制癌剤含有リポソームの腫瘍細胞取り込みに対する
polyethyleneglycol 修飾化の影響佐塚泰之・廣津祥代・広田貞雄^{*1)}、金川麻子・森田哲生^{*2)}*Effect of polyethyleneglycol modification on tumor cell uptake of antitumor agent encapsulated liposomes*

We prepared the liposomes, changed the entrapped amount of adriamycin(ADR) per the amount of liposome composing lipid, and after the addition of these liposomes with the same concentration of ADR(therefore, different dose of lipid), the tumor cell uptake of ADR was examined. The high entrapped amount of ADR demonstrated the usefulness in the tumor cell uptake of the ADR liposome *in vitro*. The cell uptake of the liposome depended on additional amount of ADR and liposomal lipid. Next, using ADR contained liposome and irinotecan contained liposome, its usefulness on tumor cell uptake by the polyethyleneglycol(PEG) modification of the surface on the liposome *in vitro* examined. In both liposome, PEG modification of the surface on the liposome facilitated the initial rate of the liposome uptake into the tumor cell. We have considered that this facilitation was attributed to the lipo-hydrophilic property of PEG and the fixed aqueous layer around the liposome. Therefore, PEG modification of the surface on the liposome, prevents the adhesion of serum opsonine and avoids reticuloendothelial system, does not inhibit tumor cell uptake rather facilitates. From the results of dextran sulfate contained liposome, it is expected that these liposome passed through the membrane of the tumor cell. Therefore, a higher entrapped amount of antitumor agents in the liposome and PEG modification have been confirmed to be beneficial in the tumor cell uptake.

Yasuyuki Sadzuka・Sachiyo Hirotsu・

Sadao Hirota^{*1)}, Asako Kanagawa・
Tetsuo Morita^{*2)}*key words : liposome, adriamycin, CPT-11, polyethyleneglycol, cell uptake*

医薬品の有効利用をはかる一手段としてのリポソームは、drug delivery system(DDS)として広く認知されるようになってきており、その有用性は衆目の一致するところである。リポソーム化がもっとも試みられているのは制癌剤であり、制癌剤のリポソーム封入が、血中滞留性の増大、腫瘍集積性をもたらすことがこれまでの研究により示されている^{1,2)}。

Anthracycline系抗生物質である adriamycin(ADR)は、現在臨床で繁用されている制癌剤である³⁾が、血中消失が速く^{4,5)}、また、重篤な心毒性、骨髄機能抑制⁶⁾などの副作用のため、その使用に対し制限が加えられている。したがって、抗腫瘍性、副作用両面より考えてDDSを試みる最適の薬物であり、もっともリポソーム研究がすすんでいる薬物のひとつである^{7,8)}。一方、topoisomerase I 活性阻害という特異的な作用メカニズムを持つ塩酸イリノテカン(CPT-11)⁹⁾は、致死性の胃腸障害により厳重な管理下におかれている制癌剤であり、リポソーム化の試みが近年なされている¹⁰⁾。

これらリポソームによる有用性の増大はリポソーム表面をpolyethyleneglycol(PEG)で修飾することにより、さらに明確になる。PEGによるリポソームの修飾は表面に固定水層を形成させることにより血清中のオプソニンの付着を妨げ、肝臓、脾臓といった細網内皮系(reticuloendothelial system, RES)でのリポソームの捕捉を回避¹¹⁾、passive targetingによる腫瘍集積を示す¹²⁾。

^{*1)} Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka 静岡
岡県立大学薬学部薬品製造工学教室

^{*2)} Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy
and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University
福山大学生化薬学教室
Offprint requests to : Yasuyuki Sadzuka Ph. D.,
School of Pharmaceutical Sciences, University of
Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526

表 1 Physical properties of ADR encapsulated liposomes

	Zeta potentials(mV)	Size(nm)
Empty liposome	-64.7	167.8
PL-DM 0.2	-37.0	128.6
PL-DM 0.6	-35.3	166.2
PL-DM 1.0	-31.7	131.2
PEG-DM 1.0	-11.3	140.7
PL-DS 0.2	-40.4	113.6
PL-DS 0.6	-35.6	125.5
PL-DS 1.0	-28.5	171.1
PEG-DS 0.6	-13.3	141.1
PEG-DS 1.0	-12.9	144.2

しかしながら、腫瘍細胞がリポソームを取り込む際、この PEG 修飾が及ぼす作用についてはまったく検討されていない。そこで、これら制癌剤を内封したリポソームを調製し、*in vitro*において、腫瘍細胞へのリポソーム取り込みに対する制癌剤内封量、PEG によるリポソーム表面の修飾の影響を検討した。

材料と方法

(1) 薬物

Adriamycin hydrochloride (ADRIACIN® 10 mg/vial), irinotecan hydrochloride (TOPOTECIN® 100 mg/5 ml vial) は、協和発酵工業、第一製薬よりそれぞれ購入した。リポソーム調製に用いた L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), L- α -distearoylphosphatidylcholine (DSPC), dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) は、日油リポソームより、1-monomethoxypolyethyleneglycol-2, 3-dimyristoyl glycerol (PEG-DMG, PEG 部の分子量 2,000) は日本油脂から供与された。cholesterol (CH) は、和光純薬の試薬特級品を用いた。Eagle's Minimum Essential Medium は、日水製薬より購入した。その他の試薬はすべて試薬特級をそのまま用いた。

(2) ADR 含有リポソーム調製法

リポソームの調製は、前報¹³⁾に示したように Bangham らの方法¹⁴⁾の改良法にて行った。なお、DMPC/CH/DMPG (100/100/60 μ mol) と ADR

10 mg (18 μ mol) よりなるリポソームを PL-DM 1.0 (最終 ADR 濃度: 1.0 mg/26 μ mol lipid/ml) と表示した。同様に、lipid film 調製時添加する ADR 量を変化させて PL-DM 0.6, PL-DM 0.2 を調製した。また、PEG 修飾は PL-DM 1.0 に 15 mol/mol となるように PEG-DMG を添加し、超音波処理により膜に組み込み、これを PEG 修飾 ADR 含有リポソーム (PEG-DM) とした。DSPC-リポソームの調製法は DMPC-リポソームの脂質を DMPC から DSPC に変えて同様に行い、PL-DS 1.0, PL-DS 0.6, PL-DS 0.2 と表示した。

調製したリポソームは、9.0% sucrose in 10 mM lactate buffer (pH 4.0) で 16 時間透析を行った。透析前後のサンプルを蛍光法 (Ex: 500 nm, Em: 550 nm) により測定¹³⁾し、trap 率を算出したところ、いずれも 95% 以上の trap 率を示した。CPT-11 含有リポソームも同様に調製した¹⁵⁾。

(3) 細胞内取り込みに対する内封量、PEG 修飾化の影響

DDY 系雄性マウス (5 週齢、体重 20~25 g) に Ehrlich ascites carcinoma 1.0×10^6 cells/animal を腹腔内移植し、7 日後腹水を採取し、150 g, 3 分間遠心分離したあと、さらに Tris-HCl 緩衝液で混在する血球成分等を分離除去した。細胞は、Eagle's MEM 培地で 2 度洗浄し、 5.0×10^6 cells/ml に再懸濁した。

この細胞懸濁液に、ADR 水溶液 (sol) ADR 含有リポソームをそれぞれ ADR 濃度が 10 μ g/ml となるように添加し、37°C で一定時間インキュベーションし、細胞内に ADR を取り込ませた。このあと、氷冷し、150 g, 3 分間遠心分離して上清を取り除き、細胞をリン酸緩衝液 (pH 7.8) で 2 回洗浄したあと、同緩衝液 1.0 ml に再懸濁した。以下、前出と同様に ADR 濃度を測定した。CPT-11 についても同様に実験を行った¹⁵⁾。

細胞への PEG 分配に関する実験においては、細胞懸濁液 1.0×10^7 cells/ml に PEG-DMG を 10 nmol/ml となるよう添加し、37°C で 20 分間インキュベーションを行った。5 分ごとに細胞懸濁液を一部取り、氷冷し、150 g, 3 分間遠心分離し

図 1 Effect of ADR encapsulation ratio on ADR uptake in Ehrlich ascites carcinoma cells *in vitro*

Each point represents the mean value of three independent experiments, each with duplicate data points with no more than 5% variation between them.

て上清を取り除き、細胞をリン酸緩衝液(pH 7.8)で2回洗浄したあと、同緩衝液 1.0 ml に再懸濁した。細胞中の PEG は、ピクレート法¹⁶⁾により測定した。

In vitro での腫瘍細胞におけるリポソームの取り込み様式の検討においては、DMPC/CH/DMPG (100/100/60 μmol) よりなるリポソームに dextran sulfate (DXS, 平均分子量 3,200) を内封させたリポソーム (DXS lip) もしくは DXS 水溶液 (DXS sol) を DXS として 1 μM となるよう Ehrlich ascites carcinoma 1.0×10^7 cells/ml に加え、20 分間インキュベーション後、細胞上清の lipoprotein lipase (LPL) 活性を前報¹⁷⁾に従って測定した。なお、1 mM ST638, 0.2 mg/ml biochanin A, 10 μM herbimycin A にて 10 分間 preincubation した細胞を同様に処理することにより tyrosine kinase inhibitor としての作用を検討した。

(4) 統計処理

統計処理は、student's t-test もしくは ANOVA にて行った。

結果

(1) ゼータ電位(表 1)

空リポソームのゼータ電位にくらべ、ADR 含有リポソームではゼータ電位の絶対値の減少が認められた。また、PL-DM, PL-DS いずれにおいて

も ADR 内封量増大に伴うゼータ電位の減少が確認されるとともに、PEG 修飾化によりその電位は 1/3 程度になった。一方、いずれのリポソームにおいても粒径に大きな変化はなかった。

(2) 細胞内取り込みに対する内封量, PEG 修飾化の影響

① 内封量の影響(図 1)

細胞内 ADR レベルは、PL-DM 0.2 = PL-DM 0.6 < PL-DM 1.0 < sol (PL-DS 0.2 = PL-DS 0.6 < PL-DS 1.0 < sol) となり、ADR の添加量が同一でも、内封量の増大に伴い ADR の腫瘍細胞内への取り込み増加がみられた。また、PL-DM 1.0 (PL-DS 1.0) と PL-DM 0.6 (PL-DS 0.6), PL-DM 0.2 (PL-DS 0.2) との間には有意差 ($p < 0.001$) が認められた。

② PEG 修飾化の影響

sol, ADR 1.0 mg/26 μmol lipid/ml 含有 DMPC リポソーム (PL-DM), PEG 修飾 PL-DM リポソーム (PEG-DM), ADR 1.0 mg/26 μmol lipid/ml 含有 DSPC リポソーム (PL-DS), PEG 修飾 PL-DS リポソーム (PEG-DS) を ADR として 10 μg/ml 添加後の Ehrlich ascites carcinoma cell における ADR 取り込み初速度を図 2 に示す。

腫瘍細胞において、リポソーム化により ADR 取り込み初速度の増大が認められた。さらに、取り込み初速度の増大は PEG 修飾化により顕著と

図 2 Effect of PEG modification on the initial rate of cell uptake *in vitro* (ADR liposome)

Each column represents the mean $\pm$ SD of three experiments. Significant differences from the level of the sol group are indicated by a) $p < 0.001$ and c) $p < 0.05$. Significant difference from the PL-DM or PL-DS group is indicated by d) $p < 0.001$.

図 3 Effect of PEG modification on the initial rate of cell uptake *in vitro* (CPT-11 liposome)

Each column represents the mean $\pm$ SD of three experiments. Significant difference from the level of the sol group is indicated by a) $p < 0.001$. Significant difference from the PL-DM or PL-DS group is indicated by d) $p < 0.001$.

なり、PEG-DM で PL-DM の 1.8 倍、PEG-DS で PL-DS の 2.3 倍を示した。また、PEG 修飾化による腫瘍細胞でのリポソーム取り込み初速度の増大は、CPT-11 含有リポソームにおいても認められ(図 3)、PEG-DM で PL-DM の 1.5 倍、PEG-DS で PL-DS の 1.3 倍を示した。

一方、図 4 に示すように Ehrlich ascites carcinoma cell と PEG-DMG 水溶液をインキュベートしたところ、PEG は経時的に細胞に取り込まれ、15 分後には添加した PEG の 33.8% が細胞分画に存在していた。

③ 取り込み形態(図 5)

DXSlip もしくは DXSsol により、コントロール群に比べ LPL 活性は上昇した。DXSsol 群に tyrosine kinase inhibitor である ST-638, biochanin A, herbimycin A を添加したところ、ST-638, biochanin A 併用群では DXSsol による LPL 活性上昇を有意に抑制したのに対し、herbimycin A はまったく影響を及ぼさなかった。一方、DXSlip 群においては、ST-638, biochanin A 併用群では DXSlip による LPL 活性上昇に影響を及ぼさなかったのに対し、herbimycin A 併用群では、活性上昇を有意に抑制した。

考 察

その組織分布性、抗腫瘍性より有用性が示され

ている ADR 含有リポソーム¹³⁾を用い、ADR 内封量が *in vitro* における細胞への取り込みにいかなる影響を及ぼすかを検討する一方、PEG 修飾化の意義を CPT-11 含有リポソームとともに調べた。

今回調製したリポソームは陰性荷電の DMPG を用いているため、空リポソームにおいては、そのゼータ電位は -64.7 mV を示した。これに陽性荷電の ADR を添加すると ADR の脂溶性もありその一部はリポソーム膜中に存在するため、ゼータ電位の絶対値は低下する。ADR 内封量の増大に伴うゼータ電位の減少はこのことを裏付けている。また、これらリポソームへの PEG 修飾化は PEG 固定水層の形成によるすべり面の移動のため¹¹⁾実測されるゼータ電位に低下をもたらした。

著者らは、リポソーム構成脂質当たりの ADR 量を変化させたこれらリポソームにおいて、ADR として同用量を投与後の組織分布性を検討しており、血漿、腫瘍中において内封量の増大に伴う ADR 濃度の増加が、肝臓中においては低下が認められ、リポソーム構成脂質当たりの ADR 量が大きいほどリポソーム化の意義も大きいことを示している¹⁸⁾。組織分布性において有効であった ADR 内封量の高いリポソームは、本研究より *in vitro* での腫瘍細胞への取り込みにおいても同様に有効であることが示された。

ADR の取り込み量が低かった群においては、

図 4 Cell uptake of PEG-DMG

脂質の飽和により細胞内に多量のリポソームが入り込むことができないために細胞内の ADR レベルが低値をとってしまう結果となったと思われる。これに対し、ADR の取り込み量が高かったリポソームにおいては、内封量の増大に伴い、ADR 同濃度の添加の場合、培地中のリポソームの脂質量が減少し、その結果、細胞へのリポソームの取り込みは数に依存して増加するために内封量の増加による細胞内へのリポソームの取り込みが上昇するものと考えられた。このことは、PL-DM 1.0 (PL-DS 1.0) への空リポソームの添加が細胞内への ADR リポソームの取り込みを PL-DM 1.0 で 62%、PL-DS 1.0 で 38% 減少させたことから裏付けられた (結果は示していない)。

以上の結果により、ADR リポソームの細胞内への取り込みには、細胞懸濁液への ADR 添加量だけではなく、リポソーム内封量、すなわち添加する脂質量によっても左右されることが明らかとなった。in vitro で示されたこのような現象が、in vivo で生ずるために血中滞留性および組織分布性に内封量の影響が出現し、リポソーム構成脂質当たりの ADR 量が多いほどリポソーム化の意義も大きくなった¹⁸⁾ものと思われる。

また、オプソニンの付着を妨げ、RES 回避において有効であった PEG 修飾リポソームはそれ自身が有する固定水層¹¹⁾のために、細胞への取り込みが妨げられると予想されたが、そのような傾向はまったくなく、むしろ PEG 修飾化により細胞内への取り込み速度は増大することが明らかと

図 5 Effect of the liposomalization DXS-induced LPL release from the tumor cell

Each column represents the mean $\pm$ SD of three experiments. Significant difference from the control level in each group is indicated by a) $p < 0.001$.

なった (図 2)。すなわち、in vivo においてオプソニンの付着回避により RES 捕捉を逃れ、血中滞留後、passive targeting により腫瘍へ分布した PEG 修飾リポソームは、腫瘍細胞への取り込みに関し、非修飾リポソーム以上の移行性を期待できる可能性が示された。なお、この原因として、PEG の両親媒性があげられる。PEG 修飾リポソームは、その表面に PEG 層よりなる固定水層を形成している¹¹⁾。一方、リポソーム膜中にアンカーとしてアルキル基を埋入している PEG-DMG は、その一部が緩衝液や血漿により引き抜かれることが知られている¹⁹⁾。引き抜かれた PEG は、固定水層のシールドにより PEG 部を固定水層に保持したまま、短時間は存在すると考えられる。この時、PEG-DMG のアルキル部は、リポソーム固定水層の外に突き出している可能性があり、これが細胞膜にアタックするため、PEG 修飾リポソームにおいて細胞取り込みが早くなったと考えられる。このことは PEG を腫瘍細胞と incubation することにより、1 時間でその 33.8% が細胞膜に吸着もしくは取り込まれたことから推測できる。

以上の PEG 修飾化の結果は CPT-11 においても同様であった。すなわち、PEG 修飾化による腫瘍細胞へのリポソーム取り込み速度の増大が示された。したがって、これらの結果は ADR に特異的な現象ではなく、両親媒性の制癌剤リポソームに

共通の現象であるといえる。

以上より、細胞へのリポソーム取り込みに関し有用な知見を得たわけであるが、リポソームが細胞表面に吸着しているだけであり、細胞内へ取り込まれていない可能性も考えられた。そこで DXS リポソームを調製し検討を加えた。DXS は腫瘍細胞からの LPL の分泌を促進することが示されており、この作用は tyrosine kinase を介することが知られている¹⁷⁾。今回の実験においても、DXSol および DXSlip いずれにおいても LPL 活性は上昇した。しかしながら、各阻害剤処理後の変動には違いが認められた。

ST-638 は 4-hydroxycinnamamide 誘導体、biochanin A は genistein 誘導体の isoflavone である。両薬物は細胞の外側より作用して tyrosine kinase 活性を阻害するのに対し、herbimycin A は src gene product の tyrosine kinase 活性を阻害するため、細胞の内側より作用する。DXSol による LPL 分泌促進は、細胞の外側より作用する ST-638, biochanin A により阻害されたが、herbimycin A には阻害されなかった。

したがって、DXS は細胞膜透過性がないこともあり、細胞の外側より作用していることは明らかである。これに対し、DXSlip による LPL 分泌促進は、阻害剤によりまったく逆の現象を示した。すなわち、ST-638, biochanin A には阻害されなかったが、細胞の内側より作用する herbimycin A には阻害された。したがって、DXSlip においては、リポソームが endocytosis もしくは fusion によって細胞膜を透過するため細胞内に DXS が放出され、この DXS が細胞の内側より作用し、LPL 活性を上昇させたと思われる。すなわち、リポソームは細胞表面に吸着、その部位で崩壊するだけでなく、細胞内に確実に取り込まれていることが示唆された。

以上の結果により、内封量の多いリポソームの有効性が確認され、制癌剤含有リポソームにおいて、その抗腫瘍効果に結びつくと考えられる腫瘍細胞への取り込みは、薬物の内封量、PEG による表面修飾に影響されることが明らかとなった。特に PEG 修飾化は *in vivo* において RES への取り

込みを抑制する一方、腫瘍細胞への取り込みに関しては促進的に作用することが明らかとなり、PEG 修飾化の有用性が示唆された。

文 献

- 1) Forssen EA, Tokes ZA : Improved therapeutic benefits of doxorubicin by entrapment in anionic liposomes. *Cancer Res.* 43 : 546-550, 1983.
- 2) Goren D, Gabizon A, Barenholz Y : The influence of physical characteristics of liposome containing doxorubicin on their pharmacological behavior. *Biochim. Biophys. Acta* 1029 : 285-294, 1990.
- 3) Blum RH, Carter SK : New anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Intern. Med.* 80 : 249-259, 1974.
- 4) Yesair DW, Schwartzbach E, Shuk D, Deine E, Asbell MA : Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res.* 32 : 1177-1183, 1972.
- 5) Benjamin RS, Riggs Jr CE, Bachur NR : Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Res.* 37 : 1416-1420, 1977.
- 6) Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Von Hoff AL et al. : Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 91 : 710-717, 1979.
- 7) Gill PS, Espina BM, Muggia F, Cabriaes S, Tulpule A et al. : Phase I / II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J. Clin. Oncol.* 13 : 996-1000, 1995.
- 8) Sadzuka Y, Nakai S, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S : Effects of administered route on tissue distribution and antitumor activity of polyethyleneglycol-coated liposomes containing adriamycin. *Cancer Lett.* 111 : 77-86, 1997.
- 9) Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K : Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 51 : 4187-4191, 1991.
- 10) Sadzuka Y, Hirotsu S, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S : The study of polyethyleneglycol-coated liposomes containing CPT-11. *J. Liposome Res.* 7 : 241-260, 1997.
- 11) Shimada K, Miyagishima A, Sadzuka Y, Nozawa Y, Mochizuki Y et al. : Determination of the thickness of the fixed aqueous layer around polyethyleneglycol-coated liposomes. *J. Drug Targeting* 3 : 283-289, 1995.
- 12) Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A : Liposomes containing synthetic lipid derivatives of polyethylene glycol show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1066 : 29-36, 1991.
- 13) Sadzuka Y, Nakai S, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S : The effect of dose on the distribution of adriamycin encapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes. *J. Drug Targeting* 3 : 31-37,

- 1995.
- 14) Bangham AD, Standish MM, Watlins JC : Diffusion of univalent ion across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13 : 238-252, 1965.
 - 15) Sadzuka Y, Hirotsu S, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S : The preparation and the tissue distribution of liposomal CPT-11. *Drug Delivery System* 11 : 419-426, 1996.
 - 16) Favretto L, Tunis F : Determination of polyoxyethylene alkylphenyl ether non-ionic surfactants in waters. *Analyst* 101 : 198-202, 1976.
 - 17) Morita T, Kanagawa A, Fujii M, Ueki H : Stimulatory release of lipoprotein lipase activity with activation of protein tyrosine kinase produced by low molecular weight dextran sulfate in Ehrlich ascites tumor cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17 : 724-726, 1994.
 - 18) Sadzuka Y, Hirota S : Does the entrapped amount in the liposomes contained antitumor agent influence tissue distribution and cell uptake. *Cancer Lett.* in press.
 - 19) Matsuo S, Shimada K, Miyagishima A, Sadzuka Y, Nozawa Y, Hirota S : Determination of fixed aqueous layer thickness(FALT) around the liposomes modified with poly(ethyleneglycol). *Prog. Drug Delivery System* 6 : 1-10, 1997.