EPR 効果に影響を及ぼす因子の体系化に向けて

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系) 薬物動態制御学分野^{*1)}・静岡県立大学薬学部 医薬生命化学分野^{*2)}・エーザイ株式会社^{*3)}

大河原賢一^{*1)}・浅井知浩^{*2)}・兵頭健治^{*3)}・浅野 誠^{*3)}・菊池 寛^{*3)}

Toward the schematization of the factors which affect the enhanced permeability and retention effect

Due to the long circulation time of polyethylene glycol (PEG)-modified liposomes (PEG liposomes) and the leakiness of the microvasculature in solid tumors, PEG liposomes containing anticancer drugs have been shown to accumulate preferentially in tumors. This phenomenon, known as the enhanced permeability and retention (EPR) effect, has been generally observed in many types of murine solid tumors and provides a good opportunity for passive targeting of liposomal anticancer drugs to tumor tissues. However, differences in the pathophysiological characteristics of tumors may result in different therapeutic effects in EPR effect-based therapy. In this review, various factors which would affect EPR effect-based therapy are summarized and are briefly introduced in a point-by-point fashion.

固形がんの腫瘍組織では、比較的大きな物質も血液中から間質へと漏出し、漏出したものは腫瘍組織内に蓄積するという Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果が認められる。この特性により、正常血管では血管外へ漏出しにくい粒子径 100 ~ 200 nm 程度のナノ粒子も、腫瘍組織内の新生血管からは血管外に漏出可能であり、さらに漏出したナノ粒子は腫瘍組織内に滞留することとなる。すでにポリエチレングリコール(PEG)により表面修飾したリポソームにドキソルビシンを内封した製剤(DOXIL[®])が臨床応用されている。本稿では EPR 効果を利用したナノ粒子製剤による抗腫瘍効果に影響を与える各種因子について、生体側および製剤側の因子に分類し、それぞれについて簡単に紹介する。

Ken-ichi Ogawara^{*1)}, Tomohiro Asai^{*2)}, Kenji Hyodo^{*3)}, Makoto Asano^{*3)}, Hiroshi Kikuchi^{*3)}

Keywords: EPR effect, Liposomes, Cancer chemotherapy, Tumor-bearing animal models

1. はじめに

Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果と聞くと血中滞留性の高いナノ粒子に特有の現象であると考えがちであるが、果たしてこれは正しいだろうか。初めて EPR 効果が見つかったのは前田 浩先生と松村保広先生が Evans blue を担がんマウスに投与した実験にさかのぼる¹⁾。Evans blue は分子量 961 の低分子化合物であり、血中のアルブミンと非常に強固に結合し、タンパク結合率は 90 % 以上

である。アルブミンに結合した Evans blue ががん組織に長時間集積したことから、高分子化合物やナノ粒子ががん組織選択的に集積するという EPR 効果が発見された。つまり低分子化合物であってもアルブミンなどのように血中滞留性のよい血清タンパク質と強固に結合できるような化合物は、DDS 製剤化しなくても EPR 効果でがん組織に集積できることを示唆している。例えば、パクリタキセルはタンパク結合率約 90 % 前後の低分子抗がん剤であり、DDS 製剤化しなくても Evans blue のように腫瘍に集積することが示唆される。2017 年 12 月 7 日に開催された日本薬学会関東支部第 42 回学術講演会において、前田 浩先生から「パクリタキセルのようなタンパク結合率の高い低分子化合物も EPR 効果で

^{*1)} Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

^{*2)} Department of Medical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

^{*3)} Eisai Co., Ltd.

腫瘍に集積するため、EPR効果は血中滞留型ナノ粒子だけでなくパクリタキセルのような低分子化合物にもその概念は適用される」と定義していただいた。近年、ヒトではEPR効果がないのではないかという議論が出ているが、EPR効果は本稿で紹介するように非常に多くの因子の影響を受けており、臨床で最大の効果を発揮するDDS製剤を創り上げるためには、EPR効果に影響を及ぼす因子の体系化が必要であると考えている(表1)。

なお、前報²⁾において、その因子の一部についてはすでに言及しているので、本稿とあわせてご笑覧いただけると幸甚である。

表1 EPR効果に影響を及ぼす因子：がん組織

- [A] 生体および腫瘍側：(下記因子が複合的に影響している)
- ① 腫瘍血管の違い(密度、透過性)
 - ⇒移植がん細胞の種類による違い
 - ⇒同種移植系(Allograft: マウス腫瘍系)
 - 異種移植系(Xenograft: ヒト腫瘍系)
 - ⇒移植部位(皮下あるいは同所(Orthotopic))
 - ⇒血管内皮細胞の性質および成熟度
 - ② 腫瘍間質組織(結合組織、腫瘍随伴マクロファージ)
 - ③ がん細胞自体の抗がん剤への感受性(耐性獲得を含めて)
 - ④ がん組織内におけるがん細胞の不均一性(がん組織内の外側、内側)
 - ⑤ がん細胞の増殖速度(がん細胞外の薬物濃度との関連で)と貪食能
 - ⑥ 腫瘍サイズ測定方法の問題(腫瘍体積と生細胞の不一致の事象)
 - ⑦ がん細胞外のpHの違い(がん種、がんの状態で異なる)
 - ⑧ がん細胞外液の組成の違い(細胞によって種々のfactorを細胞外に放出; 上記⑦と同様に、これがリポソームの安定性や薬物放出速度に影響する)
 - ⑨ 腫瘍内血圧
 - ⑩ 低酸素状態の違い(がん種により異なる)
 - ⑪ リンパ管の有無
 - ⇒これらは、*in vivo* 実験の薬物分布で検討可能?
 - (ただし、現状では、*in vivo*におけるリポソーム内外の薬物を分離定量できない)
 - ⇒これらは、*in vitro* 実験系、*in situ* 実験系で再現できないか?
- [B] 抗がん剤封入リポソーム側:
- Passive Targeting の場合、① リポソームからの薬物放出速度、② がん組織内& がん細胞外のフリーの薬物濃度の2因子
- ⇒リポソーム(薬物)のがん組織への分布量、リポソームからの薬物放出速度・フリー薬物濃度は上記生体側因子の影響を受ける

(文献2の表3をもとに筆者が手を加え作成)

2. 血管密度と EPR 効果

Taurin らによって報告されているように³⁾、血管密度はがんの種類に大きく左右される。例えば、血管密度は腎細胞がんで高く、頭頸部扁平上皮がんや悪性黒色腫では低い。また非小細胞肺がんでは、がんのステージと腫瘍内微小血管密度と良好な相関が観察されるものの、腎細胞がんなどの他のタイプの腫瘍では、ステージと血管密度との間に相関が認められないなど、これらの相関関係を単純に一般化するのは難しい。一方、転移性腫瘍は非転移性腫瘍と比較して高い血管密度を有する傾向がある。

これまでに腫瘍内微小血管密度を調節する各種因子が明らかとなっており、中でも血管内皮増殖因子(VEGF)とチミジンホスホリラーゼ(TP)に関する知見が多い。VEGF は乳・脳・胃・大腸・肺・膀胱がんにおいて、TP は乳・胃・大腸・肺・膀胱がんにおいて、それぞれ腫瘍内微小血管密度との正の相関が報告されている。TP と腫瘍内微小血管密度との相関は VEGF と比べると弱い、他の血管新生促進因子と組み合わせた場合に相乗的な相関を示すことが多く、相補的な機能を担っているものと考えられている。

EPR 効果が、ナノ DDS 製剤の腫瘍内微小血管からの漏出性と腫瘍間質での滞留性に大きく依存していることを考慮すれば、腫瘍組織内の血管密度(血管径などの血管特性を含む)が EPR 効果に影響を与える因子の1つであることは容易に想像できる。しかしながら、筆者らのグループにおける以前の検討において、PEG 修飾リポソームの腫瘍組織への移行性に、腫瘍組織内の血管密度が影響を及ぼす可能性を示唆する結果を得た一方で、それ単独では結果を説明不可能であり、血管透過性など他の因子も複合的に影響を与えていることが示唆された。したがって腫瘍組織内の血管密度のみで EPR 効果の大きさを類推するのは少々短絡的といえるのかもしれない⁴⁾が、重要な1因子であることは間違いない。

3. 血管透過性と EPR 効果

EPR 効果発現において、上述した血管密度に加

え、腫瘍内微小血管透過性も極めて重要な因子の1つであることはいうまでもない。腫瘍組織内における血管透過性は、がんの種類、組織内における血管位置(中心部 or 周辺部)、腫瘍組織内の微小環境によって大きく異なることが知られているものの、血管透過性調節因子として最も重要なものは腫瘍細胞による VEGF の分泌である。由来の異なる各種ヒトがん細胞における VEGF アイソフォームならびに各種 VEGF 受容体の発現には多様性が認められるため³⁾、ナノ DDS 製剤を設計する際には、標的腫瘍組織における微小血管密度、がん細胞から分泌される VEGF などの血管透過性因子の分泌などの特性をあらかじめ把握し、それらの情報を考慮に入れることが必要になると考えられる。

一方、腭がんやスキルス胃がんといった、いわゆる難治性の固形がんでは、腫瘍組織内の血管密度が乏しいことに加え、一般的な他の固形がんと比べて構造的に安定で、かつ透過性が低い血管を有するために、DOXIL[®] などのナノ DDS 製剤を投与しても、EPR 効果に基づいた腫瘍組織への移行が起こりにくく、十分な治療効果を得ることが困難であることが知られている。これまでに難治性固形がんの腫瘍組織内血管の透過性亢進を目指し、さまざまなアプローチが試みられてきた。中でも代表的ものは、ハイパーサーミアとサブスタンス P の利用である^{5,6)}。これら以外にも、ある種の増殖因子阻害剤の前投与により腫瘍組織内血管の透過性が一時的に亢進されたとの報告があるものの、血管透過性亢進に用いる化合物の正常組織への影響を考えると、本アプローチには安全性の観点から課題が残る。前述したとおり、EPR 効果を利用したナノ DDS 製剤の腫瘍組織へのデリバリーにおいて血管密度と血管透過性は重要な因子となる。血管密度を能動的に増加させることは極めてハードルが高いため、今後、乏しい血管透過性の一時的、かつ安全な亢進手法の確立が待たれるところである。

4. がん細胞の抗がん剤に対する感受性と EPR 効果

抗がん剤を用いたがん化学療法において、用いる抗がん剤に対するがん細胞の感受性は、いうまでも

なく治療成績に多大な影響を与える重要な因子となる。すなわち、抗がん剤に対するがん細胞の感受性が乏しければ、どれだけ EPR 効果を利用して抗がん剤の腫瘍組織への送達効率を改善したとしても、依然として治療成績は低いものとなる。

近年、抗がん剤開発の進展に伴い、さまざまな作用メカニズムを有する抗がん剤が臨床において用いられているが、固形がん代表される一部のがんに対しては、必ずしも優れた治療効果が認められていないのが現状である。それには多くの要因が考えられるが、その1つとして、がん細胞の耐性獲得があげられる。一般に、抗がん剤は重篤な副作用の軽減のために、低用量で長期にわたり使用されるが、その一方で多くの場合、初回投与時には抗がん剤に対して高い感受性を示すがん細胞が、抗がん剤の継続的な投与によりその抗がん剤に対する耐性を獲得し、薬物の有効性が徐々に低下することが知られている。この抗がん剤の長期的な曝露によるがん細胞の耐性化が、現在、臨床でのがん化学療法における重大な問題と考えられている。耐性化獲得メカニズムとしては、さまざまな可能性が提唱されており、実際には複数のメカニズムが同時に関与していると考えられているが、薬物排出トランスポーターである P-糖タンパク質(P-gp)のがん細胞上での発現誘導が、がん化学療法における耐性獲得に関与する主要な因子として考えられている。

P-gp は非常に広範囲な基質認識性を示すため、多くの抗がん剤に対する耐性をがん細胞に付与することが知られている。この P-gp の発現誘導により耐性化したがん細胞の耐性克服を目的として、現在は P-gp 阻害剤と抗がん剤の併用が基礎および臨床研究において試みられている。また、エンドサイトーシスを受けやすい抗がん剤内封ナノ DDS 製剤は、抗がん剤がナノ粒子に封入された状態でエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるため、P-gp による抗がん剤の細胞外への排出を受け難く、P-gp により耐性化したがん細胞に対しても有効性を発揮するという報告もなされている。さらに、前述の方法とは根本的に異なる方法として、RNA 干渉を利用した siRNA により P-gp をコードする MDR1 遺伝子の発現そのものを抑制することで、耐性の克服

を目指す核酸医薬についても研究が進められている。このように抗がん剤耐性の克服を目的として、現在さまざまなアプローチが試みられているが、臨床成績は依然かんばしくないのが現状である。

以前、筆者らのグループにおいて、P-gp 高発現がん細胞(ドキシソルビシンの IC_{50} 値は感受性株の約 30 倍)を作製し、この耐性株を用いて作製した固形がんモデルマウスに対するドキシソルビシン内封 PEG 修飾リポソーム製剤の抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro* 実験における結果とは異なり、感受性株、耐性株において同程度の高い抗腫瘍効果が認められた。本結果の背後に存在する機構について種々解析した結果、がん細胞から P-gp により細胞外に排出されたドキシソルビシンが腫瘍組織内血管内皮細胞に対して作用し、血管新生が阻害された結果、腫瘍増殖の抑制につながったものと考えられた⁷⁾。P-gp の別の基質であるパクリタキセルを用いた場合にもほぼ同じ結果が得られた⁸⁾ことから、これらの結果は、耐性克服を目的としたがん化学療法における、抗がん剤内封ナノ DDS 製剤の新たな有用性を示唆するとともに、がん治療における標的細胞として腫瘍組織内血管内皮細胞を選択することの合理性を示すものであると考えられ、大変興味深い。

5. がん組織内におけるがん細胞の不均一性と EPR 効果

がんは正常細胞の増殖プログラムに異常が生じたために発生する「細胞の病」であることはよく知られている。しかし、がんの本質は発生あるいは進展の過程でその姿をかえていくことであり、ある程度の大きさに至った腫瘍塊は、すでに異なった性質を有する細胞の集合体と化している。こうしたがん細胞の不均一性はその治療を困難にしている障壁となっている。腫瘍組織を構成するがん細胞の遺伝子型、表現型としての多様性に加え、本稿と関連した事項としては、腫瘍組織内部では間質内圧の上昇に伴い血流が滞るため、ナノ DDS 製剤の腫瘍組織深部への送達性は周辺部と比べて乏しいことがあげられる。

固形がんの腫瘍組織内では、異常な血管新生が引

き起こされる。がん細胞はその増殖に必要な酸素、栄養分を得るために、がん細胞自身が VEGF などの血管新生促進因子を過剰に分泌し、新生血管を誘発する。また腫瘍の増殖段階においては、正常な血管新生とは異なり、促進因子の過剰分泌のみが認められ、抑制因子の分泌を伴わないため、常に促進因子側にバランスが傾き、新生血管は構築され続けることになる。これにより、血管新生が亢進している腫瘍組織では、不連続で分岐の多い血管が形成され、血流を伴わないもの、血流が逆流しているものなど、さまざまな種類の血管の構築が無秩序に繰り返されている。またさらに、腫瘍組織においては血管の安定化に寄与するペリサイトの血管内皮細胞への接着が不十分で、欠落していることも多く、そのことが腫瘍内血管の高い透過性にもつながっていると考えられている。EPR 効果は腫瘍組織内血管の高い透過性を積極的に利用するものである反面、このような腫瘍組織において認められる新生血管の特徴が、通常のがん化学療法、放射線療法においては、その作用の減弱へとつながる可能性が報告されている。例えば、異常な新生血管の血流は不均一であり、一部の血管には血流が伴っていないことから、腫瘍組織内への酸素の供給が不十分となり、低酸素状態となる部分が発生する。また、このような状況下では、血流を介した腫瘍組織への抗がん剤の移行は妨げられる。さらに、腫瘍組織ではリンパ系組織が未発達であるために老廃物の除去が効率よく行われず、間質内圧が非常に高くなっていることが知られている。間質内圧の上昇は特に腫瘍組織中心部において認められ、このことは抗がん剤を腫瘍組織内の広い範囲に浸透させるには大きな障壁となっている。これら腫瘍組織の組織学的な特性は、効果の発現に酸素を必要とする光線力学療法や一部の化学療法剤の効果を減弱させることに加え、低酸素状態はがん細胞の耐性化・転移能獲得といった腫瘍組織の悪性化にも関与している。以上から、この腫瘍組織内新生血管の構造的・機能的異常を改善し、腫瘍組織内の低酸素状態および間質内圧を低減させることが、がん化学療法の効果増強につながると考えられる。

こうした背景のもと、分子標的薬である VEGF 阻害剤を適切に利用することで、腫瘍内血管の構造、

機能が改善できるという「血管正常化説」が提唱された⁹⁾。この「血管正常化説」では、固形がん組織内の血管が無秩序に構築され構造・機能的に不完全である原因を、「血管新生促進因子の過剰」かつ「抑制因子の相対的な不足」による両因子の慢性的な不均衡であると捉え、分子標的薬である VEGF 阻害剤によりこれらのバランスを適度に是正することで、腫瘍内血管の機能が改善できるとしている。筆者らのグループでは固形がんモデルマウスにおいて、難水溶性の VEGF 阻害剤を適切な剤形(O/W型エマルション)により前投与したところ、腫瘍内の血管構造・機能が一部正常な血管に近づき、その後に投与する抗がん剤の腫瘍内分布挙動、すなわち、腫瘍中心部への抗がん剤の到達性が改善され、抗腫瘍効果の増強につながることを示した¹⁰⁾。

上記のアプローチ以外にも、①アンジオテンシンⅡの投与により動脈圧を上げる、②ニトログリセリン(一酸化窒素)の腫瘍デリバリーによって腫瘍内血管を弛緩し腫瘍内血圧を下げることにより EPR 効果が向上することが数多く報告されている¹¹⁾。腫瘍内血圧は血管の収縮や弛緩のみでなく、微小血管の塞栓や細胞外マトリックスの蓄積によっても変化すると考えられる。近年、細胞外マトリックスの1つであるヒアルロン酸を分解する酵素を投与することで、腫瘍間質圧を低下させ腫瘍血管への血流を増加させるというアプローチも報告されている¹²⁾。これにより抗体の腫瘍への集積が上昇するだけでなく、NK 細胞など免疫系細胞の腫瘍へのアクセスを向上させ、結果としてより高い抗腫瘍効果が得られる¹³⁾。さらに現在上市されている細胞障害性抗がん剤のいくつかは免疫賦活化能をもっていることが報告されており¹⁴⁾、腫瘍血管を正常化するというアプローチはナノ粒子の EPR 効果を向上させるだけでなく、免疫細胞の腫瘍へのアクセスを向上させるという点でも興味深い。また、エリブリンも腫瘍血管に影響を与え、腫瘍血管再構成に伴い、その透過性を増強させる作用があることが知られている¹⁵⁾。今後、これらのアプローチが、どのような種類の固形がんに応用可能であるのかを明らかにする必要があるだろう。

6. がん細胞の増殖速度と EPR 効果・食食能

図1は、前報²⁾において「がん細胞の増殖速度」と「がん組織内(がん細胞外)の薬物濃度」との関係の説明で用いたものであるが、ここでは、がん細胞の食食能との関係の説明で再利用する。

表2はがん細胞増殖速度と EPR 効果・がん細胞食食能の関係を示している。増殖が速い細胞(例えば、卵巣がん細胞 COV434 や TOV-112D)を用いる担がんマウス実験を行う場合には、①新生血管の構造が軟弱であり血管透過性が高くなっている、②リンパ管がないなどの理由により、EPR 効果がより出やすくなっている一方で、増殖が遅い細胞(例

図1 ヒトがん細胞株をヌードマウス皮下に移植した際の腫瘍体積推移 (文献2の図1より引用)

表2 がん細胞増殖速度と EPR 効果・がん細胞食食能の関係

がん細胞増殖速度		増殖が速い細胞	増殖が遅い細胞
EPR効果		出やすい	出にくい(注)
EPR効果に影響する因子	血管透過性	高い	低い
	リンパ管	なし	あり?
	それ以外の因子(今後精査が必要)	差があったとしても、影響は小さい	
がん細胞の(非特異的な)食食能		大きい	小さい/ない
留意点		多くの担がんマウス実験はこちら	実際のヒトのがん組織はこちら?

注: DOXIL[®] はヒトでも一部の固形がん EPR 効果が確認されている

例えば、腎がん細胞 ACHN や卵巣がん細胞 EFO-21) を用いる場合には、EPR 効果がより出にくくなっていると考えられる(注: DOXIL[®] はヒトでも一部の固形がんでは EPR 効果は確認されている)¹⁶⁾。

さらにまた留意しなければならない点は、がん細胞の貪食能である。一般に、増殖が速い(細胞分裂が速い)細胞の場合には、その(非特異的な)貪食能も大きく、増殖の過程で(DDS を含む)細胞周囲の物質をどんどん貪食していくことになる。1980～1990 年代に研究が盛んであった高分子化医薬のほとんどの殺細胞メカニズムは、①高分子化医薬の(コンジュゲートのまま)がん細胞内への取り込みと、それに続く②がん細胞内でのスパーサーの切断と抗がん剤の放出であった。しかしながら、実際のヒト臨床試験ではこのメカニズムが再現できず、多くの候補医薬品が開発を断念した歴史がある¹⁷⁾。なお、現在、臨床試験中の高分子化医薬はこれを改良したものであり、がん細胞外でスパーサーが切れるもの、あるいはがん細胞表面の受容体へのアクティブターゲティングを指向したものとなっている。また、2000 年前後に研究が盛んであった(がん治療を目的とした)遺伝子治療用リポソーム¹⁸⁾でも、同じような可能性が潜んでいたといえる。当時の遺伝子導入用リポソームは、プラスミド DNA と、さらにその先のがん細胞との静電的相互作用を意図してカチオニックリポソームが用いられていたが、作用メカニズムとしては、①プラスミド DNA 含有リポソームの静電的相互作用によるがん細胞表面への吸着と、それに続く②エンドサイトーシス(貪食作用)によるがん細胞内への取り込みと、さらなる③遺伝子の核内への移行と遺伝子発現が考えられていた。ある種の処方では *in vitro* 実験において良好な結果が得られ、担がんモデルマウスを用いた *in vivo* 実験においても延命効果が得られていた。当時はウイルスを用いた遺伝子治療の研究が(不幸な事件が重なったために)世界的に自粛されたり、社内事情もあつたりで、この遺伝子治療用リポソームがヒト臨床試験に進むことはなかったが、ここにおいても、担がんモデルマウス実験の危険性を垣間見ることができる。増殖が速い細胞の実験系だから期待する効果が得られたのであり、細胞増殖速度がずっと遅い

実際のヒト臨床ではどうだったのであろうか? との疑問にぶち当たる。(筆者注: 近年、siRNA 治療薬で開発されている次世代型のカチオニックリポソームは、増殖がほとんどない細胞系でも良好な核酸の細胞内導入が起きていることを付記しておく。)

以上、この項では、がん細胞の増殖速度と EPR 効果・がん細胞増殖能の関係について記した。我々は DDS の処方スクリーニングに、効率などを考えて否応なしにがん細胞増殖速度の速い実験系を用いているが、そこに潜んでいる落とし穴に留意する必要があるといえる。そうでないと、マウス実験系では効いたのに、実際のヒト臨床では効かなかったという事態になりかねない。

7. 薬効評価方法の問題と EPR 効果

臨床において EPR 効果がないのではないかという議論の根底には、前臨床試験と臨床試験における薬効の違いがあるのではないだろうか。臨床試験における Phase 2 および Phase 3 試験では、特定のがん種における生存期間・奏効率の評価が既存治療法との比較を目的として行われるが、非臨床の薬理試験においては、動物愛護の観点から生存期間に関する試験は実施することが難しく、抗腫瘍効果は腫瘍体積の変化率で評価することが主である。エンドポイントが違うため臨床での EPR 効果の有無を非臨床の結果と比較することは難しい。また、非臨床モデルにおける腫瘍体積の変化率が臨床の生存期間と相関するかという課題も残されている。臨床、非臨床に関わらず腫瘍内には増殖が盛ながん細胞、細胞周期 G₀ 期で眠ったがん細胞、ネクローシスしたがん細胞などさまざまな状態のがん細胞が存在する。前報²⁾でも記したように、臨床のがんと非臨床のがんでは腫瘍増殖速度が大きく異なることが明らかであり、これをもとに推察すると臨床のがんでは増殖が盛ながん細胞の比率が少なく、非臨床のがんモデルでは増殖が盛ながん細胞の比率が高いのではないかと推察される。抗がん剤の DDS 製剤を開発する際に選択する化合物は細胞障害性のものが多く、このタイプの抗がん剤が効果を発揮するのは増殖が速いがん細胞であることを考えると、非臨床

のがんモデルでは抗がん剤の効果が実際の臨床よりも強く表れやすいということが考えられる。これが非臨床で EPR 効果が強く、臨床で EPR 効果が弱いといわれることの要因ではないかと考えられる。

8. がん細胞外の pH と EPR 効果

前報²⁾で記したように、腫瘍組織内ではがん細胞の嫌気性解糖系の亢進による乳酸産生の結果、腫瘍内(細胞外)pH は弱酸性側に傾いており、リポソームからの薬物放出速度に影響を及ぼす一因である。細胞内 pH は、がん細胞と正常細胞でほぼ差がなく¹⁹⁾、pH 7.2 程度に保たれている。つまり腫瘍組織中では細胞外が低 pH となる pH 勾配が細胞膜を隔ててつくられていることになり、抗がん剤の薬理効果に影響を及ぼす可能性が示唆される。例えば pK_a 8.2 の塩基性化合物であるドキソルビシンは、腫瘍組織中の pH が低い状態では細胞外でイオン化しやすい状態となり、細胞内への分布が抑制されると考えられる。実際に、ドキソルビシンの抗腫瘍効果を検討した試験で、ドキソルビシンを投与する際にグルコースを投与して細胞外 pH を低下させるとドキソルビシンの抗腫瘍効果が減弱するという報告がある²⁰⁾。腫瘍組織中の pH はリポソームからの薬物放出に影響を及ぼすだけでなく、リポソームから放出された後の薬物の細胞内への分布にも関係しており、リポソーム化のメリットが得られやすい腫瘍モデルとそうでないモデルが存在する要因の1つと考えられる。EPR 効果は本来薬物動態的な概念であるが、一般的には抗腫瘍効果をもとに議論されることが多く、非臨床でリポソーム化のメリットが高いモデルでの薬理効果と臨床の治療成績を比較することから EPR 効果に対する誤解が生じるものと考えられる。腫瘍内(細胞外)pH および細胞内 pH は、個々の腫瘍にて微妙に異なり、また、同一腫瘍内においても部位により不均一であることから、概念的には理解されて研究されているものの、実際の臨床においては患者を層別化可能なバイオマーカー、または検査法が必要となることを忘れてはならないだろう。絶えず個々の患者のがんの状態を考慮することが日々の研究で重要である。

9. 血中滞留性の向上と EPR 効果

リポソーム製剤の血中滞留性を向上させれば EPR 効果の増強につながり、逆に血中からの消失が速いと EPR 効果が減弱することは容易に想像できる。リポソームの血中滞留性に関わる因子として、以下の免疫反応が重要となってくる。

9-1. クッパー細胞の影響

PEG 修飾リポソームは、非修飾リポソームと比較すると有意に細網内皮系(reticuloendothelial system: RES)組織による捕捉を回避するが、それでもある程度は肝臓や脾臓に集積する。この PEG 修飾リポソームに封入した抗がん剤は、肝臓の常在マクロファージであるクッパー細胞を傷害することが明らかになっている²¹⁾。図2には、ドキソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム(L-DOX)を BALB/c 健常マウスに投与した後のクッパー細胞数の変化を示す。L-DOX(ドキソルビシン量で 5 mg/kg)を単回静脈内投与したところ、クッパー細胞の数は有意に減少した。

L-DOX 投与によってクッパー細胞数が減少しているときに、さらに次のリポソームを投与した際の体内分布を図3に示す。ここでは、マウス Meth A 肉腫細胞を移植した BALB/c マウスに L-DOX(ドキソルビシン量で 5 mg/kg)を静脈内投与し、その3日後に³H 標識した空の PEG 修飾リポソームを静脈内投与してその体内分布を調べた。コントロー

図2 ドキソルビシン封入 PEG 修飾リポソームをマウスに静脈内投与したときの肝クッパー細胞数の減少

白色：コントロール、黒色：ドキソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=5$ 。(文献21の図5より引用)

図3 ドキソルビシン封入PEG修飾リポソームを前投与した担がんマウスに³H標識PEG修飾リポソームを静脈内投与したときの体内分布 (n=5)
グラフの Normal 群はがん細胞を移植していない健常マウス。

ル群の L-DOX を前投与していない担がんマウスでは、³H 標識 PEG 修飾リポソームの投与24時間後において約16%の同リポソームが血漿中に検出された。一方、健常マウスに³H 標識 PEG 修飾リポソームを投与した場合には、約25%の同リポソームが血漿中に検出された。この差の原因としては、リポソームの腫瘍への集積分が減っていることもあげられるが、加えて肝臓への集積分増によっても減っていることがデータから読み取れる。したがって、がん細胞の移植によって宿主の何らかの免疫系が賦活化され、それによってリポソームの血中滞留性が低下したことも要因として考えられる。一方、L-DOX を投与した担がんマウスでは、³H 標識 PEG 修飾リポソームの投与24時間後において約35%の同リポソームが血漿中に検出された。このときの肝臓への集積分量は、コントロールの約36%に対し、L-DOX 前投与群では約10%であり、クッパー細胞によるリポソームの貪食の差が血中滞留性の差となって現れたと考えられる。この血中滞留性の差は、³H 標識 PEG 修飾リポソームの投与48および72時間後においても同様であった。³H 標識 PEG 修飾リポソームの腫瘍への集積分量は、投与後の時間経過とともに増加し、また L-DOX 前投与によって増加した。なお、腫瘍の大きさの違いを補正するために、腫瘍の重量[g]あたりでもデータ処理を行っているが、やはり L-DOX 前投与によって有意に増加していた (data not shown)。以上の結果から、クッパー細胞

の傷害によってリポソームの血中滞留時間が延長し、EPR効果による腫瘍集積分量が増加した可能性が考えられる。L-DOX の前投与によって腫瘍内の微小環境が変化した可能性なども考えうるので、要因を断定することはできないが、内封薬剤が生体の免疫防御システムに支障をきたし、リポソームの血中滞留性と腫瘍集積分量が増加することが示された。マウスを用いた抗がん試験において、リポソーム化抗がん剤を繰り返し投与すると、EPR効果が増強される可能性が考えられる。

9-2. B細胞の影響

同じ PEG 修飾リポソームの繰り返し投与でも、2回目投与時の PEG 修飾リポソームの血中滞留性が著しく低下する accelerated blood clearance (ABC) 現象が知られており、こちらは EPR 効果による腫瘍集積分の低下につながりかねない免疫反応といえる。ABC 現象の原理や DOXIL[®] 投与時の ABC 現象については、清水ら²²⁾によって詳しく解説がなされているので、そちらを参照されたい。先に腫瘍集積分の低下につながりかねないと述べたように、ABC 現象は、リポソームの投与量や封入薬物に依存して生じたり、生じなかったりする。その1例を図4に示すが、1回目に投与した PEG 修飾リポソームが薬物を封入していない場合には ABC 現象が観察され、中にドキソルビシンが封入されている場合には ABC 現象は観察されなかった。また1回目に遊離のドキソルビシンと空のリポソームを投与した場合には、ABC 現象が観察された。したがって、この実験においてはリポソームに封入されたドキソルビシンが ABC 現象を起こす免疫反応を阻害したことが考えられる。筆者らは、ABC 現象は T 細胞非依存的な B 細胞の応答であり、PEG 修飾リポソームが thymus-independent type 2 antigen (TI-2 抗原) として認識され排除される機序で起こることを以前に報告している²³⁾。封入薬物がこの T 細胞非依存的な B 細胞の応答を阻害するような条件下であれば、ABC 現象が起こることはなく、EPR 効果によるター

図4 リポソーム内の薬剤がABC現象に及ぼす影響

初回投与のリポソームにドキソルビシンが封入されていると、2回目投与時にABC現象が誘発されない。

白色：コントロール、灰色：PEG修飾リポソーム、黒色：ドキソルビシン封入PEG修飾リポソーム、斜線：PEG修飾リポソームと遊離のドキソルビシンの混合液。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs コントロール、# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 、### $P < 0.001$ vs ドキソルビシン封入PEG修飾リポソーム、 $n=5$ 。

(文献23の図1より引用)

ゲティングが可能になる。EPR効果を評価する上ではABC現象も重要な課題といえよう。

10. アクティブターゲティングとEPR効果

「1.はじめに」の項でも記したが、タンパク質と結合した低分子化合物でもEPR効果が起こることより、近年話題の抗体薬物複合体(antibody drug conjugate: ADC)も同様の概念からEPR効果により腫瘍集積が起これと考えられる。しかしながらADCの場合は腫瘍部位における抗原の発現(ADCとの結合能)が、その薬効に大きく影響する。当然ながら抗原発現の高い腫瘍ほどEPR効果以上に抗原抗体反応により腫瘍への集積が高まり、ADCとしての薬効は強く発揮される。しかし、抗原発現の低い腫瘍に対してもEPR効果により腫瘍集積されたADCは薬効を発揮すると考えられる。事実、抗腫瘍活性が抗原タンパク質発現量と相関の低いADCの報告もある。膜タンパク質によっては、細胞外領域のみからなる可溶性レセプターとして血中に遊離されているものもあり、この場合、ADCは血中で免疫複合体形成をして排除されてしまうことが想定される。このように腫瘍および血中の抗原量は、ADCの腫瘍集積ひいては薬効に大きく影響すると考えられる。特定のリガンドでリポソームや高

分子ミセルを表面修飾したアクティブターゲティング型ナノ粒子でもADCと同様に、EPR効果と抗原特異的送達のバランスが評価を行うマウスモデルあるいは臨床のがん種によって異なると考えられ、臨床の腫瘍の状態により近いモデルを構築し、評価を行うことが重要である。

11. ヒトでEPR効果は起こるのか？

前報²⁾でも紹介したが、Petersenらによる報告²⁴⁾により、ヒトではEPR効果が存在しないのではないという議論が沸き起こった。筆者らは「EPR効果とは薬物動態的な概念であり、最終的なアウトカムである治療効果だけでその有無を議論すべきではない。また、固形がんでも、EPR効果が出やすいがん組織とそうでないがん組織もわかっている。」という立場、すなわち、ヒトで(ある種の固形がんでは)EPR効果は存在するという立場に立って本稿を執筆した。実際にリポソーム製剤では、DOXIL[®]投与後のバイオプシー検査¹⁶⁾、VesCan(¹¹¹In封入リポソーム)投与後のイメージング効果²⁵⁾、イリノテカン封入リポソーム投与後のバイオプシー検査とMRI造影剤によるイメージング効果の比較試験²⁶⁾、⁶⁴CuラベルしたMM-302(ドキソルビシン封入抗体修飾リポソーム)投与後のイメージング効果²⁷⁾において、各種のヒトがん患者でEPR効果は確認されている。もちろん、個人差などのばらつきは認められているが、原則的には、ヒトでもEPR効果は存在するといつてよいのではないだろうか。

12. おわりに

本稿では、前報²⁾に続く形で「EPR効果に影響を及ぼす因子の体系化」を目指して論述した。EPR効果が発見されて30年経過した。当時はその概念に基づいて上市されたDDS医薬品は存在しなかったが、その後、いくつかのDDS医薬品がヒト臨床試験に入り、あるいは上市されて、EPR効果における動物とヒトの種差の問題を解明する糸口が見つかりだしている状況でもある。ある種の固形がんでは間違いなくヒトでもEPR効果は成立するというの

が我々筆者の立場であるが、このEPR効果はさまざまな因子の複雑なからみあいによって成り立っていることを理解することが重要であろう。本稿が効率的なDDS医薬品開発に役立つことを望んでいるが、ご批判やご意見も大歓迎である。皆で協力して体系化に近づくことができれば、この上ない喜びである。

文献

- 1) Matsumura Y., *et al.*, *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986)
- 2) 兵頭健治, *et al.*, *Drug Delivery System*, **32**, 402-410 (2017)
- 3) Taurin S., *et al.*, *J. Control. Release*, **164**, 265-275 (2012)
- 4) Ogawara K., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **359**, 234-240 (2008)
- 5) Kirui D.K., *et al.*, *Nanomedicine*, **10**, 1487-1496 (2014)
- 6) Rosenecker J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7236-7241 (1996)
- 7) Ogawara K., *et al.*, *J. Control. Release*, **133**, 4-10 (2009)
- 8) Yoshizawa Y., *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **62**, 274-280 (2014)
- 9) Jain R.K., *Sci. Am.*, **298**, 56-63 (2008)
- 10) Yoshizawa Y., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **9**, 3486-3494 (2012)
- 11) Maeda H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **91**, 3-6 (2015)
- 12) Thompson C.B., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 3052-3064 (2010)
- 13) Singha N.C., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, **14**, 523-532 (2015)
- 14) Zitvogel L., *et al.*, *Immunity*, **39**, 74-88 (2013)
- 15) Funahashi Y., *et al.*, *Cancer Sci.*, **105**, 1334-1342 (2014)
- 16) Gabizon A., *et al.*, *Cancer Res.*, **54**, 987-992 (1994)
- 17) 菊池寛, *Drug Delivery System*, **29**, 51-63 (2014)
- 18) Kikuchi A., *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 947-955 (1999)
- 19) Gerweck L.E., *et al.*, *Cancer Res.*, **56**, 1194-1198 (1996)
- 20) Gerweck L.E., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 1275-1279 (2006)
- 21) Yahuafai J., *et al.*, *J. Control. Release*, **192**, 167-173 (2014)
- 22) 清水太郎, *et al.*, *Drug Delivery System*, **32**, 396-401 (2017)
- 23) Koide H., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **392**, 218-223 (2010)
- 24) Petersen G.H., *et al.*, *J. Control. Release*, **232**, 255-264 (2006)
- 25) Jensen G.M., *et al.*, *J. Liposome Res.*, **17**, 121-137 (2007)
- 26) Ramanathan R.K., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 3638-3648 (2017)
- 27) Lee H., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 4190-4202 (2017)

謝辞

今回、ヒト臨床でのEPR効果の有無に関連して、カリフォルニア大学サンフランシスコ校Francis Szoka教授から貴重な情報(文献25~27)をいただいた。この場を借りて感謝の意を表したい。