

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890258

研究課題名（和文）多剤耐性癌の克服を目指した新規機能性リポソームの開発

研究課題名（英文）Development of liposome for treatment of multidrug-resistant cancer

研究代表者

跡部 一孝（ATOBE KAZUTAKA）

徳島文理大学 香川薬学部 助教

研究者番号：00454885

研究成果の概要：

抗癌剤が効きにくい癌（薬剤耐性癌）を克服することは、現在の癌治療における非常に重要な課題である。本研究は、薬剤耐性癌にだけ薬を送ることで、抗癌剤の効果を高め、かつ抗癌剤投与でおこる副作用を軽減する目的で行った研究である。本研究では薬を運ぶ容器として、細胞と同じ成分でできた微小なカプセル（リポソーム）を用い、癌細胞だけでなく薬剤耐性癌細胞にも十分な効果を持つことを明らかとした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：DDS、薬物治療

## 1. 研究開始当初の背景

癌研究において、新生血管阻害療法が着目され、広く研究されている。新生血管阻害療法とは、癌新生血管内皮細胞を標的とし新生血管形成を選択的に阻害することで、癌への栄養供給を遮断し、癌組織の増殖抑制（休眠療法）や癌組織の退縮を期待するものである。近年の薬物送達キャリアーの研究もこの点を踏まえ、血管内皮細胞を標的としたキャリアーの開発が行われている。

これまでの研究において、抗癌剤を封入したリポソームを用いてモデル動物の治療を行った際、一度癌の消失が確認された動物に

おいて、2～3ヵ月後に同一部位に癌組織の再増殖が認められることを確認した。このことは近年話題になってきている「癌幹細胞（もしくは癌幹細胞様細胞）」が関与することによって引き起こされたと考えられた。「癌幹細胞様細胞」とは、幹細胞の特徴と強い発癌性を持ち、幹細胞や耐性癌細胞同様に多剤排出トランスポーターを高発現しているという特徴を持つ癌細胞である。またその発癌性は通常の癌細胞と異なり、少ない細胞数において発癌する能力を持つと考えられている。すなわち現在行われている癌治療において、血管新生阻害や癌細胞そのも

のを標的とするだけでは、癌細胞の増殖を抑え、また完治したようにみえても、癌幹細胞様細胞が生き残ることで癌の再発が生じると考えられる。

また、リポソーム製剤は生体内投与後 EPR 効果によって癌組織に集積し、細胞内および細胞間隙において封入した薬物を徐々に放出することで、癌組織の退縮を引き起こすと考えられている。しかし一方で、この緩やかな薬物の放出は逆に薬物に対する感受性を低下させ、癌細胞の多剤耐性化を引き起こす可能性が考えられている。

## 2. 研究の目的

1. 研究背景に挙げた問題を解決する手段の1つとして、リポソームが癌組織内の細胞間隙や細胞内に内在化した後、速やかに内封薬物を放出できるシステムを構築することが必要であると考えた。このシステムを構築することができれば、癌細胞の多剤耐性化を引き起こすことなく、また一気に内封薬物を放出することによって一時的に多剤排出トランスポーターの働きを飽和させ、細胞内の薬物濃度を高くできることで、すでに耐性化している癌細胞に関しても十分な抗腫瘍効果を得ることができる。

そこで本研究課題では「細胞内でのリポソーム内封薬物の放出性の制御」および「多剤耐性癌細胞の克服」に焦点をあて、より効果的かつ、副作用の軽減できる抗がん剤封入 pH 感受性ポリエチレングリコール(pH-PEG)修飾カチオニックリポソームの開発を目的とした。

