

15 - 21 がん化学療法におけるドラッグデリバリーシステム

(DDS)の開発に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 松村 保広

本研究の成果については、病理、薬理、材料工学、生化、臨床的研究からもたらされた。Drug delivery system にとって腫瘍血管および腫瘍組織の構築を知ることは重要である。抗がん剤抵抗性の胃がんや膵がんの腫瘍血管の電顕的研究からこれらの腫瘍血管は基底膜が重層化し、筋繊維芽細胞は随所でがん細胞に密着している。また内皮細胞の腫大などみられ薬剤ががん細胞に到達しにくくなっていることが判明した。DDS 製剤としてはカンプトテシン、タキソール、シスプラチンピルビニウムパモエイトのミセル化に成功した。リポソーム製剤ではファージディスプレイ法で得られた腫瘍血内皮に親和性のあるペプチドを付加したアドリアマイシン内包リポソームが作製され抗腫瘍効果の増強が認められた。臨床ではアドリアマイシン内包イムノリポソーム MCC-465 の臨床第 1 相試験が行なわれている。ミセルではアドリアマイシン内包ミセル NK911 の臨床第 1 相試験につき第 2 相が行われ、タキソール内包ミセル NK105 の臨床第 1 相が順調に進んでいる。

研究者名	所属施設および職名
松村保広	国立がんセンター研究所支所 部長
横山昌幸	* 東京女子医科大学先端生命科学研究so 助教授
	* 神奈川科学技術アカデミー高分子ナノメ ディカルプロジェクトリーダー
奥 直人	静岡県立大学薬学部 教授
川口隆憲	福島県医科大学病理学 講師
濱口哲弥	国立がんセンター中央病院 医師
	* 平成 15 年 4 月 1 日 ~ 16 年 3 月 31 日
	* 平成 16 年 4 月 1 日 ~ 17 年 3 月 31 日

がん治療におけるドラッグデリバリーシステム(DDS)の役割は抗がん剤や毒素、あるいは放射性物質を化学修飾またはミセルやリポソームなどのナノキャリアに封入するという工夫をすることにより、抗がん剤などの正常組織への集積を抑えつつ、がん組織に選択的に集積させることにある。すでに国立がんセンターではアドリアマイシンあるいはタキソール内包ミセルの臨床試験が始まっている。本研究班ではヒト固形腫瘍の間質や脈管の構造に基づく DDS 製剤の開発を旨とし、シスプラチンやタキソール、カンプトテシンなどの抗がん剤内包ミセルあるいは腫瘍血管指向性ペプチド付加リポソームの研究開発を行い、前臨床試験そして臨床試験のすみやかな開始を企てるものである。

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、化学療法は確実に進歩してはきているが、消化器系や呼吸器系のがんにおいてはまだ有効性が低く満足いく治療法として一般的に認知されていない。最近、分子標的薬剤が脚光を浴びているが、一部の悪性腫瘍を除き、がんは多数の遺伝子変化のうえに成立するし、また遺伝子の発現も強弱はあるものの真にがん特異的とはいえないので、ある特定の分子のみを阻害する、いわゆる分子標的剤のみではがんの根治は望めないし、逆に分子標的剤特有の有害事象が問題とされつつある。

分担研究課題

- 1) 腫瘍脈管の特性に基づく DDS 製剤の開発
- 2) 難溶性抗がん剤の高分子ミセルによるターゲティング
- 3) 腫瘍新生血管標的化 DDS によるがん治療
- 4) 腫瘍細胞と脈管の相互関係に関する病理組織学的、電顕的研究
- 5) DDS 製剤の臨床導入に関する研究

2 研究成果

1) 腫瘍脈管の特性に基づく DDS 製剤の開発 : (背景) シスプラチン (CDDP) は種々の悪性腫瘍に広く使用されている重要な抗がん剤であるが、骨髄抑制、消化器症状、神経障害、腎毒性などの有害事象が発現することが知られており、特に神経障害や腎毒性に関しては治療効果が持続していても治療中止を余儀なくされることも経験する。(目的) ポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロックコポリマーのポリグルタミン酸と CDDP との配位結合によりシスプラチン内包ミセル体 (C/M) を作製し、抗腫瘍効果及び毒性に関して薬理学的、神経生理学的に比較検討した。C/M の粒子サイズ分布は非常に狭くサイズのピークは約 40 ナノメートルであった。ラットを使った薬物動態研究においては、C/M 投与群の血中プラチナ濃度の AUC 値 (1123.8 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$) は、CDDP 投与群の AUC 値 (55 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$) と比べ約 20 倍高値を示した。正常組織における分布のしやすさを示す V_{dss} においては C/M が CDDP の約 100 分の 1 と低値であり C/M が正常組織に分布しにくいことを示す。しかしながら、肝臓などの網内系においては C/M は外郭をポリエチレングリコールが覆っており stealth 効果を保持しているとはいえ、やはり高分子であるが故に CDDP より高い集積をしめした。それにともない生化学的にも C/M 投与群において一過性の肝機能障害を認めた。しかしながら 2 週目には回復した。一方腎機能に関しては、10mg/kg 投与において CDDP 投与群では致死的な BUN とクレアチニン値の上昇を認めたのに対し、同等量の C/M 投与において腎毒性はまったく認められなかった。このことは病理学的にも証明された。抗腫瘍効果においては両者間には有意な差は認められなかったが、C/M のほうが高い傾向が認められた。神経毒性に関しては 2mg/kg を毎週 1 回計 6 回にわたり反復投与後、神経行動学、尾神経における感覚神経伝導速度、坐骨神経における神経線維の電子顕微鏡所見など詳細に調べられ、C/M 投与群において CDDP における神経障害が著しく抑制されることが判明した。このことは神経組織におけるプラチナ濃度が CDDP 投与群より C/M 投与群が半以下になることによるものであることが分かった。(考察) CDDP のミセル内包化により CDDP の抗腫瘍効果が低下することなく腎毒性や神経毒性が著しく抑えられることが分かった。このことは臨床において長期投与を可能にし、腎障害がないので大量の点滴も不要のため外来治療を可能にすることが示唆される。

2) 難溶性抗がん剤の高分子ミセルによるターゲティング : (研究目的) 高分子ミセル型ドラッグキャリアーシ

テムとは、親水・疎水などの不均質な構造のブロックあるいはグラフトコポリマーからミセル構造を形成させ、薬物を化学的結合あるいは物理的吸着によりミセル内核に封入したものである。典型的には粒径が 10 ~ 100 nm の範囲にあり、その粒径分布も狭い。本研究では、抗がん剤カンプトテシンを固形癌に効率よくターゲティングする高分子ミセルシステムを得るとともに、非水溶性抗癌剤を安定にミセル内核に封入するための、高分子設計理論の構築を目的とする。

(研究結果) (1) 高分子の合成 高分子ミセルを形成するブロックコポリマーは、PEG-ポリ (アスパラギン酸) ブロックコポリマーの側鎖にベンジルエステルを 44 ~ 75 mol% 導入した PEG-P(Asp(Bzl)) である。また、100% ベンジル化で、アミノ酸ユニットが α -アミドのみの PEG-PBLA も用いた。薬物の封入は、カンプトテシン (CPT) とブロックコポリマーを CHCl_3 に溶かし、溶媒を蒸発させてから、蒸留水を入れて超音波照射をして高分子ミセルを得た。ミセル封入効率率は UV 吸収で、また、ミセル封入安定性は水系の GPC で評価し、ゲル排除体積にミセルとして流出する CPT の量が大きいほど安定性が高いとした。CPT 収率はベンジルエステル 69% で最大となった。仕込みの CPT / ポリマー = 40% で、収率は 85% となり、少なくともミセル中の 30% が CPT であるという高い薬物含量のミセルが得られた。封入安定性は PEG-P(Asp(Bzl)) では、いずれもかなり高いものであったが、ベンジル化率が高まるにつれて安定性も高まる傾向が見られた。おもしろいことに 100% ベンジル化の PEG-PBLA では安定性はとても低い値を示した。また、 α -アミドのみで 66% ベンジル化のブロックコポリマーでも、 β -アミドが約 75% を占める PEG-P(Asp(Bzl)) には封入安定性は遙かに及ばなかった。以上のことは、疎水性薬物の高分子ミセルへの封入挙動を最適化する上で、単に疎水性の強さのみではなく、適切な疎水基の密度と間隔が重要な因子であることがわかった。(2) 血液中の動態 ブロックコポリマーとしてはベンジル化率の 44% のもの (PEG-P(Asp(Bzl44))) と 63% のもの (PEG-P(Asp(Bzl63))) の 2 種類を用いた。ベンジル化率の低い方は静脈内投与後に速やかに血液より消失し、投与 4 時間後には投与量のわずか 0.1% 程度が血液にあるにすぎなかった。この値はカンプトテシンを従来処方エマルジョン投与した場合と違いがほとんどなかった。

これに対し、ベンジル化率の高い PEG-P(Asp(Bzl63)) では投与 4 時間後にも投与量の約 6% が見いだされ、安定な血液循環が確認された。このような組成では EPR

効果に基づく固形がんへのターゲティングが期待される。

3) 腫瘍新生血管標的化DDSによるがん治療 固形がんの維持、成長には、栄養や酸素を補給するための腫瘍血管が新生される必要がある。この腫瘍新生血管は脆弱で透過性が亢進しており、100 nm 程度の薬剤キャリアがEPR効果によりパッシブに腫瘍間質に蓄積するために、これまでパッシブターゲティングを利用した抗がん剤のDDS製剤化が試みられてきた。しかしながらパッシブターゲティングには限界があり、キャリアを用いる利点は主に副作用の軽減に主眼がおかれてきた。より効率的なアクティブターゲティングが同時に試みられてきたが、がんを標的とする場合に血流からのがん組織への移行はパッシブターゲティングによらざるを得ない。

本研究は血流から直接標的化できる新生血管内皮細胞に着目し、標的化DDSを試みた。新生血管内皮細胞は増殖性の細胞であり、抗がん剤で傷害を受けることが期待された。実際に、phage displayed peptide library 法を用いて腫瘍新生血管に親和性を有するペプチドAPRPGを選別し、リポソーム化することにより、腫瘍新生血管特異的に抗がん剤を送達できることが明らかとなった。さらに、新生血管を標的とする治療法は、従来のがんを標的とする治療に比べて、薬効の増強が確認された。APRPG修飾リポソームに長期血中滞留性を付与するために、APRPGのPEG化脂質を合成し、長い血中滞留性を保持したまま血管内皮細胞を認識させるリポソームの調製を試みた。APRPG-PEG修飾リポソームの体内動態をPositron emission tomography (PET)により解析したところ、未修飾リポソームと比較してPEGおよびAPRPG-PEG修飾リポソームはがん組織により多く集積することが明らかとなった。また、肝臓および脾臓のPET画像から、未修飾リポソームは肝臓、脾臓に対し高い集積性を示したが、PEGおよびAPRPG-PEG修飾リポソームでは肝臓や脾臓によるトラップを回避している傾向が見られた。さらに、PEG修飾リポソームよりもAPRPG-PEG修飾リポソームの方が有意に高く腫瘍に集積することが明らかとなった。次に、腫瘍内におけるリポソームの分布を確認するため、がん移植マウスに蛍光標識したリポソームを投与した2時間後の腫瘍切片を作製し、血管内皮細胞を免疫蛍光染色した。その結果、PEG修飾リポソームは血管外に漏出し集積するのみであったのに対し、APRPG-PEG修飾リポソームは血管外への漏出に加え、血管内皮細胞に接着もしくは取り込まれていることが観察された。

以上の結果から、腫瘍新生血管を標的とすることは直接がん細胞を標的とするよりも効果的ながん治療が可能

であり、APRPG-PEG修飾リポソームは腫瘍新生血管傷害療法の新規DDSキャリアとして有用であることが示された。

4) 腫瘍細胞と脈管の相互関係に関する病理組織学的、電顕的研究：ヒト肝癌とラット腫瘍 (LY80・腹水肝癌) の腫瘍血管・間質の特性を病理組織学的、電子顕微鏡学的に研究した。また癌細胞のリンパ行性転移に関わると考えられる異常糖鎖を有する蛋白質を研究した。研究1 ヒト肝癌で、中心に未熟毛細血管を有し周囲に未熟血液系細胞と未熟間葉系細胞を配する構造体を透過型電子顕微鏡的に同定した。これを「未熟間葉系類構造体」と名づけた。免疫組織学的にこの構造体はCD3⁺, c-kit⁺であった。肝癌は癌細胞と腫瘍血管の間に大量の線維・線維芽細胞・筋線維芽細胞を有するが、これらの間質線維成分は未熟間葉系類構造体うちの未熟間葉系細胞に由来すると考えられた。脾臓癌細胞から線維芽細胞・筋線維芽細胞の増殖を誘発する因子が大量に放出されるとすれば癌細胞と腫瘍血管の間に繊維成分が介在する現象が説明できる。研究2 ラット腹水肝癌AH109A細胞を腹部皮下に移植後に発生する腫瘍を研究した。興味あることに腫瘍血管の出現する以前に癌細胞の周囲に明瞭な間葉系細胞の構造体が形成され、ここから腫瘍間質が形成されると考えられた。この類構造体は1週間前後までは腫瘍血管が優位でその後線維・線維芽細胞が主体となった。現在までこの類構造体は筋膜から発生しCD34⁺, CD31⁺, c-kit⁺, Sca-1⁺細胞からなることが確認された。研究3 癌細胞のリンパ行性転移に関わると考えられる異常糖鎖を有する蛋白質の分離・精製をすすめてきたが、今年度はラット腹水肝癌AH109A細胞・腹水が~30 kDaのVicia villosa agglutinin結合糖鎖を有するMUC1分子を産生していることが判明した。

5) DDS製剤の臨床導入に関する研究：(要旨) 本研究では、わが国のすぐれたナノテクノロジー技術により開発されたDDS系抗がん剤を臨床導入するための臨床試験体制の構築をめざす。

(結果)NK911はアドリマイシン内包ミセル体であり、外殻をPEGが覆うため血中安定性に富み、また肝などの網内系での捕獲も抑制される。内核は疎水性鎖のポリアスパラギン酸とアドリマイシンの化学結合および物理結合により形成される。NK911の第1相試験では23名の患者に投与した。用量制限毒性は骨髄抑制であり、推奨投与量はアドリマイシン当量50mg/m²であった。ゲムシタピン不応の膀胱がん患者において有効例がみられたことから、アドリマイシン当量50mg/m²にて転移性膀胱がんを対象に臨床第2相試験をおこなっている。

1.5 - 2.1 がん化学療法におけるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発に関する研究

イムノリポソームアドリアマイシン内包 PEG (ポリエチレングリコール) リポソームである doxil は、臨床において消化器系がんには有効性が示されていない。MCC465 はアドリアマイシン内包 PEG リポソームに新規モノクローナル抗体 GAH の F(ab')₂ が付加されたイムノリポソームである。現在の時点で GAH が認識する抗原は明らかにはされていないが、消化器がんを中心に 70% 以上の陽性率をしめす。従って、MCC465 は passive targeting と active targeting の両方を兼ね備えているといえる。そこで、胃がん、大腸がん、食道がんを対象に週 1 回投与、3 週連続を 1 コースとする臨床第 Ⅰ 相試験を行った。初回投与量を 15mg/m² として副作用を観察しながら 15→20→25→30→35mg/m² と増量した。用量制限毒性は骨髄抑制であり推奨投与量は 30mg/m² となった。推奨投与量における各癌種での有効性を検討するための症例集積が完了し、現在、治療経過を観察中である。残念ながら、今のところ奏効例はみられておらず、今後はアドリアマイシン感受性のある卵巣がんや乳がんでの開発や、消化器系がんにおいても他剤との併用療法を検討していく予定である。

ミセルキャリア NK105 はタキソール内包ミセル体であり外殻を PEG が覆うため血中安定性に富み、内核はポリアスバラギン酸とタキソールからなるコア・シェル型ミセルであり、前臨床試験では腫瘍指向性の向上 (腫瘍内 AUC で 25 倍) が確認されている。大腸癌細胞株 HT-29 移植マウスを用いた vivo での腫瘍縮小効果の検討では、通常タキソール 100mg/kg 投与群と NK105 の 25mg/kg 投与群との間で同等の抗腫瘍効果がみられ、さらに NK105 の 100mg/kg 投与群では全例で腫瘍が消失した。また一般臨床においてタキソールの蓄積性末梢神経障害のために患者 QOL の低下のみならず、抗腫瘍効果が得られているにもかかわらず神経障害のために治療休止もしくは中止を余儀なくされることが問題となっている。また現在神経障害を軽減させる支持療法も確立していない。そこで基礎的検討において NK105 による末梢神経障害を病理的および電気生理学的に検討したところ、NK105 により神経毒性が軽減することが確認された。そこで、平成 16 年 4 月より標準治療に抵抗性となりタキソールの前治療歴のない固形腫瘍患者を対象に臨床第 Ⅰ 相試験を開始した。初回投与量は 10mg/m² とし、accelerated titration method により増量した。可及的早急に臨床第 Ⅰ 相試験を完遂させ、臨床第 Ⅱ 相および第 Ⅲ 相試験へ展開していく予定である。

3 倫理面への配慮

動物実験は各施設の動物倫理委員会の上の承認を得て実施

するものとし、当該委員会が設置されていない場合にも、自主的に動物愛護の観点から BAAA などのガイドラインに準拠して行った。

臨床第 Ⅰ 相試験においては新 GCP に従い施設内倫理審査の承認を得たうえで慎重に行なっている。