

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590194

研究課題名(和文) 腫瘍組織内微小環境の調節に基づいた新規がん治療戦略の構築に向けた基礎的検討

研究課題名(英文) Establishment of novel strategy in cancer treatments based on modulation of microenvironment of tumor tissues

研究代表者

大河原 賢一(Ogawara, Ken-ichi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30291470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤パクリタキセル内封リポソーム製剤の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤 SU5416 (VEGF 2 型受容体のチロシンキナーゼ阻害剤)内封エマルジョン製剤の併用効果を検討した。検討の結果、両製剤を併用することで、腫瘍増殖抑制効果の増強が認められた。そこで次に、両製剤による併用効果の発現メカニズムの解明を試み、種々検討を加えたところ、PE-SU5416 製剤を前投与することで、腫瘍内血管の構造的・機能的な改善が引き起こされ、その後投与する PL-PTX の腫瘍内中心部への分布性が増大した結果、in vivo 抗腫瘍効果の増強へと繋がったことが推察された。

研究成果の概要(英文)：The effect of pre-treatment with SU5416, a selective VEGF receptor-2 inhibitor, on tumor disposition and in-vivo anti-tumor activity of polyethylene glycol (PEG)-modified liposomal paclitaxel (PL-PTX) was evaluated. To improve the solubility of SU5416, the inhibitor was formulated in PEGylated O/W emulsion (PE-SU5416). Pre-treatment with PE-SU5416 significantly enhanced the in-vivo anti-tumor effect of PL-PTX. The pretreatment with PE-SU5416 improved the tumor vessel functions, including oxygen supply. Furthermore, the pre-treatment with PE-SU5416 increased the distribution of PEG liposomes and included PTX in the core region of the tumor. These results suggest that the functional normalization of the tumor vasculature by the pre-treatment with PE-SU5416 enabled liposomes to reach the deeper regions within tumor tissues, leading to more potent anti-tumor activity of PL-PTX.

研究分野：DDS, 製剤学, 薬剤学

キーワード：がん治療 抗がん剤 血管正常化 リポソーム エマルジョン 抗腫瘍効果 局所動態

1. 研究開始当初の背景

固形がん内部に存在する血管は、構造ならびに機能が不完全であり、そのため、がんの悪性化が助長されているが、この血管の構造・機能不全は、腫瘍組織内部への抗がん剤の送達も低下させることとなり、治療成績の低下につながっていると考えられている。こうした背景の元、分子標的薬である VEGF 阻害剤を適度に利用することで、腫瘍内血管の構造、機能が改善できるという「血管正常化説」が提唱された。その後、本説を提唱したグループを中心にその実証が進められてきた結果、幅広い VEGF 阻害剤において、その投与により腫瘍内血管の構造ならびに機能改善が認められることが示唆されてきている。

しかし、これまでに行われた検討は、VEGF 阻害剤投与による、腫瘍内血管の構造変化、血流改善をはじめとした機能改善、あるいは VEGF 阻害剤前投与後の抗がん剤による治療効果の増強の有無、のいずれかに焦点を絞って実施された断片的なものであり、これら一連の検討を包括的に実証した例は無い。また、VEGF 阻害剤をはじめ、多くの分子標的薬は水溶性に乏しいため、その製剤開発ならびに臨床開発には困難を伴う場合が多い。実際に「血管正常化説」の検証を目的として既に検討が加えられた VEGF 阻害剤についても、動物実験において溶血や過敏症惹起の危険性が伴う可溶化剤を用いて、溶液として投与されている。このような剤形および投与方法は、実際的ではなく、安全性の面で問題であるだけでなく、VEGF 阻害剤の腫瘍への送達乏しいため、効果も不十分なものとなる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、この「血管正常化」という新しい概念を検証すると共に、VEGF 阻害剤を安全且つ効率的に腫瘍内に送達するため、VEGF 阻害剤 (SU5416) をナノ粒子製剤化 (PE-SU5416) し、腫瘍特異的な血管構造ならびに機能の改善を促し、その後投与するパクリタキセル内封リポソーム製剤 (PL-PTX) の腫瘍組織への移行性を増大させることで、抗腫瘍効果の増強を目指す。

即ち、申請者は本研究において、1) VEGF 阻害剤内封ナノ粒子製剤 (PE-SU5416) の設計、2) 同製剤による前処置後の腫瘍内血管の構造・機能評価、3) 同製剤による前処置後に投与した抗がん剤内封ナノ粒子製剤の腫瘍組織移行動態の解析、および 4) 抗腫瘍効果の評価、という一連の検討を通じて、本治療システムの最適化を図るとともに、その治療への応用を目指すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) VEGF 阻害剤のエマルジョン製剤化とその最適化:

油滴の粒子径、安定性、油相における SU5416 の溶解度、SU5416 の放出特性など

を精査し、至適な処方絞り込みを行った。

(2) SU5416 製剤及び PTX 製剤の併用療法による in vivo 抗腫瘍効果の検討:

C26 を皮下に移植することで作製した固形がんモデルマウスを用いて検討を行った。また対照群として、生理食塩水投与群、PE-SU5416 (5 mg/kg) 単独投与群、並びに PL-PTX (1 mg/kg) 単独投与群を選択した。実験は、腫瘍体積が 50-100 mm³ に達した時点から投与を開始し、両製剤併用群においては、PE-SU5416 投与 1 日後に PL-PTX を投与した。

(3) VEGF 阻害剤による腫瘍内血管の構造ならびに機能変動の評価:

腫瘍内血管の構造的ならびに機能的な変化については以下の二つの項目を指標として評価した。

腫瘍組織内血管の血管内皮細胞と壁細胞のマーカー分子を免疫染色することにより、壁細胞による血管の被覆度を半定量的に評価する。(構造的改善の指標としての血管の壁細胞被覆の程度の評価)

免疫染色による腫瘍組織内低酸素領域の可視化により、低酸素領域の増減を半定量的に評価する。(機能的改善の指標としての腫瘍組織内血管の酸素運搬能力の評価)

(4) VEGF 阻害剤投与後の抗がん剤内封リポソームの腫瘍組織移行動態の解析: VEGF 阻害剤投与後の抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行動態の評価は、C26 担がんマウスを用いて検討する。実験は、リポソームそのものを ³H-コレステロール誘導体で標識し、¹⁴C によりパクリタキセルをトレーサー標識したパクリタキセル内封リポソームを調製し、その静脈内投与後の、リポソームおよびパクリタキセルの体内動態、および腫瘍組織への移行動態をそれぞれ解析・評価する。

4. 研究成果

(1) VEGF 阻害剤のエマルジョン製剤化とその最適化:

エマルジョンの調製は、EPC、Tween 80、Tricaprylin を混合し、EPC をヘキサンの溶解させた後で、エバポレーションによりヘキサンを除去したものを油相とし、その後、超音波処理下で水相 (2.25% glycerol solution) に油相を滴下・混合することにより行った。エマルジョンの体内動態特性には、粒子径や表面電荷といった物理化学的特性が大きく影響を及ぼす。そこでまず、油相成分の構成比の異なるエマルジョンを調製し、その粒子径及び表面電荷を測定した結果、いずれのエマルジョンにおいても表面電荷はほぼ 0 mV 付近であったものの、粒子径については EPC: 160 mg、Tween 80: 120 mg、

Tricaprylin: 400 mg の構成比のエマルジョンで約 100 nm になり、それ以外の構成比においては粒子径が増大する傾向が認められた。一方、微粒性キャリアー静脈内投与後の血中滞留性は、粒子径 100 nm 前後、表面電荷 0 mV 前後で最も高くなり、腫瘍組織への蓄積性も増大することが知られている。そこで本検討においても、その条件に最も近い粒子径、表面電荷を示す構成比 (EPC: 160 mg, Tween 80: 120 mg, Tricaprylin: 400 mg) により調製したエマルジョンを今後の検討に用いることとした。

(2) SU5416 製剤及び PTX 製剤の併用療法による in vivo 抗腫瘍効果の検討:

SU5416 製剤 (5 mg/kg) 単独投与は、抗腫瘍効果を示さないのに対して、PTX 製剤 (1 mg/kg) は生理食塩水投与群と比較して、有意な抗腫瘍効果を発揮することが示された。更に、両製剤を併用することで、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。また、その効果は PTX 製剤単独投与群と比較しても統計的に有意なものであった。以上のことから、PL-PTX に、単独では効果を示すことの無かった PE-SU5416 を併用することで、相乗的抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。

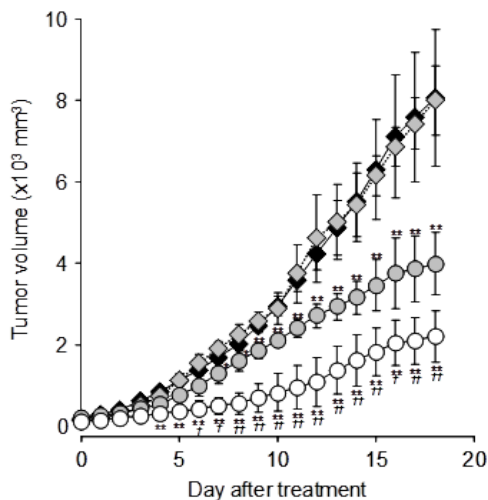


Fig. 1 In Vivo Anti-Tumor Activity of PL-PTX with or without Pre-Treatment with PE-SU5416: Keys: closed diamond, control (saline); gray diamond, PE-SU5416; gray circle, PL-PTX; open circle, PL-PTX after PE-SU5416 pre-treatment. Saline or PE-SU5416 was injected on day 0, and PL-PTX was injected 24 hr after saline or PE-SU5416 pre-treatment (on day 1). Each point represents the mean tumor volume \pm S.D. (n = 5). ** p < 0.01; * p < 0.05, compared with saline-treated group. †† p < 0.01; † p < 0.05, compared with PL-PTX alone.

(3) VEGF 阻害剤による腫瘍内血管の構造ならびに機能変動の評価 (評価項目):

血管内皮細胞マーカー分子である CD31、及び壁細胞マーカー分子である α -Smooth Muscle Actin (SMA) により蛍光二重染色を施すことで両者を検出することを試みた。得られた画像を解析し、腫瘍内の血管数 (Fig. 2(A))、壁細胞被覆を伴う血管数 (Fig. 2(B))、並びに壁細胞被覆を伴う血管の割合 (Fig. 2(C)) をそれぞれ示した。その結果、血管分布数は PE-SU5416 投与により、統計的に有意な差ではないが減少傾向にあることが示された (Fig. 2(A))。また、壁細胞数はどちらの腫瘍においても同程度であった (Fig. 2(B))。その一方で、壁細胞被覆を伴う血管の数、及びその割合は、PE-SU5416 投与により顕著に増加することが明らかとなった (Fig. 2(C))。この結果は、PE-SU5416 を投与することで、腫瘍内血管の血管構造が一部正常な血管に近づいたことを示唆するものであった。

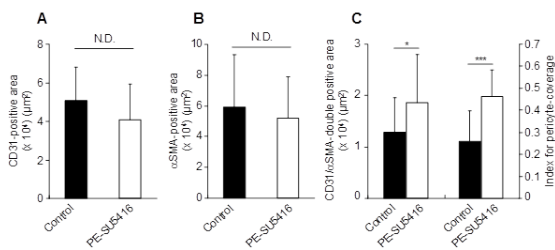


Fig. 2 Evaluation of Structural Properties of Vessels within Tumor Tissues Treated with PE-SU5416: A, the area of CD31-positive vessels. B, the area of α SMA-positive pericytes. C left, CD31/ α SMA-double positive area. C right, the ratio of pericyte-covered vessels to CD31-positive vessels. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 20). *** p < 0.001; * p < 0.05, compared with control.

(3) VEGF 阻害剤による腫瘍内血管の構造ならびに機能変動の評価 (評価項目):

腫瘍組織内の血管網は無秩序であり、また個々の血管構造も脆弱である為、腫瘍組織内の血流は不均一であり、時として一時的な血流遮断を繰り返している。そのような不完全な血液循環の為に、腫瘍組織内部の細胞は酸素が不十分な環境、即ち、低酸素状態に陥っていることが知られている。そこで、腫瘍組織内の酸素分圧を検討することで、PE-SU5416 投与が腫瘍内血管の機能特性に与える影響について評価を加えることとした。実験は、腫瘍体積が 400-500 mm³ に達した時点で PE-SU5416 (5 mg/kg) を静脈内

投与し、その 1 日後に腫瘍組織を摘出し、低酸素マーカー分子 (CA9) により免疫組織化学的に染色することで評価した。検討の結果、PE-SU5416 投与により CA9 陽性部位、即ち低酸素領域の顕著な減少が認められた (Fig. 3)。以上のことから、PE-SU5416 投与により、腫瘍内血管の構造的、並びに機能的異常が一部改善された結果、酸素供給を含む物質の運搬機能が向上し、低酸素領域が減少したものと推察された。

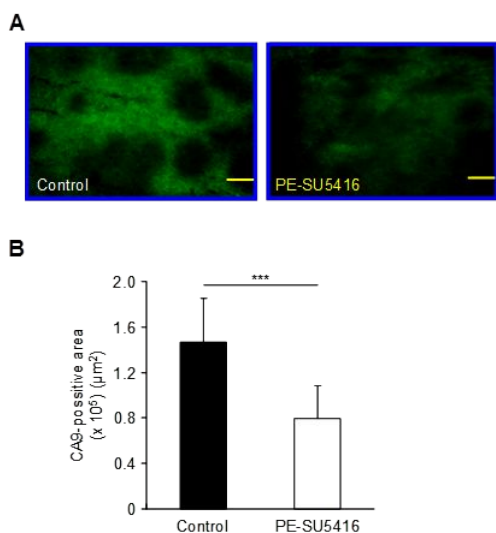


Fig. 3 Immunohistochemical Detection of Hypoxic Region in PE-SU5416-Treated and Control Tumors: A, representative immunostaining image of hypoxic region (CA9-positive region, green). B, area of hypoxic region within tumor tissues. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 10). *** p < 0.001, compared with control. Scale bars, 100 μm.

(4) VEGF 阻害剤投与後のパクリタキセル内封リポソーム (PL-PTX) の腫瘍組織移行動態の解析:

1. PTX 製剤の腫瘍組織内移行量の評価

まず PE-SU5416 前投与が PL-PTX の腫瘍組織への移行性に及ぼす影響について評価することを試みた。実験は、腫瘍体積が 400-500 mm³ に達した時点で PE-SU5416 (5 mg/kg) を静脈内投与し、その 1 日後に PL-PTX (1 mg/kg) を静脈内投与した。更に、その 1 日後に腫瘍組織を摘出し、PL-PTX の腫瘍組織内への蓄積量を評価した。尚、PL-PTX の定量は、同一個体から採取した同一試料から、PEG 修飾リポソーム、内封 PTX それぞれを分離定量する為に、³H]-CHE によりリポソームを、¹⁴C]-PTX により内封 PTX をそれぞれ標識し、それらの分子に由来する放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定することで

行った。その結果、Fig. 4 に示すように、PE-SU5416 併用群における、腫瘍組織内への PEG 修飾リポソーム自身、並びに内封 PTX の蓄積性は、コントロール群と同程度であることが明らかとなった。即ち、前投与した PE-SU5416 により腫瘍内血管の構造的、並びに機能的な改善により血管の物質運搬機能が向上していると考えられたにもかかわらず、その後投与した PL-PTX の腫瘍組織内への送達効率の改善は認められなかった。

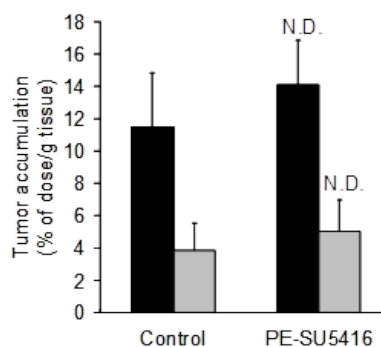


Fig. 4 Effect of Pre-Treatment with PE-SU5416 on Tumor Disposition of PL-PTX: Keys; closed bar, PEGylated liposome; filled bar, paclitaxel. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 5).

2. PTX 製剤の腫瘍内分布挙動の評価

腫瘍組織内において、薬剤の不均等な分布性をもたらし要因の一つとして、“間質内圧の上昇”が挙げられる。通常、血管内圧は周辺組織の間質圧よりもかなり高く保たれている。しかし、腫瘍内血管の構造的異常により血管透過性が亢進することで、巨大な孔から血液成分が漏出し間質内圧が血管内圧と同程度にまで上昇することが知られている。また、正常組織において排水路としての機能を持ち、間質内圧を制御しているリンパ管が、腫瘍組織内においては未発達であることが知られており、このことも腫瘍組織内部における間質内圧の上昇に寄与していると考えられる。更に、この間質内圧は、腫瘍周縁から中心部に近づくにつれて上昇することが報告されており、薬剤の分布性も腫瘍中心部と周縁部とは、大きく異なる可能性が考えられた。

そこで、摘出した腫瘍組織を、中心部と周縁部とに切り分け、それぞれを分離定量することで、PL-PTX の腫瘍内分布挙動をより詳細に評価することを試みた。実験は、腫瘍体積が 400-500 mm³ に達した時点で PE-SU5416 (5 mg/kg) を静脈内投与し、その 1 日後に ³H]-CHE 及び ¹⁴C]-PTX 標識した PL-PTX (1 mg/kg) を静脈内投与した。更に、その 1 日後に腫瘍を摘出後、直ちに凍結し、プレインスライサー及びメスを用いて、Fig. 5 に示す方法で、腫瘍切片を作

製した。先ず、Z 軸方向に 3 等分した中央部を、次に X-Y 平面に 4 x 4 の格子状に切り分け、中心 4 区画 (2 x 2) を腫瘍中心部と定義した。また、中心部以外の (上部、下部を含む) 全ての切片を、腫瘍周縁部と定義した。

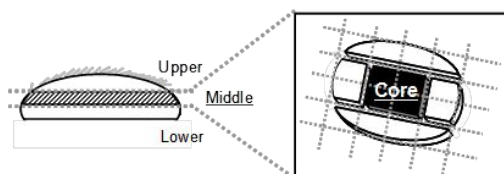


Fig. 5 Schematic Representation of the Method to Separate Core and Peripheral Parts of Tumor Tissues

検討の結果、PE-SU5416 を前投与することで、腫瘍中心部への分布が、PEG 修飾リポソーム自身、並びに内封 PTX どちらにおいても有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 6)。この結果は、PL-PTX がこれまで腫瘍組織内へ送達されていたものの、腫瘍中心部までは十分に到達できていなかった可能性を示唆しており、また、PE-SU5416 前投与により、PL-PTX の腫瘍中心部への送達効率が増大したことを示唆するものであった。

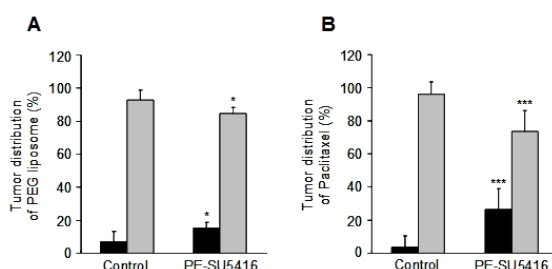


Fig. 6 Effect of Pre-Treatment with PE-SU5416 on Intratumoral Distribution of PL-PTX: Tumor disposition amounts were separately measured for PEGylated liposomes (A) and paclitaxel (B) in the core and peripheral parts of tumor tissues. Keys; closed bar, core region; gray bar, peripheral region. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 5). *** p < 0.001; * p < 0.05, compared with control.

5. 結論

本研究では PL-PTX の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤 SU5416 (VEGF 2 型受容体のチロシンキナーゼ阻害剤) の併用効果を検討した。SU5416 は、当研究室で調製した PEG 修飾 O/W 型エマルション (PE-SU5416) として投与し、PL-PTX の C26 結腸がんモデルマウスにおける抗腫瘍

効果に対する影響を評価した。その結果、両製剤を併用することで、腫瘍増殖抑制効果の増強が認められた。そこで次に、両製剤による併用効果の発現メカニズムの解明を試み、種々検討を行った。その結果、PE-SU5416 を前投与することで、壁細胞被覆を伴う血管の増加といった、血管構造の改善に伴って、血管の物質運搬機能が向上することが示された。更に、これら腫瘍内血管の構造的・機能的な改善が、その後投与する PL-PTX の腫瘍内中心部への分布性を増大させた結果、in vivo 抗腫瘍効果の増強へと繋がったことが推察された。以上、本研究により得られた知見は、臨床成績の更なる向上が求められているがん治療において、抗がん剤と血管新生阻害剤の併用による最適ながん化学療法の確立を図る上で、非常に有益な基礎的情報を提供すると共に、臨床現場にて用いられている抗がん剤の体内動態を適切に制御することにより、安全、且つ有効ながん治療に大きく貢献可能であることを示すものである。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ogawara K., Abe S, Un K., Yoshizawa Y., Kimura T., Higaki K., Determinants for In Vivo Antitumor Effect of Angiogenesis Inhibitor SU5416 Formulated in PEGylated Emulsion. *J. Pharm. Sci.*, 103(8), 2464-2469 (2014)

Yoshizawa Y., Ogawara K., Kimura T., Higaki K., A novel approach to overcome multidrug resistance: Utilization of P-gp mediated efflux of paclitaxel to attack neighboring vascular endothelial cells in tumors. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 62, 274-280 (2014)

〔学会発表〕(計 3 件)

荒川 奏江、石川 啓輔、大河原 賢一、檜垣 和孝、パクリタキセル内封微粒子製剤の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤との併用効果に関する基礎的研究, 第 29 回日本薬剤学会 (2014.5.20-22, 大宮ソニックビル、埼玉)

Ken-ichi Ogawara, Tomoya Araki, Rie Kawai, Haruka Suzuki, Kazutaka Higaki, Augmented EPR effect by photo-triggered tumor vascular treatment improved therapeutic efficacy of liposomal paclitaxel in mice

bearing tumors with low permeable vasculature, 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2014.11.15-16, 熊本大学薬学部、熊本)

荒木 知哉、大河原 賢一、檜垣 和孝、光線力学的前処置が及ぼす腫瘍内血管透過性及びパクリタキセル内封 PEG リポソーム製剤の抗腫瘍効果への影響, 第135回日本薬学会 大学院生シンポジウム (2015.3.26-28, 神戸学院大学など、兵庫)

7. 研究組織

(1) 研究代表者

大河原 賢一 (OGAWARA, Ken-ichi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 30291470

(2) 研究分担者

檜垣 和孝 (HIGAKI, Kazataka)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 60284080