

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791278

研究課題名(和文)放射線照射による白金製剤内包高分子ミセルの腫瘍集積性の変化

研究課題名(英文) Ionizing radiation-induced change of the tumor microenvironment and its influence on the accumulation of platinum-type anticancer drug-incorporating polymeric micelles

研究代表者

水野 和恵 (Mizuno, Kazue)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80615972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：白金製剤を内包した高分子ミセルは、血中滞留性・固形癌への集積性・副作用の面で高い効果が確認されており、単独での化学療法だけでなく、化学放射線療法への応用が期待されている。しかし、高分子ミセルが癌細胞に到達するまでの挙動が従来の白金製剤と異なるため、薬剤投与と放射線照射のタイミングを最適化しなければならない。本研究では、X線照射後のマウス皮下腫瘍の形態変化と、シスプラチン含有高分子ミセルの腫瘍集積性の経時変化を評価した。その結果、短期的には炎症に伴い高分子ミセルの集積性は向上するが、長期的には線維化によって集積性が低下する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The polymeric micelles containing platinum-type anti-cancer drugs have shown superior blood circulation, tumor accumulation and toxicity to conventional free drugs. The micelles are expected to be used not only for chemotherapy but also be applied to chemoradiotherapy in the near future. Since the pharmacokinetics of polymeric micelles are different from free drugs with small molecular weight, the dose and timing for the administration and radiation irradiation should be optimized before clinical use. In this research, therefore, the pathological change of the tumor after X-ray irradiation and its influence on the amount of accumulation of CDDP-containing polymeric micelles into tumor were evaluated by using mouse xenograft model. The results showed that the accumulation was improved during a few days after irradiation along inflammation, while the accumulation was decreased due to the fibrosis after several weeks.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：化学放射線療法 ドラッグデリバリーシステム 癌治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗癌剤と放射線を組み合わせた化学放射線療法は、それぞれの特性を生かすことで高い治療効果が期待できる一方で、副作用も増大されてしまう。そこで、薬剤を腫瘍に選択的に集積させるドラッグデリバリーシステム(DDS)を採用することで、副作用を低減すると共に、腫瘍部においてピンポイントで治療効果の増強を図ることが可能であると考えられる。

(2) 我々は、放射線感受性を持つ抗癌剤を内包した DDS 薬剤として、白金製剤内包高分子ミセルに着目し、放射線治療との併用の実現性について検討を行ってきた。その一種であるシスプラチンミセルおよびダハプラチンミセルは、血中滞留性・固形癌への集積性・副作用の面で、従来の白金製剤よりも優れていることが確認されている[1]。白金製剤は肺癌・頭頸部癌・膵臓癌などの化学放射線療法に広く用いられており、また白金製剤含有高分子ミセルは既にアジアやヨーロッパでの臨床試験が進んでいることから、化学放射線療法への早期臨床応用が可能であると期待される。

2. 研究の目的

(1) 白金製剤含有高分子ミセルを放射線と併用する際の一番大きな問題点は、高分子ミセルが癌細胞に到達するまでの挙動が従来の低分子の白金製剤と異なるため、薬剤投与と放射線照射のタイミングを新たに最適化しなければならない点である。放射線照射後には腫瘍および正常組織の環境が照射前と大きく異なることが報告されている。高分子ミセルは、数十 nm のサイズや表面の特性を利用して腫瘍集積性を高めている為、腫瘍内環境の変化が集積性に及ぼす影響を明らかにすることは大変重要である。

(2) そこで本研究では、放射線照射が白金製剤含有高分子ミセルの腫瘍集積性および併用療法の抗腫瘍効果に及ぼす影響を、細胞実験およびマウス皮下腫瘍モデルを用いた動物実験により評価する。さらに、得られた結果を元に、最も治療効果が高くなるような照射・薬剤投与スケジュールを考案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MTT アッセイ

細胞レベルで、薬剤添加と放射線照射のタイミングが細胞生存率に影響を及ぼすかどうかを、MTT アッセイにより評価した。使用した細胞株は、ヒト頭頸部癌細胞(SAS, HSC4)およびヒト肺癌細胞(A549, NCI-H460, PC14-PE6)の5種類である。細胞を96ウェルプレートに播種し、24時間後にシスプラチンもしくはシスプラチン含有高分子ミセル(シスプラチンミセル)を異な

る濃度で培地に加えた。薬剤添加1時間後もしくは24時間後にX線3Gyもしくは6Gy(200kV, 1.3Gy/min)を照射し、播種から96時間後の細胞生存率をMTTアッセイにより測定・比較した(N=3)。

(2) 放射光蛍光 X 線分析

Balb/c nu/nu マウス(, 5週齢)の右下腿に、BxPC3(ヒト膵臓癌)腫瘍の薄片をドナーマウスから皮下移植し、生着後にX線10Gyを照射した。BxPC3細胞が形成する皮下腫瘍は、間質が多く、癌巣をもつことから、難治性の膵臓癌のモデルとして用いられている。照射5日後にシスプラチンと同じく白金製剤であるダハプラチン含有高分子ミセル20mg/kg(オキサリプラチン換算)を尾静脈注射し、24時間後に腫瘍を摘出し、OCTコンパウンドに包埋した。連続切片の片方にヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、もう片方の20 μ m厚の切片をポリプロピレン膜上で自然乾燥させ、高輝度光科学センターの大型放射光施設SPring8のBL37において、放射光蛍光X線分析による元素マッピングを行った。用いた光源の波長は13.5keV、ビームサイズは1 μ m \times 2 μ mである。シスプラチンミセル由来の白金元素、および生体由来の元素(カリウム、鉄、亜鉛等)の2次元分布画像を得た(N=1)。

(3) 病理試験

Balb/c nu/nu マウス(, 5週齢)にSAS細胞 2×10^6 個を皮下移植し、10日後にX線0, 4, 8, 12, 16Gyを照射した。腫瘍部以外は鉛プレートを用いて遮蔽した。照射後の短期的および長期的な効果を評価する為、照射1, 2, 3日後および1, 2, 3週間後に腫瘍を摘出し、ホルマリン固定後、HE染色および各種免疫染色による病理解析を行った(N=1~3)。

(4) ICP-MS 試験

SAS細胞を皮下移植したマウスに、X線4Gyもしくは8Gyを照射し、1, 2, 3および7日後にシスプラチンミセル5mg/kgを尾静脈投与した。24時間後に腫瘍を摘出し、硝酸処理後、腫瘍内の白金含有量を誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)により測定した。(N=5~6)また、長期的な効果を調べるため、8Gy照射3週間後の腫瘍についても、同様の測定を行った。ただし、測定時の腫瘍サイズの平均値が同じになるよう、移植から照射までの期間を各条件につき調節した。病理解析は北海道大学大学院医学研究科・探索病理学講座の西原広史氏・毛利普美氏のご協力をいただいて実施した。

(5) 抗腫瘍効果

A. 1回照射と1回投与

短期的な併用効果を調べる為、SAS皮下移植作成8日目にX線4Gyを照射し、その直後もしくは3日後(集積性の高いタイミング)

に、シスプラチンミセル 5mg/kg を 1 回投与し、その後の腫瘍径の経時変化を計測した。(N=6)

B. 1 回照射と複数回投与

短期的な効果を評価する為の異なるスケジュールとして、シスプラチンミセル 2mg/kg を 2 日に 1 回ずつ、計 3 回投与し、薬剤投与開始の前日もしくは最終日の翌日に X 線 4Gy を照射し、その後の腫瘍径の経時変化を計測した。(N=6)

C. 複数回照射と複数回投与

長期的な併用効果を評価する為、X 線 4Gy の照射の直後もしくは 3 日後にシスプラチンミセル 5mg/kg を 1 回投与する併用療法を、週に 1 回、3 週間繰り返した際の抗腫瘍効果を計測した。(N=6)

4. 研究成果

(1) 細胞試験

SAS, HSC4, A549, PC14-PE6 細胞に対するシスプラチンもしくはシスプラチンミセルと X 線の併用効果は、薬剤添加から放射線照射の時間に依らず、相加効果となった。しかし、NCI-H460 細胞は、薬剤添加から 24 時間後に照射した方が 1 時間後よりも高い細胞毒性が得られたことから、癌細胞の種類によっては、投与から照射までのタイミングが治療効果に影響する可能性が示唆された。薬剤を培地に添加後の細胞周期停止やアポトーシス誘導の比較試験を行ったが、特に差異は見られず、併用効果に影響を及ぼす因子について、今後明らかにする必要がある。

(2) 放射光蛍光 X 線分析

未照射の BxPC3 腫瘍の切片では、円形の癌細胞巣が多く認められた。癌細胞内では癌細胞の活性を示すカリウム濃度が高く、また巣の内部では血管が乏しいため鉄濃度が低い様子が観察された。一方、X 線 10Gy を照射して 5 日後の BxPC3 腫瘍では、癌細胞が委縮し、間質との境界が円形からひだ状に変化していた(図 1)。癌細胞内の面積あたりの白金含有量が増加していたことから、照射によって癌細胞の表面積が大きくなり、癌細胞内に

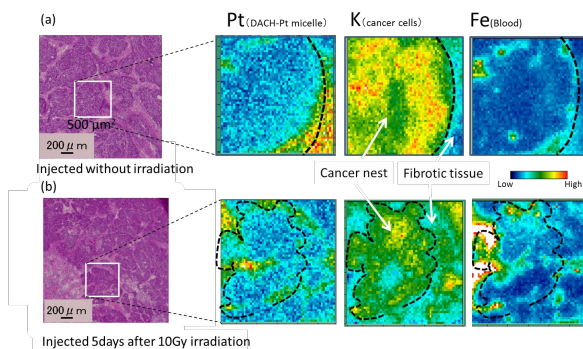


図 1 (a) 未照射と (b) X 線 10Gy 照射 5 日後の BxPC3 腫瘍の HE 染色と Pt, K, Fe の元素分布

取り込まれる高分子ミセルの量が増加したと推測される。SAS 腫瘍についても同様の評価を行ったが、腫瘍内の白金分布が BxPC3 に比べ均一であり、後述の質量分析を用いた定量評価の方が適していると判断した。

(3) 病理試験

照射 1, 2, 3 日後の SAS 腫瘍において、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)染色を行ったところ、1 日後には好中球数の上昇が認められ、2, 3 日後は横ばいであった。特に 8Gy 以上の照射群において、好中球の増加が顕著であった。抗 F4/80 抗体を用いたマクロファージ数の評価では、1 日後には若干減少、2 日後に増加、3 日後は 2 日後と同等数であった。これは、照射部位のマクロファージが一旦死滅し、その後新たに外部から侵入してきた為と考えられる。TUNEL 染色によるアポトーシス誘導の評価では、1 日後からアポトーシスを起こした細胞が認められ、徐々に減少した。照射 3 日後では、線量が高いほど染まっている細胞数が多いという結果であった。Claudin5(血管内皮細胞の結合因子)による評価を行ったところ、特に 8Gy 以上で結合因子の低下が認められた。SAS 皮下腫瘍において Claudin5 の発現量とナノメートルサイズの粒子の透過性との関連性は明らかになっていないものの、新しい知見であると考えている。以上のことから、放射線照射後速やかにアポトーシス誘導と急性の炎症反応が起き、その度合いは線量依存的事実であることが示された。また、血管内皮細胞の結合因子の低下により、照射後に血管透過性が向上する可能性が示唆された。

X 線照射 1,2,3 週間後の腫瘍の病理切片に対し、線維化の指標として α -smooth muscle actin(α -SMA)染色および Platelet-Derived Growth Factor- β (PDGFR- β)染色を用いた解析を行った。線維化部分の割合は経過時間と伴に増加し、3 週間後に最大となった。また、0 から 16Gy の間では、8Gy が線維化のピークであった。

(4) ICP-MS 試験

短期的な効果として、重量あたりの腫瘍内白金含有量は、未照射群に比べ、X 線照射群の腫瘍で優位に高くなった。白金含有量は照射後の時間経過と伴に増加し、3 日後でピークとなり、4Gy では未照射群の 1.5 倍、8Gy では 2.4 倍であった。照射 7 日後には、未照射群と同じレベルにまで低下していた。一方、8Gy 照射 3 週間後の腫瘍では、未照射群の約 0.8 倍となり、線維化により集積量が低下したと考えられる。

(5) 抗腫瘍効果試験

A. 1 回照射と 1 回投与

マウス皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果は、X 線照射の直後にシスプラチンミセル

5mg/kg を投与した場合と、照射から 3 日後に投与した場合とで、同じ結果となった。ICP-MS 測定の結果から、照射 3 日後には集積量が 1.5 倍となり、抗腫瘍効果の向上が期待されたが、それが得られなかった要因として、照射線量として設定した 4Gy が、1 回の照射としては比較的大きな値であり、照射による抗腫瘍効果がシスプラチンミセルの 1 回投与による抗腫瘍効果よりも大きく差異として確認できなかったことが挙げられる。また、照射により細胞の感受性が変化した可能性も考えられる。

B. 1 回照射と複数回投与

上記の結果を受けて、シスプラチンミセル 2mg/kg の複数回投与の前、もしくは投与後に X 線照射を行い、抗腫瘍効果を比較した。シスプラチンミセルの投与前に照射した場合は、一旦腫瘍の成長が抑制されるが、最終的には、投与後に照射した場合と同じ腫瘍体積となった。A のスケジュールと同様に、照射の影響がシスプラチンミセルの影響よりも大きいことや、シスプラチンミセルによる細胞周期の停止が、放射線感受性に影響を与えている可能性が考えられる。

C. 複数回照射と複数回投与

短期的に最も効果が高いと予想される、照射 3 日後にシスプラチンミセルを投与する A のスケジュールを、3 週連続で 3 回実施した。その結果、照射直後に投与した場合と、照射 3 日後に投与した場合とで、ほぼ同じ抗腫瘍効果が得られた。このことから、本研究で実施した条件では、放射線照射後の腫瘍において、シスプラチンミセルの腫瘍集積量は短期的には向上、長期的には低下したが、併用した際の治療効果への影響は見られなかった。

本研究により得られた知見は、高分子ミセルだけでなく、ドラッグデリバリーシステムの技術を活用した他のナノサイズの薬剤に関しても、放射線との併用に向けて、有用であると考えられる。今後、白金製剤含有高分子ミセルを用いた化学放射線療法の臨床応用に向けて、併用タイミング依存性を決める因子の探索や、血管透過性の向上に関わるタンパクの発現量の線量依存性・経時変化を、更に明らかにする必要がある。そのような放射線照射後の腫瘍組織内の微小環境の変化を理解することで、新たな薬剤キャリアの設計へのフィードバックも期待される。

参考文献

[1] H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, *et al*, *Br Journal Cancer*, 93, 678-687 (2005)

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

水野 和恵、Horacio Cabral、西山 伸宏、

片岡 一則、放射線治療との併用に向けた白金製剤含有高分子ミセルの評価、第 35 回日本バイオマテリアル学会

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

水野 和恵 (MIZUNO, Kazue)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号： 80615972