トランスフェリン受容体を介した癌のターゲット療法

高後 裕・加藤淳二・根田 寛*

Targeting cancer therapy by transferrin receptor mediated endocytosis

The drug delivery system using transferrin receptor mediated endocytosis is described. Transferrin is a serum glycoprotein which carries iron to cells possessing its receptor. The expression of transferrin receptor has been well known to be increased in cells with malignant transformation. Our aim is to utilize the transferrin-transferrin receptor system for the specific delivery of anticancer drugs and foreign genes. Human transferrin was conjugated with anticancer polypeptide, neocarzinostatin (NCS) by using (SPDP) and purified by ion exchange chromatography. The obtained Tf-NCS conjugate is capable binding to transferrin receptor and shows higher cytotoxicity. *In vivo* study using tumor inoculated mice also showed the significant growth suppression. The cytotoxicity of the conjugate was the sum of the receptor binding and intracellular degradation. Similar strategy was adopted to foreign gene transfer to tumor cells and IL-2 activated lymphocytes both of which express transferrin receptors. Transferrin was conjugated with vector containing β -galactosidase by transamination. The conjugate was effectively transferred to cells by receptor-mediated fashion and the transfected gene was expressed. This procedure would be useful for gene therapy.

Yutaka Kohgo・Junji Kato・Hiroshi Neda*

key words : receptor-mediated endocytosis, transferrin-conjugate, neocarzinostatin, drug resistance, gene therapy

腫瘍細胞へ抗癌剤などを特異的に搬送する試みの一つとして、細胞表面に豊富に存在する受容体を標的とし、そのリガンドとの複合体を運搬体として用いる方法がある。この方法は、リガンドとその受容体の特異的結合を利用し、細胞内へ藥物などを取り込ませるものである。なかでもトランスフェリン受容体は、腫瘍細胞でその発現がいちじるしく増強し、リガンドであるトランスフェリンとの特異的結合のあと、エンドサイトーシスの機構で細胞内に取り込まれることが詳細に検討されており、この方法の応用には適した分子である¹⁻³⁾。本稿では筆者らが行ってきたトランスフェリンと抗癌剤や遺伝子との複合体による受容体介在性 drug delivery system について紹介する。

トランスフェリンとその受容体の代謝回転

血清中のトランスフェリンは、細胞表面の特異的受容体と結合して腫瘍細胞内へ取り込まれる。その詳細を図1に示すが、1分子のトランスフェリンは、鉄原子を2個結合した状態(ferro-transferrin)で、受容体と結合する。その後、被覆小胞(coated pit)を形成、細胞内へ陥入、エンドソームと融合して内包化され、compartment of uncoupling for receptor and ligands(CURL)となり、多胞体(multivesicular bodies, MVBs)を介して receptor-recycling compartment(RRC)へ運ばれたあと、細胞表面へ戻される。この間に、コンパートメント内のpHが酸性側にシフトするため(したがってアシドソームとも表現する)、トランスフェリンに結合していた鉄原子は遊離し、さらに細胞質内へ移動し利用される。この機構は、細胞の代謝、分裂、増殖などに必須の鉄原子を効率よく細胞内へ取り込むために存在している⁴⁾。鉄原子のキャリアであるトランスフェリンは受容

* Department of Internal Medicine (Section IV), Sapporo Medical College 札幌医科大学第四内科学教室

図1 トランスフェリンとその受容体の代謝回転の模式図

インタクトなトランスフェリンは受容体へ結合、エンドサイトーシスされたあと、リサイクルするが、トランスフェリンと抗癌剤や遺伝子などを結合、複合体を形成させると、一部はリサイクルせず、リソソームへ搬送されたのち生物活性を発揮する。

体と結合し内包化とされたあと、結合鉄イオンを放出し、アポトランスフェリンとなって細胞表面へリサイクルされ、再び血清中で再利用される。

受容体の内包化には、受容体の細胞質ドメインにある芳香族アミノ酸を含む YXRF(Tyr-X-Arg-Phe)モチーフが重要であることが明らかとなったが⁵⁾、上皮増殖因子など、そのままりサイクルせずリソソームへ移行してしまうリガンドと異なりその後のリサイクルがどうして起きるのか、詳細な点は不明のままである。インタクトなトランスフェリンに、金コロイドなどを結合させ、その細胞内での移行経路をみると、リサイクルせずリソソームへ移行、細胞内へ貯留することから、トランスフェリンになんらかの化学修飾を加えると、細胞内運搬経路を変更させることができる可能性を示している。

トランスフェリン-抗癌剤複合体

トランスフェリンに抗癌剤を結合させ、受容体を介して特異的に細胞内へ搬送させるためにはいくつかの条件を満足しなければならない。まず第一に、トランスフェリンと抗癌剤との複合体が、おのおのの生物活性つまり受容体結合能と抗腫瘍

活性を保持したまま作製されること、第二に、複合体が受容体を介して細胞表面に結合し、エンドサイトーシスされること、第三に、細胞内にとどまり抗腫瘍活性を発揮することである。筆者らは、抗腫瘍性ポリペプチドであるネオカルチノスタチン(neocarzinostatin, NCS)を用い、SPDP法によりヒト鉄飽和トランスフェリンとの複合体を作製、その複合体がNCS自身にくらべどのような利点を有しているか検討している。

当初作製したTf-NCS複合体は、トランスフェリン1分子当たり平均2.4分子のNCSを結合したもので、トランスフェリンにNCSが1から6分子結合したものの混合物であった⁶⁾。この複合体は、フリーのNCSにくらべ明らかな抗腫瘍効果の増強がみられた。細胞表面に結合したあと、約10分でアシドソームへ移行し、一部はリソソームまで移動し分解されることをパコール密度勾配遠心法で確かめた。

Sasakiらは、この混合物をさらにイオン交換クロマトグラフィーによるゲル濾過法により分画して、トランスフェリン1分子とおおのNCS1から6分子まで結合させた複合体を得、これらの受容体への結合能と細胞障害活性を比較した⁷⁾。図2にその結果を示すが、トランスフェリン受容体への結合能は、トランスフェリンへNCSが1から5分子まで結合させると順次低下し、NCSを6分子結合させると完全に失われる。

このことは、分子量8万のトランスフェリンに分子量1万のNCSを結合させていくと、受容体への親和性が低下していくことを意味するが、それは、NCSによるトランスフェリンの化学修飾による立体構造の変化や、結合部位のマスキングが関係しているであろう。

一方、ヒト白血病由来のK562細胞を標的として複合体の抗腫瘍活性をみると、Tf-4NCS、Tf-3NCS、Tf-2NCS、Tf-1NCSの順であり、受容体に結合活性を示さないTf-6NCSは抗腫瘍活性を示さなかった。複合体が抗腫瘍活性を発揮する際、一つには受容体へ結合して細胞内へエンドサイトーシスされることが重要であるが、もう一つに、細胞内へ取り込まれた複合体が、インタクトなトランスフェリンと異なり、リサイクルせずリソソームへ搬送され分解、活性基であるクロモフォ

図2 異なるモル比のトランスフェリン-NCS 複合体の受容体結合能と細胞障害活性
イオン交換クロマトグラフィーで分離した NCS とトランスフェリンの異なる結合モル比の複合体は、おのおの受容体結合能は異なり、最終的な細胞障害活性は、受容体結合能と細胞内代謝過程の総和で決定される。

アを遊離することが必要である。

放射性ヨードで標識した複合体の細胞内動態を、トリクロル酢酸沈澱法で、酸可溶の小ペプチドと酸不溶のインタクトな分子にわけ、放射能を測定すると、Tf-4NCS が Tf-1NCS よりも、より細胞内でデグラデーションを受けやすいことが明らかとなった。したがって、受容体介在性の抗癌剤-リガンド複合体で、最適な分子種を選択する際には、結合と代謝のオーバーオールな結果に注意する必要がある。対馬ら⁸⁾は、Tf-NCS 複合体をヒト大腸癌細胞を皮下移植したヌードマウスへ投与し、その抗腫瘍効果をみたところ、フリーの NCS にくらべ有意な腫瘍増殖抑制作用を認めた。副作用としては、軽度の貧血が出現したのみで、それも対照として用いたフリーの NCS と同程度のものではあった。放射性ヨード標識複合体を、尾静脈より投与し、経時的にオートラジオグラフィを行ったところ、当初、肝、肺、骨髄、その他全身の臓器に分布していた放射能が、48 時間後には移植した皮下腫瘍に残留していることを認めている。

さらに、ヒト白血病患者末梢血液から、白血病細胞を採取し、その細胞表面トランスフェリン受

容体数と Tf-NCS 複合体に対する感受性を検討した。その結果、表面受容体数が多い細胞で、Tf-NCS 複合体への感受性が高いことを確認した⁹⁾。将来的には、直接投与のほか、骨髄移植細胞における *ex vivo purging* にも利用できる可能性がある。

このように、Tf-NCS 複合体は、通常細胞内へ抗癌剤を取り込ませるのとは異なった経路を用いるわけであるが、このことは、細胞内へ通常より高濃度の抗癌剤を取り込ませる意味と同時に、抗癌剤のエフラックスや中和などによる解毒と耐性化をも克服できる可能性がある。筆者らは、大腸癌由来細胞 M7609 を NCS 存在下で培養し、順次 NCS 濃度を上げていくことにより、NCS に対する耐性株を樹立した。この細胞の IC₅₀ は、1.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、親株のそれ (IC₅₀=0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$) にくらべ明らかに耐性となっていた。この細胞の耐性は、細胞質内のグルタチオン S 転移フェラーゼ π (GST π) の増加によるものであったが、この耐性は、NCS のかわりに等 NCS モルの複合体を用いると克服された (図 3)。

このように、同一抗癌剤でも、細胞内へ別経路を用いて搬送すると、耐性の克服ができる可能性が示されたわけであるが、その機序としては、① 受容体を介することにより、より高濃度の NCS が細胞質内へ移行し、GST π による中和機構を凌駕した可能性と、② 受容体からアシドソーム、リソソームを経由、遊離した活性基であるクロモフォアがなんらかの細胞内経路 (実際には明らかではない) を経て、より選択的に核に移行した可能性などがあげられるため、現在詳細を検討中である。

トランスフェリン-遺伝子複合体

前項で述べてきたように、トランスフェリンと NCS の複合体は、効率よく細胞内へ取り込まれ、しかも代謝されたあと、核へ移行し、核酸のフラグメンテーションを起こし抗腫瘍効果を発揮する。用いた NCS は分子量約 1 万で、4~5 分子の NCS がトランスフェリン (分子量約 8 万) 結合しても受容体への結合親和性を保持している。同様な試みが、外来遺伝子を用いても可能であれば、新しい遺伝子導入法として開発できる可能性がある。

図3 トランスフェリン-NCS 複合体による NCS 耐性の克服

NCS 耐性ヒト大腸癌由来 M7609 細胞に対し、トランスフェリン-NCS 複合体は、受容体を介して細胞内へ取り込まれることより、抗腫瘍効果が増強される。

る。

最近、筆者らは、トランスフェリンと遺伝子の複合体を作製し、それが受容体を介して細胞内へ取り込まれ、かつ遺伝子発現が起きるか否かについて検討を行っている⁹⁾。教室の根田らは、トランスフェリンと β ガラクトシダーゼ (β gal) 遺伝子を組み込んであるベクターを、トランスアミネーションにより結合させ、トランスフェリン- β gal 遺伝子複合体を作製した (in preparation)。

この複合体は、トランスフェリン受容体を豊富に発現しているヒト白血病由来 K 562 細胞に取り込まれ、細胞内で β ガラクトシダーゼの酵素活性を発現した (図 4)。この発現は細胞外液に過剰量のトランスフェリンを存在させると低下が起ることから、受容体を介した特異的遺伝子搬入が行われていることを示唆するものである。この方法は、トランスフェリン受容体の豊富な細胞であれば広く応用が可能である。多くの腫瘍細胞では、トランスフェリン受容体の発現が強いことから、腫瘍細胞への *in vitro* および *in vivo* ターゲティングができれば、さらにサイトカインや増殖因子を用いて、細胞のトランスフェリン受容体の発現を高めるようにすると、他の細胞への応用も可能となる。

たとえば、リンパ球をインターフェロン γ

図4 トランスフェリン- β ガラクトシダーゼ遺伝子複合体のヒト白血病 K562 細胞への受容体介在遺伝子導入

トランスフェリン受容体を介して取り込まれたリガンド-遺伝子複合体は、翻訳、転写され酵素活性が発現される。

(IL-2)で刺激すると、トランスフェリン受容体の発現が増加することから、本法を用いることができる。トランスフェリンに腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α , TNF α) の発現ベクターである pCDV-TNF を結合させ、受容体を介して遺伝子導入させると、IL-2 で活性化されたリンパ球は、高濃度の TNF を産生するようになり、抗腫瘍効果も明らかに増強される。

この方法の利点を、従来の遺伝子導入法と比較してみると、電気穿孔法やカルシウム沈澱法にくらべ導入効率がよいこと、リポフェクチン法のような細胞毒性がないこと、レトロウイルスを用いた場合の細胞指向性と異なり、より選択性を持たせることができるなどである。

ところで、取り込まれた遺伝子が効率よく発現されることの根拠としては、遺伝子自体がきわめて塩基性の荷重を持つため、なんらかの方法で強制的に細胞内へ送りこめれば、自然に核内へ移行するとする考えかたがあるが、トランスフェリン-NCS 複合体の場合には、受容体を介して搬入されたトランスフェリン-遺伝子複合体が細胞質内小器官で代謝を受ける過程でより効率よく核内へ運ばれる可能性もあると思われ、細胞内での代謝運搬過程について現在検討中である。

受容体介在 DDS の将来性

最後に、トランスフェリン受容体を含め、受容体介在性 drug delivery system の将来性について、その問題点をふくめて述べることにする。細胞表面で DDS の標的受容体として考えられている分子としては、トランスフェリン受容体のほか、アシアロ糖蛋白受容体, epidermal growth factor 受容体, IL-2 受容体などがあり、おのおののリガンドに抗癌剤, トキシンや遺伝子を結合させる試みが行われつつある¹⁰⁻¹⁵⁾。もちろん生体内では、native なリガンドが存在しそれが複合体の受容体への結合の効率に影響を与える可能性や、さらにアルブミンなどの血清蛋白質も炎症や腫瘍局所に集積するいわゆる非特異的集積との違いについても常に考慮し明らかにしておく必要があるなど、将来の臨床応用に向けての基礎的データを蓄えておく必要があろう。

DDS のキャリアとしてのトランスフェリンは受容体への特異性が高く、かつ細胞内での代謝過程が明確にされやすいなどの利点を有していること、薬剤ばかりでなく、遺伝子の搬送にも応用できる可能性があるため、将来性のある研究対象であると考えている。

本レビューは、第8回 DDS 学会シンポジウム

“癌のターゲット療法”での発表内容を中心に書き下ろした。機会を与えていただいた谷内 昭会長に深謝致します。また、本研究の一部は、癌研究振興財団助成金、厚生省癌研究助成金、文部省科学研究費、寿原記念財団助成金により行われた。

文 献

- 1) Klausner, R.D. et al. : J. Biol. Chem. 258 : 4715, 1983.
- 2) 高後 裕・他 : 蛋核酵 37 : 26, 1992.
- 3) Aisen, P., Listowsky, I. : Annu. Rev. Biochem. 49 : 357, 1980.
- 4) Stoorvogel, W. et al. : Liver Diseases-targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands. Dekker 1991, p 267.
- 5) Collawan, J.F. : Cell 53 : 1061, 1990.
- 6) Kohgo, Y. et al. : Jpn J. Cancer Res. 81 : 91, 1990.
- 7) Sasaki, K. et al. : Jpn. J. Cancer Res. 84 : 191, 1993.
- 8) 対馬伸泰・他 : 札幌医誌 60 : 379, 1991.
- 9) 高後 裕 : Annual Review 血液. 中外医学社, 1992, p 58.
- 10) Cawley, D.B. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 3383, 1981.
- 11) Cawley, D.B. et al. : Cell 563, 1980.
- 12) Lorberboum-Galski, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. : 85, 1922, 1988.
- 13) Wu, G. et al. : J. Biol. Chem. 264 : 16985, 1989.
- 14) Wagner, E. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 3410, 1990.
- 15) Neda, H. et al. : J. Biol. Chem. 266 : 14143, 1991.