

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790128
 研究課題名 (和文) Tumor dormant therapy へのリポソーム化抗がん剤の応用
 研究課題名 (英文) Application of liposomal anticancer drug for tumor dormant therapy

研究代表者
 石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：50325271

研究成果の概要：本研究では、low dose metronomic chemotherapy(LDM)が有する課題を、がん新生血管に標的化されたりポソーム化抗がん剤を、あるいは LDM とリポソーム化抗がん剤を併用する事によって解決する事を目的とした。腫瘍新生血管標的抗がん剤封入リポソームを用いることで、通常の治療よりも低用量で高い抗腫瘍効果が得られることを確認した。また、経口抗がん剤 (S-1) の LDM とリポソーム化抗がん剤を併用することで LDM による腫瘍内微小環境変化に起因したりポソームの腫瘍移行性の亢進に基づく相乗的な抗腫瘍効果向上が得られることを明らかにした。本検討から、既存の LDM の課題を克服できる可能性があることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：癌、癌治療、リポソーム、DDS、癌新生血管、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法における最大の問題は、抗がん剤の非特異的な生体内分布による毒性の発現と、高用量・頻回投与による耐性化である。このような問題を克服する治療法として、低用量を複数回投与する low-dose metronomic chemotherapy (LDM)が報告されていた(Kerbel, R.S., et al., *Nat. Rev. Cancer*, 4, 423-436, 2004)。この方法は、抗がん剤の低用量投与により、新生血管のみを死滅させてがん組織の増大と転移の抑制をはかり、かつ同時に副作用発

現をも減少させうる優れた治療法である。事実、実際の臨床でも顕著な効果が報告されている(Kieran, M.W., et al., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 27, 573-581, 2005)。しかし、低用量の基準も曖昧であり、複数回投与によるがん巣・新生血管の耐性化も懸念された。さらに、anti-angiogenic(抗血管新生阻害)効果により治療効果が生じるといわれているものの、免疫系の活性化、あるいは細胞増殖を抑制する遺伝子発現の亢進などが生じているなどとも報告されており、その作用機序は明確になっ

ていない。また、その効果を客観的に評価しうる biomarker も見つかっていなかった。さらに、LDM において抗がん剤の併用がより高い治療効果を導く事が報告されているが、どのような抗がん剤の組み合わせが最適かも分かっておらず、さらなる検討が必要な状況にあった (Baruchel, S. and Stempak, D., *Onkologie*, 29, 305-307, 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、LDM が有する課題を、がん新生血管に標的化されたリポソーム化抗がん剤を、あるいは LDM とリポソーム化抗がん剤を併用する事によって解決する事を目的とした。

本検討の目的が達成されることによって期待される点は以下の通りである。

- (1) 長期間投与時の LDM の安全性に対する懸念は、抗がん剤をリポソーム化し、腫瘍部位以外への分布を抑制する事で向上できる。また、リポソームを選択的にがん新生血管に送達すれば、より低用量で効果が得られ、安全性がさらに高まる。
- (2) LDM によりがん新生血管が障害を受ければ、血管の透過性が亢進し、リポソーム化した抗がん剤がより腫瘍組織に移行しやすくなる。したがって、リポソーム化抗がん剤と LDM を併用する事で、結果として抗がん剤総投与量が低用量になり、より安全で高い薬理効果が得られる。

リポソーム化抗がん剤の LDM への応用はこれまで報告されておらず、新規性が高くかつ有望であると考えられた。LDM 時に投与される抗がん剤は、常用量に比べれば低用量ではあるが、患者が生存している長期間にわたって抗がん剤を投与する必要があるため、長期間の安全性が保証されなければならない。しかし、既存の LDM のように遊離の抗がん剤を投与する場合、非選択的な抗がん剤の生体内分布を抑制することはできず、耐性化や予想しえない副作用が発現するリスクを払拭する事ができない。このような問題は、抗がん剤をキャリアに封入し、新生血管近傍に送達することで解決される。もちろん、リポソーム化することにより抗がん剤の生体内動態が変化し、このことに起因する新たな副作用の発現も考えられる。しかし、このことは、がん新生血管に選択的に結合するリポソーム化抗がん剤を用いたり、既存の LDM と組み合わせ抗がん剤の投与量を減らすことで解決できるものと考えた。

このような背景から、本課題は、①既存の LDM へのリポソーム化抗がん剤併用時の効果増強、②リポソーム化抗がん剤自体による LDM、の二つのアイデアから成り立たせた。

