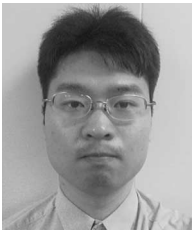


《若手研究者紹介》



癌および新生血管を標的とした MT1-MMP ターゲトリポソームに関する研究

跡 部 一 孝 Kazutaka Atobe

徳島文理大学香川薬学部

1. はじめに

抗癌剤を正常組織ではなく、癌細胞だけに選択的に送達させることで抗癌剤の治療効果を増加させ、正常組織での副作用の軽減を図る drug delivery system (DDS) の開発が盛んに行われている。リポソームの表面に癌細胞表面に高発現している分子に対する抗体やリガンドなどを結合させることで癌細胞への標的化を行ったターゲトリポソームもその1つである。これらターゲトリポソームを生体内に投与すると enhanced permeability and retention 効果¹⁾によって癌組織に集積し、さらに標的分子に結合することで細胞内に取り込まれ、内封した薬物を癌細胞に選択的に送達し高い効腫瘍効果を発揮する。しかしながら、癌細胞だけを標的とした場合、すべての細胞を死滅さなければ生き残った細胞が再増殖を起こしたり、また抗癌剤に対する耐性を獲得することによってより悪性度が高い癌組織が形成されることが考えられる。

近年の癌治療において新生血管形成を阻害することで、癌への栄養や供給を阻害し癌組織の維持や退縮を期待する、新生血管阻害療法が着目され広く研究が行われてきている²⁾。新生血管を阻害するメリットとしては、①1つの腫瘍血管内皮細胞は約100個の癌細胞を養うため、1つの内皮細胞の死は

100個の癌細胞の死につながり、効率が良い、②腫瘍血管内皮細胞は、正常細胞なので薬剤耐性を獲得せず、治療を中止して再開しても、再度同じ血管新生阻害薬が有効に使える、③腫瘍細胞は多様であるために多種類の抗癌剤の開発が必要とされるが、血管内皮細胞は基本的に同じ性質を持つ正常細胞であるため、1つの有効な新生血管阻害剤があらゆる腫瘍に有効である可能性、などがあげられる。しかし、近年開発されている新生血管阻害薬は単独では生存期間の延長など有効な治療効果を示さず、抗癌剤との併用において生存期間の延長が認められている³⁾。このことから血管新生阻害薬は抗癌剤と併用することにより高い効果がでてくると考えられている。

抗癌剤は細胞の増殖を抑制することが主な作用機序である。つまり抗癌剤を選択的に増殖性の高い癌組織中の血管内皮細胞に送達することができれば、新生血管阻害薬と同様に血管形成を抑制することができると考えられる。そこで癌細胞だけでなく、癌新生血管内皮細胞の両方を標的とするダブルターゲトリポソームを調製できれば、癌細胞、癌血管内皮細胞へ一度に抗癌剤を送達することができ、癌細胞を標的としたターゲトリポソームとしての働きと、新生血管阻害薬としての働きによる両方の効果により、これまで研究されてきたターゲトリポソームよりも高い治療効果を持つことが可能になると考えられる。このダブルターゲトリポソームを実現するためには、癌細胞だけでなく、癌新生血管内皮細胞に特異的に存在する分子を標的とする必要がある。そこで癌細胞や内皮細胞の進展の際に発現

筆者紹介:2002年3月徳島大学薬学部薬学科卒業,2007年3月徳島大学大学院薬科学教育部博士後期課程修了,2007年3月博士(薬学)を取得,2007年4月より徳島文理大学香川薬学部薬物動態学分野,助教就任。研究のモットー:あきらめず,何かひとつでも見つけ出す。趣味:音楽鑑賞,読書。

が亢進していることが知られている, マトリクスメ
タロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)
に着目した.

MMP は, 発生, 創傷治癒, 炎症, 血管新生, 癌
の浸潤・転移などのさまざまな生理的および病的
な生命現象に関与するタンパク質分解酵素である.
ほ乳類では, 現在までに 25 種類が同定され, ドメイ
ン構造や産生後の推移により, 18 種類の分泌型と 7
種類の膜型の二つに分類されている. これら MMP
の中で癌の成長や血管新生に関与している分子とし
ては, 分泌型の MMP-2, MMP-9, 膜結合型の mem-
brane type 1-MMP (MT1-MMP; MMP-14) が特
に他の MMP の活性化し重要な働きを果たすと考え
られている. MT1-MMP は, 前駆体として分泌され
る MMP-2 (pro-MMP-2) などの他の MMP の活性
化因子であるのみならず, コラーゲン I, II 型, フィ
ブロンectin, ラミニン, ビトロネクチン, フィブ
リン, プロテオグリカンなどの幅広い細胞外マトリ
クス (extracellular matrix; ECM) を基質とする.
また, MT1-MMP は細胞表層の因子を制御すること
で, 特に細胞運動性の亢進に関与する可能性が報告
されている^{4~6}. 癌細胞および血管内皮細胞へ効率
よく薬物を送達するためには, 標的とする分子が細胞
膜表面に存在していることが必須である. そのため
MT1-MMP を標的としたリポソームを調製する
ことで, 理想とするダブルターゲットリポソームを
実現できると考えられる.

そこで MT1-MMP を標的としたターゲットリポ
ソームの有用性について, *in vitro* および *in vivo* で
のターゲット効果の検討を行った.

2. 研究成果

2.1 ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞へのターゲット 効果の検討

癌細胞のモデルとして, MT1-MMP を恒常的に発
現しており, MT1-MMP の研究に広く用いられてい
るヒト線維肉腫細胞 HT-1080 細胞を用いた. リポ
ソームの脂質組成はモル比で HSPC: Chol:
PEG₂₀₀₀-DSPE = 1.49:1:0.059 とし, 薄膜振盪法
(Bangham 法)により調製した. また *in vivo* での血
中滞留性を増加させるための PEG 表面修飾は, コ
ンベンショナルリポソームを形成後, PEG 修飾を
行うポストインサージョン法により行った (粒子径

約 100 nm). 抗体は抗 MT1-MMP モノクローナル
抗体を Fab' 化したものを用いた. 以降, MT1-
MMP を標的とした本リポソームを SIL[MT1-
MMP(Fab')] と記載する. また対照実験として抗体
を結合させていないステルスリポソーム (SL) を用
いた.

まず, SIL[MT1-MMP(Fab')] の癌細胞へのター
ゲット効果について検討を行った (Fig. 1). その結
果, SIL[MT1-MMP(Fab')] はリポソーム濃度依存的

