

《若手研究者紹介》



DDS の理想を追いかけて

清 水 広 介* Kosuke Shimizu

静岡県立大学薬学部医薬生命化学分野

1. 研究者誕生秘話

研究のゴールはどこにあるのか、ノーベル賞を取ることか、新しい薬を作り、多くの患者を救うことか。私が研究という言葉を知ったのは中学生の頃である。将来なりたい職業についてうまく書けず、どんな職業があるかと参考に見たパンフレットにあったイメージ図（色の付いた液体が入ったフラスコを持ち、白衣を着た人が立っている図）が自分の中で格好良かったため、そこに書いてあった科学者という言葉を書き写したことが始まりである。親にその話をすると「将来がんの特効薬を作れば、ノーベル賞を取れるよ」と言われ、研究とは何か新しいものを作る職業で、科学者はみんなノーベル賞を取りたいものなのかと思ったことを今でも覚えている。それから将来は“がんの特効薬を作る”という漠然かつ壮大な夢を冗談交じりで言うことが増えた。高校時代、祖父をがんで亡くし、自分の中で“がんはくやしい存在”という思いは強まった。時は過ぎ、大学受験。理系の学部を探し、実家から徒歩圏内という好条件にあった静岡県立大学薬学部を受験し合格。結果としてこれが、自分と薬学をつなぐ大きな出来事となった。学部生時代は難易度の高い講義内容に圧倒され、テスト前に徹夜ということも

多く、とりあえず目の前に置かれている状況を突破することが最優先であった。当然のことながらテスト後に残る知識も少なく、果たして自分が今何の勉強をしているのか、この知識が自分の将来にどう役立つのか、そういった疑問がまた自分に負のスパイラルを生み出し、もしかしたら薬学は自分にはハードルが高すぎたのではと思ったことも多々あった。当時は知ることはできなかったが、薬学の教育カリキュラムにおいてはそれら一つ一つが欠かすことなく重要であり、恥ずかしながら今となってももう一度一から勉強し直し、それらを深く理解したい気持ちさえある。

さて自分の中で研究という分野に足を踏み入れる大きな岐路となったのは、間違いなく研究室配属である。前述したとおり、焦りとプレッシャーに押しつぶされそうになっていた学部生時代、研究という言葉はいつの間にか自分の奥底にしまわれ、卒業後は薬剤師として病院か調剤薬局で働き、目の前に立つ患者一人一人と向き合い救うことが自分の役目かと思いついていた頃のことである。実際、研究というものの実体をつかめないまま研究室を選ぶ時期にはなってしまったが、自分が何をやりたいかと考えた時、そこにはやはりキーワードとして“がん”があったため、がん治療 DDS (Drug delivery system) を専門に研究する現所属教室である医薬生命化学教室（当時は放射薬品学教室）を希望した。余談ではあるが、ちょうどその頃、同教室現教授である奥直人先生の講義内容が自分にとってわかりやすく、この先生のもとでいろいろと指導を受ければ、自分の方向性が見つけられるかも知れないと勝手に決めつけていたことも要因の一つである。ただ、この物事

*2001年静岡県立大学薬学部卒。2005年同大学院薬学
研究科博士後期課程中退後、同大学助手（現助教）、博士（薬学）。研究領域：リポソーム DDS。研究モットー：
創造は想像から。趣味：音楽、キャンプ、スポーツ等
多数。清水エスパルスと広島カープのファン。ラーメンと晴れた日に芝生の上で飲むビールをこよなく愛する。連絡先：〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1
E-mail: kshimizu@u-shizuoka-ken.ac.jp

を決める時のフィーリングとそこから生み出せる可能性への信念は今でも大切にしている。幸運にも同研究室に配属が決まり、そこから DDS の魅力にとりつかれた研究者としての生活が始まった。

2. リポソーム DDS の可能性に魅了されて

私が研究室に配属後詳しい研究内容を決める際、がんは重要なキーワードであったが、実は DDS にも惹かれていた。特にターゲティングというのは、自分の興味を強くかき立てた。たぶんこれは自分の性格とマッチしていた部分が大いのではないかと考えている。というのも昔から競馬のゲームや宝くじといった娯楽に興味を持っており、ワンチャンスで大きなものをつかむ魅力というのが、DDS 研究にも垣間見えたからである。余談ではあるが競馬で財産を2倍にするというのは、幼少からの私の夢である。私は今でも、ターゲティング DDSこそ自分が思い描く理想の薬物治療戦略だと考えている。体の中に入った薬が、患部だけに送られて作用して効く。これこそ薬物送達の究極なのではないか。非常に魅力的である。

私とリポソームとの出会いは、研究室生活が始まってからである。当初、細胞内小器官であるリポソームのことかと思っていたくらい全くの無知であった。しかしこれに関しては、たぶん自分以外にもこの間違いをした人は少なくないのではと勝手に思っている。初めて与えられたテーマは新規抗がん剤のリポソーム化とがん治療に関する研究であった。分子標的治療薬がまだ上市されていなかった当時、細胞増殖を止めることによりがん細胞を殺傷する古典的な抗がん剤の開発も進められてはいたが、同時に副作用も強く、その開発は行き詰まりを見せている状況にあった。効く薬は無数にあるこの状況を打破するべく、日本においても脚光を浴びていたのがリポソームなどの薬物ナノキャリアを用いた DDS 治療戦略であった。当時欧米では既にかんを適用とした Doxil[®] (日本においては2007年に承認)などが承認されていたが、日本においてはリポソーム製剤すら上市に至っておらず(2003年の加齢黄斑変性症を適用とした Visudyne[®]が初)、抗がん剤封入リポソームの早期承認が期待されてはいたが、ドラッグラグなどの問題からなかなか進んでいなかった。リポソームは細胞膜と同じ脂質二重膜構造を基本構成

単位とし、球状をとったカプセルのようなものであり、擬似細胞型という点から、生体適合性の高さを最大限に生かした薬物キャリアと言っても過言ではない。またターゲティング能を付与することができるという点は、自分が見据える DDS 理想像に適合していた。“がんを狙い撃ちできる薬物キャリア”。なんとも頼もしい。私が初めて封入を試みた抗がん剤は、ドキソルビシンと同様に弱塩基性低分子化合物であったため、リポソーム内外の pH 勾配を利用したリモートローディング法による封入を試みた。化合物特性、膜特性を生かして薬物を封入するこの原理を知った時、なんて理にかなった封入方法なのだろう、こういったアイデアはどこから来るのだろうと思った。たとえそれがノーベル賞級の研究ではなかったとしても、自分にとって非常に印象深かったことを覚えている。そして何より自分にインパクトを与えたのは、リポソーム化した抗がん剤を用いて動物治療実験を行った時のことである。サンプルを投与することによって、固形がんが小さくなっていくことを目のあたりにし、ああこの何ともいえない驚きと発見が研究の醍醐味なのかと。今でも実験をしていて、どのような形であれポジティブデータが出た時の喜びと、小規模ながらも世界でこのデータを知っているのは自分ただ一人という優越感、その結果から広がる可能性の想像、これらの瞬間を大切にしている。結局この実験は、リポソーム化によって原薬の副作用を軽減できるという結論だけに留まり、革新的な開発までは行かず中断せざるを得なかったが、学術雑誌に掲載されるまで一通りできたため、いわゆる研究というものの一連の流れを知ることができた¹⁾。

自分にとって研究とは何なのか。説明することはなかなか難しい。しかしあえて言うのであれば、例えば非常に悪いかもしれないが、趣味に近い要素を含んでいると自分では思っている。病気に苦しむ患者を救うことを最大かつ最終の目標とし、生命を追求する仕事であるため、自己満足要素の多い遊びの趣味とは大きく異なるが、ある目的に向かって追求し、結果を出した時の達成感は似たものがあると考えられる。この達成感を味わいながら、さらなる高嶺を目指し精進していく日々。自分にとって研究は合っているのかもしれない。

3. 想像から創造へ

リボソームを用いた DDS で何がそしてどこまでできるか。私はよく勝手な妄想を抱く時がある。自分は決して知識が豊富というわけではないので、物事を整理・理解する時には頭の中でイメージすることが多い。それは机の前に座って遠くを眺めている時であったり、湯船に浸かって目を閉じている時であったり。こんなものがあったら便利だな、これを応用すればこんなことができるのでは。そんなことをよく考えている。もちろん想像から現実に戻って来た時には、論理的、物理的等々の理由により、現時点の自分に実現させることが難しいことを知らされるわけであるが、こういったイメージ作りから入るのは、自分の研究スタイルであり、大事なことだと思っている。研究の構成は非常にシンプルなものであり、シンプルであるがゆえに完成させるのが難しいものであると考えているわけだが、その初期段階の想像に関してはいくらでもできる。研究費もかからない。そんな私の想像から生まれた研究について一つ紹介させていただきたい。

がん細胞は正常細胞の DNA が異常となり、異常増殖・遠隔転移する能力を持つようになるわけであるが、そのがん細胞を取り囲む微小環境もまた、がんの増大に伴って変化し、正常組織とは異なった様相となっていることが知られている。なかでもよく知られているのはがん組織における異常な血管構築であり、がん細胞の密度が高くなるのに伴い、酸素や栄養素の供給ルートの確保として新生血管が誘導され、細胞増殖に好都合な環境を作り出している。その構造特性を逆手にとって、血管透過性が亢進したがん組織に粒子径 100 nm 程度の薬物ナノキャリアを Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) により受動標的化する手法や、血管新生阻害によるがん兵糧攻めもまたよく知られているがん治療戦略である。一方で 1990 年代後半からリンパ管検出の技術が発達し、新たなリンパ管の構築現象、リンパ管新生とがんのリンパ行性転移の関係について注目され始め、特に乳がんやメラノーマといったリンパ節転移しやすいがん種に関しては、がん組織に新生リンパ管が多数存在することが明らかとなった²⁾。リンパ管は元来、免疫担当細胞のリクルート経路のみならず、組織における膠質浸透圧の

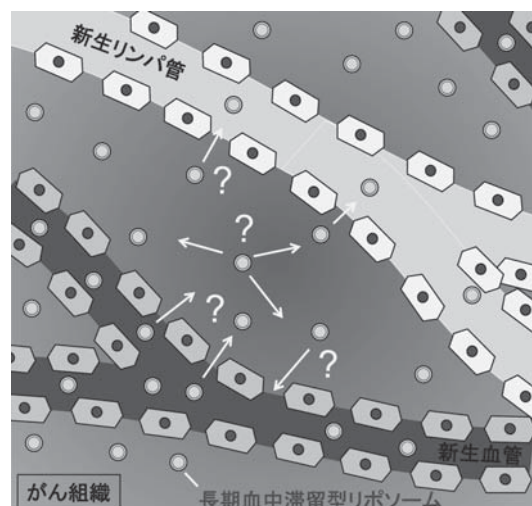


図1 リンパ管新生によるがん組織内のリボソームの挙動変化の仮説図

がん組織内に排除系であるリンパ管が多く存在することにより、がん組織に集積したリボソームの挙動、さらにはがん組織へのリボソーム集積そのものに変化が出てくる可能性がある。

調節の役割を担っているため、私はこの排除系であるリンパ管に着目し、古くからがん組織におけるリンパ管は未発達とされ、集積したリボソームが排除されにくく、それが EPR 効果における滞留効果の重要なファクターとされてきた背景を踏まえ、このようなリンパ行性転移を起こしやすいがん種に関しては、がん組織に集積したリボソームのその後の挙動、さらには集積性そのものに影響が出るのではと考えた (図 1)。ちょうど洗面台の排水溝に異常が生じた場合、蛇口から出てきた水がどうなるかを想像していただければ良い。きっと洗面器に溜まる水の量や挙動に変化が生じるであろう。それが抗がん剤を封入したリボソームであれば、その治療効果にも影響が及ぶのは間違いない。実際の実験としてはまず、リンパ管新生を誘導するがんのモデルを作製するために、リンパ管新生促進因子 VEGF-C (Vascular endothelial growth factor-C) の遺伝子をおがん細胞に導入し、VEGF-C 発現の高いがん細胞を選別した。この細胞を用いて固形がん担がんマウスを作製し、実際にリンパ管新生が促進されているか確認したところ、VEGF-C の発現のみならず、リンパ管上皮細胞のマーカである LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) の発現が有意に高くなっていることが確認された。この固形がん担がんマウスを腫瘍リンパ管新生誘導モデルとして

用い、実際に PEG (Polyethylene glycol) 修飾リポソーム尾静脈内投与後のリポソームの固形がんへの集積を比較したところ、がん組織中のリンパ管の密度によって、リポソームのがんへの集積に違いが生じることを明らかとした。また固形がんにおけるリポソームの分布について調べたところ、リンパ管が多く存在することによりリポソームのがんにおける分布が広範となるデータも得ることができた。本実験で得られた結果から、がんにおけるリンパ管新生により、リポソームのがん局所内の挙動に変化が生じ、結果としてリポソームの固形がんへの集積に変化がもたらされたと考察している。詳細データについては本誌においては割愛させていただくが、論文化に向け準備を進めているので、掲載された際にご覧いただけたら幸いである。今後はこの集積の違いが治療効果にどう結びつくか追求し、抗がん剤封入リポソームを用いたがん治療において、より効率的な治療方法を発案していきたい。

4. 新しいターゲティング概念の実用化に向けて

ターゲティング DDS を理想に近づけるための一つのファクターとして、用いる標的化プローブの特異性がある。特異性が高ければ高いほど、標的となる細胞または臓器への送達効率が良くなるのは言うまでもない。研究段階ではあるが、現在標的化プローブとして用いられているものには、抗体を含めたタンパク質、機能性ペプチド、糖鎖、低分子化合物などがあり、標的となる細胞に多く発現する分子を特異的に認識することで、薬物キャリアや薬物そのものの送達を向上させることが可能となる。このようなタイプのターゲティングはしばしばアクティブターゲティングと呼ばれており、実用化に向け新たな標的分子またはプローブ分子の探索が盛んに行われている。私も以前から、新生血管内皮細胞を標的とするペプチドやがん細胞上に発現した分子に対する抗体をリポソームの標的化プローブとして用い、抗がん剤をそれらの細胞に送達することで強く障害し、がん治療効果改善を目指す研究に取り組んできた³⁾。

一方、生体内における分子間の特異的相互作用の代表格として抗原抗体反応があり、抗体による抗原への反応特異性が自己・非自己を決定し、自身を内因性および外因性の異物から守っている。また時と

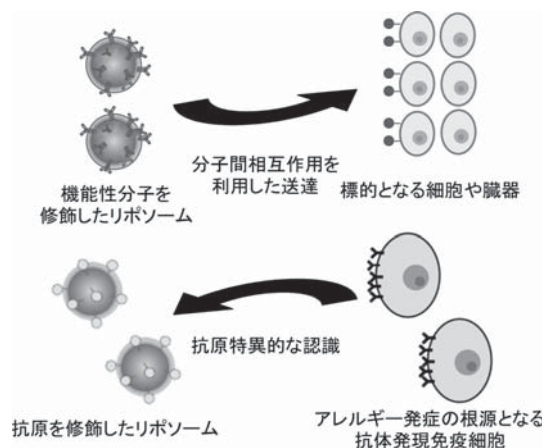


図2 標的化と逆標的化の違い

従来の標的化 (上段) は、抗体等の機能性分子を表面修飾したリポソームを、標的となる細胞や臓器に送達する戦略であるのに対し、逆標的化 (下段) は、抗原となる分子をリポソーム表面に修飾することで、抗原特異的な抗体を細胞膜表面に発現する免疫細胞群に認識させる手法である。リポソームがいわゆる“罠 (おとり)”となることで、内封する薬物をそれらの細胞群に特異的に作用させることができる。

してこの反応がアレルギー反応を引き起こし、花粉症や重篤な自己免疫疾患を引き起こすことも知られている。私の研究室ではアレルギー発症メカニズムにおいて、B細胞などの免疫細胞群がアレルギー反応を引き起こす抗体を分泌する際、細胞膜表面に発現する抗体を介してその抗原を特異的に認識する過程を経る点に着目し、発症の根源となる抗原を表面修飾したリポソームを投与することにより、これらの細胞群にリポソームを認識させ、さらに内封する細胞障害性薬物により特異的に殺傷できれば、アレルギーの発症を元から絶つことができ、根治療法につながるという新たな標的化治療戦略を提唱してきた。前述のように抗体などを標的化プローブとして用い、標的細胞に能動的にキャリアを送達するのではなく、抗原を表面に修飾することで免疫細胞群に認識させるこの標的化戦略を当研究室では逆標的化 (リバースターゲティング, Reverse targeting) と呼んでいる (図2)。ちょうど免疫細胞に対し、抗原修飾リポソームが“罠 (おとり)”となり、内封する薬物によりそれらの細胞が殺傷される構図である (図3)。この概念を導入するにあたり、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、OVA修飾リポソームの免疫細胞への認識について検討を行ったところ、OVA修飾リポソームが抗OVA抗体に特異的に結合することを明らかとし、OVAで事前に感作した

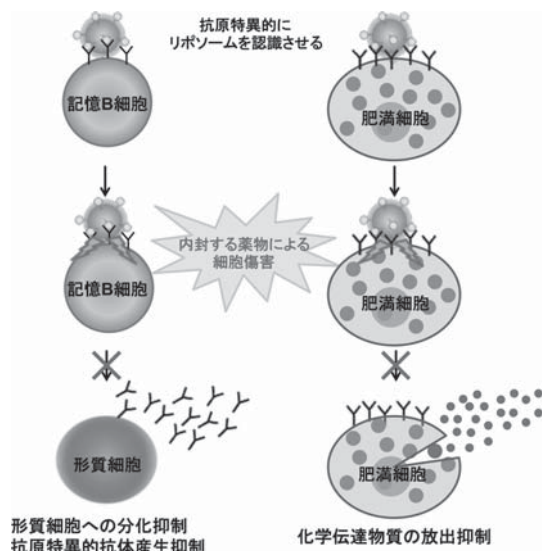


図3 逆標的化を利用したアレルギー疾患治療の概念図
アレルギー発症の抗原となる分子を修飾したリポソームは、その特異的抗体を細胞表面に発現する記憶B細胞や肥満細胞に認識され、内封する薬物によりそれら細胞群に致死的障害を与えることができる。これによりその後のアレルギー反応を抑えるだけでなく、アレルギー発症そのものを長期的に抑えることが可能となる。

マウスにおけるOVA特異的抗体の抗体価が、OVA修飾リポソーム尾静脈内投与後に有意に上昇することも明らかとした⁴⁾。また全身免疫を司る臓器である脾臓へのリポソームの集積が、OVAの表面修飾により有意に高くなり、脾臓内の分布についてはB細胞集団と共局在していることも同時に確認された。さらに細胞障害性のモデル薬物としてドキソルビシン(DOX)を用い、DOXを内封したOVA修飾リポソームをOVA感作マウスに投与したところ、その後の追加免疫におけるOVA特異的抗体の血中抗体価の上昇が、有意に抑制されることが明らかとなった⁵⁾。これらの結果より、抗原となるタンパク質を標的化プローブとして用いることで、その抗原を特異的に認識する免疫細胞群へと薬物キャリアを送達でき、さらに内封する薬物によりその細胞群における免疫反応も強く抑制できたことが示唆された。この逆標的化戦略の最大の利点は、何と云っても標的の特異性である。抗原に対する抗体の認識特異性が、薬物の送達特異性を決定しているため標的の特異性は極めて高く、他の免疫反応にも影響が少ないことが予想される。さらに修飾する抗原となるタンパク質を換えることで、理論上抗原が特定されている多く

のアレルギー疾患、自己免疫疾患治療への応用も可能である。現在花粉症を含め、他のアレルギー疾患に対する検討を行っている。もちろん実用化へは多くの課題が残されているが、いつかアレルギー疾患の根治が実現できるように、本治療戦略の有効性、有用性など多く情報を発信していきたい。

今回、若手研究者紹介として本稿を執筆する機会を与えていただき、大変感謝致しております。これまで自分が歩んできた研究者としての道のり、研究理念、研究内容、さらには私自身を広く知っていただいた上で、今後また多くの方からご指導、ご鞭撻、ご支援がいただけたらと思います。まだまだ研究者として力不足なところは多くありますが、いつか自分が夢見た理想のDDSを実現するその日まで、いろいろなことに挑戦していきたいと思います。これからもどうぞよろしくお願いいたします。

最後に私が研究者として現在に至るまで、奥直人教授を含めた静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室のメンバーを始め、多くの方々にご指導、ご支援を賜りました。末筆ながらこの場を借りて深く感謝いたします。

引用文献

- 1) K. Shimizu, M. Takada, T. Asai, K. Irimura, K. Baba, N. Oku, Potential usage of liposomal 4β-aminoalkyl-4'-O-demethyl-4-desoxy podophyllotoxin (TOP-53) for cancer chemotherapy, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 783-786 (2002).
- 2) M. Skobe, T. Hawighorst, D. G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey, M. Detmar, Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis, *Nat. Med.*, **7**, 192-198 (2001).
- 3) K. Shimizu, T. Asai, N. Oku, Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach, *Expert Opin. Ther. Targets*, **9**, 63-76 (2005).
- 4) K. Ichikawa, T. Urakami, S. Yonezawa, H. Miyauchi, K. Shimizu, T. Asai, N. Oku, Enhanced desensitization efficacy by liposomal conjugation of a specific antigen, *Int. J. Pharm.*, **336**, 391-395 (2007).
- 5) K. Ichikawa, T. Asai, K. Shimizu, S. Yonezawa, T. Urakami, H. Miyauchi, H. Kawashima, T. Ishida, H. Kiwada, N. Oku, Suppression of immune response by antigen-modified liposomes encapsulating model agents: A novel strategy for the treatment of allergy, *J. Control. Release* (2013) in press.