

論文の内容の要旨

論文題目 リガンド搭載ナノ製剤による難治性頭頸部扁平上皮癌に対する
治療効果に関する研究

氏名 宮野 一樹

頭頸部扁平上皮癌は、初診時における頸部リンパ節転移症例が多く、そのコントロールが困難でかつ予後に影響してくる事から難治性癌として知られており、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療を施行したとしても、治療後の5年生存率は50%台にとどまっている。構音・発声・咀嚼・嚥下といった機能を担う器官に発生する頭頸部扁平上皮癌の治療にあたっては、生命予後と機能温存の両側面を達成する事が求められるため、放射線化学療法の治療成績が向上した現在においては、機能温存、転移制御の観点から放射線化学療法が選択される事が増えてきているが、治療中に放射線化学療法に耐性を示す事もあり、また、放射線化学療法施行中の急性期有害事象である治療部位の粘膜炎、疼痛による摂食障害により、治療の完遂が出来ない場合も少なくない。よって、放射線化学療法に対する耐性獲得機構の克服、治療の副作用（有害事象）低減による治療の完遂が達成出来れば、頭頸部扁平上皮癌の治療成績、予後の改善が期待される。近年、がんの浸潤、転移に関する分子機構の解析が盛んに行われているが、がんの治療耐性、転移に関して、がん幹細胞が寄与しているという報告もあり、特に頭頸部扁平上皮癌では細胞外基質と結合する接着分子で細胞膜表面に発現する糖蛋白質のCD44が、がん幹細胞マーカーとして知られている。その中でも、CD44バリエーションアイソフォーム（CD44v）の発現が遠隔転移と関連する事が報告されており、CD44vが細胞膜上でシスチントランスポーターのサブユニットであるxCTと結合しシスチンの取り込みを活性化させ、グルタチオンの生成を促進する事で活性酸素の蓄積に抑制的に作用しており、この事ががん幹細胞の特性の一つである酸化ストレス抵抗性の獲得に関与していると考えられている。申請者の所属する研究室では、ナノテクノロジーを応用したドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発を行っており、そこで開発された抗がん剤内包高分子ミセルは、ミセル合成過程においてnmサイズでのミセル粒子径の調節が可能であり、その最適化されたミセル粒子径（30nm）により、腫瘍組織の新生血管の隙間構造、血管透過性を利用したenhanced permeability and retention（EPR）効果により選択的に腫瘍組織へと到達した後に、エンドサイトーシスによりがん細胞に侵入し、内包された抗がん剤が徐々にミセルから放出され核内に送達される。その結果、正常組織へのダメージが少なく、従来の抗がん剤で懸念事項となっている副作用が軽減され、更には抗がん剤が腫瘍細胞核へと効率よく送達される事により、優れた抗腫瘍効果を得る事が可能となり、治療耐性獲得を回避する事も期待できる。

本研究では、これら従来型のEPR効果を利用したパッシブターゲティング（受動的ターゲティング）型の抗がん剤内包高分子ミセルをさらに改良し、腫瘍細胞や新生血管におい

て過剰発現している $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンをターゲットとするアクティブターゲティング（能動的ターゲティング）型の抗がん剤内包高分子ミセルを開発し（図 1）、難治性頭頸部扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を検証した。具体的には、シスプラチン（CDDP）を内包した高分子ミセル（シスプラチンミセル：CDDP/m）に、 $\alpha v \beta 3$ インテグリン、 $\alpha v \beta 5$ インテグリンと親和性の高い環状型 RGD ペプチド（cRGD ペプチド）をリガンドとして用いた「cRGD 搭載シスプラチンミセル」(cRGD-CDDP/m) を新規合成し（図 2）、ヒト舌癌リンパ節高転移能を有する細胞株（SAS-L1）のルシフェラーゼ（Luc）発現株（SAS-L1-Luc）に対する cRGD-CDDP/m の効果を検証した。更に、ヒト舌癌同所移植マウスモデル、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルを確立し、cRGD-CDDP/m の腫瘍組織への集積性、抗腫瘍効果を検証した。

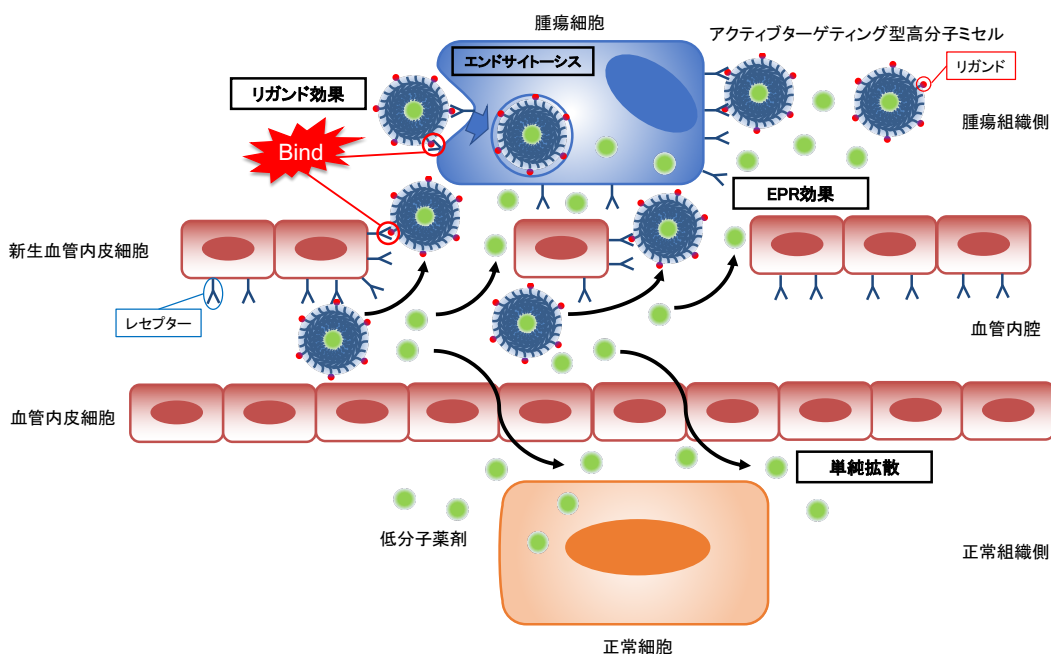


図 1. アクティブターゲティング型高分子ミセルの全身投与から標的部位までの薬剤送達経路

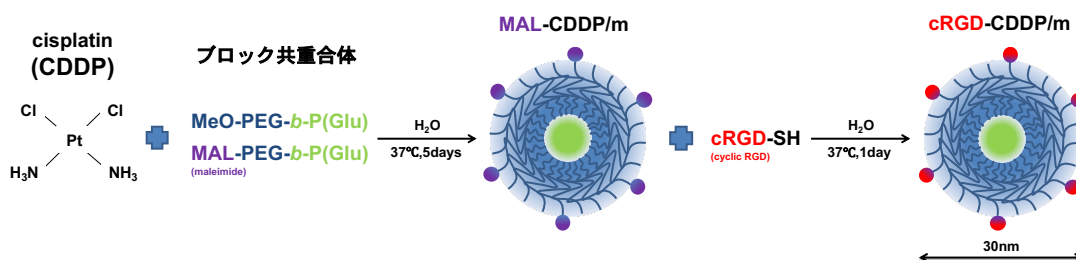


図 2. cRGD 搭載シスプラチン内包高分子ミセル（cRGD-CDDP/m）とその調整方法

in vitro 実験においては、SAS-L1-Luc 細胞株の $\alpha\beta3$ インテグリン、 $\alpha\beta5$ インテグリンの発現を解析した結果、 $\alpha\beta5$ インテグリンの過剰発現が確認された。また、がん幹細胞マーカーの一つである CD44v9 の発現を解析した結果、SAS-L1-Luc 細胞株で過剰発現が認められ、CD44v9 陽性細胞集団のうち 96%程度に $\alpha\beta5$ インテグリンの発現が認められた。この結果より、cRGD-CDDP/m が $\alpha\beta5$ インテグリンを介し、CD44v9 を発現するがん幹細胞に効果的に作用する事が予想されたため、SAS-L1-Luc 細胞株における CD44v9 陽性細胞に対する CDDP/m、cRGD-CDDP/m の効果を検証した。その結果、cRGD-CDDP/m は CDDP/m と比較し、SAS-L1-Luc 細胞株における CD44v9 の発現を有意に減少させ、薬剤濃度を上げるとその差は顕著であった。in vivo 実験においては、まず本研究において樹立された SAS-L1-Luc 細胞株を用いて、ヒト舌癌同所移植マウスモデル、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルを確立し、IVIS imaging system にて腫瘍組織からの発光強度を継時的に測定する事で、投与薬剤の抗腫瘍効果を判断する評価系を確立した。それらのマウスモデルを用い CDDP、CDDP/m、cRGD-CDDP/m の血中滞留性、舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節における薬剤集積性について、ICP-MS を使用した誘導結合プラズマ質量分析法により、循環血漿、舌腫瘍、転移リンパ節、正常リンパ節内の薬剤プラチナ (Pt) の定量を施行する事で評価した。その結果、cRGD-CDDP/m (半減期 ($T_{1/2}$): 5.0 時間) と CDDP/m ($T_{1/2}$: 5.5 時間) 両者の血中滞留性は、CDDP の血中滞留性と比較しはるかに優れており、薬剤投与後 24 時間において CDDP/m は、血漿 1ml あたりに投与量の約 15%程度が残存していた。そこで、それぞれの薬剤における $AUC_{0-24h} [(\%dose/ml) \cdot h]$ (area under the blood concentration-time curve) を算出した結果、CDDP/m の AUC_{0-24h} (828 ± 44.3) と cRGD-CDDP/m の AUC_{0-24h} (648 ± 68.9) は、CDDP の AUC_{0-24h} (45.3 ± 2.28) に比し顕著に高値であり、CDDP/m と cRGD-CDDP/m の間には統計学的有意差が認められた。同所舌腫瘍における cRGD-CDDP/m と CDDP/m の薬剤集積性は、CDDP の薬剤集積性と比較しはるかに優れており、特に cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤投与早期より優れた腫瘍への集積を示した。転移リンパ節においても、cRGD-CDDP/m と CDDP/m の薬剤集積性は CDDP の薬剤集積性と比較しはるかに優れており、その中でも薬剤投与後 1 時間においては、cRGD-CDDP/m は CDDP/m に比し薬剤集積性が顕著に優れていた。この現象を可視化する為に、Alexa555 にて蛍光標識をした cRGD-CDDP/m、Alexa647 にて蛍光標識をした CDDP/m を新規合成し、リアルタイム生体内共焦点レーザー顕微鏡 (in vivo confocal laser scanning microscopy : IVCLSM) を用いて、薬剤投与早期に舌腫瘍、転移リンパ節に集積する cRGD-CDDP/m の挙動を確認した。これらの結果より、cRGD-CDDP/m は特に薬剤投与早期における転移リンパ節への集積性に優れている事が判明したため、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルにおける抗腫瘍効果を検証した結果、転移リンパ節に対する抗腫瘍効果、転移抑制効果に優れており、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルの生存期間の延長が認められた。この cRGD-CDDP/m が発揮する優れた抗腫瘍効果の解明のために、ヒト舌癌リンパ節転移マウスモデルの転移リンパ節、正常リンパ節組織におけるインテグリンの発現を、免疫組織化学的蛍光染色法を用い共焦点レーザー顕微鏡システムにて解析

した結果、転移リンパ節の正常領域、正常リンパ節において RGD 配列を認識する $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの発現が確認された。よって cRGD-CDDP/m は、転移リンパ節において、SAS-L1-Luc 細胞株に発現する $\alpha v \beta 5$ インテグリン、腫瘍新生血管内皮細胞に発現する $\alpha v \beta 3$ インテグリン、転移リンパ節の正常領域に発現する $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの3つをターゲットとする事で、優れた抗腫瘍効果、転移抑制効果、薬剤集積性を示したと考えられた。

アクティブターゲティング型の抗がん剤内包高分子ミセルは、ミセルに搭載するリガンド分子の種類により、多種多様な標的志向性を付与する事が可能となる。本研究では、CDDP/m に cRGD をリガンドとして搭載する事で、特にリンパ節転移に対する治療効果が向上する事を立証した。現在頭頸部扁平上皮癌治療において、リンパ節への微小転移については、術前画像検査にて検出できない場合もしばしば認められ、早期舌癌のハイリスク群においては予防的頸部郭清術が施行されている。今後 cRGD-CDDP/m が臨床応用される場合には、転移リンパ節における抗腫瘍効果のみならず、微小転移の可能性があるリンパ節における転移成立阻止効果により、頭頸部扁平上皮癌の治療戦略において既存の予防的頸部郭清術に取って代わる革新的な DDS 製剤となる事が期待される。