

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420843

研究課題名(和文)ハイブリッドリポソームのがん転移抑制効果に関する研究

研究課題名(英文)Inhibitory effects of hybrid liposomes toward cancer metastasis

研究代表者

市原 英明 (ICHIHARA, Hideaki)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：70369114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DMPCおよびC12(E0)25からなるハイブリッドリポソーム(HL)のヒトの結腸直腸癌(WiDr)細胞の増殖における*in vitro*および*in vivo*での治療効果を検討した。*in vitro*でのWiDr細胞の増殖に対して、HLのアポトーシス誘導による増殖抑制効果が得られた。*in vivo*において、WiDr細胞の肝転移モデルマウスに対するHLのアポトーシス誘導による著明な治療効果は、組織学的分析により明らかになった。WiDr細胞の肝転移モデルマウスに対する延命効果が得られた。これらの結果から、抗がん剤を含まないHLのヒトの結腸直腸がん細胞の肝転移に対する治療効果が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic effects of hybrid liposomes (HL) composed of L-alpha-dimyristylphosphatidylcholine (DMPC) and polyoxyethylene (25) dodecyl ether (C12(E0)25) on the growth of human colorectal cancer (WiDr) cells *in vitro* and *in vivo*. The inhibitory effects of HL on the growth of WiDr cells along with apoptosis were obtained *in vitro*. Remarkable inhibitory effects of HL for the liver metastasis of colorectal cancer cells along with apoptosis were revealed on the basis of histological analysis. Prolonged survival was obtained for the xenograft mouse models of colorectal cancer after the treatment with HL *in vivo*.

研究分野：化学工学

キーワード：癌 転移 シグナル伝達 ナノメディシン *in vivo*

1. 研究開始当初の背景

がんの転移を制御することは、がん治療において最も重要な戦略の一つである。転移の過程には、転移性がん細胞と種々の宿主細胞(血小板、リンパ球、内皮細胞)と細胞外マトリックスや基底膜との相互作用が転移を引き起こす。肝臓および肺は一般的にがんの転移、特に血行性転移の標的となる臓器であり、しかも、転移を伴うがんの予後は非常に悪い。そのため、転移メカニズムを明確にし、治療の目安にすることは、転移性がんによる生存率を改善するのに最も重要なことである。

ハイブリッドリポソーム(HL)は、リン脂質とミセル分子を水溶液中で超音波処理するだけで得られ、素材および組成比の選択により、形態やサイズ、相転移温度、疎水性および流動性のコントロールが可能な生体適合性指向の新しい医用素材である(*J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988))。抗がん剤を含有せずに、それ自身ががん細胞膜特異的に蓄積した後、選択的なアポトーシス誘導により増殖抑制効果を示すことを見出した(*Int. J. Cancer*, **115**, 377 (2005))。さらに、動物レベルでは、担がんマウスに対して高い治療効果と安全性が認められ、生命倫理委員会の承認後、末期がん患者に対する臨床でのパイロットスタディにおいて高い安全性、延命効果および固形リンパ腫の縮小が確認されている(*Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709 (2011))。

以上のように、HL は、これまでに無い副作用の無い画期的な抗転移能を有する化学療法剤として期待できる。

2. 研究の目的

HL は、それ自身でヒト培養がん細胞に対して顕著な増殖抑制効果および担がんモデル動物に対する治療効果を示し、正常動物に対しては無毒性であり副作用がないことを報告している。また、制がんメカニズムが、アポトーシス誘導に起因することをすでに見出している。さらに、生命倫理委員会の承認を得た後、再発悪性リンパ腫や咽頭癌などの末期患者に対して HL を投与してパイロットスタディを行ったところ、約1年間の治療期間中全く副作用はなく、高い安全性および延命効果が認められた。そこで本研究においては、抗がん剤を全く含まない HL を用いて、がんの中でもとりわけ悪性で転移能の高い大腸がん、リンパ腫、骨肉腫の転移に対する効果的な化学療法を目指した。(1) 素材として無毒性のリン脂質と PEG 系直鎖型界面活性剤を構成成分とする HL を用い、(2) *in vitro* におけるヒト大腸がん、リンパ腫および骨肉腫に対する制がん効果、転移・浸潤抑制効果および抗転移メカニズムを検討した。(3) *in vivo* において、ヒト大腸がん、リンパ腫および骨肉腫を移植したがん転移モデルに対する治療実験を行った。さらに臨床応用を目指し、正常動物に対する安全性試験、体内動態試験等の前臨床試験を実施した。

以上のように、細胞レベルおよび動物実験レベルでの HL の前臨床試験結果を蓄積し、がん治療が困難な患者への臨床応用を早期に実現することで社会に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

抗がん剤を全く含まず、リン脂質と中性ミセル界面活性剤から成る HL 自身の制がん効果により、低毒性でしかも優れた抗転移効果をもつ化学療法剤を開発することを目的として研究を進めた。

(1) HL の調製および *in vitro* での細胞増殖抑制効果、(2) HL のアポトーシス誘導解析、(3) HL の *in vitro* での転移・浸潤抑制効果、(4) がん転移モデルマウスに対する *in vivo* での転移・浸潤抑制効果、(5) 正常動物を用いた体内動態試験。(6) HL の *in vitro* での転移・浸潤抑制メカニズム解析、(7) *in vivo* での固形腫瘍のアポトーシス誘導観察、(8) *in vivo* での固形腫瘍の免疫染色による抗転移メカニズム解析、(9) 正常動物に対する安全性試験、(10) 担がんマウスを用いた体内動態試験を実施した。

4. 研究成果

(1) マウス骨肉腫(LM8)細胞の転移性の増殖に関して PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₃)からなるハイブリッドリポソーム(HL)の抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。*in vitro* において HL は、LM8 細胞の増殖をアポトーシス誘導により顕著に抑制した。HL は、*in vitro* において LM8 細胞の浸潤と細胞表面における糸状仮足の形成を劇的に抑制することが明らかになった。さらに、HL で治療した LM8 細胞を移植した肺転移モデルマウスにおいて、顕著な治療効果が確認された。すなわち、組織学的分析において、マウス皮下に移植した LM8 細胞の原発腫瘍成長がアポトーシス誘導により抑制されることが明らかになった。加えて、HL が原発腫瘍からの LM8 細胞の浸潤の抑制することにより、肺転移を有意に減少させることが確認された。(*Cancer Medicine*, **2**, 267 (2013))

(2) DMPC、PEG 系界面活性剤(C₁₂(EO)₂₁)およびカチオン性脂質(2C14ECl)からなるハイブリッドリポソーム(HL)のヒト大腸がん(HCT116)の肝転移モデルマウスに対する治療効果を検討し、以下に示す新しい知見が得られた。カチオン脂質含有 HL の静注により、大腸がん肝転移モデルマウスに対する治療効果が得られた。組織学的解析により、カチオン脂質含有 HL で治療した肝転移モデルマウスの肝臓内の腫瘍部分で、アポトーシス誘導が確認された。(*Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **3**, 498 (2014))

(3) DMPC および C₁₂(EO)₂₅ からなる HL のヒトの結腸直腸癌(WiDr)細胞の増殖におけ

る *in vitro* および *in vivo* での治療効果を検討した。*in vitro* における WiDr 細胞の増殖に対して、HL-25 のアポトーシス誘導による増殖抑制効果が得られた。*in vivo* において、WiDr 細胞の肝転移モデルマウスに対する HL のアポトーシス誘導による著明な治療効果は、組織学的分析により明らかになった。*in vivo* において、WiDr 細胞の肝転移モデルマウスに対する延命効果が得られた。これらの結果から、*in vivo* での抗がん剤を含まない HL のヒトの結腸直腸がん細胞の肝転移に対する治療効果が明らかになった。(*Anticancer Research*, **34**, 4701 (2014))

(4) HL の腫瘍に対する血管新生抑制効果を検討するために、*in vitro* においては、HL の血管新生抑制メカニズムについて正常ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を用いて検討した。*in vivo* においては、ヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験を行った。HL は、HUVEC の生存に影響を与えない濃度で、管腔形成を抑制することが明らかとなった。MDA-MB-453 細胞皮下移植モデルマウスにおいて、HL 治療群では Control 群と比べて有意に腫瘍重量が小さかった。CD34 免疫染色により、腫瘍表面、腫瘍内部の両方で、CD34 陽性領域の減少が確認された。

(*Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, **6**, 1000207 (2015))

(5) HL による肺がん(A549)細胞への制がんメカニズムに関して、セラミドとの関連及び転移浸潤抑制効果について検討した。HL の A549 細胞に対する G₀/G₁ arrest およびアポトーシス誘導による増殖抑制効果が明らかとなった。HL 濃度依存的にセラミド量が増加し、HL が誘導する G₀/G₁ arrest およびアポトーシスには、セラミドの関与が明らかとなった。中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤で処理により増殖抑制効果が阻害され、HL によるセラミド産生に中性スフィンゴミエリナーゼが関与することが示された。HL で処理した細胞では、スフィンゴミエリン量が減少し、HL が誘導するセラミドは細胞内のスフィンゴミエリンにより生成される可能性が示された。HL により MT1-MMP(MMP-14)量が減少しており、遊走・浸潤抑制効果への MMP の関与が明らかとなった。(*Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, **6**, 1000230 (2015))

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 12 件)

H. Ichihara, Y. Komizu, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of non-small cell lung carcinoma cells and anti-invasive

activity by ceramide generation without any drugs, *J. Carcinog. Mutagenen*, **6**, 1000230(1-5) (査読有) (2015).

(DOI: 10.4172/2157-2518.1000230)

H. Ichihara, S. Yamasaki, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Hybrid liposomes inhibit the growth and angiogenesis in human breast cancer model, *J. Carcinog. Mutagenen*, **6**, 1000207(1-7) (査読有) (2015).

(DOI: 10.4172/2157-2518.1000207)

H. Ichihara, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Therapeutic effects of cationic hybrid liposomes on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis *in vivo*, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 498-503 (査読有) (2014).

(DOI: 10.1248/bpb.b13-00764)

H. Kitajima, Y. Komizu, H. Ichihara, K. Goto, R. Ueoka, Hybrid liposomes inhibit tumor growth and lung metastasis of murine osteosarcoma cells, *Cancer Med.*, (査読有) **2**, 267-276 (2013).

(DOI: 10.1002/cam4.67)

S. Nakagawa, Y. Matsuoaka, H. Ichihara, H. Yoshida, K. Yoshida, R. Ueoka, Therapeutic Effects of autologous lymphocytes activated with Trastuzumab for xenograft mouse models of human breast cancer, *Biol. Pharm. Bull.*, (査読有) **36**, 861-865 (2013).

(DOI: 10.1248/bpb.b12-01084)

[学会発表] (計 33 件)

K. Kuwabara, H. Ichihara, Y. Matsumoto, 「 Therapeutic effects of hybrid liposome against human carcinoma using model mice of carcinoma 」 2015 年 12 月 18 日, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (Hawaii, USA).

M. Kuwano, H. Ichihara, Y. Matsumoto, 「 Inhibitory effects of liposomes including trehalose surfactants on the growth of tumor cells along with apoptosis 」 2015 年 12 月 18 日, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (Hawaii, USA).

M. Okumura, H. Ichihara, Y. Matsumoto, 「 Therapeutic effects of hybrid liposomes against colon carcinoma using xenograft mouse models of colon carcinoma 」 2015 年 12 月 18 日, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (Hawaii, USA).

H. Ichihara, Y. Matsumoto, 「 Chemotherapy with hybrid liposomes without drugs along with induction of apoptosis *in vivo* 」 2015 年 12 月 18 日, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

(PACIFICHEM 2015) (Hawaii, USA).

Y. Matsumoto, M. Hino, H. Ichihara,
「Anti-tumor effects of cationic hybrid liposomes against colon carcinoma along with apoptosis in vitro and in vivo」2015年10月10日, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

H. Ichihara, M. Hino, Y. Matsumoto,
「Therapeutic effects of hybrid liposomes with anti-angiogenic/metastatic activity for breast tumors」2015年10月8日, The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

【 Invited Speaker 】 H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, 「Chemotherapy and detection of cancer using hybrid liposomes」2014年8月4日, 9th International Forum on Multimedia and Image Processing (IFMIP) 2014 (World Automation Congress; WAC) (Hawaii, USA).

市原英明, 日野元貴, 松本陽子, 上岡龍一, 「ハイブリッドリポソームの血管新生抑制活性による乳がん治療効果」2014年6月27日, 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会, TKP ガーデンシティ仙台 (宮城県仙台市).

〔図書〕(計2件)

R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, Y. Komizu, 「Membrane-Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Cancer Cells Leading to Apoptosis」, Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions, Springer, 270 (221-244) (2016).

H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, 「Chemotherapy and detection of cancer using hybrid liposomes」, World Automation Congress (WAC), IEEE Xplore, 929 (125-130) (2014).

6. 研究組織

(1)研究代表者

市原 英明 (ICHIHARA, Hideaki)
崇城大学・生物生命学部・准教授
研究者番号：70369114

(2)研究分担者

松本 陽子 (MATSUMOTO, Yoko)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：00133562

上岡 龍一 (UEOKA, Ryuichi)
崇城大学・生物生命学部・客員研究員
研究者番号：70099076