

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893174

研究課題名(和文) DDS製剤の体腔内投与を介した新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer therapy via direct injection of DDS therapeutics into body cavity

研究代表者

安藤 英紀 (ANDO, Hidenori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教

研究者番号：00735524

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)：悪性胸膜中皮腫や胃がん腹膜播種転移など、胸腔や腹腔のいわゆる体腔内で増殖・浸潤した悪性腫瘍に対する新規治療法として、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を利用したナノキャリア製剤の体腔内投与の有用性を評価した。胸膜中皮腫モデルマウスを作成し、ナノキャリア製剤として薬剤封入リボソームあるいは核酸搭載リボソームを胸腔内投与したところ、いずれも胸腔内での高い滞留性を示すとともに、胸膜中皮腫に対する高い治療効果を発揮した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the potency of intrapleural or intraperitoneal direct administration of DDS therapeutics as novel therapeutic strategy for cancer that proliferates and invades in pleural or peritoneal cavity, e.g. malignant pleural mesothelioma (MPM) and peritoneal dissemination of gastric cancer. MPM model mice were prepared and were intrapleurally injected with liposomes encapsulating anti-cancer drugs or liposomes complexed with nucleic acids. As results, both liposome formulations showed intrapleural retention for an extended period of time and exerted high therapeutic effect on MPM.

研究分野：核酸DDS

キーワード：がん治療 悪性胸膜中皮腫 胃がん腹膜播種 リボソーム 抗がん剤 核酸 ドラッグデリバリーシステム 体腔内投与

1. 研究開始当初の背景

体腔（胸腔・腹腔）は悪性胸膜中皮腫や卵巣がん・胃がんの腹膜播種転移など、難治性腫瘍の増殖部位であり、これらを治療するため体腔内は抗がん剤の投与部位として最適である。しかし、体腔内投与後の抗がん剤は速やかに血液中に排泄されてしまい、十分な薬理効果を得ることが困難である。実際、日本肺癌学会の治療ガイドラインでは、胸腔内直接投与を推奨する学術的な根拠はないとされている。また薬物の組織滞留性の向上を実現するドラッグデリバリーシステム（DDS）の利用に関しても、肺がんに対するシスプラチン含有リポソーム製剤の胸腔内直接投与で若干の延命効果が見られたというヒトでの報告はあるものの、体腔に投与したナノ粒子も遊離型の薬剤同様に速やかに循環血中へと排泄されてしまい、十分な治療効果を得ることができていない。これらの知見から、DDS 技術を利用した体腔内投与によるがん治療は高い障壁を有し、これを打破するための新規なアプローチが必要であるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、DDS 技術を利用した当該疾患の革新的治療法の開発を目指し、腫瘍環境下における胸腔および腹腔に投与されたナノキャリアの体内挙動を解析することで、難治性疾患治療のための体腔内から排除されにくいナノキャリアを創製すると同時に、本治療におけるナノキャリア体腔内投与の有用性を支持する学術的根拠を示すことである。研究は以下に示す課題の通りに進めた。

- (1) 胸膜中皮腫モデルマウスにおけるリポソーム胸腔内投与後の動態検討と治療評価
- (2) 胸膜中皮腫モデルマウスにおけるリポプレックス胸腔内投与後の動態検討と治療評価
- (3) 胃がん腹膜播種モデルマウスにおけるリポソーム腹腔内投与後の動態検討

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼ発現 MST0-211H ヒト胸膜中皮腫細胞 (MST0-211H-Luc) を BALB/c *nu/nu* mouse の胸腔内に移植することで胸膜中皮腫モデルマウスを作成した。作成したモデルマウスに対し、蛍光脂質である DiR で標識した中性リポソーム (NL、脂質組成：POPC/DOPE/コレステロール/DMPC/ポリエチレングリコール (PEG) 脂質=2/3/3/2/0.5 モル比) あるいはカチオン性リポソーム (Chol CL、脂質組成：POPC/DOPE/コレステロール/DC-6-14/PEG 脂質=2/3/3/2/0.5 モル比) を胸腔内投与した後の体内動態を *in vivo* imaging system (IVIS) を用いて評価した。悪性胸膜中皮腫に対する標準治療として用いられるペメトレキセド (PMX) を用い、脂質組成の異なる 2 種類のカチオン性リポソーム (Chol CL および Non-Chol CL、Non-Chol CL

の脂質組成：POPC/DOPE/DC-6-14/PEG 脂質=5/3/2/0.5 モル比) に内封させた PMX 内封カチオン性リポソーム (PMX/Chol CL および PMX/Non-Chol CL) を作成した。作成した各リポソームの PMX 放出性を検討し、胸膜中皮腫モデルマウスに胸腔内投与した後の治療効果を評価した。また、胸腔内投与後の PMX の腫瘍集積性および血中移行性を評価した。

(2) MST0-211H-Luc 細胞を用いて胸膜中皮腫モデルマウスを作成した。カチオン性リポソーム (CL、脂質組成：DOPE/DOPC/DC-6-14=3/2/5) と腫瘍の増殖に関与するチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase ; TS) の発現を抑制する核酸 (short hairpin RNA ; shRNA) との複合体であるリポプレックス (lipoplex ; Lpx) を作成し、胸膜中皮腫モデルマウスに胸腔内投与した後の体内動態を IVIS で評価した。胸膜中皮腫モデルマウスを用い、Lpx 胸腔内投与による胸膜中皮腫治療効果を IVIS による腫瘍成長の観察およびマウス生存期間で評価した。

(3) MKN45 ヒト胃がん細胞を BALB/c *nu/nu* mouse の腹腔内に移植することで腹膜播種モデルマウスを作成した。DiR で蛍光標識したカチオン性リポソーム (CL、脂質組成：DOPE/DOPC/DC-6-14=3/2/5) および PEG 修飾 CL (PEG-CL、脂質組成：DOPE/DOPC/DC-6-14/PEG 脂質=3/2/5/1) をそれぞれ調製し、腹膜播種モデルマウスに腹腔内投与した後の体内動態を IVIS で観察した。また、DiI で蛍光標識した CL を調製し、腹膜播種モデルマウスに腹腔内投与した後に腫瘍を回収、腫瘍の凍結切片を作成し蛍光顕微鏡で観察することで、CL の腫瘍集積性を評価した。

4. 研究成果

(1) NL および Chol CL の粒子径はそれぞれ約 100 nm、ゼータ電位は NL が中性、Chol CL がカチオン性であった。胸膜中皮腫モデルマウスに DiR 標識 NL あるいは Chol CL を胸腔内投与し、その後の体内動態を IVIS で評価した (図 1)。NL は胸腔内投与 4 時間後までで全身への移行が見られたのに対し、Chol CL では全身に移行する時間が遅くなり、胸腔内滞留性が向上することが観察された。そこで、

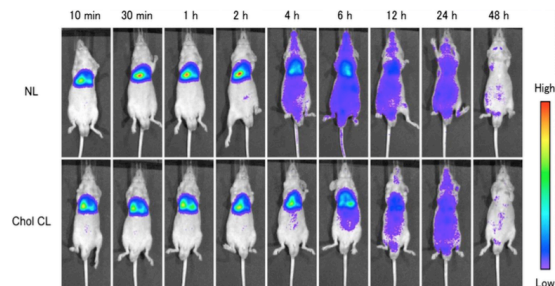


図 1. 胸膜中皮腫モデルマウスを用いた NL および Chol CL 胸腔内投与後の動態検討

脂質組成の異なる2種類のカチオン性リポソーム (Chol CL、Non-Chol CL) を用いて PMX 封入カチオン性リポソーム (PMX/Chol CL、PMX/Non-Chol CL) を調製した。PMX/Chol CL は PMX 放出性が低いリポソームであり、血清との 48 時間インキュベーションで約 25.9% の PMX を放出していた。一方 PMX/Non-Chol CL は PMX 放出性の高いリポソームであり、同様のインキュベーションで約 70.9% の PMX を放出した。調製した各 PMX 封入 CL を用い、胸膜中皮腫モデルマウスを用いた治療検討を行った (図 2)。その結果、PMX/Non-Chol CL では高い抗腫瘍効果が認められたのに対し、遊離型 PMX および PMX/Chol CL ではそれがほとんど見られなかった。また興味深いことに、PMX/Non-Chol CL 投与群の腫瘍内 PMX 量は PMX/Chol CL 投与群と比較して 4 分の 1 程度であり、PMX 胸腔内投与による MPM 治療を実現するためには、PMX を効率的に暴露させる放出制御型 DDS キャリアの利用が重要であることが示された。

