リポソーム化 CNDAC リン脂質誘導体による肺転移癌治療

浅井知浩・黒羽子孝太・岡田昌二^{*1)}、周東 智・栗野博一・松田 彰^{*2)}、塚田秀夫^{*3)}、奥 直人^{*1)}

Therapy of lung metastatic cancer by lung-targeted liposomal 5'-O-dipalmitoylphosphatidyl 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine

2'-C-cyano-2'-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine(CNDAC), a novel antitumor nucleoside antimetabolite, has a new mechanism of action for damaging tumor cells. This compound showed potent growth inhibitory activity against various kinds of human tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, 5'-phosphatidylation of the compound enhanced the antitumor activity. In the present study, we liposomalized 5'-O-dipalmitoylphosphatidyl derivative of CNDAC(DPP-CNDAC) and investigated the effect of DPP-CNDAC incorporation on the *in vivo* behavior of these liposomes by a non-invasive method using positron emission tomography (PET).

Interestingly, liposomes composed of DPP-CNDAC and cholesterol(DPP-CNDAC/CH liposomes) were observed to have a tendency to accumulate in lungs. Furthermore, this accumulation was markedly enhanced in the mice bearing lung metastatic cancer. Therefore, we attempted to use these CNDAC/CH liposomes for lung targeting and to examine the therapeutic efficacy against lung metastatic cancer. In experimental model using highly lung metastatic murine B16BL6 melanoma cells, these liposomes significantly reduced the number of lung tumor colonies as well as the size of them in a dose dependent manner. On the contrary, reduced lung colonization was not seen by use of the formulation of conventional liposomes or soluble CNDAC.

These results were coincident with the data of PET analysis, and suggesting the usefulness of DPP-CNDAC/CH liposomes for curing lung metastasis.

Tomohiro Asai・Kohta Kurohane・Shoji Okada^{*1)}, Satoshi Shuto・Hirokazu Awano・Akira Matsuda^{*2)}, Hideo Tsukada^{*3)}, Naoto Oku^{*1)}

key words : liposomes, CNDAC, DPP-CNDAC, chemotherapy, lung metastatic tumor

2'-C-Cyano-2'-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine(CNDAC)は、新しい作用機序で癌に効くように設計・合成された新規核酸系代謝拮抗剤である¹⁻⁴⁾。CNDACは、さまざまなヒト腫瘍に対して強い抗癌活性を示すことが *in vitro* と *in vivo* の試験により明らかとなっている。また、CNDACのリン脂質誘導体は、おそらくその薬物動態変化のために、CNDACを上回る活性を示すことが明らかとなっている⁵⁾。このように、CNDACおよびDPP-CNDACは新規の抗癌剤として期待されるが、癌組織への選択性がなく正常組織にも毒性を示すために、DDS製剤化が有効であると考えられる。

リポソームは組成やサイズの調製、膜修飾が容易であり体内動態をある程度制御できるため、このような抗癌剤に選択性を持たせることが可能と考えられる。特に膜修飾などにより血中滞留性を獲得したりポソームは、パッシブターゲティングにより癌組織に集積するため、その応用が期待され、実際に米国ではカポジ肉腫の治療に用いられている。

筆者らは以前にDDSを目的として、CNDACのジパルミトイルホスファチジル誘導体(DPP-CNDAC)をRES回避リポソーム化し、固形癌に対する有効性について検討した。RES回避型リポソーム化DPP-CNDACは、対照のDPP-CNDAC含有リポソームや遊離のCNDACにくらべ顕著な腫瘍退縮効果と延命効果、および副作

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

^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University 北海道大学薬学部薬化学教室

^{*3)} Hamamatsu Photonics, K. K. 浜松ホトニクス(株)
Offprint requests to : Naoto Oku, Ph.D., School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526

用の軽減を示し、固形癌治療に DPP-CNDAC の RES 回避型リポソーム化が有用であることを明らかにした⁶⁾。また、positron emission tomography (PET) を用いた非侵襲的解析⁷⁾により、RES 回避型リポソーム化 DPP-CNDAC の高い血中滞留性を証明した。さらにこの検討の過程で、DPP-CNDAC のリポソーム膜への組み込みによる体内動態に及ぼす影響について検討したところ、DPP-CNDAC とリポソームの安定化のために加えたコレステロールとから形成されるリポソーム (DPP-CNDAC/CH リポソーム) が肺に集積性を示すことを見出した。本研究では、DPP-CNDAC/CH リポソームの肺集積性についてさらに検討を加えた。すなわち、このリポソームを用いて肺転移癌に対するターゲティングを試み、その腫瘍集積性について検討した。また、この結果を基に、DPP-CNDAC/CH リポソームを肺転移癌治療に応用し、その有効性について検討した。

