

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650643

研究課題名(和文)コンブレタスタチンによる微小転移巣へのEPR効果導入と機序の解析

研究課題名(英文)Induction of EPR effects on microtumors by combretastatin and its microcirculation mechanism

研究代表者

堀 勝義(Hori, Katsuyoshi)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：00143032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：若い腫瘍血管はナノ粒子を漏らさず、EPR効果(亢進した血管透過性と物質の腫瘍停留性の持続が組合さった効果)が起きない。コンブレタスタチン誘導体Cderivはその血管の透過性を高めると共に、腫瘍循環機能を抑制する。EPR効果機序解明のために、本研究では、Cderiv投与後の腫瘍血管と、腫瘍-宿主インターフェイス(T-HI)血管の構造と機能を解析した。T-HI血管は透過性が著しく高く、その内皮には高分子血管外移行に寄与するvesiculo-vacuolar organelle (VVO)が豊富に存在していた。EPR効果には、VVOの存在とT-HI領域を含む腫瘍微小循環機能の抑制が重要である。

研究成果の概要(英文)：Nanoparticles are difficult to extravasate from initial stage tumor vessels. Therefore, enhanced-permeability and retention (EPR) effects do not occur in such vessels. A combretastatin derivative, Cderiv, enhances vascular permeability. To elucidate the microcirculation mechanisms of the EPR effect, we investigated the structure and function of tumor vessels and tumor-host interface (T-HI) vessels after Cderiv administration. We also assessed the therapeutic enhancement effects of the combination of doxorubicin micelle with Cderiv. Results show the following. (1) The T-HI vessel endothelium contained many vesiculo-vacuolar organelles (VVO), which contribute to macromolecule extravasation, even after the Cderiv administration. (2) Combination therapy (Cderiv + doxorubicin micelle) markedly inhibited LY80 tumor growth. The presence of VVO and the decline of tumor microcirculation function involving T-HI are important for the EPR effect.

研究分野：実験腫瘍学

キーワード：腫瘍血流遮断 コンブレタスタチン 腫瘍血管 EPR効果 高分子ミセル DDS インターフェイス

## 1. 研究開始当初の背景

抗癌剤をナノ粒子化し、EPR 効果により、それを腫瘍に選択的に到達亢進させようとする研究が活発に進められている。しかし、最近、我々は、ナノ粒子が漏出し易いのは、腫瘍-壊死インターフェイス、および腫瘍-宿主インターフェイスの領域であり、ステージの若い腫瘍血管からは漏れにくいこと、そして、その血管が支配する領域には、ナノ粒子が蓄積しないことを見出した (Hori et al, J Pharm Sci, 2010)。この事実は、微小転移巣を含む初期増殖段階の腫瘍は、ナノ粒子化抗癌剤の攻撃を免れることを強く示唆している。

一方、我々は、コンプレタスタチン(腫瘍血管破断薬)誘導体 Cderiv で処置すると、径 3 mm 以下の微小腫瘍にも EPR 効果が起きることを、蛍光標識したナノミセルを用いて示した。

## 2. 研究の目的

この所見を踏まえ、本研究では、ナノ粒子が腫瘍内に移行・蓄積する病態生理学的機序を解明し、EPR 効果の適用範囲を微小増殖巣にまで広げることを目指した。具体的には、以下の研究を達成することを目的とした。(1) コンプレタスタチンを投与した時の微小腫瘍の循環機能変化の解析、(2) コンプレタスタチン処置後の微小血管の微細構造の観察、(3) コンプレタスタチン処置後にドキシソルピシン封入ミセルを投与することによる治療効果増強の検証、である。しかし、(3)の実験を進めた結果、併用治療を行った場合においても、腫瘍辺縁部からの再発を防ぐことができなかった。そこで、さらに、(4) 辺縁部からの再発の原因の解明とその抑制対策、を研究目的に加えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物、癌細胞、麻酔

実験動物は 200 - 250 g の雄ドンリュウラット (TU-Donryu; 東北大学加齢医学研究所で自家繁殖)を用い、癌細胞は吉田肉腫の変異株 LY80 (難治癌モデル)を用いた。実験は全て、微小循

環に影響を及ぼさない麻酔条件 (25 mg/kg ペントバルビタールと 1%エトレン吸入麻酔の併用)のもとで行った。全ての動物実験は、東北大学動物実験専門委員会で承認された。

### (2) 腫瘍血管破断薬 Cderiv

腫瘍血管破断薬としてコンプレタスタチン誘導体 Cderiv を用いた。Cderiv は Ohsumi らの方法に従って合成された (東京化成に依頼)。この薬剤は、強力な選択的腫瘍血流遮断作用を持ち、それによって腫瘍血管の破断を誘導する。10 mg/kg の用量を静脈内投与で使用した。

### (3) ドキシソルピシン内包ミセル

ドキシソルピシン内包ミセルは、発明者の横山 (東京慈恵会医科大学) から提供された。

### (4) 蛍光物質

物質の移行性を解析するためのトレーサーとして、フルオレセインナトリウム (分子量 376.3)、および FITC (fluorescein isothiocyanate) ラベルのナノミセル (横山から提供されたものであり、サイズは 48 nm) を用いた。この蛍光ミセルは、治療実験に用いたドキシソルピシンミセルに構造とサイズが類似している。

### (5) 腫瘍血流量測定

腫瘍血流量は水素クリアランス法を用い、絶対血流量を測定した。

### (6) 生体観察

腫瘍血管の変化を顕微鏡下で直接観察し、各種蛍光物質の血管外移行を計測した。その手段として、サンドイッチ式ラット背部皮下透明窓 (無蛍光石英ガラス製) を用いた。

### (7) X 線照射

X 線照射には実験用 X 線照射装置 (日立 MBR-1520R) を用いた。照射条件は電圧 150 kV、管電流 20 mA であり、厚さ 0.1 mm Cu + 0.5 mm Al のフィルターを使用した。本研究での 1 回照射線量は 5 Gy、線量率は 1 Gy/min であった。

#### (8) 蛍光物質の血管外移行と組織からの消失

蛍光物質の血管外移行と、組織からの消失は映像に記録し、画像解析により、その動態を最大蛍光強度、最大蛍光強度に達するまでの時間、蛍光強度の半減期などで評価した。

#### (9) 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡用の組織切片はヘマトキシリン & エオジン染色、トルイジンブルー染色を行い、検鏡、写真撮影を行った。

#### (10) 電子顕微鏡観察

微小血管の微細構造は、電顕(JEM-1400、日本電子株式会社)を用いて観察し、写真撮影を行った。以下の4つの領域の微小血管をサンプルとした。(I) 腫瘍辺縁から200 μm以上離れた腫瘍内領域、(II) 辺縁から200 μm以内の腫瘍内領域、(III) 辺縁から200 μm以内の腫瘍外領域(腫瘍-宿主インターフェイス)、(IV) 辺縁から200 μm以上離れた宿主の領域。

#### (11) Cderiv とドキシソルピシン内包ミセルの併用治療実験

治療実験は以下の4群に分け、Cderivとドキシソルピシン投与は各1回のみという条件で行った。A群: 無処置コントロール (n = 4); B群: ドキシソルピシンミセル単独群 (n = 5); C群: Cderiv単独群 (n = 5); D群: Cderiv + ドキシソルピシンミセル併用群 (n = 5)。

LY80細胞200万個をラット背部皮下に移植し、8日後、C群とD群にCderiv (10 mg/kg) を静脈内投与した。そして、その24時間後、D群にドキシソルピシンミセル (6 mg/kg) を静脈内投与した。同時間帯にB群にもドキシソルピシンミセルを投与した。腫瘍サイズと体重は連日計測した。

#### (12) X線照射とCderivの併用治療実験

辺縁部からの癌の再発の原因を究明することと、その再発を阻害することを目的として、X線照射 (5 Gy) とCderiv (10 mg/kg) とを組合せた治療実験を行った。照射72時間後にCderivを静脈内投与した群と、逆に、Cderiv投与72時間後に照射を行った群との治療効果と病態生理の違

いを比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) コンプレタスタチン誘導体Cderivによる微小腫瘍の循環機能の変化

微小増殖巣におけるフルオレセインナトリウムの漏出の様子を図1に示す。フルオレセインは低分子のため、静脈内投与後、組織の全領域(腫瘍、腫瘍-宿主インターフェイス、宿主)で迅速に血管外移行した。特に、腫瘍-宿主インターフェイスでの漏出が著しかった。また、ウオッシュアウトも速く、約2時間で組織から消失した。

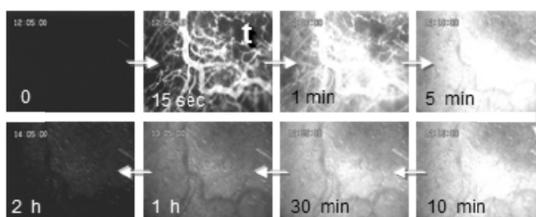


図1 Cderiv処置前のフルオレセインナトリウムの血管外移行。各写真右上の位置が微小腫瘍。左下が宿主組織。その境界部が腫瘍-宿主インターフェイス。t, 腫瘍; 矢印, 時間の方向。腫瘍はLY80 (Hori et al, Cancer Sci, 2014より引用)。

