ステルスリポソームを用いた抗癌剤の開発

丸山一雄*・山下 純・鈴木 亮・滝澤知子・宇都口直樹

帝京大学 薬学部 〒199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091

Development of PEG-Liposomal Formulation Encapsulating Anti-cancer Drugs

Kazuo Maruyama*, Atsushi Yamashita, Ryo Suzuki, Tomoko Takizawa and Naoki Utoguchi

Teikyo University, School of Pharmaceutical Sciences
Sagamiko, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195, Japan

Newly developed liposomes, containing amphipathic polyethylene glycol (PEG) derivatives, are not readily taken up by the macrophages in the RES and hence stay in the circulation for a relatively long period of time. PEG is useful because of its ease of preparation, relatively low cost, controllability of molecular weight and linkability to lipids or proteins including the antibody by a variety of methods. The presence of PEG reduces binding of serum protein, i.e. opsonins marking the liposome for clearance by MPS. PEG-liposome can take advantage of the EPR effect (enhanced permeability and retention effect) for efficient targeting binding in the tumor. The blood clearance of immunoliposomes must be minimized in comparison with rate of extravasation in the tumor. PEG-liposomes offer the development of immunoliposomes with both long survival times in circulation and target recognition being retained *in vivo*. For the active targeting following the passive targeting to the solid tumor tissue, transferrin (TF) was conjugated to prepare the pendant type immunoliposome (TF-PEG-LP). When TF-PEG liposomes were injected, we observed a prolonged residence time in the circulation and low uptake by the RES in tumor-bearing mice, resulting in enhanced accumulation of drug into the solid tumor tissue. In a more important thing, TF-PEG-LP could be internalized into tumor cells with receptor-mediated endocytosis following extravasation into tumor tissue. In this review, the potential advantages of using TF-PEG-LP for site-specific delivery of anti cancer drugs will be introduced.

Key words : liposome / polyethylene glycol / DDS / transferrin / doxorubicin / EPR effect

1. はじめに

近年のナノテクノロジー分野における技術革新は目を見張るものがあり、日進月歩でその技術が飛躍的に進歩している。このナノテクノロジーは、医薬品業界でも非常に注目されており、難溶性医薬品の可溶化、徐放性製剤や特定組織への薬物送達製剤などの薬物送達キャリアー開発の分野において有望な

技術であると期待されている。最近では、ナノテクノロジーを駆使して開発された薬物キャリアーを利用する医薬品が、ナノメディシンと呼ばれるようになっている。このナノメディシンに用いられている薬物キャリアーとしてリポソーム、エマルジョン、ミセル、ゲル、高分子粒子などが広く知られている。これらキャリアーには様々な特性があり、キャリアー自身の物性や薬物徐放速度、組織分布などの特性を生かした封入薬物や適応疾患の選択が必要となるものの、既存や新規医薬品の有効性や安全性を向上するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術として注目されている。

* Corresponding Author

Tel : 0426-85-3722 Fax : 0426-85-3432

e-mail : maruyama@pharm.teikyo-u.ac.jp

Fig. 1 Scheme of conventional, PEG and immunoliposome.

リポソームは脂質を主体とする閉鎖小胞であり、様々な薬物を封入・会合可能であるため薬物キャリアーとして期待されている。これまでに数多く論文や特許でリポソームの有用性が報告されている。現在では、欧米においてであるがリポソーム製剤として7品目が上市されるまでとなり、臨床におけるリポソームの有効性や安全性が認められつつある。また、工業技術的にもリポソームの製剤化技術が、ほぼ確立されていると考えられる。このような背景の中で、著者らは薬物キャリアーとしてのリポソームを用いた癌治療に関する研究を長い間続けており、リポソームの血中滞留性および腫瘍組織への集積性を改善したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームや癌細胞内への薬物送達をも可能にするアクティブターゲティング型リポソームなどの開発に着手している¹⁻¹¹⁾。そこで本稿では、著者らの研究を紹介するとともに、癌治療を目指したリポソーム製剤の今後の展望について論ずる。

2. PEG-リポソーム (ステルスリポソーム) の開発

フォスファチジルコリンを主構成成分として調製した表面修飾を行っていないリポソーム (Fig. 1a) は、静脈内投与した場合、血液成分と相互作用した後、単核食細胞系 (MPS) により認識され循環血中より速やかに除去される。このようなリポソーム除去に関わる肝臓や脾臓には、MPSが多数存在しており、MPSがリポソームを生体外異物として認識し、捕捉している。このような肝臓や脾臓における異物処理システムは、細網内皮系 (reticulo-endothelial system: RES) として知られている。このRESへのリポソーム捕捉メカニズムとして、リポソームへの抗体や補体成分などのオプソニン分子の吸着によるRESへの取り込みが考えられている。さらに、リポソームとオプソニン分子の相互作用およびRESへの

取り込みは、リポソームの表面電位、膜流動性やサイズなどに依存していることも報告されている¹²⁾。それゆえ、リポソームの血中滞留性を維持するためには、リポソームの表面電位、膜流動性やサイズなどの最適化が必要である。しかしながら、最適化したリポソームでも血中滞留性維持には限界があり、RESへの捕捉を回避可能なリポソームの開発が望まれていた。

この問題を解決するため、リポソーム表面への血中タンパク質吸着を抑制する目的でリポソーム表面をPEGで修飾したPEG-リポソームが開発された (Fig. 1b)。PEG-リポソームのRES回避の原理は、リポソーム表面への水和層形成に伴うオプソニンタンパク質の吸着阻害によるマクロファージ系細胞への取り込み抑制、およびリポソーム自身のマクロファージへの非特異的接着性の低下に伴う取り込み抑制である。このリポソームはRESによる捕捉から回避できるため、ステルスリポソームとも呼ばれている。

3. PEG-リポソームによる腫瘍組織へのパッシブ (受動的) ターゲティング

固形腫瘍では、腫瘍血管新生が誘導される反面で、血管新生に見合うリンパ系システムが構築されないことが知られている。また、腫瘍血管は未熟な血管内皮細胞から構築されているため、血管透過性が亢進している。それゆえ、正常な血管において漏出しにくかった高分子物質でも、腫瘍血管では漏出しやすい特性を有している。さらに、この漏出した高分子物質は漏出局所に停滞しやすいことも報告されている。このような現象はEPR (enhanced permeability and retention) 効果として知られている¹³⁾。このEPR効果は血中滞留性の良好なPEG-リポソームでも観察されるため、PEG-リポソームは固形癌へのパッシブターゲティングキャリアーとして注目され、様々な抗癌剤を封入したPEG-リポソームによる研究がなされている。著者らも、ドキソルビシン封入PEG-リポソームによる固形癌に対する治療効果を検討しており、抗癌剤キャリアーとしてのPEG-リポソームの有用性を報告している^{1,2)}。

近年、ドキソルビシンやダウノルビシンなどを封入したPEG-リポソーム製剤 (Doxil®, DaunoXome®) が相次いで上市された。これらリポソーム製剤は、腫瘍組織におけるEPR効果によるパッシブターゲティングで薬物を腫瘍部位に集積させることで、抗腫瘍効果の増強および抗癌剤の副作用発現組織への分布抑制による副作用発現頻度の低下を可能にする画期的な製剤として利用されている。しかしながら、

一方でDoxil®投与により皮膚、特に圧迫部位への集積が認められ、手掌・足底発赤知覚不全症候群などの予期せぬ副作用が報告されている。この副作用改善に向けて、リポソームの脂質組成、サイズ、薬物放出速度と副作用発現の関連性評価に関する研究が進められているが未解明な部分が多く、副作用の改善には至っていないのが現状である^{14,15)}。

4. リポソームによる腫瘍細胞へのアクティブ（能動的）ターゲティング

前述のように、抗癌剤の体内動態をPEG-リポソームによるパッシブターゲティングのみに頼るだけでは、抗癌剤の副作用を完全には拭い去れないことが明らかになりつつある。それゆえ、このPEG-リポソームの安全性および有効性を改善し、臨床における有用性を最大限に引き出すためには、目的細胞のみに薬物送達できるアクティブターゲティング能をも付与した次世代型リポソーム製剤の開発が望まれている。

近年、HER 2モノクローナル抗体を用いた乳癌患者に対する治療を皮切りに抗体医薬品が、次々と上市され注目を集めている。この抗体医薬は、抗体を医薬品グレードで大量生産可能にしたバイオ生産技術や臨床で反復投与可能な抗体とするためのキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体の作製技術などといった様々な分野の最先端技術融合により生まれた医薬品であるといえる。このように抗体をも医薬品として利用可能になったことは、癌ミサイル療法を行う上で抗体という最高のターゲティングツールを手に入れたことに他ならない。最近では、癌細胞に特異的に発現もしくは発現亢進する腫瘍関連抗原が多数報告されつつあり、その抗原を狙った癌ミサイル療法に対する研究が始められている。その中で、リポソーム表面に抗体を修飾し、特定部位にアクティブターゲティングする試みもなされており、この抗体修飾リポソームはイムノリポソームと呼ばれている^{3-5,16)}。

癌治療を考えた場合、イムノリポソームは静脈内投与された後、RESを回避する必要がある。さらに、イムノリポソームが腫瘍細胞表面上の抗原を認識するためには、血管内から腫瘍組織に本リポソームが移行する必要もある。それゆえ、PEG-リポソームに抗体を修飾することが有効であると考えられる（Fig. 1c）。すなわち、このPEG-イムノリポソームは、EPR効果にて腫瘍組織内にパッシブターゲティングされた後に、リポソーム表面上の抗体により癌細胞表面の目的抗原を認識（アクティブターゲティング）

Fig. 2 Time course of tumor accumulation of I-OHP in colon26 bearing mice colon26 cells (2×10^6 cells) were subcutaneously implanted to BALB/c mice. When the tumor volume was reached to 150 mm³, these mice were intravenously injected I-OHP solution, I-OHP-encapsulated within Bare-, PEG- or TF-PEG-liposomes (I-OHP: 5 mg/kg weight).

できる。このようにPEG-イムノリポソームは、パッシブターゲティングとアクティブターゲティングを組み合わせることで、目的細胞へのターゲティング能を向上することができる優れたキャリアーであると言える。

また、イムノリポソームとは異なり、癌細胞で特異的発現または発現亢進するレセプターに対するリガンドを修飾したリポソームによるアクティブターゲティングも行われている⁶⁻⁷⁾。さらには、ファージディスプレイ技術により、特定細胞に親和性の高いペプチドをスクリーニングし、そのペプチドを修飾したリポソームを用いたアクティブターゲティングも報告されている^{17,18)}。著者らは、イムノリポソームや特定レセプターに対するリガンド分子を利用したリポソームのターゲティングに関する研究を行っているので紹介する。

5. トランスフェリン修飾PEG-リポソーム (TF-PEG-リポソーム)

トランスフェリン (TF) は分子量 75,000 の鉄結合性糖タンパク質で、肝実質細胞で合成される。このTFは、ヒト血液中に 250 ~ 450 mg/dL 存在し、レセプターを介して細胞内に鉄を送達している。一方、トランスフェリンレセプターは、癌細胞表面や転移性の高い癌細胞表面で正常細胞に比べ過剰発現していることが知られている。したがって、このTFレセ

Fig. 3 Anti-tumor activity of I-OHP liposome against colon26 bearing mice colon26 cells (2×10^6 cells) were subcutaneously implanted to BALB/c mice. When the tumor volume was reached to 150 mm³, these mice were intravenously injected I-OHP solution, I-OHP-encapsulated within Bare-, PEG- or TF-PEG-liposomes (I-OHP : 5 mg/kg weight) twice every three days.

プターを標的分子とした癌ターゲティング療法が有効であると考えられた。そこで著者らは、TF-PEG-リポソーム (Fig. 1c) を用いた癌治療に関する研究に着手した。

5.1 抗癌剤封入 TF-PEG-リポソームによる抗腫瘍効果^{6~8, 19)}

オギザリプラチン (I-OHP) は、海外において優れた治療成績が報告されている抗癌剤であるが、血中からの消失が非常に速い欠点を有している。そこで、この欠点の改善および治療効果の向上を目指し、I-OHP を封入した TF-PEG-リポソームの腫瘍組織集積性および抗腫瘍効果を検討した。まずはじめに、腫瘍集積性に関する検討を行った (Fig. 2)。その結果、I-OHP の PEG-リポソームへの封入により、I-OHP の腫瘍組織集積性が確認できた。これは、PEG-リポソームによるパッシブターゲティングによるものと考えられた。一方、TF-PRG-リポソームでも I-OHP の腫瘍組織集積性が確認できた。また、この集積性は PEG-リポソームと異なり、24 時間以降においても I-OHP の腫瘍組織滞留性が認められた。これは、TF-PEG-リポソームが TF レセプターを介して細胞内に I-OHP を効率よく送達可能であったためと考えられた。そこで次に、担癌モデルマウスにおける、抗腫瘍効果を検討した (Fig. 3)。その結果、I-OHP 封入 TF-PEG-リポソーム投与において、I-OHP 封入 PEG-リポ

Fig. 4 Scheme of boron neutron-capture reaction

ソームよりも強い抗腫瘍効果が認められた。

胃癌患者の癌摘出手術後の癌再発において、腹膜播種の頻度が高いことが知られている。この腹膜播種に対して抗癌剤の腹腔内投与が行われているが、癌細胞への抗癌剤取り込みが少ないため、有効性を得るためには大量投与が必要となる。しかし、抗癌剤の大量投与により重篤な副作用を引き起こす危険性があるため、癌細胞への抗癌剤ターゲティングが望まれている。前述したように多くの癌細胞では TF レセプターの発現亢進が認められ、腹膜播種となった胃癌細胞も TF レセプターの発現亢進が認められる。そこで著者らは、ヒト胃癌細胞 (MKN45P) の腹膜播種モデルにおけるシスプラチン封入 TF-PEG-リポソームの有用性を検討した。その結果、シスプラチン溶液やシスプラチン封入 bare-リポソーム投与ではほとんど延命効果は認められなかった。また、シスプラチン封入 PEG-リポソーム投与でも若干の延命効果しか認められなかった。一方、シスプラチン封入 TF-PEG-リポソーム投与により、顕著な延命が観察された。この結果は、TF-PEG-リポソームの腹膜播種モデルにおける優れた抗癌剤送達能力を示すものであった。

このように PEG-リポソームへの TF などのターゲティング分子付与によるアクティブターゲティングは、非常に有効な癌治療戦略になりうるものと期待された。

5.2 ボロン中性子捕捉療法への TF-PEG-リポソームの応用^{9, 10)}

近年、癌放射線療法の中のボロン中性子捕捉療法 (BNCT) が、強力かつ安全性の高い癌治療法の一つとして期待されている。この BNCT に使用されるボロン (^{10}B) 原子は中性子捕捉反応により α 粒子を放出する (Fig. 4)。この α 粒子は細胞核内の遺伝子を損傷し、高い殺細胞効果を誘導するが、その飛距離は 10 μ m 程度と細胞の大きさと同じ程度である。し

Fig. 5 Survival curve of colon26 bearing mice after *i.v.* injection of liposomes encapsulated ¹⁰B compound. 15 mg ¹⁰B/kg of liposomal mercaptoundecahydrodecaborate (BSH) or BSH solution was injected into colon26 bearing mice. At 72 hr after injection, the mice were anesthetized and irradiated thermal neutron with 2×10^{12} thermal neutrons/cm² for 37 min.

たがって、¹⁰B化合物を選択的に癌細胞内に効率よく送達することで、癌細胞のみを選択的に傷害し、癌細胞周囲の正常細胞には影響しない理想的な放射線療法が可能になると考えられている。前述したように、TF-PEG-リポソームは癌細胞表面上のTF-レセプターを介して取り込まれる性質を有しているため、¹⁰B化合物の癌細胞ターゲティングと長時間に亘る細胞内¹⁰B濃度維持を可能にするキャリアーとして期待される。そこで、著者らはTF-PEG-リポソームを用いたBNCT療法に関する検討を行った (Fig. 5)。この検討において、¹⁰B化合物封入TF-PEG-リポソームが担癌モデルマウスのBNCTにおいて著効を示すことが証明され、BNCTにおけるTF-PEG-リポソームの有用性が確認された。

6. 今後の展望

DDSの基礎となる“魔法の弾丸”コンセプトを提唱したのはPaul Ehrlichである。2004年9月、NurnbergでPaul Ehrlichの生誕150周年記念“World Conference on Magic Bullets”が開催された。“魔法の弾丸”コンセプトは抗癌剤や抗生物質の開発を生み、平均寿命の延長をもたらす医療を大きく変えた。しかし、副作用も強く、その軽減に向けた次の“魔法の弾丸”の開発、つまりDDSがここ30年来活発に進められている。そして、現在のナノテクノロジー

を駆使したDDSキャリアーの開発研究につながっている。

一般的な医薬品の研究・開発では、膨大な化合物ライブラリーからヒット化合物をスクリーニングする方法で候補化合物が見出されている。一方で、既存医薬品の体内動態制御や安定性改善などにより、副作用軽減や有効性を向上させるためのキャリアー開発も盛んに行われている。後者のキャリアー開発では、ナノテクノロジーを駆使したナノメディシンが注目され、多くの研究がなされている。その中のリポソームは、Banghamらによる発見から約40年経過し、医薬業界における有用性が評価されつつあるキャリアーである。現在では、前述したようにリポソーム製剤も上市されるまでになり、副作用軽減や有効性向上に一役買っている。このように21世紀は、リポソームなどの薬物キャリアーを用いたナノメディシン時代の幕開けであり、既存医薬品を含めた新・旧医薬品の体内動態をいかに制御するかがポイントになると考えられる。本稿で紹介したようなパッシブターゲティングおよびアクティブターゲティングを駆使したリポソーム製剤は、薬物治療の最適化を目指したDDSの理想的キャリアーとして期待されている。将来、このような薬物の体内動態制御を可能にするリポソーム製剤などのナノメディシンにより、有効性が高く、副作用のない薬物治療が可能になることを期待したい。

文 献

- 1) Ishida O, et al. : *Int. J. Pharm.*, **190**, 49 (1999)
- 2) Hosoda J, et al. : *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1234 (1995)
- 3) Maruyama K, et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 74 (1995)
- 4) Maruyama K, et al. : *FEBS Lett.*, **413**, 177 (1997)
- 5) Maruyama K, et al. : *Biosci. Rep.*, **22**, 251 (2002)
- 6) Maruyama K, et al. : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 89 (1999)
- 7) Ishida O, et al. : *Pharm. Res.*, **18**, 1042 (2001)
- 8) Iinuma H, et al. : *Int. J. Cancer*, **99**, 130 (2002)
- 9) Yanagie H, et al. : *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 639 (2004)
- 10) Kakudo T, et al. : *Biochemistry*, **43**, 5618 (2004)
- 11) 丸山一雄：ファームテクジャパン，じほう，**20**, 963 (2004)
- 12) Allen TM, et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56 (1991)
- 13) Matsumura Y, et al. : *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986)
- 14) Charrois GJ, et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 102 (2003)
- 15) Charrois GJ, et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1663**, 167 (2004)
- 16) Nam SM, et al. : *Oncol. Res.*, **11**, 9 (1999)
- 17) Maeda N, et al. : *J. Control. Release*, **100**, 41 (2004)
- 18) Pastorino F, et al. : *Cancer Res.*, **63**, 7400 (2003)

19) Suzuki R, et al.: *Drug Delivery System*, 19, 539 (2004)

(Received 19 September 2005;
Accepted October 11 July 2005)

著者略歴

丸山 一雄 (まるやま かずお)

1977年3月 東京薬科大学衛生薬学
科 卒業

1979年3月 熊本大学大学院薬学研
究科 修了

1979年4月 帝京大学薬学部薬剤学
教室 助手

1988年9月～1990年8月 The University of Tennessee 博
士研究員

2002年4月 現在に至る 帝京大学薬学部生物薬剤学教室
教授

研究テーマ

新規機能性リポソームの開発とその応用に関する研究
機能性リポソームによる新規遺伝子導入法の開発
新生血管内皮を標的とする癌免疫に関する研究

山下 純 (やました あつし)

1985年3月 広島大学医学部総合薬
学科卒業

1987年3月 広島大学大学院医学系
研究科博士課程前期
修了

1990年3月 広島大学大学院医学系研究科博士課程後期
修了

1990年4月 帝京大学薬学部衛生化学教室 助手

1998年1月 米国テキサス大学 博士研究員

1999年9月 帝京大学薬学部衛生化学教室 講師

2002年1月 現在に至る 帝京大学薬学部衛生化学教室
助教授

研究テーマ

脂質代謝, リン脂質代謝の酵素学的研究
癌へのDDS研究

鈴木 亮 (すずき りょう)

1996年3月 東京薬科大学薬学部薬
学科 卒業

2001年3月 大阪大学大学院薬学研
究科博士課程 修了

2001年4月 東レ株式会社医薬研究所 先端・融合研究所
研究員

2004年4月 現在に至る 帝京大学薬学部生物薬剤学教室
助手

研究テーマ

樹状細胞を用いた癌免疫療法における抗原送達キャリアー
開発に関する研究
ペプチド・抗体修飾リポソームを用いた薬物ターゲティン
グに関する研究
超音波造影ガス封入リポソームの核酸医薬への応用に関す
る研究

滝澤 知子 (たきざわ ともこ)

1993年3月 帝京大学薬学部薬学科
卒業

1993年4月 帝京大学薬学部薬剤学
教室 教務職員

1997年4月 現在に至る 帝京大学薬
学部生物薬剤学教室
助手

研究テーマ

ステルスイムノリポソームによるターゲティングに関する
研究
リポソームを用いた遺伝子導入法に関する研究

宇都口 直樹 (うとぐち なおき)

1990年3月 大阪大学薬学部 卒業

1992年3月 大阪大学大学院薬学研
究科修士課程 修了

1995年3月 大阪大学大学院薬学研
究科博士課程 修了

1995年4月 昭和薬科大学薬剤学研究室 助手

1997年7月 米国カンサス大学 博士研究員

1999年4月 昭和薬科大学 講師

2002年4月 現在に至る 帝京大学薬学部生物薬剤学教室
助教授

研究テーマ

癌へのDDS研究
癌免疫療法の開発