

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390381

研究課題名(和文)

細胞内小領域標的ナノヴィークルの開発とがん治療への応用

研究課題名(英文)

Development of cancer therapy using organelles-targeting nanocarrier

研究代表者

水野 正明 (MIZUNO MASAOKI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70283439

研究成果の概要(和文)：本研究では、DEAE ポリマーテクノロジーとリポソームテクノロジーを活用し、細胞内小器官を標的としたナノヴィークル(ナノメートルサイズのバイオマテリアルキャリア)の開発を目指した。そして開発したナノヴィークルに siRNA を結合させ、dry 並びに wet 環境下で生物学的活性の誘導を確認した。さらにこの試験物を臨床試験に活用できるよう GLP 及び GMP 下での製造方法を確立し、がん治療への応用に一步近づけた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed nanocarrier for organelles based on the technologies using DEAE polymer and liposome, and succeeded to target a lot of organelles such as mitochondria, chromosome, and contractile ring. When binding siRNA to the nanocarrier, we could confirm the biological activities in in vitro and in vivo experiments. Also, we established the process to produce the siRNA binding nanocarrier under GLP (Good Laboratory Practice) and GMP (Good Manufacturing Practice) control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：細胞、ナノテクノロジー、細胞内小器官、がん、siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

バイオテクノロジーの進歩により、核酸やタンパク等をはじめとするバイオマテリアルを細胞内に導入するテクノロジーは数多く開発されてきている。その上で当該分野において要求される次世代テクノロジーは、さらに精度の高い導入テクノロジー、すなわち細胞内の小領域に特異的にバイオマテリアルを導入するテクノロジーである。このテクノロジーは、今後、遺伝子医療、分子医療、再生医療、細胞医療、ゲノム創薬、ゲノム創

食といった先端医療分野には必須となる。これまでも我々は当該分野に関連する研究を進めてきており、DEAE ポリマーテクノロジー並びにリポソームテクノロジーにおいては独自技術を開発してきた。例えば DEAE はこれまでも細胞内への遺伝子導入法のひとつとして利用されてきたが、このテクノロジーががん治療等の臨床応用まで至らなかった理由として、①細胞毒性がある、②遺伝子等導入効率が低い、③滅菌がむずかしい等の問題があった。我々はこれらの問題を、

DEAE を特殊な技術を用いてポリマー化することで解決し、細胞毒性の軽減、遺伝子等導入効率の向上、滅菌可能な物質への変換を達成した。一方、リポソームにおいては多くのリポソームを調製し、その性状を明らかにしてきた。中でも TMAG (N-( $\alpha$ -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride) という 4 級アミンを基盤にしたリポソームテクノロジーでは、アミンの細胞毒性を軽減し、遺伝子やタンパク等のバイオマテリアルを効率よく細胞内に導入することに成功した。さらに、このテクノロジーを活用したがんに対する遺伝子治療臨床研究を実施し、人における安全性も確認した。これらの成果を基盤に本事業を進めることになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに開発してきたキャリアテクノロジー、すなわち DEAE ポリマーテクノロジー及びリポソームテクノロジーをさらにスキルアップし、細胞内小器官を標的としたナノヴィークルを開発し、がん治療への応用を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、「細胞内小器官を標的としたナノヴィークルの開発」と「がん治療への応用」の 2 つの研究課題を立てた。これらの課題を実現するため、(1) 試験物のデザイン（設計）、(2) 試験物の製造、(3) 生物学的効果の検証、及び(4) GMP での製造プロセスの確立をそれぞれ目指した。

### (1) 試験物のデザイン（設計）

ここではこれまでに我々が培ってきたキャリアテクノロジー、すなわち DEAE ポリマーテクノロジーとリポソームテクノロジーに siRNA を実装した試験物のデザイン化を目指した。siRNA が対象とするタンパク分子としてアポトーシスの促進または抑制に関与する DNase-gamma や XIAP のほか、細胞骨格関連タンパク、aurora, STAT, dicer を取り上げた。

### (2) 試験物の製造

ここでは、遺伝子治療や細胞・再生医療ですでに臨床研究の実績をもつ名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センター（現在の先端医療・臨床研究支援センター）の製剤調製技術を基に、臨床応用可能なグレードの試験物の製造を試みた。

### (3) 生物学的効果の検証

試験物の生物学的効果の検証については、まずは各種培養ヒトがん細胞を使って検証した。その観察方法を以下に示す。

① siRNA を FITC で、キャリアを R18 でラベルし、培養細胞に投与後、蛍光顕微鏡でその局在及び経時的变化を観察した。

② 核膜周辺に集積する条件を把握した後、共焦点レーザー顕微鏡でその局在を三次元的に評価した。また、3D イメージを多方面から解析し、その動態を見極めた。

③ 生物学的活性については、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡下での細胞の変化を観察するとともに、細胞骨格関連タンパク等のリン酸化状態を評価できる特異的抗体やウェスタンブロット等で評価した。同時に細胞死に関連した分子の動きも観察した。

その後動物実験（各種がん細胞を、それぞれが本来あるべき臓器に移植して作製した担がん動物モデル）にてその効果を検証した。

## (4) GMP での製造

上記(3)の①②③の効果を確認後、試験物の GMP 製造工程の確立を目指した。siRNA に関する一定の基盤研究データをもっていれば、どんな疾患に対しても適応できる製造プログラムを作成するため、本研究で生物学的効果が確認できた臨 siRNA 結合 DEAE ポリマーヴィークル及び siRNA 包埋リポソームを対象にした。

## (5) 情報ネットワークづくり

重要なデータである画像関連データを一元的に管理するためのコンピュータネットワークの構築を目指した。また、臨床で活用している CT や MR 等の画像と連携できるよう、保存形式の標準化も合わせて検討した。

## 4. 研究成果

研究方法に示した(1)-(5)の各々について、それぞれプラン、実行、チェック、評価の 4 つのサブプロセス、すなわち PDCA サイクルを念頭に置きながら研究を進めた。

### (1) 試験物のデザイン（設計）

ナノヴィークルの一型としてデザインした siRNA を結合した DEAE ポリマーヴィークルとナノサイズリポソームには共通した特性のあることが見出された。その特性とは、ある特定の条件下で核膜やオルガネラの周辺に集積するという現象である。本研究では、この特性を生かし、核膜周辺の RNA スプライシング領域やタンパク合成領域で機能するタンパク、DNase-gamma, XIAP, auora を標的にした DEAE ポリマーヴィークルとナノサイズリポソームの 2 つの試験物について dry 及び wet 環境でデザイン解析を行った。試験物、特に siRNA については、分子間の自由エネルギーやエントロピーに基づくドッキングスタディをコンピュータ上で行い、「創薬スクリーニングプログラム」にかけて評価した。

これにより、より高い確率で生物学的効果を誘導できる siRNA をデザインすることができた。

### (2) 試験物の製造 (図 1)

製造の場とした名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センター (現在の先端医療・臨床研究支援センター) は、ISO9001:2008 及び 13485:2003 に基づいて臨床応用可能なグレードの試験物を製造できる (GMP: Good Manufacturing Practice)。この技術を活用してまずは前臨床試験の実施に必要な GLP (Good Laboratory Practice) 下での試験物製造工程を確立した。特に本研究で使用した DEAE ポリマーはオートクレーブによる滅菌が可能であることから、キャリア製剤としての有用性をもつことが実証できた。GLP 下での試験物製造工程の確立は、本研究の成果物を臨床応用できる GMP 下での製造工程に直結する技術の確立を意味しており、きわめて重要な成果を言える。その後、GMP 下での製造工程を確立した。



図 1 試験物の GMP 下での調製風景

### (3) 生物学的効果の検証

DNase-gamma、XIAP、auora を標的にした試験物を用いて dry 及び wet 環境でその生物学的効果を検証した。

試験物の細胞内での動態や分布については、siRNA を FITC で、キャリアを R18 でラベルし、培養細胞に投与後、蛍光顕微鏡でその局在及び経時的変化を観察した。その結果、ミトコンドリア、分裂期染色体、収縮環等の細胞内小領域への標的化が可能であることを実証できた (図 2, 3, 4)。さらに、試験物の表面荷電、すなわち Z-potential を変化させ、細胞内または組織内分布の変化をキーンズ社のオールインワン蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡及びビデオ強化型微分干渉顕微鏡を活用して調べた。その結果、Z-potential の高い方が核膜やオルガネラへの集積度が高い事実がわかった。

試験物の集積状況及び集積条件を把握した後、共焦点レーザー顕微鏡でその局在を三次元的に解析した。また、最も重要な生物学

的活性については、ビデオ強化型微分干渉顕微鏡下での細胞の変化を、細胞骨格関連タンパク等のリン酸化状態を評価できる特異的リン酸化抗体を用いて評価し、その有用性を確認した。

その後、脳腫瘍、悪性黒色腫 (皮膚がん)、肝細胞がんのモデルとして作成した動物を用いてその効果を確認した。

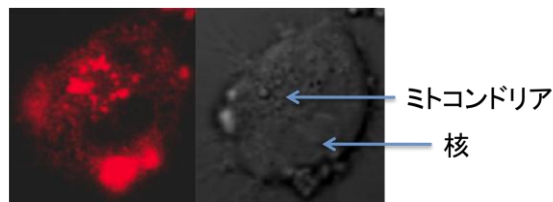


図 2 キャリアのミトコンドリア標的

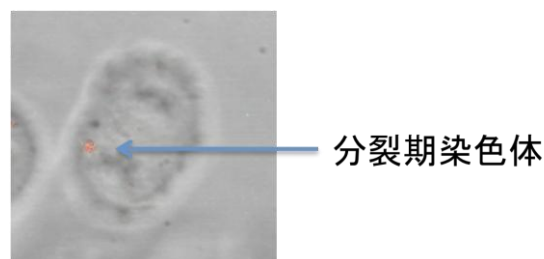


図 3 キャリアの分裂期染色体標的

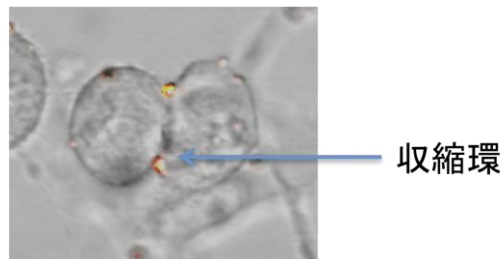


図 4 キャリアの収縮環標的

### (5) 情報ネットワークづくり

重要なデータである画像関連データを一元的に管理するため、設備備品として本研究で計上したコンピュータを活用し、情報ネットワークを構築した。画像データの形式については医療情報標準化技術を活用した。

(1)-(5) の成果を受け、今後もがん治療のための新しい 2 つのナノヴィークルの活用を続けていきたいと考えている。特に siRNA を用いた新規医薬品開発は、健康長寿立国を目指すわが国においては次世代医薬品開発 (先端医療) の中核事業に位置づけられており、世界最速で超高齢社会を迎えたわが国においては、最重要課題のひとつとなっている。さらに当該開発は、欧州を中心に次世代医薬品としての注目度が高く、国際競争力をつけることがわが国の国力の維持にもつながると考えている。

## 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 8 件)

- ①水野正明 日本版 EHR (Electronic Health Record) 構築に向けて, 電子情報通信学会誌 94:172-177, 2011, 査読無
- ② Eshita Y\*, Higashihara J, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Takasaki T, Yoshioka H, Kubota N, Onishi Y. A Mechanism of the Introduction of Exogenous Genes into Cultured Cells Using DEAE-Dextran-MMA Graft Copolymer as a Non-Viral Gene Carrier.II. Its Thixotropy Property. Nanomedicine & Nanotechnology 2: 1-5, 2011. 査読有
- ③ Arata J\*, Tada Y, Kozuka H, Wada T, Saito Y, Ikedo N, Hayashi Y, Fujii M, Kajita Y, Mizuno M, Wakabayashi T, Yoshida J, Fujimoto H. Neurosurgical robotic system for brain tumor removal. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2010 Jul 13. 査読有
- ④ Tanaka Y, Yu Q, Doumoto K, Sano A, Hayashi Y, Fujii M, Kajita Y, Mizuno M, Wakabayashi T, Fujimoto H. Development of a real-time tactile sensing system for brain tumor diagnosis. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2010 Jul;5(4):359-67. 査読有
- ⑤ Hayashi S\*, Mizuno M, Yoshida J, Nakao A. Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFN $\beta$  gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. Cancer Gene Ther 16, 638-643, 2009. 査読有
- ⑥ Yamamoto K, Mizutani Y, Nakanishi H, Fujiwara J, Ishida H, Toiyama D, Abe K, Hayashi I, Okada K, Kawauchi A, Mizuno M, Yoshida J, Miki T\*. Significant antitumor activity of cationic multi-lamellar liposomes containing human interferon- $\beta$  gene in combination with 5-fluorouracil against human renal cell carcinoma. Int. J Oncol 33:565-571, 2008. 査読有
- ⑦ Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y, Fujii M, Mizuno M, Yoshida J\*. A phase I clinical trial of interferon- $\beta$  gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. J Gene Med 10:329-339, 2008. 査読有
- ⑧ Matsumoto K, Kubo H, Murata H, Uhara H, Takata M, Shibata S, Yasue S,

Sakakibara A, Tomita Y, Kageshita T, Kawakami Y, Mizuno M, Yoshida J, Saida T\*. A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. Jpn J Clin Oncol 38: 849-856, 2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ①水野正明 疾患別医療からみた医療情報の標準化及び共有化: 日本版 EHR の構築に向けて 第 14 回日本医療情報学会春季学術大会 2010 年 5 月 28 日 高松
- ②水野正明 インターフェロン遺伝子治療の展開と先端医療開発体制の再整備 第 48 回日本癌治療学会 2010 年 10 月 28 日 京都
- ③水野正明、吉田 純: 連携医療を支えるセキュリティ 第 65 回放射線技術学会・総会学術大会シンポジウム 2009 年 4 月 18 日 横浜
- ④水野正明、吉田 純 地域医療情報連携システムの現状と展望 第 29 回医療情報学連合大会 2009 年 11 月 25 日 広島

[図書] (計 5 件)

- ①水野正明、若林利彦 がんに対する遺伝子治療 脳腫瘍 日本臨床 8:623-626, 2010
- ②水野正明、吉田 純 ITvision 一方向型地域医療連携における ICT の利活用 2009 38-39
- ③水野正明、吉田 純 日本医師会雑誌 ICT を用いた脳卒中連携医療支援システムの構築 2009 1369-1373

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野正明 (MIZUNO MASAOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 70283439

(2) 研究分担者

島戸信司 (SHIMATO SHINJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 30464142

(3) 連携研究者

なし