本リポソームは生体内に投与されると、抗がん剤自体の、また抗がん剤を封入したリポソームによって生じる副作用を軽減し、癌の耐性化の抑制、および耐性癌に対して効果を発揮し、また癌の再発予防を達成しうる革新的な DDS である。本 DDS は、癌細胞がリポソームを取り込んだ後、エンドソームの pH 変化に伴いリポソーム表面の PEG が切断され、それによって現れるカチオニック脂質によってリポソームがエンドソームもしくはライソゾーム膜と融合することで、速やかに内封抗がん剤を細胞内に放出できるよう設計されている。したがって、本リポソームは高い抗腫瘍効果を発揮するだけでなく、癌の耐性化をも阻止する。さらに本システムは耐性癌の克服を目的としているため、同様に多剤排出トランスポーターである P 糖タンパク (P-gp) を発現している「癌幹細胞様細胞」についても高い殺細胞効果を期待できるものであるため、癌の再発を予防できる。

## 3. 研究の方法

### (1) リポソームの調製

各種リポソームは、薄膜振盪法 (Bangham 法) により調製した。使用する脂質としては、膜流動性の高い脂質として EPC を、膜流動性の低い脂質として HSPC を用いた。脂質組成は、HSPC or EPC : Chol : DOTAP = 1.49~1.34 : 1.00 : 0.0~0.15 (mol 比) とし、extrusion 法により粒子径を約 100nm に調製し実験に用いた。

リポソームへの抗癌剤ドキシソルピシン (DXR) の封入は、硫酸アンモニウム勾配法を用いて、脂質 (HSPC or EPC + DOTAP) : DXR = 1.0 : 0.2 (重量比) となるように添加した。未封入の DXR はゲルろ過法を用いて取り除き実験に使用した。

### (2) 細胞への殺細胞効果の検討

抗癌剤 DXR に対する感受性の高い癌細胞としてヒト線維肉腫細胞 (HT-1080)、感受性の低い癌細胞として膠芽細胞腫 (T98G) を用い検討を行った。

各種細胞をプレートに播種、24 時間後リポソーム封入、未封入状態の DXR を 1~24 時間添加し、47~95 時間後の細胞生存率を MTT Assay 法をもちいて検討した。

### (3) 細胞への DXR およびリポソームの集積の検討

HT-1080 細胞および T98G 細胞へのリポソーム封入、未封入の DXR 蓄積量をフローサイトメーターおよび蛍光光度計を用いて検討を行った。

また、リポソームそのものについても、蛍光色素でラベル化したリポソームを用いて、フローサイトメーターおよび蛍光光度計を用いて検討を行った。

### (4) リポソームの細胞内動態に関する検討

HT-1080 細胞および T98G 細胞でのリポソームの細胞内動態を、DXR または蛍光色素カルセインを封入したリポソームを用い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

また、細胞内の集積部位を検討するため、lysosome を選択的に染色する LysoTracker などの細胞内器官を特異的に染色できる蛍光マーカーを用いて検討を行った。

### (5) 細胞へのリポソームの内在化経路の検討

細胞へのリポソームの内在化経路を検討するため、クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤、カベオラ経路阻害剤存在下でのリポソームを添加し、封入されている DXR の蛍光を測定することで検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) リポソームの物性について

各種リポソームの平均粒子径は、約 95nm であり、カチオン脂質の含有量およびドキソルピシン封入の有無による違いは認められなかった。また、リポソームの表面電荷（ゼータ電位）は、カチオン脂質含有量 1% から正電荷に傾き、カチオン脂質含量の増加に従って増加することが明らかとなった。（表 1）

表 1. リポソームの粒子径およびゼータ電位

Liposome Formulation (mol / mol)	Size (nm)	ζ potential (mV)
EPC : Chol : DOTAP 1.34 : 1.00 : 0.15 (10% cation - EPC)	95.8 ± 2.3	45.8 ± 1.6
EPC : Chol : DOTAP 1.49 : 1.00 : 0.00 (0% cation - EPC)	89.6 ± 2.3	-16.9 ± 1.8
HSPC : Chol : DOTAP 1.34 : 1.00 : 0.15 (10% cation - HSPC)	90.7 ± 3.5	40.2 ± 2.5
HSPC : Chol : DOTAP 1.49 : 1.00 : 0.00 (0% cation - HSPC)	97.8 ± 7.0	-15.5 ± 3.4

##### (2) 細胞への結合性の検討

調製したリポソームの細胞への結合性を調べたところ、リポソームは DOTAP の含量に依存して結合量の増加が認め、10% カチオン脂質を含有するリポソームは、カチオン脂質を含まないリポソームに比べ、37°C の条件下で約 33 倍の結合を示すことが明らかとなった。また、リポソームの結合量は時間依存的に増加し、カチオン脂質を含有するリポソームと比べ、最大で 26 倍高い結合を示した。（図 1）

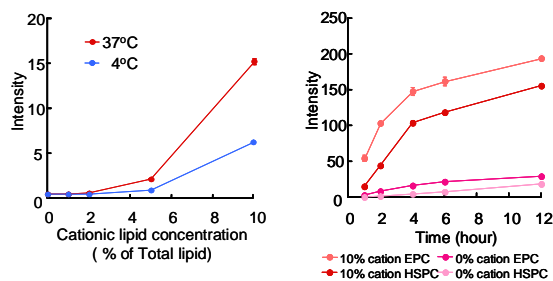


図 1. HT-1080 細胞への DXR 送達量

蛍光顕微鏡での観察の結果、リポソーム曝露 1 時間（図 2）では、カチオンリポソームは細胞表面に結合しているのがほとんどであるのに対し、曝露 24 時間（図 3）では、細胞内に内在化していることが明らかとなった。

また、カチオン脂質を含有することにより、細胞への結合性が増加することが視覚的に確認できた。

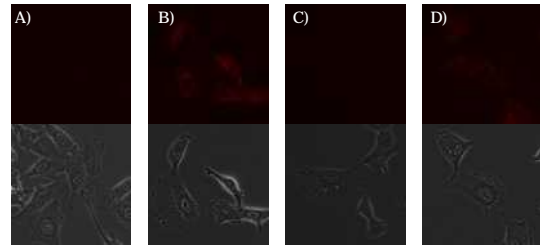


図 2. リポソーム 1 時間接触直後の顕微鏡画像  
A) 0% HSPC, B) 10% HSPC, C) 0% EPC, D) 10% EPC

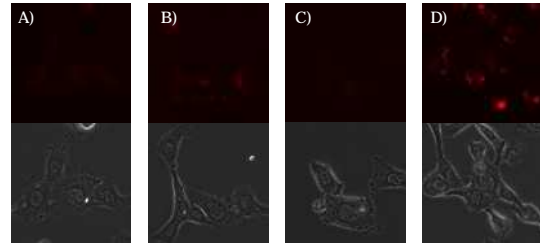


図 3. リポソーム 24 時間接触後の顕微鏡画像  
A) 0% HSPC, B) 10% HSPC, C) 0% EPC, D) 10% EPC

##### (3) HT-1080 細胞への殺細胞効果の検討

DXR 封入リポソームの殺細胞効果について検討を行った。

カチオンリポソームは(10% cation EPC, HSPC)、カチオン脂質を含まないリポソーム(0% cation EPC, HSPC)に比べ、それぞれ 25 倍、5 倍以上の非常に高い殺細胞効果を持つことが明らかとなった。10% cation HSPC は、48 時間培養に比べ 72 時間培養した方が高い殺細胞効果を示すことから、内在化後の薬物の放出は緩やかな放出であると考えられる。一方で、10% cation EPC は、48 時間培養時から Free DXR とほぼ同程度の殺細胞効果を示したことから、内在化後、速やかに内封薬物が放出されていると考えられ、非常に有用なリポソームであると考えられる。（表 2）

また、DXR を封入していない空のリポソームによる細胞毒性は全く認められなかった。

表 2. DXR 封入リポソームによる殺細胞効果

Liposome Formulation (mol / mol)	IC <sub>50</sub> (μM)	
	48 hr	72 hr
Free DXR	1.46 ± 0.39	0.29 ± 0.20
10% cation - EPC	7.12 ± 2.55	3.55 ± 1.77
0% cation - EPC	176.95 ± 25.39	39.04 ± 14.83
10% cation - HSPC	60.58 ± 1.52	8.20 ± 2.59
0% cation - HSPC	> 300	> 300

#### (4) 細胞内での薬物放出の検討

カルセインを封入したリポソームを用いて、細胞内での薬物の放出について検討を行った。(図4)

10% cation EPC は1時間曝露直後から細胞内に比較的強い蛍光が認められたのに対し、10% cation HSPC はほとんど蛍光が認められなかった。(図4-A,C) また、曝露終了24時間経過後もほぼ同様であった。(図4-E,G)

この結果から、カチオン脂質を含み、かつ膜流動性の高いリポソームの方が細胞膜もしくはエンドソーム膜と融合しやすく、細胞内により速く薬物を放出できるためであると考えられる。

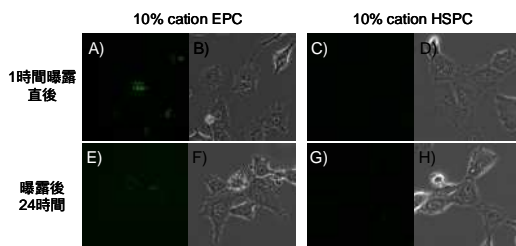


図4.カルセイン封入リポソームによる細胞内薬物放出

#### (5) 細胞内での薬物放出の検討

DXR を封入した 10%カチオン脂質を含むリポソームを用いて、細胞内への取り込み経路について検討を行ったところ、カチオニックリポソームはカベオラ依存的な経路と、クラスリン依存的な経路を通して内在化することが明らかとなった。またその寄与はカベオラ依存的な経路によるところが大きかった。

#### (6) まとめ

抗癌剤ドキソルピシンを封入したカチオニックリポソームは、DOTAP(カチオン脂質)量の増加に依存して、HT-1080 細胞およびT98G 細胞への高い親和性を示した。細胞へのドキソルピシン送達量は時間依存的に増加し、その取り込み量はカチオン脂質を含まないリポソームに比べ、非常に高いものであった。

また、膜流動性の高いEPCで調製したリポソームは、細胞内に内在化する過程、もしくは内在化後比較的速やかに内封する薬物を細胞質内に放出することが明らかとなった。

これらの結果より、カチオン脂質を含み、かつ膜流動性の高い脂質で形成したリポソームは細胞内への内在化後、速やかに薬物を放出することができるため、高い抗腫瘍効果を持つということが明らかとなった。

さらに、本カチオニックリポソームは、薬

剤耐性癌細胞に対しても、効果があることが明らかとなった。このことは、薬剤耐性癌の克服に非常に有用な効果をはっきりと考えられる。

さらに、カチオニックリポソームは、癌新生血管に選択的に集積することが多数報告されている。一方で、癌新生血管細胞は、薬剤に対して耐性を持つという報告も存在する。本カチオニックリポソームは、耐性癌細胞へも効果が認められたことから、現在報告されているカチオニックリポソームよりもより高い効腫瘍効果を期待できると考えられる。今後、in vivoの実験系を用いて、更なる検討を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1件)

発表者：跡部 一孝

発表タイトル：細胞内での速やかな薬物放出を目指したカチオニックリポソームの開発

学会名：日本薬剤学会第24年会

発表年月日：2009年5月21日

発表場所：静岡

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

跡部 一孝

徳島文理大学・香川薬学部・助教

研究者番号：00454885

##### (2) 研究協力者

加藤 善久

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：90161132

尾熊 隆嘉

徳島文理大学・香川薬学部・教授