

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390310

研究課題名(和文) 腹腔内化学療法におけるナノ粒子化抗癌剤の播種巣内浸透性を規定する諸因子の解明

研究課題名(英文) Distribution analysis of intraperitoneally administrated nanomicellar drugs in peritoneal metastasis

研究代表者

石神 浩徳 (Hironori, Ishigami)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80372382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1)胃癌MKN45の腹膜播種モデルにて、NK105の腹腔内投与はPTX群と比較して、播種の成立を有意に強く抑制した。解剖時の肝腎機能には差はなく、NK105の腹腔内投与は播種に対してより高い有効性を示すことが推測された。(2)播種結節の表面は多数のCD31陽性の微小血管を含む繊維性膜様構造が存在し、PTXの腹腔内投与後はこの血管群を強く障害させることが判明した。(3)腹腔内CD90(+)間葉系細胞は腹腔内に散布された癌細胞を集合させ、その生育に適した線維性間質を誘導することにより、腹膜播種の成立を促進させた。この細胞を標的とするDasatinibの臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intraperitoneal (IP) administration of nanomicellar PTX (NK105) significantly reduced peritoneal tumors than conventional PTX formulation with similar systemic toxic effects, suggesting the clinical usefulness of IP-NK105. Peritoneal nodules are covered with fibrous capsule containing many CD31(+) microvessels both in human and mice. After IP-PTX, however, the peripheral vessels were greatly reduced in number with luminal obstruction. These findings strongly suggest that the remarkable efficacy of IP-PTX is partly dependent on the destruction of peripheral tumor vessels. CD90(+) cells in human peritoneum vigorously grew in culture and express CAF characteristics by TGF- β , and IP co-injection with MKN45 significantly enhanced peritoneal metastasis in nude mice. The CD90(+) cells were engrafted in metastatic nodules mainly at the fibrous area. Oral administration of Dasatinib significantly inhibited the development of peritoneal metastasis of MKN45 with reduced fibrillar formation.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：腹腔内化学療法 NK105 ナノ化抗癌剤 繊維化 血管新生阻害

1. 研究開始当初の背景

胃癌において腹膜播種は最も頻度の高く、予後不良な進展形式であり、現在、全身化学療法が一般には行われているが十分な成績はえられていない。全身に投与された抗癌剤は腹腔内への移行が悪いことがその原因と考えられる。一方、1978年にDedrickらが抗癌剤の腹腔内投与が播種に対して薬物動態学的利点があるという理論的根拠を提唱して以来、卵巣癌播種症例においては、腹腔内化学療法の安全性と有効性が示され、米国では標準的治療の一つとして認定されている。胃癌においても近年、複数の臨床試験において腹腔内化学療法の有効性が示されてきている。

腹腔内化学療法において、投与された薬剤が播種結節に浸透し抗腫瘍効果を発揮するためには、薬剤の腹腔内滞留性・結節への浸透性が高いことをはじめとした薬物動態が非常に重要になる。しかし、固形癌に対する薬剤浸透性に関する情報は極めて少ない。また、腹腔内化学療法の抗腫瘍効果の機序や播種結節におけるがんに伴う線維化の機序についても十分な情報は得られていない。

2. 研究の目的

著者らは、これまでに生体適合性に優れた2-メタクリロイルオキシエステルホスホコリン(MPC)と疎水性のメタクリル酸 n-ブチル(BMA)の共重合体である両親媒性ポリマーPMB-30Wを用いてPTXを溶解し、高分子ミセル製剤であるPTX-30Wを作成、マウス腹膜播種モデルへの腹腔内投与でPTX-Creと比較して抗腫瘍効果の増強と生存期間の延長がもたらされることを報告した。また、PTX-30Wが腹腔内投与後、PTX-Creと比較して播種結節の表面よりより深部へ浸透していることを報告した。今回、ナノミセル化PTXとしてすでに製剤化され、臨床試験が進行中であるNK105(日本化薬、東京)を用いて、ナノ粒子化PTXの腹腔内投与に関する

