

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249084

研究課題名(和文) 独自開発ウイルス成分とのハイブリッドリポソームによる癌の新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a molecular-targeting therapeutic agent for cancer therapy using a cancer-targeting liposome coupled with viral proteins

研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA, HIDEKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円、(間接経費) 10,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究でわれわれは、癌細胞に対し、より効率的かつ特異的に吸着・摂取されるドラッグ・デリバリー・システムを利用した難治性癌の治療法の開発を行った。腫瘍へ特異的に感染し増殖する低病原性ウイルスの蛋白を付加したりポソームへ、さらに抗癌剤あるいは放射線の効果を増強する癌分子標的薬を含有させ新たなリポソームを開発した。in vitroおよびin vivoで有意な腫瘍抑制効果を示し、臨床応用可能な新規治療法となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a new strategy of chemotherapy and/or radiation therapy against treatment-resistant tumor using with the cancer-targeting liposome loading the some sensitizer. In this therapy, these liposomes exhibited higher cytotoxicity to cancer cells than the only sensitizer and displayed the tumor regression in mice bearing a drug or radiation resistant tumor.

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：臨床腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

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来た (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が、ほとんどの臓器の正常細胞には感染・増殖をしない (確認済み)。特にシンドビスウイルス (SIN) 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) に感染する。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ーを介して行われることが知られている。また、特に、シンドビスウイルスは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、血中投与による全身投与ができるものと考えられ、動物実験で何ら問題がないことを確認した。申請者らは、平成21年度に終了した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ドラッグ・デリバリー・システムを開発した (特許出願中)。すなわち、本システムにより、次頁の図に示すような独自開発ハイブリッド型リポソームにより色素や抗がん剤を癌細胞にのみ輸送できることを確認した。なお、本ハイブリッド型リポソームはウイルス成分を用いたものであるが、ウイルスではなく、通常の薬剤と同等の扱いを法的に受けるため、ウイルス治療や遺伝子治療よりも扱いが簡便な薬剤となることが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究は、抗癌剤単剤投与法と比較して、新規治療法群 (耐性遺伝子発現阻害物質や治療増強剤と抗癌剤を併用投与) と新規治療法群 (耐性遺伝子発現阻害物質や治療増強剤とともに抗癌剤をハイブリッド型リポソームに搭載して投与) における抗癌効果を最大限にする条件を求め、新規治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 【耐性遺伝子発現阻害剤の選定】

抗癌剤耐性遺伝子の同定には、抗癌剤耐性細胞株と感受性細胞株に関してマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行い、候補遺伝子として PDE3B と AKR1C family を同定した。次に、PDE3B 阻害剤とし、シロスタゾール、ミルリノン、PDE3・4 阻害剤とし、ロリプラム、PDE3・5 阻害剤とし、ジビリダモール、シナルディフィルを選定し、AKR1C family 阻害剤とし、メフェナム酸、ジャスモン酸を選定した。

次に、放射線耐性遺伝子の同定を放射線耐性株と感受性株で同様におこない、候補遺伝子として FGFR3 を同定した。FGFR3 阻害剤として、PD173074 を選定した。

#### 【抗癌剤耐性遺伝子発現阻害剤の効果】

候補阻害剤の単剤と抗癌剤の併用にて細胞傷害性効果を測定し選定を行った。

シロスタゾールは、エタノールで 1 mM に溶解し、ミルリノン、ロリプラム、ジビリダモール、シナルディフィルは DMSO で 5 mM 溶解した。

シロスタゾールは、1  $\mu$ M、800、400、200、100、50 nM の単独と、シスプラチン 20  $\mu$ M の併用で添加し、ミルリノンは、1、10、100  $\mu$ M の単独と、シスプラチン 20  $\mu$ M の併用で添加し、ロリプラム、ジビリダモール、シナルディフィルは、1、2、5  $\mu$ M の単独と、シスプラチン 20  $\mu$ M の併用で添加した。

ジャスモン酸は、メタノールで 1 M に溶解し、1、2、3、4 mM の単独投与と、シスプラチン 20  $\mu$ M の併用で添加し、メフェナム酸は DMSO で 1 M に溶解し、100、200、400、600  $\mu$ M の単独と、シスプラチン 20  $\mu$ M の併用で添加した。添加後 72 時間で MTS アッセイを行った。

#### 【放射線耐性遺伝子発現阻害剤の効果】

放射線候補阻害剤は 1 候補だけであり、単剤投与と併用にて細胞傷害性効果を再確認した。PD173074 は、DMSO で 20 mM に溶解し、100 nM の単独で投与し、放射線 4 Gy を 1 回照射した。照射後 72 時間で MTS アッセイを行った。

#### 【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。

#### 【阻害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  $\mu$ mol を 200  $\mu$ l クロロホルムに入れ、70 で溶解する。更に、20 mM シロスタゾールを 400  $\mu$ l 添加し、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。次にハンクス緩衝液 1 ml 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。リポソーム溶液中のシロスタゾール濃度は 5 mM (100  $\mu$ M) とした。

同様に、1 M ジャスモン酸 / エタノールを 200  $\mu$ l (4 mM) 添加し、リポソーム溶液中に 200 mM とした。メフェナム酸は 4.8 mg を添加し、リポソーム溶液中に 20 mM

M (400 μl) とした。1MPD173074 / DMSO は 10 μl 添加し、リポソーム溶液中に 5 mM (100 nM) とした。

【阻害剤含有リポソームの細胞傷害性試験】 SIN を付加した阻害剤内包リポソームの細胞傷害性の効果を、抗癌剤耐性株 Sa3R と放射線耐性株 HSC2 を用い、検討した。対照として、SIN 付加なし阻害剤内包リポソーム、阻害剤単剤のみを作製した。

シロスタゾールリポソーム、ジャスモン酸リポソーム、メフェナム酸リポソーム、0.3 μM で添加し、各阻害剤の最終濃度は、シロスタゾール 100 μM、ジャスモン酸 4 mM、メフェナム酸 400 μM とした。4 時間後に最終濃度が 20 μM となるようにシスプラチンを添加した。72 時間後に MTS アッセイで細胞生存率を測定した。

PD173074 リポソームを 0.3 μM で添加し、最終濃度は、PD173074 は 100 nM とした。24 時間後に、放射線を 4 Gy 照射し、照射後 72 時間で MTS アッセイを行い、細胞生存率を測定した。

#### 【腫瘍抑制効果】

ヌードマウスへ抗癌剤耐性株 Sa3R を移植して、腫瘍容積が 100 mm<sup>3</sup> になったら、2 週に 1 回の間隔で、シロスタゾールリポソーム、ジャスモン酸リポソーム、メフェナム酸リポソームの各条件 5 匹ずつ、脂質量 0.4 mg / 匹で尾静脈投与を行った。リポソーム投与時に、シスプラチン 100 μg / マウス (5 μg / g) を同時投与した。8 週行い、腫瘍容積を測定して、コントロールと比較して腫瘍抑制能を評価した。

各薬剤のマウス 1 匹に対する投与量は、シロスタゾール 4 μg、ジャスモン酸 4 mg、メフェナム酸 4.8 mg となった。シスプラチン 100 μg / マウス (5 μg / g)

ヌードマウスへ放射線耐性株 HSC2 を移植して、腫瘍容積が 100 mm<sup>3</sup> になったら、1 回に PD173074 リポソームの各条件 5 匹ずつ、脂質量 0.4 mg / 匹で尾静脈投与を行った。PD173074 は 5 mg とした。リポソーム投与後 24 時間後から 1 回放射線 4 Gy を 4 日間施行した。2 週目も同様に処置し、3 週目から腫瘍容積を測定して、コントロールと比較して腫瘍抑制能を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 【増感剤の新規療法 の in vitro の効果】

##### 抗癌剤増感剤

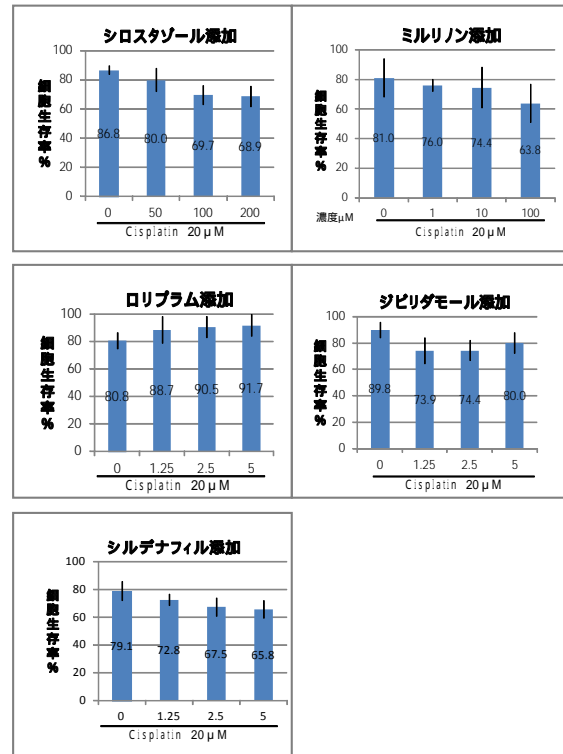
##### PDE3B 阻害剤

PDE3B 阻害剤である、シロスタゾール、ミルリノン、ロリプラム、ジビリダモール、

シナルディフィル選定した。

シスプラチン単剤と比較し、増感剤を併用することにより、細胞傷害性は、シロスタゾールは 100 μM で 18% 向上し、ミルリノンは 100 μM で 17% 向上し、ロリプラムは変化が無く、ジビリダモールは 2.5 μM で 15% 向上し、シナルディフィルは 14% の向上があった。

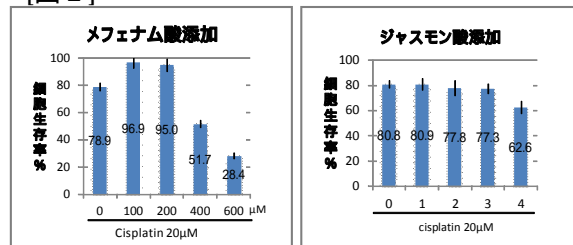
【図 1】



##### AKR1Cファミリー阻害剤

AKR1C family 阻害剤とし、メフェナム酸、ジャスモン酸を選定した。シスプラチンと併用することにより、メフェナム酸は 400 μM から細胞傷害性の 30% 向上があった。ジャスモン酸は 4 mM で 20% の向上があった。

【図 2】



DMSO を混入するとリポソーム作成時の薄膜形成率が悪くなり、10 μL が限界である。そのため、DMSO 溶解性の薬剤は候補から外し、単剤でも増強効果が高い抗癌剤耐

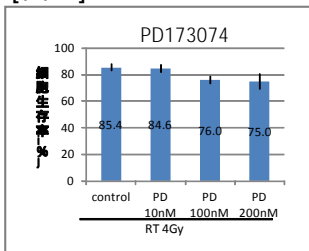
性遺伝子阻害剤としては、シロスタゾール、ジャスモン酸、メフェナム酸を候補として、リポソーム化を行った。

**放射線増感剤**

**F G F R 3 阻害剤**

放射線耐性遺伝子 F G F R 3 耐性遺伝子の阻害剤とし PD 1 7 3 0 7 4 を選定した。細胞傷害性は、放射線のみと比較すると、1 0 0 n M から 9 % の向上が示された。

[ 図 3 ]



【増感剤の新規療法の in vitro の効果】

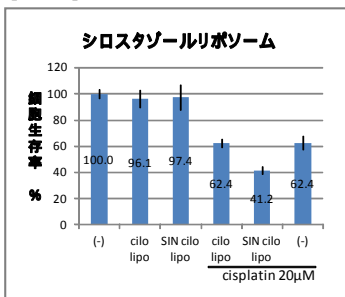
**抗癌剤増感剤**

**P D E 3 B 阻害剤**

(1)シロスタゾール

シロスタゾールリポソームではシスプラチン単剤より、S I N リポソーム (S I N C i l o l i p o) では、細胞傷害性が 2 0 % 向上していた。新規療法 では、細胞傷害性が 3 1 % ( 図 1 ) であるのに対して、新規療法 では、5 9 % ( 図 4 ) と有意に向上していた。

[ 図 4 ]

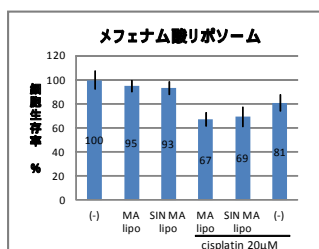


**A K R 1 C ファミリー阻害剤**

(2)メフェナム酸

メフェナム酸リポソームではシスプラチン単剤より、S I N リポソーム (S I N M A l i p o) では、細胞傷害性が 1 2 % 向上していた。しかし単純リポソーム (M A l i p o) でも 1 3 % の向上があった。新規療法 では、細胞傷害性が 4 9 % ( 図 1 ) であるのに対して、新規療法 では、3 1 % ( 図 5 ) であった。

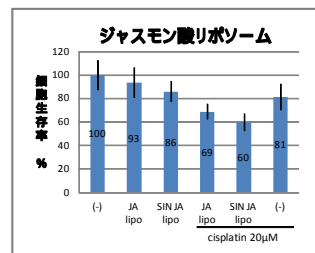
[ 図 5 ]



(2)ジャスモン酸

ジャスモン酸リポソームではシスプラチン単剤より、S I N リポソーム (S I N J A l i p o) では、細胞傷害性が 2 0 % 向上していた。新規療法 では、細胞傷害性が 2 6 % ( 図 1 ) であるのに対して、新規療法 では、3 9 % ( 図 6 ) と有意に向上していた。

[ 図 6 ]



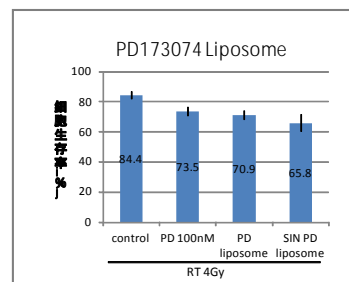
**放射線増感剤**

**F G F R 3 阻害剤**

(1)P D 1 7 3 0 7 4

P D 1 7 3 0 7 4 リポソーム (P D l i p o) では単剤と放射線 4 G y をおこ、S I N P D リポソーム (S I N P D l i p o) では、細胞傷害性が 2 0 % 向上していた。新規療法 では、細胞傷害性が 9 % ( 図 1 ) であるのに対して、新規療法 では、1 9 % ( 図 7 ) と有意に向上していた。

[ 図 7 ]



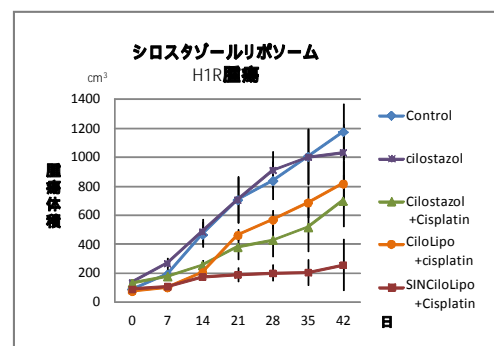
【増感剤の新規療法の in vivo の効果】

**P D E 3 B 阻害剤**

(1)シロスタゾール

新規療法 であるシロスタゾール単剤 (C i l o) より、新規療法 である S I N シロスタゾールリポソーム (S I N C i l o l i p o) では、有意に腫瘍抑制効果が見られた。

[ 図 8 ]

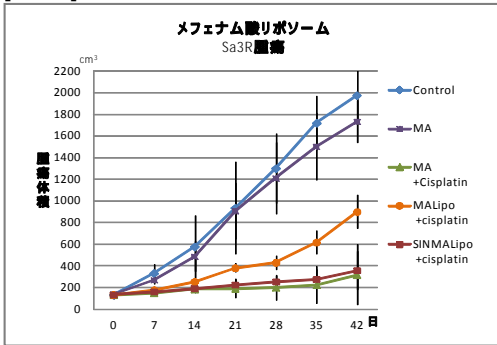


## AKR1Cファミリー阻害剤

### (1)メフェナム酸

新規療法 であるメフェナム酸単剤 (MA) と、新規療法 であるSINメフェナム酸リポソーム (SIN MA lipo) に、コントロールと比較すると有意な腫瘍抑制効果があったが、両療法に差はなかった。

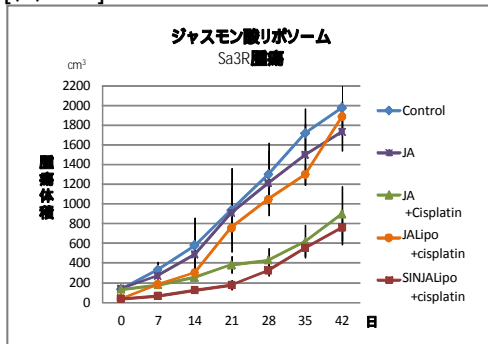
[図9]



### (2)ジャスモン酸

新規療法 であるジャスモン酸単剤 (JA) と、新規療法 であるSINジャスモン酸リポソーム (SIN JA lipo) に、コントロールと比較すると有意な腫瘍抑制効果があったが、両療法に差はなかった。

[図10]



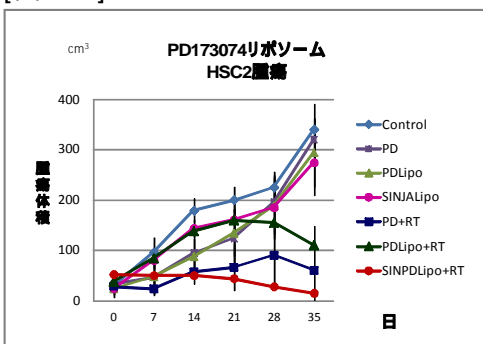
## 放射線増感剤

## F G F R 3 阻害剤

### (1)PD173074

新規療法 であるPD173074単剤 (PD)と比較すると、新規療法 であるSINPD173074酸リポソーム (SIN PD lipo) は有意に腫瘍抑制効果を示した。さらに、両療法とも、コントロールと比較すると有意な腫瘍抑制効果が見られた。

[図11]



## 【副作用】

全てのリポソーム製剤において、正常細胞において、細胞傷害性は現れない濃度で使用した。また、in vivo においては、実験中に、治療や薬剤による、体重減少や死亡などは見られなかった。

## 【まとめ】

今研究により、従来からある化学療法と放射線療法の増感剤を同定するとともに、独自で改良した腫瘍特異的ドラッグデリバリーシステムを用いることにより、従来の治療法を増感させる新規治療法を開発することができた。

## 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)Shiiba M, Saito K, Fushimi K, Ishigami T, Shinozuka K, Nakashima D, Kouzu Y, Koike H, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K, Uzawa K, Takiguchi Y, Tanzawa H. Lipocalin-2 is associated with radioresistance in oral cancer and lung cancer cells. Int J Oncol. 2013 Apr;42(4):1197-204. 査読有

(2)Suganami A, Toyota T, Okazaki S, Saito K, Miyamoto K, Akutsu Y, Kawahira H, Aoki A, Muraki Y, Madono T, Hayashi H, Matsubara H, Omatsu T, Shirasawa H, Tamura Y. Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. Bioorg Med Chem Lett. 2012 Dec 15;22(24):7481-5. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

(1)齋藤謙悟; 第72回癌学会(2013年10月3日~5日横浜); The effects of cancer-targeted liposomes loaded with PDE inhibitors on the cisplatin-resistance on cancer cells

(2)齋藤謙悟; 第71回癌学会(2012年9月19~21日札幌); The effects of a cancer-targeted liposome loaded inhibitors to cisplatin resistance in the cancer cells

(3)齋藤謙悟; 第70回癌学会(2011年10月3日~5日名古屋); The study of cancer-targeted liposome with viral proteins for imaging cancer cells

### 〔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〕  
なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹沢 秀樹 (HIDEKI TANZAWA )  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：50236775

### (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