

平成22年 5月28日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005～2009
課題番号：17016035
研究課題名（和文） がん増殖・転移におけるバイオイメーjingとターゲティング型DDS 開発
研究課題名（英文） Development of bioimaging method and targeted drug delivery system for inhibiting tumor proliferation and metastasis
研究代表者 橋田 充 (HASHIDA MITSURU) 京都大学・薬学研究科・教授 研究者番号：20135594

研究成果の概要（和文）：癌細胞の動態、存在状態の多様性および治療薬の癌病巣への到達性の制御の困難さのため、普遍的に適用可能な治療法は未だ確立されていない。本研究では、まず、癌増殖・転移過程の非侵襲的解析に必要な不可欠な基盤技術であるバイオイメーjingによる可視化および定量法を確立した。さらに、DDSのコンセプトに基づき、有効な癌治療薬および遺伝子医薬品の送達システムの開発および治療への応用を行った。

研究成果の概要（英文）：Anti tumor therapy, which generally applicapable for several tumors, has never established , because of the diversity of distribution and condition of tumor cells or the hurdle of targeted delivery of antitumor drugs. In this study, we established the visualization and quantitative method using bioimaging, which became the foundation for non-invasive analysis of the process or tumor proliferation and metastasis. Furthermore, based on the concept of DDS, we developed the carrier for antitumor drugs or gene medicine and apply them for antitumor therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,600,000	0	20,600,000
2006年度	19,800,000	0	19,800,000
2007年度	19,800,000	0	19,800,000
2008年度	19,800,000	0	19,800,000
2009年度	19,800,000	0	19,800,000
総計	99,800,000	0	99,800,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：DDS、癌ターゲティング、イメーjing、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

DDSのコンセプトに基づき、癌増殖・転移の各過程を標的とした治療薬の開発が進められているが、癌細胞の動態、存在状態の多様性および治療薬の癌病巣への到達性の制御の困難さのため、普遍的に適用可能な治療

法は未だ確立されていない。癌転移は、癌患者の予後を決定する最大の要因であり、癌増殖・転移過程の非侵襲的解析によるバイオイメーjingは、有効な治療薬の開発において不可欠な基盤技術であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞の増殖・転移過程のリアルタイム観察および定量を可能にする方法論を構築し、得られた情報に基づいて癌細胞の複雑な増殖・転移機構を解明する。さらに、種々の過程を抑制し得る抗癌剤、癌転移抑制剤ならびに遺伝子医薬品の病巣部へのターゲティング製剤開発を行う。

3. 研究の方法

①癌転移過程の可視化および定量

マウスメラノーマ B16-BL6 細胞株ならびにマウス大腸癌 colon 26 細胞に対し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA (pCMV-Luc) を導入することによりルシフェラーゼ安定発現細胞株 B16-BL6/Luc ならびに colon 26-Luc を作成した。作成した細胞をマウスへ投与後、分布については高感度 *in vivo* イメージング機器により撮影した。各臓器への分布は摘出した臓器をホモジナイズし、ルシフェラーゼ活性の測定により定量した。

②マンノース修飾量子ドットの合成

まず、thiomannoside を合成し、次に NH₂-PEG2000-quantum dots に結合させることにより作成した。

③カタラーゼ誘導体の合成

カタラーゼと ethylenediamine (ED) を pH 5 - 5.5 の EDAC 溶液中で混合することにより ED カタラーゼを合成した。また、カタラーゼと polyethylene glycol (PEG) を pH 9.2 の borate buffer 中で混合することにより PEG-カタラーゼを合成した。

④糖修飾リポソームの作成

cholesteryl choloroformate と N-(4-aminobutyl)carbamic acid tert-butyl ester および、thiomannoside または、thiogalactoside より Man-C4-Chol および Gal-C4-Chol を合成した。これを、DOPE、DSPE など各製剤に必要な脂質と共にクロロホルムに溶解し、最適なモル比で混合後、溶媒を減圧留去した。これを 5% デキストロース溶液に懸濁し超音波処理後、滅菌濾過し均一なリポソーム溶液を調製した。

