

論文の内容の要旨

論文題目

大腸癌肝転移に対するダハプラチン内包ミセル製剤の効果と副作用

氏名 仁禮 貴子

【背景・目的】

近年、大腸癌の罹患者数は日本においても世界的にも増加傾向にある。大腸癌患者のなかで、根治的切除の適応がない切除不能・転移再発大腸癌に対しては、全身化学療法が有効である。大腸癌の全身化学療法に用いられる抗癌剤は、1950年代の5-フルオロウラシルの開発に始まり、イリノテカン、シスプラチン、オキサリプラチンなどが開発された。1990年代後半に多剤併用療法である、FOLFIRI療法の有効性が示され、2000年代にFOLFOX療法が発表されると、その後に登場した分子標的治療薬と併せて、切除不能再発転移大腸癌患者の生存期間中央値は、現在2年半まで改善した。切除不能大腸癌の遠隔転移臓器の内訳では肝臓が最多であるが、多剤併用療法により、切除不能であった肝転移が化学療法後に切除可能となる報告が増加した。一方で、全身化学療法には副作用があるため、十分な治療効果が得られない原因となっている。オキサリプラチンは白金系の抗癌剤であり、DNA内に白金-DNA架橋を形成することで、DNAの複製および転写を阻害する。オキサリプラチンに特徴的な副作用としては、末梢神経毒性や、アナフィラキシー反応、ブルーリバー症候群などが知られている。抗癌剤の副作用を軽減し、抗腫瘍効果を高める技術として、ナノテクノロジーが注目されている。固形癌の組織内に見られる新生血管は、正常血管と異なっており、①血管壁の物質透過性が亢進し、より高分子のナノ粒子を血管外に放出できること、②腫瘍組織では老廃物を排除するリンパ系器官が未発達であるために、組織に浸透した物質がより長く組織内にとどまりやすいこと、が共通して認められる。1986年に松村らにより報告されたこの2つの性質は、**enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)**とよばれ、抗癌剤をナノ粒子化し、腫瘍組織に選択的に輸送する技術に応用されている。現在、リポソーム、高分子-薬剤複合体、ナノ粒子、デンドリマー、高分子ミセルなどがナノキャリアとして開発されており、中でも親水性のポリエチレングリコール (PEG) の外殻をもつ高分子によりナノ粒子化された抗癌剤は、臨床試験段階に入っている。その中のひとつに、オキサリプラチンの活性錯体であるダハプラチンをナノ粒子化した、ダハプラチンミセルがある。ダハプラチンミセルは、マウス大腸癌皮下腫瘍モデルでのオキサリプラチンよりも高い抗腫瘍効果が認められている。しかし、大腸癌肝転移に対しての抗腫瘍効果についての検討はまだ不十分である。

今回われわれは、マウス大腸癌肝転移モデルを作成し、オキサリプラチンとダハプラチ

ンミセルを用いて、副作用および抗腫瘍効果を比較検討した。

【方法】

BALB/c マウス・メス・6 週齢を購入し、全身麻酔を施した上で開腹し、マウス大腸癌細胞株 colon 26 を脾臓に注射投与し、マウス大腸癌肝転移モデルを作成した。細胞株の脾注後 2 週間で、高い再現性をもって肝転移が作成できた。まず、第一実験としてダハプラチンミセルの副作用と抗腫瘍効果を検討するため、肝転移マウスを、対照群、オキサリプラチン投与群、ダハプラチンミセル投与群に各 20 匹ずつ準備した。脾注から 14 日目と 21 日目に、各薬剤を尾静注で投与した。オキサリプラチンもダハプラチンミセルも白金製抗癌剤であり、抗腫瘍効果は Pt 含有量に比例するため、1 回投与量は Pt ベースで 4 mg/kg に調整した。対照群には生理食塩水を投与した。28 日目にマウスを犠牲死させて、血液サンプル・肝臓を採取した。

副作用の評価項目は、生存日数、体重推移、血清 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、血清 glutamic pyruvic transaminase (GPT)、血清クレアチニン値およびブルーリバー症候群の病理学的評価とした。また、抗腫瘍効果の評価項目は、肉眼的な肝転移結節数、肝重量とした。

また、本実験でのダハプラチンミセルの腫瘍選択的集積を検討するために、第二実験を追加した。BALB/c マウス・メス・6 週齢を 20 匹用意し、前述と同様の手法でマウス大腸癌肝転移モデルを 10 匹作成した。残りの 10 匹は肝転移のない正常肝臓マウスとした。14 日目に、正常肝臓マウスに対して、Pt ベースで 4 mg/kg のオキサリプラチンとダハプラチンミセルをそれぞれ 5 匹ずつ 1 回尾静注した。肝転移マウスにたいしても、14 日目に 4 mg/kg のオキサリプラチンとダハプラチンミセルをそれぞれ 5 匹ずつ 1 回尾静注した。抗癌剤投与 24 時間後に、すべてのマウスを犠牲死させて肝臓を摘出し、肝臓内の Pt 濃度を測定した。

【結果】

最初に第一実験において副作用を評価した。実験中、1 週間ごとにマウスの体重を測定し、各群で比較したが、各群に有意差を認めなかった。実験 28 日目にマウスの心臓から採血した血清成分を用いて、GOT と GPT を測定した結果、ダハプラチンミセル投与群とオキサリプラチン投与群の間に有意差はなく (GOT: 19.0 U/L vs 29.9 U/L, $p=0.53$ 、GPT: 93.3 U/L vs 72.0 U/L, $p=0.15$)、対照群とも有意差を認めなかった (GOT: 19.0 U/L vs 30.4 U/L, $p=0.15$ 、GPT: 93.3 U/L vs 39.9 U/L, $p=0.15$)。血清クレアチニン値の比較では、ダハプラチンミセル投与群は対照群との間に有意差を認めなかったものの (0.52 mg/dl vs 0.49 mg/dl, $p=0.26$)、ダハプラチンミセル投与群はオキサリプラチン投与群よりも有意に血清クレアチニン値が低かった (0.52 mg/dl vs 0.72 mg/dl, $p=0.0087$)。28 日目に犠牲死させたマウスの肝臓を顕微鏡で観察したところ、オキサリプラチン投与群、ダハプラチンミセル投与群のど

