

氏名（本籍）	岩瀬由布子	（愛知県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第150号	
学位授与年月日	平成24年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Octreotide-targeted liposomes loaded with CPT-11 for the treatment of medullary thyroid carcinoma	
論文審査委員	主査	教授 米谷芳枝
	副査	教授 辻 勉
	副査	教授 大西 啓

論文内容の要旨

がん（悪性新生物）は高齢社会の到来により増加の一途をたどっており、1981年以降わが国における死亡原因の第1位となっている。現在、がんによる死亡者数は年間35万人を超えている。これまでに、肺がん・胃がん・大腸がんといった罹患者数の多い common ながんに対しては、数多くの取り組みが精力的になされ、克服できるようになりつつある。一方で、罹患者数の少ない『稀少ながん』に対する取り組みはまだ充分とは言えない。したがって、『稀少ながん』の治療法の開発は、社会的にも医学的にも急務でありその重要性は高い。

『稀少ながん』のひとつに、内分泌腫瘍の甲状腺がんがある。甲状腺がんは、乳頭がん・濾胞がん・髄様がん・未分化がんの4つに大別される。このうち甲状腺のC細胞由来の髄様がん（MTC）は、若年層での発症が多く、転移により予後が悪化し治療が困難になる。現在までのところ、治療は病変部の外科的切除が第一選択とされ、薬物療法は確立されていない。動物実験で有効性が示唆されているイリノテカン（CPT-11）は、腫瘍細胞内への薬物送達が高いため十分な治療効果を得るには至っておらず、副作用が問題になる場合もあるからである。薬物療法で十分な治療効果を得るためには、腫瘍への選択的な薬物送達量を上げ、正常組織への移行を制御することが重要になる。

Drug Delivery System (DDS, 薬物送達システム) は、薬物を体の必要なところへ、必要な量、必要なときに届ける技術のことであり、薬物の有効性と安全性を高めることを可能にする。DDS ツールのひとつに薬物担体であるリポソームがある。リポソームは、リン脂質やコレステロールなどの生体適合脂質を主成

分とし、脂質二重膜構造を基本とする閉鎖小胞であり、粒子の大きさ、表面電荷の改変や表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾することで、細網内皮系への取り込みを回避し有効血中濃度の長時間維持が可能である。この種の血中滞留性製剤は既に市販されている。一方、リポソームは標的細胞に特異的な抗体・タンパク質・糖類などによるアクティブターゲティングにより、選択的集積性を高め治療効果を向上させることも可能であるが、この種の製剤はまだ研究段階である。

MTC はソマトスタチン受容体 (SSTR) を過剰発現している。SSTR に特異的なリガンドでリポソーム表面を修飾すれば、受容体依存性エンドサイトーシスにより、MTC 腫瘍細胞への薬物移行性を高め、治療効果を向上させることができると考えた。そこで SSTR に高い親和性を示すオクトレオチド (Oct) をリガンドとして選択し、CPT-11 封入りリポソーム製剤のアクティブターゲティングを試みた。まず、リン脂質 DSPC とコレステロールがモル比で 55 対 45 からなるリポソームを調製し、CPT-11 をリポソーム内水相に封入したコンベンショナルリポソーム (CL) を調製した。リポソームに未封入の CPT-11 をゲルろ過で除去した後、CL と Oct-PEG 脂質をインキュベートして表面修飾を施し、Oct 修飾 CL (Oct-CL) を調製した。同様に、CL と PEG 脂質をインキュベートし PEG 修飾 CL (SL) も調製した。その結果、粒子径が約 140 nm、CPT-11 封入率が 82% 以上と良好な製剤を調製することができた。

次に、Oct 修飾製剤が MTC 腫瘍細胞に選択的に取り込まれるかどうかを明らかにするため、MTC 由来 TT 細胞を用いて製剤の取り込みをフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡で確認した。その結果、総脂質の 1.4mol% 以上の Oct-PEG 脂質修飾により、Oct-CL は SL よりも有意に TT 細胞への取り込みが高くなることが示された。1.6mol% Oct-CL は、2 倍量の、薬物未封入 1.6mol% Oct-CL (empty Oct-CL) により細胞内への取り込みが拮抗され、SSTR を介して選択的に取り込まれることが明らかになった。また、Oct-CL と SL 製剤からの CPT-11 の放出は両製剤間でほぼ同じであった。さらに、TT 細胞での細胞毒性試験を行ったところ、96 時間インキュベートした場合、SL の IC50 値は CPT-11 と同程度だったのに対して、Oct-CL は CPT-11 より約 3 倍強い毒性を示した。

これまでに、インスリノーマなどに対して Oct そのものが抗がん作用を示し、そのメカニズムは PI3K/Akt/mTOR 経路の阻害によることが報告されている。この経路は細胞の増殖や成長に寄与する。このことから、リガンドとして用いた

Oct が TT 細胞においてもこの経路の阻害に寄与し、毒性を高めた可能性が考えられた。これを確かめるため、empty Oct-CL を用いて TT 細胞での細胞毒性を調べた。対照は薬物未封入の PEG 修飾リポソーム (empty SL) とした。その結果、empty Oct-CL はリガンドの Oct 量に依存して細胞毒性を示したが、empty SL では認められなかった。このことは、Oct リガンドがこの経路を阻害することを示唆している。

一般に、PI3K/Akt/mTOR 経路の阻害効果は、この経路の最下流のタンパク質である p70S6K のリン酸化の抑制を指標とする。そこで empty Oct-CL および empty SL 暴露時の TT 細胞の p70S6K リン酸化状態を調べた。その結果、empty Oct-CL のみがこのリン酸化を抑制することが示された。また CPT-11 とその活性代謝物の SN-38 はこのリン酸化に影響を与えなかった。

次に、Oct-CL の MTC 治療効果を TT 細胞担がんマウスで評価した。TT 細胞担がんマウスの尾静脈から Oct-CL、CL または SL を、CPT-11 として 10 mg/kg となるように、3 日間隔で 2 回投与した。フリーの CPT-11 (CPT-11 として 30 mg/kg) 投与群または生理食塩液投与群は、3 日間隔で 3 回投与した。各製剤投与後の腫瘍体積および体重の経時変化を調べ、抗腫瘍効果を評価した。また、延命効果も併せて評価した。その結果 Oct-CL は生理食塩液、フリーの CPT-11、CL および SL 投与と比べて、有意に優れた抗腫瘍効果および延命効果を示した。なお、このとき副作用としての体重減少は観察されなかった。

さらに、TT 細胞担がんマウスでの製剤の体内分布も調べた。Oct-CL または SL を尾静脈から単回投与し、6 時間および 24 時間後に血液、腫瘍組織および各臓器を採取し、CPT-11 とその活性代謝物である SN-38 の濃度を HPLC で測定した。その結果、投与 6 時間後に既に腫瘍の CPT-11 濃度は Oct-CL 投与群が SL 投与群より約 3.7 倍高く、アクティブターゲティング能が発揮されていることが示された。これに対応して、SN-38 濃度も、投与 6 時間後および 24 時間後 Oct-CL 投与群が SL 投与群より有意に高い値を示した。

体内分布の検討から、Oct-CL は優れた腫瘍細胞選択的な送達能を持つことが示された。しかしながら、腫瘍で検出された SN-38 が、腫瘍組織に選択的に取り込まれた Oct-CL から放出された CPT-11 由来であるか、主たる代謝組織である肝臓で代謝され血液を介して腫瘍に運ばれたものであるか明らかでなかった。

生体内では、CPT-11 から SN-38 への変換はカルボキシエステラーゼが触媒する。そこで次に、TT 細胞担がんマウスの腫瘍組織を用いて、CPT-11 から SN-38 への変換活性を *in vitro* で調べた。その結果、腫瘍で CPT-11 から SN-38 への変

換が生じること、またその変換率は肝臓の約 80% に相当することが明らかとなった。この結果は、Oct-CL 投与により腫瘍に高濃度で検出された SN-38 は、腫瘍組織選択的に取り込まれた Oct-CL が腫瘍組織内で CPT-11 を放出し、その CPT-11 が腫瘍で代謝されたものであることを強く示唆する。

また、TT 細胞担がんマウスに empty Oct-CL および empty SL を単回投与したとき、腫瘍での p70S6K のリン酸化は empty Oct-CL で抑制されたが、empty SL では抑制されなかった。しかしながら、empty Oct-CL 投与のみによる腫瘍増殖抑制効果は *in vivo* では観察されなかった。ここまでのことから、CPT-11 封入 Oct 修飾製剤において Oct リガンドは、腫瘍細胞内への選択的薬物送達と mTOR 阻害効果の 2 つの機能をもつことが示された。

MTC 治療における mTOR 経路の阻害効果による抗腫瘍効果をより明確にするため、mTOR 阻害薬のエベロリムスを用いて抗腫瘍効果を調べた。エベロリムスは *in vitro* で TT 細胞増殖抑制作用を示した。すなわち、MTC 治療においては mTOR 経路の阻害も抗腫瘍効果発現のための重要な標的となると言える。

以上のことから、CPT-11 封入 Oct 修飾リポソームが甲状腺髄様がんに対して優れた治療効果を示す製剤であることを明らかにした。また、Oct 修飾リポソームは、フリーの Oct よりもソマトスタチン受容体に対する親和性が高いので、Oct 単剤での治療や Oct との併用治療においても、有用な剤形となることが期待される。このターゲティング製剤による稀少ながんでの治療効果は、ソマトスタチン受容体が高発現し、PI3K/Akt/mTOR 経路が活性化している神経がんなどの難治性がんや、肺がんなどの common ながんに対する新しい治療の糸口になる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

がんは、高齢社会の到来により増加の一途をたどっており、1981年以降わが国における死亡原因の第1位となっている。現在、罹患者数の多い common ながんに対する取り組みが進む一方、罹患者数の少ない稀少ながんへの取り組みは充分とは言えない。稀少ながんの治療法の開発は、社会的にも医学的にも急務でありその重要性は高い。稀少ながんのひとつに甲状腺髄様がん (MTC) がある。MTC は、病変部の外科的な切除が治療の第一選択とされる。放射線療法は奏功せず、化学療法は RET、VEGFR および EGFR 阻害薬のバンデタニブが FDA で承認されているのみである。動物実験レベルではイリノテカン (CPT-11) の有効性が示唆されているものの、腫瘍への薬物送達性が低く、正常組織への薬物移行性が高いことから、十分な治療効果を得るには至っておらず、副作用が問題となる場合もある。そこで、本研究では薬物キャリアを利用して腫瘍選択的に薬物を送達し、正常組織への薬物移行性を制御することで、優れた治療効果を示す MTC 治療用製剤の開発を試みた。

はじめに、MTC に高発現するソマトスタチン受容体 (SSTR) を標的とし、CPT-11 を封入したリポソームを、SSTR に高い親和性を示すオクトレオチド (Oct) で表面修飾した腫瘍選択的薬物送達能を有する CPT-11 封入 Oct 修飾リポソーム製剤 (Oct-CL) と、対照としてポリエチレングリコールで表面修飾したリポソーム (SL) を調製し、MTC 由来 TT 細胞への取り込みを検討した。その結果、両者の粒子径はほぼ同じであるが、Oct-CL の TT 細胞への取り込みは SL よりも有意に高いことを明らかにした。また、フリー Oct との拮抗試験から Oct-CL の取り込みが SSTR を介していることが示された。TT 細胞担がんマウスを用いた治療効果の検証からは、Oct-CL は SL およびフリーの CPT-11 と比較して有意に優れた治療効果を示すことを明らかとし、これは Oct 修飾によるリポソーム製剤の腫瘍への選択的な薬物送達能が向上したためであることを薬物の体内分布の実験から明らかにした。

Oct は単独でも抗腫瘍効果をもつことが報告されている。薬物未封入 Oct 修飾リポソームは、フリーの Oct よりも細胞毒性が約 238 倍高いことを見出した。このことは、Oct 修飾リポソームが Oct 単剤での治療や Oct との併用治療において、有用な剤形となる可能性を示唆している。また、薬物未封入 Oct 修飾リポソームによる細胞毒性はリガンドの Oct による PI3K/Akt/mTOR 経路の阻害に起因することを、ウエスタンブロットによりリン酸化状態を調べることで

明らかにした。これらのことから、Oct-CLはリガンドであるOctが腫瘍への選択的薬物送達のみならず、mTOR経路の阻害の抗腫瘍薬としても作用することによって治療効果を高める製剤であることを明らかにした。

さらに、mTOR阻害薬エベロリムスによるMTC治療効果の検証から、エベロリムスが*in vitro*でTT細胞増殖抑制作用を示したので、MTC治療においてはmTOR経路を阻害することも抗腫瘍作用の発現には重要な標的となることを見出した。

本論文は正確に記載され、治療法の選択肢が非常に狭いMTCに対し、新たな治療法を提示している。さらに、この製剤はMTCに留まらずSSTRを高発現しmTOR経路が活性化しているような、肺がんなどのcommonながんに対する新しい治療の糸口になる可能性を提示するものである。このようなことから、本論文は博士（薬学）の学位論文に値するものと判断する。