

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659590

研究課題名(和文) アクティブターゲティングリポソームを用いたマイクロRNAの抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Anti tumor effect of micro RNA transferred by active targeting liposomes

研究代表者

二宮 善文(NINOMIYA, Yoshifumi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70126241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌、悪性胸膜中皮腫は治療抵抗性の疾患で、特に転移を認め手術不能の場合の予後改善のために、効果的な新規治療法の確立は急務である。

申請者らは、本疾患を抑制するマイクロRNA(miRNA)を発見しており、本研究では腫瘍細胞に選択的に集積する標的化リポソーム(lip)の確立を目指した。まず細胞やマウス腫瘍モデルでlip集積の、次にmiRNA内包での抗腫瘍効果の評価を計画した。

当初十分なlip集積が細胞・マウス共に得られなかったが、lip及び投与条件・モデル作成法の改善により集積は向上した。ただし本過程に研究期間の多くを費やしたので、細胞内へのlip取り込み評価とmiRNA内包は今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer and malignant pleural mesothelioma are refractory disease. Particularly, establishment of new effective therapies are urgent business to improve prognosis of inoperable tumor with the metastasis.

We have discovered microRNA (miRNA) which works inhibitory to these diseases and aimed at the establishment of active targeting liposome (lip) to accumulate to tumor cells selectively. In this study, we planned to evaluate the accumulation of the lip for the cultured tumor cells and the mouse subcutaneous tumor models for the first and the antitumor effect of the miRNA-lip the second.

At first, expected enough accumulation of the lip were not observed with cells and mouse models either, but we were successful for improvement of the accumulation efficiency by improving the lip, administration condition, and model construction methods in detail. However we spent most of the period by these processes, evaluation of the lip taking into cells and developing miRNA-lip are future problems.

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科 発現制御 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

肺癌、悪性胸膜中皮腫（以下、中皮腫）はいずれも治療抵抗性の疾患である。特に、両疾患とも発見時には血行性転移、リンパ行性転移などを認める進行癌で手術不能である場合が多く、化学療法が治療の主体となる。現在の化学療法による治療では、劇的な予後改善効果は得られていない。そのため、新しい効果的な治療法の確立は研究者の急務である。

2. 研究の目的

申請者らは、両疾患の治療応用分子として腫瘍抑制性のマイクロRNA(以下, miRNA)を発見しており、胸部悪性腫瘍細胞に選択的に集積するアクティブターゲティングリポソームの確立を目指す。本研究では、まず培養細胞やマウス皮下腫瘍モデルにおける蛍光・あるいは金コロイド内包リポソームの集積評価を行い、次にmiRNA内包による抗腫瘍効果評価を目指す。

3. 研究の方法

(1)悪性腫瘍指向性リポソームの作製

本研究ではアクティブターゲティング化として各悪性腫瘍に特異的な抗体（肺癌に対しては抗SLX抗体、中皮腫に対しては抗メゾテリン抗体等）を結合させる。リポソームには蛍光試薬（Cy3 など）を内包させており、培養腫瘍細胞への集積を確認することができる。使用する細胞株は、肺癌ではSLX高発現株、中皮腫ではメゾテリン高発現株、さらに表面高原の解析が進んでいる大腸癌細胞株を使用する。腫瘍細胞への優位な取り込みの確認が目標である。

特異抗体産生ハイブリドーマを培養し、Protein A カラムにより精製する。悪性腫瘍指向性リポソームを作製し、培養大腸癌、肺癌細胞、中皮腫細胞への取り込みを正常細胞（あるいは低発現細胞）と比較する。取り込み蛍光量の比較により、特異性を確認する。

(2)マウス皮下腫瘍モデルにおけるアクティブターゲティングリポソーム集積の評価

生体内での腫瘍選択的リポソーム集積能を検討するため、マウス皮下腫瘍モデルを利用する。具体的には、皮下腫瘍モデルマウスに蛍光（Cy5.5）を内包したリポソームを尾静脈注射によって投与し、in vivo イメージングで蛍光シグナルを探索することにより、生体内での腫瘍細胞へのリポソームの集積を確認する。経時的 in vivo イメージングを行うことにより、同一個体で担癌部位へのリポソームの集積経過を観察することができる。また、表面リガンド未修飾リポソーム投与との集積性の違いも比較することができる。

金コロイド内包リポソームを投与し、項目の実験データをもとに、サンプルを採取し、パラフィンブロックとする。パラフィン切片標本中の金コロイドを銀で増感し、マクロでの腫瘍および肝臓、脾臓等も含めたリポソームの集積を確認する。固定サンプルの一部を、電子顕微鏡サンプルとすれば、細胞内取り込みを最終確認することができる。

これらにより最終的に、正常臓器への集積が少なく、腫瘍細胞特異的なアクティブターゲティングリポソームによるDDSであることの確認が行える。

(3) miRNA 封入アクティブターゲティングリポソームによる抗腫瘍効果の検討

すでに肺癌、中皮腫で抗腫瘍効果が確認されている let-7, miR-34b/c を、in vivo での治療応用 miRNA 候補として検討する。(2)で用いたマウス皮下腫瘍モデルに miRNA 封入リポソームを尾静脈投与し、in vivo での抗腫瘍効果および有害事象の有無を確認する。抗腫瘍効果の検討には、腫瘍細胞のアポトーシス、細胞分裂の停止等を摘出組織で確認、また、アニマル CT を用いた腫瘍の経時変化を観察することで抗腫瘍効果を検討する。最終的に犠牲死させたマウスでの正常組織における変化、異常を検討し、安全性を検討する。

4. 研究成果

まずリポソームと実験系の準備として、アクティブターゲティング化のために必要となる抗体の確保と、リポソームを投与する in vitro および in vivo の実験系に用いる事が可能な細胞株の選別、in vivo (マウス体内)でのヒト腫瘍細胞株の抗原性の確認を行った。

我々が入手したハイブリドーマの培養上清を用いてポジティブコントロールとして使用可能な細胞株に対して免疫細胞化学法を行ったところ、ポジティブコントロールの抗体を用いた場合と同等の反応性を確認できた。

リポソーム合成には1ロット当たり最低2mgの精製抗体が必要であるので、回転培養法を用いた大量培養を行った。ここで、採取された培養上清を精製して、上清中の牛血清アルブミンを取り除き、精製抗体を得た。この過程で採取した溶液をSDS-PAGE法で泳動したところ、不純物を含まない抗体が得られていることが確認できた。

また、マウス皮下腫瘍モデルの作製と腫瘍およびその転移の可能性がある肝臓、肺、脾臓、膵臓、胃の標本作製を行い、腫瘍は皮下の原発巣のみに存在することを確認した。

次に、リポソームの集積評価実験として、2種類の蛍光内包リポソームの評価を行った。

In vitro では Cy3 内包蛍光リポソームを表面抗原の発現が確認されている細胞に添加し、暴露時間、投与濃度を変更しながら観察した。標識リポソームで一定の集積を確認できた。さらに、in vivo の実験においては上記マウスモデルへの Cy5.5 内包蛍光リポソームの投与実験を行った。投与直後、3、18、24、48、72 時間後に IVIS で非侵襲的にマウス体内での蛍光の集積を確認したところ、48 時間後に腫瘍への最も強い集積を認めた。

上記によりリポソームの一定の集積は確認できたが、より集積効率が高められるかを検討するため、表面修飾を変更したりリポソームを作成した。

この改良型リポソームを用いて in vitro および in vivo での集積実験を行った。In vitro では前回の実験結果を参考に曝露時間の延長や投与濃度の増加等の変更を行い、前回より集積度を向上させることができた。ただし顕微鏡による目視では判定精度に限界があり、より正確な判定法の開発も課題と考えられた。In vivo では腫瘍モデルの作成時に細胞担体の使用を中止し、より生理的な条件に近づけたうえでリポソーム投与を行った。前回の結果から投与直後、2、4、6、24、48 時間後と短時間に集中的に測定し、24、48 時間後に前回よりも高い集積が得られた。

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 9 件)

1. Inagaki J, Takahashi K, Ogawa H, Asano K, Faruk Hatipoglu O, Cilek MZ, Obika M, Ohtsuki T, Hofmann M, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S: ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp Cell Res*. 2014;323:263-275. (査読有)
DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.03.002.

