

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249072

研究課題名（和文） 腫瘍・間質の血管新生シグナルを標的としたナノ粒子による革新的  
消化器がん治療戦略研究課題名（英文） A novel treatment strategy for digestive system cancer against  
angiogenic signal in tumor stroma using nanosize particle .

研究代表者

前原 喜彦（MAEHARA YOSHIHIKO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80165662

研究成果の概要（和文）：

ラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子を用いて、増殖活性の高い腫瘍血管内皮細胞を特異的に標的とした新たな治療系の開発を行った。PDGF-AA/ PDGFR $\alpha$ / p70S6K 系を阻害することによって強力に腫瘍血管新生を抑制し、抗腫瘍効果を得ることが可能であった。また、*in vivo* における検討では大腸癌皮下腫瘍モデル、肝転移モデルにおいて統計学的に有意な抗腫瘍効果を認めた。PLGA ナノ粒子を用いて腫瘍の虚血部位に薬剤を到達させ、PDGF-AA/ PDGFR $\alpha$ / p70S6K 系を阻害する治療系は、抗血管新生療法のパラダイムシフトとなる可能性が示唆された。現在、臨床試験を行うために、ナノ粒子製剤の GMP 製造化と安全性試験を計画中である。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel treatment strategy against tumor vascular endothelium using nanosize particle encapsulated rapamycin. Inhibiting the signaling PDGF-AA/ PDGFR  $\alpha$  / p70S6K, the tumor angiogenesis was remarkably restricted, which result in significant antitumor effect. The same observation was recognized *in vivo* analysis of subcutaneous colon tumor model and liver metastatic colon tumor model. These drug delivery system, using PLGA nanosize particle which affect tumor ischemic region suggested that it might be possible to break out the paradigm of anti-angiogenic treatment. To conduct a clinical test, we have a plan to produce nanosize particle based on Good Manufacturing Practice and to perform a clinical safety study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	24,300,000	7,290,000	31,590,000
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：腫瘍血管新生、PLGA ナノ粒子、PDGF $\alpha$ 受容体、ラパマイシン

### 1. 研究開始当初の背景

血管新生は腫瘍の転移・進展に必須であるが、VEGF（血管内皮細胞増殖因子）はその中でも最も重要な因子として知られている。しかしながら、VEGFを標的とした治療は十分な効果を認めていないのが現状であり、新しいコンセプトに基づいた抗血管新生治療の開発が喫緊の課題であった。我々は過去の知見から、腫瘍血管新生における PDGF-AA/PDGFR $\alpha$ /p70S6K 系の重要性に着目しており、これらのシグナルを遮断する事によって、より高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。

別途開発中である生体吸収性ナノ粒子である PLGA ナノ粒子は虚血となっている血管内皮細胞へ選択的に取り込まれる事が知られている。我々は PDGF-AA/PDGFR $\alpha$ /p70S6K の阻害剤であるラパマイシンをナノ粒子に封入する事により、腫瘍間質の虚血化した血管内皮細胞を標的とした新たな DDS システムの構築を目指した。

### 2. 研究の目的

腫瘍血管新生における PDGF-AA/PDGFR $\alpha$ /p70S6K 系の関与について検討を行う。またそのシグナルを遮断する事による抗腫瘍効果について具体的に検討し、その有効性と安全性を検討する。

臨床応用を目指した抗血管新生治療の開発を行うため皮下腫瘍のみではなく、有効な治療法がない消化器癌の肺転移モデル、肝転移モデルを中心に有効性に着眼した解析と検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1)ラパマイシン封入ナノ粒子の製造、安全性の検討：

薬剤濃度と封入率など、製造のバリデーションを実施する。また、ラパマイシン相当としての致死量をマウスへ投与する事による急性毒性の有無を確認する。

(2)皮下腫瘍モデル、肝転移肺転移モデルに対するラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子による抗腫瘍効果の検討：

対数増殖期にあるヒト大腸癌細胞株 (HT29,HCT116,DLD-1)を Balb/c nu/nu の皮下、静脈内、脾臓内へ投与する事により臨床病態に類似したモデルマウスを作成した。これらのモデルマウスに対して腫瘍接種後 7 日目より治療を開始し、ラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子(2.5mg/kg)を 1 週間毎に静注した。皮下腫瘍モデルにおいては、経時的に腫瘍を計測し評価を行った。肝転移モデルについては腫瘍接種後 14 日目に肝臓を摘出・固定し、顕微鏡で観察する事で肝内の微小肝転移巣の大きさについて検討を行った。また皮下腫瘍につ

