

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術開発研究事業

「標的ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所 DDS の開発」に関する研究

平成16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 石坂幸人

平成19（2007）年3月

目次

I. 総合研究報告

「ペプチド付加型磁性体ナノ粒子を用いた癌病変部の MRI による画像化」
に関する研究

主任研究者 石坂幸人 ----- 1

分担研究者 総合研究報告書

「磁性ナノ粒子へのペプチド付加、最適化」に関する研究

長谷川正勝 ----- 5

「感温性高分子を用いたインテリジェント型
リポソームの構築」に関する研究

河野健司 ----- 7

「サル胚性幹細胞に対する分子導入法の技術開発」

湯尾 明 ----- 10

「標的ペプチド付加型感温性ナノミセル及び
高周波焦点照射による局所 DDS の開発」に関する研究

畠 清彦 ----- 11

「グルカゴン様ペプチド受容体を用いた画像解析」に関する研究

山下克美 ----- 15

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術開発研究事業）
総合研究報告書

「ペプチド付加型感温性ナノミセルを用いた癌病変部の MRI による画像化」に関する研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター 難治性疾患研究部

研究要旨 標的ペプチドを結合させた磁性体ナノ粒子と MRI を用いて、微小病変を画像化が可能になった。神経芽腫で高率に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET に結合するペプチド(以下 RBP-1)と癌部栄養血管の形成に必要な血管内皮細胞増殖因子レセプター(以下 KDR-1)に結合性を示すペプチド(以下 KDR-BP)を磁性体粒子に結合させた複合体を用いた。いずれのペプチドの場合も、磁性体ナノ粒子(約 40 nm の粒径)一個に対して 10-15 個ペプチドを付加させた磁性体ナノ粒子が有効に機能した。一方、温度に反応して融解するリポソームに抗癌剤を包封し、担癌マウスに投与後、腫瘍局所に外部から加温誘導することで、腫瘍組織の増殖を抑制することが可能になった。

分担研究者

長谷川正勝 名糖産業名古屋研究所長
河野健司 大阪府立大学工学部教授
湯尾 明 国立国際医療センター
血液疾患研究部長
畠 清彦 (財)癌研究会附属病院化学療法部長
山下克美 金沢大学大学院助教授

A. 研究目的

理想的な化学療法を実現するためには、標的病巣を的確に検出し、選択的に薬物を送達する技術の確立が必要である。最近、MRI により病変を検出しながら、高周波照射を用いて患部温度を上昇させることで、温熱加療を可能にする医療機器(MRgFUS: MR guided focused ultrasound surgery)が開発された。そして、この医療機器の有効性が立証されたことから米国 FDA により臨床での使用が認可された。本機器が一般化することで、今後患者 QOL の大幅な改善が期待される。しかし、このシステムは MRI の単純画像に依存して病変部位を診断していること、子宮筋腫等の比較的大きな病変を対象にしてきたために照射野が広い事、また加療システムが温熱にのみ依存していることなど、繊細でかつ多角的な治療法を行うためには、今後いくつかの点を改善することが必要である。本研究課題では、標的ペプチドを結合させた磁性体ナノ粒子等を用いて、特異的な画像を取得する一方、温度で融解するリポソームと抗癌剤を使用することで、加温誘導による局所 DDS を可能にするためのシステム開発を目的として開始した。

温度応答性リポソームは、体温環境下では薬物を保持するが、加温に反応して薬物を放出するリポソームである。これまでリン脂質のゲル-液晶転移を利用して温度応答性を付与したものが用いられていたが、応答温度の調節が困難であり、また、薬物放出の制御も不十分であった。本研究では、所望の温度領域において鋭敏な温度応答性を示す温度応答性リポソームとして、感温性高分子を複合化したリポソームを設計し、その抗癌剤の送達システムとしての機能について検討した。

B. 研究方法

a. 磁性体ナノ粒子の開発

本研究に使用する磁性体ナノ粒子は、目的の腫瘍組織に集中させるために、血中に長く滞留することが好ましい。即ち、血中半減期の長い特性を有する磁性体ナノ粒子の作成が必要要件となる。そこで、粒子表面上にカルボキシル基(陰性荷電)およびアミノ基(陽性荷電)を種々の割合で付与することにより、表面電荷の異なる粒子を作成するのに加えて、粒子サイズの調節を行うことで、本研究に最適な磁性体ナノ粒子を選定した。各磁性体ナノ粒子をマウスの尾静脈から投与したあと、経時的に血液を採取し、鉄含有量を NMR による T2 緩和時間を測定することにより、磁性体粒子の血中半減期を算出した。また、粒子表面に官能基を付与し、ペプチドを結合するための基点として使用した。

b. 標的ペプチドの磁性体ナノ粒子への結合

本実験では 2 種類のペプチドを使用した。即ち、

用した。

b. 標的ペプチドの磁性体ナノ粒子への結合

本実験では2種類のペプチドを使用した。即ち、神経芽細胞腫細胞株で高率に発現を認めるレセプター型チロシンキナーゼ RET に結合性を示すペプチド（以下 RBP-1）と腫瘍組織を栄養する血管造成に必須の分子である血管内皮細胞増殖因子レセプターに結合するペプチド（以下 KDR-BP）である。磁性体ナノ粒子であるカルボキシメチルデキストランマグネタイト（以下 CMDM）のカルボキシル基にマレイミド基を付与した後、粒子一個に対して、種々のモル比でペプチドを作用させた。その後、システインを用いて余剰の反応基をブロックした後透析し、フィルター滅菌を行った標品を実験に供した。ペプチドが付加された磁性体粒子の標的分子に対する結合性はビアコアを用いて解析した。全ての反応は pH7.2 のリン酸バッファー中で行った。

c. 磁性体粒子の MRI ファントム解析と担癌マウスを用いた MRI 解析

MRI 解析はシーメンス社製 1.5 テスラーの MRI を使用し、主として T1 及び T2 強調画像による解析を行った。磁性体ナノ粒子の濃度の変化による MRI の画像変化の有無を調べるため、種々の濃度の磁性体溶液を作成し、水中で MRI 解析を行った。標的分子を発現させた腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた。尾静脈から磁性体を投与し、経時的に MRI 解析を行った。

d. 感温性リポソームの開発

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル (EOEOVE)-オクタデシルビニルエーテル (ODVE) ブロック共重合体、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質と卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシン (ADR) を加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。下肢に Colon26 の腫瘍をもつマウスに ADR 内封リポソームを尾静脈投与し、その後の腫瘍径の変化を測定することで、リポソームの抗腫瘍効果を評価した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

(倫理面への配慮)

すべての実験はマウスを用いて行った。それぞれの研究機関における動物取り扱い規約を遵守しながら、研究を行った。

3. 研究結果及び考察

a. 磁性体ナノ粒子の開発

MRI 造影剤として既に臨床使用されているデキストランマグネタイトの表面にカルボキシル基やアミノ基を種々の量で付与させたものを作成し、マウス血中半減期を解析した。その結果、血中滞留時間は付与するカルボキシル基に依存し、粒子サイズに逆相関することが判明した。また市販されている PEG 系粒子と比較すると、より長い半減期を示した。この結果から、本研究には比較的小径な CMDM を使用することとした。また、CMDM に付与されているカルボキシル基を介して、まずリンカーとしてマレイミド基を結合し、その後ペプチドを種々のモル比で安定的に結合した。

b. 磁性体粒子を用いた MRI 解析

磁性体 1 分子に対して 10-15 個のペプチドを付加することにより、標的分子への強い結合性が検出された。In vitro でペプチド結合型磁性体ナノミセルを標的分子発現細胞に作用させ、MRI 解析を行ったところ、RET 及び KDR-1 発現細胞が MRI により再現良く検出された。