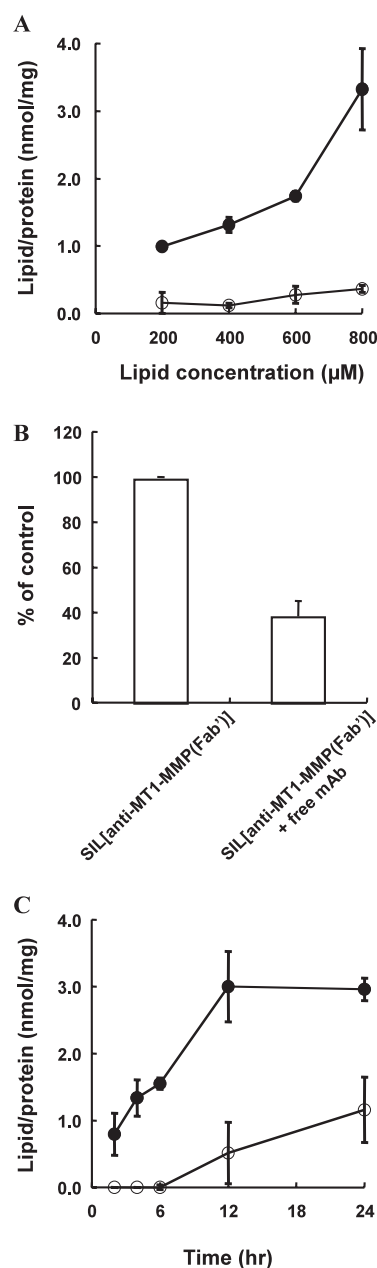


Fig. 1. Binding/Uptake of Fluorescence (DiI) -Labeled Liposomes by HT-1080 Cells. (A) Lipid concentrations, (B) Competition experiment, (C) Time period. ●: SIL[MT1-MMP(Fab')], ○: SL.

に細胞に取り込まれることが明らかとなった (Fig. 1-A). SIL[MT1-MMP(Fab')] が MT1-MMP を介して結合していることを示すため, 抗 MT1-MMP モノクローナル抗体と SIL[MT1-MMP(Fab')] の競合実験を行ったところ, SIL[MT1-MMP(Fab')] の結合が抑制された (Fig. 1-B). このことから SIL[MT1-MMP(Fab')] は MT1-MMP に結合することで取り込まれることが明らかとなった. 次に時間依存的な取り込みについて検討を行ったところ, 12 時間まで時間に依存した取り込みが認められた (Fig. 1-C). 一方, SL は細胞に取り込まれているものの, その取り込み量は SIL[MT1-MMP(Fab')] に比べ少ないことがわかった. これらの結果から SIL[MT1-MMP(Fab')] は MT1-MMP を発現している癌細胞に対して高いターゲット効果を持つことが明らかとなった.

2.2 ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC へのターゲット効果の検討

次にもう 1 つの標的細胞である血管内皮細胞へのターゲット効果について, 新生血管や MT1-MMP の研究で広く用いられているヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC をモデルとして実験を行った. その結果 HUVEC においても HT-1080 細胞と同様に時間依存的な取り込みが認められた (Fig. 2). HUVEC で認められた SIL[MT1-MMP(Fab')] の取り込みは,

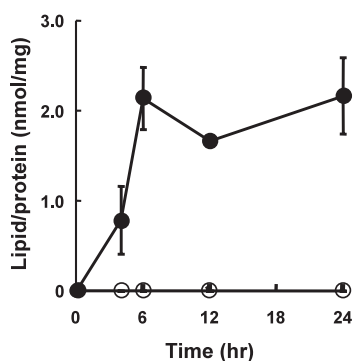


Fig. 2. Binding/Uptake of DiI-Labeled Liposomes by HUVEC.
●: SIL[MT1-MMP(Fab')], ○: SL.

Table 1. Comparison of the Cytotoxicity of Various Liposomal Formulations with DXR in HT-1080 Cells and HUVECs.

Formulations	IC ₅₀ (DXR μM)	
	HT-1080 cells	HUVEC
Free DXR	2.6 ± 1.2	4.48 ± 1.5
DXR-SL	37.5 ± 3.1	78.8 ± 6.4
DXR-SIL[anti-MT1-MMP(Fab')]	>300	>300

HT-1080 細胞に比べると少ないものであった. これは細胞での MT1-MMP の発現量や, 細胞活性による違いであると考えられる. これらの結果から SIL[MT1-MMP(Fab')] は癌細胞だけでなく, 血管内皮細胞においても高いターゲット効果を持つことが明らかとなった.

また, HT-1080 細胞および HUVEC 両細胞において, SIL[MT1-MMP(Fab')] は細胞内に内在化後ライソゾームに集積していることを観察している (data not shown). このことから SIL[MT1-MMP(Fab')] は細胞内に内在化後, ライソゾームで分解されることで内封する薬物を放出し殺細胞効果を発揮すると思われる.

2.3 ドキソルビシン封入りリポソームによる殺細胞効果の検討

これまでの結果から, SIL[MT1-MMP(Fab')] は癌細胞および血管内皮細胞の両方を標的とすることができることが明らかとなった. そこで実際にリポソームにドキソルビシンを封入し, それぞれの細胞における殺細胞効果について検討を行った. その結果を Table 1 に示している. SIL[MT1-MMP(Fab')] は Free ドキソルビシンには及ばないものの, SL に比べ高い殺細胞効果を持つことが明らかとなった. これは SL に比べ SIL[MT1-MMP(Fab')] の方が多くの薬物を細胞内に効率的に運ぶことができるためであると思われる. しかし癌細胞 HT-1080 細胞に比べ血管内皮細胞 HUVEC への効果は, 低いことも明らかとなった. この効果の違いは Free ドキソルビシンでも観察された. これはドキソルビシンが細胞増殖を阻害することで殺細胞効果を発揮する薬物であるため, 癌細胞に比べ細胞増殖速度の遅い HUVEC では効果が減弱したと考えられる. 以上の結果から, SIL[MT1-MMP(Fab')] は SL に比べ高い殺細胞効果をもつことが明らかとなった.

2.4 新生血管誘導モデルを用いた新生血管ターゲットに関する検討

In vitro において SIL[MT1-MMP(Fab')] は、癌細胞および血管内皮細胞に対して高いターゲット効果を示し、またドキシソルビシンを封入することによって高い殺細胞を持つことが明らかとなった。そこで次に *in vivo* での新生血管ターゲット効果について、dorsal air sac model によって新生血管を誘導したマウスを用いて検討を行った。その結果、SIL[MT1-MMP(Fab')] は新生血管血管壁に選択的に集積していることが確認された (Fig. 3-A, B)。一方、SL は新生血管とは関係なく全体的に広く分

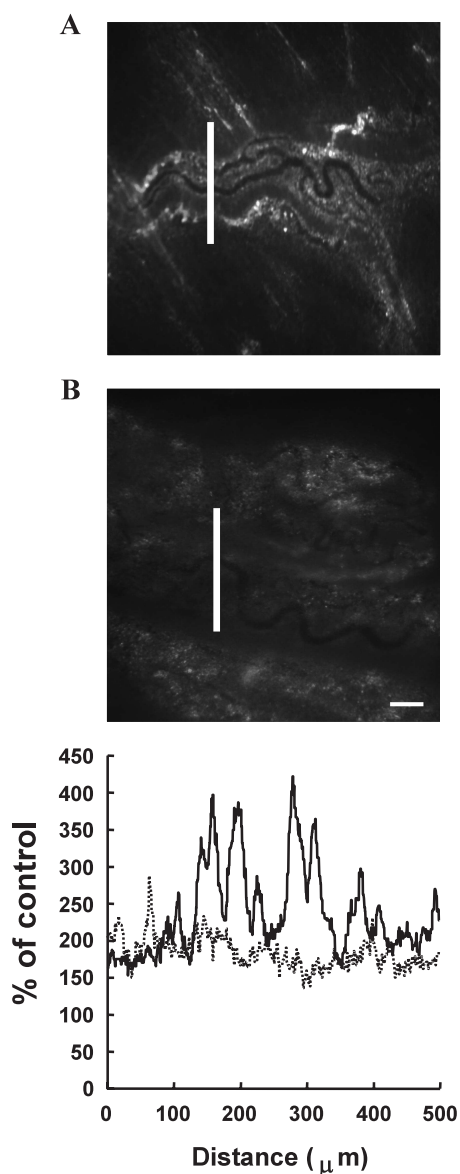


Fig. 3. Accumulation of Liposomes in Neo-Vasculature. (A) SIL[MT1-MMP(Fab')], (B) SL, (C) Penetration of liposomes. — : SIL[MT1-MMP(Fab')], ··· : SL. Bar 200 μm.

布していることが確認された (Fig. 3-C)。また血管への集積度をリポソームの蛍光強度を指標として計測すると、SIL[MT1-MMP(Fab')] は SL に比べ最大で2倍のリポソームが集積していることが確認された。

次にドキシソルビシンを封入したリポソームを用いて、新生血管阻害効果について検討を行った (Fig. 4)。SL 投与群ではコントロール群と同様の血管形成が認められ、新生血管形成は阻害されなかったが、SIL[MT1-MMP(Fab')] はコントロール群、SL 群に比べ新生血管形成数は明らかに少なく、形成された新生血管もコントロール群、SL 群と比較して、細く未熟なものであった。これらの結果から SL に比べ SIL[MT1-MMP(Fab')] は *in vivo* においても高いターゲット効果を示し、ドキシソルビシンを封入す

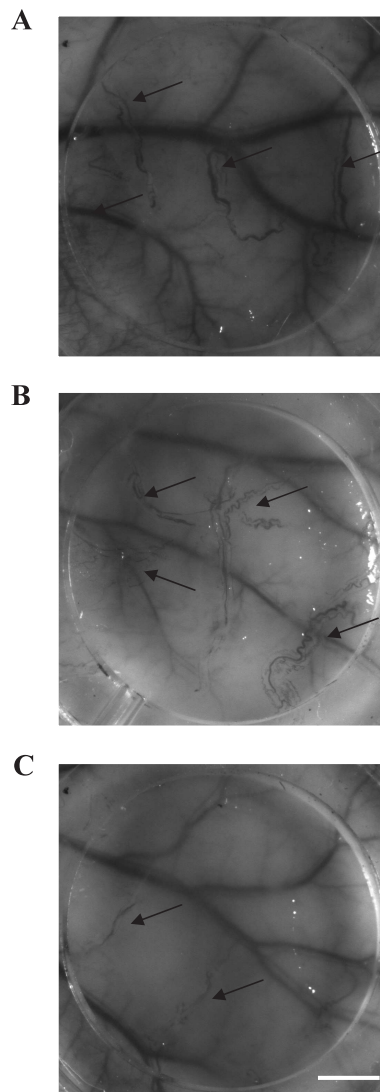


Fig. 4. Inhibition of Angiogenesis by Liposomes. (A) Control, (B) SL, (C) SIL[MT1-MMP(Fab')].

ること高い新生血管阻害効果を有することが明らかとなった。

これらのことから、MT1-MMPを標的としたSIL[MT1-MMP(Fab')]は癌細胞および新生血管を標的とできるダブルターゲットリポソームとして有用であることが明らかとなった。

3. 最 後 に

博士課程3年間の間に、癌細胞および血管内皮細胞を標的とするダブルターゲットリポソームの有用性について検討を行うことができた。今後は、これらの研究により学んだ知識、経験等を生かし、より高い治療効果を発揮できるDDSキャリアーの開発を設計していきたい。

本研究に際して始終御指導御鞭撻頂いた徳島大学・際田弘志教授、石田竜弘准教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し、有益なる御助言をいただきました、北海道大学・原島秀吉教授、秋田英万博士、静岡県立大学・奥直人教授、浅井知浩博士に心より感謝いたします。数々の貴重な御助言と御協力をいただきました、エーザイ株式会社・菊池寛博士、第一三共株式会社・小林英夫博士、橋本

浩一研究員、小幡賢一研究員、青木隆則研究員、第一ファインケミカル株式会社・安田純子研究員に深く感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.*, **46**, 6387–6392 (1986).
- 2) J. Folkman, Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.*, **285**, 182–186 (1971).
- 3) H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, *et al.*, Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2335–2342 (2004).
- 4) M. Kajita, Y. Itoh, T. Chiba, *et al.*, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration, *J. Cell Biol.*, **153**, 893–904 (2001).
- 5) N. Koshikawa, G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki, V. Quaranta, Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5, *J. Cell Biol.*, **148**, 615–624 (2000).
- 6) E.I. Deryugina, B.I. Ratnikov, T.I. Postnova, D.V. Rozanov, A.Y. Strongin, Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 9749–9756 (2002).