

氏名（本籍）	川 野 久 美	（神奈川県）
学 位 の 種 類	博士（薬学）	
学 位 記 番 号	甲第90号	
学位授与年月日	平成15年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Liver-targeting of liposomes modified with β -sitosterol glucoside for cancer chemotherapy	
論文審査委員	主 査	教 授 米 谷 芳 枝
	副 査	教 授 瀬 山 義 幸
	副 査	教 授 辻 勉

論文内容の要旨

初めに

近年、優れた抗癌剤の開発により、化学療法による癌の治療効果は高まってきた。しかし、抗癌剤は一般に有効濃度と副作用発現濃度が近いために、有害反応の発現頻度が高く、有効量の薬物を投与するのは困難である。そこで、抗癌剤のターゲティング療法は、指向性を有する担体により癌局所に薬物を送達して治療効果を高め、正常組織への薬物分布を抑制して副作用を軽減する方法として期待されている。これには、種々の薬物担体が研究されているが、中でもリポソームはリン脂質の二重膜からなる閉鎖小胞で、生分解性であり、生体適合性が高く、安全性の高い優れた薬物担体として知られている。さらにリポソームは、種々の薬物を内封でき、脂質組成を変えることにより機能性を与えたり、表面修飾などで指向性を付与することが比較的容易であることから、応用性の高いターゲティング担体として注目されている。

これまでに、抗癌剤ドキソルビシン（DXR）を大豆由来ステロールグルコシド（SG）で修飾したリポソーム（SG リポソーム）に封入した製剤は、肝癌モデル動物に静脈内投与すると高い治療効果を示したと報告されているが、その機構は明らかになっていない。また、SG とその主成分である β -シトステロールグルコシド（Sit-G）は、鼻粘膜の薬物吸収促進剤として有効であることも報告されている。肝実質細胞にはガラクトース残基を認識するアシアロ糖タンパクレセ

プター (ASGP-R) が局在している。そこで本研究では、ASGP-R を発現している肝癌由来 HepG2 細胞を用いて、SG リポソームの肝細胞取り込み機構と Sit-G の肝細胞に対する影響を調べ、SG リポソームの肝実質細胞への薬物担体としての有効性を検討した。また、DXR よりさらに高い肝癌治療効果を得るために、DXR の誘導体で抗腫瘍効果が高いピラルピシン(THP)の Sit-G 修飾リポソーム(Sit-G リポソーム)化を目指し、THP 封入 Sit-G リポソーム (L-THP)の調製および、その体内動態と抗腫瘍効果を検討した。

1. SG リポソームによる肝薬物送達

DXR 封入 SG リポソームはマウスに静脈内投与すると、肝臓に DXR を高く集積させた。このように、グルコース残基を有する SG リポソームの肝臓での取り込み機構を明らかにするために、SG リポソームに封入した蛍光標識体および DXR の HepG2 細胞による取り込みを、ASGP-R のリガンドであるアシアロフェツイン (AF) の共存下で調べた。

リポソームの脂質膜部分を脂溶性蛍光物質 (DiI) で標識した DiI 標識 SG リポソームは、4℃に比べ 37℃のインキュベーションにおいて高い取り込みを示し、AF の共存下では抑制された。また、負電荷を有し、細胞にほとんど取り込まれない粒子径 50nm の蛍光標識ポリスチレン粒子 (Fluoresbrite) は、SG リポソーム化することによって 37℃で取り込まれ、AF の共存下でこの取り込みは抑制された。しかし、DXR 封入 SG リポソームの DXR は、37℃で細胞に取り込まれたが、AF による取り込みの抑制に有意差は見られなかった。これは、リポソームから遊離した DXR がリポソーム化した DXR に比べ細胞によって取り込まれやすいため、AF の影響が見られなかったと推察した。これらの結果から、SG リポソームは肝細胞の ASGP-R により取り込まれることが示唆された。SG リポソームはガラクトース残基修飾薬物担体と同様に、肝臓への薬物ターゲティングに有効な担体であることを明らかにした。

2. Sit-G の肝細胞における薬物透過促進

SG や Sit-G は薬物の粘膜吸収促進剤として報告されていることや、リポソ-

ムは、静脈内投与後肝臓のクッパー細胞やマクロファージといった細網内皮系に取り込まれて分解されることから、Sit-G の肝細胞への直接的影響を調べた。生体分子間相互作用解析装置 (IASys) による測定結果から、Sit-G は HeLa 細胞に比べ HepG2 細胞に高い親和性を有することを明らかにした。さらに、モデル薬物である FITC-デキストラン 4,400 (FD-4) 溶液に Sit-G を添加して HepG2 細胞とインキュベーションすると、FD-4 の取り込みは、インキュベーション時間、Sit-G の添加濃度、細胞内に取り込まれた Sit-G 量の増加と共に上昇した。よって Sit-G は細胞膜に分布することにより流動性を増加させ、薬物の透過を促進させると推察した。これらの結果から、Sit-G は肝指向性を有するリガンドとして薬物送達に有効であるのみならず、肝細胞の近傍で Sit-G がリポソームにより送達した薬物の透過を促進する可能性が示唆された。

3. ピラルビシン封入 Sit-G リポソームの調製とその体内動態・抗腫瘍効果

癌化している肝実質細胞へ高濃度で抗癌剤を送達するためには、肝シヌソイドの間隙を通過できる約 $0.4\mu\text{m}$ 以下の粒子径とし、高い薬物封入率の Sit-G リポソームが必要である。脱水復水法は薬物の性質によらず封入できるリポソーム調製法であるが、粒子径が大きくなるため蔗糖を用いてこれを防ぎ、また、THP の封入率を高めるためにオレイン酸を添加して負電荷リポソームにした。THP 封入 Sit-G リポソーム (L-THP) の体内動態と抗腫瘍効果を M5076 転移肝癌マウスで調べた。L-THP の投与では THP 溶液に比べて、約 4 倍の THP が肝臓に集積し、副作用の発現する心臓や他の正常組織への薬物移行を抑制した。また、L-THP 投与群では THP 溶液投与群に比べ生存日数が延長し、延命率 42.9%となり、DXR 封入 SG リポソームの延命率 27.3%より向上した。これらの結果から、脱水復水法は、静脈内投与用リポソームの調製を可能にすること、また、THP を Sit-G リポソームに封入することにより、肝癌へ薬物を送達して抗腫瘍効果を高め、副作用の発現を減少できることが示された。

まとめ

DXR 封入 SG リポソームは静脈内投与すると DXR を肝臓に集積させ、肝癌治療

効果を示す。この機構を HepG2 細胞を用いて検討したところ、SG リポソームは ASGP-R を介して取り込まれることが推察された。また、SG の主成分である Sit-G は、肝細胞への親和性を有し、薬物の透過を促進する可能性が示唆された。さらに肝癌の治療効果を高めるために、DXR の誘導体である THP を封入した Sit-G リポソームを脱水復水法によって調製した。リポソーム化した THP は肝臓に集積し、副作用を軽減することにより、肝癌マウスにおいて DXR 封入リポソームより高い抗腫瘍効果を示した。よって、Sit-G リポソームは肝癌に抗癌剤を有効に送達することが明らかになった。以上より、Sit-G リポソームは、肝臓に選択的に薬物を送達する担体であり、肝へのターゲティング用薬物送達システムとして有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

抗癌剤は一般に、有効濃度と副作用発現濃度が近接しているために、有害反応の発現頻度が高く、有効量の薬物を投与することが困難である。そのため、抗癌剤のターゲティング療法は、指向性を有する担体により癌局所に薬物を送達して治療効果を高め、正常組織への薬物分布を抑制して副作用を軽減する方法として期待されている。種々の薬物担体が用いられるが、中でもリポソームはリン脂質の二重膜からなる閉鎖小胞で、生分解性であり、生体適合性が高く、安全性の高い優れた薬物担体として知られている。さらにリポソームは、種々の薬物を内封でき、脂質組成を変えることにより機能性を与えたり、表面修飾などで指向性を付与することが比較的容易であることから、応用性の高いターゲティング担体として注目されている。

本研究では、肝指向性が報告されている大豆由来ステロールグルコシド(SG)修飾リポソーム(SGリポソーム)の肝薬物送達機構を検討し、またSGの主成分である β -シトステロールグルコシド(Sit-G)の薬物透過促進効果について検討した。さらに、Sit-G修飾リポソームに抗癌剤ピラルビシン(THP)を封入し、その肝癌治療効果について検討した。以下にその結果を要約する。

リポソーム表面にグルコース残基を有するSGリポソームの肝細胞における取り込み機構として、肝実質細胞に局在し、ガラクトース残基を認識するアシアロ糖タンパクレセプター(ASGP-R)の関与を検討した。ヒト肝癌由来HepG2細胞によるSGリポソームの取り込みは、ASGP-Rのリガンドであるアシアロフェツインの共存で抑制されることから、SGリポソームの肝細胞での取り込みはASGP-Rを介したものであることが示された。

また、SGやSit-Gには薬物透過促進効果が報告されている。そこでFITC-デキストラン4,400(FD-4)溶液にSit-Gを添加してHepG2細胞とインキュベーションすると、モデル薬物であるFD-4の取り込みは、インキュベーション時間、Sit-Gの添加濃度、細胞内に取り込まれたSit-G量の増加と共に上昇した。よってSit-Gは細胞膜に分布することにより流動性を増加させ、薬物の透過を促進させることが示唆された。これらの結果から、Sit-Gは肝指向性を有するリガンドとして効果的な薬物送達を可能にするとともに、リポソームにより肝細胞の近傍へ送達された薬物の透過を促進する可能性が示された。

肝癌治療に用いる薬物担体は、十分量の薬物を保持しながら、肝シヌソイドの間隙を通過できる粒子径にする必要がある。そのため、THP封入Sit-Gリポ

ソーム (L-THP) の調製に脱水復水法を用い、さらに改良を加えることにより肝実質細胞に薬物送達可能な粒子径と、高い薬物封入率を有するL-THPを調製した。このL-THPはTHP溶液に比べ肝臓に高く薬物を集積させることにより、M5076転移肝癌マウスにおいて生存日数を延長した。

以上のように、本研究では、SGおよびSit-G修飾リポソームの肝薬物送達機構が明らかにされ、肝薬物送達担体としての有用性が示されるとともに、抗癌剤THPの肝送達を可能にした。また、本論文は、Sit-Gリポソームを用いて肝癌治療を行う上で基盤となる有益な知見が得られている。よって、博士の学位を授与するに相応しいものと判定した。