

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ節転移の全身治療のための高分子ミセル型ナノメディシンに関する研究

氏名 牧野 惇

背景 –リンパ節転移治療法とドラッグデリバリーシステム–

現代医学においてがん治療の研究は広く行われているが、がんの根治を可能とするような治療法は未だに実現できていないのが現状である。この大きな理由の1つに、がんには他の臓器に拡散してゆく、転移という性質をもつことが挙げられる。特に、がんはリンパ節に転移することが多く、またリンパ節からさらに他の臓器へと転移をしてゆく性質を持つため、リンパ節転移は患者の予後不良に大きく関わっているといえ、この治療法の開発は強く望まれている。現在では外科療法や放射線療法がリンパ節転移治療のために行われているが、リンパ浮腫や疼痛、長期入院といった問題点がありさらには再発の危険も伴っている。全身投与を介した化学療法によるリンパ節転移治療が実現できれば、このような問題点を解決することができると考えられ、多くの研究が行われているが、リンパ節転移へと効率的に制がん剤を送達できるような手法の開発には至っていない。

そこで、本研究では所属研究室の先行研究で開発されたドラッグデリバリーシステムである高分子ミセル型ナノ粒子を利用して、リンパ節転移の全身投与による治療法の開発を目指した。高分子ミセルとは、両親媒性のブロック共重合体が水中において自己集合することにより調製される、親水性の外殻と疎水性の内核をもった、粒径数十ナノメートルのナノ粒子である。その内核には薬剤を内包することが可能であり、また外殻は生体適合性の高い材料であるポリエチレングリコール (PEG) で覆われているため、血中においてタンパク質の吸着を防ぎ、免疫系からの捕捉を回避して、高い血中滞留性を示すことが可能である。このような高分子ミセルを血中に投与すると、腫瘍周囲の血管の高い透過性を利用して選択的に腫瘍組織へと集積することができる。このように、高分子ミセルは内包された薬剤を腫瘍に選択的に運ぶことができ、腫瘍に対して優れた標的性、深部浸透性、治療効果をもつことが示されている。さらに近年では、ミセル表面にがん細胞や腫瘍血管の物質に特異的に結合するリガンドを導入することで、さらにその効果を高めることが可能であることも示されている。このようながん標的に関する優れた物性は、リンパ節転移の標的治療にも応用可能であると考えられ、本研究が行われた。具体的には、現在臨床試験に進んでいる、ブロック共重合体 PEG ポリグルタミン酸を用いて調製された、白金制がん剤オキサリプラチンの活性体 (1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) を内包した高分子ミセルである DACHPt 内包ミセルを用いて、リンパ節転移モデルに対する効果を評価した (Figure 1)。がんモデルは、マウスメラノーマ B16F10 をマウスの前足足蹠に接種し上腕リンパ節に転移させ

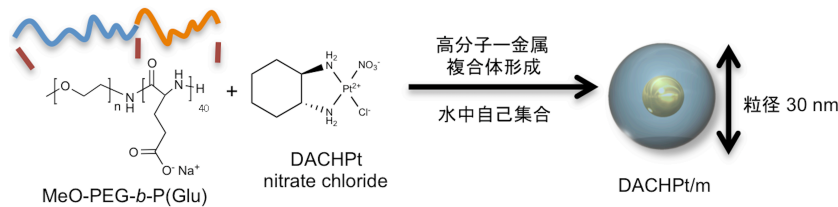


Figure.1 DACHPt 内包高分子ミセルとその調製手法

ることにより作製した。

DACHPt 内包ミセル全身投与によるリンパ節転移標的治療

マウスメラノーマ B16F10 のルシフェラーゼ発現株 B16F10-luc を用いて作製したリンパ節転移モデルは、生体発光イメージングによりマウスの生きたまま転移の発症や成長を評価することが可能である。リンパ節転移モデルマウスに DACHPt 内包ミセルを投与した結果、オキサリプラチン単剤投与群と比較して、体重減少を引き起こすことなく有意に高い効果を示すことができた。さらに、転移を確認後に原発巣を切除したモデルを作製し、それに対するミセルの効果調べたところ、同様に高い効果が得られた。このことから、ミセルは原発巣を介してではなく、血管から直接リンパ節転移に集積ができることが示唆された。また、蛍光標識したミセルと B16F10 の GFP 発現株由来の蛍光性の腫瘍を用いた転移リンパ節組織切片の蛍光顕微鏡観察や、切片の蛍光 X 線分析においてもミセルが血管を透過して集積することが観察された。ここで示された性質は、外科手術後のアジュバント化学療法においてこの治療法は高い効果が期待できることを示している。

ミセルのサイズとリンパ節転移標的治療効果

DACHPt 内包ミセルのリンパ節転移に対する治療効果を比較するため、臨床応用されている DDS 製剤であるドキソルビシン内包リポソーム（ドキシル）と DACHPt 内包ミセルのリンパ節転移治療効果を比較した。その結果、ドキシルと比べてミセルは高い効果を示すことが明らかになった。そこで、蛍光標識したミセルとドキシルをリンパ節転移モデルマウスに共投与し、*in vivo* 共焦点レーザー走査型顕微鏡法によりミセルの動態を経時的に追跡したところ、ミセルはドキシルと比べて腫瘍深部への浸透性が高いことが明らかになった。このような浸透性の差は、ドキシルとミセルの粒径の差から生じると考え、通常の 30 nm の粒径のミセルよりも大きな 70 nm の粒径をもつミセルを調製し、それら 2 種類のサイズのミセルの比較を行った。その結果、70 nm ミセルに比べて 30 nm ミセルはリンパ節転移に対して高い効果を示した。さらに、それらのミセルを別々の蛍光色素で標識し、リンパ節転移モデルマウスに共投与後に *in vivo* 共焦点レーザー走査型顕微鏡法により観察を行った結果、30 nm ミセルは 70 nm ミセルよりも速やかに血管から溢出し、腫瘍深部へと浸透してゆくことが明らかになった。このようなことから、ミセルのサイズがそのリンパ節転移に対する浸透性・治療効果に大

きく影響を与えることが明らかになった。ここで示された結果から、ナノ粒子のサイズを最適化することでより優れたリンパ節転移治療が可能となることが示唆された。これは、リンパ節転移を標的としたドラッグデリバリーシステムの臨床応用の上で非常に重要な知見であると考えられる。

cRGD 導入ミセルによるリンパ節転移の抑制と治療の相乗効果

ミセルの表面に様々な生体内物質に特異的に結合するリガンドを結合することで、さらにその治療効果を高めることが可能である。そこで、本研究ではがん細胞や腫瘍新生血管に過剰発現されている $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンに特異的に結合する環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸ペプチド (cRGD ペプチド) を DACHPt 内包ミセルの表面に導入することで、さらなる治療効果の向上を目指した。cRGD ペプチドには、転移の発症を抑制する効果をもつことが知られているため、cRGD 導入ミセルにもそのような効果があることが期待される。そこで、B16F10-luc メラノーマ細胞をマウスの前足足蹠に接種してから、リンパ節転移を起こす前にミセルの投与を行い、転移の抑制効果を検証した。その結果、cRGD 導入ミセルは通常のリガンドのないミセルと比較して、高い転移抑制効果を示すことが明らかになった。さらに、リンパ節転移が形成された後に投与を行っても、cRGD 導入ミセルは導入していないミセルよりも高い転移成長抑制効果を示した。しかしながら、転移が形成された後に原発巣を切除したモデルに対しては、cRGD 導入ミセルと通常のみセルでは効果に差がみられなかった。また、2種類のみセルはメラノーマ細胞に対する *in vitro* での細胞毒性も同等であった。このようなことから、cRGD 導入ミセルと通常のみセルでは、原発巣からリンパ節転移へのがん細胞の遊走に対する効果に差があるのではないかと考え、*in vitro* で細胞遊走を評価する実験を行った。その結果、創傷治療アッセイ及びトランスウェルアッセイの両方において、cRGD 導入ミセルは通常のみセルよりも高い細胞遊走抑制効果を示すことが明らかになり、このような効果が転移形成抑制効果や原発巣存在下での転移成長抑制効果に寄与していることが示唆された。また、これらの *in vivo* や *in vitro* における実験を、通常のみセルに遊離した cRGD ペプチドを混合したものをを用いて行ったところ、cRGD 導入ミセルと比べて効果が低いことが示された。cRGD ペプチドを単にミセル溶液に混合するだけでは不十分であるというこの結果は、cRGD ペプチドをミセルの表面に導入することで、腫瘍に到達する cRGD ペプチドの量を増やすことができること、さらにはがん細胞表面のインテグリンに cRGD ペプチドが多価結合できることが起因していると考えられる。また、cRGD 導入ミセルはある程度まで成長した腫瘍に対しては通常のみセルと効果が変わらないため、このような標的化による治療効果の向上は、がんの進行過程の全ての段階で起こりうるものではないことが示唆された。すなわち、がんがどの段階において標的化に敏感であるかを調べることは、ナノ医薬を基にした標的治療の研究において非常に重要であるということが言える。

結語

本論文では、薬剤内包高分子ミセルの全身投与によるリンパ節転移の治療法の研究について論述した。本研究が将来的に臨床応用されれば、外科療法や放射線療法の効果が望めないがんに対する治療や、外科療法の補助化学療法として高い効果を発揮することができると考えられる。また、本研究では高分子ミセルのサイズによるリンパ節転移組織への浸透性の影響や、ミセル表面のペプチドによるがん細胞の遊走性への影響など、リンパ節転移巣の構造や転移のメカニズムを研究する上で価値の高い知見を示すことができたと考えられる。本研究で示された治療法がさらに発展する、あるいは本研究がリンパ節転移に関する生物学的な研究の発展に貢献することで、将来的に臨床において多くの患者を救うことができると確信している。