

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06641

研究課題名(和文) がん幹細胞をターゲットとしたリガンド搭載シスプラチンミセルの開発

研究課題名(英文) Development of installing cRGD peptide on micellar nanomedicines incorporating cisplatin against cancer stem-like cells

研究代表者

宮野 一樹 (Miyano, Kazuki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：50801213

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)：頭頸部扁平上皮癌細胞株では、腫瘍細胞や新生血管に発現している $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとがん幹細胞(CD44v9)の共発現が認められており、それらをターゲットとするcRGDペプチド搭載シスプラチン内包高分子ミセル(cRGD-CDDP/m)を開発し、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果を検証した。転移リンパ節におけるcRGD-CDDP/mの薬剤集積性は、CDDP、CDDP/mの薬剤集積性と比較しはるかに優れており、特に薬剤投与早期における薬剤集積性は顕著であり、その結果、転移リンパ節に対する抗腫瘍効果に優れており、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルの生存期間の延長が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後cRGD-CDDP/mが臨床応用される場合には、転移リンパ節における抗腫瘍効果のみならず、微小転移の可能性のあるリンパ節における転移成立阻止効果により、頭頸部扁平上皮癌の治療戦略において既存の予防的頸部郭清術に取って代わる革新的なドラッグデリバリーシステム(DDS)製剤となる事が期待される。また、有害事象が少なくかつ腫瘍選択的な薬剤投与が可能となる事で、社会生活を継続しながらも高い治療効果を楽しむ事が可能となり、患者本人の経済的負担、並びに副作用対策医療費の軽減が期待され、患者のQOL、医療経済の側面においても多大なメリットがもたらされると考えている。

研究成果の概要(英文)：We found that the CSCs (cancer stem-like cells) subpopulation in two HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) cells (human oral carcinoma cells SAS-L1 and HSC-2) overexpresses $\alpha_5\beta_1$ integrins, which is preferentially expressed in tumor neovasculature and cancer cells and we have modified the CDDP-loaded micelles (CDDP/m) with cyclic Arg-Gly-Asp (cRGD) peptide, which can target $\alpha_5\beta_1$ integrins, for enhancing their antitumor efficacy against HNSCC. Thus, in this study, we propose installing cRGD peptide on micellar nanomedicines incorporating cisplatin for improving their activity against CSCs and enhancing survival. cRGD-CDDP/m showed significant antitumor activity against both orthotopic SAS-L1 and HSC-2 tumors in vivo. Moreover, cRGD-CDDP/m rapidly accumulated into the lymph node metastasis of SAS-L1 tumors, effectively inhibiting their growth, and prolonging mice survival.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 高分子ミセル シスプラチン リンパ節転移 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は構音・発声・咀嚼・嚥下といった機能を担う器官に発生するために、その治療にあたっては生命予後と機能温存の両側面を達成する事が求められる。しかし、頭頸部扁平上皮癌は高率にリンパ節転移を生じる事が多く、手術単独治療による根治は困難な事が多く、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療が施行されている。これまでは生存率を優先するために喉頭機能を犠牲にした手術療法が選択される機会が多かったが、近年では放射線化学療法の治療成績が向上したため、機能温存、転移制御の観点から放射線化学療法が選択される事が増えている。現在(放射線)化学療法に使用されているシスプラチン(CDDP)は、抗腫瘍効果が高い薬剤ではあるが、その反面骨髄抑制、腎機能障害、粘膜炎などの副作用が問題である。また、放射線化学療法施行後に再発または転移をきたした症例では、CDDP耐性を獲得している事も少なくなく、救済治療に非常に難渋する。

近年、がんの転移、再発、耐性獲得には、がん幹細胞が寄与しているという報告もあり、特に頭頸部扁平上皮癌ではCD44バリエーション(CD44v)が、がん幹細胞マーカーとして知られている[1]。CDDPを腫瘍特異的、更にはがん幹細胞へと効率良く送達し、その結果再発転移を制御できれば、根治と副作用低減の双方に有利である。

当研究室では、ナノテクノロジーを応用したドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発を行っており、これまでの研究でCDDPをミセルに内包する(シスプラチンミセル:CDDP/m)ことによって[2]、ヒト舌癌同所移植マウスモデルにおける効率的な薬剤送達と高い抗腫瘍効果を確認している[3]。このCDDP/mの有効性は、腫瘍組織の新生血管の隙間構造、血管透過性を利用したenhanced permeability and retention(EPR)効果に起因しており、ミセルの粒子径を最適化する事で、高い腫瘍組織浸透性を実現している[4]。このCDDP/mは、膵臓癌において国内外で第相臨床試験、頭頸部癌においても海外で第相臨床試験が進行中であり、近い将来、日常診療における使用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、CDDP/mをさらに改良し、腫瘍細胞、腫瘍新生血管、更にはがん幹細胞への標的指向性を付与したミセルの開発を目的とする。従来のCDDP/mは、EPR効果を利用したパッシブターゲティング(受動的ターゲティング)に依存するが、標的指向性を付与したアクティブターゲティング(能動的ターゲティング)型のミセルは、さらに効果的な抗腫瘍効果を期待できる。本研究の立案に際し予備検討では、リンパ節高転移能を有するヒト舌癌細胞株(SAS-L1-Luc)において、CD44vと $\alpha v\beta 5$ インテグリンが腫瘍細胞に共発現していることが確認されている。加えて、 $\alpha v\beta 3$ インテグリン、 $\alpha v\beta 5$ インテグリンは、腫瘍細胞や新生血管でも過剰発現しているため、腫瘍細胞、腫瘍新生血管、がん幹細胞を標的とするには好都合である。よって $\alpha v\beta 3$ インテグリン、 $\alpha v\beta 5$ インテグリンと親和性の高い環状型RGDペプチド(cRGD)をリガンドとして用いた「cRGD搭載シスプラチンミセル」(cRGD-CDDP/m)を新規合成する。このアクティブターゲティング型のcRGD-CDDP/mが、実際にがん幹細胞マーカーであるCD44vをターゲットとし得るか、CD44vが関連している転移癌に対して優れた抗腫瘍効果を示すかについて解析検討をし、DDSによる転移、再発、耐性癌の克服を目指す。

3. 研究の方法

cRGD搭載シスプラチンミセルの腫瘍への集積性及び血中滞留性の検討

リンパ節転移を有するヒト舌癌同所移植マウスモデルにCDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/mを尾静脈投与し、それぞれの薬剤における1、8、24時間後の血中滞留性、腫瘍への集積性を評価した。各薬剤投与後(1、8、24時間後)のマウスモデルにイソフルラン全身麻酔を施行し、同所舌腫瘍組織、転移リンパ節、正常リンパ節を摘出した。同時に下大静脈より採血を施行し、遠心分離にて血漿成分を抽出した。抽出した腫瘍組織と血漿を180、90%硝酸で融解蒸散しプラチナを抽出し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いて各サンプルのプラチナ量を測定した。

cRGD搭載シスプラチンミセルの抗腫瘍効果の検討

ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデル(舌腫瘍切除後)にCDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/mを尾静脈投与し、それぞれの薬剤の抗腫瘍効果を比較検討した。IVIS imaging systemを用いて、転移リンパ節の発光強度を経時的に計測する事で、薬剤の抗腫瘍効果を比較検討した。

同所舌腫瘍、転移リンパ節におけるインテグリン発現解析

腫瘍組織には腫瘍の発育に必要な新生血管が存在しており、その新生血管には $\alpha v\beta 3$ インテグリンが発現している事が知られている[5]。また、同じくRGD配列を認識する $\alpha 5\beta 1$ インテグリンは、腫瘍血管の新生に重要な役割を果たしている事も報告されている[6]。よって、cRGD-CDDP/mのターゲットとなり得る $\alpha v\beta 3$ インテグリン、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現を、リンパ節転移を有するヒト舌癌同所移植マウスモデルの同所舌腫瘍組織、転移リンパ節組織において免疫組織学的に解析検討した。

4. 研究成果

cRGD-CDDP/m は薬剤投与早期における優れた血中滞留性、腫瘍への集積性を示した
 cRGD-CDDP/m (半減期 ($T_{1/2}$): 5.0 時間) と CDDP/m ($T_{1/2}$: 5.5 時間) 両者の血中滞留性は、CDDP の血中滞留性と比較しはるかに優れていた。薬剤投与後 1 時間では CDDP/m に比し、cRGD-CDDP/m は優れた血中滞留性を示し、2 群間に統計学的有意差が認められた (図 1A)。

同所舌腫瘍においては、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤投与早期より優れた薬剤集積性を示し、薬剤投与後 1 時間では同所舌腫瘍組織 1g あたりに cRGD-CDDP/m 投与量の 3% 程度が腫瘍内に集積しており、薬剤投与後 24 時間においてもそれを維持していた。一方で CDDP/m は、徐々に同所舌腫瘍へと集積した結果、薬剤投与後 24 時間において cRGD-CDDP/m と同等の薬剤集積性を認めた。この cRGD-CDDP/m と CDDP/m 両者の同所舌腫瘍への薬剤集積性は、CDDP の薬剤集積性と比較しはるかに優れており、両者間に統計学的有意差が認められた (図 1B)。

転移リンパ節においては、薬剤投与後 1 時間で cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し転移リンパ節への集積性が顕著に優れており、両者間に統計学的有意差が認められた。cRGD-CDDP/m と CDDP/m 両者の転移リンパ節への薬剤集積性は、いずれの時間においても CDDP の転移リンパ節への薬剤集積性と比較しはるかに優れており、両者間に統計学的有意差が認められた (図 1C)。

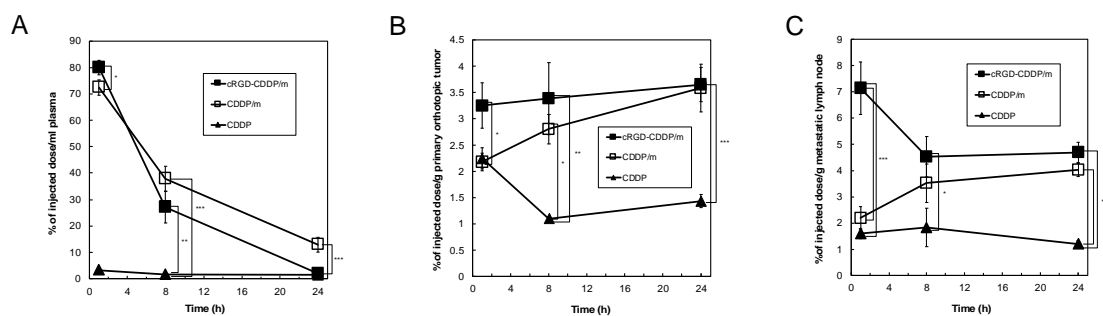


図 1. CDDP, CDDP/m, cRGD-CDDP/m の経静脈投与後における血漿中 Pt 濃度 (A)、同所舌腫瘍組織中 Pt 濃度 (B)、転移リンパ節組織中 Pt 濃度 (C) の経時的変化。平均値±SE (n = 5)。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。

cRGD-CDDP/m は転移リンパ節に対し優れた抗腫瘍効果を示し、副作用も軽度であった

cRGD-CDDP/m 治療群は転移リンパ節に対し劇的な抗腫瘍効果を発揮し、CDDP/m 治療群との間に統計学的有意差が認められた (図 2A)。また、経時的体重変化の結果より CDDP 1mg/kg 治療群では、薬剤投与開始後 12 日の時点において、治療開始時と比較し 15% 程度の体重減少が認められ、cRGD-CDDP/m、CDDP/m 治療群との間に統計学的有意差が認められた (図 2B)。ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデルにおいては、CDDP 1mg/kg の低容量であったとしても生物学的毒性が高く、かつ PBS 治療群 (コントロール群) と比較し抗腫瘍効果が認められなかった。治療終了後 30 日目の予後比較検討においては、cRGD-CDDP/m 治療群は他の治療群と比較し、ヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) リンパ節転移マウスモデルの生存率が高く (図 2C)、転移リンパ節への抗腫瘍効果、転移抑制効果に優れたリガンド搭載型の高分子ミセル製剤の有用性が示された。

