

学位論文題名

# Development of tumor vasculature targeted liposomal delivery system for the treatment of chemotherapy resistant cancer

(薬剤耐性がん治療に向けた腫瘍血管内皮細胞へのリポソームによる薬物送達システムの開発)

## 学位論文内容の要旨

Tumor vasculatures are the general route of entry of nutrients and chemotherapeutic drugs to tumor cells. It plays a critical role in tumor growth and progression, not only by providing nutrients, and oxygen but also by spreading of metastatic cells into the systemic circulation. Selective inhibition or destruction of the tumor vasculature could trigger tumor growth inhibition and thereby offer a novel approach to cancer treatment, more specifically for the treatment of multi-drug resistant tumor tissues like renal cell carcinoma, RCC. The resistance of RCC to chemotherapeutic treatments remains a major obstacle in therapy. TECs express different types of cell surface markers and Integrin  $\alpha\beta 3$  is one of them which is readily recognized by RGD motif peptide. In this study, RGD modified PEG-LPs (RGD-PEG-LP) are used to target the tumor vasculature of RCC tumor.

Size of liposomes (LPs) specially governs its biodistribution. Small size PEGylated liposomes (PEG-LPs) of about 100 nm in diameter (dnm) are widely used to target many diseased tissues including cancers. Large size PEG-LPs remain beyond the interest of use due to have some limitations specially its recognition by reticuloendothelial system (RES) as well as filtration out from blood circulation through spleen. In this study, RGD modified small (~100 dnm) and large (~300 dnm) size PEG-LPs were prepared and in vitro cellular uptake was performed to observe the binding efficiency towards the target receptor using Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) which express remarkable amount of Integrin  $\alpha\beta 3$ . This study indicated that RGD motif peptide presenting on the top of PEG of large size PEG-LP exerted the stronger multivalent interaction with its target receptor, as compared to the small size version. Consequently, the tumor vasculature targeting efficiency of large size RGD-PEG-LP is compared with the small size version. To test the therapeutic efficacy, doxorubicin (DOX), a widely used anticancer drug was encapsulated into the PEG-LPs. The tissue distribution and anti-tumor activity were investigated in OSRC-2 (human RCC) tumor bearing mice. The therapeutic efficacies of DOX loaded RGD-PEG-LPs were compared to that of Doxil (a clinically used small size PEG-LP having

~100 dnm) in mice bearing OSRC-2 tumor xenografts. Large size RGD-PEG-LP (DOX) significantly reduced tumor growth and prolonged the life span of the mice. However; Doxil, which accumulated in the tumor tissue via the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, failed to suppress tumor growth. Compared to small size RGD-PEG-LP (DOX) (~100 dnm), large size RGD-PEG-LP (DOX) also showed a significant anti-tumor effect, which was exerted through its strong anti-angiogenic activity on the tumor vasculature rather than having a direct effect on DOX resistant RCC. Tumor vasculatures are generally leaky which permits tumor accumulation of small size (~100 dnm) PEG-LP via the EPR effect. Based on these, a new hypothesis has been generated considering that large size PEG-LP (~300 dnm) might avoid or minimize the EPR effect that finally leads the larger number of particles to come to close contact to tumor endothelium. The in vivo study also revealed that the large size RGD-PEG-LP mainly resides and preferentially targets the tumor vasculature presumably because of multivalent interactions with the receptor expressed from TECs; where the small size RGD-PEG-LP extravasates to tumor cells. Moreover, TECs derived from OSRC-2 tumor tissues were found 100 times more sensitive to DOX as compared to OSRC-2 tumor cells, indicating the efficacy of anti-angiogenic therapy against RCC. Therefore, the newly developed large size RGD-PEG-LP that targets the tumor vasculature would be an effective and alternate therapeutic strategy for the treatment of tumor cells that are resistant to chemotherapy, in cases where Doxil is ineffective.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	原島秀吉
副査	教授	菅原満
副査	准教授	秋田英万
副査	准教授	武隈洋

## 学位論文題名

### Development of tumor vasculature targeted liposomal delivery system for the treatment of chemotherapy resistant cancer

(薬剤耐性がん治療に向けた腫瘍血管内皮細胞へのリポソームによる  
薬物送達システムの開発)

博士學位論文審査等の結果について(報告)

がん細胞の薬剤耐性化は化学療法によるがん治療を困難する深刻な問題である。近年、がん細胞自身ではなく、がんの血管新生を阻害することで栄養や酸素の供給を遮断することで、がんの成長を抑制出来る血管新生阻害療法に注目が集まっており、がんの血管新生を標的とした分子標的医薬や抗体医薬の研究・臨床応用に大きな期待が寄せられている。しかし、消化管出血などの重篤な副作用の問題もクローズアップされており、効果の増大と副作用軽減の観点から、腫瘍血管へ特異的に薬物を送達可能なキャリア開発は重要な課題といえる。

がん組織の腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞は正常血管の内皮細胞とは性質が異なることが明らかとなっており、本論文では腫瘍血管内皮細胞を標的とするリポソーム型薬物送達システムの開発と薬剤耐性癌における癌治療を目的としたものである。

腫瘍へのリポソームの送達では、血中を滞留し 100nm サイズとすることで enhanced permeability and retention (EPR) 効果で受動的に蓄積させる方法が一般的であるが、本論分で著者は、腫瘍血管を効率よく認識するため、リポソームサイズを EPR 効果が起こらないよう 300nm とあえて大きく制御し、インテグリン分子と結合する RGD モチーフペプチドを PEG の先端に修飾した。インテグリン陽性 HUVEC 細胞を用いた細胞結合能試験を行った結果、リガンドを介した標的化リポソームの腫瘍血管内皮細胞への認識能は 100nm の標的化リポソームと比較し 300nm の標的化リポソームで約 10 倍高いことが明らかとなった。リポソームのリガンド介在性標的化には、そのサイズが大きく影響することが示唆された。

次に著者は、薬剤耐性が広く知られる癌種のひとつである腎細胞癌 (renal cell carcinoma: RCC) をモデルとして抗腫瘍効果について、市販のリポソーム製剤である Doxil (Caelyx) を比較対象として評価した。Doxil は直径が 100nm 程度であり EPR 効果でがん組織に蓄積し、がん細胞を標的とするドキソルビン封入 PEG 修飾リポソームである。ドキソルビン投与量 1.5mg/kg での抗腫瘍効果の結果、Doxil ではまったく抗腫瘍効果が得られなかったのに対して、著者が構築した 300nm の標的化リポソームでは有意な癌増殖抑制が観察された。また 100nm の標的化リポソームと比較しても有意に高い抗腫瘍効果を示した。この抗腫瘍効果のメカニズムについてさらに検討を行った。リポソーム処置後の腫瘍組織中の腫瘍血管の様子を共焦点顕微鏡で観察したところ、血管の面積は Doxil と比較して、標的化リポソームで有意に減少していた。またがん組織内のアポトーシス細胞を詳細に解析したところ、300nm の標的化リポソームでは 100nm のものよりも、腫瘍血管で多く観察され。よって、腫瘍血管内皮へドキソルビンを送達し血管新生阻害が抗腫瘍効果の主要因であることが示唆された。最後に、がん組織から単離された腫瘍血管内皮細胞と腎癌細胞のドキソルビンの感受性を評価したところ、腎癌細胞と比較し腫瘍血管内皮細胞は約 100 倍ドキソルビンへの感受性が高いことが示された。

これを要するに、著者は、300nm の標的化リポソームを用いることで腫瘍血管内皮細胞への認識能を

飛躍的に高めることで、ドキソルビシン耐性がんの治療において、がん細胞を標的とするよりも非常に効率よく腫瘍増殖を抑制可能であるという新知見を得たものである。本論文の結果は、腫瘍血管内皮細胞への薬物送達システムの開発において有益な知見であるとともに、薬剤耐性癌治療へ貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。