

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20890018  
 研究課題名（和文） 低血管透過性腫瘍における透過性亢進剤を用いたナノドラッグデリバリーシステムの解明  
 研究課題名（英文） Analysis of nano-drug delivery system in tumor with low vascular permeability with permeability-enhancing agents.  
 研究代表者  
 河合 賢朗 （ KAWAI MASAOKI ）  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：80513530

研究成果の概要（和文）：生体内1粒子可視化技術を用い新生血管特異的 DDS 実現において EPR 効果を利用する粒子径を検討し腫瘍間質、血管近傍と細胞間では粒径によって動態が異なることを解明した。VEGF-Qdot の作製並びに VEGFR 発現細胞に対する結合作用を検討し VEGF-Qdot は Qdot 単独、PDGF-Qdot に対し高い蛍光強度を得ることを確認した。マウス肢虚血モデルを作成しレーザードップラー装置にて血流低下を確認した。

研究成果の概要（英文）：We clarified appropriate sizes of nanoparticles to use enhanced permeability and retention effects by the single molecular imaging method *in vivo*. The dynamics of the particles depends on the place in the tumor. We made vascular endothelial growth factor (VEGF) - quantum dot (Qdot) complex. VEGF-Qdot complex attaches vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) expressing tumor cell *in vitro* higher than platelet-derived growth factor (PDGF)-Qdot and Qdot only. We confirmed reduced blood flow of the mouse ischemic limb model we made by the laser Doppler apparatus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度		0	0
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：DDS, 新生血管, EPR 効果, 量子ドット, 血管内皮細胞増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における乳癌罹患数は増加の一途にあり、現在年間 40,671 人が罹患し、10,721 人が死亡している。また、罹患率、死亡率も共に増加し、罹患率は 40 歳台において最も高く、死亡率は 30 歳代から 60 歳代において他の癌種と比較して最も高率であり、日本社

会の基盤を担う重要な位置を占める女性を襲う疾患であるといえる。乳癌死亡率の減少へ向けた施策は人口減少、労働力減少社会における速効性が期待される有効な一手となると考えられる。

乳癌死亡率減少において科学的根拠を持つのは、現在のところ、50 歳以上におけるマン

モグラフィ検診と、薬物療法のみである。なかでも薬物療法は乳癌と診断された患者の80%以上に行われるため、死亡率減少へ向けたアプローチとしての効率は高いものと思われる。現代の乳癌薬物治療においては、化学療法、内分泌療法、分子標的治療があり、これらの組み合わせによって治療効果の向上が認められているが、依然として死亡率減少には至っていない。

この原因は従来の薬物療法は生体に対する副作用が少なからずあり、これが薬物療法のコンプライアンスの大きな低下、すなわち、薬剤作用低下、治療効果の減少の原因となっていることが考えられる。それゆえ、正常組織に対する作用(=副作用)を減らし、がん組織に対する作用(=効果)を増大させ、コンプライアンスの増加を実現する、腫瘍選択性の高い新規薬剤の研究開発に向けたアプローチが重要である。

また、がんの種類によって、腫瘍内薬剤の分布、浸透度が異なり、薬物に対する応答性が異なることが知られている。「がん組織の個性に応じた腫瘍選択性の高い薬物治療」の実現の為に、がん組織に生じる新生血管の特徴を利用した薬剤の開発がある。このような新生血管は、通常血管に比較して大きな血管孔をもち、既存の薬剤より大型の分子を選択的に通過させるという、がん特有の個性を持つものである。したがって、通常の薬剤よりも薬剤を大型化することで腫瘍特異性を持つようになり、正常組織には集積せず副作用の少ない治療薬となりうる。しかしながら、癌種によっては薬剤透過性の低いものも存在し、前述のアプローチでは選択性を持たせることができず、治療には従来既存の小分子薬剤を使用するにとどまることになる。このような腫瘍は血管透過性を直接向上させることで薬剤の分布、浸透度を拡大させることができると考えられる。この作用を持つ物質の一つとして TGF-beta (Transforming Growth Factor beta) 阻害剤がある。TGF-beta 阻害剤を腫瘍に作用させることで、血管壁細胞の減少が認められ、腫瘍におけるナノ粒子の蓄積増加が認められる。また、TGF-beta 阻害剤は腫瘍新生血管特異的に作用して透過性を亢進し、正常血管における作用はほぼ示さないという優れた選択性を持つ(Proc Natl Acad Sci 2007)。

更に、腫瘍間質に漏出した蛍光ナノ粒子は、粒子の径に応じて間質組織に滞留する時間が長くなり、その時間が計算可能であることを明らかにした(第66回日本癌学会, 2007)。腫瘍間質に長時間停滞することは、薬剤作用における重要な因子であり、そのため、腫瘍に対して最適な大きさをもった薬剤分子を作成することが重要である。大きさの調節は、アルブミンや抗体等のタンパクを付加する

こと等で可能になると考えられる。このようなタンパクとして、がん細胞に対する特異的抗体を用いた分子標的療法のなかで、乳がんに対する抗腫瘍抗体 Trastuzumab がある。本抗体は乳癌治療に大きな成果を上げている治療薬である。我々は、この抗腫瘍抗体 Trastuzumab に蛍光ナノ粒子を結合し、マウスのがん組織に浸透することを確かめ、独自に開発した高速2次元イメージング装置で細胞に結合した量子ドットをイメージングした(Cancer Research 2007)。Higuchi らが開発した蛍光色素による一分子イメージング法(Proc Natl Acad Sci 2004, EMBO J, 2003; Nature Struct Mol boil 2005; Nature, 2003)を改良し、抗体-量子ドットを細胞内で高速かつ三次元的に可視化する装置を開発し、がん細胞内の3次元的な挙動の可視化に成功した(Biochem Biophys Res Com, 2007)。また抗体-量子ドットが細胞膜から核付近に輸送される過程を一分子レベルで可視化した(Cancer Research, 2007)。またこの抗体を結合した蛍光ナノ粒子は通常のナノ粒子と比較しても粒子が大きく、粒径の調節材料としての使用、標的治療としての表面修飾としての応用が考えられる。

## 2. 研究の目的

薬剤の大きさと TGF-beta による透過性との関連の定量化、並びにこの新知見を用いた、従来の抗がん剤では治療困難であった癌種へのナノテクノロジーの応用による新規治療の開発への応用、がん治療の進歩を目指す。

この新知見を基盤として、将来腫瘍の個性に応じた薬剤の開発、治療困難であった腫瘍への薬剤治療へ応用の道が開けるものと期待される。

## 3. 研究の方法

本研究においては

1. 市販される粒子径の異なるナノ粒子を用いた、様々な癌種における透過性の生体内観察、透過性の検討、血管透過性別に分けた腫瘍の選定
2. 腫瘍における TGF-beta 阻害剤の血管透過性増強作用の、蛍光蛋白、抗体等の大分子を用いた静的、または生体内実験系による定量化
3. 腫瘍における TGF-beta 阻害剤の血管透過性増強作用の、抗体を付加して粒径を変化させたナノ粒子を用いた静的、または生体内実験系による定量化

を行う。

## 4. 研究成果

蛍光ナノ粒子を1粒子レベルで生体内を観

察する技術を利用し、新生血管に特異的な DDS を実現するにあたり enhanced permeability and retention (EPR) 効果を利用しうる粒子の大きさを一分子レベルで検討し、腫瘍間質、血管近傍と細胞間とは粒径によって動態が大きく異なることが分かった (Breast Cancer Res, 2009)。血管透過性において血管新生因子の関与が考えられる。この動態観察のため、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, 血管内皮細胞増殖因子)—Qdot 705 (Quantum Dot, 量子ドット) 複合体の作製並びに VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, 血管内皮細胞増殖因子受容体) 発現マウス脾臓細胞 CRL-2460 : MS1 VEGF に対する結合作用の検討を主として行った。新生血管のイメージングを可能にするプローブ作成をおこなった。VEGF、PDGF をビオチン化し、アビジン化 Qdot と反応させることで VEGF-Qdot 複合体、PDGF-Qdot 複合体を作製した。第二に CRL-2460 : MS1 VEGF と MS1 の結合実験を行った。In vitro における結合性の実験結果にて、CRL-2460 : MS1 VEGF に VEGF-Qdot 複合体を反応させた群では、Qdot を単独で反応させた群に対して 6.3 倍、PDGF-Qdot を単独で反応させた群に対して 3.4 倍の総蛍光強度を得ることが確認された。MS1 に対しては各群間に差を認めなかった。また、虚血型モデルの確立としてマウス片側後肢虚血モデルを作成し、レーザードップラー還流イメージング装置を用いて血流が低下している事を確認した。

#### 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. Kawai M, Higuchi H, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N. Dynamics of different sized solid state nanocrystals as tracers for a drug delivery system in the interstitium of a human tumor xenograft. Breast Cancer Research, 有, 2009, R43.

[学会発表] (計 12 件)

1. 河合賢朗. 粒径の異なるナノ粒子による腫瘍間質ドラッグデリバリーシステムの解析. 第 18 回乳癌基礎研究会, 2008/07/15, 福島.
2. Kawai M. Interstitial Nano-particle Tracking and Analysis of the Movements in the Human Tumor Xenografts in Mice. The 26th Congress of the

International Association for Breast Cancer Research, 2008/09/24, 岡山県倉敷市.

3. 河合賢朗. 蛍光ナノ粒子による腫瘍間質ドラッグデリバリーシステムの生体内一分子イメージング, 第 16 回 日本乳癌学会総会, 2008/09/27, 大阪.
4. Gonda K, Kawai M. Imaging of cancer metastasis in living tumor with quantum dot. The 7th International Symposium on Nano-Biomedical Engineering, 2008/10/24, National Cheng Kung University, Tainan.
5. 武田元博, 河合賢朗. 機能性ナノ粒子による生体イメージングの臨床検査・外科への応用. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、シンポジウム 10 : 医学領域におけるナノ粒子展開をめぐる話題「機能性ナノ粒子による生体イメージングの臨床検査への応用」, 2008/11/27, 名古屋.
6. Takeda M, Kawai M. Bio-imaging by functional nano-particles of nano to macro scale. The 13th International Conferencenon Biomedical Engineering, 2008/12/04, National University of Singapore, Singapore.
7. Kawai M. The feature of the interstitial nano drug delivery system with fluorescent nanocrystals of different sizes in the human tumor xenograft in mice. The 13th International Conferencenon Biomedical Engineering, 2008/12/04, National University of Singapore, Singapore.
8. Takeda M, Kawai M. Bioimaging and dynamics of functional nano-particles. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-, 2009/02/04, Okazaki, Japan.
9. Hikage M, Kawai M. Basic examination of the fluorescent endoscopic surgery using nanoparticle tracer. The 2nd International Symposium on Nanomedicine, Asian Core Symposium-Nano and Biomedical Molecular Science-, 2009/02/04, Okazaki, Japan.
10. Ohuchi N, Kawai M. Novel bio-imaging by functional nano-particle. 9th International Symposium of Tohoku University Global COE Program, 2009/03/24, Sendai, Japan.
11. 日景允, 河合賢朗. ナノ粒子をトレーサーとした鏡視下手術の基礎的検討. ナノ学会第 7 回大会, 2009/05/10, 東京大学

- 本郷キャンパス(浅野地区) 武田ホール.
12. 権田幸祐、河合賢朗. 分子イメージング  
In vivoナノイメージングで解き明かす  
がん転移とDDSの仕組み. 第25回日本  
DDS学会学術集会,  
2009/07/03-2009/07/04, 東京ドームホ  
テル.

〔図書〕(計 2件)

1. 河合賢朗. 外科治療. 外科医に必要なが  
ん化学療法の知識B. がん化学療法の実際  
7. 乳癌 「乳癌の集学的治療と化学療  
法」, 2008, 241-249.
2. 武田元博、河合賢朗. 臨床病理. 医学領  
域におけるナノ粒子展開をめぐる話題  
機能性ナノ粒子による生体イメージング  
の臨床検査への応用, 2008, 60.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 賢朗 (KAWAI MASAOKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80513530