

機関番号：23803  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20790041  
 研究課題名（和文） 新概念、リンパ管新生がもたらすがん標的化リポソーム DDS への影響  
 研究課題名（英文） Influence of tumor lymphangiogenesis on tumor-targeting liposomal DDS  
 研究代表者  
 清水 広介（SHIMIZU KOSUKE）  
 静岡県立大学薬学部・静岡県立大学大学院薬学研究科 助教  
 研究者番号：30423841

研究成果の概要（和文）：長期血中滞留型リポソームは、全身循環後その一部が腫瘍部位に集積するため、がんへの標的化を可能とする薬物キャリアである。このリポソームの腫瘍への集積は、腫瘍部位におけるリンパ管が未発達であるとされることが一つの要因となっている。しかし近年、腫瘍組織においてリンパ管が新たに構築されるイベント、リンパ管新生が多くのがんで起こっていることが明らかとなった。そこで本研究は、リポソームの腫瘍標的化 DDS におけるリンパ管新生の影響の解明を行った。結果、腫瘍におけるリンパ管の存在が、腫瘍に集積したリポソームの排除を誘導することを見出し、リンパ管新生の誘起はリポソームの腫瘍集積性に影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：It is known that the microenvironment surrounding tumor cells is continuously changed. Recent studies have demonstrated that lymphangiogenesis, an event involving construction of new lymphatic vessels, frequently occurs in tumor tissue and contributes to lymph node metastasis of tumors. Since lymphatic vessels in tissues function as a drainage system, tumor lymphangiogenesis would be considered to affect the liposomal accumulation in the tumor. In this study, we found that lymphangiogenesis caused the decrease in tumor accumulation of liposomes, and demonstrated the influence of tumor lymphangiogenesis on tumor-targeting liposomal DDS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

#### 1. 研究開始当初の背景

がんは増大していく際、がん細胞を取り巻く環境を増殖するために有利な環境に随時変化させていることが知られている。特に代

表的なイベントとして血管新生が挙げられ、がん細胞の増殖に必須である酸素や栄養素は新たな血管を構築することで補給されている。一方で排除システムとして知られてい

るリンパ系は、がん組織においては未発達であることが従来から提唱されてきた。がん組織におけるこの特性を生かし、長期血中滞留型リポソームを血管透過性が高まっているがん組織に受動的にさせることが一般化し (Allen *et al.*, *Science* 303, 2004)、我が国においても欧米から遅れること十数年、抗がん剤のリポソーム製剤が市販されるまでに至っている。一方、近年の分子生物学研究の発達により、多くのがんにおいて血管新生とともに、リンパ管が新たに構築されるイベントであるリンパ管新生が盛んに行われていることが明らかとなった (Alitalo *et al.*, *Nature* 438, 2005)。実際このリンパ管新生を阻害することによりがんのリンパ行性転移を抑制できるというデータが報告されている (Roberts *et al.*, *Cancer Res* 66, 2006)。このため、がん組織においてリンパ系が未発達であるという従来の概念が崩されつつあり、がん組織においてもリンパ系は十分存在するという新たな概念ができてきた。本来リンパ管は、組織における浸透圧の調節や異物の免疫細胞へのリクルートだけでなく、高分子の血流への再循環や体外への排除などを担っているため、腫瘍内リンパ管新生の誘起は、がん組織における薬物のコンパートメントに影響を与える可能性が考えられる。これらの見解から、私はこの新たな概念に着目し、リポソームのがん組織への集積性とリンパ管新生との関連を明らかにすることを試みた。

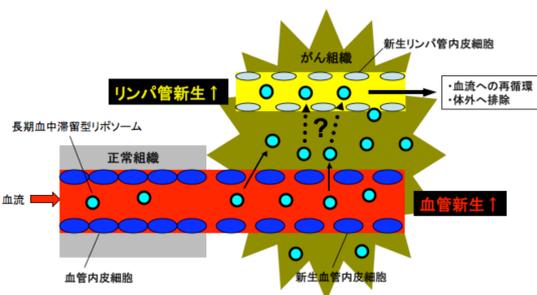


図 1 実験戦略の概要

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、リポソームを用いたがんへの標的化 DDS における腫瘍リンパ管新生の影響を解明することである。本研究ではまず、(1) リンパ管新生誘導がんの構築を行い、次に (2) リポソームの腫瘍部位への局所投与後の挙動の確認、さらには (3) リポソーム尾静脈内投与後の腫瘍集積の変化について検討を行うことで、研究仮説の証明を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) リンパ管新生誘導がんの構築

腫瘍におけるリンパ管新生は、腫瘍細胞よ

り分泌されるリンパ管新生促進因子により誘導されることが知られている。代表的なサイトカインとして Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) に関する研究が最も進んでおり、VEGF-C を過剰発現させたがん細胞がリンパ節転移を起こしやすくなることなどが以前に報告されている。これらの背景から、本検討においてリンパ管新生を誘導するがん細胞の構築にあたり、VEGF-C を過剰発現するがん細胞を作製することとした。まずマウスメラノーマ細胞である B16BL6 細胞から全 RNA を抽出し、逆転写後 PCR 反応によりマウス VEGF-C 遺伝子をコードする DNA を得て、pcDNA3.1/Hygro<sup>+</sup>プラスミドベクターにクローニングすることで VEGF-C 発現プラスミドベクター (pcDNA3.1/Hygro<sup>+</sup>/mouse VEGF-C) を構築した。

次に、構築したプラスミドベクターをマウスメラノーマである B16F10 細胞にリポフェクタミン 2000 を用いて遺伝子導入した。細胞 (B16F10/VEGF-C) に導入後、RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法、さらにはウェスタンブロッティング法により B16F10 細胞における VEGF-C の発現を遺伝子およびタンパク質レベルで解析した。さらに同細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植して担がんマウスを作製し、固形がんにおける VEGF-C およびリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1 の発現を解析するとともに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、リンパ管の観察を行った。

### (2) リポソーム局所投与後の挙動解析

腫瘍に集積した長期血中滞留型リポソームのその後の挙動に関して、リンパ管新生による影響を調べた。方法は、放射標識したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを作製し、前述と同様の方法で作製した固形がん担がんマウスに、インフュージョンポンプを用いてリポソームを固形がん内に直接投与した。投与 3 時間後におけるリポソームの組織分布 (各種臓器、リンパ節およびがん) を調べた。さらに蛍光標識 PEG 修飾リポソームを調製し、リポソームの固形がんにおける詳細な挙動を共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

### (3) リポソーム尾静脈内投与後のリポソームの腫瘍への集積

B16F10/VEGF-C 固形がん担がんマウスを作製し、放射標識 PEG 修飾リポソーム尾静脈内投与後のリポソームの組織分布、特に腫瘍への集積について、野生型の B16F10 細胞を移植した担がんマウスと比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) リンパ管新生誘導がんの構築

構築した pcDNA3.1/Hygro<sup>+</sup>/mouse VEGF-C プラスミドのインサート領域を切り出し、アガ

ロースゲル電気泳動により展開後、エチジウムブロマイド染色したところ、目的とされるサイズの位置 (1,200 bp 付近) にバンドが検出され、さらにシークエンス解析の結果から、今回構築したプラスミド DNA のインサート領域のシークエンスが、GenBank から提供されているマウス VEGF-C 遺伝子情報と完全に一致していることが明らかとなり、目的とするプラスミド DNA を作製することに成功した (Fig. 1)。

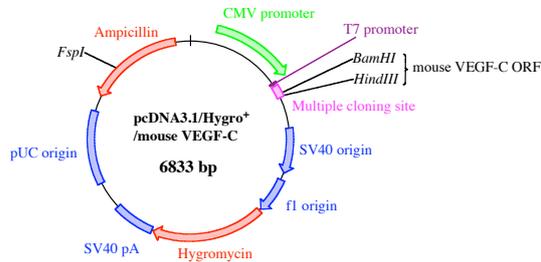


Fig. 1. Map of pcDNA3.1/Hygro<sup>+</sup>/mouse VEGF-C

次に作製したプラスミド DNA を B16F10 細胞に遺伝子導入し、VEGF-C の発現を調べたところ、B16F10/VEGF-C 細胞における VEGF-C の過剰発現が遺伝子およびタンパク質レベルで確認された (Fig. 2)。