さらなる基礎的検討を行った。胃癌腹膜播種に対するNK105の腹腔内投与を今後臨床に応用していくことを念頭に置き、動物モデルを用いてNK105の腹腔内投与の腹膜播種と皮下腫瘍への効果と腹腔内投与後のPTXの生体内分布と血中動態を検討することを第一の目標とした。

また、これに関連して、一般に播種結節は線維化が強いとされているが、病理学的にはどのような構造になっているのか？線維化はどのような機序でおこるのか？腹腔内化学療法を施行した播種結節にはどのような組織学的変化がおこるのか？に関する基礎的情報を得ることを追加の目標とした。

3. 研究の方法

PTX-CreとNK105は、日本化薬株式会社(東京)より供与を受けた。ヒト胃癌腹膜播種株であるMKN45Pを用いた。MKN45Pは、ヒト胃癌細胞株MKN45(理研細胞開発銀行、つくば)を培養し、これをヌードマウスの腹腔内に接種し播種巣を採取、その後、これをさらに継代し、同様に再接種することを繰り返し、高頻度に播種を形成する亜株として作成したものである。これを10%FCS、100units/mLペニシリン、100µg/mLストレプトマイシンを含むDMEM(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)培養液で、37℃、5%CO₂気相下で培養し、subconfluenceに達したのちEDTAとtrypsinにて剥離し、実験に使用した。SPFのメスBALB/cヌードマウスはチャールズリバージャパン(横浜)から購入した。23℃の空調管理設備にて、12時間ごとの明暗管理下で飼育した。メスの日本白色ウサギは、埼玉実験動物供給所(埼玉)より購入し、餌と水を自由に飲める環境で個別に飼育した。全ての動物実験は東京大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

8週齢のメスのBALB/cヌードマウスに、MKN45P 2×10⁶個を1mLのPBSに浮遊させ腹腔内へ注入し、同時にMKN45P 1×10⁶個を200

μL の PBS に浮遊させマウスの側背部に皮下注した。これにより、皮下腫瘍と腹膜播種を有するマウスモデルとした。これを無作為にコントロール群、PTX-Cre 群、NK105 群の 3 群に分けた。各群それぞれ、N = 10, 7, 7 とした。週 3 回、キャリパーにて皮下腫瘍の長径(L)(mm)と短径(S)(mm)を測定した。腫瘍の体積は、 $(L \times S^2)/2$ (mm³)の近似式にて計算した。細胞接種後 19 日目にマウスを犠牲死させ解剖した。犠牲死は、吸入麻酔下の心臓採血により行った。開腹し、0.5 mm 以上の腸間膜結節の個数を数え、その総重量を測定した。血液は、15 分室温に静置した後、700g × 5 分、4 にて遠心し、上清を分離した。紫外線吸光法にて AST, ALT, 尿素窒素(UN)を、酵素法にてクレアチニン(Cre)を測定した(SRL、東京)。

5 週齢のヌードマウスに対し、 3.0×10^6 個の MKN45P を 1ml の PBS に懸濁させ、腹腔内に注入した。MKN45P の腹腔内注入後 21 日目に、PMB-30W に溶解した PTX-30W 溶液をそれぞれ静脈投与および腹腔内投与した。静脈投与、腹腔内投与後の 24 時間、48 時間後にそれぞれ犠牲死させて、腸間膜の播種結節を摘出した。標本は、4 にて 10%ホルマリンに 1 時間固定した後、置換のため 10%スクロースに 1 時間、15%スクロースに 1 時間、20%スクロースに一晩浸透させた。それを、O.C.T. compound (Tussie-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋し、アセトンとドライアイスで冷却した n-ヘキサンにて急速凍結した。標本は、-80 にて蛍光顕微鏡観察まで凍結保存した。観察時は、10 μm の凍結切片にし、蛍光実態顕微鏡 (BZ8000; Keyence, Osaka, Japan) を使用した。OG-PTX は励起波長 480nm、蛍光波長 510nm にて緑色の蛍光色素として観察された。

この切片で、血管を検出するために免疫染色を行った。まず、凍結切片を PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。一次抗体として Blocking