いてはホルマリン固定、パラフィン包埋した後薄切し、これらの切片を抗 CD31 抗体にて免疫染色を行い、腫瘍内血管数を定量化した。

(3)臨床検体を用いた PDGF-AA/PDGFR $\alpha$ /p70S6K 系活性化の臨床病理学的検討：

血管新生と予後との関連については肺癌においても多くの報告がなされている。128 例の肺癌切除症例から得られたパラフィン包埋切片を用いて、PDGF-AA の免疫組織学的染色を行い、PDGF-AA の発現と臨床病理学的因子の関連について検討した。同じ切片中の血管平滑筋よりも染色強度が強く、少なくとも 30%以上の腫瘍細胞が染色されているものを陽性と定義した。

### 4. 研究成果

(1)ラパマイシン封入ナノ粒子の製造、安全性の検討:ナノ粒子の平均粒子径は約 200 $\mu$ m、ラパマイシンの含有率は 5.31 $\pm$ 0.04(%)に均一化させる事が可能であった。

マウス致死量相当のラパマイシンを封入した PLGA ナノ粒子をマウスへ投与しても急性毒性の出現は認めなかった。これは PLGA ナノ粒子が徐放製剤となっていることに起因しているものと考えられた。

現在臨床試験へ向けて、ラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子の GMP 化を行っている。

(2)皮下腫瘍モデル、肝転移肺転移モデルに対するラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子による抗腫瘍効果の検討：

肺転移モデルは恒常的・安定的に肺転移を形成させることができなかったため、解析対象から除外した。皮下腫瘍モデルでのラパマイシン封入 PLGA ナノ粒子による治療効果は図 1 に示す。治療群においてはコントロールと比較して有意に腫瘍の縮小効果を認めた。また、これらの皮下腫瘍の切片を摘出し CD31 抗体にて免疫染色を行った。腫瘍内血管数を定量化したところ、治療群では有意に腫瘍内血管数が減少していた。

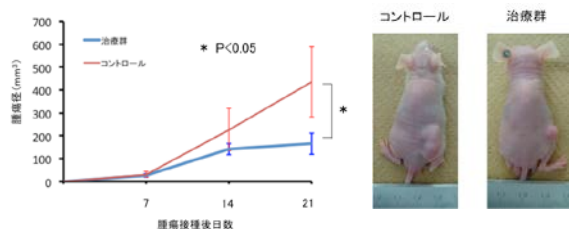


図 1 ヒト大腸癌皮下腫瘍モデルにおけるラパマイシン封入 PLGA による抗腫瘍効果

また、ヒト大腸癌細胞株を脾臓内注入する事により肝転移モデルを作成する事ができた (図 2 左)。このモデルに対してラパマイシ

ン封入 PLGA ナノ粒子を経静脈的に投与する事により、有意に肝転移巣の縮小効果を認めた (図 2 右)。

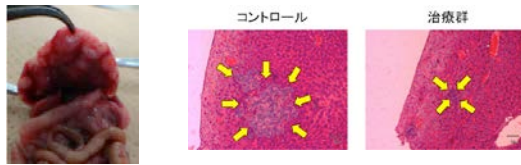
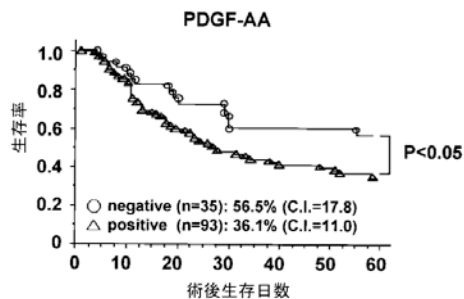


図 2 ヒト大腸癌肝転移モデルにおけるラバマイシン封入 PLGA による抗腫瘍効果

(3) 臨床検体を用いた PDGF-AA/PDGFR $\alpha$ /p70S6K 系活性化の臨床病理学的検討:

PDGF-AA 陽性の症例では陰性の症例よりも有意に術後生存日数が短かった。



#### 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 295 件)

1. Yoshimatsu M, Maehara Y, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* 128: 562-573,2011
2. Morita K, Maehara Y, et al. Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver Int* 31: 474-484,2011
3. Fukuhara T, Maehara Y, et al. Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus. *Microbes Infect* 13: 405-412,2011
4. Ueda S, Maehara Y, et al. Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18:1204-1211,2011
5. Sanefuji K, Maehara Y, et al. Significance of DNA polymerase delta catalytic subunit p125 induced by mutant p53 in the invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *Oncology*79: 229-237,2011
6. Sugimachi K, Maehara Y, et al. Prognostic significance of preoperative imaging in recipients of living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 91: 570-574,2011
7. Aishima S, Maehara Y, et al. Histological and immunohistological findings in biliary intraepithelial neoplasia arising from a background of chronic biliary disease compared with liver cirrhosis of non-biliary aetiology. *Histopathology*59: 867-75,2011
8. Okano S, Maehara Y, et al. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-1-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. *J Immunol* 186: 1828-1839,2011
9. Shirabe K, Maehara Y, et al. Hepatic aflatoxin B1-DNA adducts and TP53 mutations in patients with hepatocellular carcinoma despite low exposure to aflatoxin B1 in southern Japan. *Liver Int* 31: 1366-1372,2011
10. Hisamatsu Y, Maehara Y, et al. Impact of FOXA1 Expression on the Prognosis of Patients with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 19: 1145-1152,2011
11. Tokunaga E, Maehara Y, et al. Low incidence of methylation of the promoter region of the FANCF gene in Japanese primary breast cancer. *Breast Cancer*18: 120-123,2011
12. Sugiyama M, Maehara Y, et al. Antagonism of VEGF by genetically engineered dendritic cells is essential to induce antitumor immunity against malignant ascites. *Mol Cancer Ther* 10: 540-549,2011
13. 沖 英次、他. 胃癌の個別化医療—遺伝子異常を中心に. *外科* 73: 1045-1050,2011
14. 沖 英次、他. 胃癌における PKC. *Surgery frontier* 18,2011
15. Egashira A, Maehara Y, et al. Loss of p53 in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with survival: analyses of gene mutations, protein expression, and loss of heterozygosity in Japanese patients. *J Surg Oncol* 104: 169-175,2011
16. Saeki H, Maehara Y, et al. Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. *Clin Cancer Res.* 17 : 1731-1740,2011
17. Yoshida R, Maehara Y, et al. Concurrent genetic alterations in DNA polymerase proofreading and mismatch repair in human colorectal cancer. *Eur J Hum Genet.* 19: 320-325,2011
18. Okano S, Maehara Y, et al. Provision of Continuous Maturation Signaling to Dendritic Cells by RIG-I-Stimulating

- Cytosolic RNA Synthesis of Sendai Virus. *J Immunol.* 186: 1828-39,2011
19. Koga T, Maehara Y, et al. CHFR hypermethylation and EGFR mutation are mutually exclusive and exhibit contrastive clinical backgrounds and outcomes in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 128: 1009-1017,2011
  20. Yoshimatsu M, Maehara Y, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer.* 128: 562-573,2011
  21. 江頭健輔、他. 血管医学から先端医療研究開発への展開. *血管医学* 11: 55-62, 2010
  22. Ueda S, Maehara Y, et al. Evaluation of ERCC1 Expression for Cisplatin Sensitivity in Human Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* Epub ahead of print,2010
  23. Uchiyama H, Maehara Y, et al. Dual hepatic artery reconstruction in living donor liver transplantation using a left hepatic graft with 2 hepatic arterial stumps. *Surgery* 147: 878-886, 2010
  24. Fujita N, Taketomi A, et al. Down-regulation of artery in moderately differentiated hepatocellular carcinoma related to tumor development. *Hum Pathol.* 41: 838-47,2010
  25. Fukuhara T, Maehara Y, et al. Impact of amino acid substitutions in the core region of HCV on multistep hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 40: 171-178,2010
  26. Taketomi A, et al. Improved results of a surgical resection for the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Ann Surg Oncol.* 17: 2283-2289,2010
  27. Ando K, Maehara Y, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 101: 639-645,2010
  28. Zhao Y, Maehara Y, et al. The impact of a high-frequency microsatellite instability phenotype on the tumor location-related genetic differences in colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 196: 133-139,2010
  29. Maehara Y, et al. Molecular mechanisms of esophageal squamous cell carcinogenesis: clues to improve treatment outcomes. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 16: 387-388,2010
  30. Suda K, Maehara Y, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 16: 5489-5498, 2010
  31. Maehara Y. Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 15: 543,2010
  32. Suzuki H, Maehara Y, et al. Podoplanin in cancer cells is experimentally able to attenuate prolymphangiogenic and lymphogenous metastatic potentials of lung squamous cancer cells. *Mol Cancer.* 9: 287,2010
  33. Harimoto N, Maehara Y, et al. The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 78: 361-368, 2010
  34. Aishima S, Maehara Y, et al. p62+ Hyaline inclusions in intrahepatic cholangiocarcinoma associated with viral hepatitis or alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol.* 134: 457-465,2010
  35. Fukuhara T, Maehara Y, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology.* 139: 1577-1585,2010
  36. Yotsumoto F, Maehara Y, et al. HB-EGF orchestrates the complex signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *Int J Cancer.* 127: 2707-2017,2010
  37. Kayashima H, Maehara Y, et al. Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. *J Immunol.* 185: 698-708,2010
  38. Fukuhara T, Maehara Y, et al. Mutations in hepatitis C virus genotype 1b and the sensitivity of interferon-ribavirin therapy after liver transplantation. *J Hepatology.* 52: 672-680,2010
  39. Ueda Y, Yonemitsu Y, et al. Sendai Virus for cancer immunotherapy. *Methods in Molecular Biology* 515: 1-10,2009
  40. Kimura S, Egashira K, et al. Nanoparticle-Mediated Delivery of Nuclear Factor-κB Decoy Into Lungs Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension* 53: 877-883,2009
  41. Koga JI, Egashira K, et al. Soluble Flt-1 Gene Transfer Ameliorates Neointima Formation After Wire Injury in flt-1 Tyrosine Kinase-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 133: 139-143,2009
  42. Murakami Y, Yonemitsu Y, et al. Inhibition of choroidal neovascularization via brief subretinal exposure to a newly developed lentiviral vector pseudotyped with Sendai virus envelope proteins. *Human Gene Therapy* 21: 199-209,2009

