

平成22年 5月13日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007-2009
 課題番号：19390508
 研究課題名 (和文)
 腫瘍特異的ウイルスカプシド成分の合成による腫瘍特異的吸着リポソームの開発
 研究課題名 (英文)
 Development of cancer-targeted liposome with viral proteins
 研究代表者
 鶴澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)
 千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：30302558

研究成果の概要 (和文)：ドラッグ・デリバリー・システムにおいて、効率良く癌細胞へ特異的に吸着するシステムを開発した。我々は、腫瘍細胞膜上のレセプターを介して腫瘍に特異的に吸着するが、ヒトに対しては低病原性であるシンドビスウイルスを分離し、腫瘍細胞レセプターと結合するウイルス蛋白を、シスプラチン含有リポソームへ修飾した。同リポソームは有意に腫瘍細胞を傷害していたが、正常細胞株である線維芽細胞では差がなかった。動物実験においても、有意な腫瘍抑制効果があった。以上から、今回開発したシンドビス蛋白で修飾したリポソームは、腫瘍特異的吸着リポソームとして癌治療へ応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Targeted liposomes can be broadly defined as liposomes that are engineered to interact with a particular population of cells with the objective of delivering a payload or increasing their retention within the targeted cell population. We previously identified a Sindbis virus (SIN) strain which preferentially infects several cancers in vitro and in vivo without side effects. In this study, we have developed a cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome with the SIN protein and evaluated its cytotoxicity to cancers in vitro and in vivo. In vitro, the cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome has exhibited higher cytotoxicity to cancer cells than the cisplatin-encapsulating non-targeted liposome. Mice injected with the cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome displayed rapid tumor regression. Thus, this finding that a cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome with the SIN protein selectively fused with cancer cells and sensitized cancer cells suggested the application of this cancer-targeted liposome to cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

現在、ドラッグ・デリバリー・システムの開発が盛んに行われている。ナノ・テクノロジー等を応用しているが、効率的に癌細胞に特異的に吸着・摂取されるようなシステムの開発には至っていない。

我々は殺腫瘍ウイルス (Oncolytic virus) の研究を、レオウイルス科レオウイルスとトガウイルス科アルファウイルス属シンドビスウイルスに関して行ってきた (米国特許申請中)。これらのウイルスは腫瘍に特異的に感染 (吸着) し、腫瘍特異的に増殖する (ほとんどの臓器の正常細胞には感染・増殖をしないことを *in vitro*, *in vivo* で確認済み)。特にシンドビスウイルスは非常に多くの種類の癌細胞 (悪性黒色腫、悪性リンパ腫、扁平上皮癌、腺癌に関し報告済み) に感染し、これらのウイルスの腫瘍細胞への感染 (吸着) は癌細胞膜上のレセプターを介して行われることが知られており、数種類のレセプターが同定されている。このため、これらのレセプターと結合するリガンドを用いれば癌特異的なドラッグ・デリバリー・システムの開発が可能になる。また、特に、シンドビスウイルスは蚊が媒介して、ヒトに感染するが、軽微な発熱を引き起こすだけの低病原性ウイルスであり、全身投与もできることから、その成分を用いても、毒性が無い、血中投与による全身投与ができるものと考えられる

2. 研究の目的

本研究では、低病原性ウイルスであるシンドビスウイルスの腫瘍特異的吸着能を有するリガンドを混入したリポソームによる癌特異的なドラッグ・デリバリー・システムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

【リポソームの組成】

経時的に安定性があり、ウイルスタンパクを二重脂質膜へ挿入できるような許容性を持たせるために、脂質成分に不飽和脂肪酸を含むものにした。

基本的な細胞膜成分である Phosphatidylcholine (Pho)、Cholesterol (Chol) の成分のみ、それに加えて、phosphatidylserine (PS)、L- α -dimyristoyl, phosphatidic acid (DPA)、sphingomyelin (SM) などを配合して検討した。配合比は、Pho:Chol (1:1)、Pho:Chol:PS(4:5:1)、Pho:Chol:DPA(4:5:1)、Pho:Chol:SM (4:5:1) である。

【リポソームの作製】

水和法で行い、サイズの統一化を行っている。つまり、各種の配合脂質をクロロホルム 2 ml に溶解し、エバポレーターで溶媒を揮発さ

せ、フラスコに薄膜フィルムを形成させる。次に、1 ml の生理食塩水で水和させ、エクストルーダーに 400nm フィルムをセットして、サイズの均一化を行った。

【ポリエチレングリコール (PEG) の修飾】
Vivo で、血中の安定性を持たせるために 2 KD ポリエチレングリコール (PEG) を付加した。脂質量に対して、0.75%mol の PEG を混和して、45°C で 30 分間振盪した。

【SIN 蛋白の付加】

ウイルスタンパクを 2 重脂質膜へ取り込む処理法は、リポソームとウイルスタンパクを 37 度の恒温槽内で振動させながら 2 時間インキュベーションさせた。インキュベート後もリポソームの粒子径を測定した。

【蛍光標識】

癌細胞への吸着性を評価するために、リポソームの脂質内に蛍光脂質の添加を検討した。リポソームの作製の際に、脂質の溶解液へ各蛍光脂質、rhodamine 脂質 (Rhodamin-DSPE)、Oregongreen 脂質 (OregongreenDSPE)、NBD-PE を 0.2mol% 添加した。蛍光標識したリポソームへ PEG と SIN 蛋白を付加し、癌細胞株 (口腔癌、肺癌、抗癌剤耐性株) と正常細胞株へ、脂質濃度 0.2mM で添加培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

【細胞傷害性試験】

シスプラチン内包リポソームを作製した。水和を 5mM シスプラチン生食で行い、SephadexG50 にてカラム精製を行った。その後、PEG と SIN の修飾を行った (SIN Liposome Cisplatin)。癌細胞 (口腔癌、肺癌) と正常細胞株 (ヒト線維芽細胞株) で細胞傷害性試験を施行した。対照として、SIN 付加なしシスプラチン内包リポソーム (Liposome Cisplatin)、SIN 付加あり、または、なしの生食内包リポソーム (SIN Liposome NS, Liposome NS) を作製した。以上、SIN Liposome Cisplatin、Liposome Cisplatin、SIN Liposome NS、Liposome NS を 0.3 μ M で添加して 48 時間後に MTS アッセイで細胞生存率を測定した。

【腫瘍抑制効果】

ヌードマウスへ肺癌細胞株 (RERF-LC-AI) を移植して、腫瘍容積が 100 mm³ になったら、週 1 回、SIN Liposome Cisplatin、Liposome Cisplatin、SIN Liposome NS、Liposome NS の各条件 6 匹ずつ、脂質量 0.4mg/匹で頸静脈投与を行った。これを、7 週行い、商用容積を測定して、無投与のコントロールと比較して腫瘍抑制能を評価した。

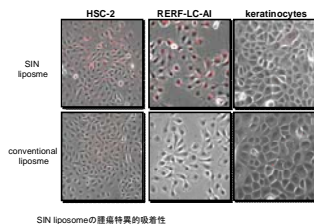
4. 研究成果

【シンドビスハイブリッドリポソーム】

リポソームは、Pho:Chol:PS(4:5:1)の配合比が経時的安定性があり、PEGの付加、SIN蛋白の付加が可能であった。

【腫瘍細胞吸着性】

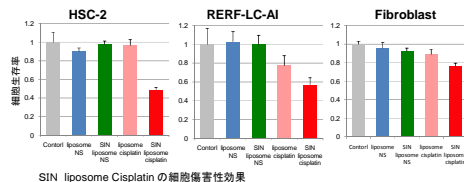
吸着性の機能評価を行うのに有効な蛍光脂質は、Rhodamin-DSPE、OregongreenDSPEが有効であった。次に、癌細胞株（口腔癌、肺癌、抗癌剤耐性株）と正常細胞株（Keratinocytes）へ、脂質濃度 0.2mM でリポソームを添加培養したところ、癌細胞株では、SIN蛋白を付加したリポソーム(SIN liposome)が特異的に吸着し内包物を移送していた。



SIN liposomeの腫瘍特異的吸着性

【腫瘍細胞傷害性】

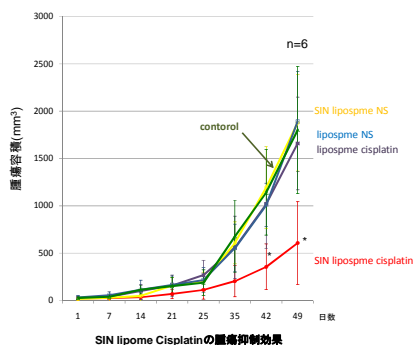
癌細胞（口腔癌、肺癌）と正常細胞株（ヒト線維芽細胞株）で細胞傷害性試験を施行した。SIN Liposome Cisplatin、Liposome Cisplatin、SIN Liposome NS、Liposome NSを 0.3 μM で添加したところ、SIN Liposome Cisplatin で傷害性が高かった。



SIN liposome Cisplatinの細胞傷害性効果

【腫瘍抑制効果】

SIN Liposome Cisplatinでは有意に腫瘍抑制が見られた。Liposome Cisplatin、SIN Liposome NSでは有意差がないことから、腫瘍抑制能がSIN自身によるものでなく、SINによりシスプラチンが特異的に腫瘍へ集積した効果考えられた。



SIN liposome Cisplatinの腫瘍抑制効果

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 2 件）

1. Saito K, Shirasawa H, Isegawa N, Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. Oncolytic virotherapy for oral squamous cell carcinoma using replication-competent viruses. Oral Oncology 2009 Dec;45(12):1021-7 査読有
2. Saito K, Uzawa K, Kasamatsu A, Shinozuka K, Sakuma K, Yamatoji M, Shiiba M, Shino Y, Shirasawa H, Tanzawa H. Oncolytic activity of Sindbis virus in human oral squamous carcinoma cells. Br J Cancer. 2009 Aug 18;101(4):684-90. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Saito K, Shirasawa H, Uzawa K, Tanzawa H. The effect of a cisplatin-encapsulating cancer-targeted liposome with viral proteins on cancer cells 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama 2009.10.3
2. Saito K, Shirasawa H, Shiiba M, Uzawa K, Tanzawa H. Oncolytic activity of sindbis virus for oral cancer cells; 3th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine: Greece Krete, 2008.10

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：腫瘍特異性を有する新型リポソーム
 発明者：鶴澤一弘、齋藤謙悟、丹沢秀樹、白澤浩、山本恵司、森部久仁一、椎葉正史
 権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特願 2010-086071 号

取得年月日：平成 22 年 4 月 2 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

(2) 研究分担者

白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00216194
椎葉 正史 (SHIIBA MASASHI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20301096
武川 寛樹 (BUKAWA HIROKI)
筑波大学・医学部臨床医学系・教授
研究者番号：80173558
齋藤 謙悟 (SAITO KENGO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70451755