

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249080

研究課題名（和文）非ノ低病原性腫瘍特異的感染ウイルス成分による癌明示システムの開発

研究課題名（英文） The effect of cancer-targeted liposome with viral proteins on staining and visualizing cancer cells

研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50236775

研究成果の概要（和文）：

本研究はシンドビスウイルス成分を搭載した腫瘍特異的吸着リポソームを用いて癌細胞を色素標識して明示化し、生体内での追跡実験や手術のナビゲーション・システムを開発することを目的とする。ウイルス蛋白の融合許容性と、経時的・物理的安定性を持つリポソーム(Liposome NS)を調整し、超遠心濃度勾配濃縮法で精製した腫瘍特異的吸着能リガンド成分を加えて、シンドビスハイブリッドリポソーム(SIN Liposome NS)を作成した。電子顕微鏡でリポソーム表面へのリガンド成分の融合を確認した。マーカーとして、リポソーム内水層への標識に GFP 蛋白、rhodamin 蛋白、FITC-dextran を、リポソーム脂質内への標識に FITC 脂質、rhodamine 脂質を検討した。結果、吸着と蛍光評価には 0.5mMrhodamin 蛋白溶液が、内包標識には 5mMFITC-dextran 溶液が、脂質標識には FITC 脂質または rhodamine 脂質が有効であった。内水層への蛍光標識より脂質への標識の方が感度は高く、蛍光特異性は FITC-dextran が高かった。以上から、FITC-dextran、rhodamin 脂質標識した Liposome NS と、ウイルス成分をさらに加えた SIN Liposome NS を用いて以下の実験を行った。SIN Liposome NS を各種癌細胞株と正常細胞へ添加培養したところ、癌細胞株に特異的に吸着・蛍光した。さらに脂質濃度を工夫し、フローサイトメトリーで吸着能を各種癌細胞で 135%から 200%の範囲に向上させた。次に、担癌マウスの頸静脈投与法でリポソーム溶液 50  $\mu$ l (脂質濃度 0.2mg/マウス)から投与開始し、リポソーム溶液 100  $\mu$ l が副作用の見られない最大量であることを見出した。さらに、IVIS Lumina(Caliper)を用い、担癌ヌードマウスで色素の検出感度の差、体内分布、検出可能時間を検討した結果、色素は TexasRed が最も効率的に検出され、腫瘍、肝臓、手足関節部に集積し、投与後 30 分から1時間での計測において S/N 比が高かった。

研究成果の概要（英文）：

We developed a novel fluorescence-labeled cancer-targeted liposome coupled to sindbis virus proteins (SIN hybrid liposome) on the surface that can be used for imaging tumors and optimized for a bio-distribution analysis and an intra-operative navigation system. SIN hybrid liposome was prepared by mixing the pegylated liposome and UV-inactivated Sindbis virus protein that were purified by an ultracentrifuge. The structure of SIN hybrid liposome was observed by a Transmission Electron Microscope. When cancer cells were incubated with SIN hybrid or non-SIN hybrid rhodamin labeled liposomes encapsulating FITC-dextran, both confocal microscopy and flow cytometry revealed that a large number of rhodamin fluorescence on the cell membrane and FITC in the cytoplasm were detected in the cancer cells treated with SIN hybrid liposomes compared with non-SIN hybrid liposomes. Furthermore, each liposome was systemically injected in tumor bearing mouse model and imaged for distribution using IVIIS lumina systems. SIN hybrid liposome showed distribution and accumulation at the tumor site preferentially and improved the signal-to-noise ration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	17,300,000	5,190,000	22,490,000
2009 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
総計	30,700,000	9,210,000	39,910,000

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：非/低病原性ウイルス、シンドビスウイルス、ハイブリッド型リポソーム、腫瘍特異的吸着性、手術支援システム

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療に関しては、神経、血管、需要臓器が集中し、また、機能的にも、新美性・人間の尊厳という観点からも、癌の手術において、他の領域に無い精緻な操作を要求される。このため、癌細胞を手術時に明示・同定し、手術操作をサポートするシステムの開発が望まれており、現在、岡山大学とベンチャー企業では本研究と同様にウイルスを用いたシステムを開発中であるが、安全に全身投与することが未だできないのが現状である。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し、腫瘍特異的に増殖する。これらのウイルスの内、シンドビスウイルスはほとんどの臓器の正常細胞には感染・増殖をせず、元々非/低病原性であるため、血中 (全身) 投与可能で安全である。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、腺癌に関して報告済み) に感染する。腫瘍細胞への感染は数種類のレセプターを介して行われることが知られているが、あくまでも生物学的であるため、単一のレセプターによるものではなく、複雑なメカニズムによるものと考えられている。このような特性を有するシンドビスウイルスのカプシドとエンベロープを搭載した腫瘍特異的吸着性リポソームを最近開発したので、癌明示システムとしての応用を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究は、非/低病原性ウイルスであるシンドビスウイルス成分を搭載した腫瘍特異的吸着リポソームを用いて癌細胞を色素標識して明示化し、生体内での追跡実験や手術のナビゲーション・システムを開発することを目的とする。具体的には、以下の事項検討する。

- 1) 効率的に腫瘍に吸着するハイブリッド型リポソームの性能をさらに高める。
- 2) 各種色素を用いて、癌細胞を染色する性質の高い色素、あるいはその組み合わせを明らかにする。
- 3) これらの色素を搭載したハイブリッドリポソームのマウスに対する投与量に関して、安全投与範囲を決定する。
- 4) 担癌マウスを用いて色素搭載ハイブリッド型リポソームによる染色実験を行い、効率の良

いシステムを開発する。

### 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- $\alpha$ -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二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、リポソームの粒子径を測定した。

#### 【リポソームの電子顕微鏡観察】

SIN 成分を付加したリポソームをネガティブ染色 (リンタングステン) を行い、電子顕微鏡 (JEM-2000EX 100kV TEM) にて観察を行った。

#### 【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

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。

【フローサイトメトリー】

癌細胞株（口腔癌、肺癌、抗癌剤耐性株）と正常細胞株へ、各蛍光脂質、rhodamine 脂質 (Rhodamin-DSPE)、Oregongreen 脂質 (OregongreenDSPE)、NBD-PE で標識した SIN リポソームを脂質濃度 0.2mM で添加し、1 時間インキュベート後、PBS 洗浄を行い、0.125% トリプシン溶液で細胞を浮遊後、洗浄を行い、FACS cant II (BD)にて定量をした。

【マウスを用いた安全性試験】

担癌マウスを用いて、頸静脈投与法でリポソーム溶液 50 μl(脂質濃度 0.2mg/マウス)から投与開始し、10 μl ずつ増量して安全投与の最大量を決定した。

【担癌マウスにおける腫瘍集積性試験】

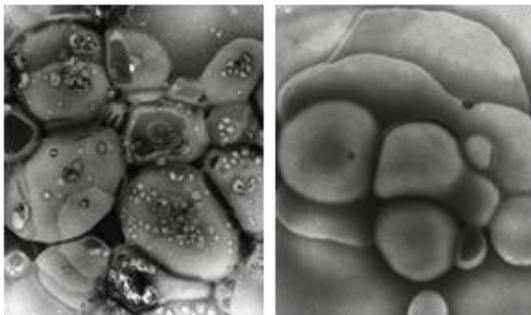
肺扁平上皮癌(RCRF-LC-AI)あるいは口腔扁平上皮癌(HSC-2)を担癌させたBALB/cヌードマウスにおいて、rhodamin 脂質、TexasRed 脂質等の色素で蛍光標識したハイブリッドリポソームの検出感度の差、体内分布、検出時間の検討をIVIS Lumina II (Caliper)を用い、体外から検出する方法で検討した。

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。ネガティブ染色を行い、電子顕微鏡にてリポソーム表層へのウイルス成分の付着を観察できた。

SINリポソーム      リポソーム

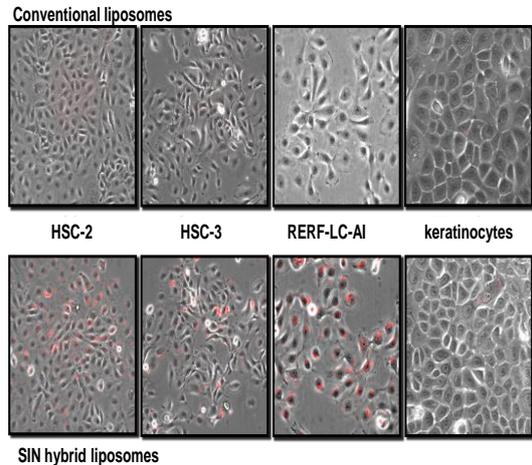


【腫瘍細胞吸着性】

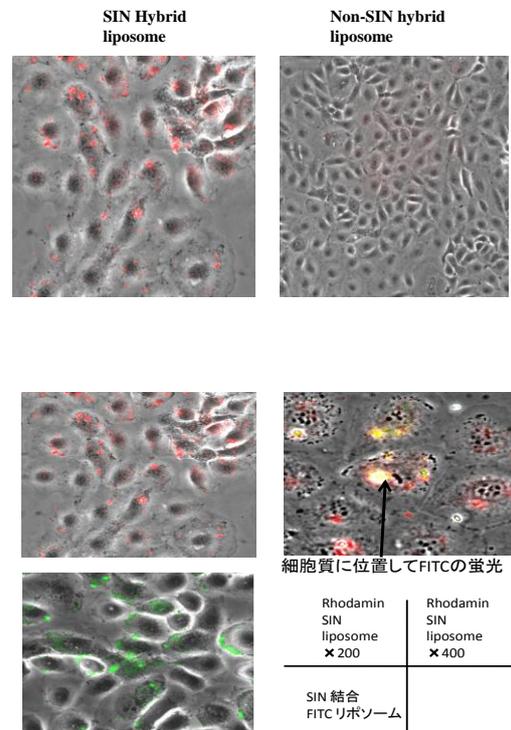
吸着性の機能評価を行うのに有効な蛍光脂質は、Rhodamin-DSPE、OregongreenDSPE が有効であった。次に、癌細胞株（口腔癌、肺癌、抗癌剤耐性株）と正常細胞株 (Keratinocytes) へ、脂質濃度 0.2mM でリ

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。

Binding of SIN hybrid liposomes to cancer cells



ウイルス成分の有無による  
リポソーム吸着効果の差

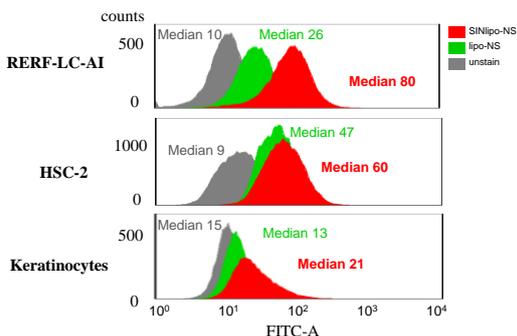


【腫瘍吸着性定量】

癌特異的吸着能の定量をフローサイトメトリーにて行ない、吸着能の向上を確認した。次に、rhodamin 色素を用いた細胞吸着発色実験を行った。シンドビスを修飾したもの(SIN Liposome NS)は、修飾しないもの(Liposome NS)と比較して、蛍光量の平均値の上昇が、肺扁平上皮癌株(RERF-LC-AI)で200%、口腔扁平上皮癌

HSC-2 で 113%、HSC-3 で 33%、胃癌細胞 (MKN45) で 200%であった。一方、正常細胞株 (ヒト角化上皮) は変化がなかった。

#### Targetability of SIN hybrid liposomes to cancer cells

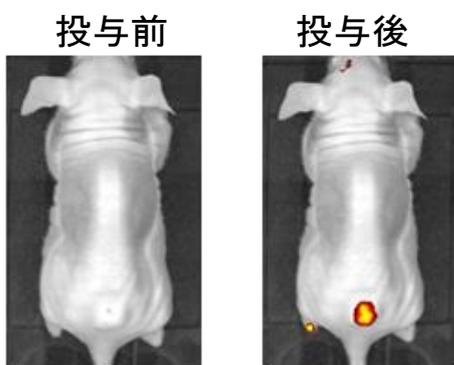


#### 【マウスを用いた安全性試験】

担癌マウスを用いて、頸静脈投与法でリポソーム溶液を少しずつ増量していったところ、リポソーム溶液 100  $\mu$ l が副作用の見られない最大量であることを見出した。

#### 【担癌マウスにおける腫瘍集積性】

頸静脈投与法で、リポソーム溶液 50  $\mu$ l (脂質濃度 0.2mg/マウス) から投与開始し、リポソーム溶液 100  $\mu$ l が副作用の見られない最大量であった。色素はTexasRedのみ検出が可能であった。体内分布は、腫瘍以外の部位では肝臓と手足の関節部へ集積があった。投与後の検出時間は、10分、30分、1時間、3時間で測定し、30分から1時間での計測がS/N比が高かった。肺扁平上皮癌 (RCRF-LC-AI) と比較し、口腔扁平上皮癌 (HSC-2) はより高く、SIN Liposome NS は、Liposome NS と比較し、S/N比は最大20%の増加があった。



#### 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. 査読有 Oral Oncology 2009 Dec;45(12):1021-7
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, 2008.10.9

[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: 鶴沢一弘、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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)  
 千葉大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号: 50236775

(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  
 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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: