

機関番号：32676

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2010

課題番号：20790146

研究課題名（和文） 昇圧療法による抗がん薬封入リポソーム製剤の腫瘍内送達

研究課題名（英文） Angiotensin II-induced hypertension enhanced delivery of liposomal anti-cancer drugs into tumor

研究代表者

服部 喜之 (HATTORI YOSHIYUKI)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90350222

研究成果の概要（和文）：本研究ではアンギオテンシン II (ATII)を用いて昇圧し、一過的に腫瘍内の血流を増加させることにより、抗がん薬封入リポソーム製剤の腫瘍組織への集積性を高め、高い治療効果を得ることが出来るか検討した。腫瘍内血流量が多いマウス大腸がん Colon26、あるいは腫瘍内流量が低いマウス肺がん Lewis lung cancer (LLC)担がんマウスに、ドキシソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム製剤(DXR-SL)を尾静脈内投与した。その後、AT II を点滴投与し、最高血圧を 150 mmHg で 25 分間維持した。投与 24 時間後に DXR の腫瘍集積量を HPLC により定量したところ、AT II の昇圧の有無に関わらず、DXR の腫瘍集積量に有意な差は観察されなかった。しかしながら、蛍光標識リポソームと DXR の局在を蛍光顕微鏡で観察したところ、昇圧群においては血管から離れた部位に蛍光標識リポソームと DXR が観察されたのに対し、非昇圧群では血管周辺に観察された。さらに DXR-SL 投与後に昇圧した群では、Colon 26、LLC どちらの担がんマウスにおいても非昇圧群よりも高い抗腫瘍効果を示した。以上の結果から、AT II による昇圧下で投与されたリポソーム製剤は、腫瘍の血流量の違いに関わらず、腫瘍深部に抗がん薬を送達させることで高い抗腫瘍効果を誘導できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether the therapeutic efficacy of liposomal doxorubicin (DXR-SL) could be enhanced by angiotensin II (AT)-induced hypertension. AT-induced hypertension increased the volume of tumor blood flow in mice bearing a poorly vascularized Lewis lung carcinoma (LLC) tumor, but only slightly in mice bearing a well-vascularized colon carcinoma Colon 26 tumor. In therapeutic efficacy, AT-induced hypertension enhanced the antitumor activity of DXR-SL in mice bearing LLC and Colon 26 tumors. Localization of DXR-SL after injection by AT-induced hypertension was observed outside tumor blood vessels in LLC and Colon 26 tumors, but within them under the normotension. From these findings, AT-induced hypertension had potential to improve the delivery of DXR-SL to both well- and poorly vascularized solid tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、昇圧化学療法、リポソーム、アンギオテンシン II、がん治療

1. 研究開始当初の背景

抗がん薬を封入したリポソームなどのナノ粒子製剤は、抗がん薬をがん組織に高効率に送達させると同時に正常組織への移行性を少なくすることができる。がん組織の新生血管は壁細胞を欠損した内皮細胞からなる不完全な血管構造であることが知られており、粒子径約 200 nm 程度までの高分子は腫瘍血管外に漏出できる。そのため、正常血管では血管外に漏出できない約 100-200 nm の粒子径のリポソーム製剤を投与すると、リポソーム製剤は腫瘍血管から漏出して腫瘍組織に集積する (Enhanced permeability retention 効果)。しかしながら、リポソーム製剤を用いた抗がん薬送達による治療効果は、副作用を軽減できるものの、期待された以上の奏効率は得られていない。

2. 研究の目的

昇圧化学療法は、アンジオテンシン II (AT II) 投与による一過的な昇圧下で静脈内に抗がん剤を投与することにより、短時間で腫瘍内へ抗がん薬を蓄積させる方法である。AT II による昇圧は、体循環の血圧を上昇させるが、正常組織 (脳や骨髄など) の血流量は変化させない。一方、腫瘍血管は未成熟な新生血管が多いため、AT II により上昇した血圧により腫瘍内への血流量を増加させることが出来る。しかし、AT II による昇圧化学療法は、抗がん薬の奏効率を有意に高めるが、延命率には影響を与えないと報告されている。抗がん薬単独投与の場合、全身に抗がん薬が分布するため腫瘍内薬物濃度は低く、昇圧化学療法により腫瘍内血流量が増加しても、有効濃度にまで抗がん薬濃度を到達させることが困難であったことが原因ではないかと考えられた。そのため、抗がん薬封入リポソーム製剤を昇圧化学療法に用いることで、正常組織への薬物移行を抑制し、腫瘍内薬物濃度を上昇させることが出来れば、従来の治療法よりも高い治療効果が得られることが予測できた。しかしながら、これまでリポソーム製剤を用いた昇圧化学療法の報告はなかった。

本研究では、抗がん薬封入リポソーム製剤を投与後、AT II による一過的な昇圧による腫瘍内への一過的な血流量増加により、リポソーム製剤が効率的に腫瘍組織内へ移行し、高い抗腫瘍効果が得られるか評価を行った。

3. 研究の方法

(1) リポソーム製剤の調製

ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソーム製剤は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール、PEG₂₀₀₀-DSPE (40/16/12.5 (mg/mg/mg) = 55/45/5 (モル比))の組成で薄膜法により調製した。ローダミン標識 PEG 修飾リポソーム製剤の調製においては、上記の組成にローダミン-DHPE を 1 mol% 添加して調製した。ドキシソルピシン(DXR)のリポソーム内への封入は、300 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) を用いた pH 勾配法にて行った。未封入の DXR は、生理食塩液を移動相としたゲルろ過クロマトグラフィー (SephadexTM G-50 Fine) により除去し、ドキシソルピシン封入 PEG 修飾リポソーム製剤(DXR-SL)を調製した。

(2) 担がんマウスの作製

雌性 CDF1 マウス(5 週齢)、雌性 C57BL/6Cr マウス (5 週齢) は SPF 環境下において飼育した。マウス大腸がん Colon 26 担がんマウスは、Colon 26 細胞を PBS に懸濁させ CDF1 マウスの皮下に、またマウス肺癌 Lewis lung cancer (LLC)担がんマウスは LLC 細胞を PBS に懸濁させ C57BL/6Cr マウスの皮下に移植して作製した。

(3) AT II の投与後の血圧測定

雌性 ddY 系マウス (6 週齢) を SPF 環境下で飼育した。マウスを 1.5% イソフルランで麻酔し、尾静脈から 27G の翼状針を用いて AT II (投与量 2 µg/kg/min) を 30 分間持続点滴注入した。血圧は、非観血式方法である Tail-cuff 法にて経時的に測定した。

(4) AT II による腫瘍内血流量の変化

Colon 26 あるいは LLC 担がんマウスの尾静脈内から AT II の点滴投与により昇圧後、Hoechst 33342 を 5 mg/kg で尾静脈内投与し、1 分後に腫瘍を摘出した。その後、マイクロトームを用いて 20 µm の腫瘍凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により Hoechst 33342 の蛍光を観察した。

(5) DXR-SL 投与 24 時間後の腫瘍集積性の評価

DXR-SL を担がんマウスに尾静脈内投与した。昇圧群においては DXR-SL 投与直後に AT II により 25 分間昇圧した。DXR-SL 投与 24 時間後に麻酔下で下大静脈より採血し、その

後、肝臓、脾臓、腎臓、肺、心臓、がんを摘出した。各組織からの DXR の抽出のために、アンモニア緩衝液 (0.1 M $\text{NH}_3\text{Cl}/\text{NH}_3$ 緩衝液 pH 9.0) と内標準物質であるダウノルビシンを添加し、ホモジナイズを行った。その後 CHCl_3 /メタノール溶液 (2/1(v/v)) を各臓器のホモジネート液に添加し、30 分間振とう後、15,000 rpm で 10 分間、遠心分離した。有機層を採取し、 N_2 ガス存在下 60°C で乾燥させた。乾燥後メタノールを加え溶解し、HPLC により DXR 濃度測定を行った。HPLC は、0.1 M Ammonium formate (pH 4.0) /アセトニトリル (7/3) を移動相として C18 カラムを用いて DXR を分離し、蛍光検出器 (Ex 482、Em 550) で DXR を検出した。

(6) DXR-SL 投与 24 時間後の DXR とりポソームの腫瘍内分布

DXR-SL あるいはローダミン標識 PEG 修飾リポソーム製剤を担がんマウスに尾静脈内投与した。その後、昇圧群においては AT II により 25 分間昇圧した。投与 24 時間後に Hoechst 33342 を 5 mg/kg でマウス尾静脈内投与し、1 分後に腫瘍を摘出した。マイクロトームを用いて $20\ \mu\text{m}$ の腫瘍凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により DXR とローダミン標識リポソーム、Hoechst 33342 (血管) の局在を観察した。

(7) DXR-SL を用いた昇圧化学療法

Colon 26、LLC 担がんマウスの腫瘍体積が $100\ \text{mm}^3$ になった際に、生理食塩水、DXR、DXR-SL を投与し、昇圧群においては DXR-SL 投与直後に AT II による昇圧を 25 分間行った。DXR は 5 mg/kg で投与し、経時的に腫瘍体積を測定した。

4. 研究成果

AT II の点滴による尾静脈内投与後の血圧の変化を麻酔下で調べた。SBP (systolic blood pressure : 最高血圧)、MBP (mean blood pressure : 平均血圧)、DBP (diastolic blood pressure : 最低血圧) を経時的に測定したところ、AT II の投与 5 分後に SBP は 77 mmHg、MBP は 49 mmHg、DBP は 35 mmHg 増加し、血圧の上昇率は SBP で約 199%、MBP で 204%、DBP で 206% となった (図 1)。AT II 投与 30 分後の血圧は AT II 投与 5 分後の血圧とほぼ同じ血圧値を示した。このことから、AT II の 30 分間の持続投与により昇圧状態が維持されていることが確認された。

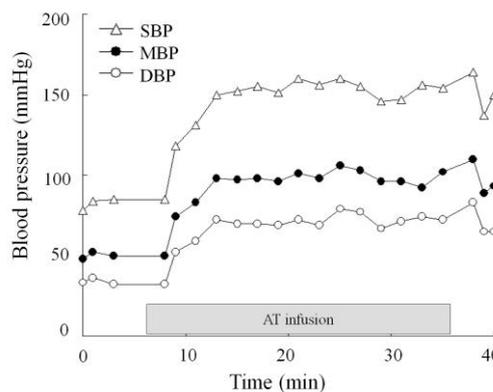


図 1 AT II 投与によるマウスの血圧変化

次に、AT II による昇圧時における腫瘍内血流量の変化を調べた。担がんマウスは、腫瘍内血流量が多い Colon 26 腫瘍と腫瘍内血流量が少ない LLC 腫瘍を用い、AT II による昇圧下で血管を染色する Hoechst 33342 を投与した。その結果、Colon 26 腫瘍ならびに LLC 腫瘍どちらにおいても血流を示す蛍光が AT II の昇圧により増加することが判った (図 2)。特に、AT II の昇圧により、腫瘍内血流量が少ない LLC 腫瘍において高い血流の改善が観察された (図 2D)。

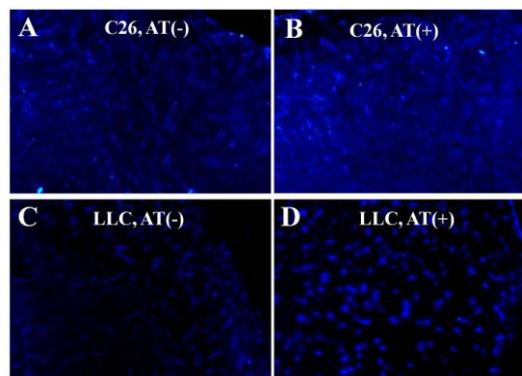


図 2 AT II 投与による腫瘍内血流量の変化
AT(-), 非昇圧下; AT(+), 昇圧下

通常、低分子抗がん薬を用いた昇圧化学療法においては、抗がん薬の血中半減期が短いため AT II による昇圧下で抗がん薬の投与を行うが、DXR-SL は血中半減期が長いので DXR-SL 投与後に昇圧を開始した。まず、DXR-SL の腫瘍内局在を評価するために、DXR-SL 投与 24 時間後の腫瘍切片を作成し、蛍光顕微鏡にて DXR の蛍光を観察した (図 3)。昇圧群と非昇圧群で DXR-SL 投与後の DXR の腫瘍内局在を比較すると、Colon 26、LLC 担がんマウスどちらにおいても昇圧群では、Hoechst 33342 により染色される血管 (青

色) から離れた領域においても DXR の蛍光 (赤色) が検出されたのに対し(図 3B, D)、非昇圧群では血管周辺に DXR の蛍光が観察された(図 3A, C)。また同様に、蛍光標識リポソーム製剤を投与したところ、昇圧群では血管から離れた領域においてリポソームの局在を示す蛍光 (赤色) が観察されたのに対し(図 4B, D)、非昇圧群では血管周辺でリポソームの局在が観察された (図 4A, C)。この結果より、リポソーム製剤投与後の昇圧により、腫瘍深部に DXR-SL が到達されたものと考えられた。

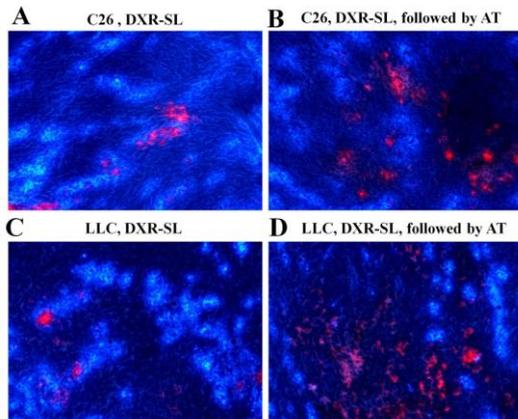


図3 DXR-SL 投与後の AT II の昇圧による腫瘍内 DXR の分布の変化

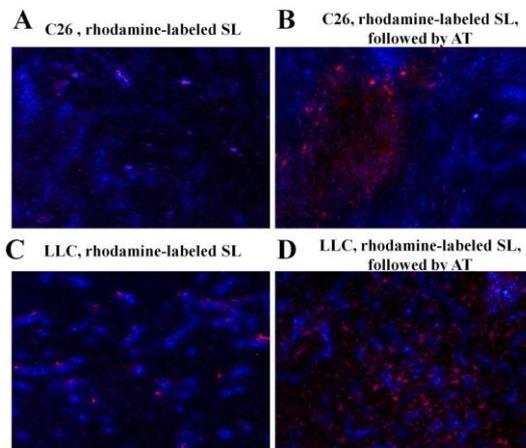


図4 ローダミン標識リポソーム投与後の AT II の昇圧による腫瘍内リポソームの分布の変化

担がんマウスにおける DXR の生体内分布を調べるため、DXR-SL 投与 24 時間後に各臓器を摘出し、HPLC にて DXR 量を定量した。DXR-SL 投与後の昇圧により Colon 26 ならびに LLC 担がんマウスどちらも腫瘍内 DXR 集積量は増加しなかった(図 5A, B)。正常組織においても昇圧による DXR の集積量の変化は観察されなかった。

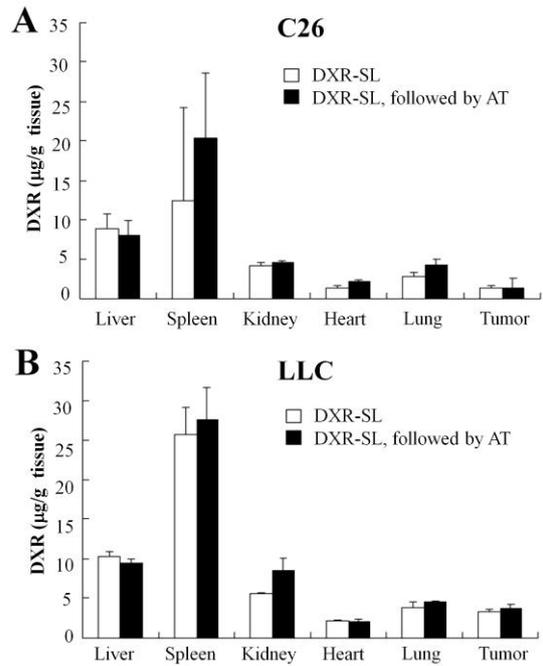


図5 DXR-SL 投与 24 時間後の Colon 26 担がんマウス(A)、LLC 担がんマウス (B)における DXR の生体内分布

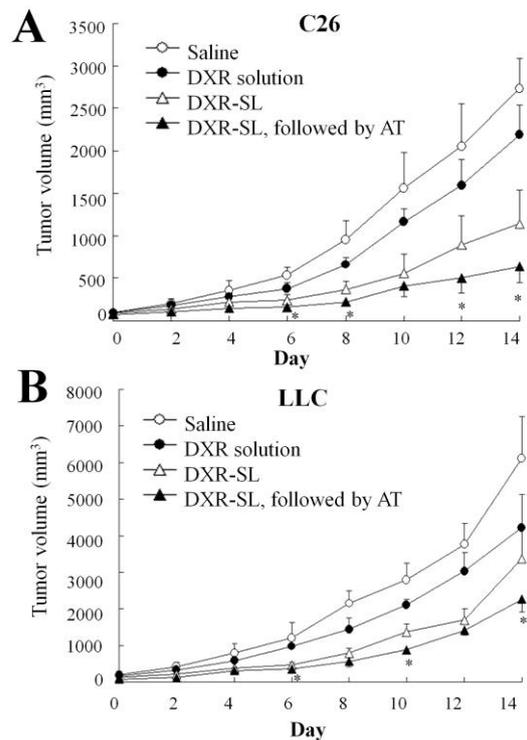


図6 Colon 26 担がんマウス(A)、LLC 担がんマウス(B)における DXR-SL 投与後の AT II の昇圧による抗腫瘍効果

最後に Colon 26、LLC 担がんマウスの DXR-SL による抗腫瘍効果を昇圧群と非昇圧

群で比較した。どちらの担がんマウスにおいても、DXR-SL 投与後の昇圧群は、生理食塩水投与群、非昇圧下での DXR 溶液、DXR-SL 投与群と比べ高い抗腫瘍効果を示した (図 6A,B)。以上の結果より、DXR-SL を用いた昇圧化学療法は腫瘍への薬物集積量は増加させないが、腫瘍深部に薬物を送達することにより、高い抗腫瘍効果を示すのと考えられた。

本研究当初は、抗がん薬の放出性が高い PEG 修飾のない DXR 封入リポソーム製剤 (DXR-L) を調製し、AT II による一過的な腫瘍内血流量増加により、短時間で腫瘍内へ DXR を蓄積させるシステムの開発を目指した。昇圧下で DXR-L を投与したところ、非昇圧のものと比較し高い DXR の腫瘍集積性ならびに抗腫瘍効果を示したが、いずれも非昇圧下で投与した PEG 修飾したリポソーム製剤である DXR-SL よりも低い抗腫瘍効果であった (データ未公表)。そのため本研究では、PEG 修飾した DXR-SL を昇圧化学療法に用いた。

本研究結果より、AT II による昇圧化学療法は、リポソームなどの薬物送達担体と併用することにより、高濃度の薬物を腫瘍内に広く送達させることができるものと考えられた。抗がん薬封入リポソーム製剤を用いた昇圧化学療法の報告は、本研究が初めてである (発表論文 1)。DXR 封入リポソーム製剤である Doxil® (ドキシソルビシン内包 PEG 化リポソーム製剤) が市販されており、昇圧化学療法に用いられている AT II 製剤のデリバート® との併用療法は、有用ながん治療方法になるものと期待できる。現在、遺伝子送達用ベクターである正電荷リポソーム製剤を用いたプラスミド DNA の腫瘍への送達に昇圧療法を用いることにより、静脈内投与後の腫瘍への遺伝子送達効率が向上できるかについても検討している。

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 1 件)

1. Y. Hattori, H. Ubukata, K. Kawano, Y. Maitani, Angiotensin II-induced hypertension enhanced therapeutic efficacy of liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice, *Int J Pharm.* 403: 178-184 (2011). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 田中拓海, 服部喜之, 米谷芳枝, アンギオテンシン II 昇圧下におけるリポプレックスの腫瘍内分布, 日本薬学会 第 131 年会, 2011 年 3 月 28-31 日, 静岡

2. 田中拓海, 服部喜之, 米谷芳枝, アンギオテンシン II 昇圧下における正電荷リポソームのがん遺伝子送達, 第 26 回日本 DDS 学会, 2010 年 6 月 17-18 日, 大阪

3. 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝, アンギオテンシン II による昇圧下でのリポソーム製剤の腫瘍集積性の検討, 日本薬学会 第 130 年会, 2010 年 3 月 28-30 日, 岡山

4. 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝, アンギオテンシン II を用いた昇圧療法によるドキシソルビシン封入リポソーム製剤の担がんマウスの体内分布の評価, 第 25 回日本 DDS 学会, 2009 年 7 月 3-4 日, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/souzai/index1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 喜之 (HATTORI YOSHIYUKI)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90350222