

15. 高分子抗癌剤の治療効果を高める新規 EPR 増強剤の開発

異島 優

Key words: ヒト血清アルブミン,
ドラッグデリバリーシステム,
一酸化窒素, 腫瘍微小環境,
Enhanced permeability and retention effect

熊本大学 薬学部 薬剤学講座

緒言

腫瘍部位における著しい血管透過性の亢進などが原因で、高分子がより高い腫瘍内蓄積性を示す効果 (EPR 効果) は、現在の高分子抗癌剤開発の礎となっている理論の一つであり、本邦でもドキソルビシンを封入したリポゾーム製剤ドキシル®をはじめ、複数の薬剤について臨床試験が行われている。そのため、今後も EPR 効果を基盤とした高分子抗癌剤の開発は増え続けることが予想される。しかしながら、それら高分子抗癌剤の腫瘍集積性は、EPR 効果を駆使しても高々 10% 程度にすぎず、残りの 90% は標的部位以外に拡散あるいは代謝される結果、副作用や長期毒性の原因となる。言い換えれば、この問題の克服には、EPR 効果を高めることが鍵を握っている。

他方、高分子抗癌剤の開発における課題の一つとして、動物モデルと癌患者での EPR 効果の違いが指摘されている。この原因として、異種移植モデルや比較的 EPR 効果が生じやすい癌種では、内因的な EPR 効果が発揮されやすいが、癌患者の癌組織では内因的な EPR 効果に限界があることに起因していると考えられている。すなわち、『内因的な EPR 効果だけでは十分な集積性が得られない』という新たな課題がヒトへの応用に移行した段階でクローズアップされるようになってきたり。

そこで我々は、『EPR 増強剤の併用による次世代型 EPR 治療戦略』が、上述した高分子抗癌剤の臨床応用における課題の克服に有効であると考えている。本戦略のメリットは、既存の高分子抗癌剤に EPR 増強剤を併用投与するだけで、主薬の腫瘍内集積性を増大させるとともに、正常組織への分布を抑制できるため、治療効果の向上はもとより、副作用の軽減による QOL の改善も期待できる点である。また、EPR を基盤とした高分子製剤であれば、理論的にはどの薬剤にも応用可能である。すでに我々は、生体内シグナル伝達物質である一酸化窒素 (NO) が EPR 効果を正に制御していること着目し、EPR 増強剤としての可能性について検討してきた。その研究過程で、NO の臨床応用に際しては、自身の短い半減期と低い腫瘍移行性を克服するための担体が必要不可欠であることを認識した。本研究で用いる NO 担体は“ヒト血清アルブミンの 2 量体 (HSA-Dimer)”であり、その利点としては次の 3 点があげられる。

- (1) 血清タンパク質であることから非常に生体適合性に優れていること
- (2) 単純タンパク質であるため酵母などにより遺伝子組換え体として大量に発現可能なこと
- (3) 内因的な NO 運搬タンパク質であるため、循環血中を安定に NO 輸送可能なこと

本研究では、HSA-Dimer 1 分子に NO を 2 分子付加した S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンダイマー (SNO-HSA-Dimer) を作製し、EPR 増強剤としての有用性について検討する予定である。既に、SNO-HSA-Dimer が HSA よりも 7 倍効率良く腫瘍内に NO を輸送することを突き止めている²⁾。この SNO-HSA-Dimer の分子径はおおよそ 30 nm である。興味深いことに、片岡らの報告によると、EPR 効果を示しやすいモデルでは、30~100 nm まで幅広いサイズのみセルが抗癌効果を示したが、EPR 効果を示しにくい臓癌では、30 nm のみセルのみが奏効した。したがって、SNO-HSA-Dimer は、EPR 効果が低い癌種においても送達可能なサイズであり、効率的に NO を送達し、EPR 効果を増強する結果、高分子抗癌剤の有用性を向上させることが期待される。そこで本研究では、『高分子抗癌剤の移行性を 5 倍上昇させる』ことを目標としている。現状の 10% 程度の移行性から 50% まで上昇させることで、『投与量を 1/5 に削減できる』ことや『他臓器への移行性を半減する』ことに繋がるため、副作用の少ないより効果的治療が可能になる。

