

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16766

研究課題名(和文)腫瘍血管の動的透過性(Nano eruption)の解明とその制御

研究課題名(英文) Manipulation of dynamic tumor blood vessel permeability: nano-eruption

研究代表者

井上 雄太 (Inoue, Yuta)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10802358

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)：Nano-eruption は腫瘍血管系の一時的で不規則な開口部(dynamic vent)を介してドラッグデリバリーシステムが腫瘍組織に送達する動的な血管透過性亢進現象である。TGF- $\beta$  阻害薬とクロロキニンに着目し30-nmと70-nmナノメディシンに併用してnano-eruptionの変化を解析した。TGF- $\beta$  阻害薬はnano-eruptionの頻度、持続時間を亢進し幅広いサイズのdynamic ventを生成した。クロロキニンはNano-eruption発生部位の血管径、最大nano-eruptionの面積と放射状増加が亢進した。30-nmより70-nmの方が変化が大きいことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nano-eruption は腫瘍血管系の一時的で不規則な開口部(dynamic vent)を介してドラッグデリバリーシステム(DDS)が腫瘍組織に送達する動的な血管透過性亢進現象である。Nano-eruptionの制御はDDSの効率を改善することが期待される。本研究からTGF- $\beta$  阻害薬とクロロキニンとナノメディシンのサイズを介したNano-eruptionの制御は、DDSの効率をさらに促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have recently discovered dynamic extravasation through transient tumor vascular bursts. This phenomenon, named as nano-eruption (NE), increases accumulation of larger nanomicelles in tumors. To unveil the mechanisms and ultimately control NE, conditions that either provoke or inhibit NE is under investigation. Tumor-bearing mice were treated with either TGF- $\beta$  inhibitor and chloroquine. The 30- or 70- nm fluorescent-labeled micelles were administered, and their tumor distribution was assessed over time with intravital microscopy. TGF- $\beta$  inhibitor increased the frequency, maximum area & velocity and duration time of NE. Chloroquine did not affect the frequency, but increased the maximum area & velocity and duration time of NE.

Our result demonstrated that different modulator drugs enhanced the different aspect of the NE, and the consequences are also dependent on the micelle size.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：癌 ナノメディシン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究チームは高分子ナノミセルを用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発研究を行っている。これまでの概念では、腫瘍血管には細胞間隙やフェネストラなどの透過性の高い静的な孔(static pore)があり、これを介して徐々に高分子物質が血管外へ漏出するとされていた(Enhanced Permeability and Retention effect: EPR 効果)。DDSの生体内動態を詳細に評価するために生体リアルタイム共焦点・多光子レーザー走査型顕微鏡(以下、生体顕微鏡)を構築した。解析を行う中で、腫瘍血管が一過性に破綻しDDSが腫瘍組織に噴出する動的透過経路(dynamic vent)を発見しNano eruptionと命名した(Matsumoto, et al. Nature Nanotech 2016)。

Nano eruption についてのこれまでの解析では以下のことが判明している。観察期間を通じて時空間的に不規則に発生する。発生頻度は腫瘍細胞からの距離と相関する。微小出血では無く血漿成分の一過性の噴出である。腫瘍血管のstatic poreとdynamic ventの2種類の透過経路に大小の粒径(30 nm 及び70 nm)の高分子ナノDDSを用いたところ、30 nm ミセルはstatic poreもdynamic ventも突破したが、70 nm ミセルはstatic poreを突破できずdynamic ventに依存して血管外へ噴出した。短時間で増大する噴出期(eruption phase)と、その後徐々に広がっていく拡散期(dispersal phase)に分けることができる。Eruption phaseでは噴出速度などに有意差は無いため、eruption phaseは腫瘍血管内外の圧力差を駆動力とすることが示唆された。Dispersal phaseでは30 nmの高分子ナノDDSは有意に拡散効率が高かった。つまりdispersal phaseは対流(convection)に依存し、腫瘍組織の密度に左右されることが示唆された。

Nano eruptionはDDSにとっては好都合な薬剤侵入経路ではあるが、発生の部位や機序について明らかになっていない点も多い。また、Nano eruptionは血漿成分なども腫瘍組織に流入するものとなりうる。つまり、腫瘍細胞の栄養や酸素の供給源となり、腫瘍細胞の増殖や脈管浸潤のもととなる可能性がある。Nano eruptionの機序を解明することはがんの微小環境を明らかにすることにつながり、Nano eruptionを制御することが出来れば、例えばDDS投与中はNano eruptionを促進し休薬期間中はNano eruptionを抑制するといったような、新しいDDS治療戦略の開発に貢献できる。

当研究に関連して過去にTGF- $\beta$ 阻害薬の併用が粒径の大きなミセルを腫瘍組織深部に到達させ、がんの増殖を抑制することが示されている(Kano, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007)(Cabral, et al. Nature Nanotech 2011)。また、抗マラリア薬のクロロキンはNotchシグナルを介し腫瘍血管のnormalizationによって腫瘍組織の低酸素状態改善や治療薬の効果を高めることで抗腫瘍効果を示す報告がある(Maes, et al. Cancer cell 2014)、血管のnormalizationがNano eruptionにどのような影響を与えるかは興味深いところである。他にも、血管のnormalizationについては、サリドマイドが血管内皮細胞のPDGF-B発現を上昇させ壁細胞活性化を促進することで血管成熟が誘導されるという報告があり、臨床で遺伝性血管疾患患者の出血症状が減少することが示されている(Lebrin, et al. Nat Med 2010)が、同様の作用が腫瘍血管でも起こるのであればNano eruption抑制に働くことが期待できる。COX-2阻害薬のセレコキシブはVEGF阻害を介して血管新生抑制と腫瘍増殖抑制を示すことは動物実験でも臨床試験でも証明されている(Xu, et al. Sci Transl Med 2014)(Wu, et al. J Control Release 2014)が、これもNano eruptionとの関連性が強く疑われる。

## 2. 研究の目的

本研究は新たに発見されたNano eruptionという現象について薬剤を併用することで詳細に調べ、その機序と制御の条件を明らかにしてがんの微小環境の解明と治療に応用することを目的とする。これまでDDS製剤はその効果を高めるため、active targetingやpassive targetingを用いたターゲティング効率やナノ粒子そのものの改良について様々な研究がなされてきたが、臨床応用に成功した例は少ない。

近年tumor conditioningが着目されている。ナノ粒子投与前あるいは同時に何らかの修飾を施すことによってナノ粒子の腫瘍集積、治療効果を改善するという概念である。Tumor conditioningは総じて腫瘍血管に働きかけてその透過性を向上させるが、そこに我々の研究チームが報告したNano eruptionがどのように関与しているか明らかにする。

Tumor conditioningに使用する薬剤として、TGF- $\beta$ 阻害薬、クロロキン、セレコキシブとサリドマイドに注目した。それぞれ併用することでNano eruptionの変化を観察する。本研究はがんの微小環境の変化について生体顕微鏡を用いて撮影することで動的に観察し解析を行う。

## 3. 研究の方法

実験の基礎となるのは腫瘍を移植した担癌モデルマウスを全身麻酔下に生体顕微鏡の観察台へ固定し、蛍光標識した高分子ナノミセルを投与後10分ごとに10時間以上観察を行う。使用する担癌モデルマウスは、Balb/c nu/nuの6週から8週の雌で、移植する腫瘍細胞株はBxPC3-

GFP 株、移植した腫瘍を観察するための Dorsal skinfold chamber を背中に装着して、皮下に腫瘍を移植する。移植から 2 週間経過して腫瘍が生着したのを確認してから観察を行う。麻酔はイソフルランによる持続吸入麻酔を用い、生体顕微鏡の観察台は 37 度に保ち、観察中の体温を一定に保つ。その上で蛍光標識した高分子ナノミセルの腫瘍内動態の観察を行う。高分子ナノ DDS は内核を構成するポリグルタミン酸の比率を調整することによって、粒径を 30nm から 100nm まで変化させることができる (Cabral, et al. Nature Nanotech 2011)。使用する高分子ミセルは先行研究と同じく static pore も dynamic vent も突破できる 30 nm ミセルと static pore を突破できず dynamic vent に依存する 70 nm ミセル両方を使用する。70 nm ミセルの動態へより大きな影響を及ぼすものが Nano eruption に強く影響したとすることが出来る。

取得した画像は ImageJ を用いて二値化、差分解析などの画像処理と解析を行う。画像の処理法と解析作業は検討の結果、既に半自動化している。検出した Nano eruption について、画像解析による数値化を行い Nano eruption の単位面積当たりの発生回数 (撮影開始から時間ごとの比較と全観察時間の合計の比較も行う)、Nano eruption の最大噴出面積、最大噴出速度、最大噴出の発生時間、Nano eruption の噴出持続時間、腫瘍細胞と Nano eruption の発生部の距離、Nano eruption が発生した血管径をそれぞれ求める。続いて、TGF- $\beta$  阻害剤、クロロキン、セレコキシブ、サリドマイドの薬剤をそれぞれ併用することで Nano eruption の各観察項目に有意な変化があるかどうかを検討する。投与量は先行研究をもとに TGF- $\beta$  阻害剤が 1mg/kg、クロロキンは 100mg/kg を各腹腔内投与し、セレコキシブは 200mg/kg を経口投与したもの、サリドマイドは 75mg/kg を腹腔内投与とする。同一の薬剤について少なくとも 3 回以上実験を繰り返してその結果を総括して Nano eruption を誘発する条件、抑制する条件などを検討する。

これにより、Nano eruption を制御し、高分子ナノ DDS を効率よく腫瘍深部まで送達する理論を構築する。本研究で明らかにした亢進因子と抑制因子を用いて、担癌マウスを DDS 単独治療群、DDS 治療誘発因子併用群、DDS 治療抑制因子併用群、DDS 治療 2 剤併用群、未治療抑制因子単独群などに分け、構築した理論通り治療効果が得られるかどうか病態の進行との因果関係を検証する。

#### 4. 研究成果

TGF- $\beta$  阻害薬またはクロロキンの投与によって Nano-eruption の発生が変化する前提として、TGF- $\beta$  阻害薬やクロロキンの投与によって腫瘍の血管構成比が TGF- $\beta$  阻害薬またはクロロキンの投与によって影響を受けるかどうかを評価した。指標として、血管径ごとの腫瘍血管の面積比 (Tumor vessel area) を用い、tumor vessel area はナノメディシン投与直後の生体内蛍光画像によって測定した。すべての腫瘍血管を細い (20 マイクロメートル未満)、中間 (20-40 マイクロメートル)、太い (40 マイクロメートルより太い) 血管径ごとに分けた。面積比は、各腫瘍血管面積をすべての腫瘍血管面積で割ることによって決定した。70 ナノメートルナノメディシンのみ投与したコントロール群と 70 ナノメートルナノメディシンと TGF- $\beta$  阻害薬を投与した群との間で腫瘍血管面積に有意差は認めなかった ( $p > 0.05$ )。70 ナノメートルナノメディシンとクロロキンを投与した群は、コントロールと比較してより厚い腫瘍血管領域の有意な増加を示した ( $p < 0.01$ )。Tumor vessel area は、クロロキンを併用することにより変化することが明らかになった。

セレコキシブの投与によって Nano-eruption の発生に変化を認めるか実験を行ったところ、測定した Nano-eruption の頻度、最大 Nano-eruption 面積、最大 Nano-eruption 半径増大量、Nano-eruption の持続時間、各 Nano-eruption の最も近い腫瘍細胞までの距離、最大 Nano-eruption の発生時間と Nano-eruption 発生部位の血管径で有意な変化を認めなかった。

研究結果をまとめ以下の論文を成果として報告することができた。(Inoue, et al. Journal of Controlled Release 2021)

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Yuta, Matsumoto Yu, Toh Kazuko, Miyano Kazuki, Cabral Horacio, Igarashi Kazunori, Iwasaki Shinichi, Kataoka Kazunori, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 329
2. 論文標題 Manipulating dynamic tumor vessel permeability to enhance polymeric micelle accumulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 63 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.11.063	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 該当する

1. 著者名 野内 舞, 木下 淳, 井上 雄太, 西村 信一, 奥野 妙子	4. 巻 32
2. 論文標題 アブミ骨周囲に硬化病変を生じた顔面神経減荷術後症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 222-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11289/otoljpn.32.222	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------