標的リポソームを用いての薬剤の細胞内輸送に関する研究

鈴木啓一郎^{*1)}, Lee Leserman^{*2)}, Patrick Machy^{*2)},松本純夫^{*1)}, 多田隈卓史^{*3)}*Study of drug delivery into the cytoplasm with targeted liposomes*

Several parameters have been established as important for the efficient delivery of liposomes-associated molecules. A non-exhaustive list includes parameters, such as size of liposomes, lipid composition, nature of the encapsulated molecule, the nature of the target molecule and the cell type expressing it.

Of these, we studied size of liposomes and target molecules on human T lymphocytes. Liposomes, composed of dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol and the modified phosphatidylethanolamine used to couple Protein A, were used as a model system to demonstrate drug transfer into specific lymphoid cells. Protein A, which selectively recognizes mouse IgG2 antibodies, was coupled to liposomes to target them specifically to defined cells types coated with IgG2 antibody. Methotrexate(MTX)-containing liposomes of different sizes(0.05, 0.1, or 0.2 μ m), targeted to the major histocompatibility complex(MHC)-encoded class I molecules, were evaluated by their efficiency. It was clearly demonstrated that large liposomes are internalized by human lymphoid cells less well than smaller liposomes.

And we have examined two T lymphocyte cell surface molecules, CD4 and CD7, as targets for specific drug delivery of drugs from targeted liposomes. CD7 was shown to be a good target for drug delivery. But CD4 targeted liposomes, in contrast, was ineffective.

Hiroichiro Suzuki^{*1)}, Lee Leserman^{*2)},
Patrick Machy^{*2)}, Sumio Matsumoto^{*1)},
Takushi Tadakuma^{*3)}

key words : drug delivery, size of liposomes,
CD4, CD7

標的リポソームによる治療は大変有用と考えられているが、その臨床応用は現時点では限られている。リポソームは作製が容易であり多量の薬剤を修飾することなく封入することができる利点があるが、一方、多くの高分子物質と同様に肝臓などの RES 系組織により排除されること¹⁾、血管から標的とする実質組織への移行がわるく標的組織への集積が期待されたほどではないこと²⁾、多くの腫瘍抗原は細胞内への取り込みが明らかでないことなどの問題点がある。今後、リポソームを臨床に応用していくためにはこれらの問題点を解決しなくてはならない。

筆者らは標的リポソームと細胞の相互関係につき検討し細胞膜の性質を明らかにしてきたが、このような知識の集積はターゲティングの効率を向上させることが予想される。抗癌剤封入リポソームに抗体を結合させることにより細胞表面分子の細胞内へのエンドサイトーシスを検討することができる。抗癌剤は細胞内で作用するので、殺細胞効果が、標的とした分子の細胞内へのエンドサイトーシスに関連すると報告されている^{3,4)}。

筆者らは人工脂質膜小胞であるリポソームのT細胞内への移行がリポソームの大きさ、各種の細胞表面分子により、いかにかわるかを検討した。Tリンパ球を標的細胞として研究することは白血病、AIDS などの治療、臓器移植の拒絶反応の抑制、腫瘍免疫の活性化等に応用することができる可能性があり注目されている。

標的リポソームの作成

リポソームは Leserman らの方法⁵⁾に従い作製した。すなわち、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, および N-hydroxysuccinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionate (SPDP)をあらかじめ dipalmitoylphosphatidyle-

^{*1)} Fujita Health University, School of Medicine, Second Teaching Hospital, Department of Surgery 藤田保健衛生大学医学部第二教育病院外科

^{*2)} Centre d'Immunologie INESERM-CNRS de Marseille-Luminy

^{*3)} Keio University, School of Medicine, Department of Microbiology 慶応義塾大学医学部微生物学教室

図1 Protein A 結合リポソームによる細胞の標的

生理的な環境下で IgG₂ 抗体の Fc 部に結合する Protein A をリポソームに結合することにより、いろいろな抗体と混合培養すれば異なった分子への標的化が可能である。また、同一作製のリポソームで異なった分子を標的とすることが可能となり、表面分子の細胞内への取り込みを比較することも容易である。

thanolamine(DPPE)と結合させておいた DTP-DPPEを梨型コルベンに 10:10:0.2~0.4 のモル比で混合する。エバポレーターおよび真空ポンプにて有機溶媒を除く。フラスコ壁に薄膜が形成されたあと、真空乾燥を2時間行う。これに MTX 溶液 (20 mM, 100 mM NaHCO₃ 溶液) と Ralston らの方法⁶⁾により精製した 10 mM carboxyfluorescein (以下 CF) を加え激しく振盪することにより脂質の薄膜を剥がす。つぎにドライアイス加エタノール溶液と 60°C の温湯の中に交互に入れ凍結と融解を5回行う。

このようにしてできた多重層リポソームを polycarbonate filter を装着した Exturder (Lipex Biomembranes, Inc.) で小さな単層リポソーム (SUV) にする。リポソームに SPDP を作用させ、多くの抗体の Fc 部に結合する。Staphylococcus aureus の Protein A (Pharmacia) を結合させた。抗体と混合培養することで間接的に標的細胞と結合させることができる。抗体をかえれば異なった標的に対し同一作製のリポソームが使用可能であり、標的分子の輸送効率の比較が容易である (図1)。

細胞とリポソームの相互関係

リポソーム内の薬剤を標的細胞内に輸送しようとする場合、もっとも期待される方法は細胞膜表面上の分子を認識するリガンドや抗体をリポソームに持たせることである。筆者らの作製した DPPC, cholesterol を主要構成脂質としたリポ

ソームは通常の培養条件下では安定でほとんど薬剤を放出しない。

Machy らは、このリポソームを使用してマウスの T, B 細胞等の検討で以下の事実を明らかにした⁷⁾。すなわち、① 細胞内への封入物の輸送は細胞とリポソームの融合ではなく標的分子のエンドサイトーシスによる、② エンドサイトーシスの頻度は標的分子と細胞の性質に依存する、③ リポソームが標的分子に結合したあと、標的分子の陥入 internalization, そしてエンドサイトーシスに伴ってリポソームも細胞内に取り込まれる、④ 被覆小胞がエンドゾームになるのに伴い、リポソームはしだいに細胞内の酸性環境下に入り、陰性に荷電していた MTX は脱分極し脂質の膜を通過し細胞質内に入る、⑤ エンドゾームはライソゾームに結合しリポソームは破壊される、⑥ 細胞質内に出た MTX は dihydrofolate reductase を阻害し DNA 合成を阻害する。

以上の事実は、エンドサイトーシスを阻害する薬剤である cytochalasin, colchicin により標的細胞の DNA 合成が抑制されなくなったこと⁸⁾、MTX 封入リポソームが弱酸性下で MTX を放出すること⁹⁾、標的細胞の DNA 合成抑制が細胞質内の pH を上昇させる NH₄CL により抑制されなくなったこと⁸⁾により明らかとなった。

図2は Machy らが撮影したマウス線維芽細胞 L cell をリポソームで標的したときの電子顕微鏡写真であるが¹⁰⁾、リポソームがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれているのが認められる。

図2 リポソムの細胞内へのエンドサイトーシス (電顕像, Machy ら¹⁰⁾)

マウス線維芽細胞 L cell に抗 MHC クラス I 分子抗体結合ホスラディッシュペルオキシダーゼ封入リポソムを加えた。a, b は培養 1 分後であるが黒染したリポソムが細胞膜の陥入とともに細胞内に移行している。c, d は 15 分後であるがリポソムは大空胞 large vacuole の中に数個集まってきている。e は 1 時間後であるがエンドソムがライソゾムに融合したあと、リポソムが破壊されはじめたためにリポソム内のペルオキシダーゼが漏れ出て黒染部が広がってきている。f は 4 時間後であるが、多くのリポソムは破壊され空胞内にペルオキシダーゼが広がっている。

リポソムと大きさ

extruder に pore size の異なる polycarbonate filter を装着することにより、小さなウイルスから大きな細菌ぐらいまでの大きさのリポソムを作製することができる。リポソムは大きいと血管内から実質組織内への移行がわるくなった²⁾、RES 系への取り込みが増加するので具合わ

図3 リポソムの大きさの測定

作製したリポソムをサブミクロン粒度分布分析システム (NICOMP 370) により測定した。extruder に (●)0.05 μm , (▲)0.1 μm , (■)0.2 μm の polycarbonate filter を装着後リポソムを作製し大きさを測定した。filter の size とほぼ一致したリポソムが得られた。

るいが、一方小さくすると封入率がわるくなり十分な量の薬剤を輸送できなくなる可能性がある。筆者らは小さなリポソムでは分量を輸送できないと考えて、リポソムの最適の大きさについての検討を MTX 封入リポソムを用いて行った。

extruder に 0.05 μm , 0.1 μm , または 0.2 μm の polycarbonate filter を装着してリポソムを作製した。サブミクロン粒度分布分析システム (NICOMP 370) にてリポソムの大きさを測定した。polycarbonate filter の pore size とほぼ同等の大きさのリポソムを作製することができた(図3)。

これらの作製したリポソムを用いて T 細胞で細胞内へのエンドサイトーシスによる取り込みの効率を MTX の DNA 合成抑制と MTT の取り込み抑制にて検討した。細胞は PHA 刺激ヒト末梢血リンパ球 (T 細胞芽球)、ヒト T 細胞白血病株 CEM、組織球リンパ腫株 U937 を用いた。標的分子は細胞内にエンドサイトーシスされることがよく知られている細胞膜表面上の MHC class I 分子とし抗 HLA A, B, C 抗体 B1.23.2¹¹⁾(IgG2a) を使用した。対照としてマウスの抗 H2K 抗体 H1005/28¹²⁾(IgG2a)を用いた。ヒト T 細胞芽球、CEM では抗 HLA A, B, C 抗体で標的した 0.05 μm , 0.1 μm の大きさのリポソムの順に細胞内への取り込みが多く、0.2 μm では抗腫瘍効果が認められなかった(図4)。抗 H2K 抗体で標的した

図4 リポソームの大きさによるヒトT細胞芽球, CEMの細胞内への取り込み

各細胞に Protein A 結合 CF または MTX 封入リポソームと抗体を混合培養し, 3 時間後に ³H-deoxyuridine を添加, 12 時間後の DNA への取り込みを検討した. (×)MTX 単独, (+)抗マウスクラス I 標的 CF 封入リポソーム, (田)抗ヒトクラス I 標的 CF 封入リポソーム, (○)抗マウスクラス I 標的 MTX 封入 0.05 μ m リポソーム, (●)抗ヒトクラス I 標的 MTX 封入 0.05 μ m リポソーム, (△)抗マウスクラス I 標的 MTX 封入 0.1 μ m リポソーム, (▲)抗ヒトクラス I 標的 MTX 封入 0.1 μ m リポソーム, (□)抗マウスクラス I 標的 MTX 封入 0.2 μ m リポソーム, (■)抗ヒトクラス I 標的 MTX 封入 0.2 μ m リポソーム

リポソームは無効であった。

食細胞機能を有すると考えられる U937 では, 抗 HLA A, B, C 抗体で標的した 0.05 μ m, 0.1 μ m, 0.2 μ m のリポソームともに取り込みが認められた(図5)。

ヒトのリンパ球でのリポソームの大きさの違いによる検討はいまだないが, Machy ら³⁾はマウス

図5 リポソームの大きさによる U937 の細胞内への取り込み

U937 細胞に Protein A 結合 MTX 封入リポソームと抗体を混合培養し, 48 時間後に MTT を加え細胞内への取り込みを測定した. 各群の記号は図4と同じ。

のリンパ球にて検討し 0.1 μ m 以下のリポソームでのみ細胞内への取り込みが認められたと報告しており, 筆者らの結果と一致した. T細胞では MHC class I 分子による細胞内への取り込みは被覆小胞(coated vesicle)によりなされ, 小胞の大きさは 0.2 μ m 程度であると報告されている. 0.2 μ m 以上のリポソームではその小胞内に入れないため取り込みができないものと考えられる。

食細胞機能を有する細胞では標的効果が認められたが, リポソームの大きさが 0.2 μ m でも取り込みが認められ, 異なった機構により細胞内に取り込まれることが示唆された。

T リンパ球表面分子への標的

T リンパ球に対する targeting にはイムノトキシン, リポソームともに多くの報告がある^{13,14)}. 筆者らは CD4, CD7 分子を標的としたときの細胞内への取り込みを検討した. CD4 分子は分子量約 60,000 で, AIDS の原因ウイルスである HIV の T細胞上の標的分子として注目されている. CD7 は分子量約 40,000 で, T細胞の発達段階でごく初期に発現し, 現在のところ生理的機能は明らかではないが, もっとも信頼される T細胞白血病マーカーとされている¹⁵⁾. 抗 CD7 抗体結合イムノトキシンでは強い蛋白抑制効果が得られたとの報告がある^{4,13,14)}.

表 1 細胞膜表面分子の発現

細胞	細胞膜表面分子					蛍光標識
	対照抗体 (H2K)	CD4 (BL4)	CD4 (OKT4A)	CD7 (8H8.1)	HLA (B1.23.2)	
T細胞芽球	4.0	31.2	22.4	120.4	641.6	FITC
T細胞芽球	10.7	47.0	22.4	110.8	638.8	リボソーム
CEM, MRS	2.1	135.0	117.0	162.6	137.5	FITC

細胞と抗体を培養後、Protein A 結合 CF 封入りリボソームまたは FITC 標識抗マウス IgG 抗体を加え、フローサイトメトリーで細胞膜表面分子の発現を測定した。細胞のみで測定した内因性フルオレッセンスの値を 1 としてあらわしている。

図 6 CD4, CD7 標的リボソームによるヒト T細胞芽球, CEM-MRS と DNA 合成抑制の検討

ヒト T細胞芽球または CEM, MRS に Protein A 結合 MTX 封入りリボソームと抗 CD4 抗体 (▲: BL4, △: OKT4a), 抗 CD7 抗体 (■), 抗ヒトクラス I 抗体 (●) を混合培養し, 3 時間後に ^3H -deoxyuridine を添加, 12 時間後の取り込みを検討した。MTX 単独 (×) を対照群としておいた。

標的細胞としてヒト末梢血 PHA 刺激リンパ球, CEM 細胞の CD4 高発現株をクローニングした CEM-MRS を用いた。CD4 分子に対する抗体は BL4¹⁶⁾ (IgG2a, Immunotech), OKT4A (IgG2a,

Ortho), CD7 に対しては 8H8.1 抗体¹⁵⁾ (IgG2a) を使用した。また, 対照として抗 HLA A, B, C 抗体 B1.23.2 を使用した。

各分子の細胞表面上の発現をフローサイトメトリーで比較したのが表 1 である。T細胞芽球の各表面分子を CF 封入りリボソームと FITC 標識抗体により染色したが両者に差を認めなかった。作製したリボソームが特異的に結合していることを示している。CEM-MRS の CD4 の発現は HLA の発現とほぼ同程度認められた。

それぞれの分子に対する抗体とプロテイン A 結合 MTX 封入りリボソームを混合培養し, MTX によるデオキシウリジンの取り込み抑制によりリボソームの細胞内への取り込みを検討した。CD7 に対して標的したリボソームは HLA に対してより高い DNA 合成抑制が認められ, 細胞内へ多く取り込まれることがわかった。しかし, CEM-MRS では HLA と同程度細胞表面に CD4 分子を発現しているにもかかわらず, CD4 標的リボソームはまったく DNA 合成抑制を認めなかった (図 6)。

MTX 封入りリボソームによる DNA 合成抑制が表面分子のエンドサイトーシスと一致していることを確認する目的でプロテイン A に ^{125}I を標識し抗体と混合培養することにより表面分子の細胞内へのエンドサイトーシスを検討した (表 2)。CD7 分子は HLA 分子より多く細胞内に取り込まれているのに対し, CD4 分子はほとんど細胞内に取り込まれないことが明らかとなった。

結 論

T細胞を標的とする場合, リボソームの大きさが $0.2\ \mu\text{m}$ 以上では無効であること, CD7 分子が

表2 CD4, CD7 分子の CEM-MRS 細胞内への取り込み

標的分子	全結合 ^{125}I	酸低抗性 ^{125}I	
		4°C	37°C
CD4	7410±500	330±50	310±40
CD7	13560±1010	920±130	5640±640
HLA	8830±210	910±40	2290±440

CEM-MRS 細胞に CD4, CD7, または HLA に対する抗体を 4°C, 1 時間反応後洗浄し, ^{125}I 標識 Protein A を加え再び 4°C, 1 時間反応後洗浄した, 10^6 個の細胞に結合している ^{125}I を測定し初期の全結合 Protein A とした. その後, 4°C または 37°C にて 90 分間培養後, 4°C の pH4.5 の酢酸バッファーにて 5 分間処理し細胞表面の Protein A を遊離させ, 再び洗浄し ^{125}I を測定した.

よい標的分子となりうる事が示された. 細胞内への薬剤輸送効率には標的分子の密度, 標的分子の細胞内へのエンドサイトーシスの効率, リポソームの細胞内での薬剤放出などに依存すると考えられる.

今後の展望

癌化学療法の DDS の理想とするところは, 抗癌薬剤の細胞内の薬剤作用部位までの送達であるが, 効率よい targeting 療法には腫瘍特異的な分子の細胞レベルでの検討が必須と考えられる. 現在のところ細胞内に効率よく取り込まれる腫瘍関連抗原は少なく, 今後の検討が期待される.

最近注目されている遺伝子治療へのリポソームの応用が期待されている^{17,18)}. 筆者らの検討してきた薬剤運搬効率のよい大きさのリポソームはウイルスの大きさと類似している. 細胞内に効率よく遺伝子を運搬することにより子孫を増やせるようなウイルスが自然淘汰されてきたことがうかがえる.

リポソーム内に遺伝子を封入することにより外界の酵素による遺伝子の分解を防ぎ, さらに細胞内に効率よく遺伝子を運搬することができる可能性がある. 自然界にあるウイルスを模していくことにより効率のよい遺伝子治療が可能と考えられる. HIV ウイルスは T 細胞の CD4 分子に対して結合する分子を持っているが, 筆者らの検討でも

示されたように細胞内へはエンドサイトーシスされない. HIV ウイルスは T 細胞に結合する分子だけでなく細胞膜と融合する分子を持っている. 融合することにより, 直接, 細胞内に運ぶことができる.

リポソームにも HIV のような融合蛋白を結合できれば, より高い細胞内輸送効率が期待できる. しかし, 融合するようなリポソームは非特異的な輸送や不安定などの問題点も予想され今後の検討が必要と考えられる.

文 献

- 1) Konno, H., Suzuki, H., Tadakuma, T., Kumai, K., Yasuda, T. et al.: Antitumor effect of adriamycin entrapped in liposomes conjugated with anti-human α -fetoprotein monoclonal antibody. *Cancer Res.* 47: 4471-4477, 1987.
- 2) Poste, G.: Liposome targeting *in vivo*: problems and opportunities. *Biol. Cell* 47: 19-39, 1983.
- 3) Machy, P., Leserman, L. D.: Small liposomes are better than large liposomes for specific drug delivery *in vitro* *Biochim. Biophys. Acta* 730: 313-320, 1983.
- 4) Preijers, F. W. M. B., Tax, W. J. M., Witte, T. D., Janssen, A., Heijden, H. V. D. et al.: Relationship between internalization and cytotoxicity of ricin A chain immunotoxins. *Br. J. Haematol.* 70: 289-294, 1988.
- 5) Leserman, L., Langlet, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Machy, P.: Positive and negative liposome-based immunoselection technique. *Methods in biology* 32: 447-471, 1989.
- 6) Ralston, E., Hjelmeland, L. M., Klausner, R. D., Weinstein, J. N., Blumenthal, R.: Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions: effect of impurities, and purification of the dye. *Biochim. Biophys. Acta* 649: 133-137, 1981.
- 7) Machy, P., Leserman, L.: Interactions between cells and liposomes. *Liposomes in cell biology and pharmacology*. (INSERM), John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, 1987, p 99-165.
- 8) Barbet, J., Machy, P., Truneh, A., Leserman, L. D.: Endocytosis of monoclonal antibody-bearing liposomes. *Biol. Cell* 45: 368, 1982.
- 9) Barbet, J., Machy, P., Truneh, A., Leserman, L. D.: Weak acid-induced release of liposome-encapsulated carboxyfluorescein. *Biochim. Biophys. Acta* 772, 347-356, 1984.
- 10) Machy, P., Truneh, A., Gennaro, D., Hoffstein, S.: Endocytosis and de novo expression of major histocompatibility complex encoded class I molecules: kinetic and ultrastructural studies. *Eur. J. Cell. Biol.* 45, 126-136, 1987.

- 11) Rebai, N., Malissen, B. : Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue antigens* 22 : 107-117, 1983.
- 12) Lemke, H., Hümerling, G. J., Hümerling, U. : Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 47 : 175-206, 1979.
- 13) Carrier, D., Arcier, J. M., Derocq, J. M., Fontaine, C., Richer, G. : Antigenic modulation induced by four monoclonal antibodies adsorbed on gold particles (specificity anti-CD4, anti-CD5, anti-CD7, and anti-150-kDa antigen) : relationship between modulation and cytotoxic activity of immunotoxin. *Exp. Cell. Res.* 182 : 114-128, 1989.
- 14) Derocq, J. M., Laurent, G., Casellas, P., Vidal, H., Poncelet, P. et al. : Rationale for the selection of ricin A-chain anti-T immunotoxins for mature T cell depletion. *Transplantation* 44 : 763-769, 1987.
- 15) Reinherz, E. L., Haynes, B. F., Nadler, L. M., Bernstein, I. D. : Summary of T cell studies performed during the second international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens. *Leukocyte typing II.* (ed. Haynes, B. F.), Springer Verlag, New York, 1986, p 3-30.
- 16) Sattentau, Q. J., Arthos, J., Deen, K., Hanna, N., Healey, D. et al. : Structural analysis of the human immunodeficiency virus-binding domain of CD4. *J. Exp. Med.* 170 : 1319-1334, 1989.
- 17) Leonetti, J. P., Machy, P., Degols, G., Lebleu, B., Leserman, L. : Antibody-targeted liposomes containing oligodeoxyribonucleotides complementary to viral RNA selectively inhibit viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2448-2451, 1990.
- 18) Juliano, R. L., Akhtar, S. : Liposomes as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. *Antisense Res. Develop.* 2 : 165-176, 1992.