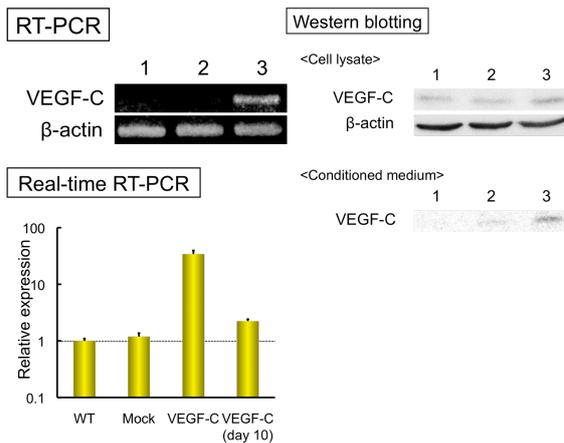


Fig. 2 . Expression of VEGF-C in VEGF-C-transfected B16F10 cells

B16F10 cells were transfected with mouse VEGF-C/pcDNA3.1/Hygro<sup>+</sup> vector by using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000. RT-PCR and real time RT-PCR, and Western blotting analyses of VEGF-C expression were performed at 24 or 48 h after transfection. (Lane 1; Wild type, lane 2; Mock, lane 3; VEGF-C transfected)

さらに固形がんにおけるリンパ管の観察を行ったところ、野生型 B16F10 細胞を移植

した固形がん比べ、B16F10/VEGF-C を移植した固形がんにおいて、非常に多くのリンパ管を観察することができた (Fig. 3)。これらの結果から、VEGF-C を B16F10 細胞に過剰発現させることにより、リンパ管新生を誘導できることが明らかとなった。

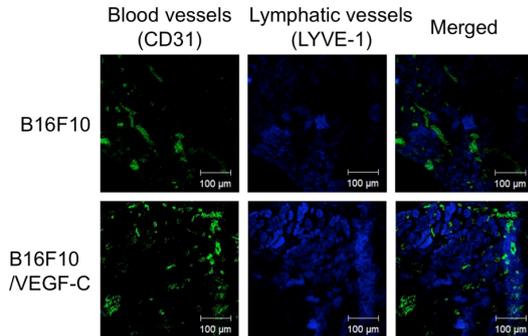
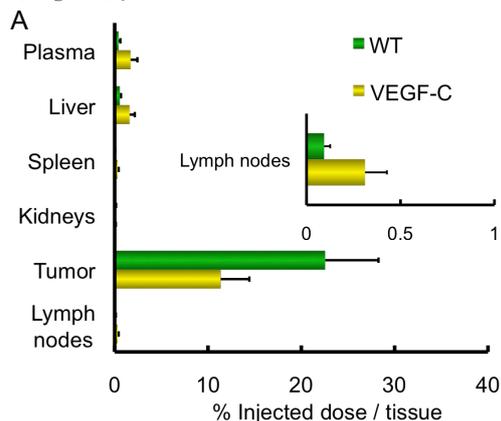


Fig. 3 . Tumor lymphangiogenesis in B16F10/VEGF-C solid tumor

B16F10 or B16F10/VEGF-C cells were subcutaneously implanted to 5-week-old male mice and the solid tumor-bearing mice were prepared. Then, the tumor sections were prepared, and incubated with anti-LYVE-1 antibody for staining of lymphatic vessels (blue images) and with anti-CD31 antibody for staining of blood vessels (green images). Scale bars represent 100 μm.

## (2) リポソーム局所投与後の挙動解析

放射標識した PEG 修飾リポソームを担がんマウスの固形がん中に局所投与し、その後の腫瘍におけるリポソーム量について調べたところ、野生型 B16F10 固形がん内におけるリポソーム量が減少していることが確認され、さらにリンパ節における集積量が増加していることが明らかとなった。さらにどのリンパ節に多く集積したかを詳しく調べたところ、腫瘍を移植した左側の膝窩および腋窩リンパ節に多く蓄積していることが明らかとなった (Fig. 3)。



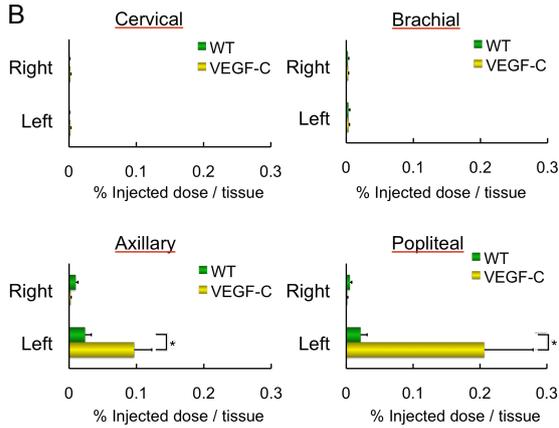


Fig. 3. Biodistribution of PEG-modified liposomes after intratumoral injection  
 $^3\text{H}$ -labeled PEG-modified liposomes were intratumorally injected to B16F10 (WT) or B16F10/VEGF-C (VEGF-C) tumor-bearing mice. The mice were sacrificed, and their organs and tumor (A), and major lymph nodes (B) were collected at 3 h after injection. Then, the radioactivity in each organ was determined. Data are presented as percent of the injected dose per tissue and S.E. (n=7) in each tissue. Significant differences are indicated as follows; \*  $P < 0.05$ .

さらに固形がん内におけるリポソームの分布の観察を行ったところ、B16F10/VEGF-C 固形がん内においてリポソームがリンパ管周辺に多く分布している様子が観察された (Fig. 4)。

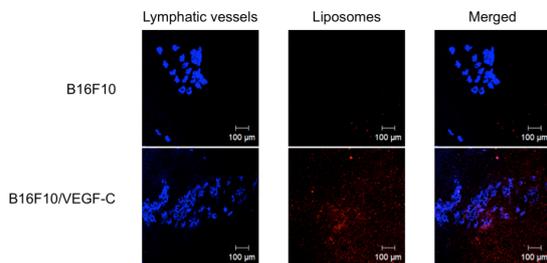


Fig. 4. Distribution of PEG-modified liposomes in the tumor  
 DiI-labeled PEG-modified liposomes were intratumorally injected to B16F10 or B16F10/VEGF-C tumor-bearing mice at day 10 after tumor implantation. At 3 h after injection, the frozen-sections of tumor were prepared. Immunofluorescence staining of LYVE-1 was performed to visualize lymphatic vessels. The tumors were observed under a confocal laser scanning microscope.

### (3) リポソーム尾静脈内投与後のリポソームの腫瘍への集積

B16F10 または B16F10/VEGF-C 担がんマウスを作製した後、PEG 修飾リポソームを尾静脈内投与し、その後のリポソームの体内動態、特に腫瘍への集積について検討を行った。結果、B16F10/VEGF-C 固形がんにおけるリポソームの集積は、B16F10 固形がん に比べ、有意に減少することが明らかとなった。また、近隣のリンパ節への集積が増加する傾向にあることが確認された (Fig. 5)。

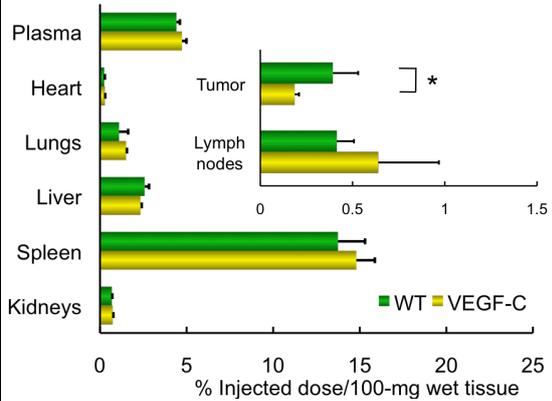


Fig. 5. Biodistribution of PEG-modified liposomes after intravenous injection  
 $^3\text{H}$ -labeled PEG-modified liposomes were intravenously injected to B16F10 (WT) or B16F10/VEGF-C (VEGF-C) tumor-bearing mice via the tail vein. The mice were sacrificed, and their organs, tumor, and major lymph nodes were removed at 3 h after injection. Then, the radioactivity in each organ was determined. Data are presented as percent of the injected dose per 100-mg tissue weight and S.E. (n=6) in each tissue. Significant differences are indicated as follows; \*  $P < 0.05$ .

