リポソーム化 RGD による癌転移抑制

奥 直人・徳留嘉寛・小池千恵子・岡田昌二^{*1)},
西川尚之・森 英登^{*2)}, 済木育夫^{*3)}*Effective inhibition of metastasis by liposomal Arg-Gly-Asp analogs*

L-arginine-L-glycine-L-aspartic acid (RGD) sequence, originally found in fibronectin, one of main component of extracellular matrices, is known as a ligand to some adhesion molecules.

Since the interaction of metastatic tumor cells with target endothelium and extracellular matrices under it, is important for establishment of blood-borne metastasis, analogs of the peptide have been developed for the suppression of tumor metastasis. In fact, some synthetic peptides having the RGD sequence have been found to decrease metastatic colonization. To enhance the metastasis-suppressing efficacy of these analogs, we attempted to stabilize and to prolong the circulation time of these analogs by liposomalization.

Various structures of hydrophobized-RGD analogs (lipophilic antimetastatic peptides, LAPs) were synthesized, and incorporated into liposomes. Liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine, cholesterol, dipalmitoylphosphatidylglycerol and LAPs were injected intravenously with B16BL6 murine melanoma cells into mice. Liposomal RGD (0.6 μ mol of the analog equivalent to ca. 200 μ g RGD peptides) inhibited lung colonization up to 76%. This dose is an order of magnitude lower than that for comparable inhibition reported for free RGD. Multi-dose administration of LAP-liposomes (0.15 μ mol of the analog equivalent to ca. 50 μ g RGD peptides) also inhibited the

spontaneous lung metastasis of cells from a primary tumorsite of B16BL6 cells subcutaneously implanted into the footpad of mice.

In conclusion, liposomal RGD may be useful for the suppression of tumor metastasis.

Naoto Oku・Yoshihiro Tokudome・
Chieko Koike・Shoji Okada^{*1)},
Naoyuki Nishikawa・Hideto Mori^{*2)},
Ikuro Saiki^{*3)}*key words : metastasis, Arg-Gly-Asp,
liposome, B16BL6 melanoma*

癌転移は、原発巣から離脱し血管内へ侵入した転移性癌細胞が、標的組織の血管内皮細胞や細胞外基質へ接着、浸潤し、転移巣を形成する一連の複雑な過程を経て成立する¹⁾。なかでも癌細胞が、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどにより構成される基底膜や細胞外基質に接着する過程は重要であり、これらの相互作用を抑制する物質は、癌転移阻害剤として有用である可能性がある。

Arg-Gly-Asp (RGD) は、細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチン中に存在する細胞接着ドメインとして見出されたが、この RGD ペプチドは転移性癌細胞による血小板凝集を阻害することや、転移抑制活性をもつことが見出されてきた^{2,3)}。そこで、この配列を基本にした合成ペプチドによる転移抑制が検討されてきた^{3,4)}。同様に、フィブロネクチンの III CS 領域に由来する CS1 ペプチドや、ラミニン由来の YIGSR ペプチドなども転移抑制物質として試みられてきた^{5,6)}。しかしながら、RGD ペプチドのような短いペプチドは、血中半減期も短く代謝を受けやすいため、その生物活性を発揮するためには通常マウスで 1 匹あたり数 mg という投与量を要していた。

^{*1)} Department of Radiobiocchemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka 静岡県立大学薬学部放射薬品学教室

^{*2)} Ashigara Research Laboratories, Fuji Photo Film Co. Ltd. 富士写真フイルム株式会社研究部

^{*3)} Department of Pathogenic Biochemistry, Research Institute for WAKAN-YAKU, Toyama Medical and Pharmaceutical University 富山医科大学和漢研究所病態生化学部門

Offprint requests to : Naoto Oku, Ph.D., Department of Radiobiocchemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422

筆者らは、RGD ペプチドのリポソーム化により、安定性と血中滞留性を高め、低用量で癌転移を抑制できるかどうかを検討した。同様な考え方から、RGD の冠状ペプチド化⁷⁾や高分子化^{8,9)}も試みられており、それなりの成果をあげている。これらは、キャリアあたり1～数分子のRGDを結合させるに留まるが、リポソームの特徴は、一つのキャリアにRGDペプチドを数千分子結合させることも容易であるため、より効率的に働く可能性がある。そこで、RGD配列を有する脂質誘導体を合成、リポソーム化し、その転移抑制作用について検討した。

C57BL/6 マウスに B16BL6 メラノーマをリポソーム化 RGD とともに尾静脈投与し、その後マウスを解剖し、肺表面の結節数より実験的転移の抑制を評価した。同様に、下肢皮下にメラノーマを移植したマウスにリポソーム化 RGD を反復投与し、自然転移の抑制を評価した。両モデルにおいて、リポソーム化 RGD 投与群では、遊離のRGD投与群にくらべ、有意な肺結節数と結節サイズの減少が観察されたので、以下に詳細を述べる。

材 料

図1に、用いた RGD 誘導体を示した。疎水基を有する RGD 有導体は、以下のように合成した。

まず(G)RGD(S)保護ペプチドは、定法に従い液相法で合成した。DCCにより保護ペプチドに脂肪酸を縮合し、加水素分解により保護基をはずした。LAP-5に関しては、ベンジルグリセロールをヨウ化フィタニルでエステル化し、その還元により得られた1,2-O-ジフィタニルグリセロールとN-Boc エタノールアミンをフェニルリン酸ジニトロトリアゾールで縮合した。その後、保護基をはずし、RGDペプチドを導入した。合成 RGD 誘導体(以下、LAP)の構造決定は、¹H-NMR および FAB-MASS により行った。

ジステリアルルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)は日本精化(株)難波幸弘博士からご供与いただいた。コレステロールはシグマ社製を用いた。

図1 Structure of RGD analogs

方 法

(1) リポソーム化 RGD の調製法とその性状解析

脂質と LAP-5, LAP-6 はクロロホルムに、LAP-1～LAP-4 はクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解した。実験的転移には、モル比で DSPC, コレステロール, DPPG, LAP=20/20/5/6 となるリポソームを調製した。LAPを含む脂質溶液に適量のクロロホルムを加えたのち、ロータリーエバポレーターにより溶媒を減圧留去し、脂質フィルムを作製した。さらに1時間以上真空にて乾燥し、リン酸緩衝生理食塩水(PGS)1.0 ml で水和した。液体窒素を用い凍結融解を3回繰り返したのち、バス型ソニケーターで約5分間の超音波処理を行った。得られたリポソームは、孔径400 nm と孔径200 nm のポリカーボネート膜を重ねたものを3回、孔径100 nm のポリカーボネート膜を2枚重ねたものを3回通過させ、サイジングを行った。組み込まれなかった脂質誘導体は、ミクロ超遠心100,000 g×10分により除去した。この遠心により得られたリポソーム画分を1.0 ml のPBSで再懸濁し、実験に用いた。

自然転移には、モル比で DSPC, コレステロール, DPPG, LAP=20/20/5/1.5 となるリポソームを同様な方法で調製した。

調製した LAP リポソームのサイズ分布は、準弾性光散乱法(Nicomp Model 370)により調べた。また、リポソームへの LAP の取り込みは、

リポソームを 0.3M マンニトールで調製後、遊離の LAP を遠心分離(100,000 g×10 分)し、上清の吸収(204 nm)より求めた。リポソームの凝集性に関しては、50%ウシ胎仔血清と 37°C、30 分インキュベート後、450 nm の濁度変化により検討した。

(2) リポソーム化 RGD の細胞毒性

B16BL6 細胞は、10%ウシ胎仔血清を含む培地中、37°C、5 %CO₂ 下培養した。トリプシン処理により細胞をはがし 1×10⁵ cells/ml の細胞浮遊液を得、LAP リポソーム(最終濃度 0.6 μmol/ml の LAP を含む)と 37°C、2 時間インキュベート後、トリパンブルー染色法によりバイアビリティを測定した。

(3) リポソーム化 RGD による実験的転移の抑制

B16BL6 細胞 0.1 ml (2×10⁵ cells) を LAP リポソーム溶液 0.1 ml (0.6 μmol LAP, RGD として 200 μg 相当)とともに、5 週齢雄性 C57BL/6 マウス(日本 SLC)に尾静脈内投与した。14 日後にマウスをエーテル死させ、肺を摘出後、肺表面の結節数と大きさを測定した。実験は 1 群 5 匹で行い、再現性を確かめるために、同様の実験をさらに 2 回行った。

(4) リポソーム化 RGD による自然転移の抑制

B16BL6 細胞 50μl (5×10⁵ cells) を、5 週齢雄性 C57BL/6 マウスの右後肢皮下に移植した。LAP リポソーム溶液 0.1 ml (0.15 μmol LAP, RGD として 50 μg 相当)をマウス尾静脈内から計 7 回、癌移植 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 日後に投与した。この間、癌移植 21 日後に外科的に原発巣をネブプター麻酔下切除し、さらに 14 日後(癌移植 35 日後)に動物を解剖し、肺を摘出後、肺表面の結節数と大きさを測定した。実験は 1 群 5 匹で行い、同様の実験をもう一度行い、再現性を確かめた。

結果と考察

(1) リポソーム化 RGD の調製法とその性状解析

リポソームの組成としては“硬い”ほうが血中滞留性がよいことが知られているので¹⁰⁾、本実験

表 1 Characterization of RGD liposomes

Liposomes	Sized(SD) (nm)	Incorporation of LAPs (%)	Agglutinability (Δ450 nm)
LAP-1	139(50)	94.4(0.5)	1.00
LAP-2	150(46)	86.5(0.2)	0.98
LAP-3	137(40)	96.4(0.2)	0.94
LAP-4	148(36)	96.0(1.2)	1.35
LAP-5	153(52)	78.0(0.5)	0.95
LAP-6	143(50)	101.0(0.6)	0.98

Liposomes composed of DSPC, cholesterol, DPPG, and LAP=20/20/5/6 were prepared. The size distribution of liposomes was determined by dynamic light scattering with a Submicron Particle Analyzer (Nicomp Model 370). The amount of unincorporated LAP into liposomes was determined after centrifugation of liposomes as described in the text. Liposomal agglutinability was determined by turbidity change at 450 nm after an incubation in the presence of 50% fetal bovine serum for 30 min at 37°C. Relative turbidity compared with that in mannitol was shown.

では DSPC とコレステロールを主成分とするリポソームを用いた。転移抑制実験に先立ち、LAP リポソームの性状解析を行った。その結果を表 1 に示す。

LAP のリポソームへの取り込みは、LAP-2 と LAP-5 を除いて、ほぼ 100%であった。LAP-2 と LAP-5 に関しては、構造上もとても安定にリポソーム化できると考えられることから、この両者のいずれかを含むリポソームの膜透過性が亢進し、遠心分離でリポソーム画分が沈殿しきれなかったためと考えられる。そう考えると、合成したすべての LAP は、リポソーム化に適していると結論づけられる。

リポソームのサイズと安定性に関しては、血清存在下で LAP-4 リポソームが若干の凝集性を示すほかは、ほぼ均一のサイズと安定性を有していた。

つぎに、リポソームの毒性について細胞傷害活性を指標に検討した。データは示していないが、LAP リポソームの B16BL6 細胞に対する毒性を調べたところ、LAP-4 以外のリポソームでは 95%以上のバイアビリティを保っていた。しかしながら、LAP-4 では、ほぼすべての細胞が死滅

図2 Effect of liposomal RGD on experimental lung metastasis

Liposomes composed of DSPC, cholesterol, DPPG, and LAP=20/20/5/6 (0.6 μ mol as LAP) as well as free GRGDS (0.6 μ mol) were coinjected with B16BL6 cells (1×10^5 cells/mouse) into a tail vein of 5-week-old C57BL/6 male mice. At day 14, the mice were sacrificed under anesthesia, and the metastatic colonies in lungs were counted.

Colony numbers were expressed as percent of control and SD, where the number of control colonies was 94.8 ± 14.9 . Five mice were used for each group.

したことが確認できた。この理由として、細胞存在下では、LAP-4 がリポソーム二重膜構造中から抜けやすく、細胞膜に移行し、毒性を示したということが考えられる。このため、以下の実験では、LAP-4 は用いないこととした。

(2) リポソーム化 RGD による実験的転移の抑制

図2に、B16BL6 細胞と LAP リポソーム溶液を同時投与したあとの転移形成能を示した。LAP-2, LAP-3 および LAP-5 リポソームでは、肺結節数はコントロールにくらべ 16.9, 58.6 および 52.3%と低く、これらの LAP リポソームが転移抑制に有効に働くことが示された。

リポソームはドラッグキャリアとして用いられてきたが、本実験で用いたものと類似のサイズと組成を有するリポソームが、長時間血中に滞留することが知られている¹¹⁾。したがって、本実験でみ

図3 Effect of liposomal RGD on primary tumor produced by s.c. injection of B16BL6 cells

B16BL6 cells (5×10^5 cells/mouse) were injected s.c into right footpad of the mice. LAP-liposomes (0.15 μ mol as LAP) were injected i.v on day 7, 10, 13, 16, 19, 22 and 25. On day 21, primary tumors were surgically removed and weighted.

Figure shows primary tumor weight and SD. Five mice per group.

られた転移抑制は、RGD の血中半減期を延長したためと考えられる。あるいは一つのリポソーム上に多くの RGD が存在するために、協同的結合が起こり、作用が増強された可能性もある。

なお、データには示していないが、これら LAP リポソームの副作用を調べるため、マウスの体重の増減を調べたところ、PBS 投与群との差はみられなかった。

LAP-2, LAP-3 および LAP-5 リポソームで転移抑制がみられた一方で、LAP-1 および LAP-6 リポソーム存在下での転移率は 82.9%, 84.4%であり、効果的な転移抑制は示さなかった。この理由としては、LAP-1 は両側に脂肪酸があるため、また LAP-6 は RGD にサクシニル基がついているために、RGD のアペイラビリティが低くなったことが考えられる。

以下の自然転移実験では、実験的転移抑制効果の高かった 3 種の LAP について実験を行った。

(3) リポソーム化 RGD による自然転移の抑制
自然転移モデル作成のために、B16BL6 細胞をマウスの右後肢皮下に移植した。LAP-2, LAP-3

図4 Effect of liposomal RGD on spontaneous lung colonization by cells from implanted B16BL6 tumor

B16BL6 cells (5×10^5 cells) were injected into the right hind footpad of 5-week-old C57BL/6 male mice. Liposomes composed of DSPC, cholesterol, DPPG, and RGD analog=20/20/5/1.5 (0.15 μ mol as LAP) were i.v injected 7 times. On day 21, primary tumors were excised from the foot of mice under anesthesia. On day 35, the mice were sacrificed, and lung colonization was examined.

a : colony numbers (% of control) $\pm$ SD

b : average diameter of colonies $\pm$ SD

および LAP-5 リポソーム、また対照として PBS を、マウス尾静脈から計 7 回投与した。この間、原発巣を 21 日目に切除し、その重量を測定した。

図 3 は、原発巣の重量を示しているが、LAP リポソーム投与群での有意な減少はみられなかつ

た。このことは、LAP リポソームが癌増殖そのものを抑えてはいないことを示しており、LAP リポソームが転移抑制を起こすメカニズムが、あくまで転移過程の抑制であることを示唆している。

原発巣とは対照的に、転移巣形成は LAP-2 および LAP-5 リポソームにより、有意に抑制されることが示された(図 4)。

考 察

以上述べたように、リポソーム化 RGD が、新規製剤として非常に有用であると考えられる。現在、転移抑制ペプチドとして、RGD をはじめ YIGSR¹²⁾ など、さまざまな検討が行われている。RGD 配列は、血小板に存在するインテグリン α IIb β 3 や、インテグリン α 5 β 1, α 3 β 1 など、多くの接着因子のリガンドとなっている^{13,14)}。したがって、RGD 関連ペプチドは、RGD 配列を含む基質への細胞の接着を阻害することが知られている^{7,15)}。しかしながら、ペプチドは一般的に血中代謝が速いため、癌転移を抑えるためには、マウスで mg 量のペプチドを投与する必要がある^{4,16)}。

RGD 関連ペプチドを転移抑制剤として用いるために、環状ペプチドの開発や⁷⁾、ポリエチレングリコールへのペプチド修飾¹⁷⁾、非ペプチド性の類似体の開発¹⁸⁾などが盛んに行われている。しかしながら、これらの物質は、十分には大きくないために、迅速に尿中に排泄される。さらに、RGD 修飾高分子を用いた場合でも、高分子 1 分子に修飾できる RGD 分子数は数分子に満たない。

これらに反して、リポソーム化をした場合には、長期血中滞留性が実現でき、また一つのキャリアリポソームに数千分子の RGD を運搬させることが可能である。実際に、10 モル%の RGD を含む 100 nm のリポソームでは、計算上 8,000 分子の RGD をリポソーム表面にもつことになる。さらに、150 nm のリポソームでは、18,000 分子以上の RGD がリポソーム表面に存在することになる。

今回、筆者らが報告したリポソーム化 RGD は、実際にこれまでに報告された RGD 誘導体にくらべ、より少ない量で同等またはそれ以上の効果があることを示している。このように、リポソーム

は RGD のキャリアとしてすぐれており、実際に転移抑制剤に有効に働く可能性がある。

さらに、リポソームは抗癌剤を内封することが可能であり、実際にアドリアマイシン¹⁹⁾やビンクリスチン²⁰⁾を内封したりポソームが、癌の原発巣に対して非常に効果が高いことも知られている。そこで、より効率的に癌を制圧するために内水相に抗癌剤を内封し、同時に転移抑制を起こすリポソームなどについても今後、検討する価値が十分にあると考えている。

最後に、本実験を行うにあたり、ご協力くださいました静岡県立大学薬学部・藤本佳子、斎藤暢子、湯山ゆきの、黒羽子孝太氏に感謝致します。また、リポソームの粒度分布測定にご協力くださいました日本精化(株)・難波幸弘博士に感謝致します。

文 献

- 1) Pauli BU, Augustin-Voss HG, el Sabban ME, Johnson RC, Hammer DA : Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev.* 9 : 175-189, 1990.
- 2) Humphries MJ, Yamada KM, Olden K : Investigation of the biological effects of anti-cell adhesive synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. *J. Clin. Invest.* 81 : 782-790, 1988.
- 3) Sheu JR, Lin CH, Chung JL, Teng CM, Huang, TF : Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing anti-platelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. *Jpn. J. Cancer Res.* 83 : 885-893, 1992.
- 4) Humphries MJ, Olden K, Yamada KM : A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233 : 467-470, 1986.
- 5) Saiki I, Murata J, Makabe T et al. : Inhibition of lung metastasis by synthetic and recombinant fragments of human fibronectin with functional domains. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 : 1003-1011, 1990.
- 6) McCarthy JB, Skubitz APN, Palm SL, Furcht LT : Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin. *J. Natl. Cancer Inst.* 80 : 108-116, 1988.
- 7) Kumagai H, Tajima M, Ueno Y, Giga-Hama Y, Ohba M : Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 : 74-82, 1991.
- 8) Saiki I, Yoneda J, Igarashi Y et al. : Antimetastatic activity of polymeric RGD peptides conjugated with poly(ethylene glycol). *Jpn. J. Cancer Res.* 84 : 558-565, 1993.
- 9) Komazawa H, Saiki I, Nishikawa N et al. : Inhibition of tumor metastasis by Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide conjugated with sulfated chitin derivative, SCM-chitin-RGDS. *Clin. Expt. Metastasis* 11 : 482-491, 1993.
- 10) Oku N, Namba Y : Long-circulating Liposomes. *Crit. Rev. Therapeut. Drug Carrier Syst.* 11 : 231-270, 1994.
- 11) Oku N, Namba Y, Okada S : Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1126 : 255-260, 1992.
- 12) Iwamoto Y, Robey FA, Graf J et al. : YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 238 : 1132-1134, 1987.
- 13) Pytela R, Piershbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E : Platelet membrane glycoprotein II b/III a : member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 231 : 1559-1562, 1986.
- 14) Hynes RO : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25, 1992.
- 15) Ferguson TA, Mizutani H, Kupper TS : Two integrin-binding peptides abrogate T cell-mediated immune responses *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 8072-8076, 1991.
- 16) Soszka T, Knudsen KA, Beviglia L et al. : Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. *Exp. Cell Res.* 196 : 6-12, 1991.
- 17) Saiki I, Murata J, Iida J et al. : Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-II e-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br. J. Cancer* 60 : 722-728, 1989.
- 18) Hardan I, Weiss R, Herschkoviz N et al. : Inhibition of metastatic cell colonization in murine lungs and tumor-induced morbidity by non-peptidic Arg-Gly-Asp mimetics. *Int. J. Cancer* 55 : 1023-1028, 1993.
- 19) Oku N, Doi K, Namba Y, Okada S : Therapeutic effect of adriamycin encapsulated in long-circulating liposomes on Meth-A-sarcoma-bearing mice. *Int. J. Cancer* 58 : 415-419, 1994.
- 20) Tokudome Y, Oku N, Namba Y, Okada S : Antitumor activity of vincristine encapsulated in glucuronide-modified long-circulating liposomes in mice bearing Meth A sarcoma. *Biochem. Biophys. Acta* 1279 : 70-74, 1996.