

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21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790031

研究課題名（和文） 生体内一粒子 DDS イメージングと新生血管透過性制御による乳癌薬物治療の最適化

研究課題名（英文） Optimization of chemotherapy for breast cancer by in vivo single molecular imaging of drug delivery system and control of neovasculature permeability.

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）：

虚血部位における新生血管観察のため、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)と量子ドット(aQDs)による VEGF-aQDs とマウス虚血モデルを作成した。in vivo 1 粒子蛍光イメージングにて VEGF-aQDs は aQDs と比較して新生血管壁に対し約 3.3 倍の結合を確認した。また VEGF-aQDs は新生血管壁に対して通常血管壁の約 2.4 倍の結合が認められた。新生血管壁における VEGF-R 分布を解析した。

研究成果の概要（英文）：

To image the neovasculature in the ischemic portion, VEGF-aQDs complexes and mouse ischemic limb model were structured. Injected VEGF-aQDs were attached to the wall of the neovasculature about 3.3 times higher compared to the aQDs (control). Injected VEGF-aQDs were also attached to the wall of the neovasculature about 2.4 times higher compared to the wall of the normal vessel. We analyzed the distribution of VEGF receptor on the wall of the neovasculature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：虚血性腫瘍・Quantum Dot・in vivo イメージング

1. 研究開始当初の背景

わが国における乳癌死亡者数は増加の途にあり、2008年には年間11,795人が死亡している。中でも30歳代から60歳代の壮年層において他の癌腫と比較して最も高率であり、日本社会の基盤を担うべき女性を襲う重大疾患といえる。乳癌死亡率の減少へ向けた研究は人口減少、労働力減少の21世紀社

会において速効性が期待される有効な一手となる。

死亡率減少を実現する上で科学的根拠を持つ治療として薬物療法が挙げられる。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、その研究開発は死亡率減少へ向けた効率の高いアプローチとして期待される。現在の乳癌薬物治療の代表として化学療法や分子標的治療があり、これらの組み合わせ

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。この理由の一つとして、薬剤が腫瘍に効率的に到達しないため、投与量に対して効果が小さいことが考えられる。抗腫瘍効果を増大させる為、投与量を増やすと正常組織に生じる作用(=副作用)が大きくなり、これが薬物療法の使用可能量、治療効果の上限となっている。また、これは無駄の多い治療ともいえる。それゆえ、正常組織への集積による副作用を減らし、がん組織に特異的に集積し、効果を発揮する腫瘍選択性が高い、最適化された新規薬剤の研究開発が重要である。

腫瘍は個々に特異的な新生血管をもち、それぞれ透過性が異なる事が知られている。薬剤の腫瘍組織到達は新生血管からの漏出によるため、血管透過特性を知り、腫瘍の種類に応じて薬剤が腫瘍に効率的に到達する方法を開発することが、これからの癌薬物治療開発の鍵になる。

腫瘍新生血管は血管内皮細胞と血管壁細胞を含む平滑筋細胞からなる血管孔をもつ。その血管孔は一般的に正常血管より大きく、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、特有の個性を持つ。したがって、通常よりも薬剤を大型化することで腫瘍特異的に血管外漏出、集積させることが可能である。しかも、正常組織には集積しないため副作用の少ない治療薬となりうる。実臨床において、このような作用を持つ薬物としてドキシソルピシン内包リポソーム製剤やアルブミン結合パクリタキセルなどがある。

がん種によっては腫瘍血管透過性の低いものも存在し、薬剤を大型化するだけのアプローチでは選択性を持たせることができない。しかし、腫瘍新生血管の透過性を直接向上させることで薬剤の集積を高めることが可能である。このような作用を持つ物質の一つとして TGF- β (Transforming Growth Factor beta) 阻害剤がある。TGF- β 阻害剤を腭がん由来腫瘍細胞 BxPC3 担がんマウスに作用させることで、血管内皮細胞が増加、腫瘍間質における血管壁細胞を含む平滑筋細胞が減少し、投与したナノ粒子の腫瘍における蓄積増加が認められた(Kano MR, Cancer Sci, 2009)。

