

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289299

研究課題名(和文) 難治性疾患ナノ治療を目指した人工細胞膜の医療工学的研究

研究課題名(英文) Medical technological study of nano chemotherapy using hybrid liposomes for the refractory disease

研究代表者

上岡 龍一 (UEOKA, Ryuichi)

崇城大学・生物生命学部・客員研究員

研究者番号：70099076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ベシクル分子(リン脂質)とミセル分子からなるハイブリッドリポソーム(HL)のがん治療を含む難治性疾患に対する治療に関して以下の興味深い知見が得られた。(A) *in vitro*において、種々のがん細胞に対する顕著な増殖抑制効果が明らかになった。(B) がん細胞をターゲットとするアポトーシス誘導経路が明らかになった。(C) *in vivo*では、種々の担がんモデルマウスを用いた治療実験や体内動態試験において、腫瘍への長時間の選択的蓄積による顕著な延命効果が確認された。(D) エイズ関連リンパ腫に対する治療効果が明らかになった。HLは、疾患細胞膜をターゲットとする選択性の高い新しい化学療法剤として期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have produced hybrid liposomes(HL) which can be prepared by sonication of vesicular and micellar molecules in a buffer solution. We investigated the anticancer and anti-AIDS effects of HL and following results are obtained. (A) The remarkable inhibitory effects of HL on the growth of various tumor cells were attained *in vitro*. (B) Apoptotic induction pathway which targeted tumor cell membranes was observed. (C) Significantly chemotherapeutic effects were obtained using mice model of carcinoma after the treatment with HL *in vivo*. Long-term selective accumulation of fluorescent labeled HL into tumor was observed in pharmacokinetics test using mice model of carcinoma. (D) Therapeutic effects of treatment for the lymphoma with relation to AIDS was obtained. These findings suggest that HL should be a new type of nanomedicinal drug anti-cancer and anti-AIDS that targets refractory disease cell-membranes to trigger apoptotic cell death for various cancer cells.

研究分野：化学工学

キーワード：リポソーム 癌 エイズ 細胞膜 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

リポソームをドラッグキャリアーとして利用する手法は広く知られており、抗がん剤含有リポソームの*in vivo*での制がん作用をPapahadjopoulosらが1980年に報告した。その後、ドキシソルピシン含有リポソームが市販されるに至っているが、抗がん剤そのものの副作用に問題が残っている。

申請者は、有機溶媒を使用せず、超音波照射という簡便な水溶液調製法により、1985年に、新しいナノ粒子として、ベシクル分子とミセル分子から成るハイブリッドリポソーム (HL: 人工細胞膜) を世界に先駆けて開発した (*J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988))。HLは、ナノ素材として極めて有用であり、HLにペプチド触媒を組み込んだ人工膜酵素による不斉加水分解反応において、L体アミノ酸のみを優先的に加水分解する酵素機能の発現に成功している。さらに、天然由来のリン脂質と無毒性のミセル界面活性剤の素材および組成比を選択することで、サイズ、相転移温度、流動性などの膜物性をコントロール可能にし、直径100nm以下の均一で長期間安定なナノ医療に適した新規HLの創製を可能にした。

申請者が新規に開発した HL は、抗がん剤を含まない HL のみで (1) がん細胞膜をターゲットとしたアポトーシス誘導による細胞レベルでの増殖抑制を明らかにした (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006), *Int. J. Cancer*, **115**, 377 (2005)他、特許第2694701号)。図1にHLのがん細胞膜への蓄積を、又、図2にアポトーシス誘導経路を示す。(2) 担がんマウスの延命効果と安全性 (*Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006), *Int. J. Pharm.*, **406**, 173 (2011)他)、さらに (3) 再発悪性リンパ腫などの患者に対する臨床での延命効果は世界に先駆けたものである (*Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008))。これらの製法および特色ともに独創的で、抗がん剤なしでのリポソーム単独でのがん細胞選択的アポトーシス誘導は、国内外ともに今までに例がない。副作用の無い新しい化学療法としての可能性があり、ナノ医療の分野で先導的と考えている。また、(4) 蛍光試薬を含有させることで新しいがん診断薬となる可能性が高い (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **128**, 3251 (2002))。これら一連のがん研究は、我が国の国家戦略「がん研究の推進」に沿ったナノバイオサンエンスに根ざしたアプローチによるものであり、医療現場からの期待が高まっている。

HLは従来の副作用の大きい制がん剤とは全く異なり、アポトーシス誘導型の

安全な新しいがん化学療法として期待できる。以上のように、HLは、難治性疾患治療として医療現場および患者から強く期待されており、近い将来に必須となる重要なテーマのひとつと考える。

2. 研究の目的

HLは、それ自身でヒト培養がん細胞に対して顕著な増殖抑制効果および担がんモデル動物に対する治療効果を示し、正常動物に対しては無毒性であり副作用がないことを報告している。また、制がんメカニズムがアポトーシス誘導に起因することをすでに見出している。さらに、生命倫理委員会の承認を得た後、再発悪性リンパ腫や咽頭癌などの末期患者に対してHLを投与したところ、約1年間の治療期間中全く副作用はなく、高い安全性および延命効果が認められた。そこで本研究においては、HLによるがん治療効果に関し、(1) *in vitro*において、がん細胞膜をターゲットとしたアポトーシス誘導の制がん機構の全容を明らかにする。(2) *in vivo*において、種々の担がん (乳がんや肝がんなど) モデルマウスを用い、治療効果と安全性を検討する。(3) 正常マウスを用いて、HLの代謝系を含む体内動態を明確にする。(4) がん抑制遺伝子を含有したHLの遺伝子導入試験を行い、がん細胞および担がんマウスに対する治療効果を検討する。(5) *in vitro*および*in vivo*において、蛍光標識HLの診断薬の有用性を解析する。さらに、HLを用いる免疫学的研究として次のテーマを設定し、がん研究で得られた成果と関連させながら研究を進めていく予定である。

以上のように、がん治療に関して、細胞レベルおよび動物実験レベルでのHLの前臨床試験結果を蓄積し、がん治療が困難な患者への臨床応用を早期に実現することで社会に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

HLによるがん治療効果に関し、(1) *in vitro*において、がん細胞膜をターゲットとしたアポトーシス誘導の制がん機構の全容解明を試みた。(2) *in vivo*において、種々の担がん (乳がんや肝がんなど) モデルマウスを用い、治療効果と安全性を検討した。(3) 正常マウスを用いて、HLの代謝系を含む体内動態を検討した。(4) *in vitro*および*in vivo*において、蛍光標識HLの診断薬の有用性を解析した。さらに、(5) HIV およびその感染細胞に対す

る HL の効ウイルス効果を観測し、新しい AIDS 治療薬としての可能性を検討した。(6) 腫瘍免疫関連分子(抗原ペプチドや膜タンパク)を組み込んだ HL を創製し、がん免疫療法への応用を試みた。一方、(7) HL によるアルツハイマー原因物質 A の神経細胞への蓄積・凝集の抑制効果とメカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) 脂質分子(DMPC)とミセル分子(C₁₂(EO)₂₃)から成るハイブリッドリポソーム(HL)が、がん細胞膜に特異的に融合・蓄積してアポトーシスを誘導することを見出している。本研究では、HL の肺がん細胞に対する制がん機構を明らかにするため、細胞周期関連タンパク質の関与について *in vitro* で検討した。その結果、HL は、ヒト肺がん細胞 (A549, H460, H23) に対して、低濃度では、G₀/G₁ 期細胞周期停止 (G₀/G₁ arrest) を、高濃度ではアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、HL による G₀/G₁ arrest には、cyclin dependent kinase inhibitor (CKI)である p21 や p27 の増大等が関与することを示した。興味深いことに、HL は、A549 細胞に対して、細胞内 pAkt タンパク質量を濃度・時間依存的に有意に抑制した。これらの結果より、HL は、A549 細胞に対して、pAkt の阻害により、CKIの増大を経て G₀/G₁ arrest が誘導されることが示唆された。(Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis, 5, 1000157-1-5 (2014))

(2) 脂質分子(DMPC)およびミセル分子(C₁₂(EO)₂₃)から成るハイブリッドリポソーム(HL)のヒト前立腺がん細胞に対する増殖抑制効果を *in vitro* で検討した。その結果、HL は、前立腺がん細胞 (DU145, PC-3) に対して、顕著な増殖抑制効果を示した。さらに、HL は、DU145 および PC-3 細胞に対して、カスパーズ-3 を経由してアポトーシスを誘導を明らかにした。これらの結果から、HL は前立腺がんに対する新しいナノ治療薬としての有用性が示唆された。(SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 1, 1-4(2014))

(3) DMPC および C₁₂(EO)₂₅ からなる HL のヒトの結腸直腸癌(WiDr)細胞の増殖における *in vitro* および *in vivo* での治療効果を検討した。*in vitro* における WiDr 細胞の増殖に対して、HL-25 のアポトーシス誘導による増殖抑制効果が得られた。*in vivo* において、WiDr 細胞の肝転移モデルマウスに対する HL のアポトーシス誘導による著明な治療効果は、組織学的分析により明らかになった。*in vivo* において、WiDr 細胞の肝転移モデルマウスに対する延命効果が得られた。これらの結果から、*in vivo* での抗がん剤を含まない HL のヒトの結腸直腸がん細胞の肝転移に対する治療効果が明らかになった。(Anticancer Research, 34,

4701-4708 (2014))

(4) HL の腫瘍に対する血管新生抑制効果を検討するために、*in vitro* においては、HL の血管新生抑制メカニズムについて正常ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を用いて検討した。*in vivo* においては、ヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験を行った。HL は、HUVEC の生存に影響を与えない濃度で、管腔形成を抑制することが明らかとなった。MDA-MB-453 細胞皮下移植モデルマウスにおいて、HL 治療群では Control 群と比べて有意に腫瘍重量が小さかった。CD34 免疫染色により、腫瘍表面、腫瘍内部の両方で、CD34 陽性領域の減少が確認された。以上の結果から、MDA-MB-453 細胞皮下移植モデルマウスに対して、HL-25 は、抗腫瘍効果を持ち、血管新生を抑制することが示唆された。HL は、患者にやさしい制がん剤として期待できると考える。(Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis, 6, 1000207-1-7 (2015))

(5) 肺癌が Ceramide synthase6 (CERS6) と呼ばれるセラミド合成酵素の一種を過剰発現することで、がん転移を促進していることを見出した。C16 セラミドは、今回発見したがん転移促進を推進する一方で、アポトーシスと呼ばれる細胞死を誘発する物質として知られており、肺がんが転移のために高発現している CERS6 を分子標的とするため、C16 セラミドの代謝上流物質である L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)を主体とした HL を投与したところ、DMPC が CERS6 依存的に C16 セラミドに代謝され、細胞死を誘導した。本研究の成果は CERS6 を分子標的とする新たな治療法が可能であることを示すものである(The Journal of Clinical Investigation, 126, 254-265 (2016))

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18件)

M. Suzuki, Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, T. Takahashi et al., Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells, *J. Clin. Invest.*, 126, 254-265 (査読有) (2016).

(DOI: 10.1172/JCI79775)

Y. Komizu, M. Yukihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, Cell cycle arrest by hybrid liposomes for human lung carcinoma cells, *J. Carcinog. Mutagen.*, 5, 157-1-6(査読有) (2014).

(DOI: 10.4172/2157-2518.1000157)

H. Ichihara, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Therapeutic effects of cationic

hybrid liposomes on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis in vivo, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 498-503 (2014). (DOI: 10.1248/bpb.b13-00764)

K. Matsuda, S. Hattori, Y. Komizu, R. Kariya, R. Ueoka, S. Okada, Cepharanthine inhibited HIV-1 cell-cell transmission and cell-free infection via modification of cell membrane fluidity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (査読有) **24**, 2115-2117 (2014).

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.03.041)

H. Kitajima, Y. Komizu, H. Ichihara, K. Goto, R. Ueoka, Hybrid liposomes inhibit tumor growth and lung metastasis of murine osteosarcoma cells, *Cancer Med.*, (査読有) **2**, 267-276 (2013).

(DOI: 10.1002/cam4.67)

〔学会発表〕(計 11 件)

M. Suzuki, T. Murate, M. Kyogashima, Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Inokuchi, T. Takahashi, 「Targeting CERS6-dependent sphingolipid homeostasis in lung cancer cells」2015 年 10 月 10 日, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

【Invited Speaker】H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, 「Chemotherapy and detection of cancer using hybrid liposomes」2014 年 8 月 4 日, 9th International Forum on Multimedia and Image Processing (IFMIP) 2014 (World Automation Congress; WAC) (Hawaii, USA).

市原英明, 日野元貴, 松本陽子, 上岡龍一, 「ハイブリッドリポソームの血管新生抑制活性による乳がん治療効果」2014 年 6 月 27 日, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, TKP ガーデンシティ仙台 (宮城県仙台市).

〔図書〕(計 3 件)

上岡龍一, 「ハイブリッドリポソームの基礎と応用」揺らぎ・ダイナミクスと生体機能, Dojin Bioscience, ((株)化学同人), 368 (305-313) (2013)

R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, Y. Komizu, 「Membrane-Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Cancer Cells Leading to Apoptosis」, *Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions*, Springer, 270 (221-244) (2016)

上岡 龍一 (UEOKA, Ryuichi)
崇城大学・生物生命学部・客員研究員
研究者番号: 70099076

(2)研究分担者

松本 陽子 (MATSUMOTO, Yoko)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 00133562

松下 琢 (MATSUSHITA, Taku)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 10209538

後藤 浩一 (GOTO, Koichi)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号: 30279377

市原 英明 (ICHIHARA, Hideaki)
崇城大学・生物生命学部・准教授
研究者番号: 70369114

古水 雄志 (KOMIZU, Yuji)
崇城大学・生物生命学部・助教
研究者番号: 80735829

6. 研究組織

(1)研究代表者