

氏名	倉本 夕香里
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第654号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	免疫活性化能を有するCpG DNAのマクロファージ選択的送達に基づく新規腹膜播種治療法の開発に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 橋田 充 教授 高倉喜信 教授 乾 賢一

論文内容の要旨

腹膜播種は、例えば胃癌において肺転移や肝転移と同様にその進行の第Ⅳ期に病態分類され、完治は不可能であると考えられている。腹膜播種における最大の問題点として、原発巣の臓器漿膜から離脱した癌細胞の大網乳斑を介した経リンパ行性転移が挙げられる。しかしながら現在使用されている多くの低分子抗癌剤では低リンパ移行性ならびに副作用が隘路となり、これらを克服するための新規治療法開発が急務である。大網乳斑や腸間膜などのリンパ系組織には、免疫担当細胞であるマクロファージが多数存在することから、マクロファージの活性化により経リンパ行性転移に対する効率的な免疫療法が可能になると考えられる。バクテリアゲノムDNA由来のCpGモチーフを含む短鎖DNA (CpG DNA) は、マクロファージや樹状細胞に発現する Toll-like receptor (TLR)-9 に認識され、TNF- α 、IL-12などのTh1型サイトカインの産生に基づく高い抗腫瘍効果が期待されることから、局所投与により既に臨床試験が行われている。しかしながら、CpG DNAを用いた効率的な腹膜播種治療を行うためには、ドラッグデリバリーシステムの概念に従い、CpG DNAをリンパ系組織のマクロファージへ細胞特異的に送達するための製剤設計法の確立が必要である。そこで申請者は、カチオン性リポソームを用いたCpG DNAの微粒子性製剤化による腹膜播種治療法の開発を行った。さらに、当研究室で開発したマンノース修飾リポソームを用いてCpG DNAのマクロファージ選択的送達を行い、腹膜播種治療効果について検討した。また、更なる腹膜播種治療効果向上のために、免疫細胞に対する分化誘導能ならびに癌細胞に対するアポトーシス誘導能を有することが知られる全トランスレチノイン酸 (ATRA) をO/Wエマルジョン製剤に封入し、CpG DNAによる免疫療法との併用による腹膜播種治療効果について評価した。

第1章 カチオン性リポソーム/CpG DNA複合体による腹膜播種治療法の開発

腹腔内投与した物質のリンパ移行に関しては、サイズが重要な因子であることが報告され、100~200nmの大きさの粒子がリンパ移行性ならびにリンパ節における滞留性に優れることが明らかにされている。CpG DNAは分子量約8,000の短鎖DNAであり、腹膜播種における転移好発部位であるリンパ系組織への移行性は低いものと考えられるが、カチオン性リポソームを用いると、静電的相互作用により核酸と複合体を形成することから、CpG DNAを微粒子性製剤化できる。そこで複合体の製剤設計を行い、CpG DNAとカチオン性リポソームとの混合比や溶媒の塩濃度等の各種条件を最適化することで、平均粒子径約100nm程度のナノ微粒子を得た。得られたCpG DNA/カチオン性リポソーム複合体 (CpG DNA複合体) を腹膜播種モデルマウスに腹腔内投与すると、腹膜播種における転移好発部位である大網ならびに腸間膜での癌細胞数が未処置群と比較して有意に減少した。また、マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞にCpG DNA複合体を添加することにより、Th1型サイトカインであるTNF- α の産生増大が認められた。以上、カチオン性リポソームを用いたCpG DNAの微粒子化により、免疫活性化に基づく腹膜播種治療が可能になることが示された。

第2章 マンノース修飾リポソーム/CpG DNA複合体によるマクロファージ選択的送達に基づく腹膜播種治療法の開発

マクロファージに高発現するマンノース受容体は、厳密な基質特異性を有することから、*in vivo*細胞選択的送達に利用

可能である。CpG DNAはマクロファージに発現するTLR-9に認識されるため、マクロファージへの細胞選択的送達により免疫活性化能の更なる増強が見込まれる。そこで、マンノース修飾リボソーム複合体によるマンノース受容体介在性エンドサイトーシスを利用した新規腹膜播種免疫療法の開発を行った。マウス腹腔内より単離した初代培養マクロファージに、マンノース修飾リボソーム/CpG DNA複合体 (Man/CpG DNA複合体) を添加後、上清中TNF- α 濃度を指標に免疫活性化能を評価したところ、Man/CpG DNA複合体処置により、CpG DNA複合体あるいはガラクトース修飾リボソーム/CpG DNA複合体処置群と比較して、TNF- α 産生量が有意に増大することが明らかとなった。腹膜播種モデルマウスを用いてMan/CpG DNA複合体を腹腔内投与後の大網あるいは腸間膜における癌細胞数を定量的評価したところ、CpG DNA複合体投与群と比較して、大網ならびに腸間膜での癌細胞数がそれぞれ約2%, 0.5%まで減少し、さらに、生存日数の延長が認められた。以上、CpG DNAのマンノース修飾リボソームを用いた送達に基づく腹膜播種治療効果の改善の可能性が示された。

第3章 ATRA封入エマルジョン製剤とマンノース修飾リボソーム/CpG DNA複合体の併用による新規腹膜播種治療法の開発

既存の抗癌剤による腹膜播種治療は、免疫抑制作用等の重篤な副作用により、CpG DNAを用いた免疫療法との併用には不適切であると考えられる。そこで、腹膜播種に対する新規化学療法の開発を目的として、免疫細胞に対する分化誘導能ならびに癌細胞に対するアポトーシス誘導能を有することが知られるATRAをエマルジョン製剤に封入した。得られた平均粒子径約150nmのATRA封入エマルジョン製剤を腹膜播種モデルマウスに腹腔内投与したところ、Man/CpG DNA複合体との併用により顕著な癌細胞増殖抑制効果が示されることが明らかとなった。また、臨床での腹膜播種治療において汎用されるパクリタキセルの腹腔内投与と比較して、体重減少などの副作用が低いことが確認された。以上、化学療法剤であるATRA封入エマルジョン製剤とMan/CpG DNA複合体による免疫療法の併用による効率的な腹膜播種治療の可能性が示唆された。

以上、申請者は、免疫活性化能を有するCpG DNAの細胞選択的送達を可能とするドラッグデリバリーシステムの開発に関して系統的な検討を行い、マンノース修飾を利用したマクロファージ選択的送達とそれに基づく抗腫瘍効果の大幅な改善に成功した。本研究で得られた知見は、CpG DNAを用いた有効かつ安全な腹膜播種療法の開発に対して有用な情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

癌の腹膜播種治療においては、原発巣の臓器漿膜から離脱した癌細胞の大網乳斑を介した経リンパ行性転移などが問題となるが、大網乳斑や腸間膜などのリンパ系組織にはマクロファージが多数存在することから、マクロファージの活性化による免疫療法が有効と考えられ、マクロファージに発現するToll-like receptor (TLR)-9に認識されTh1型サイトカインの産生を介して抗腫瘍効果を示すバクテリアゲノムDNA由来のCpGモチーフを含む短鎖DNA (CpG DNA)の局所投与が臨床試験されている。申請者は、腹膜播種治療を効率的に行うために標的であるマクロファージへのCpG DNAの細胞特異的送達が必要と考え、カチオン性リボソームやマンノース修飾リボソーム製剤を適用して送達と治療効果を評価した。また、免疫細胞に対する分化誘導能や癌細胞に対するアポトーシス誘導能を持つ全トランスレチノイン酸 (ATRA)とCpG DNAとの併用による治療効果を評価した。

腹腔内投与した物質のリンパ移行に関しては、サイズが重要な因子であることが報告され、100~200nmの大きさの粒子がリンパ移行性ならびにリンパ節における滞留性に優れることが明らかにされている。CpG DNAは分子量約8,000の短鎖DNAでリンパ系への移行性は低いものと考えられるが、カチオン性リボソームを用いると静電的相互作用によりCpG DNAと複合体を形成し微粒子性製剤化できる。そこで複合体の製剤設計を行い、CpG DNAとカチオン性リボソームとの混合比や溶媒の塩濃度等の各種条件を最適化することで、平均粒子径約100nm程度のナノ微粒子を得た。得られたCpG DNA/カチオン性リボソーム複合体 (CpG DNA複合体)は、マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞におけるTh1型サイトカインであるTNF- α の産生を増大させ、また腹膜播種モデルマウスに対する腹腔内投与により転移好発部位である大網ならびに腸間膜での癌細胞数が未処置群と比較して有意に減少した。次に、マンノース修飾リボソーム

/CpG DNA 複合体を調製してマンノース受容体介在性エンドサイトーシスを利用した新規腹膜播種免疫療法の開発を試み、マウス腹腔内より単離した初代培養マクロファージに、複合体を添加後CpG DNA 複合体あるいはガラクトース修飾リボソーム/CpG DNA 複合体処置群と比較して、TNF- α 産生量が有意に増大することが明らかとなった。また、腹膜播種モデルマウスを用いてMan/CpG DNA 複合体を腹腔内投与後の大網あるいは腸間膜における癌細胞数を定量的に評価した結果、他の投与群と比較して癌細胞数が著しく減少し生存日数が延長した。さらに、既存の抗癌剤による腹膜播種治療は免疫抑制作用等の重篤な副作用により、CpG DNA を用いた免疫療法との併用には不適切と考えられることから、腹膜播種に対する新規治療法の開発を目指して免疫細胞に対する分化誘導能ならびに癌細胞に対するアポトーシス誘導能を有するATRAのエマルジョン製剤を調製し、得られた平均粒子径約150nmのATRA封入エマルジョン製剤が腹膜播種モデルマウスに対するMan/CpG DNA 複合体との併用投与により顕著な癌細胞増殖抑制効果を示すことを確かめた。本治療法は、臨床での腹膜播種治療に汎用されるパクリタキセルの腹腔内投与と比較して体重減少などの副作用が低く、ATRA封入エマルジョン製剤による化学療法とMan/CpG DNA 複合体による免疫療法の併用は、新しい腹膜播種治療法に成り得ることが示唆された。

以上、申請者は免疫活性化能を有するCpG DNA に対するドラッグデリバリーシステムの開発に関して系統的な検討を行い、マンノース修飾リボソームを用いたマクロファージ選択的送達とそれに基づく抗腫瘍効果の大幅な改善に成功した。本研究で得られた知見は、CpG DNA を用いた有効かつ安全な腹膜播種療法の開発に対して有用な情報を提供するものと思われる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。