

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790433

研究課題名(和文) ナノDDS血管外移行の分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms in extravasation of nanoDDS

研究代表者

狩野 光伸 (Kano, Mitsunobu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80447383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管の形質も腫瘍難治性の一因であることを代表者らは明らかにし、腫瘍血管の性質を制御してナノDDSの薬効を向上させることを試み、既に膵癌・胃癌の動物モデルにおいて治療効果増大が見られることを証明した。この分子メカニズムとして、本研究では新生血管においてのみ高い発現が見られ、内皮細胞・壁細胞の安定化に重要であることが示唆されている分子に着目して解析を行い、この分子が重要な説明因子であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We have shown that characteristics of tumor vasculature can determine the intractability of tumors, and that manipulation of the vasculature characteristics can improve the efficacy of nanoDDS in the animal models of pancreatic and gastric cancers. In this study we focused on a protein, known to be expressed in neovasculature and stabilizing endothelial-mural cell attachment. The protein was suggested to play an important role in the mechanism of extravasation of nanoDDS from tumor vasculature.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍血管 ナノDDS

## 1. 研究開始当初の背景

外科療法が適応外であるような進行した膵癌やスキルス胃癌、あるいは脳腫瘍、転移性肝癌など、難治性固形癌の治療は困難を極める。これまでの腫瘍研究では、これらの難治性の原因を、腫瘍細胞の性質に起因させる方法論で主に進められ多大な成果が挙げられている一方、固形腫瘍は腫瘍細胞以外にも腫瘍間質と称される、血管・線維組織などから構成されており、これらの要素が互に関連しあって腫瘍組織を形作っていることが、明らかにされつつある。特に難治性固形腫瘍では、これら間質のうち血管の形質も難治性の原因を形成していることが代表者らによって明らかにされてきた。実験的には、ナノ DDS は難治性固形腫瘍に対しても治療効果の高い薬剤となることが期待されてきたが、実地臨床では実現が十分でなく、その原因はまだ十分に解明されていない。代表者らは腫瘍血管の性質を制御することでナノ DDS の蓄積を向上させることを試み、既に膵癌・胃癌の動物モデルにおいて、TGF- 阻害剤を用いた血管新生制御の併用によってナノ DDS の効果増大が見られることを証明した (Kano et al. PNAS, 2007)。

このメカニズムとして、これまでに代表者は、新生血管の壁細胞被覆程度の違いが、ナノ DDS の漏出性の違いに寄与することを示した (Kano et al. Cancer Sci., 2009 ほか)。つまり、膵癌では、TGF- 阻害剤によって、腫瘍血管の壁細胞の被覆の程度が減少し、よりナノ DDS が漏出して腫瘍に蓄積する。このように、壁細胞を減少させた方がナノ DDS が蓄積するという方法論は、適応可能な腫瘍の種類が拡大したために、将来臨床的にも重要な意味を持つてくることが期待される。一方で、これまでナノ DDS の薬効評価に頻用されている C26 大腸癌モデルではもともと壁細胞被覆が少なく、この場合には TGF- 阻害剤ではなく VEGF 阻害剤を併用した場合にナノ DDS がより蓄積するという結果が得られた。すなわち、腫瘍の血管構築に応じた対応が必要であることが示唆されている。

しかしながら、いずれの方法論が対象の腫瘍にふさわしいかを予測するための指標は壁細胞被覆程度のみであり、しかもその詳細な分子メカニズムは未だ不明であった。これについて、本研究では、内皮細胞に関連する分子メカニズムとナノ DDS の挙動の関連について明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、われわれがすでに明らかにしてきた、ナノ DDS の漏出性と新生血管の分子標的薬による制御の関連に対して、さらに詳細なメカニズム解析を試みた。動物モデルに加え、in vitro チャンバーにおける血管内皮細胞と壁細胞の共培養によりバリア機能を

解析する方法論も確立した。これらの方法により、増殖因子や壁細胞被覆による内皮細胞関連分子メカニズムの制御を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

難治癌モデルでは、TGF- 阻害剤投与によって壁細胞被覆の程度が減少するほど、ナノ DDS の蓄積が多いという知見が得られた。一方で、元来壁細胞の少ない癌モデルでは、VEGF 阻害剤の併用で壁細胞の被覆を増加させ、血管を「正常化」させるとナノ DDS の蓄積が増強した。すなわち、もともと壁細胞被覆が多い腫瘍モデル (膵癌、スキルス胃癌、悪性膠芽腫など) では TGF- 阻害剤が壁細胞被覆を低下させると同時に高分子デキストラン (分子量 2,000,000、流体力学的推定直径が約 50nm の分子) の蓄積を増強し、逆にもともと壁細胞被覆が少ない腫瘍モデル (大腸癌などを含め大部分のモデル) では VEGF 阻害剤が壁細胞被覆を増やすと同時にやはり高分子デキストランの蓄積を増強するという、壁細胞被覆の程度とナノ DDS の蓄積の関係性の観点からは一見矛盾するデータが得られている。

このことを説明するにあたり、本研究では、新生血管においてのみ高い発現が見られ、内皮細胞 壁細胞の安定化に重要であることが示唆されている分子 P\* に着目して、in vitro, in vivo 両方の解析を行った。

## 4. 研究成果

前述の通り、新生血管においてのみ高い発現が見られ、内皮細胞 壁細胞の安定化に重要であることが示唆されている分子 P\* に着目して解析を行った。その結果、BxPC3 ヒト膵癌皮下腫瘍モデルにおいて、TGF 阻害を行った個体では P\* 陽性血管が減少し、さらに血管における P\* 染色性とナノ粒子の腫瘍内貯留が逆相関する可能性を見出した。これまで、内皮細胞間の細胞間接着には Claudin5 と VE-cadherin などが、また血管内皮細胞 壁細胞間の細胞間接着を担う分子としては、主に N-cadherin が注目されてきたが、本研究の結果から、これらに加えて P\* 分子がナノ粒子漏出性の機能的マーカーとなる可能性が示唆された。

その発現制御メカニズムを明らかにするために、in vitro モデル細胞としてマウス内皮細胞 MS1 を用いた解析の結果、TGF シグナル依存的に P\* の mRNA・タンパク質発現が上昇する結果を得た。この発現変化は、播種密度および TGF 刺激時間により差がみられ、P\* 発現制御は内皮細胞のおかれる局所環境により精密に制御されていると考えられる。これらの知見から、TGF 阻害により増強する漏出性は P\* の発現低下により説明され、すなわち P\* が新生血管における漏出性を規定

する分子である可能性が示唆されてきた。

これらと並行し、ヒト腫瘍病理標本を用いて、膵癌、胃癌（通常・スキルス）、大腸癌、卵巣癌において壁細胞被覆程度を免疫染色によって解析し、膵癌・スキルス胃癌は壁細胞被覆が多く、他は少ないことが示された。この結果は、これら腫瘍の難治性の程度と関連しており、腫瘍難治性が薬剤送達性によっても影響されていることが示唆された。

P\*は、これまでに、安定化した既存血管では発現が低く、新生血管においてのみ壁細胞との接着に関与していることが報告されている。本研究で得られた知見と合わせると、内皮細胞と壁細胞との接着状態は段階的に推移し、その段階によって血管漏出性が変化するのでないかと推測された。

引き続き、P\*とナノ粒子漏出性に関する解析を行った。炎症環境下でP\*の発現は増強しており、BxPC3 ヒト膵癌皮下腫瘍モデルにおいてもP\*陽性血管は多くみられる。一方、P\*細胞外ドメインの分解によっても説明されるため、P\*の分解についても解析を行った。in vitro モデル細胞としてヒト内皮細胞 HUVEC および HMVEC、およびマウス内皮細胞 bEnd3 を用いた解析を行った結果、炎症性シグナル依存的にP\*を発現上昇させた後のTGFシグナル抑制により、P\*細胞外ドメインの切断が増加することが明らかになった。

さらに、切断を受けた結果細胞表面から産生される遊離型のP\*細胞外ドメインにより、内皮細胞間の細胞間接着に重要であるClaudin5の発現が減少することが示唆された。FITC標識デキストランを用いた透過性解析の結果、P\*細胞外ドメインにより処理された血管内皮細胞では透過性が亢進することも明らかになった。

これらの知見より、P\*陽性内皮細胞におけるTGFシグナルの抑制が、(1)壁細胞接着の減少と、(2)内皮細胞での直接的な漏出性制御という両面から、ナノ粒子送達性の増強をもたらしていることが示唆された。

そこでP\*細胞外ドメインによる内皮細胞漏出性の直接的な制御について検討をすすめた。その結果、すでに全長P\*の結合分子として知られているP\*\*の発現を抑制すると、P\*細胞外ドメインによる透過性への影響が逆になり、透過性の亢進が確認された。さらに、P\*\*が発現しない内皮細胞では、P\*細胞外ドメインにより透過性が亢進した。以上から、P\*細胞外ドメインがP\*\*発現細胞においてのみ、透過性を亢進する作用を有するという結果を得た。

以上により、P\*がTGFシグナル制御によるナノDDS血管外移行を増大させる事象の分子メカニズムにおいて重要な説明因子であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

1. Kano MR. Nanotechnology and tumor microcirculation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013, in press.
2. Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier. *ACS Nano*. 2013, in press.
3. Cabral H, Murakami M, Hojo H, Terada Y, Kano MR, Chung UI, Nishiyama N, Kataoka K. Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(28):11397-402.
4. Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki I, Kataoka K. SPI0-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPI0-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsomes). *J Control Release*. 2013;169(3):220-7.
5. Harada M, Iwata C, Saito H, Ishii K, Hayashi T, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Kato Y, Kano MR. NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:2713-27.
6. Zhang L, Nishihara H, Kano MR. Pericyte-coverage of human tumor vasculature and nanoparticle permeability. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35(5):761-6.
7. Chen Q, Osada K, Ishii T, Oba M, Uchida S, Tockary TA, Endo T, Ge Z, Kinoh H, Kano MR, Itaka K, Kataoka K. Homo-cationic integration into PEGylated polyplex micelle from block-cationic for systemic anti-angiogenic gene therapy for fibrotic pancreatic tumors. *Biomaterials*. 2012; 33(18):4722-30.
8. Yuzawa S, Kano MR, Einama T, Nishihara H. PDGFR expression in tumor stroma of pancreatic adenocarcinoma as a reliable prognostic marker. *Med Oncol*. 2012; 29(4):2824-30.

9. Rafi M, Cabral H, Kano MR, Mi P, Iwata C, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. J Control Release. 2012; 159(2):189-96.

10. Hosoya H, Kadowaki K, Matsusaki M, Cabral H, Nishihara H, Ijichi H, Koike K, Kataoka K, Miyazono K, Akashi M, Kano MR. Engineering fibrotic tissue in pancreatic cancer: a novel three-dimensional model to investigate nanoparticle delivery. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 419(1):32-7.

11. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. Nat Nanotechnol. 2011; 6(12):815-23.

12. Vachutinsky Y, Oba M, Miyata K, Hiki S, Kano MR, Nishiyama N, Koyama H, Miyazono K, Kataoka K. Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. J Control Release 2011; 149: 51-57.

13. Oba M, Miyata K, Osada K, Christie RJ, Sanjoh M, Li W, Fukushima S, Ishii T, Kano MR, Nishiyama N, Koyama H, Kataoka K. Polyplex micelles prepared from omega-cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. Biomaterials 2011; 32: 652-663.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases、Kano MR、国際膵臓フォーラム、仙台、口頭発表(招待) 2013.7.

2. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases、Kano MR、The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '13)、大阪、口頭発表(招待) 2013.7.

3. Use of nanoparticle to analyze

vasculature in diseases、Kano MR、International Workshop on Biointerface and Biomedical Engineering, 2013 “Opening New Field of Biology through Cutting-edge Technologies”、岡山、口頭発表(招待) 2013.3.

4. Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases、Kano MR、IEEE nanomed 2012、タイ バンコク、口頭発表(招待) 2012.11.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

狩野 光伸(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究者番号: 80447383

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし