

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689003

研究課題名(和文)腫瘍関連マクロファージ指向DDSの開発と癌に対する新しい薬物治療戦略

研究課題名(英文)Development of tumor associated macrophages-selective DDS and its application to tumor therapy

研究代表者

川上 茂(Kawakami, Shigeru)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20322307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円、(間接経費) 6,420,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織に存在する腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、がん治療において重要な標的細胞であるが薬物を選択的に送達させる方法が無い。マンノース修飾キャリアでは、同レセプターを発現する全身のマクロファージに薬物が送達される。本研究では、マクロファージ指向性を有するマンノース修飾バブルリポソームと腫瘍組織への超音波照射を利用した方法を考案し、TAM細胞質内へ選択的に核酸薬物を送達させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages (TAM) exhibit an M2 phenotype that promotes tumor progression, and conversion of M2 TAM toward a tumoricidal M1 phenotype is a promising anti-cancer therapy. However, little has been reported on TAM-selective drug delivery because a specific ligand is lacked. Mannosylated carriers would be an effective approach, but they can be distributed to all of macrophages that highly expressed mannose receptors in the body. In this study, we succeeded to develop a mannosylated bubble lipoplex and ultrasound irradiation to tumor site for TAM-selective delivery of nucleic acid.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：DDS ターゲティング リポソーム 超音波 腫瘍関連マクロファージ マンノース修飾リポソーム

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織に浸潤する間質細胞、特に腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophages; TAM) が産生する増殖因子やサイトカインが、癌微小環境において i) 血管新生促進、ii) 癌細胞増殖・転移促進、あるいは iii) 獲得免疫の抑制を引き起こし癌進行・転移に重要な役割を果たしている。腫瘍関連マクロファージにおける細胞機能制御は癌治療において非常に重要である。しかしながら、TAM 指向性 DDS 開発に関して、特異的なリガンド探索や細胞内取り込み等が隘路となり、殆ど進んでいない。腫瘍関連マクロファージにも高発現するマンノースレセプターは、腫瘍関連マクロファージ以外にも、Kupffer 細胞や樹状細胞、全身のマクロファージ等にも広く高発現しており、これらの細胞での機能発現を回避・最小化する新たな方策が必要である。

申請者は、これまで糖鎖認識レセプターによる細胞認識能を有する糖修飾ナノ微粒子であるガラクトース、マンノース、フコースなどのリガンド修飾リポソームを開発し、糖鎖認識機構に基づく細胞選択的なターゲティングに成功している。また、最近では、糖鎖認識による in-vivo 誘導と超音波応答による細胞穿孔を併せ持つ新規 DDS キャリアとして、糖修飾リポソームに超音波造影ガスを封入した糖修飾バブルリポソームを開発し、超音波照射でのバブル崩壊により生じるキャピテーションエネルギーを利用した一過性の細胞穿孔を介して、同レセプターが高発現する肝臓の Kupffer 細胞・類洞血管内皮細胞や脾臓の樹状細胞への高効率な細胞選択的核酸送達法の構築を行い、糖修飾バブルリポソーム製剤と核酸医薬を基盤とし、超音波応答による標的細胞内への DDS 基盤技術の開発に成功している。

そこで本研究では、マンノース修飾リポソームによる標的指向性と体外からの腫瘍への超音波照射による細胞内穿孔の組み合わせを利用した TAM 特異的 DDS 製剤を開発し、次に本システムを利用したがん治療への展開を行う。

2. 研究の目的

研究では、超音波応答性マンノース修飾リポソームをプロトタイプとし、外部刺激を腫瘍へ照射させることで、新たな標的細胞として腫瘍関連マクロファージで特異的に薬物が放出される標的指向 DDS の構築と癌に対する新規薬物治療戦略の確立を目指す。本研究計画は3年間とする。まず1年目は、マンノース修飾バブルリポソームを胆癌マウスへ投与し、固形腫瘍へ超音波を照射時における TAM への取り込みの最適化を超音波の側、糖修飾リポソームの側から製剤設計指針の最適化を行う。2年目は、プラスミドやオリゴ核酸を用いた細胞機能の制御を目指す。さらに3年目は、癌に対する新しい薬

物治療法確立を目的に、2年目までの超音波照射や核酸医薬による TAM 機能抑制時における治療効果の総合的評価を行う。また、新規がん指向性 DDS キャリアの開発も併せて行う。

3. 研究の方法

本研究において、まず、超音波応答性マンノース修飾バブルリポソームの開発を行った。調製法としては、申請者らのマンノース修飾バブルリポソームに関する初報 (Biomaterials, 31, 7813, 2010) で開発したものをプロトタイプ製剤として、パーフルオロプロパンガスを安定に封入させるための脂質組成の探索・最適化を行った。また、生体適合性添加剤のみで調製できるバブル製剤の開発を行った。次に、開発したマンノース修飾 DDS 製剤の腫瘍関連マクロファージ指向性 DDS としての最適化を行うため、in-vitro および in-vivo での評価系の構築を行った。さらに、マクロファージへの siRNA 送達における off target 効果の評価を行うため、本システムを用いてマクロファージへ送達を行った際の、細胞内取り込み機構、インターフェロン応答の評価を行った。最後に、本研究において開発した TAM 指向 DDS により細胞選択的に送達したオリゴ核酸の抗腫瘍効果に関する評価を行った。

4. 研究成果

本研究の目的は、癌微小環境における TAM を標的とした DDS 開発とその癌治療への展開である。本年度は、腫瘍関連マクロファージに発現するマンノースレセプターによって認識され、超音波照射後に発生するキャピテーションエネルギーにより発生する一過性の小孔を介して、細胞内に核酸・遺伝子導入を可能とするマンノース修飾バブルリポソーム製剤について、siRNA 送達及びプラスミド DNA 送達特性、超音波照射に関する評価を行った。ルシフェラーゼに対する siRNA を用いて作製した超音波応答性マンノース修飾バブルリポソームへの超音波照射併用により、マクロファージのエンドソームではなく、細胞質内へ高効率に送達され、高い遺伝子発現抑制効果を示していることが示された。一方、off target 効果の原因となる型インターフェロンの産生は、市販の遺伝子・核酸導入用カチオン性リポソームを用いて導入した場合と比べ、顕著に低い値であり、安全に使用できることが示された。この低い免疫反応性は、toll like receptor 7, 8 が発現するエンドソームを介さず細胞質内に直接 siRNA を導入しているためであると推察される。

本研究成果の医療応用を目指した新規バブル製剤の開発を目的として、アニオン性となる核酸・遺伝子、カチオン性高分子、超音波造影ガス封入アニオン性リポソームをそれぞれ静電的相互作用を利用して3元複合

体を形成させ、新たにアニオン性を示す超音波応答性リポポリプレックス製剤の開発と遺伝子・核酸キャリアとして in-vivo での最適化を行った。新規バブル製剤は、アニオン性を示すため、従来のカチオン性製剤で見られるアニオン性を示す血球との静電的相互作用による凝集は認められなかった。また遺腹腔側の腹壁から肝臓側への超音波照射によりマウス肝臓での遺伝子発現の大幅な増大が示された。この肝臓での発現レベルは、従来、高発現を占める遺伝子導入用のカチオン性製剤とほぼ同レベルの遺伝子発現であった。腎臓は特異的なリガンドが無いなど、DDS キャリアを用いた有望な遺伝子導入法が無い。そこで、本システムによる遺伝子導入を試みた。マウス背部から腎臓側に向けて超音波照射を行ったところ、超音波照射を行った側の腎臓において高い遺伝子発現が認められた。以上、アニオン性を示し、安全かつ高効率な遺伝子導入が可能となる新規バブルリポポリプレックス製剤の開発に成功した。本製剤は、マンノース修飾バブル製剤の医療展開においてプラットフォームとして用いることができる。一方、新たながん治療に有効な標的指向型キャリアとしてシアリルルイス X 修飾リポソームを開発し、ヒト血管内皮細胞株 HUVEC を用いた培養細胞での検討において、本リポソームが E-セレクトインを介して HUVEC と結合することが示された。

次に、TAM への高効率なオリゴ核酸導入に基づく TAM 機能の制御化による癌治療戦略の構築を行った。まず、オリゴ核酸を用いたマンノース修飾バブルリポポリプレックスの調製法に関して、従来の脂質組成で (Biomaterials, 31, 7813, 2010) で用いていた DSTAP に変えて DSDAP を用いた方がよりガス保持に優れたバブル製剤の調製が可能であった。そこで、新しい処方でマンノース修飾バブルリポソーム/NF- κ B decoy 複合体を調製し、以下の実験に用いた。Colon-26 固形がんモデルマウスに対して、マンノース修飾バブルリポソーム/NF- κ B decoy 複合体を腫瘍内投与し、腫瘍部位に超音波照射を行うことで、TAM に対して NF- κ B decoy を送達させた。その結果、NF- κ B decoy 導入により Th1 サイトカイン量が増大し、Th2 サイトカイン産生量が有意に減少、また、VEGF、MMP-9 発現量の減少、NO 産生量の亢進が認められ、TAM の表現型の存在比が M1 型有意なものへシフトされている可能性が示された。また、TAM 選択的に NF- κ B decoy を導入することで、腫瘍増殖抑制効果、ならびに、延命効果が認められた。このように、超音波照射とマンノース修飾バブルリポソームを用いて、高効率に TAM へ NF- κ B decoy 導入を行うことで、TAM の phenotype 変化が認められる可能性が示された。さらに、Ehlich 腹水がんモデルマウスを用いた評価を行った。マンノース修飾バブルリポソーム/NF- κ B decoy 複合体の腹腔内投与と超音波照射の併用により、がん性腹水中

の TAM に対する NF- κ B decoy の導入を行った。固形腫瘍の場合と同様に、腹腔内における血管新生、がん細胞増殖、腹水貯水の有意な抑制、延命効果が得られることが示された。これらは、先ほどの腫瘍内投与の検討と良く対応するものである。以上、マンノース修飾バブルリポソームと超音波照射の併用による TAM 選択的な DDS の開発に成功し、また、がん治療へ応用できる可能性が示された。

また、マウス大腸がん細胞である colon26 細胞を移植したマウスに高密度焦点式超音波照射をおこなったところ、固形腫瘍の増殖抑制効果が認められた。今後、腫瘍部位へ超音波照射を行う際、高密度焦点式を利用し、マンノース修飾バブルリポソーム製剤と組み合わせることで、精度が高いターゲティング型 DDS の構築ができるものと考えている。

以上、本研究で得られた知見は、新規超音波応答性糖修飾バブル製剤の開発および TAM を標的としたがん治療薬開発において有益な基礎的知見となることが期待される。

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 10 件)

1. T. Kurosaki[†], S. Kawakami[†], Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, H. Sasaki, F. Yamashita, M. Hashida[†]: Kidney-selective gene transfection using anionic bubble lipopolyplexes with renal ultrasound irradiation in mice, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*, in press (2014) 査読有
2. M. Yoshida, S. Kawakami[†], K. Un, Y. Kono, Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida[†]: Evaluation of inflammatory responses due to siRNA transfer using unmodified and mannose-modified bubble lipopolyplexes with ultrasound exposure in primary cultured macrophages, *Journal of Drug Targeting*, in press (2014) 査読有
3. Y. Kono, S. Kawakami[†], Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida[†]: In vitro evaluation of inhibitory effects of NF- κ B activity by small interfering RNA on pro-tumor characteristics of M2-like macrophages, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37 (1), 137-144 (2014) 査読有
4. T. Kurosaki, S. Kawakami[†], Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, H. Sasaki, F. Yamashita, M. Hashida[†]: Development of anionic bubble lipopolyplexes for efficient and safe gene transfection with ultrasound exposure in mice, *Journal of Controlled Release*, 176, 24-34 (2014) 査読有
5. 川上 茂: 外部刺激を利用した in vivo 核酸デリバリー法の開発、*薬剤学*, 73, 153-160 (2013) 査読無
6. K. Un, Y. Kono, M. Yoshida, F. Yamashita, S.

- Kawakami[†], M. Hashida[†]: Enhancement of gene expression by transcriptional activation using doxorubicin-loaded liposome/pDNA complexes, *Pharmazie*, 67(5), 400-405 (2012) 査読有
7. K. Un, S. Kawakami[†], M. Yoshida, Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida[†]: Efficient suppression of ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation, *Hepatology*, 56 (1), 259-269 (2012) 査読有
8. T. Kurosaki, S. Kawakami, R. Suzuki, K. Maruyama, H. Sasaki, M. Hashida: Novel ultrasound-responsive gene carrier with ternary structure, *Human Gene Therapy*, 23 (10), A141-A142 (2012) 査読無
9. 運 敬太, 川上 茂, 橋田 充: 糖修飾超音波応答性リポソームによるがん免疫治療・抗炎症治療戦略, *実験医学増刊*, 30, 135-141 (2012) 査読無
10. K. Un, S. Kawakami[†], Y. Higuchi, R. Suzuki, K. Maruyama, F. Yamashita, M. Hashida[†]: Involvement of activated transcriptional process in the efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure, *Journal of Controlled Release*, 156 (3), 355-363 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 川上 茂: 体外からの刺激に応答して機能を発揮する遺伝子デリバリーシステムの開発, *バイオマテリアル学会九州講演会 2013 (招待講演)*, 2013 年 9 月 20 日, 熊本大学くすの木会館 (熊本県)
2. 川上 茂: 外部刺激を利用した標的指向型遺伝子・核酸送達システムの開発, *遺伝子・デリバリー研究会第 13 回夏季セミナー*, 2013 年 7 月 24 日, ハワイプリンスホテルワイキキ (ハワイ)
3. 河野裕允, 川上 茂, 樋口ゆり子, 鈴木亮, 丸山一雄, 山下富義, 橋田 充, マンノース修飾バブルリポソームを用いた NF-κB 活性化制御による腫瘍関連マクロファージの phenotype 変化, 2013 年 5 月 23 日, ウィンクあいち (愛知県)
4. 川上 茂: 外部刺激を利用した in vivo 核酸デリバリー法の開発と評価, *日本薬剤学会第 27 年会 (招待講演)* 2012 年 5 月 25 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
5. 川上 茂: 外部刺激を利用した遺伝子・核酸デリバリーシステム, *第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (招待講演)*, 2012 年 7 月 5 日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
6. Y. Kono, K. Un, M. Yoshida, F. Yamashita, S. Kawakami, M. Hashida: Enhancement of gene expression by transcriptional activation using doxorubicin-loaded liposome/pDNA

- complexes, 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2011 年 11 月 26 日, 名古屋大学医学部附属病院 (愛知県)
7. 吉田 允, 川上 茂, 運 敬太, 山下富義, 橋田 充: 超音波応答性マンノース修飾リポソームを用いた siRNA 導入による効率的な細胞選択的遺伝子発現抑制法の開発, *第 61 回日本薬学会近畿支部大会*, 2011 年 10 月 22 日, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパス (兵庫県)
8. S. Kawakami, K. Un, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Higuchi, F. Yamashita, M. Hashida: Anti-inflammatory effects by icam-1 siRNA delivery using mannose-modified bubble lipoplexes and ultrasound exposure, *日本薬物動態学会第 26 年会*, 2011 年 11 月 17 日, 広島国際会議場 (広島県)
9. 川上 茂, 運 敬太, 橋田 充: 細胞特異的核酸医薬デリバリーを目的とした超音波応答性マンノース修飾リポソームの開発, *第 27 回日本 DDS 学会学術集会 (招待講演)*, 2011 年 6 月 10 日, 東京大学本郷キャンパス (東京都)
10. 林 昂司, 清水一憲, 森 勇樹, 川上 茂, 小西 聡, 橋田 充: 体内埋込型マイクロシステムを用いた腎臓への遺伝子導入法の開発, *第 27 回日本 DDS 学会学術集会*, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学本郷キャンパス (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

1. 名称: アニオン性を有する新規ナノバブルポリリポ・ブレッक्सの製造方法
 発明者: 黒崎友亮, 川上 茂, 橋田 充
 権利者: 京都大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-181409
 出願年月日: 2012 年 8 月 20 日
 国内外の別: 国内

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〕

ホームページ等
 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 展開医療薬学講座 医薬品情報学分野 <http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/arp/index-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上 茂 (KAWAKAMI, Shigeru)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20322307

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し ()

研究者番号：