

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390010

研究課題名(和文)腫瘍内微小環境の能動的制御に基づく革新的DDSの開発とがん治療への展開

研究課題名(英文)Improvement of tumor-targeting therapy with nanocarrier system by changing the tumor microenvironment.

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50325271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナノキャリアに封入された抗がん剤は、enhanced permeability and retention effect (EPR効果)にしたがって腫瘍内に移行する事が知られている。しかし、このEPR効果を利用したナノキャリアによる抗がん剤デリバリーに限界があり、腫瘍内血管ネットワークに関連する腫瘍内微小環境の能動的な制御を行う事が重要である。経口型抗がん剤および抗がん剤封入ナノキャリアの低用量繰り返し投与が腫瘍内血管系に影響を与え、ナノキャリアの腫瘍への移行性および腫瘍内部での拡散性を改善する事を明らかにし、ナノキャリアの腫瘍移行性を亢進する新規な方法を提示する事ができた。

研究成果の概要(英文)：Efficient systemic delivery of anticancer drug to tumor tissue is a current critical challenge. Several studies have demonstrated that nanoparticles enhance the systemic delivery of anticancer drug to tumor via EPR effect. However, the disordered tumor microenvironment still poses a potential impediment with respect to the efficient delivery. Metronomic chemotherapy successfully improved the accumulation of PEG-coated liposome in solid tumor and improved therapeutic efficacy of oxaliplatin (I-OHP) encapsulated in the liposome. We also showed that repeated injection of I-OHP containing PEGylated liposome enhanced the accumulation of subsequently injected liposome and improved their therapeutic effect compared to the treatment with longer intervals between doses. The methodology (regimen) we proposed in this study may be applicable for clinical setting.

研究分野：薬剤学

キーワード：ドラッグデリバリー リポソーム がん治療 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

リポソームや高分子ミセルなどのナノキャリア (平均粒子径 50-200nm) に封入された抗がん剤は、非選択的な生体内分布が抑制されて腫瘍組織へ集積されることで、毒性の軽減とともに抗腫瘍効果が増強されることが知られている。これは、腫瘍ではがん細胞の増殖に伴って新生血管がつくられており、このような血管は内皮細胞間の隙間が大きく (400-800nm) この隙間を通過してナノキャリアが腫瘍間質に移行しやすいこと、さらには腫瘍内リンパ系が未成熟であるため間隙に貯まったナノキャリアの排泄速度は極めて遅く、結果として顕著な腫瘍内貯留がみられることに由来する。このような現象を Matsumura らは enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) と名付けている。

しかし、この EPR 効果を利用したナノキャリアによる腫瘍へのデリバリーに限界があることが分かってきていた。腫瘍内血管ネットワークは腫瘍個々でその状態が異なり、カポジ肉腫のように血管密度が高いものもあれば、膵癌のように血管密度が低いものもある。ナノキャリアは血行性であり、腫瘍内への移行量は自ずとその血管密度に依存する。効果を高めるためには、血管密度やその透過性を高めるなど、ナノキャリアの到達率を向上しうる優れた戦略が必要である。

研究代表者らは、経口型抗がん剤 (S-1, Cyclophosphamide) の繰り返し投与 (low dose metronomic chemotherapy (LDM)) を併用することでナノキャリア (PEG 修飾リポソーム) の腫瘍内移行性が亢進され、結果として高い抗腫瘍効果が得られることを、抗がん剤のオキサリプラチン封入リポソーム、Bcl-2 siRNA 包含リポプレックスを用いて示した。LDM は血管新生阻害療法として捉えられており、LDM によって腫瘍内血管系が影響を受け、ナノキャリアに対する EPR 効果が亢進されたことが原因と考えられる。

また近年では、同様に TNF- や TGF- 阻害剤、VEGF-R 阻害剤など血管作動性の薬剤と併用することによってナノキャリアの腫瘍移行性が亢進されることが相次いで報告されており、先に述べた“限界”を打破する優れた戦略である可能性が示されている。しかし、詳細な機構は明らかではない。

また、研究代表者らは、オキサリプラチン封入 PEG 修飾カチオニックリポソームを繰り返し投与することによっても、1回目投与リポソームが2回目投与リポソームの腫瘍移行性を高め、さらには2回目投与リポソームが3回目投与リポソームの腫瘍移行性を高める事を示しており、EPR 効果によって腫瘍内に移行した抗がん剤封入リポソームが、次に投与されるリポソームに対する EPR 効果を高めることを明らかにしている。ほぼ同時期に、カナダのグループからも同様の報告がイリノテカン、ドキソルビシン、ビンクリスチンなどの抗がん剤を封入した PEG 修飾リポソームに関してされており、経口型抗がん剤の LDM 投与だけでなく、抗がん剤封入 PEG 修飾リポソームの繰り返し投与によっても腫瘍内の微小環境が EPR 効果を亢進させる方向に変化している可能性が示唆されている。

このような抗がん剤や血管作動性薬剤の EPR 効果に対する“正の影響”に関して、Jain らが提唱している腫瘍内血管系の“正常化 (normalization)”の関与を支持する文献が存在する一方で ten Hagen らが主張する“abnormalization”の関与を支持する文献も存在しているが、系統立てた検討が加えられていないため、詳細は不明であった。

2. 研究の目的

ナノキャリアの腫瘍への移行は EPR 効果によることが知られているが、EPR 効果を利用したナノキャリアによるデリバリーには限界があり、腫瘍への到達率を向上する戦略

の構築が求められていた。研究代表者らは、経口型抗がん剤を低用量で繰り返し投与すると、腫瘍内の微小環境が大きく変化してナノキャリアの腫瘍移行量が増加する事を示しており、腫瘍内微小環境を能動的にコントロールすることができれば、キャリアに封入した抗がん剤や siRNA の薬効を最大に発揮させる事ができるものと考えた。本検討では、腫瘍内微小環境の能動的制御に繋がる、腫瘍内微小環境変化の誘導機構、生じた腫瘍内微小環境変化が EPR 効果に与える影響、について詳細な検討を行い、このような微小環境変化を能動的に実現できる投与レジメンを確立し、これまでなかった腫瘍内環境の能動的制御に基づく革新的 DDS を確立することを目的として研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍内微小環境変化とその誘導機構の解明

腫瘍内血管密度の変化：抗がん剤処置後のマウスに新生血管内皮細胞に親和性を持つレクチン（蛍光標識）を i.v.投与し、血流がある腫瘍新生血管の染色を行う。この腫瘍に対して、組織切片を作成し、血管のマーカーである CD31 に対する抗体（蛍光標識）で免疫染色を行い、血流のある血管（両方の分子で染色されている）を定量評価する。

開口している血管数の変化：抗がん剤処置後の腫瘍切片を H&E 染色し、開口している腫瘍内血管(面積で 100 μm^2 以上)をカウントして定量評価する。

腫瘍内の血流量の変化（灌流量の変化）：抗がん剤処置により、腫瘍内の血流量が増加したか、腫瘍内の赤血球由来の Hb を Drabkin 法によって測定し、定量評価する。

血管透過性の変化：血管から腫瘍間質への血漿の漏れに関しては、定性的には Hoechst 33342 の静脈内投与によって腫瘍内の間質細胞の核がどの程度染色されるかで評価を行

う。

腫瘍内細胞死の評価：抗がん剤投与によって誘導される腫瘍内微小環境変化は、抗がん剤による細胞死と密接な関係にあるものと考えられる。そこで、抗がん剤処置後の腫瘍内の細胞死を TUNEL assay によって定量評価し、～ の検討で得られた知見と比較して、細胞死と腫瘍内微小環境変化の関連について明らかにする。

(2) 腫瘍内微小環境の変化がナノキャリアに対する EPR 効果に与える影響：

がん細胞をマウスに移植し、経口抗がん剤および抗がん剤封入リポソーム投与後の PEG 修飾リポソームの腫瘍移行性と腫瘍内分布を組織切片の蛍光顕微鏡観察による可視化、放射活性を指標とした移行量の評価の両面から行う。ナノキャリアのモデルとして PEG 修飾リポソーム（平均粒子径：100nm）を用いる。EPR 効果を利用するナノキャリアは 50-200nm の粒子径を有しており、粒子径が 100nm の本リポソームを用いて得られる情報は、普遍性の高い情報である。

(3) 経口型抗がん剤の LDM 投与および抗がん剤封入リポソーム投与による EPR 効果の促進とそのがん治療への展開：

得られた情報に基づき、腫瘍内に最も多くナノキャリアが移行しうる dosage regimen(投与量、投与間隔)を提案し、実際に抗がん剤封入 PEG 修飾リポソームあるいは siRNA 含有 lipoplex と併用することで、抗腫瘍効果と毒性発現（主として体重変化）を評価する。

本研究課題を完遂することでこれまでなかった概念に基づく新規な DDS の確立を目指す。

4. 研究成果

まず、抗がん剤(オキサリプラチン; I-OHP)封入 PEG 修飾リポソーム繰り返し投与時に腫瘍内で生ずる腫瘍内微小環境変化の誘導機構、生じた腫瘍内微小環境変化が EPR 効果

に与える影響、について詳細な検討を行った。I-OHP 封入 PEG 修飾リポソーム投与後の腫瘍内の細胞死を TUNEL assay によって定量評価したところ、投与間隔が短いほど腫瘍内で細胞死が生じている事が明らかとなった。これは、EPR 効果によって血管から I-OHP 封入 PEG 修飾リポソームが漏出し、血管近傍に貯留された初回投与同リポソームから放出された I-OHP による細胞死が、次に投与されたリポソームの貯留スペースを拡大し、よりリポソームの貯留を促進し、これが繰り返される事によるものであると考えられた。血管近傍の細胞の死は、リポソームの貯留スペースの拡大だけではなく、増殖しているがん細胞による血管の圧迫も緩和する可能性があり、結果として併用投与される遊離型薬物の腫瘍移行性も高める可能性が高い。また、このようなアポトーシス細胞の増加は遊離型抗がん剤の繰り返し投与時には観察されておらず、DDS 化抗がん剤を繰り返し投与する、というレジメが重要であることが示唆された。実際、上述のような正の結果を得るためには、抗がん剤封入ナノキャリアを 3~5 日の投与間隔で繰り返し投与するべきであることも明らかとしており、DDS を用いた今後のがん治療戦略を考えるうえで重要な知見が得られたものと考えている。

次いで、経口型抗がん剤の併用による抗腫瘍効果亢進機構について検討を行った。驚くべきことに、I-OHP 封入 PEG 修飾リポソームの腫瘍微小環境に対する薬理効果が腫瘍内での経口型抗がん剤(5-FU)の血管透過性、組織浸潤性を高め、その結果として抗腫瘍効果の観点において良好な相加相乗効果を誘導していることを確認する事ができた。さらに、先に示した I-OHP 封入 PEG 修飾リポソームの短期間での繰り返し投与によっても腫瘍内の微小環境が大きく変化し、後に投与したナノキャリアの腫瘍内移行性が向上するという結果に基づき、核酸を封入したナノキャ

リアを併用し、抗腫瘍効果の向上が見られるか検討した。その結果、殺細胞活性を有する核酸を封入したナノキャリア単独投与ではほとんど抗腫瘍効果が得られなかったのに対して、I-OHP 封入 PEG 修飾リポソームと併用した場合に I-OHP 封入 PEG 修飾リポソーム単独の抗腫瘍効果よりも高い効果が得られ、核酸含有 PEG 修飾リポソームの腫瘍組織移行性の亢進がこのような抗腫瘍効果増強に繋がったものと類推された。

