

治療抵抗性胆嚢癌に対する DDS 製剤を用いた新規治療薬の開発

関西医科大学 外科学講座

菱川 秀彦

1. 緒言

胆嚢・胆管癌の罹患数はおよそ 22,800 人であり (2016 年)、男女とものがん罹患全体の 3% である。胆嚢癌は、5 年生存率が全病期で 30% 未満、Stage III で 20% 未満、Stage IV では 3% と予後不良な腫瘍である。外科切除が第一選択だが切除不能症例が多く、切除不能例の化学療法奏効率は 21~38%¹⁾ と低率であり、放射線治療の効果も非常に限定的である。胆嚢癌の診断及び治療の発展・開発が望まれている。光増感剤インドシアニングリーン (Indocyanine green : ICG) は、近赤外励起光を照射すると 830 nm のピーク波長で蛍光を発する水溶性のトリカルボシアニン色素である。臨床現場では、ICG を使用して、乳癌、眼科血管造影および冠動脈血流評価におけるセンチネルリンパ節転移を同定する。消化管手術の分野では、肝臓機能評価や蛍光画像法による HCC の術中局所診断に用いられている²⁾⁻⁵⁾。近年、光増感剤と特定の波長のレーザー光との間の光化学反応を利用した光線力学療法 (Photodynamic therapy : PDT) に ICG が用いられている。簡潔に述べると、光増感剤が投与され、癌組織に蓄積され、次いで腫瘍にレーザー光を照射する。活性化された光増感剤は、内因性酸素と反応し、一重項酸素の生成をもたらし、腫瘍細胞におけるアポトーシスなどの細胞死をもたらし、さらに、反応によって熱が発生し、この熱効果もまた腫瘍抑制効果に寄与する。PDT は主に、皮膚癌や表在性膀胱癌などの悪性腫瘍の局所療法として適用されている^{6),7)}。さらに、PDT は最近、早期胃癌、食道癌および肺癌の治療選択肢として広く受け入れられている⁸⁾。

高分子ミセルのナノキャリアは、腫瘍イメージングおよび抗腫瘍治療の両方に潜在的に応用されている。これらのミセルは、浸透性および保持 (Enhanced permeability and retention (EPR)) 効果の向上により固形腫瘍に蓄積する。EPR 効果は、腫瘍血管の高浸透性および腫瘍組織周囲のリンパ流の低下により、30~100 nm のナノ粒子が腫瘍内に受動的に蓄積する現象である。しかしながら、ナノキャリアは、肝細胞内皮系 (Reticuloendothelial system : RES) の細胞によって捕捉され、肝臓に蓄積する可能性がある。ラクトソームは、ヘリカルポリ (L-乳酸) (PLLA) の疎水性ブロックとポリ (サルコシ) の親水性ブロックとを有する両親媒性ポリデプシペプチドからなる高分子ミセルであるコア-シェル型のナノキャリア

である。ラクトソームは生体適合性で生分解性の物質であり、急性毒性がなく、腫瘍に選択的に蓄積することができ、RES を避けることができる。本研究では、腫瘍特異的に蓄積する ICG-ラクトソームを調製し、ヒト胆嚢癌に対する腫瘍集積性を利用した診断および PDT による治療効果を調べた。

2.方法

2-1) ヒト胆嚢癌の培養細胞に対する PDT による抗腫瘍効果 (*in vitro*) の解析

96 well プレートを用いてヒト胆道癌細胞 (NOZ) を 1×10^4 個培養する。培養 24 時間後に Laser 照射及び ICG-ラクトソーム 2 mg/mL を加え PDT (波長 810 ± 10 nm) を行った。18 J/cm² または 100 J/cm² で各々高出力/短時間照射、低出力/長時間照射の 2 パターンで照射を行った。0 分、24 時間、48 時間、72 時間で MTT assay を行い生存率の比較検討を行った。

2-2) ヒト胆嚢癌皮下移植マウスを用いて、“ICG-ラクトソーム”の集積および PDT による抗腫瘍効果に対する至適条件の検討

集積：BALB/c nude mice、5 週齢、雄の左鼠径部皮下にヒト中分化型管状腺癌細胞株 (NOZ 細胞) 5×10^6 個を皮下注射し腫瘍体積が約 10~100 mm³ (植え付けから 3 週発育) になった時点でマウス尾静脈より ICG 及び ICG-Lactosome を投与した。試薬の投与量は ICG 0.2 mg/mL 100 μL、ICG-ラクトソーム 20 mg/mL 100 μL とし ICG の質量%を一致させ投与を行った。ICG 投与群 5 匹、ICG-ラクトソーム投与群 5 匹で IVIS[®] imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用い腫瘍部及び対側鼠径部の蛍光強度をそれぞれ観察し比較した。観察時間は 0、3、6、24、48、72、150 時間とした。

PDT：BALB/c nude mice、5 週齢、雄の左鼠径部皮下にヒト中分化型管状腺癌細胞株 (NOZ 細胞) 5×10^6 個を皮下注射し腫瘍体積が約 10~100 mm³ になった時点でマウス尾静脈より ICG 投与群 0.2 mg/mL を 200 μL、ICG ラクトソーム投与群 (1 回照射、2 回照射)：20 mg/mL を 200 μL 各 8 匹に投与。1 回目照射は投与後 2 日目、2 回目照射は投与後 5 日目に 1,150 mW/cm²、90s で 100 J/cm² で照射を行った。照射後に 1 日おきに腫瘍体積を測定した。

3.結果

3-1) ヒト胆嚢癌の培養細胞に対する PDT による抗腫瘍効果 (*in vitro*) の解析

18 J/cm² まで照射した群ではコントロール群、レーザーのみ群、ICG-ラクトソームのみの群、PDT 群での有意差は明らかなものは認めなかった。100 J/cm² まで照射した群では $P < 0.001$ で PDT 群のみ有意に細胞障害が出現しているのが観察された (図 1)。

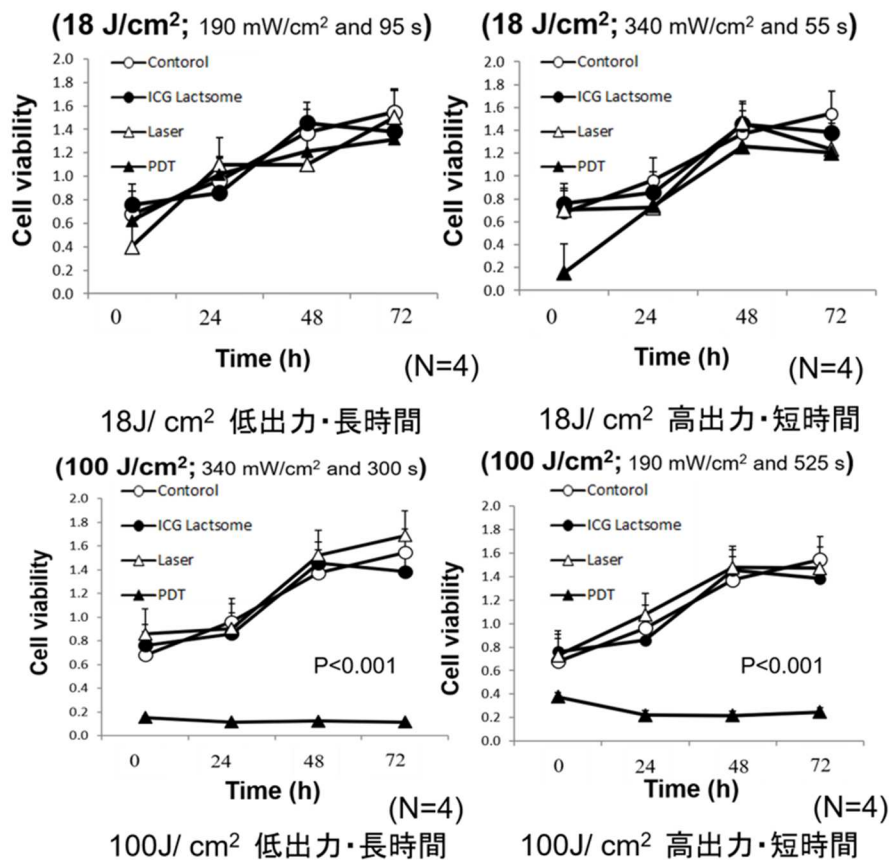


図 1

3-2) ヒト胆嚢癌皮下移植マウスを用いて、“ICG-ラクトソーム”の集積および PDT による抗腫瘍効果に対する至適条件の検討

集積：ICG 投与群では、投与直後に肝臓へ集積したのちに速やかに腸管を経由して体外へ排泄されており、蛍光強度もこれを反映し腫瘍部、非腫瘍部ともに蛍光を示さず、有意差を認めなかった。ICG-ラクトソーム投与群では、薬剤投与直後は ICG の薬物動態とは明らかに異なり、全身に薬剤が分布。その後、徐々に腫瘍へ薬剤が集積。蛍光強度では 24～48 時間後をピークとして上昇が認められ、右鼠径部の非腫瘍部との比較において $P < 0.05$ と有意差を認めた（図 2）。

PDT：PDT 開始後より 9 日目まで観察を行った。ICG 投与群では腫瘍は経時的に増大を認め、ICG-ラクトソーム 1 回照射群および 2 回照射群では明らかな抗腫瘍効果が認められ、 $P < 0.001$ および 0.01 と有意差を認めた。また、1 回照射群と 2 回照射群の比較でも $P < 0.05$ と有意差を認めた。apoptotic index は低い傾向であり 3 群間に有意差は認めなかった。necrosis area rate は ICG と ICG-ラクトソーム一回照射群において $P < 0.05$ 、2 回照射群においては $P < 0.001$ と有意差を持って高値を得られた（図 3）。

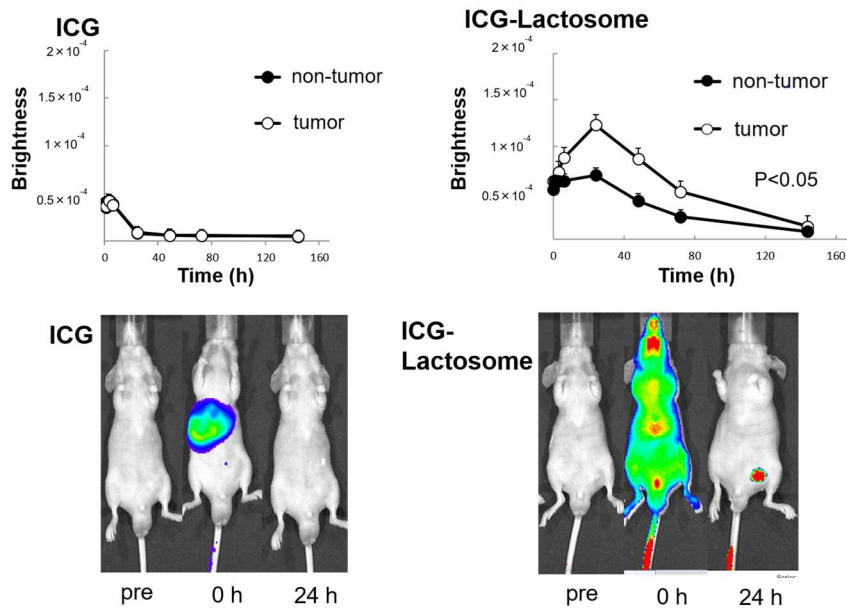


図 2

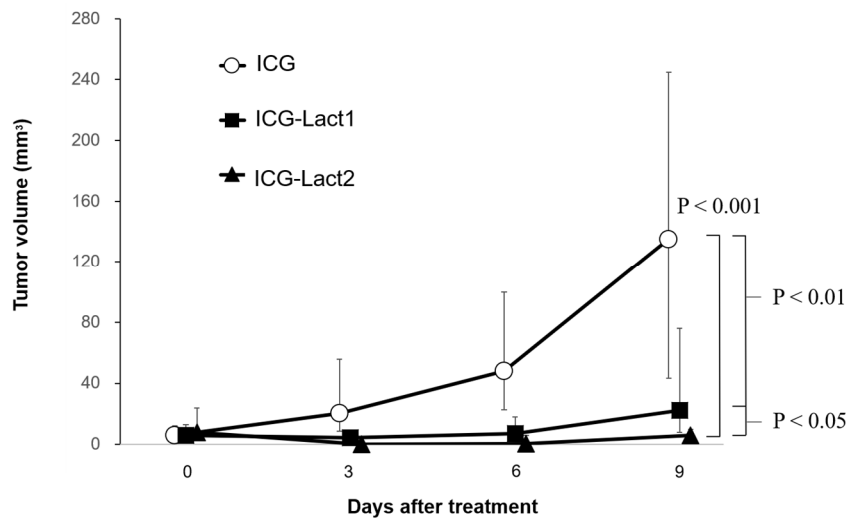


図 3

4.考察

ICG-ラクトソームは異種移植腫瘍に蓄積し、PDT による抗腫瘍効果を認めた。ICG-ラクトソームは PDT 後腫瘍に再集積し短期間に 2 回の PDT を行うことでより抗腫瘍効果を得ることができた。ICG-ラクトソームは術中癌画像診断や術中 PDT 併用による胆嚢癌根治手術の達成、さらに切除不能胆嚢癌に対して、将来的にはより局所での“ICG-ラクトソーム”の内視鏡的逆行性胆管造影下 PDT による down-staging より根治切除が可能になれば、胆嚢癌予後改善へ大きく貢献することができる。

5.結語

ICG-ラクトソームは胆嚢癌の診断及び治療に関して有用であると考えられる。

6.文献

- 1) Phase II study of gemcitabine and cisplatin in advanced biliary tract cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21:999–1003.
- 2) Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest.* 1960; 39:592–600.
- 3) Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 2009; 1:2491–2504.
- 4) Lightinduced decomposition of indocyanine green. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:1777–1783.
- 5) Photodynamic therapy for human hepatoma-cell-line tumors utilizing biliary excretion properties of indocyanine green. *J Gastroenterol.* 2014; 49:110–116.
- 6) Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015; 13:863–874.
- 7) Superficial bladder cancer therapy. *ScientificWorldJournal.* 2004; 28:387–399.
- 8) Photodynamic therapy as salvage treatment for local failures after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Gastrointest Endosc.* 2005; 62:31–36.