43. Onimaru M, Yonemitsu Y, et al. VEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 297: H1685-1696,2009
44. Komaru A, Yonemitsu Y, et al. Sustained and NK/CD4<sup>+</sup>T- cell-dependent efficient prevention of lung metastasis induced by dendritic cells harboring recombinant Sendai virus. *The Journal of Immunology* 183: 4211-4219,2009
45. Matsuura M, Yonemitsu Y, et al. Autocrine loop between VEGF-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated lymphangiogenesis in oral squamous cancer cells. *The American Journal of Pathology* 175: 1709-1721,2009
46. Kinoh H, Yonemitsu Y, et al. Generation of optimized and urokinase-targeted oncolytic Sendai virus vectors applicable for various human malignancies. *Gene Therapy* 16: 392-403,2009
47. Fukuhara T, Maehara Y, et al. Impact of amino acid substitutions in the core region of HCV on multistep hepatocarcinogenesis. *Hepatology Res.* 40: 171-178, 2009
48. Iguchi T, Maehara Y, et al. Fascin expression in progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 100: 575-579,2009
49. Iguchi T, Maehara Y, et al. Both fibrous capsule formation and extracapsular penetration are powerful predictors of poor survival in human hepatocellular carcinoma: a histological assessment of 365 patients in Japan. *Ann Surg Oncol* 16:2539-2546,2009
50. Iguchi T, Maehara Y, et al. A Comprehensive analysis of immunohistochemical studies in intrahepatic cholangiocarcinoma using the survival tree model. *Oncology* 76: 293-300,2009
51. Sanefuji K, Maehara Y, et al. Characterization of hepatocellular carcinoma developed after achieving sustained virological response to interferon therapy for hepatitis C. *J Surg Oncol* 99: 32-37,2009
52. Iguchi T, Maehara Y, et al. Fascin overexpression is involved in carcinogenesis and prognosis of human intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and molecular analysis. *Hum Pathol* 40:174-180,2009
53. Ando K, Maehara Y, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci*: 639-645,2009
54. Tokunaga E, Maehara Y, et al. Low incidence of methylation of the promoter region of the FANCF gene in Japanese primary breast cancer. *Breast Cancer*: Published online, 2009  
[学会発表] (計 110 件)
1. 前原喜彦. 「講演：がん分子標的治療とがん診療ガイドライン」日本医学会シンポジウム. 2011年12月8日東京
2. 武富紹信, 他. 「肝細胞癌に対する外科治療における分子標的治療薬の役割」第49回日本癌治療学会学術集会. 2011年10月27-29日名古屋
3. 前原喜彦. 「講演：われわれが取り組んでいる消化器癌の研究－染色体不安定性の解析－」第20回日本癌転移学会. 2011年6月30日静岡
4. Taketomi A, et al. 「Lon-term outcomes of the patients with hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation using left lobe graft. 」ASCO 2011. 2011年6月3-7日 Chicago, USA
5. 武富紹信, 他. 「ゲノム解析による肝移植後再発C型肝炎に対する高精度IFN治療効果予測法の開発 / Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C」第111回日本外科学会. 2011年5月25日誌上開催
6. Takeji Y, et al. 「Strategies for Treating Liver Metastasis from Gastric Cancer」9th International Gastric Cancer Congress. 2011年4月20-23日 Seoul, Korea
7. 掛地吉弘, 他. 「消化器がんに対する診断・治療の新しいアプローチ」第28回日本医学会総会. 2011年4月8-10日東京
8. 江頭健輔. 「DESの血管内皮修復不全に対する生体吸収性ナノ粒子溶出ステントの役割」第18回日本血管生物医学会学術集会、2010年12月3日大阪
9. Egashira K. 「NPC1L1 Inhibition with Ezetimibe Prevents Accelerated Plaque Destabilization and Rupture Induced by Dietary Cholesterol Oxidation Products in ApoE-deficient Mice」Scientific Sessions 2010 of the American Heart Association., 2010年11月13-17日 Chicago, USA
10. 前原喜彦. 「消化器外科の基礎研究：病態解明からの挑戦」JDDW2010、2010年10月15日横浜
11. 江頭健輔. 「DESの血管内皮修復不全に対する生体吸収性ナノ粒子溶出ステントの役割」CVIT2010 第19回日本心血管インターベンション治療学会学術集会、2010年8月23日仙台
12. Egashira K. 「Impact of Nanotechnology-based Drug Delivery on Treatment of Cardiovascular Disease」The Annual Scientific Meeting of Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis 2010 and The 10th Taipei International Vascular Biology Symposium., 2010年8月15日 Taipei
13. 掛地吉弘, 他. 「可溶性FLT1発現センダイウイルスベクター活性化樹状細胞を利用した抗腫瘍免疫治療」第20回日本サイトメトリー学会学術集会、2010年6月26-27日東京
14. Takeji Y, et al. 「Staging laparoscopy and

neoadjuvant chemotherapy of biweekly docetaxel and S-1 for gastric cancer with peritoneal dissemination.」 American Society of Clinical Oncology 46th Annual Meeting 2010.  
2010年6月4-8日 Chicago,USA

15. 江頭健輔. 「血管内皮細胞選択的ナノ DDS 技術」を基盤とする革新的低侵襲治療的血管新生療法の実現のための橋渡し研究」第32回ヒューマンサイエンス、2010年5月19日東京
16. 米満吉和. 「機能的血管再生のメカニズムとその治療への展開」第99回日本病理学会総会、2009年4月27日-29日東京
17. 佐伯浩司、前原喜彦、他. p53 gene abnormalities in squamous cell carcinoma of the esophagus. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1-3日横浜

〔図書〕(計1件)

1. Ueda Y, Yonemitsu Y, et al. Humana Press. U.S.A. Ed.by Hicks BW, Methods in Molecular Biology: Viral Applications of the GFP: 総ページ12,2009

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：樹状細胞、及び抗癌剤  
発明者：前原喜彦、米満吉和、杉山雅彦、吉田久美、井上誠、長谷川護  
権利者：九州大学、ディナベック株式会社  
種類：公開特許公報(A)  
番号：特許公開2010-263859  
出願年月日：平成21年5月15日  
国内外の別：国内

○取得状況(計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：80165662

### (2)研究分担者

掛地 吉弘 (KAKEJI YOSHIHIRO)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80284488

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)  
九州大学・薬学研究院・教授  
研究者番号：40315065

江頭 健輔 (EGASHIRA KENSUKE)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：60260379

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：70363364

吉永 敬士 (YOSHINAGA KEIJI)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：90507790

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：