一般的な DDS 化抗がん剤は、非選択的な分布による副作用の発現を避ける目的で少なくとも 3 週間の休薬期間をあけることが推奨されている。しかし、本検討で明らかとなった最適レジメでは、臨床用量よりもずっと少ない投与量でかつ短い投与間隔で繰り返し投与するものであった。当該レジメ実行時において、体重減少を指標とした毒性の発現は観察されておらず、臨床でも十分に使用可能なレジメである可能性が高い。また、抗がん剤封入ナノキャリアと別のナノキャリアを併用することで相乗的な制がん効果が得られることもあわせて明らかになった。これは抗がん剤封入リポソームの EPR 効果亢進効果によって別のナノキャリアが腫瘍組織内に移行しやすくなり、制がん効果をより発揮しやすいたためであると考えている。

以上のように、本検討により、腫瘍内の微小環境を制御する事の重要性を明確にし、またその能動的な制御法について提案する事ができた。当該研究成果は臨床における DDS 製剤の至適投与法(レジメ)の開発に寄与できる重要なものであると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Suzuki, T., Ichihara, M., Hyodo, K., Yamamoto, E., Ishida, T., Kiwada, H., Kikuchi, H., Ishihara, H., Influence of dose and animal species on accelerated blood

clearance of PEGylated liposomal doxorubicin. *Int. J. Pharm.*, 476, 205-212 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.047

Nakamura, H., Doi, Y., Abu Lila, A.S., Nagao, A., Ishida, T., Kiwada, H., Sequential treatment of oxaliplatin-containing PEGylated liposome together with S-1 improves intratumor distribution of subsequent doses of oxaliplatin-containing PEGylated liposome. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 87, 142-151 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.12.007

Abu Lila, A.S., Essam Eldin, N., Ichihara, M., Ishida, T., Kiwada, H., Multiple administration of PEG-coated liposomal oxaliplatin enhances its therapeutic efficacy: a possible mechanism and the potential for clinical application. *Int. J. Pharm.*, 438, 176-183 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.030

Abu Lila, A.S., Matsumoto, H., Doi, Y., Nakamura, H., Ishida, T., Kiwada, H., Tumor type dependent vascular permeability constitutes a potential impediment to the therapeutic efficacy of liposomal oxaliplatin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81, 524-531 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.010.

Abu Lila, A.S., Okada, T., Doi, Y., Ichihara, M., Ishida, T., Kiwada, H., Combination therapy with metronomic S-1 dosing and oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes in a murine colorectal tumor model: Synergy or antagonism? *Int. J. Pharm.*, 426, 263-270 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.046.

Ishida, T., Anti-PEG immunity against PEGylated materials. 11th DDS Symposium France-Japan, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市) 2014年10月6日 加藤千尋、石田竜弘、他、In vivo imaging system による胸腔内投与リポブレックスの動態評価、第30回日本 DDS 学会 学術集会、慶応義塾大学薬学部(東京都・港区) 2014年7月30日

清水太郎、石田竜弘、他、マウス肺癌細胞に対するFTY720 とドキシルとの併用効果に関する検討、第30回日本 DDS 学会学術集会、慶応義塾大学薬学部(東京都・港区) 2014年7月30日

清水太郎、石田竜弘、他、脾臓辺縁帯 B 細胞による抗原封入 PEG 修飾リポソームの濾胞への輸送現象を利用した抗腫瘍免疫誘導効果、日本薬学会第29年会、大宮ソニックシティビル(埼玉県・さいたま市) 2014年5月20日

小林早紀子、石田竜弘、他、リポソームからの Pemetrexed の放出性が胸腔内移植腫瘍の増殖に与える影響、日本薬学会第134年会、熊本大学(熊本県・熊本市) 2014年3月29日

藤原由佳子、石田竜弘、他、転移性肝臓がんの存在がオキサリプラチン封入 PEG 修飾リポソームの肝移行性へ与える影響、日本薬学会第134年会、熊本大学(熊本県・熊本市) 2014年3月29日

石田竜弘、石田竜弘、他、ナノテクノロジーを用いた薬物動態制御の可視化、高分子学会九州支部・九州有機材料研究グループ研究会、北九州市立大学(福岡県・北九州市) 2014年3月20日

Ishida, T., Improvement of tumor-targeting therapy with nanocarrier system by changing the tumor microenvironment. *Synchrotron Radiation in Nano-medicine*

and Advanced Health Care (SRNAHC),
甲南大学 (兵庫県・神戸市) 2014
年1月9日

田中真生、石田竜弘、他、固形がんにお
ける抗がん剤封入 PEG 修飾リボソーム
と shRNA 含有 lipoplex によるがん治療法
の確立、第52回日本薬学会・日本薬剤
師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学
術大会、松山大学 (愛媛県・松山市)
2013年10月26日

加藤千尋、石田竜弘、他、In vivo imaging
system を用いたリボソーム胸腔内投与
後の体内動態の評価、第52回日本薬学
会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中
国四国支部学術大会、松山大学 (愛媛
県・松山市) 2013年10月26日
西尾美穂、石田竜弘、他、腫瘍内血管系
の動的変化が PEG 修飾リボソームの腫
瘍内分布に及ぼす影響、第22回 DDS
カンファランス、グランシップ静岡 (静
岡県・静岡市) 2013年9月6日

藤田理紗子、石田竜弘、他、PEG 修飾剤
末端構造が与える ABC 現象誘導への影
響に関する検討、第22回 DDS カンフ
ァランス、グランシップ静岡 (静岡県・
静岡市) 2013年9月6日

Shimizu, T., Ishida, T., et al., Potentiation of
specific antibody response against antigen
encapsulated in PEGylated liposomes via
active transport of the liposomes from
marginal zone into follicle. 5th Asian Arden
Conference, 愛知学院大学 (愛知県・名
古屋市) 2013年8月5日

石田竜弘、腫瘍内微小環境の能動的制御
に基づく腫瘍選択的デリバリーシステ
ムの開発、日本薬学会第133年会、パ
シフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 20
13年3月30日

中村浩之、石田竜弘、他、S-1 と I-OHP
封入 PEG 修飾リボソーム併用療法にお

ける腫瘍内血管系の変化、日本薬学会第
133年会、パシフィコ横浜 (神奈川
県・横浜市) 2013年3月28日

西尾美穂、石田竜弘、他、PEG 修飾リボ
ソームの腫瘍内移行に血管系の経時的
変化が与える影響、日本薬学会第133
年会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜
市) 2013年3月28日

石田 竜弘、腫瘍内微小環境の能動的制
御による新規 DDS の開発と治療への応
用、創剤フォーラム第18回若手研究会、
長井記念ホール (徳島県・徳島市) 20
12年11月17日

中村 浩之、石田竜弘、他、S-1 と I-OHP
封入 SL 併用療法における SL の体内動態
および腫瘍内環境の変化、創剤フォーラ
ム第18回若手研究会、長井記念ホール
(徳島県・徳島市) 2012年11月1
7日

Ishida, T., Improvement of tumor-targeting
therapy with nanocarrier system by
changing the tumor microenvironment. 10th
DDS Symposium France-Japan, Grand
Hotel de Bordeaux (ボルドー(フランス)),
2012年10月13日

Ishida, T., Improved intratumoral delivery
of PEG-coated siRNA-lipoplexes by
combination with metronomic S-1 dosing in
a murine solid tumor model.
Oligonucleotide Delivery: Biology,
Engineering and Development, Schloss
Hernstein in Hernstein (ウィーン(オー
ストリア)) 2012年10月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiro)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：50325271