

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21101

研究課題名（和文）マルチスケール反応拡散モデル構築による薬物送達のための腹膜播種巣の統合的理解

研究課題名（英文）Integrated understanding of peritoneal dissemination for drug delivery based on multi-scale reaction-diffusion model

研究代表者

伊藤 大知（Ito, Taichi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：50447421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：胃がんや卵巣がんの腹膜播種は、腹腔内に広範囲にがん細胞が転移し、播種巣が形成される疾患である。本研究では、がん微小環境を反映した播種巣内部の反応拡散モデルと腹腔・全身循環を結合した新たなマルチスケール薬物動態モデルを構築した。構築したモデルにより、抗がん剤を腹腔投与した際の腹膜播種への送達挙動やその種差による違い、ハイドロゲルを用いて徐放化した際の効果などについて、定量的に議論することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜播種治療において、無数に広がる転移巣を効果的に治療可能な抗がん剤送達期待されるが、薬物送達の「ラスト・ワン・マイル」である播種巣中での薬物やDDSキャリアの組織浸透性が低く、現在でも完治が非常に困難である。本研究で構築したモデルにより、システムの理解に基づく定量的なDDSキャリア設計が可能となり、腹膜播種の治療成績向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Peritoneal dissemination is a metastatic form of gastric or ovarian cancer that forms numerous small tumor nodules dispersed throughout the peritoneal cavity. In this study, we developed a novel multi-scale pharmacokinetic model via integrating reaction-diffusion inside tumor nodule, transport through peritoneal membrane, and systemic circulation. The developed model enabled quantitative discussion on delivery behavior of intraperitoneally administered drugs, difference between different species, and effect of controlled release using drug-loaded hydrogel.

研究分野：医用化学工学

キーワード：DDS マルチスケール 腹膜播種 反応拡散 数理モデル

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌や卵巣癌などの原発癌からがん細胞が腹腔内に広がり、小さい無数の播種巣を形成する癌の転移形式である。外科手術単独による治療は困難であることから、主にパクリタキセルやシスプラチンなどの抗がん剤の静脈投与が行われている。しかし、生存時間中央値は胃癌腹膜播種において12か月に留まり、予後は極めて不良である[1]。そのため、播種巣に高濃度で薬物を暴露できる抗がん剤の腹腔内投与が期待されている。

これに加え、近年ではミセル、リポソーム、ナノゲルなどのキャリアへの抗がん剤の封入やハイドロゲル、スポンジなどを用いた徐放が腹膜播種治療に向けて検討されている[2-4]。しかし、薬物送達の「ラスト・ワン・マイル」である播種巣中での薬物やDDSキャリアの組織浸透性が低く、現在でも完治が非常に困難である。これらの薬物送達システム的设计のためには、数理モデルの利用が有効であると期待される。しかし、播種巣を微小環境の異なる三層の球と仮定し、播種巣内の輸送と全身循環をカップリングすることでパクリタキセルを腹腔内投与した際の播種巣への送達過程を計算したモデルは報告されているものの[5]、薬物キャリアの腹膜播種への送達に関するモデルは報告されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、がん微小環境を反映した播種巣内部の反応拡散モデルと腹腔・全身循環を結合した新たなマルチスケール薬物動態モデルを構築することを目的とした。さらに、構築したモデルを用いて、薬物送達の手法の一つであるゲルを用いた徐放の影響の検討を行った。これらの検討により、腹膜播種の治療効果向上の指針を得ることを目指した。

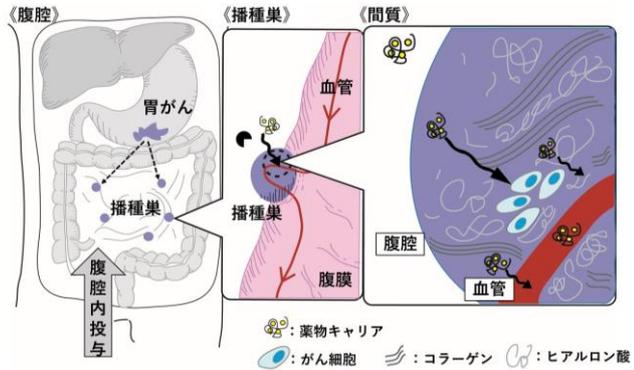


Fig. 1. 腹膜播種に対する薬物キャリアの腹腔内投与の概念図

3. 研究の方法

播種巣内でのパクリタキセルの拡散、移流、細胞内への取り込み、全身の血循環への移行を、既往の文献[3]に基づきモデル化した。播種巣として Fig. 2 に示す3層で構成される構造を仮定し、播種巣中の間質における薬物の物質収支の式を以下のように記述した。

$$\phi_i \frac{\partial C_{t,u}}{\partial t} = -\nabla \cdot J_{s,i} + \frac{S_v}{V_t} J_{s,t} - \phi_c \frac{\partial C_{t,b}}{\partial t}$$

ここで $\phi_i[-]$ は播種巣中の間質の体積分率を、 $\phi_c[-]$ は播種巣中の細胞の体積分率を、 $C_{t,u}[\text{mol}/\text{m}^3]$ は間質中の薬物濃度を、 $C_{t,b}[\text{mol}/\text{m}^3]$ は細胞に結合した薬物濃度を、 $J_{s,i}[\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)]$ 及び $J_{s,t}[\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)]$ はそれぞれ間質中及び播種巣中の血管壁を介した薬物輸送フラックスを、 $S_v/V_t [1/\text{m}]$ は播種巣体積当たりの血管の表面積を表す。

また、細胞への結合は以下の式で記述した。

$$\frac{\partial C_{t,b}}{\partial t} = k_{\text{assoc}} C_{t,u} (B_{\text{max}} - C_{t,b}) - k_{\text{dissoc}} C_{t,b}$$

ここで $k_{\text{assoc}}[\text{m}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})]$ は薬物の細胞へ結合速度定数を、 $B_{\text{max}}[\text{mol}/\text{m}^3]$ は細胞に結合する薬物濃度の最大量を、 $k_{\text{dissoc}}[1/\text{s}]$ は薬物の細胞からの解離速度定数を表す。

間質中及び血管壁の薬物輸送フラックス $J_{s,i}$ 及び $J_{s,t}$ は以下の式で表される。

$$J_{s,i} = u_i C_{t,u} - \nabla(DC_{t,u})$$

$$J_{s,t} = J_v(1 - \sigma_p)ppl \cdot C_p + P_d(ppl \cdot C_p - C_{t,u}) \frac{Pe}{\exp(Pe) - 1}$$

ここで $u_i[\text{m}/\text{s}]$ は間質中を流れる水の線速を、 $D[\text{m}^2/\text{s}]$ は間質中の拡散係数を、 $J_v[\text{m}/\text{s}]$ は血管から間質中に流れる間質液の線速を、 $\sigma_p[-]$ はパクリタキセルの血管壁に対する反射係数を、 $ppl[-]$ は血中の薬物のうち血漿タンパクに吸着していない割合を、 $P_d[\text{m}/\text{s}]$ は血管の透過係数を、 $Pe[-]$ は間質中の物質移動のペクレ数を表す。

また、線速 u_i 及び J_v はダルシーの法則及びスターリングの式を用いて以下のように表せる。

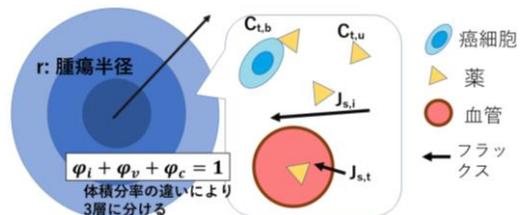


Fig. 2. モデルで仮定した播種層の構造の概念図

$$\vec{u}_i = -K\nabla P_i$$

$$\nabla \cdot \vec{u}_i = \frac{S_v}{V_t} J_v = L_p \frac{S_v}{V_t} (P_v - P_i - \sigma_v(\pi_v - \pi_i))$$

ここで $K[m^2/(Pa \cdot s)]$ は播種巣中の透水係数を、 $P_i[Pa]$ は間質内圧力を、 $L_p[m^2/(Pa \cdot s)]$ は血管の透水係数を、 $P_v[Pa]$ は血管内圧力を、 $\sigma_v[-]$ は血漿タンパクの血管壁に対する反射係数を、 $\pi_i[Pa]$ 及び $\pi_v[Pa]$ はそれぞれ間質及び血管の浸透圧を表す。

この播種巣と腹腔、血管、リンパ管の4つのコンパートメントモデルを仮定し、Fig. 3 に示すスキームでコンパートメントモデルを構築した。4つのコンパートメントの物質収支式は、それぞれ以下のように立式した。この時、腹膜を透過する物質及び腹腔液の収支の検討には、腹腔と腹壁中の血管との間の物質収支のモデル化に用いられている three-pore model を用いた。

$$V_{ip} dC_{ip}/dt = -F_L C_{ip} + S(J_{s,u,i} + J_{s,s,i} + J_{s,L,i}) - n \times J_{s,i} (\text{播種巣表面}) \times A$$

$$V_L dC_L/dt = F_L(C_{ip} - C_L)$$

$$V_p dC_p/dt = F_L C_L - S(J_{s,u,i} + J_{s,s,i} + J_{s,L,i}) - k_{el} \times C_p - n \times J_{s,t} \times \phi_v \times V_t$$

$$\phi_i dC_t/dt = -\nabla \cdot J_{s,i} + J_{s,t}$$

ここで、 $J_{s,u,i}$ はアクアポリンに対応する ultrasmall pore、 $J_{s,s,i}$ は small pore、 $J_{s,L,i}$ は large pore を透過するフラックス[12]、 ϕ_v はそれぞれ播種巣の血管の体積分率を、 A は播種巣の表面積を表す。これらの式を COMSOL Multiphysics を用いた有限要素法により解くことで、腹腔内投与されたパクリタキセルの動態を計算した。計算に用いた各定数パラメータの値は Table 1 に示す。

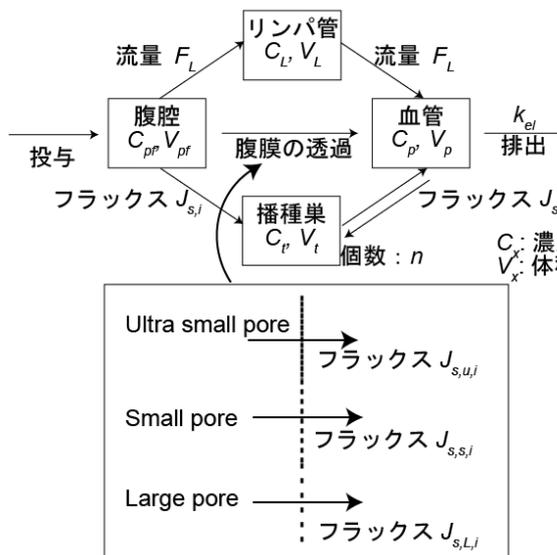


Fig. 3 全身循環モデルの概念図

Table. 1 各パラメータの値

記号	値	引用
L_p	$1.86 \times 10^{-7} \text{ cm} / \text{mmHg/s}$	[5]
P_d	$2.0 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$	[5]
P_v	20 mmHg	[7]
P_{iv}	10 mmHg	[8]
π_i	19.8 mmHg	[5]
π_v	17.3 mmHg	[5]
σ_v	0.0012	[5]
σ_p	2.5×10^{-5}	[5]
B_{max}	$81.8 \mu\text{M}$	[5]
k_{assoc}	$1.64 / \mu\text{M/h}$	[5]
k_{dissoc}	$0.462 / \text{h}$	[5]
V_{ip}	$5.0 \times 10^{-5} \text{ m}^3$	[9,10]
V_D	$4.6 \times 10^{-3} \text{ m}^3$	—
V_L	$4.6 \times 10^{-4} \text{ m}^3$	—
F_L	$4.8 \times 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$	[10]
S_p	1.7 m^2	[11]
k_{el}	20 ml/min/m^2	[12]

4. 研究成果

構築したモデルを用いて、まず腹腔内に投与した薬物がどのように腹腔からクリアランスされていくかの検討を行った。120 mg のパクリタキセルを溶解した 1L の生理食塩水を腹腔内に一回で投与したという仮定のもと、腹腔内からのパクリタキセルの輸送を計算した。シミュレーションから得られた腹腔内のパクリタキセル濃度の時間変化から半減期を求めたところ、半減期は 13 時間であった。臨床において、同条件でパクリタキセルを腹腔内投与した際の腹腔内濃度の半減期は、7.5 時間であると報告されている[4]。シミュレーションで得られた半減期は臨床の値と同程度であり、この結果から、本研究で構築されたモデルによる計算結果の妥当性が示唆された。腹腔中のパクリタキセルの血中への輸送を腹膜の各孔及びリンパ液ごとに分割した結果を Fig. 4 に示す。孔径がパクリタキセルのサイズに比べて小さすぎるため、パクリタキセルは Ultrasmall pore を透過しなかった。また、その他の各経路のクリアランス速度は、Large pore > Small Pore > リンパ節の順であった。この理由を考察するために、腹膜の孔を透過する時の

物質移動のペクレ数を計算したところ、Small pore では $0.02 \sim 0.09$ 、Large pore では $0.012 \sim 0.013$ となった。この結果から、孔の透過においては移流よりも拡散の方が支配的であり、そのためより拡散の障害の少ない Large Pore からの輸送が最も速かったものと考えられる。また、各 pore による腹膜を介したパクリタキセルの輸送量の総量と、リンパ管を介した輸送を比較すると、腹膜を介した輸送の方が 1 桁以上多いという結果になった。これらの結果から、腹腔内から血管へのパクリタキセルの輸送においては、リンパ管による輸送よりも腹膜の透過による輸送の方が支配的であることが示唆された。

またこの投与条件下における播種巣へのパクリタキセルの浸透を評価した結果を Fig. 5 に示す。時間の経過と共に、パクリタキセルが腫瘍内部へと浸透していく様子が確認された。一方で、6 時間経過後も浸透の深さは限定的であり、腫瘍中心部へはパクリタキセルが十分に送達されていない可能性も示唆された。これは、腫瘍中の ECM が過剰に産生されることで高密度となり、パクリタキセルの拡散が阻害されていることが原因であると考えられる。これに加え、輸送の各パラメータの感度を解析した結果、腫瘍中の高い間質圧による移流の障害も、浸透性の低さに大きく寄与することが示唆されている。

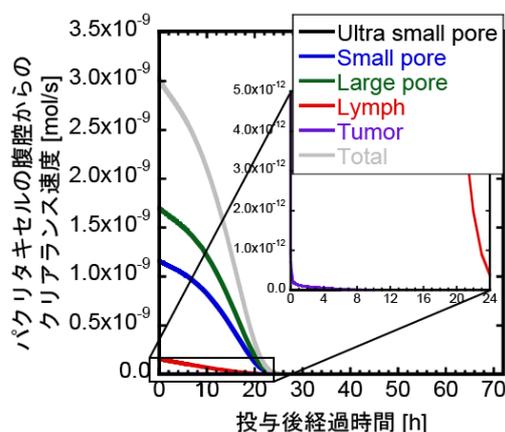


Fig.4 腹腔からの各経路によるパクリタキセルのクリアランス速度の比較

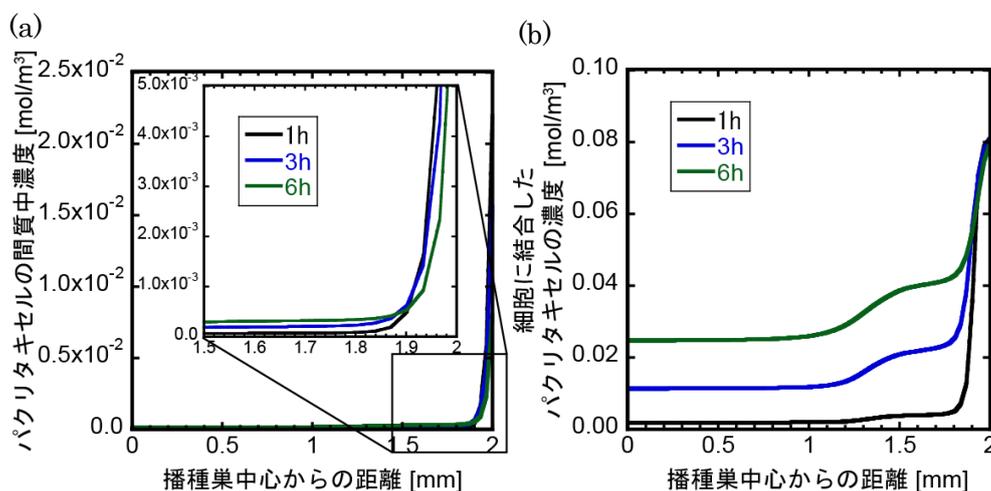


Fig. 5 播種巣中の(a)間質中及び(b)細胞に結合したパクリタキセルの濃度

続いて、異なる動物種に抗がん剤を投与した際の体のサイズの違いが、上記で観察された薬物の送達過程に及ぼす影響を検討するために、マウスのパラメータを用いたモデルを構築した。体重当たりのパクリタキセルの投与量を揃え、播種巣中のがん細胞に結合したパクリタキセル濃度をヒトとマウスで比較した結果を Fig. 6 に示す。体重当たりの投与量を揃えたにもかかわらず、両者の間には明確な違いが観察された。これは、ラットとヒトで体重当たりの腹膜面積及び腹腔液の体積、及び毛細管圧や腹腔内圧などのパラメータが異なり、これらにより体重を基準として考えた時の輸送フラックスが変化したためだと考えられる。抗がん剤および薬物キャリアの開発において、動物実験の結果をヒトへの適用に外挿する上で、種差による送達挙動の違いは大きな課題であり、本モデルでの検討の結果は、この課題の解決に寄与することが期待される。

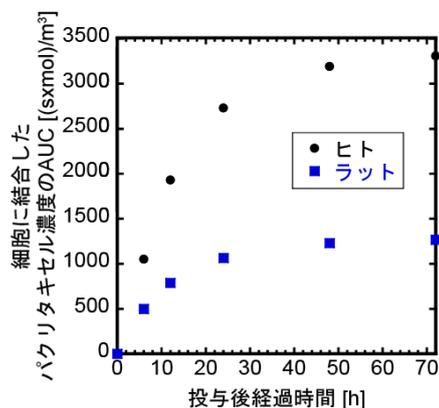


Fig.6 ヒトとラットでのパクリタキセル送達挙動の違い

以上で構築されたモデルを用いて、パクリタキセルを封入したゲルを腹腔に投与し、ゲルからの徐放によって腹腔中の濃度を高く保った場合の効果について検討を行った。パクリタキセルの徐放速度として、以下に示す 1 次徐放を仮定して計算を行った。

$$r = -\frac{dC_{gel}}{dt} = k_{rel}C_{gel}$$

ここで r [mol/(m³・s)]はゲルからのパクリタキセルの徐放速度を、 k_{rel} [1/s]はパクリタキセルの徐放の速度定数をそれぞれ表す。徐放開始後 72 時間で封入したパクリタキセルのうち 90%以上が徐放されるように、 k_{rel} の値を設定した($k_{rel} = 1.0 \times 10^{-5}$ [1/s])。この条件の下で播種巣へ取り込まれた薬物濃度の計算を行い、播種巣内の細胞に結合した薬物濃度の時間曲線下面積(Area under the curve: AUC)を以下の式を用いて求めた。

$$AUC = \int_0^t C_{t,b} dt$$

この検討結果の比較のため、パクリタキセルをゲルに封入せず腹腔中及び静脈中に投与した場合についても、投与するパクリタキセルの総量が同じになるように初期濃度を設定して計算を行った。この時、条件を揃えて比較を行うため、薬液投与による腹腔液、血液の体積増加は起こらないものとした。AUCを比較した結果を Fig. 7 に示す。投与直後の AUC は腹腔投与、静脈投与、ゲルの腹腔投与の順に高くなること分かった。これに対し、投与後時間が経過するとゲルの腹腔投与における AUC が高くなり、48 時間以降では他の投与方法と比較して AUC が最大になった。一方で、この時の間質中のパクリタキセルの濃度を比較すると、腫瘍中心でのパクリタキセル濃度はヒト胃癌細胞 MKN-45 を用いた *in vitro* 実験で求められた IC50 よりも低かった (Fig. 8) また、徐放の利用により播種巣だけでなくその他の正常組織に対する暴露量が抑制されることで、副作用の抑制にもつながることも示唆された。以上の結果から薬物送達システムとして徐放を用いた時の利点と欠点の両方が確認された。

以上、本研究での検討により、腹膜播種の播種巣に対し、パクリタキセルを投与した時の薬物送達の検討を行うための新規薬物循環モデルを構築することができた。腹腔から血中への腹膜を介した輸送を、three-pore model を用いて検討することで物質のサイズの影響及び投与に用いた液体の影響の検討を可能にした。またマウスのパラメータを使用したモデルを構築することで、薬物送達挙動の種差による違いを議論することが可能となった。さらに、ゲルからのパクリタキセルの徐放の影響を組み込むことで、薬物送達システムとして徐放を用いた際の利点と欠点の両方を議論することが可能となった。

参考文献

- [1] F. Coccoloini et al., *World Journal of Gastroenterology*, 19(41), (2013), 6679-6840
- [2] S. Emoto et al., *Surgery Today*, 44, (2019), 919-926
- [3] Y. Amano et al., *Molecular Pharmaceutics* 19, (2022), 853~861
- [4] K. Yamaguchi et al., *Molecular Pharmaceutics* 18, (2021), 4090~4098
- [5] J. L. -S. Au et al., *The APPS Journal*, 16(3), (2014), 424-439
- [6] 古居奈歩ほか, *医療薬学*, 29(3), (2003), 263-269
- [7] C-H. Heldin et al., *Nature Reviews Cancer*, 4, (2004), 806-813
- [8] A. Al-Hwiesh et al., *Peritoneal Dialysis International*, 31(3), (2011), 315-319
- [9] 友森 佐規子, *体腔液検査の基礎*, 第 1 回一般検査研修会
- [10] S. C. Blackburn et al., *Seminars in Pediatric Surgery*, 23, (2014), 326-330
- [11] B. Rippe and G. Stelin, *Kidney International*, 35, (1989), 1234-1244
- [12] 医薬品インタビューフォーム, タキソール 注射液, 2018 年 2 月改訂(第十版)

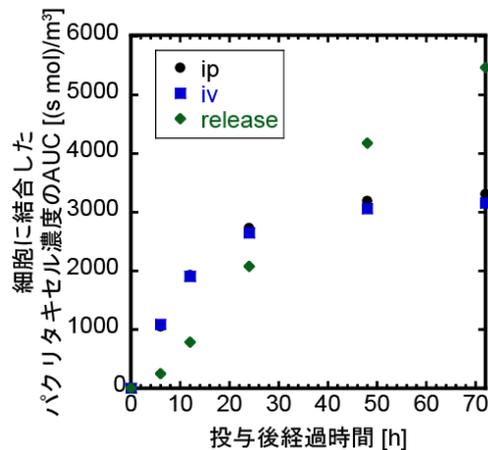


Fig. 7 投与方法 (ip: 腹腔投与、iv: 静脈投与、release: ゲルを用いた投与) ごと播種巣内の細胞に結合した薬物濃度の AUC の時間変化

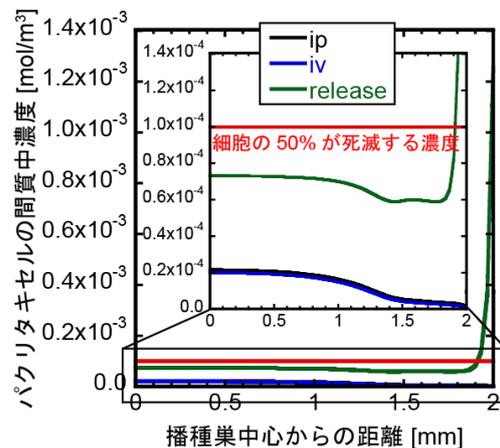


Fig. 8 投与後 48 時間後における投与方法ごとの播種巣内の間質中の薬物濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamaguchi Kohei, Hiraike Osamu, Iwaki Haruna, Matsumiya Kazuki, Nakamura Noriko, Sone Kenbun, Ohta Seiichi, Osuga Yutaka, Ito Taichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of a Cisplatin-Loaded Nanogel through a Hybrid System Containing an Alginate Acid-Based Nanogel and an <i>In Situ</i> Cross-Linkable Hydrogel for Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4090 ~ 4098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00514	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 Amano Yuki, Sakura Kazuma L., Ohta Seiichi, Ito Taichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Cisplatin-Chelated Iminodiacetic Acid-Conjugated Hyaluronic Acid Nanogels for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 853 ~ 861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00797	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7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤大知
2. 発表標題 Injectableハイドロゲルを用いた癒着防止材・止血剤・ドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 第27回次世代医工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤大知
2. 発表標題 DDSの基礎とハイドロゲルの活用
3. 学会等名 情報機構セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩城晴奈・Arvind Singh Chandel・戚蟠・太田誠一・伊藤大知
2. 発表標題 インクジェットプリンティングを用いたシスプラチン徐放シートの開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩城晴奈・戚蟠・太田誠一・伊藤大知
2. 発表標題 腹膜播種治療に向けたインクジェットプリンティングによるシスプラチン徐放シートの開発
3. 学会等名 第20回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田昂大・太田誠一・伊藤大知
2. 発表標題 腹膜播種治療のための腹腔内薬物所法システムの数理モデルを用いた設計
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田昂大・太田誠一・伊藤大知
2. 発表標題 Three-pore modelを用いた腹膜播種への薬物送達モデルの構築
3. 学会等名 膜シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田昂大・太田誠一・伊藤大知
2. 発表標題 腹膜播種への薬物送達システムの数理モデルを用いた設計
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	太田 誠一 (Ohta Seiichi) (40723284)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	

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