

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790137

研究課題名（和文）

トランスフェリンレセプター発現リズムを指標とする新規時間薬物送達システムの構築

研究課題名（英文）Molecular basis for the dosing-time dependent change in the intratumoral delivery of oxaliplatin by transferrin-targeting liposomes

研究代表者 松永 直哉(MATSUNAGA NAOYA)

（九州大学・大学院薬学研究院・助教）

研究者番号：10432915

研究成果の概要（和文）：種々の生体機能や疾患症状には日周リズムが存在し、その分子機構が明らかとされてきている。また、薬物の効果・副作用は投薬時刻により変化する。これら研究成果により、投薬時刻を加味した治療、時間治療がさまざまな疾患で実施されている。しかし抗腫瘍薬に関しては実用化に及んでいない。その理由として、抗腫瘍薬の至適投薬タイミングを設定するためのリズムマーカーの同定および選択と、そのマーカーを指標に投薬する薬剤の種類に限りがあることが考えられる。我々は、癌細胞で著しく発現が亢進するトランスフェリンレセプター（TfR）の発現に、日周リズムが存在することを発見し、癌時間治療のリズムマーカーとして利用可能な所見を得た。そこで本研究では、癌細胞に発現する TfR をリズムマーカーとして用い、そのリズムに合わせてトランスフェリンリポソーム化製剤を投薬し、効率的に癌細胞に送達させる。これら一連の、リズム診断 至適投薬タイミングの設定 薬物投与・癌細胞への薬物送達といった時間薬物送達システムの構築を目指している。平成 20 年度では、トランスフェリンリポソーム化オキサリプラチン（Tf-OHP）の抗腫瘍効果におよぼす投薬タイミングの検討をした。Colon26 を移植した BALB/c マウス を対象に、抗腫瘍効果を指標として Tf-OHP 投薬時刻の影響を検討した結果、9:00 比較し 21:00 投与群において有意に抗腫瘍効果が増強した。Colon26 を移植した BALB/c マウス を対象に、9:00 または 21:00 に Tf-OHP を投与し血液中および腫瘍内 Pt 量を測定した結果、9:00 比較し 21:00 投与群において腫瘍ない Pt 量が有意に増強した。平成 21 年度では、TfR 発現リズム解析を行い、TfR のリズムマーカーとしての有用性を検証した。その結果、TfR 発現リズムは cMyc により制御され、それらをマーカーとし抗腫瘍効果を増強可能であることを明らかとした。本研究より、リポソーム製剤が投薬時刻を変えることで効果を増強できることを初めて立証した。また、新規の DDS 開発に有用なストラテジーの構築に至った。

研究成果の概要（英文）：Liposomes with ligands bonded to their external membrane surface have been

studied in order to provide a method for delivering drugs or genes selectively to a target region. Transferrin N-glutaryl-dioleoyl-Phosphatidylethanolamine (Tf-NGPE) liposomes were designed as intracellular targeting carriers of chemotherapeutic drugs into tumors. This study showed that the intratumoral delivery of a platinum (Pt)-based anticancer drug, oxaliplatin (L-OHP), using Tf-NGPE liposomes varied depending on the 24-hr variation in the expression of transferrin receptors on tumor cells. Colon 26 tumor-bearing mice were housed under standardized light/dark cycle conditions (lights on at 07:00 h, off at 19:00 h) with food and water *ad libitum*. The growth of tumor cells implanted in mice was more severely inhibited by intravenous injection of Tf-NGPE liposome encapsulated with L-OHP (L-OHP: 7.5 mg/kg) in the early dark phase than when it was injected in the early light phase. The dosing-time dependency of the anti-tumor effect was parallel to that of Pt incorporation into tumor DNA. Luciferase reporter and chromatin immunoprecipitation analyses revealed that c-Myc regulated the 24-hr oscillation of type 1 transferrin receptor (TfR1) expression in tumor cells, which underlay the dosing-time-dependent changes in the internalization of Tf-NGPE liposome-delivered L-OHP into the tumor cells. These results suggested that intratumoral delivery of chemotherapeutic drug using Tf-NGPE liposomes is enhanced by administering the drug when tumor expression of TfR1 is abundant. The potent therapeutic efficacy of such an intracellular targeting drug delivery system (DDS) could be enhanced by optimizing the dosing schedule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

