

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06524

研究課題名（和文）マクロファージに着目した腫瘍内環境改善によるリポソームの腫瘍移行性向上戦略の構築

研究課題名（英文）Construction of a method for enhancing the tumor accumulation of liposomes via improving tumor microenvironment focusing on macrophages

研究代表者

河野 裕允（Kono, Yusuke）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60732823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍内マクロファージの極性をM2型からM1型へ転換することで腫瘍内血管を正常化し、リポソーム製剤の腫瘍組織移行性を向上させることを試みた。また、リポソーム製剤の治療効果を事前に予測可能な診断法の構築にも取り組んだ。ジスルフィラムによる腫瘍内マクロファージの極性転換により、血管の特性が異なる2種の固形腫瘍に対するドキシソルビシン内封PEGリポソームの移行性および抗腫瘍効果が増大した。また、ジスルフィラム前処置によるリポソーム製剤の抗腫瘍効果の増大の程度を予測するマーカーとして、CT26腫瘍については周皮細胞数、B16/BL6腫瘍については血管内皮細胞数が候補となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したマクロファージの極性を転換する手法は、血管新生の抑制のみでなく壁細胞による血管安定化も誘導でき、従来のVEGFを阻害する手法よりも効率的に血管の構造・機能を正常化することが可能である。本手法を利用してリポソームの腫瘍移行性を向上するアプローチを臨床において構築できれば、微粒子性抗がん剤の治療効果向上と適応拡大につながる。

また、リポソーム製剤のがん治療効果を予測するためのマーカー候補の探索は、効果が得られる患者を適切に選別するための予測法の構築につながり、これにより効果の期待できない患者への不要な抗がん剤投与による副作用の発現や医療費の負担を回避できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to enhance the tumor accumulation and anti-tumor efficacy of anti-cancer drug-loaded liposomes by improving tumor microenvironment through the phenotypic conversion of tumor-infiltrated macrophages using disulfiram. In addition, I also tried to construct the diagnosis for predicting the therapeutic effect of liposomes combined with disulfiram. The tumor accumulation and anti-tumor efficacy of doxorubicin-loaded liposomes were significantly increased by disulfiram-induced phenotypic conversion of macrophages from M2 to M1 in both CT26 and B16/BL6 solid tumor. In addition, it is likely that the increasing ratio of anti-tumor efficacy by disulfiram may be correlated with the number of pericytes in CT26 tumor and vascular endothelial cells in B16/BL6 tumor, respectively.

研究分野：薬物送達学

キーワード：腫瘍内マクロファージ リポソーム 腫瘍内血管

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質二重膜よりなる 100 nm 程度の閉鎖小胞であるリポソームは、薬物の体内動態を制御するための薬物キャリアとして広く利用されている。特に、リポソームに関する研究はがん治療分野において最も進められている。これは、腫瘍内の新生血管は構造が脆弱で透過性が高く、正常血管よりも高分子が漏出しやすくなっているため、リポソームが腫瘍組織へ効率的に移行するとされているためである。しかし、腫瘍内血管は機能的に不完全で、しばしば血流が途絶えており、また、その分布も不均一である。そのため、期待されるほどリポソームが腫瘍組織へ移行せず、抗がん剤内封リポソーム製剤によるがん治療効果が十分に得られない場合が多い。この問題を解決するためには、リポソーム製剤が移行・集積しやすくなるように腫瘍内環境を改善することが必要である。