これらの肝臓にも、明らかな肝類洞の異常拡張所見 (blue liver syndrome) は認められなかった。

次に抗腫瘍効果を評価した。生存日数については、実験 28 日目までに、対照群 20 匹中 10 匹が死亡した。オキサリプラチン投与群では 20 匹中 7 匹が死亡した。ダハプラチンミセル投与群では 20 匹中 3 匹が死亡した。ダハプラチンミセル群は対照群よりも有意に生存期間を延長した ($p=0.008$)。ダハプラチンミセル投与群のマウスの生存日数がオキサリプラチン投与群よりも長い傾向にあるものの、有意差は認められなかった ($p = 0.16$)。28 日目には、すべてのマウスを犠牲死させているため、その後の生存日数は評価していない。実験 28 日目、対照群やオキサリプラチン投与群のマウスには、腹水やリンパ節の異常腫大を認めたが、ダハプラチン投与群では明らかな腹水貯留やリンパ節腫大を認めなかった。肉眼的に肝転移の個数を比較したところ、オキサリプラチン投与群に比べて、ダハプラチン投与群で有意に肝転移が少なかった (14.8 個 vs. 4.9 個, $p=0.038$)。対照群と比較してもダハプラチン投与群は有意に肝転移が少なかった (14.9 個 vs. 4.9 個, $p=0.041$)。また、肝重量を比較したところ、重い方から順に対照群、オキサリプラチン投与群、ダハプラチンミセル投与群であった。ダハプラチンミセル投与群は対照群よりも有意に肝重量が軽く (1394 mg vs. 2215 mg, $p=0.0047$)。オキサリプラチン投与群と比べても有意に肝重量が軽かった (1872 mg vs. 1394 mg, $p=0.037$)。

続いて、マウス肝転移モデルにおけるダハプラチンミセルの腫瘍選択的集積については (第二実験)、薬剤投与 24 時間後の肝臓内 Pt 濃度を比較したところ、オキサリプラチン投与群では、正常肝に対しても転移を有する肝臓に対しても、Pt 濃度に有意差なく蓄積した。

(1.7 % 投与量/組織 (g) vs. 1.7 % 投与量/組織 (g), $p=0.83$)。一方ダハプラチンミセルは、正常肝よりも有意差を持って多く転移のある肝臓に蓄積していた (16.5 % 投与量/組織 (g) vs. 21.9 % 投与量/組織 (g), $p=0.0039$)。また、転移のある肝臓において、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンよりも有意に多く蓄積していた (21.9 % 投与量/組織 (g) vs. 1.7 % 投与量/組織 (g), $p<0.0001$)。

【考察と結論】

本実験では、マウス大腸癌肝転移モデルにおいて、ダハプラチンミセルがオキサリプラチンに比べ高い抗腫瘍効果を有すること、および対照群よりも有意に長い生存期間をもたらすことを初めて示した。過去のマウス大腸癌肝転移モデルに対するダハプラチンミセルの実験報告では、蛍光マーカーでラベルした colon26 細胞株を用いて、生体発光イメージングシステムにより全体を撮像する方法がとられていたが、本実験では、肉眼的な肝転移結節数および肝重量で抗腫瘍効果を解析しており、より直接的な評価方法と言える。

腎機能評価において、ダハプラチンミセル群の方がオキサリプラチン群よりもダハプラチンミセル群で有意に血清クレアチニン値が低かった。過去のシスプラチンとそのミセル化製剤 (NC-6004) を使用した実験では、抗癌剤投与 14 日後の血清クレアチニン値は、ミセル化製剤で有意に低い結果が得られており、ミセル化製剤が従来の抗癌剤よりも、徐放的

に抗癌剤を放出するため、腎負荷が少ないと考察されている。本実験結果に関しても、同様の理由で、ダハプラチンミセルはオキサリプラチンよりも腎機能に関して安全性が高いと推測された。

また、ダハプラチンミセルが正常肝よりも肝転移に有意に多く集積したことは EPR 効果の裏づけとして既報とも矛盾しないが、一方で、腫瘍の有無によらず、肝臓へのダハプラチンミセルの高い集積性が認められたことは、対照群やオキサリプラチン群に比べダハプラチンミセル群で GPT 値が若干高い傾向の原因となっている可能性があり、オキサリプラチンと同量のダハプラチンミセルは **over dose** となる可能性が示唆された。ダハプラチンミセルが、肝臓、腎臓、脾臓にオキサリプラチンよりも多く分布することは、これまでも報告があり、肝臓や脾臓において、マクロファージ等の免疫細胞や肝臓のクッパー細胞からの貪食作用を受けやすいのではないかと推測されるが、はっきりとした原因は不明である。

今回実験に使用した **PEG-P(Glu) block copolymer micelles** は、抗癌剤との化学的な相性がさまざまであり、すべての抗癌剤をミセル化し臨床応用するには至っていない。しかしながら現在臨床試験に進んでいるものがあり、これらの臨床試験すべてで既存の抗癌剤よりもミセル化製剤の方が、有意に副作用が少ないと報告されていることから、ダハプラチンミセルも臨床に十分貢献できると考えられる。