一方、腫瘍においてはこのような薬剤を用いても効果がなく、逆に腫瘍血管を正常血管へ近い形へ変更することで腫瘍への薬剤到達効果が高くなるものも認められる。この理論を応用した薬剤に抗 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 阻害抗体や抗 VEGF 阻害小分子薬等がある。大腸がん由来腫瘍細胞 CT26 担がんマウスにこれらの薬剤を投与したところ、血管内皮細胞が減少、腫瘍間質における血管壁細胞を含む平滑筋細胞が増加するも、別に投与したナノ粒子の集積

が亢進することが報告されている。

このようにがんの種類に応じて血管透過性調節剤を選択し、それによって変化した腫瘍新生血管に応じたナノレベルでの大きさを持つ薬剤を使用する事で腫瘍選択性が高効率な薬物治療を行うことが可能となる。血管透過性調節剤は上記のもの以外にも多数のものが開発中であり、一つ一つの薬剤と、個々の腫瘍の組み合わせに応じた最適化に関する検討が必要である。

これまで我々の研究グループ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)を改良した高速 2 次元イメージング装置で、in vitro の細胞に結合した蛍光ナノ粒子をイメージングすることができた(Tada H, Cancer Res, 2007)。更に、抗体-蛍光ナノ粒子複合体を in vivo 担がんマウスに投与し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(Tada H, Cancer Res, 2007)。更に、担がんマウスに異なる大きさを持つ蛍光ナノ粒子を投与し生体内一粒子イメージングと定量化を行い、腫瘍間質に漏出した粒子はその径に比例して間質に滞留する時間が長くなり、そしてその時間が計算可能であることを明らかにした(Kawai M, Breast Cancer Res, 2009)。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るため、個々の腫瘍や治療目的に応じ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。現在は薬剤の大きさの調節を行っており、蛍光ナノ粒子をミセル化してその大きさをコントロールすることに成功している(未発表データ)。

このような研究背景にて、ナノ粒子の大きさをコントロールして担がんマウスに投与し生体内リアルタイム一粒子イメージングを行う事で、ナノ粒子が腫瘍血管を透過して腫瘍細胞まで至る過程を追跡する事が可能と成っている。将来的な生体応用への準備として、アルブミンや抗体等の生体内タンパクをナノ粒子に付加して大きさのコントロールを行う技術を開発する。

2. 研究の目的

本研究においては種々の虚血モデルを作成し、そこに生じる新生血管の観察のためのプローブの作成を行い、観察を行う。虚血腫瘍モデルの種類に応じた血管透過性調節剤と、薬剤の大きさに応じた集積効果に関する最適な組み合わせを、大きさを調節した蛍光ナノ粒子を薬剤モデルとして定量的観察並びに解析を行う。更に生体内一粒子イメージングを通じて種々の虚血モデルにおける新生血管の多様性を明らかにし、DDS に最適な

大きさを決定、更に病理学的評価と実際の粒径ごとの透過性との比較を行う。また、血管外漏出から腫瘍へ至る過程を同イメージング法にて計測、定量化し、個々の治療に応じて最適化された DDS を構築、薬物療法の効率化を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 腫瘍新生血管の観察のため、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, 血管内皮細胞増殖因子) と量子ドットを結合させた複合体の作製を行う。
- (2) 作成した複合体の VEGFR (VEGF Receptor, 血管内皮細胞増殖因子受容体) 発現細胞に対する結合作用の検討を行い、腫瘍新生血管のイメージングを可能にするプローブの性能評価を行う。
- (3) 虚血性腫瘍モデルの確立として、マウス肢虚血モデルを外科的に作成し、血流還流イメージング装置を用いて血流を確認し、モデルの妥当性を確認した。
- (4) 虚血性腫瘍モデルへの集積の高い VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, 血管内皮細胞増殖因子) 結合量子ドットを投与し腫瘍到達までのリアルタイム in vivo イメージングを行い、一粒子運動解析による定量化を行う。

4. 研究成果

- (1) ビオチン化 VEGF とストレプトアビジン結合量子ドット (avidin conjugated Quantum dots : aQDs) を結合し、複合体の作成を行った。
- (2) In vitro アッセイでは、モル比 16:1 で結合させた VEGF-aQDs と反応させた MS1 は、量子ドット単体である aQDs に比べて約 1.4 倍、アビジン化 Platelet Derived Growth Factor (PDGF) と aQDs をモル比 16:1 で反応させた PDGF-aQDs に比べて約 1.3 倍の有意な蛍光強度を示した ($p < 0.05$)。一方、VEGF-aQDs と反応させた MS1VEGF は、aQDs に比べて約 5.5 倍、PDGF-aQDs に比べて約 4.7 倍の有意に強い蛍光強度を示した ($p < 0.05$)。アビジン化 VEGF と aQDs をモル比 8:1 で反応させた VEGF-aQDs-8 は VEGF-aQDs との結合能は同様であったため、in vivo の実験には、VEGF-aQDs-8 を使用した。

	VEGF-aQDs vs aQDs	VEGF-aQDs vs PDGF-aQDs	P
MS1	1.4	1.3	<.05
MS1VEGF	5.5	4.7	<.05

(3) 虚血モデル作成では、正常肢の血流を基準とした虚血肢の相対的血流量は、手術直後には 0.08 ± 0.01 (\pm SD) と有意に減少し ($P < 0.05$)、21 日目までで 0.34 ± 0.11 まで回復した。血流が有意に改善した期間は 7 日目から 14 日目であった ($P < 0.05$)。

	VEGF-aQDs vs aQDs	VEGF-aQDs 結合	P
虚血	3.3	2.4	<.05
正常	1.8	1.0	<.05

(4) In vivo 粒子蛍光イメージングでは、VEGF-aQDs-8 は aQDs と比較して、虚血肢の血管壁に対して約 3.3 倍の粒子の結合が認められ、正常肢においては 1.8 倍の粒子の結合が認められた。前者・後者とも有意差があった ($p < 0.05$)。また、aQDs は、正常肢と虚血肢に対する結合数に有意差がなかったが、VEGF-aQDs は、虚血肢に対して、正常肢の約 2.4 倍の有意な結合が認められた ($P < 0.05$)。

	正常肢	術直後	21 日目
虚血 血流	1.0 (対照)	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.11

考察：

in vitro アッセイでは、VEGF-aQDs は、VEGFR 発現細胞に対して強い結合能をもつ可能性があることが考えられた。in vivo イメージングの定量解析から、VEGF-aQDs が正常肢に比べて、虚血部位に多く結合した結合能の差は、虚血部における新生血管における VEGF-R の発現量の差を表している可能性が高いと考えられた。

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 4 件)

- ① Kawai M, Minami Y, Nishino Y, Fukamachi K, Ohuchi N, Kakugawa Y. Body mass index and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women. BMC Cancer, 査読有, 2012, 12, 149-149.

② Kasahara Y, **Kawai M**, Tsuji I, Tohno E, Yokoe T, Irahara M, Tangoku A, Ohuchi N. Harms of screening mammography for breast cancer in Japanese women. Breast Cancer, 査読有, 2012, in press.

③ Minami Y, Nishino Y, **Kawai M**, Kakugawa Y. Being breastfed in infancy and adult breast cancer risk among Japanese women. Cancer Causes Control, 査読有, 2012, 23, 389-398.

④ **Kawai M**, Minami Y, Kakizaki M, Kakugawa Y, Nishino Y, Fukao A, Tsuji I, Ohuchi N. Alcohol consumption and breast cancer risk in Japanese women: The Miyagi Cohort Study. Breast Cancer Res Treat, 査読有, 2011, 128, 817-825.

[学会発表] (計 1 件)

① **Kawai M**, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Molecular Imaging of DDS with Nano-Technology, 2010 Taipei International Breast Cancer Symposium (2010TIBCS), 2010/09/03 - 2010/09/05, Taipei, ROC

[図書] (計 2 件)

① 多田寛、石田孝宣、甘利正和、**河合賢朗**、大内憲明. 医学書院、臨床検査「更年期における乳腺の画像検査」、2011、55、272-276.

② 多田寛、**河合賢朗**、大内憲明. 南山堂、乳がん診療最前線、治療「乳がん検診」、2011、93、1217-1222.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：