

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591125
 研究課題名（和文） B細胞リンパ腫のCD19抗体標識リポソームを用いたp38MAPK分子標的治療
 研究課題名（英文） Molecular targeting against p38MAPK in B-cell lymphoma using anti-CD19 antibody-labeled liposome
 研究代表者
 佐藤 勉（Sato Tsutomu）
 札幌医科大学医学部・助教
 研究者番号：40404602

研究成果の概要：本研究で我々は、抗CD19抗体標識ステルスリポソームをDrug Delivery Systemに用いて、B細胞性悪性リンパ腫細胞のp38MAPKを標的とする、新規分子標的治療の開発を行った。まずはin vitroでB細胞リンパ腫細胞株を用いた検討を行い、最終的には患者より採取したリンパ腫細胞をマウスに接種したin vivoの系でも良好な結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：①内科、②臨床、③癌

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は、リツキシマブなど画期的な分子標的薬の普及にも関わらず、未だ予後不良な血液悪性疾患のひとつである。進行例においてその初期治療は、ドキシソルビシンをキードラッグとした化学療法が中心となるが、臓器障害を有する高齢者に初発した場合など、化学療法による十分な寛解導入が困難な場合もある。高齢化や外来化学療法の普及などもあいまって、より副作用が少なく、より効果の高い薬剤が強く希求されている。このような状況を反映して新規薬剤の開発が盛んに行なわれているが、同時に既存の薬剤をリポソームで修飾する方法論にも注目が集まっている。例えばDOXILは、ドキシソルビシ

ンをポリエチレングリコール（PEG）修飾血中滞在型（ステルス）リポソームで包含した薬剤であるが、リポソーム製剤化により、血中滞在時間の延長や腫瘍への集積亢進など優れた特性を得る事に成功した。更に、PEG修飾ステルスリポソームに末端がマレイミドのPEG修飾剤を混合する事で、抗CD19抗体をDOXILに結合させ、CD19を発現するB細胞性リンパ腫細胞に対する特異性を高める試みが成功している。しかしながらこのストラテジーでは、ドキシソルビシンによる正常Bリンパ球に対する傷害は避け難く、抗体産生低下などによる免疫不全が危惧される。このような問題は、リンパ腫細胞をリンパ腫細胞たらしめる分子、すなわちリンパ腫細胞での

み活性化している分子を標的にする事によって解決されるべきと考える。

これまで申請者らは、正常Tリンパ球や未分化大細胞型リンパ腫 (ALCL) で特徴的に発現される CD26 を検討し、CD26 陰性の B 細胞性リンパ腫細胞株に CD26 を強制発現させると、p38MAPK の活性化を介してドキシソルビシン耐性が誘導される事を明らかにした (Cancer Res 2005, 65: 1973-83)。更に、CD26 を強発現する ALCL 細胞株と、レトロウイルスにより siRNA で CD26 の発現を抑制した亜株を比較する事により、CD26 が接着形質を誘導する事、この接着形質はインテグリン β 1 のリン酸化によって担われる事、そしてインテグリン β 1 のリン酸化は p38MAPK を介してシグナルされる事を明らかにした。また、CD26 の発現は ALCL 細胞株の in vivo における造腫瘍能に必須である事も明らかにした (Cancer Res 2005, 65: 6950-6)。なお、未発表データながら、p38MAPK の阻害剤 (SB203580) が ALCL 細胞株の増殖を抑制し、ドキシソルビシン耐性を解除する事も in vitro で確認している。

一方、リンパ腫患者のリンパ節を用いた検討では、ろ胞型やび慢性大細胞型などの B 細胞性リンパ腫細胞において恒常的に p38MAPK が活性化されていると報告された。このような報告から、p38MAPK を介するドキシソルビシン耐性や造腫瘍能などの誘導が、ALCL のみならず B 細胞性リンパ腫細胞にも共通する普遍的なシグナルである可能性が推測される。また、正常 B リンパ球で p38MAPK は活性化していない事が確認されており、p38MAPK 阻害剤がリンパ腫細胞に特異的な治療薬となる可能性も推測される。これまで、p38MAPK 阻害剤は全身的な副作用の懸念から悪性リンパ腫の治療薬として試みられた事はないが、前述した抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソームの方法論をデリバリーシステムとして導入する事により、二重の安全弁が施されるものと推測する。すなわち、抗 CD19 抗体による CD19 陽性細胞へのターゲティングと、活性化 p38MAPK を標的にする事による正常 B リンパ球の除外である。なお、CD20 も有望な標的と思われるが、CD19 とは異なり CD20 は internalize されない事、また CD20 を標的にした場合リツキシマブの併用が妨げられる事などから、標的には CD19 が妥当と考えている。

2. 研究の目的

(1) p38MAPK 阻害剤 SB203580 の抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム化
p38MAPK の抑制には、代表的な特異的阻害剤である SB203580 を用いる。これの CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム化には、ドキシソルビシンを対象とした既報に従う。すな

わち、Hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) と Cholesterol (CHOL)、methoxy poly(ethylene glycol) (Mr2000) covalently linked to distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE)、Maleimide derivatized PEG-DSPE (Mal-PEG-DSPE) を 2:1:0.08:0.02 で混合し、まずは PEG 修飾ステルスリポソームを脂質溶解法で調整する。SB203580 は凍結乾燥法で PEG 修飾ステルスリポソームへ導入する。また、抗 CD19 抗体へは Traut's 試薬を用いて SH 基を付加し、抗体の SH 基と SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム表面の Maleimide と結合させる。また、マウス IgG 抗体を同様の手順で SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソームと結合させ、これをコントロールに用いる。

(2) SB203580 包含抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム (以下、p38-SIL と省略) の効果 (in vitro)

対象には、CD19 を高発現する B 細胞リンパ腫細胞株 Namalwa を用いる。同細胞を p38-SIL と反応させ、これによって p38MAPK の活性化が抑制されるか、抗リン酸化型 p38 抗体を用いたウェスタンブロットで検討する。同時に、細胞の増殖能低下やドキシソルビシン感受性亢進につき検討する。更に、患者検体を用いた検討を行なう。当科では、悪性リンパ腫患者のリンパ節を生検した際、患者同意を得てその一部を細切し、浮遊したリンパ腫細胞を凍結保存している。その内訳はろ胞型 10 例、び慢性大細胞型 12 例であるが、これらを用いて p38-SIL がドキシソルビシン感受性へ及ぼす影響を検討する。また、正常健康人末梢血から B リンパ球を回収し、これに対して p38-SIL が細胞傷害性などを惹起しない事を明らかにする。

(3) p38-SIL の効果 (in vivo)

前述の Namalwa 細胞は SCID マウスに移植可能である事が確認されており、これを in vivo 実験に用いる。SCID マウスの皮下に Namalwa 細胞を移植し、尾静脈から各種濃度の p38-SIL を投与する。まずは p38-SIL 単独による腫瘍増殖抑制効果を検討する。次に、ドキシソルビシンを併用して、p38-SIL によるドキシソルビシン感受性の亢進を検討する。更に、前述した患者リンパ腫細胞を SCID マウスに皮下移植する。その際には抗アシアロ GM1 抗体でマウスを前処置する。リンパ腫細胞が生着したら、p38-SIL 単独もしくはドキシソルビシン併用で治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) p38MAPK 阻害剤 SB203580 の抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム化
p38MAPK の抑制には、代表的な特異的阻害剤である SB203580 を用いる。これの CD19 抗体

標識 PEG 修飾ステルスリポソーム化には、ドキシソルビシンを対象とした既報に従う。すなわち、Hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) と Cholesterol (CHOL)、methoxy poly(ethylene glycol) (Mr2000) covalently linked to distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE)、Maleimide derivatized PEG-DSPE (Mal-PEG-DSPE) を 2:1:0.08:0.02 でクロホルムに溶解した後、窒素バブリングで乾燥させる (脂質溶解法)。これを HEPES-buffered saline で溶解し、リボナイザーを用いてポリカーボネートフィルターを通過させ、リポソーム粒子径の均一化を図る (extrusion 法)。更にこれを凍結乾燥し、SB203580 水溶液を添加する事で、PEG 修飾ステルスリポソームによる SB203580 の包含を誘導する (凍結乾燥法)。また、抗 CD19 抗体へは Traut's 試薬を用いて SH 基を付加する。反応後は Sephadex G-50 を用いて Traut's 試薬を除く。SH 基が付加された抗 CD19 抗体と SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソームを混合し、抗体の SH 基と SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム表面の Maleimide の結合を誘導する。SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソームと結合しなかった SH 基付加抗 CD19 抗体は、CL-4B column で除去する。また、マウス IgG 抗体を同様の手順で SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソームと結合させ、これをコントロールに用いる (Control-SIL)。同時に、抗 CD19 抗体非標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソーム、抗 CD19 抗体非標識 SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソームなども調整し、これらもコントロールとして用いる。

(2) SB203580 包含抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム (以下、p38-SIL と省略) の効果 (in vitro)

対象には、CD19 を高発現する B 細胞リンパ腫細胞株 Namalwa を用いる。5×10⁶ 個の Namalwa 細胞に p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的にこれを回収する。p38-SIL の投与量については、あらかじめ SB203580 を単独で Namalwa 細胞に添加し、その細胞傷害性を参考にして設定する。また、SB203580、抗 CD19 抗体、PEG 修飾ステルスリポソーム、SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソームなどもコントロールとして添加する。回収した細胞は可溶化し、抗リン酸化型 p38 抗体を用いたウエスタンブロット法を行なう。これによって p38-SIL の p38MAPK に対する抑制効果を確認する。次に Namalwa 細胞を対象として、p38-SIL の増殖抑制効果を検討する。1×10⁴ 個の

Namalwa 細胞に p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的に細胞数を定量する。細胞数の定量化は MTT

(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 法で行なう。p38-SIL の投与量は、上述した検討の結果を参考に決定する。また、p38-SIL がドキシソルビシン感受性を亢進させるか検討する。すなわち、1×10⁴ 個の Namalwa 細胞にドキシソルビシンおよび p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的に細胞数を定量する。細胞数の定量化は MTT 法で行なう。なおドキシソルビシンについては、あらかじめこれを単独で添加し、至適濃度を決定しておく。

更に、悪性リンパ腫患者のリンパ節から回収したリンパ腫細胞を対象として、p38-SIL とドキシソルビシンの併用効果を検討する。当科では、悪性リンパ腫患者のリンパ節を生検した際、患者同意を得てその一部を細切し、浮遊したリンパ腫細胞を凍結保存している。その内訳はろ胞型 10 例、びまん性大細胞型 12 例である。1×10⁴ 個の患者リンパ腫細胞にドキシソルビシンおよび p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的に細胞数を定量する。細胞数の定量化は MTT 法で行なう。ドキシソルビシンや p38-SIL の投与量は、Namalwa 細胞を対象とした検討を参考にして決定する。また、正常健常人末梢血から CD20 陽性 B リンパ球をマイクロビーズ法で回収し、これに対し p38-SIL が細胞傷害性などを惹起しない事を明らかにする。

(3) p38-SIL の効果 (in vivo)

前述の Namalwa 細胞は Severe Combined Immunodeficiency (SCID) マウスに移植可能である事が確認されており、これを in vivo 実験に用いる。1×10⁶ 個の Namalwa 細胞を 1 ml の細胞培養用培地 RPMI1640 に懸濁してツベルクリン用の 1 ml シリンジに充填、これを SCID マウスの背部皮下へ注入する。腫瘍が形成され直径が 6 mm に達した時点で、尾静脈より各種濃度の p38-SIL もしくは Control-SIL を投与する。p38-SIL の投与量については、あらかじめ SB203580 を単独で SCID マウスに投与し、その毒性を参考にして設定する。その後、p38-SIL 投与群と Control-SIL 投与群の腫瘍系を経時的に比較して、p38-SIL の腫瘍増殖に対する抑制効果を検討する。その際には、SB203580 投与群、抗 CD19 抗体投与群、PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群などもコントロールとして検討する。次に、Namalwa 細胞を対象として p38-SIL がドキシソルビシン感受性を亢進させるか検討する。Namalwa 細胞を上述したとおりに SCID マウスの皮下へ移植し、腫瘍系が 6 mm に達

した時点で治療を開始する。ドキシソルピシンについては、あらかじめこれを単独で投与し、指摘投与量を決定しておく。Namalwa 細胞を移植した SCID マウスに、この量のドキシソルピシンを尾静脈から投与する。更に、各種濃度の p38-SIL もしくは Control-SIL を尾静脈より投与する。その後、p38-SIL 投与群と Control-SIL 投与群の腫瘍系を経時的に比較する。

更に、悪性リンパ腫患者のリンパ節から回収したリンパ腫細胞を対象として、p38-SIL とドキシソルピシンの併用効果を検討する。リンパ節からリンパ腫細胞を回収する手順は前述のとおりである。1×10⁶ 個の患者リンパ腫細胞を 1 ml の細胞培養用培地 RPMI1640 に懸濁してツベルクリン用の 1 ml シリンジに充填、これを SCID マウスの背部皮下へ注入する。なお、SCID マウスには、あらかじめ抗アジアロ GM1 抗体を腹腔内投与しておく。腫瘍が形成され直径が 6 mm に達した時点で、ドキシソルピシンおよび各種濃度の p38-SIL もしくは Control-SIL を尾静脈から投与する。ドキシソルピシンや p38-SIL の投与量は、Namalwa 細胞を対象とした検討を参考にして決定する。その後、p38-SIL 投与群と Control-SIL 投与群の腫瘍系を経時的に比較する。

4. 研究成果

(1) p38MAPK の抑制には、代表的な特異的阻害剤である SB203580 を用いた。SB203580 包含抗 CD19 抗体標識 PEG 修飾ステルスリポソーム (以下、p38-SIL と省略) を調整し、対象には CD19 を高発現する B 細胞リンパ腫細胞株 Namalwa を用いた。5×10⁶ 個の Namalwa 細胞に p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的にこれを回収した。p38-SIL の投与量については、あらかじめ SB203580 を単独で Namalwa 細胞に添加し、その細胞傷害性を参考にして設定した。また、SB203580、抗 CD19 抗体、PEG 修飾ステルスリポソーム、SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソームなどもコントロールとして添加した。回収した細胞は可溶化し、抗リン酸化型 p38 抗体を用いたウエスタンブロット法を行なった。これによって p38-SIL の p38MAPK に対する抑制効果を確認した。次に Namalwa 細胞を対象として、p38-SIL の増殖抑制効果を検討した。1×10⁴ 個の Namalwa 細胞に p38-SIL もしくは Control-SIL を添加し、経時的に細胞数を定量した。細胞数の定量化は MTT

(3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 法で行った。p38-SIL の投与量は、上述した検討の結果を参考に決定した。これらの検討により、p38-SIL の Namalwa 細胞に対する増殖抑制効

果が示された。

(2) Namalwa 細胞は Severe Combined Immunodeficiency (SCID) マウスに移植可能である事が確認されており、これを in vivo 実験に用いた。1×10⁶ 個の Namalwa 細胞を 1 ml の細胞培養用培地 RPMI1640 に懸濁してツベルクリン用の 1 ml シリンジに充填、これを SCID マウスの背部皮下へ注入した。腫瘍が形成され直径が 6 mm に達した時点で、尾静脈より各種濃度の p38-SIL もしくは Control-SIL を投与した。p38-SIL 投与群と Control-SIL 投与群の腫瘍系を経時的に比較したところ、p38-SIL の腫瘍増殖に対する抑制効果が確認された。なお、SB203580 投与群、抗 CD19 抗体投与群、PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群などもコントロールとして検討したが、これらの群で腫瘍増殖の抑制は確認されなかった。更に、悪性リンパ腫患者のリンパ節から回収したリンパ腫細胞を対象として検討した。リンパ節からリンパ腫細胞を回収する手順は常法のとおりである。1×10⁶ 個の患者リンパ腫細胞を 1 ml の細胞培養用培地 RPMI1640 に懸濁してツベルクリン用の 1 ml シリンジに充填、これを SCID マウスの背部皮下へ注入した。なお、SCID マウスには、あらかじめ抗アジアロ GM1 抗体を腹腔内投与した。腫瘍が形成され直径が 6 mm に達した時点で、尾静脈より各種濃度の p38-SIL もしくは Control-SIL を投与した。p38-SIL 投与群と Control-SIL 投与群の腫瘍系を経時的に比較したところ、p38-SIL の腫瘍増殖に対する抑制効果が確認された。なお、SB203580 投与群、抗 CD19 抗体投与群、PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、SB203580 包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群、抗 CD19 抗体標識 SB203580 非包含 PEG 修飾ステルスリポソーム投与群などもコントロールとして検討したが、これらの群で腫瘍増殖の抑制は確認されなかった。

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 10 件)

- ① Kobune M, Takimoto R, Murase K, Iyama S, Sato T, Kikuchi S, Kawano Y, Miyanishi K, Sato Y, Niitsu Y, Kato J. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34(+) leukemic cells. Cancer Sci. 2009 Mar 6. [Epub ahead of print] 査読有
- ② Sato Y, Takayama T, Takahashi D, Sagawa T, Sato T, Abe S, Kogawa T, Nikaido T, Miyanishi K, Takahashi S, Kato J, Niitsu

Y. Successful treatment for gastro-intestinal bleeding of Osler-Weber-Rendu disease by argon plasma coagulation using double-balloon enteroscopy. Endoscopy. 2008 Sep;40 Suppl 2:E228-9. 査読有

③ Sagawa T, Yamada Y, Takahashi M, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Fukaura J, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Kato J, Sasaki K, Hamada H, Niitsu Y. Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53, and 5-fluorouracil in mice. Hepatology. 2008 Sep;48(3):828-40. 査読有

④ Sato T, Machida T, Takahashi S, Murase K, Kawano Y, Hayashi T, Iyama S, Takada K, Kuribayashi K, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Niitsu Y. Apoptosis supercedes necrosis in mitochondrial DNA-depleted Jurkat cells by cleavage of receptor-interacting protein and inhibition of lysosomal cathepsin. J Immunol. 2008 Jul 1;181(1):197-207. 査読有

⑤ Kobune M, Kawano Y, Takahashi S, Takada K, Murase K, Iyama S, Sato T, Takimoto R, Niitsu Y, Kato J. Interaction with human stromal cells enhances CXCR4 expression and engraftment of cord blood Lin(-)CD34(-) cells. Exp Hematol. 2008 Sep;36(9):1121-31. 査読有

⑥ Murase K, Matsunaga T, Hayashi T, Ishiwatari H, Araki N, Iyama S, Sato T, Kobune M, Takimoto R, Miyazaki T, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y. Successful treatment of autoimmune pancreatitis complicated with autoimmune thrombocytopenia and interstitial pneumonia by prednisolone. Intern Med. 2008;47(11):1033-8. 査読有

⑦ Iyama S, Matsunaga T, Sato T, Murase K, Araki N, Takimoto R, Kobune M, Sagawa T, Takayama T, Niitsu Y. Successful treatment of chronic myeloproliferative disease-unclassifiable (CMPD-U) with no chromosomal abnormalities by imatinib mesylate. Intern Med. 2008;47(8):791-4. 査読有

⑧ Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, Takimoto R, Takada K, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Niitsu Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nat Biotechnol. 2008 Apr;26(4):431-42. 査読有

⑨ Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M,

Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sagawa T, Sato Y, Takimoto R, Takayama T, Kato J, Gasa S, Sakai H, Tsuchida E, Ikebuchi K, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. Int J Hematol. 2008 May;87(4):339-50. 査読有

⑩ Kuribayashi K, Nakamura K, Tanaka M, Sato T, Kato J, Sasaki K, Takimoto R, Kogawa K, Terui T, Takayama T, Onuma T, Matsunaga T, Niitsu Y. Essential role of protein kinase C zeta in transducing a motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide, fMLP. J Cell Biol. 2007 Mar 26;176(7):1049-60. 査読有

[学会発表] (計1件)

① 佐藤勉、町田卓郎、高橋祥、村瀬和幸、井山諭、佐藤康史、小船雅義、瀧本理修、松永卓也、加藤淳二「ミトコンドリアDNA欠損Jurkat 亜株において、アポトーシスシグナルはカテプシン活性の抑制によりネクロシスシグナルを凌駕する」第67回日本癌学会学術総会 2008年10月28日 名古屋国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勉 (Sato Tsutomu)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：40404602

(2) 研究分担者

井山 諭 (Iyama Satoshi)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：50398319