Anthracycline 新規制癌剤 MX2 誘導マウス組織中 過酸化脂質上昇に対するリポソーム化の効果

佐塚泰之・広田貞雄*

Effect of liposomalization on MX2, a new anthracycline derivative, induced lipid peroxidation

We examined the effect of liposomalization on the changes of lipid peroxide level and glutathione peroxidase (GSHpx) activity in mice tissues after 3'-deamino-3'-morpholino-13-deoxy-10-hydroxycarminomycin (MX2) administration. The agreement of the decrease in body weight on the 4th day after double MX2 administration (3.0 mg/kg/day $\times$ 2 days, i.p.) was similar to those after adriamycin (ADR) administration (15 mg/kg, i.p.). The lipid peroxide level in the heart and liver significantly increased after MX2 double treatment. GSHpx activity in the heart decreased to 80% on the 2nd day after MX2 injection, compared to normal activity. However, these changes are smaller than those after ADR administration (15 mg/kg). NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation in mouse liver increased, induced more by MX2 than by ADR. The combination of α -tocopherol with MX2 suppressed the increase in the lipid peroxide level by MX2 whereas did not suppress the decrease in GSHpx activity.

Thus, it is considered that two mechanisms are involved, i.e., the increase in the lipid peroxide level occurs due to the production of active oxygen from MX2 and due to MX2-induced inhibition of GSHpx. The liposomalization of MX2 suppressed both MX2 induced changes in lipid peroxide level and GSHpx activity. Namely, it is considered that MX2 induced toxicity by these changes were reduced by α -tocopherol combination or liposomalization of MX2.

Yasuyuki Sadzuka・Sadao Hirota*

key words : MX2, anthracycline, lipid peroxide,
glutathione peroxidase, liposome

anthracycline 系抗癌剤 adriamycin (ADR) は、

非常に強い抗腫瘍性と広い抗腫瘍スペクトルを有し¹⁾、繁用されている薬物の一つであるが、副作用として重篤な心筋障害を発症し、このため総投与量が制限されている²⁾。この心毒性の改善と、より高い抗腫瘍効果を目的としていくつかの誘導体が開発、市販されている³⁻⁵⁾。しかし、多剤耐性腫瘍の出現とともに、anthracycline 系内での交叉耐性が問題となり、その克服を目指して新たな誘導体の開発が進んでいる。MX2 (3'-deamino-3'-morpholino-13-deoxy-10-hydroxycarminomycin, 図 1) は、梅沢ら⁶⁾により開発された半合成の新しい morpholino anthracycline で、脂溶性が高いのが特徴である。前臨床試験において、ADR と同等以上のすぐれた抗腫瘍効果を示し⁷⁾、さらに血液脳関門を通過するため、脳腫瘍に対して有効性が示されている⁸⁾。また、MX2 は、P-glycoprotein の発現している多剤耐性腫瘍に対して *in vivo*, *in vitro* とともに効力を有し、既存の anthracycline 系化合物と交叉耐性を示さない点が特に注目されている⁹⁾。一方、ADR の心毒性は、心筋中に蓄積する過酸化脂質に起因することが Myers ら¹⁰⁾により示されており、この過酸化脂質レベル上昇は、生体内の glutathione peroxidase (GSHpx) をはじめとする脂質過酸化防御酵素の活性低下がもたらした結果であることを筆者らは明らかにしている¹¹⁾。新規薬物の MX2 は、ADR にくらべ心毒性が低いと報告されている⁷⁾が、過酸化脂質レベル、GSHpx 活性の変動は検討されていない。そこで、これらの点について検討するとともに、ADR の副作用軽減方法として有効である α -tocopherol 併用や、近年、筆者らがその有効性を確認している ADR のリポソーム化¹²⁾

* Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526 静岡県立大学薬学部薬品製造工学教室

Offprint requests to : Yasuyuki Sadzuka, Ph.D.

図 1 Structure of MX2

をMX2についても試み、副作用の改善について検討した。

材料と方法

(1) 試薬

ADRは協和発酵(株)より、ADRIACIN[®]注(注射用塩酸ドキシソルピシン)を購入した。MX2はキリンビール(株)より供与された。 α -tocopherolは和光純薬より購入し、Tween 80にて乳化後使用した。L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), L- α -dimyristoylphosphatidyl-DL-glycerol (DMPG)は日油リポソーム(株)より購入した。1,N-(monomethoxypolyethyleneglycol)-2,3-dimyristoyl-glycerol (PEG-DMG)は日本油脂(株)から提供されたもので、polyethyleneglycol (PEG)部分の平均分子量が2,000のものをを用いた。

その他の試薬は、すべて入手できるもっとも純度の高いものを使用し、再蒸留、再結晶することなく、常法に従って調製して用いた。

(2) リポソーム調製法

リポソームの調製法はBanghamらの方法¹³⁾で行った。なお、DMPC/cholesterol/DMPG/MX2 (100/100/60/18 μ mol)で調製したMX2含有リポ

ソームをplain-liposomal MX2 (PLMX2), PEG-DMGを組み込ませたものをPEG-liposomal-MX2 (PEG-LMX2)とした。

(3) マウス組織中過酸化脂質レベル, GSHpx 活性に及ぼすMX2の影響

CDF₁系雄性マウス(5週齢, 20~25 g)を、日本エスエルシー(株)より購入した。1回投与のマウスには、0日目にMX2またはADRを3.0 mg/kg腹腔内投与し、投与2日後または4日後に頸椎脱臼にて動物を屠殺した。2回投与のマウスには、同様に0日目と2日目に薬物を投与し、4日目に動物を屠殺した。いずれも心、肝、腎および肺を摘出、過酸化脂質レベルおよびGSHpx活性をそれぞれ筆者ら¹⁴⁾、Hafemanら¹⁵⁾の方法で測定した。また、血清中のクレアチンホスフォキナーゼ(CPK)は、CPK II-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した。ADRの副作用試験で用いられる用量である15 mg/kg (i.p.)投与も同時に行い、同様に測定した。

(4) MX2によるマウス組織中過酸化脂質レベル, GSHpx活性変化に対する α -tocopherol併用の効果

マウスに、 α -tocopherol 25 mg/kg/dayを4日間連続腹腔内投与し、投与0、2日目の被検薬投与の3時間後に、MX2またはADR 3.0 mg/kgを腹腔内投与した。薬物投与最終日の翌日、マウスを頸椎脱臼にて屠殺し、同様に処理した。

(5) マウス組織中過酸化脂質レベル, GSHpx活性に及ぼすMX2リポソームの影響

マウスには、ADR, MX2, PLMX2, PEG-LMX2, 3.0 mg/kgを0日目、2日目に腹腔内投与し、4日目に動物を屠殺後、同様に処理した。

(6) NADPH依存マウス肝ミクロゾーム脂質過酸化

Svingenらの方法に従って行った¹⁶⁾。なお、過酸化脂質測定の際、MX2自身の蛍光が測定を妨害するため、除蛋白によりその影響を除去した。

(7) 統計処理

各データの統計処理は、Student's t-testにて行った。

図2 Time courses of lipid peroxide and GSHpx activity in the heart of mice after MX2 administration

Significant differences from the normal value are indicated by ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$.

---●--- ADR (3.0 mg/kg) × 1
—○— ADR (3.0 mg/kg) × 2
---■--- MX2 (3.0 mg/kg) × 1
—□— MX2 (3.0 mg/kg) × 2
■ ADR 15 mg/kg

結果

(1) マウス組織中過酸化脂質レベル, GSHpx 活性に及ぼす MX2 の影響

① 体重

MX2 2 回投与により, マウスの体重は投与 1 日後から経時的に減少しており, MX2 投与 4 日目には, 投与開始時の 78.2% ($p < 0.001$) を示した。また, MX2 1 回投与では, 4 日後に若干の回復が認められた。同用量の ADR 投与では, いずれにおいても体重は減少しなかったが, ADR 15 mg/kg 投与では 25% の体重減少を示した。

② CPK 活性

MX2 投与により血清中 CPK 活性は上昇し, MX2 1 回投与 4 日後では 2.9 倍, 2 回投与では 4.1 倍にまで上昇した。また, ADR 投与群でも CPK 活性上昇が認められたが, ADR 1 回投与 4

図3 Time courses of lipid peroxide and GSHpx activity in the liver of mice after MX2 administration

Significant differences from the normal value are indicated by ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

---●--- ADR (3.0 mg/kg) × 1
—○— ADR (3.0 mg/kg) × 2
---■--- MX2 (3.0 mg/kg) × 1
—□— MX2 (3.0 mg/kg) × 2
■ ADR 15 mg/kg

日後で 1.1 倍, 2 回投与で 1.4 倍と, MX2 よりも低い上昇率だった。一方, ADR 15 mg/kg 投与では 4.9 倍に上昇した。

③ 心臓(図2)

過酸化脂質レベルは, 投与 2 日目には ADR, MX2 で各々 1.3 倍, 1.4 倍 ($p < 0.01$) に上昇した。投与 4 日目には MX2 2 回投与群のみが正常値の 1.6 倍 ($p < 0.001$) にまで上昇したが, MX2 1 回投与および ADR 投与群では, 2 日後に比べ同等か, または減少傾向を示した。GSHpx 活性は MX2 投与で減少し, 2 日後には正常値の 82% ($p < 0.05$) を示した。ADR 15 mg/kg 投与では, 過酸化脂質レベルは 2.1 倍に上昇, GSHpx 活性は 61% に低下した。

④ 肝臓(図3)

過酸化脂質レベルは, MX2 投与により著明に上昇した。1 回投与では 2 日後, 正常値の 1.6 倍

図 4 Effect of α -tocopherol on MX2-induced change in lipid peroxide level and GSHpx activity in the heart of mice

Significant difference from the control value is indicated by ^{a)} $p < 0.05$. Significant differences from the MX2+Saline value is indicated by ^{b)} $p < 0.001$.

図 5 Effect of liposomal MX2 on lipid peroxide level and GSHpx activity in the heart of mice

Significant difference from the control value is indicated by ^{a)} $p < 0.01$. Significant differences from the MX2 value is indicated by ^{b)} $p < 0.05$.

に上昇し、4日目にはほぼ正常値のレベルに回復したのに対し、2回投与群ではさらに2.0倍($p < 0.05$)に上昇した。GSHpx活性は、MX2 1回投与、2回投与とも投与2日目には正常値の88% ($p < 0.05$)、投与4日目には84% ($p < 0.01$)にまで減少した。ADR投与群では、過酸化脂質レベル、GSHpx活性ともにほとんど変化はみられなかった。また、ADR 15 mg/kg投与ではMX2投与と同様の変動を示した。

肺、腎臓における過酸化脂質レベル、GSHpxの経時変化には有意な変化は認められなかった。

(2) NADPH 依存マウス肝ミクロゾーム脂質過酸化に対する ADR, MX2 の影響 (*in vitro*)

NADPH 依存マウス肝ミクロゾーム脂質過酸化系に、ADR, MX2 をそれぞれ 100 μ M 添加し、37°C でインキュベートしたときの過酸化脂質濃度は control に対し、ADR では 1.4 倍 ($p < 0.01$)、MX2 では 4.6 倍 ($p < 0.001$) に上昇した。

(3) MX2 によるマウス組織中過酸化脂質レベル、GSHpx 活性に対する α -tocopherol 併用の効果

MX2 投与により、血清中 CPK 活性は有意に上昇した ($p < 0.001$) が、 α -tocopherol 併用によっ

て、その上昇は51.5%(MX2との有意差: $p < 0.001$)に抑制された。心臓において、MX2投与による過酸化脂質レベルの上昇は図4に示すように、 α -tocopherol併用によって有意に低下し、正常値より低い過酸化脂質レベルを示した。これに対し、GSHpx活性では、MX2投与による低下傾向を α -tocopherolはほとんど回復しなかった。

一方、肝臓でも、MX2投与による過酸化脂質レベル上昇は、 α -tocopherol併用によって有意に抑制され、正常域まで回復した。また、GSHpx活性の低下を α -tocopherol併用は回復させることはなかった。

(4) マウス組織中過酸化脂質レベル、GSHpx活性に及ぼすMX2リポソームの影響

PLMX2の粒径は 167.4 ± 50.7 nm、ゼータ電位は -36.7 mVであった。また、PEG-LMX2の粒径は 169.3 ± 56.8 nm、ゼータ電位は -14.6 mVであった。

心臓中の過酸化脂質レベル(図5)は、MX2>PLMX2>PEG-LMX2であり、リポソーム化、さらにPEG修飾化により、過酸化脂質レベル上昇は抑制された。また、GSHpx活性は、MX2による低下をPLMX2およびPEG-LMX2では回復した。

考 察

本研究において、MX2の過酸化脂質レベルに対する作用を検討する際、用いる投与量は以下のことを考慮して決定した。臨床での抗腫瘍効果は、MX2はADRの1/4の投与量で同等であり⁶⁾、LD₅₀は、マウス(i.p.)で、ADR 13.6 mg/kg、MX2 4.55 mg/kgと、MX2はADRの1/3である¹⁷⁾。また、ADRにおいて、過酸化脂質レベル上昇の検討に用いられる投与量は15 mg/kgであるため、これらの点を考慮して、MX2の投与量を3.0 mg/kg/day 1回もしくは2回投与とし、同用量のADRと比較するとともに、同毒性用量としてADR 15 mg/kgとも比較、検討した。

MX2投与後の体重変化は、2回投与で経時的に減少し、4日目には開始時の78%を示した。これはADR 15 mg/kg投与4日後と類似していた

ことより、ADR 15 mg/kgとMX2 3.0 mg/kg 2回投与はほぼ同等の毒性を有することが示唆された。

過酸化脂質レベルは、MX2 2回投与により、心臓、肝臓において有意に上昇した。心臓における過酸化脂質レベルは、MX2投与2日目には1.4倍に上昇し、その後2回目の投与でその上昇は1.6倍を示したが、1回投与では、2日目以降回復傾向が認められた。また、GSHpx活性は、2日後には正常値の80%に減少したが、1回投与、2回投与ともに、それ以降有意な変化はみられなかった。MX2 1回投与で、2日目以降、過酸化脂質レベルが回復したのは、MX2が組織内から消失したためだと思われるが、1回投与、2回投与時のGSHpx活性の低下が同程度であるのに、過酸化脂質レベルが2回投与時においてのみ大きかったのは、過酸化脂質レベル上昇にGSHpx活性低下以外の原因があると考えられた。NADPH系において、MX2からの活性酸素発生能がADRよりも高いことが確認されたため、MX2投与による過酸化脂質レベル上昇にこの機構も関与すると考えられた。しかし、MX2と抗酸化剤である α -tocopherol併用により、過酸化脂質レベル上昇が抑制されてもGSHpx活性低下が抑制されなかったことから、MX2から生じる活性酸素により過酸化脂質が上昇し、これによりGSHpxが抑制されるという機構は考えられない。したがって、過酸化脂質レベル上昇は、MX2による直接的な過酸化脂質レベル上昇と、GSHpx活性阻害により間接的に過酸化脂質レベル上昇を引き起こすという二つの作用が考えられた。また、MX2投与後のGSHpx活性の低下は、ADRと同様にMX2の本来の作用である抗腫瘍性の発現メカニズムでもあるDNA、蛋白の生合成阻害作用の結果である可能性が十分に考えられた。

一方、心筋障害により血清中に漏出するCPK活性が、MX2投与で正常値の4.1倍まで上昇したことから、心臓中の過酸化脂質レベルが上昇するとともに心筋障害を発症していることも示唆された。また、MX2による過酸化脂質レベル上昇の α -tocopherol併用による有意な抑制は、CPK値

でも同様であり、 α -tocopherol 併用が MX2 による心毒性の抑制に結びつく可能性を示していた。MX2 投与後の心臓中過酸化脂質レベル上昇は、同用量の ADR にくらべ高い上昇率を示した。しかし、LD₅₀より同程度の毒性用量である ADR 15 mg/kg 投与の場合、投与 4 日後の心臓中の過酸化脂質レベルは正常値の 2.1 倍に上昇し、GSHpx 活性は 61%に低下したことより、MX2 3.0 mg/kg 2 回投与と ADR 15 mg/kg 投与で比較した場合、心臓における過酸化脂質レベル上昇、GSHpx 活性低下は、ADR のほうが重篤であることが明らかであった。

肝臓においても、MX2 2 回投与で顕著な過酸化脂質レベル上昇が認められた。この上昇は正常値の 2.0 倍であり、GSHpx 活性も、正常値の 83.8%に低下していた。このことから、MX2 2 回投与による過酸化脂質レベル上昇は、心臓よりも肝臓で問題になると思われた。また、GSHpx 活性の低下は、心臓での低下率とほとんど同じであったことから、肝臓では、酸化系酵素の活性が心臓より高いため、MX2 による直接的活性酸素産生が大きく、過酸化脂質レベルが心臓より上昇したと考えられた。また、ADR 15 mg/kg での過酸化脂質レベル上昇が正常値の 2.0 倍であることから、MX2 3.0 mg/kg 2 回投与と ADR 15 mg/kg が、同程度の肝毒性を示すと思われた。さらに、肝臓においても、 α -tocopherol 併用により過酸化脂質レベルが抑制され、毒性の抑制に結びつく可能性が示された。

副作用軽減、主作用増強をこのような薬物併用によるのではなく、その動態変動によりもたらす手段として drug delivery system がある。そこで、別の角度より、薬物の体内動態変化による副作用軽減を目的として、MX2 のリポソーム化を行った。いままでの報告によると、ADR のリポソーム化により、心臓に分布する ADR 量が低下し、心毒性が軽減されることが示唆されている^{12,18)}。一方、リポソームは細網内皮系に取り込まれやすく、肝臓、脾臓への分布が大きくなるが¹⁹⁾、これはリポソームを PEG で修飾することにより改善できる²⁰⁾。よって、MX2 も ADR と同様にリ

ポソーム化し、毒性の検討を行った。

心臓において、過酸化脂質レベル上昇幅は MX2>PLMX2>PEG-LMX2 であり、リポソーム化、さらに PEG 修飾化により過酸化脂質レベル上昇は抑制された。また、MX2 による GSHpx 活性低下は PLMX2、PEG-LMX2 投与では緩和された。したがって、MX2 をリポソーム化することにより MX2 の心毒性が軽減されることが示された。なお、このとき、血清中の MX2 濃度はリポソーム化により増加しており、さらに PEG 修飾化による血中滞留性の増大も認められた。これに対し、副作用発現組織である心臓においては、リポソーム化、PEG 修飾化による MX2 濃度の減少が示されており、分布性の変化による副作用の軽減が図れたことが明らかとなった(データは示していない)。

以上より、MX2 は、過酸化脂質レベル上昇、GSHpx 活性低下に関して ADR と類似のメカニズムを示した。また、ADR と同用量では MX2 の毒性は強いものであるが、抗腫瘍作用をもたらす同治療用量では、ADR と同等かもしくは ADR より低い毒性を示すことが明らかとなり、これら毒性は、 α -tocopherol 併用やリポソーム化により軽減されることが示唆された。

MX2 および PEG-DMG をご供与くださいましたキリンビール(株)および日本油脂(株)に深謝致します。また、実験を実施してくださいました石原直子氏に感謝致します。

文 献

- 1) Blum RH, Carter SK : New anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Intern.* 80 : 249-259, 1974.
- 2) Carter SK : The clinical evaluation of analogs-III. anthracyclines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 4 : 5-10, 1980.
- 3) 古江 尚 : アクラルピシン. 癌と化学療法 8 : 329-331, 1981.
- 4) Kolaric K, Potrebica V, Cervek J : Phase II clinical trial of 4'-epi-doxorubicin in metastatic solid tumors. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 106 : 148-152, 1983.
- 5) Majima H : Preliminary phase II clinical study 4'-o-tetrahydropyranyl doxorubicin (THP-ADM). *Jpn. J. Cancer Chemother.* 10 : 805-810, 1983.

- 6) Umezawa H, Nakajima S, Kawai H, Komeshima N, Yoshimoto H et al. : New morpholino anthracyclines, MX, MX2 and MY5. *J. Antibiot.* 40 : 1058-1061, 1987.
- 7) Watanabe M, Komeshima N, Nakajima S, Tsuruo T : MX2, a morpholino anthracycline, as a new antitumor agent against drug-sensitive and multi-drug-resistant human and murine cells. *Cancer Res.* 48 : 6653-6657, 1988.
- 8) 新開 寛, 高橋秀明, 河合弘行 : 新規アントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質 KRN8602 (MX2・HCl) のラットにおける生体内動態, 第 47 回日本癌学会総会記事, p 566, 1988.
- 9) Acton EM, Tong GL, Mosher CW, Wolgemuth RL : Intensely potent morpholinyl anthracyclines. *J. Med. Chem.* 27 : 638-645, 1984.
- 10) Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC : Adriamycin : the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197 : 165-167, 1977.
- 11) Sazuka Y, Takino Y : Effect of adriamycin on the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in tissues of mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 89-94, 1989.
- 12) 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.
- 13) Bamgham AD, Standish MM, Watkins JC : Diffusion of univalent ions across the lamella of swollen phospholipid. *J. Mol. Biol.* 13 : 238-252, 1965.
- 14) Sazuka Y, Takino Y : Micro-determination of lipoperoxide in the mouse myocardium by thiobarbituric acid fluorophotometry. *Chem. Pharm. Bull.* 29 : 2910-2914, 1981.
- 15) Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG : Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104 : 580-587, 1974.
- 16) Svingen BA, Bus JA, O'Neal O, Aust SD : The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 254 : 5892-5899, 1979.
- 17) 大黒友路, 宮崎英治, 原 卓治, 波多野宗利, 清水源昭 : アドリアマイシンの毒性, 基礎と臨床 7 : 56-57, 1973.
- 18) Gabizon A, Goren D, Fuks Z, Barenholz Y, Dagan A, Meshorer A : Investigations of the antitumor efficacy of liposome-associated doxorubicin in murine tumor models. *Cancer Res.* 43 : 4730-4735, 1983.
- 19) Berenstein GL, Kasi L, Rosenblum MG, Haynie T, Jahns M et al. : Distribution and pharmacology of intravenous technetium-99m-labelled multilamellar liposomes in rats and mice. *Cancer Res.* 44 : 375-378, 1982.
- 20) Klibanov AL, Murayama K, Torchilin VP, Huang L : Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta* 1062 : 142-148, 1991.