

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：37401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K07743
研究課題名（和文）EPR効果におけるオフターゲットデリバリーの抑制によるナノメディシンの効果増強

研究課題名（英文）Augmentation of EPR effect and therapeutic effect of nanomedicine by inhibiting off-targeting delivery

研究代表者
方 軍（Fang, Jun）
崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：20412736
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）：本研究は、ナノメディシンのoff-target deliveryの抑制を目指すことで、RES機能抑制作用を持つ臨床静注用脂肪乳剤Intralipidに注目し、その有用性を検討しました。Intralipidの前投与により各種抗がんナノメディシンの肝臓集積の減少、血中半減期の増加、腫瘍血流の改善および腫瘍デリバリーの有意な増加が得られました。その結果、Intralipidとの併用により抗がんナノメディシンの治療効果が有意に改善されました。これらの結果から、Intralipidとナノメディシンの併用治療は新たな抗がん戦略として、その臨床応用が期待されています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、静脈栄養剤として臨床で広く応用されるIntralipidを用いることで、ナノメディシンのoff-targetデリバリーの抑制による副作用の少ないEPR効果の増強法を確立できると考えられます。その結果、ナノメディシンのより効率的かつこれまで以上に優れた抗がん治療効果が得られると信じています。つまり、本研究の成果はがんの効率的な治療に繋がり、医療費の削減ならびにがん患者のQOL向上に寄与するものと強く期待されています。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the usefulness of the clinically used lipid emulsion, Intralipid, which has a function of suppressing the reticuloendothelial system, in suppressing the off-target delivery of anticancer nanomedicines. Intralipid pretreatment led to a significant reduction in liver accumulation of various anticancer nanomedicines, an increase in blood half-life, improvement in tumor blood flow, and a significant increase in tumor delivery. As a result, the combination of Intralipid and nanomedicines significantly improved the therapeutic effect of anticancer nanomedicines. These results suggest that the combination therapy of Intralipid and nanomedicines could be a new anticancer strategy with potential clinical applications.

研究分野：抗がんナノメディシン、DDS、癌治療、EPR効果

キーワード：EPR効果 ナノメディシン off-targetデリバリー イントラリピッド 腫瘍血流

1. 研究開始当初の背景

今世紀に入ってから、EPR に基づくナノメディシンの研究は世界中で腫瘍ターゲティング戦略の一つとして注目されています。EPR 効果は、1986 年に前田らによって提唱され、ナノメディシン(高分子型薬剤)の腫瘍集積性に関する腫瘍血管の病理学的特徴による独特な現象です。EPR 効果は、がんの特異的な制癌剤のデリバリーの基本概念として認識されています。しかし、ナノメディシンは高い腫瘍集積を示しますが、網内系 (reticuloendothelial system, RES) に捕獲され、肝臓や脾臓に高く集積する off-target デリバリーの問題があります。これまでの前臨床および臨床実験のデータから、ナノメディシンの腫瘍デリバリーは投与量の 1-10% に留まることがわかっています。このため、十分な EPR 効果や治療作用を得ることができず、副作用の懸念もあります。これがナノメディシンのがん治療効果を制限する一つの要因と考えられます。そのため、ナノメディシンの効果を向上するには、off-target デリバリーの抑制が重要な位置を占めるものと考えられます。

ナノメディシンの off-target デリバリーを抑制する方法として、ナノドラッグの設計や組成に注目する方法がありますが、RES 機能を抑制する薬剤のスクリーニングも有望な手段の一つとされています。静脈栄養剤である脂肪乳剤 Intralipid は、以前からその RES 抑制作用が知られており¹⁾、最近では Intralipid の投与によってナノメディシンの肝臓へのデリバリーが減少し、副作用も軽減されることが報告されています²⁾。その作用機序については、一般的には肝臓のクッパー細胞の機能を抑制することが認識されていますが、最近の研究により肝臓類洞内皮細胞や肝実質細胞もナノメディシンの off-target デリバリーに関与することが分かっています³⁾。しかし、Intralipid の EPR 効果への影響やその細胞レベルでの作用メカニズムについてはまだ解明されていません。

2. 研究の目的

本研究では、Intralipid がナノメディシンの off-target デリバリーを抑制する作用と、EPR 効果を増強する作用、そしてそのメカニズムを評価・解明することが目的です。具体的には、in vitro 細胞培養系や各種固型腫瘍モデルを用いて、Intralipid の投与による腫瘍内外でのナノメディシンの分布を調べ、肝臓や脾臓への集積量の減少効果、クッパー細胞の機能変化について検討します。また、Intralipid による EPR 効果の増強作用やナノメディシンの効果増強剤としての有用性についても検討し、その細胞レベルでのメカニズムを解明することを目指します。

3. 研究の方法

本研究では、腫瘍集積・EPR 効果を証明された高分子ミセル剤 HPMA-Pyropheophorbide-a (P-PyF) 及びシスプラチン-スチレンマレイン酸コポリマーナノコンプレックス (SMA-CDDP) を用いて^{4, 5)}、EPR 効果の評価を行いました。また、臨床的に承認された抗がんナノ医薬品である Doxil も使用しました。腫瘍モデルとして、マウスザルコーマ S180、大腸がん C26 の皮下移植モデルを使用し、In vitro においては、マウス肝臓クッパー細胞を用いました。

1) クッパー細胞におけるナノメディシンの取り込みと Intralipid の影響：マウス肝臓のクッパー細胞を使用し、Oil Red O 染色によって Intralipid の細胞内取り込みを観察しました。Intralipid 処理後の各時点で、P-PyF を添加し、Pyropheophorbide-a 由来の蛍光強度から細胞内取り込み量を比較しました。また、FITC 標識ラテックスビーズを使用して、FACS によりクッパー細胞の貪食能を評価し、Intralipid がクッパー細胞の貪食能に及ぼす影響(濃度依存性、時間依存性)を調べました。

2) ナノメディシンの血中動態 (Pharmacokinetics) と組織分布に対する Intralipid の影響：マウスザルコーマ S180 腫瘍モデルを用い、Intralipid 処理後 P-PyF を経静脈注射し、経時的に血中または腫瘍および正常臓器・組織中の薬物量を測定しました。測定には DMSO 抽出と蛍光分光光度計を用いました。また、前述の実験に加えて、In vivo イメージング装置 (IVIS Lumina-XR) を用いて、P-PyF 投与後の経時的な腫瘍イメージングを行い、EPR 効果を評価しました。

3) SMA-CDDP の肝毒性に対する Intralipid の改善作用：マウスザルコーマ S180 腫瘍モデルを用い、Intralipid 処理後 SMA-CDDP を経静脈注射しました。SMA-CDDP 投与後、治療後動物の体重変化と死亡率を測定し、さらに血清生化学検査 (ALT) を行い、肝毒性を評価しました。

4) Intralipid による抗がんナノメディシンの抗腫瘍効果の増強：当研究室で開発した P-PyF と臨床で応用されているナノ抗がん剤ドキシル⁶⁾ を用い、各種固型腫瘍モデルを用いた in vivo 実験において、Intralipid の併用によるナノメディシンの効果増強を検討しました。治療後の腫瘍体積の変化、担がんマウスの生存率を測定し、その結果を評価しました。

5) 血液粘度及び腫瘍血流に対する Intralipid の作用：Intralipid の作用機序を解明するため、マウ

スザルコーマ S180 腫瘍モデルを用いて、Intralipid 処理後の血液粘度の変化を Physica MCR 101 粘度計を用いて測定しました。さらに、Intralipid 処理後の腫瘍血流の変化は、蛍光プローブ(α -SWCNT-PEG)⁷⁾を用いて SAI-1000 蛍光イメージングシステムで測定しました。

4. 研究成果

1) Intralipid のクッパー細胞内取り込み

まず、クッパー細胞による Intralipid の取り込みを確認しました。Intralipid を添加すると、クッパー細胞内に脂質小滴が明らかに観察されました。さらに、結果を定量化したところ、Intralipid が時間と依存的に取り込まれ、8 時間で飽和し、24 時間まで一定に保たれることが示されました。また、S180 腫瘍モデルでも、Intralipid 投与後の肝臓組織内で脂質小滴の形成が確認されました。

2) Intralipid によるナノメディシンのクッパー細胞内取り込みの抑制

Intralipid のクッパー細胞におけるナノメディシン取り込み抑制効果を検討するために、直径約 100 nm の蛍光ナノ粒子 (Latex Beads-Rabbit IgG-FITC Complex) を用いて実験を行いました。図 1A に示されるように、クッパー細胞は蛍光ナノ粒子を内部に取り込み、細胞内で緑色の蛍光が観察されました。しかし、クッパー細胞に Intralipid を 6 時間前処理し、細胞内での Intralipid の取り込みがほぼ飽和状態になった後、細胞内に取り込まれる蛍光ナノ粒子の数 (緑色) は、大幅に減少しました (図 1A)。また、フローサイトメトリーでも、クッパー細胞によるナノ粒子の取り込み量が有意に低下 (約 20%) することが示されました (図 1B)。

この効果は、PDT ナノプローブの P-PyF を使用して確認されました。Intralipid を 6 時間前処置した後、クッパー細胞は P-PyF の取り込みが有意に低下し、80%以上の抑制が観察されました (図 1C)。

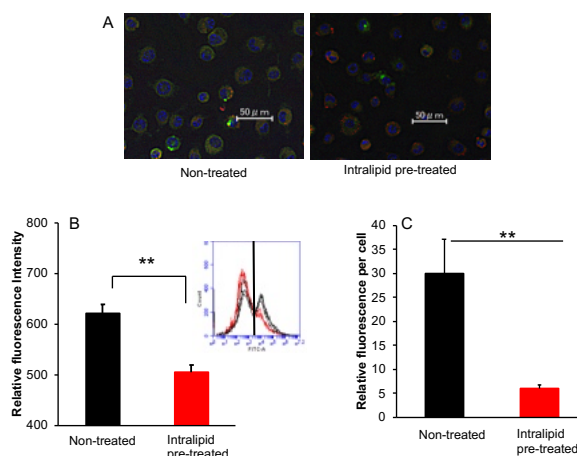


図 1 ナノメディシンのクッパー細胞内取り込みにおける Intralipid の作用

3) Intralipid によるナノメディシンの in vivo 組織分布の改善

次に、マウスのサルコーマ S180 モデルを用いて、Intralipid のナノメディシンの体内分布に及ぼす影響を調べました。図 2A に示すように、Intralipid の予処置によって、ナノプローブ P-PyF の肝臓組織内での蓄積が減少し、腫瘍組織内での蓄積が増加しました。また、Intralipid の予処置時間が長いほど、この効果がより強くなりました。Intralipid を 24 時間予処置すると、肝臓の蓄積が 40%減少し、脾臓でも同様の結果が得られました。一方、腫瘍組織内の P-PyF の蓄積は 1.5 倍に増加しました (図 2A の拡大図)。肝臓以外の腎臓、肺、心臓、筋肉など他の組織での P-PyF の分布には、Intralipid の影響が見られません。肝臓の摂取量の減少 ($p = 0.05$) と腫瘍組織内の蓄積の増加 ($p = 0.08$) は有意ではありませんでしたが、腫瘍/肝臓比は 0.14 から 0.39 に有意に ($p = 0.04$) 増加しました (図 2B)。これは、ナノメディシンのより良い治療効果につながると考えられています。

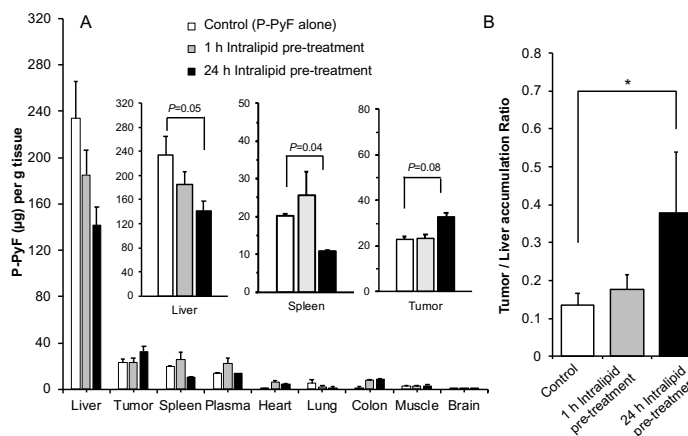


図 2 Intralipid によるナノメディシンの in vivo 組織分布の改善

4) Intralipid による抗がんナノメディシン SMA-CDDP の肝毒性の軽減

Intralipid の前処置による肝臓中のナノドラッグの蓄積量の低下は、肝毒性の低減という利点をもたらします。この作用を確認するために、本研究では抗がんナノメディシン SMA-CDDP を使用して検討しました。S180 担癌マウスに対して、最大許容用量を超える濃度の SMA-CDDP を投与すると、Intralipid の前処置を行わなかった群では、7 匹のうち 4 匹が 24 時間以内に死亡

しました。しかし、Intralipid の前処置を行った群では、48 時間までの生存率が 86%であり、有意に向上しました。また、SMA-CDDP 投与 72 時間後の生存率は、Intralipid 前処置群と非処置群でそれぞれ 57%と 29%でした。

5) Intralipid による抗がんナノメディシンの抗腫瘍効果の増強

最近報告により、Intralipid は抗がんナノメディシンの抗腫瘍効果を増強することがわかっています¹⁾。この報告を受け、本研究では、まずマウスのサルコーマ S180 固形腫瘍モデルでナノプローブ P-PyF を使用して光力学療法 (PDT) を行い、Intralipid との併用治療効果を検討しました。PDT 単独使用時には、P-PyF の濃度依存的な PDT 効果が観察されました。低用量 PDT (2.5 mg/kg の P-

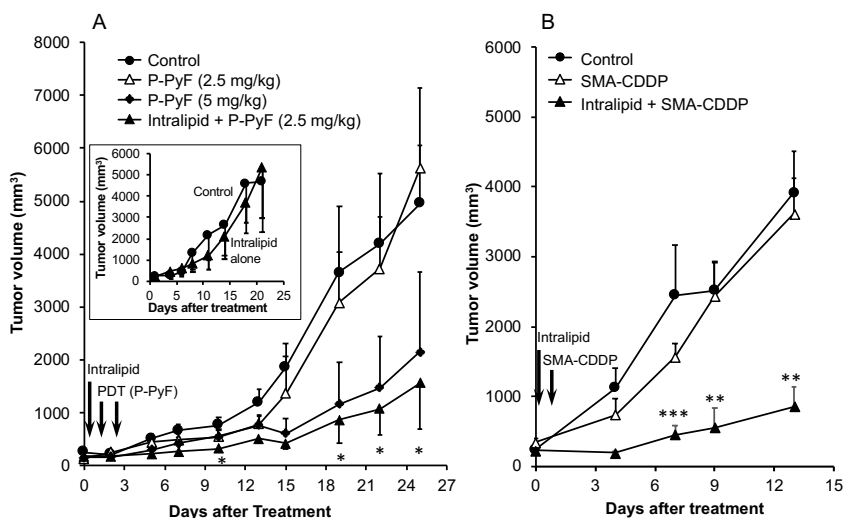


図3 Intralipid による抗がんナノメディシンの抗腫瘍効果の増強

PyF) では明らかな抗腫瘍効果は示されず、高用量 PDT (5 mg/kg の P-PyF) では腫瘍成長を著しく抑制しました (図 3A)。さらに、Intralipid の併用治療 (1 g/kg、24 時間の前処置) が低用量 PDT の治療効果を著しく増加させたことがわかりました。しかし、Intralipid 単独では明らかな抗腫瘍効果は示されませんでした (図 3A の挿入図)。併用療法は著しい腫瘍成長の抑制をもたらし、高用量 PDT よりも優れた治療効果が得られました (図 3A)。これらの結果から、Intralipid の前処置は、腫瘍内で PDT ナノプローブの蓄積を 2 倍以上増加させたことを示唆しています。同様に、シスプラチンの高分子複合体である SMA-CDDP (10 mg/kg、CDDP 相当) も、Intralipid 前処置によりその治療効果が有意に増強されたことが示されました (図 3B)。

また、in vivo イメージングにより、Intralipid の併用によるナノプローブ P-PyF の腫瘍内集積の増加を確認しました。図 4 に示されるように、Intralipid 前処置後、腫瘍内の P-PyF の蛍光が明らかに増強されたことがわかりました。この蛍光増強は、注射後 2 時間で観察され、24 時間以上持続しました (図 4)。

さらに、我々は、臨床で使用される抗がんナノ医薬品であるドキシルを使用して、Intralipid との併用治療効果を、2つの異なる固形腫瘍モデル (S180 および C26) を用いて検討しました。S180 腫瘍モデルにおいて、1.25 mg/kg の Doxil 単独治療では腫瘍成長を抑制することができませんでしたが、Intralipid (1 g/kg、24 時間前処置) と併用することで、腫瘍の成長が有意に抑制されました。この結果は、2.5 mg/kg の Doxil とほぼ同様であり、約 2 倍の高い治療効果が示されました。同様に、C26 腫瘍モデルでも、ドキシル単独治療に比べて、Intralipid 併用治療による明らかな抗腫瘍効果の増強が観察されました。

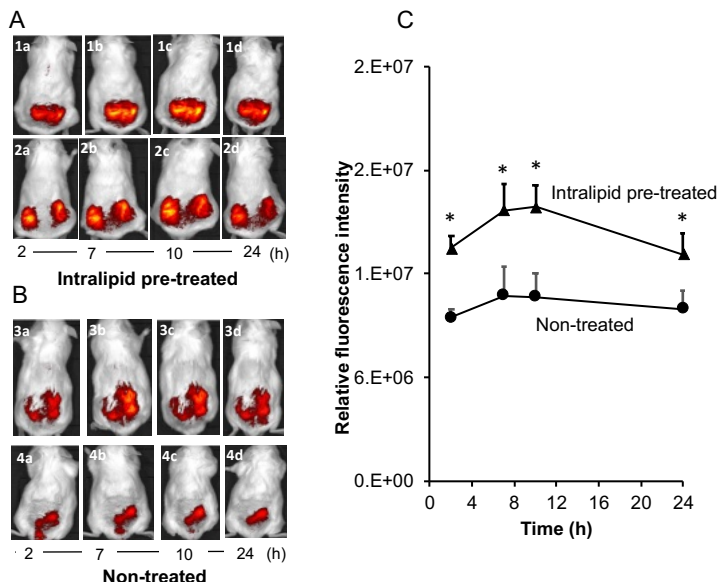


図4 Intralipid による抗がんナノメディシン P-PyF の腫瘍内集積の増加 (in vivo imaging)

6) ナノメディシンの血中動態 (Pharmacokinetics) に対する Intralipid の作用

Intralipid のナノメディシンの腫瘍内蓄積を増加させる可能なメカニズムについて、我々はまず Intralipid がナノメディシンの薬物動態に及ぼす影響に注目しました。蛍光ナノプローブ P-

PyF を用いた実験により、通常の ddY マウスにおいて、Intralipid 処理後 24 時間で P-PyF の血中半減期が有意に増加し、AUC 値も有意に増加したことが明らかになりました ($P = 0.002$) (図 5A)。しかし、S180 担癌マウスにおいては、Intralipid 処理が P-PyF の血中半減期に影響を与えなかったことが示されました (図 5B)。これらの結果は、正常なマウスでは

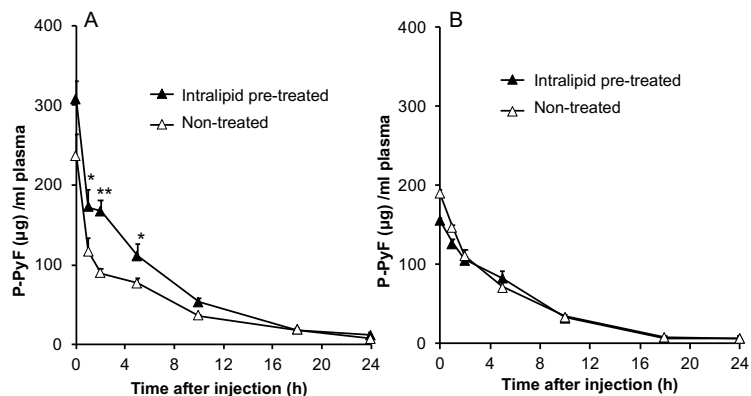


図 5 ナノメディシンの血中動態 (Pharmacokinetics) に対する Intralipid の作用

で、RES を抑制することにより血中半減期が増加するが、担癌マウスでは腫瘍がナノメディシンのもう一つの集積先となり、RES を抑制した結果、ナノメディシンがより多く代替ルート (腫瘍) に移動する可能性が示唆されました。

7) 血液粘度及び腫瘍血流に対する Intralipid の作用

Intralipid の前処置によるナノメディシンの腫瘍集積の増加に関する分子機構について、その血液粘度と腫瘍血流への影響を調べました。S180 担癌マウスに Intralipid (1 g/kg) 投与 24 時間後、血液粘度が有意に低下し、血流力学と血流が改善されたことを示唆しました (図 6A)。これをサポートするため、さらに Intralipid 治療後の腫瘍の血流を測定しました。予想通り腫瘍血流が大幅に改善されていることを確認しました。図 6B に示されるように、Intralipid 治療前には、腫瘍において血管が少ない、または血管が観察されない領域が多数存在しましたが、Intralipid 治療後には、多くの血管が観察され、腫瘍血流が回復または改善したことが示されました。

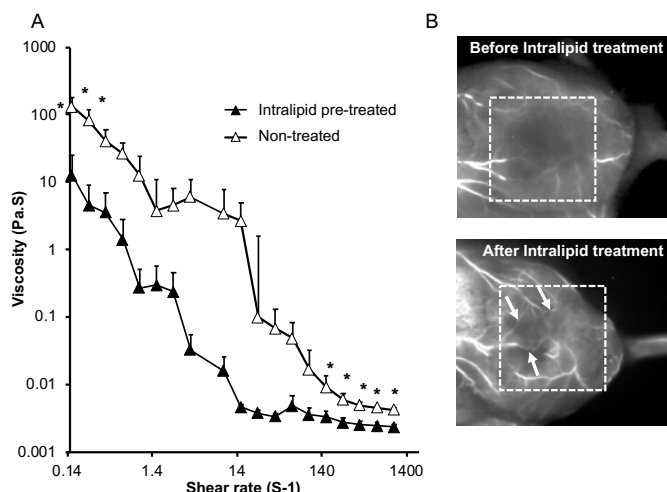


図 6 Intralipid による血液粘度の減少と腫瘍血流の増加

以上の研究結果から、Intralipid 処置は RES によるオフターゲットのナノメディシン送達を抑制するだけでなく、より重要なことに、腫瘍血流を改善することで ERP 効果を促進し、腫瘍へのナノメディシン送達を促進することが示されました。そのため、Intralipid とナノメディシンの併用治療は新たな抗がん戦略として、その臨床応用が期待されています。

<引用文献>

- 1) Nugent KM. Intralipid effects on reticuloendothelial function. *J Leukoc Biol.* 1984;36(2):123-32. doi: 10.1002/jlb.36.2.123.
- 2) Liu L et al. A New Approach to Deliver Anti-cancer Nanodrugs with Reduced Off-target Toxicities and Improved Efficiency by Temporarily Blunting the Reticuloendothelial System with Intralipid. *Sci Rep.* 2017;7(1):16106. doi: 10.1038/s41598-017-16293-6.
- 3) Tsoi KM et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nat Mater.* 2016;15(11):1212-1221. doi: 10.1038/nmat4718.
- 4) Fang J et al. N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide polymer conjugated pyropheophorbide-a, a promising tumor-targeted theranostic probe for photodynamic therapy and imaging. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;130:165-176. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.06.005.
- 5) Saisyo A et al. pH-sensitive polymeric cisplatin-ion complex with styrene-maleic acid copolymer exhibits tumor-selective drug delivery and antitumor activity as a result of the enhanced permeability and retention effect. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;138:128-37. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.032.
- 6) Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release.* 2012;160(2):117-34. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- 7) Fang J et al. Augmentation of EPR Effect and Efficacy of Anticancer Nanomedicine by Carbon Monoxide Generating Agents. *Pharmaceutics.* 2019;11(7):343. doi: 10.3390/pharmaceutics11070343.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Islam R, Maeda H, Fang J.	4. 巻 19(2)
2. 論文標題 Factors affecting the dynamics and heterogeneity of the EPR effect: pathophysiological and pathoanatomic features, drug formulations and physicochemical factors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Expert Opin Drug Deliv.	6. 最初と最後の頁 199-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17425247.2021.1874916.	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 該当する

1. 著者名 Islam R, Gao S, Islam W, Subr V, Zhou JR, Yokomizo K, Etrych T, Maeda H, Fang J.	4. 巻 126
2. 論文標題 Unraveling the role of Intralipid in suppressing off-target delivery and augmenting the therapeutic effects of anticancer nanomedicines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomater.	6. 最初と最後の頁 372-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2021.03.044.	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 該当する

1. 著者名 Fang Jun, Islam Waliul, Maeda Hiroshi	4. 巻 157
2. 論文標題 Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	6. 最初と最後の頁 142 ~ 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.addr.2020.06.005	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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rayhanul Islam, Hiroshi Maeda, Jun Fang
2. 発表標題 HPMA polymer conjugated pyropheophorbide-a, an acidic pH responsive nanoprobe for tumor-targeted photodynamic therapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rayhanul Islam, Marina R. Tavares, Vladimir Subr, Tomas Etrych, Hiroshi Maeda, Jun Fang
2. 発表標題 Tumor environment-responsive nanoprobe HPMA polymer conjugated pyropheophorbide a for tumor-targeted photodynamic therapy
3. 学会等名 第37回日本DDS学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rayhanul Islam, Waliul Islam, 前田 浩, 方 軍
2. 発表標題 Suppression of off-target delivery of nano-drugs and augmentation of therapeutic effect of nanomedicine by Intralipid
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rayhanul Islam, Waliul Islam, 前田 浩, 方 軍
2. 発表標題 Suppression of off-target delivery of nanomedicine and augmentation of therapeutic effect of nanomedicine by Intralipid
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Fang, Waliul Islam, Rayhanul Islam, Vladimir Subr, Tomas Etrych, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda
2. 発表標題 Improving therapeutic effect of nanomedicine by EPR enhancers.
3. 学会等名 83th Prague Meeting on Macromolecules (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 方 軍, Rayhanul Islam, Waliul Islam, Vladimir Subr, 前田 浩
2. 発表標題 一酸化炭素産生薬を用いるEPR効果増強法の検討
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Fang, Vladimir Subr, Waliul Islam, Steffen Hackbarth, Rayhanul Islam, Takuro Niidome, Tomas Etrych, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda
2. 発表標題 Polymeric pyropheophorbide-a, a promising tumor-targeted theranostic probe for photodynamic therapy and imaging
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Fang, Rayhanul Islam, Waliul Islam, Hiroshi Maeda
2. 発表標題 Augmentation of EPR effect and therapeutic efficacy of nanomedicine by carbon monoxide generating agents
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rayhanul Islam, Waliul Islam, Hiroshi Maeda, Jun Fang
2. 発表標題 Suppression of off-target delivery of nano-drugs and augmentation of therapeutic effect of nanomedicine by Intralipid
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

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

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
---------	---------