

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790203

研究課題名(和文)腫瘍関連マクロファージ標的リポソーム製剤のがんに対する有効性の評価

研究課題名(英文)Evaluation of antitumor effect of tumor-associated macrophage-targeting liposomes

研究代表者

服部 喜之(Hattori, Yoshiyuki)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90350222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の増殖を促進する腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、葉酸受容体を発現している。そこで、マクロファージ阻害薬ゾレドロン酸(ZOL)を封入した葉酸修飾リポソーム製剤(FL-ZOL)を調製し、*in vitro*と*in vivo*で抗腫瘍効果を評価した。FL-ZOLを培養細胞に添加したところ、葉酸受容体を介してがん細胞やマクロファージ細胞に選択的に取り込まれた。しかしながら、FL-ZOLを担がんマウスに投与したところ、ZOLのリポソーム化により副作用が高まり死亡するマウスが多く観察されたため、FL-ZOLによるTAMを介した*in vivo*での抗腫瘍効果の評価はできなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of whether depletion of tumor-associated macrophages (TAMs) by zoledronic acid (ZOL) entrapped in folate-linked liposome (FL-ZOL) could inhibit tumor angiogenesis and consequently tumor growth. FL-ZOL showed high cytotoxicity for FR-positive KB and murine macrophage RAW264.7 cells, but not for FR-negative Colon 26 cells, suggested that FL-ZOL was selectively taken up via FR-mediated endocytosis. However, injections of FL-ZOL did not induce antitumor activities for KB and Colon 26 tumor-bearing mice, and had a lethal effect by high toxicity. From these findings, the severe *in vivo* toxicity of liposomal ZOL limited its utility for *in vivo* TAM targeting, although FL-ZOL could selectively induce *in vitro* cytotoxicity via FR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：葉酸受容体 リポソーム マクロファージ ゾレドロン酸 がん治療

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、腫瘍細胞以外にも線維芽細胞やマクロファージ、血管内皮細胞などの間質細胞で構成されている。膵がんやスキルス胃がんなどの難治性腫瘍においては、腫瘍組織中の腫瘍間質が占める割合が70%程度と多く、間質の占める割合と腫瘍の悪性度に相関性があることが知られている。間質細胞の中でも腫瘍内に存在するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) とも呼ばれ、血管内皮増殖因子(VEGF)などのサイトカインを分泌し、腫瘍内に栄養を供給するための新生血管の形成を促進する。そのため、TAMを標的とした薬物治療は、新たながん治療法となると考えられるが、これまで腫瘍内のTAMを選択的に死滅させるがん治療法についてはほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

腫瘍組織中に存在するTAMは、葉酸受容体(FR) β を特異的に発現していることから、FR β を標的としたマクロファージ阻害薬は、腫瘍の種類に関わらず高い抗がん効果を発揮するがん治療薬となりうる可能性が高い。そこで本研究では、マクロファージ阻害薬を封入した葉酸修飾リポソーム製剤を調製し、担がんマウスの尾静脈内投与により効率的に腫瘍内のTAMにFR β を介して薬物を送達し、TAMを死滅させることで抗腫瘍効果が得られるかどうか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR法による培養細胞と腫瘍組織におけるFR mRNAの発現解析

ヒトがん細胞として、前立腺がんPC-3細胞、甲状腺髄様がんTT細胞、咽頭上皮癌KB細胞、大腸がんHT-29細胞を用いた。マウスがん細胞として、大腸がんColon 26細胞、肺がんLLC細胞、メラノーマB16細胞、肉腫S180細胞、神経芽細胞腫Neuro2a細胞を用いた。各がん細胞をマウス皮下に移植して固形がんを作製した。各培養細胞と固形がんからtotal RNAを抽出後、RT-PCR法により、ヒトFR α (hFR α)、ヒトFR β (hFR β)、マウスFR α (mFR α)またはマウスFR β (mFR β) mRNAの発現を調べた。また、各腫瘍組織におけるmFR β mRNAにおいては定量PCR法により発現量

を比較した。

(2) 担がんマウスにおける蛍光標識葉酸の尾静脈内投与後の組織分布

FR陽性のKB細胞、FR陰性のPC-3、Colon 26細胞をそれぞれマウス皮下移植した担がんマウスに蛍光標識葉酸(FolateRSense680)を尾静脈内投与した。投与6時間後に各組織を摘出し、蛍光標識葉酸の分布を*ex vivo* imagingにより観察した。

(3) マクロファージ阻害薬封入葉酸修飾リポソーム製剤の調製

マクロファージ阻害薬としてゾレドロン酸(ZOL)を用いた。ZOL封入葉酸修飾リポソーム製剤(FL-ZOL)とZOL封入葉酸未修飾リポソーム製剤(L-ZOL)は、卵黄レシチン、コレステロール、葉酸PEG₂₀₀₀-DSPEまたはPEG₂₀₀₀-DSPEを60:39.5:0.5(モル%)の組成で薄膜法により調製した。調製後の各リポソーム製剤は、ゲルろ過カラムにて精製後、リポソーム内のゾレドロン酸量をHPLCにより測定し、封入率(%)を算出した。

(4) 培養細胞に対するリポソーム製剤の細胞毒性

KB細胞、Colon 26細胞、マクロファージ様細胞RAW264.7細胞に、様々なZOL濃度でZOL溶液、L-ZOL、FL-ZOLを添加した。KB細胞とColon 26細胞においては添加48時間後に、RAW264.7細胞においては添加72時間後に細胞生存率(%)をWST-8アッセイにより測定した。

(5) ローダミン標識葉酸修飾リポソームの腫瘍への集積

ローダミン標識葉酸修飾リポソーム(FL)とローダミン標識葉酸未修飾リポソーム(L)は、FL-ZOL、L-ZOLの脂質組成にローダミン標識脂質(Rhodamine-DHPE)を0.5 mol%添加して調製し、KBまたはColon 26担がんマウスに尾静脈内投与した。投与6時間後に腫瘍を摘出し、16 μ mの凍結切片を作製した。リポソームの腫瘍内の局在は、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(6) KBおよびColon 26担がんマウスに対する抗腫瘍効果

KBまたはColon 26担がんマウスに対して、ZOL溶液、L-ZOLまたはFL-ZOLを5 μ g ZOLの投与量で3日毎に計3回、あるいは20 μ g ZOLの投与量で3日毎に計2回投与した。投与開始から継時的に腫瘍体積(mm³)とマウ

ス体重(g)を測定し、抗腫瘍効果と副作用を調べた。

4. 研究成果

(1) 培養細胞と腫瘍組織における FR mRNA の発現

がん組織において、FR α と FR β の 2 種類のアイソフォームが主に発現していることが報告されている。そこで、4 種類の人がん細胞と 5 種類のマウスがん細胞を用いて、がん培養細胞とマウス皮下に移植した固形がんにおける FR α と FR β mRNA の発現を RT-PCR 法により比較した。ヒトがん培養細胞での hFR α mRNA の発現は、KB 細胞で強く、HT-29 細胞と TT 細胞で弱く発現していた。マウスがん培養細胞での mFR α mRNA の発現は、B16 細胞と Neuro2a 細胞で認められたが、他のがん細胞では検出されなかった(図 1B)。一方、FR β mRNA はヒトとマウスのいずれのがん細胞においても検出されなかった(図 1A, B)。

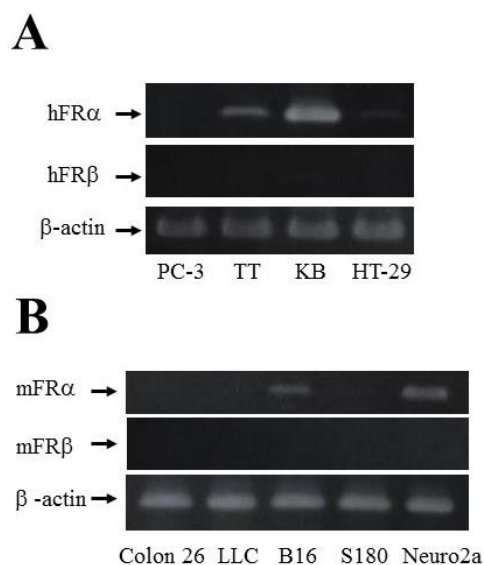


図 1 ヒトがん細胞(A)とマウスがん細胞(B)における FR α と FR β mRNA の発現

一方、担がんマウスの腫瘍組織においては、FR α mRNA の発現は培養細胞の結果と同様に、ヒト腫瘍では KB 腫瘍で強く、TT、HT29 腫瘍で弱く検出され、マウス腫瘍では B16 と Neuro2a 腫瘍で検出された(図 2 A, B)。しかしながら、mFR β mRNA の発現は、全ての腫瘍組織で検出された。以上の結果より、腫瘍組織における FR β mRNA 発現はがん細胞由来ではなく、腫瘍間質細胞である TAM 由来で

あるものと考えられた。

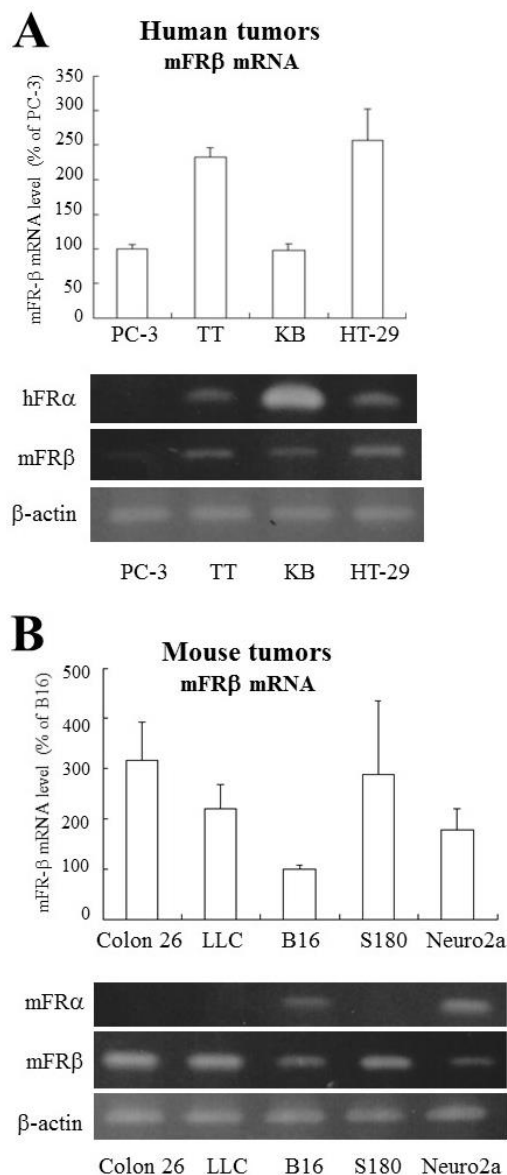


図 2 マウス皮下に移植したヒト腫瘍(A)とマウス腫瘍(B)における FR α と FR β mRNA の発現

(2) 蛍光標識葉酸投与後の担がんマウスの腫瘍への集積

固形がんには FR β を発現している TAM が存在している。そこで、担がんマウスに尾静脈内投与した葉酸が腫瘍の TAM に取り込まれるかどうか調べた。FR 陰性株として PC-3 または Colon 26 細胞を、FR 陽性株として KB 細胞を用いて担がんマウスを作製した。各担がんマウスに対し、蛍光標識葉酸の投与 6 時間後に各組織を摘出し、蛍光標識葉酸の集積量を *ex vivo imaging* により調べた(図 3)。その結果、がん細胞における FR の発現の有無に関わらず、いずれの固形がんにおいても葉酸の集積が認められた。FR を発現していない PC-3 または Colon 26 腫瘍においては、FR β

を発現している TAM が葉酸を取り込んだものと考えられた。

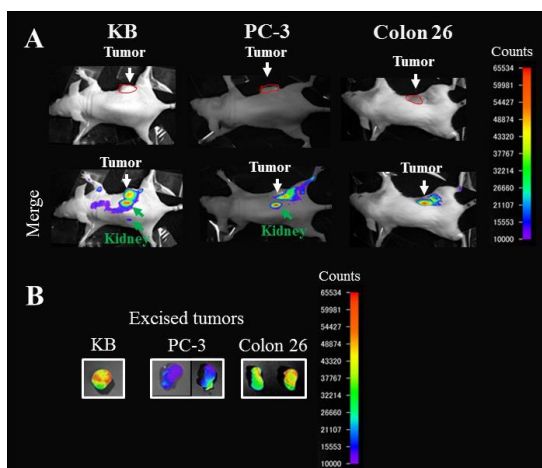


図 3 蛍光標識葉酸投与 6 時間後のマウス体内分布

(3) マクロファージ阻害薬封入葉酸修飾リポソーム製剤の調製

(1)と(2)の結果より、リポソーム製剤に葉酸修飾すると効率的に TAM に FR β を介して薬物送達できるものと考えられた。そこで、マクロファージ阻害薬を封入した葉酸修飾リポソーム製剤の調製を試みた。マクロファージ阻害薬として初めにクロドロン酸を用いてリポソーム製剤の調製を行った。クロドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤は、フォスファチジルコリンとコレステロールに葉酸修飾 PEG 脂質を添加した組成で薄膜法により調製した。その後、これまでに報告されている論文を参考に有機溶媒を用いてリポソーム脂質を除去し、リポソーム内に封入されたクロドロン酸量を紫外吸光度法で測定した。しかしながら、脂質を完全に除去出来ず、脂質由来の紫外吸光によりクロドロン酸を正確に定量することが出来なかった。さらに、HPLC を用いてリポソーム脂質とクロドロン酸を分離し、クロドロン酸量の定量を試みたが、脂質とクロドロン酸のピークが分離できず、クロドロン酸量を正確に定量することが出来なかった。そこで、マクロファージ阻害薬であるゾレドロン酸 (ZOL)を用いて ZOL 封入葉酸修飾リポソーム製剤を作製し、HPLCによりリポソーム内に封入された ZOL 量の定量を行った。その結果、リポソーム内に封入された ZOL 量を正確に定量することができたため、以後、ZOL を薬物として用いた。ZOL 封入葉酸修飾リポソーム製剤 (FL-ZOL)と ZOL 封入葉酸未修飾リポソーム

製剤(L-ZOL)は、卵黄レシチン、コレステロール、葉酸 PEG₂₀₀₀-DSPE または PEG₂₀₀₀-DSPE を 60:39.5:0.5 (モル%)の組成で薄膜法により調製した。FL-ZOL と L-ZOL の粒子径は、どちらも約 150 nm、 ζ 電位は約-15 mV、ZOL 封入率は FL-ZOL で約 8%、L-ZOL で約 11%であった。

(4) リポソーム製剤の培養細胞に対する細胞毒性

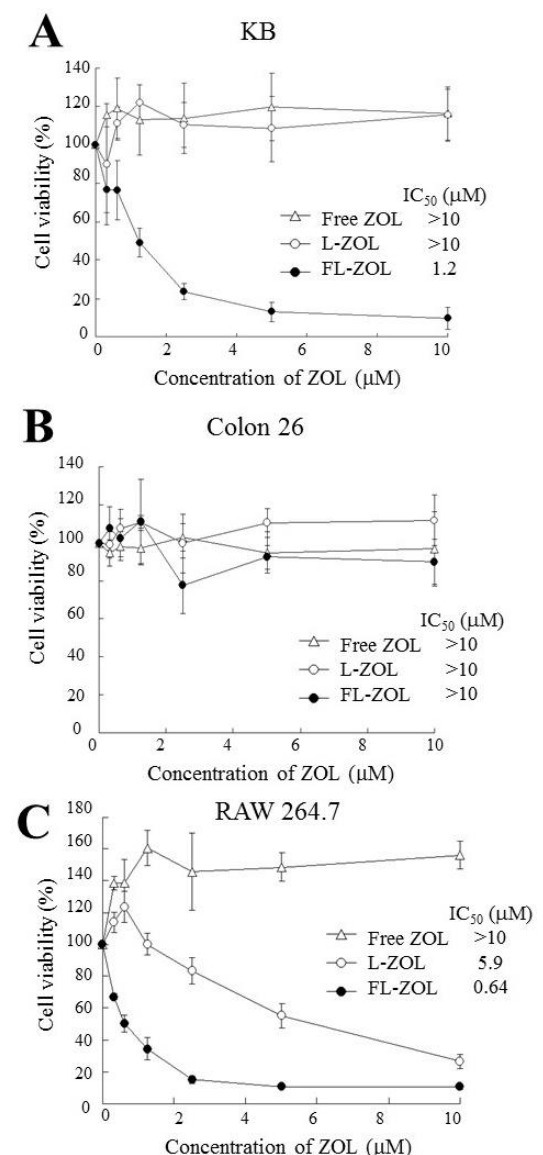


図 4 ゾレドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤の細胞毒性

調製した FL-ZOL が葉酸受容体を介して細胞内に取り込まれ細胞毒性を誘導できるかどうか確認するため、FR 陽性の KB 細胞とマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞、FR 陰性の Colon 26 細胞に対する細胞毒性試験を行った。ZOL は強い負電荷を有する薬物のため、細胞膜を透過できず、ZOL 溶液処置群ではい

ずれの細胞においても細胞毒性が認められなかった(図4)。FL-ZOL 処置群では KB 細胞や RAW264.7 細胞に対し細胞毒性を示したが、Colon 26 細胞に対しては細胞毒性を示さなかった。一方、L-ZOL 処置群では RAW264.7 細胞に対して弱い細胞毒性を示したが、KB、Colon 26 細胞に対しては細胞毒性を示さなかった。L-ZOL が RAW264.7 細胞に対して弱い細胞毒性を示した理由は、マクロファージ細胞の貪食作用によるものと考えられた。

(5) ローダミン標識葉酸修飾リポソームの腫瘍への集積

培養細胞においては葉酸受容体を介した FL-ZOL の取り込みが確認できたことから、次に担がんマウスに尾静脈内投与後の腫瘍における葉酸修飾リポソームの集積性を調べた。KB 担がんマウスの腫瘍では、Colon 26 担がんマウスの腫瘍よりもリポソームの集積が多く観察された(図5)。また、KB 担がんマウスの腫瘍では、リポソームの葉酸修飾により腫瘍における集積性が上昇したが、Colon 26 担がんマウスの腫瘍ではリポソームの集積量は葉酸修飾により大きな違いは認められなかった。

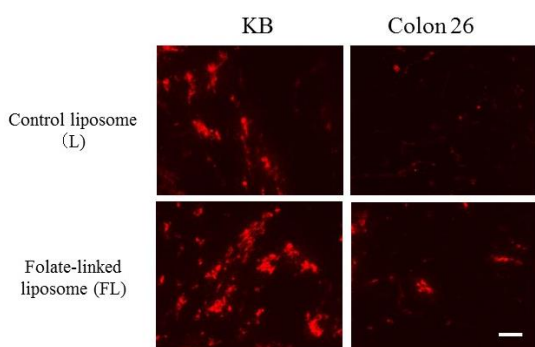


図5 ローダミン標識葉酸修飾リポソーム製剤投与6時間後のマウス固形がんにおける局在 (Scale bar = 100 μ m)

(6) KB および Colon 26 担がんマウスに対するリポソーム製剤による抗腫瘍効果

KB ならびに Colon 26 担がんマウスを用いてリポソーム製剤の抗腫瘍効果を調べた。KB および Colon 26 担がんマウスに対して 5 μ g ZOL を計 3 回、尾静脈内投与したところ、FL-ZOL および L-ZOL どちらも抗腫瘍効果を示さなかった(図6)。KB 担がんマウスにおいては、FL-ZOL 投与群ですべてのマウスが 12 日目までに死亡した。Colon 26 担がんマウス

においては、FL-ZOL 投与群では 3 匹中 2 匹のマウスが 14 日目までに死亡し、L-ZOL 投与群ではすべてのマウスが 9 日目までに死亡した。また、FL-ZOL 投与群および L-ZOL 投与群において、体重減少も観察された。しかしながら、ZOL 溶液投与群では、いずれのマウスにおいても死亡や体重減少などの副作用は観察されなかった。

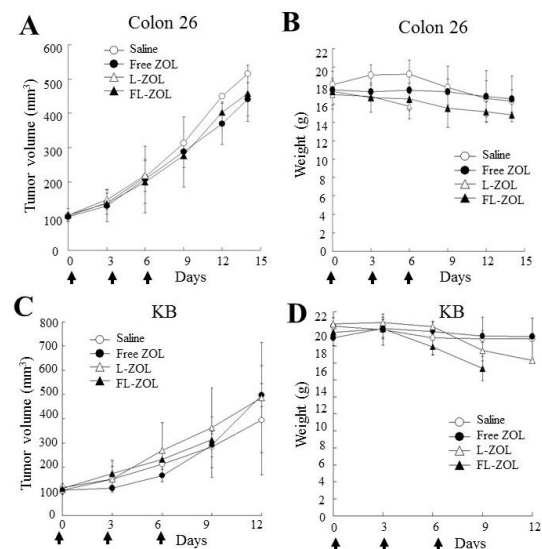


図6 ゼレドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤による抗腫瘍効果 (5 μ g ZOL/mouse で計 3 回投与)

さらに、20 μ g ZOL の投与量で各リポソーム製剤を担がんマウスに尾静脈内投与したところ、KB および Colon 26 担がんマウスいずれの腫瘍においてもわずかな抗腫瘍効果が認められたが(図7)、FL-ZOL 投与群および L-ZOL 投与群において 7 日目までにすべてのマウスが死亡した。

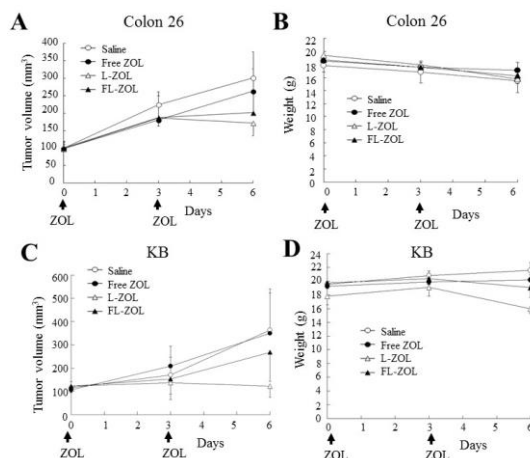


図7 ゼレドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤による抗腫瘍効果 (20 μ g ZOL/mouse で計 2 回投与)

以上のことより、FL-ZOL は培養細胞において FR 選択的な細胞毒性を示したが、*in vivo*

においては ZOL のリポソーム化により副作用が増加し、TAM を介した抗腫瘍効果を評価することができなかった。クロドロン酸のリポソーム製剤においてはこのような副作用は報告されていないため、リポソーム内に封入する薬物をクロドロン酸やアレンドロン酸などの薬物に変更すれば、葉酸修飾リポソーム製剤による TAM を標的とした抗腫瘍効果を評価することが可能であるかもしれない。

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 Y. Hattori, A. Nakamura, S. Arai, M. Nishigaki, H. Ohkura, K. Kawano, Y. Maitani and E. Yonemochi, In vivo siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-L-glutamic acid-coated lipoplex, Results in Pharma Sciences, 4: 1-7 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.rinphs.2014.01.001

② Y. Hattori, M. Date, S. Arai, K. Kawano, E. Yonemochi, Y. Maitani, Transdermal delivery of small interfering RNA with elastic cationic liposomes in mice, Journal of Pharmaceutics, Article ID 149695 (2013). 査読有

DOI: 10.1155/2013/149695

③ Y. Hattori, H. Yamasaku, Y. Maitani, Anionic polymer-coated lipoplex for safe gene delivery into tumor by systemic injection, J. Drug Target., 21(7): 639-647 (2013). 査読有

DOI: 10.3109/1061186X.2013.789035

④ K. Kawano, Y. Hattori, H. Iwakura, T. Akamizu, Y. Maitani, Combination therapy with gefitinib and doxorubicin inhibits tumor growth in transgenic mice with adrenal neuroblastoma, Cancer Med., 2(3): 286-295(2013). 査読有

DOI: 10.1002/cam4.76

⑤ Y. Hattori, T. Nakamura, H. Ohno, N. Fujii, Y. Maitani, Enhanced plasmid DNA transfer into tumor cells by nanoparticle composed of cholesteryl triamine and diamine, Biol. Pharm. Bull., 36: 856-860 (2013). 査読有

DOI: 10.1248/bpb.b12-01062

⑥ M. Kato, Y. Hattori, M. Kubo and Y. Maitani, Collagenase-1 injection improved tumor distribution and gene expression of cationic lipoplex, Int. J. Pharm., 423 (2):428-434 (2012). 査読有

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.12.015

⑦ Y. Hattori, Y. Nagaoka, M. Kubo, H. Yamasaku, Y. Ishii, H. Okita, H. Nakano, S. Uesato, Y. Maitani, Antitumor effect of liposomal histone deacetylase inhibitor-lipid conjugates in vitro, Chem. Pharm. Bull., 59(11):1386-1392 (2011). 査読有

DOI: 10.1248/cpb.59.1386

[学会発表] (計 7 件)

① 日本薬学会 第 134 年会, 2014 年 3 月 27-30 日, 熊本, 腫瘍関連マクロファージを標的としたゾレドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤による抗腫瘍効果の評価, 山下潤, 坂井田知里, 川野久美, 服部喜之, 米持悦生

② 第 13 回 遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2013 年 5 月 11 日, 東京, 新規正電荷コレステロール誘導体を用いて調製した脂質ナノ粒子製剤によるがん細胞への siRNA 送達, 服部喜之, 中村司, 大野浩章, 藤井信孝, 米谷芳枝

③ 日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜, 固形がんにおける葉酸受容体の発現と腫瘍関連マクロファージ標的ゾレドロン酸封入葉酸修飾リポソーム製剤の開発, 山下潤, 坂井田知里, 服部喜之, 米谷芳枝

④ 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 京都, 2012 年 11 月 15-16 日, 脂質ナノ粒子製剤を用いたがんへの遺伝子送達, 服部喜之

⑤ 第 8 回 つくばがん遺伝子治療研究会, 東京, 2012 年 7 月 12 日, がん遺伝子治療のための非ウイルスベクターの開発, 服部喜之

⑥ 第 109 回日本内科学会総会, 2012 年 4 月 13-15 日, 京都, 甲状腺乳頭癌における葉酸受容体発現, 金本巨哲, 服部喜之, 上田依利子, 曾根正勝, 三浦晶子, 八十田明宏, 荒井宏司, 米谷芳枝, 中尾一和

⑦ 日本薬剤学会 第 26 年会, 2011 年 5 月 29-31 日, 東京, がん遺伝子導入用負電荷ポリマー被覆リポプレックス製剤の開発
山作晴香, 服部喜之, 米谷芳枝

[その他]

ホームページ:

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/souzai/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 喜之 (HATTORI, Yoshiyuki)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90350222