

論文内容の要旨

論文題目

膵臓がんに対して有効な化学療法剤の開発を目指して
～SN-38 内包ミセル製剤 NK012 による膵臓がん局所制御
と抗 TF 抗体による浸潤・転移制御～

氏名 齋藤 洋平

序論

膵臓がんは、最も予後不良のがんの一つとされており、局所進展が早く著しい浸潤・転移が認められるという特徴をもつ。現在、ゲムシタビンが標準化学療法として適用されているが、奏効率が 10%未満 (*Br J Cancer*, 73; 101-105, 1996) と非常に低い。この理由として①膵臓がん組織は血管が乏しく、間質が豊富である (*J Gastroenterol*, 40; 518-525, 2005) ためのがん細胞に抗がん剤が十分に到達しないという膵臓がん病理の組織学的特性が考えられる。この生理的バリアーにより血管から漏れ出た抗がん剤ががん細胞まで届きにくい。さらには②著しい浸潤・転移が起こるという特徴が挙げられる。現在、このような特徴を持つ膵臓がんの効果的な治療法を見出すことが必要とされている。

がん治療における Drug Delivery System (DDS) は正常組織と腫瘍組織の脈管系の違いに基づいて腫瘍特異的に薬剤をデリバリーする方法である。すなわち、腫瘍組織の血管は、正常組織の血管に比べ構造的に疎で、血管透過性が非常に亢進している。そのため、正常血管では漏れ出さないような高分子物質であっても腫瘍血管においては漏出する。さらに腫瘍組織ではリンパ回収系が欠失しているため、漏れ出した高分子物質が回収されずに蓄積する (*Cancer Res*, 46; 6387-6392, 1986)。この現象に基づき、低分子抗がん剤をミセルやリポソームで内包させた DDS 製剤が作られてきた。ミセル化やリポソーム化が施され高分子化された DDS 製剤は、腫瘍血管から特異的に漏れ出し蓄積するため、腫瘍

特異的にデリバリー可能であるとともに、正常組織における副作用が軽減される。このように DDS 製剤は腫瘍血管依存的に作用する。そのため卵巣がんや乳がんのように血管が豊富ながんでは効果があるが、膵臓がんのように血管が乏しいがんでは効果が低いとされている。

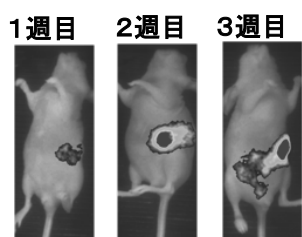
そこで、本研究では、はじめに膵臓がんにも有効な DDS の特徴を見出し、膵臓がん増殖を制御すること、さらには膵臓がんの浸潤・転移抑制法の開発することを目的とした。

結果と考察

1. ヒト膵臓がんの増殖や血行性肝転移を模倣するマウスモデルの確立に成功した。

上記したように、ヒト膵臓がんは血管が乏しく間質が豊富である。転移・浸潤に関しては、隣接臓器に著しい浸潤を引き起こし、遠隔臓器には血流によって転移するという特徴をもつ。よって、膵臓がんにも有効な治療法開発にはまず膵臓がんの特徴を踏まえた適切な動物モデルの確立が必須である。そこでまずは、腫瘍血管が乏しく、膵臓でのがん増殖を引き起こす動物モデルを作製することとした。生体発光を用いた *in vivo* imaging を可能とするため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2/Luc を免疫不全マウスの膵臓に直接移植した膵臓がん同所移植モデルマウスを作製した。移植後、*in vivo* imaging により膵臓局所でのがんの生着と増殖を観察した。その結果、移植 1 週目で膵臓にがんが生着し、経時的に増殖することがわかった (図 1)。また、SUIT-2 をマウスの皮下に移植した膵臓がん皮下移植モデルと比較して、同所移植モデルでは、有意に腫瘍血管数が少ないことが示された。

続いて血行性転移を抑制する治療実験に使用するマウスモデルの確立を目指した。ヒト膵臓がん転移は、門脈からがん細胞が血流に入り込み、肝臓に転移するのが最も一般的である。そこで、本研究では門脈から直接がん細胞を注入し、肝転移を引き起こさせる門注肝転移モデルを作製した。



マウスを開腹し、門脈から直接ヒト膵臓がん細胞株である BxPC3/Luc を注入したところ、肝臓に限局してルシフェラーゼ活性が観察された。以上の実験により、①腫瘍血管が乏しく、膵臓でのがん増殖を引き起こすモデルと②血行性肝転移を引き起こすモデルの作製に成功し、以下の治療実験に用いることとした。

図1. 膵臓がん同所移植モデルにおける膵臓局所のがん増殖と浸潤
SUIT-2/Luc をマウスの膵臓に移植後、1週目から3週目にかけてのがんの増殖と浸潤を *in vivo* imaging により観察した。

2. SN-38 内包ミセル製剤 NK012 は膵臓がん同所移植モデルにおいて有意な腫瘍縮小効果が認められた。

本研究の治療実験で用いる DDS 製剤は SN-38 が内包されているミセル体である NK012 である。NK012 の特徴として、以下の点があげられる。

87312 齋藤洋平

すなわち他の DDS 製剤に比べて、内包されている抗がん剤が数日かけて徐放的にリリースされる。これは、内包されている SN-38 がミセル内核を形成するポリマーにエステル結合で付加されているためである。著者は以前 NK012 が、血管が乏しく間質が豊富である膵臓がん皮下腫瘍に効果的であったことを証明した。

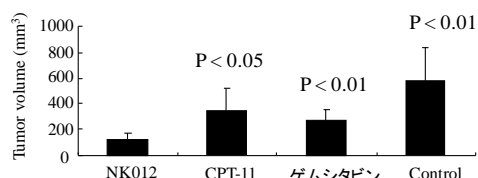


図2. SUIT-2/Luc 同所移植モデルにおけるNK012、CPT-11、ゲムシタビンの腫瘍縮小効果
SUIT-2/Luc をマウスの膵臓に移植後、3週目からNK012、CPT-11、ゲムシタビンを最大投与量で投与した。治療開始から12日後に腫瘍を摘出し、腫瘍体積を測定した。NK012群とそれぞれの群を比較した。

そこで本研究では、よりヒト膵臓がんの臨床像を模倣している膵臓がん同所移植モデルを用いて、NK012 が膵臓がん増殖抑制に効果はあるかどうかを調べた。膵臓がんの標準治療薬ゲムシタビンとの治療効果を比較したところ、NK012 はゲムシタビンに比べ、膵臓がんを有意に腫瘍縮小させ、生存期間を延長させた (図 2)。

また HPLC や蛍光顕微鏡での薬剤分布の検討の結果、NK012 は同所移植モデルにおいても長時間腫瘍に留まり続けることがわかった。膵臓がんに対して NK012 の効果が高かった理由として、SN-38 の作用メカニズムが時間依存的であること、また SN-38 のリリースが徐放的におこることが考えられ、血管が乏しく間質が豊富ながんにおいてもがん組織中のがん細胞集団に十分な量の抗がん剤が届くという結論に達した。

3. 外因系血液凝固因子 Tissue Factor (TF) 中和抗体は、膵臓がん浸潤抑制と血行性転移抑制に機能した。

上記したように膵臓がんは著しい浸潤・転移を引き起こす。そこで、続いて、膵臓がんの浸潤・転移抑制法の確立を目指すこととした。著者は外因系血液凝固開始因子 TF に着目した。膵臓がんは全ての固形がんのなかでがんを伴った静脈性血栓症が最も高い割合で発症することが知られている。さらに TF と膵臓がんとの関係を調べてみると、TF が膵臓がん組織で過剰に発現していること (*Br J Surg*, 82; 1101-1104, 1995)、TF 強発現患者の予後が悪いこと (*Clin Cancer Res*, 11; 2531-2539, 2005)、さらには、TF は浸潤能獲得に至る前段階の組織に発現が見られ始めること (*Clin Cancer Res*, 13; 2870-2875, 2007) が報告されている。細胞膜貫通型タンパクである TF は血液凝固促進と細胞内シグナル伝達という 2 つの機能を有する。すなわち細胞外では外因系血液凝固カスケードを誘導することにより、血液凝固を引き起こす。また細胞内では、Protease activated receptor-2 を介して細胞内シグナルを誘導する。筆者は最近 TF が *in vitro* でのがん細胞浸潤に促進的に働き、それは TF の細胞内シグナルを介して MMP-9 の発現上昇によるものであることを明らかにしている。そこで著者は、TF の細胞内シグナルを抑制することで浸潤を抑制し、細胞外の血液凝固カスケードを阻害することでがん細胞が血液中で細い血管に詰まり、そこから転

移する機構を抑制できるのではないかと考えた。また筆者はこれまでに TF の細胞内シグナル、細胞外血液カスケードの両方を抑制する TF 中和抗体 1849c を確立している。そこで、TF に対する中和抗体 1849c を用いて膵臓がんの浸潤や血行性転移を抑制できるのかどうかを上記で作製した動物モデルを用いて検討することにした。

まず、同所移植モデルを用いて周辺臓器への浸潤や遠隔臓器への転移を抑制するのかどうかを検討した。TF の発現が高い BxPC3/Luc をマウス膵臓に同所移植し、経時的に *in vivo imaging* を用いて評価したところコントロール群では、がん細胞を示すルシフェラーゼ発光活性が膵臓を中心に全身に観察されたのに対して 1849c を投与した群では膵臓部に限局していた。またコントロール群に比べて 1849c 投与群マウスの生存期間も延長された。また浸潤の度合いをスコア化したところ、1849c を投与した群でコントロール群に比べ、有意に浸潤スコア値が小さかった (図 3)。

続いて、1849c が血液凝固カスケードを抑制することにより、血行性転移を抑制するということをより直接的に証明するため、BxPC3/Luc を門脈から直接血流内に注入する門注肝転移モデルを作製し、1849c の抗転移作用を評価した。その結果、コントロール群に比べ、1849c を投与した群ではがん細胞の注入後、5 時間から 10 時間の間にルシフェラーゼ活性が有意に下がることが明らかとなった。また 4 日後には強い活性減少がみられた (図 4)。以上の結果から 1849c は TF の機能を抑制することで周辺臓器への浸潤や血流を介した転移を抑制することが明らかとなった。

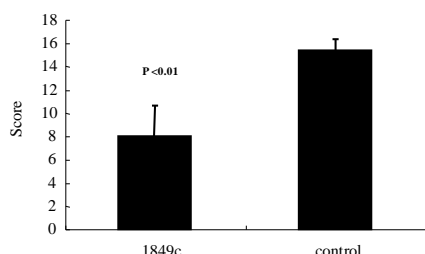


図3. 同所移植モデルを用いた1849cの浸潤抑制の評価

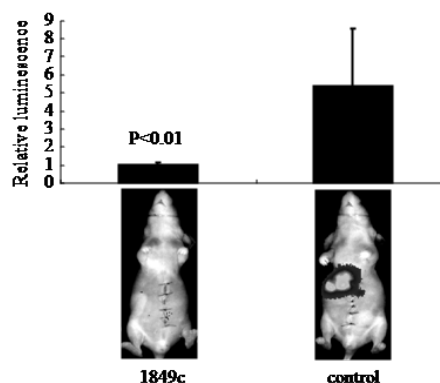


図4. 門注肝転移モデルを用いた1849cの血行性転移抑制の評価
1849cを投与後に門脈からBxPC3/Lucを直接、血流に注入した。

結論

膵臓がんは、膵臓局所でのがん増殖に加えて、著しい浸潤・転移が起こるために、その両面からの視点で治療法を検討しなければならない。腫瘍血管が乏しく、間質が豊富である膵臓がんには、DDS 製剤は効果が低いとされてきたが、本研究を通して NK012 のように内包されている抗がん剤が効率よくリリースできれば、膵臓がんにおいても有意な腫瘍縮小効果があることがわかった。浸潤・転移に関しては、外因系血液凝固因子である TF の細胞内シグナル、細胞外血液凝固カスケードを両方抑制することが膵臓がんの局所浸潤や血行性転移を抑制する有用な治療選択肢になることが示唆された。

87312 齋藤洋平