

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

グロメロイド血管制御ナノsiRNAによる膠芽腫の革新的治療戦略開発

研究代表者 狩野 光伸 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高い腫瘍である。しかし、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は依然として悪性腫瘍の中でも特に悪い。このため、効果的な化学療法の開発が待たれる状況である。近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては未だにナノDDSの十分な薬効発揮は難しい状況である。この状況に鑑み、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指した。

研究分担者

岸村顕広・九州大学大学院工学系研究科・准教授

松崎典弥・大阪大学大学院工学系研究科・助教

西原広史・北海道大学大学院医学研究科・特任准教授

着目されてこなかった。従って妥当な実験系も存在していない。これをヒト病理学的所見に照らしながら確立し、主にGVに含まれるPCを治療標的として、その血管内皮細胞（endothelial cells, EC）への接着や成熟を抑制するsiRNA配列を特定し、そのsiRNAを搭載したナノDDSをヒトにおける適用可能性を視野に入れつつ開発した。

A．研究目的

我々はこれまでの研究から、グロメロイド血管（GV）では血管内皮細胞周囲の壁細胞（pericyte, PC）集積が豊富であることを見出しており、これによりPCの過剰増殖が血管バリア能を異常に強化している可能性を仮説とした。この仮説に基づき、本研究では膠芽腫組織内におけるPCを抑制することでGV形成を回避しうる可能性を考えた。

GVは、ヒト脳腫瘍のなかでもっとも悪性度が高い悪性膠芽腫における特徴的血管構造である。しかしながら、その機能的側面にはこれまでほとんど

B．研究方法

H25年度は、H24年度に選定した膠芽腫モデル細胞株（TS-GFP細胞）を用いてGV形成に関する評価を行った。

始めに、TS-GFP細胞(Sampetean et al, *Neoplasia* 2011)によるマウス移植モデルにおけるGV様構造の解析を行った。TS-GFP細胞は、これまでの報告においては頭蓋内移植モデルにより検討が進められてきた。我々もH24年度に同モデルの同所移植標本について組織学的解析を行った。その結果、GV

様の構造はヒト同様にSMA陽性細胞が他モデルと比較し厚く血管周囲を覆っていることを見いだした。これら同所移植モデルは十分にヒト膠芽腫病理を反映しているものの、腫瘍生育に3-4週間の時間を要した。

本研究では、siRNA製剤の薬効を病理組織構築と比較をしつつ、十分に検証する必要がある。そこでより迅速な解析を行うために、TS-GFP細胞による皮下移植モデルの組織構築について解析を行った。

並行して、H24年度に確立したヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いた*in silico*解析手法により導出した、GV抑制にあたり有力な候補分子の中から、CXCL12およびその受容体であるCXCR4について解析を進めた。

まずCXCR4を阻害する、低分子化合物（AMD3100：既に臨床投与が認可されている）をTS-GFP細胞皮下移植モデルに投与し、PC被覆およびナノ粒子（PICsome）分布に関して組織学的に解析した。

さらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列（siCXCL12）を決定した上で、siRNA送達用ナノデバイスであるcRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに搭載し（以下、siCXCL12ミセル）、同様にPC被覆並びにPICsome分布を評価した。

（倫理面への配慮）

患者の病理検体に関して：本研究で用いられる病理検体はすべて研究開始前に研究分担者により北海道大学において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。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（平成20年厚生労働省告示第415号）に基づいて、当該機関の倫理委員会で得られている本研究課題の承認内容に基づき、組織代表者の許可を得る原則のもと研究を遂行した。また、成果発表等の際には個人の特定が行われないよう最大限の配慮をとっている。

動物実験に関して：本研究課題で行う動物実験については、各所属機関の動物実験施設の動物生命倫理に関する審査委員会に申請し、承認を得て行った。全ての動物は本学ガイドラインに基づいて愛護的

に扱い、実験に際して苦痛は最小限になるよう努め、殺処分の際は安楽死させるようにした。

C．研究結果

はじめに、TS-GFP細胞を移植する際に調製する細胞懸濁液の至適条件について検討を行った。TS-GFP細胞 3×10^5 個を、TS-GFP細胞の培養培地（TS培地）またはTS培地とマトリゲル基底膜マトリックスグロースファクターリデュースト（マトリゲルGFR、コーニング社）を等量ずつ混じた溶液で懸濁し、マウス腹部に移植した。

腫瘍体積の経時変化を追ったところ十分に生着し、移植後10日目には解析を予定していた 500mm^3 に達した。組織学的な評価を行った結果、皮下腫瘍組織内の血管もまた、脳同所移植モデルと同様にSMA陽性細胞による被覆が顕著に見られ、血管密度が高く、形状も不整であった。

この傾向は、特にTS培地とマトリゲルGFRを混じた溶液で細胞懸濁液を調製した群において顕著であった。

この結果より、皮下移植モデルを用いることでより迅速にGV内PC抑制による薬効評価を行うことが可能であると考え、初期検討において皮下移植モデルを利用することとした。また、以後の実験ではTS培地とマトリゲルGFRを等量混じた溶液で移植細胞の懸濁液を調製した。

次に、H24年度に確立した*in silico*解析手法により導出した、GV抑制にあたり有力な候補分子の中から、初めにCXCL12について検証を進めた。

まずTS-GFP細胞皮下移植動物モデルに対し、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤（AMD3100）を、移植後7-9日目に 0.25 mg/kg ずつ腹腔内投与し、10日目に腫瘍組織を回収し、PC被覆に関して組織学的に解析を行った。その結果、PC（SMA陽性細胞）による血管の被覆が約50%低下していることを見いだした。

続いて、AMD3100による処置後にCy5標識nano-PICsome（Cy5-PICsome）を尾部静脈より投与した個体に関してPC被覆とCy5-PICsome分布について評価し、粒径が 100 nm であるナノ粒子の腫瘍内分布にAMD3100が与える影響について解析した。

その結果、AMD3100によりCy5-PICsomeの腫瘍内分布領域が有意に拡大することが明らかになった。

そこでさらに、CXCL12を抑制するsiRNA配列 (siCXCL12) を設計した (siCXCL12-CDS1またはCDS2) 。始めにin vitroにおける抑制効率を解析した結果、いずれも70-80%程度CXCL12の発現を抑制可能であることを確認した。

そこで、これらのsiRNAをcRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリシンによるミセルに搭載し(対照ミセルおよびsiCXCL12ミセル) 、同様にPC被覆並びにCy5-PICsome分布を評価した。

始めに、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後3、5、7、9日目に、siCXCL12-CDS1またはCDS2または対照siRNAを各々内包した高分子ミセルをsiRNA濃度9.2 μ Mとなるよう調製された水溶液を200 μ l/匹の投与量で尾静脈より投与し、移植後10日目に腫瘍組織を回収した。PC被覆に関して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12-CDS1またはCDS2のいずれを内包したミセルによっても、PC被覆の有意な抑制は観察されなかった。

さらに詳細に血管構築を解析したところ、CXCL12の抑制により血管の形状が対照群とは異なることを見いだした。CXCL12は血管新生亢進にも寄与するという報告もなされていることから、腫瘍形成期間の初期からCXCL12を抑制する今回の治療プロトコルでは、PC被覆を伴う腫瘍血管に対する薬効については解析が難しいと判断した。そこで次に、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおける10日間の腫瘍形成期間のうち、腫瘍内血管が十分にPCにより被覆される時期の特定を試みた。TS-GFP細胞移植後3-8日目の期間に関して腫瘍内血管のPC被覆率を評価した結果、移植後6日目以降には血管構築が安定化し、PC被覆も80-90%ほどの血管で豊富に見られることを確認した。

以上より、TS-GFP細胞皮下移植モデルにおいてPC抑制を行うミセル製剤の投与は、移植後6日目以降が適切であると考えた。

そこで、改めてsiCXCL12ミセルのPC被覆に対する影響を評価するために、TS-GFP細胞皮下移植モデルに対し移植後6、8日目にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った。

その結果、PC被覆 (SMA、NG2陽性) 血管の有

意な減少が確認できた。さらに、同様にsiCXCL12ミセルまたは対照ミセルを投与後、さらに9日目にCy5-PICsomeを投与し、10日目に腫瘍組織を回収して組織学的に解析を行った結果、siCXCL12ミセル投与群においてPICsome分布領域が拡大することを確認した。

以上の結果より、TS-GFP細胞による膠芽腫モデルにおいてCXCL12を特異的に抑制するsiRNAミセルを投与すれば、その後に投与するナノ薬剤の腫瘍実質への到達効率を改善することができることが示された。

D . 考察

本研究では、従来とは異なるアプローチによる膠芽腫の画期的な化学療法の確立を目指した。これまでに治療標的として着目されたことのないグロメルロイド血管 (glomeruloid vessel, GV) に焦点を当て、ナノ粒子を用いたsiRNAの送達によりGVにおける漏出性を制御することで、腫瘍組織全体への薬剤送達効率を改善することを目指している。我々はこれまでの研究においてGVに着目した解析を行い、GVは一層の内皮細胞およびそれを取り囲む多層のPCから構成されることを確認し、組織中にGVが多い症例は予後不良であることを明らかにしている。また膠芽腫以外の腫瘍ではPC抑制によりナノDDS治療効率が大きく改善されることを膵癌ほかで実証してきた。したがって、GVを標的とすることで、国民の死因の第一位であるがんの中でも特に治療が困難な膠芽腫において、化学療法の効能および患者QOLの大幅な改善をもたらすことができると確信される。

以上の目的を鑑み、H24年度にGV形成機構解明のためによりふさわしい細胞株であるTS-GFP細胞の選定に至った。H25年度はこのTS-GFP細胞を用い、GV様構造における壁細胞 (pericyte, PC) を抑制することを試みた。H24年度行ったヒト膠芽腫に関する既存データベースを用いたin silico解析より、標的候補としてCXCL12を得たことを受け、H25年度にはこの発現を抑制するsiRNAやその受容体であるCXCR4阻害剤をTS-GFP細胞移植モデルに投与し、PC被覆率ならびにCXCL12抑制後の腫瘍内に

おけるナノ薬剤の分布について解析を行った。異なる投与スケジュールによる複数の検討の結果、TS-GFP細胞による腫瘍組織内で血管が十分に構築され、PC被覆も豊富になった時期からCXCL12を抑制するミセル製剤を投与すれば、その後に投与するナノ薬剤の分布効率を向上させられることが明らかになった。この結果から、膠芽腫においても血管構築を制御することにより100 nm程度の比較的大きな粒径を持つナノ粒子の腫瘍実質への送達効率を改善することが可能であることが示唆された。今回用いた膠芽腫モデルはマウス由来細胞であるため、ヒト臨床検体由来の膠芽腫モデル細胞を用いて同様の検証を行う必要があることは課題であるが、ヒト病理組織の解析から、ヒト膠芽腫のGVにおいても、CXCL12受容体であるCXCR4陽性細胞が観察されることがわかった。CXCR4陽性の患者は予後が悪いことが既存データベースによる解析より明らかになり、一方、これまでの研究より、予後の悪い症例においてGVが多く観察されることも見出している。これらより、ヒト膠芽腫においてもCXCR4のGV形成への関与が示唆され、マウス由来モデル細胞であるTS-GFP細胞で確認されたCXCL12阻害によるナノ粒子分布増大の傾向がヒトにおいても再現可能であることが期待できると考えている。

E . 結論

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高いが、現状において有効な治療法はほぼなく、治療成績は依然として悪性腫瘍の中でも特に悪く、効果的な化学療法の開発が待たれる。近年、ナノ薬剤送達システム（ナノDDS）はがん治療において有効性を示しつつあるが、膠芽腫に対しては製剤設計のみではナノDDSの十分な薬効発揮は難しい。したがって、本研究では膠芽腫の特徴的病理構造、特にグロメロイド血管（glomeruloid vessel, GV）に着目し、膠芽腫の新規治療戦略確立を目指し、下記の進展があった。

まず、GV構成細胞を抑制するシグナル分子の同定について、本研究ではGV形成の責任因子として主に老化関連分泌因子群（Senescence-associated secretory proteins, SASPs）に着目してきた。H24年度に本研究のモデル細胞として見出したTS-GFP細胞についても、SASPs遺伝子群（特にCXCLs、EGF）が高発現していることを確認し、SASPsがGV抑制

の標的候補であることが改めて示唆された。さらに既存データベースを用いたin silico解析結果を合わせ、CXCL12を標的分子候補として解析を進めた。

薬効の評価基準として壁細胞マーカーであるSMA陽性細胞による血管被覆率を指標とし、TS-GFP細胞移植モデルを用いた解析を行った結果、CXCL12の受容体であるCXCR4の低分子阻害剤を投与することによりより壁細胞被覆が有意に低下することを見出した。

さらに分担研究者により行われた、ヒト膠芽腫CXCL12受容体であるCXCR4のヒト病理における発現解析の結果、GV構造が主に見られるGradeIVの検体においてのみ、GV構造においてCXCR4陽性細胞が確認できた。GradeIVの検体ではGV構造周囲においても、CXCR4陽性細胞がGVに向けて集積する病理像が得られており、CXCL12-CXCR4シグナルがヒト病理においてもGV形成に関与する可能性が示唆された。

また、分担研究者とともに、新たに腫瘍細胞の三次元培養に成功し、その技術基盤を確立した。本法によって多層化した腫瘍細胞の細胞応答性に関して検討した結果、層構造の厚みが増すほど各種壁細胞マーカーの発現上昇が確認された。

次に、分担研究者とともに、実用化可能なsiRNA内包高分子ミセルの開発を行い、H25年度は、siRNA送達用のナノ粒子キャリアとして、企業導出済み実績のあるsiRNA内包高分子ミセルを用いた。具体的には、cRGD付加PEG-イミノチオラン修飾ポリリンを用いた。このsiRNA内包高分子ミセルは、腫瘍血管内皮細胞に過剰発現するインテグリン受容体の特異的に認識する環状RGDペプチドを表層に搭載したものであり、標的分子発現を抑制する種々のsiRNAについてin vivoにおける奏功が確認されている。我々もCXCL12に対するsiRNAを設計し、同高分子ミセルに内包し（siCXCL12ミセル）、TS-GFP細胞移植モデルに投与した。その結果、siCXCL12投与群において壁細胞が強く抑制され、siCXCL12ミセル処置後に投与されるナノ薬剤の腫瘍内分布が向上することが明らかになった。

さらに、siCXCL12の投与スケジュールに関し検討した結果、わずか一回の投与でもナノ薬剤分布改善の効果がみられることを確認した。これらの結果から、siCXCL12をナノ担体に内包して腫瘍血管を特異的に抑制し、さらにナノ薬剤を投与すれば、膠芽腫においても十分なナノDDSを達成しう

ることが示唆された。

本研究で得たこれらの成果に基づき、その産業化を促進するため、関連企業と共同研究を開始した。

F . 健康危険情報

特記すべきことはない。

G . 研究発表

1. 論文発表

Kano MR. Nanotechnology and tumor microcirculation. Adv Drug Deliv Rev. 2013. Epub ahead of print.

Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, Kano MR, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Cyclic RGD-Linked Polymeric Micelles for Targeted Delivery of Platinum Anticancer Drugs to Glioblastoma through the Blood-Brain Tumor Barrier. ACS Nano. 2013, in press.

Kokuryo D, Anraku Y, Kishimura A, Tanaka S, Kano MR, Kershaw J, Nishiyama N, Saga T, Aoki

I, Kataoka K. SPI0-PICsome: Development of a highly sensitive and stealth-capable MRI nano-agent for tumor detection using SPI0-loaded unilamellar polyion complex vesicles (PICsome s). J Control Release. 2013;169(3):220-7.

2. 学会発表

〔学会発表〕

Use of nanoparticle to analyze vasculature in diseases, Kano MR, The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '13)、大阪、口頭発表（招待）、2013.7.

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない