

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15438

研究課題名(和文) 磁性リポソームを利用したEPR効果の増強に基づく新たな難治性がん治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel intractable cancer therapy based on the enhancement of EPR effect by using magnetic liposomes

研究代表者

河野 裕允 (Kono, Yusuke)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・准教授

研究者番号：60732823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微粒子性抗がん剤を用いた効果的な難治性がん治療を達成するため、磁性リポソームを用いて腫瘍血管を傷害し血管透過性を亢進することで、微粒子製剤の腫瘍移行性を改善することを試みた。まず、正電荷を有する酸化鉄磁性ナノ粒子内封リポソームと外部磁場を併用することで腫瘍血管を傷害でき、高分子の腫瘍組織への漏出が亢進することを見出した。また、本手法により抗がん剤ドキシフルビンを内封したリポソーム製剤による抗腫瘍効果が顕著に増大することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性がんは血管分布および透過性が乏しいため薬物送達効率が低く、治療満足度が非常に低い。本研究で構築した腫瘍血管透過性を亢進する手法は、難治性がん組織への高分子薬物の送達効率を顕著に改善できるものであり、難治性がんを既存の抗がん剤で治療するための有用な技術となり得る。また、本研究で対象としたメラノーマのみでなく、様々ながん種への適用が期待できる。さらに、リポソーム製剤のみでなく、タンパク質製剤や遺伝子医薬品などの高分子薬物の有効性の向上、適応拡大にも大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to improve the tumor permeability by magnetic liposomes for efficient cancer therapy using anti-cancer drug-encapsulated nanoparticles. Magnetic liposomes exhibited strong cytotoxicity against tumor vascular endothelial cells under a magnetic field. Moreover, This approach induced the increment of tumor permeability and enhancement of the anti-tumor effect of doxorubicin-encapsulated liposomes in B16BL/6 melanoma-bearing mice.

研究分野：薬物送達学、薬剤学、薬物動態学

キーワード：リポソーム 外部磁場 がん治療 EPR効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の新生血管は脆弱な構造をしており正常血管よりも透過性が高い。また、腫瘍組織のリンパ回収系は未発達であるため、脂質二重膜の小胞であるリポソームなどの微粒子性薬物キャリアは腫瘍組織へ選択的に移行し、蓄積する (Enhanced Permeability and Retention 効果: EPR 効果)。そのため、抗がん剤をリポソームに封入することで、効率的に抗がん剤を腫瘍組織へ送達することが可能となる。しかしながら、悪性黒色腫などの難治性がんに対するリポソームの移行性は低く、これは難治性がんにおける新生血管の透過性が顕著に低いことに起因する。そのため、抗がん剤内封リポソーム製剤を用いた効果的な難治性がん治療を達成するためには、難治性がん組織における EPR 効果を増強する手法の開発が必要である。

我々はこれまで、正電荷を有するリポソームに磁性ナノ粒子を封入した製剤である磁性正電荷リポソームを開発し、その脂質組成および内封磁性ナノ粒子量を最適化することにより、磁場を付加した部位に存在する細胞に磁性正電荷リポソームを選択的に導入し傷害することに成功している。本結果を基に、磁性正電荷リポソームの投与と腫瘍組織への磁場付加により、腫瘍内血管を選択的に傷害することができ、これにより EPR 効果を増強できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに開発した磁性正電荷リポソームを基盤として、磁場付加環境下において腫瘍内血管を選択的に傷害することができる安全な新規磁性リポソーム製剤を開発し、本製剤を利用した EPR 効果増強法を構築することを目的とした。また、本手法により EPR 効果を増強した悪性黒色腫に対する抗がん剤内封リポソーム製剤の有効性についても評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 磁性リポソーム製剤の作製

磁性正電荷リポソームは、カチオン性脂質 DOTAP、中性リン脂質 DSPC、およびコレステロールをモル比として 6:0:4、5:1:4、4:2:4、あるいは 3:3:4 で混合して作製したリポソームに四酸化三鉄磁性ナノ粒子を 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL あるいは 0.5 mg/mL の濃度で内封することで作製した。作製した磁性正電荷リポソームをヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC に添加し、30 分間永久磁石を用いて磁場付加を施した後、WST-8 アッセイにより細胞生存率を測定した。

また、磁性負電荷リポソームは、負電荷リン脂質 DSPG およびコレステロールをモル比として 6:4 で混合して調製したリポソームの内部に 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL あるいは 0.5 mg/mL の濃度の酸化鉄磁性ナノ粒子を封入することで作製した。さらに、磁性負電荷リポソームとアテロコラーゲンを 2:1 (w/w) で混合することにより複合体を作製した。

(2) 磁性リポソームと外部磁場を併用した際のマウス固形腫瘍内血管の漏出性の評価

本検討には、マウス悪性黒色腫細胞株 B16BL/6 を皮下に移植することにより作製した固形がんモデルマウスを用いた。固形腫瘍が 500 mm³ に到達した時点で磁性正電荷リポソーム、あるいは磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体をマウス尾静脈より投与し、5 分後に腫瘍組織へ永久磁石を用いて 30 分間磁場付加を施した。その後、エバンスブルーを静脈内投与し、6 時間後に腫瘍組織を摘出し、漏出したエバンスブルー量を測定した。

(3) EPR 効果の増強を施した固形腫瘍に対する PEG 修飾リポソームの移行性の評価

(2) の手法に従い、B16BL/6 悪性黒色腫固形がんモデルマウスに対して磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を静脈内投与した後、腫瘍組織に対して磁場付加を施した。その後、Di IC18(3)標識ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを静脈内投与し、24 時間後に腫瘍組織中の PEG 修飾リポソーム量を定量した。また、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓についても同

様に PEG 修飾リポソームの移行量を測定した。

(4) EPR 効果の増強を施した固形腫瘍に対するドキシソルピシン内封 PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果の評価

固形腫瘍が 100 mm³ に到達した時点で(2) の手法に従い、固形がんモデルマウスに対して複合体の投与と磁場付加を行った。その後、ドキシソルピシン内封 PEG 修飾リポソームを静脈内投与し、経日的に腫瘍径、および体重を測定した。また、生存日数の観察も行った。

4 . 研究成果

(1) 血管内皮細胞に対する磁性正電荷リポソームの殺細胞効果の in vitro 評価

本研究で作製した磁性正電荷リポソームの粒子径は約 110 nm、表面電荷は約 40-60 mV であった。この磁性正電荷リポソームを HUVEC に添加した後、磁場付加を施した際の細胞生存率を評価した。内封磁性ナノ粒子量を 0.1 mg/mL に固定し、リポソームの脂質組成について評価を行った結果、カチオン性脂質を 50%以上含有する磁性正電荷リポソームは磁場付加の有無に関わらず細胞毒性を示した。一方、カチオン性脂質を 40%含有する磁性正電荷リポソームは、磁場非存在下においては HUVEC の生存率に影響を及ぼさず、磁場付加を施した際に高い殺細胞効果を示した。次に、内封磁性ナノ粒子量について最適化を行った。磁性ナノ粒子濃度を 0.2 mg/mL とした場合、0.1 mg/mL と比較して有意に高い殺細胞効果が認められた。一方、0.5 mg/mL の濃度では磁場非存在下においても細胞生存率の低下が認められた。これらの結果より、磁性正電荷リポソームの脂質組成は DOTAP: DSPC: コレステロール = 4:2:4 (mol)、内封磁性ナノ粒子量は 0.2 mg/mL とすることとした。

(2) 磁性正電荷リポソームと外部磁場を併用した際の腫瘍組織への高分子漏出性の評価

前項において組成を最適化した磁性正電荷リポソームを B16BL/6 悪性黒色腫固形がんモデルマウスに対して尾静脈内投与した後、腫瘍組織に対して磁場付加を施した際のエバンスブルーの腫瘍組織内漏出性について評価した。磁性正電荷リポソーム投与 5 分後に 30 分間磁場付加を施すことにより、エバンスブルーの漏出が顕著に増大することが明らかとなった。本結果より、磁性正電荷リポソームと磁場付加の併用により、マウス悪性黒色腫固形腫瘍における EPR 効果を増強できることが示された。しかしながら、磁性正電荷リポソームの投与量の増大に伴い、マウスの死亡率の増大が認められた。これは、リポソームを構成する正電荷脂質に起因するものである可能性が示された。

(3) 磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体の血管内皮細胞に対する殺細胞効果と EPR 効果増強効率の評価

前項において、DOTAP を構成成分とする磁性正電荷リポソームが、マウスに対して投与量依存的に毒性を示すことが確認された。そこで、磁性正電荷リポソームの代用として、我々が開発した磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を用いた EPR 効果増強法の構築に取り組んだ。本複合体は、安全性の高い負電荷リン脂質を構成成分とした磁性リポソームにアテロコラーゲンを修飾することでリポソーム表面に正電荷を付与している。複合体の粒子径は約 130 nm、表面電荷は約 -30 mV であった。表面電荷の測定値は負の値を示しているが、複合体表面に存在するアテロコラーゲンに由来する正電荷により、本複合体が磁場存在下において効率的に細胞の表面へ吸着することを既に確認している。この磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を HUVEC に添加し、磁場付加を施したところ、内封磁性ナノ粒子濃度を 0.5 mg/mL とした場合に高い殺細胞効果が得られた。また、磁場非存在下における細胞生存率の低下は認められなかった。

そこで、本複合体を B16BL/6 悪性黒色腫固形がんモデルマウスに静脈内投与した後、腫瘍組織に対して磁場付加を施し、エバンスブルーの腫瘍内漏出性を評価した。その結果、磁性正電荷リポソームを用いた場合と同程度の腫瘍組織へのエバンスブルーの移行が認められた。また、投与量の増大に伴うマウスの死亡・体重変化も認められず、肝毒性の指標である血中 ALT、AST の増大も認められなかった。これらの結果より、磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を用いることで、安全に難治性がん組織の EPR 効果を増強できる可能性が示された。

(4) EPR 効果を増強した腫瘍組織における PEG 修飾リポソームの蓄積性の評価

磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体と外部磁場付加の併用により EPR 効果を増強したマウス悪性黒色腫固形腫瘍に対する PEG 修飾リポソームの移行性を評価した。本検討で用いた PEG 修飾リポソームの粒子径は約 100 nm、表面電荷は約 -10 mV であった。複合体の投与、あるいは磁場付加を単独で行った際には、PEG 修飾リポソームの腫瘍組織移行性に変化は認められなかった。一方、複合体の投与と外部磁場付加を行った場合、PEG 修飾リポソームの投与 24 時間後における腫瘍組織移行量が顕著に増大した。また、その他の主要臓器への移行性、および血中濃度には顕著な変化は認められなかった。

(5) EPR 効果を増強した腫瘍組織に対するドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果の評価

磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を用いて EPR 効果を増強したマウス悪性黒色腫固形腫瘍に対するドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの抗腫瘍効果を評価した。ドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームをドキソルビシン量として 2 mg/mL で単独投与した場合、若干の腫瘍増殖抑制効果が認められた。磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体の投与と外部磁場付加のみを行った場合には、腫瘍増殖速度の変化は認められなかった。一方、複合体の投与と磁場付加を行った後、ドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソームを投与した場合、顕著に高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。その効果はドキソルビシン内封 PEG 修飾リポソーム単独投与群と比較して有意に高く、もた顕著な延命効果も認められた。これらの結果より、磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を用いた EPR 効果の増強により、難治性がんに対する微粒子性抗がん剤の治療効果を顕著に改善できることが示された。

(6) 交流磁場を用いた EPR 効果増強法の構築

前項までの評価では、固形の永久磁石を用いることで腫瘍組織への磁場付加を行った。しかしながら、永久磁石は表面からの距離に比例して急激に磁束密度が減少するため、腫瘍の深部まで磁場が到達していないことが考えられる。そこで、腫瘍のより深部まで EPR 効果の増強を行うため、交流磁場を用いた評価を行った。磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体を固形がんモデルマウスに静脈内投与した後、交流磁場を腫瘍組織へ付加した結果、その後に投与した PEG 修飾リポソームの腫瘍組織移行性は永久磁石を用いた場合と同程度であった。一方、腫瘍の中心部 (10 mm 四方) を摘出し PEG 修飾リポソームの集積量を定量した結果、交流磁場を用いた場合に約 1.3 倍高い集積が認められた。本結果は、交流磁場を用いることにより、複合体による腫瘍血管の傷害がより深部まで到達し、腫瘍の中心部まで EPR 効果を増大できたことを示唆するものであった。

以上、磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体と外部磁場を併用することで、血管内皮細胞を傷害し、腫瘍組織における EPR 効果を増強することに成功した。また、本手法により抗

がん剤内封 PEG 修飾リポソーム製剤の腫瘍組織移行量が増大し、顕著に高い腫瘍増殖抑制効果が得られることを明らかにした。今後は、本研究で構築した EPR 効果増強法を利用した抗体医薬や細胞製剤によるがん治療についても研究を進めていく予定である。本研究で得られた知見は、微粒子性抗がん剤を用いた難治性がんに対する効果的な治療法を開発する上で有益な情報を提供するものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 D Hira, A Suzuki, Y Kono, K Shimokawa, S Matsuoka, KY Hasumoto, H Kawahara, M Onoue, T Fujita, T Okano, M Kakumoto.	4. 巻 4
2. 論文標題 Pharmaceutical stability of colloidal saccharated iron oxide injection in normal saline.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharm Health Care Sci	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40780-018-0116-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Y Kono, S Konishi, T Fujita.	4. 巻 42
2. 論文標題 An openable artificial intestinal tract system enables the evaluation of drug absorption in Caco-2 cells through the reduction in thickness of the unstirred water layer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y Kono, T Nakai, H Taguchi, T Fujita	4. 巻 24
2. 論文標題 Development of magnetic anionic liposome/atelocollagen complexes for efficient magnetic drug targeting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 1740-1749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10717544.2017.1402219	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Y Kono, H Jinzai, Y Kotera, T Fujita	4. 巻 40
2. 論文標題 Influence of physicochemical properties and PEG modification of magnetic liposomes on their interaction with intestinal epithelial Caco-2 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 2166-2174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-00563. Epub 2017 Sep 30	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大庭 健、平岡 芹菜、松田 浩司、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 外部磁場を利用した組織選択的細胞送達に向けた磁性化間葉系幹細胞の作製
3. 学会等名 日本薬剤学会 第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口 ひとみ、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 ドキソルピシン内封磁性負電荷リポソーム/アテロコラーゲン複合体のin vitro殺細胞効果の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会 第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小寺 陽太、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 異なる混合比からなる磁性負電荷リポソームアテロコラーゲン複合体の細胞内取り込み効率および免疫応答の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会 第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 裕允
2. 発表標題 アテロコラーゲンを利用した安全な磁性リポソーム製剤の開発
3. 学会等名 NanoBio 第11回若手ネットワーキングシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y Kono
2. 発表標題 Liposome-based active drug targeting using a magnetic field
3. 学会等名 8th UBC-Ritsumeikan Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野 裕允、中井 健人、田口 ひとみ、藤田 卓也
2. 発表標題 効率的な磁場応答性薬物キャリアとしての磁性アニオン性リポソーム/アテロコラーゲン複合体の開発
3. 学会等名 第11回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大庭 健、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 標的組織への効率的な集積を目指した磁性化間葉系幹細胞の作製とその機能評価
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2017/第25回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 ひとみ、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 アテロコラーゲンを利用した磁性リポソームの細胞内取り込み効率の改善
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2017/第25回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中井 健人、河野 裕允、藤田 卓也
2. 発表標題 磁性アニオン性リポソーム/アテロコラーゲン複合体の作製 (1): 細胞内取り込み効率の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会 第32年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 裕允、中井 健人、藤田 卓也
2. 発表標題 磁性アニオン性リポソーム/アテロコラーゲン複合体の作製 (2): 磁性カチオン性リポソームとの比較検討
3. 学会等名 日本薬剤学会 第32年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----