

1. 論文発表
  1. Kawai Y, Aoki I, Umeda M, Higuchi T, Kershaw J, Higuchi M, Silva AC, Tanaka C. In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2010 Feb 15;49(4):3122-31.
  2. Inoue Y, Aoki I, Mori Y, Kawai Y, Ebisu T, Osaka Y, Houru T, Mineura K, Higuchi T, Tanaka C. Detection of necrotic neural response in super-acute cerebral ischemia using activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI, NMR in Biomedicine. 2010 Apr;23(3):304-12.
  3. Aung W, Hasegawa S, Koshikawa M, Obata T, Ikehira, Furukawa T, Aoki I, Saga T. Visualization of in vivo electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging. *Gene Therapy* 2009 Jul;16(7):830-9. Epub 2009 May 21.
  4. Matsumoto K, Nagata K, Yamamoto H, Anzai K, Aoki I. Visualization of Free Radical Reactions in a Aqueous Sample Irradiated by 290 MeV Carbon Beam. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2009 May;61(5):1033-9.
  5. Sawada K, Sun XZ, Fukunishi K, Kashima M, Sakata-Haga H, Tokado H, Aoki I, Fukui Y. Developments of sulcal pattern and subcortical structures of the forebrain in cynomolgus monkey fetuses: 7-tesla magnetic resonance imaging provides high reproducibility of gross structural changes. *Brain Struct Funct*. 2009 Feb 12.
  6. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl Radicals for Labeling of Conventional Therapeutics and Non-Invasive Magnetic Resonance Imaging of Their Permeability for Blood-Brain Barrier: Relationship between Structure, Blood Clearance, and MRI Signal Dynamic in the Brain. *Molecular Pharmaceutics*. 2009 Mar-Apr;6(2):504-12.
  7. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl radicals as low toxic spin-labels for non-invasive magnetic resonance imaging of blood-brain barrier permeability for conventional therapeutics. *Chem Commun (Camb)*. 2009 Jan 7;(1):53-5. Epub 2008 Nov 13.
2. 学会発表
  1. Multimodal Thermo-Sensitive Polymer-Modified Liposome for Visualization and Treatment of Disseminated Cancer. Daisuke Kokuryo, Hiroyuki Yoshida, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17: 894.
  2. Quantitative Assessment of Prenatal X-Ray Exposure Using Longitudinal Gadolinium-, Manganese-Enhanced and Perfusion MRI in Neonatal Rats. Shigeyoshi Saito, Kazuhiko Sawada, Xue-Zhi Sun, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17: 1261.
  3. Evaluation of Hippocampal Degeneration After Prenatal Radiation Exposure Using Manganese-Enhanced MRI (MEMRI). Shigeyoshi Saito, Xue-Zhi Sun, Kazuhiko Sawada, Tetsuya Suhara, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17: 1292.
  4. Signal Source in Heavily Diffusion-Weighted Functional MRI. Daigo Kuroiwa, Hiroshi Kawaguchi, Jeff Kershaw, Atsumichi Tachibana, Joonas Autio, Masaya Hirano, Ichio Aoki, Iwao Kanno, Takayuki Obata. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17: 1571.
  5. Diffusion-Weighted TE-Dependent FMRI Signal in Rat Somatosensory Cortex at 7 T. Joonas Arttu Autio, Jeff Kershaw, Takayuki Obata, Sayaka Shibata, Daigo Kuroiwa, Iwao Kanno, Ichio Aoki. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2009; 17: 1572.
  6. Daisuke Kokuryo, Seiji Nakashima, Kenji Kono, Iwao Kanno, Ichio Aoki. Visualization of Drug Accumulation and Release in a Disseminated Mouse Tumor Model using Multimodal Thermo-sensitive Polymer-modified Liposome. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009
  7. Daisuke Kokuryo, Yuichi Kimura, Takayuki Obata, Taiga Yamaya, Hiroo Ikehira, Ichio Aoki, Iwao Kanno. Bridge Capsule: Holding Fixture to Improve Reproducibility and Registration During Longitudinal Multimodal Imaging. 2009 World Molecular Imaging Congress, 697, Montreal, Canada, 23-26 September 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況
  1. 特許取得 無
  2. 実用新案登録 無
  3. 出願 無

「単クローン抗体の作成とその臨床的有用性の検定」に関する研究

分担研究者 濱田洋文 札幌医科大学 分子医学研究部門

**研究要旨** 継続して、温感性リポソーム複合体の腫瘍標的ピンポイント DDS 開発に必要な高性能標的化抗体 (STAAB: Super-targeting antibody) の作製をユニークなスクリーニング方法を用いている。特異的遺伝子導入のための標的の系統的探索を目的として、抗体の Fc ドメインに結合する Z33 モチーフを含むファイバー改変アデノウイルスを用いたスクリーニング法で樹立できる抗体は腫瘍細胞の細胞表面分子に対して高結合能・特異性を有することがこれまでの研究成果より明らかになっており、各種のヒト膵臓がん細胞 (PK-1, AsPC1) 等を免疫原として標的化抗体を作製してきた。これまでに膵臓がんを選択的に反応する抗体 S11 の認識抗原として新規膵臓がん抗原 PAP2a の同定に成功し本プロジェクトへの共同研究を展開している。さらに多くの種類のがん組織で強反応性を示す抗体の樹立および認識抗原同定まで成功した。これら得られた抗体の中にはラットに反応性のある抗体が含まれており、動物実験系への展開が可能となった。また、新しく開発した EZiTox 系を用いて、イミュノトキシン (iTox) 治療にとって格段に効果の高い標的分子の探索系を確立し、抗体スクリーニングを開始することができた。

A. 研究目的

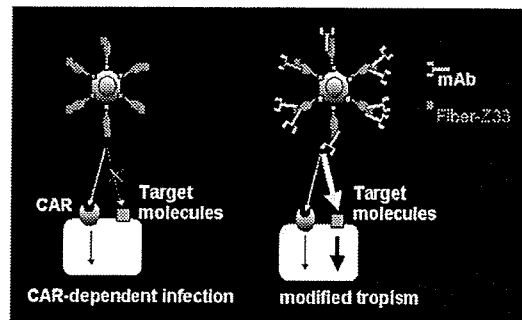
本研究は、膵臓がんに対する新しい標的抗原同定とその抗体を作製し、これを高磁場 MRI 検出システムのプロブへ応用することで効果の高い診断法・治療法を開発する事を目的とする。私たちが開発した Adv-FZ33 と膵臓がん細胞株に対する抗体のライブラリーと組み合わせたスクリーニング法は従来腫瘍マーカー探索 (マイクロアレイ解析、プロテオミクス解析など) と異なり抗原同定と同時に細胞表面を認識する高性能な抗体を得ることが効率よく出来、抗原同定から診断などへの応用に迅速に利用できる。また得られた抗体にはラットへの反応性を持つ抗体も含まれており、これらの抗体はラット膵臓がんモデルを用いて検討することが出来る。

B. 研究方法

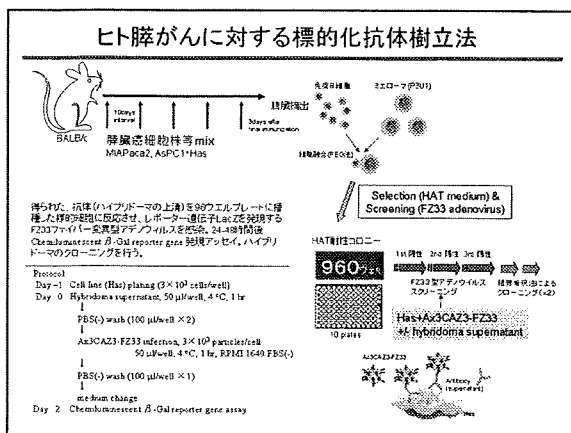
a. アデノウイルス (Adv-FZ33) 標的化による膵臓がん標的分子の系統的探索  
膵臓がんをはじめとする難治がんの治療法の開発にとって「選択的な治療薬剤の導入」の戦略を編み出すことが鍵である。私たちは、腫瘍の標的化に好適な表面抗原はどのような分子か? という疑問に答えることを目指して、ヒト膵臓がん (膵臓がん・前立腺がん等) の標的化抗体のスクリーニング法として従来の蛍光抗体法 (FACS) や ELISA 法よりも高感度かつ高性能抗体を選別しやすい手法を用いた。アデノウイルスベクターのファイバー部に IgG の Fc 結合

Z33 モチーフ (FNMQQRRFYALHDPNLNNEEQRNAKIKSIRDD) を含むファイバー変異型アデノウイルス Adv-FZ33 を作製した。このファイバー-Z33 変異型アデノウイルスは細胞表面抗原に対して抗体依存的に感染することが可能で、従来の蛍光抗体法や ELISA 法よりも抗体の性能の差異を明確に判定することができる。

抗体を介した細胞への遺伝子導入発現量を測定し、高い標的化能をもつ抗体を選別する。下の図はその概念図である。



標的化抗体依存的にがん細胞に遺伝子導入効率を高めることができる抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリー (免疫細胞としてヒト膵臓がん細胞株 PK-1, AsPC1, KCI-MOH1 を使用) をスクリーニングした。Adv-FZ33 で陽性ウェルをスクリーニング後、限界希釈法によりモノクローナル抗体を多数樹立した。



b. 膵がんを標的化できる新規 iTox 抗体の樹立と標的化ターゲットの同定：

EZiTox 系を用いて、免疫ノトキシン治療にとって格段に効果の高い標的抗原・抗体の組み合わせを探索樹立し、臨床医薬への実用化を目指すこととした。具体的には以下のように進めた。

**概要** 1) 注目する膵がん細胞でマウスを免疫し、腫瘍に対するモノクローン抗体のライブラリーを作製する。 2) EZiTox 系でのスクリーニング： 抗体の Fc に結合する Protein G の C ドメイン三個 (3C) を含むジフテリアトキシン (DT) 融合タンパク (DT3C) を用いて、抗体とトキシンとを簡便に架橋する (EZiTox 法)。これを用いてトキシンによる細胞毒性が特段に高い抗体を選別する。 3) 免疫沈降・質量分析により、抗体で認識される抗原分子の同定をおこなう。 4) 腫瘍細胞に対して選択的治療効果が期待できる標的化分子候補に関して、実用化に必要な解析を進める。

**詳細は以下の 1) から 4) のようである**

1) ライブラリーの作製： ヒト膵がん細胞で Balb/c マウスを免疫し、P3U1 ミエローマ細胞と免疫マウスの脾細胞とを PEG 法により細胞融合させ、ハイブリドーマ・ライブラリーを作製する。マウス 10 匹、ハイブリドーマとして 50000 クローンのスクリーニングを行う予定で進めている。

2) スクリーニングとハイブリドーマ・クローンの樹立： 抗体の Fc ドメインに結合する Protein G の C ドメインをタンデムに 3 個 (3C) とジフテリアトキシン (DT) のカタリティックドメインとの融合リコンビナントタンパク DT3C を用いて、抗体とトキシンとを簡便に架橋することによって、トキシンによる細胞毒性

が特段に高い抗体をスクリーニングする。方法：抗体 (ハイブリドーマの上清) と DT3C リコンビナントタンパクとの混合物を 4°C で 30 分間反応させ、標的細胞に振りかける。24-48 時間後に、WST1 細胞増殖アッセイを行い評価する。陽性コントロール (抗 CD71 トランスフェリン受容体抗体) に比べて特段に細胞傷害効率が高まっているクローンを選別する。限界希釈クローニングを、最低 2 回以上行う。私たちのこれまでのスクリーニングの経験からは、通常、スクリーニングに供した全クローンの 0.5% 程度のクローンが、iTox 細胞傷害活性を抗 CD71 抗体と同等程度高める抗体を産生するハイブリドーマ・クローンとして樹立される。

3) 抗体で認識されるターゲット抗原の決定：

i) 得られた抗体が、どのような細胞と反応するか、フローサイトメトリー FACS で解析する。 ii) 標的細胞を用いて、免疫沈降実験を行う。まず、 $10^7$  個程度の少量の細胞を用いて、生細胞表面をビオチンラベルする。可溶化剤で溶かし、各抗体と反応させてから免疫沈降する。沈降物を SDS-PAGE で分離し、Avidin-antiavidin HRP、HRP の基質を用いて発色させ、抗原の分子量を決定する。 iii) 大量 ( $10^8$  個程度) の細胞を用いて免疫沈降し、切り出した抗原バンドを質量分析に供し、データベース検索により抗原タンパクを同定する。 iv) 質量分析の情報に基づいて、該当する cDNA を発現ベクターに組み込んで 293T 細胞や CHO 細胞に強制発現させ、あるいは siRNA を用いて膵がん細胞での発現を抑制し、FACS 解析を行い、当該抗体と抗原の反応性を確認する。

4) 抗体・抗原に関する基礎的な解析を行う。EZiTox による細胞傷害： 得られた抗体は、特徴的なスクリーニング・アッセイの方法で選別されてきているため、すべて、当該膵がん細胞に対する iTox 細胞傷害活性が特段に高い抗体である。標的抗原分子を発現する他の腫瘍細胞に対しても、iTox 細胞傷害活性をはじめ、基礎的な検討を行なう予定である。

### C. 研究成果

a. ヒト膵がん細胞に対する遺伝子導入効率を高める抗体産生ハイブリドーマ・ライブラリー・スクリーニング

昨年度に引き続き今年度も膵がん細胞を始めとして多くの固形がん細胞を標的化できるモノクローナル抗体の樹立に成功した。

すなわち、ヒト膵がんなどに対し計 600 種の高効率標的化抗体を樹立し、現在までに約 60 種の抗原を同定できた。

Efficient gene transfer via target molecules: A list of representatives ...	
<b>Tumor-targeting markers</b> •CD20 (B cell antigen) •EGFR (Epidermal growth factor receptor) •IGF1R •CD44 •EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) •TROP2 •EphA2 •L1CAM •CEACAMs (Carcinoembryonic antigens) •MCSP (Mesothelin chondroitin sulfate proteoglycan) •CD146 (Melanoma cell adhesion molecule) •CD228 (Melanotransferrin) •PSMA (Prostate specific membrane antigen) •CD10 (CALLA) •CD71 (Transferrin receptor) •CD109 (ALX) •CD99 (MUC2) •CD147 (MAM6P#) •CA12 (Carbonic anhydrase #1) •CD276 (ST-115) •PAP2a (Pancreatic and cholecystic 2a) •IL13Ra2 (IL13 receptor 2)	<b>General markers</b> <b>Viral receptors</b> •CD9 •CD13 •CD46 •CD54 •CD55 •CD58 •CD155 •SCAR31 •CEACAMs <b>Adhesion molecules</b> •Integrin α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> •CD32 •CD62 <b>Transporters</b> •CD88 •CD289 (Na <sup>+</sup> ATPase b3)

結果のまとめを表に示す。その中には、十数種の既知のウイルス受容体 (CD9、CD13、CD46、CD54、CD155、MHC class I & II、各種 CAM・インテグリンなど) があつた。ほかに、EGFR や CD20 などすでに抗体医薬として腫瘍の標的治療に用いられているもの、あるいは CD44、CD71、CA12、EpCAM、MCSP、CD146、CD228、PSMA、CEA など腫瘍標的治療の候補分子として注目され臨床開発途上のものが、高い比率で含まれており、当方法は強力な標的分子スクリーニング手段となることがわかつた。この方法では、極めて高いアフィニティなど、標的化治療に必要な資質を併せ持つ標的抗原と抗体をセットで同定樹立できることが、大きなアドバンテージである。得られた標的化抗原 (PAP2a、IL13Ra2) による新しい診断治療法の特許 2 件など、順調に成果を挙げてきた。また、当研究で得られた抗体に関して、国内の製薬企業 2 社とがん治療抗体医薬としての共同開発研究 2 件を進めている。

#### b. イミュノトキシン標的の新しい探索法

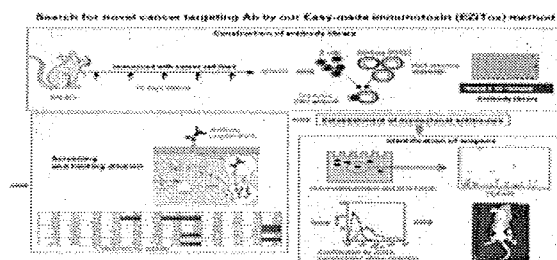
新しい治療用抗体を探索する場合には、できるだけ目的 (私たちの場合は標的化) をシミュレートしたスクリーニング法を採用すれば、実用化の可能性が高い抗体を見つける近道が得られる。たとえば、抗体医薬として毒素を結合した抗体を開発したいならば、毒素結合抗体のライブラリーを作製し、対象となる細胞に対する毒性の活性で抗体のスクリーニングを行うことが、最短の道になる。

このような方針の具現化を目指し、私たちは、標的化抗体にタンパク合成阻害毒素を結合さ

せたイミュノトキシン (iTox) を簡便に作製できる方法 (イーザーメイドイミュノトキシン、EZiTox) を樹立した。プロテイン G 由来の抗体結合 C ドメインを持つジフテリアトキシン DT3C を大腸菌で作製し、これ (DT3C) を用いて細胞毒性効果を指標に好適な抗体を選別する方法である。

この系を用いて細胞傷害活性を調べた今までの予備実験の結果から、1) アデノウイルス感染の標的化に高効率な標的であっても、その中のごく一部の標的だけが iTox として有効であること、2) さらにその標的抗原に対する抗体のうちでも一部のエリート抗体のみが iTox 活性を呈すること、すなわち、高いアフィニティに加え、好適なエピトープ特性をもつことが iTox 活性に必須であること、を見いだした。

このような経緯から私たちは、独自の新規標的探索法 EZiTox を用いた直接的な抗体スクリーニングの系での高性能の抗体を作製し、膵がんを初めとする難治がんに対する効果の高い iTox 治療法樹立を目指すことを開始した。下の図はその手順の概念図である。



#### D. 考察

##### a. ファイバー Z33 型アデノウイルスを用いたスクリーニング系

このシステムを用いて難治性がんである膵臓がん・前立腺がんに対する抗体を数種類樹立し、認識抗原を明らかにしてきた。今までに樹立した抗 CD276 抗体 (5 個) と抗 EphA2 抗体 (5 個) は多くの癌で高発現しており、代表的な膵がん細胞株 8 種においてすべて発現が見られた。また、得られた抗体の中でラットに反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることから、抗体を投与した場合の副作用などの影響や、分子イメージングへの適応を考慮し、担癌ラットモデルでの抗体の集積性や抗腫瘍効果を解析、さらに温感性リポソームへの結合を行い、より特異性・集積性そして診断・治療効果の高いピンポイント DDS の開発を目指すことが可能となった。

b. 独自の新規標的探索法 EZiTox を用いた直接的な抗体スクリーニングの系

膵がんを初めとする難治がんに対する効果の高い iTox 治療法樹立を目指して実験を進めている。当方法 EZiTox は、標的化治療をシミュレートした、iTox 作製に好適な抗体を得るための直接的なスクリーニング法であり、私たち独自開発のユニークな系である。ここで得られた iTox 抗体は難治性膵がんの新しい抗体医薬候補として臨床応用へと歩を進めたい。

以前から iTox に関しては国内外で多くの研究が重ねられているが、標的抗原は iTox に適しているという直接的な実験証拠から選ばれた分子ではない。また、多くの抗体は ELISA など別の選別法で得られたものが流用されている。このため、臨床に使える優れた iTox 活性の得られるものは稀である。これに対して EZiTox 法は、iTox 作製に好適な抗体を得るための直接的な選別法であり、特に優れた標的抗原・抗体をセットで選ぶことができるユニークな系である。

今後は、新規の標的化抗体のスクリーニングと抗原同定に集中して実験を行う予定である。得られる抗体はすべて、陽性コントロールとして用いるトランスフェリン受容体 (CD71) と同等ないしはるかに高い効率の iTox 標的として、iTox 標的治療に使うことのできる候補分子である。このパネルの中から、腫瘍細胞に対して選択性が高いものを抽出し、実用化に必要な個別の解析を進めることとしたい。

#### E. 結論

膵がんを始めとした難治性腺がんに対する高性能標的化抗体の樹立に成功した。標的抗原としては、膵がんを含む腺がんで高発現している CD276 (B7-H3) と EphA2 などである。各抗原でラットがん細胞との交差反応性を示すモノクローナル抗体が含まれていることがわかった。これらの抗体を使用して、ラット膵がんモデルなど *in vivo* での検討を進めることが可能であり、本研究の最終目標である感温性リポソームの生体内標的化にこれらの抗体が応用できるかを検討中である。さらに、新しく開発した EZiTox 系を用いて、イミュノトキシン (iTox) 治療にとって格段に効果の高い標的分子の探索系を確立し、抗体スクリーニングを開始することができた。

より感受性の高いプローブの作製へつなげる予定である。

F. 健康危険情報 ファイバー改変アデノウイルスベクターを本研究で用いているが、使用・管理とも指定の施設内で行い、汚染・持ち出し等の問題もなく、順調に研究が施行できている。またヒト手術材料を用いる臨床研究に関しては、倫理面に配慮した実施計画書・説明同意書などを作製し、すでに、札幌医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会ですべて許可を受けている。研究課題「新規標的化抗体による癌の診断・治療法の開発」、許可番号第 217-3 号、平成 18 年 2 月 10 日付け。以上のように健康危機情報としては特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, Seo E, Wakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo I, Yokoyama KK. E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer. *Cancer Gene Ther.*, 16 (2): 126-136, 2009.
2. Toyama K, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Jeffery D. Kocsis. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 216(1): 47-55, 2009.
3. Ono I, Akasaka Y, Kamiya T, Sato M, Kobune M, Hamada H, Yamashita T. De novo follicular regeneration of the skin by wingless int 3 and bone morphogenetic protein 2 genes introduced into dermal fibroblasts and fibroblast growth factor-2 protein. *Wound Rep. Reg.*, 17: 436-446, 2009.
4. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Hamada H, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an *in vitro* expansion system. *ASAIO J.*, 55(3): 200-205,

- 2009.
5. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol.*, 83(11): 5918-5927, 2009.
  6. Huang J, Inoue M, Hasegawa M, Tomihara K, Tanaka T, Chen J, Hamada H. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease. *Angiogenesis*, 12 (3):243-249, 2009.
  7. Katsu M, Koyama H, Maekawa H, Kurihara H, Uchida H, Hamada H. Ex vivo gene delivery of ephrin-B2 induces development of functional collateral vessels in a rabbit model of hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.*, 49(1): 192-198, 2009.
  8. Kojima Y, Honda K, Hamada H, Kobayashi N. Oncolytic gene therapy combined with double suicide genes for human bile duct cancer in nude mouse models. *J. Surg. Res.*, 157(1):e63-e70, 2009.
  9. Sasaki K, Kogure K, Chaki S, Nakamura Y, Moriguchi R, Hamada H, Danev R, Nagayama K, Futaki S, Harashima H. An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal Bioanal Chem.*, 391(8): 2717-2727, 2009.

出願番号：特願2007□147478  
 発明の名称：IL□13Ra2に対する抗体およびこれを含む診断・治療薬  
 発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則  
 出願日：2007. 6. 1

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

公開番号：W02006/123829

国際出願番号：PCT/JP2006/310406

発明の名称：PAP2a に対する抗体ならびにその診断的および治療的応用

発明者：濱田洋文、加藤和則、中村公則

出願日：2006. 5. 17

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. 出願

膵臓がん発がんモデルの作成と MRI 画像診断

分担研究者 中釜 斉 国立がんセンター研究所 早期がん研究プロジェクト

研究要旨 新規の膵臓がん特異的な治療及び診断のための標的分子を探索する目的で、ヒト膵臓がん細胞株を用いて腫瘍抑制的な機能を有する miRNA の網羅的な機能スクリーニングを行った。膵臓がん細胞株に、レンチウイルスの miRNA ライブラリーを感染させた後に継代培養させ、細胞増殖に抑制的作用を有する複数の miRNA を同定した。同定した miRNA の標的遺伝子を同定し、BOP 誘発ハムスター膵臓がんモデルや、変異型 K-ras Tg ラットモデルで誘発される膵臓微小病変や膵がん組織を用いた免疫組織学的な解析により、膵臓がんの早期診断及び治療標的に資する分子を同定する予定である。

A. 研究目的

発がん要因への曝露から膵臓がん発生に至るまでの多段階的な進展過程が病理学的にも詳細に解析されているハムスター及びラットの膵臓がんモデルを用いて、膵がん早期微小病変の分子イメージングによる非侵襲的な診断法や治療システムを構築することを目的とする。膵臓がん特異的な単クローン抗体を磁性体ナノ粒子と結合させ、MRI による膵臓がん微小病変の検出を *N*-nitrosobis-(2-oxopropyl) amine (BOP) 誘発ハムスター膵がんや変異型 K-ras 遺伝子のトランスジェニック (Tg) ラットの自然発生膵臓がんを用いて検証する。

本研究では、より特異性の高い膵臓がんの新規標的分子を同定するため 2 つの手法を試みる。その一つは、ヒト膵臓がん細胞株を用いて、レンチウイルスの miRNA ライブラリーを感染させた後に継代培養させ、細胞増殖に抑制的作用を有する複数の miRNA を同定し、その標的となる mRNA を探索する方法をとった。二つ目は、変異型 K-ras Tg ラットの自然発生膵がんモデルを用いて、mRNA 及び miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行い、膵臓がん中で特異的に発現が亢進或いは低下する mRNA や miRNA を探索する。さらに、同定した新規膵臓がんの新規標的分子に関して、動物モデルを用いて膵がん微小病変や膵がん組織における発現を解析する。

B. 研究方法

a. ヒト膵臓がん細胞株を用いた腫瘍抑制的 miRNA の機能的スクリーニング

ヒト膵臓がん細胞株 (MIA PaCa-2) に、約 450 種の microRNA のレンチウイルスライブラリーを MOI  $\square$  3 程度で感染させ (P0)、その後、約 3 日毎に細胞の 1/8 を用いた継代培養を連続的に行った (P0-P9)。各々の継代において回収した細胞より DNA を抽出し、P5 vs P0 或いは P9 vs P5 の comparative genomic

hybridization (CGH) 解析を行い、P5 或いは P9 の細胞においてコピー数が減少している腫瘍抑制的な機能を有する microRNA の探索を行った。再現性良く同定できた腫瘍抑制的な microRNA に関しては、MIA PaCa-2 細胞に当該 microRNA のレンチウイルスベクター或いは合成された成熟 miRNA 分子を一過性に導入することにより、増殖抑制効果の有無を検証した。

C. 研究成果

P9 vs P0 の比較において、P9 の細胞でコピー数が 1/10 程度或いはそれ以下に再現性良く減少している microRNA の上位 5 位の microRNA として、miR-532, miR-224, miR-29b, miR-34a, miR-222 を同定した。P5 vs P0 の比較でも同様の結果であった。MIA PaCa-2 膵臓がん細胞株にこれら microRNA のレンチウイルスベクターを感染させると、コントロール microRNA に比較して 70-90% の増殖抑制効果を示すことが分かった。MTT アッセイによる解析では、miR-29b 以外の 4 種の microRNA (miR-532, miR-224, miR-34a, miR-222) ではほぼ完璧に増殖が抑制された。miR-29b のレンチウイルスベクターの感染では、約 50-60% の増殖抑制が認められた。合成した成熟型 microRNA のトランスフェクションでも同様な増殖抑制効果を示した。FACS 解析では、miR-34a, miR-224, miR-532 の感染細胞では G1 arrest が誘導され、miR-222 では G2/M arrest が誘導されることが分かった。一方、miR-29b では細胞周期の各分画の顕著な変化は認められなかった。何れの 5 種類の microRNA でも細胞死 (sub-G1 分画) の誘導は認められなかった。これら 5 種類の標的遺伝子或いは標的となる分子経路について、現在解析を進めている。

D. 考察

腫瘍抑制的な機能を有する microRNA の網羅

的な機能スクリーニング法により今回同定された5つのmicroRNAのうち、miR-34aは以前の我々の研究成果により、p53依存的に発現誘導される腫瘍抑制的なmicroRNAとして同定されたものである。我々の開発した機能スクリーニング法の有用性を保証するものである。miR-34a以外にも、同様にG1 arrestを示す2種類のmicroRNAが同定された。さらに、本機能スクリーニング法の利点としては、増殖抑制に関わらずみならず、幹細胞における幹細胞維持機構に関わるmicroRNAの同定や転移の制御に関わるmicroRNAの同定など、がん細胞の様々な特性の維持・獲得に関わるmicroRNAの検索に適していることが示唆される。

今回同定した腫瘍抑制的なmicroRNAの標的遺伝子に関しては、現在解析を進めているところであるが、microRNAの配列との相同性から、miR-224, miR-532の標的候補としてはCDC42が、またmiR-222の標的候補としてはPAK-1が想定される。CDC42は、Rhoファミリーに属するsmall GTPaseの一つで、S6キナーゼの活性化によるcyclin Eの発現誘導を介したG1-S期の進行制御に関わっていることから、miR-224, miR-532がCDC42の翻訳抑制を介してG1 arrestの制御に関与していることが示唆される。

miR-222の標的候補の可能性のあるPAK1は、セリン・スレオニン蛋白質キナーゼでCDC42及びRhoのシグナル経路の下流にある分子である。胃がん細胞においてPAK1をノックダウンするとG2/M期停止を示す細胞分画が増加することから、miR-222がPAK1の翻訳抑制を介してG2 arrestを誘導していることが示唆される。

miR-29bによる細胞増殖抑制については、p85 $\alpha$ 及びCDC42の抑制を介したp53の発現亢進が示唆されているが、MIA PaCa細胞ではp53遺伝子に変異(R248W)していることから、p85 $\alpha$ 及びCDC42の発現抑制を介したp53非依存的な増殖抑制活性機構が示唆される。

## E. 結論

今回、我々が独自に開発したmicroRNAの機能スクリーニング法を用いて、ヒト膵臓がん細胞株MIA PaCa-2の増殖を顕著に抑制する腫瘍抑制的なmicroRNAを複数同定した。同定したmicroRNAの標的分子の探索は現在進められているが、細胞の接着・浸潤に関わるCDC42

(miR-224, miR-532の標的候補遺伝子)やPAK-1(miR-222の標的候補遺伝子)等がその候補としてリストされている。今後、変異型K-ras Tgラットの膵がんモデルを用いたmRNA及びmiRNAの網羅的遺伝子発現解析の結果と合わせて、より特異性の高い新規膵がん標的分子の同定とそのMRI画像診断への応用について検討を進める。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。  
特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus. *J Biol Chem*, 284:25585-25592, 2009.
2. Okamoto K, Taya Y, Nakagama H. Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, 583:2710-2714, 2009.

### 2. 学会発表

1. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによるmicroRNAの発現プロファイルの変化とその大腸発がんにおける意義、第24回発癌病理研究会 2009. 8. 25-8. 27
2. Fukuda H, Takamura T, Masuda Y, Kamiyama K, Ochiai M, Nakagama H：発がん物質PhIPに対する細胞応答及同付加体部位での損傷乗越えDNA修復の解析 DNA-damage checkpoint response to PhIP-exposure and translesion DNA synthesis at PhIP-dG, 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1-10. 3
3. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜 斉：Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and its significance in colon, 第68回日本癌学会学術総会 2009. 10. 1-10. 3



4. 落合雅子、五十嵐麻希、中釜斉：化学物質で誘発される細胞障害性ストレスによる microRNA の発現変動とその大腸発がんへの関与 Changes of microRNA expression by chemically-induced cellular stress and their relation to colon carcinogenesis, 第 38 回日本環境変異原学会 2009. 11. 26-11. 27

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. 出願

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

「GLP-1 受容体単クローン抗体の作成」に関する研究  
-癌化初期細胞のイメージングに向けた基盤研究-

分担研究者 山下克美 金沢大学医薬保健研究域 薬学系

**研究要旨** 多くの癌細胞において共通性の高い活性化パスウェイの一つである、PI3K-Akt-mTOR パスウェイを、バイオイメージングにより検出するシステムの構築を試みた。バイオイメージングは、二分子蛍光相補 (BiFC) 法を用い、分割された GFP の再会合は、mTORC1 の下流に存在する Pdc4 タンパク質の SCF<sup>βTrCP</sup> による分解反応のうちの、Pdc4 と βTrCP1 との相互作用により誘発される。すなわち、mTORC1 下流のキナーゼによりリン酸化された Pdc4 と βTrCP1 が相互作用することで、二分割 GFP が再会合し、緑色蛍光が検出される。このようなプローブが導入された細胞に TPA を処理したところ、プローブ導入細胞から蛍光が検出され、プローブの有効性が示された。

A. 研究目的

初期のがん病変においては、正常細胞では活性化されていない様々なパスウェイが存在する。遺伝子変異やエピジェネティックな修飾により、癌細胞特異的に活性化されたパスウェイを検出することは、癌微小病変を検出し診断や治療方針を決定する上で、非常に重要である。本研究では、多くの固形がん恒常的活性化が認められる、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路伝達系の活性亢進を検出できるプローブを作成し、初期のがん病変の診断と治療に貢献できるツールの開発を目指した。

B. 研究方法

シグナル伝達系の活性化の検出は、蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングを応用した。本研究では、蛍光タンパク質を二分割し励起光による応答を消失させた二分子蛍光相補 (Bi-molecular Fluorescence Complementation: BiFC) 法を応用した。本方法は、分割蛍光タンパク質断片が再会合することにより消失した蛍光が回復する性質を利用する。この再会合は、調べたい二つのタンパク質の相互作用によってもたらされるため、検討対象となる二つのタンパク質間に相互作用があれば、蛍光を検出できる方法である。

本研究においては、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路において mTOR の下流に位置する、CAP 依存性 mRNA の翻訳系制御因子間の相互作用を利

用した。即ち、非増殖状態では翻訳制御タンパク質である eIF4A と結合し、翻訳抑制活性を有する Pdc4 タンパク質が、増殖状態では、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化により、mTORC1 によりリン酸化を受け活性化された、リボソーム S6 キナーゼ (p70<sup>S6K</sup>) によりリン酸化され、ユビキチン化酵素 SCF<sup>βTrCP</sup> によりユビキチン化され分解される反応を適用した。この反応において、Pdc4 は p70<sup>S6K</sup> によるリン酸化依存的にユビキチン化因子である βTrCP タンパク質と相互作用する。これらのタンパク質と蛍光タンパク質 (本研究では緑色蛍光タンパク質 GFP) を二分割した断片を融合させた遺伝子を作成し、さらに二つの融合遺伝子を融合させ、細胞内で一つのタンパク質として発現される遺伝子をプローブとして作成した。

C. 研究成果

多くのがん細胞で PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化が報告されている。多くのヒト腫瘍由来の培養細胞においても PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路上の遺伝子の異常により本経路が活性化されているため、本研究で開発したプローブの有効性の検討は困難である。

そこで、発がんプロモーターの TPA に応答して Protein kinase C 依存的に PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化が起きることが報告されている、HEK293 細胞にプローブ遺伝子を導入し、TPA 処理により蛍光が観察されるか否かを検討した。

HEK293 細胞にプローブを形質導入し、24 時間後に 50nM の TPA を処理した。TPA 添加 24 時間後に蛍光顕微鏡下で細胞を観察したところ、プローブ導入細胞特異的に緑色蛍光が観察された。この緑色蛍光は、Protein kinase C 阻害剤である Bisindolylmaleimide I 添加により阻害されたことから、TPA 依存的な PI3 キナーゼ-Akt-mTORC1-p70<sup>R6K</sup> の活性化が抑制されたことが強く示唆された。

#### D. 考察

本研究により、Pdc4- $\beta$ TrCP1 相互作用を介した PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化をバイオイメージングにより検出できる可能性が示された。今後は、TPA および発がんプロモーション活性の異なる誘導体や類似作用をもつ化学物質を用いて応答性を検討する必要がある。さらに、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路上の遺伝子を siRNA や阻害剤で抑制した場合の応答性等についても、詳細に検討し、本プローブの有効性を validate する必要がある。

また、PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化が証明されている培養細胞を用いて、応答性を検討するとともに、腫瘍由来の初代培養細胞へのプローブの導入法などについて検討を行い、診断ツールとしての有効性を検討することが求められる。

#### E. 結論

多くの腫瘍組織で制御異常が報告されている PI3 キナーゼ-Akt-mTOR 経路の活性化を、バイオイメージングにより検出できる可能性がある遺伝子プローブを作成した。本プローブは、Pdc4- $\beta$ TrCP1 相互作用を利用するものであり、mTORC1 の活性化により翻訳抑制因子である Pdc4 タンパク質が $\beta$ TrCP1 を主要コンポーネントとするユビキチン化タンパク質によりユビキチン化される反応を応用したものである。今後は、今回開発されたプローブの有効性を多面的に検討し、実用化を目指す必要がある。

#### F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K, Ueno H, and Sagata N.: The extracellular signal-regulated kinase-

mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>-dependent degradation for cell cycle arrest. *Mol Biol Cell* 20: 2186-2195, 2009.  
2. Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, and Yamashita K.: Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res* 69: 6438-6444, 2009.  
3. Yamashita Y, Kasugai I, Sato, M Tanuma N, Yamashita K, Nomura M, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, and Shima H.: CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J Neuro-oncol*: in press.

##### 2. 学会発表

1. 内田早苗、渡辺信元、松永司、中釜斉、山下克美: Degradation of Cdc25B induced by cellular stresses. 第 82 回日本生化学会大会 10.21-24, 2009. 神戸.
2. 山下克美、内田早苗、松永司、落合雅子、中釜斉: 遺伝毒性・非遺伝毒性化学発がん物質のバイオイメージングによる検出. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜.
3. 松永司、山下克美、若杉光生: 癌細胞における DNA 損傷/複製ストレス後の Chk1 リン酸化の異常亢進. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜
4. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、善岡克次、松永司、中釜斉、山下克美: JNK 誘発性 SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> 依存的 Cdc25B ユビキチン化の分子機構. 第 68 回日本癌学会学術総会 10.1-3, 2009. 横浜.
5. 内田早苗、渡辺信元、工藤保誠、松永司、中釜斉、山下克美: Sequence requirement for degradation of Cdc25B by SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> in response to cellular stress. 第 32 回日本分子生物学会年会 12.9-12, 2009. 横浜.
6. 内田早苗、松永司、渡辺信元、中釜斉、山下克美: Cdc25B の分解制御機構: 上流 PEST 配列の寄与. 第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 11.13-14, 2009. 熊本.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. 出願 なし

膵管がんモデル動物による早期診断法の開発

分担研究者 津田洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野

**研究要旨** 膵管がんモデル動物を用いた評価法の確立を行う。Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras<sup>V12</sup> または Kras<sup>V12</sup> コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras301/327) において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AxCANCre) を膵管内に注入することによって、不活性状態で導入した変異 ras 遺伝子の発現を誘導し膵管がんを発生させた。発生した腫瘍より膵がん細胞株を樹立し、発光イメージングが可能ないように Luciferase 遺伝子を導入した。Luciferase 発現膵がん細胞を移植したヌードマウスで発光イメージングに成功した。今後、担がん状態の Hras250 または Kras301/327 ラットにおいて、*in vivo* の早期病変を検出する画像診断が可能となれば、本モデル動物は膵がんの早期診断・治療モデルとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

膵がんは早期発見が最も難しいがんのひとつであり、大部分の患者は症状を来してから受診するために進行がんの状態での診断され、すでに切除できない場合が多く、予後不良の難治がんである。外科的に切除できたとしても、がんが小さなうちから他の臓器に浸潤・転移している例が多いため、膵がんの克服には早期発見と早期治療が重要である。

本研究においては、膵管がんの臨床症状の発現より早期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期診断モデル」として応用を試みる。これまでにラットに化学物質によって膵管がんを発生させたモデルは確立されていなかった。我々は、Cre/loxP システムを用いた活性型 Hras<sup>V12</sup> または Kras<sup>V12</sup> コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras301/327) において、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を膵管内に注入することによって変異 ras 遺伝子を活性化させて膵管がんを高率に発生させる方法をラットで初めて確立した (図 1)。このモデルを用いて、治療後の 5 年生存率は 5% という最も予後の悪い膵管がんを、臨床症状の発現より早

期に診断できるシステムを確立し、ヒトの膵がんの「早期あるいは前臨床診断モデル」として応用を試みる。動物に変異 ras 遺伝子を膵管内で発現させて成熟動物に任意の時にがんを発生させ、早期膵がんのモデルとして血清、画像診断に用いる。まずは、Luciferase 遺伝子を導入したラット膵がん細胞株をヌードマウスに移植し、*in vivo* における発光イメージングを行い、*in vivo* での画像診断の可能性について検討する。この膵がんモデルにおいて我々は既に別の研究において血清診断マーカーを同定している。本研究において、*in vivo* で膵がんの画像診断が可能となれば、血清診断と併せて精度の高い早期診断法を確立できる。

B. 研究方法

a. ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を HEK293 細胞に感染させて、AdeX/Cre を増幅し精製した。精製した AdeX/Cre を、Hras250 または Kras327 トランスジェニックラットの総胆管から膵管内に注入 ( $4 \times 10^9$  ifu/ml, 150  $\mu$ l) することによって膵管がんを発生させた。

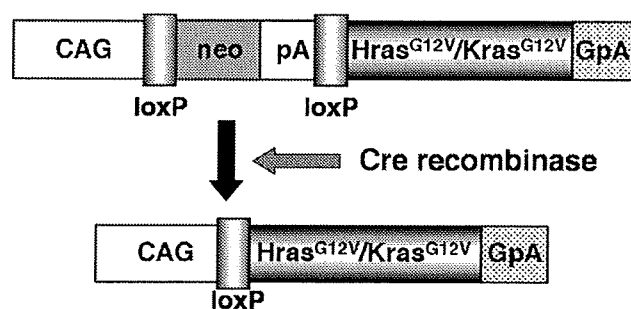


図1 活性型 Rasトランスジェニックラットの導入遺伝子

b. ラット膵癌細胞株 (634NOD) の樹立  
Hras250 ラットに発生した膵癌の腫瘍塊を 1-2 mm<sup>3</sup> 角に細切し、NOD-SCID に移植した。腫瘍形成が認められた腫瘍結節を摘出し、組織片培養法により *in vitro* での培養を行った。初代培養後、ゆっくりと増殖する細胞集団が認められ、継代後も安定して増殖することから細胞株の樹立が確認された。さらに、この細胞株を NOD-SCID に移植したところ腫瘍原性が認められた。

#### c. Luciferase 発現細胞の樹立

ホタル Luciferase 発現ベクターである pGL4 (Promega) をラット膵がん細胞株 (634NOD) に Fugene 6 (Roche) を用いて導入した。pGL4 にはあらかじめ Hygromycin 耐性遺伝子を挿入したので、Hygromycin を加えベクターが導入された細胞を選択した後、細胞のクローニングを行った。各クローンにおける Luciferase の活性を Luciferase assay system (Promega) を用いて測定し、Luciferase 安定発現株を樹立した。

#### d. In vivo イメージング

樹立した Luciferase 発現ラット膵がん細胞株をヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下に移植した。移植後、Luciferin を腹腔内投与 (150 mg/kg) し、超微弱発光・蛍光イメージングシステムである Night Owl (Berthold) を用いて移植腫瘍の可視化を行った。

### C. 研究成果

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルス (AdeX/Cre) を Hras250 または Kras301/327 ラットの膵管に注入することにより、種々の段階の膵管がんが、2~4 週間程度の短期間に発生した。このモデルにおける膵管がんは、病理学的解析により膵管、介在管および腺房中心細胞に由来することが示唆された。また、その組織像はヒト膵管がん極めて類似していた。

Hras250 ラットに発生した膵がんより樹立した膵がん細胞株 (634NOD) を NOD/SCID マウスに移植してできた腫瘍の組織像は、膵管細胞のマーカーである Cytokeratin19、Cytokeratin7 陽性であり、Hras250 ラットに発生した膵管がんとは形態学的に非常に類似しており膵管がん由来であると考えられた (図 2)。

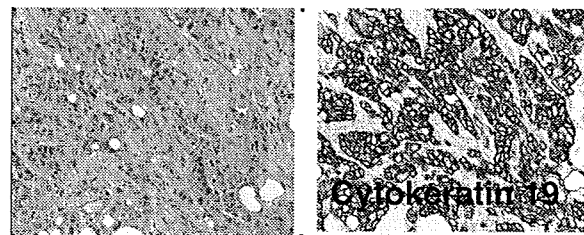


図 2 NOD/SCID マウスに移植された膵がん細胞株 (634NOD)

ラット膵がん細胞株 (634NOD) に Luciferase 発現ベクターを導入し、26 クローンを単離した。このうち、7 クローンで Luciferase 活性が認められた。Luciferase 活性がみられたクローンのうち最も高い Luciferase 活性を示すクローン (#4-21) を *in vivo* イメージングに用いた (図 3)。

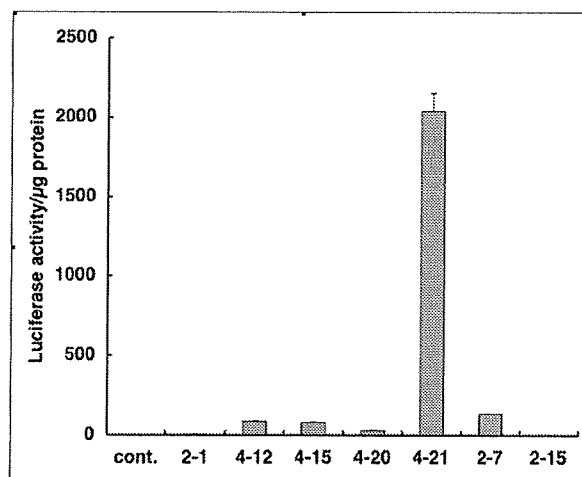


図 3 Luciferase 発現ラット膵がん細胞における Luciferase 活性

樹立した Luciferase 発現ラット膵がん細胞をヌードマウスに移植した。移植後、Luciferin を投与し腫瘍の発光イメージングを行った。その結果、Luciferase 発現膵がん細胞を移植したヌードマウスでは、移植直後からイメージングが可能となり、高感度に腫瘍細胞を検出可能となった (図 4)。

しかしながら、移植 1 週間後における腫瘍重量と発光量との明らかな相関はなく、定量性はみいだせなかった。また、我々の同定したラット膵がん血清診断マーカーである N-ERC は、移植ヌードマウスでは血清中に微量に検出されるのみで、腫瘍重量または発光量との相関はみら

れなかった。

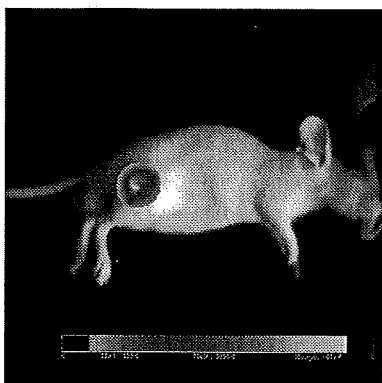


図 4 Luciferase 発現ラット膵がん細胞を移植したヌードマウスにおける腫瘍細胞のイメージング

#### D. 考察

我々の確立したラット膵がんモデルは、膵管由来の膵管がんを発生させることが可能である。ヒトの膵がんはほとんどが膵管由来の膵管がんであり、このモデルを用いればヒトに類似した膵管がんを 4 週間以内の短期間に発生させることが可能である。今回、Luciferase 発現ラット膵がん細胞株を皮下に移植したヌードマウスにおいて、発光イメージングにより腫瘍細胞を可視化することが可能となった。しかし、今回の条件では腫瘍重量と発光量との相関はなく、定量性を上げる工夫が必要である。また、移植モデルだけでなく、ラットに発生した腫瘍でのイメージングが可能か検討することが必要である。膵臓は腹腔内の検出し難い場所に位置するため、光または蛍光の透過度の問題があり、さらなる検出感度を上げる検討が必要である。この膵がんモデル動物を血清診断マーカーの解析と、初期病変の画像解析の開発研究に供し、新たな膵がんの早期診断法を確立することが、今後の課題である。また、このラット膵管がんモデルにおいて我々が同定した血清診断マーカーと画像診断とを併せて、早期膵がん病変を検出することが可能となることが期待される。

#### E. 結論

膵がん細胞のヌードマウスへの皮下移植モデルにおいて腫瘍の発光イメージングが可能で

あることが示された。活性型 Hras<sup>V12</sup> または Kras<sup>V12</sup> コンディショナルトランスジェニックラット (Hras250 または Kras327) においても画像診断が可能となれば、膵がんの早期診断・治療モデルとなり得る。また、Hras250 または Kras301/327 ラットは膵がんの画像診断の開発に有用なモデルである。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka, H., Tsuda, H., et al., Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. *Cancer Sci.*, 101: 341-346, 2010.
2. Fukamachi, K, Tsuda, H., et al., An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009.

##### 2. 学会発表

1. 峯本謙, 深町勝巳, 津田洋幸, 濱田洋文, 石坂幸人. Detection of pancreatic cancers by an in vivo imaging system. 68回日本癌学会総会 2009年10月.
2. 田中創始, 大嶋浩, 深町勝巳, アレキサンダー・デビッド, 二口充, 城卓志, 津田洋幸. Possible identification of cytogenesis of pancreas cancer and lung cancer in the rat. 68回日本癌学会総会 2009年10月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. 出願

発明の名称: ヒト変異型 K-ras (K-rasV12) 遺伝子をコンディショナルに発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物及びその用途

出願番号 特願 2007-243313

出願人: 名古屋市立大学

発明人: 津田洋幸、深町勝巳、デイビッド・ビー・アレキサンダー

出願日: 2007. 9. 20

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

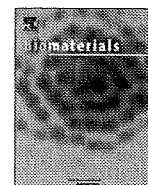
著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Eiji Yuba, Chie Kojima, Atsushi Harada, Tana, Shinobu Watarai, Kenji Kono	pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity.	Biomaterials	31	943-951	2010
Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Kenji Kono	Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes.	J. Control. Release			in press
Tanaka, H., Tsuda, H., et al.	Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats	Cancer Sci.	101	341-346	2010
Fukamachi, K, Tsuda, H., et al.	An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas	Biochem. Biophys. Res. Commun.	390	636-641	2009

Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RYC, and Yamashita K.:	Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation	Cancer Res	69	6438-6444	2009
Isoda M, Kanemori Y, Nakajo N, Uchida S, Yamashita K, Ueno H, and Sagata N	The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF <sup>b-TrCP</sup> -dependent degradation for cell cycle arrest.	Mol Biol Cell	20	2186-2195	2009
Fukuda K, Abei M, Ugai H, Kawashima R, seo E, Eakayama M, Murata T, Endo S, Hamada H, Hyodo H, and Yokoyama KK..	E1A, E1B double-restricted replicative adenovirus at low dose greatly augments tumor-specific suicide gene therapy for gallbladder cancer.	Cancer Gene Ther.	16	126-136	2009
Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, Kamiya K, Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F, Nakagama H	Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine (PhIP) <i>in vitro</i> : Rev1 inserts dC opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3' dC terminus	J Biol Chem	284	25585-25592	2009
Okamoto K, Taya Y, Nakagama H	Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase	FEBS Lett	583	2710-2714	2009
Aung W, Hasegawa S, Koshikawa M, Obata T, Ikehira, Furukawa T, Aoki I, Saga T.	Visualization of <i>in vivo</i> electroporation-mediated transgene expression in experimental tumors by optical and magnetic resonance imaging.	Gene Therapy	16	830-839	2009





## pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity

Eiji Yuba<sup>a</sup>, Chie Kojima<sup>b</sup>, Atsushi Harada<sup>a</sup>, Tana<sup>c</sup>, Shinobu Watarai<sup>c</sup>, Kenji Kono<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599 8531, Japan

<sup>b</sup> Nanoscience and Nanotechnology Research Center, Research Institutes for Twenty First Century, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599 8570, Japan

<sup>c</sup> Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-orai Kita, Izumisano, Osaka 598 8531, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2009

Accepted 2 October 2009

Available online 21 October 2009

#### Keywords:

Vaccine

Dendritic cell

pH-Sensitive polymer

Cytoplasmic delivery

Fusogenic liposome

### ABSTRACT

By modification of liposomes with poly(glycidol) derivatives such as succinylated poly(glycidol) and 3-methylglutarylated poly(glycidol), we have developed functional liposomes that generate fusion ability at mildly acidic pH. We investigated the feasibility of these polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for induction of cellular immunity. These pH-sensitive fusogenic liposomes encapsulating ovalbumin (OVA) were applied to DC2.4 cells, a murine dendritic cell line. Observation with confocal laser scanning microscopy showed that these polymer-modified liposomes were taken up efficiently by the cells, thereafter delivering their contents into the cytosol, probably through fusion with endosomal membranes. Murine bone marrow-derived dendritic cells treated with polymer-modified liposomes encapsulating OVA stimulated CD8-OVA1.3 cells more strongly than OT4H.1D5 cells, indicating that the liposomes induced MHC class I-restricted presentation. Furthermore, administration of the polymer-modified, OVA-loaded liposomes from nasal cavities of mice induced stronger cellular immune responses than the OVA-loaded plain liposomes. Because the ability of the polymer-modified liposomes to activate cellular immunity was comparable to that of Freund's complete adjuvant, which is a widely used adjuvant, they potentially have use in production of efficient vaccines for immunotherapy.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Efficient vaccination strategies have been desired for overcoming new pathogens and for evolution of resistance of microorganisms. In addition, efficient vaccine delivery systems have been required for achievement of cancer immunotherapy. Dendritic cells (DCs) are known as potent professional antigen presenting cells; they play a crucial role in innate and adaptive immune responses [1–3]. The DCs recognize, take up, process, and present antigens to native and resting T cells for induction of an antigen-specific immune response. Antigenic proteins internalized *via* endocytosis are degraded to peptide fragments. These peptides are presented by binding to major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, which mainly activate CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, thereby inducing humoral immunity. On the other hand, antigenic proteins introduced into cytosol of DCs are degraded by proteasomes after ubiquitination. These fragmented peptides are presented by MHC class I molecules on the surface of DCs. They mainly activate CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to

induce cellular immunity. To attain efficient target-specific immunity, induction of the antigen-specific CTLs is important because they eliminate the infected cells and pathogens directly. Therefore, carrier systems that can introduce antigenic proteins efficiently into the cytosol of DCs are necessary to establish effective immunotherapy.

Numerous attempts have been undertaken to achieve delivery of antigens into the DC's cytosol. For example, Akagi et al. reported that nanoparticles of  $\gamma$ -poly(glutamic acid) introduced entrapped antigenic ovalbumin (OVA) into cytosol of DC and induced antigen-specific CTLs [4,5]. In addition, Fréchet and coworkers showed that acid-degradable, acrylamide-based nanoparticles achieved cytosolic delivery of OVA and presentation of OVA-derived peptides *via* the MHC class I pathway [6]. These nanoparticles might be taken up by DC *via* endocytosis and enhance transfer of their encapsulated antigen molecules from endosome and/or lysosome to cytosol by destabilization of the membranes of these acidic compartments through hydrophobic or electrostatic interactions [5,6].

One of the most effective strategies for efficient introduction of antigenic proteins into cytosol of DC might be to use membrane fusion especially for membrane-based nanoparticles, such as liposomes. To date, viral fusion proteins have been used frequently to provide liposomes with fusion ability [7,8]. Indeed, viral fusion

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 722 54 9330.

E-mail address: [kono@chem.osakafu-u.ac.jp](mailto:kono@chem.osakafu-u.ac.jp) (K. Kono).

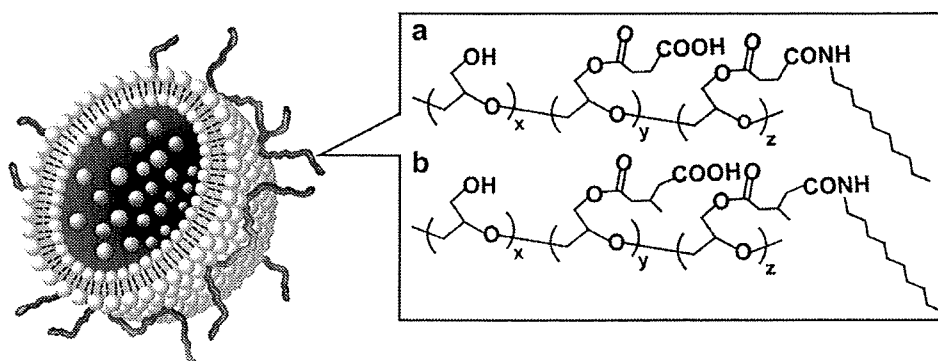


Fig. 1. Structures of SucPG (a), MGLuPG (b) and pH-sensitive polymer-modified liposome.

protein-incorporated liposomes have been used to introduce encapsulated antigenic OVA into DC's cytosol and induced efficient cellular immunity [7,8]. However, viral proteins might provoke unexpected immune responses. Therefore, the use of synthetic carriers might be preferred for the delivery of antigens into DCs.

We have developed pH-sensitive liposomes, which generate fusion ability under weakly acidic conditions, by surface modification of egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) liposomes with poly(glycidol) derivatives having carboxyl groups (Fig. 1) [9,10]. In fact, these polymer-modified liposomes delivered a membrane-impermeable fluorescent dye, calcein, into cytosol of HeLa cells after internalization via endocytosis and subsequent fusion with membrane of endosome or lysosome [9,10]. Especially, 3-methylglutaryl poly(glycidol) (MGLuPG), which has hydrophobic side chains, exhibited higher fusion ability than succinylated poly(glycidol) (SucPG) [10].

Considering the excellent performance of these polymer-modified liposomes as a cytoplasmic delivery vehicle, we attempted to apply these liposomes to the production of potent vaccines, which deliver antigenic proteins into cytosol of DCs and activate cellular immune response through their administration via nasal mucosa, which affords some advantages, such as noninvasive needle-free administration and induction of both mucosal and systemic immune responses [11–14]. Correlation of fusogenic properties of the liposomes with their ability to activate cellular immunity was described.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

EYPC and  $\alpha$ -dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) were kindly donated by NOF Co. (Tokyo, Japan). N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)dioleoyl phosphatidylethanolamine (NBD-PE) and lissamine rhodamine B-sulfonyl phosphatidylethanolamine (Rh-PE) were purchased from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). Monophosphoryl lipid A (MPL), Freund's complete adjuvant (CFA) and OVA were purchased from Sigma (St. Louis, MO.). SucPG and MGLuPG were prepared using poly(glycidol) with number average and weight average molecular weights of  $1.6 \times 10^4$  and  $2.5 \times 10^4$ , respectively, as previously reported [10,15]. Molar percentages of glycidol/carboxylated glycidol/*n*-decylamine-attached unit in the resultant SucPG and MGLuPG were determined to be 18/74/8 and 9/81/10, respectively, using  $^1\text{H NMR}$ .

### 2.2. Cell lines culture

DC2.4 cells, which were an immature murine DC line, were provided from Dr. K. L. Rock (Harvard Medical School, USA) and were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (MP Biomedical, Inc.), 2 mM L-glutamine, 100  $\mu\text{M}$  nonessential amino acid, 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (2-ME) and antibiotics at 37 °C [16]. EL4, a C57BL/6 mice-derived T lymphoma, was obtained from Tohoku University (Sendai, Japan). E.G7-OVA, which is a chicken egg OVA gene-transfected clone of EL4 and which presents OVA with MHC class I molecules, was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) [17]. CD8-OVA1.3 cells, a T-T hybridoma against OVA<sub>257–264</sub>/H-2 K<sup>b</sup> complex, were kindly provided by Dr. C.V. Harding [18], and were

grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, 50  $\mu\text{M}$  2-ME, and antibiotics. OT4H.1D5 cells, a T-T hybridoma against OVA<sub>265–277</sub>/I-A<sup>b</sup> complex, were kindly provided by Dr. J.A. Kapp [19], and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 50  $\mu\text{M}$  2-ME, and antibiotics.

### 2.3. Animals

Female C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>, 7 weeks old) were purchased from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal experimentation in Osaka Prefecture University.

### 2.4. Generation of murine bone marrow-derived DCs

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were prepared according to the method of Lutz et al. with slight modification [20]. Briefly, bone marrow cells flushed from the femurs and tibias of C57BL/6 mice were seeded at  $5 \times 10^6$  cells per sterile 100-mm bacterial grade culture dish in 10 ml of RPMI 1640 containing 10% FBS, 10 ng/ml recombinant murine granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-SCF, PeproTech EC Ltd.), 50  $\mu\text{M}$  2-ME, and antibiotics. On day 5, another 10 ml of culture medium was added to the dish for medium replenishment. Nonadherent cells were harvested on days 6–8 as immature BMDCs.

### 2.5. Preparation of liposomes

Liposomes were prepared by two kinds of methods, namely vortex and extrusion. Liposomes were prepared using vortex as follows: a dry thin membrane of a mixture of EYPC, DOPE, and SucPG or MGLuPG (EYPC/DOPE = 1/1, mol/mol; lipids/polymer = 7/3, w/w) was dispersed in PBS by vortex to afford liposomes. Also, liposomes were prepared by extrusion method as follows: a dry thin membrane of a mixture of lipid and polymer was suspended by a brief sonication using a bath-type sonicator and the obtained liposome suspension was extruded through a polycarbonate membrane of pore sizes of 100 nm [9,10,15]. For liposomes encapsulating OVA, PBS containing OVA (4 mg/ml) was used for hydration of the lipid/polymer membranes. Free OVA was removed by ultracentrifuge for vortex method and by gel filtration using a Sepharose 4B column for extrusion method. Unmodified liposomes were also prepared according to the above procedure using dry membrane of a lipid mixture without polymer.

### 2.6. Dynamic light scattering and zeta potential

Diameters and zeta potentials of the liposomes were measured using a Nicomp 380 ZLS dynamic light scattering instrument (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) equipped with a 35 mW laser (632.8 nm wavelength). Zeta potentials were measured by equipped an Avalanche photodiode detector, and were detected at an 18.9 angle treated with 9.75 mV. Data was obtained as an average of more than three measurements on different samples.

### 2.7. Fusion assay

Fusion between plain EYPC liposomes and polymer-modified liposomes was detected by measuring resonance energy transfer between NBD-PE and Rh-PE [21,22]. Polymer-modified liposomes containing NBD-PE and Rh-PE were prepared according to the above procedure using the lipid/polymer membrane containing NBD-PE (0.6 mol%) and Rh-PE (0.6 mol%) and extrusion through a polycarbonate membrane with a pore size of 50 nm. Probe-free plain liposomes were also prepared according to the same procedure. The labeled liposomes (final concentration of lipid 0.125 mM) were mixed with fluorescent probe-free EYPC liposomes (final concentration of lipid 0.25 mM) in 25 mM MES and 125 mM NaCl solution of varying pH. Their fusion was followed by monitoring the fluorescence intensity ratio of NBD-PE

to Rh-PE ( $R$ ). The excitation wavelength of NBD-PE was 450 nm and monitoring wavelengths for NBD-PE and Rh-PE were 520 nm and 580 nm, respectively. Percentage increase in  $R$  was defined as:

$$\text{Percentage increase in } R = (R_t - R_0)/(R_{100} - R_0) \times 100 \quad (1)$$

where  $R_0$  and  $R_t$  represent the initial and intermediary  $R$  values.  $R_{100}$  is the  $R$  of the labeled liposomes when the liposomes fused completely. The fluorescent lipid-labeled liposomes and the unlabeled liposomes were dissolved in methanol, dried by evaporation, and resuspended in MES buffer. The  $R$  value of the suspension was taken as  $R_{100}$  [21].

### 2.8. Cellular uptake

The DC2.4 cells ( $1 \times 10^5$  cells) cultured for 2 days in a 12-well plate were washed with Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma) and then incubated in culture medium. The liposomes containing FITC-labeled OVA or the liposomes which lipids were substituted by Rh-PE (1 mol%) were added gently to the cells and incubated for 4 h at 37 °C. The cells were washed with HBSS three times, and then the detached cells using trypsin were applied to flow cytometry [23].

### 2.9. Microscopy

The DC2.4 cells ( $2 \times 10^5$  cells) cultured for 2 days in 35-mm glass-bottom dishes were washed with HBSS, and then incubated in serum-free medium. The liposomes containing FITC-labeled OVA (50 µg), in which lipids were substituted by Rh-PE (1 mol%), were added gently to the cells and incubated for 4 h at 37 °C. After the incubation, the cells were washed with HBSS three times and then replaced by serum-free medium. LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) was used by the staining of intracellular acidic compartments according to the manufacturer's instructions. Briefly, LysoTracker Red was added to cells at the final concentration of 75 nM. After the 5 min-incubation, the cells were washed with HBSS three times. Confocal laser scanning microscopic (CLSM) analysis of these cells was performed using LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss Co. Ltd.).

### 2.10. In vitro antigen presentation assay

The BMDCs were seeded in a 96-well culture plate at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well and cultured for 12 h at 37 °C. Each well was washed twice with HBSS, and then the cells were treated with various liposomes containing OVA or OVA solution at various OVA concentrations. After 3 h incubation at 37 °C, the cells were washed three times with HBSS. Subsequently, the cells were co-cultured with  $2 \times 10^4$  CD8-OVA1.3 or OT4H.1D5 cells for 24 h at 37 °C. The response of stimulated CD8-OVA1.3 or OT4H.1D cells was assessed by determining the amount of IL-2 released into an aliquot of culture medium (100 µl) using a murine IL-2 ELISA KIT (PeproTech EC Ltd.).

### 2.11. Immunization

Mice were nasally immunized with 10 µl aliquots of polymer-modified liposomes or unmodified liposomes containing 100 µg of OVA on days 0 and 14. Other group of mice was nasally immunized with OVA solution and another group of mice was subcutaneously immunized with CFA/OVA emulsion.

### 2.12. CTL assay

Splenocytes from immunized mice were suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, and 20 U/ml recombinant murine IL-2 (PeproTech, London, UK). Seven days after the second immunization, splenocytes were obtained from five mice, and the splenocytes were pooled and stimulated with mitomycin C-treated E.G7-OVA cells at a ratio of 10:1 for 5 days. The stimulated splenocytes were used as effector cells for the cytotoxicity assay. The CTL activity was evaluated at various ratios of effector cells to target cells (E.G7-OVA or EL4 cell), which were defined as E/T ratios, using a lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity detection assay (Takara Biomedicals, Tokyo, Japan).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of liposomes

We measured sizes and zeta potentials of prepared liposomes to characterize the liposomes. Table 1 presents particle sizes and zeta potentials of various liposomes prepared by vortex method or extrusion method. When the liposomes were prepared using the vortex method, unmodified liposomes were of about 1500 nm diameter. Although the SucPG-modified and MGluPG-modified liposomes were prepared according to the same method, they

**Table 1**

Particle size and zeta potential of various liposomes.

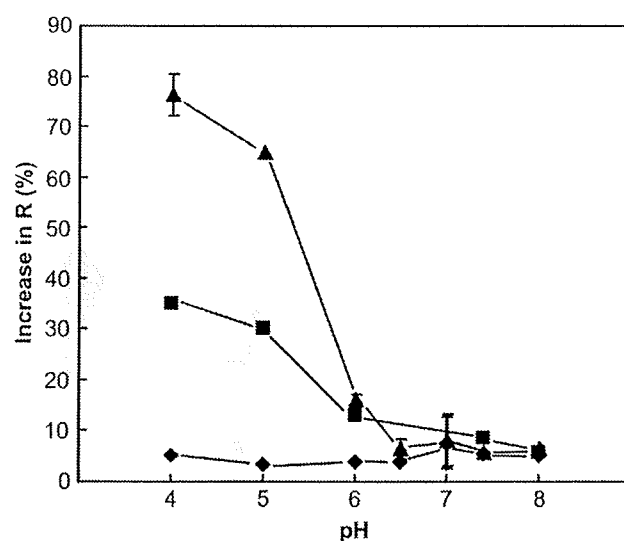
Liposome	Method	Zeta potential/mV (SD)	Particle size/nm (SD)
Unmodified	Vortex	-0.51 (0.73)	1560 (817)
Unmodified	Extrusion	-0.92 (0.42)	116 (26.0)
SucPG	Vortex	-11 (2.4)	431 (112)
SucPG	Extrusion	-12 (2.5)	105 (18.0)
MGluPG	Vortex	-11 (3.5)	523 (78.0)
MGluPG	Extrusion	-11 (2.4)	110 (23.0)

showed much smaller diameters of around 400–500 nm, probably because negatively charged polymers bound on the liposome surface enhanced hydration of the membrane surface and increased the colloidal stability of the liposomes. When prepared using the extrusion method, all liposomes showed similar particle sizes of around 110 nm, which corresponds to the pore size of the membrane used for their extrusion.

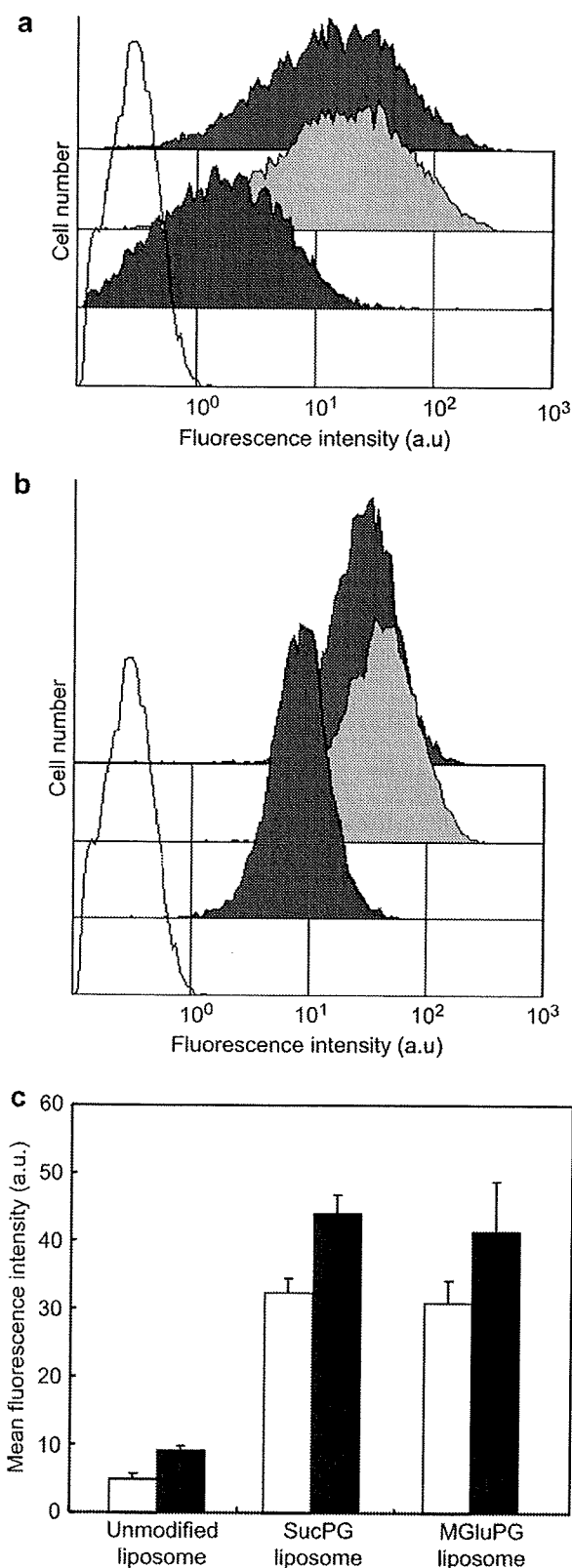
Regarding zeta potentials of the liposomes, the unmodified liposomes were nearly zero, indicating that their surface was electrically neutral. However, the liposomes modified with SucPG or MGluPG showed negative zeta potentials of around -11 mV because of carboxylate anions on the polymer chains. This result demonstrates that these polymer-modified liposomes have electrically similar surface characteristics, irrespective of the polymers attached on their surface.

### 3.2. Fusogenic activities of liposomes

In previous studies, we showed that modification with SucPG and MGluPG provides pH-dependent fusion ability to stable EYPC liposomes [9,10]. In this study, we used a mixture of EYPC and DOPE as liposomal lipids because inclusion of DOPE is shown to increase the fusion ability of liposomes [24]. We examined the fusion abilities of these polymer-modified liposomes using resonance energy transfer between NBD-labeled and Rh-labeled lipids in the liposome membranes. The labeled liposomes were mixed with



**Fig. 2.** pH-dependent fusogenic properties of liposomes. Percent increase in  $R$  values for fluorescent lipid-labeled unmodified (diamonds), SucPG-modified (squares) and MGluPG-modified (triangles) EYPC/DOPE liposomes after 1 h incubation with the unlabeled plain EYPC liposomes at varying pH was shown. Measurements were performed in 25 mM MES and 125 mM NaCl at 37 °C. Each point is the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Liposomes prepared by extrusion method were used.



**Fig. 3.** Evaluation of cellular association of various liposomes labeled with Rh-PE using flow cytometry. DC2.4 cells were treated with SucPG-modified (green), MGLuPG-modified (blue) and unmodified (red) liposomes prepared by vortex method (a) or extrusion method (b). Fluorescence intensity of untreated cells (black lines) is also

unlabeled plain EYPC liposomes and incubated for 1 h at various pH. Fusion between these liposomes was evaluated by monitoring the ratio of fluorescence intensity of NBD to that of Rh ( $R$  value).

Fig. 2 portrays the percent increase in the  $R$  value during 1 h incubation as a function of pH. The unmodified liposomes exhibit a very low extent of the increase in  $R$  throughout the experimental pH region, indicating the lack of fusion ability for unmodified liposomes. The SucPG-modified liposomes also showed a very low extent of the increase in  $R$  at neutral pH, but the  $R$  value increased below pH 6, suggesting that the SucPG-modified liposomes generated fusion ability at weakly acidic pH. Although a similar pH-dependence of fusion was apparent for the MGLuPG-modified liposomes, the extent of increase in the  $R$  value in the weakly acidic pH region was greater, indicating that the MGLuPG-modified liposomes generated higher fusion ability than SucPG-modified liposomes. Because MGLuPG has more hydrophobic side chains than SucPG, polymer chains of MGLuPG might strongly disrupt the liposome membrane, resulting in more intensive fusion of the liposomes.

These results indicate clearly that SucPG and MGLuPG provided fusion ability to stable EYPC/DOPE liposomes and that the latter gave higher fusion ability than the former, which is consistent with our previous observation [10].

### 3.3. Association of liposomes with DCs

To estimate the performance of the polymer-modified liposomes as delivery vehicles of antigenic proteins to cytoplasm of DC, we examined the association of the liposomes with DCs after their incubation. The DC2.4 cells were incubated with various liposomes labeled with Rh-PE for 4 h; then fluorescence intensities of the cells were measured using a flow cytometer. As presented in Figs. 3a and 3b, cells treated with the labeled liposomes exhibited higher fluorescence intensities than intact cells, indicating the association of liposomes to the treated cells. In addition, the cells treated with SucPG-modified and MGLuPG-modified liposomes displayed stronger fluorescence of Rh-PE, suggesting more efficient association of these polymer-modified liposomes to DCs. To evaluate their ability to associate DCs further, the average of cellular fluorescence intensities was calculated (Fig. 3c). Compared with the cellular association of the unmodified liposomes, on average, 6.6 and 6.2 times higher amounts of liposome association were observed, respectively, for SucPG-modified and MGLuPG-modified liposomes. Actually, DCs are known to have scavenger receptors, which recognize the microorganisms or apoptotic cells with an anionic component [25]. As described in a previous report, these polymer-modified liposomes are likely to be taken up by DCs through interaction of their anionic surfaces with scavenger receptors [23].

Comparison of liposomes prepared by the extrusion method to those prepared by the vortex method shows that the former exhibited slightly higher cellular association than the latter, indicating that DCs engulf small liposomes more efficiently than large liposomes with diameters of 500–1500 nm, although the difference was slight.

### 3.4. Cytoplasmic delivery of antigenic protein to DCs

We examined the ability of the polymer-modified liposomes to deliver OVA, which was used as an antigenic protein into cytosol of

shown. (c) Mean fluorescence intensity of the liposome-treated DC2.4 cells. Each point is the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Cellular treatment was performed by incubating with liposomes prepared by vortex method (open) or extrusion method (closed) in serum-free medium at 37 °C for 4 h. Concentration of liposomal lipids was 0.1 mM.