方 法

1. 担癌マウスの作製

C26 担癌マウスは、BALB/c マウス（雌，8 週齢）を日本 SLC より購入し，エーテル麻酔下で，C26 細胞懸濁液 (2×10^6 cells/100 μ L saline) を背中側皮下に投与し，C26 担癌マウスを作製した。B16F10 担癌マウスは，C57BL6 マウス（雌，8 週齢）を日本 SLC より購入し，エーテル麻酔下，B16F10 細胞懸濁液 (2×10^6 cells/100 μ L saline) を背中側皮下に投与し，B16F10 担癌マウスを作製した。

なお，腫瘍体積 (v) については腫瘍の短径 (a) と長径 (b) を計測し， $v = 0.4 \times a^2b$ 式にて算出した。

2. 腫瘍内 EPR 増強時間および部位の検討

腫瘍体積が 100 mm³ に達した C26 担癌マウスにて，SNO-HSA Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) を尾静脈より投与し，その 0.5，1，2，3，4 時間後にエバンスブルー (EB) (10 mg/kg) を尾静脈より投与した。EB を投与して 24 時間後に採血及び腫瘍摘出を行い，血液は遠心処理後に血清を回収した。腫瘍は，血管近傍から上部，中部，下部と 3 つの部位に分断し，それぞれを PBS で洗浄後，ホルムアミドに浸しホモジナイズし，遠心処理後，その上清をサンプルとして用いた。

3. Abraxane[®]の抗腫瘍活性評価

腫瘍体積が 100 mm³ に達した C26 担癌マウスにて投与開始時点を day 0 とし，day 0，7，14 に Abraxane[®] (20 (PTX) mg/kg) 及び SNO-HSA Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) を尾静脈より投与した。経日的に腫瘍体積を測定した。

4. Doxil[®]の抗腫瘍活性評価

腫瘍体積が 100 mm³ に達した C26 担癌マウスおよび B16F10 担癌マウスにて投与開始時点を day 0 とし，day 0，7，14 に Doxil[®] (2.0 or 4.5 (DOX) mg/kg) および SNO-HSA Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) を尾静脈より投与した。

結 果

1. SNO-HSA Dimer 投与による腫瘍内 EPR 増強時間および部位の解析

まず，腫瘍内の EPR 増強時間および EPR 増強部位の範囲を評価すべく，EB の集積性評価を行った。マウスの背中側に C26 大腸癌細胞を皮下投与した担癌モデルを作製し，EB 色素単独投与および，SNO-HSA Dimer 併用投与時における EB の腫瘍集積性および腫瘍内局在量を測定した。併用投与群に関して，SNO-HSA Dimer 投与後 0.5，1，2，3，4 時間後に EB を投与した (Fig. 1)。

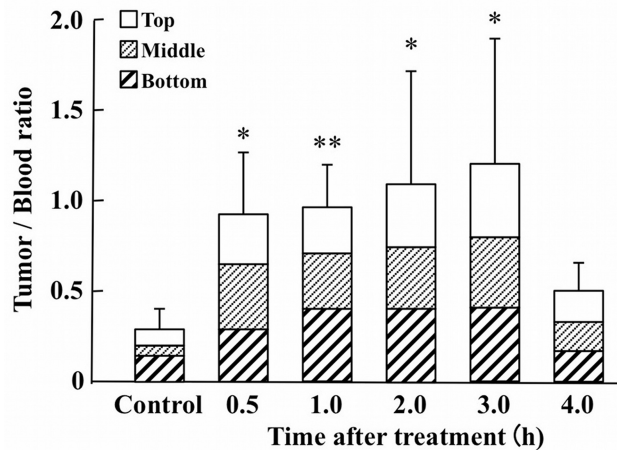


Fig. 1. Extravasation of Evans blue induced by SNO-HSA Dimer in various section of solid tumor. SNO-HSA-Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) was injected intravenously into C26-bearing mice. Evans blue dye was injected i.v. at a dose of 10 mg/kg into three of the six groups of the tumor-bearing mice at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h after administration of SNO-HSA-Dimer. Twenty-four hours later, the top (nearest from blood vessel), middle, and bottom (furthest from blood vessel) sections of tumor tissues were assessed. Blood concentrations of Evans blue in the mice were also assessed as reference. Results are means \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control. The statistical significance of collected data was evaluated using the ANOVA analysis followed by Newman-Keuls method for more than 2 means.

腫瘍集積性に関しては、EBの組織/血漿濃度比により評価し、腫瘍内局在量に関しては、腫瘍組織を血管側から上部 (Top)、中部 (Middle)、下部 (Bottom) に3等分し、それぞれの部位のEB濃度を算出し評価した。その結果、EB単独投与と比較して、SNO-HSA Dimerとの併用投与は、EBの腫瘍集積性を向上させ、その効果はSNO-HSA Dimer投与後0.5時間から増強が観察され、投与後2時間においてピークに達し、その後EPR効果は、コントロールレベルへ戻ることが判明した。この結果から、SNO-HSA DimerによるEPR増強作用はSNO-HSA Dimer投与後1～3時間に強く観察され、その効果は一過性であることが示唆された。

2. アルブミン結合型抗癌剤の治療効果におけるSNO-HSA Dimer併用投与の有用性評価

EPR効果の指標として使用したEB法は、色素であるEBが、血中のアルブミンと強力に結合し、見かけ上分子量約7万という高分子として挙動することで、EPR効果や炎症などにより透過性が亢進した血管のみから漏出するという原理を利用している。すなわち、内因的なHSAの腫瘍への集積性がSNO-HSA Dimerにより向上していることを示すものである。このことから我々は、HSAをDDS担体として用いている抗癌剤においても同等の効果が得られるのではないかと仮説立てた。このことを実証すべく、すでに上市されているアルブミン結合型高分子抗癌剤であるAbraxane[®]を用い、その抗腫瘍活性へ及ぼすSNO-HSA Dimerの併用効果の影響を検討した。このAbraxane[®]は、HSAにパクリタキセルを結合させナノ粒子化したパクリタキセル製剤である。ナノ粒子化されているものの、EPR効果を企図した設計ではなく、水に極めて難溶性のパクリタキセルをHSAに結合させ、凍結乾燥製剤化したことにより、従来のパクリタキセル製剤の溶媒であるポリオキシエチレンヒマシ油やエタノールを使わず、生理食塩液で懸濁し投与することが可能となった製剤である。このAbraxane[®]を用いて、C26担癌モデルにて、Control群、Abraxane[®]単独投与群およびSNO-HSA Dimer + Abraxane[®]併用投与群の3群に分けて治療を行い、腫瘍体積を経日的に測定した。その結果、腫瘍体積の変動については、Abraxane[®]単独投与群と比較して、SNO-HSA Dimerとの併用投与群において腫瘍増殖を有意に抑制していた (Fig. 2)。

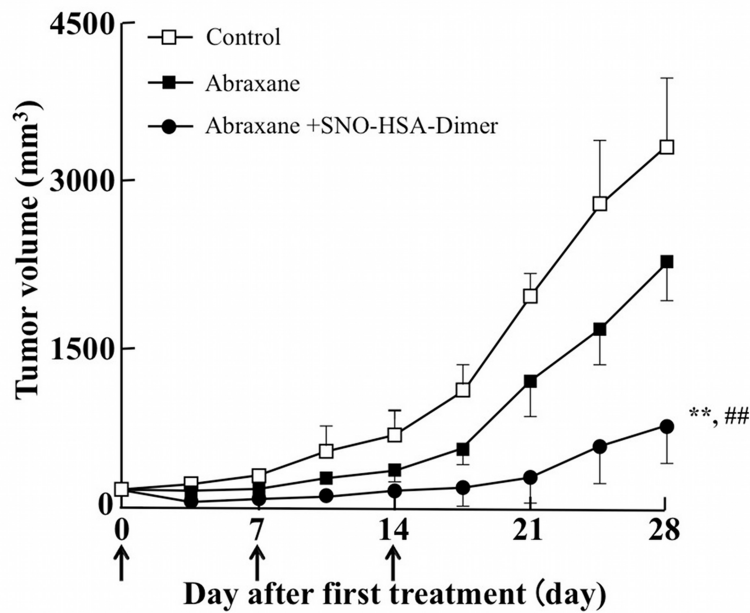


Fig. 2. Antitumor activity of Abraxane, without or with SNO-HSA-Dimer, in C26 tumor-bearing mice.

Changes in tumor growth were measured in C26 tumor-bearing mice as a function of time (days). The mice were divided into cohorts (n = 4-5) and treated i.v. with saline (control), Abraxane, SNO-HSA-Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) or Abraxane combined with SNO-HSA-Dimer on day 0, 7 and 14 and then followed for 14 days. Results are means \pm SD. **P < 0.01, as compared with control, ##P < 0.01, as compared with Abraxane. Differences between the groups were evaluated by Student's t test.

3. リポソーム製剤の治療効果における SNO-HSA Dimer 併用投与の有用性評価

リポソーム製剤である Doxil[®]の治療効果における SNO-HSA Dimer の影響を評価すべく、C26 担癌マウスにおいて、SNO-HSA Dimer および Doxil[®]の投与後における腫瘍体積を経日的に測定した。C26 担癌マウスにて、Control 群、Doxil[®]単独投与群 (2.0 or 4.5 (DOX) mg/kg) および SNO-HSA Dimer + Doxil[®]併用投与群の 5 群に分けて、Doxil[®]や SNO-HSA Dimer の投与は、週に 1 回の計 3 回行った。その結果、低投与量の Doxil[®] (2.0 (DOX) mg/kg) を用いた治療において、Doxil[®]単独投与群と比べ、SNO-HSA Dimer との併用投与群において有意な腫瘍体積増加の抑制効果が確認された (Fig. 3).

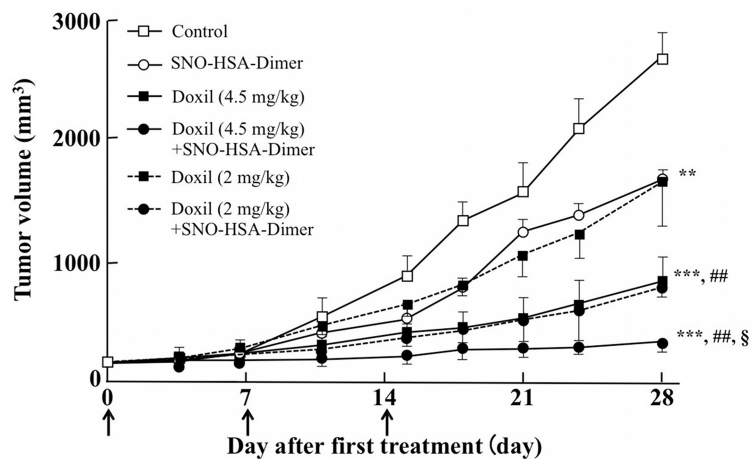


Fig. 3. Antitumor activity of Doxil, without or with SNO-HSA-Dimer, in C26 tumor-bearing mice.

Changes in tumor growth were measured in C26 tumor-bearing mice as a function of time (days). The mice were divided into cohorts ($n = 4-5$) and treated i.v. with saline (control), Doxil (2.0 or 4.5 (DOX) mg/kg), SNO-HSA-Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) or Doxil combined with SNO-HSA-Dimer on day 0, 7 and 14 and then followed for 14 days. Results are means \pm SD. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with control, ## $P < 0.01$, as compared with Doxil (2 mg/kg), § $P < 0.01$, as compared with Doxil (4.5 mg/kg). Differences between the groups were evaluated by Student's t test.

同様に、高投与量の Doxil® (4.5 (DOX) mg/kg) を用いた治療群でも、Doxil®単独投与群と比較し、SNO-HSA Dimer との併用投与群にて有意な腫瘍体積増加の抑制効果が見られ、その腫瘍増殖効果は、ほとんど腫瘍サイズを増大させないほど強力であった。また、興味深いことに、高投与量における Doxil®単独投与群と低投与量における併用投与群の腫瘍体積変動が同等であったことから、SNO-HSA Dimer 投与により、Doxil®の抗腫瘍効果が2倍以上増強されたことが推察された。また、マウスの背中側に B16F10 メラノーマ細胞を皮下投与し、C26 担癌モデルと同様に、Doxil®の抗腫瘍活性に及ぼす SNO-HSA Dimer の影響を評価した。その結果、Doxil®単独投与においては、ほぼ抗腫瘍効果を示さなかったのに対し、SNO-HSA Dimer との併用により、有意に腫瘍増殖を抑制した (Fig. 4).

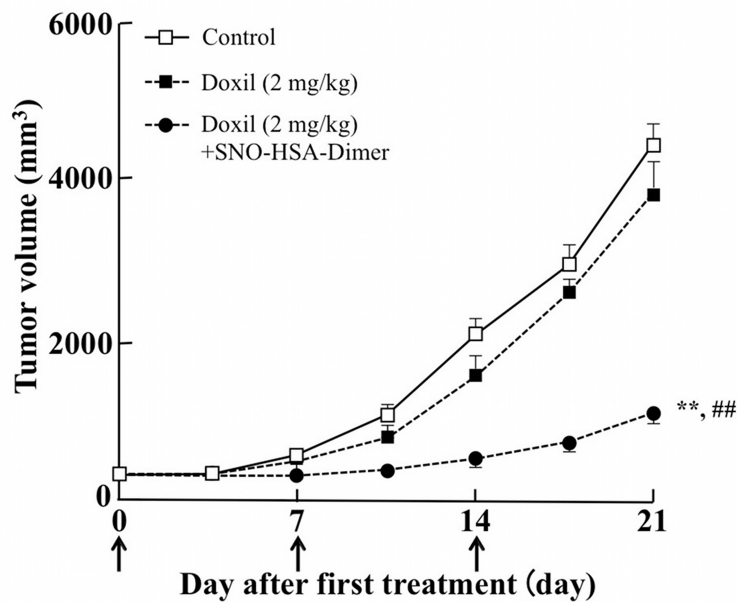


Fig. 4. Antitumor activity of Doxil, without or with SNO-HSA-Dimer, in B16 tumor-bearing mice.

Changes in tumor growth were measured in B16 tumor-bearing mice as a function of time (days). The mice were divided into cohorts (n = 5) and treated i.v. with saline (control), Doxil (2.0 (DOX) mg/kg), or Doxil combined with SNO-HSA-Dimer (1.3 (NO) μ mol/kg) on day 0, 7 and 14 and then followed for 7 days (tumor growth experiment). Results are means \pm SD. **P < 0.01 as compared with control, ##P < 0.01, as compared with Doxil (2 mg/kg). Differences between the groups were evaluated by Student's t test.

考 察

固形腫瘍において、EPR 効果が増強し、血管透過性が亢進することは、腫瘍増殖において抑制的に働く抗癌剤のみならず、促進的に働く酸素や栄養源となる物質の腫瘍移行性を増強してしまうため、EPR 効果増強効果は抗癌剤投与時のみという限定的なものである必要がある。実際に、これまでに行われている EPR 効果増強の研究においても、可逆性のあるものが多く見受けられている。今回の検討において、SNO-HSA Dimer 投与からの経過時間ごとに EB の血管外漏出の程度、すなわち EPR 増強の程度を評価したところ、投与して 0.5 時間ごろから、その効果の増大が見られ、2 時間後には最大となりその後コントロールレベルへ戻るといったように EPR 効果増強にタイムウィンドウが存在することが分かった。腫瘍微小環境を時間的に制御できるということは、抗癌剤の投与設計に合わせて、腫瘍への送達を効率的なものにすることができ、かつ、腫瘍の栄養源の取り込みの増大を最小限にすることが可能となり、癌化学療法において非常に有意義なことであると考えられる。さらに、腫瘍内局在評価の結果より、SNO-HSA Dimer の投与により、EB が血管側近傍の部位のみでなく、腫瘍深部へも到達していたことから、腫瘍内における拡散の促進も、血流量の増加と併せて腫瘍送達の亢進に寄与していると思われる。腫瘍送達への障害の一つとしては間質液圧 (IFP) の増大が挙げられ、腫瘍内部から血管側への圧力勾配が生じることで、抗癌剤の腫瘍への透過が困難となるが、腫瘍深部への送達が行われていたことから、SNO-HSA Dimer が IFP を低下させ、圧力勾配を緩和したと考えられる。この IFP 低下作用に関しては、詳細なメカニズムは分かっていないため、今後十分に検討する必要がある。

また、Abraxane[®]は、アルブミンを DDS 担体とした製剤であり、その有効成分であるパクリタキセルの溶剤 (クレモホル油など) 由来の副作用を克服し、現在では乳癌、非小細胞肺癌、さらにはゲムシタピンとの併用で膀胱癌への適応も承認されている。しかしながら、骨髄抑制等の副作用が報告されていることから、腫瘍への集積をさらに増強する必要がある。そこで今回 SNO-HSA Dimer を併用することで EPR 効果を増強させ、Abraxane[®]の腫瘍移行性および抗腫瘍活性の増強を試みたところ、単独投与群と比べて、有意に腫瘍体積増加を抑制した。このことは、SNO-HSA Dimer が実際に臨床で承認されている高分子抗癌剤の治療へも有効であることを示し、臨床においても有用性が高いことを示唆している。さらに、リポソーム製剤である Doxil[®]は臨床において HIV 関連カポジ肉腫や転移性卵巣がんへ

の適応が承認されているが、その腫瘍集積性は未だ十分とは言い難く、さらにはドキソルビシン単体では見られない手足症候群といった副作用も起こることから、腫瘍への選択性を増強する必要がある。今回の検討において、SNO-HSA Dimerにより Doxil®の抗腫瘍活性を2倍以上増強し、腫瘍成長を抑制し、さらに有効成分のドキソルビシンの分布評価よりその結果が、Doxil®の腫瘍移行を亢進していることに基づくものであることが推察された。

さらに、血管透過性の高い癌種のみならず、一般的に高分子抗癌剤の移行性が低く、EPR効果を示しにくい癌種であるメラノーマモデルにおいても、同様にDoxil®の腫瘍移行性並びに抗腫瘍活性の増強が認められたことから、様々な固形腫瘍において、この治療戦略が応用可能であると期待される。これらの結果より併用投与時は、高分子抗癌剤が低投与量であってもその倍以上の投与量の単独投与と同等の効果を示すことから、投与による患者への負担軽減および抗癌剤減量による医療費の低下にも繋がり得ると考えられる。今回の検討においては、体重変動以外の副作用の指標となるものを評価していないが、併用投与時のDoxil®の分布において、腫瘍組織への集積を亢進していると同時に、正常組織への移行を抑制していることから、副作用を抑える効果も得られると考えられるため、今後はDoxil®由来の副作用である肝障害や骨髄抑制、さらにリポソーム製剤化したことにより起こる手足症候群の評価を血液パラメーターや、組織学的評価により確認する必要がある。

本研究において、SNO-HSA DimerによるEPR増強作用のメカニズム解析について評価を行ったが、より明確なデータを得るためには、SNO-HSA Dimer投与後の腫瘍周囲の血管の様子やナノ粒子の血管外漏出を視覚的に評価することや、腫瘍への血流量ならびに腫瘍内圧を実際の数値として得ることが必要であると考えられる。安全性に関しても、より高い効果を得るためにSNO-HSA Dimerの投与量に関する検討や他の動物種での検討を行うことで許容範囲等を確認することが必須である。また、高分子抗癌剤との併用試験において、今回用いたモデルは全て、皮下移植モデルであり、実際の臨床におけるケースを忠実に再現しているとは言い切れないため、皮下移植だけでなく同所移植モデルや、発癌性化学物質の投与、もしくは遺伝子改変により、自然発症モデルにおいても同様の検討を行うことが、実際の臨床使用へのアプローチとなると思われる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、崇城大学薬学部の小田切優樹および前田 浩、熊本大学薬学部薬剤学分野の丸山 徹、渡邊博志、末永綾香、木下 遼および池田真由美である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Prabhakar, U., Maeda, H., Jain, R. K., Sevick-Muraca, E. M., Zamboni, W., Farokhzad, O. C., Barry, S. T., Gabizon, A., Grodzinski, P. & Blakey, D. C. : Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.*, **73** : 2412-2417, 2013.
- 2) Ishima, Y., Chen, D., Fang, J., Maeda, H., Minomo, A., Kragh-Hansen, U., Kai, T., Maruyama, T. & Otagiri, M. : S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconjug Chem.*, **23** : 264-271, 2012.