

ドラッグデリバリーと関連技術(第1回)

ナノ粒子製剤を用いたがん治療： 敵を知ることの重要性

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

薬物動態制御学分野

大河原賢一



はじめに

近年の抗がん剤研究開発の進歩により、小児がん、白血病、絨毛がんなど一部のがんに対して十分な治療効果が期待できる薬剤が登場してきた。反面、年間30万人を超えるがん死亡者の大半を占める胃がん、大腸がん、肺がんなどの固形がんに関しては、十分な効果を示す治療薬が確立されたとは言い難い状況である。克服すべき課題のひとつとして、抗がん剤の作用の非特異性が挙げられる。現状の抗がん剤は、がん細胞の高い増殖性に着目し、主にDNAの生合成あるいはその複製の阻害に基づいているため、骨髄細胞、神経細胞、毛母細胞など、増殖が盛んな正常細胞への作用が切り離せず、それらは時としてがん化学療法における重篤な副作用として表出することが知られている。そこで投与部位から作用発現部位にいたるまでの薬物の動きを、各種の技術で制御することにより、副作用を低減し、且つ最適な治療効果を得る投与形態の開発により、現在、「薬物投与の最適化」を目指した数多くのDDS技術の開発が進められている¹⁾。上述したように、現行のがん化学療法の抱える問題点は、主に抗がん剤の作用の非特異性に起因するものであるため、DDS技術を利用することにより抗がん剤の体内動態を適切に制御することが出来れば、主作用(抗腫瘍効果)の増大のみならず、種々の副作用の低減にも繋がるため、抗がん剤を用いたがん化学療法の質を劇的に改善可能となる。

EPR効果を利用したナノ粒子製剤の抗腫瘍効果決定因子の解析

固形がんの腫瘍組織では、腫瘍の増殖に必要な酸素や栄養分を獲得するために血管網の構築が盛んに行われている(血管新生)。しかし、そこで構築される新生血管網は分岐が多く、また血管壁に小孔を有した構造をしているうえ、組織中の様々な老廃物の除去を司るリンパ系の発達が不十分であるという特徴を併せ持つことから、腫瘍組織では比較的大きな物質も血液中から間質へと漏出し、漏出したものはリンパ系による回収を受けることなく腫瘍組織内に蓄

積するというEnhanced Permeability and Retention Effect(EPR効果)が認められる²⁾。この腫瘍組織の特性により、ナノ粒子に薬物を封入することで、腫瘍組織内への内封薬物の到達性及び滞留性を改善可能であることが知られており、これまでEPR効果を利用した腫瘍組織への移行の駆動力となるナノ粒子投与後の血中滞留性の改善に主眼を置き、数多くのナノ粒子製剤の設計・開発が試みられてきた。

しかしながら、抗がん剤内封ナノ粒子製剤の抗腫瘍効果は、ナノ粒子の血中滞留性のみならず、がん種固有の微小環境に依存したナノ粒子の腫瘍組織移行性、ナノ粒子あるいは内封薬物の腫瘍組織内における局所動態、更には用いた抗がん剤に対するがん細胞の感受性など、多くの因子が複雑に絡み合って決定されていると考えられる。そこで著者らは、臨床応用もされているドキシソルビシン内封PEG修飾リポソーム(PL-DOX)をモデルナノ粒子製剤として選択し、その抗腫瘍効果に影響を与える諸因子を系統的に検討することにより、実質的な抗腫瘍効果決定因子の解析を試みた³⁾。

由来の異なる3種類のがん細胞Colon-26(C26)、B16/BL6(B16)、Lewis Lung Carcinoma(LLC)を選択し、これらがん細胞のDOXに対する感受性を評価したところ、DOXに対する感受性はLLCが最も高く、C26が最も低いことが明らかとなった。一方、これらのがん細胞をマウス背部皮下に移植することにより作製した固形がんモデルマウスを用いて、PL-DOX静脈内投与後の腫瘍増殖抑制効果を評価したところ、“*in vitro*”においてDOXに対する感受性が最も低いことが示されていたC26腫瘍において、最も高い抗腫瘍効果が、“*in vivo*”において認められた。本結果は、実際の抗腫瘍効果には、がん細胞の抗がん剤に対する感受性のみならず、体内動態を含む、その他の要因が関与していることを強く示唆するものであった。

そこで*in vivo*抗腫瘍効果に影響を与える要因として、PL-DOXの腫瘍組織への移行性に着目し、静脈内投与後のPEGリポソームの移行量を評価したところ、用いた3種類の腫瘍組織の中で、C26腫瘍への移行量が最も高く、この結果は*in vivo*抗腫瘍効果と対応したものであった。そこでEPR効果によるPEGリポソームの腫瘍組織への分布・蓄積性に影響を及ぼす因子として、腫瘍組織内の血管分布性、血管透過性に着目し、種々評価を加えたところ、顕著な抗腫瘍効果が認められたC26腫瘍組織においては、微細な血管が組織全体に分布し、それら血管の透過性が高いことが明らかとなった。これらの結果より、EPR効果を利用したナノ粒子製剤の抗腫瘍効果には、内封抗がん剤に対するがん細胞の感受性のみならず、ナノ粒子の腫瘍組織へのデリバリー効率が実質的な支配因子として機能していること、またナノ粒子の腫瘍組織へのデリバ

リー効率に影響を与える重要な因子として、ナノ粒子の血中滞留性のみならず、がん種に依存した腫瘍組織内の血管透過性と血管密度が挙げられることを明らかにした。

抗がん剤に耐性を獲得した腫瘍に対する新規治療戦略

一般に、抗がん剤は副作用軽減のため、低投与量で長期に渡り使用されるが、多くの場合、投与開始初期には抗がん剤に対して高い感受性を示すがん細胞が、継続的な投与により抗がん剤に対する耐性を獲得し、薬物の有効性が徐々に低下することが知られている。この抗がん剤の長期的な暴露によるがん細胞の耐性化は、現在、臨床でのがん化学療法における重大な問題のひとつと考えられている。がん細胞の耐性獲得メカニズムとしては、様々なものが提唱されているが、中でも薬剤排出トランスポーター P-糖タンパク質 (P-gp) の発現誘導が主要な機構であると考えられている。そこで著者らは、P-gp を高発現するがん細胞耐性株を樹立し、その耐性株を用いて *in vivo* 抗腫瘍効果の改善を目指し、研究に着手した⁴⁾。本検討では P-gp の基質として知られている抗がん剤パクリタキセル (PTX) をモデル抗がん剤として選択し、まず PTX に対する C26 耐性株の樹立を目指した。培養液中の PTX 濃度を段階的に増大させながら C26 を培養することにより、PTX に耐性を示す C26 耐性株の樹立に成功した。また耐性の機構が、細胞膜上に高発現した P-gp 機能によるものであることも確認できた。そこで、この耐性株により作製した固形がんモデルマウスにおける PTX 内封 PEG 修飾リポソーム製剤 (PL-PTX) の抗腫瘍効果を検討したところ、培養細胞を用いた *in vitro* 条件下における結果とは異なり、感受性株と同程度の高い *in vivo* 抗腫瘍効果が認められた。そこで著者らは、耐性株において認められた *in vivo* 抗腫瘍効果に、PTX のがん細胞に対する直接作用以外の機序が関与しているのではないかと考え、腫瘍の増殖に不可欠なプロセスである血管新生において中心的な役割を演じている血管内皮細胞に着目し、検討を加えた。PL-PTX 投与後初期において、腫瘍組織内でアポトーシスを起こしている細胞と血管内皮細胞を蛍光二重免疫染色により検出したところ、耐性がんモデルマウス腫瘍組織内では、アポトーシスを起しているがん細胞数が顕著に少ない一方で、血管内皮細胞とアポトーシスを起している細胞の分布が一致している特徴的な箇所が高い割合で認められた。この結果は、PTX による腫瘍組織内血管内皮細胞に対する殺細胞効果が、耐性がんモデルマウスにおいて認められた高い *in vivo* 抗腫瘍効果に関与していることを示唆するものであった。以上の結果から、PTX 耐性がんモデルマウスにおいて認められた PL-PTX の高い *in vivo* 抗腫瘍効果発現メカニズムとして、著者らは以下のような推察を行っ

た。即ち、腫瘍間質中に漏出した PTX は、細胞内に流入後、直ちに細胞膜上に高発現した P-gp により細胞外に排出される為、結果的に高濃度の PTX が腫瘍間質中に滞留すると考えられる。その結果、PTX が腫瘍組織内血管内皮細胞に対して強く作用し、血管新生が阻害された結果、酸素や栄養分等の供給が断たれ、腫瘍増殖の抑制へと繋がったものと考えた。これら一連の結果は、耐性克服を目的としたがん化学療法における、抗がん剤内封ナノ粒子製剤の新たな有用性を示唆すると共に、がん治療における標的細胞として、腫瘍組織内血管内皮細胞を選択することの合理性を示すものであった⁴⁾。

血管正常化説とそれに立脚した新規治療戦略

上述した腫瘍内血管内皮細胞を標的としたアプローチは、所謂、「兵糧攻め」を基盤とした戦略であるが、近年、腫瘍内新生血管を退縮・破綻させるのではなく、異常な血管を正常な血管に近づけることにより、がん化学療法の治療効果を高めようとする新しいコンセプトが提唱され、注目を集めている⁵⁾。腫瘍組織内の新生血管は構造的・機能的に不完全であり、且つその分布には偏りがある為、腫瘍組織内の血流は不均一であることが知られているが、このコンセプトでは、この新生血管の構造的・機能的不全が抗がん剤の効率的な腫瘍組織内送達を妨げていると考え、“腫瘍組織内部でその分泌が過剰となっている血管内皮増殖因子 (VEGF) によるシグナル伝達を適度に阻害することにより、腫瘍内血管の構造、機能を一部正常な血管へと近づけることが出来る”という「血管正常化説」に基づき、腫瘍内血管の正常化により高い腫瘍内薬物送達が可能となると考えている。そこで著者らは、PTX 内封 PEG 修飾リポソーム製剤 (PL-PTX) の抗腫瘍効果に及ぼす血管新生阻害剤 SU5416 前投与の影響を多面的に評価した⁶⁾。先ず C26 モデルマウスにおける PL-PTX の抗腫瘍効果に対する、SU5416 の PEG 修飾 O/W 型エマルジョン製剤 (PE-SU5416) 前投与の影響を評価した結果、これら製剤の単独投与時と比較して、顕著に高い腫瘍増殖抑制効果が認められた。そこで併用効果の発現メカニズムを解明する為に、先ず、腫瘍切片を用い、腫瘍内血管内皮細胞、及び血管壁細胞を、それぞれのマーカー分子 (CD31, α SMA) に対する蛍光二重染色により検出したところ、併用群では壁細胞被覆を伴う血管の割合が有意に増大していることが明らかとなった。また、腫瘍切片を低酸素マーカー分子である CA9 に対して免疫染色したところ、PE-SU5416 投与群では、腫瘍組織における低酸素領域の有意な減少が認められた。これらの結果は、PE-SU5416 を前投与することで、腫瘍組織内の異常な血管が構造的に改善され、酸素供給を含む血管の機能が向上したことを示唆するものであった。そこで次に PE-SU5416 前投与後の、PL-PTX の腫瘍

組織への移行量を評価したところ、PEG 修飾リポソーム自身、並びに内封 PTX のいずれも、対照群と同程度であった。即ち、PE-SU5416前投与により腫瘍内血管の物質運搬能が向上していると考えられたにもかかわらず、その後投与した PL-PTX の腫瘍組織への送達効率は改善されていないことが明らかとなった。そこで著者らは、腫瘍組織を一つのコンパートメントと捉えていたこれまでの解釈から、腫瘍組織を中心部、及び周縁部に分け分離評価することで、PL-PTX の腫瘍内でのより詳細な分布挙動の解析を試みた。その結果、PE-SU5416を前投与することで、PL-PTX の腫瘍周辺部への分布が若干減少した一方で、腫瘍中心部への分布は有意に上昇することを明らかにした。この結果は、PL-PTX がこれまで腫瘍組織へ送達されていたものの、腫瘍中心部までは十分に到達できておらず、PE-SU5416前投与により、PL-PTX の腫瘍中心部への送達効率が改善したことを示すものであった。以上、これら一連の結果は、PE-SU5416前投与による PL-PTX の抗腫瘍効果増大には、SU5416による腫瘍組織内新生血管の構造特性並びに機能の改善に伴った PL-PTX の腫瘍深部への移行性の向上が一部関与していることを示唆する非常に興味深いものであった⁶⁾。

今後の課題と展望

「固形がん」とは、共通の組織学的な特性を有する画一的な組織ではなく、がん種ごと、更には個体ごとに固有の腫瘍組織内微小環境を有することが明らかとなってきている。したがって、DDS 技術を利用したがん化学療法の最適化のためには、それら固有の微小環境を適切に理解し(敵を知り)、その情報に立脚した治療戦略を立案することが今後益々重要となるだろう。そういった観点から、臨床現場において患者から採取可能な生検サンプルは、患者個々

の腫瘍組織に関する重要な情報源であると考えられ、今後これらを有効に活用するための方法論を確立することが急務であろう。このような「診断技術」と、得られた情報に立脚した「治療方針の決定」という一連の合理的なプロセスが、近い将来、理論的に構築され、がん化学療法治療成績の飛躍的な改善に結びつくことに期待したい。

参考文献

- 1) 橋田 充・高倉喜信共著：生体内薬物送達学(1994)，産業図書。
- 2) Maeda, H., Sawa, T. and Konno, T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J. Control. Release*, **74**: 47-61 (2001).
- 3) Ogawara, K., Un, K., Minato, K., Tanaka, K., Higaki, K. and Kimura, T.: Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors. *Int. J. Pharm.*, **359**: 234-240 (2008).
- 4) Ogawara, K., Un, K., Tanaka, K., Higaki, K. and Kimura, T.: In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells. *J. Control. Release*, **133**: 4-10 (2009).
- 5) Jain, R. K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, **307**: 58-62 (2005).
- 6) Yoshizawa, Y., Ogawara, K., Fushimi, A., Abe, S., Ishikawa, K., Araki, T., Molema, G., Kimura, T. and Higaki, K.: Deeper penetration into tumor tissues and enhanced in-vivo anti-tumor activity of liposomal paclitaxel by pre-treatment with angiogenesis inhibitor SU5416. *Mol. Pharm.*, **9**: 3486-3494 (2012).