

平成 30 年 8 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08072

研究課題名(和文) 腫瘍内血管の正常化による新規がん治療戦略：効果に影響を及ぼす腫瘍組織側因子の解析

研究課題名(英文) Establishment of novel strategy in cancer treatments based on normalization of tumor vasculatures

研究代表者

大河原 賢一 (Ken-ichi, Ogawara)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30291470

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)：抗がん剤内封リポソーム製剤の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤 SU5416 (VEGF2型受容体阻害剤) 内封エマルジョン製剤の併用効果を異なるがん細胞 (B16, LLC) を用いて作製した固形がんモデルマウスで検討した結果、B16ではSU5416 の投与により、腫瘍内血管の構造的並びに機能的な異常が一部改善したことで、その後投与するリポソーム製剤による高い抗腫瘍効果に繋がったものと推察された。一方、LLC ではそのような影響は認められなかったことから、LLCのようにVEGFをほとんど分泌しないがん種に対しては、本戦略は有効ではない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The effect of pre-treatment with SU5416, a selective VEGF receptor-2 inhibitor, on tumor disposition and in-vivo anti-tumor activity of polyethylene glycol (PEG)-modified liposomal paclitaxel (PL-PTX) was evaluated in two B16 or LLC solid tumor-bearing mice. Pre-treatment with SU5416 significantly enhanced the in-vivo anti-tumor effect of PL-PTX in B16 tumor-bearing mice, but the same treatment did not affect the anti-tumor effect of PL-PTX in LLC tumor-bearing mice at all. Considering that VEGF levels within B16 tumors was found to be about 20-fold higher than that in LLC tumors, it was suggested that SU5416 would be able to normalize tumor vasculatures in certain types of tumor tissue such as B16 where VEGF plays a major role for promoting angiogenesis.

研究分野：DDS、製剤学、薬剤学

キーワード：がん治療 抗がん剤 血管正常化 リポソーム エマルジョン 抗腫瘍効果 局所動態

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の新生血管は構造的・機能的に不全であり、且つその分布には偏りがあるため、腫瘍組織内の血流は不均一であることが知られている。このような状況下では、血流を介した腫瘍組織への抗がん剤の移行は妨げられ、十分な抗がん作用へと結びつかない可能性が報告されている。近年、腫瘍組織内微小環境の調節に基づいた新規治療戦略が数多く検討されており、中でも、血管新生に関与する血管内皮増殖因子 (VEGF) を適度に阻害することにより、薬物の腫瘍内移行を改善する方法「血管正常化説」が注目されている。これまで当研究室では、マウス結腸がん由来がん細胞 colon26 (C26) を用いて作製した固形がんモデルマウスにおいて、VEGF 阻害剤 (SU5416) をナノ粒子製剤化 (PE-SU5416) し、腫瘍組織局所的に血管構造ならびに機能の改善を促すことを目的として前投与することにより、その後の投与するパクリタキセル内封リポソーム製剤 (PL-PTX) の腫瘍組織への移行性が増大し、それに連動して抗腫瘍効果も増大することを明らかにしてきた。一方で、腫瘍組織内の微小環境はがん種によって異なっていることが知られており、この C26 に対して有効性が認められた PE-SU5416 と PL-PTX を利用した逐次的な併用療法が、他の固形がんに幅広く適用可能かは不明であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、腫瘍内の血管分布性や血管透過性といった腫瘍内微小環境の違いが、本戦略の成否に対して如何なる影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とし、C26 とは異なるがん種を用いて種々検討を行った。本検討では、マウス悪性黒色腫由来がん細胞 B16/BL6 Melanoma (B16)、及びマウス肺がん由来がん細胞 Lewis Lung Carcinoma (LLC) の計 2 種を選択し、これらのがん細胞により作製した固形がんモデルマウスを用い、PE-SU5416 前投与が、1) 腫瘍組織内血管構造および機能特性、2) 腫瘍組織内酸素分圧、3) PL-PTX の腫瘍組織移行量などに与える影響について多面的に解析すると共に、PE-SU5416 と PL-PTX を利用した逐次的な併用療法の抗腫瘍効果についても検討を加えることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) PE-SU5416 及び PL-PTX の併用療法による *in vivo* 抗腫瘍効果の検討：

B16 あるいは LLC を皮下に移植することで作製した固形がんモデルマウスを用いて検討を行った。また対照群として、生理食塩水投与群、PE-SU5416 (5 mg/kg) 単独投与群、並びに PL-PTX (1 mg/kg) 単独投与群を選択した。実験は、腫瘍体積が 50-100 mm<sup>3</sup> に達した時点から投与を開始し、両製剤併用群においては、PE-SU5416 投与 1 日後に

PL-PTX を投与した。

#### (2) PE-SU5416 前投与による腫瘍内血管の構造ならびに機能変動の評価：

腫瘍内血管の構造的ならびに機能的な変化については以下の二つの項目を指標として評価した。

腫瘍組織内血管の血管内皮細胞と壁細胞のマーカー分子を免疫染色することにより、壁細胞による血管の被覆度を半定量的に評価する。(構造的改善の指標としての血管の壁細胞被覆の程度の評価)

免疫染色による腫瘍組織内低酸素領域の可視化により、低酸素領域の増減を半定量的に評価する。(機能的改善の指標としての腫瘍組織内血管の酸素運搬能の評価)

#### (3) PE-SU5416 前投与後の抗がん剤内封リポソームの腫瘍組織移行動態の解析：

VEGF 阻害剤投与後の抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行動態の評価は、B16 あるいは LLC 担がんマウスを用いてそれぞれ検討した。実験は、リポソームを 3H-コレステロール誘導体で標識し、14C によりパクリタキセルをトレーサー標識したパクリタキセル内封リポソームを調製し、その静脈内投与後の、リポソームおよびパクリタキセルの体内動態、および腫瘍組織への移行動態をそれぞれ解析・評価した。

#### (4) 腫瘍組織における VEGF 分泌量の測定：

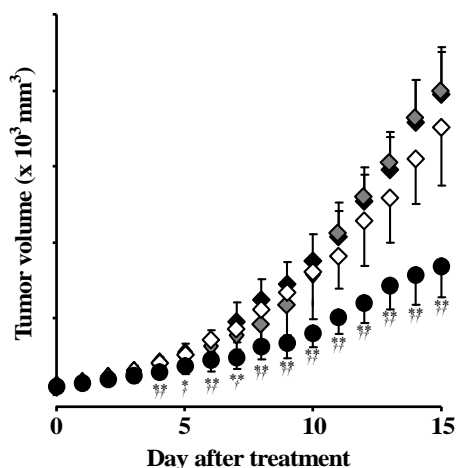
VEGF の定量は Mouse VEGF ELISA Kit (Bio Source 社) に準じて行った。サンプルを 100  $\mu$ L を添加後、Biotinylated anti-VEGF 抗体 50  $\mu$ L を添加し、プレートカバーをして 2 時間処理した。ウェル内の液を除去し、Wash Buffer にて洗浄後、Streptavidin-HRP Working Solution 100  $\mu$ L を添加し、プレートカバーをして 30 分間処理した。再びウェル内の液を除去し、Wash Buffer にて洗浄後、Stabilized Chromogen 100  $\mu$ L を添加し、25 分間処理した。処理後、Stop Solution 100  $\mu$ L を添加し、吸光度 (波長 450 nm) を測定することにより VEGF の定量を行った。タンパク質定量は、DC protein assay kit (Bio-Rad) に準じて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) SU5416 製剤及び PTX 製剤の併用療法による *in vivo* 抗腫瘍効果の検討：

B16 固形がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果について検討した結果を Fig. 1 に示す。検討の結果、PE-SU5416 (5 mg/kg) 単独投与は生理食塩水投与群と比較して、有意な抗腫瘍効果を示さなかった。また、PL-PTX (5 mg/kg) 単独投与でも、若干の抑制傾向は示したものの、有意な効果は認められなかった。これに対して、両製剤を併用することで、

顕著な腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。また、その効果は PL-PTX 単独投与群と比較しても統計的に有意なものであった。



**Fig. 1 In-Vivo Anti-Tumor Activity of PL-PTX with or without Pre-Treatment of PE-SU5416 in B16 Solid Tumor-Bearing Mice**

Keys; ◆, Saline; ◇, PE-SU5416; ◇, PL-PTX; ●, PL-PTX after PE-SU5416 pre-treatment  
Each point represents the mean tumor volume  $\pm$  S.D. (n = 7-15). \*\* p < 0.01; \* p < 0.05, compared with saline-treated group. †† p < 0.01; † p < 0.05, compared with PL-PTX alone.

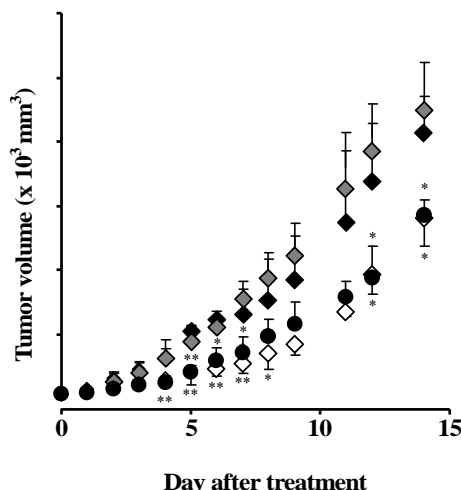
一方 LLC 固形がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果について検討した結果を Fig. 2 に示す。その結果、PE-SU5416 (5 mg/kg) 単独投与は、抗腫瘍効果を示さないのに対して、PL-PTX (1 mg/kg) 単独投与は生理食塩水投与群と比較して、有意な腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。一方で、両剤併用投与では、生理食塩水投与群と比較して有意な抗腫瘍効果は認められたものの、PL-PTX と比較して有意な効果は認められなかった。すなわち、B16 固形がんモデルマウスで認められた両剤併用投与による増強効果が、本モデルマウスでは認められないことが明らかとなった。

**(2) PE-SU5416 前投与による腫瘍内血管の構造ならびに機能変動の評価：**

B16 腫瘍を用いて行った免疫組織染色の結果、腫瘍内血管領域、壁細胞領域の総量に有意な変化は認められなかったのに対し、壁細胞被覆を伴う血管領域の総和は、統計的に有意ではないものの増加傾向が認められた。さらに、壁細胞被覆を伴う血管の割合、すなわち、正常な血管構造に近づいた血管の割合は有意に増加することが明らかとなった。一方で LLC 腫瘍ではそのような変化は認められなかった。これらの結果は、PE-SU5416 を投与することで、B16 における腫瘍内血管の血管構造が一部正常な血管に近づいたことを示唆するものであった。

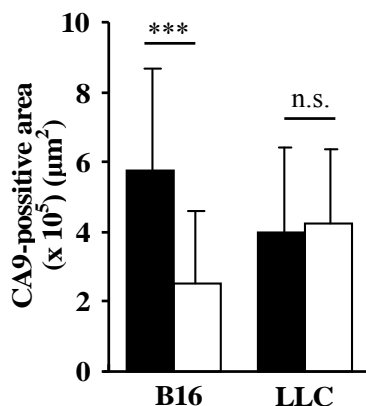
腫瘍組織内の低酸素領域マーカーの CA9 により染色した結果、PE-SU5416 前投与に

より B16 では特に血管周辺において CA9 陽性部位の顕著な減少が認められた一方で、LLC ではそのような変化は認められなかった (Fig. 3)。これらの結果から、B16 では PE-SU5416 前投与により、腫瘍内血管の構造的、並びに機能的異常が一部改善された結果、酸素供給を含む物質の運搬機能が向上し、低酸素領域が減少したものと推察された。



**Fig. 1 In-Vivo Anti-Tumor Activity of PL-PTX with or without Pre-Treatment of PE-SU5416 in LLC Solid Tumor-Bearing Mice**

Keys; ◆, Saline; ◇, PE-SU5416; ◇, PL-PTX; ●, PL-PTX after PE-SU5416 pre-treatment  
Each point represents the mean tumor volume  $\pm$  S.D. (n = 5). \*\* p < 0.01; \* p < 0.05, compared with saline-treated group.



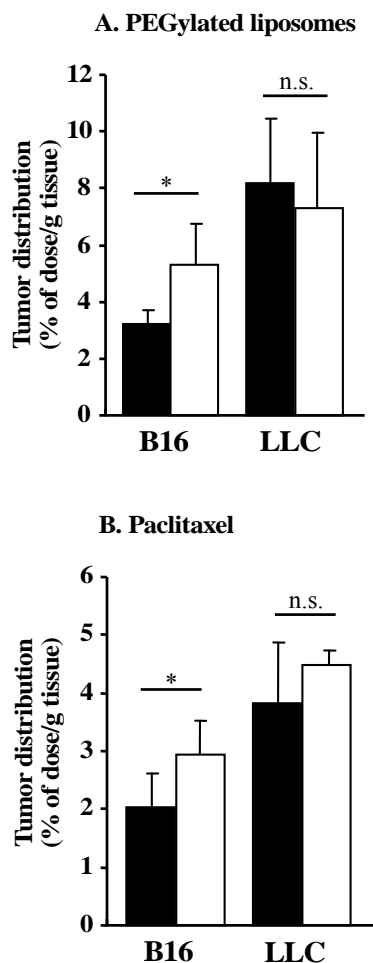
**Fig. 3 Area of a Hypoxic Region within Tumor Tissues**

Keys; closed bar, control; open bar, PE-SU5416. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 20-25). \*\*\* p < 0.001, n.s., not significant.

**(3) PE-SU5416 前投与後の抗がん剤内封リポソームの腫瘍組織移行動態の解析：**

PE-SU5416 前投与が PL-PTX の腫瘍組織への移行性に及ぼす影響について定量的に評価したところ、B16 固形がんモデルマウスにおいて PE-SU5416 を前投与することで、腫瘍組織への移行量が、PEG 修飾リポソーム自身、並びに内封 PTX いずれも有意に増大することが明らかとなった (Fig. 4)。

この結果は、前投与した PE-SU5416 により腫瘍内血管の構造的、並びに機能的な改善により血管の物質運搬機能が向上していることを示唆するものであった。一方で、LLC 固形がんモデルマウスにおいては、PE-SU5416 併用群での腫瘍組織内への PEG 修飾リポソーム自身、並びに内封 PTX の蓄積量は、コントロール群と同程度であることが明らかとなった。



**Fig. 4 Effect of PE-SU5416 on Intratumoral Distribution of PL-PTX in B16 and LLC Solid Tumor-Bearing Mice**

Tumor disposition amounts were separately measured for PEGylated liposomes (A) and paclitaxel (B) in B16 and LLC tumor tissues. Keys; closed bar, control; open bar, PE-SU5416. Results are expressed as the mean with the vertical bar showing S.D. (n = 4). \* p < 0.05, n.s., not significant.

**(4)腫瘍組織における VEGF 分泌量の測定：**

本検討にて用いた 2 種の固形がんモデルマウスにおいて認められた、PL-PTX との併用効果発現の差に関して考察する上で、腫瘍組織内における VEGF 量は大変重要な因子である。SU5416 の血管新生阻害作用が、VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖を抑制することによるものであることを考慮すると、腫瘍組織内に分泌される VEGF 量の多寡が、SU5416 による血管正常化戦略に大き

く影響を与えられられる。そこで本検討に用いた B16、LLC に加え、マウス結腸がん由来 C26 を用いた固形がんモデルマウスから採取した腫瘍組織を用いて、ELISA 法により腫瘍組織内 VEGF 量を測定した結果、LLC 腫瘍内における VEGF 量は B16、C26 と比較して顕著に低いことが明らかとなった (Table 1)。

**Table 1 VEGF Amount within Each Type of Tumor Tissues by ELISA**

	VEGF Amount (pg/mg Protein)
C26	381 ± 159* †
B16	983 ± 342
LLC	43 ± 4.3††

Results are expressed as the mean ± S.D. (n=4).

\* p < 0.05, compared with LLC.

†† p < 0.01; † p < 0.05, compared with B16.

**結論**

VEGF は血管新生を誘導する最も主要な因子として知られるが、VEGF 以外にも血管新生促進因子は数多く存在しており、LLC 腫瘍内での血管新生には、VEGF 以外の血管新生促進因子によるシグナル伝達が主要な経路としてはたらいっていることが推察される。従って、LLC 固形がんモデルマウスにおいて PE-SU5416 の前投与による、PL-PTX との併用による相乗効果が認められなかった要因として、腫瘍組織内の VEGF 分泌量が低く、VEGF が血管新生の実質的な促進因子として機能していないことが示唆された。LLC 腫瘍において血管新生の実質的な促進因子として機能している分子に関しては今後詳細に検討する必要があると考える。

**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 3 件 ) ( すべて査読有り )

K. Ogawara and K. Higaki, Nanoparticle-Based Photodynamic Therapy: Current Status and Future Application to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 637-641 (2017)

K. Ogawara, Y. Fukuoka, Y. Yoshizawa, T. Kimura, and K. Higaki, Development of safe and potent O/W emulsion of paclitaxel to treat

peritoneal dissemination. *J. Pharm. Sci.*, **106**, 1143-1148 (2017)

T. Araki, K. Ogawara, H. Suzuki, R. Kawai, T. Watanabe, T. Ono and K. Higaki, Augmented EPR effect by photo-triggered tumor vascular treatment improved therapeutic efficacy of liposomal paclitaxel in mice bearing tumors with low permeable vasculature. *J. Controlled Release* **200**, 106-114 (2015)

〔学会発表〕(計3件)

K.Ogawara, Optimization of cancer treatment with nano-DDS formulations: Knowledge of tumor vasculatures to make things work, International seminar on pharmacology and clinical pharmacy: Current trend of molecular pharmacology in the drug development and clinical use (2016.9.1-2, Hotel Harris, Bandung, Indonesia)

寺内 克、荒川 奏江、大河原 賢一、檜垣 和孝, パクリタキセル内封微粒子製剤の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤との併用効果に関する基礎的研究, 第32回日本DDS学会(2016.6.30-7.1, グランシップ、静岡)

寺内 克、荒川 奏江、大河原 賢一、檜垣 和孝, パクリタキセル内封微粒子製剤の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤との併用効果に関する基礎的研究, 第31回日本薬剤学会(2016.5.19-21, 長良川国際会議場、岐阜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大河原 賢一 (OGAWARA, Ken-ichi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30291470

### (2)研究分担者

檜垣 和孝 (HIGAKI, Kazataka)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60284080