生体リズムは生物界に広く普遍的に存在する生命現象であり、近年、一連の遺伝子群（時計遺伝子）が約 24 時間周期で発現の増減を繰り返すことが、リズム発振の中心機構であることが明らかになってきた。哺乳類動物における生体リズム中枢（体内時計）は視床下部の視交叉上核(SCN)に位置し、神経の活動性やホルモン分泌、免疫、代謝機能など多くの生体機能の日周リズムを制御している。また、細胞の増殖能なども一日の中の特定の時間帯に亢進する。一方、癌化した細胞では正常細胞と異なった細胞増殖リズムや増殖因子の合成分泌リズムを示し、その機序として時計遺伝子の発現量との関連性が示唆されている。

薬物の効果や副作用の程度もまた、これら生体リズムが成因となり投薬する時刻によって変化する。現在までのところ、気管支喘息薬治療、副腎皮質ホルモン、降圧薬、高脂血症治療薬などで時間薬物療法がなされているが、抗腫瘍薬などその他の薬物に関しては実際の治療には応用されるに至っていない。当研究室では、動物実験レベルにおいて腫瘍細胞増殖能や血中腫瘍増殖因子の日周リズムを指標とした至適投薬時刻の設定により、抗腫瘍薬の効果増強および副作用軽減が可能になることを明らかとしている。しかしながら、実用面では、抗腫瘍薬の至適投薬タイミングを設定するためのバイオマーカー（リズムマーカー）の同定および選択と、そのマーカーを指標に投薬する薬剤の種類に限りがあることが妨げとなり、臨床応用されるまでに至っていない。

申請者はここ数年間一貫して「生体リズムを基盤とした医薬品の適正使用方法に関する研究」に力を注ぎ、薬の効果が投薬時刻の違いにより変化する原因を、体内時計の分子機

構との関連から明らかとしてきた。また、体内時計に着目した発癌メカニズムの解明研究を基盤として(第 124 回日本薬学会 大阪)、抗腫瘍薬の時間治療に応用可能な新たなリズムマーカーの検索を行ってきた。最近の基礎研究において、癌細胞で著しく発現が亢進するトランスフェリンレセプターの発現に、日周リズムが存在することを発見し、抗腫瘍薬の至適投薬タイミングを設定するためのリズムマーカーとして、新たに利用可能な所見を得た。そこで本研究では、癌細胞に発現するトランスフェリンレセプターをリズムマーカーとして用い、そのリズムに合わせトランスフェリンリポソーム化製剤を投薬し、効率的に癌細胞に送達させる。これら一連の、リズム診断 至適投薬タイミングの設定 薬物投与・癌細胞への薬物送達といった時間薬物送達システムの構築を目指し、下記に示す年次計画を予定している。

2. 研究の目的

本研究の独創的な点は、癌細胞に発現するトランスフェリンレセプターの日周リズムに着目し、トランスフェリンレセプターを標的とする新規時間薬物送達システムの構築を目指すところにある。また、癌細胞の増殖と深く関連しているトランスフェリンレセプターの発現リズムの成因解明をし、時間薬物送達システムを実践展開するための、より有用な方策を提示する点に大きな特色がある。

トランスフェリンレセプターは、鉄飽和トランスフェリンと結合し細胞内に鉄を取り込む 95kD の糖タンパク質である。生体内の各組織にユビキタスに発現し、そのほとんどがリガンドであるトランスフェリンが結合している状態にある。しかし、増殖の盛んな癌細胞においては、著しい発現の亢進が認められる。そのため癌細胞をターゲットとした薬物送達技術や、ガリウムシンチグラフィといった悪性腫瘍の診断などにも応用さ

れ、癌化学療法の進展に期待を寄せられている分子である。

今日の癌治療では、個別化医療の試みが進められており、特に分子標的薬を用いた治療において、薬剤の感受性予測、有効性を評価するバイオマーカーが重要視されている。同じように癌の時間薬物療法を実施する際、抗癌剤に対する生体の感受性、薬物動態のリズムを加味するための指標となる、バイオマーカー(リズムマーカー)の同定および選択が必要である。本研究においては、トランスフェリンレセプターをリズムマーカーとして用い、癌細胞の細胞動態リズムを予期し至適投薬タイミングを設定する。また、癌細胞の細胞動態リズムが、正常細胞と同じか異なるか(リズムの位相が同じか異なるか)が重要となるが、本研究では癌細胞に発現の亢進が認められるトランスフェリンレセプターを直接標的とした薬物送達技術を用いることで、正常細胞への影響を最小限にすることを考慮している。