One で 200 倍希釈した Rat Anti - Mouse PECAM-1 monoclonal 抗体を使用し、60 分間、室温にて反応させた。その後 PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄、続いて、ブロッキングワンで 200 倍希釈した Alexa Fluor 594 標識の 2 次抗体を 60 分間、暗所、室温にて染色し、PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。対比染色として、細胞核を DAPI にて染色した。10000 倍希釈の DAPI で暗所、室温にて 2 分間染色した後、PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。最後に、マウント液にて固定した。観察は第一章と同様、蛍光実態顕微鏡 (BZ8000; Keyence, Osaka, Japan) を使用し、PECAM-1 と DAPI はそれぞれ、赤色および青色として観察された。

低酸素領域の同定には、前述の MKN45P 腹膜播種マウスに pimonidazole hydrochloride (60mg/ml) を腹腔内投与し、1 時間後に犠牲死させ、アセトン固定、薄切切片を作成し、抗 pimonidazole 抗体 (5microg /mL) で免疫染色、ABC 法にて発色した。

また、ヒト胃癌の播種結節切除検体のホルマリン固定標本から、厚さ 5 microM の薄切切片を作成、5%BSA による blocking の後、抗 CD31 抗体 (5microg /mL) または抗 Ki-67 抗体 (5microg /mL) を添加、12 時間後に二次抗体を添加、ABC 法にて発色した。陰性コントロールとしてマウス IgG を用いた。

4 . 研究成果

1 . MKN45P の In vitro での増殖は PTX-Cre、NK105 によって、抑制されたが、その率には差はなかった。播種結節の個数と重量は、PTX-Cre 群および NK105 群のいずれにおいてもコントロール群と比較して有意に減少しており、NK105 群においては PTX-Cre 群と比較しても有意に減少していた。解剖時における各群の体重、血清中の AST、ALT、尿素窒素 (UN)、クレアチニン (Cre) の値は、PTX-Cre 群と NK105 群の間にはいずれの項目も有意差を認めなかった。

2. ヒトの播種結節の切除標本(化学療法なし8例、あり8例)を用いて、組織学的検討を行った。代表的な像を図6に示す。前学療法のない全ての検体にて、播種巣の表面は繊維性に富む皮膜様の構造で覆われており、CD31抗体で免疫染色すると、多数の微小血管が内包されていることが判明した。また、細胞分裂の指標であるKi-67に対する抗体で染色すると、深部に比べて表層近く癌細胞に多く染色される傾向があった。一方、腹腔内化学療法後のサンプルでは、多くは癌細胞は消失し線維化で置換されており、完全退縮(CR)の像を示した。また、CD31陽性の血管像を見ると、播種内部の血管はintactであったのに対し、表面近くの血管は消失ないし内腔が閉塞していることが確認された。

また、前述のマウスのMKN45播種モデルにて、オレゴングリーンで蛍光標識したPTXを腹腔内投与した後の切除標本にてCD31抗体で血管を観察すると、PTXが浸透した周辺部の血管が激しく傷害されている一方で深部の血管は健常である像がみられ、ヒトと同様の所見が得られた。

以上の結果から、腹膜播種の辺縁部には微小な腫瘍血管が密生し、活発に細胞分裂を起こしている癌細胞が多数存在しており、腹腔内化学療法はこの部位に多量の薬剤(PTX)を運搬することによって、癌細胞および腫瘍血管に障害を与えることによって、著明な腫瘍退縮をきたしていると考えられた。

3. 胃癌患者・肝硬変患者において、腹水・腹腔洗浄細胞液を採取、Ficoll液にて遊離細胞を分離、培養するとCD90(+)の大型の付着性細胞が得られた。この細胞は高い運動能と増殖能を有し、2~3週間には大多数を占めるようになった。本細胞は通常培養では中皮細胞様形態を示すが、至適培養下にて脂肪細胞、骨芽細胞などの分化形質を発現し、Tリンパ球の増殖を強く抑制した。また、TGF-刺激にて紡錘型の形態変化をきたし、□-smooth

muscle actin(α -SMA), Vimentin, Fibroblast activated antigen- α (FAP α)などのmyofibroblast形質を発現した。