腫瘍内では、マクロファージががん細胞から産生されるコロニー刺激因子 1 (CSF1) に応答して腫瘍増殖促進性の極性 (M2 型) に分化し、種々の増殖因子の産生を通して血管新生およびがん細胞の増殖を促進している。近年、マクロファージに発現する CSF1 受容体を阻害することで、マクロファージが M2 型から腫瘍抑制性の M1 型に転換することが明らかにされた。M1 型マクロファージは、血管の構造・機能の正常化を促し、また、がん細胞を貪食する性質も有する。よって、腫瘍内マクロファージの CSF1 受容体を阻害し、M2 型の極性を M1 型へ転換することで、血流を伴う血管を腫瘍全体へ分布させることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、抗 CSF1 受容体抗体あるいはジスルフィラムによる前処置により、腫瘍内マクロファージの極性を M2 型から M1 型へ転換することで腫瘍内環境を改善し、抗がん剤内封リポソーム製剤の腫瘍組織移行性および抗腫瘍効果を向上させることを目的とする。また、腫瘍内のマクロファージや血管の量的・質的变化とリポソームによる抗腫瘍効果の相関性を解析し、リポソーム製剤投与前にその治療効果を予測可能な診断法の構築にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍内マクロファージの極性の定量的評価

本研究には、マウス結腸癌細胞株 CT26 あるいはマウス悪性黒色腫細胞株 B16/BL6 を皮下に移植することで作製した固形がんモデルマウスを用いた。CT26 腫瘍は血管密度が大きく、血管透過性も高いことが知られている。一方、B16/BL6 固形腫瘍は血管密度が小さく、血管透過性が低いことが報告されている。固形腫瘍が 500 mm³ に到達した時点で抗 CSF1 抗体あるいはジスルフィラムを腹腔内投与あるいは腫瘍内投与し、24 時間後に腫瘍を単離・分散した後、CD86 を M1 型、CD206 を M2 型の指標としてフローサイトメトリーにより腫瘍内マクロファージの量と極性を解析した。

(2) ジスルフィラム搭載マクロファージの作製

ジスルフィラムを内封した負電荷リポソーム(DSPG : DSPC : cholesterol = 4 : 1 : 5 mol)を調製し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に 3 時間添加することで、ジスルフィラム搭載マクロファージを作製した。

(3) 腫瘍内血管の質的・量的解析

固形がんモデルマウスに対してジスルフィラム搭載マクロファージを静脈内投与し、その 3 日後に固形腫瘍を摘出し、凍結切片を作製した。その後、CD31 を腫瘍内血管内皮細胞、 α -SMA を周皮細胞の指標として蛍光免疫染色により各細胞数を定量した。また、CD31 と α -SMA の共局在領域の定量も行った。

(4) PEG リポソームの腫瘍組織移行性の評価

固形がんモデルマウスに対してジスルフィラム搭載マクロファージを静脈内投与した後、3 日後に Doxil[®]と同様の組成のポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームを静脈内投与した。その 24 時間後に固形腫瘍を摘出し、腫瘍内リポソーム量を測定した。リポソームの定量は、リポソームを ¹¹¹In で標識し、カウンターにて放射活性を測定することで行った。

(5) ドキソルピシン内封 PEG リポソームの抗腫瘍効果の評価

固形がんモデルマウスに対して、ジスルフィラム搭載マクロファージとドキソルピシン内封 PEG リポソームを(4)と同様のスケジュールで投与した。その後、経日的に腫瘍体積と体重を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗 CSF1 受容体抗体あるいはジスルフィラム投与に伴う腫瘍内マクロファージの極性変化

の評価

まず、固形がんモデルマウスに対して抗 CSF1 受容体抗体を腹腔内投与した際の腫瘍内マクロファージの極性変化について評価した。その結果、未処置の CT26 固形がんモデルマウスにおいては、約 85%の腫瘍内マクロファージが M2 型を示していたが、抗 CSF1 受容体抗体を投与することで M2 型マクロファージが 20%まで減少し、約 60%が M1 型を示した。一方、B16/BL6 固形がんモデルマウスでは、抗 CSF1 受容体抗体の投与による腫瘍内マクロファージの極性転換は認められなかった。これは、B16/BL6 固形腫瘍は血管透過性が低いことが報告されているため、腹腔内投与した抗 CSF1 受容体抗体が腫瘍内に十分に移行しなかったことが原因であると推察された。そこで、マクロファージの極性転換作用を有することが報告されている低分子化合物であるジスルフィラムを用いて検討を行った。B16/BL6 固形腫瘍に対してジスルフィラムを直接投与した結果、腫瘍内の M2 型マクロファージの約半数が M1 型へ転換することが示された。一方で、ジスルフィラムを静脈内投与した場合には腫瘍内マクロファージの極性変化が認められなかった。そこで、ジスルフィラムを B16/BL6 固形腫瘍へ効率的に送達するための技術開発を行うこととした。

(2) マクロファージを用いた腫瘍選択的なジスルフィラム送達の評価

我々はこれまで、低分子薬物を固形腫瘍へ効率的に送達するための薬物キャリアとして、リポソーム搭載マクロファージを開発した。静脈内投与したリポソーム搭載マクロファージの B16/BL6 固形腫瘍への集積量は、リポソームを単独で静脈内投与した場合と比較して顕著に多いことを確認している。本検討では、ジスルフィラムを内封したリポソームをマクロファージに搭載することで、ジスルフィラム搭載マクロファージを作製した。B16/BL6 固形がんモデルマウスに対してジスルフィラム搭載マクロファージを静脈内投与した際の腫瘍内マクロファージの極性変化を評価した結果、腫瘍内の M2 型マクロファージの約 40%が M1 型へ転換することが確認された。また、CT26 固形がんモデルマウスにおいても類似した結果が得られた。これらの結果は、ジスルフィラム搭載マクロファージにより、固形腫瘍へ効率的にジスルフィラムを送達できたことを示唆している。

(3) ジスルフィラム投与による腫瘍内血管の量的・質的变化の解析

次に、各固形がんモデルマウスに対してジスルフィラム搭載マクロファージを投与した際の腫瘍内血管の量的変化を血管内皮細胞数を指標に評価した。また、周皮細胞が血管壁に接着している血管は、機能的に正常であることが報告されているため、腫瘍内血管の質的变化を血管内皮細胞と周皮細胞の共局在領域数を指標に評価した。その結果、CT26 固形腫瘍においては、ジスルフィラム処置による血管内皮細胞数の変化は認められなかったが、血管内皮細胞と周皮細胞の共局在領域が増加していることが示された。本結果は、ジスルフィラム処置により CT26 固形腫瘍内の血管機能が正常化したことを示唆するものであった。続いて、B16/BL6 固形腫瘍についても同様の評価を行った結果、ジスルフィラム処置により血管内皮細胞数の増大および周皮細胞数の減少が確認され、透過性の高い血管が再構築されている可能性が示された。

(4) ジスルフィラム前処置による PEG リポソームの移行性への影響の評価

続いて、ジスルフィラム前処置を施した固形腫瘍に対する PEG リポソームの移行性について評価した。その結果、CT26 固形腫瘍、B16/BL6 固形腫瘍ともに、ジスルフィラム前処置を施した際に、未処置の場合と比較して PEG リポソームの腫瘍組織移行量が有意に増大することが明らかとなった。これは、CT26 固形腫瘍においては、血管機能の改善により固形腫瘍への血流が増大したことに起因していると推察される。また、B16/BL6 固形腫瘍においては、血管透過性の高い血管が増大したことが主な要因であると考えられる。

(5) ジスルフィラム前処置とドキシソルピシン内封 PEG リポソームによる抗腫瘍効果の評価

ジスルフィラム前処置を施した各固形がんモデルマウスにおけるドキシソルピシン内封 PEG リポソームの抗腫瘍効果を評価した。その結果、いずれの固形がんモデルマウスにおいても、ジスルフィラム搭載マクロファージを前処置することで抗腫瘍効果が顕著に増大することが示された。このとき、有意な体重変化は認められなかったため、本治療法による重篤な副作用は発現しないものと考えられる。

(6) 腫瘍内環境の変化とリポソームによる抗腫瘍効果の相関性の解析

これまで得られた結果を基に、ジスルフィラム投与に伴う腫瘍内マクロファージの極性の変化率とドキシソルピシン内封 PEG リポソームによる抗腫瘍効果の増大率の相関性を解析した。その結果、CT26 固形腫瘍、B16/BL6 固形腫瘍ともに、腫瘍内マクロファージの極性の変化率と抗腫瘍効果の増大率との間に有意な相関は認められなかった。そこで次に、腫瘍内の血管内皮細胞数および周皮細胞数に着目し、これらの項目とドキシソルピシン内封 PEG リポソームによる抗腫瘍効果の増大率の相関性を解析した。その結果、CT26 固形腫瘍については、周皮細胞数の増大率が抗腫瘍効果の増大率と相関関係にある可能性が示唆された。一方、B16/BL6 固形腫瘍については、内皮細胞数の増大率が抗腫瘍効果の増大率と相関している傾向が認められたが、有意なものではなかった。引き続き、本治療法の抗腫瘍効果を正確に予測するためのマーカーの同定に

取り組む。

以上、ジスルフィラムによる腫瘍内マクロファージの M2 型から M1 型への極性転換により、腫瘍内血管の特性の異なる 2 種の固形腫瘍に対するドキソルビシン内封 PEG リポソームの移行性および抗腫瘍効果を増大することができることを明らかにした。このとき、CT26 固形腫瘍においては血管機能の改善、B16/BL6 固形腫瘍においては血管密度および血管透過性の増大が関与している可能性が示された。また、ジスルフィラム前処置によるリポソーム製剤の抗腫瘍効果の増大の程度を予測するマーカーとして、CT26 固形腫瘍については周皮細胞数、B16/BL6 固形腫瘍については内皮細胞数が候補となる可能性を見出した。本研究で得られた知見は、既存の微粒子性抗がん剤の治療効果を改善するための新たな技術開発を行う上で有益な情報を提供するものと考えられる。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kono Yusuke, Uesugi Naoki, Saegusa Mikoto, Onishi Kae, Hosokawa Mika, Ogawara Ken-ichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Suppression of Phagocytic Activity Leads to the Efficient Surface Modification of Macrophages with Liposomes for Developing a Biomimetic Drug Delivery System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00280	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 -

1. 著者名 Kono Yusuke, Kamino Renpei, Hirabayashi Soma, Kishimoto Takuya, Kanbara Himi, Danjo Saki, Hosokawa Mika, Ogawara Ken-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient Liposome Loading onto Surface of Mesenchymal Stem Cells via Electrostatic Interactions for Tumor-Targeted Drug Delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 558 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11020558	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西 可恵、河野 裕允、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 がん指向型薬物キャリアとしてのリポソーム搭載マクロファージの作製とその機能評価
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大西 可恵、河野 裕允、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 生体模倣型薬物キャリアとしてのリポソーム搭載マクロファージの作製 -マクロファージ表現型の影響の評価-
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河野 裕允
2. 発表標題 細胞を基盤としたがん指向型DDSの開発
3. 学会等名 第30回次世代医工学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 紙野 廉平、河野 裕允、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 磁性リボソームを用いたリボソーム修飾間葉系幹細胞の作製(1): リボソーム修飾条件の最適化
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩山 佳寛、河野 裕允、吉川 愛芽、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 磁性リボソームを用いたリボソーム修飾間葉系幹細胞の作製(2): ドキソルピシンの封入に適したリボソーム内水相の検討
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 裕允、紙野 廉平、平林 奏磨、岸本 拓也、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 磁性リボソームを用いた効率的な間葉系幹細胞表面へのリボソーム修飾法の構築
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西 可恵、河野 裕允、上杉 直幹、細川 美香、大河原 賢一
2. 発表標題 リボソーム搭載マクロファージの作製に関する基礎的検討 -リボソーム組成の最適化とマクロファージの表現型の影響の評価-
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 裕允、納富 蒼、根来 亮介、藤田 卓也
2. 発表標題 外部磁場存在下における磁性化間葉系幹細胞の骨格筋内滞留性および抗炎症効果の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 裕允、竹垣 淳也、根来 亮介、藤田 聡、藤田 卓也
2. 発表標題 磁性リボソームを利用した標的組織内滞留型磁性化間葉系幹細胞の作製 骨格筋内滞留性および抗炎症効果の評価
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	藤田 卓也 (Fujita Takuya)		

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