

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04831

研究課題名（和文）高分子薬の有効化に寄与する癌微小環境改善薬の開発

研究課題名（英文）A strategy for improving tumor microenvironment that contributes to the efficacy of macromolecular drugs.

研究代表者

山本 浩文（Yamamoto, Hirofumi）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30322184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,500,000円

研究成果の概要（和文）：癌周囲の微小環境の中でも高い間質液圧は薬剤の到達を妨げている。Pre実験によって、細胞表面と間質の主基質であるコラーゲンとの接着に働く Integrin 1 (ITGB1) に注目した。ITGB1は2価イオンであるカルシウムによって折りたたまれた不活性型構造を取る。HT29細胞をコラーゲン上に撒き、カルシウムまたはカルシウムを含有するナノ粒子を添加すると活性型ITGB1が減少した。動物実験でも、カルシウム含有ナノ粒子の静注により腫瘍部のカルシウム濃度の上昇がみられ、腫瘍間質液圧が低下した。このことから、腫瘍周囲の間質を制御する薬剤としてカルシウムを含むナノ粒子が有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌周囲の高い間質液圧は薬剤の到達を妨げている。細胞表面と間質の主基質であるコラーゲンとの接着に働く Integrin 1 (ITGB1) に着目した。ITGB1は2価イオンであるカルシウムによって不活性型構造を取ることから、カルシウム含有ナノ粒子の Maus への静注により、腫瘍間質液圧が低下し、高分子物質の腫瘍への集積が高まった。このことから腫瘍周囲の間質を制御する薬剤としてカルシウムを含むナノ粒子が有用である可能性が示唆された。本研究の成果は、薬剤の副作用の低減や、高価な生物学的製剤等の投与量を抑えることに繋がることから極めて重要な知見といえる。

研究成果の概要（英文）：It was found that sCA negatively regulated the cell adhesion to cancer stroma possibly by inactivation of integrin 1 (ITGB1) in cancer cell lines. On the other hand, Mg was found to restore cell adhesion. Intravenous administration of sCA reduced interstitial fluid pressure (IFP) in tumor-bearing mice, leading to increased accumulation of macromolecule in tumors. Furthermore, administration of Mg to these mice increased the tumor residence of the macromolecule. These results suggest that the administration of sCA or Mg can cause changes in the microenvironment of tumor tissue, thereby contributing to control the amount and retention of macromolecular drugs in tumors.

研究分野：医学、消化器外科学

キーワード：癌微小環境 高分子医薬 DDS インテグリンB1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

試験管内では優れた抗腫瘍効果を発揮する制癌剤が、ヒトの生体内では固形癌に対しての治療効果が不十分となる原因は、(1)薬剤を運ぶ腫瘍血管は腫瘍内部で均一ではなく、少なからず血流の乏しい部分があるため腫瘍全体に薬剤を浸透させることができず、腫瘍血管から高分子が漏れ出し腫瘍内に停留する EPR (Enhanced permeability and Retention) 効果も限局的となること、(2)さらに腫瘍間質の圧力(間質液圧 IFP: interstitial fluid pressure)が亢進しており、腫瘍血管から漏れ出した薬剤が腫瘍細胞に辿り着くことを阻んでいることである。固形癌の微小環境を改善することで薬剤の本来のポテンシャルを引き出すことで奏効率が向上し、あるいは薬剤の投与量を減らすことができれば医療費削減にも繋がる。

### 2. 研究の目的

従来から癌の微小環境を改善する分子として Integrin 1(ITGB1)や TGF が報告されていたが、全身投与の際に起こる副作用の問題のために実際には使われていない。我々が siRNA や miRNA の DDS(Drug delivery system)として開発してきた sCA(super carbonate apatite)は血中の高分子医薬品の腫瘍移行性を向上させる特性を有する。そこで、そのメカニズムを明らかとして、癌の微小環境を改善する薬剤を開発することで、高分子製剤のもつ本来の効能を最大限に引き出すことを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)大腸癌細胞株を用いて、癌間質液圧を低下させると既報のある Integrin 1 や TGF について複数の siRNA からノックダウン効率の良い siRNA をひとつ選別する。HT29 細胞担癌(皮下腫瘍)マウスを作製し、選定した siRNA によって高分子抗癌剤 P-THP\*の腫瘍への取り込み増強効果を検討する(図1)。\*P-THP は水溶性ポリマーであるポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド (Poly (N- (2-Hydroxypropyl) methacrylamide: PHPMA) と抗癌剤のピラルビシン (pirarubicin: THP)が結合した高分子抗癌剤であり、特有の蛍光を発することで腫瘍への取り込みが測定できる。

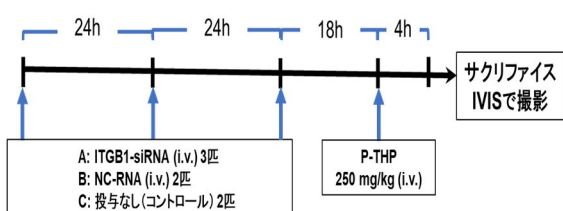


図1. 実験スキーム: HT29 担癌マウスに ITGB1-siRNA または TGFB1-siRNA を搭載した sCA を3回静注し、18時間後に P-THP を静注して、その4時間後に腫瘍への集積を IVIS で測定した。

(2)コラーゲン Type I-C コートプレートに大腸癌細胞 HT29 を接着させ、 $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  による細胞接着性の影響を検討した(図2, 3)。

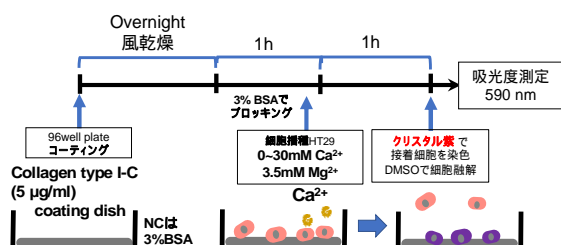


図2. 実験スキーム: BSA でブロッキングを行い、細胞を播種した。Mg は一定にして、Ca 濃度を変化させて添加、1時間後にクリスタルバイオレットで接着細胞を染色し、DMSO で融解した後に、色素の吸光度(590 nm)を測定した。

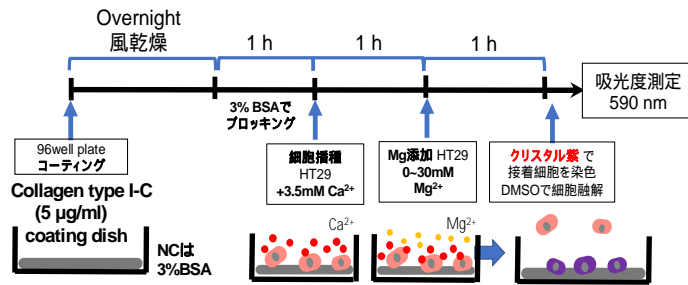


図3. 細胞播種と共にCaを3.5mM添加してから、1時間後にMg濃度を振って添加した。その1時間後にクリスタルバイオレットで接着細胞を染色し、色素を測定した。

(3)Ca や sCA を大腸癌細胞株に曝露させて ITGB1 の構造変異への影響を検討した。構造変化の分析には活性型 ITGB1 を認識する特異抗体 12G10 および非活性型 ITGB1 に対する特異抗体 mAb13 を用いた。

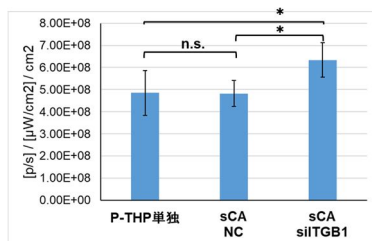
(4) <sup>44</sup>Ca 同位体を用いて sCA を作製し、腫瘍部における Ca 濃度を測定した。sCA を静注した後、微細圧モニターを腫瘍に穿刺し、腫瘍間質液圧を経時的に測定した。

(5)担癌マウスを作製し、sCA と Mg を併用した時の経時的な腫瘍への取り込みを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ITGB1 や TGFβ1 のノックダウンによる高分子抗癌剤 P-THP の腫瘍集積性に及ぼす影響マウス皮下に HT29 細胞を移植し図 1 示す実験方法によって検討した。結果として ITGB1-siRNA 投与群では P-THP の腫瘍集積は有意に上昇したが、TGFβ1-siRNA 投与群では有意ではなかった (図 4)。

##### ITGB1



##### TGFβ1

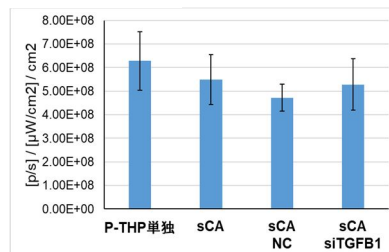


図4. 腫瘍へのP-THPの取り込みをIVISで定量した。ITGB1をノックダウンした群では腫瘍への取り込みが有意に上昇した。\*P < 0.05。

(2) Ca と Mg の添加が大腸癌細胞の接着性に及ぼす影響について

大腸癌細胞 HT29 とコラーゲン基質との接着において Ca, Mg の添加による細胞接着への影響を調べた。その結果、一定量の Mg 存在下に Ca を添加する系では (図 2) Ca 濃度が高くなると HT29 のコラーゲン Type I-C への接着が減少した (図 5)。また Ca の存在下で接着性が低下した状態で Mg を投与する系では (図 3)、Mg 濃度依存性に接着性が回復した (図 6)。

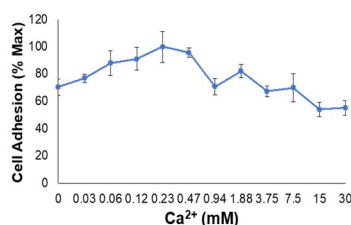


図5. Mg 一定、Ca を増やすと接着は減少

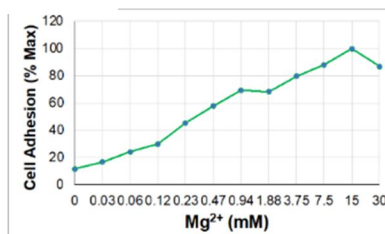


図6. カルシウム一定、Mg を増やすと接着は増加

(3) Ca 又は sCA が ITGB1 の構造変化に及ぼす影響について

ITGB1 は Mg 存在下では活性型の構造を取り、コラーゲンと細胞表面との接着に中心的な役割を果たす。しかし、Ca 存在下では Head 部分が折りたたまれて接着分子としての機能を発揮出来なくなる。そこで、Type IV コラーゲンをコートしたディッシュ上で培養した HT29 に Ca を添加し 24 時間後に、活性型 ITGB1 を認識する抗体 12G10 又は非活性型 ITGB1 を認識する抗体 mAb13 を用いて蛍光免疫染色を行いそれぞれの ITGB1 の発現を観察した。Ca の濃度の上昇に伴って活性型 ITGB1 は減少し非活性型 ITGB1 は増加した ( 図 7 A , B )。sCA の添加によっても (Ca 濃度としては 0.5mM に相当) 活性型 ITGB1 は消失した。

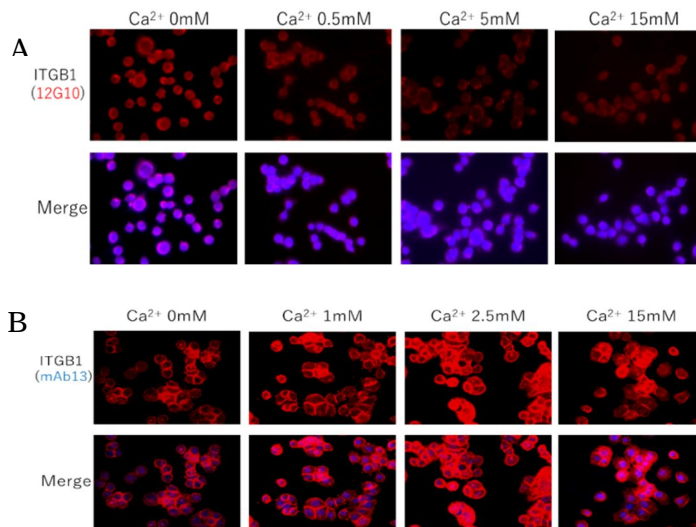


図 7. Ca が ITGB1 の構造変化 ( 活性 ) に及ぼす影響を検討した。HT29 を Type IV コラーゲンコートしたディッシュに播種した。写真上部に記載した濃度になるように  $Ca^{2+}$  を添加した後 24 時間に (A) 12G10 又は (B) mAb13 を用いて蛍光染色を行った。

(4) sCA 投与が腫瘍内 Ca 濃度と腫瘍間質液圧に及ぼす影響について

$^{44}Ca$  同位体を用いて sCA を作成し、sCA の静注後の腫瘍内 Ca 量を測定した。その結果、静注後、2 時間でピークに達し、その後減衰した ( 図 8 )。

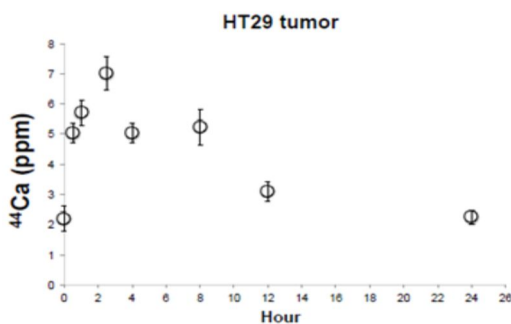


図 8 . sCA 静注によるマウス腫瘍 (HT29) の間質液圧の変化 (A) 腫瘍部での Ca 濃度 : マウス担癌モデルに  $^{44}Ca$  同位体を用いて作成した sCA を静注し、腫瘍部でのカルシウム濃度を経時的に測定した。静注後速やかに腫瘍部での Ca 濃度は上昇し、2 時間でピークに達した。

次いで微細圧センサーを腫瘍に穿刺して腫瘍間質液圧をモニター測定した。その結果、sCA 静注後 2-4 時間では有意に間質液圧が低下し、10-11 時間で回復した ( 図 9 )。sCA の投与後 2 時間で腫瘍内の Ca 量が増加し、それに呼応して間質液圧の低下が認められたことから sCA から遊離した Ca が腫瘍間質液圧の低下に關与することが示唆された。

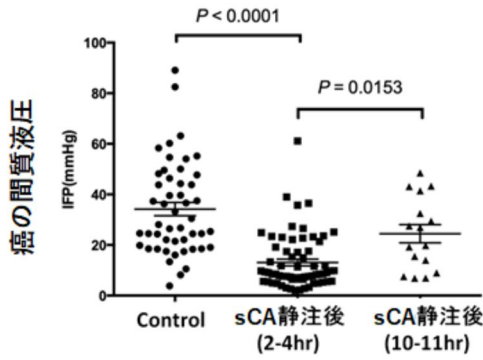


図 9. 腫瘍間質圧測定 sCA 静注後、腫瘍間質液圧は有意に減少した。

(5) 腫瘍内薬剤停留時間に Mg の後行投与が及ぼす影響について

sCA に含まれる Ca が細胞接着を弱め、間質に隙間が生じ薬剤が浸透しやすくなることが想定された。一方で Mg は in vitro 実験では sCA の主成分である Ca により弱められた細胞とコラーゲンの接着を増強することが明らかとなった。これらの結果から、sCA によって薬剤を送達した後 Mg<sup>2+</sup> を後行投与し、一旦弱まった細胞・間質間の接着を再び増強することで、薬剤の腫瘍内保持時間が延長できないか検討した。Alexa750 で蛍光標識した核酸を内包した sCA の静注後に MgSO<sub>4</sub> を低用量または高用量の 2 種類で静注し、蛍光核酸の腫瘍移行量を IVIS により測定した (図 10)。その結果、sCA の投与後に低用量の MgSO<sub>4</sub> を投与することで sCA の腫瘍停留時間を延長することができた。

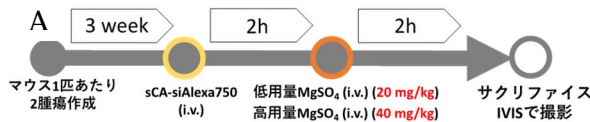
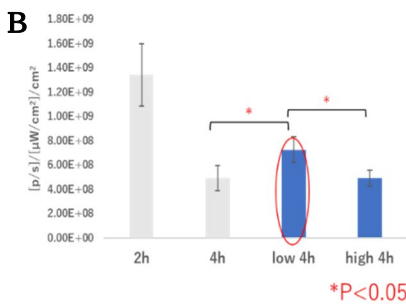


図 10. HT29 担癌マウスにおける Mg 後行投与による sCA 内包 siAlexa750 集積性の検討



(A)実験スキーム。Alexa750 標識した核酸を内包した sCA 投与して 2 時間後と 4 時間後に IVIS で腫瘍内核酸濃度を測定した。比較群として核酸を投与して 2 時間後に低・高濃度で Mg を静注し、その 2 時間後(核酸投与後 4 時間)に腫瘍内に残存する核酸量を IVIS で測定した。(B) sCA 投与 2 時間後に腫瘍内核酸濃度はピークに達し、4 時間後には減衰した。低濃度 (20mg/kg) Mg 投与群では 4 時間後の腫瘍残存核酸量が有意に増加した。\*P<0.05。

(まとめ)プレ実験で腫瘍間質を攻略する分子として ITGB1 が有効であることがわかった。siRNA の 3 回投与 (1 ~ 3 日間) でマウス腫瘍での ITGB1 発現を抑えることはできるが、腫瘍局所の Ca 濃度を上昇させることで、短時間で ITGB1 の非活性化を惹起することが出来ることから、カルシウムを含んだ sCA そのものが間質液を低下させる微小環境改善薬となることが明らかとなった。更に Mg を後行投与することで腫瘍からの薬剤退出を遅らせることが可能であり、治療効果を増強する可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xin Wu, Yuhki Yokoyama, Hidekazu Takahashi, Shihori Kouda, Hiroyuki Yamamoto, Jiaqi Wang, Yoshihiro Morimoto, Kazumasa Minami, Tsuyoshi Hata, Awad Shamma, Akira Inoue, Masahisa Ohtsuka, Satoshi Shibata, Shogo Kobayashi, Shuji Akai, Hirofumi Yamamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Improved In Vivo Delivery of Small RNA Based on the Calcium Phosphate Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm11111160	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本浩文
2. 発表標題 核酸医療のための新しいリン酸カルシウム法の確立
3. 学会等名 第30回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021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	安藤 幸滋 (Ando Koji)  (20608864)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	
研究分担者	中川 貴之 (Nakagawa Takayuki)  (40447363)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授  (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	赤井 周司  (Akai Shuji)  (60192457)	大阪大学・大学院薬学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	横山 雄起  (Yokoyama Yuhki)  (60615714)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	森 正樹  (Mori Masaki)  (70190999)	東海大学・医学部・特任教授   (32644)	
研究分担者	伊藤 心二  (Itoh Shinji)  (90382423)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	
研究分担者	江口 英利  (Eguchi Hidetoshi)  (90542118)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授   (14401)	

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