

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 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590115

研究課題名（和文）2重安全機構を採用した癌指向性の細胞内崩壊性リポソームによる癌治療技術の開発

研究課題名（英文）Development of a cancer treatment technique using intracellular collapsing liposomes directed to cancer with double safety systems

研究代表者 長宗 秀明（NAGAMUNE HIDEAKI）

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40189163

研究成果の概要（和文）：有効かつ安全性の高い、2重安全機構を採用した細菌毒素を用いる新規癌治療技術の開発を目指した。1段目の安全機構を持つ標的可変型の標的化毒素を開発し、これを癌胎児性抗原(CEA)に対するIgGと併用し作製した治療用抗癌剤封入りポソームは、CEA陽性癌細胞に特異的標的化が可能であり、CEA陽性癌細胞移植マウスでは顕著な延命効果も示し有効性が確認された。2段目の安全機構を持つ細胞障害性エフェクター毒素の作製にも成功し、両毒素を用いる標的可変型の新規癌治療技術の開発の目処がたった。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a novel effective and safe technique for cancer treatment using bacterial toxins with dual safety systems. First, a targeting toxin with safety system and the variable targeting ability was developed. It was confirmed that the liposomes enclosed anticancer drug prepared by using the targeting toxin and anti-carcinoembryonic antigen (CEA) IgG could specifically target to CEA-positive cancer cells and were effective to prolong life of mice inoculated with CEA-positive cancer cells. The second cytotoxic effector toxin with safety system was also produced, so the development of a novel technique for the target-variable cancer treatment using both toxins with safety systems came in sight.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計・癌治療法・DDS・細菌毒素

1. 研究開始当初の背景

近年国内外において、癌患者のQOLを重視して、切除手術と抗癌剤の全身投薬による癌療法以外に免疫細胞療法や癌ミサイル療法等が検討されている。そのために癌細胞に特異的かつ効率良く標的化して作用する副作

用の少ない治療薬/ツールの開発が望まれている。例えばモノクローナル抗体などを癌への標的分子として用いる標的化技術やそれにリンクさせる抗癌剤の開発についても多くの検討が成されているが、実際の癌治療においては、それらの標的化分子を目標の癌細胞に大量に集積する技術が十分ではなく、さ

らなる改善が必要である。我々はこれまで、細胞膜やコレステロール(CHL)含有膜に作用し、膜上で大きな環状会合体となり膜孔を形成する細菌毒素のコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)の分子性状や作用機構の解析を行ってきた。その過程で、CDCの膜結合ドメインが、抗CEA抗体を活性化免疫細胞や薬剤封入リポソームに簡単に連結するための有用なアダプターとして利用できることを示した。またCDCの一種インターメディリン(ILY)やストレプトリシン0にSS結合を1つ導入することで立体構造変化を阻害して、細胞膜結合力は持つが膜孔(穴)の形成が阻害される構造改変毒素(CDC-SS変異体)を調製し、それをリポソームや細胞に結合させた後にSS還元反応を行うと容易に膜孔形成が誘導できることも見出した。一方、これまでに抗癌剤をSS結合で抗体に連結した標的化抗体が作られ、癌細胞にエンドサイトーシスされた後に細胞内グルタチオンなどの還元環境で抗癌剤が遊離して薬効を示すことも確認されている。これらの背景からCDC-SS変異体を応用し、細胞外では機能しないよう改変した低副作用性の細菌毒素などの薬剤を高濃度で封入した膜小胞(リポソームなど)を作製し、ここにキャリアーとして癌指向性ペプチドや抗体を連結したCDC-SS変異体を結合させて、(1)癌標的化機能、(2)大量の薬剤の集中送達機能、(3)細胞内のみでの安全な薬剤放出機構(細胞内エンドリソソームでのグルタチオン作用による内容物自動放出性)を持たせた、2重安全機構を採用した効果的な新規の癌治療用ドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築を着想し、開発を試みた。

2. 研究の目的

細菌毒素を遺伝子工学的に改変し、特定の条件でのみ活性を發揮するよう安全機構を施したDDS用の毒素改変体を作製する。これらを用いて有効かつ安全性の高い2重安全機構を採用した細菌毒素を用いる新規癌治療技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) DDS構成要素の作製

① 標的化毒素の調製

CDCを改変して標的化毒素を作製した。CDCは必須基本構造として、分子集合と膜貫入の役割を担うドメイン1-3と細胞膜への結合を担うドメイン4を持つ。数種の候補分子の中から今回は、(i)ドメイン1-3部位の立体構造変化を拘束するSS結合の開裂が調節し易いインターメディリン(ILY)のドメイン1-3(ドメイン2と3間にSS結合を導入)

と、CHL結合性を持ちCHL含有リポソームに連結が容易なスイリシン(SLY)のドメイン4(Cys/Ala置換体)変異体からなるキメラ毒素のN末端に、*S. aureus* IF012732株由来プロテインAの抗体結合ドメインZを融合発現した変異体毒素(Z-mSLY-SS)、(ii)ILYドメイン1-3(ドメイン2と3間にSS結合を導入)と、CHL親和性がSLYよりやや低い*S. mitis*由来ヒト血小板凝集因子(Sm-hPAF)のドメイン4からなるキメラ毒素のN末端に肺癌結合性ペプチド配列(LTBP) [Oyama T. *et al.*, *Cancer Lett.*, 202, 219-230(2003)]を融合発現した変異体毒素(LTBP-mPAF-SS)を用いた。Z-mSLY-SSの発現系の作製方法の詳細は、5項の特許明細書に記載した。LTBP-mPAF-SSの作製方法の詳細は、5項の雑誌論文①に記載した。なお比較分子として用いる各キメラ毒素のZドメイン及びLTBPを欠く分子やLTBP-mSLY-SSも同様な手法で調製した。

各毒素の発現系大腸菌をLB培地で培養し、遠心集菌後、超音波破碎で菌体から組換え体毒素の粗分画を得た。HisTrapHPキレート親和性クロマトグラフィーにより、この粗分画から精製標品を得た。LTBP-mPAF-SS変異体については、HisTrapHPカラムの主分画をさらにHiTrap Butyl HPカラムで精製を行い精製標品を得た。各々の標品はSDS-PAGEで純度確認し、使用まで-80℃にて凍結保存し使用した。

② エフェクター毒素の調製

細胞外においては低毒性であり、細胞内で活性を發揮するエフェクター毒素として、緑膿菌(*P. aeruginosa*)の持つ外毒素A(ETA)の細胞膜受容体結合ドメインIaを欠いた毒素(Δ BD-ETA)を作製した。まず、PAO-1/S-Lac株由来のシグナル配列を含まない野生型ETA遺伝子をPCR増幅し、改変pQE-1ベクターにクローニングしたpORF-ETAプラスミドを作製した。これを鋳型とし、細胞質移行ドメインから酵素活性ドメインまでの遺伝子断片を、5'端にBamHI、3'端にSphI認識切断部位を付加してPCR増幅した。この断片を、BamHIとSphIで切断してインサートを除いたpORF-ETAに挿入してp Δ BD-ETAを作製した。これら2つのプラスミドで作製した野生型ETA及び Δ BD-ETA発現系大腸菌をそれぞれLB培地で培養し、標的化毒素と同様にキレート親和性クロマトグラフィーにより精製標品を得た。各々の標品はSDS-PAGEで純度確認し、使用まで-80℃にて凍結保存し使用した。

③ 薬剤封入リポソーム

抗癌剤封入リポソームの調製：送達薬剤として5mMの5-フルオロウラシル(5-FU)とリポソーム密封性可視化剤として10mMの蛍光色素フルオレセインNaを含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)を封入したリポソーム [Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) /

CHL(モル比 1:1)]をバンガム法で調製した。これにつき凍結融解を5回繰り返す、さらに100nmメンブランフィルターを通して単一膜(ULM)リポソームを作製した。さらにゲルろ過カラムで5-FU/フルオレセインNa封入リポソーム分画を未封入の薬剤から分離・回収した。また必要に応じて超遠心処理で濃縮を行い使用した。

△BD-ETA変異体封入リポソームの調製方法の検討:

送達するエフェクター毒素として△BD-ETA変異体を変性させずに封入したリポソームを調製するため、定法の飽和脂肪酸側鎖を持つリン脂質を用いて加熱(60°C)・超音波処理で作製する手法に替わるものとして、2つの不飽和脂肪酸側鎖を持つリン脂質Dioleoylphosphatidylcholine(DOPC)を用いて常温近く(40°C)でジャイアントリポソーム(GL)を形成させ、その後のCHL+DPPC添加処理でリポソームを安定化し、さらに粒径サイズダウンを行って毒素封入リポソームを調製する手法の検討を行った。

(2) 安全機構を施した毒素機能の確認

①SS結合による標的化毒素の活性制御

SS結合による標的化毒素の膜孔形成活性の制御性評価は、以下のようにヒト赤血球に対する溶血活性測定で行った。赤血球のPBS懸濁液に、SS還元剤であるジチオスレイトール(DTT)あるいは細胞内還元物質の還元型グルタチオン(GSH)の有無の条件下で標的化毒素を37°Cにて1時間作用させた後、遠心上清中のヘモグロビン量を540nmの吸光度で測定して溶血活性(%)を算出し比較した。

②標的化毒素のリポソームへの結合能

ULMリポソーム懸濁液に標的化毒素を加え、37°Cで1時間反応させた。これを超遠心して上清(結合反応上清分画)を回収し、沈殿をPBSで遠心洗浄して洗浄上清(洗浄上清分画)と沈殿(結合反応リポソーム分画)を回収した。これらをSDS-PAGEで泳動した。泳動後、分離した蛋白質をPVDF膜上に転写した。転写した膜は1%ウシ血清アルブミン含有PBS(ブロッキング液)でブロッキング後、ブロッキング液で1000倍希釈した抗Hisタグ-マウス抗体(Santa Cruz)を加えて室温で1時間反応させ、3回洗浄を行い、ブロッキング液で1000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識化-抗マウスIgGと室温で1時間反応させた。6回洗浄後、HRP活性検出用化学発光試薬(Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore)と反応させてルミノイメージアナライザー(LAS-4000mini、Fujifilm)で発光画像を記録した。

③Z-mSLY-SSのIgG結合能

Z-mSLY-SSが持つIgG抗体結合活性は以下のように検討した。96穴ELISAプレートの各穴に、健康人ボランティア及びウサギの正常

血清由来の精製IgGを1 μ gずつ乾燥固定し、ブロッキング液で30分ブロッキングし、ブロッキング液で作製したZ-mSLY-SS希釈列と1時間、抗SLYマウス単クローン抗体と1時間、ブロッキング液で希釈したHRP標識化-抗マウスIgGヤギ抗体と1時間、この順で反応させた。各々の反応後はPBSで6回洗浄を行った。最後にABTSと過酸化水素を含むHRP基質液を分注して一定時間後、415nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

④標的化毒素の癌細胞標的化作用

ULMリポソーム分画とZ-mSLY-SSをモル比400(DPPC):1で混合し、25°Cにて30分反応させた。これを2分割し、一方は抗CEAウサギIgG抗体(AB BIOTEC社)と反応・洗浄した後、2分画とも上清を10%ウシ胎児血清(FBS)含有DMEM培地に置換し、同濃度になるように再懸濁した。これを、コラーゲンコートしたカバーガラス上にCEA陽性ヒト癌細胞(大腸癌細胞Lovoあるいは肝癌細胞HepG2)とヒト正常線維芽細胞NB1RGBを混合培養した上に加えて37°Cで炭酸ガス培養器中にて2時間反応させた。その後、上清を取り除いて血清を含まないDMEM培地で3回洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定した。PBSで3回洗浄後、封入剤で封入して倒立型蛍光顕微鏡IX71(Olympus)で観察した。LTBP-mPAF-SSについてもLTBPを持たないmPAF-SSと比較しながら、リポソームの代わりにヒト赤血球を結合させてA549細胞とNB1RGB細胞に作用させ、洗浄後に位相差顕微鏡で標的化の特異性を検討した。

⑤細胞膜受容体結合ドメインを欠いたエフェクター毒素の細胞障害活性

野生型のETAを対照として、△BD-ETA変異体の示す細胞毒性をヒト肺癌細胞A549とヒト正常線維芽細胞NB1RGBを用いて検討した。各細胞を5x10³細胞/穴となるよう96穴培養プレートに分注して37°Cにて炭酸ガス培養器中で24時間培養し、細胞を定着させた。ここに10%FBSを含むDMEM培地で作製したETA及び△BD-ETAの希釈液を加えて同条件で48時間培養を継続した。その後、細胞の生存率をWST-1/PMSを用いたMTTアッセイ変法によって測定した。

(3) DDSの正常マウスに対する影響

以下のようにDDSを構築し、正常マウスに対するその毒性を観察した。Balb/cマウス(オス、10週齢)の各5匹に、(i)36 μ gのZ-mSLY-SSを25°Cにて1時間処理して結合させた5-FU含有リポソーム(75nmolのDPPC相当)の懸濁液0.1ml、(ii)36 μ gのLTBP-mPAF-SSを25°Cにて1時間処理して結合させた5-FU封入ULMリポソーム(75nmolのDPPC相当)の懸濁液0.1ml、(iii)5-FU含有リポソーム(75nmolのDPPC相当)のみの懸濁液0.1ml

をそれぞれ、腹腔内注射し、その後1週間間隔で4回同量のDDSを投与し、経過を観察した。なお、標的化毒素処理したリポソームは毒素処理後に10 μ MのCHL含有PBSで処理して、調製過程で含まれる可能性がある遊離毒素の中和処理を施して使用した。

(4) DDSの担癌マウス生存率に対する影響

今回は2つの標的化毒素の内、Z-mSLY-SSに例を絞り、これと抗CEA抗体とを連結させて抗癌剤5-FU封入ULMリポソームに結合させたDDSにつき、CEA陽性癌を移植したヌードマウスの生存率に及ぼす効果を検討した。ヌードマウスとしてBalb/cSlc-nu/nuマウス(オス、11週齢)を使用し、ランダムに4群(各群5匹:下記参照)に分別した。これらの群のうち、1~3群のマウスの腹腔内には、 1.0×10^6 個のCEA陽性のヒト肝癌細胞HepG2をペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM培地1mlに懸濁して移植した。その翌日に、各群のマウスに下記のDDSのPBS懸濁液またはPBSを腹腔内投与した。DDSの調製:5-FU封入ULMリポソーム(75nmolのDPPC相当)を、36 μ gのZ-mSLY-SSと25 $^{\circ}$ Cにて1時間結合させ、これを10 μ MのCHL含有PBSで処理し、残存する遊離Z-mSLY-SSのCHL結合性の中和処理を施した。次に36 μ gの抗CEA抗体(IgG)を反応させてZ-mSLY-SSに抗体を連結し、抗体結合Z-mSLY-SS化5-FU封入リポソーム(antiCEA/Z-mSLY-SS(LIPO))を調製した。これをDDSとして動物実験に使用した。また比較実験用に、上記で調製した5-FU封入ULMリポソーム(75nmolのDPPC相当)を、36 μ gのZ-mSLY-SSと25 $^{\circ}$ Cにて1時間処理して結合後、抗体を結合させていないZ-mSLY-SS(LIPO)も作製し、同様に動物実験に使用した。以下に各群の投与物を示す。

- ・ 1群: antiCEA/Z-mSLY-SS(LIPO) PBS懸濁液 0.1ml (+HepG2, +antiCEA/Z-mSLY-SS(LIPO))
- ・ 2群: Z-mSLY-SS(LIPO) PBS懸濁液 0.1ml (+HepG2, + Z-mSLY-SS(LIPO))
- ・ 3群: 0.1mlのPBS (+HepG2)
- ・ 4群(コントロール群): 肝癌細胞HepG2を移植せず、他群のDDS投与時に0.1mlのPBSのみを投与(-HepG2(control))

これらのPBS懸濁液またはPBS投与(初回投与)の30日後に、各群のマウスに同様のPBS懸濁液またはPBSを腹腔内投与した。但しその際、1群及び2群に投与したDDSについては、いずれも初回で投与したリポソーム量(5-FU量)は同じだが、Z-mSLY-SS及び抗CEA抗体(IgG)量はいずれも2/3量に減量し調製したものである。その後、各群のマウスを個別に体重測定と状況観察を行いつつ、その生死を観察した。

4. 研究成果

(1) 安全機構を施した標的化毒素とそれを用いたDDS

安全機構を施した標的化毒素としてCDCのキメラ毒素を複数作製した結果、肺癌指向性の標的化毒素としてLTBP-mPAF-SS、組み合わせるIgG抗体の特異性によって指向性が可変型のZ-mSLY-SSの作製とキャラクタライズに成功した。両毒素ともに分子内のSS結合によって細胞膜及びCHL含有リポソームに対する膜孔形成活性が、1 μ g/mlと高濃度でも阻害されており、これがDTTや細胞内で想定される濃度のGSHの共存により解除され、膜孔形成が進行することが確認された。図1にLTBP-mPAF-SSの例を示す。従ってこれらは細胞内でGSHによるリポソームの崩壊を誘導できる能力を持つことが示唆された。

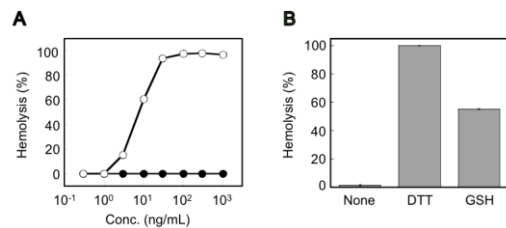


図1: LTBP-mPAF-SS変異体のSS結合による活性制御例
A. 黒丸はSS還元剤非存在下の溶血活性、白丸は10mM DTT存在下の溶血活性。B. SS還元剤3mM存在下あるいは非存在下の溶血活性。

これらの標的化毒素は、赤血球膜やCHL含有リポソームに反応させたところ、いずれも強い結合能を示した。また図2に示すように、Z-mSLY-SSは*S. aureus*プロテインAと結合性を示すヒトやウサギ等のIgGとの結合能も保持することが確認された。

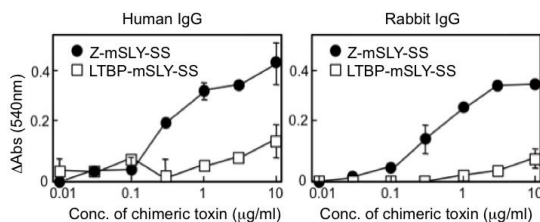


図2: Z-mSLY-SSのIgG抗体結合能

まず、これらの標的化毒素の中のLTBP-mPAF-SSをヒト赤血球に結合させ、ヒト肺癌細胞A549への特異的標的化をヒト正常線維芽細胞NB1RGBと比較して検討した結果、図3に示すようにLTBP-mPAF-SSを表面を持つ赤血球はA549に大量に結合した。一方、LTBPを欠くキメラ毒素を結合させた赤血球ではどちらの細胞にもほとんど親和性を示さなかった。またどちらの毒素を結合させた赤血球も正常細胞であるNB1RGBには結合性を示さなかった。この結果はLTBP-mPAF-SSが肺癌指向性のDDS用標的化毒素として機能することを示唆すると考えられた。

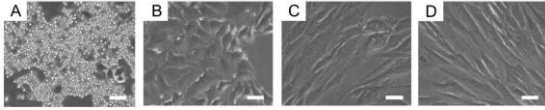


図3：LTBP-mPAF-SSの肺癌細胞指向性
A及びC: LTBP-mPAF-SSを結合したヒト赤血球を作用させた場合。B及びD: mPAF-SSを結合したヒト赤血球を作用させた場合。A及びB: ヒト肺癌細胞A549。C及びD: ヒト正常線維芽細胞NB1RGB。各右下スケールは40μm。

次にZ-mSLY-SSを、蛍光色素を封入したCHL含有ULMリポソームに結合させたDDSを作製し、抗CEA-IgGと併用してヒトのCEA陽性癌細胞への標的化を試みた。抗CEA-IgGを連結したZ-mSLY-SSを結合させたリポソームはヒトの正常線維芽細胞NB1RGBとCEA陽性大腸癌細胞Lovoの混合培養系において、選択的にLovoに結合することが観察された(図4)。

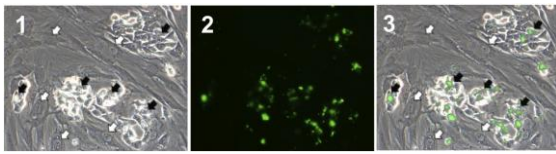


図4：抗CEA/Z-mSLY-SS(LIPO)のCEA陽性癌細胞Lovoへの選択的送達
LovoとNB1RGBの混合培養系に抗CEA/Z-mSLY-SS(LIPO)を作用させた結果。1. 明視野像。2. フルオレセインの蛍光像。3. 1と2の重ね合わせ像。黒矢印がLovo、白矢印がNB1RGB。

またCEAを持つ肝癌細胞HepG2でも、同様な選択的な結合が観察された(図5)。これらの結果から、抗CEA抗体とZ-mSLY-SSを用いれば、CEA陽性の癌細胞特異的な抗癌剤治療が可能であることが示唆された。

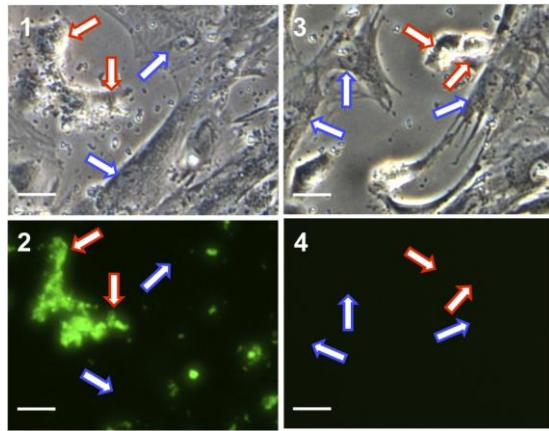


図5：抗CEA/Z-mSLY-SS(LIPO)のCEA陽性癌細胞HepG2への選択的送達
HepG2とNB1RGBの混合培養系に抗CEA/Z-mSLY-SS(LIPO)を作用させた結果(1及び2)とZ-mSLY-SS(LIPO)を作用させた結果(3及び4)。1及び3. 明視野像。2及び4. フルオレセインの蛍光像。赤矢印がHepG2、青矢印がNB1RGB。左下スケールは40μm。

さらにLTBP-mPAF-SSとZ-mSLY-SSを結合したリポソームをマウスに投与して毒性を検討した結果、5回の反復投与を行っても異常は認められず、死亡する個体も無かった。そこでZ-mSLY-SSに例をとり、これと抗CEA-IgG抗体を連結させて5-FU封入ULMリポソームに結合させ、ヒト肝癌細胞を移植したヌードマウスに投与して影響を観察したところ、図6に示すように、1ヶ月間隔での2回の投与によって、癌細胞移植100日後でも80%の生存率を維持した。しかし抗CEA抗体

を併用しない場合やDDSを全く投与しない場合には、生存率が各々40%と20%であり、抗CEA抗体を併用したDDSの投与による顕著な延命効果が確認された。従って、安全機構を施した標的化毒素のみをDDSに応用した癌治療法でも、その有効性が十分に示唆された。

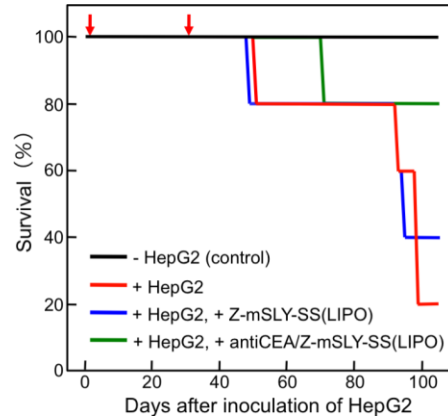


図6：ヒト肝癌HepG2担癌ヌードマウスに及ぼす抗CEA-DDSの延命効果
赤矢印はDDS投与時点を示す。

(2) 安全機構を施したエフェクター毒素

ETAの3つのドメイン(細胞膜受容体結合ドメイン/細胞質移行ドメイン/伸長因子2-ADPリボシル化酵素ドメイン)の内の細胞膜受容体結合ドメインを欠く Δ BD-ETAとドメイン構成が完全な野生型ETAについて、肺癌細胞A549及び正常線維芽細胞NB1RGBへの細胞毒性を比較した結果、A549に対する野生型ETA及び Δ BD-ETAのLD50値は各々14pgと59ng、NB1RGBに対するそれらは各々530pgと2.3μgであり、それぞれの細胞に対して野生型ETAの4000倍以上加えないと細胞外からは Δ BD-ETAの取り込み/殺細胞活性は見られなかった。従ってこの安全域を念頭に濃度を設定して使用すれば、安全性の高い細胞内作用性のエフェクター毒素として有用であることが確認できた。このように、 Δ BD-ETAを封入したりポソームと先に示した標的化毒素とを組み合わせることで癌細胞のエンド/ファゴソーム内へ Δ BD-ETAを送達できれば、5-FU等の通常抗癌剤比べてより効率的な癌治療が可能であることが示唆された。しかし通常のリポソーム作製法ではその過程の加熱による Δ BD-ETAの失活が著しく、十分量の毒素を封入できなかった。そこでDOPCを用いて低温で作製したGLに Δ BD-ETAを封入し、それをサイズダウンすることを試みたが、リポソームの密封性が低く毒素の漏れが短時間で起こった(調製3日後で残存率12%)。そこでGL作製後にCHLとDPPCを取り込ませたところ、密封性の有意な改善が認められた(調製3日後で残存率63%)。従って、今後この作成方法を更に最適化すれば、2重安全機構を備えた安全性と効率の高い癌治療用DDSの開発ができる目処が立ってきた。

(3) 総括

本研究では、有効かつ安全性の高い、2重安全機構を施した細菌毒素を用いる新規癌治療技術の開発を目指した。その結果、先ず1段目の、細胞外では活性を示さず細胞内でのみ活性を示す安全機構を施した標的化毒素として、肺癌細胞に指向してリポソームを運搬できる毒素や抗体を併用することで標的変型のリポソーム運搬毒素の開発に成功した。特に後者を CEA に対する IgG 抗体と併用して作製した治療用抗癌剤封入リポソームによる DDS は、CEA 陽性癌細胞に特異的に標的化でき、CEA 陽性癌細胞を移植したヌードマウスによる動物実験で顕著な延命効果を発揮し、その有効性が確認された。このような安全機構を持った標的化毒素は国内外で開発例は無く斬新なものであり、この1段目の毒素のみを用いた癌治療システムでも有望な技術と考えられる。さらに、2つ目の安全機構を施した癌細胞障害性エフェクター毒素の作製にも成功した。今回の研究では当初の目的である、この両者を併用した DDS の開発までには到らなかったものの、今後このエフェクター毒素を安定かつ効率的にリポソームに封入する技術が確立できれば、両毒素を併用した標的変型の新規癌治療技術の開発は十分可能であると考えられ、新規癌治療法の開発の目処がついた。

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1件)

- ① A. Tababa, Y. Ohkubo, E. Sakakura, T. Tomoyasu, K. Ohkura, H. Nagamune, Investigation of a Bacterial Pore-forming Chimera Toxin for Application as a Novel Drug-delivery System Tool, *Anticancer Research*, 査読有, Vol. 32, No. 6, 2012, pp. 2323-2330, <http://ar.iiajournals.org/content/32/6/2323.full.pdf>

[学会発表] (計4件)

- ① 田端厚之ら、「膜孔形成性キメラ毒素の新規 DDS ツールとしての応用性に関する検討」、第15回バイオ治療法研究会学術集会、平成23年12月3日、福岡大学病院メディカルホール (福岡県)
- ② 長宗秀明ら、「細胞標的化キメラ毒素を用いた DDS ツールの開発と応用」、第84回日本生化学会大会、平成23年9月22日、国立京都国際会館 (京都府)
- ③ 田端厚之ら、「細菌由来膜孔形成性機能分子を用いた DDS ツールの分子設計とその機能評価」、神戸学院大学 LSC 研究会「高

齢化社会における加齢性疾患の予防・治療薬と機能性食品の開発」、平成23年3月16日、神戸学院大学 (兵庫県)

- ④ 長宗秀明ら、「汎用性の標的変型 DDS ツールの開発」、神戸学院大学 LSC 研究会「高齢化社会における加齢性疾患の予防・治療薬と機能性食品の開発」、平成23年3月16日、神戸学院大学 (兵庫県)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: コレステロール依存性細胞溶解毒素の変異体及びその DDS への利用

発明者: 長宗秀明、友安俊文、田端厚之

権利者: 国立大学法人 徳島大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-051295

出願年月日: 平成23年3月9日

国内外の別: 国内

名称: コレステロール依存性細胞溶解毒素の変異体及びその DDS への利用

発明者: 長宗秀明、友安俊文、田端厚之

権利者: 国立大学法人 徳島大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/056203

出願年月日: 平成24年3月9日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長宗 秀明 (NAGAMUNE HIDEAKI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス

研究部・教授

研究者番号: 40189163

(2) 研究分担者

友安 俊文 (TOMOYASU TOSHIFUMI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス

研究部・准教授

研究者番号: 20323404

田端 厚之 (TABATA ATSUSHI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 10432767

(3) 連携研究者

()

研究者番号: