

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659635

研究課題名（和文） 抗がんナノ粒子製剤の効果を増強するマクロファージ制御技術の開発

研究課題名（英文） Effective delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells

研究代表者

小田 竜也 (ODA TATSUYA)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20282353

研究成果の概要（和文）：抗がんナノ粒子は新たな Drug delivery system (DDS) の形態として注目されているが、腫瘍に到達する前に肝臓クッパー細胞を中心とする組織マクロファージに捕捉されてしまう弱点がある。本提案では、リポソーム化クロドロネートをあらかじめ患者に投与して細網内皮系を一時的に抑制し、抗がんナノ粒子の腫瘍への集積量を高められる事を動物モデルで証明した。クッパー細胞を抑制する治療戦略は様々なナノ粒子製剤を使った抗癌治療に汎用出来る基幹技術になる可能性を示せた。

研究成果の概要（英文）：Although chemotherapeutic nanoparticles would confer various advantages, the majority of administrated nanoparticles are known to be spoiled by the reticuloendothelial system (RES). Intending to more effectively deliver therapeutic nanoparticles to target regions in vivo, host RES, especially Kupffer cells in the liver, have been depleted ahead of drug administration. In conclusion, Kupffer cells depletion by clodronate liposomes enhanced the plasma concentration and antitumor effects of Doxil, and would be widely applicable for various clinical cancer chemotherapies using nanoparticles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：消化器外科学

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：がん治療，ナノ粒子，マクロファージ，クロドロネートリポソーム，ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 抗がんナノ粒子は低分子化合物、遺伝子ベクター、snRNA、放射性物質等を内包し、それぞれの抗腫瘍薬剤の効果発現を底上げする新たな Drug delivery system (DDS) の形態として注目されてきた。抗がんナノ粒子は 3-200nm 程度という大きさ故に、独特の薬物動態を示す。すなわち、腫瘍における血管透過性は正常組織よりも高い為、ある一定の大

きさ以上の粒子が腫瘍細胞に取り込まれ停留しやすいという EPR (enhanced permeability and retention) 効果により、腫瘍特異的に分布する。更に、粒子から薬物が長時間に渡って徐放される作用が合わさって、未修飾状態では効果が十分でない薬剤にも新たな治療効果をもたらす可能性がある。(2) しかし一方で、ナノ粒子治療薬の薬物動態は既存の小分子化合物とは全く異なり、血

管内投与されると速やかに肝臓の Kupffer 細胞あるいは組織マクロファージなどの細網内皮系に捕捉されてしまう。その結果、血中に循環する薬剤濃度が下がり、ひいては腫瘍への分布が不十分になると事が問題であった。

(3)本提案独自のアイデアは、患者の細網内皮系を一時的に抑制することによって、抗がんナノ粒子の腫瘍への集積量を高める事が出来るのではないかというものである。既に、ビスフォスフォネート製剤である clodronate をリポソーム化して投与するとマクロファージ、肝 Kupffer 細胞を一時的に消失させ得る事が知られている。

## 2. 研究の目的

本提案の目的は、患者の細網内皮系を一時的に抑制する事によって、ナノ粒子化抗癌剤の肝臓での取り込みを減らすことができ、ひいては血中濃度が上昇し、抗がんナノ粒子の腫瘍への集積量を高め抗腫瘍効果が増大する、という仮説を証明する事である。様々な抗がん薬治療に応用できるブースター効果をもたらす治療戦略を開発する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1 クロドロネートリポソームによるクッパー細胞の除去

クロドロネートは骨粗鬆症に用いられるビスフォスフォネート製剤の一つで、それ自体は毒性を持っていない。しかし、リポソームに内包されると、脂質に親和性のあるマクロファージが貪食し、クロドロネートがマクロファージに取り込まれる。すると、マクロファージ内でアポトーシスが誘導され、マクロファージが除去される。実際、コントロール群のマウスのクッパー細胞は 23 個/視野であったのに対し、クロドロネートリポソーム投与後 2 日後および 3 日後ではほぼ完全にクッパー細胞が除去されていた。経時的に観察すると、5 日後に再分布をはじめ徐々に増加し、14 日後には最初のクッパー細胞数の 82% まで回復した。

### 3-2 クッパー細胞除去マウスにドキシルを投与した後のドキソルビシン血中濃度の測定

ドキソルビシンを内包したナノ粒子製剤ドキシルを投与する 2 日前にクロドロネートリポソームをマウスに投与し、クッパー細胞を除去した。ドキシルは 1.25、2.5、5.0mg/kg の投与量を設定し、ドキシル投与後 1、3、5 日後に採血し血中のドキソルビシン濃度を

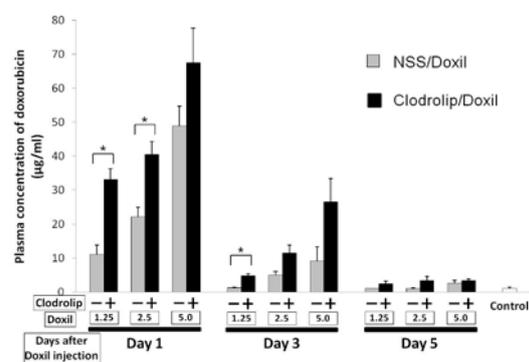
測定した。また、ドキシル投与後 1、3、5 日後に肝臓、脾臓、肺、心臓、腎臓、腫瘍を摘出し、組織中濃度を測定した。

### 3-3 クッパー細胞除去マウスにドキシルを投与した後の腫瘍体積の測定

ヒト膵癌細胞 SUIT-2 をマウスに皮下移植し、7 日後にクロドロネートリポソームを投与してクッパー細胞を除去した。除去 2 日後にドキシル (1.25、5.0mg/kg) あるいはドキソルビシン (5.0mg/kg) を投与し、腫瘍径を測定した。腫瘍体積 (V) は、 $V = \pi ab^2/6$  (a : 最大径、b : 最小径) で算出した。

## 4. 研究成果

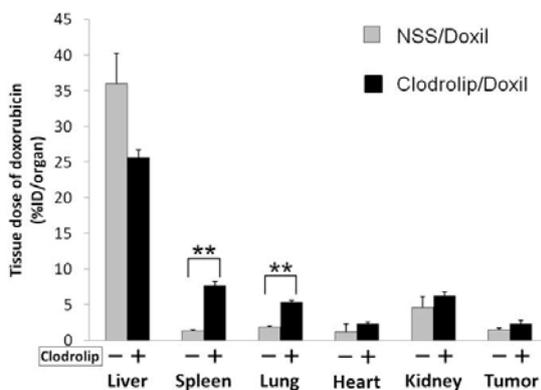
4-1 クッパー細胞除去マウスにドキシルを投与した後のドキソルビシン血中、組織濃度  
クッパー細胞を除去すると、ドキシル投与 1 日後において、3 つの投与量ごとのドキソルビシン血中濃度は 11  $\mu$ g/mL から 33  $\mu$ g/mL (投与量 1.25mg/kg)、22  $\mu$ g/mL から 40  $\mu$ g/mL (投与量 2.5mg/kg)、49  $\mu$ g/mL から 68  $\mu$ g/mL (投与量 5.0mg/kg) にそれぞれ上昇した。血中濃度の上昇した割合は各々、3 倍 (投与量 1.25mg/kg)、1.8 倍 (投与量 2.5mg/kg)、1.4 倍 (投与量 5.0mg/kg) であり、低用量のドキシルの方が、よりクッパー細胞除去による上昇効果が際立つことがわかった。



血中濃度の上昇幅をみると、ドキシル投与 1 日後では 3 つの投与量においていずれも約 20  $\mu$ g/mL とほぼ等しかった。ドキシル投与 3 日後において、3 つの投与量ごとのドキソルビシン血中濃度は 1.3  $\mu$ g/mL から 4.8  $\mu$ g/mL (投与量 1.25mg/kg)、5.0  $\mu$ g/mL から 12  $\mu$ g/mL (投与量 2.5mg/kg)、9.0  $\mu$ g/mL から 26  $\mu$ g/mL (投与量 5.0mg/kg) にそれぞれ上昇した。ドキシル投与後 5 日目においては、クッパー細胞を除去してもあまり血中濃度の変化はなく、投与量で比較しても差がほとんどないため、ドキシルの大部分が代謝排泄され血中から消失していると考えられた。

逆に、クッパー細胞除去後にリポソーム化していないフリーのドキソルビシン (5.0mg/kg) を投与する実験では、投与1時間後には  $2.5 \mu\text{g/mL}$  (非除去群) と  $2.2 \mu\text{g/mL}$  (除去群) であり、明らかな差は認めなかった。

クッパー細胞除去 2 日後にドキシル (1.25mg/kg) を投与した後の、ドキソルビシン組織中濃度を測定した。データは、組織中濃度 (単位:  $\mu\text{g/g-tissue}$ ) と組織集積量 (単位: %投与量[ID]=組織中濃度×組織重量×100/投与量) で示した。ドキシル投与1日後の肝臓中濃度は、クッパー細胞除去すると、 $6.4 \mu\text{g/g-tissue}$  (36%ID) から  $4.7 \mu\text{g/g-tissue}$  (26%ID) に減少した。対照的に、クッパー細胞を除去すると、脾臓 ( $3.5 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $15 \mu\text{g/g-tissue}$ )、肺 ( $3.1 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $8.7 \mu\text{g/g-tissue}$ )、心臓 ( $1.7 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $4.6 \mu\text{g/g-tissue}$ )、腎臓 ( $3.5 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $4.4 \mu\text{g/g-tissue}$ ) の組織中濃度は上昇した。



腫瘍においては、ドキシル投与1日後に  $3.6 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $4.7 \mu\text{g/g-tissue}$  に、3日後に  $0.78 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $3.0 \mu\text{g/g-tissue}$  に、5日後に  $0.44 \mu\text{g/g-tissue}$  から  $1.6 \mu\text{g/g-tissue}$  にそれぞれ上昇した。腫瘍において統計学的有意差は認めなかったが、5日間にわたりクッパー細胞除去によるドキソルビシン濃度の上昇を認めた。

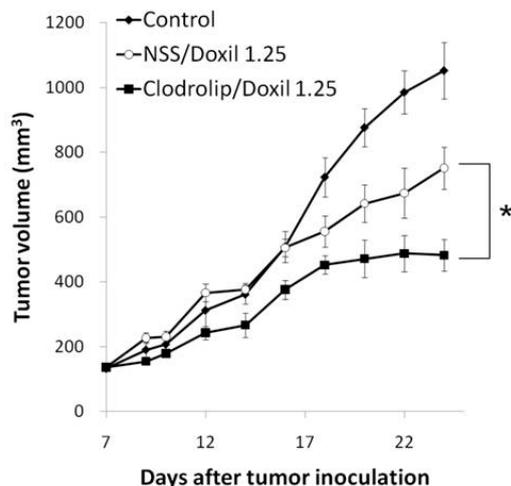
#### 4-2 クッパー細胞除去マウスにドキシルを投与した後の腫瘍体積の測定

クッパー細胞除去後にドキシル (1.25、5.0mg/kg) を投与した後の、皮下腫瘍移植マウスの腫瘍体積を計測した。ドキシル 1.25mg/kg 投与では、腫瘍細胞移植 24 日後の腫瘍体積は  $751\text{mm}^3$  (非除去群) と  $482\text{mm}^3$  (除去群) であり、クッパー細胞除去後によりドキシルの抗腫瘍効果が高まった。ドキシル 5.0mg/kg 投与では、腫瘍細胞移植 28 日後の腫瘍体積は  $403\text{mm}^3$  (非除去群) と  $356\text{mm}^3$  (除去群) であり、クッパー細胞除去後によりドキシルの抗腫瘍効果が

高まったが、1.25mg/kg 投与と比較するとその変化はわずかであった。また、同様にドキソルビシン 5.0mg/kg 投与した系では、非除去群と除去群で腫瘍増殖に差は認めなかった。さらにクロドロネートリポソーム単独投与、即ちクッパー細胞除去だけのマウスでは、抗腫瘍効果に影響を認めなかった。

癌細胞を駆逐するためには抗癌剤が腫瘍に高濃度で集積することが必須である。クッパー細胞除去によるドキシル血中濃度の上昇を受けて、腫瘍中濃度も5日間にわたって増加し、抗腫瘍効果も増大することを明らかにした。この抗腫瘍効果はリポソームではないドキソルビシン投与実験では認められず、クッパー細胞除去がナノ粒子の腫瘍送達を増強しているという仮説を支持している。

ここで考察すべき事は、免疫を司るクッパー細胞を一時的にでも除去することは、実臨床で応用可能か、という問題である。懸念されることのひとつに、免疫を司るクッパー細胞を除去することで生体に影響がでないかどうかということである。実際にマクロファージを抑制すると血中の細菌のクリアランスが低下することがラットでの実験で明らかにされている。しかし、我々は、クッパー細胞除去は下記の3つの点において臨床で許



容しうると考えた。1、クッパー細胞が除去されるのは一時的で、完全に消失するのは3日程度であり、14日で速やかに回復する。2、クロドロネートリポソーム投与後は脾臓や腫瘍周囲のマクロファージに変化を認めず、除去効果は肝臓に限定的であった。3、クッパー細胞除去はドキシル単独投与によってもすでに引き起こされる現象であり、実臨床ですでに使われているドキシル投与後に重症な感染などの副作用が増大するというこ

とは報告されていない。

またもう一つの問題として、クッパー細胞を除去しドキシルの血中濃度が上昇すると、ドキシルによる副作用が増大するのではないかという懸念がある。Luらは、マウスにおいてドキシルを10mg/kgから15mg/kgという我々よりも極めて高い用量で投与し、発症する副作用を検討した。結果として、心筋や消化管粘膜に組織学的な異常は認められず、超高用量でも副作用が起きにくい薬剤であることが確認された。本実験は主に、ドキシル1.25mg/kg投与でのクッパー細胞除去効果を明らかにしたものであり、その際の濃度上昇も3倍であることを考えると、この実験系でドキシルの血中濃度が上昇しても副作用の増加は起こりにくいと考えた。

本提案は、肝臓のクッパー細胞を一時的に除去する事により、ナノ粒子製剤の非特異的な食食を抑制し、抗がん治療薬の血中濃度を上昇させ、抗腫瘍効果を高めることを明らかにした。ナノ粒子のDDS研究は主に表面修飾の改良に重点がおかれているが、我々の戦略は生体環境を変えることで腫瘍送達を増強するという新たなアプローチである。この技術が膵癌をはじめとした難治性癌の治療に応用されることを期待する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- (1) Akashi Y, Oda T, Ohara Y, Miyamoto R, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, Kobayashi A, Fukunaga K, Ohkohchi N. Histological advantages of the tumor graft: a murine model involving transplantation of human pancreatic cancer tissue fragments. *Pancreas* 2013 in press 査読有
- (2) Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, Kobayashi A, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N. Effective delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. *Int J Cancer*. 131, 2402-10, 2012 査読有 DOI: 10.1002/ijc.27502.
- (3) Takahashi K, Sasaki R, Oshiro Y, Fukunaga K, Oda T, Ohkohchi N. Well-differentiated endocrine carcinoma originating from the bile duct in association with a congenital choledochal cyst. *Int Surg*. 97, 315-20, 2012 査読有 DOI: 10.9738/CC152.1
- (4) Nowatari T, Kobayashi A, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Recognition of other organ involvement might assist in the differential diagnosis of IgG4-associated sclerosing cholangitis without apparent pancreatic involvement: report of two cases. *Surg Today*. 42, 1111-5, 2012 査読有 DOI: 10.1007/s00595-012-0278-6
- (5) Murata S, Onozawa S, Oda T, Mine T, Ueda T, Kumita S, Nomura K. Pharmacologic advantages of negative-balance isolated pelvic perfusion: achievement of intensive exposure of the pelvis to platinum without systemic leakage. *Radiology*. 262, 503-10, 2012 査読有 DOI: 10.1148/radiol.11102453
- (6) Kobayashi A, Oda T, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N. Invasion of the hepatic artery is a crucial predictor of poor outcomes in gallbladder carcinoma. *World J Surg*. 36, 645-50, 2012 査読有 DOI: 10.1007/s00268-011-1413-z.
- (7) Kishimoto M, Minagawa M, Yanagihara H, Oda T, Ohkouchi N, Kita E. Synthesis and magnetic properties of platelet  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles for medical applications using hysteresis-loss heating. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 324, 1285-9, 2012 査読有
- (8) Ikeda N, Murata S, Maruyama T, Tamura T, Nozaki R, Kawasaki T, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Homma M, Ohkohchi N. Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell: In vitro study. *Hepatol Res*. 42, 91-102, 2012 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00893.x.

[学会発表] (計7件)

- (1) 明石義正, 膵癌組織片移植モデルの有用性 —細胞株移植モデルとの組織学的特徴および薬剤送達の比較による検証—, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日~9月21日, ロイトン札幌(札幌)

- (2) 大原佑介, 膵内分泌腫瘍と膵 solid-pseudopapillary neoplasms の免疫組織学的検討, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日~9 月 21 日, ロイトン札幌 (札幌)
- (3) 宮本良一, 固形腫瘍における腫瘍血管内皮細胞の分離培養および、その腫瘍血管透過性の評価, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日~9 月 21 日, ロイトン札幌 (札幌)
- (4) 明石義正, 膵癌における Neuropilin-1 発現の意義、およびそれを標的とした腫瘍透過性亢進ペプチド (iRGD) による新規治療の可能性, 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日~2012 年 7 月 20 日, 富山国際会議場 (富山)
- (5) 明石義正, 腫瘍浸透ペプチドを用いた膵癌への薬剤集積増強法, 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日~2012 年 4 月 14 日, 幕張メッセ (千葉)
- (6) Ohara Y, Enhanced delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host Kupffer cells. 2011 Nano in Cancer: Linking Chemistry, Biology, and Clinical Applications In Vivo. 2012 年 1 月 12 日~1 月 15 日, Miami, U. S. A.
- (7) 大原佑介, 膵癌臨床検体における CD44/CD24/ESA 陽性細胞の組織学的意義, 第 70 回日本癌学会学術集会, 第 70 回日本癌学会学術集会, 2011 年 10 月 3 日~10 月 5 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 竜也 (OTA TATSUYA)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 20282353