さらに、胃癌細胞MKN45と共にnude mouse腹腔内に注入すると、播種の成立を増強した。組織所見では、多数のCD90(+)細胞が播種巣内に取り込まれており、主に間質の線維組織に分布し、Type I Collagen, FAP-□□を発現していた。

最後に、このCD90(+)細胞を抑制することによる播種に対する影響を検討した。In vitroにて様々な薬剤を試したところ、Tyrosine kinase inhibitor, Dasatinibが10 μ M以下の濃度でこの細胞の増殖を強く抑制する一方で、MKN45の増殖には影響をあたえないことが判明した。そこで、In vivoにてDasatinib(25mg/Kg)を14日間継続で経口投与したところ、播種巣内線維成分の低下と共に播種の成立を有意に抑制した(図13)

以上の事実から、CD90(+)間葉系細胞は腹腔内に散布された癌細胞を集合させ、その生育に適した線維性間質を誘導することにより、腹膜播種の成立を促進する。したがって、従来の腹腔内化学療法に加えて、間葉系細胞の抑制薬を上乗せする事により効果的な播種治療となることが推測された。

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6件)

2014年度

1. Emoto S, Yamaguchi H, Kamei T, Ishigami H, Suhara T, Suzuki Y, Ito T, Kitayama J, Watanabe T. Intraperitoneal administration of cisplatin via an in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogel for peritoneal dissemination of gastric cancer. Surg Today. 査読有, 44(5), 2014, 919-26
doi: 10.1007/s00595-013-0674-6
2. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. CD90+ mesothelial-like cells in peritoneal fluid promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive

microenvironment. PLoS One. 査読有, 9(1),2014, e86516

doi: 10.1371/journal.pone.0086516

3. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. Intraperitoneal paclitaxel induces regression of peritoneal metastasis partly by destruction of peripheral microvessels. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有, 73(3)2014, 605-12
doi: 10.1007/s00280-014-2393-0

2013 年度

4. 石神 浩徳, 北山 丈二, 山口 博紀, 江本 成伸, 渡邊 聡明, State of the art 腹膜播種陽性胃癌に対するパクリタキセル腹腔内投与併用化学療法, 胃がん perspective, 査読無, 6(1), 2013, 22-29

2012 年度

5. 石神 浩徳, 甲斐崎 祥一, 北山 丈二, 【進行胃癌治療の最前線】胃癌腹膜播種に対する治療戦略, 日本外科学会雑誌, 査読無, 113(1), 2012, 18-21
6. Emoto S, Yamaguchi H, Kishikawa J, Yamashita H, Ishigami H, Kitayama J. Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination. Cancer Sci. 2012 Jul;103(7):1304-10.

〔学会発表〕(計 5 件)

2014 年度

1. 石神 浩徳, 北山 丈二, 山口 博紀, 江本 成伸, 渡邊 聡明, 腹膜播種陽性胃癌に対する新規集学的治療戦略, 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/5, 国立京都国際会館(京都府・京都市)
2. Joji Kitayama, Shigenobu Emoto, Hironori Yamaguchi, Hironori Ishigami, Toshiki Watanabe, CD90(+) intraperitoneal mesothelial-like cells(MLC) promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive microenvironment, American Association for Cancer Research annual meeting 2014, 2014/4/6, San Diego(USA)

2013 年度

3. 江本 成伸, 山口 博紀, 石神 浩徳, 北山 丈二, 渡邊 聡明, 胃癌腹膜播種に対するナノ粒子化パクリタキセルの腹腔内投与, 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/13 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
4. 江本 成伸, 山口 博紀, 石神 浩徳, 北山 丈二, 渡邊 聡明, 胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法におけるドラッグデリバリーシステムの工夫, 第 86 回日本胃癌学会総会, 2013/3/21, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2012 年度

5. 江本 成伸, 山口 博紀, 石神 浩徳, 山下 裕玄, 北山 丈二, 胃癌腹膜播種に対するナノミセル化抗癌剤 NK105 の腹腔内投与による治療効果, 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012/4/14, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石神 浩徳 (ISHIGAMI Hironori)
東京大学医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 80372382

(2) 研究分担者

北山 丈二 (KITAYAMA Joji)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 20251308