

## 《若手研究者紹介》



## リポソーム技術を駆使したがん治療を目指して

鈴 木 亮 Ryo Suzuki

帝京大学薬学部生物薬剤学教室

## 1. はじめに

著者がリポソームに初めて出会ったのは、東京薬科大学薬学部4年生のときに第一薬剤学教室（現薬物送達学教室）に配属されたときであった。その当時、土屋晴嗣教授（現日本薬科大学教授）、新楨幸彦助教授（現東京薬科大学薬学部教授）、原 寿史助手（現大正製薬株式会社）、有馬英俊助手（現熊本大学薬学部教授）からリポソームを用いたドラッグデリバリーシステム（DDS）に関する研究の面白さをお教えた。そしてリポソームについて勉強する中で、リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソームに興味を持つようになり大阪大学大学院薬学研究科薬学分野の修士課程に進学した。眞弓忠範教授（現神戸学院大学薬学部教授、大阪大学名誉教授）、中川晋作助教授（現大阪大学大学院薬学研究科教授）、堤 康央助手（現大阪大学大学院薬学研究科教授、独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー）、微生物病研究所 博士研究員 水口裕之先生（現独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー）のご指導の下、修士課程の2年間で膜融合リポソームを用いた遺伝子導入に関する研究を行った。この2年間ですっかり研究の面白さに魅了され、博士課程への進学を決めた。博士課程では、

著者紹介：平成8年東京薬科大学薬学部卒業，平成10年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了，平成13年同博士後期課程修了，薬学博士（大阪大学）。同年東レ株式会社入社，平成16年帝京大学薬学部助手，平成19年帝京大学薬学部助教，現在に至る。研究のモットー：激烈に努力すること。趣味：ドライブ，旅行。

京都薬科大学 岡田直貴助手（現大阪大学大学院薬学研究科講師）からも多くのご助言をいただきながら、生体内の環境に応じて生理活性物質を分泌する機能性細胞を薬物キャリアーとして利用していくための「細胞性製剤」とも言うべき新たな製剤設計に関する研究を行った。大学院生活の5年間で様々な研究テーマに触れるチャンスをいただき、さらに研究室内において先生や先輩方とのディスカッションをさせていただいたことが、現在の著者の礎になっているのは間違いない。博士課程修了後、東レ株式会社にてDDSに関する研究を3年間行い、その中で大学においてDDSに関する基礎研究がしたいという思いが強くなり、現在所属している帝京大学薬学部生物薬剤学教室の助手となった。現在では丸山一雄教授、宇都口直樹准教授のご指導の下、薬学教育とリポソームに関する研究に没頭する毎日を過ごしている。今回、若手研究者紹介のコラムを執筆するチャンスをいただいたので、現在進めているリポソーム研究について紹介させていただく。

2. アクティブターゲティング型リポソームを用いたがん治療戦略<sup>1)</sup>

脂質二分子膜からなるリポソームは、膜モデルやDDSキャリアーとして幅広い分野で注目されてきた。このリポソームは生体の構成成分であるリン脂質を主成分としているため、毒性が低いことが知られている。しかし一方で、生体内での不安定性や静脈内投与後の肝臓や脾臓などの細網内皮系（RES）への取り込みがリポソームの実用化における課題とされていた。この課題を解決する手段として、表面を polyethylene glycol (PEG) で修飾したリポソーム

ム (PEG-リポソーム) が開発され, RES 回避可能な画期的なリポソームとして脚光を浴びている。この PEG-リポソームは, リポソーム表面の PEG により補体系たん白質の吸着が抑えられるため RES に捕捉されにくくなり, 血中での安定性および滞留性に優れている。一方, 腫瘍組織では一般に血管透過性が亢進しているため, 全身投与された PEG-リポソームは腫瘍組織に集積しやすい。この現象は Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によるもので, PEG-リポソームのパッシブターゲティングメカニズムとして知られている。2007 年には EPR 効果を期待したドキソルビシン封入 PEG-リポソーム製剤 (Doxil) が本邦でも認可された。この Doxil は, 副作用を軽減し, がん細胞に対する抗がん作用を増強しうる有望な治療戦略とされている。しかし一方で, 皮膚, 特に圧迫部位への Doxil 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。したがって, 腫瘍組織へのパッシブターゲティングだけでは抗がん剤の副作用を完全に拭い去ることが困難であると考えられている。それゆえ, PEG-リポソームの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。

がん細胞に対するアクティブターゲティング型リポソームを開発するためには, リポソーム表面にがん細胞を特異的に認識する抗体やリガンドなどのターゲティング分子を修飾する必要がある。これまでがん細胞において特異的に発現もしくは発現亢進する分子について多数の報告がなされている。その中で著者らは, 正常細胞に比べ多種類のがん細胞で発現が亢進しているトランスフェリンレセプターに着目した。このレセプターは細胞内への鉄の取り込みに関与するレセプターであり, レセプター介在型エンドサイトーシスによりトランスフェリン (TF) を細胞内に取り込む機能を有している。したがって, TF を PEG-リポソーム表面に修飾した TF 修飾 PEG-リポソームを利用すれば, トランスフェリンレセプターを過剰発現するがん細胞へのアクティブターゲティングが可能になると考えられる。そこで, TF 修飾 PEG-リポソームの抗がん剤デリバリーにおける有用性を評価した。今回の検討では,

海外において優れた治療成績が報告されており, 2005 年に本邦でも「エルプラット」として薬価収載された抗がん剤であるオキサリプラチン (I-OHP) を TF 修飾 PEG-リポソームに封入することとした。この I-OHP はホリナートおよびフルオロウラシルとの併用療法 (FOLFOX4 法) として使用した場合の有用性が報告されているが, 単剤投与による有用性は確立されていない。これは, I-OHP のがん細胞へのデリバリー効率が低いことに起因していると考えられる。そのため, 上述の TF 修飾リポソームに I-OHP を封入し, がん細胞に積極的にデリバリーで

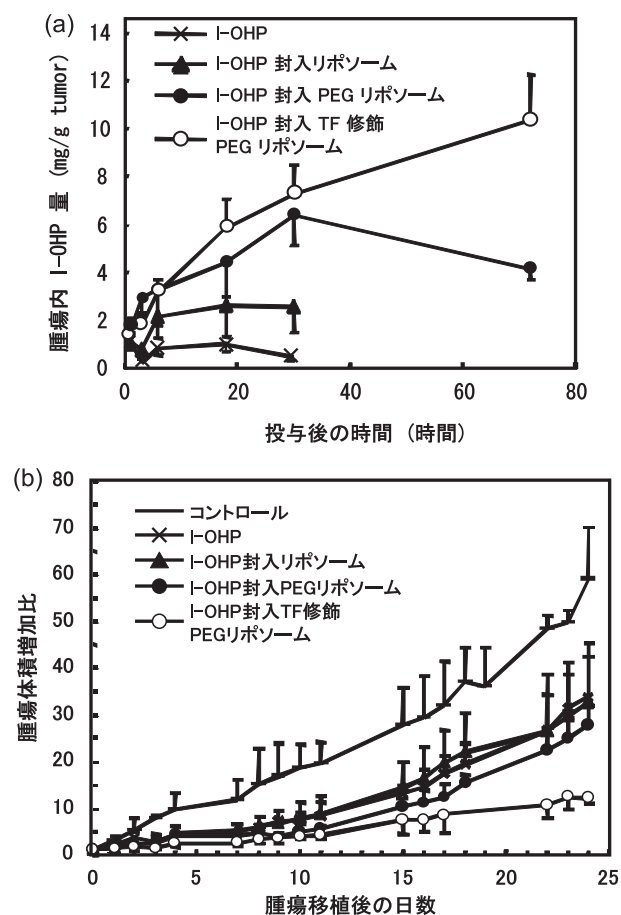


図1 I-OHP封入TF-PEGリポソーム投与後の腫瘍内I-OHP量および抗腫瘍効果  
 (a) I-OHP投与後の腫瘍内I-OHP濃度推移: Colon26細胞を皮内移植した担がんモデルマウスにI-OHP量として5 mg/kgとなるように単回尾静脈内投与し, 任意の時間で腫瘍組織を採取後, I-OHP量を測定した。  
 (b) I-OHP投与後の抗腫瘍効果: Colon26細胞を皮内移植した担がんモデルマウスにI-OHP量として5 mg/kgとなるように腫瘍移植後9日目と12日目に尾静脈内投与し, その後の腫瘍体積を測定し腫瘍移植後9日目の腫瘍体積に対する腫瘍体積増加比を算出した。

できれば、1-OHP 単剤でも抗腫瘍効果が得られるようになる」と期待される。そこでTF 修飾 PEG-リポソームの有用性を評価する目的で、担がんモデルマウスへの1-OHP 封入 TF 修飾 PEG-リポソーム投与による腫瘍への1-OHP の集積性および抗腫瘍効果について検討した。まず腫瘍内1-OHP 量を測定したところ、1-OHP 単剤投与群や1-OHP 封入リポソーム(PEG 未修飾)に比べ、1-OHP 封入 PEG-リポソームや1-OHP 封入 TF 修飾 PEG-リポソーム投与群において高い腫瘍内1-OHP 量が観察された。これはPEG-リポソームのEPR 効果によるパッシブターゲティングで腫瘍に1-OHP が集積したためであると考えられた。さらに興味深いことに、1-OHP 封入 PEG-リポソーム投与群において投与72 時間後に腫瘍内1-OHP 量の低下が認められたものの、1-OHP 封入 TF 修飾 PEG-リポソーム投与群では腫瘍内1-OHP 量が維持されていた(図1a)。これは、1-OHP 封入 TF 修飾 PEG-リポソームがパッシブターゲティングにより腫瘍組織に集積後、がん細胞表面上のトランスフェリンレセプターに認識され細胞内に取り込まれたためであると考えられた。次に抗腫瘍効果について検討したところ、1-OHP 封入 PEG-リポソーム投与群より1-OHP 封入 TF 修飾 PEG-リポソーム投与群において高い抗腫瘍効果が認められた(図1b)。このことから、パッシブターゲティングとアクティブターゲティング能を併せ持ったTF 修飾 PEG-リポソームはがん治療における次世代型薬物デリバリーキャリアーになるものと期待される。

### 3. リポソーム技術のがん免疫療法への応用<sup>2)</sup>

近年のがん免疫に関する研究の進展に伴い、がん免疫療法が現実的なものとなりつつある。このがん免疫療法を有効な治療法として確立していくためには、がん細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化することが重要である。そのためには、T 細胞への強力な抗原提示細胞として知られている樹状細胞 (DC) の MHC クラス I 分子上にがん関連抗原を提示させる必要がある。しかし、通常外来性抗原は MHC クラス II にのみ提示されることが知られており、がん免疫療法の成功の鍵は、外来性抗原を MHC クラス I に抗原提示を誘導可能な抗原送達キャリアー開発にあると考えられている。これまでに、DC 上の Fc $\gamma$  レセプターを介して抗原を DC に取り込ませることで、外来性抗原が MHC クラス I にクロスプレゼンテーションされることが確認されている。この原理を利用して抗原抗体複合体によるクロスプレゼンテーション誘導が試みられるようになった。しかし、この方法では抗原に対して抗体をそれぞれ用意する必要があるため、汎用性の点で問題がある。この問題を解決するため著者らは、DC 上の Fc $\gamma$  レセプターを介して積極的に抗原をデリバリー可能なリポソーム開発に着手した。前項で述べたようにリポソーム表面には標的指向性分子を修飾することができる。そこで、リポソーム表面に IgG 分子を修飾したリポソーム (IgG リポソーム) を抗原送達キャリアーとして利用することを考えた (図2)。実際にこの IgG リポソームは *in vitro* において

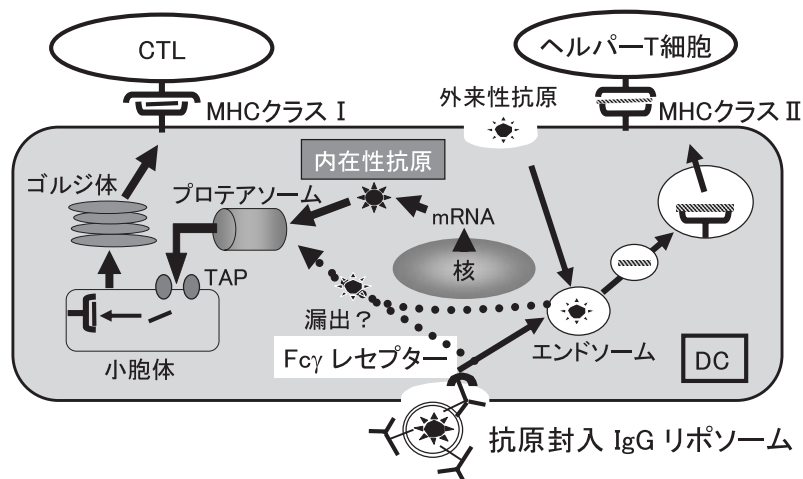


図2 IgG リポソームを用いた DC への抗原デリバリー戦略



DC Fcγレセプターを介したエンドサイトーシスにより内在化され、内封抗原をDCに効率よく送達可能であった。また、この送達された抗原がDCのMHCクラスI上にクロスプレゼンテーションされ、このDCをマウスに免疫することで抗原特異的CTLが誘導できることが明らかとなった。そこで、IgGリポソームを用いた抗原送達システムの樹状細胞がん免疫療法(*ex vivo*法)における有用性を評価した。モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン(OVA)を封入したIgGリポソームまたはIgG未修飾リポソーム(Bareリポソーム)を作用させたマウス骨髄由来DCを1週間隔で2回マウスに免疫した。最終免疫から1週間後にモデル腫瘍としてOVA発現リンパ腫(E.G7-OVA細胞)を皮内移植し、その腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した(図3)。その結果、DCのみを免疫した群、OVAのみを作用させたDCを免疫した群では、顕著な抗腫瘍効果は認められなかった。一方、OVA封入Bareリポソームを作用させたDCを免疫した群において若干の抗腫瘍効果が認められた。さらに、OVA封入IgGリポソームを作用させたDCを免疫した群では、全例において腫瘍の生着が完全に阻害された。なお、OVA未封入IgGリポソームを作用させたDCを免疫しても抗腫瘍効果がほとんど認められなかったことより、OVA封入IgGリポソームを用いた際の抗腫瘍効果は内封したOVAに対する抗原特異的CTL誘導に起因するものと考えられた。以上の結果から、IgGリポソームががん免疫療法における有用な抗原送達

ツールになることが示唆された。このようにリポソーム技術はがん免疫療法における抗原デリバリーシステムへの応用も期待される。

#### 4. リポソーム技術と超音波技術の融合による新たな遺伝子導入システムの構築<sup>3,4)</sup>

遺伝子治療は、先天性の遺伝子疾患やがんの新しい治療法として期待されている。これまでに行われてきた遺伝子治療では、遺伝子導入効率の観点から、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターが利用されてきた。しかし、ウイルスベクターに関して安全性の面で危惧する報告がなされており、安全性が高く、容易に利用できる非ウイルスベクターが注目を集めている。一方で、非ウイルスベクターの遺伝子導入効率は一般的に低いため、この問題を解決可能な新規遺伝子導入ツールの開発が望まれている。さらに、いずれのベクターにおいても遺伝子導入部位を簡易的にコントロールすることは困難であるとされている。したがって、有効性が高く、副作用の少ない遺伝子治療を行っていくためには、目的部位特異的に安全かつ効率よく遺伝子導入可能なシステムの構築が求められている。そこで著者らは、超音波造影剤である微小気泡(マイクロバブル)を利用した超音波遺伝子導入法に着目した。この遺伝子導入法はマイクロバブルへの超音波照射により誘導されるバブルの崩壊(キャビテーション)を細胞への遺伝子導入の駆動力にしている。すなわち、キャビテーション時に生じるジェット流

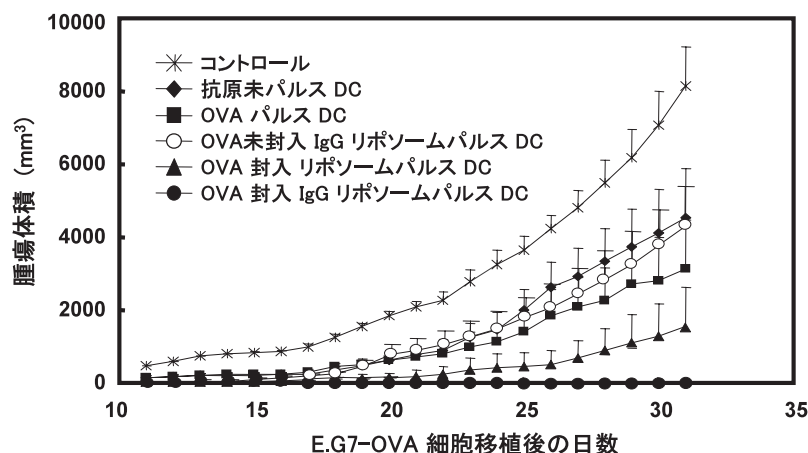


図3 IgGリポソームを用いたDCへの抗原デリバリーによる抗腫瘍効果  
各形態のOVA(15 μg/mL)をパルスしたマウス骨髄由来DCを1週間隔で2回免疫し、最終免疫から1週間後にモデル腫瘍であるE.G7-OVA細胞をマウス皮内に移植した。その後、腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を評価した。

が細胞に一過性の小孔を開け細胞膜の透過性を向上させることで細胞外の遺伝子が細胞内に導入される。最近では、この方法が体外からの超音波照射により目的組織にのみ薬物・遺伝子デリバリーを可能とする新たな DDS として期待されている。しかし、既存のマイクロバブルは直径 2 ~ 3  $\mu\text{m}$  であり形状的に大きく、遺伝子治療の臨床で要求される組織深部に到達することは困難であると考えられる。また、市販のマイクロバブルに対し標的指向性を付与するのも容易ではない。残念ながら多くの研究では、遺伝子送達に最適化されたバブルがないために仕方なく市販のマイクロバブルを使用しているのが現状である。したがって、これからは核酸医薬への応用をも見据えた新たなバブル製剤の開発が望まれる。そこで著者らは、前項までに述べたような

DDS キャリアーとしての可能性・安全性・汎用性の点で有用であると考えられるリポソームに着目し、リポソームを新たなバブル素材として利用するための研究を始めた。そして、超音波造影ガスを封入した新規リポソーム（バブルリポソーム）を開発することができた（図 4）。このバブルリポソームの粒子径は 400 ~ 950 nm であり、既存のマイクロバブルより小さいことが判明した。またこのバブルリポソームに超音波を照射したところバブルリポソームの崩壊が誘導され、様々な種類の培養細胞に遺伝子導入できることを確認している。本方法は超音波を照射したときのみ遺伝子導入が誘導されるため、*in vivo* 遺伝子導入において超音波照射部位をコントロールすることで超音波照射部位特異的な遺伝子導入が可能になると考えられる。そこで、バブルリポソームと超音波の併用による低侵襲的かつ組織特異的な遺伝子導入システムの確立を試みた。バブルリポソームとルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を尾静脈から全身投与後、直ちに肝臓に向けて体外から経皮的に超音波照射した。その 1 日後にマウスから各臓器を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、超音波照射した部位である肝臓において高いルシフェラーゼ発現が認められた（図 5）。このようにバブルリポソームとプラスミド DNA が血流を介して流れていたにも関わらず肝臓に遺伝子導入できたのは、バブルリポソームが超音波照射部位である肝臓部位で崩壊し同時に遺伝子を肝臓に導入したためであると考えられた。今回は示していな

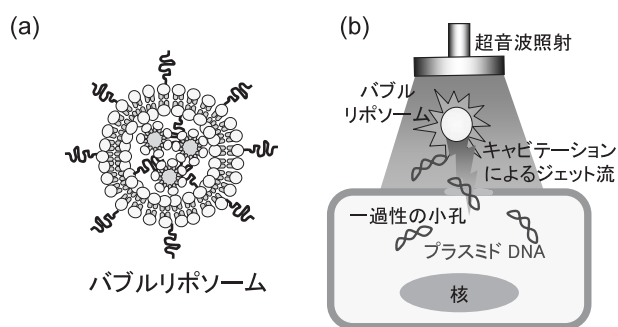


図 4 バブルリポソームを用いた遺伝子デリバリーメカニズム  
(a) バブルリポソームの模式図。  
(b) バブルリポソームと超音波の併用による細胞へのプラスミド DNA 導入メカニズム。

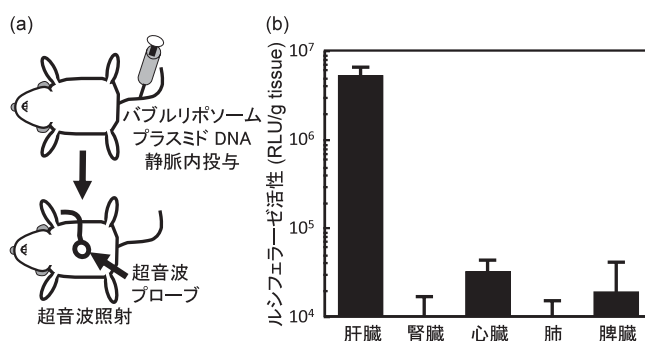


図 5 バブルリポソームと超音波の併用による肝臓への遺伝子導入  
(a) バブルリポソームと超音波を利用したマウス肝臓への遺伝子導入方法。バブルリポソーム (500  $\mu\text{g}$ ) とルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (100  $\mu\text{g}$ ) を ddY マウスに尾静脈内投与し、投与後速やかに体外から肝臓に向けて超音波照射 (1 MHz, 1 W/cm<sup>2</sup>, 1 分間) した。超音波照射 2 日後にマウスから各臓器を回収し、ルシフェラーゼ活性測定を行った。  
(b) バブルリポソームと超音波の併用により遺伝子導入したマウスにおける各組織での遺伝子発現。

いが、著者らは同様の方法を用い超音波照射部位を変更することで脾臓や脳へも遺伝子導入できることを確認している。今回示した方法は、超音波照射部位を変更するだけで様々な組織や部位に低侵襲的かつ特異的に遺伝子導入できる可能性を有しており、他の遺伝子導入ベクターにはない非常に簡便でユニークな特性をもつ方法であると言える。最近では、超音波照射部位を数 mm オーダーでコントロールできる集束超音波技術が開発されている。それゆえ、将来的には上述したようなリポソーム技術と超音波技術をうまく組み合わせることで低侵襲的かつがん組織特異的な遺伝子導入が可能となり、副作用の少ないがん遺伝子治療が確立できるものと期待される。

## 5. おわりに

以上、最近の著者らのリポソームに関する研究について紹介した。近年、リポソーム製剤が本邦においても認可されはじめ、DDS キャリアー開発におけるリポソーム技術が注目されている。本稿で示したようにリポソームは、薬物・抗原デリバリーキャリアーとしてばかりではなく、超音波との併用による遺伝子デリバリーツールとしても利用可能であることが明らかとなった。このように、リポソーム技術を駆使することで新たなコンセプトに基づいた DDS 戦略を構築できるものと考えられる。そこで現在著者は、このリポソーム技術を利用し、有効性が高く副作用の少ない最適ながん治療戦略の構築を

目指し研究を進めている。

最後に本研究の遂行にご指導賜りました帝京大学薬学部・丸山一雄先生、宇都口直樹先生、東京大学大学院工学系研究科・柳衛宏宣先生、京都大学大学院医学研究科・門脇則光先生、大阪大学大学院薬学研究科・岡田直貴先生、東京薬科大学薬学部・根岸洋一先生に深謝するとともに、研究にご協力いただいた学生諸子に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Kuwata, M. Mutoh, N. Ishiguro, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Eriguchi, H. Yanagie, K. Maruyama, Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome, *Int. J. Pharm.*, **346**, 143–150 (2008).
- 2) K. Kawamura, N. Kadowaki, R. Suzuki, S. Udagawa, S. Kasaoka, N. Utoguchi, T. Kitawaki, N. Sugimoto, N. Okada, K. Maruyama, T. Uchiyama, Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective antitumor immunity, *J. Immunother.*, **29**, 165–174 (2006).
- 3) R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, K. Hagiwara, K. Tanaka, K. Sawamura, N. Utoguchi, T. Nishio, K. Maruyama, Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound, *J. Control. Release*, **117**, 130–136 (2007).
- 4) R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, N. Utoguchi, K. Sawamura, K. Tanaka, E. Namai, Y. Oda, Y. Matsumura, K. Maruyama, Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer *in vivo* with novel liposomal bubbles, *J. Control. Release*, **125**, 137–144 (2008).