以上の結果から、腫瘍リンパ管新生はリポソームを用いたがんへの標的化において、その効率化の鍵を握る因子の一つであり、また抗がん剤封入リポソーム製剤を用いたがん治療においても、その治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられた。

### 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 14 件、うち 12 件査読有)

1. Piyaviriyakul S, Shimizu K, Asakawa T, Kan T, Siripong P, Oku N. :

- Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. Biol Pharm Bull. 34, 396-400 (2011) 査読有
2. Oku N, Yamashita M, Katayama Y, Urakami T, Hatanaka K, Shimizu K, Asai T, Tsukada H, Akai S, Kanazawa H.: PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes. Int J Pharm., 403, 170-7 (2010) 査読有
  3. Shimizu K, Ida T, Tsutsui H, Asai T, Otsubo K, Oku N.: Anti-obesity effect of phosphatidylinositol on diet-induced obesity in mice. J. Agric. Food Chem., 58, 11218-11225 (2010) 査読有
  4. Shimizu K, Osada M, Takemoto K, Yamamoto Y, Asai T, Oku N.: Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane. J. Control. Release, 141, 208-215 (2010) 査読有
  5. Shimizu K, Kinouchi Shimizu N, Hakamata W, Unno K, Asai T, Oku N.: Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice. Biol. Pharm. Bull., 33, 117-121 (2010) 査読有
  6. Murase Y, Asai T, Katanasaka Y, Sugiyama T, Shimizu K, Maeda N, Oku N.: A novel DDS strategy, "dual-targeting", and its application for antineovascular therapy. Cancer Lett., 287, 165-171 (2010) 査読有
  7. Urakami T, Kawaguchi AT, Akai S, Hatanaka K, Koide H, Shimizu K, Asai T, Fukumoto D, Harada N, Tsukada H, Oku N.: In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. Artif. Organs, 33, 164-168 (2009) 査読有
  8. Katanasaka Y, Ida T, Asai T, Shimizu K, Koizumi F, Maeda N, Baba K, Oku N.: Antiangiogenic cancer therapy using tumor vasculature-targeted liposomes encapsulating 3-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,3-dihydro-indol-2-one, SU5416. Cancer Lett., 270, 260-268 (2008) 査読有
  9. Shimizu K, Kinouchi Shimizu N, Asai T, Tsukada H, Oku N.: Enhanced experimental tumor metastasis with age in senescence-accelerated mouse. Biol. Pharm. Bull., 31, 847-851 (2008) 査読有

- 有
10. Asai T, Miyazawa S, Maeda N, Hatanaka K, Katanasaka Y, Shimizu K, Shuto S, Oku N.: Antineovascular therapy with angiogenic vessel-targeted polyethyleneglycol-shielded liposomal DPP-CNDAC. Cancer Sci., 99, 1029-1033 (2008) 査読有

[学会発表] (計9件)

1. Kosuke Shimizu *et al.*: Liposomal tumor targeting and tumor lymphangiogenesis. LRD/LLMB 2010 Conference 2010年8月4~7日 (Vancouver, Canada)
2. 清水広介ら: 腫瘍リンパ管新生が及ぼす薬物ナノキャリア腫瘍移行性への影響. 第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2010年5月29日 (名古屋)
3. 清水広介ら: 腫瘍リンパ管新生がリポソームのがん集積性に与える影響. 日本薬剤学会第25年会 2010年5月12日 (徳島)
4. 山口里美ら: リポソーム腫瘍内挙動に対するリンパ管新生の影響. 日本薬学会第130年会 2010年3月29日 (岡山)
5. Satomi Yamaguchi *et al.*: Involvement of lymphangiogenesis in tumor-targeting liposomal delivery. 4th International Liposome Society Conference 2009年12月14日 (London, UK)
6. 山口里美ら: リンパ管新生が及ぼすリポソームの腫瘍集積性への影響. 第25回日本DDS学会 2009年7月3日 (東京)
7. 山口里美ら: リンパ管新生が及ぼすリポソームの腫瘍内挙動への影響. Biochemistry and Molecular Biology 2008 2008年12月9日 (神戸)
8. Kosuke Shimizu *et al.*: Tumor-targeting liposomal DDS and lymphangiogenesis. 11th Liposome Research Days Conference 2008年7月20日 (Yokohama, Japan)
9. 清水広介ら: リポソームの腫瘍受動標的化におけるリンパ管新生の影響. 第24回日本DDS学会 2008年6月30日 (東京)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 広介 (SHIMIZU KOSUKE)  
静岡県立大学薬学部・静岡県立大学大学院薬  
学研究科 助教  
研究者番号：30423841

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：