図2は、Cderiv (10 mg/kg) 静脈内投与1日後の、同一部位におけるフルオレセインナトリウムの漏出の様子である。Cderivは、顕微鏡レベルの微小腫瘍においても、腫瘍血流を選択的に遮断し、腫瘍全領域を変性に導いた。しかし、腫瘍-宿主インターフェイスの血管の血流は遮断されず、この領域の血管は、Cderiv処置後も高い透過性を保持していた(最大蛍光強度、最大蛍光強度に達するまでの時間で評価)。

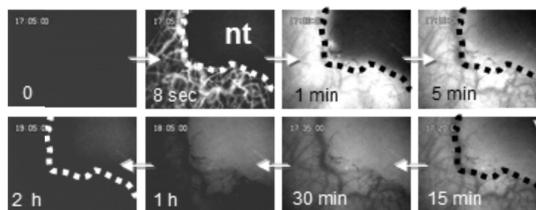


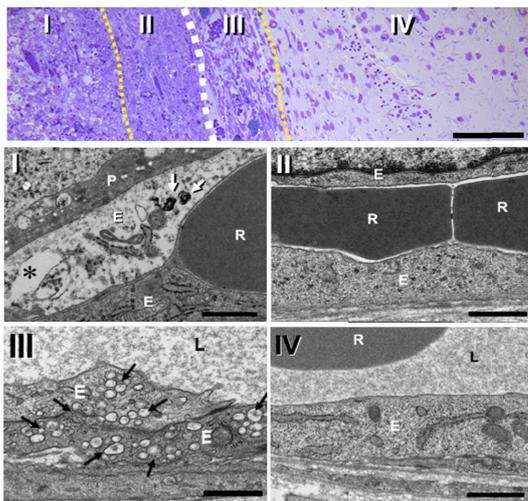
図2 Cderiv処置後のフルオレセインナトリウムの漏出。観察領域は図1と同一。点線、腫瘍の境界部。nt (necrotic tumor), 変化した腫瘍。矢印、時間の方向。Cderivにより腫瘍循環機能が完全に消失していることに注目 (Hori et al, Cancer Sci, 2014より引用)。

蛍光色素は拡散により、腫瘍変性領域にも徐々に浸透したが、この例のように、サイズが数ミリレベルの腫瘍では、フルオレセインの半減期は

短く、約 2 時間で組織から抜けた。FITCラベルのナノミセルを投与した場合には、このような変性領域に長時間停留することを、以前の研究で確かめている (Hori et al, J Pharm Sci, 2010)。

## (2) Cderiv処置後の微小血管の微細構造変化

Cderiv処置後の微小血管の微細構造変化を図 3 に示す。

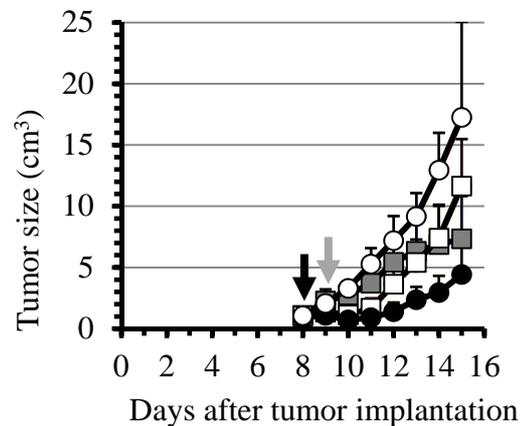


**図 3 Cderiv処置後の微小血管の微細構造**. 上は光学顕微鏡写真でトルイジンブルー染色. 太い点線は腫瘍の境界部. スケールバーは200  $\mu\text{m}$ . (I) 腫瘍辺縁から200  $\mu\text{m}$  以上離れた腫瘍内部; (II) 腫瘍辺縁から200  $\mu\text{m}$  以内の腫瘍内部; (III) 腫瘍-宿主インターフェイス; (IV) 腫瘍から200  $\mu\text{m}$  以上離れた宿主領域. 下は電顕写真. 電顕写真のローマ数字は光学顕微鏡写真のローマ数字に対応する. P, ペリサイト; E, 内皮細胞; R, 赤血球; L, 血管内腔; I の白い矢印, 細胞内小器官に由来するデブリ. \*, 細胞質内に生じた間隙. III の黒い矢印, VVO. 各写真のスケールは1  $\mu\text{m}$ . 腫瘍血管は腫瘍辺縁部から遠ざかるほど変性が著しかった. VVOは小さなものが腫瘍血管内皮にも散見されるが、インターフェイスの血管内皮のVVOはサイズが大きく、かつ数が著しく多いことが注目される (Hori et al, Cancer Sci, 2014より引用)。

腫瘍血管 (I と II) では、血管内腔が完全に消失しており、内皮は直接赤血球と接触している。一方、インターフェイスの血管 (III) と宿主の血管 (IV) の内腔は閉塞していない。Cderivによる血流遮断が腫瘍選択的であることが、構造的に裏付けられた結果である。また、インターフェイスの血管内皮 (III) にはVVOが多数観察され、この領域の血管透過性が著しく高いという生体観察所見と一致している。インターフェイスの血管の血流がCderivで停止しないことが、腫瘍辺縁部におけるEPR効果を弱め、のちの癌再発に繋がる要因である。

## (3) Cderiv とドキシソルピシン内包ミセル併用の治療効果

図 4 は 1 回治療による腫瘍増殖抑制効果の結果を示す。予備実験から、ドキシソルピシンミセルの用量を 6 mg/kg に決めた。この用量は、ラットの体重減少を10%以内にとどめ、しかもLY80腫瘍に対する組織学的効果を示したからである。Cderiv とドキシソルピシンミセル併用群は、ドキシソルピシン単独群に対し、有意の腫瘍増殖抑制効果を示した ( $p < 0.001$ )。併用群は、腫瘍内のほぼ全領域に凝固壊死をもたらしたが、辺縁部に腫瘍が残存し、その腫瘍が治療 3 日後から再増殖を開始した。そのため1回治療では増殖抑制効果は長続きしなかった。



**図 4 Cderivとドキシソルピシンミセルとの併用効果**. A (○), 無処置群 (n = 4); B (□), ドキシソルピシンミセル単独投与群 (n = 5); C (△), Cderiv単独投与群 (n = 5); D (●), Cderiv + ドキシソルピシンミセル併用群 (n = 5). LY80細胞移植 8日後に Cderiv (10 mg/kg) を静脈内投与 (黒矢印), その翌日にドキシソルピシンミセル (6 mg/kg) を静脈内投与 (灰矢印) した (未発表データ)。

## (4) X線照射とCderivの組合せの治療効果

図 4 に示したように、Cderiv単独、およびCderiv + ドキシソルピシンミセル併用治療は、腫瘍に一時的に大きなダメージを与えたが、3 日後にすべての腫瘍が再増殖した。その再発部位はいずれも腫瘍の辺縁部であった。腫瘍辺縁部は、腫瘍血管と腫瘍-宿主インターフェイス血管の両方から栄養供給を受けており、ダメージからの回復が速いためである。Cderivで腫瘍血流が完全に遮断されてもインターフェイス血管の血流が遮断されないことは、本研究で見出した重要所見である。そして、LY80腫瘍モデルにおいて、5 Gy 照射72時間後にCderivを投与すると、1回の治

療だけで、辺縁部からの再発をほぼ完全に防止することができた。逆に、Cderiv投与72時間後にX線照射をした併用群では、再発防止効果がなかった。両者の違いは、前者で、腫瘍-宿主インターフェイス領域に一過性かつ強力な浮腫が誘導され、インターフェイス血管の循環機能が完全に阻害されたことであった。

#### (5) まとめと今後の展望

EPR効果は、進展した腫瘍血管と腫瘍-宿主インターフェイス血管の内皮の構造特性、および腫瘍循環機能の低下という条件が揃った時に起きる。したがって、そのような構造特性と機能を持たない若い腫瘍血管では、EPR効果は起きにくい。しかし、そのような血管も、Cderiv処置で、構造と機能を劣化させることによって、EPR効果を誘導することができた。その結果、Cderiv とドキシソルピシンミセル併用は、単独投与に比べ、有意の増殖抑制効果を示した。また、治療後、腫瘍辺縁部から生じる癌の再発は、腫瘍-宿主インターフェイス血管の循環機能に依存するものであり、その機能を阻害することによって再発を防止できることを、本研究ではじめて明らかにした。

今後の研究の方向として、高分子医薬と腫瘍血管破断薬の最適投与タイミングの決定、腫瘍-宿主インターフェイス局所に一過性の浮腫を誘導する手法の開発、を行えば、治療効果はさらに向上するものと思われる。

#### 5. 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)

(1) Hori K, Akita H, Nonaka H, Sumiyoshi A, Taki Y: Prevention of cancer recurrence in tumor margins by stopping microcirculation in the tumor and tumor-host interface. *Cancer Sci*, 105: 1196-204 (2014).

DOI: 10.1111/cas.12477 査読有

(2) Hori K: Starvation tactics for solid tumors: tumor blood flow interruption via a

combretastatin derivative (Cderiv), and its microcirculation mechanism. *Cancer Metastasis Rev*, 31: 109-22 (2012).

DOI: 10.1007/s10555-011-9333-9 査読有

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 勝義 (HORI KATSUYOSHI)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号: 00143032

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし