悪性脳腫瘍に対する targeting 療法の開発

吉田 純・若林俊彦・水野正明*

Targeting therapy of malignant tumors

Patients with brain tumor of malignant have a very poor prognosis because of the aggressive infiltration into normal brain tissue. Successful treatment of this formidable disease requires targeting therapy for selective killing of tumor cells. Monoclonal antibody (MCA) against a glioma associated antigen, and liposomes are very promising reagents for this purpose. MCA coupled liposomes could bind with glioma cells and lead to a significant increase in the uptake of liposomal contents. A variety of chemotherapeutic agents and biological response modifiers, and also cytokine genes of interferon or tumor necrosis factor were entrapped into the liposomes. We described here the usefulness and possibility of targeting therapy using these drug delivery systems based on results of our experimental and clinical studies.

Jun Yoshida・Toshihiko Wakabayashi・

Masaaki Mizuno*

key words : monoclonal antibody, liposomes,
targeting therapy, brain tumor, gene therapy

glioma は脳実質細胞より発生し、正常脳組織へ浸潤性に増殖する悪性腫瘍である。そのため外科的に腫瘍を全摘することは不可能であり、通常術後に放射線療法と血液脳関門を通過できる限られた抗癌剤による化学療法が併用され、一部でその有効性が認められている¹⁾。

しかし両療法とも十分な治療効果を得るための投与量では、強い骨髄抑制に加え、正常脳に対する重篤な障害が報告されている。したがって、脳実質内に浸潤性に発育する glioma に対しては正常細胞に障害を与えず、腫瘍細胞のみに殺細胞効果を与える targeting 療法がもっとも理想的治療と考えられる。

そこで筆者らは以前よりヒト glioma 細胞に対

し特異的に反応するモノクローナル抗体(MCA)の作成や物質のキャリアとして数々の利点を有しているリポソームの開発を行い、すぐれた drug delivery system として考えられる MCA 結合リポソームを用いた悪性 glioma の targeting 療法について研究を進めている。ここではその研究の基礎、および臨床データを中心に報告する。

G-22 MCA の反応特異性とその対応抗原の生化学的性状

筆者らが作成したモノクローナル抗体 G-22 MCA は、ヒト glioma 細胞株 SK-MG-4 を免疫源として hybridoma 法により作成された、mouse monoclonal antibody であり、その subclass は $\gamma 2a$ に属す。この G22 MCA の反応特異性をヒト腫瘍細胞株を用いてロゼット assay 法や、間接的蛍光抗体法により解析した。

glioma (18/20), melanoma (2/2), lung cancer (3/3) で陽性を、neuroblastoma, meningioma, ependymoma, sarcoma, そして lung cancer を除く carcinoma や造血器腫瘍では陰性を示した²⁾ (表1)。

また、各組織片を 1% NP-40 により可溶化した溶液をニトロセルロース膜に dot-blot し、これを G-22 MCA を用いた間接的酵素抗体法により染色したところ、3 カ月胎児脳には陽性を示したが、8 カ月胎児脳組織、成人脳組織では陰性であった。

つぎに G-22 MCA 対応抗原の生化学的性状を分析するため、まず G-22 MCA を protein A MAPS kit にて精製濃縮したあと、CN-Br activated Sepharose 4B と結合させ、G-22 結合 affinity column を作成した。これにヒト glioma 細胞より抽出した可溶化溶液を流して pH3 の酢酸 buffer にて溶出し、この溶液を SDS-PAGE にて分離し、銀染色を行った。その結果、67 K Dalton

* Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466, Japan 名古屋大学医学部脳神経外科教室

表 1 Reactivity of G-22 mouse monoclonal antibody

immunogen: SK-MG-4 (human glioma cell line). subclass: $\gamma 2a$

neural		melanoma		hematopoietic	
glioma		Levy	+	T cell	
SK-MG-1	+	Murawski	+	RPMI8402	-
SK-MG-4	+			CCRF-CEM	-
SK-MG-5	+	sarcoma		MOLT-3	-
SK-MG-6	+	SAOS-2	-	T-45	-
SK-MG-7	+	U-20-S	-	HPB-ALL	-
SK-MG-9	+	carcinoma		Jarkat	-
SK-MG-15	+	renal		Hut-78	-
SK-AO ₂	+	Dematolay	-	Hut-102	-
SK-MS	+	Scattola	-	B cell	
U-178-MG	+			Daudi	-
U-251-MG	+	cervix		Raji	-
U-251-SP	+	ME-180	-	Monca	-
KNS-42	+	colorectal		GM1311	-
T-98	+	HT-29	-	ARA10	-
GL-2	+			RPMI1788	-
GL-4	+	lung		BALL-1	-
GL-9	+	SK-MES-1	+	Ly-16	-
GL-11	-	SK-Lu-1	+	Ly-18	-
GL-13	-	Calu-1	+	non T non B	
MK-MG	+			NALL-1	-
ependymoma		breast		NALL-6	-
KMS-II	-	MCF-7	-	myeloid	
neuroblastoma		liver		HL-60	-
SK-N-SH	-	Hep G-2	-	K-562	-
SK-N-MC	-	pancreas		THP-1	-
		Panc-1	-	U937	-
meningioma		Paca-2	-	myeloma	
GL-8	-			Oda	-
				PRMI8226	-

(Wakabayashi, T. et al.: J. Neurosurg. 68: 449, 1988)

図 1 Electronmicrogram of SUV and MLV

リポソーム

リポソームは極性脂質を水溶液中に懸濁させて生成する、脂質二分子膜よりなる閉鎖小胞であり、超音波法、ニュクリアポアメニブレンを用いた押し出し法、あるいは逆相蒸発法などにより調整される。形態学的には、① 小さな直径の一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles, SUV), ② 大きな一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicles, LUV), ③ 多重膜リポソーム (multilamellar vesicles, MLV) に分類される (図 1)。

これらのリポソームは、生体膜の脂質二重層構造と基本的に同じ構造を有しているために本質的に低毒性であり、また抗原性が低いとされている。このため、薬物や生理活性物質 (BRM) を生体へ投与する際の輸送担体として注目されている。

リポソーム内に封入された薬剤は、周囲環境からの攻撃に対して保護されるばかりでなく、リポソームに特異性や親和性を持たせることにより、生体に対する副作用を軽減し、攻撃目標を絞る、いわゆる *targeting* 療法にも応用できる。たとえば、リポソームの構成成分にサルファタイドを加えることにより血液脳関門を通過しやすくしたり⁷⁾、ヒト glioma 細胞に親和性を持たせたり⁸⁾、またリポソーム表面に各種 MCA を結合させることにより、薬剤を抗原選択的に作用させうることが可能となった⁹⁾。

領域に single band が観察され、G-22 MCA 対応抗原がヒト glioma 細胞の細胞表面に存在する分子量 67,000 の蛋白であることが示された²⁾。

一方、この G-22 MCA はすでに臨床面でも応用されている。

たとえば、glioma 患者の髄液中にこの抗原が遊離抗原として検出されることから、抗原量を定量することで脳腫瘍の髄液診断に利用されている³⁾。また放射線同位元素を G-22 MCA に標識することにより、脳腫瘍の画像診断⁴⁾および選択的放射線療法を試みている⁵⁾。

イギリスの Coakham らは松果体部腫瘍、あるいは髄芽腫の髄腔内播種症例や、白血病やリンパ腫の脳内転移症例でみられる癌性髄膜炎に対し有効であったと報告している⁶⁾。筆者らもまた glioma の髄腔内播種症例に対して 68 MBq の ¹²⁵I 標識 G-22 MCA F(ab')₂ fragment 1 mg を髄腔内に投与したところ、髄液内の腫瘍細胞の陰性化が得られ、その有効性が認められた⁵⁾。

図2 Flow cytometry of fluorescent cells

a : glioma cells (SK-MG-4). b : neuroblastoma cells (SK-N-MC). c : ependymoma cells (KMS II)
(Kito, A. et al. : J. Neurosurg. 71 : 382, 1989)

モノクローナル抗体結合リポソームの調製と薬剤の細胞内移行

筆者らは G-22 MCA 結合リポソームを Leser-man らの方法に準じて調製した⁹⁾. すなわち G-22 MCA の遊離基を, S-S 結合架橋剤 N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を用いて化学的修飾を加え, G-22 MCA-PDP を調製した. 次いで dithiothreitol (DTT) と反応させ, S-S 結合を切断し, SH 基を露出させた.

一方で dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) の chloroform methanol 溶液を triethylamine 存在下で SPDP と反応させ, DPPE-PDP を調製した. 次いでこの DPPE-PDP を, 卵黄 phosphatidylcholine, cholesterol (モル比, 2 : 1) に 1% の割合で加えた溶液を evaporate し, 脂質薄膜を調製した. そしてこれを生理食塩水で膨潤させ超音波処置により SUV を調整し, さらに抗体に結合している SH 基 20 nmol に対し 400 nmol の PDP に相当する SUV-PDP を加え, 室温で 24 時間 incubate した. これを Sepharose CL-4B column に通し, G-22 MCA 結合リポソームを単離した.

次に筆者らは, carboxyfluorescein (CF) を封入した G-22 結合リポソームを調製し, ヒト glioma

細胞と *in vitro* にて反応させ, リポソームを内に封入した色素 (carboxyfluorescein) の glioma 細胞への取り込みを, flowcytometry を用いて検討した¹⁰⁾. リポソームに封入された高濃度 (200 mM) の CF は消光状態にあり蛍光を発しないが, 細胞内にリポソームが取り込まれ破壊されると, CF が細胞内で遊出希釈し蛍光を発するようになる.

この性質を利用して 6 種のヒト glioma 細胞株における CF 封入リポソームの細胞内への取り込みを調べたところリポソームに G-22 MCA を結合させることによりすべてのヒト glioma 細胞で強い蛍光が観察され, リポソーム内に封入した物質が効率よく細胞内へ移行することが示された¹⁰⁾.

しかし一方で, Weinstein らは, 抗体結合リポソームは標的細胞と効率よく結合するものの, 細胞内に取り込まれる量はそれほど増加しないとの報告もある¹¹⁾. そこでこの CF 封入リポソームの細胞内への移行を Free CF, リポソーム内封入 CF (Lip-CF), CF 封入 G-22 MCA 結合リポソーム CF (G-22-Lip-CF) の 3 者で比較してみた.

その結果 G-22 MCA 対応抗原陽性の細胞 (SK-MG-4) では, Free CF, Lip-CF のいずれの場合も細胞内の蛍光はきわめて弱いものに対して, G-22-Lip-CF により強い蛍光を示す細胞数の増加

図3 Cytotoxicity of G-22-Lip-MTX, Lip-MTX, and free MTX to U251-MG cells
(Kito, A. et al.: J. Neurosurg. 71: 382, 1989)

が観察された。

これに対し、G-22 対応抗原陰性のヒト neuroblastoma 細胞やヒト ependymoma 細胞では、G-22-Lip-CF による CF の細胞内移行の増加は認められず、G-22-Lip-CF が対応抗原陽性のヒト glioma 細胞とのみ特異的に結合し、細胞内に移行することが明らかとなった(図2)。

また、ヒト glioma 細胞を G-22 MCA とあらかじめ incubate して、細胞膜の G-22 MCA 対応抗原をブロックした場合には、これらの処置を加えなかった場合に比較して、強い蛍光を発する細胞数が減少することが観察された。すなわち、G-22-Lip-CF のヒト glioma 細胞内へのすぐれた取り組み効率は、G-22 MCA の特異性によるものであることが確認された。

抗癌剤封入リポソームによる抗腫瘍効果

筆者らは上記の実験結果に基づきリポソーム内にシスプラチン(CDDP)、アドリアマイシン(ADR)、メソトレキセート(MTX)などの抗癌剤を封入し、その安全性と有効性を検討した。その結果 CDDP、あるいは ADR 単独では髄腔内投与により強い神経毒性が観察されるものの、リポソームに封入したおのおのの薬剤においてはいずれもその毒性が軽減されている。また水溶性薬剤であり時間依存性に抗腫瘍作用が増強される MTX では、ヒト glioma への選択的化学療法が可能であることが示唆された。

すなわち、G-22 MCA 対応抗原陽性のヒト

glioma 細胞 U-251-MG に対して、G-22-Lip-MTX は、 10^{-7} M の濃度で強い増殖抑制効果が得られたのに対して、これと同等の効果を得るには、free MTX, Lip-MTX では 10^{-5} M の濃度を必要とした(図3)。これは、マウス細胞に対する抗体結合リポソームの効果をトリチウムリジンの取り込み抑制率で検討した、Leserman らの結果と類似している¹²⁾。

また今回の結果は、前記したごとく、G-22 MCA 結合リポソームが CF の細胞内移行性を高めるという前記の結果ともよく一致した。これに対し G-22 MCA 対応抗原陰性のヒト ependymoma 細胞株(KMSII)では、G-22-Lip-MTX の増殖抑制効果は、free MTX あるいは Lip-MTX と同等であった。

BRM 封入リポソームの抗腫瘍効果

筆者は、抗癌剤の他にインターフェロン(IFN)や、腫瘍壊死因子(TNF- α)などの各種生理活性物質をリポソームに封入し、その抗腫瘍効果を検討している。特に、脳腫瘍に対し抗腫瘍性を有することが確認されている、ヒト β 型 IFN (HuIFN- β)¹³⁾ を、リポソームに封入し、その体内動態、組織内分布さらに腫瘍細胞に対する増殖抑制効果について、free の HuIFN- β と比較検討した¹⁴⁾。

$1 \sim 5 \times 10^7$ IU/kg の割合で脳腫瘍皮下移植ヌードマウスの尾静脈より注入し、体内動態や組織内分布を経時的に測定すると、free の HuIFN- β を 5×10^7 IU 静注した場合 1 時間後の血中濃度は 10^3 IU/ml 以上であるが、2 時間後にはすでに検出不能となり、free の HuIFN- β は血中より速やかに消失することがわかった。

これに対し、HuIFN- β 封入リポソームを静注した場合には、1 時間後の血中濃度は 10^5 IU/ml 以上ときわめて高い値を示し、さらにその活性は長時間維持され、8 時間後でも 10^3 IU/ml 以上の活性を示した。

ついで静注後 1 時間での各組織内濃度を測定したところ、free HuIFN- β の投与では活性が検出されなかった脳、あるいは皮下移植脳腫瘍組織内にも、 10^2 IU/g 以上の HuIFN- β 活性が証明された。さらにその後の濃度を経時的に観察し変化を調べてみると、脳腫瘍内では長時間高濃度を維持

図4 Time course of HuIFN- β levels in the blood and several tissues of nude mice bearing brain tumor after intravenous injection of the liposome-entrapped HuIFN- β (5×10^7 IU/kg)

a: ○ blood; ● liver; △ spleen.

b: ○ lung; ● kidney; △ heart; ▲ tumor; □ brain, * undetectable

(Kato, K. et al.: J. Clin. Biochem. Nutr. 4: 139, 1988)

図5 Change in TNF levels in plasma of mouse. Lip-TNF and free TNF was injected intravenously at a dose of 10,000 U

Each point represents the mean $\pm$ SD ($n=3$).

○Lip-TNF. ●free TNF

(吉田 純・他: 神経免疫研究 1: 174, 1989)

する傾向が観察された(図4)。

一方、培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討では、HuIFN- β 封入リポソームは free の HuIFN- β とくらべ、やや高い増殖抑制効果を示した¹⁴⁾。同様の体内動態は、TNF- α をリポソームに封入した場合も観察されている¹⁵⁾。free の TNF- α の場合、静注2時間後の血中での回収率が20%以下であり、8時間以内に測定不能になったが、リポソームに封入した TNF- α の場合、静注後2時間では回収率が40%と高く、その後も20%前後の比較的高い値が長時間維持され、24時間後でもその回収率は10%を示した(図5)。

一方、TNF- α の持つ抗腫瘍性 macrophage の誘導能に関しては free TNF- α にくらべ TNF- α 封入リポソーム(Lip-TNF)でより高い効果が観察された¹⁵⁾。

遺伝子包埋リポソームによる抗腫瘍効果

HuIFN- β は、分子量 20,000、166 個アミノ酸よりなる蛋白質であり、抗ウイルス作用のほか、抗腫瘍作用、免疫賦活作用をはじめとする多面的生理活性が報告されており、主として fibroblast より産生される cytokine である。この HuIFN- β はヒト glioma 細胞に対して 100~1000 IU/ml 濃度で cytostatic、あるいは細胞の種類によっては

cytotoxic に働くことが確認されており、臨床的にも悪性 glioma 患者に抗腫瘍剤として用いられている。

通常、100~300 $\times 10^4$ IU の HuIFN- β を連日点滴静注する方法が行われている¹⁶⁾。その有効性は確認されているものの有効率は10~30%と、必ずしも満足できる治療法ではない。

一方、Larsson らは、poly I : poly C, cycloheximide と actinomycin D を用いた超誘発法により、正常 glia および glioma 細胞から内因性 HuIFN- β が産生されることを報告しており¹⁷⁾、筆者らはこの超誘発法により産生される glioma 由来内因性 HuIFN- β が、ヒト glioma 細胞に対して抗腫瘍性に働くことを確認している¹⁸⁾。さらに Collins らはヒト glioma において悪性化に伴い、9 番染色体の HuIFN- β 遺伝子の存在する領域が高頻度で欠失し、この遺伝子異常が悪性 glioma の異常増殖の原因の一つと考えている¹⁹⁾。

そこで筆者らは、特殊な脂質より調製されるリポソームと G-22 MCA を用いて、HuIFN- β の遺伝子をヒト glioma 細胞に選択的に導入し、局所に大量の内因性 HuIFN- β を産生させ、ヒト glioma 細胞を殺すインターフェロン遺伝子療法の開発を行っている。Felgner らは合成カチオン

表 2 Level of HuIFN- β released in the medium from glioma cells transfected with liposome-entrapped pSV2IFN- β
Liposomes (30 nmol of lipids) containing 1.1 μ g of pSV2IFN- β were applied to glioma cells.

	G-22-MCA	incubation time (h)			
		48	72	96	96
U251-MG	-	5 $\pm$ 3 ^{*)}	11 $\pm$ 5	24 $\pm$ 8 (46 $\pm$ 12) ^{*)}	
	+	59 $\pm$ 9	147 $\pm$ 17	178 $\pm$ 26 (906 $\pm$ 210)	
COS-1	-	101 $\pm$ 22	366 $\pm$ 79	564 $\pm$ 44 (1299 $\pm$ 74)	
	+	100 $\pm$ 16	300 $\pm$ 79	520 $\pm$ 46 (1219 $\pm$ 122)	

^{*)} Mean $\pm$ SD of 6 experiments expressed in IU/ml medium.

^{**)} Mean $\pm$ SD of 6 experiments expressed in IU/mg cell protein.

(Mizuno, M. et al. : Cancer Res. 50 : 7826, 1990)

脂質, N-(1-(2,3-ジオレイオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA) という, カチオンを用いた SUV による遺伝子導入(リポフェクション)で高い遺伝子導入効率を得られると報告している²⁰⁾. その効率は磷酸カルシウム共沈殿法, DEAE-dextran 法の 5~100 倍という. しかし, この方法では, plasmid DNA が包埋されていないため, DNase の豊富な生体での利用は困難と思われる.

八木らは, pCHq110 による β -ガラクトシダーゼの発現を検討した基礎実験より, N-(α -トリメチルアンモニアセチル)-ジドデシル-D-グルタマイトクロライド (TMAG) が, 遺伝子導入用リポソームにもっとも有望な脂質であり, さらに DLPC, DOPE を TMAG に組み合わせたりポソームが TMAG の細胞毒性を減弱させ, かつサルの腎細胞由来の細胞株 COS-1 細胞に対し高い遺伝子導入効率を示すことを明らかにした²¹⁾.

筆者らはさらに TMAG, DLPC, DOPE をモル比 1 : 2 : 3 で調節したりポソームが, ヒト glioma 細胞に対する HuIFN- β の遺伝子導入に有用であり効率のよいことを明らかにした^{22,23)}.

すなわち, HuIFN- β 遺伝子を組み込んだ plasmid pSV2INF- β をこのリポソームに包埋し, COS-1 細胞, あるいはヒト glioma 細胞株 U251-MG 細胞に反応させると, HuIFN- β の発現は, 遺伝子導入後 72 時間の培養液中で, 前者が 355 IU/ml, 後者が 13 IU/ml であった. またリポソ-

ムを逆相蒸発法で調整するため, pSV2IFN- β がリポソーム内に完全に包埋され, DNase 存在下でも消化されないことも確認した. また, 筆者らは G-22 MCA 抗体を pSV2 IFN- β を包埋したりポソームに結合させ, G-22 対応抗原陰性の COS-1 細胞と陽性の U251-MG 細胞に遺伝子導入したところ, U251-MG ヒト glioma 細胞では抗体結合により 10 倍以上の発現量の増幅が示されたのに対し, COS-1 細胞では抗体結合による増幅はまったく観察されなかった(表 2).

ついで筆者らは, 遺伝子導入により, 発現された内因性 HuIFN- β の自己腫瘍細胞に対する増殖抑制効果について解析した. 遺伝子を包埋しない空のリポソームを用いた場合, G-22 MCA 抗体結合の有無にかかわらず, 培養液中に HuIFN- β 活性は認められず, また自己細胞であるヒト glioma 細胞 (U251-MG) に対する有意な増殖抑制効果も観察されなかった.

一方, pSV2IFN- β 包埋リポソームを用いた場合では, 遺伝子導入後 96 時間で培養液中の HuIFN- β の活性は 24 IU/ml と比較的低値であるにもかかわらず, 自己細胞に対する有意な増殖抑制効果が認められ, しかもこの増殖抑制効果は, 線維芽細胞由来の HuIFN- β を培養液中に 1,000 IU/ml の濃度で加えた場合よりも強かった. また G-22 MCA 抗体結合 pSV2IFN- β 包埋リポソームを用いれば自己増殖抑制効果はさらに増強された^{22,23)}(図 6).

HuIFN- β 遺伝子を用いた治療を臨床に応用するために *in vivo* でも同様の効果を観察する必要がある. そこでヒト glioma 細胞株 U251-SP 細胞をヌードマウス皮下に移植し, 得られた皮下腫瘍に対し HuIFN- β 遺伝子包埋リポソームを局注して導入したときの HuIFN- β 発現の有無および抗腫瘍効果を調べた.

その結果, 線維芽細胞由来の外因性 HuIFN- β (5×10^4 IU) の局注(腫瘍内投与)では, 増殖抑制効果は全く認められなかったにもかかわらず, pSV2IFN- β 包埋リポソームを皮下腫瘍に局注したところ, HuIFN- β が組織内で発現されるとともに, 有意に腫瘍増殖が抑制された. このリポソームを隔日計 5 回投与した結果, 遺伝子導入後 30 日までは腫瘍増殖は完全に抑制された²⁴⁾(図 7).

図6 Growth inhibition of glioma cells (U251-MG) by HuIFN- β produced by the cells transfected with pSV2IFN- β . Columns 0 and 1, control experiments 0, 0 h of incubation; 1, 96 h of incubation. Columns 2-6, data obtained at 96 h after the addition of the following samples: 2, empty liposomes; 3, antibody-coupled empty liposomes; 4, HuIFN- β produced by fibroblasts (1,000 IU/ml); 5, liposomes containing pSV2IFN- β ; 6, antibody-coupled liposomes containing pSV2IFN- β . Details are described in "Materials and Methods". Columns, means of 6 experiments; bars, $\pm$ SD. Significant difference between the indicated values: * $P < 0.01$. ** $P < 0.001$.

(Mizuno, M. et al.: Cancer Res. 50: 7826, 1990)

一方、この皮下腫瘍が 15 mm 以上に増殖すると、その中心部に cyst を形成する。そこでこの cyst 内に pSV2IFN- β 包埋リポソームを投与したところ、HuIFN- β の発現は投与後 48 時間で plateau に達し、その後少なくとも 8 日目までは 400~500 IU/ml の活性が認められた²³⁾(図8)。

すなわち、遺伝子包埋リポソームを用いれば、長時間にわたり持続的に、しかも局所で高い抗腫瘍性を持つ HuIFN- β を産生させることが可能であることが証明された。

あとがき

悪性脳腫瘍のみならず、あらゆる悪性腫瘍において、腫瘍細胞のみを選択的に殺す targeting 療法はもっとも理想的な治療法の一つであると考えられる。筆者らはモノクローナル抗体とリポソーム

図7 Growth inhibition of transplanted U251-SP human glioma by transfection with liposome-entrapped pSV2IFN- β

Group A: physiological saline (open circle).

Group B: purified fibroblastic HuIFN- β of 5×10^4 IU/20 μ l (closed circle).

Group C: empty liposomes of 150 nmol lipids/20 μ l (open triangle).

Group D: liposome-entrapped pSV2IFN- β (5 μ g DNA and 150 μ mol lipids/20 μ l) (closed triangle).

Each point represents mean $\pm$ SD (n=6). For details, see text.

(Yoshida, J. et al.: J. Clin. Biochem. Nutr. 11: 123, 1991)

図8 Changes in HuIFN- β levels in cystic fluid of transplanted U251-SP human glioma transfected with liposome-entrapped pSV2IFN- β

Purified fibroblastic HuIFN- β (2×10^5 IU/20 μ l) (open circle) or liposome-entrapped pSV2IFN- β (5 μ g DNA and 150 nmol lipids/20 μ l). (closed circle) was injected into the cyst at 0 time.

Each point represents mean $\pm$ SD (n=3).

For details, see text.

(Yoshida, J. et al.: J. Clin. Biochem. Nutr. 11: 123, 1991)

ムという、二つの drug delivery system を用い化学療法剤、あるいは生理活性物質を脳腫瘍細胞に選択的に取り込ませる方法を検討した。その結果、腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体を結合させたりリポソームにメソトレキセートを封入することにより、抗腫瘍効果の選択性を約100倍上げることが観察された。

また、HuIFN- β や腫瘍壊死因子(TNF- α)をリポソームに封入することにより、それらの生理活性物質としての作用をより長時間持続させることも明らかとなった。さらに一歩進み、筆者らは脳腫瘍細胞の増殖に関与すると思われる遺伝子異常に対して、遺伝子を腫瘍細胞に直接導入する方法について検討した。

すなわち、インターフェロン遺伝子を腫瘍細胞に選択的に導入し、直接的な抗腫瘍活性を有する内因性 HuIFN- β を産生させることに成功した。そして今回の報告の中では紹介できなかったが、その後の研究により TNF- α を前投与したり、 γ 型 IFN 遺伝子を HuIFN- β 遺伝子と同時に導入することで、腫瘍細胞が完全に撲滅され、ヌードマウスに移植したヒト glioma も完全に消退させることも可能となった。

以上の結果より、この BRM あるいはそれらの遺伝子を用いた targeting 療法が、悪性脳腫瘍に対する新しい治療法として期待されることが示された。

文 献

- Yoshida, J., Kobayashi, T., Kageyama, N.: Multimodality treatment of malignant glioma: effect of chemotherapy with ACNU and immunotherapy with N-CWS. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 24: 19-26, 1984.
- Wakabayashi, T., Yoshida, J., Seo, H., Kato, K., Murata, Y., Ratsui, N., Kageyama, N.: Characterization of neuroectodermal antigen by a monoclonal antibody and its application in CSF diagnosis of human glioma. *J. Neurosurg.* 68: 449-455, 1988.
- Yoshida, J., Yamamoto, R., Wakabayashi, T., Nagata, M., Seo, H.: Radioimmunoassay of glioma-associated antigen in cerebrospinal fluid and its usefulness for the diagnosis and monitoring of human glioma. *J. Neurooncol.* 8: 23-31, 1990.
- Yoshida, J., Mizuno, M., Inoue, I., Wakabayashi, T., Sugita, K., Seo, H., Chiba, K.: Radioimaging of human glioma xenografts with ^{125}I Labeled monoclonal antibody G-22 against glioma associated antigen. *J. Neurooncol.* 8: 221-229, 1990.
- Yoshida, J., Wakabayashi, T., Mizuno, M., Sugita, K., Seo, H., Oshima, M., Tadokoro, M., Sakuma, S.: Tumor specific binding of radiolabeled G-22 monoclonal antibody in glioma patients. *Neuro. Med. Chir. (Tokyo)* 32: 125-129, 1992.
- Coakham H. B., Lashford, L., Moseley, R.: Targeted therapy for CNS tumors with monoclonal antibodies (MAbs), in: Abstract of international symposium on advances in Neuro-oncology, 24, 1990.
- Yagi, K., Naoi, M., Sakai, H., Abe, H., Konishi, H., Arich, S.: Incorporation of enzyme into the brain by means of liposomes of novel composition. *J. Appl. Biochem.* 1: 121-125, 1982.
- 鬼頭 晃, 吉田 純, 景山直樹, 井上 達, 阿部博子, 有地 滋, 小嶋伸夫, 八木國夫: リポソームを用いる脳腫瘍の化学療法に関する基礎研究—ヒト glioma 細胞に対するサルファタイト挿入リポソームの親和性. *脳神経* 39: 783-788, 1987.
- Leserman, L. D., Barbet J., Kourilsky, F., Weinstein J. N.: Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature (Lond.)* 288: 602-604, 1980.
- Kito, A., Yoshida, J., Kajdyama, N., Kojima, N., Yagi, K.: Liposomes coupled with monoclonal antibodies against glioma-associated antigen for targeting chemotherapy of glioma. *J. Neurosurg.* 71: 382-387, 1989.
- Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R., Hagins, W. A.: *Science* 195: 489-492, 1987.
- Leserman, L. D., Machy, P., Barbet, J.: Covalent coupling of monoclonal antibodies and protein A to liposomes: specific interaction with cells *in vitro* and *in vivo*. (ed. Gregoriadis G.), *Liposome Technology*. 3, Boca Raton, FL: CRC Press, 1984, p 29-40.
- Cook, A. W., Carter, W. A., Nidzgorski, F., Akhtar, L.: Human brain tumor-derived cell lines: growth rate reduced by human fibroblast interferon. *Science (Washington DC)* 219: 811-883, 1983.
- Kato, K., Yoshida, J., Kageyama, N., Kojima, N., Yagi, K.: Liposome-entrapped human interferon- β : Its pharmacokinetics and antitumor activity against human brain tumor cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 4: 139-147, 1988.
- 吉田 純, 石山純三, 林 豊, 小嶋伸夫, 八木國夫: リポソームに包埋した腫瘍壊死因子(TNF)の glioma に対する抗腫瘍効果. *神経免疫研究* 1: 174-178, 1989.
- Nagai, M., Arai, T.: Clinical effect of interferon in malignant brain tumors. *Neurosurg. Rev.* 7: 55-64, 1984.
- Larsson, I., Landstrom, L. E., Larner, E., Lundgren, E., Miorner, H., Strannegard, O.: Interferon pro-

- duction in glia and glioma cell lines. *Infect. Immun.* 22 : 786-789, 1978.
- 18) Inoue, I., Yoshida, J., Nagata, M., Mizuno, M., Seo, H., Matsui, N. : Suparinduction of cytotoxic interferon- β in glioma cells. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 31 : 485-489, 1991.
- 19) James, C. D., He, J., Carlbom, E., Nordenskjold, M., Cavenee, W., Collins, V. P. : Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon α and interferon β -1 gene deletions in human glial tumors. *Cancer Res.* 51 : 1684-1688, 1991.
- 20) Felgener, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielson, M. : Lipofection : A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 7413-7417, 1987.
- 21) Koshizaka, T., Hayashi, Y., Yagi, K. : Novel liposomes for efficient transfection of β -galactosidase gene into COS-1 cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 7 : 185-192, 1989.
- 22) Mizuno, M., Yoshida, J., Sugita, K., Inoue, I., Seo, H., Hayashi, Y., Koshizaka T., Yagi, K. : Growth inhibition of glioma cells transfected with the human β -interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 50 : 7826-7829, 1990.
- 23) Mizuno, M., Yoshida, J., Sugita, K., Yagi, K. : Growth inhibition of glioma cells of different cell lines by human interferon- β produced in the cells transfected with its gene by means of liposomes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 9 : 73-77, 1990.
- 24) Yoshida, J., Mizuno, M., Yagi, K. : Secretion of human β -interferon into the cystic fluid of glioma transfected with the interferon gene. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 11 : 123-128, 1991.