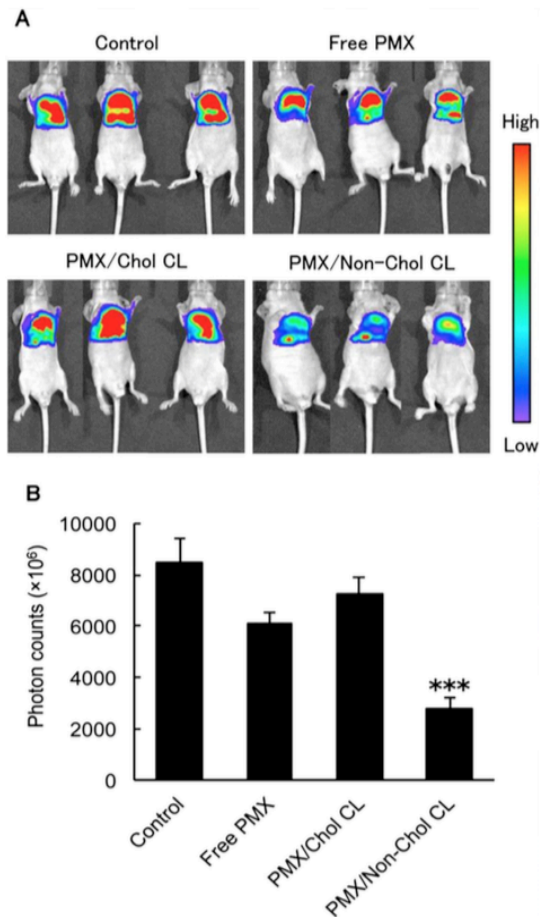


図 2. 胸膜中皮腫治療検討 (A: 腫瘍イメージング、B: A を定量化したグラフ)

(2) CL と shRNA を混合することで Lpx を調製した。Lpx は粒子径が約 140 nm、ゼータ電位が約 +50 mV と、CL とほぼ同じカチオン性ナノ粒子となった。この DiR 蛍光標識体を用い、胸膜中皮腫モデルマウスの胸腔内に投与した後の体内動態を IVIS で観察した。その結果、CL と Lpx ではほぼ同程度の胸腔内滞留性を

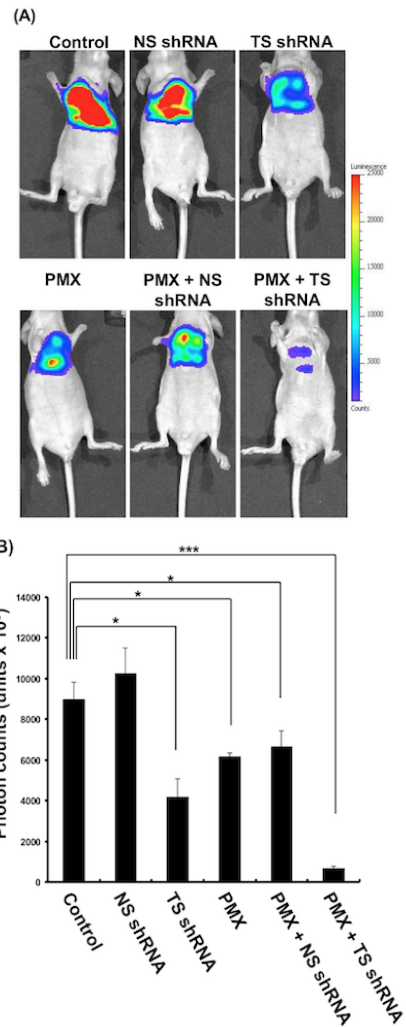


図 3. Lpx と PMX の併用投与による抗腫瘍検討 (A: 腫瘍イメージング、B: A を定量化したグラフ、TS shRNA: Lpx 投与群、NS shRNA: 非特異的な shRNA を搭載した Lpx 投与群)

示した。次に、悪性胸膜中皮腫に対する標準治療として用いられる PMX と Lpx の併用投与による抗腫瘍効果の評価した (図 3)。PMX 単独投与群および Lpx 単独投与群においても対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果が認められたが、PMX と Lpx を併用投与させることでさらに顕著な腫瘍増殖抑制効果が

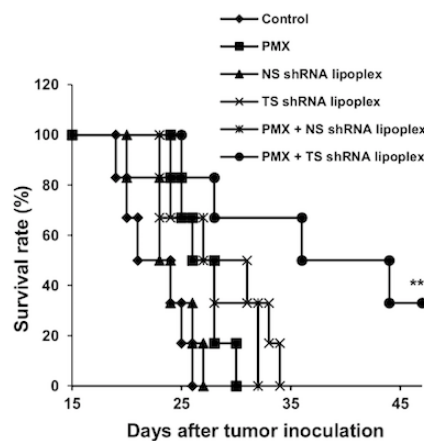


図 4. Lpx と PMX の併用投与によるマウス延命効果の検討

発揮された。また同様の実験系でマウス延命効果を評価したところ、PMXとLpxの併用投与群で顕著な延命効果が認められた(図4)。

(3)調製したCLおよびPEG-CLの粒子径・ゼータ電位は、それぞれ約120 nm・約+26 mV、約120 nm・約-1 mVと、PEG修飾することでゼータ電位が中性付近となった。MKN45腹膜播種モデルマウスにDiR標識CLあるいはPEG-CLを腹腔内投与し、その後の体内動態をIVISで評価した(図5A)。その結果、PEG-CLが投与後速やかに全身へ移行したのに対し、CLは長期間腹腔内に滞留し続ける様子が観察された。また、投与72時間後に各臓器を摘出し、各リポソームの集積性を評価したところ、CLは肝臓や脾臓の正常組織には集積が見られない一方で、腫瘍だけに選択的な集積性を示すことが明らかとなった(図5B)。さらに、CLの集積部位を蛍光顕微鏡で観察したところ、腫瘍辺縁部におけるCLの高い集積が認められた。

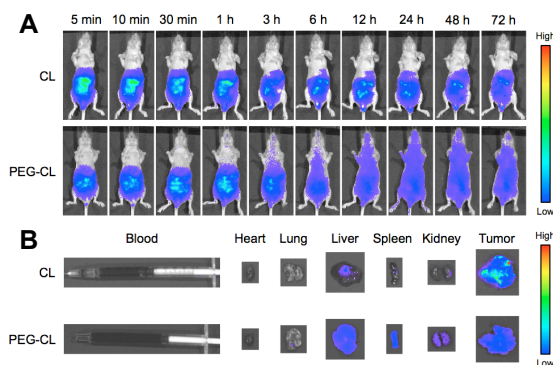


図5. MKN45腹膜播種モデルマウスにおけるCLおよびPEG-CL腹腔内投与後の動態検討(A:イメージング、B:投与72時間後の腫瘍および各臓器に対する集積性)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Ando H, Kobayashi S, Abu Lila AS, Essam Eldin N, Kato C, Shimizu T, Ukawa M, Kawazoe K, Ishida T. Advanced therapeutic approach for the treatment of malignant pleural mesothelioma via the intracellular administration of liposomal pemetrexed. *J. Control. Release* 2015, **220**, 29-36. 査読有 DOI:10.1016/j.jconrel.2015.10.019

〔学会発表〕(計3件)

- ① 金城 望、安藤 英紀、新規RNAi分子発現核酸デバイスの*in vitro*、*in vivo*有用性評価、第31回日本DDS学会、2015年7月2日～2015年7月3日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)
- ② 渡邊 奈美、安藤 英紀、胃がん腹膜播種モデルにおけるオキサリプラチン封入リポソーム静脈内投与による腫瘍増殖抑制

効果、第31回日本DDS学会、2015年7月2日～2015年7月3日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

- ③ 加藤 千尋、安藤 英紀、悪性胸膜中皮腫治療のための核酸搭載カチオニックリポソームの胸腔内投与とその動態評価、生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014年11月20日～2014年11月21日、徳島大学(徳島県・徳島市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 英紀 (ANDO, Hidenori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教

研究者番号：00735524