2. Maehara A, Nishida K, Furutani M, Matsumoto E, Ohtsuka A, Ninomiya Y, Oohashi T: Light and Electron Microscopic Detection of Inflammation-Targeting Liposomes Encapsulating High-Density Colloidal Gold in Arthritic Mice. *Inflamm Res*. 2014;63:139-147. (査読有)
DOI: 10.1007/s00011-013-0682-4.

3. Demircan K, Yonezawa T, Takigawa T, Topcu V, Erdogan S, Ucar F, Armutcu F, Yigitoglu MR, Ninomiya Y, Hirohata S: ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 and aggrecanase-generated proteoglycan fragments are induced following spinal cord injury in mouse. *Neurosci Lett*. 2013; 544:25-30. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neulet.2013.02.064.

4. Momota R, Narasaki M, Komiyama T, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A: Drosophila type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 May;45(5):1003-1011. (査読有)

DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.001.

5. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ: A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*. 2013;8(2):e55578. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0055578.

6. Hirashima K, Iyama K, Baba Y, Honda Y, Sado Y, Ninomiya Y, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H: Differential expression of basement membrane type IV collagen 2 and 6 chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Surg Oncol*. 2013 Mar;107(4):402-407. (査読有)

DOI: 10.1002/jso.23225.

7. Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S: Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Sci*. 2012 Oct;103(10):1889-1897. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02381.x.

8. Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T: Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 2012 Jun 1;520(8):1721-1736. (査読有)

DOI: 10.1002/cne.23009.

9. Kanazawa T, Furumatsu T, Hachioji M, Oohashi T, Ninomiya Y, Ozaki T: Mechanical stretch enhances COL2A1 expression on chromatin by inducing SOX9 nuclear translocation in inner meniscus cells. *J Orthop Res*. 2012 Mar;30(3):468-474. (査読有)

DOI: 10.1002/jor.21528.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 大橋俊孝ら、リジンオリゴマープローブからなる関節軟骨特異的X線プローブの創出、第27回日本軟骨代謝学会、2014年2月28日～3月1日、京都

2. 木村紘爾ら、肝細胞癌におけるXV型コラーゲン発現とその臨床応用、第45回日本結合組織学会学術大会・第60回マトリックス研究会大会 合同学術大会、2013年6月28日～29日、和歌山

3. 木村紘爾ら、肝細胞癌切除標本におけるXV型コラーゲン発現の検討とその臨床応用へ対する考察、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日～13日、福岡

4. 大橋俊孝ら、Bral2はbrevicanのペリニューロナルネットの構造の形成に重要である、第35回日本神経科学大会(Neuro2012)、2012年9月18日～21日、名古屋

5. KIMURA Kouji, et al. Expressions of Type XV Collagen in Human Livers and Hepatocellular Carcinomas . 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012)、2012年8月26日～29日、京都

6. 古松毅之ら、半月板細胞における軟骨細胞様形質の検討 半月板 inner 細胞と outer 細胞の比較、第44回日本結合組織学会学術大会・第59回マトリックス研究会大会 合同学術大会、2012年6月7日～8日、東京

7. 前原亜美ら、炎症標的化金コロイド内包リポソームのリウマチ関節炎症部位への集積 電子顕微鏡観察、第44回日本結合組織学会学術大会・第59回マトリックス研究会大会 合同学術大会、2012年6月7日～8日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし。

ホームページ等

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

二宮 善文(NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70126241

(2)研究分担者

豊岡 伸一(TOYOOKA SHINICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30397880

大橋 俊孝(OOHASHI TOSHITAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 50194262

(3)連携研究者

なし。