

2010/1001A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの
創成と脳腫瘍標的治療への展開

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成23（2011）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの
創成と脳腫瘍標的治療への展開

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 片岡 一則

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的 DDS の創成と
脳腫瘍標的治療への展開 (片岡 一則) 1

II. 分担研究報告

1. リガンド導入 DACHPt 内包高分子ミセルの構築 (西山 伸宏) 7

2. マウス脳腫瘍モデルの構築と DACHPt 内包ミセルの in vivo 機能評価 (稲生 靖) 11

3. マウス脳腫瘍モデルの組織学的評価 (狩野 光伸) 14

4. ヒト脳腫瘍組織の分子病理学的検討 (西原 広史) 17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 22

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
 総括研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と
 脳腫瘍標的治療への展開

研究代表者 片岡一則 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 教授

研究要旨
 本研究では、膠芽腫(glioblastoma, GBM)に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を目的として、脳腫瘍血管構築の特異性を明らかにしながら、脳腫瘍同所移植モデルに対する高分子ミセル型制がん剤の有効性を検証し、より効果に優れた脳腫瘍治療薬を開発することを目指している。最終年度となる本年度は、腫瘍血管に特異的に結合する環状RGD(cRGD)ペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築し、そのヒトGBMモデル（皮下移植、同所移植）に対する有効性を検証した。一方、マウスGBM由来SR-B10.A細胞の同所移植モデルの血管構築を検証した結果、造影剤の蓄積が少なく、より臨床におけるGBMに類似していることが示唆された。このような血管構築の差の臨床的意義に関して、予後情報の判明しているヒトグリオーマ手術摘出病理標本を用いて検討を行ったところ、SR-B10.A腫瘍に見られるSMA陽性血管周囲細胞の存在程度が高い症例ほど全生存期間が短いことが示された。さらに、SR-B10.A脳腫瘍モデルに対して、DACHPt内包ミセルとTGF-β阻害剤の併用治療の可能性を検討したところ、ミセルのがん組織への集積性の向上と腫瘍縮小効果が認められた。

A. 研究目的

膠芽腫(glioblastoma, GBM)に代表される悪性脳腫瘍は、血液-腫瘍関門(BTB)が存在するために薬剤の集積性が著しく低下しており、その治療のためには従来型DDSのがん集積メカニズムであるEPR効果(腫瘍組織では、血管の透過性が亢進しており、リンパ系が未発達であるため、高分子物質が集積しやすい環境が形成されているという効果)を超越した新しい薬剤のデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、研究代表者の片岡らが開発する高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めることを目的として、腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることのできる薬剤の併用や腫瘍血管内皮細胞特異的にトランスサイトシスを誘起するリガンド分子のミセル表面への導入に基づく新規治療戦略の開発を目指している。

このような目標を達成するために、本研究では、研究代表者の片岡が統括する東京大学大学院・医学系臨床医工学部門と工学系マテリアル工学専攻において、ミセル型DDSの創製から生物学的評価までを行う一方で、東大病院脳神経外科・稲生がDDSの脳腫瘍モデル(同所移植モデル)に対する治療効果を検証し、東大院・医学系分子病理学専攻

・狩野がDDSの有効性検証のためのMRIによる評価と組織学的評価を行った。特に、狩野は、これまでに腫瘍血管の周皮細胞を減少させ、DDSのがん集積性を高めることが確認されているTGF-β阻害剤の併用効果に関して検討を行った。さらに、北大院・医学系研究科病理学・西原が実際のヒト手術検体標本の解析を行い、血管構築と臨床予後との相関について検討を行った。



図1. マウスGBMモデルへの高分子ミセル型DDSのデリバリー戦略

B. 研究方法

1. cRGD ペプチド搭載 DACHPt 内包ミセルの U87MG 腫瘍に対する制がん活性評価

ヒト glioblastoma U87MG 細胞を BALB/c スードマウス (♀, 6 週齢) の皮下に注入することによって U87MG 細胞皮下移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、4mg/kg の DACHPt 換算の

DACHPt内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。

一方、U87MG細胞の同所移植モデルに関しては、U87MG細胞を脳室内に直接注入することによって作製した。このマウスに対して、3mg/kgのDACHPt換算のDACHPt内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。腫瘍体積の測定は、7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)によるMRI撮像によって行った。

2. ヒトグリオーマの病理検体における腫瘍血管の解析

昨年度までの研究において、神経膠腫の血管構築が、 α SMA陽性の厚いPericyteで被覆されるGlomeruloid血管と、 α SMA陰性PDGFR β 陽性の薄いPericyteで被覆されるChicken wire vascular networkとの二種類に分類出来ることを見出した。そこで、これらの知見に基づいて、実際のヒト神経膠腫症例の検鏡を行って血管パターンを分類し、その予後を比較することで、血管構築と臨床予後の相関を検討する。具体的には、当教室でGrade IIIまたはIVと診断された悪性神経膠腫55例において、通常のHE染色に加えて α SMA、PDGFR β 、CD31の免疫染色を行い、血管構築から下記の3群に分類した。

G群：血管の80%以上をGlomeruloid vesselが占める群

C群：血管の80%以上をChicken wire patternが占める群

GC群：G群とC群の間

(倫理面への配慮)

本研究で用いられるヒト病理検体はすべて研究開始前に人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性が及ぶことはない。しかし、人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針に基づき、本学倫理委員会の承認の下に研究を遂行する。同時に、これらの研究活動を当教室のホームページに公表し、もし患者から自身の検体の使用停止の申し入れがあった場合には速やかにその検体の使用を中止することとしている。また、成果発表等の際には個人を特定できないよう最大限の配慮をした。

3. マウスGBMモデルの解析とTGF- β 阻害剤の併用効果の検証

前年度に確立したマウス glioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルを主に用いて各種解析と治

療効果の検討を行った。解析の病理学的な方法論としては、マウスから摘出した脳または皮下腫瘍を凍結標本化し、これを薄切することにより行った。蛍光標識ミセルの場合は風乾後4%パラホルムアルデヒドで固定し封入してそのまま観察、またその他の免疫染色については特異的の一次抗体、蛍光標識二次抗体の順に反応させてから観察を行った。観察・撮影にはZeiss社製510Meta共焦点顕微鏡を用いた。

MRI撮像については、7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)を使用した。

C. 研究結果

1. cRGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルのU87MG腫瘍に対する制がん活性評価

オキサリプラチン、リガンドなしDACHPt内包ミセルおよびcRGD搭載DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性を図2に示す。この結果より、オキサリプラチンとリガンドなしDACHPt内包ミセルは有意な制がん活性を示さなかったが、環状RGD導入DACHPt内包ミセルは顕著な制がん活性を示すことが確認された($P < 0.05$)。

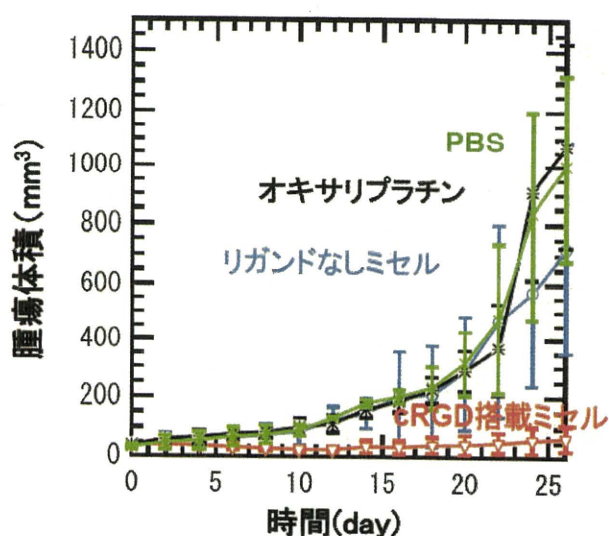


図2. 環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性

一方、cRGD搭載DACHPt内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性をMRIによって評価した結果を図3に示す。この結果より、環状RGD導入DACHPt内包ミセルは、無処置群と比較して腫瘍体積を1/6に抑制することが確認された。

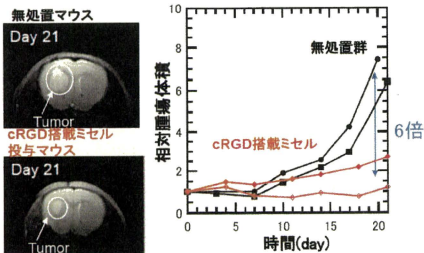


図3. 環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性

2. ヒトグリオーマの病理検体における腫瘍血管の解析

悪性神経膠腫55例をG群、C群、GC群で分類し、生存曲線を描いたところ(図4)、Chicken wire patternの血管を殆ど持たない群(G群)は、20%以上の割合でChicken wire patternの血管を有する群(GC + C群)に比して、有意に予後不良であることが判明した。尚、この結果を、これらの解析に用いた母体となる症例群における従来のWHO gradingによる予後曲線と比較すると、Grade IIIとIVに相当する差異が認められることが判明し、Chicken wire vascular networkの存在が予後良好因子となることが示唆された。

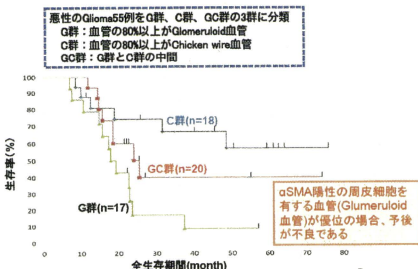


図4. 悪性神経膠腫55例における血管パターンによる分類と生存曲線

3. マウスGBMモデルの解析とTGF-β阻害剤の併用効果の検証

これまでにマウスglioblastoma (SR-B10.A)同所移植モデルは、Glomeruloid血管と同様なαSMA陽性のPericyteで被覆された血管を有しており、ヒト膠芽腫のモデルとしての妥当であることが確認されてきた。そこで本年度は、SR-B10.A同所移植モデルにおいて、TGF-β阻害剤の投与による血管構築の変化と、それによるDDSのがん集積性への影響に関して詳細に解析した。まず、SR-

B10.A同所移植モデル動物に対して、TGF-β阻害剤LY364947を1mg/kg投与し、その24時間後に動物を犠牲死させ、脳を摘出して解析を行った。ここでは、血管内皮細胞と認識されるPECAM1陽性細胞と、血管壁細胞と認識されるSMA陽性細胞を、共染色により同時に解析した。この結果、過去の報告 (M. R. Kano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 3460-3465 (2007)) における肺癌モデル組織におけるTGF-β阻害剤投与後の血管構築の変化と同様に、SMA陽性の周皮細胞に被覆された血管の割合が、TGF-β阻害剤の投与によって低下することが示された(図5)。

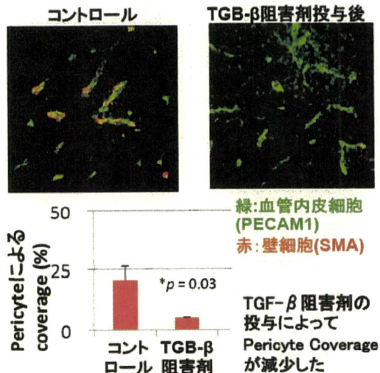


図5. TGF-β阻害剤によるSR-B10.A同所移植モデルにおける血管構築の変化

肺癌モデルでは、SMA陽性の周皮細胞に被覆された血管の割合が減少することによって、高分子物質に対する血管透過性が亢進し、高分子ミセルのがん集積性が向上することが確認されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2007))。そこで本研究においても、SR-B10.A同所移植モデルにTGF-β阻害剤を投与した時のミセルのがん集積性の変化を検討した。その結果、蛍光色素で標識したDACHPt内包ミセルの投与24時間後におけるがん集積性が向上することが確認された(図6)。

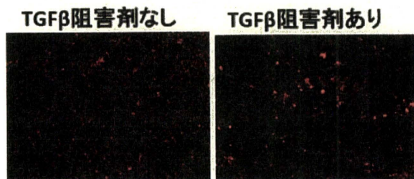


図6. TGF-β阻害剤によるSR-B10.A同所移植モデルにおける蛍光標識ミセルの集積性の変化

これらの結果に基づいて、SR-B10.A同所移植モデルに対するDACHPt内包ミセルの治療効果をMRIを用いて検証した(図7)。その結果、無治療個体に対して、腫瘍増殖の抑制効果と、生存の延長が認められた(図8)。治療個体は治療開始後30日以上生存したのに対して、無治療個体は10日で死亡した。

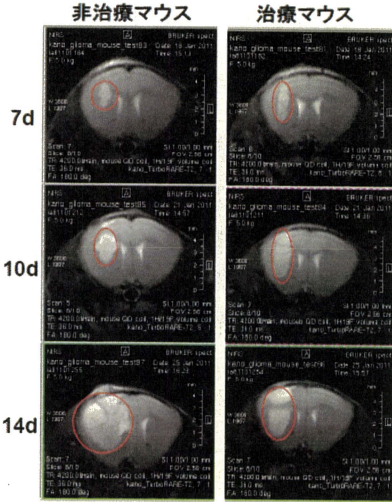


図7. TGF- β 阻害剤とDACHPt内包ミセルの併用治療後のSR-B10.A同所移植モデルのMRI

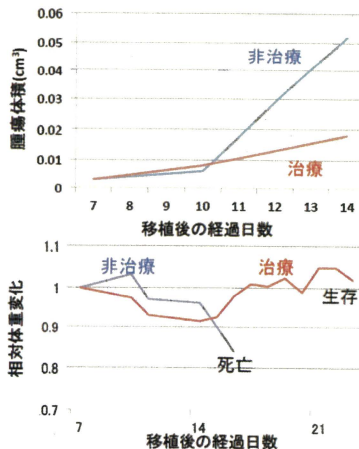


図8. TGF- β 阻害剤とDACHPt内包ミセルの併用治療後の腫瘍体積と体重変化

D. 考察

近年、がん治療におけるDDS薬剤の有用性が明らかにされている。これらのDDSは、腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因するがん集積効果(EPR効果)を利用しているが、膠芽腫(glioblastoma, GBM)に代表される悪性脳腫瘍においては血液-腫瘍関門(BTB)が存在するために薬剤の集積性が著しく低下しており、その治療のためにはEnhanced Permeability and Retention (EPR)効果を超越した新しいデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、我々が開発を進めている高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めることを目的として、DDSのがん集積性を高めることのできるリガンド分子の導入や腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることのできる薬剤の併用に基づく新規治療戦略の開発を行い、悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法を確立することを旨として研究を展開してきた。

このような目標を達成するために、本研究では、研究代表者の片岡と分担者の西山が所属する東京大学大学院・医学系臨床医工学部門において、ミセル型DDSの創製から生物学的評価までを行う一方で、東大病院脳神経外科(稲生)でDDSの脳腫瘍モデルに対する治療効果を検証し、東大院・医学系分子病理学(狩野)でDDSの有効性検証のための組織学的評価を行った。さらに北大院・医学系研究科病理学(西原)は、これらの研究成果を臨床へと繋げるために実際のヒト手術検体標本の解析を行い、モデルの妥当性の検証を行ってきた。

本研究では、オキサリプラチン活性体(DACHPt)内包ミセルにリガンド分子を導入した高分子ミセルの開発を行ってきたが、最終年度にあたる本年度は、腫瘍血管の内皮細胞ならびにがん細胞で過剰発現が認められる $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築し、ヒトGBM由来のU87MG細胞に対してリガンド導入による細胞毒性の増強ならびに皮下移植がんに対するin vivo制がん活性の向上を確認することができた。さらに、U87MG細胞の同所移植モデルにおいても環状RGDペプチド搭載DACHPt内包ミセルは有効性を示すことが確認された。

一方、本研究では、臨床のGBMに近い血管構造(CD34陽性内皮細胞+ α -smooth muscle actin(SMA)陽性・Desmin陰性周皮細胞)を有するモデルとしてマウスGBM由来SR-B10.A細胞の同所移植モデルを用いた検討も行ってきた。このような血管構築の差の臨床的意義に関して、予後情報の判明しているヒトグリオーマ手術摘出病理標本を用いて検討を行ったところ、SR-B10.A腫瘍に見られるSMA陽性血管周囲細胞の存在程度が高い症例ほど

全生存期間が短いことが示された。次に、SR-B10. A脳腫瘍モデルを用いて、DACHPt内包ミセル蓄積と治療効果を検討した。ここでは、腫瘍血管特異的に物質透過性を高めることのできる薬剤としてTGF- β 阻害剤の併用効果を検討した。その結果、TGF- β 阻害剤の併用により、DACHPt内包ミセルががん組織に集積することが確認された。そこで、DACHPt内包ミセルとTGF- β 阻害剤を2日おきに3回併用投与し、MRIによって治療効果を検証したところ、治療個体において腫瘍縮小効果が認められた。さらに、TGF- β 阻害剤の投与による血管構築への変化について解析したところ、これまで報告されている通り、内皮細胞は変化しないまま血管壁細胞の減少が認められ、この効果を介した蓄積効果の増強であることが示唆された。

以上のように、本研究課題では、GBMをはじめとする実際のヒトの悪性脳腫瘍の組織構築を再現した正所性脳腫瘍モデルを構築し、そのモデルを用いて高分子ミセル型DDSによる脳腫瘍への薬剤の送達効率を高めるための新規治療戦略の開発を行ってきた。これらの研究成果は悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法の確立に繋がるものと考えられる。

E. 結論

最終年度となる本年度は、腫瘍血管に特異的に結合する環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルを構築し、そのヒトGBMモデル（皮下移植、同所移植）に対する有効性を明らかにした。一方、マウスGBM由来SR-B10. A細胞の同所移植モデルの血管構築を検証した結果、造影剤の蓄積が少なく、より臨床におけるGBMに類似していることが示唆された。このような血管構築の差の臨床的意義に関して、予後情報の判明しているヒトグリオーマ手術摘出病理標本を用いて検討を行ったところ、SR-B10. A腫瘍に見られるSMA陽性血管周囲細胞の存在程度が高い症例ほど全生存期間が短いことが示された。さらに、SR-B10. A脳腫瘍モデルに対して、DACHPt内包ミセルとTGF- β 阻害剤の併用治療の可能性を検討したところ、ミセルのがん組織への集積性の向上と腫瘍縮小効果が認められた。以上のように、本研究課題では、悪性脳腫瘍に対して、リガンド分子の導入や腫瘍血管特異的に物質透過性を高める薬剤の併用などの新規DDS治療戦略の開発を行ってきた。これらの研究成果は悪性脳腫瘍に対する画期的な治療法の確立に繋がるものと考えられ、国民医療水準の向上に大きく貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, S. Fukushima, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *J. Control. Release*, in press
2. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
3. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* 149 (1) 51-57 (2011)
4. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
5. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
6. Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)
7. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-

platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18) 7031-7041 (2010)

8. M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)
9. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 7 (2) 501-509 (2010)
10. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010)

2. 学会発表

(国内学会)

1. 片岡一則、RNA創薬のためのドラッグデリバリーシステム、CBI学会第307回研究講演会、2010年4月12日、東京大学山上会館(東京)
2. 片岡一則、ナノテクノロジーが拓く未来医療、第39回日本脳卒中の外科学会、2010年4月16日、岩手県民会館(岩手)
3. 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けた超分子ナノデバイスの創製、遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム、2010年6月2日、北海道大学学術交流会館(北海道)
4. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション、第2回東京大学メディカルキューブシンポジウム、2010年7月5日、東京大学鉄門記念講堂(東京)
5. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション、第2回東京大学メディカルキューブシンポジウム、2010年11月29日、グランドプリンスホテル広島(広島)
6. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが

先導する診断・治療イノベーション、東京大学医学部産婦人科研究会、2010年12月11日、東天紅(東京)

(国際学会)

1. K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery. 3rd European Conference for Clinical Nanomedicine, 2010年5月10日、Messe Schweiz, Hall L'Entree (スイス)
2. K. Kataoka, Smart micelles and vesicles from PEG-polypeptide block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery. 43rd IUPAC World Polymer Congress, 2010年7月15日、Glasgow Science Centre (英国)
3. K. Kataoka, Supramolecular structures as nanocarriers in gene and drug delivery. Gordon Research Conference on Drug Carriers in Medicine & Biology, 2010年8月17日、Waterville Valley Resort, Waterville Valley (米国)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と
脳腫瘍標的治療への展開

（リガンド導入DACHPt内包高分子ミセルの構築）

分担研究者 西山伸宏 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門 准教授

研究要旨

本研究では、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍の標的治療を目的として、表面にcRGDペプチドや抗体フラグメントなどのリガンド分子を搭載したDACHPt内包ミセルの構築を目指している。最終年度にあたる本年度は、前年度まで開発した環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルのヒト膠芽腫(glioblastoma) U87MG細胞に対する細胞毒性、皮下移植モデルおよび同所移植モデルに対する制がん活性を評価した。

A. 研究目的

近年、腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系に起因するEPR効果を基盤とするがん標的治療型DDSの臨床での有効性が示されているものの、膠芽腫に代表される悪性脳腫瘍においては、血液-脳腫瘍関門(BTB)が存在するものと考えられており、EPR効果を超越したデリバリー戦略が必要である。そこで本研究では、オキサリプラチン活性体であるDACHPtを内包した高分子ミセルにペプチドや抗体フラグメントなどのリガンド分子を搭載し、がん組織の血管内皮細胞に特異的なトランスサイトシスを介して、血管内腔からがん組織への効率的な薬剤デリバリーを実現することを目指している。本年度は、前年度まで開発した環状RGDペプチドを搭載したDACHPt内包ミセルのヒト膠芽腫(glioblastoma) U87MG細胞に対する細胞毒性、皮下移植モデルおよび同所移植モデルに対する制がん活性を評価した

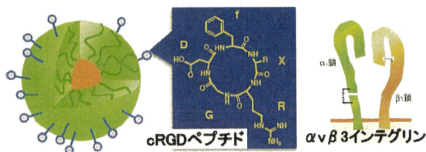


図1. 環状RGDペプチドリガンド導入DACHPt内包ミセルの模式図

B. 研究方法

1. 環状 RGD ペプチドリガンド導入 DACHPt 内包ミセルの調製

アジド末端ヘテロ PEG(N_3 -PEG- NH_2)(S. Hiki et al., Bioconjugate Chem. 21:248-254 (2010))をマクロ開始剤として γ -benzyl-L-glutamate *N*-carboxyanhydride (BLG-NCA)を開環重合し、アルカリ加水分解により側鎖ベンジル基を脱保護することによって、 N_3 -PEG-*b*-PGluを合成した。次に、Pd-Cを用いた接触水素化還元により N_3 -PEG-*b*-PGluの末端アジド基をアミノ基へと変換後、活性エステル型のマレイミド化試薬を反応させることにより、末端にマレイミド基を有する MAL-PEG-*b*-PGluを合成した。合成した MAL-PEG-*b*-PGluと MeO-PEG-*b*-PGluを 1:1(w/w)で混合し、DACHPt水溶液 (5 mM, [DACHPt]/[COO]=1)を加え、37°Cで3日間反応させた後、限外ろ過(MWCO: 30,000)により精製することによって、表面にマレイミド基を有する DACHPt 内包ミセルを調製した。cRGDリガンドの導入は、マレイミド基に対して2倍モル量のcRGDリガンドを加え、37°Cで24時間攪拌後、未反応のcRGDを遠心濾過(MWCO: 30,000)により除去することによって行った。

2. 環状 RGD 導入 DACHPt 内包ミセルの in vitro 細胞毒性評価

$\alpha_5\beta_3$ インテグリンを過剰発現しているヒト膠芽

腫(glioblastoma) U87MG細胞に対して、2種類のミセル(cRGD導入型およびリガンドなしミセル)ならびにオキサリプラチンの細胞毒性を評価した。この評価では、薬剤と細胞を3時間接触させ、培地交換を行なった後に48時間培養した後の細胞生存率をMTTアッセイによって評価した。

3. cRGD 導入 DACHPt 内包ミセルの in vivo 制がん活性評価

U87MG細胞をBALB/cヌードマウス(♀,6週齢)の皮下に注入することによってU87MG細胞皮下移植モデルマウスを作製した。このマウスに対して、4mg/kgのDACHPt換算のDACHPt内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。

一方、U87MG細胞の同所移植モデルに関しては、U87MG細胞を脳室内に直接注入することによって作製した。このマウスに対して、3mg/kgのDACHPt換算のDACHPt内包ミセルを1日おきに3回投与し(0, 2, 4日目に投与)、腫瘍体積変化を測定した。腫瘍体積の測定は、7.0-T MRI scanner (magnet: Kobelco and Jastec; console: Bruker Biospin)によるMRI撮像によって行った。

C. 研究結果

1. cRGD 導入 DACHPt 内包ミセルのヒト glioblastoma U87MG 細胞に対する in vitro 細胞毒性評価

MTTアッセイの結果、U87MG細胞に対するオキサリプラチン、リガンドなしDACHPt内包ミセルおよび環状RGD導入DACHPt内包ミセルの3時間接触後の細胞毒性(50%細胞増殖阻止濃度(IC₅₀)は、それぞれ60、>373、102 μMであった。以上のように、cRGD導入DACHPt内包ミセルはα_vβ₃インテグリンへの結合を介してU87MG細胞に効率的に取り込まれ、リガンドを導入していないミセルよりも高い細胞毒性を示したものと考えられる。

2. 環状RGD 導入 DACHPt 内包ミセルの U87MG 細胞皮下移植モデルに対する制がん活性評価

オキサリプラチン、リガンドなしDACHPt内包ミセルおよび環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性を図2に示す。この結果より、オキサリプラチンとリガンドなしDACHPt内包ミセルは有意な制がん活性を示さなかったが、環状RGD導入DACHPt

内包ミセルは顕著な制がん活性を示すことが確認された(P<0.05)。

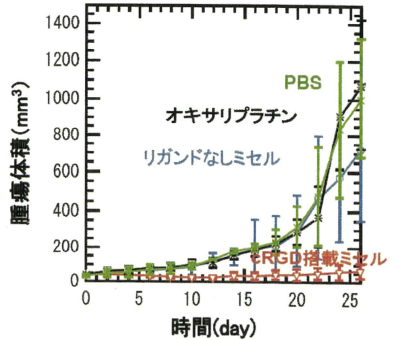


図2. 環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞皮下移植モデルに対する制がん活性

3. 環状RGD 導入 DACHPt 内包ミセルの U87MG 細胞同所移植モデルに対する制がん活性評価

環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性をMRIによって評価した結果を図3に示す。この結果より、環状RGD導入DACHPt内包ミセルは、無処置群と比較して腫瘍体積を1/6に抑制できることが確認された。

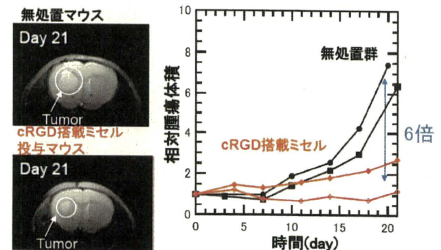


図3. 環状RGD導入DACHPt内包ミセルのU87MG細胞同所移植モデルに対する制がん活性

D. 考察

本研究では、物質透過性が著しく低下している脳腫瘍に対して効果的に集積することのできる高分子ミセルの構築を目的として、現在第一相臨床試験中のDACHPt内包ミセルの表層に腫瘍血管の血管内皮細胞で発現が向上していることが知られているα_vβ₃インテグリンに対して特異性を有する環状RGDペプチドをリガンド分子として導入

した。環状RGDペプチドは、シレンジタイド (cilengitide)がグリオーマの治療薬としてヨーロッパで承認されており、脳腫瘍を標的としたDDSのためのリガンドとしては最適であると考えられる。また、カベオレは、内皮細胞の細胞表面の10~20%を占め、血清アルブミンなどをトランスサイトーシスによって血流から組織へと通過させる役割を果たしており、さらに $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合した分子はカベオレ介在型エンドサイトーシスによって細胞内に移行することが知られていることから、cRGDリガンドは、脳腫瘍の腫瘍血管でトランスサイトーシスを誘起する可能性がある。さらに多くのがん細胞で環状RGDペプチドが特異的に結合する環状 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンおよび $\alpha_v\beta_5$ インテグリンが過剰発現していることから、環状RGDペプチドを導入したDDSは、がん細胞によって効率的に取り込まれ、優れた制がん活性を示す可能性がある。これらの可能性を検討するために本研究では、脳腫瘍のモデルとして広く利用されているヒトglioblastoma U87MG細胞の皮下移植モデルおよび同所移植モデルにおける環状RGDペプチドDACHPt内包ミセルの制がん活性を評価した。その結果、環状RGDペプチド導入DACHPt内包ミセルは、これらのモデルに対して顕著な制がん活性を示すことが明らかになった。以上のように、環状RGDペプチド導入DACHPt内包ミセルは悪性脳腫瘍の治療に有効なDDS製剤になりうるものと考えられ、今後さらなる検討を進めていきたいと考えている。

E. 結論

本分担研究では、腫瘍血管に特異的に結合し、血管内壁を通過する可能性のあるリガンドとして、環状RGDペプチドを選定し、現在臨床治験中のDACHPt内包ミセルの表層に導入した。この環状RGDペプチド導入DACHPt内包ミセルの有効性を脳腫瘍のモデルとして広く利用されているヒトglioblastoma U87MG細胞の皮下移植モデルおよび同所移植モデルに対して検証した結果、リガンド導入ミセルは、これらのモデルに対して顕著な制がん活性を示すことが明らかになった。以上のように、環状RGDペプチド導入DACHPt内包ミセルは悪性脳腫瘍の治療に有効なDDS製剤になりうるものと考えられ、実用化に向けて今後さらなる検討を進めていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, S. Fukushima, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *J. Control. Release*, in press
2. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H. -J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. *Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011)
3. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* 149 (1) 51-57 (2011)
4. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka*, Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Science Transl. Med.* 3 (64) 64ra2 (2011)
5. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery. *Biomaterials* 32 (2) 652-663 (2011)
6. Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal microvideography. *Biomed. Opt. Express* 1 (4) 1209-1216 (2010)
7. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. *Cancer Res.* 70 (18)

7031-7041 (2010)

8. M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced In vivo magnetic resonance imaging of tumors by PEGylated iron oxide-gold core-shell nanoparticles with prolonged blood circulation properties. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (17) 1521-1528 (2010)
 9. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.*, 7 (2) 501-509 (2010)
 10. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka, Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (14) 2552-2555 (2010)
2. 学会発表
1. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, "細胞内環境にตอบสนองする白金錯体制がん剤内包高分子ミセルの創製", 第 59 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川 2010 年 5 月 27 日(口頭)
 2. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 松本有, 片岡一則, "高分子ミセルを利用した細胞内薬物分布の時空間制御に基づく耐性がんの克服", 第 26 回日本 DDS 学会, 大阪国際交流センター, 大阪 2010 年 6 月 18 日(口頭)
 3. 西山伸宏, "難治がん治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 第 29 回分子病理学研究会, 筑波大学総合研究棟 D 棟, 茨城 2010 年 7 月 31 日-8 月 1 日 (招待講演)
 4. N. Nishiyama, H. Cabral, K. Kataoka, "Development of smart polymeric micelles for innovative cancer therapy", World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, September 1, 2010 (Invited Lecture)
5. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Nanocarrier-mediated photodynamic diagnosis and therapy of malignant tumors", 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology (October 5-7, 2010) "New Directions In Nanotheranostics: Imaging, Biosensors, Materials and DNA Technologies", Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany, October 6, 2010 (Invited Lecture)
 6. 西山伸宏, 守本祐司, 片岡一則, "高分子ミセル型 DDS と光照射システムの融合による革新的 PDT", 第 31 回日本レーザー医学会総会, ウィンクあいち, 愛知 2010 年 11 月 13 日 (招待講演)
 7. 西山伸宏, 村上真美, オラシオ カブラル, 呉寿栄, 松本有, 片岡一則, "オキサリプラチン耐性克服のための細胞内環境応答型高分子ミセルの開発", 第 32 回日本バイオマテリアル学会, グランドプリンスホテル広島, 広島 2010 年 11 月 30 日 (口頭)
 8. N. Nishiyama, Y. Morimoto, K. Kataoka, "Polymeric micelles for photodynamic diagnosis and therapy", The 15th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Sheraton Hotel, Salt Lake City, Utah, USA, February 13-16, 2011 (Oral)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と
脳腫瘍標的治療への展開

（マウス脳腫瘍モデルの構築とDACHPt内包ミセルの*in vivo*機能評価）

分担研究者 稲生 靖

東京大学医学部附属病院 トランスレーショナルリサーチセンター（脳神経外科） 特任准教授

研究要旨

悪性脳腫瘍は、機能温存のため外科的切除による治癒は一般に不可能であり、放射線治療や化学療法にも抵抗性で難治性である。本研究では、血液-脳関門または血液-腫瘍関門を選択的かつ効率的に通過し、薬剤を標的腫瘍内に効率的に集積させるキャリアとしてのミセル製剤の開発と実用化を目指す。脳腫瘍血管を構築する細胞の種類や発現マーカーの観点から、膠芽腫に類似した腫瘍モデルとしてSR-B10.A細胞の同系マウス同所移植モデルを使用し、解析を行った。また、ミセル製剤の腫瘍内集積を*in vivo*で経時的に観察するためにMRI装置による解析を行った。

A. 研究目的

本研究では、研究代表者片岡らが開発し、すでに複数の固形癌に対して動物実験モデルにおける集積性と有効性が示されている高分子ミセル化抗癌剤について、(1)悪性脳腫瘍の治療に対しても効率的なドラッグデリバリーシステムであるかを検証すること、(2)血液-脳関門または血液-腫瘍関門の分子病理学的特徴を解析し、ミセル化薬剤の腫瘍への到達効率に与える影響を検討すること、そして、(3)関門を通過して有効な腫瘍到達を得るために最適な機能性ミセルの開発を行なうこと、を目的とする。分担研究者は主にマウスモデルにおいてこれらを検証することを担当し、脳内同所モデルの作成とミセル投与後の抗腫瘍効果の検証を行った。

B. 研究方法および結果

1. マウス脳腫瘍モデルにおける検討

汎用されている腫瘍細胞株の脳内移植モデルを主に使用した。間質との相互作用をも検討すべく、免疫機能が正常である同系マウスへの脳内移植が可能な細胞を使用することとし、A/Jマウス由来の細胞株Neuro2a(neuroblastoma)とB10.Aマウス由来の細胞株SR-B10.A (glioblastoma)を使用した。比較のため、代表的な脳腫瘍細胞株であるU87MGのヌードマウス脳内移植モデルも使用した。一方、分子病理学的腫瘍血管構築に注目しての薬剤腫瘍内到達性の解析をより広く行うにあたり、脳以外の臓器由来の腫瘍細胞株の脳内移植モデルの検討を継続した。細胞株としては、B16(悪性黒色腫

瘍)、RenCa(腎細胞癌)、C26(大腸癌)、LL/2(肺癌)、4T1(乳癌)を使用した。これらの組織標本は分担研究者狩野のもとに送付し、血管壁を構築する細胞をその発現マーカーにより識別し検討した。その結果、SR-B10.A細胞モデルの腫瘍血管構築は、膠芽腫組織内にみられる糸球体様の血管構造に比較的類似しており、以後の実験ではこのモデルを採用した。

DACHPtミセルの抗腫瘍効果について、SR-B10.A脳腫瘍株同所接種モデルを用いて検討した。本モデルでは治療を施さない群の生存期間が腫瘍接種後14日程度であることと、体重減少等の毒性の程度等を考慮のうえ、投与量と投与間隔は腫瘍接種後7、9、11日後として4mg/kg(DACHPt換算)のDACHPtミセルの静脈内投与を行い、生存期間を観察した。また、脳腫瘍血管の高分子透過性を一過性に亢進させ、かつその腫瘍内滞留を延長させる薬剤の候補として、TGF- β 阻害薬剤の併用効果についてもあわせて検討した。

2. MRI装置を使用した腫瘍の状態の画像評価

脳内の腫瘍の状態は体外からは評価が不可能なため、従来は生存期間による解析または経時的な脳の摘出による病理組織学的検討にて評価を行ってきた。小動物用MRI装置を使用することで、同一個体を繰り返し経時的に観察することが可能となる。モデルとしてはSR-B10.A細胞のB10.Aマウス脳内接種モデルを使用した。今回の研究においては、装置の都合で撮影可能なマウスの数に制限があり、各実験結果は少数のマウスから得られたものであり、結果の解釈は慎重に行った。

脳内に接種した腫瘍がMRI画像として描出可能

であるかを、T1強調画像、T2強調画像、および通常のガドリニウム(Gd)造影剤使用によるT1強調画像において検討し、腫瘍径の追跡はT2強調画像が有用であることを確認のうえ、実際にDACHPtミセルで治療を行ったマウスでの腫瘍増殖抑制効果の検出を行った。他方、T2強調画像では治療に伴う壊死等との判別が行いにくいいため、より正確な評価のために必要に応じて通常のGd造影剤も使用した。

(倫理面への配慮) この研究で行った動物実験は東京大学及び研究協力先機関における動物実験実施規則に則って動物愛護の観点から適切に行った。遺伝子組換え実験、臨床研究に関する倫理指針に該当する研究、およびヒトES細胞を用いる研究には該当しない。

C. まとめ

本年度は、SR-B10.Aモデル(脳内腫瘍)において、ミセル製剤の*in vivo*での治療効果およびTGF- β 阻害剤併用での治療効果増強について、評価を行った。腫瘍評価にMRI画像装置を使用し生存期間延長が、実際に腫瘍増殖の抑制によることの検証を行った。

D. 研究発表

1. 論文発表

Ino Y, Todo T: Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47 Δ) for malignant glioma. *Gene Therapy and Regulation* 5 (1): 101-111, 2010.

Muraguchi T, Tanaka S, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K,

Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A:
NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating
cells by induction of oligodendroglial differentiation.
Cancer Res 71 (3): 1135-1145, 2011

2. 学会発表

2010年5月17-20日 (Travemuende, Germany) The
18th International Conference on Brain Tumor Research
and Therapy; Ino Y, Takahashi M, Saito N, Ikushima
H, Miyazono K, Todo T Oncolytic HSV-1 (G47Δ)
efficiently kills glioblastoma-derived cancer stem cells

2010年9月22-24日 (大阪) 第69回日本癌学会学
術総会; 稲生靖、福原浩、釣巻ゆずり、侯剣剛、竹
島雄太、本間之夫、藤堂具紀 緩徐に増大する腫
瘍にも高い治療効果を示す新世代がん治療用ヘル
ペスウイルスの開発

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（ナノメディシン研究事業）
分担研究報告書

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と脳腫瘍標的治療への展開
（マウス脳腫瘍モデルの組織学的評価）

研究分担者 狩野 光伸 東京大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨

従来のDDS治療薬の治療効果は、集積効果が著しく低い癌では十分ではない。これはEPR効果の程度が癌組織によって異なるため、と考える。脳腫瘍、とりわけ悪性度の高い膠芽腫は、従来薬だけでなく、DDS治療薬の効果も低い癌であり、正常脳におけるBlood Brain Barrierの透過度の低さに並ぶ、Blood Tumor Barrier (BTB)の存在も疑われる。本研究では、膠芽腫を含む脳腫瘍内の血管構築の特異性を明らかにしながら、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指す。今年度の研究により、ヒト膠芽腫のモデルとして妥当性があると考えられたSRB10A同所移植モデルにおいて、TGF- β 阻害剤の併用投与が、ナノDDSによる治療効果の発揮に有用であると考えられた。

A. 研究目的

脳腫瘍はBlood Tumor Barrierの存在が疑われ、従来のDDS治療薬の効果が低い癌である。一般に、EPR効果を利用した従来のDDS治療薬の癌への集積は、癌組織によって異なり、集積効果が著しく低下する癌では十分な効果を得られない。本研究では、脳腫瘍血管の構築を明らかにすることを通じ、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指す。このために、実際のヒト脳腫瘍の構築を明らかにしながら（分担研究者西原担当）、病理組織学的な比較において妥当な動物モデルを選択する。さらに、頭蓋内腫瘍モデルに対して、病理学的手法以外の検出方法すなわちMRI技術応用の確立も行う。これらを通じて、膠芽腫を含む脳腫瘍の有効な治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、SR-B10Aマウス脳腫瘍細胞株を用いた同所移植モデルを主に用いて各種解析と治療効果の検討を行った。またこのモデルの特徴を明らかにするために、モデルの構築は分担研究者の稲生により行われた。解析の病理学的方法論としては、マウスから摘出した脳または皮下腫瘍を凍結標本化し、これを薄切することにより行った。蛍光標識ミセルの場合は風乾後4%パラホルムアルデヒドで固定し封入してそのまま観察、またその他の免疫染色については特異的一次抗体、蛍光標識二次抗体の順に反応させてから観察を行った。観察・撮影にはZeiss社製510Meta共焦点顕微鏡を用いた。脳腫瘍動物モデルに対して投与した蛍光標識ミセルは、主任研究

者らにより開発されたものを用いた。

MRI撮影については、研究協力先の放射線医学研究所分子イメージング研究センター先端生体計測研究グループ計測システム開発チームに設置された7T高磁場MRIを用いた。

（倫理面への配慮）

この研究で行った遺伝子組換え実験は東京大学医学部及び研究協力先機関における組み換えDNA実験安全委員会において承認を受け、適切な拡散防止措置が取られた。また、動物実験は東京大学及び研究協力先機関における動物実験実施規則に則って動物愛護の観点から適切に行った。また、本研究で用いるヒト病理検体はすべて研究開始前に人体から採取された試料であり、患者個人に不険性が及ぶことはない。しかし、人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針に基づき、本学及び研究協力機関の倫理委員会の承認を得た。また、成果発表等の際には個人を特定できないよう最大限の配慮をした。本研究計画ではヒトES細胞を用いる予定はない。

C. 研究結果

従来の投薬治療を妨げていると言われる血液脳関門・血液腫瘍関門の構築解明と制御法の開発に重点を置き、前年度に引き続き解析・検討を行った。

マウスにおける腫瘍モデルは、本研究初年度に着

手しそのヒト膠芽腫のモデルとしての妥当性を示してきた、研究分担者である稲生らにより作成された、マウスSRB10A細胞を用いたグリオブラストーマ同所移植モデルを引き続き主に用いた。

本年度は、昨年度に引き続き、BTB構造の制御方法として有望な、TGF- β 阻害剤の投与による血管構築の変化と、それによるナノ DDS の治療効果の向上についてさらに詳細に解析した。まず、SR-B10A同所移植モデル動物に対して、分担研究者の稲生により TGF- β 阻害剤である LY364947 を 1mg/kg 投与し、その 24 時間後に動物を犠牲死させ、脳を摘出して解析を行った。血管内皮細胞と認識される PECAM1 陽性細胞と、血管壁細胞と認識される SMA 陽性細胞を、共染色により同時に解析した。この結果、狩野らの既報 (PNAS 2007) における膵癌モデル組織における TGF- β 阻害剤投与後の血管構築の変化と同様に、10 μ m 厚の切片における PECAM1・SMA 共陽性として認識される、壁細胞に被覆された血管構築の、全内皮面積に対する割合が、有意に TGF- β 阻害剤投与後に低下することが示された。一方で、全内皮面積そのものは TGF- β 阻害剤投与後に若干の増加傾向を示したが、有意な差ではなかった。この結果も、狩野らの前出の既報の結果と一致する。すなわち、TGF- β 阻害剤投与の壁細胞被覆腫瘍血管構築に対する効果は、脳腫瘍であるか、膵腫瘍であるかにかかわらず同等であるという結論に達した。これまで腫瘍の治療法はその発生源地である臓器ごとに開発されてきたことを考えると、異なる臓器に発生する腫瘍の間に、機構の共通点が見出されることは画期的と考える。

この結論に基づき、次に SRB10A 同所移植モデルへのナノミセルの蓄積効果にもたらず TGF- β 阻害剤投与の影響を検討した。脳腫瘍モデルにおけるミセルの蓄積を評価するにあたり、病理学的には蛍光標識付きのミセルを用い、切片における蛍光物質の分布による評価を行った。一方、蛍光標識はミセル蓄積量に対して往々にして十分な蛍光強度を持たないため、これを別手法として補強する目的で、MRI T1 強調画像における造影効果を持つ Gd を内包したミセルを用いた、高磁場 MRI を用いた解析も並行することとした。ここでは、研究協力先の放射線医学総合研究所に設置された 7 テスラ高磁場 MRI を、同研究所分子イメージング研究センター先端生体計測研究グループ計測システム開発チーム青木伊知男チームリーダーの全面的な協力をいただき、用いた。昨年度、ミセル内包のない Gd-DTPA 単体 (すでに臨床で用いられているのと同等の薬剤) を用いて、SRB10A 同所移植モデルの撮影を行った結果、SRB10A モデルにおける造影程度は、対照となる U87MG モデルにおける造影程度よりも低く、これまでに得られた血管構築の知見を反映していることが示唆されていた。

これらの前提に基づき、まず病理学的に、ミセル

として主任研究者らにより合成された、DACHPt を内包しかつ蛍光標識を持ったミセルを用いて分担研究者稲生らにより投与 24 時間後に摘出された標本の検討を行ったところ、平均粒径 70nm のミセルにおいて、TGF- β 阻害剤の投与により腫瘍内蓄積の増強が認められた。次に MRI による検出手法に対しては、前述の通り、同じく主任研究者らにより合成された、Gd-DTPA と DACHPt の双方を内包したミセル (Kaida et al., Cancer Res, 2010) を用いた。この結果、MRI にても、腫瘍組織の造影効果が認められ、蛍光標識ミセルによる結果が裏付けられた。

これらの結果を踏まえ、SRB10A 同所移植モデルに対する DACHPt 内包ミセルの治療効果を示すための実験に着手した。具体的なミセルの薬効を確認するにあたって、前年度までに明らかになったように皮下腫瘍モデルが実際のヒト脳腫瘍に比較して不相当であるとすれば、頭蓋内腫瘍の成長及び増殖抑制効果を、動物を生かしたままでも何らかの手段で確認する以外に実効的な方法はない。この目的のためにも、高磁場 MRI による評価を行うこととした。昨年度に確認されたとおりに、SRB10A 同所移植腫瘍は、造影なしの T2 強調画像により認識可能である。したがって、この画像をもとに腫瘍体積の変移を追った。この結果、無治療個体に対して、TGF- β 阻害剤併用ミセル治療個体においては、腫瘍増殖の抑制効果と、生存の延長が認められた。治療個体は治療開始後 30 日以上生存したのに対して、無治療個体は 10 日で死亡した。

D. 考察

SRB10A同所移植モデルはヒト膠芽腫のモデルとして妥当性があると考えられたが、このモデルにおいて、TGF- β 阻害剤の併用投与が、ナノDDSによる治療効果の発揮に有用であると考えられた。

この作用は、腫瘍内血管の壁細胞被覆の減少による血管透過性の亢進によるナノDDSの蓄積増加によるものと考えられた。

E. 結論

今年度の研究により、ヒト膠芽腫のモデルとして妥当性があると考えられたSRB10A同所移植モデルにおいて、TGF- β 阻害剤の併用投与が、ナノDDSによる治療効果の発揮に有用であると考えられた。

このような動物頭蓋内病変モデルの解析に、高磁場MRIの応用が有用であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified

- crosslinked polyplex micelles. *J. Control Release.* (2010) 149(1):51-7
2. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M.R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble flt-1. *Mol. Pharm.* (2010) 7 (2) 501-509
 3. Johansson E, Komuro A, Iwata C, Hagiwara A, Fuse Y, Watanabe A, Morishita Y, Aburatani H, Funa K, Kano MR*, Miyazono K. Exogenous introduction of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 reduces accelerated growth of TGF-beta-disrupted diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer Sci.* (2010) 101(11):2398-403 (Highlighted in "In this issue")
 4. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood.* (2010) 116(23):5060-70
 5. Ota H, Eto M, Kano MR, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Induction of Endothelial Nitric Oxide Synthase, SIRT1, and Catalase by Statins Inhibits Endothelial Senescence Through the Akt Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2010) 30(11):2205-11
 6. Oba M, Vachutinsky Y, Miyata K, Kano MR, Ikeda S, Nishiyama N, Itaka K, Miyazono K, Koyama H, Kataoka K. Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble flt-1. *Mol Pharm* 7, 501-509 (2010)
 7. Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene.* (2011) 30(14):1693-705.
 8. Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano MR, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K. Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Sci Transl Med.* (2011) 3(64):64ra2.
2. 学会発表
 1. 狩野光伸、第1回バイオクリエーション研究会特別シンポジウム、「Bio-creationによる難病解明」、愛媛、2010年1月25日
 2. 狩野光伸、第99回日本病理学会総会、がん難治性の原因をナノテクノロジーと病理学によって捉えなおす、2010年4月29日
 3. 狩野光伸、TGF- β 阻害剤とナノDDSによる難治腫瘍の治療、Vascular Biology Innovation Conference、2010年8月22日
 4. MR. Kano, H. Nishihara, K. Kataoka, K. Miyazono, Treating "intractable" tumours by nanoDDS and TGF-beta inhibitor, Third International NanoBio Conference 2010, Zurich (Nanobio-Zurich 2010), Zurich, Switzerland. 2010年8月24-27日
 5. 狩野光伸、第69回日本癌学会学術総会、Analyses of refractory solid tumors for application of nanoDDS、2010年9月23日
 6. 狩野光伸、難治状態を治すには：ヒト個体から社会まで、北陸先端大学第14回マテリアルサイエンス研究科セミナー、金沢、2011年3月2日
 7. Kano MR, Treating intractable tumors with nanoDDS, International Conference on Biomaterials Science 2011. 2011年3月18日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

明石 満・松崎典弥・宮園浩平・狩野光伸・細谷仁美・片岡一則・オラシオアマデオカブラルオレンゾ・伊地知秀明、腫瘍組織モデルの製造方法、特願2010-138465

血管内腔からがん組織への高効率・特異的移行を実現する革新的DDSの創成と脳腫瘍標的治療への展開
(ヒト脳腫瘍組織の分子病理学的検討)

研究分担者 西原 広史 北海道大学大学院医学系研究科 特任准教授

研究要旨

本研究は、脳腫瘍血管構築の特異性を明らかにしながら、血管内皮細胞のトランスサイトシスによるミセル型DDSの高い集積性を利用し、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指すものであるが、これらの研究モデル開発及び開発薬剤の投与にあたり、実際のヒト脳腫瘍組織での組織構築を解析し、比較検討を行うことが、その有効性検証に不可欠である。本年度は脳腫瘍特異的な血管構築と実際のヒト脳腫瘍症例における生存との相関の解析を行った。

A. 研究目的

脳腫瘍はBlood Tumor Barrierの存在により、従来の抗癌剤治療薬の効果が低い癌である。本研究は、脳腫瘍血管の構築を明らかにしながら、ナノバイオテクノロジーを用いて新しいDrug Delivery Systemを構築し、より効果的な脳腫瘍治療薬開発を目指すものである。

B. 研究方法

昨年度までの研究において、神経膠腫の血管構築が、α SMA陽性の厚いPericyteで被覆されるGlomeruloid血管と、α SMA陰性PDGFRβ陽性の薄いPericyteで被覆されるChicken wire vascular networkとの二種類に分類出来ることを見出した。そこで、これらの知見に基づいて、実際のヒト神経膠腫症例の検鏡を行って血管パターンを分類し、その予後と比較することで、血管構築と臨床予後の相関を検討する。具体的には、当教室でGrade IIIまたはIVと診断された悪性神経膠腫55例において、通常のHE染色に加えてα SMA、PDGFRβ、CD31の免疫染色を行い、血管構築から下記の3群に分類した。

G群：血管の80%以上をGlomeruloid vesselが占める群

C群：血管の80%以上をChicken wire patternが占める群

GC群：G群とC群の中間

その上で、各群の生存曲線を作成した。

染色に用いた抗体は以下表1の通り。

抗体名	メーカー	clone	免疫動物	希釈倍率	抗原賦活化処理
CD31	abcam	Polyclonal	Rabbit	1:100	Target Retrieval Solution, pH 9.0 125°C 10min
actin	Dako Japan	1A4	Mouse	1:100	無処理
desmin	Dako Japan	D33	Mouse	1:100	Dako REAL™ Target Retrieval Solution 125°C 10min
PDGFRβ	Cell Signaling Technology	C82A3	Rabbit	1:150	Target Retrieval Solution, pH 9.0 95°C 温浴 30min

表1 免疫染色に用いた抗体の一覧

(倫理面への配慮)

本研究で用いられるヒト病理検体はすべて研究開始前に人体から採取された試料であり、患者個人に不利益・危険性が及ぶことはない。しかし、人権擁護の観点から原則として研究開始前までに当該患者から試料の利用に係る同意を受けるものとし、同意を受けることが出来ない場合には臨床研究に関する倫理指針に基づき、本学倫理委員会の承認の下に研究を遂行する。同時に、これらの研究活動を当教室のホームページに公表し、もし患者から自身の検体の使用停止の申し入れがあった場合には速やかにその検体の使用を中止することとしている。また、成果発表等の際には個人を特定できないよう最大限の配慮をした。

C. 研究結果

55例の分類の結果と、各グループの診断の内訳を表2に示す。3群はほぼ均等に分類された。

	Total	AO	AOA	GBM with oligo	AA	GBM
C群	18	5	7	1	5	0
GC群	20	3	3	1	1	12
G群	17	0	1	3	1	12
Total	55	8	11	5	7	24

表2 AO; anaplastic oligodendroglioma, AOA; anaplastic oligoastrocytoma, GBM; glioblastoma, AA; anaplastic astrocytoma

次に、各グループの生存曲線を図1に示す。その結果、Chicken wire patternの血管を殆ど持たない群(G群)は、20%以上の割合でChicken wire patternの血管を有する群(GC+C群)に比して、有意に予後不良であることが判明した。尚、この結果を、これらの解析に用いた母体となる症例群における従来のWHO gradeingによる予後曲線(図2)と比較すると、Grade IIIとIVに相当する差異が認められることが判明し、Chicken wire