ついで、担癌マウスを用いた撮像実験を行った。まず CMDM 単独を投与し、腫瘍組織への集積と消退の経時的変化を観察した。約 800 ug/ml の鉄濃度に相当する磁性体粒子液 150 ul を投与すると、投与後 60 分から 90 分にかけて局所での鉄磁性体の集積はピークを迎え、その後消退する傾向が観察された。約 400 ug/ml の磁性体を投与した場合には、腫瘍組織への集積は検出されなかった。一方、市販されているデキストランまたはポリエチレングリコール型磁性体ナノ粒子を投与すると、いずれの場合も投与後腫瘍組織に集積されたまま、磁性粒子の消退傾向は認められず、これらの磁性体ナノ粒子では、腫瘍組織の標的化は不可能であることが判明した。

一方、KDR-BP 付加型 CMDM を同濃度で投与すると、5 時間後に腫瘍の辺縁に T1 強調画像上、強い白いシグナルが観察された。このシグナルは T2 強調画像では黒いシグナルとして観察された。ファントム解析の結果から、今回腫瘍組織に集積した磁性体の濃度は、数 10 ug/ml であることが示唆された。

c. 温度応答性リポソーム

40℃ 付近で親水性から疎水性に変化する

EOEOVE-ODVE ブロック共重合体を複合化したリポソームの薬物放出挙動について検討した。その結果、このリポソームは共重合体の転移温度以下においては安定に薬物を保持するが、転移温度以上において内包物質を放出することがわかった。また、リポソームの放出挙動に及ぼす共重合体分子量の影響について調べ、分子量の増大とともに、共重合体修飾リポソームの温度応答性は鋭敏になることがわかった。特に、分子量 10000 程度の共重合体を複合化したリポソームは、40℃以上において ADR の放出が促進され、45℃付近で極めて速く、著しい ADR の放出を引き起こした。また、この共重合体の複合化は、血中滞留性に優れる PEG 修飾リポソームへの温度感受性の付与に対しても有効であり、高い温度応答機能と良好な血中滞留性を併せ持つリポソームの構築に成功した。

次に、このリポソームを担癌マウスに尾静脈投与し、その後の腫瘍の局所加温（10 分間、45℃）による腫瘍への影響を観察した。局所加温を行わない場合には、腫瘍の成長はコントロールと比較してほとんど変化しないのに対し、局所加温した場合には、腫瘍成長が強く抑制された。また、リポソーム投与後の加温のタイミングの効果を調べた。その結果、投与 12 時間および 24 時間後に加温することによって、その抗腫瘍効果が高まることがわかった。そして、同量の ADR を単独投与した場合と比較すると、リポソームを用いることにより、腫瘍成長が強く阻害された。

4. 評価

1) 達成度

当初、計画した研究を遂行することができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
感温性リポソームの研究は世界をリードしている。一方、磁性体ナノ粒子と MRI を組み合わせた微少癌の MRI 検出は、世界的にみてもまだ臨床応用の報告はない。これは、マウスレベルで検出が可能でも、ヒト深部臓器に集積するはずの磁性体ナノ粒子を感度よく検出することができないためと考えられる。しかしながら、癌の早期診断と局所 DDS の開発は、社会の要請が強い研究課題であり、これまでに得られた技術／情報をさらに発展させることにより、我が国発の新しい医療技術の展開すべきと考える。

3) 今後の展望について

本研究課題で目指して来た技術は、先に述べた MRgFUS と組み合わせる事により、患者 QOL の改善におおいに貢献するものである。本プロジ

ェクト立案当時、ヒト型抗体を用いた診断治療が一般的ではなかったため、より抗原性の少ないペプチドを用いて標的化を開始した。しかし、ビアコアを用いてペプチドの結合性を解析すると、抗体の結合性と比較して、2-3 オーダー低い事が分かった。特異性と感度を上昇させるためには、是非抗体を用いることが重要である。今後、ヒト型抗体を使用することで安全性を担保しながら、検出感度を上げることで、MRI 検出に必要な鉄の投与量を減少させることも可能になるものと期待される。今後は、診断時点で進行癌である頻度が 90%近い膵臓癌に標的を絞って、研究開発を続けたいと考えている。本プロジェクトを進展させることで、膵臓癌の 5 年生存率の改善に貢献したい。また、本実験で示された様に、リポソームは単独でも癌部位に集積し、効果を発揮できる。これは、腫瘍を形成する血管が有する EPR 効果（enhanced permeability and retention）によるものと考えられている。そこで、感温性リポソームについてはそれ自体での臨床応用が可能であると考えられことから、安全性試験を行いながら臨床応用に向けた基盤整備を行うことを予定している。

5. 結論

ペプチド付加型磁性体ナノミセルを用いて標的細胞を画像化することが可能になった。また、抗癌剤を包埋した感温性リポソームと加温誘導を組み合わせる事で、抗腫瘍効果が誘導された。

6. 研究発表

1. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 234-237, 2007.
2. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Control of temperature-sensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers using peripheral modification with various alkylamide groups, *Macromolecules*, **39**, 7451-7453, 2006.
3. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, Enhancement of transfection activity of lipoplexes by complexation with transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes, *Int. J. Pharmaceutics*, **325**, 186-190, 2006.
4. Y. Tono, C. Kojima, Y. Haba, T. Takahashi, A. Harada, S. Yagi, K. Kono, Thermosensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers with

peripheral phenylalanine residues, *Langmuir*, **22**, 4920-4922, 2006.

5. A. Harada, M. Kawamura, T. Matsuo, T.

Takahashi, K. Kono, "Synthesis and characterization of head-tail type polycation block copolymer as non-viral gene vector",

Bioconjugate Chem., **17**, 3-5 (2006).

6. K. Kono, T. Murakami, T. Yoshida, Y. Haba, S. Kanaoka, T. Takagishi, S. Aoshima, Temperature-sensitization of liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: effect of copolymer chain length, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1367-1374 (2005).

7. T. Takahashi, A. Harada, N. Emi, K. Kono, Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1160-1165 (2005).

8. K. Kono, H. Akiyama, T. Takahashi, T. Takagishi, A. Harada, Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 208-214 (2005).

9. Y. Haba, A. Harada, T. Takagishi, K. Kono, "Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups", *Polymer*, **46**, 1813-1820 (2005).

10. K. Kono et al. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 208-214 (2005).

11. Y. Haba et al. Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups, *Polymer*, **46**, 1813-1820 (2005).

12. Y. Haba et al. Rendering poly(amidoamine) or poly(propylenimine) dendrimers temperature sensitive, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12760-12761 (2004)

13. K. Yoshino et al. Temperature-sensitization of liposomes by use of N-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms, *Bioconjugate Chem.* **15**, 1102-1109 (2004).

14. K. Kono, T. Takagishi, Temperature-sensitive liposomes, *Methods in Enzymology*, **387**, 73-82 (2004).

7. 知的財産権の出願・取得状況

1. 出願番号 特願 2006-48576

PCT/JP2007/053988

発明人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称；「機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体」

出願人；国立国際医療センター総長、名糖産業株式会社

出願日；2007/2/23

2. 出願番号 PCT/JP2006/321830

発明人；石坂幸人、中山泰秀、根本 泰
発明の名称；「遺伝子導入剤及び遺伝子ベクター」

出願人；国立循環器病センター総長が代表する日本国

出願日；2006/11/1

3. 出願番号 特願 2005-132169

発明人；河野健司、青島貞人
発明の名称；「温度感受性薬剤放出システム」

出願人；大阪府立大学、大阪大学

出願日；2005/4/28

4. 出願番号 特願 2005-332011

発明人；河野健司、高橋俊成
発明の名称；「ポリアミドアミンデンロン脂質を含む遺伝子等運搬媒体組成物」

出願人；大阪府立大学、大阪大学

出願日；2005/11/16

磁性ナノ粒子へのペプチド付加、最適化に関する研究

分担研究者 長谷川正勝 名糖産業株式会社 名古屋研究所長

研究要旨：MRI による検出や高周波により発熱する性質を持ち、且つ生体安全性の高い磁性ナノ粒子に、細胞特異的認識機能や細胞核内移行機能を有するペプチドを導入した「ペプチド-磁性ナノ粒子複合体」を作成した。これら複合体の生物試験の結果、目的とする細胞への特異的集積や、細胞内・核内への取り込み等が MRI により有意に確認された。これにより、これら複合体が部位特異的 MRI 造影剤や局所磁場療法剤として実用的な化合物であることが示された。

A. 研究目的

本研究は、微小癌に対する MRI 診断の発展、及び非侵襲的な局所 DDS による治療システムの構築を目指すものである。細胞特異的認識や細胞核内移行機能を有するペプチドが見出されていることから、本ペプチドを MRI による検出が可能、且つ高周波にて発熱する磁性ナノ粒子に結合した複合体により、標的細胞特異的な MRI 造影剤や局所磁場（温熱）療法剤を開発することを目的とする。

B. 研究方法

分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子に、リンカー分子を介して各種機能性ペプチドを導入した「ペプチド-磁性ナノ粒子複合体」を合成する。これら複合体において、それぞれのペプチドの特質に応じて次のような検討を実施した。

①部位特異的ペプチド結合体においては、各種物性（ペプチド結合数、粒子径、粒子表面の性質、磁性等）を適切に調整及び改良し、標的腫瘍細胞への特異的集積を行う。

これにより、未だ実用化されていない部位特異的 MRI 造影剤および局所磁場療法剤の開発を目指した。

②核内移行性ペプチド結合体については、アミノ酸配列を詳細に調査することにより、機能発現に関与する部位の特定と、その応用による移行機能の向上を行う。これにより、核内へ磁性体を効率的に運搬させることで、磁場療法、細胞磁気標識などへの応用を目指した。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

① 部位特異的ペプチド

本研究の結果、神経芽腫特異的ペプチド（RBP-1）、新生血管特異的ペプチド（KDR-BP）、膵臓特異的ペプチド（GLP-1）、神経膠種特異的ペプチド（MMP-2-BP）、各種 IgG と結合するペプチド（Z33）の計 5 種のペプチド付加型磁性ナノ粒子を作成でき、さらに、これら複合体におけるペプチド導入数や粒子表面性質を改変したものを合成することができた。このようにして試

作した複合体は、まず、シャーレ内で目的細胞指向性が確認できた。さらに、KDR-BP複合体においては、マウス血管投与の結果、目的腫瘍組織に磁性体が集積している様子をMRI画像で捉えることができた。

② 細胞核内移行性ペプチド

C45D18の断片配列と活性との相関性を調査した結果、機能の大幅な向上を達成し、加えて、配列の短縮化によるコスト削減、細胞毒性の低減による生体応用が示された。さらに、このようにして見出した新規ペプチドを結合した磁性ナノ粒子複合体は、細胞に取り込ませた後、磁場照射を行った結果、細胞損傷による増殖率の抑制が見られ、磁場療法の可能性が示された。

D. 考察

本研究により、磁性ナノ粒子に機能性ペプチドを導入した複合体は、それぞれのペプチドの特性に応じて、部位特異的なMRI造影剤や、高周波照射による磁場治療剤として有用であることが示された。今後の課題として、特異的集積時間の短縮、及び高磁力化によるMRI検出感度・発熱効率の向上などを改善していくことで、本研究の最終目標である臨床応用に到達できるものとする。

E. 結論

本研究より、①細胞標的ペプチドを導入した磁性ナノ粒子複合体は、生体に投与すると標的組織に集積する能力を有することが示され、将来、標的癌特異的MRI造影剤として実用化が期待できる。

一方、②細胞核内移行ペプチドにおいては、磁性ナノ粒子との結合により、細胞の磁気標識、及び磁性ナノ粒子本体の発熱・振動による標的癌細胞死滅化への応用も可

能性がある。また、本研究で見出されたペプチドは、磁性ナノ粒子以外にも、各種生理活性物質との複合化により、同機能を利用した各種応用が期待できる。

F. 健康危険情報

分担研究者らが開発した磁性ナノ粒子は、その類似品が既にMRI造影剤として製品化され、高い生体安全性が示されている。従って、本研究で開発されるペプチド導入磁性ナノ粒子複合体は原則安全性が高いと考えられる。しかし、新規物質ではあるので、臨床応用に際しては、GMPおよびGCPに則した対応が必要であることは言うまでもない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日本分子生物学会 2006 フォーラム

「標的ペプチド-磁性体ナノ粒子を用いた微小病変のMRIによる画像化」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1) 国際出願番号：PCT/JP07/ 号

発明者：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡

発明の名称：「機能性分子が導入された有機磁性ナノ複合体」

出願人：国立国際医療センター総長、名糖産業株式会社

出願日：2007/02/23

2) 日本国特許出願番号：2007- 号

発明者：石坂幸人、長谷川正勝、野原聡

発明の名称：「新規核内移行ペプチド」

出願人：国立国際医療センター総長、名糖産業株式会社

出願日：2007/03/07

研究課題：ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による局所DDSの開発のための基礎研究（感温性高分子を用いたインテリジェント型リポソームの構築）

分担研究者：所属施設 大阪府立大学
氏名 河野健司

A. 研究目的

理想的な化学療法を実現するために、体内の標的病巣に選択的に薬物を送達する技術の確立が求められている。本研究では、体外からの温度刺激によって、体内における薬物送達の制御が可能なインテリジェント型ナノキャリアとして、超高感度温度応答性リポソームの開発を試みた。温度応答性リポソームは、体温においては薬物を保持するが、加温にตอบสนองして薬物を放出するリポソームである。これまでに、リン脂質のゲル-液晶転移を利用して温度応答性を付与したものが用いられていた。しかし、このような従来のリポソームでは、応答温度の調節が困難であり、また、薬物放出の制御も不十分であった。本研究では、所望の温度領域において鋭敏な温度応答性を示す温度応答性リポソームとして、感温性高分子を複合化したリポソームを設計し、その抗癌剤の送達システムとしての機能について検討した。また、分子集合体ミセルは、リポソームと並んで薬物送達システムとして期待されている。本研究では、ミセル様構造を有する dendrimer に温度応答性を付与した感温性 dendrimer の開発についても検討を行った。

B. 研究方法

脂質膜へのアンカー部位をもつ感温性高分子である 2 エトキシエトキシエチルビニルエーテル (EOEOVE)-オクタデシルビニルエーテル (ODVE) ブロック共重合体、ポリエチレングリコール (PEG) 脂質と卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロールに pH5 に調製した緩衝液を加え、エクストルーダー（孔径 100nm）を用いてリポソームを作製した。このリポソーム分散液にアドリアマイシン (ADR) を加え、インキュベートすることで ADR 内封共重合体修飾リポソームを調製した。下肢に Colon26 の腫瘍をもつマウスに ADR 内封リポソームを尾静脈投与し、その後の腫瘍径の変化を測定することで、リポソームの抗腫瘍効果を評価した。温度応答性 dendrimer は、種々の世代数のポリアミドアミンにアルキルアミド基を導入することによって調製した。

C. 研究成果及び考察

C-1. 温度応答性リポソーム

40℃付近で親水性から疎水性に変化する EOEOVE-ODVE ブロック共重合体を複合化したリポソームの薬物放出挙動について検討した。その結果、このリポソームは共重合体の転移温度以下においては安定に薬物を保持するが、転移温度以上において内包物質を放出することがわかった。また、リポソームの放出挙動に及ぼす共重合体分子量の影響について調べ、分子量の増大とともに、共重合体修飾リポソームの温度応答性は鋭敏になることがわかった。特に、分子量 10000 程度の共重合体を複合化したリポソームは、40℃以上において ADR の放出が促進され、45℃付近で極めて速く、著しい ADR の放出を引き起こした。また、この共重合体の複合化は、血中滞留性に優れる PEG 修飾リポソームへの温度感受性の付与に対しても有効であり、高い温度応答機能と良好な血中滞留性を併せ持つリポソームの構築に成功した。

このリポソームを担癌マウスに尾静脈投与し、その後の腫瘍の局所加温（10 分間、45℃）による腫瘍への抗癌剤の選択的な送達について調べた。局所加温を行わない場合、腫瘍成長はほとんど影響されないのに対して、局所加温した場合、腫瘍成長が強く抑制されることがわかった。加温によって、抗癌剤が放出され、腫瘍に選択的に作用したことを示している。また、リポソーム投与後の加温のタイミングの効果を調べたところ、投与 12 時間および 24 時間後に加温することによって、その抗腫瘍効果が高まることがわかった。血中に投与されたリポソームは、12～24 時間で腫瘍組織に集積し、局所加温によって抗癌剤を放出することによって、腫瘍成長を効果的に抑制したものと考えられる。同量の ADR をフリーで投与した場合と比較すると、リポソームを用いることによって腫瘍成長は、より強く阻害された。リポソームが腫瘍部位に効率よく集積して ADR を放出することによるものと考えられる。

温度応答性リポソームの臨床応用を考えた場合、その応答温度をより低い温度領域にする必要がある。そこで、37℃付近で疎水化する共重合体を合成し、これを複合化したリポソームを調製した。このリポソームは、39℃以上において ADR を放出した。また、リポソーム脂質として、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロールに加えてジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを用いることで、その温度応答挙動

を格段に改善することができた。

C-2. 感温性デンドリマー

ミセルはリポソームと並び DDS への応用が期待されている。ミセルは分子集合体のため、血中に投与され、希薄な条件になると単量体への解離が生じるため、その安定性が問題になる。また、標的組織への集積化を促進するための機能の付与も必要である。そこで、本研究では、温度に応答するミセル様構造をもつ新しいタイプの高分子ナノ粒子として感温性デンドリマーの開発について検討した。広く用いられているポリアミドアミンデンドリマーをベースとして、その末端に種々のアルキルアミド基を導入することによって、デンドリマーに温度感受性を試みた。得られたデンドリマーは、下限臨界溶液温度を示し、特定の温度において親水性から疎水性への変化を示した。また、表面のアルキル基の鎖長を調節することで体温付近以上において応答するデンドリマーを得られることがわかった。このデンドリマーは、疎水性分子を内部に保持したまま温度応答することから、標的への薬物送達を温度制御することが可能な新しい温度応答型 DDS として応用できるものと考えられる。

D. 結論

本研究において、感温性を有する共重合体を ADR 抱埋リポソームに複合化することによって、従来にない超高感度を示す温度応答性リポソームを開発することに成功した。また、このリポソームを用いることで、マウス体内の腫瘍への抗癌剤の選択的送達ができることが示された。さらに、高分子の転移温度やリポソーム脂質組成の最適化によって、実用的な温度領域において鋭敏な温度応答性を示すリポソームを製作することに成功した。本研究で開発された超高感度型温度応答性リポソームは、局所加温との併用によって、癌病巣だけを攻撃することが可能なことから、副作用を低減し最大限の治療効果を得る、理想的な癌化学治療につながるものと期待される。一方、本研究において、世界で初めてデンドリマーに温度応答性を付与することに成功した。感温性デンドリマーは、単一分子でありながら、ミセル様構造をもち、しかも温度に応答して親水性から疎水性に変化するため、従来のミセルの問題点を解決し、精度の高い薬物送達を実現する新しい高機能 DDS として期待される。

E. 研究発表

1. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 234-237, 2007.

2. Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Control of temperature-sensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers using peripheral modification with various alkylamide groups, *Macromolecules*, **39**, 7451-7453, 2006.

3. N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, Enhancement of transfection activity of lipoplexes by complexation with transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes, *Int. J. Pharmaceutics*, **325**, 186-190, 2006.

4. Y. Tono, C. Kojima, Y. Haba, T. Takahashi, A. Harada, S. Yagi, K. Kono, Thermosensitive properties of poly(amidoamine) dendrimers with peripheral phenylalanine residues, *Langmuir*, **22**, 4920-4922, 2006.

5. A. Harada, M. Kawamura, T. Matsuo, T. Takahashi, K. Kono, "Synthesis and characterization of head-tail type polycation block copolymer as non-viral gene vector", *Bioconjugate Chem.*, **17**, 3-5 (2006).

6. K. Kono, T. Murakami, T. Yoshida, Y. Haba, S. Kanaoka, T. Takagishi, S. Aoshima, Temperature-sensitization of liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: effect of copolymer chain length, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1367-1374 (2005). Takahashi, A. Harada, N. Emi, K. Kono, Preparation of efficient gene carriers using a polyamidoamine dendron-bearing lipid: improvement of serum resistance, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1160-1165 (2005).

8. K. Kono, H. Akiyama, T. Takahashi, T. Takagishi, A. Harada, Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 208-214 (2005).

9. Y. Haba, A. Harada, T. Takagishi, K. Kono, "Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups", *Polymer*, **46**, 1813-1820 (2005).

10. K. Kono et al. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 208-214 (2005).

11. Y. Haba et al. Synthesis of biocompatible dendrimers with a peripheral network formed by linking of polymerizable groups, *Polymer*, **46**, 1813-1820 (2005).

12. Y. Haba et al. Rendering poly(amidoamine) or poly(propyleneimine) dendrimers temperature sensitive, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12760-12761 (2004). Yoshino et al. Temperature-sensitization of liposomes by use of N-isopropylacrylamide copolymers with varying transition endotherms, *Bioconjugate Chem.* **15**, 1102-1109 (2004).

14. K. Kono, T. Takagishi, Temperature-sensitive liposomes, *Methods in Enzymology*, **387**, 73-82 (2004).

F. 特許

1.河野健司、青島貞人、温度感受性リポソームおよび温度感受性薬剤放出システム、特願 2005-132169 (2005); PCT/JP2006/309052

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総合研究報告書
ヒト血液細胞ならびにサル胚性幹細胞に対する遺伝子導入法の技術開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 ヒト血液細胞への遺伝子の導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム（Drug Delivery System, DDS）の開発の大きな妨げとなっている。また、近年の再生医療の中で極めて重要な役割を果たす胚性幹細胞への遺伝子導入も、重要な検討課題である。本研究においては、ヒト血液細胞株とカニクイザル胚性幹細胞株を用いて、遺伝子（プラスミド）の導入効率改善を試みた。検討した遺伝子導入手法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン（EPEI）法、HVJエンベロープベクター、ヌクレオフェクターの3つの方法で、いずれも従来の手法よりはるかに良好な結果を生み出したが、その中でも特にヌクレオフェクターが最も効率が優れ、プラスミドDNAの導入実験に貢献した。一方、HVJエンベロープベクターは、蛋白の導入にも有効で、しかも、エンドゾームではなく細胞質への直接の導入が可能であった。

A. 研究目的

細胞への遺伝子導入は、臨床的な技術開発において、重要な課題である。特にヒト血液細胞への効率の高い遺伝子導入は極めて困難である。また、再生医療の分野で注目されている胚性幹細胞への遺伝子導入も重要な研究課題である。

本年度の研究においては、ヒト血液細胞とカニクイザル胚性幹細胞への遺伝子導入の効率化を図るための技術開発研究を行った。

B. 研究方法

細胞はヒト白血病細胞株（U937, HL-60, OCI-AML1a, F36P）とカニクイザル胚性幹細胞を用いた。プラスミドの導入効率を検討するために、GFP蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。また、FITCラベルのオリゴヌクレオチドやアレクサ標識IgGも用いた。試みた遺伝子導入促進法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン（EPEI）を用いた手法、HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法、であった。

C. 研究結果

EPEIを用いたヒト血液細胞内導入においては、オリゴヌクレオチドもプラスミドDNAも、安定した導入、発現が確認された。HVJエンベロープベクターを用いた場合は、細胞の凝集が起こりやすくなる傾向があったが、遺伝子の導入、発現はオリゴヌクレオチドでもプラスミドDNAでも良好であった。さらに、アレクサ標識IgGを用いた実験によって、HVJエンベロープベクターは蛋白の導入にも応用できることが確認された。ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法は、今回用いた全ての白血病細胞株とカニクイザル胚性幹細胞において極めて良好な（30-60%）導入、発現効率を示した（GFP発現プラスミドによる）。導入後の細胞毒性はある程度認められた。

D. 考察

HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞株への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドゾーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。

また、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、サル胚性幹細胞への良好な分子導入が可能で、ヒト胚性幹細胞への応用の可能性が示された。今後は、再生医療や遺伝子治療などへの応用が、重要な課題である。

E. 結論

HVJエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒト血液細胞株やカニクイザル胚性幹細胞に対して、オリゴヌクレオチド、プラスミドDNA、蛋白を効率よく導入することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Saeki K, Yuo A, et al: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428,2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、他

出願人：国立国際医療センター、他

特願2006-303929

ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射による
局所 DDS の開発のための基盤研究

分担研究者 畠 清彦 財団法人癌研究会癌研有明病院化学療法科 部長

研究要旨 神経芽細胞腫については、12例をまとめた治療法を CAD0/CVP 療法として、末梢血幹細胞移植を組み入れて行ったところ成績の良好であることが再現された。またこの研究では低分子化合物または神経芽細胞腫に対する新規薬剤の開発が最も重要であるが、今年度は抗体医薬の耐性機序を研究し、補体感受性を規定する CD55 蛋白の発現または悪性リンパ腫では、CD20 抗原遺伝子の点突然変異により蛋白発現が低下することによることを見出した。

A. 研究目的

癌に対する標的治療は、乳癌、悪性リンパ腫、大腸がんと成功している。臨床検体の大きさは問題であり、十分な臨床検体がとれないか、とれても非常に小さいことが課題であったので、4 μ L という小さな体積での観察を行う系を、作成する。CD20 を中心としてできるだけ早く臨床検体からの抗体による腫瘍細胞の精製を行い、解析する。

B. 研究方法

これまでに経験した症例以外に3例神経芽細胞腫を経験し、ほかの施設で治療された例ではサルベージ療法として、CyVADIC 療法を行った。今年度はさらに NF- κ B 系、STAT 系の測定を確立した。また臨床検体が非常に小さく昨年度研究に進展させにくい状況があったので、非常に小さな体積での分析ができるように、方法を開発した。レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて、4 μ L という体積に腫瘍細胞またはリンパ節から分離した細胞、約千個前後と血清、抗体医薬を共培養して、タイムラプス撮影を行って分析した。細胞死は DAPI 染色、細胞表面の染色具合、リンパ腫では CD20 遺伝子の変異を検討した。倫理面での配慮患者さんには研究的な治療であることを理解して頂いて、組織内 IRB にかけて、治療を行っている。

C. 研究結果

レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて、4 μ L という体積に腫瘍細胞またはリンパ節から分離した細胞、約千個前後と血清、抗体医薬を共培養して、タイムラプス撮影を行って分析した。現在 RET に対する抗体医薬の可能性があり、抗体療法における耐性機序を研究したところ、補体感受性の規定因子である CD55 の過剰発現または標的分子自体の変異による発現不良によることがわかった。

D. 考察

非常に小さな体積での解析を可能とし、リンパ腫における抗体療法を例として、系の小さな測定系を開発した。発表予定している。今後は神経芽細胞腫でも小さなサンプルでの解析を行う。

E. 結論

これまでの従来型抗癌剤による治療は、ある程度の成功を示しているが、再発時、転移時、高齢者、移植の適応でない患者さんを考慮すると、すぐにでも標的分子を阻害する治療を考え、かつ実用化が必要である。しかし現在 RET に対する抗体医薬の可能性があり、抗体療法における耐性機序を研究したところ、補体感受性の規定因子である CD55 の過剰発現または標的分子自体の変異による発現不良によることがわかった。神経芽細胞腫は比較的症例数が少ないこともあり、また臨床検体を得ることが困難で実際の症例からの標本獲得が十分にはできなかった。しかし生検からの小さな材料から種々の検査をイメージングを用いて測定系、容器などを開発した。

F. 健康情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表（著者・題目・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入）

2004 年

1. Mishima Y, Nagasaki E, Terui Y, Irie T, Takahashi S, Ito Y, Oguchi M, Kawabata K, Kamata S, Hatake K. Combination chemotherapy (cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine with continuous-infusion cisplatin and

etoposide) and radiotherapy with stem cell support can be beneficial for adolescents and adults with estheseuroblastoma. *Cancer*. 101(6):1437-44. 2004

2. Sawaki M, Ito Y, Tada K, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Imai T, Nakao A, Hatake K. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in heavily pretreated patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Tumori*. 90(1):40-3. 2004
3. Sawaki M, Ito Y, Hashimoto D, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N, Tada K, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Imai T, Nakao A, Hatake K. Paclitaxel administered weekly in patients with docetaxel-resistant metastatic breast cancer: a single-center study. *Tumori*. 90(1):36-9. 2004

2005 年

1. Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, Ishikawa T: Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum (II) treatment. *Cancer Res.*, 65:4998-5002 2005
2. Toi M, Saeki T, Aogi K, Sano M, Hatake K, Asaga T, Tokuda Y, Mitsuyama S, Kimura M, Kobayashi T, Tamura M, Tabei T, Shin E, Nishimura R, Ohno S, Takashima S. Late phase II clinical study of vinorelbine monotherapy in advanced or recurrent breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Jun;35(6):310-5.

2006 年

1. Osako T, Ito Y, Morimatsu A, Tada K, Sakurai N, Takahashi S, Akiyama F, Iwase T, Hatake K. Flare-up of Dermatomyositis Along with Recurrence of Breast Cancer. *Breast J*. 2007 Mar-Apr;13(2):200-2.
2. Utsubo-Kuniyoshi R, Terui Y, Mishima Y, Rokudai A, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sonoda Y, Kasahara T, Hatake K. MEK-ERK is involved in SUMO-1 foci formation on apoptosis. *Cancer Sci*. 2007 Jan 31; [Epub ahead of print]
3. Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K. Continuous treatment of

bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci*. 2007 Mar;98(3):364-72.

4. Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Trastuzumab treatment for breast cancer. *Intern Med*. 2007;46(3):149-50.
5. Furukawa K, Ito Y, Takahashi S, Sawaki M, Mizunuma N, Horikoshi N, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Furukawa K, Tajiri T, Hatake K. Efficacy and safety of combined trastuzumab and Paclitaxel therapy as a second-line treatment in women with metastatic breast cancer: a single institutional experience. *Breast Cancer*. 2006;13(4):329-33.
6. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Feb;27(2):283-9. Epub 2006 Oct 19.
7. Ennishi D, Sezaki N, Senoo T, Terui Y, Hatake K, Hino N. A case of acute promyelocytic leukemia during gefitinib treatment. *Int J Hematol*. 2006 Oct;84(3):284-5.
8. Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui KI, Maekawa T. INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph+ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its in vivo activity. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):306-14.
9. Suenaga M, Oya M, Ueno M, Yamamoto J, Yamaguchi T, Mizunuma N, Hatake K, Kato Y, Muto T. Anal canal carcinoma with pagetoid spread: report of a case. *Surg Today*. 2006;36(7):666-9.
10. Masataka Sawaki, Yoshinori Ito, Futoshi Akiyama, Nahomi Tokudome, Rie Horii, Nobuyuki Mizunuma, Shunji Takahashi, Noboru Horikoshi, Tsuneo Imai, Akimasa Nakao, Fujio Kasumi, Goi Sakamoto, and Kiyohiko Hatake. High Prevalence of HER-2/neu and p53 Overexpression in Inflammatory. *Breast Cancer Breast Cancer* vol. 13 no. 2 172-178 2006
11. Y. Mishima. Y. Terui. K. Takeuchi. E. Nagasaki. M. Yokoyama. N. Mizunuma.

- S. Takahashi. K. Yamada. T. Fukunaga. J. Yamamoto. T. Yamaguchi. Y. Kato. K. Hatake Simultaneously occurring chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib Targ Oncol 168-171 2006
12. Ichinosuke Hyodo, Kuniaki Shirao, Toshihiko Doi, Kiyohiko Hatake, Yasuaki Arai, Kensei Yamaguchi, Takao Tamura, Shoji Takemiya, Hiroya Takiuchi, Kazuhiko Nakagawa and Hideyuki Mishima. A Phase II Study of the Global Dose and Schedule of Capecitabine in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Jpn J Clin Oncol 36(7) 410-417 2006
 13. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, Yokoyama M, Mizunuma N, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to CDC with rituximab. Cancer Science. 97:72-79 2006
 14. Rokudai A, Terui Y, Kuniyoshi R, Mishima Y, Mishima Y, Aizu-Yokota Y, Sonoda Y, Kasahara T, and Hatake K. Differential Regulation of Eotaxin-1/CCL11 and Eotaxin-3/CCL26 Production by the TNF- α and IL-4 stimulated Human Lung Fibroblast. Biol. Pharm. Bull. 29: 1102-9 2006
2. 学会発表
1. 抗がん剤の適応拡大 畠清彦・伊藤良則 第3回日本臨床腫瘍学会総会 2005/3/4 横浜
 2. 外来化学療法導入と安全効率化 畠清彦 日本癌治療研究会ランチョンセミナー 2005/6/24 北海道
 3. リンパ節転移陽性乳癌における AC followed by paclitaxel 治療の遂行性と安全性の検討 徳留なおみ 第13回日本乳癌学会 2005/6/10-6/11 岡山
 4. 乳癌骨転移に対する Pamidronate 90mg 投与の検討 高橋俊二 第14回日本乳癌学会 2005/6/10-6/11 岡山
 5. 悪性リンパ腫に対する治療について 畠清彦 沖縄臨床血液研究会 2005/6/17 沖縄
 6. 抗体療法による悪性リンパ腫の治療戦略 照井康仁 北海道血液腫瘍フォーラム 2005/7/9 北海道
 7. アナストロゾール抵抗性再発進行乳癌患者におけるエキセメスタンの治療成績 小林隆之他 第13回日本乳癌学会 2005/6/9-6/11 岡山
 8. 進行再乳癌治療における decision making 伊藤良則 第13回日本乳癌学会 2005/6/9-6/11 岡山
 9. MDR-1 遺伝子治療を受けた乳癌患者の末梢血で長期に維持されていた遺伝子導入細胞クローンの解析 伊藤良則・畠清彦・高橋俊二他 第64回日本癌学会学術総会 2005/9/14-9/16 北海道
 10. 慢性骨髄白血病細胞株 K562 における autophagic cell death 誘導機構の解析 三嶋裕子・照井康仁・三嶋雄二・木村晋也・瀧澤俊宏・畠清彦 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 11. Gefitinib 投与中発症した急性前骨髄球性白血病 瀬崎伸夫・畠清彦・日野理彦・仲佐めぐみ・荒谷千登美・中川浩美 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 12. CD13/APN 阻害剤による腫瘍血管新生の抑制の機序 三嶋雄二・照井康仁・三嶋裕子・國吉良子・六代颯子・畠清彦 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 13. 抗体医薬の問題点と解決 畠清彦 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 14. 多発性骨髄腫に対する tandem auto/allo-mini transplantation 明星智洋・松村祐子・畠清彦他 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 15. 外来化学療法に於けるチーム医療の役割について考える 徳留なほみ 第2回日本乳癌学会関東地方会 2005/11/26 埼玉
 16. gefitinib 使用中発症した APL 遠西大輔 第67回日本血液学会 2005/9/17-9/19 横浜
 17. 抗体医薬の問題点と解決 畠清彦他 日本臨床血液学会合同シンポジウム 2005-9/17-9/19 横浜
- IDENTIFICATION OF CD20 MUTATIONS IN MALIGNANT LYMPHOMA: CAN THEY BE PREDICTORS OF RESPONSE TO RITUXIMAB? 照井康仁・桜井琢磨・三嶋裕子・杉村夏彦・小島清嗣・横山雅大・畠清彦 ASH 2005/12/10-12/13 アトランタ
- 2006年
1. びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫において Chk2 のタンパク発現低下は予後不良因子である 明星智洋・遠西大輔・三嶋裕子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第68回日本血液学会・第48

回日本臨床血液学会 2006/10/6-8 福岡

2. 進行期 MALT リンパ腫に対する WEEKLY RITUXIMAB±CHOP (COP)療法の後方視的解析 遠西大輔・横山雅大・三嶋裕子・明星智洋・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡

3. 当院で治療を行った Follicular lymphoma 84 例に対する後方的解析 三嶋裕子・遠西大輔・横山雅大・明星智洋・佐野公司・照井康仁・高橋俊二・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡

4. Diffuse large B-cell lymphoma に対する R-CHOP 療法 GC タイプと Non-GC タイプの比較 横山雅大・遠西大輔・上田響子・公平誠・明星智洋・三嶋裕子・竹内賢吾・五月女隆・陳勁松・照井康仁・水沼信之・高橋俊二・伊藤良則・畠清彦 第 48 回日本臨床腫瘍学会 2006/10/5-9 福岡

5. Rituximab 感受性迅速評価法の確立と耐性機序の解析 三嶋雄二・照井康仁・杉村夏彦・國吉良子・六代顕子・畠清彦 第 65 回日本癌学会学術総会 2006/9/28-30 横浜

6. CD20 の C 末端変異体は B 細胞性リンパ腫のリツキサン誘導性補体依存性細胞傷害活性低下とリツキサン耐性を引き起こす 照井康仁・三嶋雄二・杉村夏彦・小島清嗣・畠清彦・國吉良子・六代顕子 第 65 回日本癌学会学術総会 2006/9/28-30 横浜

7. リツキシマブ誘導 CDC 耐性株の樹立とその評価 杉村夏彦・三嶋雄二・照井康仁・國吉良子・六代顕子・畠清彦 第 65 回日本癌学会学術総会 2006/9/28-30 横浜

8. 子宮頸部原発のバーキットリンパ腫の一例 公平誠・遠西大輔・明星智洋・三嶋裕子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会 2006/10/6-8 福岡

9. 癌研究会有明病院における CD5 陽性 Diffuse large B cell lymphoma の後方視的検討 明星智洋・公平誠・上田響子・山田修介・遠西大輔・三嶋裕子・横山雅大・五月女隆・照井康仁・高橋俊二・竹内賢吾・畠清彦 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会 2006/10/6-8 福岡

10. LH-RH アゴニスト併用による化学療法中の卵巣機能保護の可能性について 上田響子・遠西大輔・三嶋裕子・横山雅大・照井康仁・明星智洋・高橋俊二・畠清彦 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会 2006/10/6-8 福岡

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし

標的ペプチド付加型感温性ナノミセル及び高周波焦点照射を用いた
局所 DDS に向けた基盤研究

分担研究者 山下 克美 金沢大学大学院自然科学研究科 助教授

研究要旨 すい臓のランゲルハンス島で発現が高い GLP-1（グルカゴン様ペプチド1）受容体を標的化し、すい臓を画像化することを試みた。標的ペプチドとしては GLP-1 の一部の配列を有するペプチドを用いた。まず、GLP-1 受容体（GLP-1R）を恒常的に発現する、活性型 Ras を発現する NIH3T3（NIH3T3-Ras）の作製を行った。しかしながら、GLP-1R の恒常的発現は NIH3T3-Ras の増殖を阻害するためか、発現細胞が 2 株しか分離されず、さらにこれらの細胞株の生育も悪いうえ、長期間培養するにつれて GLP-1R を発現する細胞の割合も低下した。そこで、プロゲステロンアンタゴニストである人工中絶剤のミフェプリストンを用いて GLP-1R を誘導発現することを試みた。その結果、ミフェプリストン非添加状態では NIH3T3-Ras は正常に増殖し、ミフェプリストン添加により GLP-1 受容体が効率よく発現される細胞株を樹立できた。この細胞を用いて、磁性体と結合させた GLP-1 ペプチドを GLP-1 受容体発現細胞と混和し結合を測定することを試みたが、磁性体結合 GLP-1 ペプチドが培地中で凝集したため、特異的な結合は測定できなかった。

A. 研究目的

すい臓で高い発現が認められるグルカゴン様ペプチドGLP-1の受容体（GLP-1R）を標的化し、すい臓を画像化することにより、難治性であることが知られているすい臓がんなどすい臓に生じた病変を初期に検出できるシステムを構築することが本研究の最終目標である。そこで、GLP-1Rを標的として、そのリガンドであるGLP-1の受容体との結合に必須な部分を有するペプチドを用い、このペプチドに磁性体を付加し、培養細胞レベルでGLP-1Rの発現をMRI像として画像検出するシステムを樹立することを第一目標とした。

B. 研究方法

1. GLP-1 受容体の恒常的発現細胞の樹立

GLP-1 受容体を恒常的に発現させるために、GLP-1R を CMV プロモーターの下流に結合させたプラスミドを作製した。また、発現の検定に用いるための GLP-1R 受容体に対する適切な抗体が市販されていなかったために、GLP-1R の C-末端側の細胞質ドメインに人工的な FLAG タグを付加し、抗 FLAG 抗体での検出を可能にするように加工した。この GLP-1R を CMV プロモーターに対して正または負になるように配置したプラスミドを、ヌードマウスでの造腫瘍性が知られている活性化 K-Ras 発現 NIH3T3 細胞（NIH3T3-Ras 細胞）に導入し、薬剤耐性（G418 耐性）細胞を選択することで、GLP-1R 発現候補細胞を分離した。さらにこれらの中から、抗 FLAG 抗体を用いて GLP-1R 発現細胞を選択し、磁性体結合 GLP-1 ペプチドとの結合実験に使用した。

ドとの結合実験に使用した。

2. GLP-1 受容体の誘導発現細胞の樹立

GLP-1 受容体を誘導的に発現させるために、まず、プロゲステロン受容体のリガンド結合ドメインを融合させた転写活性化タンパク質を発現させた NIH3T3-Ras 細胞を樹立した。この細胞へのミフェプリストン添加により GLP-1R の発現が可能となる、C-末端側に FLAG-タグを付した GLP-1 受容体の cDNA を挿入したプラスミドを導入した。GLP-1 受容体の誘導発現は、恒常的発現細胞の場合と同様に抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングにより検出した。

3. 磁性体結合 GLP-1 ペプチドと細胞の結合測定

このようにして樹立した細胞を用いて、磁性体結合 GLP-1 ペプチド（CMDM-GLP-1）と受容体の結合実験を行った。実験は、恒常的発現細胞の場合は、細胞を播種後 24 時間後に、また誘導発現細胞の場合は、GLP-1 受容体発現 NIH3T3-Ras 細胞を 2×10^6 M のミフェプリストンで 24 時間処理し受容体を十分発現させたのちに以下のように行った。

約 10%の濃度になるように CMDM-GLP-1 を加えた培地と交換し、さらに 12 時間培養した。その後、細胞を PBS で十分洗浄した後（基本的な方法としては、培養プレートに PBS を加え CMDM-GLP-1 を洗浄するという操作を行うが、使用した細胞は、プレートでの洗浄中にはがれやすくなってしまったために、遠心による洗浄を行った。遠心後、細胞をソニケーションにより破碎し、遠心したのち上清を調製し、タンパク定量

後に粗抽出液中の磁性体量を測定し、細胞へ結合した磁性体量とした。

(倫理面への配慮)

患者由来の生体組織を研究に使用しているわけではないので、特段の配慮はない。

C. 研究結果

1. GLP-1R 恒常的発現 NIH3T3 は極めて数が少なかったことから GLP-1R を恒常的に発現する細胞は分離されにくいものと推定された。実際に、分離した 50 個の G418 耐性細胞のうち、GLP-1R を発現しているものは 4 株しかなく、そのうちの 1 株は発現量が極めて低く、もう 1 株は増殖が遅かったため、磁性体 GLP-1 との実験には使用できないと判断された。また、かろうじて使用可能と思われた 2 株は、継代を重ねるごとに GLP-1R の発現量が低下した。間接蛍光顕微鏡観察により GLP-1R 発現細胞を検討すると、GLP-1R を発現する細胞の数が、継代によって減少していることが判明した。このことから、GLP-1R の NIH3T3-Ras 細胞への恒常的発現は、増殖の抑制に働くと考えられた。そこで、安定な結果を得るために、誘導発現細胞の作製を行った。

2. GLP-1R 誘導発現 NIH3T3-Ras 細胞の作製

まず、NIH3T3-Ras 細胞へ発現制御タンパク質である Switch タンパク質を発現する pSwitch プラスミドを導入した。その結果、6 個の候補株が得られ、そのうちの 1 株 (NIH3T3-Ras/sw2 株) を GLP-1R 誘導発現作製の親株に使用した。

NIH3T3-Ras/sw2 細胞へ C-末端側に FLAG タグを付した GLP-1R-FLAG を発現する pGENE プラスミドを導入し、ピューロマイシン耐性株を選択することで、候補細胞を得、ミフェプリストン添加の有無により GLP-1R の発現が制御される細胞を選択した。その結果、25 個が候補として選択され、さらに詳細な検討の結果、2 株 (G2 および G16 株) を GLP-1 との結合実験に用いた。これらの細胞は、GLP-1R を発現していない状態では親株の NIH3T3-Ras や NIH3T3-Ras/sw2 細胞と同様に良好な増殖を示し、GLP-1R 恒常発現細胞でみられた様な、増殖に対する阻害効果は観察されなかった。

3. GLP-1R 発現細胞への CMDM-GLP-1 の結合

恒常発現細胞の場合は、コントロール細胞である NIH3T3-Ras、GLP-1R が正方向に発現する細胞、逆方向に発現する細胞を用いて結合実験を行った。また、誘導発現細胞の場合は、コントロール細胞の NIH3T3-Ras/sw2、GLP-1R 誘導発現細胞の G2 および G16 を用いて、磁性体 CMDM 結合 GLP-1 ペプチドとの結合について検討した。

恒常発現細胞の場合は、「方法」の項に述べたように、また誘導発現細胞の場合は「方法」の項に述べたようにして GLP-1R を発現させた

後、結合実験を実施した。

その結果、CMDM 単独添加の場合は、すべての細胞において磁性体結合量が約 $10\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ 、CMDM-GLP-1 添加では、 $15\sim 25\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ という測定結果となったが、それぞれの細胞において、GLP-1R 発現の有無に関わらず、またミフェプリストン添加の有無に関わらず、磁性体結合量はほぼ一定の値を示したことから、検出された磁性体の細胞への結合は非特異的なものと判定した。

4. CMDM-GLP-1 の DMEM 培地中での凝集

2. および 3. の実験中に、CMDM-GLP-1 を培地に加えると凝集物が生成することに気がついた。凝集は PBS 中では生じることはなく、DMEM 培地への添加により発生し、さらに培地への血清添加により促進された。したがって、CMDM 単独の場合よりも CMDM-GLP-1 添加により磁性体結合量に高い値が見られたのは、この凝集が原因と推定された。

D. 考察

GLP-1R の NIH3T3-Ras 細胞への恒常的発現は細胞増殖を抑制することが考えられた。この理由は不明であるが、培地 (血清) 中に存在するグルカゴン様物質により増殖抑制に関わるシグナル伝達系が活性化されるものと考えられる。いずれにしてもこのような細胞を用いては磁性体結合 GLP-1 ペプチドとの結合実験はできないものと考えられる。

一方、GLP-1 受容体を誘導的に発現する細胞株では、増殖の抑制や GLP-1R 発現細胞数の消失などは観察されず、受容体とリガンドの結合を測定するための適切な細胞であると考えられる。

しかしながら、磁性体 CMDM 結合 GLP-1 が培地中で凝集物を生成するという問題により結合を測定するにはいたらなかった。これは、CMDM-GLP-1 の物性に由来すると思われる。したがって現時点では、リガンドと磁性体の結合様式を改善し、まず培地中での凝集をなくす必要がある。また、磁性体に結合させたペプチドも主として以下の 2 点について検討する必要がある。すなわち、ペプチドと受容体の結合の強さが十分かどうかというのが第 1 点であり、磁性体との結合で凝集が起らないような部位を選択するというのが第 2 点である。

この問題が解決されないとすれば、GLP-1R の細胞がドメイン、すなわちリガンドとの結合ドメインに対するモノクローナル抗体を作製し、その抗体に磁性体を結合させ標的化することも検討する必要がある。

E. 結論

NIH3T3-Ras 細胞を用いて、GLP-1 受容体を恒常的または誘導的に発現する細胞を作製した。

しかしながら、磁性体結合 GLP-1 が細胞培養用の培地中で凝集するという不測の事態が発生し、磁性体結合 GLP-1 の受容体発現細胞への結合は測定できなかった。

一方で、ある種の細胞で恒常的発現が細胞にとって負の影響を与える可能性のある受容体とリガンドとの結合を、細胞レベルで測定しようとする場合は、誘導発現系を用いることで可能性が開けることが示された。今後は、リガンドとの結合ドメインのみを細胞膜上に発現させるような系に構築が望まれる。

F. 健康情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (著者・題目・発表誌名・巻・頁・発行年等も記入)

① S. Uchida, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, M. Yoshida, Y. Ishizaka, and **K. Yamashita**: Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 226-232 (2004)

② S. Uchida, A. Kuma, M. Ohtsubo, M. Shimura, M. Hirata, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka, and **K. Yamashita**: Binding of 14-3-3 β but not 14-3-3 σ controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, 117, 3001-3020 (2004)

③ S. Tsukamoto, K. Yamashita, K. Tane, R. Kizu, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, H. Kawahara, and H. Yokosawa: Girolline, an antitumor compound isolated from a sponge, induces G2/M cell cycle arrest accumulation of polyubiquitinated p53. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 699-701 (2004)

④ C. Katagiri, K. Masuda, T. Urano, **K. Yamashita**, Y. Araki, K. Kikuchi, and H. Shima: Phosphorylation of Ser-446 determines stability of MKP-7. *J. Biol. Chem.*, 280, 14716-14722 (2005)

⑤ S. Uchida, A. Kubo, R. Kizu, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka, and **K. Yamashita**: Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affects the efficiency of 14-3-3 binding. *J. Biochem. (Tokyo)*, 139, 761-769 (2006)

⑥ M. Matsumoto, K. Yagimura, A. Igarashi, M. Imura, M. Hasegawa, K. Iwabuchi, T. Date, T. Mori, K. Ishizaki, **K. Yamashita**, M. Inobe, and T. Matsunaga: *J. Cell Sci.*, 120, 1104-1112 (2007)

2. 学会発表

① S. Uchida, A. Kubo and **K. Yamashita**: Contribution of 14-3-3 binding in Cdc25B subcellular localization. The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop (奈良 2004. 4)

② S. Uchida, A. Kubo, R. Kizu and **K. Yamashita**: Regulation of subcellular localization of CDC25B. Cancer Research UK Beatson International Conference" (Glasgow, UK 2004. 6)

③ 内田早苗, 久保暁嗣, 松永司, 木津良一, 石坂幸人, **山下克美**: 14-3-3 による CDC25B の細胞内局在制御. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004 10)

④ 大橋紗耶香, 金居正幸, 花井修次, **山下克美**, 田沼靖一, 浦野健, 古川鋼一, 三輪正直: ポリ ADP リボース分解酵素の細胞内局在と細胞周期への関与. 第 77 回日本生化学会大会 (横浜 2004 10)

⑤ 久保暁嗣, 内田早苗, 杉村勇人, 久保原禅, 松永司, **山下克美**: GSK-3 β の Cdc25A タンパク質量制御への関与. 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸 2004 12)

⑥ 内田早苗, 久保暁嗣, 木津良一, 松永司, 中釜斉, 石坂幸人, **山下克美**: CDC25B における 14-3-3 との結合に必要な部位の解析 (神戸 2004 12)

⑦ 松本恵, 五十嵐愛, 岩淵邦芳, 森俊雄, **山下克美**, 松永司: 紫外線照射による G0/G1 期特異的なヒストン H2AX リン酸化の解析. 第 64 回日本癌学会学術総会. 2005. 9. 札幌

⑧ S. Uchida, R. Kizu, T. Matsunaga, and **K. Yamashita**: Regulation of human CDC25A and CDC25B by environmental stress. International Symposium on Ran and Cell Cycle. 2005. 10. Awaji, Japan.

⑨ A. Kubo, S. Uchida, T. Matsunaga, and **K. Yamashita**: Effects of Lithium on cell cycle progression. 第 78 回日本生化学会大会. 2005. 10. 神戸

⑩ 内田早苗, 久保暁嗣, 中釜斉, 松永司, 石坂幸人, **山下克美**: Ser309 のリン酸化を介した CDC25B の細胞内局在制御. 第 28 回日本分子生物学会年会 2005. 12. 福岡

⑪ 松本恵, 柳沼希依, 五十嵐愛, 岩淵邦芳, 森俊雄, **山下克美**, 松永司: ヌクレオチド除去修復に依存した新規ヒストン H2AX リン酸化経路. 第 28 回日本分子生物学会年会 2005. 12. 福岡

⑫ S. Uchida, H. Nakagama, T. Matsunaga, Y. Ishizaka and **K. Yamashita**: Non-genotoxic, but not genotoxic, stress induces the cytoplasmic localization of CDC25B. 20th IUBMB (京都, 2006. 6)

⑬ ストレス応答性 MAP キナーゼ経路による CDC25B の制御: 内田早苗, 善岡克次, 中釜斉, 松永司,

石坂幸人, 山下克美. 日本分子生物学会 2006 フォーラム (名古屋 2006. 12)

⑭ K. Yamashita, S. Uchida, and T. Matsunaga: Non-genotoxic Stress Targets Cdc25A and Cdc25B for Degradation by Activation of p38MAP Kinase/MK2 and JNK. 2nd International Workshop on Cell Regulations in Divisions and Arrest (沖縄, 2007. 3)

⑮内田早苗, 松永司, 山下克美: ストレス応答性 MAP キナーゼによる細胞周期制御因子, CDC25A と CDC25B の分解誘発 (津 2007. 3)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他