

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07167

研究課題名（和文）自己血小板を利用したDDS 肝癌・血小板相互作用を逆手にとった新たな治療戦略

研究課題名（英文）DDS using autologous platelets: a new therapeutic strategy to reverse the hepatocarcinoma-platelet interaction

研究代表者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70596155

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）：本研究では、腫瘍と血小板の相互作用を利用すると、腫瘍阻害剤を封入した血小板が腫瘍治療のための薬物キャリアとして機能するという仮説を立てラットの肝発癌モデルを用いて実証した。ソラフェニブまたはレンパチニブを、in vitroで担癌ラットより単離した血小板に封入して治療を行った（週2回、10週間）。その結果、SOR-PLTまたはLEN-PLTの腫瘍組織では広範な腫瘍壊死が観察され、明らかな治療効果があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ソラフェニブの臨床応用により、肝細胞癌に対する全身化学療法の使用成績が大きく変化した。最近、レンパチニブもソラフェニブの治療効果を上回る目的で使用されている。しかし、これらの分子標的治療薬による副作用の報告が多く、副作用の少ない治療が望まれている。本研究では、肝細胞癌と血小板の強い相互作用を利用することで、自己血小板を薬物キャリアとして使用し、ラット肝細胞癌モデルにおいて、腫瘍組織に効率的に薬物を送達できることを実証した。この戦略は肝細胞癌の治療に大きな影響を与えると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Activated platelets bind to tumor-associated endothelial cells and release growth factors that promote tumor progression. We hypothesized that platelets encapsulated with tumor inhibitors would function as drug carriers for tumor therapy. We propose a therapeutic strategy for HCC using autologous platelets encapsulating tyrosine kinase inhibitors in a rat chemically induced HCC model. Sorafenib or lenvatinib was encapsulated in platelets isolated from tumor-bearing rats in vitro. The rats were divided into groups that received repeated intravenous injections (twice a week for 10 weeks) of the following materials: placebo, sorafenib (SOR), lenvatinib (LEN), autologous platelets, autologous platelets encapsulating sorafenib (SOR-PLT) and autologous platelets encapsulating lenvatinib (LEN-PLT). We observed extensive tumor necrosis in the tumor tissue of SOR-PLT or LEN-PLT. Therefore, the use of autologous platelets encapsulating drugs might be a novel therapeutic strategy for HCC.

研究分野：実験病理学

キーワード：肝がん 血小板

### 1. 研究開始当初の背景

血小板は血栓・止血において中心的な役割を担っているだけでなく、活性化することで内包しているサイトカインや増殖因子を外部に放出して炎症や組織の再生・修復を促進する。また、癌細胞由来の物質により活性化した血小板が、増殖因子などを放出すると、血管新生、癌細胞の転移を促進すると考えられている。

本邦において、肝癌は癌死亡率の上位を占めており、他臓器の悪性腫瘍と比較しても予後が悪い。肝癌の多くは慢性肝炎、肝硬変を背景に発生し、それに伴う脾腫や肝細胞の Thrombopoietin 産生低下により末梢血中の血小板が減少している。一方で、血小板減少を伴う患者での肝癌組織は比較的小さく、血小板数が正常または増加している場合は大きな肝癌組織が形成されることが報告されている (Yilmaz Y, *et al.*, *Biochem Anal Biochem* 2016, 5:2)。申請者は肝癌組織の微小血管内で血小板が活性化し、肝癌の進展を促進する役割を果たしていることを明らかにしてきた (Tanaka H, *et al.* *Cancer Sci.* 2019;110:2748-2759)。これらのことから、肝発癌過程では、背景疾患が原因となり血小板減少を伴うことがあるが、肝癌組織そのものは血小板に依存して進展すると考えられる。

肝癌の治療においては外科的治療が不可能である場合は全身化学療法の対象となる。しかし、従来の化学療法においては肝臓本来の機能である解毒作用により、薬剤が効率的に肝癌細胞に作用しない。こうした点は他臓器に発生する癌と異なる肝癌の特徴であり、治療をより困難なものにさせている。また、近年は Sorafenib や Lenvatinib などの分子標的治療薬が用いられるが、治療抵抗性や副作用が現れる例も多く、さらなる治療法の開発が求められている。一般的に癌の全身化学療法は有効な治療の一つであるが、正常細胞への影響が問題となるため、癌細胞選択的に薬剤を輸送させるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発がさまざまなアプローチで行われている。しかし、肝癌の治療において有効な DDS として標準的に用いられる治療法は確立していない。

### 2. 研究の目的

申請者は血小板が肝癌組織で活性化することを利用し治療に応用する方法を考案した。血小板には外部と交通している開放小管が存在し、外部の物質を血小板内に取り込み、活性化によりそれらを外部へ放出する (図1)。

これを利用し血小板にあらかじめ治療薬が内包されていれば、肝癌組織内で活性化することで治療薬を放出し、癌組織に選択的に作用させることができるという仮説を実証したい。血小板製剤は血小板減少や血小板機能異常による出血の治療に用いられる。しかし、頻回・大量の血小板製剤の使用は免疫学的機序による副作用のリスクを伴う。これを回避するために、本研究では担癌個体から血小板の一部を採取し、それに治療薬を内包させて同一個体に静脈注射し、治療効果を解析する。血小板そのものには薬物代謝能はないため、内包された薬物は代謝を免れ、癌組織の深部まで到達して作用させることが期待できる。また、自己血液由来の血小板を利用することで、血小板製剤で問題となる拒絶反応が回避できる。

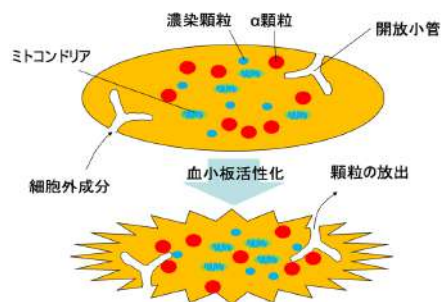
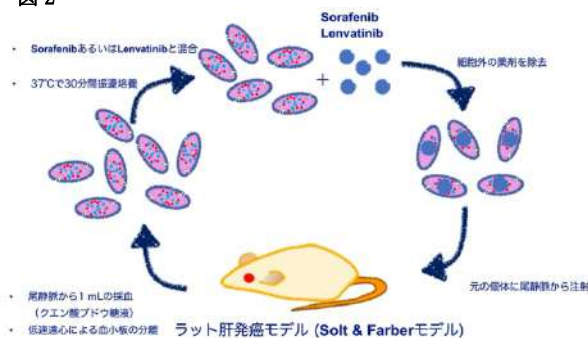


図1 血小板の構造。開放小管から外部の物質を取り込み α 顆粒や濃染顆粒に保存される。これらは血小板の活性化とともに外部に放出される。

### 3. 研究の方法

Solt & Farber プロトコール (Solt DB, *et al.* *Am J Pathol.* 1977;88:595-618) により肝癌を誘導したラットから血小板を採取し、その血小板内に治療薬として Sorafenib や Lenvatinib を取り込ませ、再び同一個体に静脈注射した (図2)。比較対照として未治療、薬剤単独投与、薬剤を内包させない血小板投与の実験群を用意する。これらのラット肝癌モデルに対して週2回、10週間の治療を行い、組織、血液を採取し治療効果の解析を行った。

図2



#### ・腫瘍組織に対する治療効果および薬物動態の解析

- ① ラットから採取した血液試料を対象として、血清トランスアミナーゼ活性、血清クレアチニン、D-ダイマーの解析を行った。
- ② 採取した肝組織内に形成された腫瘍組織およびその他の臓器を凍結保存し、投与した薬剤の含有量について質量分析により定量評価した。

- ③ 治療中のラット肝臓内の腫瘍を経時的に腹部超音波によって観察を行った。治療終了後、ラットから肝組織を採取し、病理組織標本を作成した。それらのサンプルを対象として肝癌細胞マーカー (GST-P)、細胞増殖マーカー (Ki-67)、細胞死マーカー (Cleaved-Caspase 3) の免疫染色を行い、腫瘍径の変化、増殖細胞および死細胞の割合を評価した。

#### 4. 研究成果

ラットを 6 群に分け、以下のように処置した: コントロール (プラセボ)、SOR (ソラフェニブ 1 $\mu$ g/匹)、LEN (レンバチニブ 0.1 $\mu$ g/匹)、PLT (自己分離血小板)、SOR-PLT (ソラフェニブ内包自己分離血小板)、LEN-PLT (レンバチニブ内包自己分離血小板)。

副作用は、血液学的検査、生化学的検査、末梢血中の血栓形成マーカーの定量的評価により評価した。全血球数は、治療前と治療後の時点と比較すると、治療後の PLT、SOR-PLT および LEN-PLT 群で白血球数と赤血球数の減少を示した (図 3A,B)。しかし、PLT、SOR-PLT および LEN-PLT 群では、治療後に血小板数が増加した (図 3C)。これらの分析から、全群の治療前または治療後のデータ間に有意差はないことが示された (図 3A-C)。血清分析による肝障害の評価では、AST 活性は、Control 群、SOR 群、LEN 群、PLT

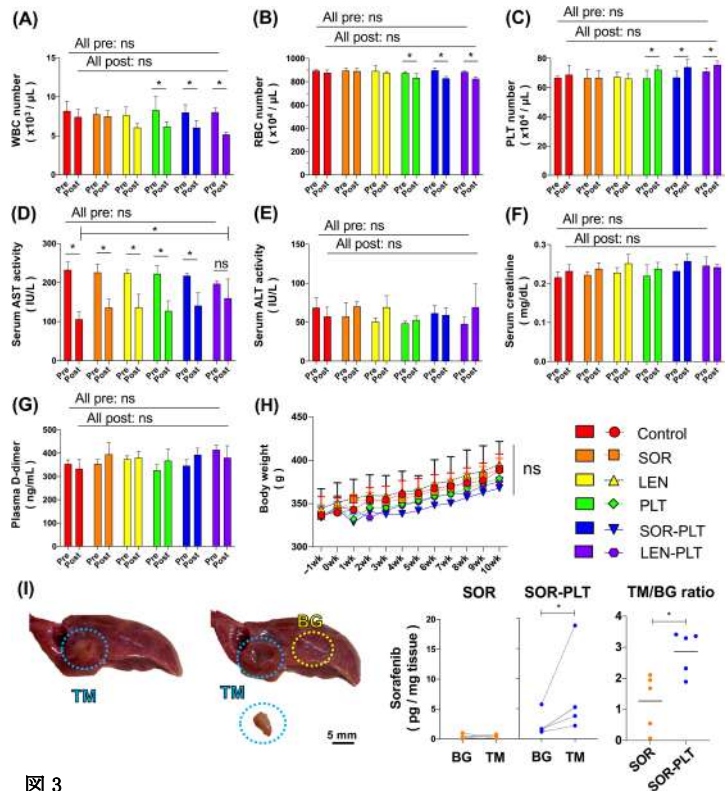


図 3

群、および SOR-PLT 群で治療後に明らかに低下したが、治療前と治療後の時点と比較すると、この低下は LEN-PLT 群で低かった (図 3D)。全実験群の治療前比較では有意差は認められなかったが、全実験群の治療後比較では、LEN-PLT 群で Control 群より高い血清 AST 活性が認められた (図 3D)。ALT については、いずれの実験群間でも有意差は認められなかった (図 3E)。血清クレアチニン分析 (CRE) による腎障害の評価では、群間および時点間に有意差は認められなかった (図 3F)。

次に、治療後の肝臓組織中の薬物含量を評価した。腫瘍組織の中には、投与 10 週後に壊死を起こしたものもあった。したがって、不正確な測定を避けるため、組織が十分に生存している投与 5 週目に組織中のソラフェニブ量を分析した。図 4I に示すように、肉眼で確認できる腫瘍を切り出し、LC-MS 分析用に抽出したものを腫瘍 (TM) とし、周囲のバックグラウンド正常組織をバックグラウンド (BG) 値とした。SOR 群では BG と TM の間にソラフェニブ含量に有意差はなかったが、SOR-PLT 群では TM に BG の 2.85 倍のソラフェニブが存在した (図 3I)。しかし、組織中のレンバチニブ含量は、投与量が非常に少なかったためか、質量分析では検出できなかった。

治療中の腹部超音波検査では、いずれの実験群でも有意な変化はなかったが、SOR-PLT 群と LEN-PLT 群では、治療開始 8 週間後に腫瘍内部に低エコー領域として空洞が検出された (図 4、右下の 2 つのパネル)。

肝臓の病理組織学的解析では、SOR-PLT 群および LEN-PLT 群では GST-P 陽性腫瘍内に有意な壊死領域と切断型カスパーゼ-3 陽性のアポトーシス細胞が認められたが、Control 群、SOR 群、LEN 群および PLT 群では有意な変化は認められなかった (図 5-A)。Control 群と PLT 群の GST-P 陽性腫瘍では、周囲の正常肝組織

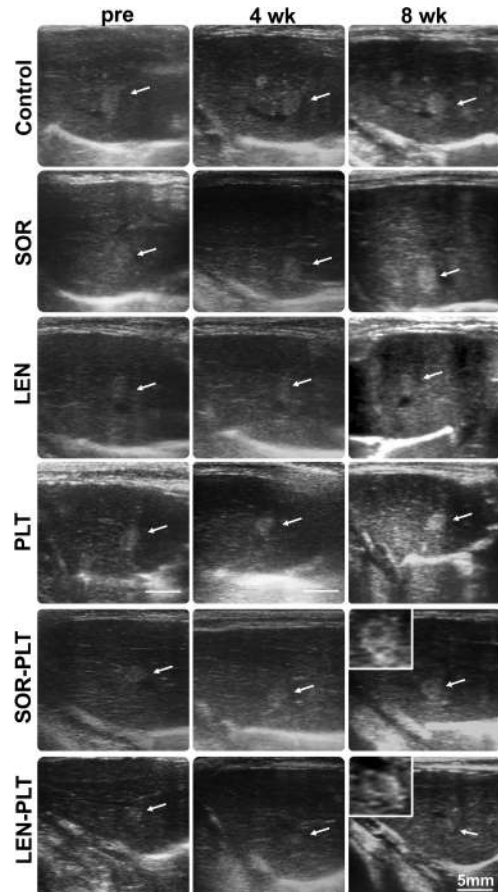


図 4

と比較して、Ki-67 陽性核を有する細胞数が多いことが観察された。しかし、SOR、LEN、SOR-PLT、および LEN-PLT ラットの GST-P 陽性腫瘍では、Ki-67 陽性核を有する細胞数は周囲の正常肝組織と同程度であった (図 5-A)。組織学的切片で観察された GST-P 陽性腫瘍の平均面積を定量的に解析したところ、LEN-PLT ラットでは Control または PLT ラットと比較して有意に面積が小さかった (図 5-B)。GST-P 陽性腫瘍内に形成された壊死領域は、SOR-PLT 群および LEN-PLT 群で他の群と比較して高かったが、SOR 群または LEN 群では、Control 群または PLT 群と比較して有意差は認められなかった (図 4C)。さらに、GST-P 陽性腫瘍組織における cleaved-caspase 3 陽性細胞の割合は、SOR-PLT 群および LEN-PLT 群で他の群と比較して高かった (図 5D)。Ki-67 の陽性率は、SOR、LEN、SOR-PLT および LEN-PLT 群では、Control および PLT 群と比較して著しく低かった (図 5E)。

ソラフェニブの臨床応用により、肝細胞癌に対する全身化学療法の使用成績が大きく変化した。最近、レンパチニブもソラ

フェニブの治療効果を上回る目的で使用されている。しかし、これらの分子標的治療薬による副作用の報告が多く、副作用の少ない治療が望まれている。

本研究では、肝細胞癌と血小板の強い相互作用を利用することで、自己血小板を薬物キャリアとして使用し、ラット肝細胞癌モデルにおいて、腫瘍組織に効率的に薬物を送達できることを実証した。この戦略は肝細胞癌の治療に大きな影響を与えると期待できる。さらに、直接的および間接的なデータから、肝細胞癌だけでなく他の臓器の癌においても血小板と腫瘍の相互作用が強いことが示されている。したがって、この方法が他の組織から発生する悪性腫瘍にも有効であることを期待している。