両アイデアが実現できれば、既存の LDM が持つ問題点を克服することができ、より有効で安全な治療法へと発展するものと考えた。

がん新生血管を標的とした薬剤や治療法が盛んに開発されている。しかし、現状ではがん進展を抑制する程度のもものがほとんどであり、当初期待された腫瘍縮小効果はほとんど得られていない。本課題の研究目標が達成できれば、革新的な治療法の確立に寄与するものと考えられた。

リポソーム化抗がん剤を用いることにより、LDM よりも少ない抗がん剤総投与量と投与回数で、LDM と同等かそれ以上の治療効果が得られる可能性が高い。このような特長は、成長期故に抗がん剤に感受性が高い小児がんの患者には、顕著な副作用軽減を導き、QOL の向上をもたらすため、福音になることが期待された。

3. 研究の方法

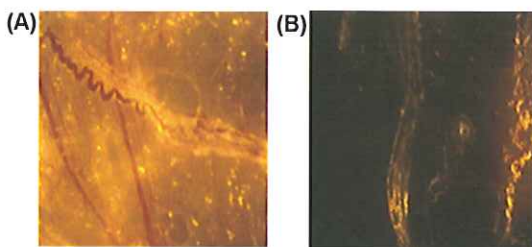
本研究を遂行するにあたり重要な点は、次の3点 (proof of target, proof of principle, proof of efficacy) である。即ち、(1)治療によりがん新生血管内皮細胞のみが障害を受け、正常組織の血管系は障害を受けない、(2)低用量複数回投与によって耐性化が誘導されず、腫瘍の増殖抑制あるいは退縮が生じるか、(3)リポソーム化抗がん剤を LDM に応用する事により、延命効果と同時に quality of life (QOL) の向上がもたらされるか、である。

これら3点に関し担がんモデル動物を用い2つの戦略 (①がん新生血管に親和性を持つ抗がん剤封入リポソームの LDM への応用、②既存の LDM へのリポソーム化抗がん剤の併用) を同時平行的に進行させ、双方から得られる知見をフィードバックさせ目的である tumor dormancy therapy (がん休眠療法) へのリポソーム化抗がん剤の応用を実現させることとした。

4. 研究成果

- (1) 腫瘍内新生血管選択的抗がん剤デリバリーシステムの開発

図1

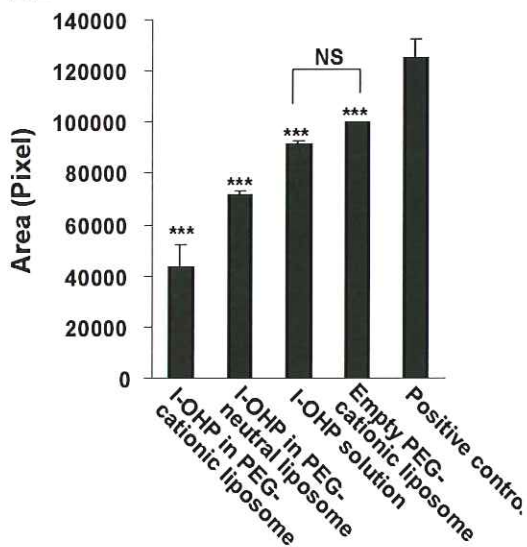


①表面電荷が正である微粒子が腫瘍内新生血管内皮細胞に選択的に集積し易いという報告に基づき、腫瘍内新生血管選択的抗がん剤デリバリーシステムの開発を行った。表面に適度な正電荷を与え、さらにポリエチレン

グリコール (PEG) で表面修飾を施した PEG-coated cationic liposome を調製して検討したところ、図 1 (A) に示すようにマウス背部皮下に人為的に誘導した新生血管に選択的に集積することが確認された。図 1 (B) は電荷を与えていないリポソームであり、集積性が低いことが分かる。

②①で調製した PEG-coated cationic liposome に抗がん剤 (オキサリプラチン) を封入し、マウス背部皮下に人為的に形成される新生血管に対する形成阻害効果を評価した。図 2 に示すように、PEG-coated cationic liposome が最も高い阻害効果を示すことが確認され、抗がん剤の腫瘍新生血管選択的デリバリーの有用性が示された。

図2



③①で調製した PEG-coated cationic liposome の腫瘍移行性を in vivo imaging 装置により同一個体を用いて経時的に観察した (図 3 (A)) ところ、表面電荷を付加していない PEG-coated neutral liposome (図 3 (B)) に比べて速やかに腫瘍内に移行し蓄積すると同時に比較的長く腫瘍内に留まることが示唆された。

次いで、PEG-coated cationic liposome が実際にどのくらい腫瘍内に抗がん剤を効率よく送達しうるのか検討した。図 4 に示すように、PEG-coated neutral liposome を用いた場合よりも、速やかにかつ多量に、しかも長期間にわたって抗がん剤を腫瘍内に滞留させることが定量的に確認された。抗がん剤の送達パターンは図 3 で確認されたリポソーム自身の腫瘍集積パターンと一致しており、PEG-coated cationic liposome の高い腫瘍新生血管への集積性と比較的高い血中滞留性に基づく EPR 効果を介した腫瘍組織移行性に

よって、効率の良い薬剤送達を実現されたものと推察された。

図3

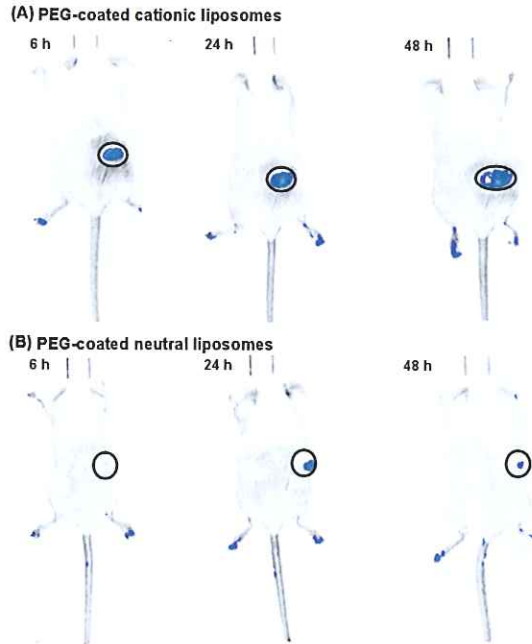
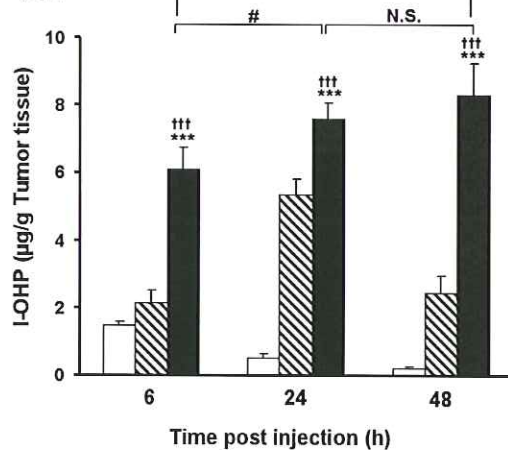


図4



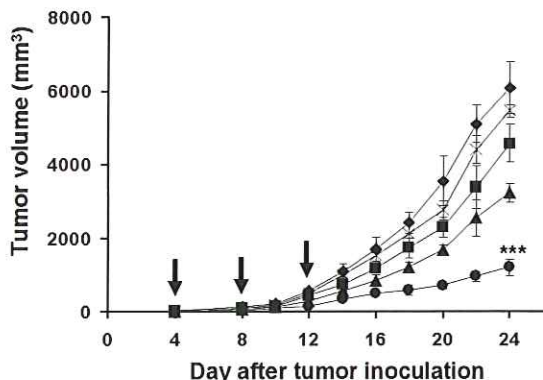
④Lewis lung carcinoma 細胞を背部皮下に移植した担がんモデルマウスを用い、実際に抗腫瘍効果の検討を行った。図 5 に示すように、オキサリプラチンを封入した PEG-coated cationic liposome (●) がその他の治療群 (オキサリプラチン封入 PEG-coated neutral liposome (▲)、empty PEG-coated cationic liposome (×)、5% dextrose 溶液 (control) (◇)) に比べて顕著に高い抗腫瘍効果を示すことを確認することができた。

*投与は図中矢印で示す日に計 3 回行った。また、オキサリプラチンの投与量は 5 mg/kg とした。

(2) 経口型抗がん剤 LDM と抗がん剤封入リポソーム併用投与時の抗腫瘍効果の検討

LDM は新生血管阻害療法であり、リポソーム化抗がん剤と併用した場合にはリポソ

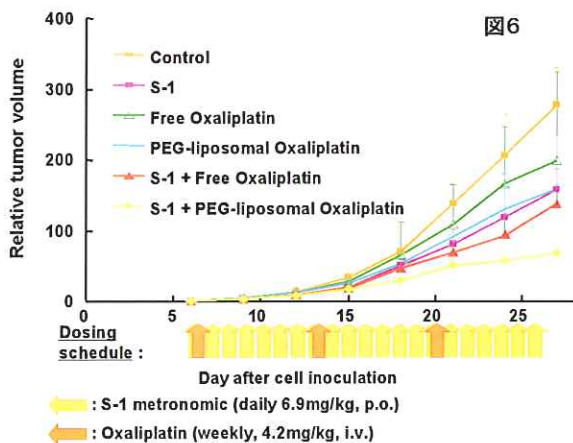
図5



腫瘍内の腫瘍内移行を抑制することが考えられる。しかし、その一方で新生血管阻害療法は血管系の normalization を実現させ腫瘍内への血液の流入量を増加させるとの報告もある。また、新生血管の阻害は腫瘍内の酸性度を一時的に高め、結果として新たな血管新生を誘導する事も考えられる。LDM による血管新生阻害と、休薬期間内での血管新生誘導とその時点でのリポソーム化抗がん剤の投与は、腫瘍内へのリポソーム化抗がん剤の移行性促進とその後の新生血管阻害による抗がん剤の腫瘍内“封じ込め”によって抗腫瘍効果を相乗的に向上させる可能性も考えられた。そこで、経口抗がん剤の S-1 の連続投与と、抗がん剤（オキサリプラチン）封入 PEG-coated neutral liposome の併用投与による抗腫瘍効果について検討を行った。

①S-1 LDM と抗がん剤封入リポソーム併用効果の検討

Lewis lung carcinoma 細胞をマウスの背部皮下に移植後、6日後より治療を開始した。治療群としては、図6に示すように、I. S-1 LDM (毎日経口投与)、II. 遊離型のオキサリプラチン (1週間に1度、計3回)、III. I と II を組み合わせたもの、IV. オキサリプラチン封入 PEG-coated neutral liposome (1週間に1度、計3回)、V. I と IV の組み合わせたもの、を選択した。図6から明らかなように、S-1 LDM とオキサリプラチン封入 PEG-coated

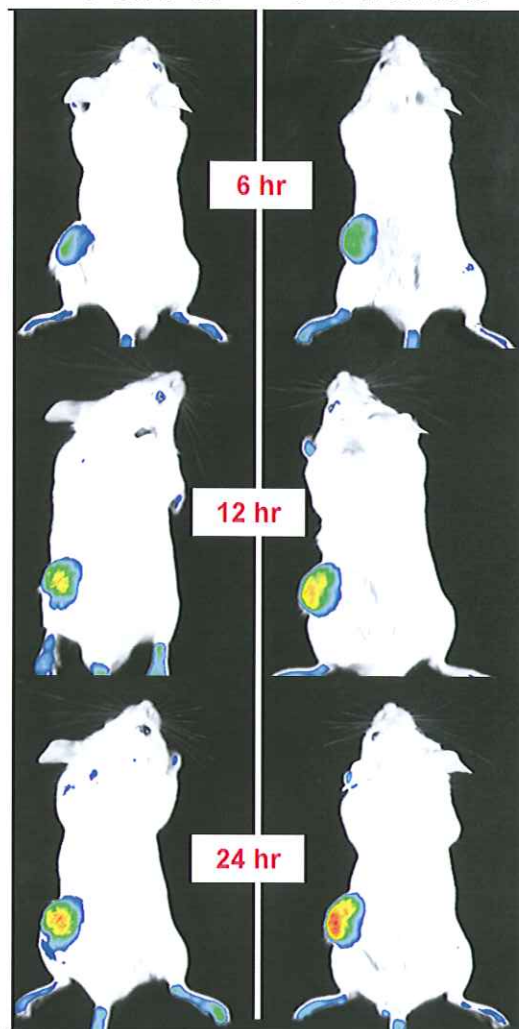


neutral liposome の組み合わせが、最も高い抗腫瘍効果を示した。

②S-1 LDM がリポソームの腫瘍移行性におよぼす影響

担がんモデルマウスを用い、S-1 LDM がおよぼす PEG-coated neutral liposome の腫瘍移行性への影響について検討した。図7に示すとおり、S-1 LDM (7日間連投) によって PEG-coated neutral liposome の腫瘍内移行性が量的に向上すると共に、腫瘍内分布の観点からも大きく拡大されていることが分かった。この結果から図6で観察された S-1 LDM とオキサリプラチン封入 PEG-coated neutral liposome 併用による抗腫瘍効果の向上は、S-1 LDM によるリポソーム化抗がん剤の腫瘍内移行性および腫瘍内分布性の改善に基づくものであることが示唆された。

図7 Control S-1 treated



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 6 件)