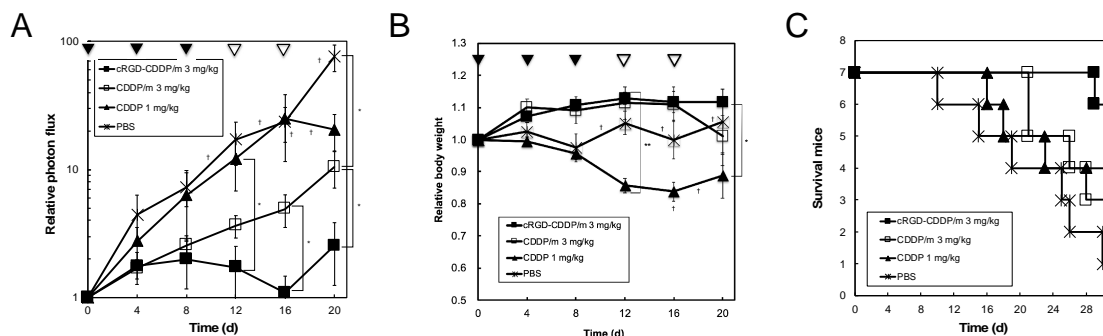


図 2. CDDP, CDDP/m, cRGD-CDDP/m のヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果、転移リンパ節における相対発光強度の経時的推移 (図 2A)、経時的体重変化 (図 2B) とマウス生存曲線 (図 2C)。平均値±SE (n = 7)。*P < 0.05、**P < 0.01。† 死亡。薬剤投与日、薬剤投与日 (CDDP を除く)。

転移リンパ節には $\beta 3$ インテグリン、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現が認められた

cRGD-CDDP/m が発揮する優れた抗腫瘍効果の解明のために、リンパ節転移を有するヒト舌癌 (SAS-L1-Luc) 同所移植マウスモデルの同所舌腫瘍、転移リンパ節を摘出後、免疫組織化学的蛍光染色を施行し共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、それら摘出組織のインテグリン発現を解析した。まず腫瘍組織 (同所舌腫瘍、転移リンパ節) における $\beta 3$ インテグリンの発現を解析した。その結果 $\beta 3$ インテグリンは、同所舌腫瘍、転移リンパ節腫瘍領域に高発現しており、転移リンパ節の非腫瘍領域においては、同所舌腫瘍、転移リンパ節腫瘍領域に比し、 $\beta 3$ インテグリンの発現はわずかであった。特に同所舌腫瘍においては、血管内皮細胞に特異的に発現する CD31 領域に一致した $\beta 3$ インテグリンの発現が高頻度に認められ、腫瘍新生血管が豊富である事が示唆された。また、転移リンパ節の拡大観察による同部位の詳細検討を施行した結果、転移リンパ節の腫瘍領域から正常領域へと移行するにつれ、 $\beta 3$ インテグリンの発現ならびに CD31 領域に一致した $\beta 3$ インテグリンの発現が乏しくなる傾向にあり、腫瘍新生血管が疎になる事が示唆された。その一方で、転移リンパ節の正常領域には $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現が高い傾向が示された。

cRGD-CDDP/m はがん幹細胞である CD44v9 の発現を優位に減少させた

がん幹細胞に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果を検証するため、薬剤投与後 24 時間の SAS-L1-Luc 生存細胞における CD44v9 の発現解析を施行した。これらの結果によれば、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比較し、SAS-L1-Luc 細胞の CD44v9 の発現を優位に減少させ、薬剤濃度を上げるとその差は顕著であった (図 3)。また、高用量の CDDP/m においても SAS-L1-Luc 細胞の CD44v9 の発現が減少していたが、これはがん幹細胞におけるグルタチオン媒介薬剤耐性機構を克服する CDDP/m の有効性を示した我々の先行研究結果と矛盾しない結果であった[3]。

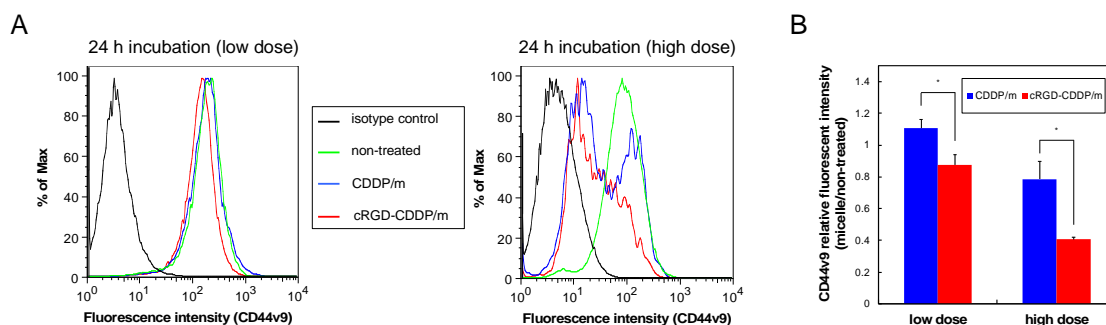


図 3. A : CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間 (左 : 低濃度、右 : 高濃度) における SAS-L1-Luc 細胞株の CD44v9 発現。B : 薬剤非投与群に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m 投与後 24 時間 (低濃度、高濃度) における SAS-L1-Luc 細胞株の CD44v9 蛍光強度比。平均値 \pm SE (n = 3)、*P < 0.05。

【総括】

これらの実験結果より、転移リンパ節においては、腫瘍新生血管上の $\alpha v\beta 3$ インテグリン、腫瘍組織に発現している $\alpha v\beta 5$ インテグリン、転移リンパ節正常領域に発現している $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの 3 つを cRGD-CDDP/m がターゲット可能となった結果、薬剤投与早期における著明な腫瘍集積によって、腫瘍組織におけるがん幹細胞の発現を低下させる事で、転移リンパ節への優れた抗腫瘍効果を発揮したものと考えられた。現在頭頸部扁平上皮癌治療において、リンパ節への微小転移については、術前画像検査にて検出できない場合もしばしば認められ、早期舌癌のハイリスク群においては予防的頸部郭清術が施行されている。今後 cRGD-CDDP/m が臨床応用される場合には、転移リンパ節における抗腫瘍効果のみならず、微小転移の可能性があるリンパ節における転移成立阻止効果により、頭頸部扁平上皮癌の治療戦略において既存の予防的頸部郭清術に取って代わる革新的な DDS 製剤となる事が期待される。また、この EPR 効果とリガンド効果を併せ持つ cRGD-CDDP/m の頭頸部扁平上皮癌の臨床応用により、有害事象が少なくかつ腫瘍選択的な薬剤投与が可能となる事で、社会生活を継続しながらも高い治療効果を楽しむ事が可能となり、患者本人の経済的負担、並びに副作用対策医療費の軽減が期待され、患者の QOL、医療経済の側面においても多大なメリットがもたらされると考えている。

< 引用文献 >

- [1] M. Yoshikawa, K. Tsuchihashi, T. Ishimoto, T. Yae, T. Motohara, E. Sugihara, N. Onishi, T. Masuko, K. Yoshizawa, S. Kawashiri, M. Mukai, S. Asoda, H. Kawana, T. Nakagawa, H. Saya, O. Nagano, xCT Inhibition Depletes CD44v-Expressing Tumor Cells That Are Resistant to EGFR-Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancer Research*, 73, 1855-1866, 2013.
- [2] N. Nishiyama, K. Kataoka, Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core, *J Control Release*, 74, 83-94, 2001.
- [3] M. Wang, Y. Miura, K. Tsuchihashi, K. Miyano, O. Nagano, M. Yoshikawa, A. Tanabe, J. Makino, Y. Mochida, N. Nishiyama, H. Saya, H. Cabral, K. Kataoka, Eradication of CD44-variant positive population in head and neck tumors through controlled intracellular navigation of cisplatin-loaded nanomedicines, *Journal of Controlled Release*, 230, 26-33, 2016.
- [4] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M.R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size, *Nat Nanotechnol*, 6, 815-823, 2011.
- [5] R.O. Hynes, A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis, *Nature Medicine*, 8, 918-921, 2002.
- [6] R. Rathinam, S.K. Alahari, Important role of integrins in the cancer biology, *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 223-237, 2010.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Miyano, K., H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, Y. Mochida, H. Kinoh, C. Iwata, O. Nagano, H. Saya, N. Nishiyama, K. Kataoka and T. Yamasoba. "cRGD peptide installation on cisplatin-loaded nanomedicines enhances efficacy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma bearing cancer stem-like cells." J Control Release、査読有、261 巻、2017、275-286
DOI:10.1016/j.jconrel.2017.06.021

[学会発表](計3件)

Miyano, K., H. Cabral, Y. Miura, Y. Matsumoto, Y. Mochida, H. Kinoh, Nishiyama, K. Kataoka and T. Yamasoba, An active targeting strategy against locally advanced head and neck squamous cell carcinoma harboring cancer stem-like cells via cRGD、14th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems、2017

宮野 一樹、頭頸部癌に対するリガンド搭載シスプラチンミセルの治療戦略、第24回東大・慶大ジョイントカンファレンス、2018

宮野 一樹、頭頸部癌治療における新たなドラッグデリバリーシステム(DDS)製剤の開発、渋谷区耳鼻咽喉科医会学術講演会、2018

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。