

論文の内容の要旨

論文題目 薬物送達の効率化に向けた腫瘍血管における粒子噴出現象の汎用性の探究

氏名 五十嵐 一紀

薬剤送達（ドラッグデリバリー）は有効な薬剤を開発する上で重要な要素の一つである。特に腫瘍に対する薬剤送達について盛んに研究が行われてきたが、その中で注目されてきたのが enhanced permeation and retention (EPR) 効果である。腫瘍を栄養する血管は内皮細胞や基底膜を欠くことが多いため透過性が高く、また腫瘍内のリンパ管は細胞浸潤によって閉塞していることが多いため有効な排出経路となり得ない。EPR 効果は、この2つの特徴が合わさることによって、血管内に投与された薬物が腫瘍へと集積しやすくなる現象である。

従来、EPR 効果による薬物送達は、濃度勾配による緩徐なものが想定されてきたが、近年、当研究グループより局所的に噴出するようにして腫瘍血管から動的にナノ粒子が透過する現象が報告され、新たな薬物送達の方法として活用できるのではないかと注目されている。この現象については、一部の特殊な条件を除き、悪性腫瘍の血管に限ってその存在が報告されている。またナノ粒子の投与から10時間以上に渡って断続的に生じること、幅広い腫瘍において存在すること、少なくとも直径100 nm以下の複数のナノ粒子や高分子が輸送されることが確認されている。さらに、直径10 μm 未満の毛細血管や腫瘍の辺縁において高頻度で生じることが報告されているが、その理由については分かっていない。

この現象は生体内蛍光共焦点顕微鏡の、リアルタイムに腫瘍血管を観察できるという特徴を生かして観測されたものであり、その動的な性質から、現時点においてその他の手法で観察することが難しく、それ故に噴出が生じる原因についても不明点が多い。一部の噴出において好中球やマクロファージが近接して存在することが報告されており、その関与が示唆されている。また TGF- β 阻害薬やクロロキンと言った薬剤の事前投与による腫瘍血管の変化によって、噴出頻度の増加や噴出範囲の拡大を促すことができると報告されている。一方、これらの薬剤は EPR 効果による緩徐な薬剤集積にも影響を与えるため、本現象による動的な薬剤集積だけを切り離して評価することが難しく、それぞれの薬剤集積に対する寄与度は明らかでない。

本研究では、腫瘍血管における噴出現象を利用できる粒子の条件について検証し、噴出箇所の時間的・空間的局在について解析することで、本現象が薬剤送達に及ぼす影響を評価すると共に、これを活用した薬剤設計を可能とすること、また腫瘍微小環境の理解を深めることを目的とした。

初めに、BxPC3 ヒト膵癌皮下移植モデルマウスに対して、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識 500 kDa デキストラン (直径 32 nm) と共に、Alexa Fluor 647 標識ダハプラチン内包ナノミセル (DACHPt/m) (直径 59 nm)、DiD 標識 PEG 化リポソーム (直径 96 nm)、Sulfo-Cy5 標識ポリイオンコンプレックス型ベシクル (PICsome) (直径 302 nm) と言ったさまざまな大きさのポリマー粒子を静注し、腫瘍血管における噴出を共焦点顕微鏡にてリアルタイムに記録した。DACHPt/m、リポソーム、PICsome はそれぞれデキストランの噴出箇所にも 56/56 回、99/100 回、81/81 回と時間的また空間的に共に存在 (共局在) していた。続いてデキストランの影響を除外する目的で FITC 標識ポリイオンコンプレックス型ミセル (PIC micelle) (直径 34 nm) と PICsome を同時に静注するも、またもや同じ噴出箇所にも 59/59 回共局在していた。さらに BxPC3 ヒト膵癌皮下移植モデルマウスの影響を除外するために 4T1 マウス乳癌同所移植モデルマウスに対して FITC 標識デキストランと PICsome を同時に静注するも、やはり同じ噴出箇所にも 15/15 回共局在していた。以上より、直径 100 nm 以下の粒子について散発的に報告されていた噴出現象が、粒子に関わらず共通の現象であることを確認すると共に、少なくとも直径 302 nm までのポリマー粒子が本現象によって輸送可能であることが明らかとなった。

次に、腫瘍体積当たりの噴出頻度について比較したところ、BxPC3 膵癌 (256.9 ± 99.2 回/時間/ mm^3) と比べ 4T1 乳癌モデル (95.1 ± 46.8 回/時間/ mm^3) では頻度が有意に低かった ($P = 0.030$)。また 4T1 の方が血管径が有意に太く ($P = 0.001$)、血管表面積も広がった ($P = 0.018$)。さらに、血管径と血管表面積の間には有意な負の相関を認めた ($R = -0.52$, $P = 0.021$)。一方、血管密度 (血管体積/腫瘍体積) および血管表面積当たりの噴出頻度には有意差を認めなかった。総合すると、細血管の方が、その表面積の広さ故に、単位体積当たりの噴出頻度が高いという傾向が示唆された。

続いて、既に他の研究グループより報告され、その妥当性が広く認められている腫瘍血管を透過する粒子の経時的な濃度変化を表す数理モデルを用いて、本現象のシミュレーションを行った。血管壁に孔が開くというシンプルなモデルで噴出現象は説明でき、また噴出孔は 620 nm 未満の範囲においてさまざまな値を取ることはなく、概して 620 nm 以上の値を取ることが推定された。

さらに、302 nm より大きな粒子について検証する目的で、直径 1 μm の PEG 化赤色蛍光標識ポリスチレンマイクロスフィアを FITC 標識デキストランと共に BxPC3 マウスに静注して観察を行った。しかしながら、マイクロスフィアはその大きさ故に噴出によっても血管表面から数 μm 以上離れた場所まで透過することはなく、少なくとも本現象によって 1 μm のような巨大粒子を薬剤として実用的な範囲で腫瘍へと送達することは難しいことが明らかとなった。

最後に、ポリマー粒子ではない粒子である抗体が本現象を活用できるのか明らかにするため

に、Sulfo-Cy5 標識抗 PD-1 抗体（直径 14 nm）と FITC 標識デキストランを BxPC3 マウスに静注し、観察を行った。観察中に 27/27 回の共局在が認められ、この噴出現象は抗体の血管透過にも関与することが明らかとなった。

一連の実験によって、腫瘍血管における粒子の噴出現象は、これまで知られていたより幅広い粒子径のポリマー粒子の輸送に寄与し、抗体の血管透過にも関与することが明らかとなった。これは、悪性腫瘍への効率的な薬剤送達を考える上での粒子設計の幅を齎すことが期待される結果であった。また細血管において、太い血管よりも噴出現象がより高頻度で生じることが推定された。血管新生阻害薬は細血管を減少させることが知られているため、その使用によって本現象が減少しうることが考えられ、これまで報告されてきたドラッグデリバリーと血管新生阻害薬との相性の悪さについては本現象も例外ではないことを示唆する。さらに、血管壁に短時間孔が生じると言うモデルでシミュレーション上、噴出局所の粒子動態の説明が付き、孔の大きさが概して 620 nm 以上と推定された。この結果は、本現象の原理についてより具体的に迫ると共に、腫瘍微小環境の理解を深めるものと考えられる。