これまでに実験動物レベルにおいて、腫瘍細胞増殖能や血中腫瘍増殖因子の日周リズムを指標とした至適投薬時刻の設定により、抗腫瘍薬の効果増強および副作用軽減が可能になることを明らかとしている。しかしながら、至適投薬タイミングを設定するためのリズムマーカーの同定および選択と、そのマーカーを指標に投薬する薬剤の種類に限りがあるなどの問題点により臨床応用されていない。そこで、本研究ではトランスフェリンレセプターをリズムマーカーとし、そのマーカーを標的とするトランスフェリンリボソーム化製剤を用いた、新規の時間薬物送達システムを構築することでこれら問題点を克服し、そしてより効率的で有効性の高い癌の個別化療法(テーラーメイド医療)に貢献できるものとする。

3. 研究の方法

平成 20 年度 ; トランスフェリンリボソーム化オキサリプラチンの抗腫瘍効果におよぼ

す投薬タイミングの検討

【実験 1 . 抗腫瘍効果に及ぼす投与量の影響】 colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を対象に、9:00 または 21:00 に上記 2 剤を投与し、抗腫瘍効果を指標として投与量を設定する。オキサリプラチン量として 0, 1, 2.5, 5 mg/kg を各群 5 匹に尾静脈から単回投与し、経日的に平均腫瘍重量を約 3 週間測定する。

【実験 2 . 抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響】 colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を対象に、抗腫瘍効果を指標として投薬時刻の影響を検討する。実験 1) より設定した投与量の薬剤を、9:00 または 21:00 に各群 10 匹に尾静脈から単回投与し、経日的に平均腫瘍重量を約 3 週間測定する。

【実験 3 . 薬物動態に及ぼす投薬時刻の影響】 colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を対象に、実験 1) より設定した投与量の薬剤を 9:00 または 21:00 の各投薬時刻および各採血時刻群 10 匹に尾静脈から単回投与する。投薬後 0, 1, 3, 6, 18 時間目にマウスを頸椎脱臼させた後、心採血および腫瘍を採取し、原子吸光度計を用い血液中および腫瘍内オキサリプラチン量を測定し、薬物動態学に及ぼす投薬時刻の影響を検討する。

【実験 4 . 腫瘍移植マウスの血清可溶性トランスフェリンレセプターの発現リズム測定】トランスフェリンレセプターは増殖の盛んな癌細胞において高発現しているため、診断、治療の標的分子として有用視されている。また、そのトランスフェリンレセプターの一部は、血清中遊離し血清可溶性トランスフェリンレセプターとなる。colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を用い、9:00,13:00,17:00,21:00,1:00,5:00 のいずれかにマウスを頸椎脱臼後を心臓採血し、血清可溶性トランスフェリンレセプター量を ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素免疫測定法)により測定し、リズムマーカーとしてまた、薬剤感受性マーカーとしての可能性を検討する。

平成 21 年度 . 腫瘍におけるトランスフェリンレセプターの日周リズムの制御機構の解析

【実験 1 . 分子イメージング技術を利用した、腫瘍内トランスフェリンレセプター発現リズムの機能評価】トランスフェリンリボソームに蛍光プローブを封入した、分子イメージングプローブを作製する。colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を用い、

尾静脈からトランスフェリンリポソーム化分子イメージングプローブを単回投与する。プローブ投与後イソフルランによりマウスに麻酔をかけ、蛍光トモグラフィーにより腫瘍を経時的に測定し、トランスフェリンレセプター発現リズムの機能を解析する。また、トランスフェリンレセプターmRNA およびタンパクレベルの日周リズムは測定済みである。

【実験2．トランスフェリンレセプター発現におよぼす時計遺伝子の影響】体内時計の本体は時計遺伝子群によって構成される Feedback Loop 機構であることが明らかとされているが、トランスフェリンレセプターの転写リズムに及ぼす時計遺伝子の影響については明らかとされていない。そこで、マウスDNAを鋳型としてトランスフェリンレセプターのプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターを構築する。レポーターベクターおよび各種時計遺伝子発現ベクターを6well plateに播種した colon26 にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、トランスフェリンレセプター遺伝子の発現への影響について検討する。これらの実験によりトランスフェリンレセプターの発現に影響を及ぼす因子が明らかとなれば、トランスフェリンレセプタープロモーターを deletion または、転写因子結合配列を変異させ遺伝子発現調節領域の解析を行う。また、各時計遺伝子の発現ベクターは調整済みである。

【実験3．トランスフェリンレセプター発現リズム制御配列の機能解析】我々は培養細胞に、デキサメタゾン刺激を施すことにより、ルシフェラーゼ活性を指標に生体内で見られる遺伝子発現の約29時間周期のリズムを、in vitro で再現することに成功している。そこで、実験2で同定したトランスフェリンレセプタープロモーターの転写リズム制御配列を合成し、ルシフェラーゼベクターに合成配列を挿入したレポーターベクターを作製

する。そのベクターを35mm dishに播種した Colon26 にトランスフェクションし、その細胞にデキサメタゾン刺激を加え、ルシフェラーゼ活性を luminescent 法によりリアルタイムに測定を行い、同定したリズム制御配列の重要性を検証する。

【実験4．トランスフェリンレセプタープロモーター領域における転写因子結合の日周リズムの解析】実験2)3)の結果をもとに、実際に vivo においてトランスフェリンレセプタープロモーターの転写調節配列に、同定した時計遺伝子が結合しているか否か確認する。colon26 をフットパットに移植した BALB/c マウス を用い、9:00,13:00,17:00,21:00,1:00,5:00 のいずれかに腫瘍を採取しクロマチン免疫沈降法(Chipアッセイ)を行う。Chipアッセイにより、トランスフェリンレセプタープロモーター領域における転写因子の経時的な結合量の変化を明らかとし、実験2)3)の結果を vivo において検証する。

【実験5．時計遺伝子ノックダウン細胞を用いた、トランスフェリンレセプター遺伝子の発現リズム制御解析】実験2)3)4)により同定したリズム制御因子を shRNA によりノックダウンしトランスフェリンレセプター発現リズムに及ぼす影響を検討する。10mm dish に播種した colon26 に shRNA をトランスフェクション後、抗生物質により細胞をセレクトし、セレクトした細胞を BALB/c マウスに移植し解析を行う。上記6時点のいずれかに腫瘍を採取し total RNA を抽出する。トランスフェリンレセプターmRNA 発現リズムを RT-PCR 法を用い測定し評価する。なお、遺伝子ノックダウン細胞作製方法については整備済みである。

4．研究成果

平成20年度では、トランスフェリンリポ

ソーム化オキサリプラチン (Tf-OHP) の抗腫瘍効果におよぼす投薬タイミングの検討をした。Colon26 を移植した BALB/c マウスを対象に、抗腫瘍効果を指標として Tf-OHP 投薬時刻の影響を検討した結果、9:00 比較し 21:00 投与群において有意に抗腫瘍効果が増強した。Colon26 を移植した BALB/c マウスを対象に、9:00 または 21:00 に Tf-OHP を投与し血液中および腫瘍内 Pt 量を測定した結果、9:00 比較し 21:00 投与群において腫瘍ない Pt 量が有意に増化した。平成 21 年度では、TfR 発現リズム解析を行い、TfR のリズムマーカーとしての有用性を検証した。その結果、TfR 発現リズムは cMyc により制御され、それらをマーカーとし抗腫瘍効果を増強可能であることを明らかとした。本研究より、リポソーム製剤が投薬時刻を変えることで効果を増強できることを初めて立証した。また、新規の DDS 開発に有用なストラテジーの構築に至った。

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 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

岡崎史泰、松永直哉、丸山一雄、小柳悟、大戸茂弘. 1Transferrin receptor 標的リポソーム製剤の至適投薬タイミングの検討 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2008年12月20日-12月21日、京都)

岡崎 史泰 松永 直哉 丸山 一雄 小柳悟 大戸茂弘. トランスフェリン標的リポソーム製剤の至適投薬タイミングの検討 日本薬剤学会 第 23 年会 (2008 年 5 月 20 日-5 月 22 日、札幌)

Shigehiro Ohdo, Fumiyasu Okazaki, Kazuo Maruyama, Naoya Matsunaga, Satoru Koyanagi.

Dosing-time dependent antitumor effects of Transferrin-Liposome Oxaliplatin (Tf-Lip-L-OHP) in tumor bearing mice LRD2008 11th liposome research days conference (JULY 19-22, 2008 - YOKOHAMA)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称 : METHOD FOR DOSING TRANSFERRIN RECEPTOR-TARGETING LIPOSOMES OPTIMIZING DOSAGE TIMING

発明者 : 大戸(代表)、松永
権利者 : 九州大学
種類 : 国際特許
番号 : QP090055-US
出願年月日 : 2009-09-22
国内外の別 : 国外

取得状況 (計 1 件)

発明者 : 大戸(代表)、松永
権利者 : 九州大学
種類 : 国際特許
番号 : QP090055-US
出願年月日 : 2009-10-14
国内外の別 : 国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 松永 直哉
(10432915)

研究者番号 :

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :