

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390406

研究課題名(和文)メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発

研究課題名(英文)Lymph node targeting by human interferon- β with hyaluronic acid based on metal coordination

研究代表者

齋藤 亮(Akira, Saito)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70507574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛を介した配位結合により、インターフェロン β とヒアルロン酸が複合体を形成する可能性がある。ラットを用いた生体内実験において複合体形成による徐放効果と考えられる結果を得ることができた。インターフェロン β 、ヒアルロン酸を混合することによりリンパ節に対する徐放効果がある。インターフェロン β をリンパ系を標的に徐放化させることにより、メラノーマの術後補助療法としてのインターフェロン β の効果をより高め、局所の再発とリンパ節転移、あるいはin transit転移を防ぐ有効な治療法となりうる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to reduce the side effects and the pain caused by frequent injections of IFN- β for melanoma while specifically targeting the lymph nodes by taking advantage of metal coordination to bind IFN- β to hyaluronic acid. Sustained release of IFN- β by conjugation with HA prolongs lymphatic retention. IFN- β -hyaluronic acid conjugates can be given as an adjuvant therapy post-surgery to reduce the risk of recurrence and eradicate melanoma residuals, such as micrometastases. In addition, due to the sustained release characteristics of the conjugate, weekly injections for melanoma could replace conventional daily injections, thereby reducing pain as well as healthcare costs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：メラノーマ インターフェロン β ヒアルロン酸 ドラッグデリバリー リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは早期にリンパ節転移をきたしやすく、予後不良な皮膚悪性腫瘍である。進行度がステージのリンパ節転移をきたした症例では5年生存率が著しく低下することも知られている。本邦では、メラノーマ術後症例に対して、インターフェロンの局所注射を併用した化学療法が行われているが、リンパ節転移をきたした症例では5年生存率が著しく低下することが知られている。ドラッグデリバリーシステムは投与方法や形態を工夫し、物質の体内での動きをコントロールする技術・方法で、薬物の徐放化、長寿命化、吸収促進、標的へのターゲティングなどの効果がある。ヒアルロン酸は、体内の全ての組織の細胞外マトリックスに豊富に存在する高分子である。この高分子の代謝経路はリンパ系を介しており、リンパ管を経由する分子の移動が、リンパ液の運搬や腫瘍のリンパ行性転移に関与する。ヒアルロン酸は、新しい生体適合性および生分解性のポリマーとして、ドラッグデリバリー、生体組織工学等に適用されており、天然のヒアルロン酸の化学的修飾が種々工夫されてきている。その結果得られたヒアルロン酸誘導体は天然のポリマーとは有意に異なる物理化学的特性を示すが、ほとんどの誘導体は生体適合性と生分解性を保持し、ある場合には天然ヒアルロン酸の薬理学的特性も保持している。ヒアルロン酸が整形外科や整容外科の領域において既に臨床応用されていることは周知のごとくである。また、ドラッグデリバリーの担体として用いられる材料の一つであり、シスプラチンをヒアルロン酸と結合させることでリンパ系をターゲットとする薬剤の開発が行われている。

2. 研究の目的

本研究ではヒアルロン酸を使用しドラッグデリバリー技術を用いて、より有効で効率的なメラノーマの術後補助療法の開発のため、ヒアルロン酸修飾インターフェロン徐放剤の作製を試みている。

3. 研究の方法

ヒアルロン酸(分子量 200,000)を純水に溶解した。オートクレーブを用いて 105 で 6~28 時間かけて熱加水分解を行った。予備検討としてリゾチームを用いて低分子ヒアルロン酸との複合体作製を行った。複合体作製には亜鉛イオンを用いた共有結合を利用した。リゾチーム 1mg を純水 0.3ml に溶解し、10mg/ml ヒアルロン酸 1ml、10 倍濃度の Phosphate buffered saline (PBS) 0.2ml を加え 37 で 30 分間振盪した後、酢酸亜鉛 0.1ml と純水 0.4ml を添加して 37 で 30 分間振盪した。酢酸亜鉛の濃度は 0~0.25mM とした。リゾチームよりもインターフェロンに分子量、等電点ともに近いエラストラーゼを用いてインターフェロンの代わりにヒ