⑤薬物およびプラスミド DNA の血中濃度測定および体内動態の評価

放射標識した薬物またはプラスミド DNA を各投与方法によりマウスへ投与し、一定時間後に採血および臓器を摘出し、放射活性を測定した。または、HPLC により検出可能な薬物については、採血または摘出した臓器より薬物を抽出することにより薬物の移行量を定量した。

⑥各種サイトカインの測定

細胞の培養液中、または血液または組織からの抽出液中のサイトカインは ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

①癌細胞の増殖・転移過程の可視化および定量的評価法の開発

樹立した癌細胞株におけるルシフェラーゼの発現は安定であり、ルシフェラーゼ活性は癌細胞数と広範囲において比例した。組織 1g 中に 400 個以上の癌細胞が含まれていれば検出可能な発現レベルの B16-BL6-Luc ならびに colon 26-Luc 細胞が得られ、これにより *in vivo* における癌細胞分布ならびに増殖を高感度かつ定量的に評価することが可能となった。*In vivo* バイオルミネッセンスイメージングシステムを用いた観察により、非侵襲的な癌転移・増殖過程の観察に成功した。次に、ManQD を合成し、癌細胞の増殖において重要な役割を果たすマクロファージのイメージングを行った。ManQD は、未修飾 QD と同程度の蛍光強度を維持し、培養マクロファージにおいてマンノースレセプターを介してマクロファージへ選択的に取り込まれた。また、ManQD による蛍光観察は 48 時間まで安定に行えることを確認した。さらに、ManQD を腹膜播種モデルマウスへ投与したところ、ManQD はマクロファージへ選択的に取り込まれ、*in vivo* イメージングにより、腹腔内での癌細胞の増殖に伴うマクロファージの増大が観察できた。

②新規血中および腹腔内滞留型および癌ターゲティング型薬物キャリアの開発および治療への応用

活性酸素消去酵素であるカタラーゼに対して生体内での安定化を実現する為、ポリエチレングリコール修飾カタラーゼ(PEG カタラーゼ)を合成した。静脈内投与後、PEG カタラーゼはカタラーゼに比べ血液中に長期間滞留することが明らかとなった。また、静脈内投与により B16-BL6-Luc 細胞を C57/BL6 雄性マウスの静脈内へ投与した肺癌転移モデルを作成し、カタラーゼ投与による転移抑制効果を評価したところ、カタラーゼ投与群に対し、PEG カタラーゼ投与群では、顕著な肺癌転移の抑制効果が認められた。次に、カタラーゼの腹腔内滞留性増大を目的にカチオン性を付与した活性酸素消去酵素カタラーゼ (ED カタラーゼ) のハイドロゲル複合体を調製し、がん細胞の腹膜播種治療を試みた。複合体を腹腔内に投与後、腹腔内カタラーゼは、14 日後も投与量の約 10% が滞留し、ED カタラーゼ単独投与の場合と比較し有意なカタラーゼ滞留性の増大が認められた。さらに、腹腔内がん細胞増殖をイメージングにより評価したところ、複合体投与による有意な増殖抑制効果が認められた。更に複合体投与により生存期間延長効果が認められた。次に、レチノイン酸誘導体を用いた新規がん分化誘導療法の開発のための基礎的検討をおこなった。レチノイン酸は脂溶性の高さから

単独では血中へ投与不可能であるため、レチノイン酸封入エマルジョンを調製したところ、平均粒子径約 175 nm で高い封入効果が認められた。更に血中滞留性増大を目的に PEG 修飾レチノイン酸封入エマルジョンを調製したところ平均粒子径はほぼ同じ 178 nm の粒子が調製できた。そこで、レチノイン酸およびレチノイン酸誘導体をエマルジョンに封入し、担癌マウスに投与したところ、腫瘍径の減少ならびに生存期間の延長が可能になった。さらに、抗癌剤などにみられる体重減少などの強い副作用は認められなかった。

特定の癌細胞指向性を有する新規薬物キャリアの開発を行った。癌細胞の表面に高発現する MUC1 に対して選択的に結合するアプタマーを、多数の官能基を有し、抗癌剤の有効なドラッグキャリアである dendriマーと結合させた。次に、アプタマー修飾 dendriマーを蛍光標識し、MUC1(+)の A549 細胞または MUC1(-)の colon26 細胞と培養したところ、A549 細胞にのみ高い取り込みが確認された。蛍光顕微鏡観察により細胞膜上の MUC1 との結合だけでなく、細胞内へ取り込まれていることも確認した。また、新規癌細胞選択的抗がん剤キャリアとして、乳癌細胞に高発現する HER2 認識抗体を修飾したリジン dendriマーを合成した。培養した HER2 高発現乳癌細胞を用いた検討により抗体修飾リジン dendriマーの選択的な取り込みを確認した。

以上、新規血中および腹腔内滞留型および癌ターゲティング型薬物キャリアの開発および治療法の開発に成功した。

③高効率な遺伝子発現を可能にする in vivo 遺伝子送達キャリアの開発および治療への応用

遺伝子発現の一つの障壁であるエンドソーム内での酵素切断を抑制可能なキャリアを開発した。ヒスチジンは、エンドソーム内でプロトンスポンジ効果によりエンドソーム膜を破壊することが知られている。そこで、遺伝子のエンドソームからの脱出促進を目的に、従来の肝細胞ターゲティング型リポソーム (ガラクトース修飾リポソーム: Gal リポソーム) にヒスチジンを導入した Gal-His リポソームを作成した。ガラクトースを認識するアジアロ糖タンパク質レセプターを高発現する HepG2 細胞を用いて検討をおこなったところ Gal リポソームと比較し Gal-His リポソームにより遺伝子の取り込み量並びに発現量の有意な増加が認められた。さらに、遺伝子医薬品送達キャリアの安全性に関する検討を行った。臨床応用に向けてカチオン性リポソームとプラスミド DNA の複合体 (リポプレックス) 投与後の免疫応答が問題とな

る。そこで、リポプレックスの投与量ならびに混合比の影響を網羅的に検討した。結果、混合比より投与量の増大により遺伝子発現量も増大するが同時に免疫応答も増大することが明らかとなった。さらに、投与量が重要な要素となり、投与量を適正に設定することにより免疫応答を抑え遺伝子発現を挙げることが可能であることが分かった。以上、遺伝子導入効率の改善およびリポプレックスによる免疫応答の基礎的な検討により、新規遺伝子導入システムの論理的設計に有用な情報を得ることができた。次に、癌細胞の腹膜播種治療を目的に、CpG オリゴの免疫担当細胞へのターゲティングを行った。免疫担当細胞指向型キャリア (Man リポソーム) を用いて CpG オリゴを静脈内並びに腹腔内へ投与後、血中並びに腹水水の IL12、IFN γ などのサイトカイン濃度が増加し、その量は未修飾カチオン性リポソームとの複合体の場合と比較し有意に高かった。さらに癌細胞の肝転移モデルマウスまたは腹膜播種モデルマウスへ CpG オリゴと Man リポソームの複合体を投与したところ未修飾カチオン性リポソームとの複合体の場合と比較し、肝臓ならびに腹腔内の有意な癌細胞数の増加抑制が認められた。また、腹膜播種モデルにおいては、生存期間の延長も認められた。

以上、高効率な遺伝子発現を可能にする in vivo 遺伝子送達キャリアの開発および治療法の開発に成功した。

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 23 件)

1. S. Zhou, S. Kawakami, F. Yamashita and M. Hashida, Intranasal administration of CpG DNA lipoplex prevents pulmonary metastasis in mice. *Cancer Letters*, 査読有, 287(1), 2010, 75-81
2. K. Hyoudou, M. Nishikawa, M. Ikemura, Y. Kobayashi, A. Mendelsohn, N. Miyazaki, Y. Tabata, F. Yamashita and M. Hashida, Prevention of pulmonary metastasis from subcutaneous tumors by binary system-based sustained delivery of catalase. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 137(2), 2009, 110-115
3. T. Okuda, S. Kawakami, Y. Higuchi, Y. Oka, T. Satoh, M. Yokoyama, F. Yamashita and M. Hashida, Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, 査読有, 373(1-2), 2009, 100-106
4. Y. Kobayashi, M. Nishikawa, K. Hyoudou,

- F. Yamashita and M. Hashida, Hydrogen peroxide-mediated nuclear KappaB activation in both liver and tumor cells during initial stages of hepatic metastasis. *Cancer Science*, 査読有, 99(8), 2008, 1546-1552
5. K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, M. Ikemura, F. Yamashita and M. Hashida, SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Clinical & Experimental Metastasis*, 査読有, 25(5), 2008, 531-536
 6. T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita and M. Hashida, Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 査読有, 357, 2008, 318-322
 7. Y. Higuchi, M. Oka, S. Kawakami and M. Hashida, Mannosylated semiconductor quantum dots for the labeling of macrophage. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 125(2), 2008, 131-136
 8. N. Chansri, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, P. Charoensit and M. Hashida, Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. *Pharmaceutical Research*, 査読有, 25(2), 2008, 428-434
 9. S. Ma, M. Nishikawa, K. Hyoudou, R. Takahashi, M. Ikemura, Y. Kobayashi, F. Yamashita and M. Hashida, Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. *Kidney International*, 査読有, 72(12), 2007, 1474-1482
 10. K. Hyoudou, M. Nishikawa, M. Ikemura, Y. Kobayashi, A. Mendelsohn, N. Miyazaki, Y. Tabata, F. Yamashita and M. Hashida, Cationized catalase-loaded hydrogel for growth inhibition of peritoneally disseminated tumor cells. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 122(2), 2007, 151-158
 11. K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, S. Mukai, M. Ikemura, Y. Kuramoto, F. Yamashita and M. Hashida, Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by cationized catalase in mice. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 119, 2007, 121-127
 12. K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Kuramoto, F. Yamashita and M. Hashida, Analysis of in vivo NF-kappaB activation during liver inflammation in mice: prevention by catalase delivery. *Molecular Pharmacology*, 査読有, 71(2), 2007, 446-453
 13. T. Okuda, S. Kawakami, N. Akimoto, T. Niidome, F. Yamashita and M. Hashida, PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 116(3), 2006, 330-336
 14. K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Kuramoto, F. Yamashita and M. Hashida, Inhibition of adhesion and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells by pegylated catalase. *Clinical & Experimental Metastasis*, 査読有, 23(5-6), 2006, 269-278
 15. S. Suzuki, S. Kawakami, N. Chansri, F. Yamashita and M. Hashida, Inhibition of pulmonary metastasis by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes in mice. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 116(1), 2006, 58-63
 16. K. Hyoudou, M. Nishikawa, Y. Kobayashi, Y. Umeyama, F. Yamashita and M. Hashida, PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radical Biology & Medicine*, 査読有, 41(9), 2006, 1449-1458
 17. T. Okuda, S. Kawakami, T. Maeie, T. Niidome, F. Yamashita and M. Hashida, Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 114(1), 2006, 69-77
 18. T. Terada, M. Iwai, S. Kawakami, F. Yamashita and M. Hashida, Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 111(3), 2006, 333-342
 19. S. Fumoto, S. Kawakami, K. Shigeta, Y. Higuchi, F. Yamashita and M. Hashida, Interaction with blood components plays a crucial role in asialoglycoprotein receptor-mediated in vivo gene transfer by galactosylated lipoplex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 査読有, 315(2), 2005, 484-493
 20. S. Kawakami, P. Opanasopit, M. Yokoyama, N. Chansri, T. Yamamoto, T. Okano, F. Yamashita and M. Hashida, Biodistribution characteristics of all-trans retinoic acid incorporated in liposomes and polymeric

- micelles following intravenous administration. Journal of Pharmaceutical Sciences, 査読有, 94(2), 2005, 2606-2615
21. M. Nishikawa, K. Hyoudou, Y. Kobayashi, Y. Umeyama, Y. Takamura and M. Hashida, Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. Journal of Controlled Release, 査読有, 109, 2005, 101-107
 22. O. Thanaketaisarn, M. Nishikawa, F. Yamashita and M. Hashida, Tissue-specific characteristics of in vivo electric gene transfer by tissue and intravenous injection of plasmid DNA. Pharmaceutical Research, 査読有, 22(6), 2005, 883-891
 23. M. Sakai, M. Nishikawa, O. Thanaketaisarn, F. Yamashita and M. Hashida, Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation. Gene Therapy, 査読有, 12(7), 2005, 607-616

[学会発表] (計9件)

1. 周 舒文, 川上 茂, 山下富義, 橋田 充, CpG DNA lipoplex 経鼻投与による肺転移・腹膜播種抑制の機構解明, 日本薬学会第 130 年会, 2010/3/28, 岡山コンベンションセンター (岡山)
2. 橋田 充, 医療薬学の Cutting Edge: 時空世界に思いを込めて, 第 19 回日本医療薬学会, 2009/10/24, 長崎ブリックホール (長崎)
3. 増田真理恵, 川上 茂, Wijagkanalan Wassana, 山下富義, 橋田 充, アミノ酸デンドリマーを用いた DNA アプタマーの生体内応用に向けたアプローチ: 癌細胞指向型アプタマー/デンドリマー結合体の開発, 第 25 回日本 DDS 学会, 2009/7/3, 東京ドームホテル(東京)
4. Pensri Charoensit, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Enhanced growth inhibition of metastatic lung tumor by intravenous injection of IL12-ATRA-lipoplexes in mice, 日本薬剤学会第 24 年会, 2009/5/21, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡)
5. 古林裕貴, 西川元也, 橋田 充, カタラーゼデリバリーによる癌の接着抑制, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008/10/28, 名古屋国際会議場 (愛知)
6. Shuwen Zhou, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Intranasally Administered CpG DNA /Cationic Liposome Complexes Prevents Lung Metastases in Mice, 第 11 回国際リポソーム研究会議, 2008/7/19, 横浜シン

ポジア (神奈川)

7. Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Mitsuru Hashida, Glycosylated liposomes for drug nucleic acids delivery, 第 11 回国際リポソーム研究会議, 2008/7/19, 横浜シンポジア (神奈川)
8. 宮野拓也, 川上 茂, 新留琢郎, 橋田 充, 抗体-アミノ酸デンドリマーコンジュゲートによる HER2 選択的細胞内デリバリー, 第 24 回日本 DDS 学会, 2008/6/29, 六本木アカデミーヒルズ (東京)
9. 川上 茂, 橋田 充: 樹状細胞選択的遺伝子送達キャリアを用いた新規 DNA ワクチン療法の開発, 第 65 回日本癌学会総会, 2006/9/29, パシフィコ横浜 (横浜)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 充 (HASHIDA MITSURU)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号: 20135594

(2) 研究分担者

山下 富義 (YAMASHITA FUMIYOSHI)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 30243041
(H20→H21: 連携研究者)

西川 元也 (NISHIKAWA MAKIYA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 40273437
(H20→H21: 連携研究者)

川上 茂 (KAWAKAMI SHIGERU)
京都大学・薬学研究科・講師
研究者番号: 20322307
(H20→H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者

なし