薬 剤 学, **68** (3), 191–195 (2008)

≪若手研究者紹介≫

癌指向性を有する新規 PEG 修飾リポソーム製剤の開発

寺 田　　武　Takeshi Terada
田辺三菱製薬株式会社製剤研究部

1. は じ め に

編集部から本コラムへの執筆のお話を頂いた時はお受けしてよいのかと未熟な自分であるがゆえの戸惑いがあったが，博学な方々と知識及び考えを共有できるこの上ない機会だと思い，筆を執らせて頂いた．

「研究者は知識の探求に対して貪欲であるべきである」，これは筆者が研究に向き合う上での自分に掲げたポリシーである．今思えば，医薬品の開発に対して総合的な知識及び情報から勘案した判断を要する薬剤学を筆者が将来にわたって携わる分野としたのは，自分のポリシーに即した最良の選択であったと考えている．さらに幸運なことに，橋田　充先生が主宰されていた教室への配属で薬物送達システム（DDS）のパラダイムシフトに触れることができ，橋田先生からはもとより博識な先輩方にも研究のいろはをご教授頂くことができた．また同時にこの幸運を受け，薬剤学を担う一人の研究者としての責任を強く感じている．この時の経験が今の仕事に対する考え方の礎となっていることはいうまでもない．

さて，上記のような最高の環境下で筆者は多くの研究に従事できる機会を頂いたわけだが，なかでも尽力した研究課題は癌指向性を有するポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームの新規戦略の考案と開発である．脂質二重膜からなるリポソームは水溶性および脂溶性薬物のいずれをも担持でき，また機能性分子で容易に表面修飾できることから抗癌剤の DDS 製剤として広く研究されている．しかし一方で，生体内での安定性の悪さや静脈投与後の肝臓や脾臓などの細網内皮系（RES）への取り込みが問題とされていた．PEG による表面修飾はこれらを解決する戦略として開発され，PEG 鎖が形成する水和相とその立体障害が RES 回避を可能とし，血中滞留性を高められることから癌治療における有望な戦略となっている．さらに腫瘍組織は正常組織と異なり，不完全な血管を有しリンパ管が未発達であることから，enhanced permeation and retention（EPR）効果によりリポソームをはじめとする高分子が集積しやすく，PEG による修飾は受動的なターゲティングが付与される．しかしながら，PEG 鎖による立体障害は癌細胞への接触を妨げてしまうため，腫瘍組織への能動的な移行は期待できない．従ってより選択的かつ効果的に腫瘍組織へ薬物を送達するためには，PEG 修飾による高い血中滞留性と癌指向性のリガンド等による能動的なターゲティングの機能を付与させ，双方が相反することなく相乗的に機能する新規 PEG 修飾リポソームの創製が強く望まれる．そこで筆者はこの大きな課題を取り上げ，克服に向けて多くの切り口が考えられるなか二つの戦略を考案し検討したので，本稿で紹介させて頂く．また，本戦略が今後の DDS 研究の振興に貢献できれば幸いである．

筆者紹介：2001 年京都大学薬学部総合薬学科卒業，2003 年同大学薬学研究科博士前期課程修了，2006 年同大学薬学研究科博士後期課程修了，博士（薬学）取得．同年旧三菱ウェルファーマ株式会社に入社，現在に至る．2007 年日本薬剤学会第 32 回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 受賞．研究のモットー：人々は驚くことを愛する．そしてこれこそ科学の種である．趣味：テニス，子育て，研究？

2. 癌組織に存在する標的分子との逐次的な結合を応用したターゲティング

上記の課題は表面がPEGで被覆されたリポソームに，腫瘍組織でのみ癌指向性のリガンドを提示させることができれば達成できる．このような機能を有するリポソームを設計するにあたり，まず初めに癌細胞へのターゲティングを達成するための標的分子を決定する必要がある．

悪性腫瘍ではfibroblast growth factor receptors（FGFRs）が高発現しており，FGFsによりその増殖が強く影響される．なかでもbasic FGF（bFGF）は血管内皮細胞の増殖・遊走の促進，血管腔の形成促進，内皮細胞由来プロテアーゼの産生促進等の血管新生因子の基本的条件を備えていることが知られている．特に前立腺癌，乳癌，メラノーマなどはFGFRsを高発現するとともに，bFGFも多く産生することが報告されており，パラクリンまたはオートクリンによる作用で増殖が促進されている．そこで，腫瘍組織に多く存在するFGFRs及びbFGFを能動的なターゲティングの標的分子とした．

腫瘍組織で癌指向性のリガンドが提示される機能を設計するためには，分子レベルで結合特性の詳細を解析できる実験系が不可欠である．そこでその実験系として表面プラズモン共鳴(SPR)法を選択した．SPR法は分子間での相互作用を評価できる方法であり，これまで筆者らは様々なDDSキャリアの評価に応用し，それらの結合特性について有益な情報を得ることに成功してきた[1～3]．そのSPR法を新規リガンドの設計にも応用し，bFGF由来ペプチドであるKRTGQYKL（residues 119-126 of bFGF）がbFGFとの結合を介してFGFR1キメラと相互作用することを見出した．したがって，bFGF由来ペプチド（bFGFp）で表面修飾したリポソーム(bFGFp-liposome)は，腫瘍組織でbFGFpのbFGFを介したFGFRsへの逐次的な結合により，FGFRsを高発現する癌細胞への能動的なターゲティングが期待できる．さらに筆者らはbFGFp-liposomeの癌細胞への選択性を高めるために，PEG修飾を施す方法を考案した．つまり，PEG修飾を施したbFGFp-liposome（mPEG/bFGFp-liposome）では，bFGFpの内在化とともに表面がPEG鎖で被覆されるため安定した血中滞留性が得られる．さらに腫瘍組織に到達後はbFGFpにbFGFが結合し，結合したbFGFがPEG層から表面化及び提示されることで，FGFRsを高発現する癌細胞へ取り込まれ，ターゲティング効率の向上が期待できる（Fig. 1）．

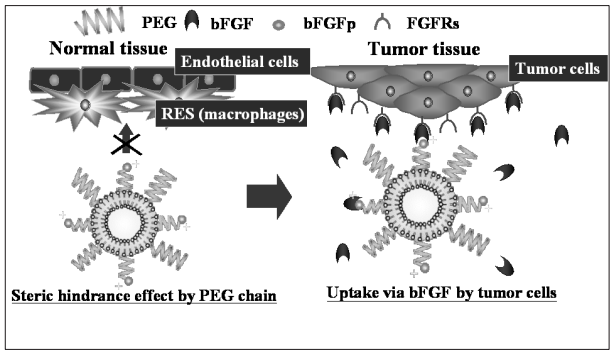

Fig. 1. Schematic representation of expected biodistribution of mPEG/bFGFp-liposome targeted to the tumor cells.

2.1 癌指向性bFGFp-liposomeの設計と評価

bFGFpの脂質誘導体は，bFGFによるbFGFpの認識を高めるために分子量2000のPEGをbFGFpとdistearoylphosphatidyl ethanolamine（DSPE）とのスペーサーとすることで合成した．作製したbFGFp-liposomeの癌指向性を分子レベル及び細胞レベルで検証するために，bFGF及びFGFRsへの結合特性さらに癌細胞への取り込み効果について検討を実施した[4]．結合特性は，その詳細を分子レベルで解析するためにSPR法と水晶発振子（QCM）バイオセンサー法を用いることとした．QCMバイオセンサー法はSPR法と同様に分子間相互作用を感度よく評価するために汎用されている方法である．その結果，bFGFp-liposomeへのbFGFの選択的な結合とbFGFとの結合を介したFGFR1キメラとの相互作用が確認された．さらにFGFRsを高発現するマウス繊維芽（NIH3T3）細胞への取り込みを評価したところ，bFGFとの前処理で細胞特異的な有意な上昇が認められた．以上，bFGFp-liposomeが癌指向性を有することを明らかにでき，次にPEG修飾を施す検討に着手した．

2.2 癌指向性mPEG/bFGFp-liposomeの設計と評価

リポソーム表面の物性はその動態に大きく影響を及ぼす．したがって，非特異的な結合を抑制するために表面をPEG鎖で被覆すれば，安定した血中滞留性が得られる．とりわけbFGFp-liposomeでは

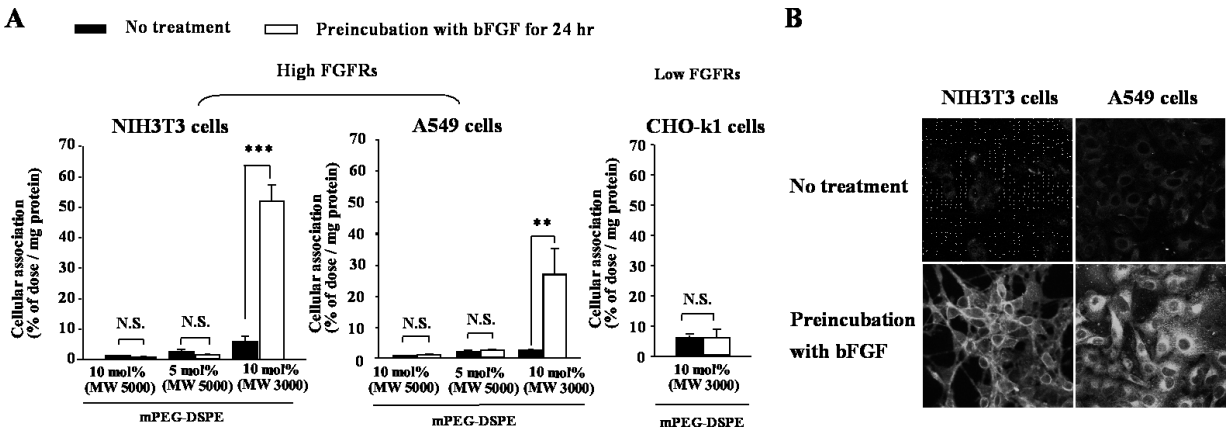

Fig. 2. Effect of bFGF pretreatment on the cellular association of mPEG/bFGFp-liposomes by different cells. (A) [3H] mPEG/bFGFp-liposomes containing 10%, 5% $mPEG_{5000}$-DSPE, and 10% $mPEG_{3000}$-DSPE without or with bFGF were used for the uptake study. Each result represents the mean ± S.D. of three experiments. (**, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; N.S., not significant). (B) FITC-labeled mPEG/bFGFp-liposomes without or with bFGF were used for the confocal microscopic study.

bFGFp の静電気的な性質によるものと考えられる細胞への非特異的な取り込みがあり，血中滞留性の低下が懸念されるため PEG 修飾は必然的な改善方法であった．

PEG 修飾の調整は非特異的な取り込みを最大限に抑制しつつ，bFGF との結合による癌指向性を達成させる必要があるため非常に苦慮した．調整には bFGFp の脂質誘導体と PEG 脂質の導入量及び比率，さらに PEG 脂質の PEG 鎖長がある．そこでまず bFGFp の脂質誘導体の導入量を，bFGF 存在下における細胞への取り込みの上昇が顕著であった 2.5 mol% とした．さらに PEG 脂質の PEG 鎖長は，bFGFp の脂質誘導体のうち bFGFp とスペーサーである PEG 領域の総分子量が 3000 程度となることを考慮し，それらを被覆するために同程度の分子量 3000（$mPEG_{3000}$-DSPE）とそれよりも長い鎖長の分子量 5000（$mPEG_{5000}$-DSPE）を選択した．次に bFGFp の被覆に必要な各 PEG 脂質の含有量を推定すべく検討を実施した[5]．方法は，血中滞留性に影響を及ぼす RES の細胞への移行及び血球成分との相互作用を *in vitro* 系で評価するために，単離したマウス腹腔マクロファージへの取り込み，さらに QCM バイオセンサー法を応用し赤血球との相互作用を評価した．その結果，$mPEG_{5000}$-DSPE では 5 及び 10 mol%，$mPEG_{3000}$-DSPE では 10 mol% を含有させることで顕著に抑制できることを明らかにした．これらの三種類の mPEG/bFGFp-liposomes に対して，癌細胞への bFGF を介した取り込みについて検討した．細胞は FGFRs を高発現することが報告されている NIH3T3 とヒト肺癌（A549）細胞を用い，低発現する細胞としてはチャイニーズハムスター卵巣（CHO-k1）細胞を選択した．$mPEG_{3000}$-DSPE を 10 mol% 含む $mPEG_{3000}$/bFGFp-liposome において，bFGF で前処理を行うことにより NIH3T3 と A549 細胞に対する取り込み及び内在化の劇的な上昇が認められた（Fig. 2）．一方，その上昇は CHO-k1 細胞では見られなかった．以上，bFGFp を用い PEG 鎖により非特異的な結合及び取り込みを抑制しつつ，癌細胞への選択的移行を示す新規 PEG 修飾リポソームを設計し，その有用性を *in vitro* において明らかにした．

3. 癌組織における選択的な PEG 鎖の分解

前節ではリガンドの提示に着眼した戦略であったが，PEG の脂質誘導体に腫瘍組織において解裂する機能を有させれば，リガンドによる癌細胞への取り込み効果を高められる．PEG 修飾リポソームから PEG を解裂させる方法として，pH 依存的に加水分解を誘起させる方法が報告されているが，腫瘍組織の環境下に対しより高い感受性を示すアプローチが必要である．そこで筆者はプロテアーゼの一種である matrix metalloproteinase-2（MMP-2）に着目し，MMP-2 により分解されることが報告されているペプチド GPLGIAGQ を介して PEG と dioleoylphosphatidyl ethanolamine（DOPE）をつなげた PEG-Peptide-DOPE（PEG-PD）を合成し，PEG

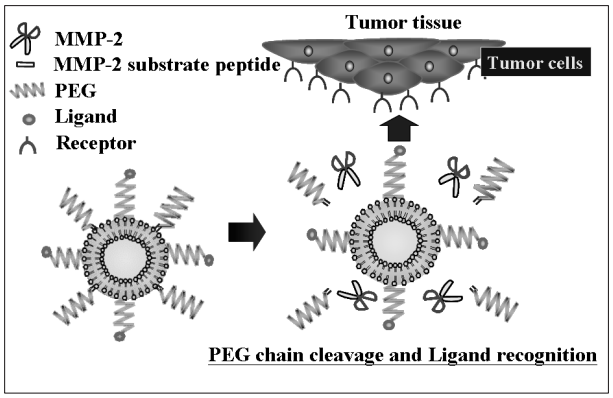

Fig. 3. MMP-2 cleavable PEGylated liposome as tumor targeting carrier.

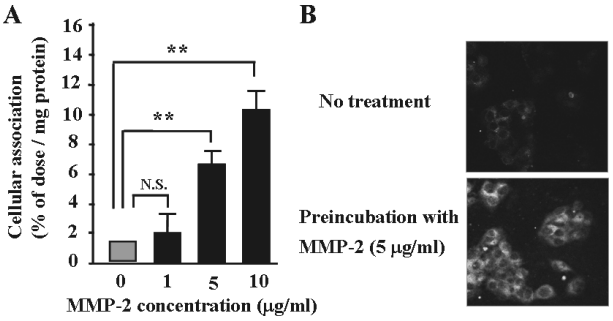

Fig. 4. Effect of MMP-2 pretreatment on the uptake of PEG-PD/Gal-liposomes by HepG2 cells. (A), [3H] PEG-PD/Gal-liposomes pre-incubated without or with 1, 5, and 10 μg/ml MMP-2 were used for the uptake study.
Each result represents the mean±S.D. of three experiments (**, $p<0.01$; N.S., not significant). (B), FITC-labeled PEG-PD/Gal-liposomes without or with MMP-2 were used for the confocal microscopic study.

修飾リポソーム（PEG-PD-liposome）からのPEGの解離を試みた[6]．細胞外マトリックスを構成するコラーゲンに対して分解特性を有するMMP-2は癌の浸潤，転移，成長に関わっており，前立腺癌，肝癌，メラノーマ等の腫瘍組織において高い存在を示していることが報告されている．したがって，EPR効果で癌組織に集積したPEG-PD-liposomeは，MMP-2によりPEGコーティングが外れることで，表面化したリガンドを介した選択的な癌細胞への移行が期待できる（Fig. 3）．

3.1 PEG-PD-liposomeのMMPsによる分解特性

PEG-PD-liposomeの分解特性を評価するために，MMP-2及び癌細胞が分泌したMMPsを含む溶液で前処理し，分解後に生成されるアミノ基を測定した．PEG-PDはMMPsによりPEG-GPLG-COOHとアミノ基を有するNH_2-IAGQ-DOPEに分解されると考えられる．その結果，前処理の時間依存的にアミノ基の増加が確認され，さらにその生成はMMPsに対して阻害効果を示すGM6001を添加することにより抑制された．したがって，PEG-PD-liposomeはMMP-2存在下で選択的にPEGが解裂される機能を有する．

3.2 リガンドを導入したPEG-PD-liposomeの癌指向性

PEG-PD-liposomeのPEG層にリガンドを内在化させれば，MMP-2によりPEGが解裂した後，それまでPEGにより制御されていたリガンドが提示され，レセプターを介した癌細胞への取り込みの促進が可能となる．そこで，原発性肝癌ではMMP-2が腫瘍組織に高濃度で存在していることから，肝臓実質細胞へのターゲティング方法として汎用されているガラクトース修飾を施したPEG-PD-liposome（PEG-PD/Gal-liposome）を作製し，本戦略の可能性を検証した．なお，PEG-PD/Gal-liposomeは合成したガラクトース修飾コレステロール誘導体（Cholesten-5-yloxy-N-(4-((1-imino-2-D-thiogalactosyl-ethyl)amino)butyl)formamide）を導入することでターゲティングの機能をもたせた．ヒト肝癌（HepG2）細胞への取り込みを評価したところ，MMP-2で前処理を行ったPEG-PD/Gal-liposomeで有意な取り込みの上昇が認められた．さらにその取り込みはガラクトース共存下で阻害されたことより，MMP-2によるPEG鎖の解裂でガラクトースリガンドを介した取り込みが誘発されたと考えられる．

MMP-2の濃度は癌患者の血中で1 μg/ml程度であること，また腫瘍組織では正常組織よりも高濃度であることが報告されている．したがって，1 μg/mlを超えるMMP-2濃度での取り込み上昇は，血中でのPEG-PDの解裂を抑え，腫瘍組織特異的な集積を促進すると考えられる．そこでPEG-PD/Gal-liposomeの未処理群と1，5，10 μg/mlのMMP-2による前処理群によるHepG2細胞への取り込みを比較検討した（Fig. 4）．5と10 μg/mlのMMP-2により取り込みの顕著な上昇が確認されたことより，腫瘍組織への特異的な移行性が示唆された．さらにAra-Cの脂溶性プロドラッグであるN4-octadecyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine（NOAC）を用いる

ことで，PEG-PD/Gal-liposomeの抗癌剤に対するキャリアとしての有用性も示せた．以上，MMP-2が高濃度で存在している腫瘍組織に抗癌剤を特異的にデリバリーできるリポソームの創製に成功した．MMP-2による認識を高めるために，ペプチド配列及びPEG-PDに挿入するスペーサーをスクリーニングし，癌指向性をさらに向上させる必要があるが，ターゲティングリガンドの選択で多様な癌細胞への応用を可能とする有用な戦略である．現在，このような腫瘍選択的分解性PEG脂質誘導体は遺伝子治療用ベクターにも応用され，その有効性が示されており[7]，今後の研究の進展が期待される．

4. おわりに

DDS製品市場は，本格的な高齢化社会を迎えるにあたり薬物療法の最適化を求める医療ニーズとジェネリックメーカーの台頭に備えた製品寿命の延長及び効率のよい製品開発を図る企業戦略を駆動力に急成長し，そのdrug delivery技術の重要性が改めて認識されるようになってきた．このような背景のなかでアカデミアを中心に培われたDDS基盤技術の英知をもとに実用化された製剤も少なくない．これまで筆者は大学での研究の中で多くの貴重な経験をさせて頂いた．これからはそれらの経験を活かしつつ，企業の目線で製剤開発を捉え，革新的な医療へ貢献していきたいと考える．現在，分野を異とする多くの研究者が有機的に連環している職場で大学時代にはない多くの刺激を受けながら，製剤リテラシーの向上に向けて自己研鑽している日々である．

本研究に際して終始ご懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科・橋田　充教授に衷心より深甚なる謝意を表します．また，終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科・山下富義准教授，川上　茂助教に謹んで深く感謝の意を表します．

引用文献

1) T. Terada, M. Nishikawa, F. Ymashita, M. Hashida, Analysis of the molecular interaction of glycosylated proteins with rabbit liver asialoglycoprotein receptors using surface plasmon resonance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 966–972 (2006).
2) T. Terada, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, Analysis of the molecular interaction between mannosylated proteins and serum mannan-binding lectins, *Int. J. Pharm.*, **316**, 117–123 (2006).
3) T. Terada, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, Influence of cholesterol composition on the association of serum mannan-binding proteins with mannosylated liposomes, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 613–618 (2006).
4) T. Terada, M. Mizobata, S. Kawakami, Y. Yabe, F. Yamashita, M. Hashida, Basic fibroblast growth factor-binding peptide as a novel targeting ligand of drug carrier to tumor cells, *J. Drug Target.*, **14**, 536–545 (2006).
5) T. Terada, M. Mizobata, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes, *J. Control. Release*, **119**, 262–270 (2007).
6) T. Terada, M. Iwai, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting, *J. Control. Release*, **111**, 333–342 (2006).
7) H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima, Development of a novel systematic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Gene Ther.*, **14**, 68–77 (2007).