

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06784

研究課題名(和文) 難治性がんの効果的治療を目指した革新的薬物送達技術の構築

研究課題名(英文) Development of novel DDS technology for effective treatment of refractory cancer

研究代表者

大河原 賢一 (Ogawara, Ken-ichi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30291470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光増感剤含有ナノ粒子投与後に、固形がん選択的な光照射により血管内で局所的に発生する一重項酸素などの活性酸素種により、難治性がん組織内血管の低い透過性を一時的に亢進させ、その後に別途投与する抗がん剤等含有ナノ粒子製剤の腫瘍組織集積性を改善し、高い抗腫瘍効果を達成する新規薬物送達技術の構築を目指し、種々検討を加えた結果、腫瘍組織内の血管透過性が低い固形がんに対して、上記光誘発型の処置を施すと、ペリサイトに覆われた構造的に安定な血管が減少し、腫瘍内の血管透過性が亢進することで、その後投与する抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行量が増大した結果、その抗腫瘍効果が増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の医療技術の発展にも関わらず、すい臓がんを代表例とする難治性がんは、5年生存率が極めて低いなど、未だ満足いく臨床成績を得ることが出来ていない。本研究はそういった現状を打破することを目標として着手された。腫瘍組織内の血管透過性が低い難治性の固形がんに対して、我々が見出した光誘発型の処置を施すと、構造的に安定な血管が減少し、腫瘍内の血管透過性が亢進することで、その後投与する抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行量が増大した結果、その抗腫瘍効果が増強された。これらの成果は今後の難治性がん治療成績の向上に極めて有益に基礎的知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We tried to temporarily cause enhanced permeability of blood vessels in intractable cancer tissues with reactive oxygen species such as singlet oxygen locally generated in blood vessels by selective light irradiation of solid tumor after administration of photosensitizer-containing nanoparticles. As a result, when the above photo-induced treatment is applied to solid cancers with low vascular permeability in tumor tissue, the number of structurally stable blood vessels covered with pericyte decreases, and the vascular permeability in the tumor was enhanced, resulting in the larger amount of anticancer drug delivered into tumor and more efficient anti-tumor effect.

研究分野：薬剤学、製剤学

キーワード：がん治療 新生血管 光線力学療法 ナノ粒子 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子製剤の利用に代表される、がんを標的とした薬物送達は、少ない投与量で安全且つ効率的ながん化学療法を可能にする有望なアプローチとして期待されている。一方、光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) は、光増感剤の静脈内投与と、外部からの光照射によって局所的に発生させた一重項酸素等の活性酸素種により、がん細胞を壊死させる低侵襲性のがん治療法であり、薬物送達技術と組み合わせることで、治療効果の増大と副作用の抑制が期待されている。しかし、これまでに確立された、腫瘍への薬物送達技術の多くは、腫瘍組織に存在する未成熟な血管 (新生血管) の構造・機能を利用するものであり、血管分布性・透過性の高い腫瘍に対しては効率的な薬物送達が可能になるものの、膵臓がんなどの血管分布性・透過性に乏しい、所謂、「難治性がん」に対する適用は困難であるという問題を抱えている。

PDT は、光増感剤の静脈内投与と、外部からの腫瘍組織選択的な光照射によって局所的に発生させた一重項酸素等の活性酸素種により、その近傍に存在する細胞を壊死させる低侵襲性のがん治療法である。しかし、PDT による通常のがん治療においては、光増感剤を溶液として投与することが一般的であるため、光増感剤は血液中から非常に速やかに消失し、その腫瘍組織への移行が極めて乏しいことが知られている。さらに正常組織、特に皮膚に移行した光増感剤は、光線過敏症という同治療法最大の副作用を引き起こすことが知られており、患者の QOL 低下の一因となっている。このように、これまでのような光増感剤の溶液投与による PDT は、安全性の面で問題であるだけでなく、光増感剤の腫瘍への送達が乏しく、効果も不十分なものとなるため実用的ではない。したがって、光増感剤の腫瘍組織への送達効率を含めたその体内動態の改善は、作用の組織選択性の改善のみならず、正常組織における副作用の低減にもつながるため、同治療法の有用性を格段に向上可能であると考えられる。我々はこれまでに、光増感剤の血中での高い保持能、および腫瘍への効率的な送達を実現可能にする PDT 用 光増感剤内封ナノ粒子製剤の開発に成功している。しかしながら、本ナノ粒子製剤も上述した他のナノ粒子製剤と同様に、血管分布性・透過性の高い腫瘍においては非常に優れた抗腫瘍効果を発揮する一方で、難治性がんに対する適用は困難であるという問題を抱えていた。

2. 研究の目的

従来、PDT による抗腫瘍効果は、がん細胞に対する直接的な作用によるものと認識されており、これまでの光増感剤の研究開発も、がん細胞に対する殺傷能力を指標に進められてきた。しかし一方で、腫瘍組織局所で発生した活性酸素種は、がん細胞のみならず腫瘍組織内の血管内皮細胞に対しても殺細胞効果を発揮しており、腫瘍の増殖に不可欠なプロセスである血管新生が阻害され、それにより腫瘍増殖が抑制されていることが示唆されている。そこで我々は、PDT における標的細胞として腫瘍組織内血管内皮細胞に着目した。すなわち、光照射により腫瘍組織局所で発生する活性酸素種の局所濃度を適切に制御することにより、腫瘍組織における血管透過性を局所的且つ一時的に亢進させ、その後別途投与する抗がん剤の腫瘍送達を向上させることが可能ではないかと考えた。

そこで本研究では、光増感剤含有ナノ粒子投与後に、固形がん選択的な光照射により血管内で局所的に発生する一重項酸素などの活性酸素種により、難治性がん組織内血管の低い

透過性を一時的に亢進させ、その後別途投与する抗がん剤等含有ナノ粒子製剤の腫瘍組織集積性を改善し、高い抗腫瘍効果を達成する「光誘発型の腫瘍組織選択的な血管透過性亢進技術 (photo-triggered tumor vascular treatment, PVT)」の構築ならびにその治療へ応用を目指した。

3. 研究の方法

I. PppIX-DME 内封ポリマーナノ粒子製剤 (PN-Por) の調製

光増感剤として、脂溶性のポルフィリン誘導体である Photoporphyrin IX dimethyl ester (PppIX-DME) を用いた。ポリマーナノ粒子調製にはブロック共重合体 PLA-PEG を用い、PppIX-DME を共に溶解させた酢酸エチルに精製水を添加し、プローブ型ソニケーター (大岳製作所) による超音波処理 (50 W, 室温, 5 min) を行い、まずは O/W 型エマルションを得た。このエマルションに対し 10 倍量の精製水を用いて希釈・攪拌を行い、PppIX-DME 内封ポリマーナノ粒子製剤 (PN-Por) を調製した。またトレーサー標識した粒子 ($[^3\text{H}]$ 標識 PN) を調製する場合には、PppIX-DME の代わりに少量の $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体を酢酸エチルに溶解させ、同様の方法で調製した。

II. 光照射装置

ポルフィリン誘導体の活性化に用いる光照射装置として、ハロゲン光源 (MHAB-150W, MORITEX) に 600 nm 以下の波長をカットするフィルターを適用して用いた。

III. PVT 処理を施した固形がんモデルマウスにおけるリポソーム製剤の腫瘍組織移行量の評価

トレーサーとして $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体を組み込んだリポソームを用いて評価を行った。作製した固形がんモデルマウス腫瘍の体積が約 400 mm³ に達した時点で PVT 処置を施し、直後に放射標識したリポソームを投与した。一定時間の後に摘出した腫瘍は生理食塩水中で洗浄し、全重量を測定後、全量をサンプルとし、Solvable®を 1 mL 加えて 50°C で 2 時間インキュベートすることにより臓器を溶解させた。その後、2 N HCl を加えて中和した後、Clear-sol II (Nacalai Tesque 社) を 10 mL 加え、液体シンチレーションカウンタにより $[^3\text{H}]$ -Cholesterol 誘導体由来の放射活性からリポソームの腫瘍組織移行量を評価した。

IV. 腫瘍組織の凍結切片の作製

作製した固形がんモデルマウスの腫瘍組織の体積が一定の大きさに達した時点で腫瘍組織を摘出した。摘出した腫瘍組織は生理食塩水中で洗浄した後、O.C.T. compound (サクラ精機株式会社) を用いて凍結包埋し、クリオスタット (CM1850, Leica Microsystems 社) により 10 μm の厚さに薄切して、スライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に付着させ、冷アセトン固定を行った。作製した凍結切片サンプルは、-20°C で保存した。

V. 蛍光免疫染色 (DiI-PL & 血管内皮細胞マーカー分子 (CD31))

調製した蛍光標識リポソーム (DiI-PL) を固形がんモデルマウスに静脈内投与した後、凍結切片を作製した。-20°C で保存していた凍結切片を室温に戻した後、DAKO ペン (Dako Cytomation 社) で腫瘍組織を囲ってから PBS で洗浄し、blocking PBS (5% FBS) で 15 分間処理した。洗浄後、1 次抗体としてラット抗マウス PECAM-1 抗体 (BD Biosciences 社)

を添加し, 45 分間処理した. 再び洗浄した後, 2 次抗体として Fluorescein 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Life Technologies 社) を添加し, 60 分間処理した.

VI. 蛍光二重免疫染色 (血管内皮細胞マーカー分子 (CD31) & 壁細胞マーカー分子 (SMA))

壁細胞 (SMA) の免疫染色は VECTOR M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories 社) を使用して行った. 作製した凍結切片を -20°C から室温に戻し, DAKO ペンで腫瘍組織を囲み, PBS で洗浄した後, blocking PBS (5% FBS) で 15 分間処理した. 洗浄後, 1 次抗体としてラット抗マウス PECAM-1 (CD31) 抗体を添加し, 45 分間処理した. 洗浄した後, 2 次抗体として RITC 標識ウサギ抗ラット IgG 抗体 (MP Biomedicals 社) で, 60 分間湿潤箱中で処理した. 再び洗浄した後, M.O.M. Mouse Ig Blocking Regent を添加し, 60 分間処理した. 洗浄した後, M.O.M. Protein Concentrate により 5 分間処理し, 1 次抗体として SMA マウスモノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加し, 30 分間処理した. 洗浄後, M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent を添加し, 10 分間処理した. 再度洗浄した後, Fluorescein Avidin DCS を添加し, 5 分間処理した.

4. 研究成果

PVT 直後に投与した PTX 内封 PEG リポソーム製剤 (PL-PTX) の抗腫瘍効果の評価

血管透過性が低いことが知られている, マウスメラノーマ細胞 B16/BL6 (B16) を用いて作製した固形がんモデルマウス (B16 モデルマウス) に対して PVT を施した直後に, すでに我々がその開発に成功している, 優れた血中滞留性を示すパクリタキセル内封リポソーム製剤 (PL-PTX) を静脈内投与し, その抗腫瘍効果を評価した (図 1). その結果, PVT 単独, 又は, PL-PTX 単独処置群では腫瘍増殖抑制効果が認められなかったのに対して, PVT 後に PL-PTX を投与した併用群において, 有意に腫瘍増殖が抑制されることが明らかとなった.

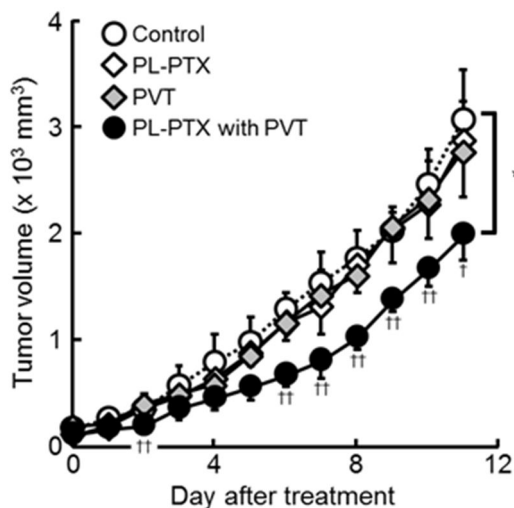


図 1 PVT 前処置の有無による B16 固形がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果の比較

○コントロール群, PTX 内封リポソーム製剤単独処置群, PVT 単独処置群, PVT 処置の後に PTX 内封リポソーム製剤を投与した群 * $p < 0.05$ (比較対象, コントロール群), ++ $p < 0.01$; + $p < 0.05$ (比較対象, PVT 単独処置群)

PVT を施した B16 モデルマウスにおける PEG リポソームの腫瘍組織移行量の評価

PVT を施した直後の B16 モデルマウスに, [³H]-CHE 標識した PEG リポソームを静脈内投与し, その 24 時間後における腫瘍組織への PEG リポソーム移行量を, 液体シンチレーションカウンタにより測定した. その結果, B16 腫瘍への PEG リポソーム移行量は, PVT を施すことにより有意に増大することが明らかとなった.

PVT後に投与したPEGリポソームのB16腫瘍組織内分布挙動の評価

PVTを施した直後にDiIで蛍光標識したPEGリポソーム(DiI-PL)を投与し、その15分後に摘出したB16腫瘍を蛍光顕微鏡により観察した。尚、観察の際にPEGリポソームが血管内と血管外のどちらに存在するかを判別可能とする為、血管内皮細胞のマーカー分子であるCD31に対する免疫染色を併せて施した。観察画像に基づき、血管外に漏出したPEGリポソームの分布面積を定量した結果、PVT後に投与した方が、無処置で投与した場合よりも有意に広いことが明らかとなり($p < 0.001$)、PVTによって腫瘍内の血管透過性が亢進されたことが示唆された。

PVTを施したB16腫瘍内血管の構造評価

PVTを施した15分後に摘出したB16腫瘍に対して、ペリサイトのマーカー分子であるSMAと血管内皮細胞(CD31)の二重免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡による観察画像全てを定量的に解析し、血管内皮細胞の総面積(図2A)、血管壁細胞の総面積(図2B)、壁細胞被覆を伴った血管の面積(図2C)、及び、血管内皮細胞の総面積に対する壁細胞に覆われた血管の面積の割合(CD31 and SMA-double positive area / CD31-positive area)(図2D)を算出した。その結果、PVTを施しても、血管内皮細胞(図2A)、又は、ペリサイトが検出された総面積(図2B)にはほとんど変化が認められなかったのに対して、ペリサイトに覆われた血管内皮細胞の割合(図2D)は、有意に低下することが明らかとなった。このことから、PVTによって血管透過性が亢進した原因の一つに、ペリサイト被覆を伴った血管の減少が関与していることが示唆された。

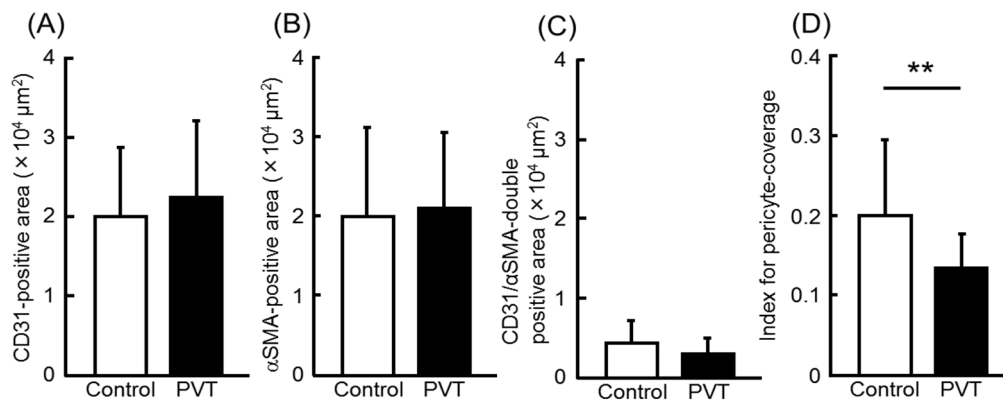


図2 B16固形腫瘍組織内血管の構造特性に及ぼすPVT前処置の影響

(A) CD31陽性血管の面積、(B) SMA陽性部位の面積、(C) CD31陽性且つSMA陽性血管の面積
(D) 血管総面積に対する壁細胞に覆われた血管面積の割合 ** $p < 0.01$

【研究成果のまとめ】

以上の結果を総括すると、B16腫瘍にPVTを施すと、壁細胞被覆を伴った血管が減少し、血管透過性が亢進することで、その後に投与したPL-PTXの腫瘍組織移行量が增大した結果、その抗腫瘍効果が有意に増強されたものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 M. Tanaka, Y. Fujita, N. Onishi, K. Ogawara, H. Nakayama, T. Mukai	4. 巻 232
2. 論文標題 Preparation and characterization of lipid emulsions containing styrene maleic acid copolymer for the development of pH-responsive drug carriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphyslip.2020.104954	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 S. Okawa, Y. Sumimoto, K. Masuda, K. Ogawara, M. Maruyama, K. Higaki	4. 巻 159
2. 論文標題 Improvement of lipid solubility and oral bioavailability of a poorly water- and poorly lipid-soluble drug, rebamipide, by utilizing its counter ion and SNEDDS preparation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharm. Sci.	6. 最初と最後の頁 105721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2021.105721	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 住元 祐介、大川 慎也、大河原 賢一、檜垣 和孝
2. 発表標題 難水溶性 - 難脂溶性薬物のSelf-nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) 製剤化に関する基礎的研究
3. 学会等名 第34回日本薬剤学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井文教、平田聖也、大河原賢一、水口裕之
2. 発表標題 腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスの前投与は、PEG修飾リポソームの腫瘍集積性を向上させる
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuminori Sakurai, Seiya Hirata, Nozomi Kurisu, Ken-ichi Ogawara, Hiroyuki Mizuguchi
2. 発表標題 Enhanced tumor accumulation of PEGylated liposomes by pretreatment with oncolytic reovirus in tumor-bearing mice.
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野 晶、檜垣 和孝、大河原 賢一
2. 発表標題 光増感剤内封ポリマーナノ粒子製剤を用いた光線力学療法の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤前投与の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Ogawara
2. 発表標題 Optimization of cancer treatment with nano-DDS formulations: Knowledge of tumor vasculatures to make things work
3. 学会等名 The 2nd Workshop for Korea-Japan Young Scientists on Pharmaceutics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井 はづき、高杉 裕太、大河原 賢一、丸山 正人、檜垣 和孝
2. 発表標題 パクリタキセル内封リポソーム製剤の転移性乳がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果に及ぼす血管正常化の影響
3. 学会等名 第35回日本薬剤学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 家中 悠輔、東條 遥佳、兵頭 健治、石原 比呂之、菊池 寛、大河原 賢一、丸山 正人、檜垣 和孝
2. 発表標題 ドキソルピシン内封リポソーム製剤の悪性黒色腫固形がん治療に及ぼす薬物放出特性の影響
3. 学会等名 第35回日本薬剤学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	檜垣 和孝 (Higaki Kazutaka) (60284080)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------