

られなかった動物（30匹）を馴化最終日に無作為に5匹ずつ選抜して群分けを行って、空ヘクター粒子の投与に使用した。

群分けしたマウスの尾静脈より、予め設定した用量の空ヘクター粒子を投与（100 マイクロリットル/マウス）して、安全性を確認した。

一般症状については、投与後に1日1回以上、7日間観察して記録を保存した。体重については、投与直前と観察期間中毎日測定を行ない、各測定日ごとの体重と各測定日間の体重増加量を算出した。

投与後7日目に、マウスを塩酸ケタミン（ケタラール、三共株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血した後に、放血により安楽死させた後に、各動物について剖検を行なった。剖検により異常が認められた臓器については、10%ホルマリンで固定して保存を行い、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した後に鏡検した。

(4) 鼻腔経路での肺組織への投与による安全性の確認

7週齢のCrJ CD-1 (ICR) 系の雄マウスを、各用量群5匹用いて、安全性に関する予備試験を行なった。試験に使用するマウスはすべて日本チャールス リハー株式会社より購入した。マウスを入荷時に外貌所見を行い、健康状態が良好であることを確認した後に7日間以上馴化を行った。馴化期間中に異常がみられなかった動物（30匹）を馴化最終日に無作為に5匹ずつ選抜して群分けを行って、空

ヘクター粒子の投与に使用した。

群分けしたマウスを、ケタミンとキシラノンの混合麻酔下で鼻腔よりピペトマンを使用して、予め設定された用量の空ヘクター粒子を投与（30 マイクロリットル/マウス）した。

一般症状については、投与後に1日1回以上、7日間観察して記録を保存した。体重については、投与直前と観察期間中毎日測定を行ない、各測定日ごとの体重と各測定日間の体重増加量を算出した。

投与後7日目に、マウスを塩酸ケタミン（ケタラール、三共株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血した後に、放血により安楽死させた後に、各動物について剖検を行なった。剖検により異常が認められた臓器については、10%ホルマリンで固定して保存を行い、パラフィン切片を作製し、HE染色を施した後に鏡検した。

(5) GLP 施設での安全性の確認

HVJ-E 非ウイルスヘクターの早期臨床応用を目指して、上記の予備検討で得られたデータを参考にして、安全性に関するデータを取得した。安全性に関する信頼性確保を図るためには、GLP 基準で試験を実施するため、GLP 基準に準拠した外部施設で試験を行なった。

投与経路としては、静脈内と経鼻投与を選択し、用量設定試験のデータを基準に投与用量の設定を行った。

(6) 倫理上の配慮

本研究を実施するにあたり、アノエス MG 株式会社は、研究所の所在地である独立法人産業総合技術研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業総合技術研究所で開催される各委員会にて実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に 1 回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

C 研究結果および考察

(1) 皮内投与による安全性の確認

皮内投与においては最高用量においても、一般症状、体重変化に関してコントロール群（生理食塩水投与）との差異は認められなかった。投与部位の局所的な影響については、高用量群においてのみ、局所の炎症と思われる変化が認められた。空ヘクター粒子は脂質成分を含んでいるため溶液中でエマルジョン状態であり、高用量群では投与部位に固形成分の貯留が認められるため、局所で認められた影響か、物理的な影響であるか或いは空ヘクター粒子に含まれる成分に対する反応であるかは、今後検討を行なう必要がある。今後、免疫毒性に関するデータを取得することで、更に安全性に関する知見を得て、精製条件の検討を行う。

(2) 静脈内投与による安全性の確認

HVJ-E 非ウイルスヘクターは赤血球凝集反応を惹起することが報告されているか、一般毒性学的な評価は実施されていない。そこで今回 HVJ-E 非ウイルスヘクターの全身投与における本質的な影響と一般毒性学的な検討をマウスで実施した。

その結果、高用量群において溶血か原因と思われる影響や、体重の減少が認められた。今後溶血試験や生化学試験を行なって、空ヘクター中の成分による影響であるかを同定する。

また、本研究で得られたデータを参考にして毒性試験のための用量設定と試験項目の設定を行った上で、下記の GLP 施設での試験デザインを終了して、臨床応用に必要となる一般毒性に関するデータ取得を開始した。

(3) 経鼻投与による安全性の確認

経鼻投与においては、最高用量の空ヘクター一粒子を投与した場合にのみ、一般症状に影響が認められた。本ハイオナノ粒子の原料である HVJ は、マウスの肺に感染する事か知られているか、空ヘクター粒子は脂質成分を含んでいるため溶液中でエマルジョン状態でありため、皮内投与の場合と同様に認められた影響か、物理的な影響による窒息であるか或いは空ヘクター粒子に含まれる成分に対する炎症反応であるかは、現在検討を行っている。体重の変化に関しては高用量群と最高用量群で、投与後 3 日～4 日まで体重の減少が認め

られた。

また本予備検討では、1匹あたり30マイクロリットルの溶液量の空ヘクター粒子を投与したか、安全性予備試験において、全群全例に投与容量による物理的な要因と思われる呼吸深大が確認され、生理食塩液投与群の1例で死亡例が認められたため、下記のGLP施設での安先生評価では、投与容量を30マイクロリットルから20マイクロリットルに変更した。

予備検討の結果から高用量のヘクター粒子を投与した場合に、マウスに対する影響が認められたため、上記の静脈内投与の場合と同様に、本研究で得られたデータを参考にして毒性試験のための用量設定と試験項目の設定を行った上で、下記のGIP施設での試験デザインを終了して、臨床应用到必要となる一般毒性に関するデータ取得を開始した。

(4) GLP施設での安全性検討

上記の予備研究のデータを根拠として、GIP試験を開始した。安全性の評価には6週齢のCrj CD-1 (ICR) 系の雄と雌のマウスをそれぞれ用い、投与経路としては固形癌に対する臨床応用を想定して経鼻及び静脈内を選択した。検討項目としては一般症状、体重変化、血液学的および血液生化学的検査、病理組織学的検査を選択した。また、予備検討のデータを根拠として、投与開始時のマウスの週齢(7週齢から6週齢へ変更)、投与用量単位(HAUからNAUに変更)、浴媒(生理食塩液からトリスバッファーに変更)などの変更を行なった上で、安全性に関する検討を行った。今

後は、抗癌剤を封入したヘクター粒子を用いて、安全性に関する検討を行い、精製条件の見直しを行っていく予定である。

D 結論

臨床応用を開始するためには、投与に用いるヘクター粒子の安全性が保証されている必要がある。本ヘクター粒子中には種々の分子を封入して治療に使用する可能性が高いため、封入物質を含まない空ヘクター粒子自身の安全性に関する検討を行った。現在のところ、食道癌、脳腫瘍など局所への投与が可能な固形癌を対象とした臨床応用を想定しているため、投与経路として静脈内投与、経鼻での肺への投与、皮内投与を選択して、種々の用量の空ヘクター粒子をマウスへ投与して、その影響について検討した。

その結果、皮内投与においては最高用量においても局所的な影響のみであったか、その他の経路については、高用量群において溶血などが原因と思われる影響や、体重の減少が認められた。今後は、抗癌剤を封入したヘクター粒子を用いて、GLP体制下で更に詳細な安全性に関する検討を行ない、臨床応用開始のための申請書作成を開始する。

E 健康危険情報

特になし。HVJを不活性化して作成したHVJエンペローフヘクターは全く感染性がないことが明らかになった。

F 研究発表

1 論文発表 なし

2 学会発表

Nakajima T, Fukummura M, Miyaji K, Yoshida K,
Kaneda Y, Kotani H Development of an
Innovative Non-Viral Vector for Cardiovascular
Disease 6th Annual meeting of the American
Society of Gene Therapy 2003年6月6日,
Washington,DC

H 知的所有権の出願 登録状況(予定を含む)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

ハイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 「抗癌剤封入ヘクターによる癌治療技術の開発」

分担研究者 中島 俊洋、福村正之 （ジェノメディア株式会社）

研究要旨 封入技術開発については、これまでに遺伝子、核酸、抗体医薬、抗原蛋白などの医用分子に関して、活性を保持した状態で封入出来る事を明らかにした。本年は、抗癌剤の副作用低減と有効性の向上を目的として、種々の抗癌剤をヘクターへ封入することで吸収効率を向上させ、その抗腫瘍効果をヒト培養癌細胞と担癌マウスを使用して検討した。その結果、ヘクターへの封入により、抗癌剤の効果を100倍以上向上できる事が明らかとなった。これらの結果から、本ヘクターは、遺伝子医薬、核酸医薬、抗体医薬など先端医薬だけでなく、副作用が高い従来型の医薬品まで広範囲の医薬品に適用出来るシステムである事が明らかとなり、副作用の低減や、医薬品使用量の低減に有用である事が示唆された。

A 研究目的

封入技術開発については、これまでの研究で遺伝子、核酸医薬など遺伝子を成分とする先端医薬や、抗体医薬や酵素など蛋白質を成分とする医薬品材料についても、その機能を保持したまま細胞へ導入出来ることか明らかとなった。これにより、従来では困難であった細胞内のシグナル伝達因子、アダプター分子、転写因子などを標的とする、抗体医薬や蛋白医薬の開発が可能となった。また、最近注目されている siRNA などの機能性核酸についても、ヘクターへ封入する事で標的細胞へ高効率に導入する事が可能であり、新規核酸医薬の開発、機能解析技術の開発に繋がる成果が得られている。

そこで、本年度の研究ではヘクターの適応疾患の拡大と、汎用性向上のために 従来

有機化合物を成分とする医薬品の吸収効率を向上するためのデリバリーシステムとして、本ヘクターシステムを利用できるかについて検討を行った。従来の医薬品で、重篤な副作用が認められる品目としては、抗癌剤と抗 AIDS 薬などが挙げられるが、本研究では抗癌剤の副作用低減と有効性の向上を目的として、種々の抗癌剤をヘクターへ封入することで吸収効率を向上させ、その抗腫瘍効果をヒト培養癌細胞と担癌マウスを使用して検討した。

B 研究方法

- (1) ヒト培養癌細胞に対する抗癌剤デリバリーシステムの有効性評価

これまでの研究で、マウスの大腸癌細胞を用いた場合には、ヘクターへ抗癌剤を封入

する事で、標的癌細胞に対する増殖抑制効果か大幅に向上することを明らかになっている。そこで、本年はヒト由来の癌細胞を含む種々の癌細胞に対しても、同様の増殖抑制効果の向上か認められるかについて検討を行った。ヒト培養癌細胞 (HeLa、HE p-2)、食道癌細胞 (T Tn、TE1、TE2、TE3) と脳腫瘍細胞 (U373、U251、T98) をそれぞれ使用して、2種の抗がん剤 (フレオマイノン、ペプロマイノン) をヘクターへ封入後に、それぞれの培養癌細胞に対して反応させた後に培地交換を行ない、増殖抑制効果をWSTアッセイ法により検討した。コントロールとしては無処理群、ヘクターへ封入していない抗癌剤のみの群、抗癌剤を封入していないヘクター粒了のみの群 (PBSを使用) の3群を設定して、ヘクターによる吸収促進効果を検討した。

(2) 生体に生着した癌に対する抗癌剤 テリハリーシステムの有効性評価

実際に生体内の癌組織に対しても増殖抑制効果か認められるかについて、生体内に移植した癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植 生着させて3~5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクターを単回投与し、腫瘍の増殖に対する効果について腫瘍径を指標として検討した。また 他の抗癌剤との相乗効果を検討するために、抗癌剤 (フレオマイノン) を封入した

ヘクターを投与する前日に、ンスプラチノの腹腔内投与を行い、その効果を検討した。

(3) 抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクター粒了の連続投与

担癌マウスに対して、抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクター粒了を連続投与することで、癌細胞に対する増殖抑制効果が増強されるかを検討した。

材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背部皮内に移植 生着させて3~5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫瘍内に抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクターを単回投与或いは、3日~4日間隔で3回連続投与を行い、腫瘍の増殖に対する効果について腫瘍径を指標として検討した。また、単回投与の場合と同様に他の抗癌剤との相乗効果を検討するために、抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクターを投与する前日に、ンスプラチノの腹腔内投与を行い、その効果を検討した。

(4) ヘクターを利用した癌免疫反応の誘導

担癌マウスに対して、抗癌剤 (フレオマイノン) を封入したヘクター粒了を連続投与して、癌組織を消失させた場合に、癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく 癌に対する免疫が誘導されるかを検討した。

材料としては Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を用い、Balb/c マウスの背

部皮内に移植・生着させて3～5mmのサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、ノスプラチンを腹腔内投与した。ノスプラチン投与1日後に、腫瘍内に抗癌剤（フレオマイノン）を封入したヘクターを3日～4日間隔で3回連続投与を行い、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。その後、初回移植と反対側の皮内に、Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を再移植して、癌細胞に対する免疫誘導効果について、腫瘍径を指標として検討した。

(5) 倫理上の配慮

本研究を実施するにあたり、アノンエス MG 株式会社は、研究所の所在地である独立行政法人 産業総合技術研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業総合技術研究所で開催される各委員会での実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の女全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

C 研究結果

(1) ヒト培養癌細胞に対する HVJ-E へ封入した抗癌剤の抗腫瘍効果

昨年度の研究では、抗癌剤をヘクターへ封入することでマウス由来癌細胞に対する増殖抑

制効果が大幅に向上することを明らかにした。そこで、本年はヒト由来の癌細胞を含む種々の癌細胞に対しても、同様の増殖抑制効果の向上が認められるかについて検討を行った。

先ず、代表的なヒト培養癌細胞として2種の細胞株（HeLa、Hep-2）を選択して、抗癌剤を直接或いはヘクターへ封入した後に培地中に添加して細胞へ取り込ませた後に、培地を除去 戦場を行なった。コントロールとしては、無処理（PBS）、抗癌剤を封入していないヘクター粒子のみの群（PBS を封入）を用いた。抗癌剤としては、副作用の問題がある事か知られている、フレオマイノンとペプロマイノンを使用して、増殖抑制効果を WST-8 アッセイにより検討したところ、図 1A、図 1B に示すように、いずれの抗癌剤を用いた場合も直接投与では、Hep-2 細胞に対しては最大で20%（図 1B、PEP）、HeLa 細胞に対しては最大で10%（図 1B、PIP）の増殖抑制効果しか認められなかったのに対して、同用量の抗癌剤をヘクターへ封入して作用した場合には、Hep-2、HeLa 細胞いずれに対しても、最大で90%（図 1B、HVJ-E/PEP）の増殖抑制効果が認められる事か明らかとなった。そこで、ヘクターへの封入により、増殖抑制効果かどの程度増強されるかを検討したところ、抗癌剤を直接培養液へ添加して同レベルの増殖抑制効果を得るためには、ヘクターへ封入した場合と比較して300倍の濃度の抗癌剤が必要である事か明らかとなった。

上記の結果から、抗癌剤をヘクターへ封入することで、増殖抑制効果が増強される事か

明らかとなったか、現在のところ癌組織に対するヘクター標的化技術は開発中であるため、適応対象となる癌としては、固形癌で直接癌組織へ投与できる食道癌や脳腫瘍などか想定される。そこで、ヒト由来の食道癌細胞と脳腫瘍細胞に対して、同様に増殖抑制効果か認められるかについて検討した。食道癌細胞については4種類 (T Tn、Tt1、Tt2、Tt3)、脳腫瘍については3種類 (U373、U251、T98) の細胞を用いて、上記と同様にフレオマイシンをヘクターへ封入した場合の増殖抑制効果の増強を検討した。その結果、食道癌細胞では T Tn 細胞で、脳腫瘍では U373 細胞で最大の効果か認められ、95%以上の増殖抑制が得られる事が明らかとなった (図2、図3)。これらの結果から、HVJ-E による抗癌剤の癌細胞に対する増殖抑制効果は、マウスの細胞だけでなくヒト癌細胞でも増強される事、その効果は特定の癌細胞に限定されず、種々のヒト由来癌細胞で認められる事が明らかとなった。

(2) 生体に生着した癌細胞に対する腫瘍縮小効果

上記の結果から、ヘクターへの封入により抗癌剤の効果か増強される事が明らかとなったか、培養細胞の場合は、細胞外マトリクスが少ない事や単層であることから、癌細胞とヘクターの接触効率が高いために高い増殖抑制効果か認められるか、実際の腫瘍組織ではヘクターの侵襲性が低くなるために そのような効果か低下する可能性がある。

そこで、実際の癌に対しても同様の治療効果か認められるか明らかにするために、生体内に移植した癌細胞に対して、ヘクターに封入した抗癌剤を直接投与して、癌細胞に対する増殖抑制効果を、腫瘍径を指標として検討した。実際の腫瘍に近いモデルとするために、Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) を、同系の Balb/c マウスの背部皮内に移植生着させて、腫瘍径か 5mm

程度になるまで癌細胞を増殖させた後に フレオマイシンを封入したヘクターを腫瘍組織内へ単回投与した。実際の癌の化子療法では、抗癌剤を併用するケースが多いため、ノスプラチンとの併用の有無により、との程度相乗効果か認められるかについても検討を行った。

先ず、実験に用いたマウス由来の大腸癌細胞株 (CT-26) に対して、*in vitro* でヘクターによる抗癌剤の増殖抑制効果か認められるかを検討したところ、図4に示すようにヘクターへの封入による効果の増強か認められる事が明らかとなった。

そこで、同系移植した癌細胞に対する効果を検討した結果、ヘクターのみの投与では増殖抑制効果は認められなかったのに対して (図5 HVJ-E)、フレオマイシンを封入したヘクターを投与した場合には、ノスプラチンの単独投与と同レベルの増殖抑制効果か認められた (図5 HVJ-F/BIM と CDDP)。フレオマイシンをヘクターへ封入せずに直接腫瘍内に投与して同様の増殖抑制効果を得るためには、100倍程度の薬剤投与用量か必要であった。以上の結果から 培養癌細胞の場合と同様に生体内で腫瘍を形成した癌細胞に対しても、

ヘクターによる増殖抑制活性の増強が認められる事が明らかとなった。

また、プレオマイノンを封入したヘクターを、ノスプラチン併用で投与した場合には、増殖抑制に対して相乗効果が認められた(図5 HVJ-E/BLM+CDDP)。

また、図6に示すようにプレオマイノンを封入したヘクターを単回投与した場合や(右中段の写真)、ノスプラチンの単回投与(中央下段の写真)では、増殖抑制効果は認められなかったか腫瘍の萎縮や消失が認められなかったのに対して、両者を併用した場合には10匹中2匹(40%)で、腫瘍の消失が認められた(右上段の写真)。

以上の結果から、抗癌剤をヘクターへ封入する事により、培養癌細胞だけでなく生体内へ生着した腫瘍に対して、癌細胞の増殖抑制効果が増強されるだけでなく、腫瘍を萎縮消失させる効果がある事が明らかとなった。

(3) 抗癌剤封入ヘクターの連続投与による抗腫瘍効果の検討

上記の結果から、担癌マウスに対して、抗癌剤(プレオマイノン)を封入したヘクター粒子とノスプラチンを単回投与することで、40%のマウスに対して腫瘍消失効果がある事が明らかとなった。実際の癌の治療においては、抗癌剤の単回投与により腫瘍を完全に消失させるのは困難であり、通常複数回の投与が行われる。そこで抗癌剤(プレオマイノン)を封入したヘクターを連続投与することで、腫瘍の萎縮や消失頻度が増加するかを

検討した。

単回投与の場合と同様に Balb/c マウス由来の大腸癌細胞である CT-26 細胞を、Balb/c マウスの背部皮内に移植 生着させ、一定のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、ノスプラチンの腹腔内投与を行い、その1H後に腫瘍内に抗癌剤(プレオマイノン)を封入したヘクターを単回投与、または3回の連続投与を行い、腫瘍の萎縮 消失が増強されるかを検討した。

その結果、連続投与を行った場合には単回投与と比較して増殖抑制効果が更に増強される事が明らかとなった(図)。また、本実験では単回投与では4匹中1匹(25%)しか腫瘍の消失が認められなかったのに対して、連続投与群では4匹中すべてで腫瘍の縮小が認められ、その中で3匹(75%)では腫瘍の消失が認められた。

以上の結果から、ノスプラチンとの併用ではあるか、抗癌剤(プレオマイノン)を封入したヘクターを腫瘍内に3回の連続投与する事で、癌細胞の増殖抑制のような抗癌効果が増強されるだけでなく、腫瘍の萎縮や消失など癌の治療効果が期待できる事が示唆された。

(4) ヘクターを利用した癌免疫反応の誘導

ヘクターへ封入した抗癌剤を連続投与することで腫瘍の消失が認められたか、注射による腫瘍内投与により、腫瘍内の総ての癌細胞に対してヘクターによる抗癌剤の吸収が起きる可能性は低く、ハイスタント効果(bystander effect)による細胞死の誘導か

起きている可能性が考えられた。また、腫瘍を外科的に摘出するのではなく、*in situ* で抗癌剤により縮小・消失させた場合には、死滅した癌細胞の腫瘍抗原が提示され、癌に対する免疫の活性化が誘導されている可能性が考えられた。

そこで、担癌マウスに対して、抗癌剤（フレオマイノン）を封入したヘクター粒了を連続投与して、癌組織を消失させた場合に、癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく、癌に対する免疫が誘導されるかを検討した。

これまでに実験と同様に Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株（CT-26）を、Balb/c マウスの背部皮内に移植・生着させた後に、ノスプラチンと併用で抗癌剤（フレオマイノン）を封入したヘクターを3回連続投与して、初回移植癌細胞による腫瘍を消失させた。その後、初回移植と同様に、CT-26 細胞を再移植して、生着の有無と腫瘍径の変化を指標にして、癌細胞に対する免疫誘導効果を検討した。

その結果、初回移植癌細胞に対して PBS 処理のみのコントロール群や単回投与群では、無処理群に対して増殖抑制効果は認められるか、癌細胞生着の阻害は認められなかった（図8）。それに対して、初回移植癌細胞に対してヘクターへ封入した抗癌剤を連続投与して、腫瘍を消失させた群では、再移植した癌細胞に対する増殖阻害（図8）と、生着の阻害が認められた（図9、右上段写真）。

そこで、癌細胞を2回移植した3群について生存率の検討を行ったところ、コントロール群と単回投与群では、経時的に生存率の低下が認められるのに対して、連続投与群では

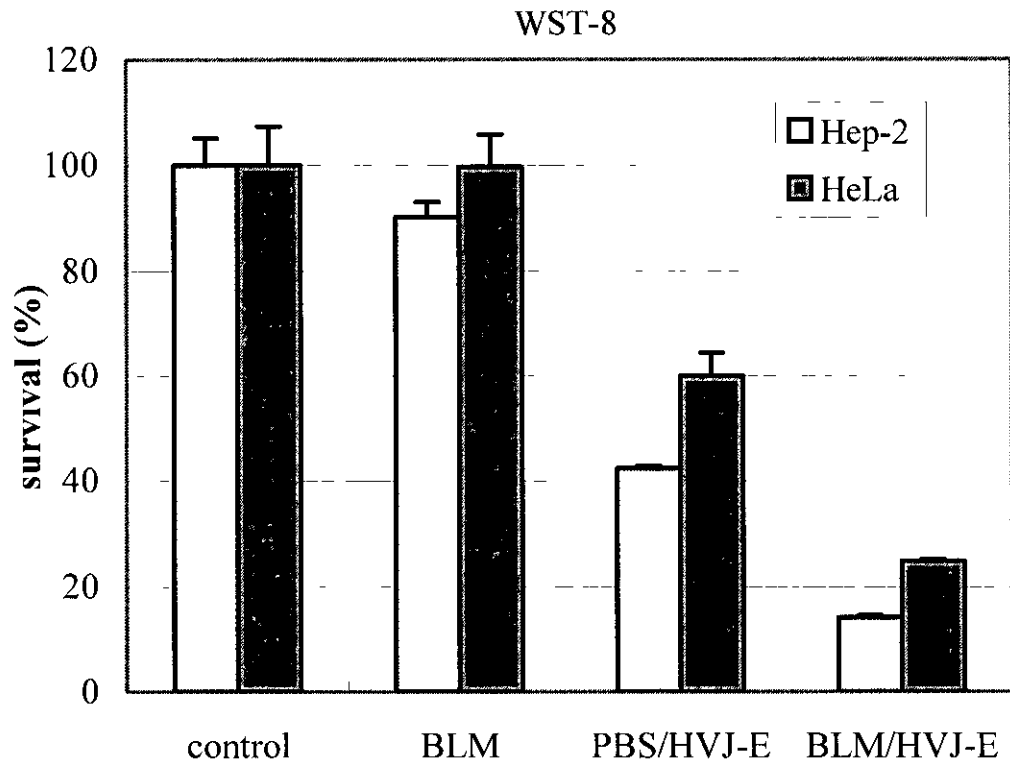
生存率の低下は認められなかった（図10）。この結果から、連続投与群では再移植した癌細胞に対して、拒絶反応が誘導されている事が明らかとなった。

以上の結果から、抗癌剤を封入したヘクター一粒了の連続投与により、腫瘍を形成している癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく、再移植した癌に対する拒絶反応を誘導出来る事が示唆された。

図1 ヒト培養癌細胞に対する増殖抑制効果

(HeLa細胞、HEp2細胞)

A プレオマイシン封入HVJ-E



B ペプロマイシン封入HVJ-E

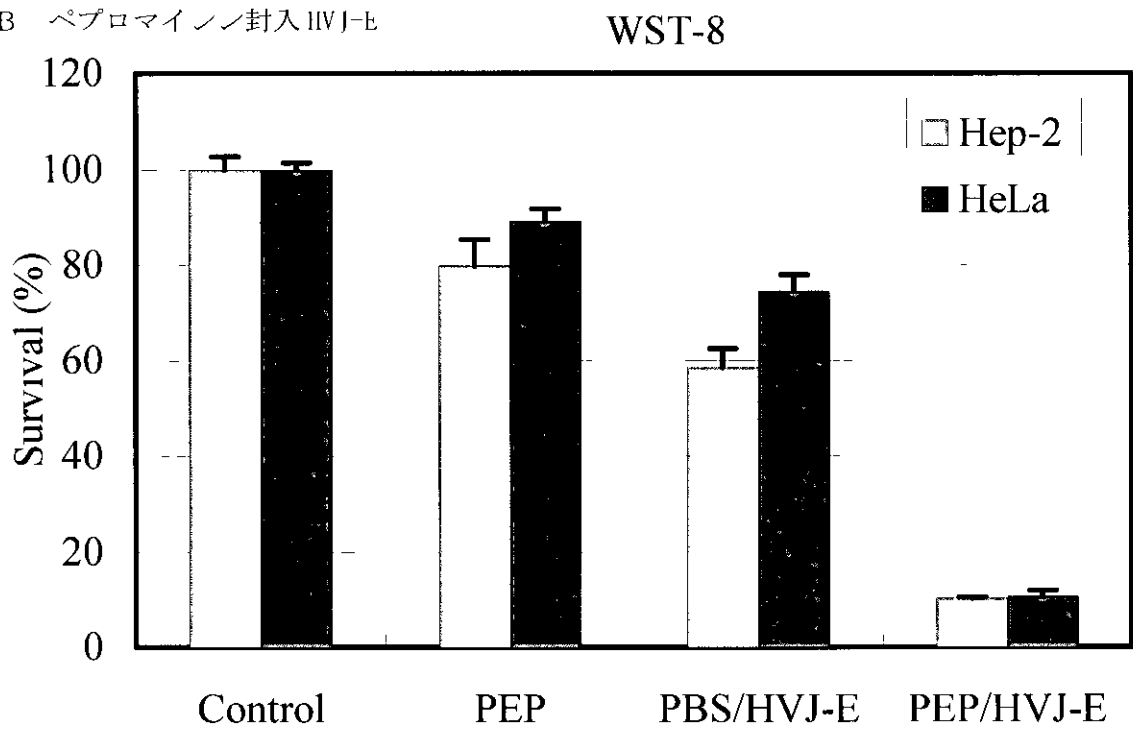


図2 ヒト食道癌細胞に対する増殖抑制効果

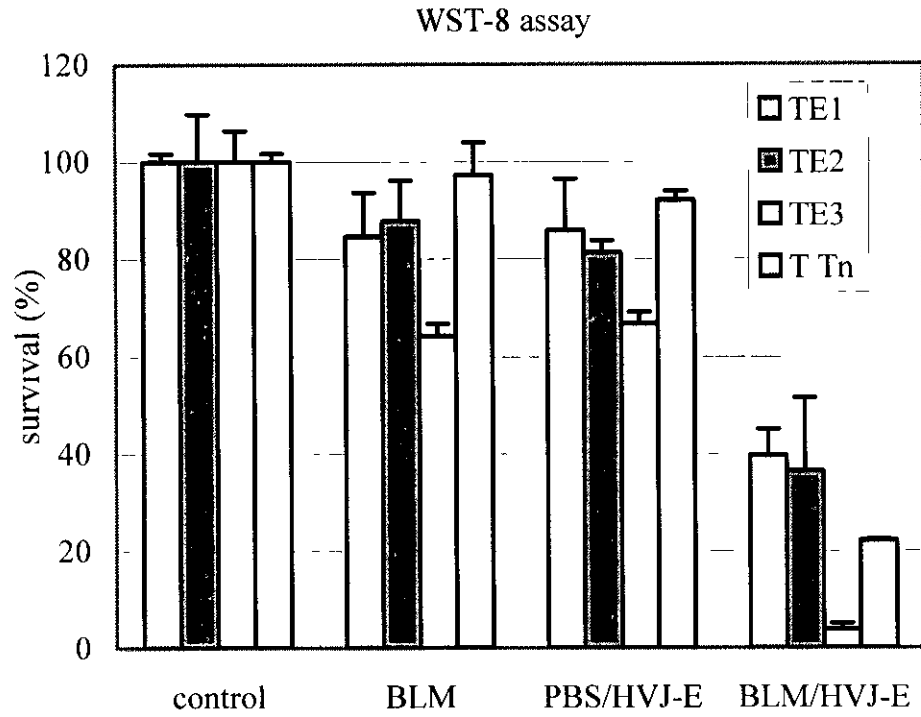


図3 ヒト脳腫瘍細胞に対する増殖抑制効果

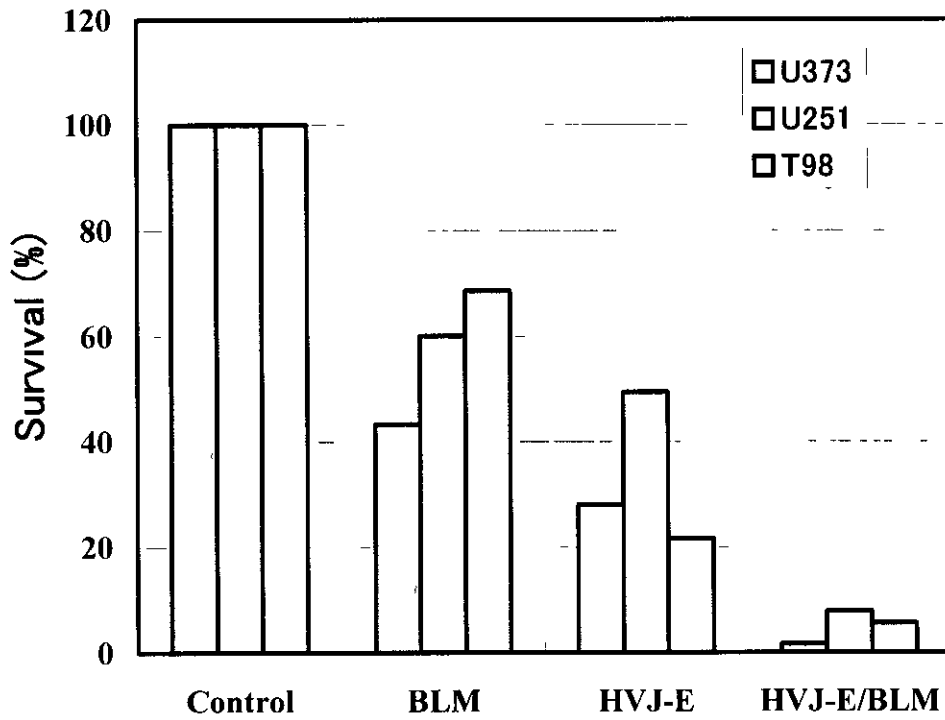


図4 Balb/c 由来大腸癌細胞に対する増殖抑制効果

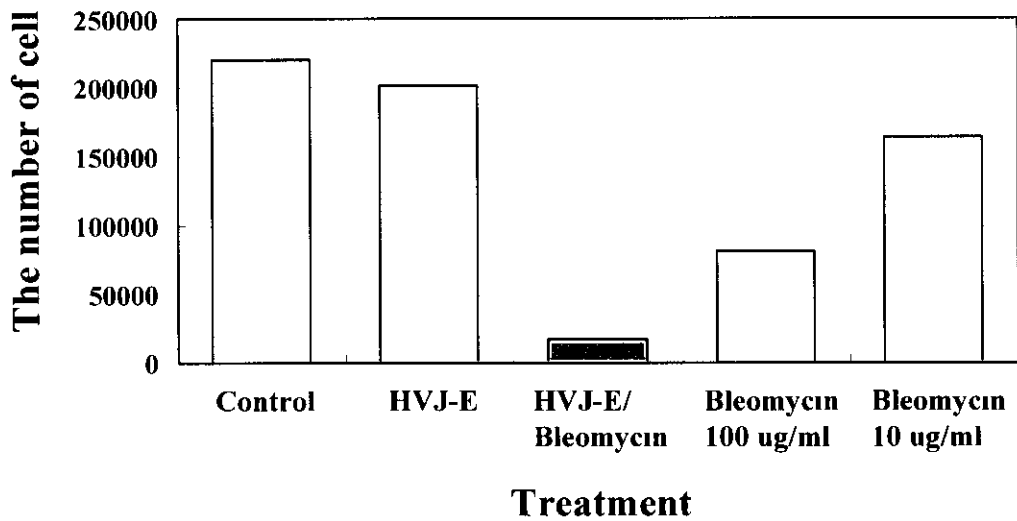
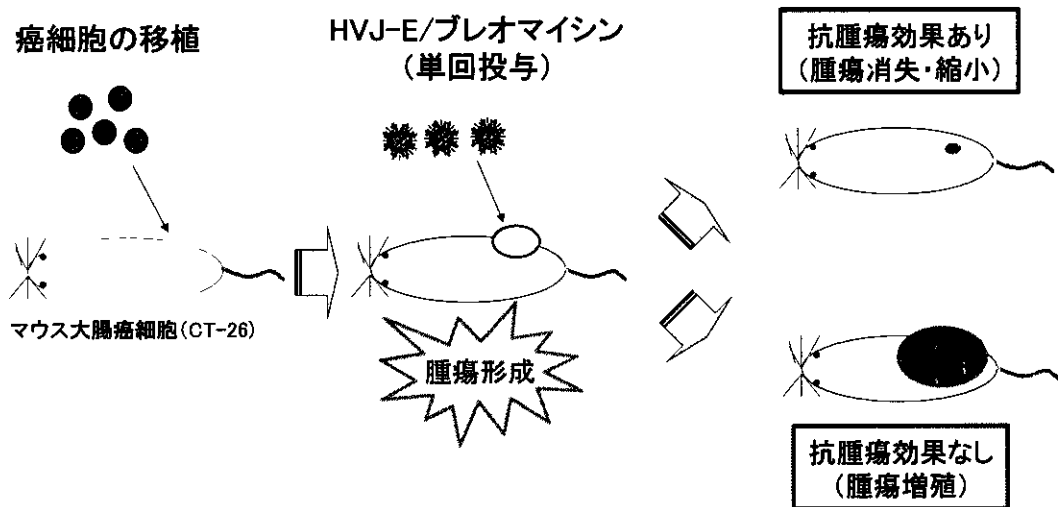


図5 単回投与による抗腫瘍効果 (1)

HVJ-Eに封入したブレオマイシンによる抗腫瘍効果 (薬効評価のプロトコール)

HVJ-Eは抗癌剤(ブレオマイシン等)のDDSとして癌細胞への吸収効率を向上出来る事が明らかとなったため、臨床応用を目指して癌のモデル動物で薬効評価を行なった。



HVJ-Eに封入したブレオマイシンによる抗腫瘍効果 (投与後の腫瘍サイズの推移)

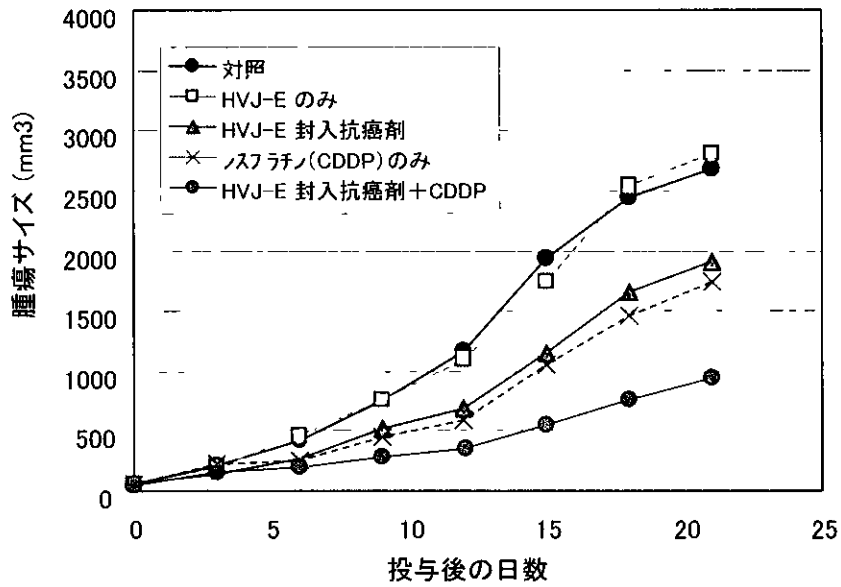


図6 単回投与による抗腫瘍効果 (2)

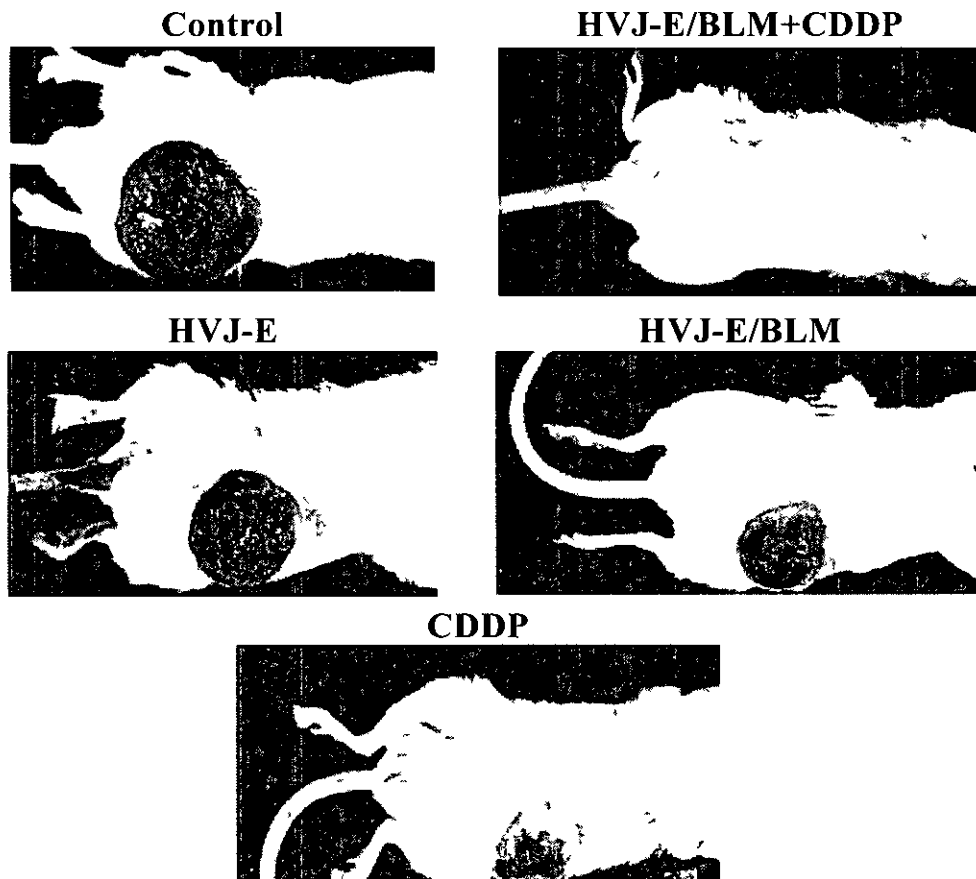


図7 連続投与による抗腫瘍効果

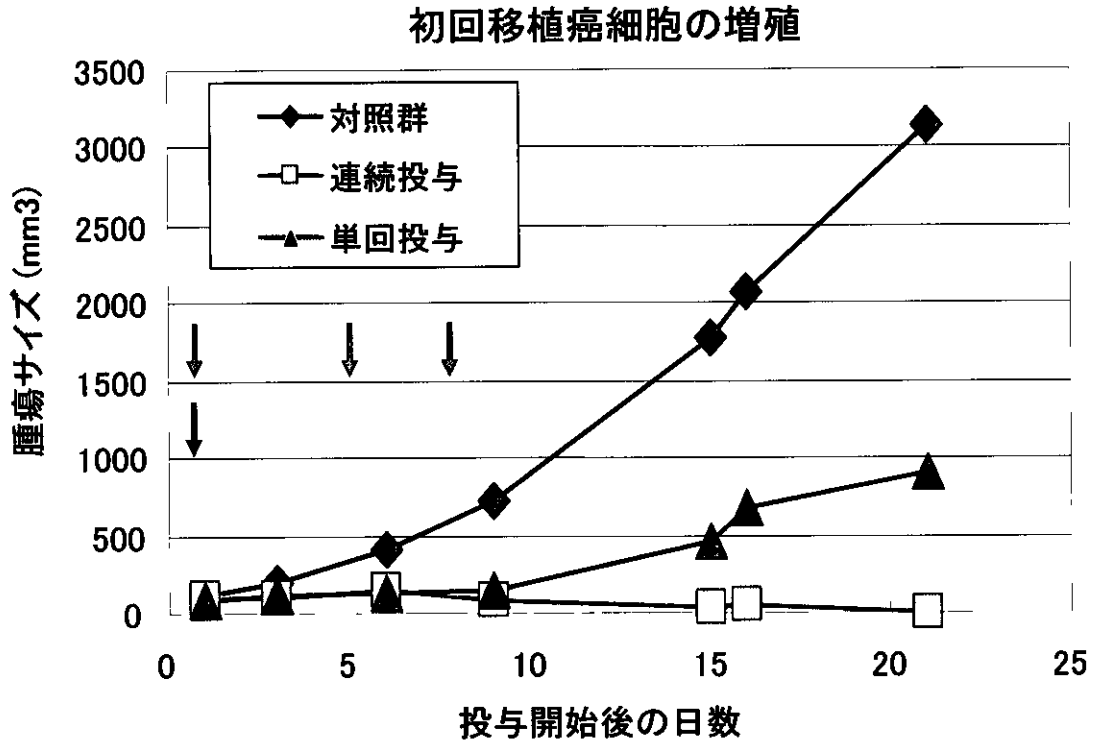


図8 癌免疫の誘導 (1)

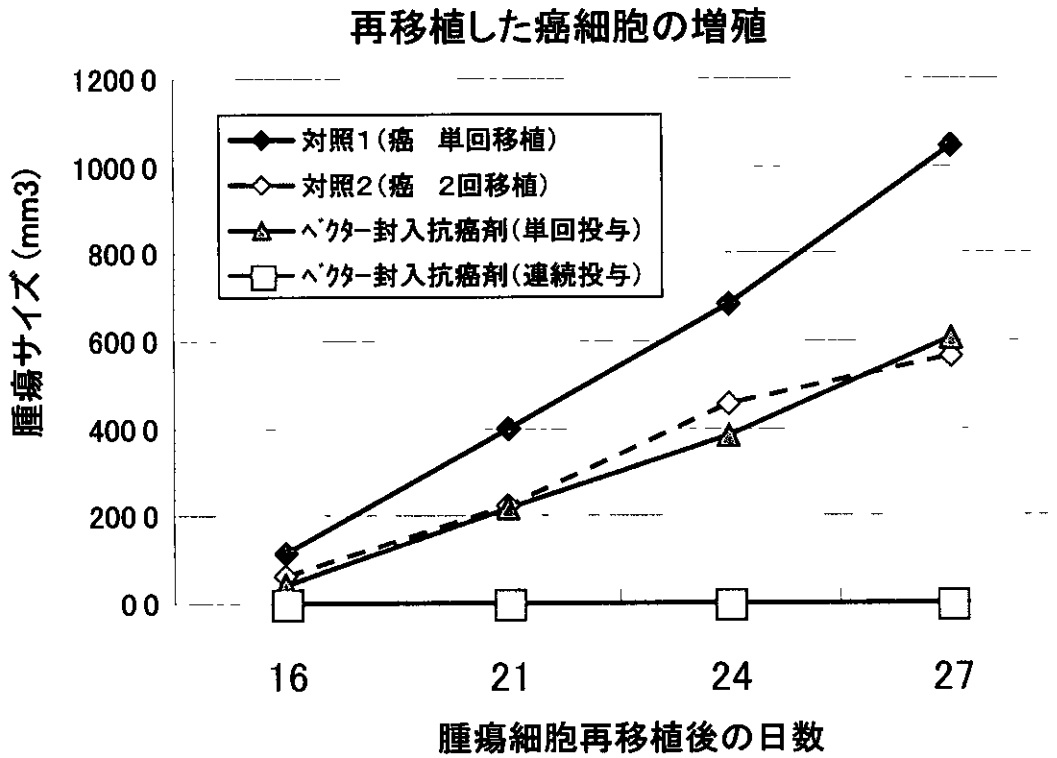


図9 癌免疫の誘導 (2)

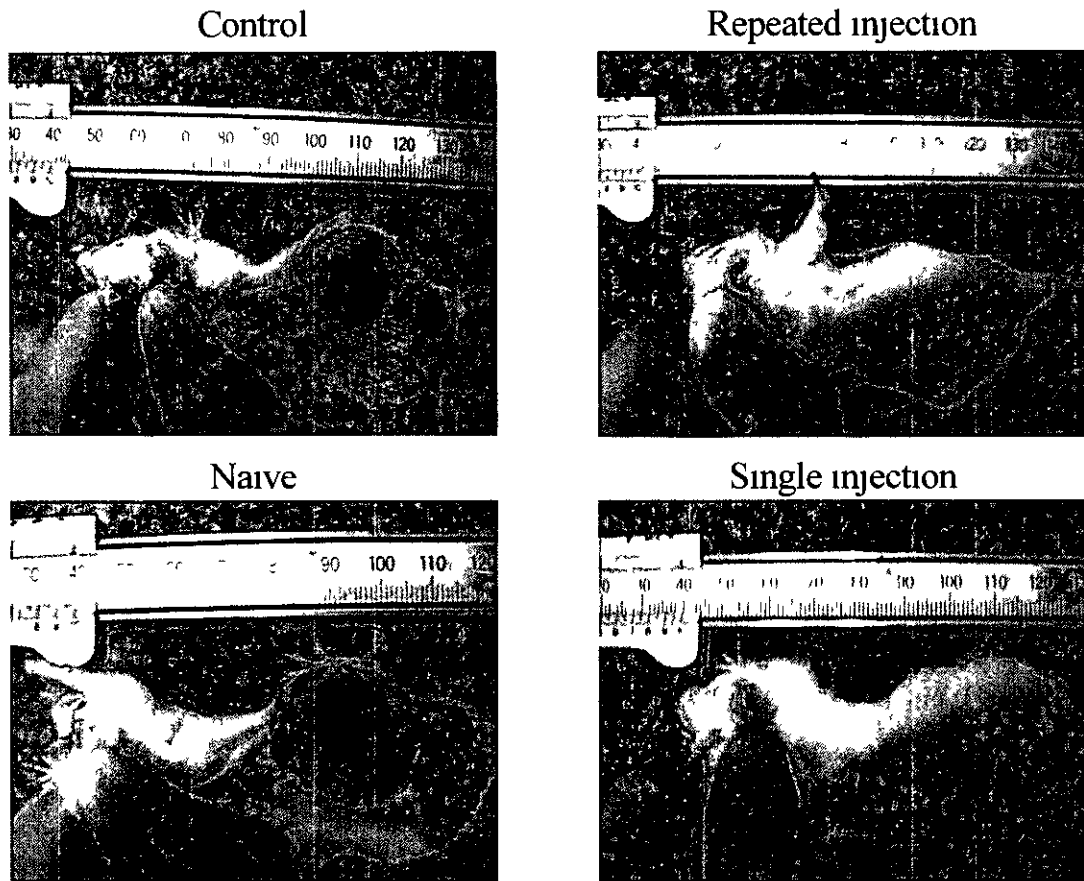
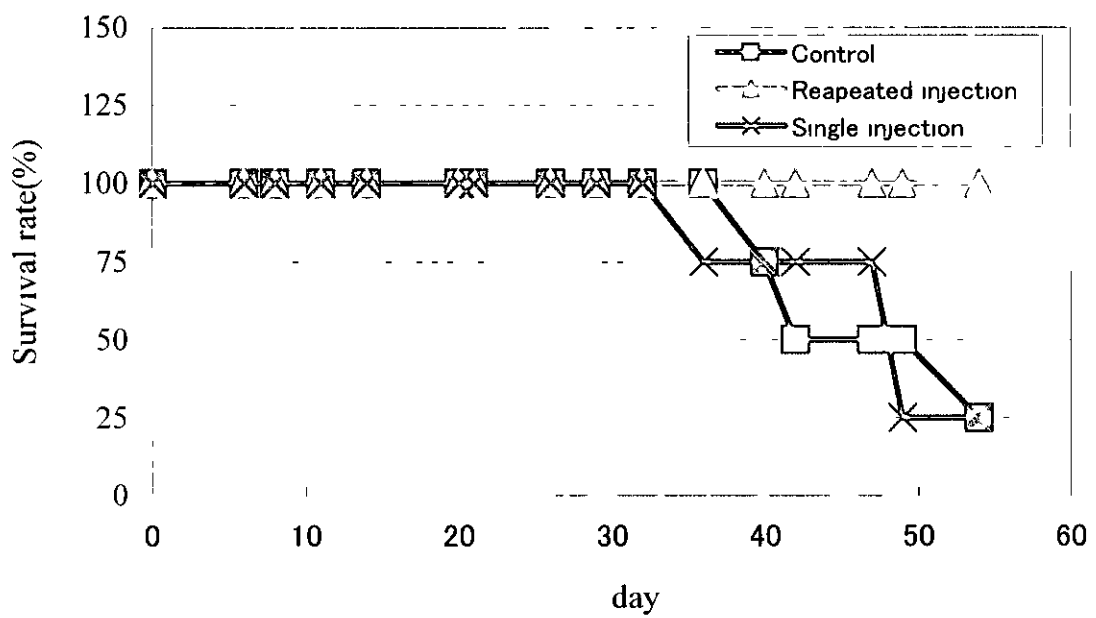


図10 癌免疫の誘導 (3)



D 考察

本研究により、ハイオナノ粒子であるHVJ-Eヘクターへの封入により抗癌剤の抗腫瘍効果は、マウスの培養癌細胞だけでなく、ヒト癌細胞に対しても認められる事が明らかとなった。また、その効果はヘクターを使用しない場合の効果と比較して300倍程度向上する事が明らかとなった。これらの結果から、HVJ-Eによる抗癌剤のテリハリーは種特異的ではなく、ヒトの癌治療に対しても適用可能である事が示唆された。

また、担癌マウスに対して、抗癌剤を封入したヘクター粒子を単回投与した場合、培養細胞に対する場合と同様に増殖抑制効果が認められただけでなく、20%のマウスで腫瘍の消失が認められた事から、本ヘクターシステムによる抗癌剤のテリハリー効率は、培養癌細胞だけでなく生体内へ生着した腫瘍に対しても大幅に向上する事が明らかとなった。また、その効果はヘクターを用いずに、抗癌剤を直接投与した場合の100倍以上であるため、本ヘクターへの封入により抗癌剤の副作用を軽減できると示唆される。

単回投与と比較して連続投与では癌の萎縮や消失など、抗腫瘍効果が増強される事が明らかとなった。HVJ-Eヘクターにより抗癌剤を投与した場合、標的となる癌細胞の細胞膜を通じた吸収ではなく、膜融合により標的の癌細胞内へ直接抗癌剤が取り込まれると考えられるか、腫瘍内のすべての癌細胞に対してヘクター粒子が接触する可能性は低いいため、

抗癌剤の直接的な効果以外にハイスタンダー効果により癌細胞死が誘導されて、腫瘍縮小効果が現れると考えられる。

担癌マウスに対して、抗癌剤を封入したヘクター粒子を単回投与するだけで腫瘍の消失が認められた事、連続投与によりその効果が増強される事、空ヘクター粒子には細胞性免疫を高める作用を持つインターフェロンを誘導する活性があることなどから、抗癌剤を封入したヘクター粒子を腫瘍内へ投与することで、癌に対する免疫が誘導される事が示唆された。実際、本研究で連続投与により初回移植した癌細胞による腫瘍を消失させた後に、同一の癌細胞を再移植すると生着が拒絶される現象が認められた。今後、この現象かどのような免疫反応により誘導されているのかを詳細に検討することで、従来の治療法よりも優れた癌免疫療法を開発できる可能性がある。

また、本研究ではノスプラチンとの併用により相乗効果が認められたか、今後それぞれの抗腫瘍効果のメカニズムや、ノスプラチン以外の抗癌剤との併用効果についても検討する必要がある。

E 結論

現在の抗癌剤は単剤では治療効果が十分ではないため、複数の抗癌剤や放射線療法を併用する治療法が取られている。しかし、副作用や転移・再発の問題から、依然として有効性が高く副作用の少ない抗癌剤や新規治療技術が切望されている。

本研究の成果で低分子医薬品である抗癌剤をハイオナノ粒子である HVJ-E ヘクターへ封入して投与を行うと、その効果が増強される事が明らかとなった。今後は、フレオマイノンやペプロマイノンとは異なる抗癌剤についても、ヘクターへの封入によりそのような効果が認められるかを検討する。それにより、ヘクターを使用した抗癌剤の吸収促進か、多種類の抗癌剤に応用されれば適用できる癌の種類か、大幅に拡大されると考えられる。

また、HVJ-E ヘクター粒子の特徴は、種々の物質を同時に封入できる事が特徴であるか、抗癌剤と同時に、その効果を増強する高分子（癌ペプチドワクチン、アンチセンス核酸医薬、テコイ核酸医薬、遺伝子医薬、抗体医薬など）を封入して、対象となる腫瘍に投与することで相乗効果により有効性を増強できる。今後、メカニズムの異なる医薬品の組み合わせ効果についても検討する必要がある。

これまでの研究成果により、ハイオナノ粒子の応用範囲を、生体高分子用 DDS たけでなく、化合物を成分とする医薬品 DDS へ拡大する事が可能となった。また、本ヘクターが従来の医薬品の、副作用低減、医薬品使用量の低減に利用できる事が示唆された。今後は、ハイオナノ粒子を医薬品として実用化するために、対象疾患を想定した動物モデルを用いて薬効評価を中心に検討を行なう予定である。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

- 1 論文発表 現在投稿準備中
- 2 学会発表

Nakajima T, Fukumura M, Miyaji K, Yoshida K, Kaneda Y, Kotani H Development of an Innovative Non-Viral Vector for Cardiovascular Disease 6th Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2003年6月6日, Washington,DC

H 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1 特許取得 現在出願準備中
- 2 実用新案登録 なし

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発
「ベクターの修飾による標的化技術の開発」

分担研究者 金田安史 （大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学・教授）

研究要旨 HVJ エンVELOPヘクターはハイオリクターシステムにより培養細胞で産生されるため、リポソームやナノパーティクルのように粒子径を調節して標的化を行なう事は困難である。そのため、化学的修飾による標的化技術の開発が課題となっていたが 本年度の研究で表面電荷調節、ポリマーによる修飾、ペプチドリカントによる就職について検討を行った結果 表面電荷の調節により肺組織への標的化が出来る事が明らかとなった。また、標的化は遺伝子、或いは核酸医薬を封入した HVJ-E ヘクター（ハイオナノ粒子）のいずれに対しても有効性が高い事が明らかとなった。

A 研究目的

ハイオナノ粒子である HVJ-E ヘクター特定の臓器や腫瘍などに標的化する技術は、ヘクターの安全性 有効性 汎用性を向上する上で、非常に重要な技術的課題である。従来癌細胞に特異的なマーカー分子の抗体やレセプターに対するリカントを利用した標的化が試みられているが、現存でも有効性の高い標的化技術の開発は、DDS やヘクター技術を開発する上で非常に重要な課題として残されている状況である。リポソームやナノパーティクルの場合、粒子径を調節する事で腫瘍の新生血管へ効率よく取り込まれる事が明らかとなっており、静脈内投与での抗癌剤の腫瘍内への滞留性を向上する技術として利用されている。しかし、本研究で開発しているハイオナノ粒子（HVJ-F ヘクター）の場合は 粒子サイズを調節する事は困難であるため、化学的

修飾による標的化技術の開発が不可欠である。

そこで、本分担研究では種々の化学修飾による、ヘクター標的化技術の開発を行った。

B 研究方法

ハイオナノ粒子である HVJ-E ヘクター 10,000 HAU 分を 200 マイクログラムのリポーター遺伝子発現用プラスミド（pCMV luciferase） 或いは 400 マイクログラムの FITC 標識したデオイオリコ核酸混合して粒子内に封入した。標的化には粒子表面の電荷を調節するために、硫酸プロタミン（1000 HAU のヘクター粒子あたり 500 マイクログラムを使用）と混合後、1000 HAU 分のヘクター粒子をマウスの尾静脈より注入した。

遺伝子発現検討の場合は、24 時間後に、各臓器におけるルンフェラーゼ遺伝子の発現を酵素活性を測定することで評価した。

また、核酸医薬のテリハリーの場合には、投与後2時間で肺を摘出して、その凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察することで評価を行なった。

C 研究結果

ハイオナノ粒子の標的化技術としては、硫酸プロタミンによる表面電荷の調節、カチオン性アニオン性ポリマーによる修飾、脂質を介したペプチドやPEGなど修飾分子の埋め込みHVJの膜蛋白質(F蛋白質、HN蛋白質)と一本鎖抗体蛋白やリカントペプチドとのキメラ化を検討しているか。本年度の研究により表面電荷の調節により、核酸医薬(図1)や遺伝子(図2)を封入したヘクター粒子肺組織へ選択的に標的化できることを明らかにした。現在、血流から脳組織や肝臓の実質細胞へ標的化する技術についても検討を進めており、来年度の研究では、それらの技術を利用して網内系組織以外の臓器に対する標的化技術も開発する予定である。

D 考察

本研究で開発しているHVJエンヘロープヘクターは直径が200~300nmのハイオナノ粒子であり、ヒト培養細胞株により製造されるためリポソームやナノ粒子のようなサイズの調節による物理的な標的化ではなく、化学的修飾による標的化技術が必要とされている。

本年度の研究では、昨年度に引き続いて表面電荷の調節による標的化が出来る事を明らかにしたか、並行してポリマーによる修飾、ホーミンクレセプターに対するリカントの付

加による標的化、HVJのF蛋白質の改変による標的化技術の開発も行っている。

現在のところ、臨床応用分野としては癌、自己免疫疾患、第二世代ワクチンなど、難治性疾患を重点領域として想定しているか、特に癌組織への標的化が出来れば固形癌への局所投与ではなく、注射剤としての開発が可能となるため、癌細胞への標的化技術の開発は重要な課題である。最近HVJと近縁で、鳥類のウイルス(NDV)をヘースとするヘクターで、癌組織への標的化が出来る事が報告されているか、HVJ-Fヘクターを癌組織へ標的化する技術開発にも同様のメカニズムを利用できる可能性がある。

臨床応用を早期に進めるためには、抗体との複合体系性のような複雑なメカニズムではなく本年度の研究のように化学物質による修飾が望ましいと考えられる。今後も、ポリマーなど化学的修飾による標的化の研究を中心に、開発を進める予定である。

E 結論

表面電荷を調節するという化学的修飾により、HVJエンヘロープヘクターを特異的な組織(肺)に標的化する事が可能となった。また、その効果は遺伝子発現と核酸医薬のテリハリーのどちらに対しても有効である事が明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし。HVJを不活性化して作成したHVJエンヘロープヘクターは全く感染性がないこ