- ① Hatakeyama, H., Akita, H., Ishida, E., Hashimoto, K., Kobayashi, H., Aoki, T., Yasuda, J., Obata, K., Kikuchi, K., Ishida, T., Kiwada, H., Harashima, H., Tumor targeting of doxorubicin by anti MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int. J. Pharm.*, 342, 194-200 (2007) (査読有り)
- ② Atobe K., Ishida T., Ishida, E., Hashimoto K., Kobayashi H., Yasuda J., Aoki, T., Obata K., Kikuchi H., Akita, H., Asai, T., Harashima, H., Oku, N., Kiwada, H., In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 972-978 (2007) (査読有り)
- ③ Suzuki, Y., Matsushita, S., Yonezawa, S., Yokota, J., Katanasaka, Y., Ishida, T., Dewa, T., Kiwada, H., Nango, N., Oku, N., Disappearance of the angiogenic potential of endothelial cells caused by Argonaute2 knockdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368, 243-248 (2008) (査読有り)
- ④ Shiraga, E., Barichello, J.M., Ishida, T., Kiwada, H., A metronomic schedule of cyclophosphamide combined with PEGylated liposomal doxorubicin has a highly antitumor effect in an experimental pulmonary metastatic mouse model. *Int. J. Pharm.*, 353, 65-73 (2008) (査読有り)
- ⑤ Ishida, T., Shiraga, E., Kiwada, H., Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model. *J. Control. Release*, 134, 194-200 (2009) (査読有り)
- ⑥ Abu-Lila, A., Suzuki, T., Doi, Y., Ishida, T., Kiwada, H., Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *J. Control. Release*, 134, 18-25 (2009) (査読有り)

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① 白髪恵美、石田竜弘、際田弘志、シクロフオスファミドを用いた low dose metronomic chemotherapy およびドキシソルビシン封入リポソーム併用による抗腫瘍効果の検討、日本薬剤学会第 22 年会 (大宮) 2007 年 5 月 23 日
- ② 萩歩美、白髪恵美、石田竜弘、際田弘志、肺転移性 melanoma 細胞に対するシクロホスファミドを用いた low-dose metronomic chemotherapy におけるドキシソルビシン封入リポソームの併用効果の検討、第 23 回日本 DDS 学会 (熊本) 2007 年 6 月 1

5 日

- ③ 白髪恵美、石田竜弘、際田弘志、シクロフオスファミドを用いた low dose metronomic chemotherapy におけるドキシソルビシン封入リポソームの併用効果および毒性の検討、第 16 回 DDS カンファレンス (静岡) 2007 年 7 月 14 日
- ④ 下田かおり、跡部一孝、石田竜弘、橋本浩一、小林英夫、安田純子、青木隆則、小幡賢一、菊池寛、秋田英万、浅井知浩、原島秀吉、奥直人、際田弘志、Anti-MT1-MMP immunoliposome の血管内皮細胞(HUVEC)における内在化経路の検討、第 23 回日本 DDS 学会 (熊本) 2007 年 6 月 14 日
- ⑤ Ishida, T., Kiwada, H., Improvement of tumor targeting therapy with nanocarriers by changing the tumor microenvironment. 11th Liposome Research Days conference, Yokohama (Japan), July 19-22 (2008)
- ⑥ 土井祐輔、平百合恵、石田竜弘、際田弘志、S-1 を用いた Metronomic chemotherapy によって生じる腫瘍内微小環境の変化がもたらすリポソームの腫瘍内移行性の向上、第 17 回 DDS カンファレンス (静岡) 2008 年 9 月 20 日
- ⑦ Ishida, T., Kiwada, H., Improvement of tumor targeting therapy with nanocarriers by changing the tumor microenvironment. 6th international workshop on Drug Delivery Systems for Nanomedicine, Prague (the Czech Republic) October 3-6 (2008)
- ⑧ 土井祐輔、平百合恵、石田竜弘、際田弘志、S-1 metronomic chemotherapy とオキサリプラチン封入ナノキャリア併用療法の開発: 相乗的効果増強機構の解明に関する研究、第 46 回日本癌治療学会総会 (名古屋) 2008 年 10 月 30 日
- ⑨ 平百合恵、土井祐輔、石田竜弘、際田弘志、フッ素ピリミジン系抗がん剤と Oxaliplatin(l-OHP)封入リポソーム併用療法に関する研究: l-OHP 放出性の違いが効果と毒性に及ぼす影響、第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (岡山) 2008 年 11 月 9 日
- ⑩ 石田竜弘、ナノキャリアを用いた抗がん剤デリバリーシステムの開発における in vivo イメージングの有用性、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 BMB 2008 (神戸)、2008 年 12 月 11 日

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：50325271

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし