

令和 3 年 9 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15511

研究課題名(和文) 腫瘍微小環境を二重標的化する革新的薬物デリバリー担体の創製と難治性癌治療への応用

研究課題名(英文) Development of innovative drug delivery carrier targeting tumor microenvironment and application for intractable cancer

研究代表者

前田 仁志 (Hitoshi, Maeda)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：80791483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境の主要な細胞群である腫瘍関連マクロファージ(TAM)やがん関連線維芽細胞(CAF)は、がんの増殖や転移、さらには悪性化や薬剤耐性化で重要な役割を果たしていることから、難治性がんに対する新たな治療標的として注目を集めている。しかしながらTAMとCAFの両者を同時に標的可能な薬物送達(DDS)担体の開発には至っていない。興味深いことに、TAMとCAFの細胞表面上には、それぞれマンノース受容体のCD206とCD280が高発現している。本研究では、TAM/CAFの両者を包括的に標的可能なMono-PEG-Man-HSAを開発し、その有用性を担癌モデルを用いて実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、モノクローナル抗体医薬をはじめとする分子標的医薬の台頭によりこれまでの低分子有機化合物を中心とした抗がん剤開発から転換期を迎えている。一方で、抗体の生産コストの問題から医療費の高騰が世界的に問題となっており、抗体を用いず低分子・中分子を腫瘍特異的に作用させる技術が望まれる。本発明で用いる薬剤担体は、低分子・中分子と容易に結合させることが可能であり、腫瘍微小環境に存在するTAM/CAFを標的とすることで腫瘍特異的に効率よく抗癌剤を送達することが可能である。さらに本発明は、全世界で抗がん剤開発を行っている企業に対し提供可能な基盤技術であり、技術開示を進め連携・臨床応用を図っていく計画である。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment including stromal cells forms an abominable tumor-promoting network. Stromal cells are divisible into tumor-associated macrophage (TAM) and cancer-associated fibroblast (CAF), both of which express mannose receptors, CD206 and CD280, respectively. We have developed mannosylated human serum albumin (Man-HSA) that has a potential to deliver therapeutics to cells expressed mannose receptors. However, Man-HSA is not suitable for cancer-targeting carrier due to own hepatic distribution. Herein, we focused on the polyethylene glycol (PEG) and developed cancer stromal-targeting carrier, Mono-PEGylated Man-HSA. Through own PEG and sugar chain, Mono-PEGylated Man-HSA preferentially distributed to tumor tissue and recognized TAM and CAF. These stromal cells and extracellular matrix are remarkably disrupted by complex of Mono-PEGylated Man-HSA with paclitaxel. The current study suggests the potential of Mono-PEGylated Man-HSA for the treatment of intractable cancer.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：がん微小環境 腫瘍間質 マクロファージ 線維芽細胞 アルブミン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

増殖/再発/転移といった難治性癌に対する新たな治療標的として、腫瘍組織の特徴的な間質である腫瘍微小環境が注目されている。これは腫瘍微小環境が癌の増殖、転移、悪性化や薬剤耐性の原因となるためである。事実、分子標的薬を含む近年の抗癌薬の多様化と治療法は大きく進歩したものの、単剤で癌を死滅させることはできない。これは、腫瘍微小環境における癌関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍関連マクロファージ (TAM) などの細胞群を制御する治療戦略が確立していないためである。M2 様マクロファージである TAM は、悪性腫瘍の発生初期から転移巣の形成までの過程、すなわち増殖、浸潤、転移に深く関与し、腫瘍の微小環境を悪性化する治療抵抗性因子として位置付けられている (Komohara T, *Cancer Sci* (2014))。加えて、CAF は増殖能、移動能に優れており、癌細胞の増殖、浸潤、転移過程において重要な役割を果たしているだけでなく、細胞外マトリックスの異常増殖を促進するため、抗癌剤の腫瘍浸透性の減弱に伴う治療抵抗性を惹き起こす (Noh H, *Theranostics*. 2013)。また、癌幹細胞と CAF とのシグナル伝達リンクが癌幹細胞の生存に重要であることも報告されている (Chen WJ, *Nature Commun*. 2014)。興味深いことに、腫瘍微小環境に CD206 高発現 TAM や CD280 高発現 CAF が多く存在する癌組織は、悪性度が高く、治療抵抗性かつ予後不良であることが臨床所見からも実証されている。従って、腫瘍微小環境を制御し、効率良い癌治療を実現するには、TAM/CAF の両者を同時に標的化する革新的な抗癌剤送達システムの開発が不可欠だが、その成否の鍵を握る薬物送達担体は存在しない。

元来、ヒト血清アルブミン (HSA) は単純タンパク質であり、糖鎖を有していないが、申請者は、N-結合糖鎖認識配列を形成するように部位特異的三重変異を導入し、これを酵母で産生することで、酵母に特有の高マンノース糖鎖を含有した HSA (Man-HSA) の作製に初めて成功した (J Control Release. 2010)。MALDI-TOFMS 解析の結果から、この糖鎖構造は 12 個のマンノース残基 (Man(12)GlcNAc2) が連なっていること、また細胞や動物実験から、この Man-HSA が野生型と同様、抗原性や変異原性を示さないことを明らかにしている。興味深いことに、TAM 表面には 1 型マンノース受容体 (CD206) が、他方、CAF 表面には 2 型マンノース受容体 (CD280) が発現している。従って、TAM/CAF に共通した形態学的特徴である“マンノース受容体”の認識素子として Man-HSA を活用すれば、TAM/CAF の両者に対する二重標的化 (dual targeting) が実現できると予想される。しかしながら、Man-HSA は自身が有する高マンノース糖鎖によって、静脈内投与すると肝臓中のマクロファージ (主にクッパー細胞) へ優先的に認識され、血中から速やかに消失してしまうため、抗がん剤担体としては適していない。従って、Man-HSA を鋳型として TAM/CAF を標的とする dual targeting 担体を開発するには、1) 肝臓への移行性を回避しつつ、2) TAM/CAF に発現するマンノース受容体 (CD206/CD280) への認識能を保持する必要がある。この Man-HSA の体内動態における課題を克服する手段として、免疫原性が低い高分子化合物であり、細毛内皮系 (RES) からの回避や、血中濃度の長期持続などを目的として DDS 製剤に汎用されているポリエチレングリコール (PEG) の活用を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍微小環境に存在する CAF および TAM の二重標的化担体を創製し、それを基盤として腫瘍微小環境改善剤、引いては癌-腫瘍微小環境を標的とした次世代型の包括的癌療法の開発と難治性癌治療へ応用することを目的とする。

3. 研究の方法

1) Man-HSA を基盤とした TAM/CAF 二重標的化担体の設計・作製 :

分子サイズが異なる 3 種類の PEG (5 kDa, 20 kDa, 40 kDa) を用い、1 分子のみ部位特異的に Man-HSA へ付加した monoPEG-Man-HSA を作製した。具体的には、還元剤である DTT (750 μ M) を Man-HSA (150 μ M) と 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。インキュベート後すぐにタンパク質と DTT 等の不純物を HiTrap Desalting ゲル濾過カラム (GE ヘルスケア社) にて分離した。DTT 処理後の Man-HSA に、タンパクの 5 倍量の PEG マレイミドを加え、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 5 mM EDTA) 中、37 $^{\circ}$ C で 24 h 反応させた。反応後、Vivaspin2 を用いて反応液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に置換した後、DEAE Sepharose FF カラムにアプライした。初めのピーク溶出後、緩衝液の塩濃度を 0.1 N NaCl に変更して溶出するピークのフラクション分画を回収し、その後 0.3 N NaCl まで gradation をかけて各ピークを回収した。monoPEG-Man-HSA のみのフラクションを選別するために、10 %SDS-PAGE によって解析した。精製した monoPEG-Man-HSA は 0.2 μ m フィルターで濾過滅菌処理して 4 $^{\circ}$ C で保存した。

2) monoPEG-Man-HSA の体内動態解析 :

ICR マウス (雄性、3 週齢) を日本 SLC で購入し、5 mM ヨウ化ナトリウム溶液を飲料水としてヨードブロックを 1 週間行い、4 週齢の健康モデルマウスとして実験に使用した。C57BL6 マウス (雄性、8 週齢) を日本 SLC より購入し、B16F10 メラノーマ細胞を担癌 1 週間後からヨードブロックを行い、担癌 2 週目 (10 週齢) で担癌モデルマウス実験に使用した。実験前日より絶食を行い、 125 I 標識各種タンパク質を 5 kBq/匹の用量でマウス尾静脈より急速注入した。ヘパリン処理した 1ml の注射筒で規定時間毎に下大静脈から約 300 μ L 採血し、3,000 rpm で 10 分遠心分離し、血漿 100 μ L を採取し、その放射活性をオートウェルカウンター (アロカ、ARC-2000) にて測定した。また、同時に各臓器の放射活性も測定した。

3) TAM 様マクロファージおよび CAF 様線維芽細胞に対する monoPEG-Man-HSA の細胞内移行性評価 :

マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞、ヒト肝星細胞株である TWNT-1 細胞 (3.5×10^5 cells/well) をそれぞれ 24 well に播種し overnight で定着させた後 D-PBS で wash し、J774.1 細胞には終濃度 20 ng/ml の IL-4, IL-13 を、TWNT-1 細胞には終濃度 5 ng/ml の TGF- β をそれぞれ添加し CO₂ インキュベーター内で 24 時間反応させた。その後 DPBS で wash し、蛍光量を揃えた各種 FITC 標識アルブミン (200 μ g/ml) を 37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた。D-PBS で 2 回 wash した後、細胞を回収し 2,000 rpm、5 分で遠心してペレットを 250 μ l の DPBS で懸濁させ、ナイロンメッシュに通した細胞内 FITC 蛍光量を Flow cytometry (Guava® easyCyte フローサイトメーター Merk Millipore) にて測定した。

4) パクリタキセル (PTX) 結合型 monoPEG-Man-HSA (PTX-monoPEG-Man-HSA) の抗腫瘍効果 :

C57BL/6 マウス (雄性、8weeks-old) は日本 SLC 株式会社より購入し、エーテル麻酔下、B16-F10 細胞 (2×10^6

cells) をマウスの右側背部に皮下投与し、担癌を行った。担癌 13 日後 (腫瘍径約 150 mm³) となった時点で各治療群に割り当て、週 1 回の投与で計 2 回の抗癌剤治療 (10 mg PTX/kg) を行い、腫瘍体積ならびに体重を経日的に測定した。腫瘍体積(v)については、腫瘍の短径(a)と長径(b)を計測し、 $v=0.4 \times a^2 b$ 式にて算出した。

4. 研究成果

(1) 部位特異的 monoPEG 化反応の構築と monoPEG-Man-HSAs の物理化学的特性

既報の HSA に準じて、唯一遊離 SH 基を有するシステイン (Cys) 34 残基を PEG 修飾の標的部位とすることで、Man-HSA に対して部位特異的な PEG 修飾法を確立した。PEG-マレイミドの反応が Cys34 残基へ選択的かどうかを調べるため、Cys34 残基に対する化学修飾剤の *N*-ethylmaleimide (NEM) を PEG 修飾に対する競合阻害剤として用いた。その結果、PEG_{5k} 処理群では、Man-HSA で観察されたバンドよりも高い分子量の位置にバンドが検出されたことから、PEG 修飾 Man-HSA が形成されていることを確認した。一方、NEM/PEG 共処理群では、PEG 修飾 Man-HSA のバンド強度が減弱していた。このことは、Man-HSA の Cys34 残基が NEM 修飾されたことで、PEG-マレイミドの Cys34 に対する反応が阻害されたことを意味している。従って、PEG-マレイミドの付加反応は Man-HSA の Cys34 残基を介した選択的な反応であることが示された。

精製した monoPEG-Man-HSA が、Man-HSA 由来の糖鎖を保持しているか否かを確認すべく、糖鎖検出法の PAS 染色により解析した。ここでは代表例として、分子サイズ 40 kDa の直鎖 PEG を 1 分子付加した monoPEG_{40k}-Man-HSA の結果を示す。CBB 染色における monoPEG_{40k}-Man-HSA のバンドと同じ位置に PAS 染色によるバンドが観察された。このことから、monoPEG_{40k}-Man-HSA は Man-HSA と同様に糖鎖を有していることが確かめられた。

次に、HSA 及び Man-HSA に対して、5 kDa、20 kDa、40 kDa の直鎖 PEG を付加した monoPEG-Man-HSAs の分子サイズを動的散乱法により評価した。その結果、いずれの PEG 化 HSAs においても、PEG の分子量依存的な分子サイズの増加が観察された。一方、ゼータ電位は高マンノース糖鎖の有無や PEG 付加により若干低下したものの、全ての PEG 化 HSAs が負の値であったことから、分子表面が負電荷を帯びており、分子としての安定性を保持していることが確認された。

さらに、PEG 化が Man-HSA の立体構造に及ぼす影響を CD スペクトル法により解析した monoPEG-Man-HSAs の遠紫外及び近紫外領域における CD スペクトルは、いずれの波長領域においても Man-HSA と類似した波形を示した。これらの結果から、monoPEG 修飾は Man-HSA の立体構造に大きな影響を及ぼさないことが判明した。

(2) monoPEG-Man-HSAs の体内動態特性

monoPEG-Man-HSAs の体内動態特性を解析すべく、monoPEG-Man-HSAs を ¹²⁵I で標識し健常マウスへ静脈内投与後、血漿中及び肝臓、脾臓中の放射線量を経時的に測定した。

その結果、Man-HSA は血中から速やかに消失したが、monoPEG 化により血中からの消失は抑制され、特に monoPEG_{40k}-Man-HSA は Man-HSA の血中滞留性を HSA レベルにまで改善した。

一方、肝臓、脾臓中分布に関しては、Man-HSA で観察される肝臓や脾臓への高い移行性が monoPEG 化により抑制することができた。また、その効果は PEG の分子サイズに依存していた。

これらの結果から、40kDa の monoPEG 付加により、Man-HSA の血中滞留性や肝臓や脾臓への分布は大きく変化し、HSA と類似する特性を示すようになった。このことから、担がん状態における monoPEG_{40k}-Man-HSA の腫瘍移行性は HSA に匹敵するのではないかと予想された。

そこで担がん状態でも、monoPEG 化が Man-HSA の血中滞留性や腫瘍移行性を改善することができるか否かについて、C57BL/6N マウスの背中側に間質に富むがん種の B16F10 メラノーマ細胞 (2×10⁶ cells) を皮下移植した担癌マウス (腫瘍サイズ: 200 mm³) を用いて検証した。その際、担癌マウスに各 ¹²⁵I 標識 HSAs を静脈内投与し、その 1 時間後及び 12 時間後における血漿中及び肝臓、脾臓中の放射活性を比較検討した。その結果、健常モデルマウスと同様、Man-HSA の血中滞留性は PEG の分子サイズに依存して向上し、Man-HSA で観察される肝臓や脾臓への高い移行性が monoPEG 化により抑制された。興味深いことに、投与 1 時間後及び 12 時間後における monoPEG_{40k}-Man-HSA の血中濃度は HSA よりも有意に高かったが、その腫瘍組織移行性は HSA よりも劣っていた。monoPEG_{40k}-Man-HSA の方が HSA よりも約 1.8 倍高い血中濃度であったことを考慮すると、より長時間の時点で解析すれば、monoPEG_{40k}-Man-HSA の腫瘍移行性はさらに増加することが予想され、最終的には HSA に匹敵するのではないかと考えられた。

そこで ¹²⁵I の代わりに近赤外蛍光プローブである Alexa750 を使い、In vivo Imaging Technique による動態解析を行なった。その結果、monoPEG_{40k}-Man-HSA は HSA と匹敵するかそれ以上の腫瘍移行性を示した (図 1)。従って、PEG 化による Man-HSA の血中滞留性、腫瘍移行性の向上並びに肝移行性の回避に関する検討結果を総合的に勘案すると、抗がん剤の腫瘍デリバリー担体として最適な PEG 分子サイズは 40 kDa であると判断し、以下の検討では monoPEG 化 Man-HSA として、monoPEG_{40k}-Man-HSA を使用することとした。

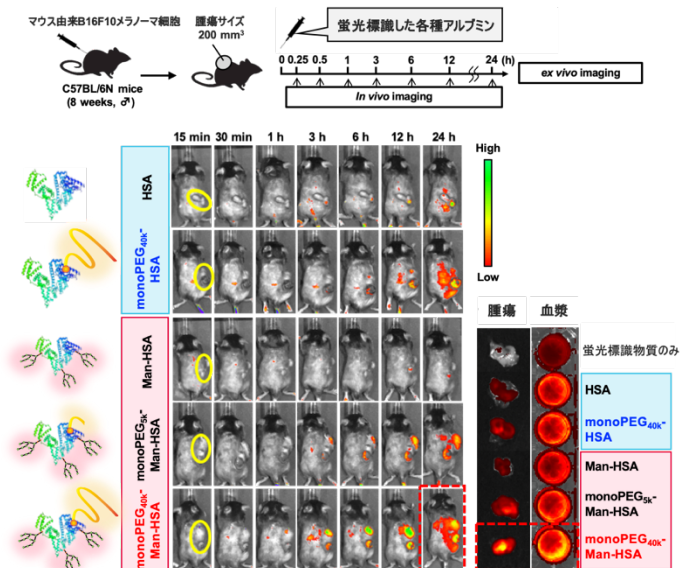


図 1. monoPEG_{40k}-Man-HSA の体内動態評価

(3) TAM 様マクロファージ及び CAF 様線維芽に対する monoPEG-Man-HSAs の細胞内移行性評価

本研究の目的である TAM/CAF を標的とする担体の開発に際しては、mono-PEG 化してもマンノース受容体 (CD206、CD280) に対する認識特性を保持している必要がある。このことを確認すべく、Man-HSA のマンノース

受容体認識能に及ぼす monoPEG 化の影響を、TAM 及び CAF を模倣した CD206 及び CD280 高発現細胞株を用いて検討した。

まず、monoPEG_{40k}-Man-HSA の TAM 移行性を評価すべく、既報に応じてマウスマクロファージ細胞株である J774.1 を IL-4 (20 ng/ml) 及び IL-13 (20 ng/ml) 刺激することで TAM を模倣したマクロファージを調製した。次に、FITC で標識した HSAs (HSA, monoPEG_{40k}-HSA, Man-HSA, monoPEG_{40k}-Man-HSA) を TAM 様マクロファージに添加し、15 分後における細胞内蛍光量をフローサイトメーターにて評価した。その結果、Man-HSA、monoPEG_{40k}-Man-HSA 添加群では、サイトカイン刺激により細胞内蛍光量が大きく上昇し、CD206 siRNA の処理によりその値は有意に減少した。細胞内蛍光量から推定される細胞内移行性は monoPEG_{40k}-Man-HSA > Man-HSA ≒ monoPEG_{40k}-HSA > HSA の順であり、monoPEG_{40k}-Man-HSA の細胞内移行性は HSA よりも約 4 倍高かった。

さらに、monoPEG_{40k}-Man-HSA の CAF 移行性はヒト肝星細胞株 TWNT-1 を用いて検討した。既報に従い、TWNT-1 を TGF-β (5 ng/ml) 刺激することで CAF 様線維芽細胞を調製した。その系に FITC 標識した HSAs を添加し、15 分後における細胞内蛍光量をフローサイトメーターにて評価した。その結果、Man-HSA 及び monoPEG_{40k}-Man-HSA 添加群では、TGF-β 刺激により細胞内蛍光強度が有意に増大し、CD280 siRNA の処理によりその値は有意に減少した。その際、monoPEG_{40k}-Man-HSA の細胞内移行性は HSA や monoPEG_{40k}-HSA よりも約 3 倍高かった。これらの結果から、monoPEG 化しても Man-HSA の CD206 及び CD280 認識性は保持されている可能性が示唆された。

次に、HSA に高い親和性を有する抗がん剤のパクリタキセル (PTX) をモデル薬物に選び、PTX を HSA に担持させた複合体 (PTX-HSAs) を調整し、その細胞傷害性を検討した。TAM 様マクロファージに各 PTX-HSAs を添加して、24 時間後の細胞生存率を評価したところ、PTX 結合体の殺細胞効果は、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA > PTX-Man-HSA ≒ PTX-monoPEG_{40k}-HSA > PTX-HSA の順であった。この結果は、PTX 担体の TAM 様細胞内移行性の結果と良く対応していたことから、PTX の細胞内供給量に依存している可能性が示唆された。事実、細胞内移行量を表す蛍光強度と殺細胞効果の間には 4 群間 (PTX-HSA, PTX-monoPEG_{40k}-HSA, PTX-Man-HSA, PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA) で有意な正の相関性が認められた。同様の結果は、CAF 様線維芽細胞を用いた際にも得られた。

(4) PTX-monoPEG-Man-HSA の担癌マウスに対する抗腫瘍活性評価

次に、*in vivo* における monoPEG_{40k}-Man-HSA の抗腫瘍効果を検証した。B16F10 メラノーマ担癌マウスの腫瘍体積が 150 mm³ となった時点で、間質細胞の浸潤が認められることを確認した。10 mg/kg の PTX を担持した PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA 群の投与を開始し、7 日後に 2 度目の投与 (週 1 回投与) を行い、投与開始から 3、7、10、14 日目に抗腫瘍効果を検討した。その際、PTX 単独、PTX-HSA ならびに PTX-monoPEG_{40k}-HSA を比較対象群として用いた。

その結果、PTX 単独、PTX-HSA ならびに PTX-monoPEG_{40k}-HSA では腫瘍の増殖を抑制することはできなかったが、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA 群では顕著な増殖抑制効果が観察された。同様の結果は腫瘍重量の測定においても得られた。前項における体内動態解析において、HSA ならびに monoPEG_{40k}-HSA は monoPEG_{40k}-Man-HSA と同等の腫瘍移行性を示したにも関わらず、PTX による抗腫瘍効果は PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA の方が優れていた。これらの結果を考え合わせると、腫瘍組織における PTX の分布や細胞内移行性、引いては殺細胞効果の発現部位の差異が抗腫瘍効果の違いに反映されたのではないかとと思われる。すなわち、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA の方が PTX-HSA や monoPEG_{40k}-HSA よりも腫瘍組織の微小環境に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

PTX 投与開始より 14 日後における腫瘍組織内のアポトーシス細胞を TUNEL 染色により、また CD206、CD280 陽性細胞を蛍光免疫染色により評価した。PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA 投与群の腫瘍組織では、腫瘍体積の結果を反映してアポトーシス陽性細胞が数多く観察される一方、CD206 または CD280 陽性領域の減少が認められた。間質領域はがん微小環境の形成に伴って増加する。そこで、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA による抗腫瘍効果が、がん微小環境を介した可能性を明らかにすべく、Picrosirius red 染色及び HE 染色により腫瘍組織の間質領域を評価した。その結果、PTX 単独、PTX-HSA ならびに PTX-monoPEG_{40k}-HSA では、間質領域の変化は観察されなかったが、対症的に PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA 群では腫瘍の間質領域が劇的に減少していた。PTX-Mono-PEG_{40k}-Man-HSA による間質領域の減少は、腫瘍組織中ヒドロキシプロリンの結果からも支持された。これらの結果から、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA は腫瘍組織の間質領域を減少させ、がん微小環境を改善する結果、優れた抗腫瘍効果を発揮したのではないかと推察された。

前項の結果が PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA の TAM/CAF 標的能を反映したものか、それとも PEG 化による血中滞留性の向上によるものかを明らかにすべく、腫瘍体積が 150 mm³ となった時点で、薬剤 (PBS、PTX 単独、PTX-HSA、PTX-monoPEG_{40k}-HSA、PTX-monoPEG_{40k}-Man-

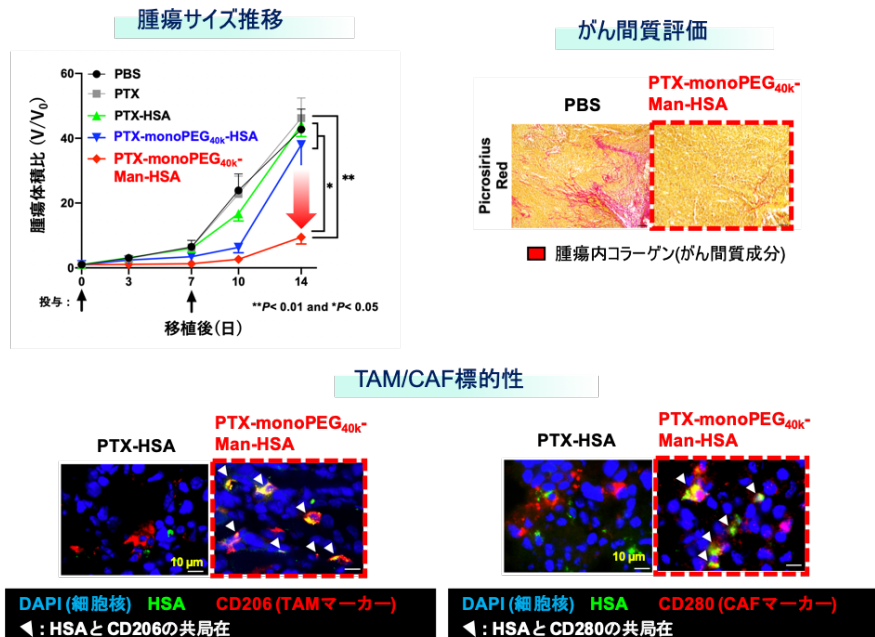


図 2. PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA の抗腫瘍効果及びがん微小環境への影響

HSA) の投与を開始し、7日後と14日後の段階で計3回の投与(週1回投与)を行い、最終投与から1時間後に腫瘍組織を回収し、組織切片を作製した後、HSA抗体、CD206抗体あるいはCD280抗体による蛍光免疫染色を行った。ここで、担体の基盤をなすHSA分子と、TAM及びCAF表面のCD206やCD280との共局在が存在すれば、担体がTAMやCAFを認識した可能性が示される。

PTX単独投与群、PTX-HSA投与群、PTX-monoPEG_{40k}-HSA投与群では、腫瘍組織切片において、HSA抗体とCD206あるいはCD280との共局在がわずかにしか観察されなかったが、対症的に、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA投与群では、HSAとCD206あるいはCD280との共局在を表す黄色のスポットが最も多く認められた。これらの結果から、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSAの抗腫瘍効果には、担体であるmonoPEG_{40k}-Man-HSAのTAM/CAFに対する二重標的能が大きく関与している可能性が示された(図3)。

前項の結果をより詳細に検証すべく、各治療群におけるがん微小環境内の細胞構成の変動を解析した。具体的には、各薬剤投与群において、最終評価日である投与開始14日目の腫瘍組織から全細胞を回収し、そこに含まれるマクロファージ及び線維芽細胞の割合を、それぞれのマーカーであるF4/80抗体とCD280抗体を指標としてフローサイトメータで算出した。その結果、PTX薬物投与群、PTX-HSA投与群、PTX-monoPEG_{40k}-HSA投与群では、F4/80陽性細胞の割合が約41~44%であり、PBS投与群(44.4%)とほとんど変わらないのに対して、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA投与群では、F4/80陽性細胞の割合が32.4%まで減少していた。一方、CD280陽性細胞の割合は、PBS投与群で36.7%であったのに対して、PTX投与群、PTX-HSA投与群、PTX-monoPEG_{40k}-HSA投与群ではそれぞれ27.8%、15.2%、16.0%まで減少した。他方、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA投与群におけるCD280陽性細胞の存在は9.7%まで低下し、最も低い割合を示した。このことから、PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA投与により、腫瘍組織内におけるマクロファージと線維芽細胞の割合が共に大きく減少することが明らかになった。

以上本研究では、PEG修飾により新たに作製したmonoPEG_{40k}-Man-HSAが、Man-HSAの肝移行性を回避しつつ、腫瘍蓄積性やTAM/CAF認識性に優れていることを実証した。また、本担体にPTXを搭載したがんDDS製剤は、TAM/CAFの減少に伴う腫瘍間質領域の減少、微小環境の改善によって、強力に抗腫瘍効果を発揮したことから、monoPEG_{40k}-Man-HSAはがん微小環境内のTAM/CAFを包括的に標的可能な新規がんDDS担体として機能することが期待される(図3)。

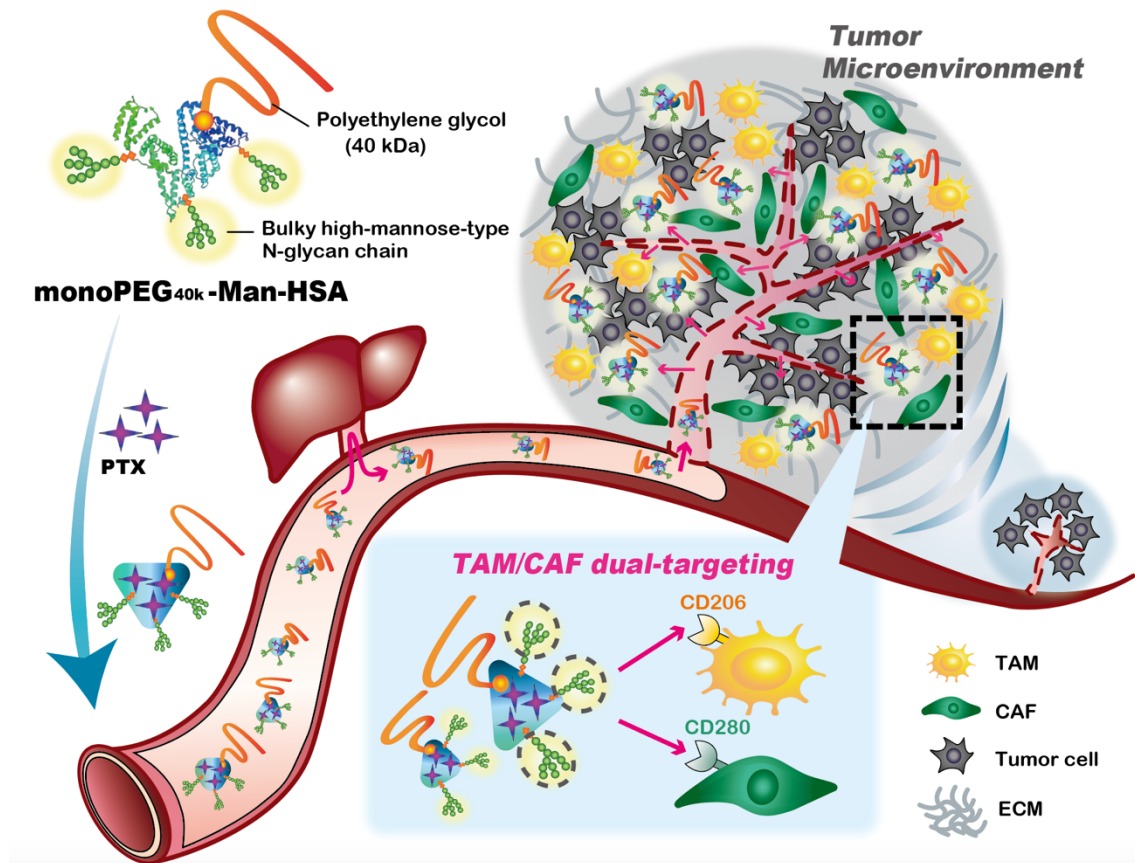


図3. PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSAのTAM及びCAF二重標的化メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minayoshi Y, Maeda H, Yanagisawa, H, Hamasaki K, Mizuta Y, Nishida N, Kinoshita R, Enoki Y, Imafuku T, Chuang VTG, Koga T, Fujiwara Y, Takeya M, Sonoda K, Wakayama T, Taguchi K, Ishima Y, Ishida T, Iwakiri Y, Tanaka M, Sasaki Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T	4. 巻 25(1)
2. 論文標題 Development of kupffer cell targeting type- interferon for the treatment of hepatitis via Inducing anti-inflammatory and immunomodulatory actions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Deliv.	6. 最初と最後の頁 1067-1077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10717544.2018.1464083.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeda H, Minayoshi Y, Ichimizu S, Mizuta Y, Nagasaki T, Matsusaka K, Oshiro S, Oniki K, Saruwatari J, Ishima Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T.	4. 巻 43(1)
2. 論文標題 Repeated Administration of Kupffer Cells-Targeting Nanoantioxidant Ameliorates Liver Fibrosis in an Experimental Mouse Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 93-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Mizuta, H. Maeda, Y. Ishima, Y. Minayoshi, S. Ichimizu, R. Kinoshita, I. Fujita, T. Kai, K. Hirata, T. Nakamura, J. Saruwatari, H. Arima, H. Watanabe, M. Otagiri, T. Maruyama	4. 巻 in press
2. 論文標題 A Mannosylated, PEGylated Albumin as a Drug Delivery System for the Treatment of Cancer Stroma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Funct Mater	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adfm.202104136	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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水田 夕稀、前田 仁志、異島 優、皆吉 勇紀、一水 翔太、木下 遼、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージを標的とした新規DDS担体の開発
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水田 夕稀、前田 仁志、皆吉 勇紀、一水 翔太、木下 遼、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹
2. 発表標題 瘍微小環境を治療標的とするDual targeting担体の開発と癌DDS治療への応用
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田仁志、異島優、皆吉勇紀、一水翔太、柳澤洋輝、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹
2. 発表標題 チオールと一酸化窒素の肝デュアルデリバリーシステムの構築とNASH治療への応用
3. 学会等名 日本薬剤学会 第32回年会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 前田仁志、異島優、皆吉勇紀、一水翔太、柳澤洋輝、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹
2. 発表標題 一酸化窒素とチオールを基軸とした新規 NASH 治療法の開発
3. 学会等名 第17回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹
2. 発表標題 マンノース受容体を標的とするナノ抗酸化剤の開発と急性及び慢性肝疾患への応用
3. 学会等名 第26回DDSカンファランス
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹
2. 発表標題 難治性肝炎をターゲットにする抗酸化ナノDDS戦略の構築
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 水田 夕稀、前田 仁志、皆吉 勇紀、一水 翔太、木下 遼、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、馬場 秀夫、丸山 徹
2. 発表標題 Development of a novel tumor microenvironment-targeted drug deliver carrier ; TAMとCAFを包括的に標的化する抗がん剤デリバリーシステムの構築
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田 夕稀、前田 仁志、皆吉 勇紀、一水 翔太、木下 遼、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹
2. 発表標題 がん微小環境を二重標的化する抗がん剤送達キャリアの開発
3. 学会等名 第44回製剤・創剤セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田 夕稀、前田 仁志、皆吉 勇紀、一水 翔太、木下 遼、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹
2. 発表標題 がん微小環境を治療標的とするDual targeting 担体の開発と新規がんDDS戦略の構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 薬物送達用担体	発明者 丸山徹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-099998	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------