

令和元年6月18日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08217

研究課題名(和文) 腫瘍微小循環改善に着目したEPR効果増強法とそれによる併用化学療法の探索

研究課題名(英文) Augmentation of EPR effect and therapeutic effect of nanomedicine by improving tumor microenvironment

研究代表者

方 軍 (FANG, Jun)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：20412736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍血流の改善に着目することで、EPR効果/高分子ナノメディシン腫瘍集積の増強およびより効果的ながん治療につながる併用化学療法の探索を目的とし、内因性の血流促進・血管透過性因子の代表として一酸化窒素(NO)と一酸化炭素(CO)に注目し、その産生薬を用い、高分子薬剤の腫瘍デリバリーへの促進作用を検討した。NO/CO産生薬の投与により、腫瘍特異的にNO/COを産生し、腫瘍血流の改善・高分子抗がん薬の腫瘍集積(EPR効果)の増加に繋がった。その結果、高分子ナノメディシンの抗がん治療効果はこれらのNO/CO産生薬との併用により著名に向上され、その臨床への応用が強く期待されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、腫瘍血流の改善による副作用の少ないEPR効果/高分子抗がん治療の増強法を確立できると考えられる。その結果、高分子抗がん剤の腫瘍内デリバリーが数倍から数十倍増加でき、より効率の良い、これまで以上優れた抗がん治療効果が得られる。つまり、本研究の成果はがんの効率的な治療へとつながり、医療費の削減ならびにがん患者のQOLを上げることに寄与するものと強く期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated approaches to augment EPR effect/tumor drug delivery of macromolecular nanomedicines, by improving tumor blood flow. For this aim, we focused on vascular mediators involved in EPR effect, i.e., nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), and examined their potentials to enhance the delivery of nanomedicines into tumor, by using NO/CO generators. The NO/CO generators induced the generation of NO/CO more selectively in tumor, which in turn resulted in the improvement of tumor blood flow and increase of nano-drugs in tumor (EPR effect). Consequently, by combining with these NO/CO generators, the anticancer effect of nanomedicines were significantly elevated which were verified in different solid tumor models including carcinogen-induced cancers. These findings strongly suggested the potentials of these NO/CO generators as EPR enhancers to improve the therapeutic effects of nanomedicines.

研究分野：腫瘍DDS

キーワード：EPR効果 DDS 腫瘍ターゲティング ナノメディシン 一酸化窒素 一酸化炭素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

今世紀になってからナノメディシンの展開には目をみはるものがある。前田らは1986年にナノメディシン（高分子型薬剤）の腫瘍集積性に関する新しい概念、EPR効果を提唱して以来、昨年までに累計1万8千件以上も引用されており、癌に特異的な制癌剤のデリバリーの新しい基本概念として認識されている。近年、高分子抗がん剤はその高い腫瘍集積性と少ない副作用により注目され、数多く開発された。しかし、EPR効果は腫瘍の血管の病理学特徴による現象であり、腫瘍血流に大きく影響される。即ち、血流の旺盛な腫瘍に対し、高分子抗がん剤が顕著な腫瘍内集積と抗がん効果を得るが、多くの難治性がん（例えば膵がん、転移性がん）は血流に乏しく、十分なEPR効果と治療作用が得られず、いわゆる **heterogeneity** を示している。このため、ナノメディシンの効果、特に難治性がんに対する治療効果を向上するには、腫瘍血流の改善・EPR効果の増強法の開発は重要な位置づけを占めるものと考えられる。

これまで、我々はNOやCOがEPR効果とよく関わる血管作動性因子として報告してきた。アルギニン (Arg) は内因性NO合成酵素の基質（原料）である。我々は心筋梗塞の治療薬ニトログリセリン (NG) は低酸素の腫瘍環境でより選択的にNOに変換され、腫瘍血流の増加を導くことを明らかにしている。白血病の治療薬であるヒドロキシウレア (HU) もNOを産生することにより作用を発揮することが報告されている。また、我々は内因性COの誘導剤PEG-hemin及び外因性のCO donorは腫瘍血流、血管透過性を増強することを証明した。最近、高分子DDS型CO donor (SMA/CORM2) の合成に成功し、それとNGの腫瘍血流の改善作用を生かし、ナノサイズの乳酸菌の腫瘍デリバリーさえも著名に増強されることを認めている。

2. 研究の目的

本研究は、上記の背景を踏まえ、化学発がんモデルを含む各種腫瘍モデル及び上述のNO/CO産生剤を用い、NOとCOのEPR増強作用を系統的に評価し、さらに、EPR効果の増強剤として高分子抗がん薬との併用治療の有用性が検討し、明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、腫瘍血流が豊富（EPR効果大）な癌腫と知られるマウスザルコーマ S180、大腸がん C26 の皮下移植モデル、腫瘍血流が乏しい（EPR効果小）マウスメラノーマ B16 皮下移植モデル、及びAOM/DSS誘発マウス大腸がんモデル、DMBA誘発ラット乳がんモデルを用いる。高分子抗がん剤として、本研究室で開発したHPMAコポリマー結合したピラルビシン (P-THP) 及び高分子化光力学治療 (PDT) 薬HPMA-亜鉛プロトポルフィリン (PZP) とHPMA-ピロフェオフォルバイド a (P-PyF) を用いる。

(1) 腫瘍組織におけるNO、COの産生：C26腫瘍モデルにおいて、NGを腫瘍及び正常皮膚に塗り、Arg、HUを腹腔内注射し各時間後、腫瘍組織を取りHPLCによりNO_x (NO₂ + NO₃)を測定し、Griess reactionによりNO濃度を定量した。また、SMA/CORM2またはPEG-heminを動物に投与後、腫瘍組織を取りガスクロマトグラフィーによりCOを定量した。

(2) 腫瘍血流測定：上記各処理による腫瘍血流の変化は、S180腫瘍モデルを用いレーザードップラー血流計により測定した。一部の実験では、in vivo imaging装置 (SAI-1000、島津) を用い、血管造影を行った。

(3) 薬物動態・組織分布・In vivo イメージング：C26やS180腫瘍モデルを用い、NO/CO産生剤処理後PZP/P-PyFを経静脈注射し経時的に血中または腫瘍および正常臓器・組織中の薬物量を測定する。測定はDMSO抽出、蛍光分光光度計を用いて測定した。また、上述の実験で、In vivo イメージング装置 (IVIS Lumina-XR) を用いPZP/P-PyF投与後腫瘍イメージングを行い、EPR効果を評価した。

(4) NO/CO産生剤を用いる併用高分子抗がん治療の検討：各腫瘍モデルにおいて、NO/COとP-THPおよびNO/COとPDT (PZP/P-PyF) との併用治療効果を検討した。治療効果は、治療後腫瘍体積の変化、転移巣 (肺) の数とサイズ、担がんマウスの生存率により評価した。さらに、腫瘍組織と取り組織HE染色の病理学的検査も行った。

4. 研究成果

(1) NO/CO産生薬による腫瘍組織内NO/COの産生：図1に示すように、NGを投与4h後、腫瘍内NO濃度は3倍ほど増加し、この高いNOレベルは約24hまで維持した。この結果は、正常組織 (腎臓、肝臓、血清) に見られなかった。Arg、HUを用いてもほぼ同様な結果が得られた¹⁾。CO産生薬においては、SMA/CORM2投与2h後、腫瘍内のCOが約10倍増加し、その後徐々に減少したが、24hまで高いCOレベル (3倍ほど) を維持した (未発表データ)；内因性COの誘導剤PEG-heminの場合、腫瘍内COが徐々に誘導され、24hに約8倍上昇した；

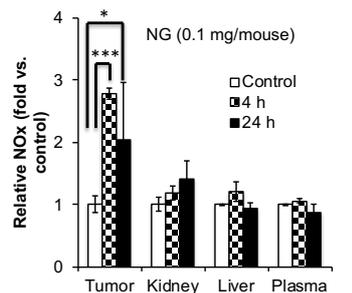


図1 NGによる組織内NOの産生

正常組織の CO 産生が、もともとヘムオキシゲナーゼ (CO 産生する酵素) の高発現の肝臓以外に著名な増加が認められなかった (未発表データ)。

(2) NO/CO 産生薬投与後腫瘍血流の変化: レーザードプラーを用いて腫瘍血流を測定した結果、未処理の担がんマウスの腫瘍血流と比較し、NO 産生薬投与後、腫瘍血流の有意な改善が見られた (投与 4h 後、NG は約 1.4 倍、Arg は約 1.5 倍、HU は約 2 倍の血流の増加を起した) (図 2) 1)。

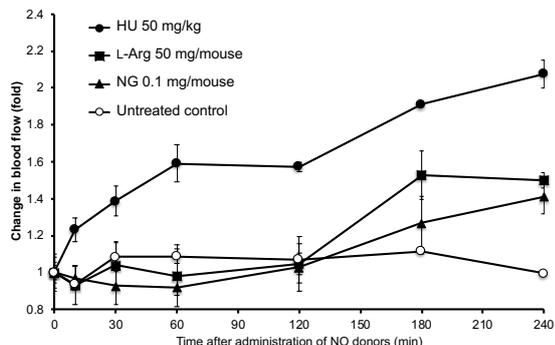


図 2 NO 産生薬による腫瘍血流の改善 (レーザードプラー)

In vivo imaging による血管造影の結果により、CO 産生薬の投与により、腫瘍血流が著しく増加されることがわかった (もともと血管、血流の見えないところに、CO 産生薬注射後血管、血流が現れた[未発表データ])。

(3) NO/CO 産生薬による高分子薬剤の腫瘍集積 (EPR 効果) の増強: 高分子抗がん薬 P-THP を用いた体内動態の結果、P-THP 単独で腫瘍選択的な集積が見られたが、NO 産生薬との併用により、その腫瘍集積がさらに 2 倍ほど増加され、このことは正常組織では認められなかった 1)。高分子 PDT ナノプローブ PZP/P-PyF を用いた実験において、同様な結果が得られた 1)。

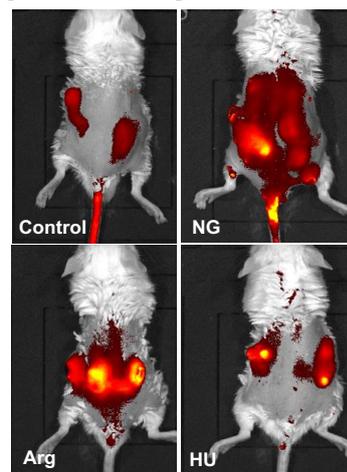


図 3 NO 産生薬による PDT ナノプローブ P-PyF の腫瘍内集積の増加 (in vivo imaging)

CO 産生薬を用いて、同様な実験を行った。高分子 PDT ナノプローブ P-PyF の腫瘍内分布は、SMA/CORM2 や PEG-hemin の処理により、顕著に増加された (1.5-2 倍)。また、正常組織への分布はほとんど影響されなかった (未発表データ)。

P-PyF を用いた In vivo imaging の実験から、NO 産生薬の投与により、著名な腫瘍内蛍光 (P-PyF 由来) の増強が見られた (図 3)。CO 産生薬 SMA/CORM2, PEG-hemin においても、ほぼ同様な結果が認められた (未発表データ)。

以上の結果より、本研究で用いた NO/CO 産生薬は腫瘍選択的に NO/CO を産生し、高分子薬剤の腫瘍集積 (EPR 効果) を増強することがわかった。

(4) NO/CO 産生薬と高分子薬剤の併用治療効果: C26 腫瘍モデルにおいて、P-THP の単回投与は濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果が得られた。P-THP low dose (5 mg/kg) と NO 産生薬を併用することにより、P-THP high dose (15 mg/kg) とほぼ同様またはよりよい治療効果が認められた (図 4)。同様な効果は、B16 腫瘍モデル (より悪性度の高い腫瘍) と S180 腫瘍モデルにおいても見られた 1)。また、CO 産生薬を用いても、著名な P-THP の抗がん効果の増強が得られた (未発表データ)。

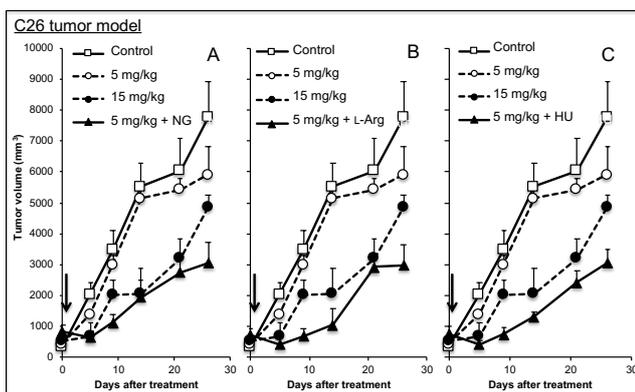


図 4 NO 産生薬による高分子抗がん薬 P-THP の抗がん効果の増強

PDT ナノプローブ PZP/P-PyF を用いた治療実験においても、同様な結果が得られた。PDT low dose は顕著な抗腫瘍効果を得なかったが、NO/CO 産生薬と併用することで、著名な抗腫瘍効果が得られ、PDT high dose (PDT low dose の 2-3 倍高い濃度) と同等な効果が見られた 1、未発表データ)。治療効果の増強は、原発の腫瘍の増殖だけではなく、肺転移の抑制にも認められた 1、未発表データ)。

さらに、われわれは臨床のヒト進行性がんに近い化学発がんモデルを用いて、検討した。AOM/DSS 誘発したマウス大腸がんモデルにおいて、AOM/DSS 処理 10 週後、マウスの大腸に複数の腫瘍ノジュールが発生した。この時点で P-THP、PDT 治療及び NO 産生薬との併用治療を行った。治療 40 日後の結果、未治療のコントロール群の複数の大きな腫瘍に対し、治療群の大腸腫瘍ノジュール数とサイズが著名に減少し、NO 産生薬との併用治療においてさらなる腫瘍ノジュールの減少が見られた。P-THP 併用 NO 産生薬の 1 回治療と P-THP 単独 3 回治療と同等な効果が認められた。大腸の病理学検査でもこの結果をサポートした 1)。DMBA 誘発ラット乳がんモデルにおいて、DMBA 投与後 12-14 週に、肉眼で観察でき

る大きい腫瘍（直径 2-3cm）が発生した時点、P-THP と NO 産生薬 NG との併用治療を行った。P-THP 単独治療は、腫瘍の増殖を顕著に抑えたが、著名な腫瘍の縮小が認められず、治療 2 ヶ月後に腫瘍の再増殖が見られた。これに対し、NG と併用することにより、明らかな腫瘍の縮小が観察され、併用治療群の 6 匹中の 1 匹は腫瘍が完全に消失した。さらに、治療後 4 ヶ月までに、腫瘍の再増殖、再発が認められなかった（図 5）¹⁾。

以上の結果より、NO/CO 産生薬は EPR 効果/高分子薬の腫瘍集積を増強することにより、高分子効果薬の抗がん効果をさらに向上 (2-3 倍) できることがわかってきた。NO/CO が有効な EPR 効果増強の候補薬として、その臨床への応用が強く期待されている。

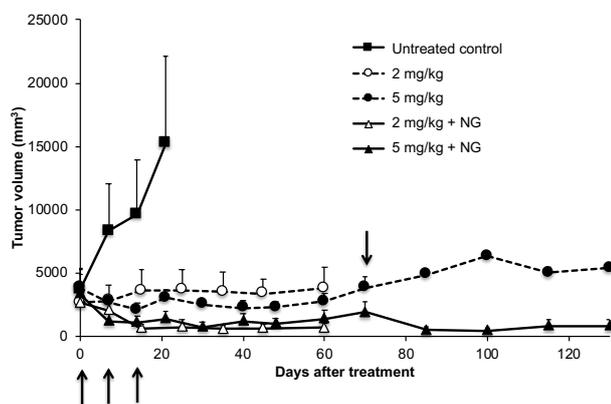


図 5 DMBA 誘発ラット乳がんモデルにおける P-THP/NG 併用治療効果

<引用文献> _

- ① Islam W, Fang J, Imamura T, Etrych T, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Augmentation of the Enhanced Permeability and Retention Effect with Nitric Oxide-Generating Agents Improves the Therapeutic Effects of Nanomedicines. **Mol Cancer Ther.** 17(12), 2018, 2643-2653.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Islam W, Fang J, Imamura T, Etrych T, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Augmentation of the Enhanced Permeability and Retention Effect with Nitric Oxide-Generating Agents Improves the Therapeutic Effects of Nanomedicines. **Mol Cancer Ther.** 査読有、17(12), 2018, 2643-2653
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0696.
- ② Fang J, Šubr V, Islam W, Hackbarth S, Islam R, Etrych T, Ulbrich K, Maeda H. N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide polymer conjugated pyropheophorbide-a, a promising tumor-targeted theranostic probe for photodynamic therapy and imaging. **Eur J Pharm Biopharm.** 査読有、130, 2018, 165-176.
DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.06.005.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Jun Fang, Hideaki Nakamura, Vladmimir Subr, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, pHPMA-conjugated zinc protoporphyrin, and its augmentation. **11th International Symposium on Polymers Therapeutics From Laboratory to Clinical Practice.** 2016
- ② Jun Fang, Hideaki Nakamura, Vladmimir Subr, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, pHPMA-conjugated zinc protoporphyrin, and its augmentation. **International Conference on Pharmaceutical Chemistry.** 2016
- ③ Jun Fang. Augmentation of tumor-targeted PDT by using nitric oxide generating agents. **International symposium of polymer therapeutics focusing the EPR effect and its Future Development.** 2017
- ④ Jun Fang, Waliul Islam, Vladmimir Subr, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. Characterization and evaluation of photodynamic effect of HPMA copolymer based nanoprobe. **Trilateral, Japan-Israel-Czech Republic, International Symposium of Polymer Therapeutics Focusing on the Targeted Nanomedicines.** 2017
- ⑤ 方軍、Waliul Islam、Tomas Etrych、Petr Chytil、Karel Ulbrich、前田浩、一酸化窒素産生薬を用いる EPR 効果増強法の検討、**第 33 回日本 DDS 学会**、2017
- ⑥ Jun Fang, Waliul Md. Islam, Hiroshi Maeda. Nitric oxide generating agents enhance tumor-targeted photodynamic therapy by modulating tumor microenvironment. **第 76 回日本癌学会**、2017
- ⑦ Jun Fang, Waliul Md. Islam, Vladmimir Subr, Tomas Etrych, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. Augmentation of tumor-targeted photodynamic therapy and imaging by modulating tumor microenvironment using nitric oxide generating agents. **The 44th Annual Meeting and Exposition**

of the Controlled Release Society. 2017

- ⑧ 方軍、Vladimr Subr, Waliul Md. Islam, Steffen Hackbarth, Tomas Etrych, Karel Ulbrich、前田浩、がんセラノスティックスを目指した HPMA ポリマー結合型 Pyropheophorbide-a の開発、第 34 回日本 DDS 学会、2018
- ⑨ Jun Fang, Vladimr Subr, Waliul Islam, Steffen Hackbarth, Tomas Etrych, Karel Ulbrich, Hiroshi Maeda. **International Conference on Medicinal Chemistry & Drug Design**. 2018
- ⑩ Jun Fang, Waliul Islam, Hiroshi Maeda. Polymeric pyropheophorbide-a, a promising tumor-targeted theranostic probe for photodynamic therapy and imaging. 第 77 回日本癌学会、2018