

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790282

研究課題名（和文） 癌血管制御によるナノメディシン分布増強

研究課題名（英文） Enhancement of nanoparticle accumulation via regulation of tumor vasculature

研究代表者

狩野 光伸（KANO MITSUNOBU）

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80447383

研究成果の概要：

我々はナノ粒子薬剤と TGF- 阻害剤の併用により難治固形癌の治療効率を高める可能性を示してきたが、本研究でその適応範囲を検討した。その結果、壁細胞被覆の多い新生血管は TGF- 阻害剤で漏出化し高分子物質の貯留が増加したが、被覆の少ない血管は、元来漏出性が高い上に VEGF 阻害剤で貯留が増加した。壁細胞被覆の多い新生血管は腫瘍モデルでは間質量の多い組織型のものに観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：病理学、癌、ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓腺癌やスキルス胃癌を含む、現状では非常に予後の悪いいわゆる難治性固形癌に対して、既存薬による効果的な化学療法はまだまだなく、その確立は急務である。

近年、ナノテクノロジーを基盤とする高分子抗癌剤の開発が盛んになりつつあり、これら難治性固形癌治療の切り札になることが期待されてきた。これは高分子物質が腫瘍に蓄積しやすいという現象すなわち EPR 効果を期待した方法である。しかし実際には、主に

薬剤構造設計を変化させて検討されてきたものの、これら難治性固形癌では明らかな蓄積効果や治療効果を示せていない状況であった。

一方、VEGF を中心としたシグナル伝達の制御により腫瘍血管を制御し、これを既存の化学療法と組み合わせることにより、固形癌に対してより効果のある抗癌療法を確立しようという試みがある。申請者らも、VEGF A、FGF-2、PDGF-BB 等の増殖因子のバランスにより、新生血管における内皮細胞と壁細胞の相互作用が変化し、血管の機能成熟化に影響す

ることを見出ししていた(Kano, M.R. et al. J Cell Sci 118, 3759-3768 (2005))。しかしこのコンセプトの治療効果は特に転移性大腸癌で証明されたものの、まだ難治性固形癌においては証明されておらず、また、ナノキャリアとの併用では証明されていなかった。

TGF-シグナルは癌細胞自体の制御のみならず、癌間質の制御にも著明な役割を果たしていることが知られている。癌細胞や癌間質における TGF-シグナルの抑制はしたがって抗腫瘍療法に利用しうると考えられてきた。しかし、TGF-シグナルには上皮細胞における増殖抑制作用もあるため、いたずらにその抑制を行うと、早期癌を促進してしまう副作用も考えられた。

我々は当初、in vivo 血管新生誘導実験系であるマトリゲルプラグアッセイで TGF-型受容体阻害剤を用いる方法で、成熟個体での新生血管に対する TGF-シグナル抑制の影響を研究していた。この結果、TGF-抑制は、血管内皮細胞の増殖と血管壁細胞の内皮への接着障害をもたらし、機能的には新生血管からの物質の漏出性が高まること、経静脈投与した分子量 200 万の高分子量デキストランの分布を用いて示された(Kano, M.R. et al., PNAS, 2007)。これらの事象はヒト膵臓腺癌細胞 BxPC3 のヌードマウス皮下移植モデルに対して同阻害剤 1 mg/kg を腹腔内投与した場合でも示され、癌組織における新生血管に対しても TGF-シグナル抑制の影響は同様であることが示唆された。なおこの 1mg/kg という TGF-型受容体阻害剤投与量は、癌細胞自体には影響を与えず、主に血管壁及び血球のみに影響を与える濃度であることが示され、阻害剤による副作用は最小限と考えられる投与量であった。

そこで我々は TGF-阻害剤を併用する対象としてアドリアマイシン(以下 ADR)内包リポソーム(ドキシル®)及び ADR 内包 PEG ミセル(Bae, Y. et al. Bioconjug Chem 16, 122-130 (2005))を選び、前記膵癌モデルを用いて、ADR の癌組織における分布と、結果としての癌増殖抑制効果を観察した。この結果、いずれのナノキャリアも単剤のみでは対照群に比して有意な癌増殖抑制効果が見られなかったのに対し、TGF-阻害剤併用群ではどちらの剤形も対照群に対して有意な抑制効果が見られた。

さらに ADR 内包ミセルと TGF-阻害剤の併用を用いて他の膵臓腺癌細胞株である MiaPaCa-2 及び Panc-1 皮下移植モデル、さらにスキルス胃癌細胞株 OCUM-2MLN の胃壁移植モデルにおける増殖抑制効果を確認したところ、全てのモデルでナノキャリア・TGF-阻害剤の併用の優位性が示された。なお正常組織での高分子デキストランや ADR の分布は阻害剤投与によって変化しなかったことが

ら、副作用発現は最小限となることが示唆された。

## 2. 研究の目的

1 に記したような結果から、低用量 TGF-阻害剤の全身投与を併用する方法は、ナノキャリア抗癌剤を用いて難治性固形癌を治療する際の切り札となる可能性が示唆されてきた。

その実用化に向けて、TGF-阻害剤による方法が、現在一般的に効果的とされる VEGF 阻害(血管正常化説)による方法とどう異なるのかを明らかにする必要がある。このことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

正常免疫動物である Balb/c マウス腹部皮下に、血管増殖因子 VEGF と FGF2 を混じたマトリゲルプラグをマウス皮下に移植し(Kano et al., J Cell Sci, 2005)誘導される新生血管を蛍光免疫組織学的に観察する方法を用いた。観察対象は血管内皮細胞と壁細胞で、各々マーカーは PECAM-1 と SMA とした。血管制御のための投与薬剤としては、TGF-阻害剤(LY364947)と VEGF を含む複数のチロシンキナーゼに対する阻害剤(ソラフェニブ)を用いた。また、ナノ粒子のモデルとしては、分子量 2MDa の FITC 標識デキストランを用いた(Kano et al., Cancer Sci., 2009)。

## 4. 研究成果

血管増殖因子 VEGF と FGF2 を混じたマトリゲルプラグをマウス皮下に移植し、誘導される新生血管を観察すると、プラグ内とプラグ周囲では性質が異なり、プラグ内では血管壁細胞に被覆された新生血管がより多い一方、周囲では血管密度がより高いが、より被覆されていなかった。プラグ周囲は急性炎症反応の影響が強く、プラグ内部は初めに混じた VEGF と FGF2 の影響が強いものと考えられる。このモデルで TGF-阻害剤と VEGF 阻害剤(ソラフェニブ)投与の高分子デキストラン分布に対する効果を比較した。

プラグ内血管は TGF-阻害剤投与によって漏出化しデキストランの貯留が増加するが、VEGF 阻害剤投与は血管数を減少させデキストランの流入自体が減少した。一方プラグ周囲の血管は、デキストラン単独でも貯留が見られ、VEGF 阻害剤によってさらにデキ

ストランの漏出が増加した。しかし TGF- 阻害剤ではデキストラン分布は変化しなかった。これらより、腫瘍血管を含む新生血管の性質は周囲の血管増殖因子のバランスによって大きく異なることが示唆され、血管壁細胞被覆程度などを指標として最適な新生血管制御を行うことで、薬剤送達を最適化できる可能性が示唆された。このことは、最近他研究グループから発表された内容 (Sennino et al., Cellular Source and Amount of Vascular Endothelial Growth

Factor and Platelet-Derived Growth Factor in Tumors Determine Response to Angiogenesis Inhibitors. *Cancer Res.*, 2009) とも合致する。

腫瘍モデルにおいては、大腸癌動物モデルとして頻りに用いられるマウス大腸癌 C26 細胞株皮下移植の系における腫瘍組織は、間質はほぼ存在せず、壁細胞被覆を持たない血管に富んでいる。つまり本研究におけるプラグ周囲のパターンを示す。一方、これまで我々が膵癌のモデルとして用いてきたヒト膵癌 BxPC3 細胞株皮下移植の系は、間質に富み、壁細胞被覆も多い。すなわち本研究におけるプラグ内部のパターンである。従って、これまでナノ粒子の効果を示すために頻用されてきた C26 モデルにおける知見は、腫瘍全てに一般化できるとは限らず、間質の少ない腫瘍にはある程度適応可能であるとしても、それ以外の組織型には適応できない可能性が示唆された。また、TGF- 阻害剤併用による方法の適応は間質が多く壁細胞被覆の豊かな血管を持つ組織型の腫瘍であることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- 1 ) Kano, M.R., Komuta, Y., Iwata, C., Oka, M., Shirai, Y., Morishita, Y., Ouchi, Y., Kataoka, K., and Miyazono, K. Comparison of the effects of the kinase inhibitors imatinib, sorafenib, and transforming growth factor  $\beta$  receptor inhibitor on extravasation of nanoparticles from neovasculature. *Cancer Sci.* 100 173-80 (2009) < 査読有 >
- 2 ) 狩野光伸・宮園浩平 EMT 制御と分子標的薬 実験医 27 653-660 (2009) < 査読無 >

- 3 ) Oka, M., Iwata, C., Suzuki, H.I., Kiyono, K., Morishita, Y., Watabe, T., Komuro, A., Kano, M.R., and Miyazono, K. Inhibition of endogenous TGF  $\beta$  signaling enhances lymphangiogenesis *Blood* 111 4571-4579 (2008) < 査読有 >
- 4 ) Miyata K, Oba M, Kano MR, Fukushima S, Vachutinsky Y, Han M, Koyama H, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polyplex Micelles from Triblock Copolymers Composed of Tandemly Aligned Segments with Biocompatible, Endosomal Escaping, and DNA-Condensing Functions for Systemic Gene Delivery to Pancreatic Tumor Tissue. *Pharm Res.* 25 924-36 (2008) < 査読有 >
- 5 ) 狩野光伸 腫瘍発育、血管新生、治療反応性への動脈硬化と血管老化の影響 分子細胞治療 7(1) 79-80 (2008) < 査読無 >
- 6 ) M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kaminishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, and K. Miyazono Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF- signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(9) 3460-3465 (2007) < 査読有 >
- 7 ) C. Iwata, M. R. Kano, A. Komuro, M. Oka, K. Kiyono, E. Johansson, Y. Morishita, M. Kaminishi, M. Yashiro, K. Hirakawa, and K. Miyazono Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Suppresses Lymph Node Metastasis via Reduction of Lymphangiogenesis. *Cancer Res.*, 67 (21) 10181-10189 (2007) < 査読有 >
- 8 ) 狩野光伸 ナノ粒子抗癌剤と低用量 TGF- 阻害剤の併用による難治癌治療 . 実験医学 25(9) 1344-1347 (2007) < 査読無 >
- 9 ) 狩野光伸 TGF- シグナルの制御と癌治療 細胞 39(8) 31-33 (2007) < 査読無 >
- 10 ) 狩野光伸・宮園浩平 血管における TGF- ファミリーシグナル 医学のあゆみ 223(12) 1037-1042 (2007) < 査読無 >

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 狩野光伸 脈管制御を応用した難治がん治療法の開拓 第7回次世代バイオマテリアル研究会 2009年3月9日 東京医科歯科大学
- 2) 狩野光伸 難治性固形腫瘍に対するナノDDS治療の実現化 第24回日本DDS学会学術総会 2008年6月30日 六本木ヒルズ
- 3) 狩野光伸 腫瘍血管新生制御が薬剤送達に影響を与える際の組織学的要因の解明 第97回日本病理学会総会 2008年5月16日 石川県立音楽堂
- 4) Kano, MR. Optimal manipulation of tumor vasculature for treatment of intractable solid tumors using nanoparticles. 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月29日 名古屋国際会議場
- 5) Kano, MR. Manipulation of TGF-signaling for cancer treatment. 28th Sapporo Cancer Seminar International Symposium. 2008年6月27日 北海道大学
- 6) Kano, MR. Optimal Manipulation of Vasculature for Nanoparticles in Intractable tumors. Swiss-Japan Symposium on Nanobio 2007. 2007.10.11, 東京大学武田先端知ビル
- 7) Kano, MR, Miyazono, K. TGF-beta signaling and regulation of cancer. Queenstown Molecular Biology 2007 satellite symposium. 2007.8.27, Queenstown, New Zealand
- 8) Kano, MR, Bae, YS., Iwata, C., Oka, M., Shirai, Y., Fujii, T., Morishita, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K., Miyazono, K. Low-dose TGF-beta inhibitor improves cancer-targeting therapy using nanocarriers for intractable solid tumors. Gordon Research Conference, Angiogenesis and microcirculation. 2007.8.22, Salva Regina University, Newport, RI, USA
- 9) Kano, MR, Bae, YS., Iwata, C., Oka, M., Fujii, T., Morishita, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K., Miyazono, K. Low-dose TGF-beta inhibitor improves cancer therapy using nanocarriers for intractable solid tumors. The 34th Annual Meeting of the

Controlled Release Society. 2007.6.11, Long Beach, CA, USA

- 10) Kano, MR, Bae, YS., Iwata, C., Oka, M., Fujii, T., Morishita, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K., Miyazono, K. Low-dose TGF-beta inhibitor for effective nanotechnology-based chemotherapy in intractable solid tumors. The 2007 AACR Annual Meeting, 2007.4.14, Los Angeles, CA, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

狩野 光伸 (KANO MITSUNOBU)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80447383

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし