



癌細胞が取り込む陽電子放射断層撮影用薬剤を応用した
リポソームによる抗癌剤標的治療

(研究課題番号 18591634)

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金

(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 20 年 3 月

研究代表者 下 瀬 省 二

(広島大学病院 講師)



〈はしがき〉

陽電子放射線断層撮影 Positron Emission Tomography (PET) は、分裂の盛んな癌細胞が多量のブドウ糖を必要とするため、ブドウ糖に類似している fluoro-2-deoxyglucose (FDG) を取り込むことを応用し診断する方法である。PET 検査はこれまで判らなかつた小さな病巣まで診断可能であり、しかも各種の癌の診断に有用であることが報告されている。この癌細胞が自ら取り込む FDG に抗癌剤を結合し、治療に用いることができれば効率のよい癌治療が可能である。われわれは、FDG を結合させたリポソームを担体として、その中に抗癌剤を封入し、腫瘍細胞が FDG を取り込む際に抗癌剤も取り込ませるという治療を考案し、その治療効果を検討した。

研究組織

研究代表者: 下瀬 省二 (広島大学病院 講師)

研究分担者: 越智 光夫 (広島大学病院 院長)

研究分担者: 久保 忠彦 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 19 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

背景および目的:

近年の癌治療のなかで大きなブレイクスルーとなっているのが、陽電子放射線断層撮影 Positron Emission Tomography (PET) による癌の早期診断である。PET 診断は、分裂の盛んな癌細胞が多量のブドウ糖を必要とするため、ブドウ糖に類似した fluoro-2-deoxyglucose (FDG) を取り込む性質を応用した画像診断法で、これまで小さくて判らなかつた病巣まで診断可能で、しかも肺癌、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、卵巣癌など多くの癌、骨軟部肉腫などで FDG の取り込みが確認されている¹⁻⁵。

リン脂質膜よりなる閉鎖小胞であるリポソームは、Drug Delivery System (DDS) の中心的な担体のひとつで、各種の薬剤を封入し、標的に運搬できることが報告されている。癌細胞が取り込む FDG に着目し、リポソームを用い FDG に抗癌剤を結合し治療に用いることができれば、より効率的な薬剤の取り込みが期待できると考えられた。これまでの癌に対する標的治療では、画像診断で確認した腫瘍を標的として抗癌剤を集積したが、認識できない腫瘍では標的がないため抗癌剤を集積できなかった。しかし癌細胞が取り込む FDG に抗癌剤を結合したものであれば、認識できない腫瘍に対しても抗癌剤の取り込みが期待でき、標的にならない小さい病巣や転移巣に対する抗腫瘍効果も期待されると考えられた。

本研究の目的は、FDG を結合させたリポソームを担体として、その中に抗癌剤を封入し、腫瘍細胞が FDG を取り込む際に抗癌剤も取り込ませ癌治療を行うことである。抗癌剤を封入した FDG リポソームを担癌ラットに静注し抗腫瘍効果を検討した。

材料:

1. 抗癌剤封入 FDG(fluoro-2-deoxyglucose)リポソームの作製

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DSPC)、Cholesterol、FDG を 5:5:2 の比率でエタノールを溶媒として混合し溶解、エバポレーターを用いて脂質フィルムを調製した。脂質フィルムの薄膜にイソプロピルエーテルを加えて溶解した後、生理的食塩水に溶解した塩酸ドキソルビシン(DOX)を加え、ソニケーターで超音波処理を 10 分間行い、W/O emulsion を作製した。次に減圧下でエバポレーターを用い溶媒を除去しゲル化、ボルテックスミキサーで軽く振盪後、再び減圧下に残りの溶媒を除去した。これを透析膜で濾過し、リポソーム内に封入した DOX と遊離の DOX を分離し、DOX 封入 FDG リポソームを作製した。エクストルーダーでリポソームの大きさを 100nm 以下に調整した。

2. 担癌ラットの作製

ラット骨肉種から作製された MSK 細胞 (1×10^7 cell/rat) をラットの背部に移植し、骨肉腫ラットを作製した。移植 2 週後に腫瘍の長径が 10mm 以上になったものは、その後の経過で腫瘍が自然に消失することがないことを確認した。

方法:

DOX 封入 FDG リポソームをラットの頸静脈より静注し(DOX・FDG-L 群)、ラットの背部に移植し作製した骨肉腫に対する抗腫瘍効果を判定した(n=6)。対象として無治療(コントロール群、n=6)、DOX 静注のみ(DOX 群、n=6)、DOX 封入リポソーム静注(DOX-L 群、n=6)の3群を作製した。

ラットの背部に MSK 細胞を移植し、2 週間後に骨肉腫の長径が 10mm 以上になったことを確認し、各治療薬を投与した。いずれの治療群も塩酸ドキソルビシン(DOX)として 5mg/kg 換算を頸静脈より投与した。治療開始後、毎週、骨肉腫の縦径(a)、横径(b)、前後径(c)を計測した。腫瘍の体積を Gass ら⁶の報告に準じ $\pi/6 \times a \times b \times c$ の公式で算出し、治療効果を腫瘍の体積で比較検討した。治療薬の副作用の指標としてラットの体重を毎週計測し比較検討した。

統計は多重比較検定として Fisher's PLSD 法を用い危険率 5%未満で有意差ありと判定した。

結果:

1) 腫瘍の体積の変化

治療開始時(腫瘍移植 2 週間後)の腫瘍体積はコントロール群が $10.9 \pm 4.8 \text{ cm}^3$ 、DOX 群が $5.8 \pm 5.6 \text{ cm}^3$ 、DOX-L 群が $7.3 \pm 7.7 \text{ cm}^3$ 、DOX・FDG-L 群が $8.9 \pm 6.3 \text{ cm}^3$ であり、特に有意差を認めなかった。治療開始 1 週間後の腫瘍体積はコントロール群が $46.5 \pm 18.7 \text{ cm}^3$ 、DOX 群が $13.2 \pm 8.7 \text{ cm}^3$ 、DOX-L 群が $18.8 \pm 7.4 \text{ cm}^3$ 、DOX・FDG-L 群が $6.2 \pm 6.0 \text{ cm}^3$ で、DOX 群、DOX-L 群、DOX・FDG-L 群のいずれの治療群も腫瘍体積がコントロール群に比べ有意に小さかった。治療開始 2 週間後の腫瘍体積はコントロール群が $95.5 \pm 56.7 \text{ cm}^3$ 、DOX 群が $54.9 \pm 66.8 \text{ cm}^3$ 、DOX-L 群が $42.6 \pm 33.1 \text{ cm}^3$ 、DOX・FDG-L 群が $11.3 \pm 17 \text{ cm}^3$ で、DOX・FDG-L 群のみコントロール群に比べ有意に腫瘍体積が小さかった。DOX 群、DOX-L 群もコントロール群に比べ腫瘍体積は小さい傾向にあったが、特に有意差を認めなかった。治療開始 3 週間後の腫瘍体積はコントロール群が $158 \pm 111 \text{ cm}^3$ 、DOX 群が $75.6 \pm 68.4 \text{ cm}^3$ 、DOX-L 群が $63.4 \pm 73 \text{ cm}^3$ 、DOX・FDG-L 群が $14.6 \pm 22.7 \text{ cm}^3$ で、DOX・FDG-L 群のみコントロール群に比べ有意に腫瘍体積が小さかった。DOX 群、DOX-L 群はコントロール群に比べ有意腫瘍体積は小さい傾向にあったが、特に有意差を認めなかった。

2) ラットの体重の変化

治療開始時のラットの体重はコントロール群が $153 \pm 7.3 \text{ g}$ 、DOX 群が $156 \pm 5.6 \text{ g}$ 、DOX-L 群が $156 \pm 6.5 \text{ g}$ 、DOX・FDG-L 群が $160 \pm 14.4 \text{ g}$ であり、特に有意差を認めなかった。治療開始 1 週間後はコントロール群が $175 \pm 10.3 \text{ g}$ 、DOX 群が $171 \pm 9.5 \text{ g}$ 、DOX-L 群が $178 \pm 6.6 \text{ g}$ 、DOX・FDG-L 群が $169 \pm 12.2 \text{ g}$ で各群ともに特に有意差を認めなかった。治療開始 3 週間後はコントロール群が $219 \pm 11.5 \text{ g}$ 、DOX 群が $219 \pm 14.3 \text{ g}$ 、DOX-L 群が $220 \pm 9.8 \text{ g}$ 、DOX・FDG-L 群が $206 \pm 10.5 \text{ g}$ で、最終計測時にも特に有意差を認めなかった。

考察:

陽電子放射線断層撮影 Positron Emission Tomography (PET) は、分裂の盛んな癌細胞が多量のブドウ糖を必要とするため、ブドウ糖に類似した fluoro-2-deoxyglucose (FDG) を取り込むことを応用した診断方法で、各種の癌において、これまで判らなかつた小さな病巣まで診断可能であることが報告されている。各種の癌細胞が FDG を取り込むことに着目し、FDG に抗癌剤を結合すれば効率のよい取り込みが期待できると考えた。リン脂質膜よりなる閉鎖小胞であるリポソームは、Drug Delivery System (DDS) の中心的な担体のひとつで、各種の薬剤を封入し、標的に運搬できる。これまで我々は、磁性体リポソームを担体とし、磁石で薬剤を標的に誘導する DDS を開発し、抗癌剤の抗腫瘍効果、BMP による骨形成、TGF- β による軟骨再生などを研究してきた⁷⁻¹⁰。これらの磁力を応用した DDS により磁性体リポソームを集積することは可能であるが、取り込みに関しては細胞の貪食作用に依存するため、効率よく薬剤の取り込みができないことが課題である。そこで癌細胞が取り込む FDG を結合させたリポソームに抗癌剤を封入することで癌への効率的な薬剤の取り込みが可能と考え、腫瘍細胞が FDG を取り込む際の抗癌剤の取り込みを評価した。

本研究では Dipalmitoylphosphatidylcholine (DSPC)、Cholesterol、FDG を 5:5:2 の比率で調製した、細網内皮系に捕らわれにくく血管透過性の高い、100nm 以下のサイズのリポソームを使用した。リポソームと PET 検査との研究に関しては、リポソーム内に FDG を封入し PET 検査で非侵襲的に各種リポソームの性質を調べた報告があるが、FDG とリポソームを結合して治療に用いた報告はない。集積性を考えるとリポソームの脂質膜に FDG を取り込むことが理想であるが、FDG は水溶性で脂質膜に取り込むことができなかつたため、塩酸ドキソルビシン (DOX) とともに封入し、DOX・FDG-リポソームとして作製した。

DOX・FDG-リポソーム静注群の腫瘍局所での抗腫瘍効果はいずれの時期もコントロール群に比較し有意に優れていた。DOX 静注群と DOX 封入リポソーム静注群の効果は治療開始 1 週間後にはコントロール群に比べ有意に優れていた。治療開始 2 週間後以降は有意差が認められないものの、DOX 静注群と DOX 封入リポソーム静注群の効果はコントロール群に比べ優れている

傾向があった。DOX・FDG-リポソーム静注群の腫瘍局所での抗腫瘍効果は他の群に比べ優れており、リポソームの血中停滞性と腫瘍の FDG 取り込み機構の利用は、薬剤を効率的に腫瘍に蓄積させ、抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。また、各群ともに体重は順調に増加し、いずれの週でも明らかな有意差はなく、本治療においては重篤な副作用の発現はほとんどないものと考えられた。

これまでの DDS を用いた癌に対する標的治療の研究では、あくまでも画像診断で確認できた腫瘍を標的として抗癌剤を集積する方法であったが、認識できない腫瘍では標的がないため抗癌剤を集積することはできなかった。しかし、癌細胞が取り込む FDG に抗癌剤を結合したものであれば、標的にならない小さい病巣や転移巣に対しても抗癌剤の集積が期待される。今回の研究で示した DOX・FDG-リポソームは FDG をリポソーム内に封入したものであり、集積性に関してはあくまでも血中停滞性による受動的な集積である。能動的な集積のためには、膜に FDG を取り込むことが必要であるが、今回の研究では FDG は膜に取り込めなかった。最近、脂溶性の fluorodipalmitin (FDP) をリポソームの膜に取り込み PET 検査で評価する方法が報告されている。FDP は FDG と類似した物質であり、今後の研究により癌に取り込まれることがわかればより効果的な担体となりうると考えられる。

結論

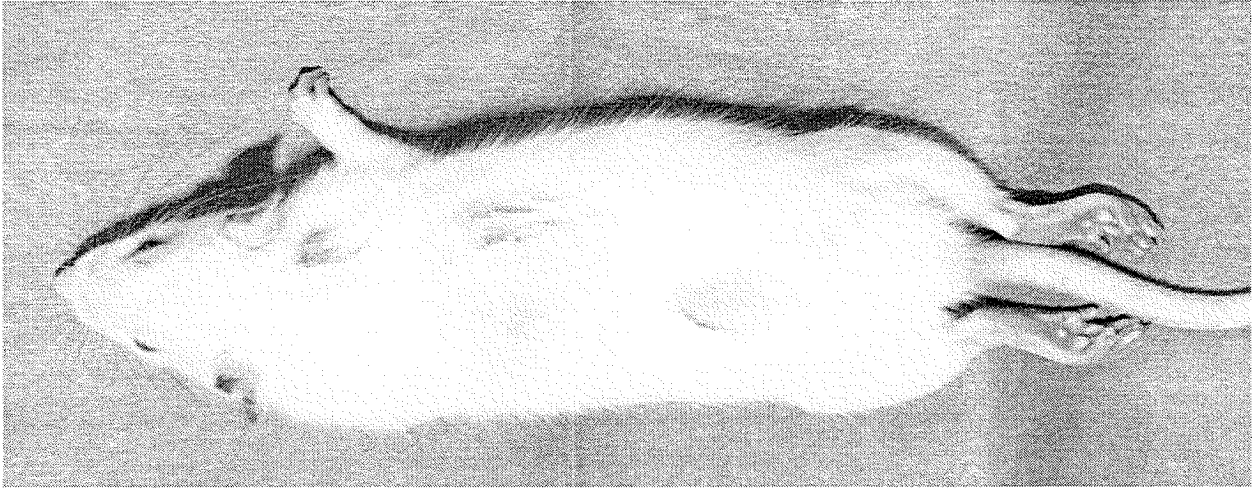
骨肉腫に対する DOX・FDG 封入リポソームの静注は、効果的に DOX を腫瘍に取り込ませることで抗腫瘍効果を発揮するため、効果的なターゲティング化学療法となり得ると考えられた。

文献

- 1) Kelloff GJ, et al, Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res.* 11: 2785-808, 2005.
- 2) Schoder H, 2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography for the detection of disease in patients with prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 11: 4761-9, 2005.
- 3) Westreenen HL, Systematic review of the staging performance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in esophageal cancer. *J Clin Oncol.* 22: 3805-12, 2004.
- 4) Hoeven JJ, 18F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography in staging of locally advanced breast cancer.
J Clin Oncol. 22: 1253-9, 2004.
- 5) Kaira K, Oriuchi N, Otani Y, Shimizu K, Tanaka S, Imai H, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Dobashi K, Kanai Y, Endou H, Nakajima T, Endo K, Mori M. Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and staging of lung cancer: a clinicopathologic study.
Clin Cancer Res. 13: 6369-78, 2007.
- 6) Gass JD. Comparison of uveal melanoma growth rates with mitotic index and mortality.
Arch Ophthalmol. 1985 Jul;103(7):924-31.
- 7) Tanaka H, Efficiency of magnetic liposomal transforming growth factor-beta 1 in the repair of articular cartilage defects in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A.* 73: 255-63, 2005.
- 8) Nobtoo H, Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet. *Int J Cancer.* 109: 627-35, 2004.

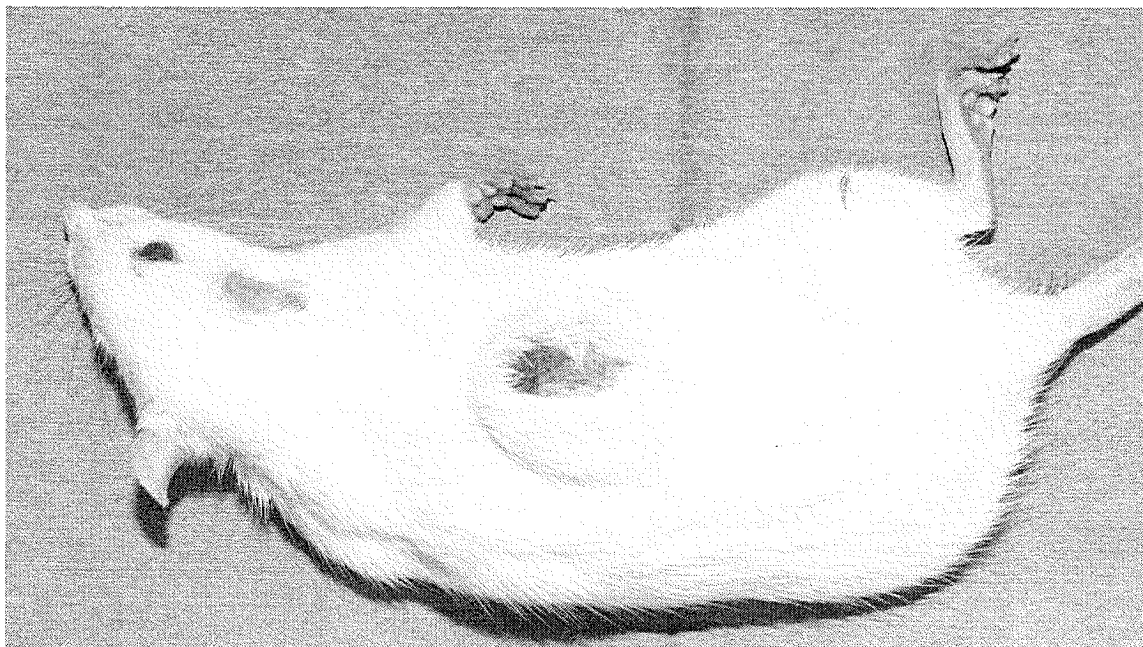
- 9) Matsuo T, Injectable magnetic liposomes as a novel carrier of recombinant human BMP-2 for bone formation in a rat bone-defect model. *J Biomed Mater Res A*. 66: 747-54, 2003.
- 10) Hirao K, Targeted gene delivery to human osteosarcoma cells with magnetic cationic liposomes under a magnetic field. *Int J Oncol*. 22: 1065-71, 2003.
- 11) Oku N, Delivery of contrast agents for positron emission tomography imaging by liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*. 37: 53-61, 1999.
- 12) Marik J, Tartis MS, Zhang H, Fung JY, Kheirrolomoom A, Sutcliffe JL, Ferrara KW. Long-circulating liposomes radiolabeled with [18F]fluorodipalmitin ([18F]FDP). *Nucl Med Biol*. 34:165-71, 2007.

図 1)MSK 細胞移植時



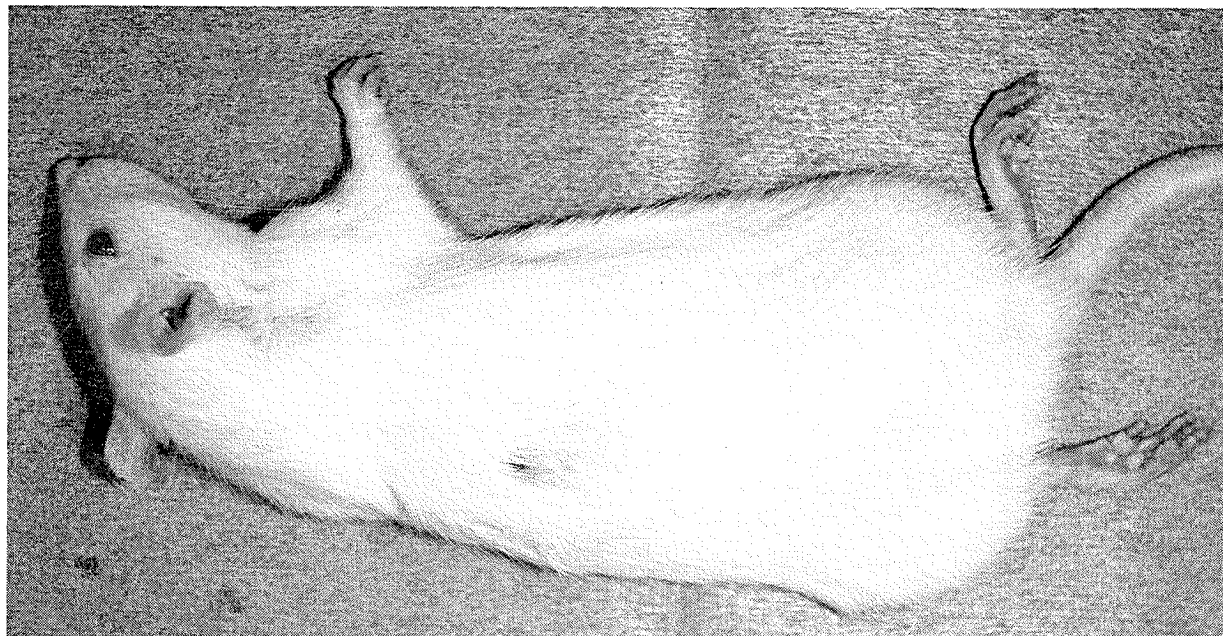
背部を剃毛し、同部位に MSK 細胞 (1×10^5 cell/rat) を移植した。

図 2) MSK 細胞移植 2 週間後



腫瘍細胞が生着し、直径 10mm 以上の大きさに成長したのを確認後、各治療を行った。

図 3) DOX・FDG-Liposome 投与後 2 週間



DOX・FDG-Liposome を投与後 2 週間で腫瘍は著明に縮小した。

図 4) 腫瘍体積の変化

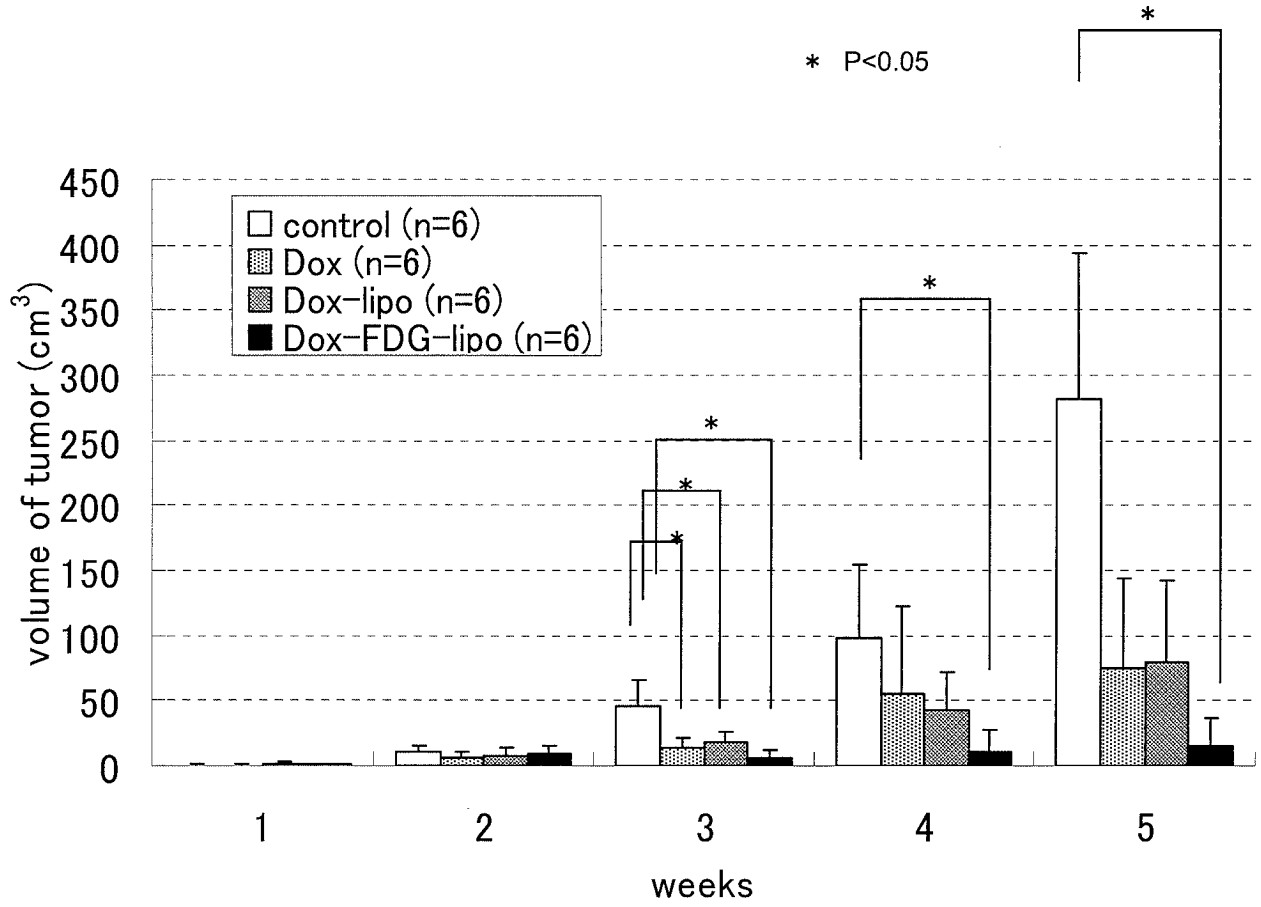
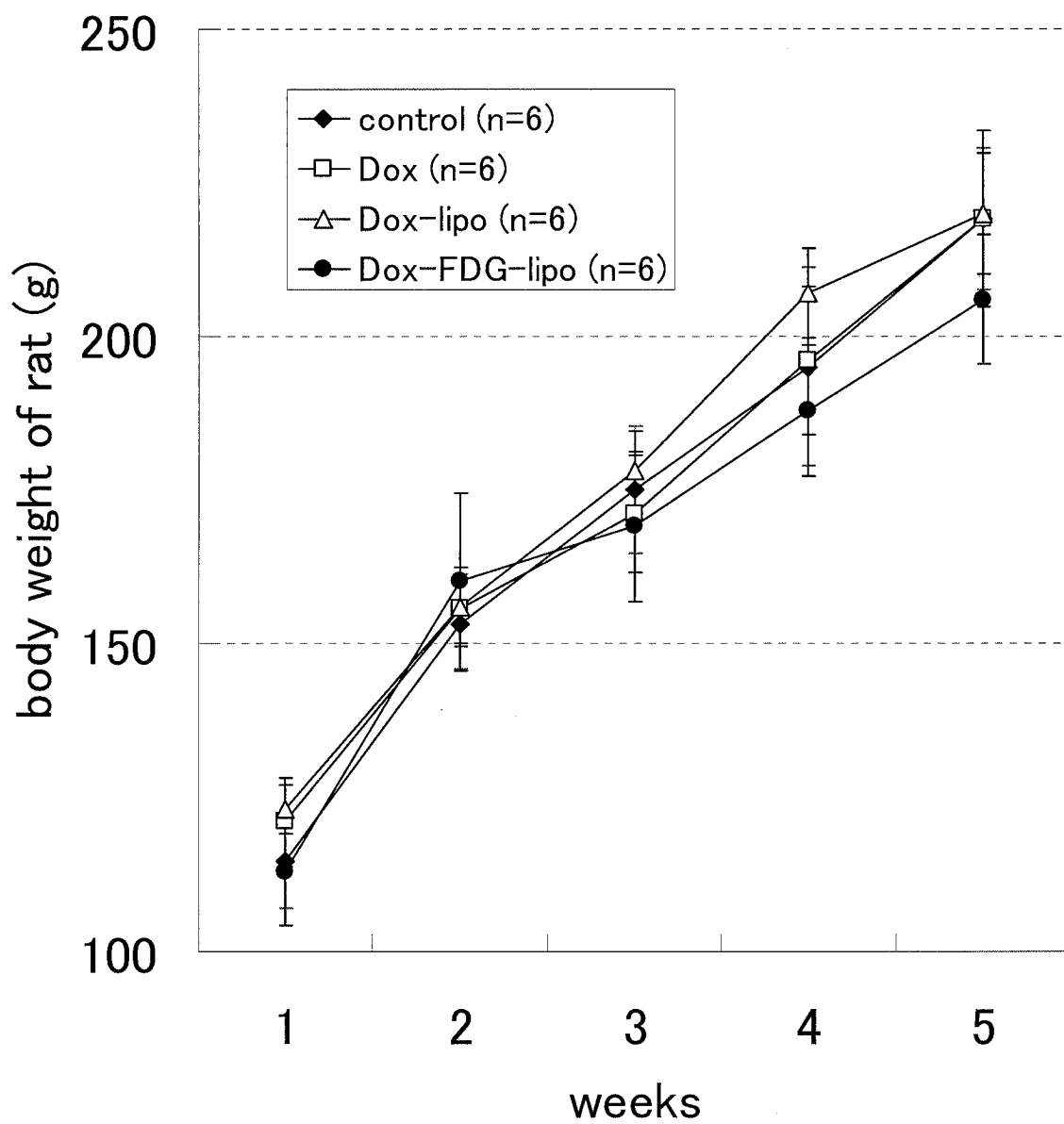


図 5) ラットの体重の変化



図の説明

図 4)

治療開始時(MSK 細胞移植 2 週間後)の腫瘍体積は各群間に有意差がないが、治療開始 1 週間後の腫瘍体積はいずれの治療群もコントロール群に比べ有意に小さかった。治療開始 2 週間後と 3 週間後の腫瘍体積は DOX・FDG-L 群のみコントロール群に比べ腫瘍体積が有意に小さかった。

図 5)

ラットの体重は MSK 細胞移植 1 週間後から 5 週間後まで各群ともに有意差を認めなかった。