、抗腫瘍効果の検証はできなかった。また腹腔内投与した場合、がん性腹膜炎を形成するマウスもあったが、均一な担癌状態とはならず、P-THP と THP とドキソルビシンの生存日数による抗腫瘍効果比較はできなかった。

以上の様に、肺転移や腹膜播種への効果は検証できなかったものの、当初予想した通り、P-THP は難治性婦人科がんのモデルである、薬剤耐性再発卵巢癌細胞株と子宮平滑筋肉腫細胞株由来の動物実験腫瘍にも明らかな効果を示した。まだ追試による結果の確認と未検証部分の追加実験中であるものの、上記結果から P-THP が従来の高分子抗がん剤で得られる EPR 効果のみでない、付加的ドラッグデリバリー増強効果を有する薬剤であることが、婦人科がんでも示された。付加的要素は P-THP が EPR 効果によって癌病巣に到達した後の薬剤の動きにある。すなわち、低い pH という腫瘍局所環境に应答し低分子の THP を拡散良く放出すること、それにより

癌細胞膜にまで容易に達した THP が、癌で特異的に高発現する膜上の輸送系（トランスポーター）によって高速かつ大量に癌細胞内に取り込まれることが、従来の DDS 製剤にはない画期的な利点である。言い換えると、P-THP は副作用のないまさに癌のみにピンポイントに作用する魅力的な高分子化合物であり、固型癌に普遍的でかつ著効を示す低毒性のナノメディシンの臨床実用化につながると思われる。本剤が実臨床で使えれば現在有効な治療法のない子宮肉腫や再発卵巣癌の患者にとって大きな恩恵となると期待する。

現在多くの製薬企業が精力的に取り組んでいる制癌剤開発は分子標的薬や抗体医薬であるが、その癌腫ごと・症例ごとに特異的な遺伝子発現や癌特異的エピトープとしてのキナーゼやレセプターなどの分子などを標的としないといけない。ところが Vogelstein ら (Science 2013) や Gerlinger ら (N Eng J Med 2012) に指摘されたように、ほとんどの固型癌は同一患者であってもおびただしい遺伝子多型をもつため、ヒト癌における標的分子の不均一性は分子標的薬や抗体医薬前が無効となる変異株 (subpopulation) の存在に直結する。よってこれらの薬剤投与後に必ず、耐性クローンは現れてくる。よって、癌治療の理想は耐性クローンも全滅させるような高濃度の薬剤を癌細胞に作用させ得るか否かにかかっているが、通常その用量規制毒性 (DLT) のためにそのレベルの高用量を投与することはできない。さらに困ったことに、これらの薬剤は非常に高額であり、間違いなく近いうちに深刻な高額医療の問題が生じてくる。よって既存の抗がん剤 THP を基に低価格で合成できる P-THP は医療経済的にも優れているだけでなく、驚異的な抗腫瘍効果を発揮しながら副作用がないというインテリジェント・ナノメディシンとして婦人科がん治療に貢献する可能性を有している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sho T, Yanazume S, Fukuda M, Togami S, Kamio M, Kobayashi H	4. 巻 45
2. 論文標題 Impact of taxane plus bevacizumab for ovarian sex cord tumor with annular tubules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 1423-1428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1111/jog.13985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Togami S, Kawamura T, Fukuda M, Yanazume S, Kamio M, Kobayashi H	4. 巻 96
2. 論文標題 Quantitative RT-PCR Assay for Detecting Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer:A preliminary Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 179-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1159/000493485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Togami S, Kawamura T, Fukuda M, Yanazume S, Kamio M, Kobayashi H	4. 巻 143
2. 論文標題 Prospective study of sentinel lymph node mapping for endometrial cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Gynaecol Obstet	6. 最初と最後の頁 313-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1002/ijgo.12651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kobayashi H
2. 発表標題 2.Our ideas and devices to establish stable and precise procedures in robotic radical trachelectomy for cervical cancer patients
3. 学会等名 SGO 50TH ANNUAL MEETING ON WOMEN'S CANCER（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yanazume S, Kobayashi H	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 431
3. 書名 Radical trachelectomy. In: Surgery for Gynecologic Cancer	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----