

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 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890174

研究課題名（和文） 高機能性温熱感受性リポソームによる薬剤耐性癌に対する新規治療戦略

研究課題名（英文） Novel therapeutic strategy to enhance the blood circulation by using novel thermosensitive liposomes

研究代表者 田上辰秋 (TAGAMI TATSUAKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・特任講師

研究者番号：10609887

研究成果の概要（和文）：

薬剤耐性は癌治療において解決されなければならない最重要課題の一つである。近年我々は、圧倒的な薬物放出能と温熱感受性に優れた「超」高感度の温熱感受性リポソーム（HaTリポソームと呼称）を開発し、軽温熱療法の温度範囲（40-42℃）で抗癌剤を腫瘍組織選択的に送達することに成功した。本研究の目的は、手術による外科的切除が不能である固形癌、特に薬剤耐性癌にも応用可能な高機能性リポソーム製剤を開発することである。申請者はHaTによる薬剤耐性を向上させる試みとして、主に、抗癌剤のリポソーム内保持力及び血中滞留性を向上させる工夫を行った。金属イオン勾配を利用したリモートローディング法により抗癌剤をリポソーム内に効率的に封入することに成功し、従来型のpH勾配を利用した方法と比較し、リポソーム内における薬物の保持力は安定していることがわかった。In vivoにおける動物実験の結果、我々の開発した新規のHaTリポソーム製剤は、通常のHaTリポソームと比較し、血中滞留性が改善された。以上より、我々は、血中滞留性の高い新規HaTリポソーム製剤の開発に成功し、さらに薬剤耐性癌の克服に有効な多くの知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel thermosensitive liposome formulation (HaT). To further extend our study, we proposed the new liposome formulation with more stability in the liposome. In traditional method to make doxorubicin (DOX)-loaded liposome, pH gradient is usually used. In contrast, transient metal complex-mediated retention in liposome is attractive technology in the field of liposome. We tried to encapsulate DOX in HaT liposome by using copper ion gradient.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：薬学、ナノデバイス、癌、トランスレーショナルリサーチ

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年、温熱療法の実用として温熱感受性リポソームを用いた化学療法の研究が行われている。これは腫瘍を加熱することで、リポソーム内に封入していた抗癌剤を腫瘍内に放出させるターゲティング療法である。昨年申請者らは、圧倒的な薬剤放出能力と温熱感受性に優れた「超」高感度の温熱感受性リポソームの開発に成功した（名称：**HaT (Hyperthermia-activated-cytoToxic)**）。HaT リポソームに含まれる Brij78 界面活性剤は「ポリエチレングリコール (PEG) 鎖」と「一本鎖脂質」から形成され、これらがそれぞれ「血中滞留性の維持」と「薬物の爆発的な放出」に貢献する(図1)。

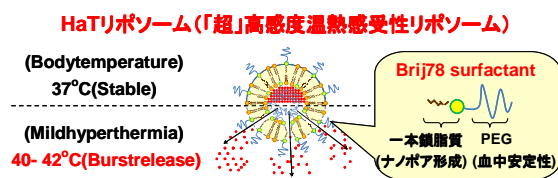


図1. 温熱感受性リポソーム：HaT

現在最も開発が進んでいる温熱感受性リポソームは ThermoDOX (Phase III) (セルシオン社：日本ではヤクルトが販売権)であるが、HaT リポソームは ThermoDOX より①薬物放出速度②腫瘍組織への薬物送達量③抗腫瘍効果の点で顕著に優れていた。

ThermoDOX と温熱療法による新しい併用療法（治療様式）は、日本を含む北米・アジア諸国(20カ国)において原発性肝癌(Phase III)・胸壁部乳癌(Phase II)に対し現在臨床試験が行われており、すでに多くの症例で顕著な治療効果が報告されている。しかし、特に腫瘍が巨大な症例の場合、繰り返し治療を行ったとしても再発が認められたため（治療効果に有意差が認められないため）、将来薬剤耐性癌に焦点を当てることの重要性が示唆されている。そこで申請者は HaT リポソームに薬剤耐性癌の克服能力を付与した高機能性の新規 HaT リポソーム開発を思い立ち、本研究計画では温熱感受性リポソームを用いた薬剤耐性癌に対する新規戦略について提案する。

2. 研究の目的

薬剤耐性は癌治療において解決すべき最重要課題の一つである。最近申請者は、圧倒

的な薬物放出能力と温熱感受性に優れた「超」高感度の温熱感受性リポソーム(HaT リポソームと呼称)を開発し、低温熱療法(40-42°C)との併用で、抗癌剤を腫瘍組織選択的に送達することに成功した。本研究の目的は、申請者が独自に開発した HaT リポソームをさらに発展させ、腫瘍組織への移行量向上を目指した高機能性リポソーム製剤を開発することである。

3. 研究の方法

①ドキシソルビシン(DOX)封入ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームの調製 (pH 勾配法)

リポソームの脂質および Brij を有機溶媒に溶解し、エバポレーターによって、薄膜フィルムの作成を行った。その後、クエン酸を加えて水和を行い、エクストリューダーによりリポソームの粒子径を 100nm 程度に調節した。その後、透析処理により、リポソームの外水相を HBS 緩衝液に置換し、リポソームの内相と外相に pH 勾配を形成した。その後塩基性薬物である DOX を添加し、37 度で培養することにより、薬物をリポソーム内に封入した。

②ドキシソルビシン(DOX)封入ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームの調製 (金属イオン勾配法)

①と同様に薄膜フィルムの作成を行った後、グルコン酸銅水溶液を加えて水和を行い、エクストリューダーによりリポソームの粒子径を 100nm 程度に調節した。その後、リポソームの外水相を緩衝液で置換し、リポソームの内相と外相にイオン勾配を形成した。その後、DOX を添加し、37 度で培養することにより、薬物をリポソーム内に封入した。

③リポソームから放出された DOX 量の定量

リポソーム溶液をマイクロチューブに入れ、マイクロチューブを各温度に保たれた浴槽に入れ、培養を行った。各時間ごとにサンプルを取り出し、氷上に移動し、サンプルの冷却を行った。サンプルを 96well プレートに移し、プレートリーダーを用いて DOX の蛍光を定量した。

4. 研究成果

薬剤耐性癌を克服する方法の一つとして、標的の腫瘍組織に効率的に抗癌剤を送達できるかどうかは鍵となる。

温熱感受性リポソームに求められる条件として、体温においては薬物を保持できるが、加温時において、一気に薬物を放出できることが上げられる。我々はこれまでに開発した HaT リポソームにおいて 30-37 度においてはほとんど薬物を放出せず、血清中で 30 分間培養しても 10-20% 程度の薬物しか漏出しなかった (in vitro 条件)。これに対し、40 度以上においては数分以内に 100% の薬物放出が見られたことより、我々の作成した HaT リポソームは非常に温熱感受性に優れていることがわかっている。

In vivo においても HaT リポソームは同様の温熱感受性を示し、温熱に反応して薬物を効率的に腫瘍組織中に送達できることがわかっている。しかし、この HaT リポソームや、最も開発が進んでいる ThremoDOX は血中滞留性が短いことが指摘されている。これは、温熱感受性に特化したリポソームであるため、リポソーム組成中にコレステロールを含有しておらず、血中で崩壊しやすいためである。コレステロールを含有した場合、温熱感受性が損なわれてしまうため、我々は、リポソームの脂質組成でなく、リポソームの水相に封入される薬物の保持力を改善することにより血中滞留性を改善し、温熱感受性も保つことを試みた。

薬物をリポソーム内部に封入する方法として、従来型の pH を利用した方法がある (図 2)。DOX は硫酸アンモニウムやクエン酸と結合し、複合体を形成することにより、リポソーム内部に効率的に保持することが可能である。

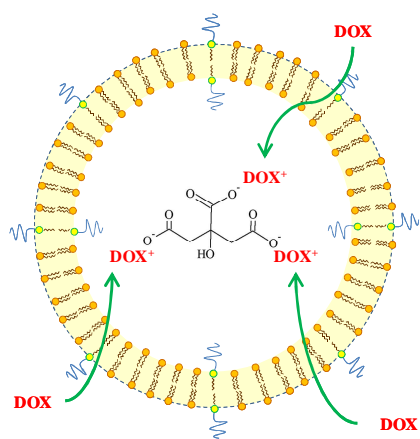


図 2. pH 勾配法による DOX のリポソーム内部への封入。

この従来型の方法をさらに改善し、薬物をさらに保持させる方法として、金属イオン・薬物による一過性の複合体を利用した方法を提案した (図 3)。特に銅イオンは DOX と複

合体を形成することが分かっているため、我々は、この金属イオン勾配を利用した DOX 封入を試みた。

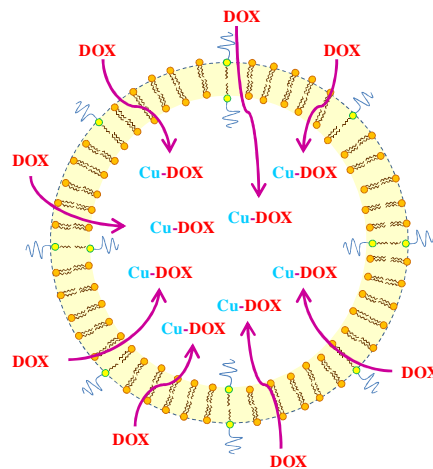


図 3. 銅イオン勾配法による DOX のリポソーム内部への封入。

その結果、pH 勾配の代わりに金属イオン勾配によって DOX を封入することができ、また、同様の量の DOX を内部に封入することに成功した。薬物の放出能力を検討したところ、37 度において、通常の HaT リポソームよりも安定であり、薬物の漏出はほとんど行われなことが明らかとなった。40-42°C においては通常の HaT リポソームと比較し、薬物放出が逆に抑制される結果となったが、これは、温熱感受性をもつ Brij の量を増量することで改善された。

血中滞留性について、実験動物であるマウスを用いて、検討した。その結果、通常の HaT と比較し、血中滞留性の改善が見られ、さらに薬物動態パラメータである AUC の向上も認められた。

以上より、我々は、本研究計画において血中滞留性の向上を目指した温熱感受性リポソーム製剤 HaT の新規製剤の開発を行った。一連の結果より、本研究計画において開発したリポソームの血中滞留性の向上は、腫瘍組織への移行性を向上させるために腫瘍細胞に到達する DOX 量の増大が期待できることから、薬剤耐性癌に対しても効果が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Tatsuaki Tagami, Jonathan May, Mark J Ernsting and Shyh-dar Li. A thermosensitive liposome prepared with

Cu²⁺ gradient demonstrate improved pharmacokinetics, drug delivery and antitumor efficacy. *Journal of Controlled Release*. (2012) in press.

Tatsuaki Tagami, Takuya Suzuki, Mariko Matsunaga, Kazuya Nakamura, Naoto Moriyoshi, Tatsuhiko Ishida and Hiroshi Kiwada. Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 422 280-289 (2012)

〔学会発表〕 (計 6 件)

田上辰秋, Mark J Ernsting, Shyh-Dar Li, 尾関哲也: DPPC リポソームに含有される PEG 系界面活性剤が温熱感受性に与える影響, 日本薬学会第 132 年会, 北海道札幌市, 2012 年 3 月

田上辰秋, 羽原正秋, 安食菜穂子, 平岡正光, 池崎秀和, 尾関哲也: 名古屋市立大学薬学部の製剤学実習における味覚センサー導入の試み, 日本薬学会第 132 年会, 北海道札幌市, 2012 年 3 月

田上辰秋, PEG 化製剤を利用した siRNA デリバリーシステムにおいて siRNA により誘導される免疫応答が体内動態に与える影響に関する研究, 第 36 回製剤セミナー, 静岡県掛川市, 2011 年 7 月.

田上辰秋, Mark J Ernsting, Shyh-Dar Li, 尾関哲也: 高い薬物放出能と温度制御能を有した新規温熱感受性リポソーム (HaT) の開発と温熱療法の併用による抗腫瘍効果の検討, 第 27 回日本 DDS 学会, 東京都文京区, 2011 年 6 月.

田上辰秋, 免疫刺激性 siRNA 含有 PEG 修飾脂質ナノ粒子によって誘導される抗 PEG 抗体分泌の機構, 日本薬剤学会第 24 年会 (East & West Global Education Seminar Workshop), 東京都江戸川区, 2011 年 5 月.

田上辰秋, Mark J Ernsting, Shyh-Dar Li, 尾関哲也: Thermosensitive liposome (HaT) による腫瘍選択的な抗癌剤送達と治療効果の検討, 日本薬剤学会第 26 年会, 東京都江戸川区, 2011 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(田上 辰秋)

研究者番号 10609887