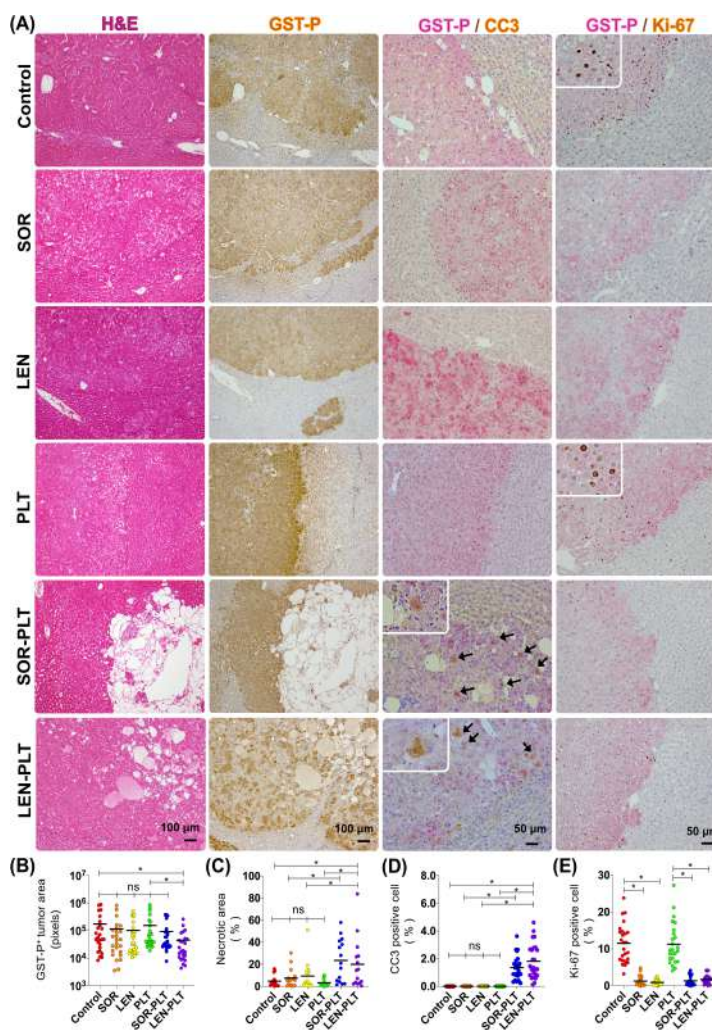


図 5

Tanaka H, Horioka K, Hasebe T, Sawada K, Nakajima S, Konishi H, Isozaki S, Goto M, Fujii Y, Kamikokura Y, Ogawa K, Nishikawa Y. Treatment of hepatocellular carcinoma with autologous platelets encapsulating sorafenib or lenvatinib: A novel therapy exploiting tumor-platelet interactions. *Int J Cancer*. 2022;150(10):1640-1653.

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 0件）

1. 著者名 Tanaka Hiroki, Horioka Kie, Hasebe Takumu, Sawada Koji, Nakajima Shunsuke, Konishi Hiroaki, Isozaki Shotaro, Goto Masanori, Fujii Yumiko, Kamikokura Yuki, Ogawa Katsuhiro, Nishikawa Yuji	4. 巻 150
2. 論文標題 Treatment of hepatocellular carcinoma with autologous platelets encapsulating sorafenib or lenvatinib: A novel therapy exploiting tumor platelet interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1640 ~ 1653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33915	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中宏樹
2. 発表標題 血小板 - 肝細胞相互作用：ラット肝細胞による血小板由来微小胞の取り込み
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Tanaka
2. 発表標題 Platelet-Derived Microvesicles Promote Selective Cell Viability in Hepatocellular Carcinoma: Differences in Properties between Normal Platelets and Tumor Educated Platelets
3. 学会等名 64th ASH annual meeting and exposition
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 宏樹, 堀岡 希衣, 後藤 正憲, 人見 淳一, 藤井 裕美子, 上小倉 佑機, 孟 玲童, 小川 勝洋, 西川 祐司
2. 発表標題 自己血小板を用いたドラッグデリバリーシステムの肝細胞癌に対するターゲティング効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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