アルロン酸と複合体を作製する予備実験を行った。エラストラーゼ 1mg を純水 0.3ml に溶解し、10mg/ml ヒアルロン酸 1ml、10 倍濃度の PBS 0.2ml を加え 37 で 30 分間振盪した後、酢酸亜鉛 0.1ml と純水 0.4ml を添加して 37 で 30 分間振盪した。酢酸亜鉛の濃度は 0~0.5mM とした。予備検討で得られた結果を元にインターフェロンとヒアルロン酸の複合体を作製した。複合体の形成の確認はゲル浸透クロマトグラフィにより行った。インターフェロンを純水で 1.0×10^8 IU/ml となるように溶解した。インターフェロン : ヒアルロン酸、インターフェロン : 亜鉛イオンがモル比でそれぞれ 1:1, 10, 100 となるよう、インターフェロン 100 μ l にヒアルロン酸 100 μ l、酢酸亜鉛 100 μ l を加え、純水 700 μ l で希釈し、計 1ml として常温で 15 分間振盪した。

インターフェロン β -ヒアルロン酸複合体、インターフェロン単体、ヒアルロン酸単体に対しゲル浸透クロマトグラフィを行った。サンプルを 100 μ l 注入し、25、流速 0.5ml/min で測定した。インターフェロンとヒアルロン酸の複合体をラット前肢足底に皮下投与を行い、一定時間後に腋窩リンパ節を採取し(図1)ELISA法を用いてインターフェロンの定量を行い、インターフェロン単体と比較した。

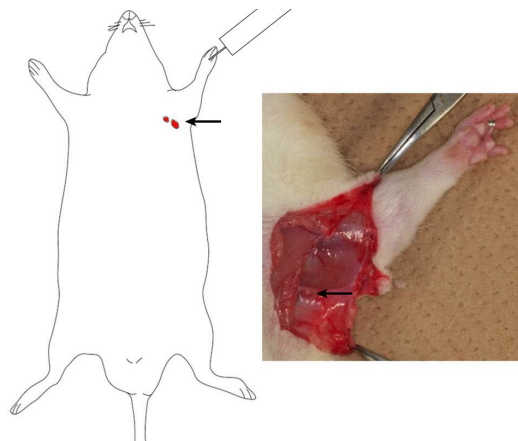


図1.ラットのリンパ節抽出

4. 研究成果

リゾチーム本来の粒子径よりも、ヒアルロン酸と混合したサンプルのほうが粒子径は大きくなり、しかも、同じ分取サンプルからヒアルロン酸が検出された(図2)。これはリゾチームとヒアルロン酸が結合することでリゾチームの見かけの粒子径が大きくなったことを意味しており、リゾチームとヒアルロン酸が複合体を形成したと考えられた。

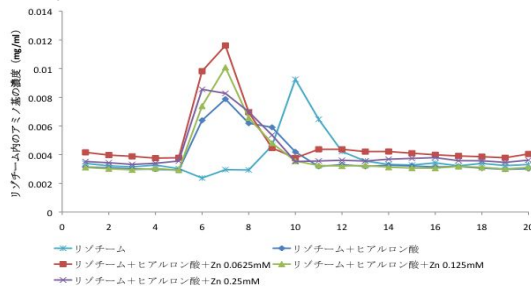


図2. リゾチーム-ヒアルロン酸複合体内のリゾチームの定量

エラスターゼはリゾチームよりも多くのアミノ基を持つにもかかわらず、TNBS法による検出が困難で、明らかな結果を得ることはできなかった。しかし、検出された濃度は低いながらも、TNBS法でリゾチームと似た傾向を示し(図3)、複合体を形成した可能性が示唆された。

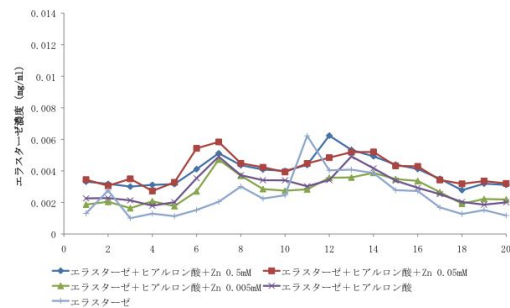


図3. エラスターゼ-ヒアルロン酸複合体内のエラスターゼの定量

ゲル浸透クロマトグラフィではインターフェロン単体で出現していたピークが複合体では消失していた(図4)。

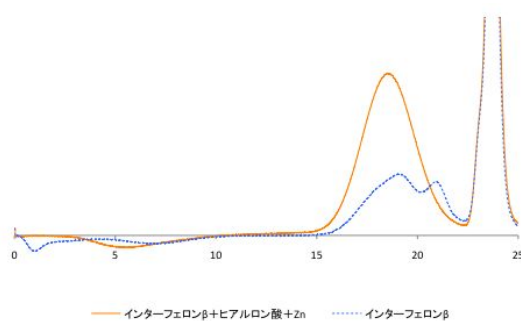


図4. インターフェロンβ-ヒアルロン酸複合体の定量

これはインターフェロンがヒアルロン酸と複合体を形成することで見かけの粒子径が増大し、インターフェロンのピークが左にシフトしたと考えることが出来た。複合体を投与したリンパ節内のインターフェロン濃度は時間が経過しても単体と比較して高い傾向を認めた(図5)。

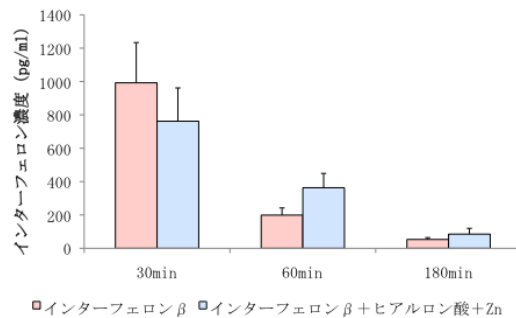


図5. インターフェロン投与後のラットリンパ節内のインターフェロン濃度

ヒアルロン酸と結合したインターフェロンが、ヒアルロン酸の分解に伴い、徐放されたことにより単体よりも高い濃度を維持したと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 7件)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発, 第87回北海道東北形成外科学会北海道地方会, 2014年2月8日, 北海道大学医学部フラテホール(札幌)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, メラノーマ治療成績向上を目指して~ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発, 第27回 北大形成外科アカデミー, 2013年12月14日, 京王プラザホテル(札幌)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, メラノーマ治療成績向上を目指して~ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発 第2報, 第22回日本形成外科基礎学術集会, 2013年11月7-8日朱鷺メッセ(新潟市)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発 第1報, 第85回日本形成外科学会北海道地方会, 2013年2月16日, 札幌医科大学記念ホール(札幌市)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之,

林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発, 第 25 回 北大形成外科アカデミー, 2012 年 12 月 8 日, 京王プラザホテル (札幌)

山尾 健, 古川洋志, 齋藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発 第 1 報, 第 21 回日本形成外科基礎学術集会, 2012 年 10 月 4-5 日, リステル猪苗代 (猪苗代町)

山尾 健, 古川洋志, 齋藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平, メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン 徐放剤の開発, 第 23 回 北大形成外科アカデミー, 2011 年 12 月 10 日, 京王プラザホテル (札幌)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 亮 (SAITO, Akira)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号: 70507574

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70271674

(3) 研究分担者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 00399924

(4) 研究分担者

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 70374486

(5) 研究分担者

舟山 恵美 (FUNAYAMA, Emi)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10533630

(6) 研究分担者

林 利彦 (HAYASHI, Toshihiko)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 00432146

(7) 連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 50211371