

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82731

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06871

研究課題名(和文) 腫瘍深部イメージングによる腫瘍内不均一性の評価とDDS動態制御

研究課題名(英文) Evaluation of tumor heterogeneity by deep tumor imaging and control of drug delivery system

研究代表者

藤 加珠子 (Toh, Kazuko)

公益財団法人川崎市産業振興財団(ナノ医療イノベーションセンター)・ナノ医療イノベーションセンター・研究員

研究者番号：90342732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の不均一性は治療の困難をもたらす。特に血管から離れた低酸素領域では薬剤が到達しにくく、再発の原因となっている。本研究ではドラッグデリバリーシステムを用いて腫瘍の深部まで到達するキャリアの開発を目的とした。すい臓がん皮下腫瘍モデルを作成後に、多光子顕微鏡を用いて種々のDDSキャリアの腫瘍深部への集積性を比較した。間質の多いすい臓がん細胞BxCP3の皮下腫瘍モデルにおいて、ポリエチレングリコールとポリアミノ酸のブロック共重合体と核酸の自己組織化で形成されるポリイオンコンプレックスが最もsiRNAを腫瘍に送達することがわかった。さらにポリマー構造の最適化により腫瘍集積性が1.8倍向上した。

研究成果の概要(英文)：Tumor heterogeneity leads to difficulties in treatment. Especially, drugs are hard to reach in hypoxic regions away from blood vessels, and that will cause recurrence. In this study, we aimed to develop the carriers for drug delivery system (DDS) that reaches the deeper part of the tumor. After preparation of subcutaneous tumor model of pancreatic cancer, tumor accumulation of various DDS carriers were compared by multiphoton microscope. The polyion complex (PICs), obtained by the self-assembly of the block copolymer and nucleic acid, delivered the siRNA to the center of the BxPC3 tumor nest most. By optimizing the polymer structure of PICs, tumor accumulation of siRNA was enhanced 1.8 times.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：腫瘍深部イメージング ドラッグデリバリーシステム

## 1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は「必要なとき、必要な場所で、必要な量だけ効率よく作用させる」というコンセプトに基づき、癌などの難治性疾患の治療効果を高める一方で、正常組織への集積を回避し副作用を低減させる。癌組織では正常組織に比べて血管新生と血管壁の透過性が亢進しており、また、高分子を排出するリンパ系が未発達であるため高分子物質が集積しやすいことが知られている（enhanced permeability and retention (EPR) 効果）(Matsumura and Maeda, *Cancer Res* (1986), Noguchi et al., *Jpn J Cancer Res* (1998))。DDS に用いられるリポソーム製剤や高分子などを用いたナノ粒子は多くの場合 EPR 効果を想定して設計されているが、全ての固形腫瘍において治療効果が約束されるわけでは無い。たとえば卵巣がんや大腸がんなど血管が豊富な腫瘍では EPR 効果によるナノ粒子の集積が顕著であるが、すい臓がんやスキルス胃がんは血管が少なく間質が豊富であるためナノ粒子の集積性は低い。

腫瘍は均質な細胞集塊ではなく同じ腫瘍内でも表面部分では血管が豊富であっても中心部分が壊死しているなど多様な状態にある。特に腫瘍の特徴として細胞の増殖速度と新生血管構築速度の不均一性から 1mm 以下の大きさの腫瘍でも低酸素領域が存在するといわれている(Kizaka-Kondoh et al. *Adv Drug Deliv Rev* (2009))。低酸素領域では低酸素応答因子-1(hypoxia-inducible factor-1: HIF-1)が活性化し、通常は低酸素領域で発生し細胞を傷害する ROS の産生を抑制し(Tello et al., *Cell Metab* (2011))、薬物耐性、転移・浸潤の亢進、血管新生の亢進を誘導する(Teicher, *Cancer Metastasis Rev* (1994), Rofstad, *Int J Radiat Biol* (2000), Pennacchietti et al., *Cancer Cell* (2003))。また放射線治療において低酸素領域では治療効果が低い(Thomlinson and Gray, *Br J Cancer* (1955))。がんの構造の不均一性から生じる低酸素領域はがん幹細胞とも関係が深い。がん幹細胞とは癌細胞のうち自己複製能と多分化能の性質を持つもので、がんの発生・進行・転移の源であると考えられている(Wicha et al., *Cancer Research* (2006), Li et al., *Cell Research* (2007))。腫瘍内の低酸素領域はがん幹細胞ニッチと呼ばれ、がん幹細胞の維持にとって重要な場所である。一部のがん幹細胞はニッチの働きによって静止期にとどまることで薬物耐性をもち、再発の原因となると考えられており、近年、がん幹細胞を静止期から追い出して抗がん剤に感受性を示すようにする取り組みが行われている(Tateishi et al., *Cancer Cell* (2013))。

腫瘍不均一性については、これまで *in vitro* で生体内の構造を再現出来るスフェロイドを用いた 3 次元培養系を用いた研究がなされてきた(Toley et al., *J Visual Exp* (2011))。典型的なスフェロイドでは、細胞増殖が盛んな表層帯、静止細胞からなる中間帯、中心部壊死帯という階層が構成される。2 次元培養と比較して、スフェロイド形成 (3 次元培養) により抗がん剤感受性が低下すること、遺伝子発現プロファイリングが変化することなどが知られている(Watanabe and Takagi, *Yakugaku Zasshi*, (2008))。

*In vivo* における腫瘍不均一性に関する研究は、従来は摘出腫瘍から標本切片を作成する方法が主流であったが、超音波/CT/MRI/PET/SPECT などの画像診断装置の普及とともに生体イメージングが盛んになってきた。上記の生体画像診断装置はマウス全体をあるいは臓器全体を評価するのに適しているが解像度が低く腫瘍組織内部の細胞レベルの評価には向かない。また、腫瘍切片は組織標本を作成する段階で薬剤が洗い流されてしまうことや、同一個体での経時変化を観察できないことなどの問題がある。申請者は高分子ミセルの研

究開発に従事しており、とくに生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を用いて、耳介血管、肝臓、腎臓、脳、腫瘍など様々な DDS の生体動態に取り組んできた。また、二光子顕微鏡では脳のイメージングを行っており、その経験を本応募課題に活かすことができると考えた。

## 2. 研究の目的

腫瘍は遺伝子レベル・細胞レベル・組織レベルで不均一な細胞集団であり、その不均一性のがん治療の限界をもたらしている。特に血管から離れた低酸素領域では薬剤が到達しにくく、放射線療法の効果も低いため再発の原因となっている。本研究では多光子顕微鏡を用いた腫瘍の深部イメージングを行う。申請者が所属する研究室で開発された様々なドラッグデリバリーシステム(DDS キャリア)や臨床で用いられている抗癌剤などについて、腫瘍深部の低酸素部位による薬物到達度の評価を行い、表層部位との分布様式の違いを明確にする。これにより、効果的な DDS キャリアの開発を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

皮下腫瘍モデルマウスを作成し、多光子顕微鏡を用いて腫瘍深部の構造を生きたままで明らかにする。また、申請者が所属する研究室で開発された様々な DDS キャリアや市販されている抗癌剤などを担がんマウスに投与し、腫瘍内分布を調べ、キャリアのサイズ、PEG鎖長や架橋構造、リガンドなどの効果を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 深部イメージング技術の確立

深部イメージングに最適な固定器具の開発、最適な蛍光試薬の探索を行った。腫瘍の表面から近い部分と遠い部分では光の到達具合が違っているので、蛍光強度による定量比較が難しい。その解決策として深さ(Z)方向による蛍光強度の減衰を補正した。

### (2) 腫瘍集積性の評価

次に、複数種の腫瘍について本研究室で作成した DDS キャリアを用いた時の腫瘍深部への薬剤到達度を比較した。中でも難治性癌の一つであるヒト膵臓癌由来の BxCP3 の皮下腫瘍モデルでは DDS キャリアのサイズによって腫瘍への浸透性が異なることが示唆された。ポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸のブロック共重合体と核酸の自己組織化で形成されるポリイオンコンプレックス(PICs) (PICs-L, 18 nm) を用いて経時的に腫瘍集積性を観察した所、腫瘍表面へ

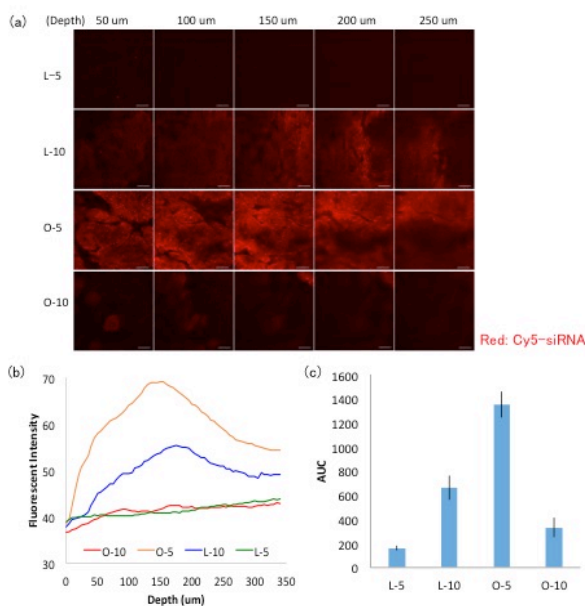


図1. BxPC3腫瘍における24h後の薬剤の深度分布

の浸透性は向上したが、腫瘍深部への浸透性は低かった。そこで、同キャリアを用いて抗癌剤排出機構の一つである ABC トランスポーターの過剰発現を抑制する siRNA の投与を行い、投与 24 時間後に蛍光標識した PICs を投与した所、血管からより離れた場所にある腫瘍深部への集積性の向上が確認された。

### (3) キャリアの最適化

次に PICs において、PEG の長さや形状、ポリアミノ酸鎖の構造の最適化を行った。腫瘍への浸透性が高かった PICs-L とそのアミノ酸の構造が異なる PICs-O について、ポリマー中のアミノ基と核酸中のリン酸基の比率(N/P 比)を変えて、マウスに尾静脈投与し、24 時間後の Cy5 標識 siRNA の腫瘍内分布を調べた。PICs-L-10 (N/P=10), PICs-O-5 (N/P=5), PICs-O-10 (N/P=10)は血中滞留性のプロファイルが似ているにもかかわらず、腫瘍集積性が異なり、PIC 図 1 に示すように PICs-O の N/P=5 で最も腫瘍への浸透性が高く、また、深部まで浸透していることがわかった。PICs-L と比較して PICs-O は腫瘍集積性が 1.8 倍向上した。

間質の多い BxPC3 腫瘍では腫瘍巣の中心まで薬剤が送達することは難しいが、PICs-O を用いることで中心部まで浸透することが示された (図 2)。

また、癌幹細胞を GFP で標識したヒト膵臓癌由来の BxPC3-n-p-GFP 細胞の皮下腫瘍モデルマウスを用いて、核酸を蛍光標識した PICs の腫瘍集積性を調べたところ、尾静脈投与 24 時間後において癌幹細胞のごく近傍まで集積していた。さらに、すべての癌幹細胞には集積が見られなかったが、一部では共局在していることがわかった (図 3)。

腫瘍の血管が不規則に一時的に開閉し、血中の蛍光標識 DDS キャリアが噴出する Nanoeruption 現象は生体内共焦点顕微鏡を用いて腫瘍の表層 (およそ 50  $\mu\text{m}$  まで) では観察されている(Matsumoto et al., Nature Nanotechnology, (2016))が、今回、多光子顕微鏡で長時間観察することにより、腫瘍のより深い場所(270  $\mu\text{m}$ )でも Nanoeruption が起きていることが確認された。特に、間質の少ないヒト膵臓癌由来の MIA PaCa 細胞の皮下腫瘍モデルマウスでは Nanoeruption によって腫瘍集積性が向上することがわかった。

## 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)

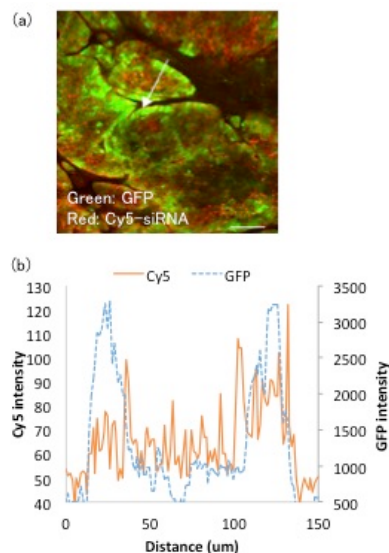


図2. BxPC3-GFP腫瘍における24h後の薬剤の浸透度

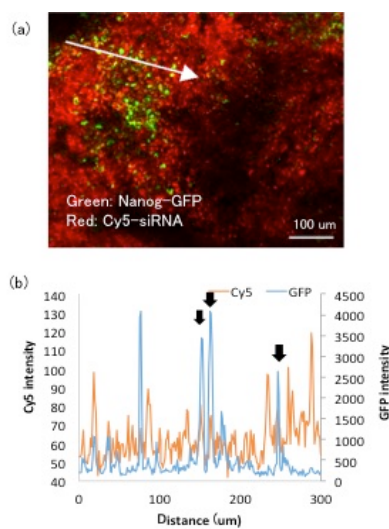


図3. BxPC3-n-p-GFP腫瘍における24h後の薬剤の分布

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. H. -S. Min, H. -J. Kim, J. -Y. Ahn, M. Naito, K. Hayashi, K. Toh, B. -S. Kim, Y. Matsumura, I.-C. Kwon, K. Miyata, K. Kataoka. Tuned density of anti-tissue factor antibody fragment onto siRNA-loaded polyion complex micelle for optimizing targetability into pancreatic cancer cells. *Biomacromolecules* in press (2018)

2. J. Li, A. Dirisala, Z. Ge, Y. Wang, W. Yin, W. Ke, K. Toh, J. Xie, Y. Matsumoto, Y. Anraku, K. Osada, K. Kataoka, Therapeutic vesicular nanoreactors with tumor-specific activation and self-destruction for synergistic tumor ablation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 45 14025-14030 (2017) (DOI: 10.1002/anie.201706964)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤 加珠子 (TOH Kazuko)

ナノ医療イノベーションセンター 研究員

研究者番号：90342732

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし