

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 25 年 3 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390380

研究課題名（和文）独自開発癌特異的吸着性ハイブリッドリポソームを用いた画像診断用強化剤の開発

研究課題名（英文）Cancer-targeted liposome coupled to viral proteins for imaging cancer cells

研究代表者

鶴澤 一弘（UZAWA KATSUHIRO）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

研究成果の概要（和文）：今研究では、リポソームへ画像診断薬を内包し、さらに、癌特異的吸着性を有するシンドビスウイルス（SIN）の蛋白をハイブリッドする事により、画像診断薬を癌特異的に集積させる画像診断用強化剤を開発した。動物実験で、画像診断薬である CT 造影剤を内包した SIN リポソームが、長時間、癌へ集積することを確認した。今後、術前画像診断や手術中のナビゲーションシステムの強化することが期待できた。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel cancer-targeted liposome coupled to sindbis virus proteins (SIN liposome) on the surface that can be used for imaging tumors and an intra-operative navigation system. The imaging efficacy of this liposome was assessed in a nude mouse bearing a tumor using a clinical CT. CT imaging showed that CT signal increases were detected in tumor site treated with SIN liposomes. Thus, this finding that SIN liposomes selectively fused with a tumor suggested the application of this cancer-targeted liposome to cancer imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2010 年度 | 8,300,000 | 2,490,000 | 10,790,000 |
| 2011 年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 2012 年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| | | | |
| 総計 | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1) 臨床腫瘍学 (2) リポソーム (3) シンドビスウイルス

1. 研究開始当初の背景

現在、ドラッグ・デリバリー・システムの開発が盛んに行われている。ナノ・テクノロジー等を応用しているが、効率的に癌細胞に特異的に吸着・摂取されるようなシステムの開発には至っていない。我々は殺腫瘍ウイルス（Oncolytic virus）の研究を、レオウイルス科レオウイルスとトガウイルス科アルファウイルス属シンドビスウイルスに関して行

ってきた（米国特許申請中）。これらのウイルスは腫瘍に特異的に感染（吸着）し、腫瘍特異的に増殖する（ほとんどの臓器の正常細胞には感染・増殖をしないことを *in vitro*, *in vivo* で確認済み）。特にシンドビスウイルスは非常に多くの種類の癌細胞（悪性黒色腫、悪性リンパ腫、扁平上皮癌、腺癌に関し報告済み）に感染し、これらのウイルスの腫瘍細胞への感染（吸着）は癌細胞膜上のレセプタ

一を介して行われることが知られており、数種類のレセプターが同定されている。このため、これらのレセプターと結合するリガンドを用いれば癌特異的なドラッグ・デリバリー・システムの開発が可能になる。また、特に、シンドビスウイルスは蚊が媒介して、ヒトに感染するが、軽微な発熱を引き起こすだけの低病原性ウイルスであり、全身投与もできることから、その成分を用いても、毒性が無い、血中投与による全身投与ができるものと考えられる。我々は、以前に科学研究費の支援を受けて、低病原性ウイルスであるシンドビスウイルスの腫瘍特異的吸着能を有するリガンドを混入したリポソームによる癌特異的なハイブリッド型リポソームを開発した。

2. 研究の目的

本研究では、イメージング機器(CT、可視光、蛍光を検出する機器)の増感剤、造影剤とハイブリッド型リポソームを併用することにより、検出感度と診断能力の改善することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 【リポソームの組成】

リポソームの膜成分として、Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)、Cholesterol (Chol)、DSPE-PEG2000 を使用した。造影剤には、イオヘキサール647.2 mg/ml (オムニパーク300:ヨード含有濃度300 mg/ml) を使用した。

(2) 【造影剤含有リポソームの作製】

DPPC、Chol、DSPE-PEG2000 をモル比55:44:5で全脂質量40 μmolを200 μl エタノールに入れ、70℃で溶解する。次に、2 ml のオムニパークで水和し、エクストリューダーに400 nm フィルムを2枚セットし、サイズの均一化を行った。リポソームを作製後、含包されなかった造影剤の除去を透析法で行った。1 ml のリポソームをカットオフ値7000 MW の透析カセット(サーモフィッシャー Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, MWCO 7000)へ入れ、250 ml の HEPES バッファーにて8時間透析を行った。

(3) 【GFP 蛍光標識リポソームの作製】

同様に DPPC、Cho、DSPE-PEG2000 をモル比55:44:5で全脂質量40 μmolをクロロホルム2 ml に溶解し、エバポレーターで溶媒を揮発させ、フラスコに薄膜フィルムを形成させる。次に、GFP 発現ベクター(pMaxGFP,Lonza) 含有 HEPES バッファー、あるいは、リコンビナント GFP タンパク質(クローンテック rGFP Protein) 水

和し、エクストリューダーに400 nm フィルムを2枚セットし、サイズの均一化を行った。その後、内包されなかった、GFPベクターとGFPタンパク質を取り除くために、セファデックス50を用いてカラム精製を行った。それぞれ、GFPベクター含有リポソームとGFP蛋白含有リポソームとした。

(4) 【シンドビスウイルス蛋白(SIN)の付加】
ウイルスタンパクを2重脂質膜へ取り込む処理法は、リポソームとウイルスタンパクを60度の恒温槽内で振動させながら2時間インキュベーションさせた。インキュベート後にリポソームの粒子径を測定した。それぞれのハイブリッド型リポソームを、SINハイブリッド造影リポソーム、SINハイブリッドGFPベクターリポソーム、SINハイブリッドGFPタンパクリポソームとした。

(5) 【造影剤の含有率の測定】

造影剤リポソームの透析開始後、1時間毎にバッファーを1 ml ずつ回収した。また、透析後のリポソームは10倍量のエタノールに溶解した。これら透析膜外液とリポソーム溶解液を紫外線分光光度計(SHIMADZU UV-1800)で波長245 nmの吸光度を測定した。含有率は、リポソーム作製時に添加した造影剤の量に対する、リポソーム内に含有された造影剤の量の比とした。

(6) 【GFP リポソームの細胞へ集積率の測定】

GFPタンパク含有リポソームは、細胞へ添加後、蛍光顕微鏡で観察を行い、1視野内の全細胞数に対する蛍光発光する細胞数の比率を計測した。また、GFPベクターリポソームは、細胞へ添加後、24時間毎に、蛍光プレートリーダーにて、蛍光量を測定した。

(7) 【CT装置で濃度の測定】

透析後の造影剤リポソームをチューブに入れ、CT装置(日立アロカ Latheta LCT-200、50kV、300mA)でCT値(単位は Hounsfield unit (HU))を測定した。

(8) 【造影剤リポソームの担癌マウスでの評価】

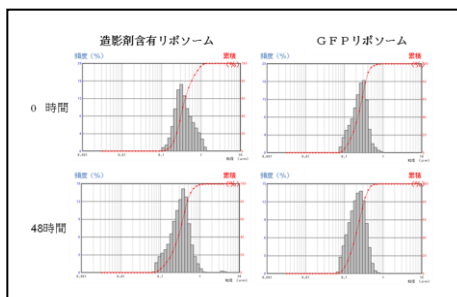
マウスの背部に口腔癌細胞(HSC-2)を担癌させ、尾静脈から200 μl (ヨード5 mg)を注射し、1時間後にCT装置(日立アロカ Latheta LCT-200 (50kV、300mA))で測定した。

4. 研究成果

(1) 【シンドビスハイブリッドリポソームの安定性】

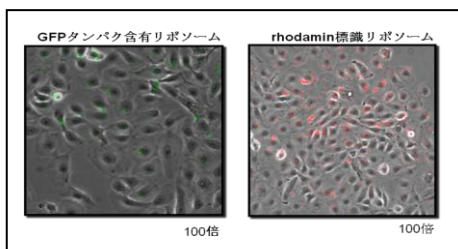
造影剤リポソーム、GFPタンパクあるいはGFPベクター含有リポソームの、SIN蛋白

の付加後、48時間に粒子径を測定した。両リポソーム共に、粒子径は200-300nmで経時的安定性があった。



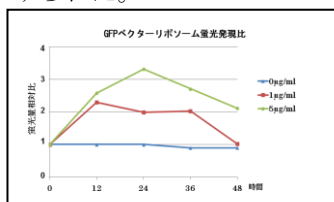
(2) 【GFPタンパク含有リポソームの評価】

GFPタンパク含有リポソームを癌細胞へ添加し、蛍光顕微鏡で観察した。コントロールとして、脂質膜に rhodamine 脂質 (Rhodamin-DSPE)を標識したものを同様に癌細胞へ添加し比較した。図のようにGFPタンパク含有リポソームは、蛍光している細胞数は数%であった。この理由として、検出器の感度が低いことやGFPタンパクの蛍光強度が低いことなどの検出方法に関する問題点と、リポソームへの封入効率やGFPタンパクの細胞質内への移送率が低いことなどのリポソーム自体の問題点が考えられた。



(3) 【GFPベクター含有リポソームの評価】

GFPリポソームを癌細胞へ添加し、蛍光プレートリーダーで12時間毎に72時間まで測定した。その結果、GFPベクターを5 μg/mlで作製したものは、添加後36時間でコントロールに比較し、20%の蛍光量の増加がみられた。



(4) 【造影剤リポソームの含有率の評価】

透析前のリポソーム溶液は、全量が1mlであり、ヨード濃度が240mg/mlで全量は240mgであった。透析開始後の8時間で膜外液のヨードの含有量は180mg達し、その後は増加がなかった。透析後のリポソーム溶液は、全量が2mlであり、ヨード濃度は30mg/mlで全量は60mgあった。

| リポソーム作製時 添加ヨード量 | 透析膜外 ヨード量 | リポソーム内封入 ヨード濃度 | リポソーム内封率 |
|--------------------|--------------|-------------------|----------|
| 240mg | 180mg | 60mg | 25% |

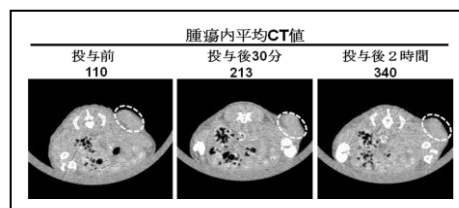
(5) 【SIN造影剤リポソームのCT値】

造影剤含有しないリポソームはCT値103Huであったのに対して、SIN造影剤リポソームは489Huであった。



(6) 【造影剤リポソームの担癌マウスでの評価】

担癌マウスへ造影剤リポソーム投与後、経時的にCT撮影を行ない、腫瘍の平均CT値を計測した。投与前ではCT値110Huであったが、2時間後にはCT値340Huになった。



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2件)

① 椎葉正史、齋藤謙悟、鶴澤一弘、Lipocalin-2 is associated with radioresistance in oral cancer and lung cancer cells、International journal of oncology、査読有、42巻、2013、1197-1204

② 菅波晃子、齋藤謙悟、白澤浩、Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、査読有、22巻、2012、7481-7485

〔学会発表〕(計3件)

① 齋藤 謙悟、シスプラチン耐性阻害剤含有腫瘍標的リポソームの効果、第71回 日本癌学会、2012年9月21日、ロイトン札幌(札幌)

② 齋藤 謙悟、The study of cancer-targeted liposome with viral proteins for imaging cancer cells、第70回 日本癌学会、2011年10月3日、名古屋国際会議場(名古屋)

③ 齋藤 謙悟、The cancer target therapy by a

cisplatin-encapsulating liposome with viral proteins、第69回 日本癌学会、2010年9月23日、大阪国際会議場（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

(2) 研究分担者

白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00216194

齋藤 謙悟 (SAITO KENGO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70451755

(3) 連携研究者

なし