様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　６ 月 ２１ 日現在

機関番号：２０１０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｈ０３６６４

研究課題名（和文）膵臓癌に対する抗がん剤の腫瘍指向性を持つ新規DDSの開発

研究課題名（英文）Development of a Novel DDS with Tumor-Directed Anticancer Drugs for Pancreatic Cancer

研究代表者
加藤　淳二（Kato, Junji）
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：２０２４４３４５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,600,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌組織指向性の抗がん剤を得るために、FDG-PET検査に用いるFDGをリポソームに結合した抗がん剤を作製した（FDG結合リポソーム内包ゲムシタビンおよびFDG結合リポソーム内包パクリタキセル）。実臨床で膵癌に標準治療として用いられているゲムシタビン、ナブパクリタキセル併用療法をFDG結合リポソーム内包抗がん剤で再現した多剤併用療法の治療戦略について研究を行った。FDG結合リポソーム内包蛍光試薬や抗癌剤のin vivoでの集積、治療効果は、FDG結合リポソーム内包抗がん剤による治療戦略が膵癌に対しても有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
FDG結合リポソーム内包抗がん剤による治療戦略が膵癌に対しても有効である可能性が示唆され、特に、既報よりも40倍少ない用量での投与でも治療効果が得られたことから、FDG結合リポソーム内包ゲムシタビンの治療効果は良好であり、FDG未結合のリポソーム内包ゲムシタビンよりも治療効果は良好な傾向があったことからFDGを結合させることの上乗せ効果が示唆された。予後の極めて悪い膵癌に対する有効な治療戦略である可能性が示され、実用化が可能であれば今後膵癌の治療成績が向上が期待され大きな社会的意義が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In order to obtain pancreatic cancer tissue-directed anticancer agents, liposome-conjugated FDG for use in FDG-PET testing was prepared. We studied the therapeutic strategy of the combination of gemcitabine and nab-paclitaxel, which is used as standard therapy for pancreatic cancer in clinical practice, by replicating the combination therapy with FDG-conjugated liposome-encapsulated anticancer agents. The in vivo accumulation and therapeutic effects of FDG-conjugated liposome-incorporated fluorescent reagents and anticancer agents suggested that the therapeutic strategy using FDG-conjugated liposome-incorporated anticancer agents may be effective for pancreatic cancer.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：膵癌　ドラッグデリバリーシステム

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様 式 C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

2018 年のがん統計予測では、膵癌の罹患数は 4 万人にものぼるとされていた。さらに膵癌の死亡数も増加の一途にあり、年間死亡者数は約 3 万 5 千人であった（癌死亡数 第 4 位）。膵癌は切除不能の状態で発見されることが多く、進行膵癌に対しては、主に抗がん剤を用いた化学療法が標準治療として行われる。進行膵癌に対する標準治療（抗がん剤の併用療法）の生存期間中央値は約 8～11 ヶ月であり、かつての標準治療薬であるゲムシタビン単剤療法が 6 か月程度であることを考えると、一定の効果は得られているが、まだ十分とはいえず、より有効な新規治療戦略の開発が必要である。申請者らは, 抗がん剤内包リポソームの開発の実績があり、膵癌に対して in vivo、in vitro で治療効果の得られる抗がん剤内包リポソームの有用性を報告した（Kato J, PLoS ONE 2012)。さらに、申請者らはこれまでに抗がん剤内包リポソームに単糖であるフコースを結合させ、大腸癌細胞に有望な治療効果を in vivo、in vitro で示した (Kato J, J Natl Cancer Inst 2016)。ところで、^{18}F-FDG-PET 検査は、膵癌組織に取り込まれた ^{18}F-FDG を検出する核医学検査であり、膵癌の 85.5%に陽性であると報告されている。これまで申請者らは大腸癌細胞が FDG を細胞内に取り込む特性を、作製した FDG-FITC 試薬を用いて確認した。大腸癌と同様に FDG-PET での集積を認める膵癌でも FDG-FITC が取り込まれる可能性が高いと考えた。本特性と申請者らのリポソームに任意の単糖を結合させる技術を応用しリポソームに FDG を結合させることでがん細胞指向性リポソームを開発した。この FDG 結合リポソームは、これまでの研究で大腸癌細胞に集積する傾向が得られており、やはり同様に FDG-PET で F DG の集積が検出される膵癌細胞においても同様の結果が得られると考えた。これまでリポソームを用いた検討では、単剤を封入したリポソームを用いていた、現在の臨床で膵癌治療に使用されている多剤併用の標準治療である、ゲムシタビン、nab-パクリタキセル療法（GEM+nab-PTX）によるリポソーム封入抗 f 腫瘍薬による治療法の開発を目指した。多剤併用療法を FDG 結合リポソームに封入することで、多くの利点が期待される。第一に、膵癌指向性リポソーム内に抗腫瘍薬を封入するため､高い組織内濃度を実現でき､高い治療効果が期待できるということである。すなわち、リポソーム内包抗がん剤は、粒子径を悪性腫瘍組織の血管内皮細胞間隙サイズ以下かつ、腎糸球体でろ過されないサイズにすることにより、がん組織特異的に集積する Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果が得られることが知られている。さらに、そのリポソームに FDG を結合させることで膵癌組織への抗腫瘍薬の集積、高い治療効果が期待できるということである。第二に、副作用を抑えることができる点である。すなわち、申請者らのこれまで作製したリポソーム内包抗がん剤の粒子径は約 100nm であり、Blood Brain Barrier (BBB) の通過や糸球体濾過を抑えることが可能である。さらに DDS 効果により総投与量も抑えられる可能性が高く、従来の多剤併用療法に見られた重篤な副作用の懸念が解消される可能性が高い。このように数々の利点が期待できる膵癌に対する多剤併用療法を抗がん剤内包 FDG 結合リポソームにて行う治療戦略はこれまでに報告がなく、非常に画期的な研究であると考えた。

２．研究の目的

本研究の目的は、膵癌に対する多剤併用療法（GEM+nab-PTX）内包 FDG 結合リポソームの開発と、その膵癌への特異性及び抗腫瘍効果を in vivo、in vitro において検討し、明らかにすることである。FDG 修飾抗がん剤を用いた新規膵癌治療戦略を確立することで、膵癌治療の治療成績を飛躍的に向上させることをねらいとした。高悪性度で死亡率の極めて高い、社会的損失著しい膵癌治療の成績を向上させることは社会的に非常に意義の大きい研究である。さらに申請者らのこれまでの研究により獲得した FDG 結合リポソームに内包化する技術を利用し、内包薬を多剤併用療法へ発展させ、より高い治療効果を得られる可能性の高い新規膵癌治療戦略に着目した。多剤併用療法を FDG 結合リポソームに内包化する DDS を利用した抗がん剤はこれまでに報告がない。

３．研究の方法

以下の手順で研究を進めた。

(1) 膵癌細胞における FDG 取り込み機構の解明

FDG-FITC の膵癌細胞への導入： 膵癌細胞株に FDG-FITC を添加し、0-24 時間培養し、細胞内への FITC の取り込みを flow cytometer で定量的に検討した。

(2) 膵癌に対する多剤併用療法内包化 FDG 修飾抗がん剤内包リポソームの開発と in vitro での検討

① FDG 修飾蛍光剤、抗がん剤の作製： 蛍光剤および抗がん剤内包 FDG 結合リポソームを作製した。リポソームによる内包化については既報に準じておこなった（Yoshida M、Kato J、PLoS ONE 2012、Osuga T、Kato J、J Natl Cancer Inst 2016)。 内容の抗がん剤は、膵癌の標準治療であるゲムシタビン、nab-パクリタキセル（GEM+nab-PTX 療法）をそれぞれ FDG 結合リポソームに内包化した。

② 蛍光物質内包 FDG 結合リポソームの膵癌細胞への導入： 各種膵癌細胞に FDG 結合リポソーム内包蛍光物質を添加し、0-24 時間培養し、細胞内への蛍光物質の取り込みを flow

cytometer で定量的に検討し、膵癌に FDG 結合リポソームが膵癌細胞株に効率的に取り込まれるか検討した。

(3) 膵癌に対する多剤併用療法内包化 FDG 修飾抗がん剤内包リポソームの in vivo での検討

① 膵癌細胞担癌マウス作製

ヌードマウスに 5×10^6 個の膵癌細胞株を皮下に接種し、担癌マウス（皮下腫瘍モデル）を作製した。

② FDG 修飾蛍光薬の腫瘍送達性の検討：

(3)-① で作製した皮下腫瘍モデルマウスを用いて、FDG 結合リポソーム内包蛍光薬の蛍光薬の腫瘍への送達性を検討した。具体的には、IVIS による in vivo imaging を行い蛍光物質の腫瘍特異性を確認した。

③ FDG 修飾抗がん薬の抗腫瘍効果の検討：

皮下腫瘍モデルを用いて FDG 結合リポソームの抗腫瘍効果を、経時的腫瘍径の変化で検討した。同量のリポソームに内包化していない薬剤を投与したマウス群、未治療群と比較検討した。

４．研究成果

(1) 膵癌細胞における FDG 取り込み機構の解明

① FDG-FITC の膵癌細胞への導入：

膵癌細胞内の FITC の取り込みを flow cytometer で確認したところ、対照としたガラクトース結合 FITC よりも FDG 結合リポソーム内包 FITC で膵癌細胞株への FITC の取り込みの増加は認められなかった。これは、試薬の溶液内での安定性に問題がある可能性が考えられた。FDG-FITC 試薬での検討には限界があると考えられたため、FDG 修飾リポソーム試薬を用いて検討を進めることとした。

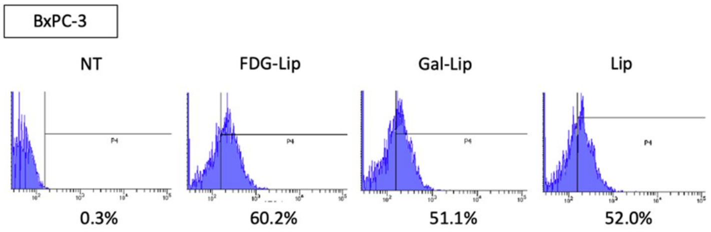
(2) 膵癌に対する多剤併用療法内包化 FDG 修飾抗がん剤内包リポソームの開発と in vitro での検討

① FDG 修飾蛍光剤、抗がん剤の作製：

蛍光剤（FITC, Cy5.5）および抗がん剤(ゲムシタビン、パクリタキセル)内包 FDG 結合リポソームの作製に成功した。複数の薬剤の一括での内包化も検討したが、複数の薬剤の最適な投与濃度比がリポソーム内包抗がん剤の場合不明であるため、個別に内包化したものを混合して投与する方法に変更した。従って、FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビン、FDG 結合リポソーム内包パクリタキセルを作製した。対照として糖未修飾リポソーム内包蛍光試薬・抗がん剤も作製に成功した。

② 蛍光物質内包 FDG 結合リポソームの膵癌細胞への導入：

膵癌細胞株（BxPC3）での検討にて FDG 結合リポソーム内包 FITC （FDG-Lip)は対照としたガラクトース結合リポソーム内包 FITC （Gal-Lip)や糖未修飾リポソーム内包 FITC （Lip)よりも FITC の導入が多い傾向であった（右図)。



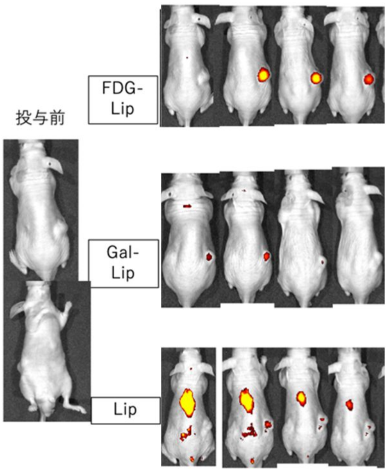
(3) 膵癌に対する多剤併用療法内包化 FDG 修飾抗がん剤内包リポソームの in vivo での検討

① 膵癌細胞担癌マウス作製

ヌードマウスに 5×10^6 個の膵癌細胞株を皮下に接種し、担癌マウス（皮下腫瘍モデル）の作製に成功した。

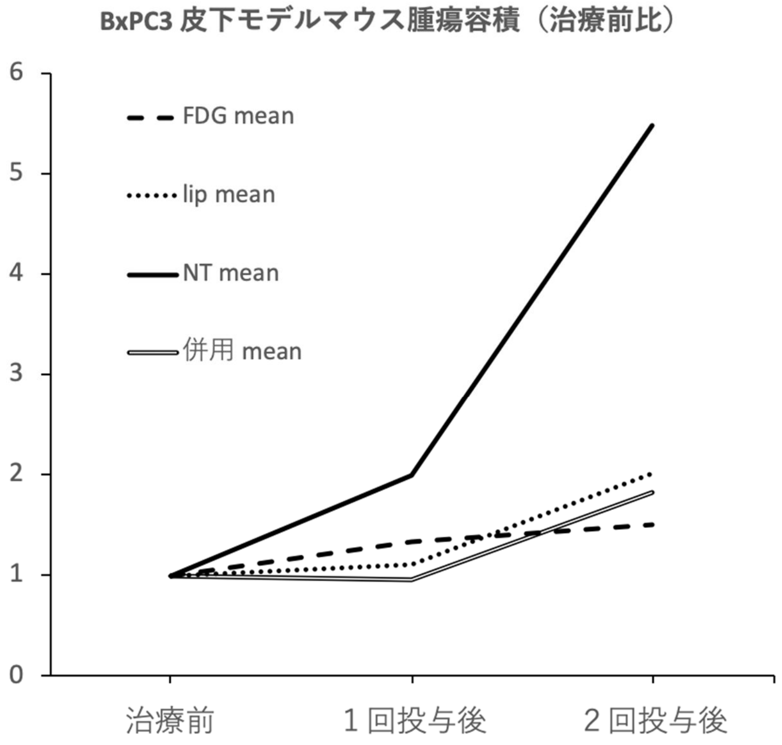
② FDG 修飾蛍光薬の腫瘍送達性の検討：

膵癌皮下腫瘍モデルマウスの腫瘍部に、FDG 結合リポソーム内包 Cy5.5 (FDG-Lip) の集積を認めた。この集積はガラクトース結合リポソーム（Gal-Lip)、糖未修飾リポソーム（Lip）に比較して、より腫瘍特異的であった。この所見により腫瘍特異的に FDG 修飾リポソームが送達されていることが示唆された。(右図)



③ FDG 修飾抗がん薬の抗腫瘍効果の検討：

既報[1]のマウス実験に用いる抗がん剤の 40 分の１の濃度であるゲムシタビン 50μg/回、パクリタキセル 5μg/回の尾静脈注射（週１回投与）にて皮下腫瘍モデルの FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビンによる、経時的腫瘍径の変化を検討した。同量の FDG を結合していないリポソームに内包化したゲムシタビンを投与したマウス群、未治療群と比較検討したところ、FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビンの投与により腫瘍の増大が抑制された。ただし、パクリタキセルとの併用での効果は不明な結果であった。パクリタキセルの含有量が少なく、十分な薬効が得られていない可能性が考えられた。(下図)



FDG…FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビン（50μg/回）
lip…糖末修飾リポソーム内包ゲムシタビン（50μg/回）
NT…リポソームのみ投与
併用…FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビン（50μg/回）と FDG 結合リポソーム内包パクリタキセル（5μg/回）の併用

＜考察＞

FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビンと FDG 結合リポソーム内包パクリタキセルによる膵癌の標準治療に準じた多剤併用療法の治療戦略について研究を行った。FDG 結合リポソーム内包蛍光試薬や抗がん剤（ゲムシタビン）の in vivo での集積、治療効果は、FDG 結合リポソーム内包抗がん剤による治療戦略が膵癌に対しても有効である可能性が示唆された。特に、既報よりも 40 倍少ない用量での投与でも治療効果が得られたことから、FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビンの治療効果は良好であり、FDG 未結合のリポソーム内包ゲムシタビンよりも治療効果は良好な傾向があったことから FDG を結合させることの上乗せ効果が示唆された。その一方で、FDG 結合リポソーム内包パクリタキセル併用による上乗せ効果は証明できなかった。パクリタキセルが既報よりも 40 倍少ない濃度での投与となったことが一因と考えられ、FDG 結合リポソーム内包ゲムシタビン、FDG 結合リポソーム内包パクリタキセルそれぞれの至適濃度については今後の検討課題であると考えられた。

＜結語＞

FDG 結合リポソーム内包抗がん剤による膵癌治療戦略は有効な可能性が示唆された。併用抗がん剤については、今後、至適濃度の設定が必要であると考えられた。

＜参考文献＞

1) Meng H et al. Use of a Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticle Platform for Synergistic Gemcitabine and Paclitaxel Delivery to Human Pancreatic Cancer in Mice. ACS nano:9(4);3540-3557,2015.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔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
研究分担者	大須賀　崇裕 (Osuga Takahiro) (40619714)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	濱口　孝太 (Hamaguchi Kota) (50866613)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	宮西　浩嗣 (Miyanishi Koji) (60372819)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	村瀬　和幸 (Murase Kazuyuki) (90444918)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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