

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20499

研究課題名（和文）腫瘍血管におけるナノ粒子の動的な噴出現象の活用による既存抗がんナノ薬剤の効果増強

研究課題名（英文）Enhancing the Effectiveness of Existing Anticancer Nano-Drugs by Exploiting the Dynamic Bursts of Nanoparticles in Tumor Vessels

研究代表者

五十嵐 一紀（Igarashi, Kazunori）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80962787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：腫瘍血管におけるナノ粒子の動的な噴出現象（nano-eruption）は、従来想定されていた静的な孔からの漏出とは異なる新たな輸送経路として、抗がんナノ薬剤の腫瘍への送達効率を向上させることが期待されている。今回我々は、これまでnano-eruptionを促進すると報告されているTGF- β 阻害薬、クロロキンの前投薬が、抗がんナノ薬剤の腫瘍への集積量を増加させるのか複数のモデル・薬剤を用いて検証したが、有意な変化を認めなかった。この結果により、既報にあるnano-eruptionの頻度の増加（2倍）や範囲の増加（8倍）を超える規模での本現象の促進を、今後目指す必要があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで報告されてきた腫瘍血管におけるナノ粒子の動的な噴出現象（nano-eruption）が、ナノ薬剤の腫瘍集積にどの程度寄与しているのかについて新たな知見が得られた。今後、本噴出現象の研究を更に進める上で、nano-eruptionの頻度増加（2倍）や、範囲増加（8倍）を超える規模での促進が、本現象を活用した抗がんナノ薬剤の腫瘍集積量増加に必要であることが明らかとなった。この成果は今後の本噴出現象の研究、ひいてはがんで苦しむ多くの方々により効果的な治療法をもたらす一助となるものであると考える。

研究成果の概要（英文）：Nano-eruption, the dynamic effusion of nanoparticles in tumor vessels, is expected to improve the delivery efficiency of anticancer nano-drugs to tumors as a new transport pathway different from the previously assumed leakage from static pores. In this study, we examined whether premedication with TGF- β inhibitors or chloroquine, which has been reported to promote nano-eruption, increases the accumulation of anticancer nano-drugs in tumors. However, with dahaplatin nano-micelles and BxPC3 pancreatic cancer models, nor with doxorubicin liposomes and 4T1 breast cancer models, no significant differences in tumor accumulation were observed. These results indicate the need to promote this phenomenon on a scale beyond the previously reported increase in nano-eruption frequency (2-fold) and range (8-fold).

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：ドラッグデリバリー 悪性腫瘍 腫瘍微小環境 ナノ薬剤

1. 研究開始当初の背景

がん(悪性腫瘍)の治療にナノ薬剤が使われるようになって久しいものの、未だ根治できない患者も一定数存在する [Mitchell et al. Nat. Rev. Drug Discov. 2021]。ナノサイズの薬剤は、通常より大きな薬剤と比べて、悪性腫瘍周囲の不完全で脆い血管壁から漏出する形でより効率的に集積する。当初、静的な血管壁の孔から漏出することが想定されていたのに対し [Jain et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2010]、当研究グループでは、腫瘍血管に数分と言う短時間で間隙が形成され、ナノ粒子が局所的に噴出するようにして透過する現象(nano-eruption)を新たに報告した [Matsumoto et al. Nat. Nanotechnol. 2016]。この現象は、全身麻酔で保定した悪性腫瘍モデルマウスに蛍光ナノ粒子を静注し、その腫瘍周囲の微小血管を共焦点レーザー顕微鏡下でリアルタイムに観察することで観察できる。

これまで nano-eruption はナノ粒子の静注後から 10 時間以上にわたり、脾臓がん、膠芽腫、線維肉腫、前立腺がん、乳がん、悪性黒色腫モデルマウスにおいて発生することが報告されている [Naumenko et al. ACS Nano 2019, Matsumoto et al. Nat. Nanotechnol. 2016]。また nano-eruption を活用できる粒子はナノ薬剤として頻用されるナノミセル、リポソームを含め多岐にわたることを当研究グループより過去に報告した [Igarashi et al. Small 2021]。またこの現象を促進する方法として、血管内皮細胞を支える周皮細胞の増殖を抑制する TGF- β 阻害薬の前投薬が nano-eruption の頻度や範囲を、腫瘍間質圧を低減するクロロキンの前投薬がその範囲を、それぞれ増加させることを報告した [Inoue, Igarashi et al. J. Control. Release 2021]。さらに当研究グループで行った予備実験では、 3.3×10^6 個の胸腺由来細胞を静脈投与した際に、nano-eruption の頻度が増加することが確認された。

一方、噴出が生じる原理については、一部の噴出箇所には好中球やマクロファージが局在し、血管壁を乗り越えて遊走することが誘因になっているという報告があるものの、これらの血球の存在を認めない噴出も数多く存在しており、未だ全容の解明には至っていない [Naumenko et al. ACS Nano 2019, Miller et al. Sci. Transl. Med. 2017]。顆粒球コロニー形成刺激因子製剤(G-CSF)の投与は Balb-c マウスにおいて血中の顆粒球(好中球を含む白血球の総称)を増加させることが報告されており [Lee et al. Lab Anim Res 2014]、nano-eruption を増加させることが期待される。

また、nano-eruption を活用して悪性腫瘍へのナノ粒子の集積量を増加、抗腫瘍効果を高めるといった試みはこれまで報告がない。

2. 研究の目的

Nano-eruption を活用することで、ナノ薬剤のがんへの集積量を高め、その抗腫瘍効果を向上させること。

2. 研究の方法

(1) TGF- β 阻害薬、クロロキンの前投薬によるダハプラチン内包ナノミセルの腫瘍集積量の変化
ヒト脾臓がん細胞(BxPC3)を培養し、Balb-c nu/nu マウス(メス、6週齢)の背部皮下に 1×10^6 個接種した。3週間後にマウスを3群に分け、TGF- β 阻害薬群には PBS を4日間と5日目に TGF- β 阻害薬を 1 mg/kg(体重)、クロロキン群には5日間続けてクロロキン 100 mg/kg(体重)、そしてコントロール群には5日間続けて PBS を腹腔内投与した。5日目の腹腔内投与の1時間後に直径 30 nm のダハプラチン内包ナノミセルをプラチナ換算で 0.1 mg/匹 静注、その24時間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍中のプラチナ濃度を ICP-MS にて測定、予め測定しておいた腫瘍重量で割ることで単位腫瘍重量当たりのダハプラチン内包ナノミセルの集積量を比較した。

(2) TGF- β 阻害薬の前投薬によるドキソルビシン内包リポソームの腫瘍集積量の変化
マウス乳がん細胞(4T1)を培養し、Balb-c マウス(メス、6週齢)の左第二乳腺に 5×10^5 個接種した。10日後に TGF- β 阻害薬を 1 mg/kg(体重)または PBS を腹腔内投与し、続いて1時間後にドキソルビシン内包リポソームをドキソルビシン換算で 0.2 mg/匹 静注、その48時間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍中のドキソルビシン濃度を HPLC にて測定、予め測定しておいた腫瘍重量で割ることで単位腫瘍重量当たりのドキソルビシン内包リポソームの集積量を比較した。

(3) 顆粒球コロニー形成刺激因子製剤(G-CSF)の前投薬による Nano-eruption 頻度の変化
マウス乳がん細胞(4T1)を培養し、Balb-c マウス(メス、6週齢)の背部皮下に 5×10^5 個接種した。本研究においては G-CSF の効果が定かでないことから、免疫系に異常があり一部の白血

球を産生できない Balb-c nu/nu マウスではなく、正常な免疫系/白血球を持つ Balb-c マウスを用いた。5 日後より G-CSF 5 $\mu\text{g}/\text{匹}$ または PBS を 5 日間連続皮下注射し、その 24 時間後に皮下腫瘍を露出させ、全身麻酔下に共焦点レーザー顕微鏡下に保定し、蛍光ダハプラチン内包ナノミセルを静注して、腫瘍周囲血管における nano-eruption の観察を行った。

(4) 胸腺由来細胞の静脈投与によるドキソルビン内包リポソームの腫瘍集積量の変化

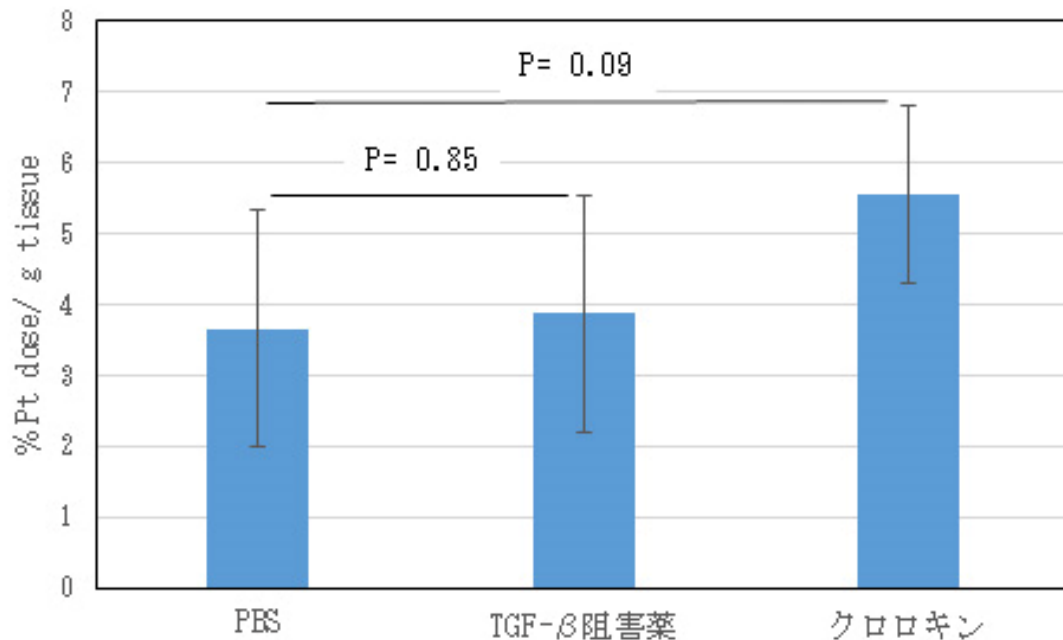
ヒト膀胱がん細胞 (BxPC3) を培養し、Balb-c nu/nu マウス (メス、6 週齢) の背部皮下に 1×10^6 個接種した。3 週間後にドキソルビン内包リポソームをドキソルビン換算で 0.2 mg/匹 静注、その直後に予め Balb-c マウス (メス、6 週齢) から抽出しておいた胸腺由来細胞 (胸腺を摘出し、セルソーターにて単離、細胞数を計測したもの) を 3.3×10^6 個、 2.5×10^7 個または同量の PBS を尾静脈より静注し、24 時間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍中のドキソルビン濃度を HPLC にて測定、予め測定しておいた腫瘍重量で割ることで単位腫瘍重量当たりのドキソルビン内包リポソームの集積量を比較した。

4. 研究成果

(1) TGF- 阻害薬、クロロキンの前投薬によるダハプラチン内包ナノミセルの腫瘍集積量の変化

%Pt dose/ g tissue (腫瘍 1g に集積したプラチナ量 \div 投与したプラチナの総量 $\times 100$) はそれぞれコントロール群 (PBS)、TGF- 阻害薬群、クロロキン群で 3.66 ± 1.67 、 3.87 ± 1.68 、 5.55 ± 1.26 であった ($n = 5 \sim 6$)。コントロール群と TGF- 阻害薬群、コントロール群とクロロキン群の間に有意差を認めなかった (図 1)。

図 1 : TGF- 阻害薬、クロロキンの前投薬後の BxPC3 膀胱がんへのプラチナ集積量

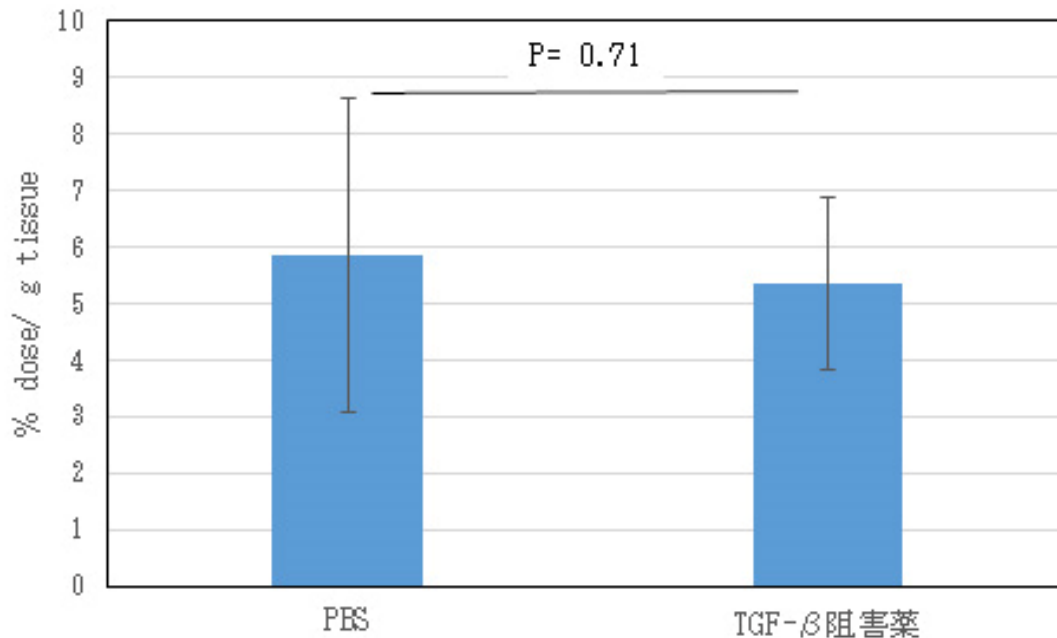


直径 30 nm のナノミセルに対して、TGF- 阻害薬およびクロロキンの前投薬は nano-eruption の範囲を約 6 倍に増加させることが報告されているが [Inoue, Igarashi et al. J. Control. Release 2021]、今回の実験ではこの nano-eruption の範囲の増加がナノミセルの腫瘍集積量の有意な増加に繋がらなかった。この結果を踏まえると、今後 nano-eruption を研究する上では、6 倍を大きく超える噴出範囲の増加を目指すべきことが示唆された。

(2) TGF- 阻害薬の前投薬によるドキソルビン内包リポソームの腫瘍集積量の変化

% dose/ g tissue (腫瘍 1g に集積したドキソルビン量 \div 投与したドキソルビンの総量 $\times 100$) はそれぞれコントロール群 (PBS) と TGF- 阻害薬群で 5.86 ± 2.79 、 5.36 ± 1.51 であった ($n = 6 \sim 7$)。コントロール群と TGF- 阻害薬群の間に有意差を認めなかった (図 2)。

図 2 : TGF- β 阻害薬の前投薬後の 4T1 乳がんへのドキソルビシン集積量



TGF- β 阻害薬の前投薬は、直径 70 nm のナノミセルに対して、nano-eruption の頻度を約 2 倍、範囲を約 8 倍にすることが報告されている [Inoue, Igarashi et al. J. Control. Release 2021]。一方、今回用いたドキソルビシン内包リポソームは直径 100 nm と 70 nm に比較的近い粒子径であり、ナノミセルとリポソームは nano-eruption においては共通の挙動を示すことが知られているため [Igarashi et al. Small 2021]、同リポソームの nano-eruption 頻度および範囲は増加していたと考えられる。しかしながら、TGF- β 阻害薬の前投薬はリポソームの有意な腫瘍集積量の増加には繋がらなかった。この結果を踏まえると、今後 nano-eruption を研究する上では、2 倍を大きく超える頻度、そして 8 倍を大きく超える噴出範囲の増加を目指すべきことが示唆された。

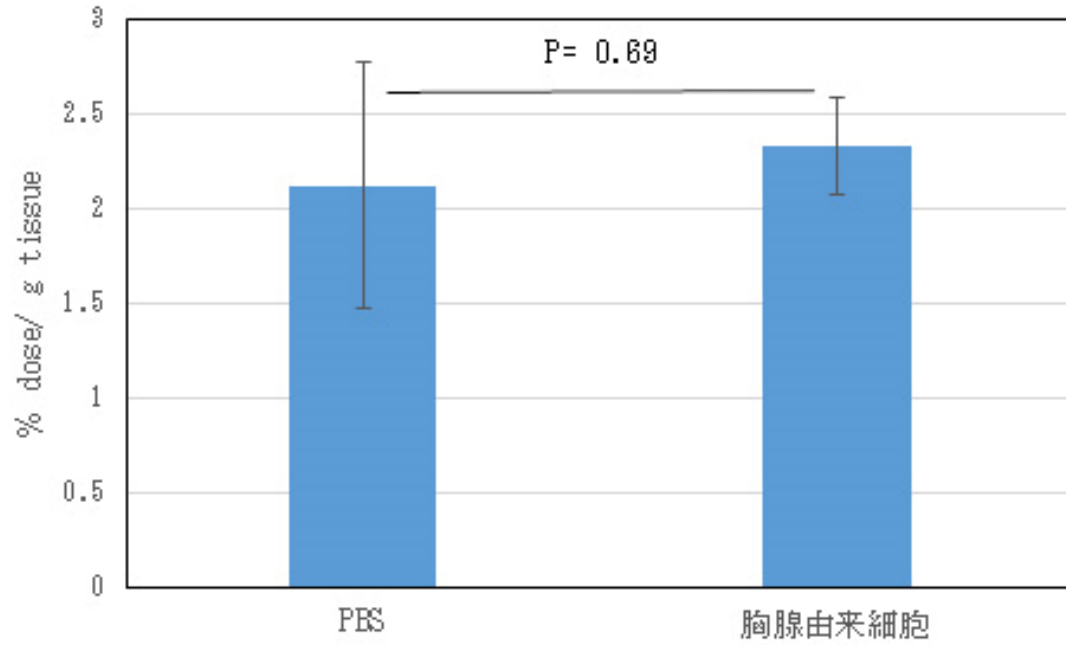
(3) 顆粒球コロニー形成刺激因子製剤 (G-CSF) の前投薬による Nano-eruption 頻度の変化

G-CSF または PBS を前投薬した 4T1 乳がんモデルマウスに全身麻酔をかけ、共焦点レーザー顕微鏡下に保定し、蛍光ダハプラチン内包ナノミセル (直径 30 nm) を静注後 1 時間、腫瘍を連続的に撮影した。腫瘍 1 mm² 当たり 1 時間で生じた nano-eruption はそれぞれコントロール群 (PBS) と G-CSF 群で 4.33 ± 0.47 回および 5.33 ± 1.70 回であった ($n = 3$)。コントロール群と G-CSF 群間で、nano-eruption の頻度に有意差は認めなかった ($P = 0.47$)。この結果は、G-CSF が nano-eruption の頻度を増加させない可能性を示唆する半面、今回の撮影可能時間が技術的制約 (マウスの呼吸性体動によって撮影条件がずれてしまう) によって 1 時間と極めて短いものであったことも影響している恐れがある。生育が早く壊死しやすい 4T1 腫瘍、そして Balb-c マウスは Balb-c nu/nu マウスより体毛の存在により手術後の感染リスクが高い問題はあるものの、より長時間の安定的撮影を可能とするドーサルスキンフォールドチャンバー (皮下にチタン製器具とカバーガラスを埋め込み、そこに腫瘍を移植したもの) を用いての再検証が望ましいと考える。

(4) 胸腺由来細胞の静脈投与によるドキソルビシン内包リポソームの腫瘍集積量の変化

% dose/ g tissue (腫瘍 1g に集積したドキソルビシン量 ÷ 投与したドキソルビシンの総量 × 100) はそれぞれコントロール群 (PBS) と 3.3×10^6 個の胸腺由来細胞群で 2.12 ± 0.65 、 2.33 ± 0.26 であった ($n = 3$)。コントロール群と 3.3×10^6 個の胸腺由来細胞群の間に有意差を認めなかった (図 3)。一方、 2.5×10^7 個の胸腺由来細胞群では投与直後に 3 匹中 2 匹のマウスが死亡し、1 匹の % dose/ g tissue は 3.63 であった。

図 3: 3.3×10^6 個の胸腺由来細胞の静脈投与後の BxPC3 膵臓がんへのドキソルビシン集積量



3.3×10^6 個の胸腺由来細胞の静脈投与では、ドキソルビシン内包リボソームの腫瘍への集積量は有意に増加しなかった。また 2.5×10^7 個の場合はやや増加する傾向がみられたものの、致死的となる恐れが高い投与細胞数であることが明らかとなった。従って、末梢静脈からの全身的な細胞投与では、生命に危険を及ぼさずにリボソームの腫瘍への集積量を増加させることが困難であることが示唆された。一方、カテーテルなどを用いた選択的動脈注射などの方法で局所的に細胞を投与できれば、nano-eruption の増加を通じてリボソームの腫瘍集積効率を向上させることができる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------