

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300179

研究課題名（和文） 制がん剤封入型バイオナノ粒子による腫瘍標的治療創薬

研究課題名（英文） Development of Therapeutic Drugs Targeting Cancer with Bio-Nanoparticle Encapsulating Anti-Cancer Reagents

研究代表者

妹尾 昌治（SENO MASAHARU）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：90243493

研究成果の概要（和文）：リポソームおよびタンパク質からなるバイオナノ粒子を運搬体としてがん細胞に特異的な細胞表面分子を標的するデザインを施し、さらに制がん剤を内封させて、がん細胞の標的を試みた。標的効果を促す様々な要因を検討したところ、粒子表面にリガンドを多価で提示する事により、標的細胞内へ粒子が取り込まれること、標的デザインによりがん細胞との接触時間が短縮できること、リン脂質の選択により正常免疫細胞への取り込みが抑制できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We tried to establish drug delivery systems, targeting cancer cells specifically, using bio-nano-particle composed of liposome and/or proteins as a carrier of anti-cancer reagents. Multivalent design of the carrier to present antibodies or ligands with high affinity to cell surface molecules was found to stimulate endocytosis of the particles. The targeting with the antibodies and ligands made the targeting efficient showing the incubation time of particle with the target cells clearly shorter. Furthermore, the particle escaped from phagocytic macrophages when lipid component was optimized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：制がん剤、ErbB2、CD44、DDS キャリア、分子標的、細胞表面マーカー、DNA マイクロアレイ、球面自己組織化マップ

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは従来から、遺伝子組換えにより生産されるB型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原（L-タンパク質）が形成する中空ナノ粒子およびこの性質を利用するリポソーム複合体を「バイオナノ粒子」と呼び、細胞や組織をピンポ

イントに標的できるドラッグデリバリーシステムのベクターとして提唱した（Yamada et al., Nature Biotechnol, 2003）。このバイオナノ粒子はHBVの能力を応用してヒト肝臓細胞を正確に標的する能力を備えているが、これまでの研究でこの粒子は表面に抗体やペ

プチドリガンドおよび糖質を結合してがん細胞に対する親和性を付与して、その細胞を生体内で効率よく標的することを可能にした (Tsutsui et al. J. Control. Release, 2007)。たとえば、ErbB2に対して親和性のあるEC-1ペプチド (S. C. Pero et al., Int. J. Cancer 2004) がin vivoにおいて分子標的に利用できることおよびこれを提示するバイオナノ粒子はErbB2過剰発現細胞を標的できる事をそれぞれ予備検討で明らかにしてきた。さらに、私たちは新規標的分子を決定するために細胞表面マーカーDNAマイクロアレイ (ヒト、ラット、マウスの細胞表面タンパク質マーカーに特化してそれぞれ1000から2000のプローブを搭載している) を独自にデザインした (Tuoya et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005)。データのクラスター解析には、情報を球面上に配置する「球面自己組織化マップ (球面SOM)」を採用して、神経芽腫細胞の細胞表面マーカーの特定を試みた (Tuoya et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008)。その結果、腫瘍細胞に共通に発現して正常組織では発現が検出できない細胞表面マーカーの特定が70%以上の高効率で可能であることを示した。そこで、ヒトの脳腫瘍由来細胞株を用いて球面SOM解析した結果、用いたすべての腫瘍由来細胞で発現しているが正常脳では発現が検出できない細胞表面抗原としてCD44が特定できた。脳腫瘍のマーカーとしてのCD44は初めての知見である。

さらに、用いる制癌剤候補も重要である。当研究室においてシスプラチンの水溶性の硝酸誘導体が塩素イオン存在化で簡便にシスプラチンへ変化する反応を利用して、硝酸配位体をリポソームに封入させてから塩素イオン濃度を加えると、シスプラチンを直接リポソームへ封入する場合に比べて約300倍量のシスプラチンを封入できる事を見出した。こ

の他に、リポソームとしてフォスファチジルセリンを利用するとドキソルビシンの封入効率が上がる事も見出している。これらの剤型の試みは世界でも新しい技術であるので、米国国立がん研究所および、中国天津医科大学附属腫瘍病院と私たちとの間で本技術を基本とする乳がん治療研究の取り組みを共同で行うべく準備が始まっている。このように、本研究は客観的にも独創的なコンセプトに基づいており、国際的な協力関係にまで発展させることのできる研究課題である。

## 2. 研究の目的

以下の4項目を検討して、制がん剤封入型分子標的医薬の原型を完成させる。

- (1) バイオナノ粒子のErbB2標的型とCD44標的型デザインを完成させる。
- (2) 新たながん細胞表面マーカーの特定とそのリガンドのデザインを行う。種々の癌由来細胞を対象としてこのマイクロアレイ解析を行い、新たに候補として特定された複数の細胞表面マーカーに対するリガンドや抗体を準備する。
- (3) 制がん剤を封入した剤型の検討を行う。
- (4) 制がん剤を封入した剤型の分子標的による薬効を評価する。

## 3. 研究の方法

- (1) バイオナノ粒子のErbB2標的型とCD44標的型デザインを完成させる。

### ① ErbB2標的型デザイン

バイオナノ粒子およびリポソームの表面上に、それぞれEC-1ペプチドおよびトラストズマブ (Trastuzumab) を提示させErbB2標的型デザインを調製した。特にEC-1ペプチドはIgG-Fcとの融合タンパク質をデザインし、ヒンジ領域の有無により単量体と2量体を準

備し、比較検討した。

② CD44標的型デザイン

CD44のリガンドであるヒアルロン酸および抗CD44モノクローナル抗体を調製して、リポソーム表面上に提示してCD44標的型デザインの構築を試みた。

(2) 新たながん細胞表面マーカーの特定とそのリガンドのデザイン。

種々の癌由来細胞を対象としてマイクロアレイ解析を行い、新たな細胞表面マーカーの特定を試みると同時に、血管新生や転移に関わるとされるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に対するリガンドや抗体を新たな標的型デザインに加える。

(3) 制がん剤を封入した剤型の検討。

シスプラチンおよびパクリタキセル誘導体を封入する剤型について検討した。

① シスプラチンについては、すでに硝酸誘導体により高効率な封入が可能となったので、これを封入のコントロールとする剤型の検討を行った。

② パクリタキセルについてはシスプラチン同様難水溶性のため、7位をグリコシル化によりパクリタキセルの水溶性が10倍増す事を利用してリポソームへの封入について検討を行った。

(4) 制がん剤を封入した剤型の分子標的による薬効を評価する。

① シスプラチンについては、すでに硝酸誘導体により高効率な封入が可能となったので、これを封入のコントロールとする剤型の検討を行った。

② パクリタキセルについてはシスプラチン同様難水溶性のため、7位をグリコシル化によりパクリタキセルの水溶性が10倍増す事を利用してリポソームへの封入について検討を行った。

4. 研究成果

(1) バイオナノ粒子のErbB2標的型とCD44標的型デザインを完成させる。

① ErbB2標的型デザイン

EC-1ペプチドのIgG-Fcとの融合タンパク質EC-FcはErbB2を認識するが単量体では細胞内への移行を促進しない細胞があった。また、2量体形成するEC-Fcで検討したところ細胞内移行が顕著に観察された。そこで、このリガンドを多価で結合したバイオナノ粒子を調製して細胞を標的したところErbB2過剰発現細胞では粒子の細胞内への移行が効率よく起こる事が示された。この細胞内移行はトラスツマブでも同様に観察され、粒子表面へ多価で提示するデザインが有効である事が明らかとなった。しかし、粒子表面上を完全に覆う様なリガンド結合デザインはむしろ標的効率を下げる事が判明し、結合量には最適値が存在する事が示唆された。バイオナノ粒子であれば約20%で効率が最大となった。このように多価で細胞表面上に結合させて細胞内移行を促進できることを示した事は重要な知見である。特にこの研究で明らかになった点は、細胞によりErbB2の内在化効率に大きな差がある事である。たとえば、ErbB2過剰発現細胞として知られるヒト乳がん由来SK-BR3細胞とヒト卵巣がん由来SK-OV3細胞を較べるとEC-1ペプチドやトラスツマブ単体ではSK-BR3細胞ではErbB2は内在化しないのに対し、SK-OV3細胞では比較的容易に内在化が起こる。しかし、どちらの細胞でも、多価にデザインしたリガンドにより内在化が誘導される。これらの結果より、リガンドを多価でデザインする事により

標的依存的に薬剤の細胞内導入が可能であることが明らかとなり、DDSへの応用に向け非常に意義ある知見となった。

② CD44標的型デザイン

ヒアルロン酸を用いるデザインはヒアルロン酸自身の分子量が大きいためリポソームなどの粒子を調製しても粒径が大きく利用が制限されると考えられた。そこで、CD44の分子標的には抗CD44モノクローナル抗体を提示するリポソーム表面上に提示してCD44標的型デザインにより、脳腫瘍由来細胞の標的を検討した結果、CD44はモノクローナル抗体単独の標的により細胞内移行が認められたため、リポソーム表面への提示はトラスツマブと同程度の結合量で分子標的を行う事が可能であった。

(2) 新たながん細胞表面マーカーの特定とそのリガンドのデザイン。

MMP2の分子標的に有効とされるエジプトサソリの毒素クロトキシシン (CTX) は約30アミノ酸からなるペプチドであるが、MMP2に対する高い特異性を持つ。そこで、CTX-Fc融合タンパク質を調製して標的能力の検討を行った。EC-1とは異なり、CTXは2量体よりも単量体で細胞特異的な細胞内移行を示したことからバイオナノ粒子には単量体を提示させて分子標的の実験を行った。その結果、MMP2依存的な脳腫瘍細胞の標的が可能であった。これと同時に世界初の成果として進行しているがん幹細胞モデルの研究では肺への転移性を示した細胞でMMP2発現量が顕著に亢進していることが分かったため、このMMP2標的型デザインは、抗CD44抗体との併用も考えられ、今後その重要性を一層に増すと考えられる。

(3) 制がん剤を封入した剤型の検討と分子

標的による薬効評価。

① 抗CD44抗体を提示するCD44標的型リポソームについては、今までの実績を活かして、硝酸誘導体を利用してシスプラチンを高効率に封入し、ヒトグリオーマ細胞株U251細胞を用いてin vitroおよびin vivoにおける標的実験を行った。その結果、in vitroでは抗CD44抗体を結合したリポソームによりシスプラチンの毒性はIC<sub>50</sub>で判定すると約100倍となり、奏功に要する時間にはシスプラチン単体と較べて変化が無かった。このことは局所的にシスプラチンを十分量投与しても副作用や急性毒性は起こり難いと考えられた。この結果から予想される通り、in vivoでも腫瘍の成長を有意に抑制した。

② グリコシル化した水溶性パクリタキセルをトラスツマブを提示するErbB2標的型リポソームに封入して、SK-BR3細胞の標的実験を行った。水溶性が10倍増したことでパクリタキセルとしての細胞毒性は1/10となったがリポソームへの封入効率は約100倍上昇した。これにより、有意な量のパクリタキセル誘導体事を利用して細胞特異的な細胞毒性を示す事ができた。特に、in vitroにおいてパクリタキセル単体の奏功時間を約15時間から1/3の約5時間へ短縮する事が可能であった。このことから、in vivoでの副作用の低減が十分に期待される結果となった。

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7件)

① Tan H, Li YG, Chen L, Kudoh T, Kasai T, Seno M. The conformational polymorphism of green fluorescent protein. Molecular Biology 査読有,

- Vol.46, No.1, 2012, 156-161.
- ② Vaidyanath A, Hashizume T, Nagaoka T, Takeyasu N, Satoh H, Chen L, Wang J, Kasai T, Kudoh T, Satoh A, Fu L, Seno M. Enhanced internalization of ErbB2 in SK-BR-3 cells with multivalent forms of an artificial ligand. *J Cell Mol Med*. 査読有, Vol.15, No.11, 2011, 2525-2538.
- ③ Hamamoto K, Yamada S, Hara A, Kodera T, Seno M, Kojima I. Extracellular matrix modulates insulin production during differentiation of AR42J cells: functional role of Pax6 transcription factor. *J Cell Biochem*. 査読有, Vol.112, No.1, 2011, 318-29.
- ④ Tan H, Li Y, Chen L, Kasai T, Seno M. Construction of a high-efficiency multi-site-directed mutagenesis. *African J Biotechnol*. 査読有, Vol.10, No.3, 2011, 449-452.
- ⑤ Tan H, Fu L, Seno M. Optimization of Bacterial Plasmid Transformation Using Nanomaterials Based on the Yoshida Effect. *Int J Mol Sci*. 査読有, Vol.11, No.12, 2010, 4962-4972.
- ⑥ Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihata M, Matsui H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials*. 査読有, Vol.30, 2009, 1746-1755.
- ⑦ Abou-Sharieha S, Sugii Y, Tuoya, Yu D, Chen L, Tokutaka H, Seno M. Identification of TM9SF2 as a Candidate of the Cell Surface Marker Common to Breast Carcinoma Cells. *Clin Oncol Cancer Res*. 査読有, Vol.6, 2009, 1-9.
- [学会発表] (計 17 件)
- ① G. Jin. The functional role of eosinophilic cationic protein in cardiomyocyte differentiation of P19CL6 cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ② S. Matsuda. Analysis of CSC-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cell. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ③ Y. Yasui. Evaluation of resistance against phagocytosis of liposome composed of phosphatidyl D-serine. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ④ Y. Uchida. CD44 protein targeting on the surface of glioma cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ⑤ M. Murakami. Targeting human breast cancer cells and ovary cancer cells with liposomes encapsulating glycosylated Paclitaxel. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ⑥ M. Seno. Cancer Stem cell Model Derived from Mouse iPS Cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
- ⑦ S. Matsuda. Analysis of endothelium mimicry by the CSC-like cells derived from iPS cells. The American Society for Cell Biology 2011 Annual Meeting, 2011.12.3-7, デンバー、米国.
- ⑧ M. Seno. ErbB2 targeting liposome loading glycosylated Paclitaxel. 22nd French-Japanese Symposium of Medicinal and Fine Chemistry, 2011.11.11-14, ルーアン、フランス.
- ⑨ M. Ikeda. Identification of TNBC-related genes and clustering of breast cancer cases by spherical selforganizing map. 情報計算化学生物学会, 日本バイオインフォマティクス学会 The 2011 Joint Conference of CBI & JSBi, 2011.11.8-10, 神戸.
- ⑩ M. Okada. Phosphatidyl D-serine containing liposome why long blood retention time. 日本癌学会 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋.
- ⑪ L. Chen. A Cancer stem cell model derived from mouse iPS cells exhibits extensive angiogenesis and metastasis. 日本癌学会 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.3, 名古屋.
- ⑫ 岡田将史, Development of cisplatin immunoliposome targeting ErbB2 overexpressing cancer. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010.12.7-10, 神戸.
- ⑬ 村上雅春, Encapsulation of glycosylated paclitaxel into liposome targeting Her2. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010.12.7-10, 神戸.
- ⑭ 村上慶太郎, Synthesis and characterization of phosphatidyl-D-serine as a

component of DDS carrier. 第 33 回  
日本分子生物学会年会 第 83 回 日本  
生化学会大会 合同大会, 2010.12.7-10,  
神戸.

- ⑮ 峯松秀希, 標的指向性リポソームを利用した造影剤の開発, 第 33 回 日本分子生物学会年会 第 83 回 日本生化学会大会 合同大会, 2010.12.7-10, 神戸.
- ⑯ 妹尾昌治, Molecular targeting of cells overexpressing ErbB2 with an artificial peptide ligand. 2010 Tianjin International Breast Cancer Symposium, 2010.10.22-27, 天津、中国.
- ⑰ 妹尾昌治, A model of cancer stem cell line derived from mouse induced pluripotent stem cell. 第 69 回 日本癌学会学術総会, 2010.9.22-24, 大阪.

[図書] (計 2 件)

- ① Yuh Sugii, Takayuki Kudoh, Takayuki Otani, Masashi Ikeda, Heizo Tokutaka, Masaharu Seno. InTech, Chap.20, Clustering Genes, Tissues, Cells and Bioactive Chemicals by Sphere SOM. In: Self Organizing Maps - Applications and Novel Algorithm Design (ed. J.I. Mwasiagi), 2011, pp. 371-386.
- ② Tan H and Seno M. Lambert Academic Publishing, Exploring the mechanism for biological evolution: DNA methyltransferase is the pushing power of DNA and protein

evolution. 2011, pp.1-154.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cyber.biotech.okayama-u.ac.jp/enolab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

妹尾 昌治 (SENO MASAHARU)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：90243493

### (2)研究分担者

工藤 孝幸 (KUDOH TAKAYUKI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号：00346412  
水谷 昭文 (MIZUTANI AKIFUMI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号：50598331

### (3)研究協力者

付 麗 (FU LI)  
中国 天津医科大学・教授  
IBRAHIM EL-SAYED  
エジプト メノフェイア大学・教授  
DAVID S. SALOMON  
米国 国立がん研究所・主幹研究員