材 料

CNDAC および DPP-CNDAC (図 1) は、以前に報告した方法で合成した^{1,4,5)}。ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) および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)難波幸弘博士よりご供与いただいた。コレステロールは Sigma 社より購入した。reduced Triton X-100 は Aldrich 社より購入した。

方 法

(1) 細胞の調製

癌細胞として高肺転移性 B16BL6 メラノーマ細胞を用いた。細胞は 10% FBS を含む DME/Ham's F12 培地を用い、CO₂ インキュベーター中で培養し継代した。

(2) DPP-CNDAC 含有リポソームの調製

DPP-CNDAC/CH リポソームの組成は DPP-CNDAC/CH=2/1 である。対照として、組成比 DPP-CNDAC/DPPC/cholesterol/DPPG=2/2/2/1 のリポソーム (DPP-CNDAC/DPPG リポソーム) を調製した。脂質をナス型フラスコに入れ、適量のクロロホルムを加え、減圧下、クロロ

図 1 Structures of (A) 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosylcytosine (CNDAC) and (B) 5'-O-dipalmitoylphosphatidyl CNDAC (DPP-CNDAC)

ホルムを留去し脂質薄膜を形成させた。PBS(-) (pH 6.8) で水和させたのち、凍結融解を 3 回行った。その後、10 分間バス型ソニケーターで超音波処理を行い、エクストルーダーを用いて、400 nm と 200 nm の孔径のポリカーボネート膜を重ねて 3 回、100 nm の孔径のポリカーボネート膜を 3 回通すことによりサイジングを行った。リポソーム溶液中の DPP-CNDAC 濃度は、リポソームを 10% reduced Triton X-100 で可溶化したのち、1N HCl を加えて溶液の pH を 1.0 とし、280 nm における UV 吸収により測定した。

(3) DPP-CNDAC 含有リポソームの [2-¹⁸F]-FDG によるポジトロン標識

DPP-CNDAC/CH リポソームおよび DPP-CNDAC/DPPG リポソームをそれぞれ [2-¹⁸F]-FDG 溶液と混和し、凍結融解を 3 回行い、[2-¹⁸F]-FDG をリポソームに内封した。リポソームは 100 nm の孔径のポリカーボネート膜を用いて、エクストルージョンによりサイジングした。内封されなかった [2-¹⁸F]-FDG を除去するため、PBS(-) で希釈後、超遠心 (180,000 × g, 20 min) によりリポソームを洗浄し、PBS(-) に再懸濁した。

(4) Positron emission tomography (PET) による DPP-CNDAC 含有リポソームの体内動態の解析

[2-¹⁸F]-FDG を封入した DPP-CNDAC/CH リポソームおよび DPP-CNDAC/DPPG リポソームを麻酔下、5 週齢雄性 C57BL/6 マウス尾静

図 2 PET images of liposomal DPP-CNDAC accumulation in the lungs

(A) Accumulation of $[2-^{18}\text{F}]$ FDG-labeled DPP-CNDAC/DPPG liposomes in mice injected with B16BL6 cells (5×10^4 cells/mouse) 7 days before PET analysis (upper panel), or in control mice (lower panel).

(B) Accumulation of $[2-^{18}\text{F}]$ FDG-labeled DPP-CNDAC/CH liposomes in mice injected with B16BL6 cells (5×10^4 cells/mouse) 7 days before PET analysis (upper panel), or in control mice (lower panel).

脈より投与し、投与直後から 120 分間 PET 測定を行った⁷⁾。リポソームの投与量は DPP-CNDAC 量で $0.6 \mu\text{mol}$ とした。PET 画像より、各臓器の関心領域 (ROI) における放射活性を算出し、時間活性曲線を得た。肺の ROI は 100 pixel とした。肺転移癌マウス群は、PET 測定の 7 日前に 2.5×10^5 cells/ml に調製した B16BL6 細胞を 5 週齢雄性 C57BL/6 マウス尾静脈より 0.2 ml 予め投与して実験に用いた。データとしては典型的な実験結果を示したが、同様の実験を繰り返し、再現性を確かめた。

(5) DPP-CNDAC/CH リポソームによる肺転移癌治療

2.5×10^5 cells/ml に調製した B16BL6 細胞を、5 週齢雄性 C57BL/6 マウス尾静脈より 0.2 ml 投与した。癌移植 3, 4, 5, 6, 7 日後にコントロー

ルとして saline および DPP-CNDAC/CH リポソームを 0.2 ml 投与した。投与量が DPP-CNDAC 量で、投与 1 回あたり $0.4, 0.6, 0.8 \mu\text{mol}$ となるようにそれぞれリポソームを調製して検討に用いた。移植 14 日後、マウスの肺を摘出し、肺表面に形成された転移結節数とその大きさを測定することで治療効果を評価した。実験は 1 群 6 匹で行った。また、同様の実験をもう一度行い、再現性を確かめた。

(6) CNDAC による肺転移癌治療の DDS 効果

2.5×10^5 cells/ml に調製した B16BL6 細胞を、C57BL/6 マウス尾静脈より 0.2 ml 投与した。癌移植 3, 4, 5, 6, 7 日後にコントロールとして saline, 遊離の CNDAC, DPP-CNDAC/DPPG リポソーム、そして DPP-CNDAC/CH リポソームをそれぞれ 0.2 ml 投与した。投与量はすべて投与

図3 Time-activity curves of ^{18}F accumulation in the lungs after the injection of $[2\text{-}^{18}\text{F}]$ FDG-labeled DPP-CNDAC/CH liposomes. Time-activity curves were obtained from the mean pixel radioactivity in the region of interest (ROI) of the images shown in Fig. 2. DPP-CNDAC liposomes were intravenously injected into a tail vein of control mice (open circle) or tumor-bearing mice (closed circle).

1回あたり CNDAC 量で $0.6\ \mu\text{mol}$ に統一した。移植 14 日後、マウスの肺を摘出し、肺表面に形成された転移結節数とその大きさを測定することで治療効果を評価した。実験は 1 群 6 匹で行った。

結果

(1) PET による DPP-CNDAC 含有リポソームの体内動態の解析

肺転移癌マウスおよび対照として用いた無処理マウスにおけるリポソームの体内動態を、PET を用いて解析した。図 2 に、リポソーム化 DPP-CNDAC の肺における集積を断層画像として示した。DPP-CNDAC/CH リポソームは、肺転移癌マウスにおいて、対照と比較し肺へのいちじるしい集積が観察された。一方、DPP-CNDAC/DPPG リポソームでは、対照と肺転移癌マウスにこのような差は観察されなかった。

図 3 は、肺における時間活性曲線を示したものである。対照マウスでは、DPP-CNDAC/CH リポソームは肺に集積するものの、その集積は低く、特に初期に時間依存的な集積低下がみられた。一

図4 Inhibitory effect of liposomal DPP-CNDAC on experimental lung metastasis. B16BL6 cells (5×10^4 cells/mouse) were injected into a tail vein of 5-week-old C57BL/6 male mice ($n=6$). DPP-CNDAC/CH liposomes were injected i.v. on days 3, 4, 5, 6, and 7 after tumor implantation. Fourteen days later, the mice were sacrificed under anesthesia, and lung colonization was examined. (A) colony numbers $\pm$ SD, (B) average diameter of colonies $\pm$ SD. Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

方、肺転移癌マウスでは、肺に顕著な集積性を示すことが明らかとなった。

PET 解析後に各臓器を摘出し、ガンマカウンターで測定した結果は、図 2 および図 3 に示したデータを支持するものであった (data not shown)。DPP-CNDAC/CH リポソームの肺集積性は、このリポソーム特有の性質であると考えられ、肺転移巣が存在すると、さらに DPP-CNDAC/CH リポソームが特異的に集積するこ

図5 Effect of DPP-CNDAC liposomes or CNDAC on experimental lung metastasis B16BL6 cells(5×10^4 cells/mouse) were injected into a tail vein of 5-week-old C57BL/6 male mice ($n=6$). DPP-CNDAC/CH liposomes, DPP-CNDAC/DPPG liposomes, or free CNDAC($0.6 \mu\text{mol}$ as DPP-CNDAC or CNDAC) were injected i.v. on days 3, 4, 5, 6, and 7 after tumor implantation. Fourteen days later, the lung colonization in those mice was examined. (A) colony numbers $\pm$ SD, (B) average diameter of colonies $\pm$ SD. Significantly different from control(*** $p<0.001$).

とが示唆された。

(2) DPP-CNDAC/CH リポソームによる肺転移癌治療

以上の結果を踏まえ、DPP-CNDAC/CH リポソームによる肺転移癌の治療効果を検討した。DPP-CNDAC/CH リポソームは、用量依存的に肺転移結節数の減少および結節の縮小効果を示し

た(図4)。また、副作用の一指標として体重変化を観察した。DPP-CNDAC/CH リポソーム投与群で投与直後に若干の体重減少が観察されたが、その減少は一過的であり、速やかに回復した(data not shown)。

(3) CNDAC による肺転移癌治療の DDS 効果

DPP-CNDAC/CH リポソームによる肺転移癌の抑制効果を、遊離の CNDAC と比較検討した。図5に示したように、DPP-CNDAC/CH リポソームが有意に制癌作用を示すのとは対照的に、遊離の CNDAC は、この投与量では治療効果が得られなかった。また遊離の CNDAC を1回あたり倍量の $1.2 \mu\text{mol}$ を投与した場合にも治療効果は得られなかった(data not shown)。

DPP-CNDAC/DPPG リポソーム投与群では、マウスによっては肺転移結節数の減少および結節の縮小効果がみられたが、治療効果が得られないマウスが多く、全体としては有意な治療効果が得られなかった(図5)。

考 察

以上の結果より、DPP-CNDAC/CH リポソームは肺に集積する傾向にあり、特に肺転移癌ではいちじるしい集積を示すことが明らかとなった。さらに DPP-CNDAC/CH リポソームは肺転移癌治療に有用であることが示唆された。DPP-CNDAC と CNDAC は同様の機構で抗癌作用を示すため、PET 解析のデータから示唆される局所的な DPP-CNDAC 濃度の上昇が肺転移癌治療効果の向上をもたらしたのと考えられる。これまで、リポソームを用いた腫瘍組織へのターゲティングは数多く試みられているが、本研究で示したような、抗癌剤を基本組成として形成されるリポソームが肺転移巣に集積するという報告は初めてである。DPP-CNDAC/CH リポソームが肺転移巣特異的に集積する機序については現時点では不明であるが、DPP-CNDAC は強い負の電荷をもつアニオン性疑似リン脂質であり、リポソーム膜の表面電荷がなんらかの影響を与えている可能性が考えられる。特に本実験ではリポソームを、肺が第一通過臓器となる尾静脈内より投与した。し

たがって、他の投与経路による検討も興味をもたれるところである。DPP-CNDAC/CH リポソームの腫瘍集積性の性因および安定性などの検討を行うことにより、新規の腫瘍選択性の高い製剤として癌治療に有効に働くことが示唆される。

文 献

- 1) Matsuda A, Nakajima Y, Azuma A, Tanaka M, Sasaki T : Nucleosides and nucleotides. 100. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine(CNDAC) : design of a potential mechanism-based DNA-strand-breaking antineoplastic nucleoside. *J. Med. Chem.* 34 : 2917-2919, 1991.
- 2) Tanaka M, Matsuda A, Terao T, Sasaki T : Antitumor activity of a novel nucleoside, 2'-C-Cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine (CNDAC) against murine and human tumors. *Cancer Lett.* 64 : 67-74, 1992.
- 3) Matsuda A, Azuma A : 2'-C-Cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabino-furanosyl-cytosine(CNDAC) : A mechanism-based DNA-strand-breaking antitumor nucleoside. *Nucleosides Nucleotides* 14 : 461-471, 1995.
- 4) Azuma A, Nakajima Y, Nishizono N, Minakawa N, Suzuki M et al. : Nucleoside and nucleotides. 122. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosylcytosine and its derivatives. A new class of nucleoside with a broad antitumor spectrum. *J. Med. Chem.* 36 : 4183-4189, 1993.
- 5) Shuto S, Awano H, Shimazaki N, Hanaoka K, Matsuda A : Nucleosides and nucleotides. 150. Enzymatic synthesis of 5'-phosphatidyl derivatives of 1-(2-C-Cyano-2-deoxy-1- β -D-arabino-pentofuranosyl)cytosine(CNDAC) and their notable antitumor effects in mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6 : 1021-1024, 1996.
- 6) Asai T, Kurohane K, Shuto S, Awano H, Matsuda A et al. : Antitumor activity of 5'-O-dipalmitoyl-phosphatidyl 2'-C-cyano-2'-deoxy-1- β -D-arabino-pentofuranosyl-cytosine is enhanced by long-circulating liposomalization. *Biol. Pharm. Bull.* 21 : 776-771, 1998.
- 7) Oku N, Tokudome Y, Tsukada H, Okada S : Real-time analysis of liposomal trafficking in tumor-bearing mice by use of positron emission tomography. *Biochim. Biophys. Acta* 1238 : 86-90, 1995.